

REKONSTRUKTION, ANALYSE UND VISUALISIERUNG
PFLANZENBIOLOGISCHER STOFFWECHSELPROZESSE

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Agrar- und Ernährungswissenschaften,
Geowissenschaften und Informatik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Frau Grafahrend-Belau, Eva
Geb. am 22.12.1974 in Freiburg i. Br.

Eva Grafahrend-Belau: *Rekonstruktion, Analyse und Visualisierung pflanzenbiologischer Stoffwechselprozesse*, September 2012

GUTACHTER:

Prof. Dr. Falk Schreiber

Prof. Dr. Stefan Schuster

VERTEIDIGUNG AM: 10.10.2013

Für Maya und Hannah

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Falk Schreiber, der mir die Möglichkeit bot, diese Arbeit trotz Babypausen zu schreiben und zu beenden. Für seinen Rat und Zuspruch, sowie für die ununterbrochene Unterstützung möchte ich mich herzlich bedanken.

Ebenso gebührt mein Dank Prof. Dr. Stefan Schuster für die Unterstützung und Begutachtung der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Ina Koch und Prof. Dr. Björn H. Junker für die Motivation und Unterstützung, sowie die sehr gute Einführung in das Gebiet der mathematischen Modellierung.

Für die anregenden Diskussionen, interessanten Anwendungsfälle und die unterstützende Zusammenarbeit möchte ich mich bei Dr. Ljudmilla Borisjuk und PD. Dr. Hardy Rolletschek bedanken.

Der Arbeitsgruppe Pflanzeninformatik, Prof. Dr. Dirk Koschützki, Dr. Rainer Pielot und Dr. Marc Strickert danke ich für die moralische, fachliche und technische Unterstützung, sowie die vielen fachlichen und nicht-fachlichen Diskussionen.

Für das Korrekturlesen der Arbeit danke ich Dr. Ulrike Lohwasser, Dr. Astrid Junker und meiner Familie.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, meinem Lebensgefährten Stefan Vogel und meinen Töchtern Hannah und Maya für ihre Unterstützung und Zuneigung.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINFÜHRUNG	1
1.1	Motivation und Zielsetzung	1
1.2	Struktur der Arbeit	3
1.2.1	Teil I: Modellierungspipeline	3
1.2.2	Teil II: Modelle und Modellvorhersagen	3
2	GRUNDLAGEN	5
2.1	Grundlagen der Biologie und Biochemie	5
2.1.1	Grundbegriffe der Stoffwechselbiochemie	5
2.1.2	Biologische Grundlagen der Stoffwechselmodelle	9
2.2	Grundlagen der Mathematik und Informatik	12
2.2.1	Optimierung	12
2.2.2	Graphentheorie	14
2.2.3	Visualisierung	15
2.3	Grundlagen der metabolischen Modellierung	18
2.3.1	Grundbegriffe	19
2.3.2	Modellrekonstruktion	23
2.3.3	Modellanalyse	28
3	MODELLIERUNGSPipeline	35
3.1	Modellierungspipeline	35
3.1.1	Modellierung pflanzenbiologischer Stoffwechselmodelle	35
3.1.2	Softwarekomponenten	35
3.1.3	Workflow	37
3.2	Modellerstellung	38
3.2.1	Motivation	38
3.2.2	Anforderungsanalyse	38
3.2.3	Methodik	41
3.2.4	Realisierung	44
3.3	Modellanalyse	46
3.3.1	Motivation	46
3.3.2	Anforderungsanalyse	46
3.3.3	Methodik	49
3.3.4	Implementierung	55
3.4	Zusammenfassung	58
4	MODELLE UND MODELLVORHERSAGEN: GERSTENSAMEN	59
4.1	Gerstensamen-Modell	59
4.1.1	Biologische Grundlagen	59
4.1.2	Modellrekonstruktion	61
4.1.3	Modelleigenschaften	61
4.2	Primärstoffwechsel	62
4.2.1	Material und Methoden	62
4.2.2	Ergebnisse	65
4.2.3	Diskussion	73
4.2.4	Zusammenfassung	77
4.3	Saccharosestoffwechsel	79
4.3.1	Material und Methoden	79
4.3.2	Ergebnisse	81
4.3.3	Diskussion	83
4.3.4	Zusammenfassung	83

4.4	Alaninstoffwechsel	85
4.4.1	Material und Methoden	85
4.4.2	Ergebnisse	87
4.4.3	Diskussion	89
4.4.4	Zusammenfassung	92
5	MODELLE UND MODELLVORHERSAGEN: GERSTENHALM VERSUS -SAMEN	93
5.1	Gerstenhalm-Modell	93
5.1.1	Biologische Grundlagen	93
5.1.2	Modellrekonstruktion	94
5.1.3	Modelleigenschaften	95
5.2	Primärstoffwechsel in Gerstenhalmen	95
5.2.1	Material und Methoden	96
5.2.2	Ergebnisse	98
5.2.3	Diskussion	99
5.3	Verknüpfung organspezifischer Modelle: Samen-/Halm-Modell	101
5.3.1	Material und Methoden	101
5.3.2	Ergebnisse	103
5.3.3	Diskussion	104
5.3.4	Zusammenfassung	104
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	105
6.1	Zusammenfassung	105
6.1.1	Teil I: Modellierungspipeline	105
6.1.2	Teil II: Modelle und Modellvorhersagen	106
6.2	Ausblick	107
A	ANHANG	109
A.1	Bestehende Ansätze der Modellrekonstruktion und -analyse	109
A.1.1	Metabolische Datenbanken mit pflanzenbiologischem Inhalt	109
A.1.2	Programme der optimierungsbasierten Modellanalyse	111
A.2	Optimierungsbasierte Modellanalyse	113
A.2.1	Metabolische Flusswerte	113
A.2.2	Sensitivität und Sensitivitätskurven	113
A.3	Gerstensamen-Modell	114
A.3.1	Stoffwechselwege des endospermalen Primärstoffwechsels	114
A.3.2	Modellrekonstruktion	118
A.4	Gerstenhalm-Modell	125
A.4.1	Stoffwechselwege des Primärstoffwechsel des Gerstenhalms	125
A.4.2	Modellrekonstruktion	129
	LITERATURVERZEICHNIS	133

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Schematischer Längsschnitt durch den Gerstensamen	9
Abbildung 2	Schematischer Querschnitt durch den Gerstenhalm	11
Abbildung 3	Grafische Darstellung metabolischer Netzwerke	15
Abbildung 4	Visualisierung metabolischer Flussdaten ohne Netzwerkkontext . .	16
Abbildung 5	Visualisierung metabolischer Flussdaten im Netzwerkkontext . . .	16
Abbildung 6	Beispielnetzwerk zur Veranschaulichung der mathematischen Grund- lagen	20
Abbildung 7	Schematische Darstellung der Modellrekonstruktion	24
Abbildung 8	Kopplung pflanzenbiologischer FBA-Modelle	27
Abbildung 9	Schematische Darstellung der Modellierungspipeline	36
Abbildung 10	Pipeline zur Kuratation pflanzenbiologischer Stoffwechseldaten . . .	41
Abbildung 11	Pipeline zur optimierungsbasierten Modellanalyse	49
Abbildung 12	ModellGraph: Bildhafte Darstellung des Beispielmodells	51
Abbildung 13	Grafische Repräsentation der Simulationsdaten	53
Abbildung 14	Interaktive Visualisierung sequentieller Simulationsdaten	54
Abbildung 15	FBA-SIMVis: Systemarchitektur	56
Abbildung 16	FBA-SIMVis: Workflow	57
Abbildung 17	Schematische Darstellung des Gersensamen-Modells	62
Abbildung 18	Darstellung der Phänotypischen Phasenebene	66
Abbildung 19	Kornwachstum in Abhängigkeit der Sauerstoffverfügbarkeit	67
Abbildung 20	Flussprofil des sich entwickelnden Endosperms unter anaeroben, hypoxischen und aeroben Wachstumsbedingungen	70
Abbildung 21	Flussprofil der ATP- und PP_i -abhängigen Glykolyse unter anaero- ben, hypoxischen und aeroben Wachstumsbedingungen	71
Abbildung 22	Flussprofil des Wildtyps, der transgenen Jekyll-Pflanze und Risø13- Mutante	82
Abbildung 23	Simulation des Alaninstoffwechsels in Abhängigkeit der Sauerstoff- verfügbarkeit	88
Abbildung 24	Flussprofil des zentralen versus peripheren Endosperms	90
Abbildung 25	Schematische Darstellung des Gerstenhalm-Modells	95
Abbildung 26	Flussprofil zum Zeitpunkt der frühen bzw. späten Samenreife . . .	100
Abbildung 27	Schematische Darstellung des Samen-/Halm-Modells	101
Abbildung 28	Zuckerstoffwechsel	114
Abbildung 29	Aminosäurestoffwechsel	116
Abbildung 30	Glykolyse	117
Abbildung 31	Grafische Darstellung des Gerstensamen-Modells	119
Abbildung 32	Zuckerstoffwechsel	125
Abbildung 33	Lichtreaktion	126
Abbildung 34	Calvinzyklus	127
Abbildung 35	Photorespiration	128
Abbildung 36	Transportprozesse	129
Abbildung 37	Grafische Darstellung des Gerstenhalm-Modells	130

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Reaktionsgleichungen des Beispielnetzwerks	19
Tabelle 2	Online-Ressourcen zur Modellrekonstruktion	26
Tabelle 4	Vergleich der Leistungsmerkmale von Informationssystemen zur Modellrekonstruktion	40
Tabelle 5	Reaktionsdaten	42
Tabelle 6	Beweiskraft der experimentellen Referenzdaten	43
Tabelle 7	Datenbankinhalt MetaCrop 1.0	44
Tabelle 8	Vergleich der Leistungsmerkmale von Softwarepaketen der opti- mierungsbasierten Modellanalyse	48
Tabelle 9	Grafische Komponenten des ModellGraphs	50
Tabelle 10	Stöchiometrische Reaktionsgleichungen	51
Tabelle 11	Simulationsdaten der optimierungsbasierten Modellanalyse	51
Tabelle 12	Grafische Repräsentation der Simulationsdaten	53
Tabelle 13	Simulationsexperimente der optimierungsbasierten Modellanalyse (Primärstoffwechsel)	63
Tabelle 14	Mathematische Definition der Zielfunktion Z_1	63
Tabelle 15	Modellparameter der Simulationsexperimente S_1 bis S_6 (Primär- stoffwechsel)	64
Tabelle 16	Kategorisierung der Modellreaktionen auf Grundlage der Wachs- tumseffizienz	65
Tabelle 17	Schattenpreisanalyse	68
Tabelle 18	Ergebnisse der <i>in silico</i> Knockout-Analyse	72
Tabelle 19	Simulationsexperimente der optimierungsbasierten Modellanalyse (Saccharosestoffwechsel)	80
Tabelle 20	Modellparameter der Simulationsexperimente S_1 bis S_3 (Saccharose)	80
Tabelle 21	Simulationsexperimente der optimierungsbasierten Modellanalyse (Alaninstoffwechsel)	86
Tabelle 22	Mathematische Definition der Zielfunktion Z_2	86
Tabelle 23	Modellparameter der Simulationsexperimente S_1 bis S_3 (Alanin)	87
Tabelle 24	Simulationsexperimente der optimierungsbasierten Modellanalyse (Gerstenhalm)	96
Tabelle 25	Mathematische Definition der Zielfunktion Z_3	96
Tabelle 26	Mathematische Definition der Zielfunktion Z_4	97
Tabelle 27	Modellparameter der Simulationsexperimente S_1 und S_2 (Gersten- halm)	98
Tabelle 28	Simulationsexperimente der optimierungsbasierten Modellanalyse (Samen-/Halm-Modell)	102
Tabelle 29	Mathematische Definition der Zielfunktion Z_5	102
Tabelle 30	Modellparameter der Simulationsexperimente S_1 , S_2 und S_3 (Samen- /Halm-Modell)	103
Tabelle 31	Ergebnisse der <i>in silico</i> Analyse (Samen-/Halm-Modell)	103
Tabelle 32	Tabellarische Beschreibung der optimierungsbasierten Analyseme- thoden	113
Tabelle 33	Biomassezusammensetzung Gerstensamen	120
Tabelle 34	Proteinzusammensetzung Gerstensamen	121
Tabelle 35	Berechnung der stöchiometrischen Koeffizienten der Kohlenhydrat- komponenten	122

Tabelle 36	Berechnung der stöchiometrischen Koeffizienten der Proteinkomponenten	122
Tabelle 37	Biosynthetische Ausgangsstoffe und Cofaktoren	123
Tabelle 38	Berechnung der wachstumsabhängigen Erhaltungsenergie	124
Tabelle 39	Biomassezusammensetzung Gerstenhalm	131
Tabelle 40	Proteinzusammensetzung Gerstenhalm	131
Tabelle 41	Berechnung der stöchiometrischen Koeffizienten	132
Tabelle 42	Biosynthetische Ausgangsstoffe und Cofaktoren	132

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BIOCHEMISCHE SUBSTANZEN	
Abkürzung	Bedeutung
2OG	2-Oxoglutarat
2PGlyc	2-Phosphoglycolat
3PG	3-Phosphoglycerat
AcCoA	Acetyl-CoA
ADP	Adenosindiphosphat
ADPglc	ADP-Glucose
ATP	Adenosintriphosphat
Ala	Alanin
AMP	Adenosinmonophosphat
AraXyl	Arabinoxylan
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
B-glucan	β -Glukan
Cel	Cellulose
Cit	Citrat
CO ₂	Kohlendioxid
Eth	Ethanol
F _{1,6} BP	Fructose-1,6-Bisphosphat
F6P	Fructose-6-Phosphat
Frc	Fructose
Fum	Fumarat
G ₁ P	Glucose-1-Phosphat
G6P	Glucose-6-Phosphat
GABA	γ -Aminobutyrat
Glc	Glucose
Glu	Glutamat
Gln	Glutamin
H ⁺	Hydron (positiv geladenes Ion des Wasserstoffs)
Lac	Laktat
Mal	Malat
NAD ⁺ /NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form/reduzierte Form)
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidierte Form/reduzierte Form)
NH ₃	Ammoniak
O ₂	Sauerstoff
OAA	Oxalacetat

Abkürzung	Bedeutung
P	Phosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PP _i	Anorganisches Pyrophosphat
Pyr	Pyruvat
Suc	Saccharose
Succ	Succinat
SuccSAI	Succinat-Semialdehyd
UDGlc	UDP-Glucose

 ENZYME & TRANSPORTER

Abkürzung	Bedeutung
AGPase	ADP-Glucose-Pyrophosphorylase
Ala-AT	Alanin-Aminotransferase
Asp-AT	Aspartat-Transaminase
cwInv	Zellwandinvertase
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
FK	Fructokinase
FUM	Fumarathydratase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GABA-T	GABA-Transaminase
GDH	Glutamatdehydrogenase
HK	Hexokinase
HEXT	Hexosetransporter
MDH	Malatdehydrogenase
PEPC	Phosphoenolpyruvatcarboxylase
PFK	Phosphofruktokinase
PK	Pyruvatkinase
PFP	Pyrophosphat-Fruktose-6-phosphat-1-Phosphotransferase
PGI	Phosphoglucoseisomerase
PGM	Phosphoglucomutase
PPDK	Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase
SuSy	Saccharosesynthase
StaSy	Stärkesynthase
SDH	Succinatdehydrogenase
SucT	H ⁺ /Suc-Cotransporter
UGPase	UDP-Glucose-Phosphorylase

BIOLOGISCHE FACHBEGRIFFE

Abkürzung	Bedeutung
BM	Biomasse
CAS-Nummer	Internationaler Bezeichnungsstandard für chemische Substanzen (engl. CAS Registry Number)
C-Fluss	Kohlenstofffluss
EC-Nummer	Numerische Klassifikation von Enzymen (engl. enzyme commission number)
DAF	Tage nach Blüte (engl. days after flowering)
<i>in silico</i>	Simulierte Experimente
<i>in vivo</i>	Experimente mit lebenden Zellen/Systemen
μ	Wachstumsrate (Einheit: h^{-1})
MW	Molekulargewicht (engl. molecular weight)
NMR	Kernspinresonanz (engl. nuclear magnetic resonance)
TG	Trockengewicht
W	Wachstumseffizienz
WT	Wildtyp

BIOINFORMATISCHE FACHBEGRIFFE

Abkürzung	Bedeutung
CBA	Constraintbasierte Netzwerkanalyse
EMA	<i>Elementary Modes Analysis</i>
EPA	<i>Extreme Pathway Analysis</i>
FBA	<i>Flux Balance Analysis</i>
FVA	Flussvariabilitätsanalyse
GUI	Grafische Nutzeroberfläche (engl. graphical user interface)
KA	<i>Knockout-Analyse</i>
LO	Optimalitätslinie (eng. line of optimality)
MFA	Metabolische Flussanalyse (engl. metabolic flux analysis)
MG	ModellGraph
OBA	Optimierungsbasierte Netzwerkanalyse
PhPP	Phänotypische Phasenebene
RA	Robustheitsanalyse
SBGN	Systems Biology Graphical Notation
SBML	Systems Biology Markup Language
SG	SimulationsGraph

*A system of the complexity of the plant metabolic network
will only be fully encapsulated and understood
through the construction of computer models.*

— Lee J. Sweetlove¹

1.1 MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

Der Stoffwechsel höherer Pflanzen ist durch eine einzigartige Komplexität gekennzeichnet [TW06, Lun07, LW10, SSK10]. Diese ist Ergebnis einer hochgradigen Kompartimentierung auf Organell-, Zell-, Gewebe- und Organebene [Web09]. Als Anpassung an die sessile Lebensweise sind Pflanzen zudem durch einen ausgeprägten Sekundärstoffwechsel gekennzeichnet. In Verbindung mit der redundanten Natur des Pflanzenstoffwechsels bedingt dies eine Plastizität, welche Pflanzen die Adaptation an verschiedenste Umweltbedingungen ermöglicht [Sha09].

Pflanzen sind von zentraler Bedeutung als Nahrungs- [GD99, MB06, RC11], Energie- [THLo6, PSP⁺11, RC11] und Rohstoffquelle [BK05, KPFC11, LNCC11]. Aufgrund der engen Verbindung zwischen Stoffwechsel und Wachstum bzw. Überleben von Pflanzen besteht ein wachsendes Interesse darin, das Verhalten und die Regulation pflanzenbiologischer Stoffwechselprozesse zu verstehen, vorherzusagen und zu modifizieren [SS07, dODQP⁺10a, SSK10]. Mit Blick auf die Qualitäts- und Ertragssteigerung von Nutz- und Energiepflanzen besteht insbesondere Bedarf an Methoden der qualitativen und quantitativen Stoffwechselanalyse, welche die gezielte Optimierung spezifischer Stoffwechselleistungen ermöglichen.

Die flexible und hoch komplexe Organisation pflanzenbiologischer Stoffwechselprozesse erfordert jedoch neue Konzepte, welche den traditionellen reduktionistischen Ansatz der Biowissenschaften erweitert und ergänzt. Vielversprechende Lösungsansätze bietet hierbei die Systembiologie [Kito2a, Kito2b, KHK⁺05, Palo6b]. Ziel der systembiologischen Forschung ist es, das Verhalten bzw. die Dynamik eines biologischen Systems in seiner Gesamtheit zu verstehen [GM08]. Die quantitative Analyse der dynamischen Systemeigenschaften basiert dabei auf der Integration von experimentellen quantitativen Methoden aus der Biologie und theoretischen Ansätzen aus der Mathematik und Informatik, wobei der mathematischen Modellierung eine zentrale Rolle zukommt.

Die mathematische Modellierung zellulärer Stoffwechselprozesse bietet neue Konzepte und Methoden, um Struktur, Dynamik und Verhalten komplexer biologischer Prozesse aufzudecken und zu beleuchten. So bietet der Einsatz von *in silico*-Modellen die Möglichkeit, experimentell überprüfbare Hypothesen zu generieren und zu testen sowie Vorhersagen über zelluläres Verhalten zu treffen. Hierbei können iterativ verfeinerte Modelle erzeugt und Einblicke in das zu analysierende System gegeben werden [Ste04]. Die Möglichkeit, das Verhalten des zu analysierenden Systems unter Einwirkung verschiedener interner und externer Faktoren vorherzusagen, unterstützt unter anderem die Planung und Durchführung von Laborexperimenten, kann zu der Aufdeckung neuer Zu-

¹ Nachweis in Sweetlove [SFF08]

sammenhänge führen und damit schlussendlich ein erweitertes Verständnis komplexer Stoffwechselprozesse bedingen.

In der Pflanzenforschung gewinnt die mathematische Modellierung von Stoffwechselprozessen zunehmend an Bedeutung. Mathematische Modellierungsansätze pflanzenbiologischer Stoffwechselsysteme reichen von weniger komplexen qualitativen bis hin zu sehr detaillierten quantitativen Ansätzen (für eine Übersicht sei auf [Gie00, MR02, PAF04, REL07] verwiesen). Die quantitative kinetische Modellierung ermöglicht detaillierte Aussagen über die Dynamik und Funktion metabolischer Systeme. Aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit kinetischer Daten ist die Anwendung der kinetischen Modellierung jedoch im Wesentlichen auf Modelle geringer Größe beschränkt. Im Unterschied dazu benötigen qualitative Modellierungsansätze wie die optimierungsbasierte Modellierung vergleichsweise wenige Daten und ermöglicht damit eine detaillierte Analyse großskaliger Systeme.

Die *Flux Balance Analysis*² (FBA) ist ein optimierungsbasierter Modellierungsansatz, der die Vorhersage von stationären (engl. steady state) Flüssen durch die Anwendung von Optimierungsalgorithmen auf einen experimentell eingegrenzten Lösungsraum ermöglicht [ERSP99]. Im Unterschied zu der kinetischen Modellierung benötigt die *Flux Balance Analysis* einfache und leicht zu messende experimentelle Daten (u.a. Wachstumsraten, Biomassezusammensetzung, Produktions- und Verbrauchsdaten), um den Lösungsraum möglicher Flüsse zu begrenzen [RP03]. FBA wurde bereits erfolgreich auf unterschiedliche biologische Systeme wie Bakterien [SCF⁺02, RP03], Pilze [DAN03, FFNP03], Algen [SM05] und Tiere [FS86, REMP01, cASuKOU07, DBJ⁺07, LSB⁺10] angewandt mit dem Ziel, verschiedene Aspekte des Stoffwechsels wie die Vorhersage optimaler Stoffwechselerträge und Flussverteilungen [EIP01, VBP93a, VBP93b], Letalität von Gendelektionen [EP00b, FFF⁺03] und Redundanz von Stoffwechselwegen [vDL02] zu analysieren und vorherzusagen. Trotzdem die Bestimmung metabolischer Flüsse als wichtiger Bestandteil des *Metabolic Engineering*³ von Pflanzen gilt und eine wesentliche Hilfe für das Verständnis pflanzenbiologischer Stoffwechselprozesse darstellt [SGOSH04, FGS05], wurde die *Flux Balance Analysis* in der Pflanzenforschung bisher noch nicht gebührend eingesetzt (siehe Abschnitt 4.2.3).

Mit dem Ziel, das Potential der *Flux Balance Analysis* für Forschungsansätze der Pflanzenbiologie zu nutzen, befasst sich vorliegende Arbeit mit der Anwendung optimierungsbasierter Modellierungsansätze auf pflanzenbiologische Stoffwechselmodelle. Der Fokus der Arbeit liegt dabei auf der Entwicklung einer Modellierungspipeline zur Rekonstruktion, Analyse und Visualisierung pflanzenbiologischer FBA-Modelle und deren Anwendung auf gewebe- und organspezifische Stoffwechselmodelle der monokotylen⁴ Nutzpflanze Gerste (*Hordeum vulgare* L.).

² Im Folgenden werden englische Fachtermini aus dem Gebiet der mathematischen Modellierung für die es in der deutschen Sprache keine adequate Entsprechungen gibt nicht übersetzt sondern *kursiv* gesetzt

³ Im Unterschied zu klassischen Ansätzen wie Selektion und zufälliger Mutagenese ist *Metabolic Engineering* als direkte Modifikation des Stoffwechsels auf der Grundlage rekombinanter DNA-Technologien definiert [Baig1, Scho8a].

⁴ Als monokotyl werden Pflanzen mit einem Keimblatt bezeichnet; Monokotyledonen = einkeimblättrige Pflanzen

1.2 STRUKTUR DER ARBEIT

Die Arbeit untergliedert sich in zwei Teile: die Entwicklung einer Modellierungspipeline zur optimierungsbasierten Analyse pflanzenbiologischer Stoffwechselmodelle im ersten Teil und deren Anwendung auf Modelle des Primärstoffwechsels von Gerste im zweiten Teil.

1.2.1 Teil I: Modellierungspipeline

Der Fokus des ersten Teils der Arbeit liegt auf der Entwicklung von Softwarekomponenten zur Rekonstruktion und Analyse pflanzenbiologischer FBA-Modelle und deren Integration zu einer Modellierungspipeline. Hierzu werden in Kapitel 2 zunächst Grundlagen aus dem Bereich der Biologie und Informatik eingeführt. Grundlagen der mathematischen Modellierung von Stoffwechselsystemen sowie eine Übersicht existierender Methoden der Modellrekonstruktion und -analyse werden im zweiten Teil des Kapitels betrachtet. In Kapitel 3 werden zunächst Anforderungen an Systeme der Netzwerkrekonstruktion und -analyse ausgearbeitet und bestehende Systeme im Hinblick auf diese Anforderungen ausgewertet. Die Umsetzung der Anforderungen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Softwarekomponenten zur Modellrekonstruktion (METACROP) und Modellanalyse (FBA-SIMVIS) und deren Integration zu einer Modellierungspipeline erfolgt im zweiten Teil des Kapitels.

1.2.2 Teil II: Modelle und Modellvorhersagen

Die Anwendung der *Flux Balance Analysis* auf gewebe- und organspezifische Stoffwechselmodelle von Gerste unter Anwendung der in Teil I der Arbeit entwickelten Modellierungspipeline erfolgt im zweiten Teil der Arbeit. Mit dem Ziel, grundlegende Erkenntnisse über die zellulären Prozesse des Speicherstoffwechsels in sich entwickelnden Gerstensamen zu erhalten, wird in Kapitel 4 ein FBA-Modell des endospermalen Primärstoffwechsels von Gerste zum Zeitpunkt der Stärkeakkumulation erstellt und in Abhängigkeit umweltbedingter und genetischer Störungen untersucht. Weiterführende Analysen in Zusammenhang mit dem samenspezifischen Saccharose- und Alaninstoffwechsel sind Bestandteil des zweiten Teils des Kapitels. Ausgangspunkt der in Kapitel 5 durchgeführten Analysen ist ein Modell des Zentralstoffwechsels im Gerstenhalm, das zum Zeitpunkt der frühen Samenentwicklung und der Hauptspeicherphase analysiert wird. Eine Verknüpfung von Samen- und Halm-Modell mit anschließender Analyse des Multiorgan-Modells erfolgt im zweiten Teil des Kapitels. Kapitel 6 fasst die Ergebnisse der Arbeit zusammen und endet mit einem Ausblick.

2.1 GRUNDLAGEN DER BIOLOGIE UND BIOCHEMIE

Im Folgenden werden die für das Verständnis der Arbeit notwendigen Grundlagen der Biologie und Biochemie eingeführt. Dazu werden zunächst grundlegende Begriffe aus dem Bereich der Stoffwechselbiochemie erläutert und dann die biologischen Grundlagen der entwickelten Stoffwechselmodelle dargelegt. Die Darstellung beschränkt sich dabei auf grundlegende Begriffe, für eine weiterführende Darstellung der biochemischen und biologischen Grundlage sei auf [Str95, Ric96, BGJ00, NCo1, VVP10] verwiesen.

2.1.1 Grundbegriffe der Stoffwechselbiochemie

BIOCHEMISCHE REAKTION Eine **biochemische Reaktion** ist ein Vorgang, bei dem aus einem oder mehreren chemischen Stoffen, den sogenannten Ausgangsstoffen (**Edukten**), unter Energieabgabe oder -aufnahme neue Endstoffe (**Produkte**) mit anderen chemischen und physikalischen Eigenschaften entstehen. Edukte werden in der Literatur auch als Ausgangssubstanz oder Reaktant, Produkte als Endsubstanz oder Reaktionsprodukt bezeichnet.

CHEMISCHE REAKTIONSGLEICHUNG Die Kurzschreibweise der bei einer biochemischen Reaktion ablaufenden Stoffumwandlungen erfolgt durch eine **chemische Reaktionsgleichung** (Reaktionsschema). Die in Form einer algebraischen Gleichung dargestellten chemischen Vorgänge beschreiben qualitativ und quantitativ die Wechselwirkungen zwischen den chemischen Verbindungen, wobei auf der linken Seite der Gleichung die Edukte und auf der rechten Seite die entstehenden Produkte aufgeführt sind, z.B.:



Anzahl und Art der Atome bzw. Atomgruppen müssen auf beiden Seiten der Gleichung identisch sein. Die **stöchiometrischen Koeffizienten**, im Beispiel rot gefärbt, geben dabei die Mengenverhältnisse an, mit denen die Moleküle der Edukte und Produkte in die biochemische Reaktion eingehen.

STÖCHIOMETRIE Die **Stöchiometrie** einer gegebenen Reaktion spezifiziert zum einen die Edukte und Produkte, die an der Reaktion beteiligt sind, zum anderen die molaren Verhältnisse, mit denen diese produziert oder konsumiert werden (siehe Reaktionsgleichung 2.1). Der **stöchiometrische Koeffizient** eines Reaktionsteilnehmers entspricht dem molaren Mengenverhältnis (Stoffmenge (Mol) an Molekülen), mit dem dieser an der Reaktion beteiligt ist.

REAKTIONSRICHTUNG & REAKTIONSGLEICHGEWICHT Aus mathematischer und thermodynamischer Sicht sind alle biochemischen Reaktionen **reversibel** [CBC00], das heißt, es laufen sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion ab, wobei die Reaktion von den Edukten zu den Produkten als Hinreaktion, die von den Produkten zurück zu den Edukten als Rückreaktion bezeichnet werden. In der Reaktionsgleichung wird die Reversibilität einer Reaktion durch den Gleichgewichtspfeil

dargestellt, \rightleftharpoons . Biochemische Reaktionen sind durch ein **Reaktionsgleichgewicht** (chemisches Gleichgewicht) charakterisiert, bei dem die Hinreaktion mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Rückreaktion abläuft, so dass kein Nettoumsatz erfolgt. In Extremfällen, in denen das chemische Gleichgewicht nahezu völlig auf Seiten der Produkte liegt, werden die Reaktionen als **irreversibel** bezeichnet.

REAKTIONSRATE, METABOLISCHER FLUSS Der (Netto-)Fluss einer metabolischen Reaktion entspricht der normalisierten **Reaktionsrate**, das heißt der Konsumtionsrate (resp. Produktionsrate) eines jeden Substrates (resp. Produktes) dividiert durch den dazugehörigen stöchiometrischen Koeffizienten [Sym82]. Ein metabolischer Fluss ist **positiv** (resp. **negativ**), falls die Hin-(resp. Rück-)reaktion schneller verläuft als die Rück-(resp. Hin-)reaktion. Flüsse durch eine Hinreaktion sind immer positiv, während Flüsse durch eine reversible Reaktion negativ sein können. Der metabolische Fluss hat die Dimension Mol/Zelle/Zeit (mol g^{-1} Zelltrockengewicht h^{-1}) oder Mol/Biomasseeinheit/Zeit (mol g^{-1} Biomassetrockengewicht h^{-1}).

Fast alle Reaktionen, die in der lebenden Zelle stattfinden, werden durch Enzyme katalysiert.

ENZYME Biokatalysatoren, meist Proteine, die biochemische Reaktionen beschleunigen, indem sie die für den Ablauf jeder Reaktion erforderliche Aktivierungsenergie (Höhe der Energiebarriere zwischen Edukt und Produkt) durch die intermediäre Bildung eines **Enzym-Substrat-Komplexes** verringern, werden als Enzyme bezeichnet. Die durch die katalytische Wirkung eines Enzyms umgewandelte chemische Verbindung wird als **Substrat** bezeichnet. Enzyme, die innerhalb des gleichen Organismus gleiche Funktionen ausüben, aber eine unterschiedliche Aminosäuresequenz aufweisen, werden als **Isoenzyme** bzw. **Isoformen** des Enzyms bezeichnet. **Multienzymkomplexe** bestehen aus einer Gruppe von Enzymen, die miteinander assoziiert sind und aufeinanderfolgende Reaktionsschritte katalysieren. Als **anaplerotisch** (griechisch: auffüllen) werden Enzyme bezeichnet, die dem Citratzyklus zuliefernde Reaktionen katalysieren und damit zusätzliche Citratzyklusintermediate bereitstellen. Im Gegensatz dazu stehen **cataplerotische** (griechisch: entleeren) Enzyme bzw. Reaktionen. Aufgrund ihrer Wirksamkeit werden Enzyme nach der von der internationalen Enzymnomenklatur-Kommission (engl. enzyme commission; EC) erarbeiteten EC-Nomenklatur auf der Grundlage von **EC-Nummern** in 6 Hauptklassen unterteilt, die aufgrund der beteiligten Substratgruppen und Coenzyme weiter in Enzymgruppen, -untergruppen und -serien unterteilt werden.

BIOCHEMISCHE KENNGRÖSSEN Die Charakterisierung biochemischer Substanzen erfolgt auf der Grundlage verschiedener Kenngrößen, wie beispielsweise:

- **Molekülmasse:** Die Summe der Atommassen aller Atome eines Moleküls wird als Molekülmasse bzw. molekulare Masse bezeichnet. Es wird zwischen relativer Molekülmasse (ohne Maßeinheit) und absoluter Molekülmasse (Maßeinheit: kg, g bzw. Da) unterschieden.
- **Summenformel:** Art und Anzahl der Atome einer chemischen Verbindung werden durch die Summenformel angegeben.
- **CAS-Nummer:** Chemische Substanzen werden durch eine CAS-Nummer eindeutig charakterisiert. Die CAS-Nummer (engl. CAS Registry Number, CAS: Chemical Abstracts Service) ist ein internationaler Bezeichnungsstandard für chemische Substanzen.

BIOCHEMISCHER REAKTIONSWEG, STOFFWECHSELWEG Eine Abfolge von biochemischen Reaktionen, die in der lebenden Zelle den Auf- oder Abbau einer Substanz bewirken, wird als **Reaktions- oder Stoffwechselweg** bezeichnet. Bekannte Stoffwechselwege sind unter anderem die Glykolyse und der Citratzyklus.

STOFFWECHSEL (METABOLISMUS) Die Gesamtheit der in einem Organismus ablaufenden Reaktionen wird als Stoffwechsel oder **Metabolismus** bezeichnet, wobei sowohl die Aufnahme, der Transport und die chemische Umwandlung von Stoffen in einem Organismus sowie die Abgabe von Stoffwechselendprodukten an die Umgebung umfasst sind. Die Gesamtheit der in einem Organismus unter Energieverbrauch ablaufenden aufbauenden Stoffwechselwege und -reaktionen wird als **Anabolismus** (Assimilation, Baustoffwechsel) bezeichnet. Als **Katabolismus** (Dissimilation, Betriebsstoffwechsel) wird die Gesamtheit der in einem Organismus unter Energiegewinnung ablaufenden Abbauprozesse bezeichnet. Eine weitere Unterteilung erfolgt zwischen **Primärstoffwechsel** (Grundstoffwechsel), der Gesamtheit der Biosynthesewege, deren Produkte für das Überleben des Organismus notwendig sind und **Sekundärstoffwechsel**, der Biosynthese von Verbindungen (z.B. Alkaloide, Gifte, Harze), die nicht zum unmittelbaren Überleben notwendig sind. Eine Substanz, die im Stoffwechsel umgesetzt wird, wird als **Metabolit** bezeichnet.

KOMPARTIMENTIERUNG In Eukaryonten sind die Stoffwechselvorgänge kompartimentiert und der Stoffaustausch findet über Membranen statt. Eukaryontenzellen sind in verschiedene, von Membranen umgebene, **Zellkompartimente** oder **-organellen** organisiert. Diese subzellulären Organellen wie **Zellkern**, **Endoplasmatisches Retikulum**, **Golgi Apparat**, **Mitochondrien** und **Plastiden** erfüllen spezifische zelluläre Funktionen. Zentrale Zellkompartimente in Speicherorganen von Pflanzen sind die **Amyloplasten**, eine chlorophyll-freie Form der Plastiden, deren Funktion die Synthese und Speicherung von Stärke ist. Eine Folge der Kompartimentierung sind räumlich verschiedene Gruppen von Enzymen, Metaboliten und Stoffwechselwegen, die eine bessere Feinregulierung des Stoffwechsels ermöglichen [HJ92].

TRANSPORT Der Transport von Substanzen zwischen Zellen und Zellorganellen erfolgt unter anderem durch Transportproteine, die den Transport durch die Zell- bzw. Organellmembran passiv erleichtern (erleichterte Diffusion) oder aktiv bewerkstelligen (aktiver, energieverbrauchender Membrantransport). Eine Unterteilung der Transportproteine erfolgt in (i) **Ionenkanäle**, (ii) **Ionenpumpen**, (iii) **Aquaporine** und (iv) **Transporter** bzw. Carrier. Letztere unterteilen sich in (i) **Uniporter** (Transport eines Moleküls in eine Richtung), (ii) **Symporter** bzw. Cotransporter (gleichzeitiger Transport mehrerer Moleküle in eine Richtung) und (iii) **Antiporter** (gleichzeitiger Transport mehrerer Moleküle in entgegengesetzte Richtung).

METABOLOM, PROTEOM, TRANSKRIPTOM Als **Metabolom** bezeichnet man die Gesamtheit der Stoffwechseleigenschaften (u.a. Metabolit-, Enzymkonzentrationen, Enzymaktivitäten) einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt. Analog dazu bezeichnet das **Proteom** bzw. das **Transkriptom** die Summe der zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt in einer Zelle (Gewebe, Organ, Organismus) vorliegenden Proteine bzw. Ribonukleinsäuren (RNA, engl. ribonucleic acids). Die Erforschung des Metabolom, Proteom bzw. Transkriptom wird als **Metabolomik** (engl. metabolomics), **Proteomik** (engl. proteomics) bzw. **Transkriptomik** (engl. transcriptomics) bezeichnet.

Spezifische Begriffe, die in Zusammenhang mit der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten optimierungsbasierten Modellanalyse stehen, werden im Folgenden näher erläutert:

WACHSTUM UNTER VARIABLEN SAUERSTOFFBEDINGUNGEN In Abhängigkeit der in einem Gewebe oder Organ vorherrschenden Sauerstoffbedingungen wird zwischen (i) anoxischen Wachstumsbedingungen (**Anoxie**) - das vollständige Fehlen von Sauerstoff, (ii) hypoxischen Wachstumsbedingungen (**Hypoxie**) - limitierenden

Sauerstoffbedingungen, (iii) aeroben Wachstumsbedingungen (**Aerobiose**) - ausreichenden Sauerstoffbedingungen und (iv) hyperoxischen Wachstumsbedingungen (**Hyperoxie**) - Überangebot ¹ an Sauerstoff unterschieden.

SUBSTRATZYKLEN Kohlenstoffzyklen, in denen katabole und anabole Reaktionen gleichzeitig ablaufen, wobei Energie verbraucht wird, werden als **Substratzyklen** (engl. futile cycles; futile = nutzlos) bezeichnet. Die physiologische Bedeutung der Substratzyklen ist umstritten und wird in der Literatur kontrovers diskutiert (siehe u.a. Portais *et al.* [PD02]).

BYPASS-REAKTIONEN Als **Bypass-Reaktionen** (engl. bypass: Nebenweg) werden Reaktionen alternativer Stoffwechselwege bezeichnet. Ein Beispiel sind die Pyrophosphat-abhängigen *Bypass*-Reaktionen der Glykolyse, die alternativ zu den entsprechenden ATP-abhängigen Reaktionen der Glykolyse aktiv sind (siehe Anhang, Abbildung 30).

ENERGIE- UND REDUKTIONSÄQUIVALENTE Der **Energiezustand** einer Zelle bzw. eines Gewebes lässt sich anhand der **Energieäquivalente**, das heißt ATP, UTP, CTP und GTP bestimmen. Analog dazu erfolgt die Bestimmung des **Redoxzustandes** auf Grundlage der **Reduktionsäquivalente** NADH und NADPH.

SOURCE- UND SINK-ORGANE Pflanzenorgane, die mehr Kohlenstoff bilden, als sie verbrauchen werden als **Source-Organ** (engl. source: Quelle) bezeichnet. Organe, die mehr importieren als exportieren werden **Sink-Organ** (engl. sink: Senke) genannt.

GENOTYP UND PHÄNOTYP Als **Genotyp** oder Erbbild bezeichnet man die genetische Ausstattung (Gesamtheit der Erbanlagen) eines Organismus. Im Gegensatz dazu bezeichnet der **Phänotyp** oder das Erscheinungsbild die Gesamtheit aller morphologischen, physiologischen, psychologischen und molekularen Merkmale eines Organismus.

TRANSGENE PFLANZEN Pflanzen, bei denen das Erbgut zielgerichtet verändert wurde, werden als **transgen** bezeichnet.

¹ über dem normalen Partialdruck von Sauerstoff liegend

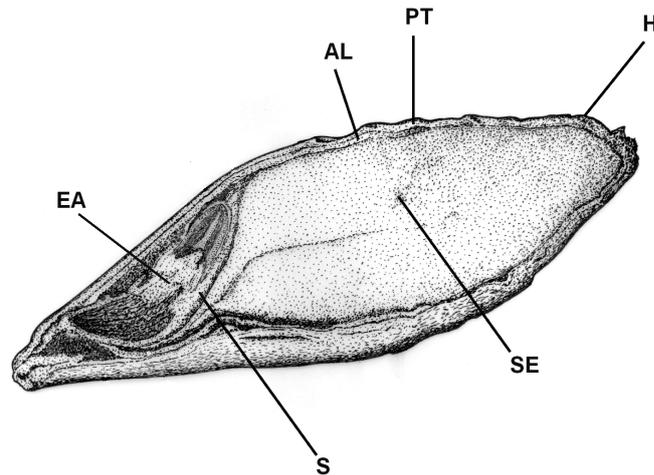


Abbildung 1: Schematischer Längsschnitt durch den reifen Gerstensamen (adaptiert von [DH10]).
 Abkürzungen: AL: Aleuron; EA: Embryoachse; H: Samenhülle; PT: Perikarp-Testa; SE: stärkehaltiges Endosperm; S: Skutellum

2.1.2 Biologische Grundlagen der Stoffwechselmodelle

Schwerpunkt der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Stoffwechselmodelle ist der Primärstoffwechsel monokotyle Kulturpflanzen zum Zeitpunkt der Samenentwicklung am Beispiel von Gerste. Die für das Verständnis der Modellbildung und -analyse notwendigen biologischen Grundlagen aus dem Bereich der Morphologie und Entwicklung von Gerstensamen und -halmen werden im Folgenden erläutert.

2.1.2.1 Samenmorphologie: Speichergewebe und Speicherstoffe

Wachsende Gerstensamen sind genetisch und physiologisch heterogene, hoch komplexe Systeme, bestehend aus dem maternalen Gewebe (**Testa, Perikarp**) und den filialen Organen **Embryo** und **Endosperm** [BRR⁺04]. In den reifen Samen der monokotylen Gerste (Abbildung 1) ist das Endosperm in die äußeren Aleuronschichten und das stärkehaltige Endosperm untergliedert. Die embryonalen Gewebe umfassen das **Skutellum**, ein Nährgewebe und den eigentlichen Embryo [Bri78].

Die Differenzierung der heterogenen Samengewebe erfolgt schrittweise, ausgehend von den maternalen und gefolgt von den filialen Geweben [BRR⁺04]. Letztere entwickeln sich zu hoch spezialisierten Speichergeweben. In Gerstensamen degeneriert das Perikarp im Verlauf der Samenentwicklung und das sich vergrößernde Endosperm wird zum Hauptspeicherorgan. Hauptspeicherstoff der Gerste ist die Stärke (55-65% des Korntrockengewichts, [MF93]), gefolgt von den Speicherproteinen (~ 12%, [She92]), die im stärkehaltigen Endosperm und dem Aleuron synthetisiert werden. Die im Wesentlichen im Aleuron und dem Embryo gebildeten Speicherlipide machen einen deutlich geringeren Anteil aus (~ 3%, [NN92, Mor93]). Eine detaillierte Darstellung des Speicherstoffwechsels in sich entwickelnden Gerstensamen folgt in Kapitel 4.

2.1.2.2 Samenentwicklung der Gerste

Die Samenentwicklung der Gerste ist ein hoch komplexer Prozess, der in drei Phasen unterteilt werden kann. Nach der für höhere Pflanzen charakteristischen doppelten Befruchtung von Ei und Zentralzelle entwickeln sich aus dem Fusionsprodukt Embryo und Endosperm (frühe Morphogenese) [Mah50]. Diese durch anhaltende Zellteilung und

Morphogenese gekennzeichnete erste Phase der Samenentwicklung wird als **Zellteilungs- oder Vorspeicherphase** bezeichnet. Bei der nachfolgenden Reifung des Samens kommt es zu einer Akkumulation von Speicherstoffen. Diese als **Reifungs- oder Hauptspeicherphase** bezeichnete Entwicklungsphase beinhaltet die Synthese und Deposition art-spezifischer Speicherstoffe (Speicherstärke, -proteine, -lipide) in den Speichergeweben (Endosperm, Embryo). Im Verlauf der dritten Entwicklungsphase, der **Austrocknungsphase**, trocknet der Samen aus und leitet die Samenruhe (Dormanz) ein. Als weitere Phase der Samenentwicklung wird in einigen Studien (u.a. [WPG⁺03, SAR⁺04]) die sogenannte **Transitionsphase** aufgeführt. In dieser, zwischen Vorspeicher- und Speicherphase liegenden Entwicklungsphase werden die hormonellen, transkriptionellen und metabolischen Regulationsprozesse von maternaler auf filiale Kontrolle umgeschaltet.

Im Folgenden werden die während der Samenentwicklung von Gerste ablaufenden Entwicklungsschritte im Einzelnen erläutert, eine umfassende Darstellung dieser Prozesse ist in [OPK92, BLO94, WPS⁺00] gegeben. Die Samenentwicklung von Gerste ist ein hoch organisierter Prozess, geregelt durch maternale und filiale Regulationsprozesse [SAR⁺04]. Im Verlauf der Vorspeicherphase (0-5 Tage nach der Blüte (engl. days after flowering, DAF), die durch Vakuolisierung, Zellteilungsprozesse und der Abwesenheit von Stärke im Endosperm gekennzeichnet ist, erfolgt die Zellularisierung des stärkehaltigen Endosperms. Das maternale Perikarp bildet den Hauptanteil des Samens und dient als Nährgewebe für das filiale Endosperm/Embryo. In der nachfolgenden Transitionsphase (5-8 DAF) findet eine erste Akkumulation von Stärke im Endosperm statt (6. DAF), und das Korn wird innerhalb weniger Tage zu massiver Speicherproduktsynthese umprogrammiert. Innerhalb des filialen Samengewebes ist diese Entwicklungsphase unter anderem durch den Wechsel von Invertase-kontrollierter zu Saccharosesynthase-kontrollierter Saccharosespaltung (siehe Anhang, Abbildung 28) und durch den Wechsel von einem hohen Hexose-²/Saccharose- zu einem hohen Saccharose-/Hexose-Verhältnis gekennzeichnet [WSB⁺05].

In der nachfolgenden Reifungs- und Hauptspeicherphase (9-24 DAF) erfolgt die Ausbildung langgestreckter, polyedrischer Endospermzellen, und die Differenzierung des Aleuron findet statt. In der späten Phase des Reifungsprozesses endet die mitotische Aktivität und die Speicherproduktdeposition beginnt, zunächst in den zentralen Regionen und sich langsam in Richtung der peripheren Regionen des stärkehaltigen Endosperms ausbreitend [OPK92, WPS⁺00]. Es kommt zu einer linearen Zunahme der Speicherproduktsynthese und -deposition (10-20 DAF), und die Hauptzunahme des Korngewichts findet statt. Nach dem 24. DAF tritt der Samen in die Austrocknungsphase (25-30DAF) ein, die durch Wasserverlust des Samens und das Erlangen der Austrocknungstoleranz gekennzeichnet ist.

2.1.1.2.3 *Morphologie der Halme: Transport- und Speichergewebe*

Der Halm monokotyler Pflanzen untergliedert sich im Wesentlichen in die zu Leitbündeln zusammengefassten vaskulären Gewebe **Xylem** und **Phloem** und das **Speicherparenchym** (Speichergewebe), siehe Abbildung 2. Während die Transportgewebe Xylem und Phloem den Langstreckentransport von Wasser und mineralischen Nährstoffen (Xylem) bzw. von Kohlenhydraten und anderen organischen Substanzen (Phloem) gewährleisten, besteht eine der Hauptfunktionen des Speicherparenchyms in der Assimilation und Speicherung von Nährstoffen.

2 Hexose: Einfachzucker, deren Kohlenstoffgrundgerüst sechs Kohlenstoffatome enthält

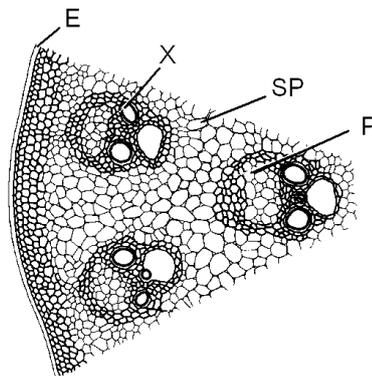


Abbildung 2: Schematischer Querschnitt durch den Halm einer monokotylen Pflanze (adaptiert von [Cro12]). *Abkürzungen:* E: Epidermis; P: Phloem; SP: Speicherparenchym; X: Xylem

2.1.2.4 Entwicklung der Halme

Nach [GRD05, HGC06] lässt sich die Pflanzenentwicklung von Gerste in neun Wachstumsphasen untergliedern: (i) Keimung, (ii) Wachstum des Keimlings, (iii) Bestockung³, (iv) Halmbildung, (v) Streckungswachstum, (vi) Ährenbildung, (vii) Blüte, (viii) Samenentwicklung und (ix) -reifung. Mit Beginn der Halmbildung (Phase iv) erfolgt die Entwicklung des Gerstenhalmes, die zunächst im Wesentlichen durch Längenzuwachs charakterisiert ist. Die Akkumulation von Reservestoffen (im Wesentlichen Fruktane) im Gerstenhalm erfolgt während der Halmbildungsphase bis zur frühen Phase der Samenfüllung [Sch93, XMJ⁺08]. Während der späten Phase der Samenfüllung erfolgt eine Remobilisierung der Reservestoffe und damit ein Funktionswechsel des Halmes von *Sink-* zu *Source-*Organ [WBWW98].

³ Bestockung: Halmverzweigung, die mehr oder minder tief im Boden erfolgt.

2.2 GRUNDLAGEN DER MATHEMATIK UND INFORMATIK

Im Folgenden werden die für das Verständnis der Arbeit notwendigen Grundlagen der Mathematik und Informatik eingeführt. Im Speziellen werden grundlegende Definitionen aus dem Bereich der Optimierung, Graphentheorie und Visualisierung gegeben. Die Darstellung beschränkt sich dabei auf grundlegende Begriffe; für eine weiterführende Darstellung der mathematischen und bioinformatischen Grundlage sei auf die an den entsprechenden Stellen im Text aufgeführte Literatur verwiesen.

2.2.1 Optimierung

2.2.1.1 Lineare Optimierung

Gegenstand der **linearen Optimierung** ist die Maximierung oder Minimierung einer linearen **Zielfunktion** von endlichen Variablen unter Einhaltung einer endlichen Anzahl von **Nebenbedingungen** (engl. constraints), die als lineare Gleichungen bzw. Ungleichungen vorliegen. Ohne Einschränkung der Allgemeingültigkeit⁴ ist ein lineares Optimierungsproblem in allgemeiner Form (Standardform) wie folgt definiert [Dan63]:

$$\max c^T x \quad (2.2)$$

unter den Nebenbedingungen

$$A \cdot x \leq b$$

$$x \geq 0$$

für $c \in \mathbb{R}^n$, $A \in \mathbb{R}^{m \times n}$ und $b \in \mathbb{R}^m$.

Jede Lösung $x \in \mathbb{R}^n$ eines linearen Optimierungsproblems, die alle Nebenbedingungen erfüllt, wird als **gültige Lösung** bezeichnet. Die Menge aller gültigen Lösungen bilden den **zulässigen Bereich M**:

$$M = \{x \in \mathbb{R}^n : A \cdot x \leq b, x \geq 0\}$$

Eine Lösung $x^* \in M$ wird als **Optimallösung** bezeichnet, falls $c^T x^* \geq c^T x$ für alle gültigen Lösungen gilt. Eine Optimallösung entspricht damit einer gültigen Lösung mit minimalem bzw. maximalem **Zielfunktionswert**.

Folgende Klassen von Lösungen lassen sich bei der linearen Optimierung unterscheiden: (i) **eindeutige Lösungen**: es existiert eine Optimallösung, (ii) **Mehrfachlösungen** (alternative Optima): es existieren unendlich viele Optimallösungen, die den gleichen optimalen Zielfunktionswert ergeben, (iii) **leere Lösungen**: die Nebenbedingungen widersprechen sich und das Problem hat keine Lösung (unzulässiges Optimierungsproblem), und (iv): **unbegrenzte Lösungen**: der zulässige Bereich ist unendlich groß, die Zielfunktion nimmt ihr Maximum im Unendlichen (unbeschränktes Optimierungsproblem). Für eine tiefer gehende Einführung in die lineare Optimierung sowie in die zugrunde liegenden mathematischen Details sei auf [Dan63] verwiesen.

⁴ Jedes Optimierungsproblem lässt sich durch folgende Transformationen in die Standardform bringen: (i) Minimierungsproblem statt Maximierungsproblem: Negierung des Koeffizienten c in der Zielfunktion, (ii) Gleichheitsbedingungen statt Ungleichheitsbedingungen: Ersetzung von $f(x) = b$ durch $f(x) \leq b$ und $f(x) \geq b$, (iii) Variablen ohne Nichtnegativitätsbedingung: Ersetzung von x_j durch $x_j' - x_j''$ mit $x_j', x_j'' \geq 0$, und (iv) \geq - statt \leq -Bedingungen: Negierung der Koeffizienten a_{ij} , b_i in der betreffenden Ungleichung i

2.2.1.2 *Nichtlineare Optimierung*

Gegenstand der **nichtlinearen Optimierung** sind Optimierungsprobleme, deren Zielfunktion und/oder Nebenbedingungen nichtlinear sind. Ein Spezialfall der nichtlinearen Optimierung ist die quadratische Optimierung, die im Folgenden näher erläutert wird.

2.2.1.3 *Quadratische Optimierung*

Die **quadratische Optimierung** umfasst Aufgaben der Form

$$f(x) = x^T C x + p^T x \quad (2.3)$$

für $C \in \mathbb{R}^{n \times n}$, $p \in \mathbb{R}^n$, $A \in \mathbb{R}^{m \times n}$, $b \in \mathbb{R}^m$ und $x \in M \subset \mathbb{R}^n$ mit

$$M = M_1 : M = \{x \in \mathbb{R}^n : A \cdot x \leq b, x \geq 0\}$$

Alternativ kann der zulässige Bereich M in folgende Darstellungen überführt werden:

$$M = M_2 : M = \{x : A \cdot x = b, x \geq 0\}$$

$$M = M_3 : M = \{x : A \cdot x \leq b\}$$

Ist eine quadratische Zielfunktion f **streng konvex**⁵ so existiert höchstens eine Lösung der Gleichung 2.3. Ein Beispiel für eine streng konvexe Funktion ist die quadrierte Euklidische Norm.

⁵ Die Funktion f in Gleichung 2.3 ist genau dann streng konvex, wenn C positiv definit ist. Die symmetrische Matrix $C \in \mathbb{R}^{n \times n}$ mit den Eigenwerten $\lambda_1, \dots, \lambda_n$ heißt positiv definit, falls $\lambda_i > 0$ für alle i .

2.2.2 Graphentheorie

2.2.2.1 Grafische Darstellung von metabolischen Netzwerken

Metabolische Netzwerke lassen sich als Graphen visuell darstellen. Im Folgenden werden die für das Verständnis der Arbeit notwendigen Begriffe aus dem Bereich der Graphentheorie vorgestellt. Für weiterführende Informationen sei auf [Tito3, KN05, Jun05] verwiesen. In den nachfolgend aufgeführten graphentheoretischen Definitionen umfasst der Begriff der biochemischen Reaktion alle in einem Stoffwechselmodell modellierten Reaktionen, d.h. enzymatische Reaktionen, spontane Reaktionen und Transportprozesse.

GERICHTETER GRAPH Ein **gerichteter Graph** $G = (V, E)$ besteht aus einer endlichen Menge von **Knoten** V und einer endlichen Menge von gerichteten **Kanten** E , wobei jede Kante zwei nicht unbedingt disjunkte Knoten verbindet. Eine gerichtete Kante $(u, v) \in E$ besteht aus einem geordneten Paar von Knoten, wobei u als **Anfangsknoten** und v als **Endknoten** bezeichnet wird.

BIPARTITER GRAPH Ein Graph wird als **bipartit** bezeichnet, falls die Knotenmenge V in zwei disjunkte Teilmengen V_1 und V_2 geteilt ist, so dass zwischen den Knoten innerhalb beider Teilmengen keine Kanten verlaufen. Allgemein werden metabolische Netzwerke als gerichtete, bipartite Graphen modelliert $G = (V_1 \cup V_2, E)$, wobei die Knoten $v \in V_1$ den Metaboliten und die Knoten aus $v \in V_2$ den biochemischen Reaktionen entsprechen. Die Kanten verbinden die Metaboliten mit den Reaktionen und spezifizieren damit, welche Metaboliten an einer biochemischen Reaktion teilhaben, siehe Abbildung 3A.

HYPERGRAPH Ein **Hypergraph** $G = (V, E)$ ist ein spezieller Graph bestehend aus einer endlichen Menge von Knoten V und einer endlichen Menge von **Hyperkanten** E , wobei jede Hyperkante mehrere Knoten verbindet.

Eine Hyperkante $(\{u_1, \dots, u_n\}, \{v_1, \dots, v_m\}) \in E$ besteht aus einem geordneten Paar von Knotenmengen, wobei $\{u_1, \dots, u_n\}$ als Menge der Anfangsknoten und $\{v_1, \dots, v_m\}$ als Menge der Endknoten bezeichnet wird. Bei der Darstellung metabolischer Netzwerke in Form von Hypergraphen entsprechen die Knoten den Metaboliten und die Hyperkanten den Reaktionen. Eine Hyperkante verbindet alle Metaboliten einer Reaktion. Sie ist von Edukt zu Produkt gerichtet und ist mit dem Reaktionsnamen bezeichnet, siehe Abbildung 3B.

Eine standardisierte Form der visuellen Darstellung biochemischer und zellulärer Prozesse bietet die **Systems Biology Graphical Notation (SBGN)** [NHM⁺09]. Komplexe biologische Prozesse lassen sich in SBGN mit Hilfe der folgenden komplementären Diagrammtypen in verschiedenen Detailstufen abbilden: (i) *Process Description (PD)*, (ii) *Entity Relationship (ER)* und (iii) *Activity Flow (AF)*. Allgemein erfolgt die Darstellung stöchiometrischer Stoffwechselmodelle in SBGN mit Hilfe der *Process Description*:

SBGN-GRAPH: PROZESS-DIAGRAMM Ein SBGN Prozess-Diagramm ermöglicht die Darstellung von molekularen Prozessen und Interaktionen zwischen biochemischen Elementen, wobei die zeitliche Abhängigkeit der Interaktionen berücksichtigt wird. Ein Beispiel für diese Art der Darstellung ist in Abbildung 3C gegeben.

Für eine umfassende Einführung in SBGN sei auf [NHM⁺09] verwiesen.

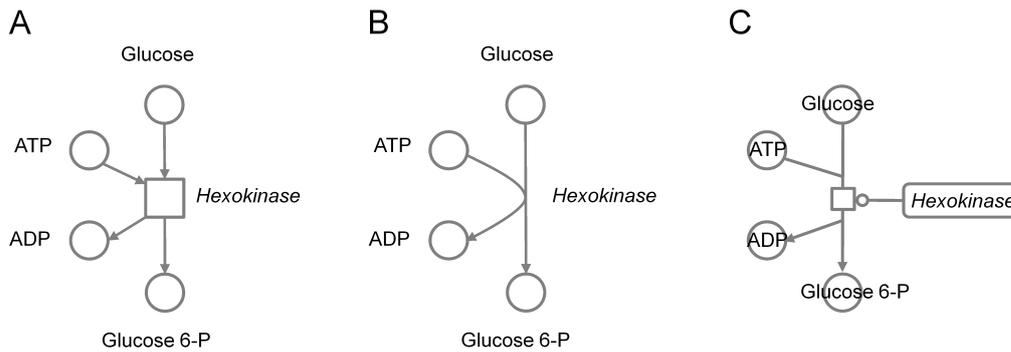


Abbildung 3: Grafische Darstellung metabolischer Netzwerke am Beispiel der Hexokinase. A: Gerichteter, bipartiter Graph, B: Hypergraph und C: SBGN-Graph (Prozess-Diagramm) der Hexokinase-Reaktion

2.2.3 Visualisierung

Visualisierung (lat. videre = sehen; visus = das Gesehene, Anblick) bezeichnet im Allgemeinen den Prozess oder die Tätigkeit abstrakte, nichtvisuelle Informationen in eine grafische bzw. visuell erfassbare Form zu überführen [Bas10]. Ziel der Visualisierung ist es komplexe Zusammenhänge mit Hilfe von grafischen Darstellungen besser verständlich und leichter erfassbar zu machen. Ein wesentlicher Aspekt ist dabei der Gewinn neuer Erkenntnisse [CMS99]. Der Begriff Visualisierung wird zudem synonym zu den Begriffen der grafischen Darstellung oder Grafik verwandt.

In Bezug auf die Modellierung metabolischer Netzwerke kann Visualisierung einen wesentlichen Beitrag sowohl zum Prozess der Modellrekonstruktion als auch zur Exploration der generierten Simulationsdaten leisten. Möglichkeiten metabolische Modelle mit Hilfe graphentheoretischer Methoden visuell erfassbar zu machen wurden bereits in Abschnitt 2.2.2.1 aufgeführt. Im Folgenden wird ein Überblick über Methoden der Visualisierung von Simulationsdaten sowie den im Rahmen einer interaktiven Visualisierung einsetzbaren Interaktionstechniken gegeben.

2.2.3.1 Visualisierung und Repräsentation von Simulationsdaten

Simulationsergebnisse der optimierungsbasierten Modellanalyse sind durch numerische Werte (u.a. metabolische Flusswerte, Sensitivitätswerte; siehe Abschnitt 2.3.3.2) beschrieben. In der Literatur werden verschiedene Möglichkeiten der Visualisierung numerischer Werte aufgeführt:

Datenvisualisierung ohne Netzwerkkontext

Die einfachste Form der Datenvisualisierung ist die **Text- bzw. Tabellenform** (siehe Abbildung 4). Neben der rein textuellen Darstellung lassen sich numerische Werte durch eine Vielzahl unterschiedlicher Visualisierungsformen grafisch darstellen. Exemplarisch seien an dieser Stelle übliche Darstellungsformen wie **Linien-, Balken-, Tortendiagramme** und **Histogramme** erwähnt (siehe Abbildung 4).

Datenvisualisierung im Netzwerkkontext

Eine Möglichkeit, Daten im Netzwerkkontext darzustellen, besteht in der **Annotation** von Netzwerknoden und -kanten mit numerischen Werten, dargestellt als Zahlen, Säulen

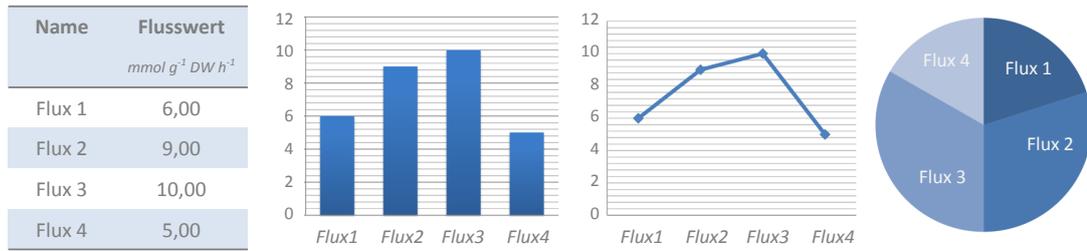


Abbildung 4: Visualisierung metabolischer Flussdaten ohne Netzwerkkontext: Tabellenform, Balken-, Linien- und Tortendiagramm

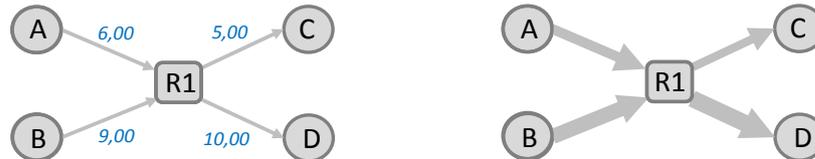


Abbildung 5: Visualisierung metabolischer Flussdaten im Netzwerkkontext: Annotation und Mapping von Flusswerten

oder Diagrammen (siehe Abbildung 5). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, numerische Werte auf visuelle Eigenschaften von Knoten und Kanten zu mappen (**Mapping**, siehe Abbildung 5). Nach Bertin [Ber83] lassen sich hierbei folgende visuelle Eigenschaften bzw. Variablen unterscheiden: Größe, Form, Farbe, Orientierung, Textur, Füllung, Graustufenverteilung und Bewegung.

2.2.3.2 Interaktionstechniken

Von zentraler Bedeutung für den visualisierungsbasierten Erkenntnisgewinn ist die interaktive Exploration und Manipulation der Daten [ZSAvLog]. Die effektive Integration von Interaktionstechniken in den Prozess der Visualisierung (**interaktive Visualisierung**) kann den Erkenntnisgewinn wesentlich beeinflussen. Nach Gershon *et al.* [GCE98] lassen sich Interaktionstechniken folgenden drei Kategorien zuordnen:

1. Fokussierung

Fokussierungstechniken beruhen darauf, dass bestimmte Ausschnitte einer Visualisierung in den Fokus des Anwenders gerückt werden. Folgende Fokussierungstechniken lassen sich unterscheiden:

ZOOMING+PANNING Die Darstellung von Objekten in unterschiedlichen Detailstufen (unterschiedlicher Auflösung) durch Veränderung des dargestellten Ausschnitts einer Abbildung wird als Zoomen (engl. *zooming*) bezeichnet. Generell werden drei Arten von Zoomen unterschieden: (i) geometrisches Zoomen, (ii) semantisches Zoomen und (iii) Fischaugen Zoom (engl. *fish-eye zoom*) (siehe [inf] für eine detaillierte Erläuterung der einzelnen Methoden). Eine Veränderung des dargestellten Ausschnitts einer Abbildung durch das horizontale bzw. vertikale Verschieben des Bildausschnitts bei gleichbleibender Auflösung wird als *Panning* bezeichnet.

ÜBERBLICK+DETAIL Die visuelle Darstellung von Objekten in unterschiedlichen, miteinander verknüpften Sichten⁶ (u.a. Überblick-, Detailsicht) unter Anwendung

⁶ Sichten sind verschiedene Visualisierungen identischer Daten, die jeweils unterschiedliche Aspekte dieser Daten visuell hervorheben.

verschiedener Visualisierungstechniken wird als Überblick+Detail Technik bezeichnet.

FOKUS+KONTEXT Fokus+Kontext Techniken beruhen darauf, dass in einer einzigen Visualisierung ausgesuchte Bereiche sehr detailliert (Fokus) und eine Übersicht der umgebenden Informationen (Kontext) mit geringerem Detailgrad dargestellt werden.

2. Filterung

Filterung, eine der grundlegenden Interaktionstechniken, basiert auf der Anwendung von Filterkriterien mit dem Ziel, die dargestellte Datenmenge zu reduzieren. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Filter- und Fokussierungstechniken besteht darin, dass sich erstere auf die Attribute der zu visualisierenden Objekte beziehen, während letztere üblicherweise den Visualisierungsraum betreffen.

3. Verknüpfung: Linking und Brushing

Linking und *Brushing* bezieht sich auf die Verbindung zwischen zwei und mehr Sichten, wobei eine Änderung in der Darstellung einer Sicht die Darstellung in den anderen Sichten beeinflusst. Als *Brushing* wird dabei das Selektieren einer Teilmenge der Daten mit Hilfe eines Eingabegerätes (Maus, Tastatur) bezeichnet. Visuell darzustellen, welche Daten bzw. Objekte einer Sicht denen einer anderen Sicht entsprechen, wird als *Linking* bezeichnet.

2.3 GRUNDLAGEN DER METABOLISCHEN MODELLIERUNG

Ziel der mathematischen Modellierung ist die Formulierung eines mathematischen Modells, auf dessen Grundlage sich Aussagen und Lösungen zu einem realen Ausgangsproblem ableiten lassen [EGKo8]. Die metabolische Modellierung, das heißt, die mathematische Modellierung von Stoffwechselsystemen, befasst sich mit der mathematischen Formulierung und Lösung von realen Ausgangsproblemen aus dem Bereich der Stoffwechselbiochemie. Der Prozess der metabolischen Modellierung umfasst sowohl die Definition eines mathematischen Modells (Modellrekonstruktion) als auch die Analyse bzw. Lösung des Modells (Modellanalyse).

Die unterschiedlichen Methoden der metabolischen Modellierung reichen von sehr detaillierten quantitativen Ansätzen zu weniger ausführlichen qualitativen Ansätzen. Nach Stelling [Steo4] lassen sich diese Methoden folgenden Hauptansätzen zuordnen:

1. **TOPOLOGISCHE MODELLIERUNG** Grundlage der topologischen Modellierung ist die Netzwerktopologie, das heißt, das Interaktionsmuster zwischen Netzwerkkomponenten. Diese elementare Netzwerkeigenschaft ist unabhängig von der Stärke und Richtung der Interaktion und ermöglicht damit die Analyse der statischen Darstellung der Netzwerkkomponenten und -interaktionen [BO04]. Die topologische Modellierung basiert im Wesentlichen auf der Anwendung graphentheoretischer Methoden. Typische Netzwerkeigenschaften, die mittels topologischer Ansätze analysiert werden können, sind die Pfadlänge zwischen Metaboliten sowie die Gradverteilung innerhalb eines Netzwerkgraphen. Weitere Arbeiten aus dem Bereich der topologischen Netzwerkanalyse befassen sich mit der Hierarchie [RSM⁺02, GJC03, HHJ03, HWBZ04], der Modularität [HHLM99, Nuro3, RSM⁺02, WA03, HWBZ04], den Motiven [SOMMA02, MA03, DBBO04] und Zentralitäten [KS08, DJSS10] in metabolischen Netzwerken und dem Vergleich topologischer Strukturen zwischen verschiedenen Organismen [MZ03]. Die topologische Netzwerkanalyse hat wesentlich zum Verständnis der metabolischen Netzwerkarchitektur beigetragen. Aufgrund ihrer Beschränkung auf topologische Netzwerkeigenschaften ist sie jedoch nur begrenzt für pflanzenbiologische Fragestellungen geeignet. Für eine tiefer gehende Einführung in die Thematik der pflanzenbiologischen topologischen Modellierung sei auf [GBJK⁺09] verwiesen.
2. **CONSTRAINTBASIERTE MODELLIERUNG** Die constraintbasierte Modellierung, die in der Literatur häufig auch unter dem Begriff stöchiometrische Modellierung aufgeführt wird, berücksichtigt neben der Netzwerktopologie räumliche, physiochemische und umweltbedingte Nebenbedingungen (engl. constraints), um die Bandbreite möglicher Zustände eines modellierten biochemischen Systems einzugrenzen. Die constraintbasierte Modellierung umfasst zwei Hauptansätze: (i) die pathwaybasierte Netzwerkanalyse und (ii) die optimierungsbasierte Netzwerkanalyse. Eine detaillierte Beschreibung der constraintbasierten Modellierung, dem Hauptansatz der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten metabolischen Modellierung, erfolgt in Abschnitt 2.3.3.
3. **KINETISCHE MODELLIERUNG** Durch die Berücksichtigung der Reaktionsmechanismen eines zu analysierenden Stoffwechselsystems lassen sich auf Grundlage der kinetischen Modellierung quantitative Aussagen über die zelluläre Dynamik treffen. Kinetische bzw. dynamische Modelle ermöglichen die Formulierung präziser, experimentell überprüfbarer Hypothesen [Steo4]. Darüber hinaus bietet die kinetische Modellierung eine detaillierte, quantitative Auswertung der Dynamik und Funktion metabolischer Systeme und unterstützt die Aufklärung genereller Prinzipien der metabolischen Regulation und Kontrolle [HR74, HS96]. Zum derzeitigen Zeitpunkt

stellt die kinetische Modellierung die geeignetste Methode zur vollständigen Charakterisierung metabolischer Systeme dar. Ihre Anwendung ist jedoch aufgrund der Komplexität biologischer Systeme sowie dem mangelhaften Wissen über die Reaktionsmechanismen und -parameter erschwert und bisher im Wesentlichen auf Modelle geringer Größe beschränkt [Kito4]. Eine Übersicht der neuesten Beispiele (pflanzenspezifischer) kinetischer Modelle ist in [MR02, REL07] sowie in den entsprechenden Modelldatenbanken (JWS Online Repository [OS04], BioModels Database [LDR+10]) gegeben. Für eine detaillierte Einführung in die pflanzenbiologischen kinetischen Modellierung sei auf [REL07, Scho9, SJ10] verwiesen.

Im Folgenden wird eine kurze Einführung in die theoretischen Grundlagen der metabolischen Modellierung und den dabei verwendeten formalen Begriffen geben (Abschnitt 2.3.1). Eine detaillierte Einführung in die Teilschritte der Modellerstellung und Modellanalyse erfolgt in den Abschnitten 2.3.2 und 2.3.3.

2.3.1 Grundbegriffe

2.3.1.1 Metabolische Modelle

Ein metabolisches Modell stellt eine abstrakte und vereinfachte Abbildung eines realen biochemischen Systems dar, wobei die Wechselwirkungen zwischen den Systemkomponenten mit mathematischen Gleichungen wiedergegeben werden. Die grundlegenden Komponenten eines biochemischen Systems bestehen aus Metaboliten und Reaktionen. Für ein optimierungsbasiertes bzw. stöchiometrisches Stoffwechselmodell lassen sich diese formal wie folgt beschreiben:

METABOLITEN Die Metaboliten eines biochemischen Systems umfassen die Edukte und Produkte der an dem System beteiligten Reaktionen. In Abhängigkeit der Systemgrenzen erfolgt eine Unterscheidung zwischen **internen** und **externen** Metaboliten [HS96, SELP00]. Metaboliten, die weder akkumulieren noch abnehmen, so dass ihre Produktionsrate der Verbrauchsrate entspricht, werden als interne Metaboliten bezeichnet. Kennzeichnend für interne Metaboliten ist, dass sie explizit in einem metabolischen Modell und damit auch in den stöchiometrischen Reaktionsgleichungen berücksichtigt werden. Im Unterschied dazu stellen externe Metaboliten Stoffwechselquellen und -senken dar [HS96], welche physikalisch außerhalb des Systems aber auch innerhalb der Zelle lokalisiert sein können. Für ein optimierungsbasiertes Modell lässt sich ein Metabolit formal durch die Angabe des Metabolitnames beschreiben.

Interne Reaktionen	Austauschreaktionen
$R_1: 1 A \rightarrow 1 C$	$T_1: 1 A_{ext} \rightarrow 1 A$
$R_2: 1 A \rightarrow 1 B$	$T_2: 1 C \rightarrow 1 C_{ext}$
$R_3: 1 B \rightarrow 1 C$	

Tabelle 1: Liste der stöchiometrischen Reaktionsgleichungen der metabolischen Reaktionen und Transportprozesse des in Abbildung 6 dargestellten Beispielnetzwerks

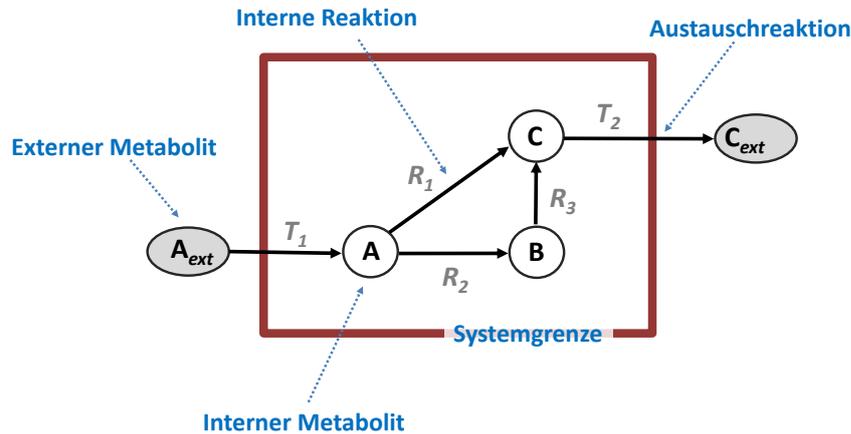


Abbildung 6: Einfaches biochemisches System. Beispielnetzwerk zur Veranschaulichung der mathematischen Grundlagen. Metaboliten sind als Knoten und Reaktionen als Pfeile dargestellt

REAKTIONEN Reaktionen eines biochemischen Systems umfassen enzymatische Reaktionen, spontane Reaktionen und Transportreaktionen. In Abhängigkeit der Systemgrenzen erfolgt eine Unterscheidung zwischen **internen Reaktionen** und **Austauschreaktionen** [SH94]. Reaktionen, deren Substrate und Produkte mindestens einen internen Metaboliten enthalten, werden als interne Reaktionen bezeichnet. Im Unterschied dazu sind alle konsumierten Substrate oder Produkte einer Austauschreaktion extern. Austauschreaktionen ermöglichen den Stofftransport über die Systemgrenzen und stellen damit eine Verbindung zwischen dem System und seiner Umgebung dar. Für ein optimierungsbasiertes Modell lässt sich eine Reaktion formal durch folgende Angaben beschreiben: (i) Reaktionsname, (ii) Edukte und Produkte, (iii) Stöchiometrische Reaktionsgleichung und (iv) Reaktionsrichtung⁷.

In Abbildung 6 ist ein einfaches biochemisches System, bestehend aus fünf Reaktionen, dargestellt. Das Stoffwechselsystem umfasst die Aufnahme des externen Metaboliten A_{ext} , sowie vier Reaktionen (T_1 , R_1 , R_2 , R_3), die zur Bildung der internen Metaboliten A, B und C führen. Der synthetisierte Metabolit C wird exportiert (C_{ext}). Insgesamt umfasst das System drei interne Metaboliten (A, B, C), drei interne Reaktionen (R_1 , R_2 , R_3) und zwei Austauschflüsse (T_1 , T_2). Tabelle 1 gibt die Liste der stöchiometrischen Reaktionsgleichungen der biochemischen Reaktionen und Transportprozesse des biochemischen Systems wieder. Diese Reaktionsliste ist ausreichend, um ein stöchiometrisches Modell des in Abbildung 6 dargestellten biochemischen Systems vollständig zu charakterisieren.

2.3.1.2 Modellparameter und -variablen

Die mathematische Formulierung metabolischer Modelle basiert auf Modellvariablen und Modellparameter, deren Zusammenhang durch die Modellgleichungen beschrieben werden.

MODELLPARAMETER Als Modellparameter wird eine variable Größe bezeichnet, die abhängig von der Modellumgebung zu definieren ist. Im Unterschied zu einer Konstanten ist ein Modellparameter für eine gegebene Modellsimulation fest, kann für die nächste Simulation aber variiert werden. Zu den Modellparametern eines optimierungsbasierten Modells gehören die stöchiometrischen Koeffizienten, festgesetzte Reaktionsraten sowie alle anderen Modelldaten, denen ein fester Wert zugewiesen werden kann.

⁷ Die Angabe der Reaktionsrichtung erfolgt auf Grundlage der Information über die Reversibilität/Irreversibilität einer gegebenen Reaktion.

MODELLVARIABLEN Als Modellvariablen werden Modelldaten bezeichnet, die während einer Simulation ihren Wert verändern. Die Modellvariablen eines optimierungsbasierten Modells sind die simulierten Reaktionsraten.

2.3.1.3 Modellsimulation

Die Durchführung von Simulationsexperimenten mit einem Modell wird als Modellsimulation bezeichnet. Ziel einer Simulation ist die Analyse des Systemverhaltens. Die Modellsimulation beruht damit auf der Anwendung qualitativer oder quantitativer Analyseverfahren (siehe Abschnitt 2.3.3) unter Vorgabe eines Parametersatzes. Ein Parametersatz enthält die für eine Modellsimulation festgesetzten Parameterwerte (Modellparameter, siehe Abschnitt 2.3.1.2). Die sequentielle Abfolge von Modellsimulationen auf Grundlage einer schrittweisen Änderung eines oder mehrere Modellparameter wird als sequentielle Modellsimulation bezeichnet.

2.3.1.4 Stöchiometrische Matrix

Mathematisch lässt sich die Struktur eines biochemischen Systems anhand der stöchiometrischen Matrix darstellen. Die Stöchiometrische Matrix S ist eine $m \times n$ Matrix, in der die Reihen den internen Metaboliten m und die Spalten den Reaktionen n des biochemischen Systems entsprechen. Externe Metaboliten werden nicht in S dargestellt. Ein Element S_{ij} in S entspricht dem stöchiometrischen Koeffizienten des i -ten internen Metaboliten der j -ten Reaktion, hierbei gilt:

$$S_{ij} = \begin{cases} +\alpha, & \text{falls Reaktion } j \text{ } \alpha \text{ Moleküle von } i \text{ in Hinrichtung produziert.} \\ -\alpha, & \text{falls Reaktion } j \text{ } \alpha \text{ Moleküle von } i \text{ in Hinrichtung konsumiert.} \\ 0, & \text{falls Reaktion } j \text{ Molekül } i \text{ weder produziert noch konsumiert.} \end{cases}$$

Die stöchiometrische Matrix des Beispielsystems dargestellt in Abbildung 6 sieht wie folgt aus:

$$\begin{array}{c} \text{A} \\ \text{B} \\ \text{C} \end{array} \begin{array}{ccccc} \text{R}_1 & \text{R}_2 & \text{R}_3 & \text{T}_1 & \text{T}_2 \\ \left(\begin{array}{ccccc} -1 & -1 & 0 & +1 & 0 \\ 0 & +1 & -1 & 0 & 0 \\ +1 & 0 & +1 & 0 & -1 \end{array} \right) = S \end{array}$$

2.3.1.5 Dynamische Massenbilanz

Mathematisch lässt sich die Dynamik eines biochemischen Systems anhand eines dynamischen Massenbilanzgleichungssystems beschreiben. Hierzu wird für jeden Metaboliten (X_i) des Systems eine dynamische Massenbilanzgleichung geschrieben, wodurch ein Differentialgleichungssystem erzeugt wird, das den zeitlichen Verlauf der Metabolitkonzentrationen beschreibt [HS96].

Die Massenbilanz eines Metaboliten X_i , die der Änderung der Metabolitkonzentration über die Zeit (dX_i/dt) entspricht, ist definiert als Differenz zwischen seiner Produktions- und Konsumtionsrate(n) und lässt sich mathematisch wie folgt darstellen:

$$\frac{dX_i}{dt} = v_{\text{prod}} - v_{\text{con}}, \quad (2.4)$$

wobei X_i der Metabolitkonzentration und v_{prod} und v_{con} der Produktions- bzw. Konsumtionsrate des Metaboliten X_i entsprechen.

Angewandt auf das Beispielnetzwerk lässt sich folgendes System miteinander verbundener Differentialgleichungen formulieren:

$$\frac{dA_i}{dt} = b_1 - v_1 - v_2$$

$$\frac{dB_i}{dt} = v_2 - v_3$$

$$\frac{dC_i}{dt} = v_1 + v_3 - b_2,$$

wobei v_i der Reaktionsrate (metabolischer Fluss) der jeweiligen internen Reaktion und b_i der Transportrate der jeweiligen Austauschreaktion entspricht. Für ein biochemisches System, das m Metaboliten und n metabolische Flüsse umfasst, lassen sich alle dynamischen Massenbilanzgleichungen anhand einer einzigen Matrixgleichung wie folgt darstellen:

$$\frac{dX_i}{dt} = S \cdot v, \quad (2.5)$$

wobei X_i dem m -dimensionalen Vektor der Metabolitkonzentrationen entspricht, v dem Vektor der n -metabolischen Flüsse und S der stöchiometrischen Matrix des biochemischen Systems. In Matrix-Notation sieht das in 2.5 dargestellte Gleichungssystem wie folgt aus:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} A \\ B \\ C \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -1 & -1 & 0 & +1 & 0 \\ 0 & +1 & -1 & 0 & 0 \\ +1 & 0 & +1 & 0 & -1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ b_1 \\ b_2 \end{bmatrix} \quad (2.6)$$

2.3.1.6 Fließgleichgewicht

Grundlage der constraintbasierten Modellierung ist die Annahme, dass sich ein zu analysierendes metabolisches Netzwerk im Fließgleichgewicht (engl. steady state = stetiger bzw. stationärer Zustand) befindet [HS96, LP08]. Im Fließgleichgewicht ist die Änderung der Menge eines Metaboliten X_i über die Zeit t über alle Reaktionen innerhalb des Systems null ($dx/dt = 0$), das heißt, dass über einen langen Zeitraum betrachtet, Metabolitkonzentrationen und Reaktionsraten konstant sind. Diese Annahme ist relevant für die meisten intrazellulären Reaktionen, da diese typischerweise schneller ablaufen als Zellwachstum und Prozessdynamiken des zellulären Phänotyps [EP98, GK04, LGP06]. Durch die Anwendung dieser Annahme vereinfacht sich Gleichung 2.5 zu [HS96]:

$$S \cdot v = 0 \quad (2.7)$$

Dieses lineare Gleichungssystem erfordert, dass die Produktion und die Konsumtion eines Metaboliten gleich sein müssen. Gleichung 2.7 ist eine grundlegende Nebenbedingung der constraintbasierten Modellierung [LGP06] (siehe Abschnitt 2.3.3).

In biologischen Stoffwechselsystemen ist die Anzahl der Metabolite m in der Regel weit geringer als die Anzahl der Reaktionen n [EP98]. Infolgedessen ist das lineare Gleichungssystem 2.7 unterbestimmt: es gibt eine unendlich große Anzahl möglicher Flussverteilungen, die diese Gleichung erfüllen [KPE03]. Lösungsansätze für dieses Problem bietet die optimierungsbasierte Netzwerkanalyse, siehe Abschnitt 2.3.3.2.

2.3.2 Modellrekonstruktion

Im Folgenden wird eine Einführung in die Rekonstruktion von Stoffwechselmodellen am Beispiel der optimierungsbasierten Modellierung gegeben. Generell wird bei der Erstellung metabolischer Modelle zwischen folgenden zwei Strategien unterschieden:

TOP-DOWN ANSATZ Ausgangspunkt bei der Erstellung metabolischer Modelle auf der Grundlage von top-down Ansätzen ist ein intaktes System, das in Komponenten und Interaktionen zerlegt wird. *Top-down* Ansätze umfassen Methoden zur systemweiten Identifizierung und Formulierung von Beziehungen zwischen den Systemkomponenten, wobei die Ableitung der Interaktionen zwischen den Systemkomponenten auf der Grundlage von *high-throughput*-Daten erfolgt. Die rechnergestützten *top-down* Ansätze ermöglichen eine rasche Rekonstruktion großer Netzwerke, die sich jedoch nicht immer in funktionale, mathematische Modelle umwandeln lassen [TP10].

BOTTOM-UP ANSATZ Die Erstellung metabolischer Modelle auf der Grundlage von *bottom-up* Ansätzen erfolgt komponentenweise, auf der Grundlage von direkten physikalischen Beweisen (u.a. biochemischen, genomischen, proteomischen, bibliomischen Daten). Ein Modell wird erstellt, indem alle bekannten Komponenten und Interaktionen in das Modell integriert werden [Kito2a]. Die quantitative Analyse der erzeugten Modelle führt zu prädiktiven Modellen, die unter anderem für die gezielte Optimierung biotechnologischer Anwendungen eingesetzt werden können [BHBW07, GM08]

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *bottom-up* Ansatz zur Rekonstruktion pflanzenbiologischer FBA-Modelle ausgearbeitet und angewandt, dessen einzelne Schritte im Folgenden näher erläutert werden. Eine schematische Übersicht des 4-stufigen Rekonstruktionsprozesses ist in Abbildung 7 gegeben.

2.3.2.1 Ansatz zur Erstellung pflanzenbiologischer FBA-Modelle

Schritt 1. Modelldefinition

Ausgangspunkt jeder Modellierung ist die Spezifizierung der Fragestellung, die anhand des Modells beantwortet werden soll. Auf Grundlage dieser Zielsetzung, die eine klare Formulierung der Problematik und Hypothesen umfasst, erfolgt die Erstellung eines initialen Modells. Das schematisierte Entwurfsmodell spezifiziert sowohl den Teilbereich des Stoffwechsels, der durch das Modell abgebildet werden soll (Inhalt: Stoffwechselwege; Ort: Organismus, Organ, Kompartimente; Zeitpunkt: Entwicklungszeitpunkt), als auch die Modellgrenzen (Stoffaustausch mit Umgebung). Der initiale Modellentwurf sollte das Verhalten des Systems im Hinblick auf das Ziel der Analyse ausreichend beschreiben und den vollständigen Satz der metabolischen Funktionalität des Modellorganismus (bzw. eine vertretbare Näherung) umfassen.

Schritt 2. Modellverfeinerung und -kuration

Der zweite Schritt der Modellrekonstruktion umfasst die Verfeinerung und Kuration des initialen Entwurfsmodells auf der Grundlage einer umfangreichen Literatur- und Datenbankrecherche. Ausgehend von den zentralen Stoffwechselwegen werden hierbei die einzelnen Reaktionsschritte eines Stoffwechselwegs ermittelt und durch folgende Daten näher spezifiziert: (i) organismusspezifische Existenz der Reaktion, (ii) Reaktionsstöchiometrie inklusive Substrat- und Cofaktorverwendung, (iii) Reaktionsrichtung und (iv) Lokalisierung der Reaktion. Sollten keine organismusspezifischen Daten verfügbar

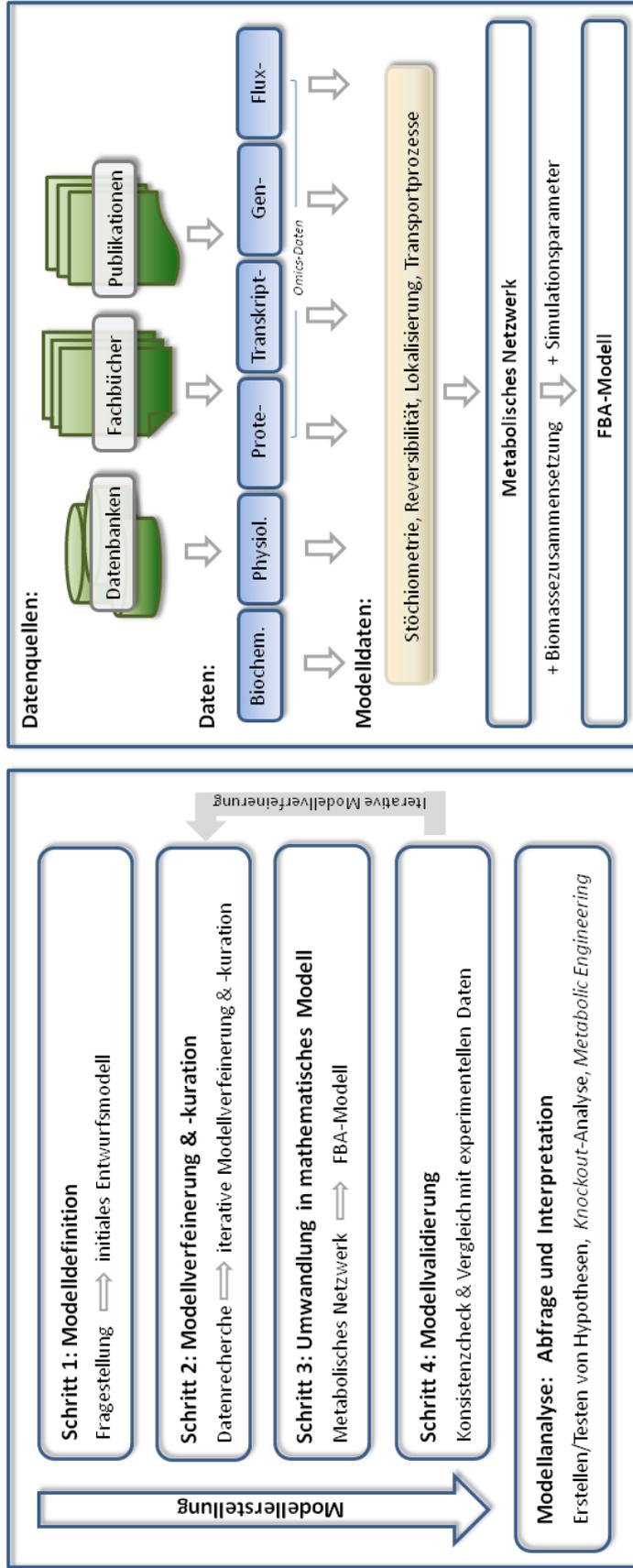


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Rekonstruktion metabolischer Modelle. Die Abbildung fasst die in Abschnitt 2.3.2.1 aufgeführten Schritte zur Rekonstruktion pflanzenbiologischer FBA-Modelle sowie die in Abschnitt 2.3.2.2 aufgeführten Modelldaten und -datenquellen zusammen

sein, werden Daten aus nah-verwandten Arten bzw. organismusspezifische Daten aus anderen Organen oder Entwicklungszeiträumen hinzugezogen. Bei unzureichenden Angaben bezüglich der Reaktionsrichtung bzw. -lokalisierung wird die Reaktionsrichtung als reversibel bzw. cytosolisch festgelegt. Durch die Betrachtung der einzelnen Reaktionen in ihrem metabolischen Kontext (d.h. der Konnektivität der Reaktion mit der metabolischen Umgebung) können Zusatz-Reaktionen identifiziert werden. Diese Reaktionen sind keinem Stoffwechselweg zugeordnet, spielen jedoch für die metabolische Funktionalität des Modellorganismus eine wichtige Rolle. Das Modell wird schrittweise durch die identifizierten Zusatzreaktionen erweitert und durch intra- bzw. extrazelluläre Transportprozesse ergänzt.

Schritt 3. Umwandlung in ein mathematisches Modell

Im dritten Schritt der Modellrekonstruktion wird das in Schritt 2 erzeugte metabolische Netzwerk durch die Integration der für die optimierungsbasierte Analyse notwendigen Simulationsparameter (u.a. maximale Aufnahme-/ Abgaberaten, Zielfunktion, Biomassezusammensetzung) in ein FBA-Modell umgewandelt.

Schritt 4. Modellvalidierung und iterative Verbesserung

Im Rahmen der Modellvalidierung wird das resultierende Modell entsprechend folgender interner Konsistenzkriterien validiert und iterativ verbessert: (i) blockierte Reaktionen (Reaktionen, die unter keiner der Simulationsbedingungen aktiv sind) (ii) *dead-end* Metaboliten (Metaboliten, die entweder nur produziert oder konsumiert werden), (iii) Netzwerklücken (fehlende Reaktion oder Funktion innerhalb des Netzwerks, die eine oder mehrere *dead-end* Metaboliten mit dem restlichen Netzwerk verbindet), (iv) *Demand-, Sink-* Reaktionen als Hilfsmittel zur Netzwerküberprüfung bzw. -fehlersuche. Durch den Vergleich mit experimentellen Ergebnissen erfolgt zusätzlich eine Analyse der grundlegenden metabolischen Modell-Funktionalität (Wachstumsrate, Sekretionsprodukte, Wachstums- & *in silico* *Knockout*-Phänotypen). Der iterative Zyklus aus Modellvalidierung und -verbesserung führt schlussendlich zu einem biologisch relevanten Modell, dessen Gesamtverhalten dem Modellorganismus entspricht und damit als Grundlage für die eigentliche Modellanalyse dienen kann (5. Schritt, siehe Abbildung 7).

2.3.2.2 *Modelldaten und-datenquellen*

Der Erfolg der Modellierung metabolischer Netzwerke ist abhängig von den Daten, die für den Rekonstruktionsprozess zur Verfügung stehen. Die Qualität und Quantität der experimentellen Daten bestimmt nicht nur die Modellrekonstruktion, sondern auch die mögliche Art der Modellvalidierung. Im Folgenden wird ein Überblick über die für die Modellierung von pflanzenbiologischen FBA-Modellen notwendigen Netzwerkdaten und den dazugehörigen Datenquellen gegeben.

Modelldaten

Die für die Erstellung pflanzenbiologischer FBA-Modelle notwendigen Informationen umfassen für jede Netzwerkreaktion Angaben bezüglich: (i) der Reaktionsstöchiometrie, (ii) der Substrat- und Cofaktorverwendung, (iii) der Reaktionsrichtung und (iv) der Lokalisierung der Reaktion inklusive räumlicher (Organ, Gewebe, subzelluläres Kompartiment) und zeitlicher (Entwicklungsstadium) Angaben.

Für die Modellsimulation werden Informationen bezüglich Aufnahme- und Exkretionsraten sowie im Fall von Wachstumssimulationen Informationen bezüglich der Biomassezusammensetzung und des zellulären Energiebedarfes benötigt. Wie aus Abbildung 7

Klassifikation	Datenbank	Netzwerk-/Referenzdaten
Chemische DB	PubChem [WXS ⁺ 09] ChEBI [ChE ₁₂] KEGG COMPOUND [GOH ⁺ 02]	Metabolitinformationen, Literatur
Enzym DB	BRENDA [SGC ⁺ 11] ExPASy-ENZYME [GGH ⁺ 03] KEGG REACTION [KGK ⁺ 04] Rhea [rhe ₁₂] Sabio-Rk [WKG ⁺ 11]	Reaktionsstöchiometrie, -cofak- -toren, -richtung, -lokalisierung, Reaktionswege, Literatur
Protein DB	UniProtKB [MC ₁₁]	Proteinexistenz, -lokalisierung, Literatur
Pathway DB ¹	KEGG [KGF ⁺ 10] MetaCyc [KOMK ⁺ 05] Arabidopsis Reactome [TCH ⁺ 08]	Reaktionsstöchiometrie, -cofak- -toren, -richtung, -lokalisierung, Reaktionswege, Literatur
Membranprotein DB	ARAMEMNON [SSvdG ⁺ 03]	Transporterinformationen, Lokalisierung, Literatur
Literatur DB	Pubmed [pub ₁₂] ISI Web of Knowledge [web ₁₂]	Literaturreferenzen

Tabelle 2: Online-Ressourcen zur Modellrekonstruktion. Abkürzungen: DB: Datenbank. ¹: Eine ausführliche Auflistung von Pathwaydatenbanken mit pflanzenbiologischen Stoffwechseldaten erfolgt in Abschnitt 3.2.2.2

ersichtlich, können diese Informationen auf der Grundlage unterschiedlicher experimenteller Daten erhoben werden. Eine hierarchische Klassifizierung der experimentellen Datentypen entsprechend ihrer Beweiskraft ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Datenquellen

Hauptdatenquellen bei der Erstellung pflanzenbiologischer FBA-Modelle sind die Primärliteratur (Fachbücher, wissenschaftliche Veröffentlichungen, etc.) sowie Online-Datenbanken. Tabelle 2 gibt einen Überblick über wesentliche Online-Ressourcen sowie den darin verfügbaren Netzwerk- bzw. Referenzdaten.

2.3.2.3 Modellkopplung: Verknüpfung pflanzenbiologischer FBA-Modelle

Voraussetzung für die Kopplung stöchiometrischer Stoffwechselmodelle ist das Vorhandensein von Schnittstellen, die den Stoffaustausch und damit die Verbindung zwischen den Stoffwechselprozessen der Einzelmodelle gewährleisten. Aus biologischer Sicht erfolgt der Stoffaustausch zwischen Zellorganellen, Geweben und Organen über aktive bzw. passive Transportprozesse, die sich mathematisch anhand von Transportreaktionen modellieren lassen. Die Verknüpfung stöchiometrischer Stoffwechselmodelle erfolgt damit durch die Integration von Einzelmodellen in ein Gesamtmodell, wobei die Verbindung (der Stoffaustausch) zwischen den Einzelmodellen durch die Integration entsprechender Transportreaktionen gewährleistet wird. Mathematisch basiert dies auf der Integration verschiedener (nicht-)linearer Gleichungssysteme (ein Einzelmodell = ein Gleichungssystem) in ein (nicht-)lineares Gesamtgleichungssystem.

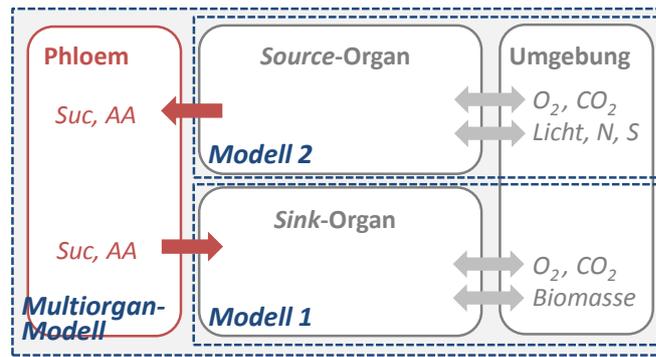


Abbildung 8: Kopplung pflanzenbiologischer FBA-Modelle. Das Phloem, welches den Stoffaustausch (u.a. Suc, AA) zwischen Source- und Sink-Organen gewährleistet, dient als Schnittstelle für die Kopplung organspezifischer Stoffwechsel des Primärstoffwechsels von Gerste. *Abkürzungen:* AA: Aminosäuren; N: Stickstoffkomponenten; S: Schwefelkomponenten; Suc: Saccharose

In der vorliegenden Arbeit wurden organspezifische Modelle des Primärstoffwechsels von Gerste zu einem Multiorgan-Modell kombiniert, indem das Phloem (siehe Abschnitt 2.1.2.3) als Schnittstelle zwischen den Stoffwechselprozessen der Einzelorgane eingeführt wurde. Als Organ, welches den Transport von Kohlenstoff- und Stickstoffkomponenten zwischen den verschiedenen Pflanzenorganen vermittelt, stellt das Phloem den für die Modellkopplung notwendigen Stoffaustausch zwischen den Einzelorganen bzw.-modellen her (siehe Abbildung 8).

2.3.3 Modellanalyse

Im Folgenden wird eine Einführung in die Analyse von Stoffwechselmodellen am Beispiel der constraintbasierten Modellanalyse gegeben. Die constraintbasierte Modellierung umfasst zwei Hauptansätze: (i) die pathwaybasierte Netzwerkanalyse und (ii) die optimierungsbasierte Netzwerkanalyse.

2.3.3.1 Pathwaybasierte Netzwerkanalyse

Grundlage der pathwaybasierten Netzwerkanalyse [SSPH99, KSo3, PSP⁺04, LPo8] ist die Berechnung aller möglichen Reaktionswege durch ein gegebenes Netzwerk, mit dem Ziel, die gesamten metabolischen Systemeigenschaften und -funktionalitäten zu charakterisieren. Folgende Ansätze werden der pathwaybasierten Netzwerkanalyse zugeordnet:

ELEMENTARY MODES ANALYSIS (EMA) Ein *Elementary Mode* (EM) ist definiert als stationäre Flussverteilung, an der eine minimale Menge an Reaktionen beteiligt ist [SH94]. Er entspricht damit einer elementaren Stoffwechselfunktion, die ein biochemisches System erfüllen kann.

EXTREME PATHWAYS ANALYSIS (EPA) *Extreme Pathways* (EPs), definiert von Schilling *et al.* [SLP00], stellen eine Untermenge der *Elementary Modes* dar. Ein wesentlicher Unterschied zwischen EMs und EPs besteht darin, dass reversible Reaktionen bei EPs in eine Vor- und Rückreaktion aufgesplittet sind, so dass alle Flüsse nur nicht-negative Werte annehmen können.

Für eine tiefer gehende Einführung in die Konzepte der pathwaybasierten Netzwerkanalyse sei auf die entsprechende Literatur verwiesen (EMA: [SH94, SDF99, SFD00, SHWF02], EPA: [SLP00, PSP⁺04]).

Ein weiterer Ansatz, der viele Parallelen zu der hier vorgestellten pathwaybasierten Netzwerkanalyse hat, ist die Petrinetz-Theorie [ZOS03]. Neben einer formalen und klaren Darstellung von Netzwerken unterschiedlichen Abstraktionsgrads sowie deren Animation ermöglichen Petrinetze die Charakterisierung verschiedener statischer und dynamischer Netzwerkeigenschaften (u.a. Fallen, Verklemmungen, Lebendigkeit) die für die Modellierung biochemischer Prozesse von Bedeutung sind [Oano3, KHo8]. In der Petrinetz-Theorie entsprechen die *Elementary Modes* den minimalen nicht-negativen T-Invarianten [Oano3], die analog zu den *Elementary Modes* der minimalen Menge an Enzymen entsprechen, die im Fließgleichgewicht wirken. Das Konzept der minimalen T-Invarianten stellt die Grundlage der Modellvalidierung biochemischer Petrinetze dar [KHo8]. Für eine tiefer gehende Einführung in die Thematik der Petrinetz-Anwendung auf dem Gebiet der biologischen Netzwerkanalyse sei auf [HRo4, Chao7, KHo8] verwiesen.

2.3.3.2 Optimierungsbasierte Netzwerkanalyse

Die optimierungsbasierte Netzwerkanalyse stellt den Hauptansatz der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Modellanalyse dar. Grundlage der optimierungsbasierten Netzwerkanalyse ist die Annahme, dass sich ein gegebenes Netzwerk optimal hinsichtlich einer Zielvorgabe verhält. Ein Hauptansatz der optimierungsbasierten Netzwerkanalyse ist die *Flux Balance Analysis* (FBA). Unter der Annahme, dass sich ein betrachtetes metabolisches System im Fließgleichgewicht befindet, ermöglicht die FBA die Vorhersage von Flussverteilungen über alle Reaktionen des Systems unter Anwendung linearer und nichtlinearer Optimierung. Unter Vorgabe einer linearen Zielfunktion, stellt

die FBA folgendes lineare Optimierungsproblem dar⁸ (siehe Abschnitt 2.2.1.1 über lineare Optimierung):

$$\min c^T v \quad (2.8)$$

unter den Nebenbedingungen

$$S \cdot v = 0 \quad (2.9)$$

$$v_i^{\min} \leq v_i \leq v_i^{\max} \text{ für } i = 1, \dots, n \quad (2.10)$$

für $c \in \mathbb{R}^n$, $S \in \mathbb{R}^{m \times n}$ und $v \in \mathbb{R}^n$. Hierbei entspricht n der Anzahl der Reaktionen des modellierten Systems, S der stöchiometrischen Matrix ($m \times n$), v ($n \times 1$) dem Vektor der n metabolischen Flüsse und die Grenzen v_i^{\min} und v_i^{\max} den minimalen und maximalen Flusskapazitäten und damit der zulässigen Bandbreite der Flüsse. Das Ergebnis der FBA ist eine diskrete optimale Flussverteilung in Form eines Flussvektors v , welcher die Zielfunktion Z maximiert oder minimiert.

Zielfunktion

Die Auswahl einer biologisch relevanten Zielfunktion, die das Stoffwechselverhalten des zu analysierenden lebenden Systems möglichst wirklichkeitsnah wiedergibt, ist ein wesentlicher Schritt der *Flux Balance Analysis*. Im Folgenden wird ein Überblick über die wesentlichen in der Literatur aufgeführten Zielfunktionen gegeben:

Die Grundannahme der meisten bisher veröffentlichten Anwendungsstudien besteht darin, dass die *Maximierung der Biomasseproduktion* das Hauptanliegen zellulärer Stoffwechselsysteme ist [VP94b, EP00a, SCF⁺02, PRP04]. Auf Grundlage einer guten Übereinstimmung zwischen *in silico* und *in vivo* Verhalten konnte in verschiedenen Studien die Eignung dieser Zielfunktion zur Vorhersage des *in vivo* zellulären Verhaltens unterschiedlicher biologischer Systeme nachgewiesen werden (u.a. [EIP01, IEP02]). Mathematisch ist diese Zielfunktion wie folgt definiert [VP94a]:

$$\max v_{BM}, \quad (2.11)$$

wobei v_{BM} dem Wachstumsfluss entspricht. Unter Vorgabe einer Basis von einem Gramm Trockengewicht pro Stunde reduziert sich der Wachstumsfluss zu der Wachstumsrate μ (Gramm Biomasse produziert pro Gramm Trockengewicht pro Stunde: $\text{g g}^{-1} \text{ TG h}^{-1} = \text{1/h}$). Wachstum bzw. die Produktion von Biomasse wird dabei wie folgt als Einzelreaktion (Biomassereaktion) modelliert:

$$\sum_{\text{alle } M} d_M \cdot M \xrightarrow{v_{BM}} \text{Biomasse}, \quad (2.12)$$

wobei M der Menge der für die Biomassesynthese notwendigen biosynthetischen Ausgangsstoffen und Cofaktoren und d_M dem Bedarf (Einheit: mmol/g BM) der einzelnen Komponenten für die Synthese von einem Gramm Biomasse entspricht. Neben dem Bedarf an Materie (biosynthetische Ausgangsstoffe) erfordert die Biomasseproduktion Energie (Cofaktoren) für das Wachstum und den Erhalt der Biomasse. In Bezug auf die Erhaltungsenergie wird zwischen wachstums- und nicht-wachstumsassoziiertes Erhaltungsenergie (engl. growth/non-growth associated maintenance energy) unterschieden.

⁸ Durch Transformation kann Gleichung 2.8 in die Standardform (Gleichung 2.2) überführt werden.

Für ein ausführliches Beispiel der Herleitung und Definition einer Biomassereaktion sei auf den Anhang (Abschnitte A.3.2.2 und A.4.2.2) verwiesen.

Weitere, in unterschiedlichen Studien angewandte Zielfunktionen, umfassen [EP98] (i) die *Minimierung der Nährstoffaufnahme*, mit dem Ziel, die Menge vorhandener Nährstoffe, die von einem lebenden System zur Aufrechterhaltung seiner metabolischen Funktionalität benötigt werden, zu minimieren, (ii) die *Minimierung der ATP-Produktion*, mit dem Ziel, die optimale metabolische Effizienz zu ermöglichen, (iii) die *Minimierung des Gesamtflusses*, mit dem Ziel, eine effiziente Steuerung der Metaboliten durch ein gegebenes metabolisches Netzwerk zu gewährleisten und (iv) die *Maximierung ausgewählter Metaboliten*, mit dem Ziel, die Produktionsfähigkeit für ein gegebenes metabolisches Netzwerk zu bestimmen.

Alternative Optima

In Abhängigkeit der Zielfunktion und der Form des Lösungsraums kann die lineare Optimierung zu Mehrfachlösungen (alternative Optima, siehe Abschnitt 2.2.1.1) führen. Eine Möglichkeit, das Auftreten alternativer Optima zu minimieren, besteht in der Anwendung einer nichtlinearen Optimierung mit streng konvexer Zielfunktion, siehe Abschnitt 2.2.1.2.

Ein Beispiel für eine streng konvexe Zielfunktion ist die *Minimierung des Gesamtflusses*. Analog zu der Minimierung der quadrierten Euklidischen Norm lässt sich diese Zielfunktion mathematisch wie folgt darstellen:

$$\min \sum_{i=1}^n v_i^2 \quad (2.13)$$

unter den Nebenbedingungen 2.9 und 2.10. Aus biologischer Sicht gewährleistet die Minimierung der Quadratsumme aller Flüsse maximale enzymatische Effizienz und damit eine ökonomische Nutzung der vorhandenen Ressourcen [BHM⁺96, Holo4, BKS05].

Zweistufige Optimierung

Mit dem Ziel, das Auftreten alternativer Optima zu minimieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die *Minimierung des Gesamtflusses* als Teilschritt einer zweistufigen Optimierung eingesetzt. In Anlehnung an einen von Çakir *et al.* [cASuKOU07] entwickelten Ansatz wurde hierzu die nichtlineare Optimierung mit streng konvexer Zielfunktion wie folgt mit einer linearen Optimierung kombiniert:

	Optimierung	Zielfunktion	Math. Definition
1. Schritt:	linear	siehe Text	siehe Text
2. Schritt:	nichtlinear	Min Gesamtfluss	$\min \sum_{i=1}^n v_i^2$

Tabelle 3: Mathematische Definition der zweistufigen Optimierung

Im Rahmen der linearen Optimierung wurden je nach Fragestellung unterschiedliche Zielfunktionen eingesetzt. Eine detaillierte Beschreibung dieser Zielfunktionen ist in den jeweiligen Kapiteln gegeben.

Für die Berechnung der nichtlinearen Optimierung wird der Zielfunktionswert z der ersten linearen Optimierung wie folgt als zusätzliche Nebenbedingung in die zweite Optimierung einbezogen:

$$c^T \cdot v = z \quad (2.14)$$

Eine weiterführende Erläuterung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten zweistufigen Optimierung ist in den jeweiligen Kapiteln (siehe Abschnitt 4.2.1, 4.3.1, 4.4.1, 5.2.1 und 5.3.1) gegeben.

Methoden der optimierungsbasierten Netzwerkanalyse

Im Folgenden wird eine kurze Einführung in Methoden der optimierungsbasierten Netzwerkanalyse, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden, gegeben. Für eine Einführung in weitere Methoden der optimierungsbasierten Netzwerkanalyse sei auf die entsprechende Literatur (u.a. [PRP04]) verwiesen.

1. Evaluation optimaler Zustände

Eine Möglichkeit, den optimalen Lösungsraum bzw. die Bandbreite alternativer Optima zu charakterisieren, besteht in der Anwendung einer Flussvariabilitätsanalyse.

FLUSSVARIABILITÄTSANALYSE (FVA) Für einen gegebenen optimalen Zustand z^{opt} wird auf Grundlage der Flussvariabilitätsanalyse (engl. flux variability analysis) [MS03] der minimal und maximal mögliche Fluss für jede Reaktion des zu untersuchenden Systems berechnet, indem für einen gegebenen Fluss v_i folgende zwei lineare Optimierungsprobleme gelöst werden:

1. Optimierungsproblem:

$$\min v_i \quad (2.15)$$

unter den Nebenbedingungen 2.9, 2.10 und

$$c^T \cdot v = z^{\text{opt}} \quad (2.16)$$

wobei z^{opt} dem Zielfunktionswert der ursprünglichen Zielfunktion Z^{opt} entspricht.

2. Optimierungsproblem:

$$\max v_i \quad (2.17)$$

unter den Nebenbedingungen 2.9, 2.10 und 2.16

2. Variation von Modellparametern

Die Sensitivität der optimalen Eigenschaften eines modellierten Systems kann untersucht werden, indem Modellparameter über eine gegebene Bandbreite von Werten verändert und der optimale Zustand wiederholt berechnet wird. Die Modellparameter umfassen (i) Umwelt- bzw. Wachstumsparameter, definiert durch die Austauschflüsse, und (ii) genetische Parameter, die durch die internen Flüsse des zu untersuchenden Systems definiert sind. Folgende optimierungsbasierte Analysemethoden beruhen auf einer Variation von Umweltparametern und/oder genetischen Parametern.

ROBUSTHEITSANALYSE (RA) Mittels einer Robustheitsanalyse (engl. robustness analysis) [VP93, EP00b] kann der Effekt, den die Variation eines einzelnen Modellparameters auf eine gegebene Zielfunktion Z ausübt, ermittelt werden.

Die Variation eines Parameters v_j zwischen den Werten a und b in l Schritten kann dabei wie folgt berechnet werden [Palo6a]:

$$\max c^T v^k \quad (2.18)$$

unter den Nebenbedingungen 2.9 und

$$v_i^{\min} \leq v_i \leq v_i^{\max} \text{ für } i = 1, \dots, n \text{ und } i \neq j, \quad (2.19)$$

$$v_j = p_k, \quad (2.20)$$

wobei p_k in l Schritten zwischen a und b , das heißt, von $p_1 = a$ bis $p_l = b$ mit $p_{k+1} = p_k + (b - a/l - 1)$, variiert wird. Als Ergebnis erhält man eine Serie von l Werten für Z ($Z_k, k \in [1, l]$) sowie die entsprechenden Flussverteilungen.

SENSITIVITÄT UND SENSITIVITÄTSKURVE Die Sensitivität (ST) der Zielfunktion in Bezug auf die Variation eines gegebenen Parameters lässt sich wie folgt berechnen:

$$ST = \frac{z^{\text{opt}}}{z^p}, \quad (2.21)$$

wobei z^{opt} dem Zielfunktionswert der Optimierung ohne und z^p dem Zielfunktionswert der Optimierung mit Parametervariation entspricht. Die Kurve, die sich aus der Berechnung der Sensitivität über eine Bandbreite von Parameterwerten ergibt, wird als Sensitivitätskurve (STK) bezeichnet.

SCHATTENPREISANALYSE Der Schattenpreis (engl. shadow price) gibt an, ob der optimale Zustand eines modellierten Systems durch die Verfügbarkeit eines gegebenen Metabolit limitiert ist. Mathematisch ist der Schattenpreis (γ_i) definiert als die schrittweise Änderung der Zielfunktion (Z) in Bezug auf die schrittweise Änderung eines Austauschflusses (b_i) [ERP02]:

$$\gamma_i = \frac{-\Delta z}{\Delta b_i}, \quad (2.22)$$

wobei z dem Zielfunktionswert entspricht. Der dimensionslose Schattenpreis kann negativ, null oder positiv sein, wobei ein negativer Schattenpreis anzeigt, dass ein Metabolit limitierend ist (d.h. eine Zunahme des Metabolit bedingt eine Zunahme der Zielfunktion) und ein positiver Schattenpreis anzeigt, dass ein Metabolit im Überschuss vorhanden ist.

PHPP-ANALYSE Die Analyse einer phänotypischen Phasenebene (engl. phenotypic phase plane: PhPP) [EP99, SELP00, ERP02] ermöglicht die Darstellung der Bandbreite der optimalen Flussverteilung in Abhängigkeit variabler Umweltbedingungen [EIP01, ERP02]. Die Variation der Umweltbedingungen beruht dabei auf der simultanen Variation von zwei Aufnahmeraten. Für die Berechnung der PhPP werden die zu untersuchenden Umweltparameter als Achsen einer (x,y) -Ebene definiert und die optimale Flussverteilung für alle Punkte der Ebene berechnet. In der PhPP existiert eine endliche Anzahl qualitativ verschiedener optimaler Flussverteilungen, das

heißt, einem unterschiedlichen Muster an genutzten Stoffwechselwegen und damit einem unterschiedlich funktionellem Zustand bzw. phänotypischem Verhalten. Die Abgrenzung von Bereichen mit unterschiedlichem phänotypischen Verhalten (phänotypischen Phasen) erfolgt auf der Grundlage einer Schattenpreisanalyse, indem die Schattenpreise der Umweltparameter, welche die Achsen der PhPP definieren, für den 2-Parameter-Raum berechnet werden. Da der Schattenpreis innerhalb einer phänotypischen Phase konstant und zwischen Phasen unterschiedlich ist, können auf der Grundlage von Änderungen des Schattenpreises Grenzlinien gezogen werden, welche die phänotypischen Phasen innerhalb der Phasenebene separieren [ERP02]. Für eine weiterführende Einführung in das Konzept der PhPP-Analyse sei auf die entsprechende Literatur [EP99, SELP00, ERP02] verwiesen.

KNOCKOUT-ANALYSE *In silico Knockout-Analysen* (d.h. Enzym- bzw. Gendelektionen) sind eine effiziente Methode, um Aussagen bezüglich der Essentialität von Reaktionen innerhalb eines metabolischen Netzwerks treffen zu können und um Einblicke in metabolische Änderungen, die durch einen *Knockout* verursacht werden, zu erhalten. Formal lässt sich die *Knockout*-Analyse wie folgt als Optimierungsproblem formulieren:

$$\max c^T v^{\text{del}} \text{ bzw. } \min c^T v^{\text{del}} \quad (2.23)$$

unter den Nebenbedingungen 2.9, 2.19 und

$$v_j = 0, \quad (2.24)$$

wobei v_j dem Fluss der deletierten Reaktion und v^{del} ($n \times 1$) dem Ergebnis der *Knockout*-Analyse in Form einer diskreten optimalen Flussverteilung über alle Reaktionen des Systems entsprechen.

3.1 MODELLIERUNGSPipeline

Mit dem Ziel, die optimierungsbasierte Analyse pflanzenbiologischer Stoffwechselmodelle zu unterstützen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Modellierungspipeline zur Rekonstruktion, Analyse und Visualisierung von Stoffwechselmodellen entwickelt. Im Folgenden wird ein Überblick über die einzelnen Teilschritte der Modellierung sowie den dabei eingesetzten Softwarekomponenten gegeben. Abbildung 9 gibt eine schematische Darstellung der Modellierungspipeline wieder.

3.1.1 Modellierung pflanzenbiologischer Stoffwechselmodelle

Die Modellierung pflanzenbiologischer Stoffwechselmodelle kann in folgende Teilschritte untergliedert werden: (i) Datenrecherche, (ii) Modellrekonstruktion, (iii) Modellsimulation und -analyse und (4) Visualisierung der Simulationsergebnisse (siehe Abbildung 9). Ausgangspunkt der Modellierung pflanzenbiologischer Stoffwechselmodelle ist eine umfangreiche Datenrecherche, in deren Verlauf die für die Modellrekonstruktion notwendigen metabolischen Netzwerkdaten erfasst und strukturiert verwaltet werden. Die Rekonstruktion der Stoffwechselmodelle erfolgt durch eine schrittweise Integration der Netzwerkdaten zu mathematischen Modellen¹. Im Rahmen der anschließenden Modellanalyse erfolgt eine Simulation der erstellten Modelle und Analyse der Simulationsergebnisse. Ein wichtiger Bestandteil der Modellanalyse stellt die visuelle Exploration der Simulationsergebnisse (Visualisierung) dar.

3.1.2 Softwarekomponenten

Die einzelnen Teilschritte der Modellierung werden durch folgende Softwarekomponenten unterstützt:

METACROP (<http://metacrop.ipk-gatersleben.de>) [GBWK⁺o8] ist ein Informationssystem zur Verwaltung und Repräsentation metabolischer Netzwerkdaten in Pflanzen. Neben einer detaillierten Repräsentation biochemischer Reaktionen und Reaktionswege des Primärstoffwechsels mono- und dikotyle Kulturpflanzen, unterstützt das System die Rekonstruktion, Verwaltung und den Export individueller, nutzerspezifischer Netzwerkmodelle. Die in METACROP verfügbaren biochemischen Reaktionen und Reaktionswege lassen sich mit Hilfe eines SBML-Exporters zu nutzerspezifischen Modellen zusammenfassen und über das Standardaustauschformat SBML² in externe Analyse- und Simulationstools oder direkt in das VANTED Add-on FBA-SIMVIS übertragen.

¹ Neben den hier aufgeführten Teilschritten der Datenrecherche und Modellrekonstruktion lässt sich der Prozess der Modellerstellung in weitere Teilschritte untergliedern, siehe Abschnitt 2.3.2.1.

² SBML (engl. systems biological mark-up language) ist ein auf XML basierendes Datenaustauschformat zur Repräsentation biochemischer Modelle

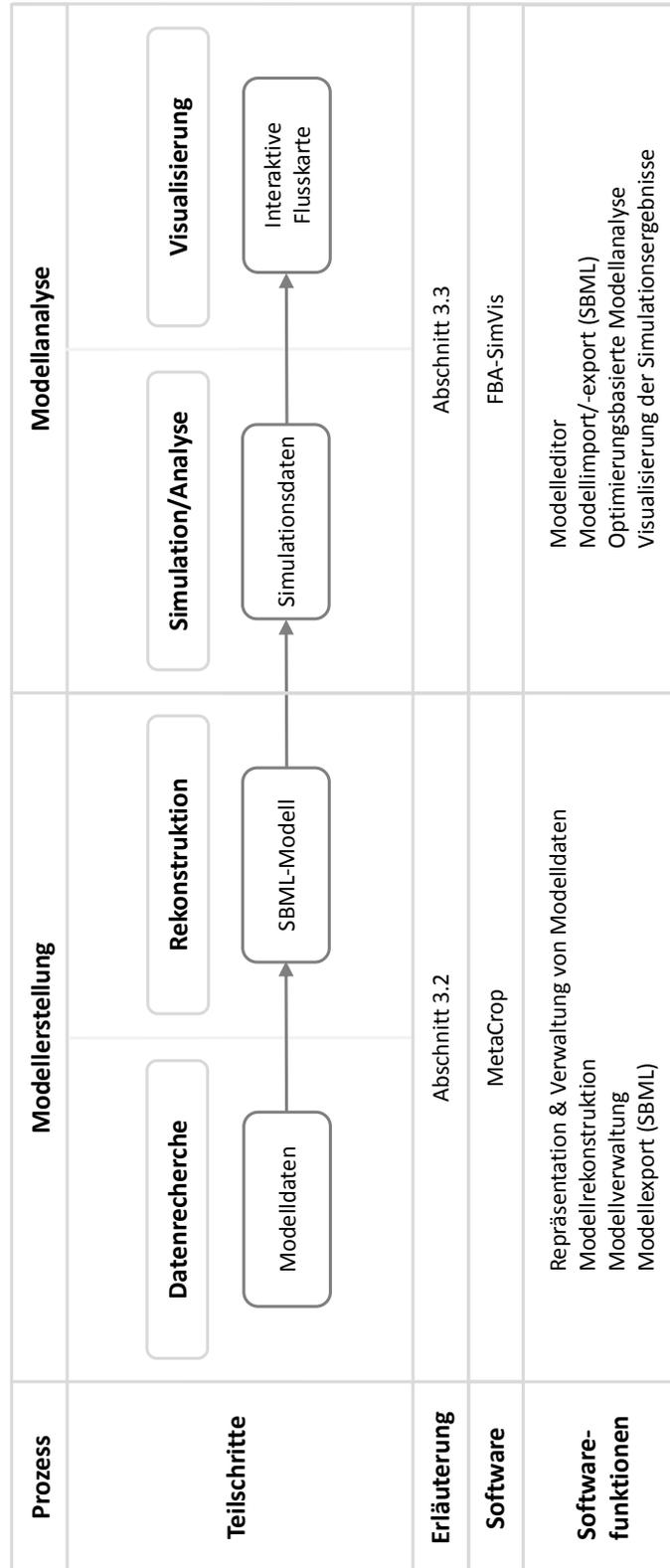


Abbildung 9: Schematische Darstellung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Pipeline zur optimierungsbasierten Modellierung pflanzenbiologischer Stoffwechselprozesse. Die Darstellung umfasst die einzelnen Teilschritte der Modellerstellung und -analyse, die eingesetzten Softwarekomponenten, sowie deren Funktionalitäten

FBA-SIMVIS (<http://fbasimvis.ipk-gatersleben.de>) [GBKJS09] ist ein VANTED Add-on zur optimierungsbasierten Analyse von Stoffwechselmodellen mit dem Schwerpunkt der visuellen Darstellung und Analyse von metabolischen Flüssen. Die Software unterstützt die Rekonstruktion, Analyse und Visualisierung optimierungsbasierter Modelle durch Programmfunktionen zur (i) grafischen Modellrekonstruktion, (ii) optimierungsbasierten Modellanalyse und (iii) interaktiven Visualisierung der Simulationsergebnisse. Extern erzeugte Modelle können über das Standardaustauschformat SBML in FBA-SIMVIS importiert werden.

Eine detaillierte Beschreibung der entwickelten Softwarekomponenten zur Modellrekonstruktion (METACROP) und Modellanalyse (FBA-SIMVIS) erfolgt in den Abschnitten 3.2 und 3.3.

3.1.3 Workflow

Ein typisches Anwendungsbeispiel der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Modellierungspipeline sieht wie folgt aus:

Ein pflanzenbiologisches Stoffwechselmodell wird auf Grundlage der in METACROP verfügbaren metabolischen Modelldaten in METACROP erstellt und über das Austauschformat SBML in das VANTED Add-on FBA-SIMVIS übertragen. In FBA-SIMVIS erfolgt eine optimierungsbasierte Modellanalyse (z.B. *Flux Balance Analysis*) sowie interaktive Visualisierung der Simulationsergebnisse in Form einer netzwerkintegrierten Darstellung der berechneten Flussprofile.

Eine detaillierte Beschreibung weiterer Anwendungsbeispiele erfolgt in den Kapiteln 4 und 5.

3.2 MODELLERSTELLUNG

3.2.1 *Motivation*

Die Rekonstruktion pflanzenbiologischer FBA-Modelle erfordert detaillierte Stoffwechselinformationen, die auf Grundlage einer umfangreichen Literatur- und Datenbankrecherche erhoben werden. Der arbeits- und zeitintensive Prozess der manuellen Datenrecherche kann durch die Nutzung von metabolischen Informationssystemen, die ein breites Spektrum der für die Modellierung notwendigen Netzwerkdaten abdecken, vereinfacht werden. Von Bedeutung sind hierbei metabolische Datenbanken (engl. metabolic pathway databases), die umfassende Informationen über Metaboliten, Enzyme, biochemische Reaktionen und Reaktionswege enthalten [Kar98, KKPW99, WB01].

3.2.2 *Anforderungsanalyse*

Mit dem Ziel, die Rekonstruktion pflanzenbiologischer Stoffwechselmodelle durch die Nutzung metabolischer Informationssysteme zu vereinfachen, wurden Anforderungen hinsichtlich der Modellierung pflanzenspezifischer Netzwerke ausgearbeitet und bestehende Systeme im Hinblick auf diese Anforderungen analysiert.

3.2.2.1 *Anforderungen*

Die Analyse und Auswertung bestehender Informationssysteme wurde auf der Grundlage folgender Anforderungen durchgeführt:

1. Anforderungen bezüglich Datenbankinhalt
 1. Umfassende Abdeckung des Primär- und Speicherstoffwechsels mono- und dikotyler Kulturpflanzen
 2. Hohe Datenqualität durch manuelle Kuratierung der Daten
 3. Feingranulare Stoffwechsellinformationen
 1. Detaillierte Angaben bezüglich der *räumlichen Lokalisierung* einer biochemischen Reaktion: Organ-, Gewebe-, Zelltyp-, Kompartiment-Spezifität
 2. Detaillierte Angaben bezüglich der *zeitlichen Lokalisierung* einer biochemischen Reaktion: Berücksichtigung pflanzlicher Entwicklungsstadien
 3. Berücksichtigung von Transportprozessen
2. Anforderungen bezüglich Nutzerinteraktionen
 - 2.1. Modellerstellung, -verwaltung, -export
 - 2.2. Unterstützung von Standardaustauschformaten, wie SBML, um den flexiblen Austausch mit externen Analyse- und Simulationstools zu ermöglichen

3.2.2.2 *Bestehende Ansätze und Anwendungen*

Im Folgenden wird ein Überblick über die wichtigsten aktuell verfügbaren metabolischen Datenbanken mit pflanzenbiologischem Inhalt gegeben. Für eine vollständige Auflistung aller verfügbaren metabolischen Datenbanken sei auf die *Pathguide Resource* verwiesen [BCSo6]. Nicht einbezogen in die Analyse wurden metabolische Datenbanksysteme wie NCBI BioSystems [GMBG⁺10] und Pathway Commons, da diese auf Sekundärdaten beschränkt und die assoziierten Quelldatenbanken bereits Bestandteil der Anforderungsanalyse sind. Bei der Analyse und Beschreibung der bestehenden Systeme wurde insbesondere darauf geachtet, wie die Datenbanken die Anforderungen 1.1 - 2.2

erfüllen. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Funktionalitäten der vorgestellten Datenbanken gibt Tabelle 4. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Datenbanken ist im Anhang (Abschnitt A.1.1) zu finden.

Datenbanken mit Vertretern aller Domänen

Die *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* KEGG [KGo0, KGF⁺10] umfasst 16 Datenbanken, die neben chemischen und genomischen Informationen auch Stoffwechsellinformationen beinhalten. Die aktuelle Version der **KEGG PATHWAY** Datenbank beinhaltet über 198.000 artspezifische Stoffwechselwege und Stoffwechsellinformationen zu über 60 Pflanzenarten. Die zur BioCyc Sammlung [KOMK⁺05] von Pathway-/Genom-Datenbanken (PGDB) gehörende Datenbank **MetaCyc** [CAD⁺10] beinhaltet experimentell bestimmte Stoffwechselwege aus der wissenschaftlichen Primärliteratur. Mit über 1800 Stoffwechselwegen aus über 2300 verschiedenen Arten ist MetaCyc (Version 16.1) eine der größten derzeit verfügbaren Sammlung an Stoffwechselwegen. **WikiPathways** [PKvI⁺08] ist eine öffentlich zugängliche Kollaborationsplattform zur Kuration biologischer Reaktionswege. Die aktuelle Version von WikiPathways umfasst 23 pflanzenspezifische Stoffwechselwege aus drei Arten. Die metabolische Datenbank **PathCASE** [EKA⁺08] umfasst neben manuell kuriierten Stoffwechselwegen eine Sammlung von Stoffwechselwegen aus KEGG und BioCyc Human Pathways. Zur Zeit beinhaltet PathCASE (Version 4.0) 414 Stoffwechselwege mit assoziierten Daten aus 855 Organismen (50 Pflanzenarten).

Pflanzenspezifische Datenbanken mit Vertretern verschiedener Arten

Die im Rahmen des Plant Metabolic Network (PMN³) entwickelte **PlantCyc** [Pla12b] ist eine auf Pflanzen spezialisierte metabolische Datenbank. PlantCyc (Version 5.0) umfasst momentan 737 Stoffwechselwege aus 366 Pflanzenarten und ist damit zur Zeit eine der umfassendsten pflanzenspezifischen Datenbanken. Die ursprünglich zur Repräsentation von biologischen Prozessen in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* entwickelte Datenbank **Arabidopsis Reactome** [TCH⁺08] enthält Stoffwechselwege aus 12 Pflanzenarten. Die aktuelle Version der Datenbank (Version 3.0) umfasst für jede der 12 Arten zwischen 990 und 1100 Stoffwechselwege.

Pflanzenspezifische Datenbanken einer Pflanzenart

Die Pathway/Genom Datenbank (PGDB) **AraCyc** [MZRo3] enthält Stoffwechselwege der Modellpflanze *Arabidopsis*, die nach der automatischen Erstellung der Datenbank zum großen Teil manuell validiert bzw. im Nachhinein als handkurierte Stoffwechselwege hinzugefügt wurden. AraCyc (Version 8.0) umfasst zur Zeit 393 Stoffwechselwege und über 3346 Literaturreferenzen. **MetNetDB** [YEW⁺05] enthält Informationen über metabolische und genregulatorische Netzwerke der Modellpflanze *Arabidopsis*. Die aktuelle Version von MetNetDB (Version 3.0) umfasst 334 Reaktionswege, die zu einer metabolischen und genregulatorischen Karte von *Arabidopsis* zusammengefasst sind.

3.2.2.3 Fazit

Der Vergleich bestehender Informationssysteme zeigt, dass kein System alle in Abschnitt 3.2.2.1 aufgeführten Anforderungen erfüllt. Wesentlicher Nachteil der betrachteten Systeme ist die eingeschränkte Repräsentation feingranularer Stoffwechsellinformationen. So werden die für die Rekonstruktion pflanzenbiologischer Stoffwechselmodelle notwendigen metabolischen Netzwerkdaten von vielen Datenbanken gar nicht oder nur begrenzt

³ Das Plant Metabolic Network (PMN) ist ein Gemeinschaftsprojekt zur Entwicklung und Kuration pflanzenspezifischer metabolischer Datenbanken und Enzymdatenbanken

Datenbank	URL	Version	Domänen	Monokotyle Arten	Datenquellen	Datenqualität	Detaillierungsgrad	Modellerstellung	SBML-Export
KEGG	[KEG12]	*	++	+	++	+	+		
MetaCyc	[Met12a]	16.1	++	+	++	++	+		+
WikiPathways	[Wik12]	*	++	+	++	++	+		
PathCase	[Pat12]	4.0	++	+	+	+			
PlantCyc	[Pla12b]	5.0	+	+	+	+	+		+
Arabidopsis Reactome	[Ara12a]	3.0	+	+	+	+	+		+
AraCyc	[Ara12b]	5.0	+		++	+	+		+
MetNetDB	[Met12b]	3.0	+		+	+	+		+

Tabelle 4: Vergleich der Leistungsmerkmale von Informationssystemen zur Modellrekonstruktion. Version: * - Sep 2012; Organismen: ++: Vertreter aller Domänen, +: Pflanzen; Datenquellen: ++: primär, +: sekundär; Datenqualität: ++: manuell kuriiert, +: neben manuell kuriierten auch importierte und/oder vorhergesagte Daten; Detaillierungsgrad: ++: Angabe feingranularer Stoffwechsellinformationen gemäß Anforderung 1.3, +: Feingranulare Stoffwechsellinformationen sind nur zum Teil und nur für einzelne Reaktionen eines Stoffwechselwegs verfügbar; Modellerstellung: +: nutzerspezifische Modellerstellung

für einzelne Reaktionen und Reaktionswege zur Verfügung gestellt. Zudem sind detaillierte Stoffwechsellinformationen für monokotyle Kulturpflanzen auf wenige Datenbanken begrenzt. Weiterhin von großem Nachteil ist, dass kein System die Erstellung und den Export nutzerspezifischer Modelle auf Grundlage der in den Datenbanken verfügbaren Netzwerkdaten unterstützt.

Aufgrund der eingeschränkten Eignung bestehender Informationssysteme in Bezug auf die Rekonstruktion pflanzenbiologischer Stoffwechselmodelle gemäß der in Abschnitt 3.2.2.1 aufgeführten Anforderungen war die Entwicklung eines neuen Informationssystems notwendig.

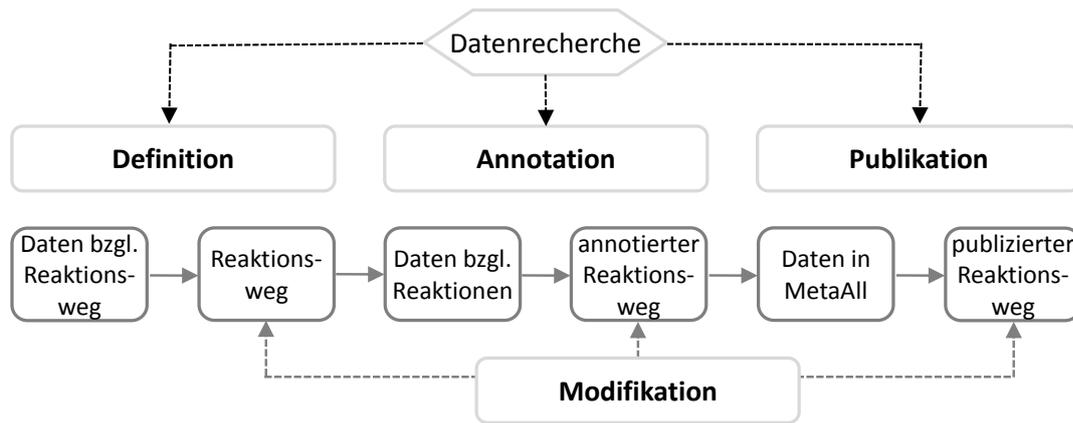


Abbildung 10: Pipeline zur Kuration pflanzenbiologischer Stoffwechseldaten

3.2.3 Methodik

Zur Erfüllung der in Abschnitt 3.2.2.1 aufgeführten Anforderungen wurde METACROP, ein Informationssystem zur detaillierten Repräsentation biochemischer Reaktionswege des Primärstoffwechsels mono- und dikotyler Kulturpflanzen realisiert. Bestandteil der vorliegenden Arbeit war die manuelle Recherche, Validierung und Extraktion der in METACROP verfügbaren Daten, sowie das Einpflegen der Daten in das bereits am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben bestehende Informationssystem METAALL [WGK⁺06].

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Methodik zur Kuration pflanzenbiologischer Stoffwechseldaten wird im Folgenden anhand der in Abbildung 10 dargestellten Kurationspipeline erläutert. Der in Abbildung 10 dargestellte Kurationsprozess untergliedert sich in drei Phasen: (i) Definitionsphase, (ii) Annotationsphase und (iii) Publikationsphase. Die einzelnen Teilschritte der drei Phasen werden im Folgenden näher erläutert:

3.2.3.1 Definition

Ausgangspunkt der Kuration von Stoffwechsel- bzw. Reaktionswegen ist eine umfangreiche Literatur- und Datenbankrecherche mit dem Ziel, Stoffwechsellinformationen auf der Ebene von Reaktionswegen zu erheben. Auf Grundlage von *Daten bezüglich eines Reaktionswegs* erfolgt die Definition eines *Reaktionswegs*.

Daten bezüglich eines Reaktionswegs

Ein Reaktionsweg umfasst eine Abfolge von biochemischen Reaktionen und Transportprozessen, die in der lebenden Zelle den Auf- oder Abbau einer Substanz bewirken. Die Definition eines Reaktionswegs beruht auf der Angabe folgender Daten: (i) Start-/Endpunkt (Ausgangssubstrat/Endprodukt), (ii) beteiligte Reaktionen und (iii) Lokalisierung der Reaktionen (siehe Tabelle 5).

Reaktionsweg

Ein Reaktionsweg im Sinne der in Abbildung 10 dargestellten Pipeline besteht aus einer Liste der an dem Reaktionsweg beteiligten Reaktionen, die durch eine eindeutige Bezeichnung (Name, EC-Nummer) näher spezifiziert werden. Diese Reaktionsliste bildet die Grundlage für die in der nachfolgenden Annotationsphase erfolgenden Datenrecherche und -extraktion.

	Metabolit	Enzym	Transporter
Name	+	+	+
CAS-/EC-Nummer	+	+	+
Molekulare Masse	+	+	+
Chemische Formel	+		
Stöchiometrische Reaktionsgleichung		+	+
Reversibilität		+	+
Edukte/Produkte	+	+	+
Coenzyme/Modulatoren		+	+
Kinetische Daten ^{1,2}		+	+
Lokalisierung ³		+	+

Tabelle 5: Reaktionsdaten: Auflistung der für die Annotation von Metaboliten, Enzymen und Transportern notwendigen Informationen. ¹ Kinetische Daten umfassen Angaben bezüglich der kinetischen Gleichung und kinetischen Parametern einer Reaktion; ² Die Recherche und Annotation von kinetischen Daten war auf Enzyme und Transporter zentraler Stoffwechselprozesse (Saccharoseabbau, Glykolyse, Citratzyklus) beschränkt; ³ Die Lokalisierung umfasst Angaben bezüglich der zeitlichen (Entwicklungszeitpunkt) und räumlichen (Organismus, Organ, Gewebe, Zelltyp und subzelluläres Kompartiment) Lokalisierung einer Reaktion.

3.2.3.2 Annotation

Die Annotation der an einem Reaktionsweg beteiligten Reaktionen erfolgt auf Grundlage einer umfangreichen Literatur- und Datenbankrecherche, in deren Verlauf relevante *Daten bezüglich der Reaktionen* erhoben und der Reaktionsweg angereichert wird (*annotierter Reaktionsweg*).

Daten bezüglich der Reaktionen

Ausgangspunkt der Recherche und manuellen Extraktion von Daten bezüglich einer Reaktion ist eine detaillierte Literatur- und Datenbankrecherche. Im Rahmen dieser Recherche werden neben der wissenschaftlichen Primärliteratur die in Tabelle 2 aufgelisteten Datenbanken konsultiert. Unter Berücksichtigung der in Abschnitt 3.2.2.1 aufgestellten Anforderungen werden dabei für jede Reaktion die in Tabelle 5 aufgeführten Reaktionsdaten manuell extrahiert.

Die Lokalisierung einer biochemischen Reaktion kann auf Grundlage unterschiedlicher experimenteller Daten erhoben werden. Eine hierarchische Klassifizierung der experimentellen Datentypen entsprechend ihrer Beweiskraft ist in Tabelle 6 aufgeführt. Ziel der Recherche von Reaktionsdaten ist die Erhebung von Daten mit hoher Beweiskraft. Aus diesem Grund erfolgt die Datenrecherche zunächst auf Ebene biochemischer Daten und wird dann auf die anderen experimentellen Datentypen ausgeweitet.

Annotierter Reaktionsweg

Ein annotierter Reaktionsweg im Sinne der in Abbildung 10 dargestellten Pipeline besteht aus einer Liste der an dem Reaktionsweg beteiligten Reaktionen, wobei jede Reaktion durch die in Tabelle 5 aufgeführten Reaktionsdaten angereichert und belegt ist.

3.2.3.3 Publikation

Die Publikation, das heißt, die Veröffentlichung der Stoffwechseldaten in der metabolischen Datenbank erfordert das Einpflegen der im Rahmen der Definitions- und Annota-

Referenzdaten	Beweiskraft
Biochemische Daten	Direkter Nachweis der Aktivität der Reaktion
Proteomdaten	Direkter Nachweis der Existenz der Reaktion
Transkriptomdaten	Direkter/indirekter Nachweis der genetischen Funktion
Physiologische Daten	Indirekter Nachweis der Reaktion auf der Grundlage physiologischer Daten ¹
Sequenz Daten	Nachweis der genetischen Funktion

Tabelle 6: Beweiskraft der experimentellen Referenzdaten. *Abkürzungen:* ¹Indirekter physiologischer Nachweis u.a. durch Sekretionsprodukte, Biomassezusammensetzung bzw. Nachweis der Vor- und Nachreaktionen innerhalb eines Reaktionsweges

tionsphase extrahierten Daten in das Informationssystem METAALL (*Daten in METAALL*) und die Freigabe des Reaktionswegs auf der Weboberfläche der Datenbank (*publizierter Reaktionsweg*).

Daten in MetaAll

Das Informationssystem METAALL ermöglicht die strukturierte Verwaltung von Stoffwechseldaten auf der Ebene von Reaktanten, Reaktionen und Reaktionswegen. Entsprechend der internen Struktur von METAALL erfolgt das manuelle Einpflegen der extrahierten Daten in das Informationssystem in drei Schritten:

1. Spezifizieren und annotieren der Reaktanten und Reaktionen
2. Verknüpfen der Daten zu einem Reaktionsweg
3. Erzeugen einer klickbaren Stoffwechselkarte und SBML-Datei

Publizierter Reaktionsweg

Ein in der Stoffwechseldatenbank publizierter Reaktionsweg umfasst neben detaillierten Angaben zu den einzelnen Reaktionen und Reaktanten (siehe Tabelle 5), eine klickbare Stoffwechselkarte und exportierbare SBML-Datei.

3.2.3.4 Modifikation

Die Kuration von Reaktionswegen ist ein iterativer Prozess. Zu Beginn der Definitionsphase wird, ausgehend von einer in der Literatur bzw. einer metabolischen Datenbank gegebenen Beschreibung, eine erste Version eines Reaktionswegs definiert. Diese wird durch den Abgleich mit weiteren Quellen (Literatur, Datenbanken) im weiteren Verlauf der Phase verifiziert bzw. modifiziert. Potentielle Modifikationen beruhen dabei auf der Integration von Transportprozessen, Isoenzymen, Zusatzreaktionen (u.a. Synthesewege von Intermediaten) und alternativen Synthesewegen (u.a. artspezifische Unterschiede). In der Annotations- und Publikationsphase können neue Erkenntnisse, die im Verlauf der Datenrecherche gewonnen werden, weitere Modifikationen erforderlich machen.

Organismus	Reaktionswege	Reaktionen	Transporter	Komp.	Referenzen
<i>H. vulgare</i>	36	293	8	5	391
<i>T. aestivum</i>	34	273	6	5	365
<i>O. sativa</i>	35	281	9	4	355
<i>Z. mays</i>	35	276	27	5	392
<i>S. tuberosum</i>	34	211	14	3	272
<i>B. napus</i>	32	170	7	4	206
<i>B. vulgaris</i>	35	228	0	4	366
<i>A. thaliana</i>	35	289	15	4	525
<i>M. truncatula</i>	34	239	0	4	337
GESAMT ^a	38	394	60	5	1100

Tabelle 7: Auflistung der in METACROP 1.0 verfügbaren Stoffwechsellinformationen mono- und dikotyler Kulturpflanzen. *Abkürzungen:* Komp.: Zellkompartimente, ^a: Einbeziehung weiterer Arten. Biochemische Reaktionswege, Reaktionen und andere Informationen, die in mehr als einer Pflanzart vorkommen, werden nur ein Mal aufgeführt

3.2.4 Realisierung

Die in Abschnitt 3.2.3 aufgeführten Anforderungen wurden unter Anwendung der in Abschnitt 3.2.3 erläuterten Methodik der Datenkuration in dem Informationssystem METACROP realisiert. MetaCrop 1.0 ist ein Informationssystem zur detaillierten Repräsentation biochemischer Reaktionen und Reaktionswege des Primärstoffwechsels mono- und dikotyler Kulturpflanzen. Das Webinterface der Datenbank ist unter <http://metacrop.ipk-gatersleben.de> verfügbar.

3.2.4.1 Datenbankinhalt

METACROP 1.0 enthält 38 Stoffwechselwege des Primär- und Speicherstoffwechsels verschiedener mono- und dikotyler Nutzpflanzen unter besonderer Berücksichtigung wirtschaftlich bedeutender Organe wie Samen und Knollen. Neben der Abdeckung der wesentlichen Stoffwechselwege des Primärstoffwechsels höherer Pflanzen (z.B. Kohlenstoff-, Aminosäure-, Lipid-, Energie-, Cofaktor- und Nukleotidstoffwechsel) umfasst die Datenbank zentrale Reaktionswege des Speicherstoffwechsels in Samen und Knollen (z.B. Saccharoseabbau in mono- und dikotylen Kulturpflanzen).

Die biochemischen Reaktionen und Reaktionswege sind durch handkurierte Informationen bezüglich der Reaktionsstöchiometrie, -richtung, -lokalisierung (Organismus, Organ, Gewebe, subzelluläres Kompartiment), -zeitpunkt (Entwicklungsstadium), der an einer Reaktion beteiligten Metaboliten (z.B. CAS-Nummer, Molekulargewicht und chemische Formel) und Enzyme (z.B. EC- und CAS-Nummer) sowie der an einem Reaktionsweg beteiligten Transportprozesse annotiert. Zudem stellt die Datenbank kinetische Informationen (z.B. v_{\max} ⁴, K_m -Werte⁵) für zentrale Stoffwechselwege (Saccharoseabbau, Glykolyse, Citratzyklus) zur Verfügung. Neben Querverweisen zu verschiedenen externen Datenbanken (PubChem, PubMed) sind die Datenbankeinträge durch Literaturreferenzen belegt. Um Datenkonsistenz sowie einen Vergleich von Daten aus unterschiedlichen Quellen zu ermöglichen, wurde kontrolliertes Vokabular (z.B. ontologische Begriffe aus der Plant Ontology [Pla12a] und Gene Ontology [Gen12]) verwendet.

⁴ v_{\max} entspricht der maximale Umsatzgeschwindigkeit der Michaelis-Menten-Kinetik

⁵ K_m entspricht der Michaeliskonstante der Michaelis-Menten-Kinetik

METACROP umfasst organismusspezifische Informationen aus vier monokotylen Kulturpflanzen (*Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Zea mays*) und fünf dikotylen Kultur- bzw. Modellpflanzen (*Solanum tuberosum*, *Brassica napus*, *Beta vulgaris*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*). Insgesamt sind über 400 enzymatische Reaktionen, 60 Transportprozesse, fünf subzelluläre Kompartimente und 1100 Literaturreferenzen in der Datenbank enthalten (siehe Tabelle 7). Die in METACROP verfügbaren Daten basieren im Wesentlichen auf biochemischen Referenzdaten (z.B. taxonspezifische Enzyminformationen). Bei Nichtverfügbarkeit biochemischer Referenzen ist eine gegebene Reaktion entsprechend der in Tabelle 6 aufgeführten Hierarchie der Referenzdaten durch proteomische, transkriptomische bzw. physiologische Daten annotiert.

3.2.4.2 Kuration und Qualitätssicherung

Sämtliche in METACROP 1.0 verfügbare Informationen sind handkuriert und wurden auf Grundlage der in Abschnitt 3.2.3 erläuterten Methodik der Datenkuration erhoben. Literaturbasierte Informationen wurden aus über 800 Veröffentlichungen pflanzenbiochemischer und -physiologischer Zeitschriften sowie Fachbüchern (u.a. [Ric96, BGJ00, HP08c]) kuriiert. Darüber hinaus wurden Informationen aus unterschiedlichen Datenbanken (siehe Tabelle 2) manuell extrahiert. Zur Sicherung der Qualität wurden die aus Datenbanken abgeleiteten Informationen, soweit verfügbar, auf der Grundlage von Literaturreferenzen validiert.

3.2.4.3 Datenbank Implementierung

METACROP basiert auf dem Informationssystem METAALL [WGK⁺06], einem System zur Verwaltung und Repräsentation metabolischer Netzwerkdaten in Pflanzen. Das Informationssystem METAALL wurde am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben unter Anwendung des relationalen Datenbankmanagementsystems Oracle sowie der Oracle-Application-Express-Technologie implementiert und stand zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits zur Verfügung. Für eine detaillierte Beschreibung des Informationssystems sei auf [WGK⁺06] verwiesen.

3.2.4.4 METACROP 2.0

Seit ihrer Veröffentlichung im Jahr 2008 [GBWK⁺08] wurde METACROP 1.0 sowohl im Bezug auf den Datenbankinhalt als auch auf technischer Ebene beständig erweitert und verbessert. Da die Weiterentwicklungen von METACROP als Bestandteil unterschiedlicher Projekte unter Mitwirkung verschiedener Mitglieder der Arbeitsgruppe umgesetzt wurden, beschränkt sich die vorangehende Beschreibung von METACROP auf Version 1.0. Für eine detaillierte Beschreibung der inhaltlichen und technischen Neuerungen von METACROP 2.0 sei auf Schreiber *et al.* [SCC⁺11] verwiesen.

3.3 MODELLANALYSE

3.3.1 *Motivation*

Die komplexe Organisation pflanzenbiologischer Stoffwechselwege erfordert neue Konzepte, um Struktur, Dynamik und Verhalten der zugrunde liegenden Stoffwechselprozesse aufzudecken und zu beleuchten. Mögliche Lösungsansätze bietet hierbei die optimierungsbasierte Modellierung, die auf Grundlage der einfach zu ermittelnden Modelldaten eine detaillierte Analyse großskaliger Stoffwechselsysteme ermöglicht.

3.3.2 *Anforderungsanalyse*

Mit dem Ziel, die Analyse pflanzenbiologischer Stoffwechselmodelle unter Verwendung bestehender optimierungsbasierter Simulations- und Analyseprogramme durchzuführen, wurden Anforderungen hinsichtlich der optimierungsbasierten Modellanalyse ausgearbeitet und bestehende Systeme im Hinblick auf diese Anforderungen analysiert. Die Anforderungsanalyse wurde auf der Grundlage von Diskussionsrunden mit Biologen und Bioinformatikern sowie dem Austesten bestehender Systeme durchgeführt.

3.3.2.1 *Anforderungen*

Die Analyse und Auswertung bestehender System wurde auf der Grundlage folgender Anforderungen durchgeführt:

1. Anforderungen bezüglich der Modellrekonstruktion, -modifikation und -import
 - 1.1. Rekonstruktionsumgebung für die Modellerstellung und -modifikation
 - 1.2. Modell-Import/-Export via SBML
2. Anforderungen bezüglich der optimierungsbasierten Modellanalyse
 - 2.1. Breites Spektrum optimierungsbasierter Analysemethoden
 - 2.2. Flexibilität in Bezug auf die Auswahl der Zielfunktionen: lineare und nicht-lineare Zielfunktionen
3. Anforderungen bezüglich der Exploration von Simulationsergebnissen
 - 3.1. Visuelle, netzwerkintegrierte Darstellung der berechneten Flussprofile
 - 3.2. Darstellung der berechneten Flussprofile als Kohlenstoffflüsse
 - 3.3. Interaktive, dynamische Analyse der grafischen Flussprofile
4. Anforderungen bezüglich der Nutzerfreundlichkeit und Verfügbarkeit
 - 4.1. Grafische Nutzeroberfläche
 - 4.2. Unabhängigkeit von kommerzieller Software

3.3.2.2 *Bestehende Ansätze und Anwendungen*

Im Folgenden wird ein Überblick über vorhandene Methoden und Software der optimierungsbasierten Modellanalyse gegeben. Bei der Analyse und Beschreibung der bestehenden Ansätze wurde insbesondere darauf geachtet, wie die Systeme die Anforderungen 1.1 - 4.2 erfüllen. Nicht Einbezogen in die Analyse wurden kommerzielle Softwarepakete⁶, Webanwendungen⁷ sowie Programme, die erst nach der Veröffentlichung von FBA-SIMVis, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Software,

⁶ Kommerzielle Softwarepakete sind u.a. SimPheny [Sim] und *In Silico* Discovery [InS]

⁷ Webanwendungen sind u.a. BioMet Toolbox [COHA⁺10] und CycSim [FSC⁺09]

publiziert wurden⁸. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Funktionalitäten der vorgestellten Analyseprogramme gibt Tabelle 8. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Programme ist im Anhang (Abschnitt A.1.2) zu finden.

Eigenständige Programme

Das Systems Biology Research Tool (**SBRT**) [WWo8] ist eine plugin-basierte open-source Software Plattform zur Simulation und Analyse stöchiometrischer Modelle. SBRT unterstützt eine große Anzahl constraintbasierter Analyseverfahren, ist jedoch auf lineare Optimierung beschränkt und bietet keine Möglichkeit der visuellen Darstellung von Flussprofilen. **MetaFluxNet** [LLH⁺03] ist ein Softwarepaket zur quantitativen Berechnung metabolischer Flüsse. Die Software umfasst im Wesentlichen Methoden der metabolischen Flussanalyse (engl. metabolic flux analysis, MFA), bietet jedoch auch die Möglichkeit der FBA-Berechnung. Trotz der Möglichkeit der Modellrekonstruktion, -simulation und Flussvisualisierung schränkt die limitierte Funktionalität der akademischen Version der kommerziellen Software die Anwendbarkeit von MetaFluxNet stark ein. Das open-source Programm **PathwayAnalyzer** [Pat] ist eine Linux-basierte Software zur Flussanalyse von Stoffwechselmodellen. Das einfache kommandozeilenbasierte Programm bietet zwei Methoden der optimierungsbasierten Netzwerkanalyse (FBA, MOMA), es unterstützt jedoch keine visuelle Darstellung der berechneten Flüsse. **Fluxor** [Flu] ist ein einfaches kommandozeilenbasiertes Python-Programm zur Berechnung von FBA. Ausgangspunkt der linearen Programmierung ist ein SBML-Modell. Fluxor ist auf lineare Optimierung beschränkt und bietet keine Möglichkeit der visuellen Darstellung von Simulationsergebnissen.

Add-ons kommerzieller Plattformen

CellNetAnalyzer (**CNA**) [KSRGo7] ist eine auf MATLAB basierende Software zur Modellierung von Stoffwechsel-, Genregulations- und Signaltransduktionsnetzwerken. CNA bietet eine Vielzahl stöchiometrischer Analysemethoden; optimierungsbasierte Ansätze sind jedoch auf die Berechnung von FBA beschränkt. Eine grafische Darstellung der berechneten Flusswerte erfolgt über interaktive Netzwerkkarten⁹. Die **COBRA** (Constraint-Based Reconstruction and Analysis) Toolbox [BFM⁺07] ist ein auf MATLAB basierendes Softwarepaket für die constraintbasierte Analyse von Stoffwechselmodellen. Neben einem umfangreichen Angebot an constraintbasierten Analysemethoden, bietet die kommandozeilenbasierte Toolbox ein hohes Maß an Flexibilität durch die einfache Integration nutzerspezifischer MATLAB-Routinen. Die COBRA Toolbox bietet keine programminternen Methoden zur Visualisierung der Simulationsergebnisse¹⁰. **SNA** (Stoichiometric Network Analysis) [Urbo6] ist eine MATHEMATICA Toolbox zur stöchiometrischen Analyse metabolischer Netzwerke. Der Schwerpunkt der Software liegt auf der Berechnung von EFMs; SNA bietet jedoch auch die Möglichkeit der FBA-Berechnung. SNA ist auf eine kommandozeilenbasierte Nutzung beschränkt, erfordert Programmierfähigkeiten und läuft nur unter dem Betriebssystem Linux.

⁸ Nach der Veröffentlichung von FBA-SIMVis publizierte Programme sind u.a. FASimu [HHG⁺11], Opt-Flux [RME⁺10] und SurreyFBA [GBARK11]

⁹ Interaktive Netzwerkkarten sind Netzwerkgrafiken mit verlinkten Textboxen, in denen die berechneten Flusswerte angezeigt werden. Trotz der Möglichkeit der visuellen Darstellung von Flussprofilen, sind die entsprechenden interaktiven Netzwerkkarten wenig nutzerfreundlich. Die zugrunde liegenden Netzwerkgrafiken müssen extern erstellt und importiert werden und die Textboxen durch Angabe der x-/y-Koordinaten sehr zeitaufwendig auf der Netzwerkkarte positioniert werden.

¹⁰ Neuere Versionen der Software unterstützen die Visualisierung metabolischer Flussprofile

	SBRT	MetaFluxNet	Pathway Analyzer	Fluxor	CNA	COBRA Toolbox	SNA
Version	2.0	1.86	1.0		9.0	1.3.1	+1.0
SBML import	+	+	+	+	+	+	+
SBML export	+	+	.	.	+	+	.
Modelleditor	.	+	.	.	+	.	+
Grafische Nutzeroberfläche	+	+	.	.	+	.	.
Kommandozeile	+	.	+	+	+	+	+
<i>Flux Balance Analysis</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Knockout-Analyse</i>	+	+	.	.	.	+	.
Robustheitsanalyse	+	.
Flussvariabilitätsanalyse	+	+	.
Zusätzl. OBA-Methoden	++	+	+	+	.	++	.
Quadratische Optimierung
Visualisierung	.	+	.	.	+	.	.
Interaktion mit ex. Vis.-software	+	+	.
Programmiererfahrung erforderlich	+	+
Unabh. von kommerzieller Software	+	+	+	+	.	.	.
Open source	+	.	+	+	.	+	+

Tabelle 8: Vergleich der Leistungsmerkmale von Softwarepaketen zur optimierungsbasierten Modellanalyse. +/. zeigen das Vorhandensein/Nichtvorhandensein eines Leistungsmerkmals an. ++ zeigt das Vorhandensein von mehr als 10 zusätzlichen OBA-Methoden an. Die Programmversion der aufgeführten Softwarepakete entspricht der zum Zeitpunkt der Analyse aktuellsten verfügbaren Version. *Abkürzungen:* OBA: Optimierungsbasierte Netzwerkanalyse; ex. Vis.-software: externe Visualisierungssoftware

3.3.2.3 Fazit

Der Vergleich bestehender Analyseprogramme zeigt, dass kein System alle in Abschnitt 3.3.2.1 aufgeführten Anforderungen erfüllt. Wesentlicher Nachteil der betrachteten Systeme ist die fehlende Unterstützung einer netzwerkintegrierten Visualisierung der Simulationsergebnisse. Weiterhin von großem Nachteil ist das fehlende Angebot einer nichtlinearen Optimierungsroutine. Zudem sind nahezu die Hälfte der Anwendungsprogramme von kommerzieller Software abhängig und damit in ihrer Nutzerverfügbarkeit eingeschränkt.

Aufgrund der eingeschränkten Eignung bestehender Analyseprogramme gemäß der in Abschnitt 3.3.2.1 aufgeführten Anforderungen war die Entwicklung einer neuen Software notwendig.

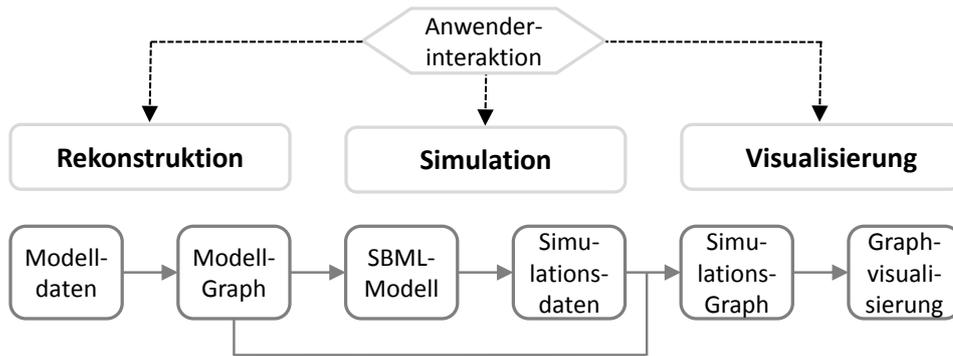


Abbildung 11: Pipeline zur optimierungsbasierten Modellierung pflanzenbiologischer Stoffwechselmodelle

3.3.3 Methodik

Zur Erfüllung der in Abschnitt 3.3.2.1 aufgeführten Anforderungen wird im Folgenden eine Methodik vorgestellt, die eine optimierungsbasierte Modellierung pflanzenbiologischer Stoffwechselmodelle mit dem Schwerpunkt einer interaktiven, netzwerkintegrierten Visualisierung der Simulationsergebnisse ermöglicht. Die entwickelte Methodik wird anhand der in Abbildung 11 dargestellten Pipeline erläutert. Die einzelnen Komponenten der Pipeline werden im Folgenden, getrennt nach den einzelnen Teilschritten der Modellierung (Rekonstruktion, Simulation, Visualisierung), aufgeführt und im Kontext der entwickelten Methodik erklärt.

3.3.3.1 Rekonstruktion

Ausgangspunkt der Rekonstruktion von Modellen der optimierungsbasierten Modellanalyse sind *Modelldaten*, die in Form einer graphentheoretischen Datenstruktur (*ModellGraph*) repräsentiert und bildhaft dargestellt werden.

Modelldaten

Die optimierungsbasierte Modellierung von Stoffwechselmodellen basiert auf stöchiometrischen Modellen. Die für die Modellrekonstruktion notwendigen Modelldaten sind durch die stöchiometrischen Reaktionsgleichungen der an dem Modell beteiligten Reaktionen gegeben.

ModellGraph

Die Graphentheorie bietet verschiedene Ansätze, die Reaktionsgleichungen eines stöchiometrischen Stoffwechselmodells in Form eines biochemischen Netzwerks strukturiert darzustellen. In Bezug auf die in Abbildung 11 dargestellte Pipeline muss eine graphentheoretische Datenstruktur zur Repräsentation stöchiometrischer Stoffwechselmodelle folgende Anforderungen erfüllen:

1. Bildhafte Darstellung des Modells

Die visuelle Darstellung vereinfacht im Unterschied zu einer rein textuellen Modelldarstellung den Rekonstruktionsprozess und bildet zudem die Grundlage für die netzwerkintegrierte Visualisierung der Simulationsergebnisse. Die Darstellung muss sowohl ein intuitives Verständnis der strukturellen Netzwerkeigenschaften als auch die Integration der quantitativen Simulationsdaten ermöglichen.

Name	Grafische Komponente	Definition
Metabolitknoten	○	$\{v \mid v \in M\}$
Reaktionsknoten	□	$\{v \mid v \in R\}$
Irreversible Reaktionskante	→	$\{e \mid e \in E \cup P\}$
Reversible Reaktionskante	↔	$\{e \mid e \in E \cup P\}$

Tabelle 9: Grafische Komponenten der bildhaften Repräsentation stöchiometrischer Stoffwechselmodell in Form eines ModellGraphs.

2. Transformation in ein SBML-basiertes mathematisches Modell

Die Attribute des Graphen müssen alle für die Modellsimulation notwendigen Modelldaten enthalten und damit eine Transformation in ein SBML-basiertes mathematisches Modell ermöglichen.

Auf Grundlage dieser Anforderungen wurde folgende graphentheoretische Datenstruktur ausgearbeitet und definiert:

MODELLGRAPH Sei F ein stöchiometrisches Stoffwechselmodell mit m internen Metaboliten und n biochemischen Reaktionen, die in Form stöchiometrischer Reaktionsgleichungen definiert sind. Ein gerichteter, benannter, gewichteter, bipartiter Graph $MG = (M \cup R, E \cup P, w, l)$ heisst *Modellgraph* von F , falls gilt:

Die Knoten $v \in M$ entsprechen den internen Metaboliten aus F , die Knoten $v \in R$ den biochemischen Reaktionen aus F . Gerichtete Kanten e der Kantenmenge $E \subseteq M \times R$ führen von Metaboliten (Edukten) zu Reaktionen, gerichtete Kanten e der Kantenmenge $P \subseteq R \times M$ führen von Reaktionen zu Metaboliten (Produkten). Gerichtete Kanten $e \in E \cup P$ einer irreversiblen Reaktion werden als irreversible Reaktionskanten bezeichnet und durch Einfachpfeile (\rightarrow) bildhaft dargestellt. Gerichtete Kanten $e \in E \cup P$ einer reversiblen Reaktion werden als reversible Reaktionskanten bezeichnet und durch Doppelpfeile (\leftrightarrow) dargestellt. Die Abbildung $w : E \cup P \rightarrow K$ ordnet jeder Kante $e \in E$ und $e \in P$ ein Kantengewicht entsprechend der stöchiometrischen Koeffizienten der stöchiometrischen Reaktionsgleichungen zu. Die Abbildung $l : M \cup R \rightarrow \text{Label}$ ordnet jedem Metabolitknoten $v \in M$ den Namen des zugehörigen Metaboliten und jedem Reaktionsknoten $v \in R$ den Namen der zugehörigen biochemischen Reaktion zu, wobei die Benennung der biochemischen Reaktionen eindeutig sein muss.

Die bildhafte Darstellung eines ModellGraphen erfolgt unter Verwendung der in Tabelle 9 aufgeführten grafischen Komponenten. Das in Tabelle 10 in Form seiner stöchiometrischen Reaktionsgleichungen wiedergegebene stöchiometrische Stoffwechselmodell lässt sich wie folgt als ModellGraph darstellen:

$$MG = (M \cup R, E \cup P, w, l) \text{ mit } M = \{A, B\}, R = \{R_1, R_2, R_3\}, E = \{(A, R_2), (B, R_3)\}, P = \{(R_1, A), (R_2, B)\}, K = \{1, 2, 1, 1\} \text{ und } \text{Label} = \{R_1, R_2, R_3, A, B\}$$

und unter Anwendung der in Tabelle 9 aufgeführten grafischen Komponenten, wie in Abbildung 12 gezeigt, bildhaft darstellen.

Reaktionsname	Stöchiometrische Reaktionsgleichung
Reaktion R1:	$\Rightarrow 1 A$
Reaktion R2:	$2 A \Rightarrow 1 B$
Reaktion R3:	$1 B \Rightarrow$

Tabelle 10: Stöchiometrische Reaktionsgleichungen des in Abbildung 12 dargestellten Modell-Graphs



Abbildung 12: ModellGraph: Bildhafte Darstellung des in Tabelle 10 in Form seiner stöchiometrischen Reaktionsgleichungen wiedergegebenen Beispielmodells

3.3.3.2 Simulation

Ausgangspunkt der optimierungsbasierten Modellanalyse ist ein SBML-basiertes mathematisches Modell (*SBML-Modell*), das nach Spezifizierung der Modellparameter simuliert werden kann. Ergebnis der Modellsimulation sind *Simulationsdaten*, die sich je nach Analysemethoden unterscheiden.

SBML-Modell

Die Transformation des ModellGraph in ein SBML-basiertes mathematisches Modell erfolgt durch Überführung der Attribute des ModellGraphen in die für die Modellsimulation notwendigen SBML-Attribute.

Simulationsdaten

Simulationsergebnisse einer Modellsimulation werden als Simulationsdatensatz bezeichnet. Die Möglichkeit einen oder mehrere Modellparameter schrittweise in einer Abfolge von Modellsimulationen zu variieren führt zu sequentiellen Datensätzen. Eine Auflistung von Simulationsdaten der optimierungsbasierten Modellanalyse ist in Tabelle 11 gegeben. Für eine detaillierte Erläuterung der aufgeführten Analysemethoden und -datentypen sei auf Abschnitt 2.3.3.2 verwiesen. Eine Beschreibung der im Rahmen der einzelnen Analysemethoden erfolgenden Eingabe, Simulation und Ausgabe ist im Anhang (Abschnitt A.2) gegeben.

	FBA	RA	KA	FVA
Flussverteilung ^a	+	+	+	
Sensitivitätskurve		+		
Sensitivität			+	
Min/max Flusswerte				+

Tabelle 11: Simulationsdaten der optimierungsbasierten Analysemethoden getrennt nach Analysemethoden. *Abkürzungen:* ^a: Aufgrund der Möglichkeit der Parametervariation können Flussverteilungen als singuläre bzw. sequentielle Datensätze vorliegen; FBA: *Flux Balance Analysis*; FVA: *Flussvariabilitätsanalyse*; KA: *Knockout-Analyse*; RA: *Robustheitsanalyse*

Wie aus Tabelle 11 ersichtlich resultiert die Anwendung verschiedener optimierungsbasierter Analysemethoden in einer Flussverteilung, das heißt, einem Flussvektor v , der jeder Reaktion $R = \{r_1, \dots, r_n\}$ eine Reaktionsrate (metabolischer Fluss) $v = \{v_1, \dots, v_n\}$ zuweist. Anforderung 3.2 in Abschnitt 3.3.2.1 erfordert die Transformation der berechneten Reaktionsraten v in Kohlenstoffflüsse v^c . Diese Datentransformation wird wie folgt durchgeführt:

Sei M ein Metabolit einer biochemischen Reaktion r_i , v_i die zugehörige Reaktionsrate, s der stöchiometrische Koeffizient von M und c die Anzahl der C-Atome des Metaboliten. Für M lässt sich der Kohlenstofffluss (C-Fluss) wie folgt berechnen:

$$v_i^c = s \cdot c \cdot v_i \quad (3.1)$$

Analog dazu lässt sich der Stickstofffluss (N-Fluss) durch Berücksichtigung der Anzahl der N- anstelle der C-Atome berechnen.

3.3.3.3 Visualisierung

Voraussetzung für die netzwerkintegrierte Visualisierung von Simulationsergebnissen der optimierungsbasierten Modellanalyse ist die Datenintegration, das heißt, die Zuordnung der Simulationsdaten zu den entsprechenden Graphenelementen des stöchiometrischen Modells. Die Kombination von Simulationsdaten und Graphenelementen erfolgt auf Grundlage des *SimulationsGraph*. Die Anwendung geeigneter Visualisierungsfunktionen und Interaktionstechniken ermöglicht eine interaktive, dynamische Visualisierung der Simulationsdaten.

SimulationsGraph

Der *SimulationsGraph* ist eine graphentheoretische Datenstruktur, welche die Netzwerkstruktur des analysierten Stoffwechselmodells und die zu den Netzwerkelementen in Beziehung stehenden Simulationsdaten integriert. Der *SimulationsGraph* ist wie folgt definiert:

SIMULATIONSGRAPH: Sei $MG = (M \cup R, E \cup P, w, l)$ der *ModellGraph* eines stöchiometrischen Stoffwechselmodells F und S die Menge der Simulationsdaten. Ein *Graph* $SG = (MG, S, map)$ heißt *SimulationsGraph* von MG , falls eine Datenzuordnungsfunktion $map : V \cup E \rightarrow S$ existiert, die den Graphenelementen von SG Simulationsdaten aus S zuordnet.

Graph-Visualisierung

Netzwerkintegrierte Simulationsdaten können durch geeignete Visualisierungen einfach verstanden und exploriert werden. Wesentliche Aspekte der interaktiven Visualisierung sind (i) die Auswahl einer geeigneten grafischen Repräsentation der netzwerkintegrierten Simulationsdaten und (ii) die Auswahl geeigneter Interaktionsformen. Beide Aspekte werden im Folgenden näher erläutert:

Grafische Repräsentation der Simulationsdaten

Auf Grundlage von Diskussionsrunden mit Biologen und Bioinformatikern wurden Anforderungen an die netzwerkintegrierte Darstellung von Simulationsergebnissen der optimierungsbasierten Modellanalyse definiert (siehe Tabelle 12) und grafische Repräsentationsformen für die Visualisierung der Simulationsdaten entsprechend dieser Anforderungen ausgearbeitet (siehe Abbildung 13).

Simulationsdaten	Darstellungsanforderungen	Realisierung
Flussverteilung	Grafische & numerische C-Flussdarstellung	Abb. 13A
Sensitivitätskurve	Reaktionsspezifische Diagrammdarstellung	Abb. 13B
Sensitivität	Reaktionsspezifische Diagrammdarstellung	Abb. 13C
Min/max Flusswerte	Reaktionsspezifische Diagrammdarstellung	Abb. 13D

Tabelle 12: Grafische Repräsentation der Simulationsdaten: Darstellungsanforderungen und Realisierung

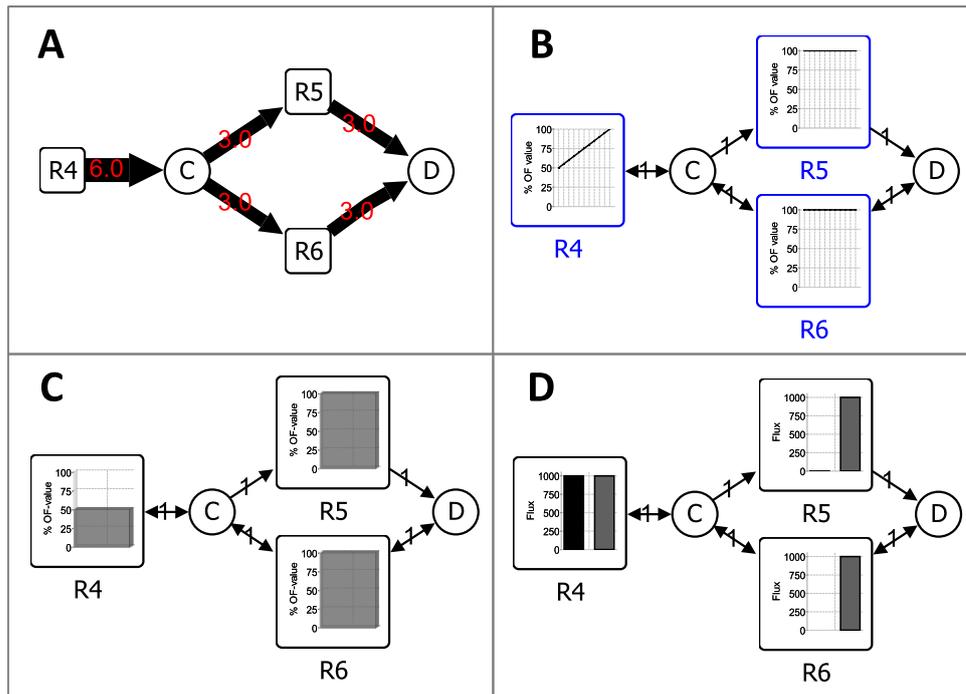


Abbildung 13: Grafische Repräsentation der Simulationsdaten: (A) *Flussverteilung*: Visualisierung der C-Flüsse durch Skalierung der Breite der Reaktionskanten entsprechender der berechneten Flusswerte; die Flusswerte werden zusätzlich auf den Reaktionskanten abgebildet; (B) *Sensitivitätskurve*: Visualisierung der reaktionsspezifischen Sensitivitätskurven in Form eines Liniendiagramms innerhalb der Reaktionsknoten. Die Sensitivitätskurve gibt an, wie sich die Flussreduktion durch eine gegebene Reaktion auf die Zielfunktion ausübt (x-Achse: Variation der Flussstärke der gegebenen Reaktion von 0 bis 100%, wobei sich 100% auf die Flussstärke unter optimalen Bedingungen, d. h., ohne Flussreduktion der gegebenen Reaktion, bezieht; y-Achse: Sensitivitätswert); (C) *Sensitivität*: Visualisierung der reaktionsspezifischen Sensitivität in Form eines Balkendiagramms innerhalb der Reaktionsknoten (y-Achse: Sensitivitätswert); und (D) *minimal/maximal möglicher Fluss*: Visualisierung der reaktionsspezifischen minimal/maximal möglichen Flusswerte in Form eines Balkendiagramms innerhalb der Reaktionsknoten (x-Achse: Minimum, Maximum; y-Achse: Flusswert)

Interaktionstechniken

Von zentraler Bedeutung für den visualisierungsbasierten Erkenntnisgewinn ist die interaktive Exploration und Manipulation der Daten auf der Grundlage geeigneter Interaktionsformen (siehe Abschnitt 2.2.3.2). In Bezug auf die optimierungsbasierte Modellanalyse stellt die Parametervariation, das heißt, die schrittweise Änderung eines bzw. mehrerer Modellparameter über eine bestimmte Bandbreite von Werten (Parametergradient), einen wesentlichen Bestandteil der Modellexploration dar. Die auf Grundlage von sequentiellen Modellsimulationen erfolgende Parametervariation resultiert in sequentiellen Simulationsdatensätzen. Als Ergebnis verschiedener Diskussionsrunden mit Biologen und Bioinformatikern hat sich gezeigt, dass eine interaktive Exploration sequentieller Simulationsdaten den Prozess der Modellanalyse wesentlich unterstützen bzw. vereinfachen würde. Mit dem Ziel, eine interaktive Exploration sequentieller Simulationsdaten zu ermöglichen wurde folgendes Visualisierungskonzept ausgearbeitet:

Eine interaktive Visualisierung sequentieller Simulationsdaten erfolgt auf Grundlage der Erzeugung von Animationen mit sich ändernden grafischen Elementen entlang eines oder mehrerer Parametergradienten. Eine interaktive Exploration einzelner Parametersätze wird durch die Zuverfügungstellung von Schiebereglern bzw. Schaltflächen ermöglicht, deren Aktivierung eine dynamische Darstellung der netzwerkintegrierten Flussprofile für den spezifischen Parametersatz zur Folge hat (siehe Abbildung 14). Entsprechend der Möglichkeit sequentielle Simulationsdatensätze zu erzeugen wurde eine interaktive Parametervariation für folgende optimierungsbasierte Analysemethoden umgesetzt: FBA, KA und RA.

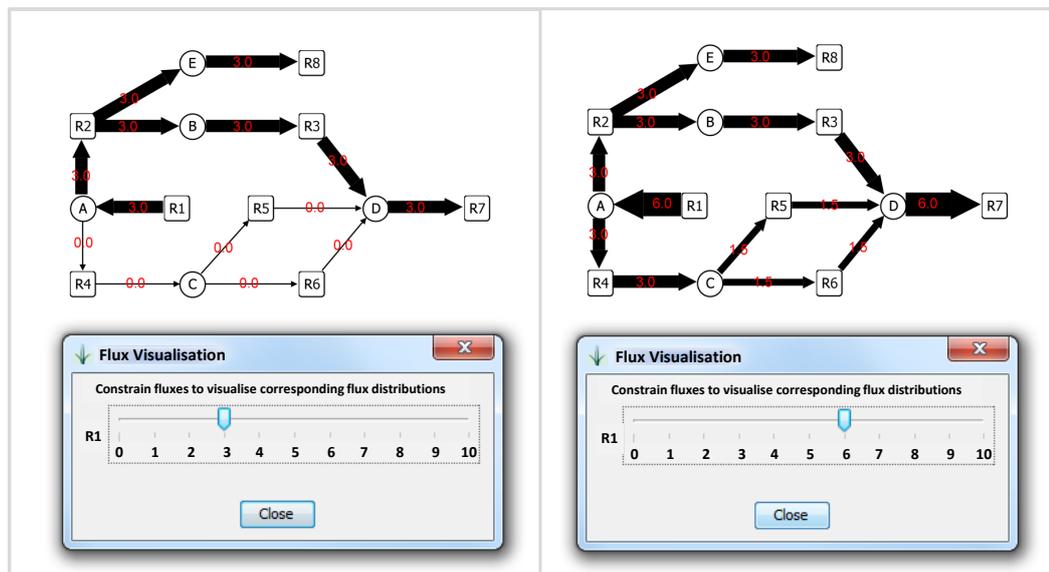


Abbildung 14: Interaktive Visualisierung sequentieller Simulationsdaten. Mit Hilfe einer interaktiven grafischen Benutzeroberfläche können die Simulationsergebnisse dynamisch animiert werden, in dem die automatisch gemappten Ergebnisse sequentieller Simulationsbedingungen interaktiv mit einem Schieberegler oder einer Schaltfläche ausgewählt und nahezu verzögerungsfrei visualisiert werden.

3.3.4 Implementierung

Die in Abschnitt 3.3.3 vorgestellte Methodik wurde in Form der Anwendung FBA-SIMVIS realisiert. FBA-SIMVIS ist als Add-on für das Softwaresystem VANTED implementiert und auf <http://www.fbasimvis.ipkgatersleben.de> verfügbar.

3.3.4.1 Systemarchitektur

FBA-SIMVIS ist als Add-on für die Analyse- und Visualisierungssoftware VANTED [JKSo6] implementiert. Das aus drei Ebenen (Core, Editor, Plugins¹¹) bestehende VANTED System bietet Methoden zur (i) Rekonstruktion biologischer Netzwerke, (ii) Integration biologischer Daten und (iii) Visualisierung netzwerkintegrierter Daten. Damit erfüllt das System bereits einen Teil der in Abschnitt 3.3.2.1 aufgeführten Anforderungen. Die flexible Erweiterung des Systems wird durch einen Plugin-Manager unterstützt.

Als Add-on zur optimierungsbasierten Analyse von Stoffwechselmodellen erweitert FBA-SIMVIS das Java-basierte VANTED System durch die Integration von Methoden der Modellrekonstruktion, optimierungsbasierten Modellanalyse und Visualisierung. Die Architektur von FBA-SIMVIS untergliedert sich in drei Ebenen (siehe Abbildung 15: Mitte).

Auf Ebene der **Modellrekonstruktion** unterstützen Rekonstruktionsregeln die grafische Rekonstruktion eines stöchiometrischen Modells in Form eines ModellGraphen, der übersetzt in SBML als Eingabe für die Modellsimulation dient.

Auf Ebene der **Modellsimulation** unterstützen verschiedene Methoden die Modellparametrisierung und -simulation. Die optimierungsbasierten Analysemethoden (FBA, KA, RA, FVA) sind als MATLAB-Code realisiert. Die implementierten MATLAB-Routinen nutzen verschiedene Methoden der freien Bibliothek der COBRA Toolbox 1.0. Wie bereits in Abschnitt 3.3.2.2 näher erläutert unterstützt diese Toolbox ein breites Angebot optimierungsbasierter Analysemethoden. Aufgrund der kontinuierlichen Weiterentwicklung der Toolbox bietet die Nutzung der Bibliothek den Vorteil, dass FBA-SIMVIS flexibel durch neueste Methoden der optimierungsbasierten Modellanalyse erweitert werden kann, ohne dass eine zeitaufwendige Neuimplementierung der Methoden erforderlich ist. Funktionalitäten der COBRA Toolbox, die in den implementierten MATLAB-Routinen verwendet wurden, umfassen Methoden der Modellhandhabung (u.a. Lesen/Edieren von SBML-Modellen) und Modellanalyse (Lineare Optimierung, RA, FVA). Mit Hilfe einer von COBRA zur Verfügung gestellten Schnittstelle wird zudem ein Solver für nichtlineare Optimierung (CLP Solver (COIN-OR Linear Program Solver) integriert und angesprochen. Die implementierten MATLAB-Routinen erweitern die Funktionalität der COBRA Toolbox durch die Implementierung (i) einer quadratischen Optimierungsfunktion (siehe Abschnitt 2.3.3.2), (ii) sequentieller Simulationsläufe (FBA, KA, RA) sowie (iii) Sensitivitätsberechnungen (KA, RA). Unterschiedliche I/O-Methoden ermöglichen den Datenaustausch zwischen dem FBA-SIMVIS Add-on und MATLAB. Um eine MATLAB-unabhängige Anwendung von FBA-SIMVIS zu gewährleisten, sind die MATLAB-Routinen als ausführbare Programme innerhalb einer MATLAB *Runtime Environment* (MRE) in das Java-basierte Add-on integriert.

Auf Ebene der **Visualisierung** integriert FBA-SIMVIS verschiedene Methoden der Interaktion (Flussanimation), Datentransformation (u.a. C/N-Flussberechnung) und netzwerkintegrierten Visualisierung von Simulationsdaten. Letztere basiert im Wesentlichen auf der Implementierung von dynamischen Flusskarten, Sensitivitätsdiagrammen und FVA-Diagrammen (siehe Abbildung 13).

¹¹ VANTED ist eine Plugin-basierte Software, die flexibel erweitert werden kann. In VANTED werden einzelne Methoden als Plugins und übergeordnete, thematisch zusammengehörende Programmfunktionalitäten als Add-ons bezeichnet

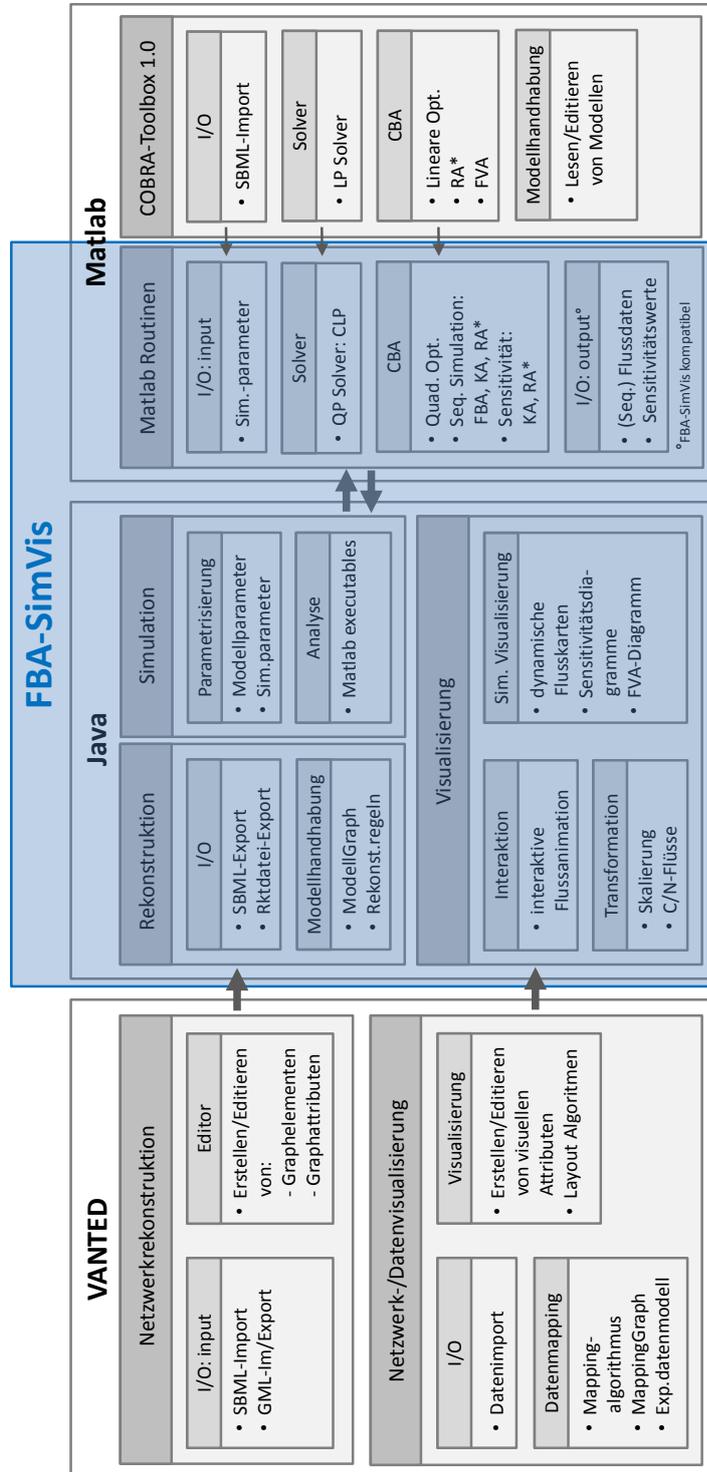


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Systemarchitektur von FBA-SimVis. FBA-SimVis ist als Add-on für VANTED implementiert. Für die Modellsimulation nutzt und erweitert das Java-basierte Add-on MATLAB-Routinen der COBRA Toolbox, die als ausführbare Programme innerhalb einer MATLAB *Runtime Environment* (MRE) in das Add-on integriert sind. Funktionalitäten von VANTED und der COBRA Toolbox, die in FBA-SimVis genutzt werden sind grau hinterlegt; neu in FBA-SimVis implementierte Methoden sind blau hinterlegt; Interaktionen zwischen den einzelnen Softwarekomponenten sind durch Pfeile dargestellt. Für eine ausführliche Darstellung der Systemarchitektur sei auf den Text verwiesen. *Abkürzungen:* Exp.datenmodell - Experimentdatenmodell; Rktdatei - Reaktionsdatei; Rekonst.regeln - Rekonstruktionsregeln; Seq. - Sequentiell; Sim.-parameter - Simulationsparameter; Quad. Opt. - Quadratische Optimierung

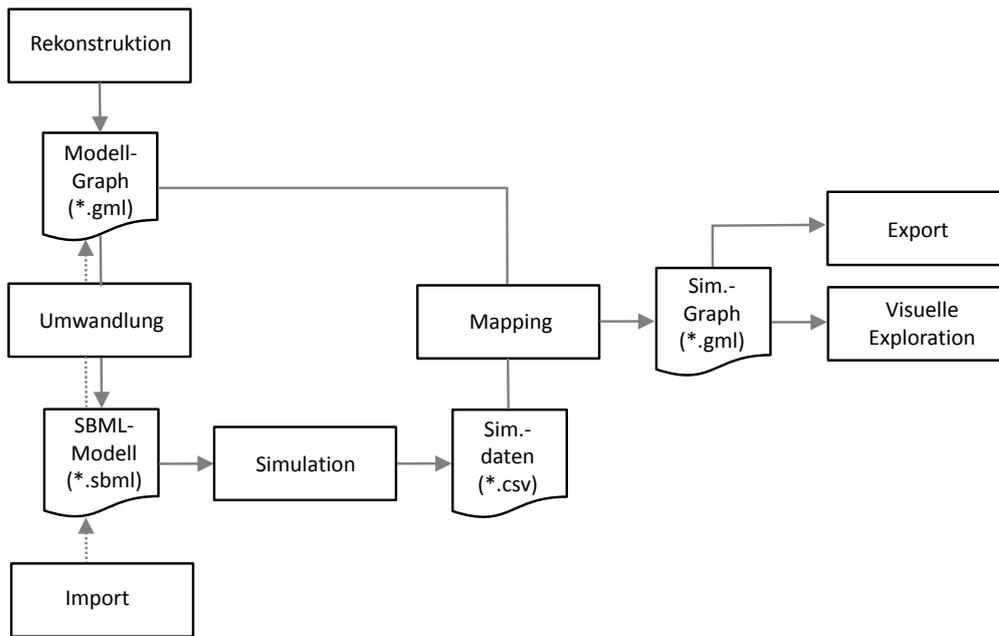


Abbildung 16: Darstellung der wesentlichen Programmfunktionalitäten in *FBA-SimVis* anhand verschiedener Workflows

3.3.4.2 Workflow

FBA-SIMVIS ist eine Java-basierte Windowsanwendung mit grafischer Benutzeroberfläche für alle Anwendungsfunktionen. Im Folgenden werden die wichtigsten Funktionen anhand der in Abbildung 16 dargestellten Workflows erläutert:

MODELLREKONSTRUKTION Die Rekonstruktion und Modifikation stöchiometrischer Stoffwechselmodelle erfolgt in FBA-SIMVIS mit Hilfe eines grafischen Modelleditors. Unter Anwendung vordefinierter Rekonstruktionsregeln können die einzelnen Modellkomponenten (Reaktions-, Metabolitknoten, Reaktionskanten; siehe Tabelle 9) mittels eines Drag- und Drop-Mechanismus auf einer interaktiven Zeichenfläche kombiniert und unter Verwendung eines Textmenüs weiter spezifiziert werden. Der resultierende interaktive ModellGraph kann individuell von Nutzerseite editiert, gespeichert und modifiziert werden und das erstellte stöchiometrische Modell in ein SBML-Modell umgewandelt und exportiert werden. Neben dieser visuellen Form der Modellerstellung kann ein bereits bestehendes Modell *via* SBML in die Software importiert und die Netzwerkgrafik mittels der in VANTED verfügbaren Layout-Algorithmen editiert und als ModellGraph abgespeichert werden.

OPTIMIERUNGSBASIERTE MODELLANALYSE FBA-SIMVIS integriert verschiedene Methoden der optimierungsbasierten Modellanalyse (FBA, KA, RA und FVA). Nach Auswahl der gewünschten Analysemethode und Spezifizierung der Optimierungsfunktion (Minimierung/Maximierung; lineare/quadratische Optimierung) und Simulationsparameter, kann die Simulation gestartet werden. Die erzeugten Simulationsdaten werden automatisch auf den ModellGraph gemappt und der SimulationsGraph erzeugt.

VISUALISIERUNG In Abhängigkeit von der ausgewählten Analysemethode erfolgt eine automatische methodenspezifische Visualisierung der Simulationsergebnisse auf der Netzwerkgrafik des SimulationsGraphen (siehe Abbildung 13). Im Falle sequentieller Simulationsdaten können die Simulationsergebnisse dynamisch animiert

werden, indem die automatisch gemappten Ergebnisse verschiedener Simulationsbedingungen interaktiv mit einem Schieberegler oder einer Schaltfläche ausgewählt und visualisiert werden.

3.4 ZUSAMMENFASSUNG

Mit dem Ziel, die optimierungsbasierte Analyse pflanzenbiologischer Stoffwechselmodelle zu unterstützen, wurden Softwarekomponenten zur Rekonstruktion, Analyse und Visualisierung von pflanzenbiologischen Stoffwechselmodell entwickelt und zu einer Pipeline integriert. Hierzu wurden zunächst Anforderungen an Systeme der Netzwerkrekonstruktion und -analyse ausgearbeitet und bestehende Systeme im Hinblick auf diese Anforderungen ausgewertet. Da diese Anforderungen weder von existierenden Systeme der Netzwerkrekonstruktion noch der Netzwerkanalyse erfüllt wurden, war die Entwicklung neuer Softwarekomponenten notwendig.

Die Anforderungen der Netzwerkrekonstruktion wurden in dem Informationssystem METACROP realisiert. In Bezug auf die Netzwerkanalyse wurden die Anforderungen in FBA-SIMVIS, einem VANTED Add-on zur optimierungsbasierten Analyse von Stoffwechselmodellen umgesetzt. Die entwickelten Softwarekomponenten wurden publiziert (METACROP 1.0: [GBWK⁺08]; FBA-SIMVIS: [GBKJS09]).

Die Synthese und Akkumulation von Speicherstoffen (Proteine, Kohlenhydrate und Lipide) ist ein zentraler Stoffwechselvorgang in Getreidesamen. Aufgrund der ernährungsphysiologischen und agronomischen Bedeutung der Reservestoffe ist das Verständnis des Speicherstoffwechsels in Getreidesamen von wissenschaftlichem Interesse mit praktischer Anwendung in der Agrarwissenschaft und Pflanzenzüchtung.

Mit dem Ziel, grundlegende Erkenntnisse über die zellulären Prozesse des Speicherstoffwechsels in sich entwickelnden Getreidesamen zu erhalten, wurde eine modellgestützte Stoffwechselanalyse unter Anwendung der im ersten Teil der Arbeit entwickelten Modellierungspipeline durchgeführt. Als Grundlage für die *in silico* Analyse wurde ein stöchiometrisches Modell des endospermalen Primärstoffwechsels von Gerste zum Zeitpunkt der Stärkeakkumulation in METACROP erstellt. Als Modellpflanze für Getreidesorten gemäßigter Zonen ist Gerste Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen [WSB⁺05]. Der Samenspeicherstoffwechsel von Gerste wurde umfassend untersucht [WPS⁺00, RWW⁺04, SAR⁺04, WSB⁺05] und stellt damit einen geeigneten Ausgangspunkt für die Modellierung des Primärstoffwechsels in Getreidesamen dar.

Unter Anwendung der in FBA-SIMVIS verfügbaren optimierungsbasierten Analyseverfahren wurde das erstellte Stoffwechselmodell zunächst in Abhängigkeit umweltbedingter und genetischer Störungen untersucht (Abschnitt 4.2), mit dem Ziel, grundlegende Erkenntnisse über die zellulären Prozesse des Primär- und Speicherstoffwechsels zu erhalten. In weiterführenden Analysen wurde der samenspezifische Saccharose- (Abschnitt 4.3) und Alaninstoffwechsel (Abschnitt 4.4) untersucht.

Entsprechend der Struktur wissenschaftlicher Publikationen aus dem Bereich der Biologie untergliedert sich die nachfolgende Darstellung der *in silico* Analysen in folgende Teile: (i) *Material und Methoden*: Spezifizierung der Simulationsmethoden und -parameter, (ii) *Ergebnisse*: Darstellung der Simulationsergebnisse, (iii) *Diskussion*: Biologische Interpretation der Simulationsergebnisse und (iv) *Zusammenfassung*.

4.1 GERSTENSAMEN-MODELL

4.1.1 *Biologische Grundlagen*

Schwerpunkt des in der vorliegenden Arbeit entwickelten Getreidesamen-Modells ist der Primärstoffwechsel in dem sich entwickelnden Endosperm von Gerste zum Zeitpunkt der Stärkeakkumulation. Eine Beschreibung der wesentlichen, durch das Modell abgebildeten Stoffwechselvorgänge wird im Folgenden gegeben.

Für eine detaillierte Beschreibung der in den folgenden Abschnitten verwendeten Begriffe aus dem Bereich der Stoffwechselbiochemie, Samenmorphologie und -entwicklung sei auf das Grundlagenkapitel (Abschnitte 2.1.1 und 2.1.2) verwiesen. Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist im Anhang, Abbildung 28 bis 30, gegeben.

Zuckerstoffwechsel

In der Hauptspeicherphase der Endospermentwicklung von Gerste basiert die Akkumulation von Speicherstoffen (Stärke, Speicherproteine) im Wesentlichen auf dem Import von Saccharose (Suc) [SAR⁺04]. Der aktive Transport von Suc in das Endosperm erfolgt mittels eines H⁺/Suc-Cotransporters [WF95, WPS⁺00]. Im Unterschied zu der Invertasekatalysierten Suc-Spaltung (Inv, EC 3.2.1.26) der Vorspeicherphase, erfolgt die Spaltung von Suc während der Hauptspeicherphase im Wesentlichen durch die Saccharosesynthase (SuSy, EC 2.4.1.13) [WPG⁺03, WSB⁺05] (siehe Abschnitt 2.1.2.2). Die Produkte der Suc-Spaltung werden entweder in der Glykolyse metabolisiert und/oder für die Stärkesynthese in den Amyloplasten transportiert. Die Verbindung zwischen Glykolyse und Hexosephosphatpool¹ erfolgt durch die cytosolische Pyrophosphat-Fruktose-6-phosphat-1-Phosphotransferase (PFP, EC 2.7.1.90) und/oder die cytosolisch/plastidäre Phosphofruktokinase (PFK, EC 2.7.1.11) [DR78, Nie94, FMRS02]. Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist in Abbildung 28 gegeben.

Stärkestoffwechsel

Kennzeichnend für die Stärkesynthese in Getreidesamen ist die Existenz einer cytosolischen Isoform der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase, EC 2.7.7.27), zusätzlich zu der in den Stärke-synthetisierenden Geweben aller Pflanzen vorkommenden plastidären Isoform [BSR01, JDM03]. Diese stellt in dem getreidespezifischen Reaktionsweg der Stärkesynthese den Hauptlieferanten von ADP-Glucose (ADPglc), dem Ausgangsstoff der Stärkesynthese, dar [TVKO96, BSR01, TVD⁺02]. Der Import von ADPglc in den Amyloplasten, dem Ort der Stärkesynthese, erfolgt mittels eines ADPglc-Transporters [PGF⁺04]. Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist in Abbildung 28 gegeben.

Aminosäurestoffwechsel

Die samenspezifische Aminosäurebiosynthese, eine Hauptdeterminante der Akkumulation von Speicherproteinen [WGH⁺98], basiert im Wesentlichen auf dem Import von Asparagin (Asn) und Glutamin (Gln), welche die Stickstoffkomponenten für die *de novo* Aminosäurebiosynthese liefern [BB94a]. Während die meisten Reaktionswege des Aminosäurestoffwechsels auf die Plastiden beschränkt sind (u.a. Histidin, Valin, Leucin, Isoleucin) [Sing99], werden eine Reihe von Aminosäuren (u.a. Arginin, Methionin, Glycin, Aspartat) in verschiedenen und/oder mehr als einem Zellkompartiment synthetisiert. Beispielsweise erfolgt die Synthese von Aspartat (Asp) aus Oxalacetat in verschiedenen Kompartimenten (Cytosol, Mitochondrium, Plastid) durch die unterschiedlichen Isoformen der Aspartat-Transaminase (Asp-AT, EC 2.6.1.1) [DR77, FBJL⁺06]. Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist in Abbildung 29 gegeben.

Energiestoffwechsel

Die Akkumulation von Speicherstoffen ist durch eine hohe transkriptionelle Aktivität von Genen des Energiestoffwechsels (Glykolyse, Gärung, Citratzyklus) gekennzeichnet [SAR⁺04]. Zusätzlich zu der Produktion von Energie- und Reduktionsäquivalenten liefern diese Reaktionswege Ausgangsstoffe für den Glucose- und Aminosäurestoffwechsel [OKHo2]. Kennzeichnend für die Glykolyse ist die subzelluläre Lokalisierung der glykolytischen Enzyme im Cytosol und Plastid [SAR⁺04, FBJL⁺06, SRS⁺06], sowie das Vorhandensein PP_i-abhängiger *Bypass*-Reaktionen (PFP, PPK) [MKL82, Nie94, FMRS02].

¹ Hexosephosphat: Monophosphorsäureester von Hexosen wie beispielsweise Glucose-1-phosphat, Glucose-6-phosphat und Fructose-1-phosphat

Verschiedene anaplerotische Enzyme (u.a. Phosphoenolpyruvatcarboxylase, Malatdehydrogenase) sorgen durch die Bereitstellung von Citratzyklus-Intermediaten dafür, dass der Abzug von Ausgangsstoffen für die Speicherstoffbiosynthese kompensiert und der Citratzyklus ausbalanciert wird. Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist in Abbildung 30 gegeben.

Transportprozesse

In sich entwickelnden Getreidesamen erfolgt der aktive Transport von Kohlenstoff in den Plastiden unter anderem durch verschiedene plastidäre Antiportsysteme wie den Triosephosphat-/Phosphat-Transporter, den Hexosephosphat-Transporter und den Phosphoenolpyruvat-/Phosphat-Transporter [FKG⁺97, PGF⁺04, TTON06]. Mitochondriale Transporter, die in Getreide nachgewiesen wurden, umfassen unter anderem den Pyruvat-Transporter, den Adenylat-Transporter und verschiedene Di- und Tricarboxylat-Transporter² wie den 2-Oxoglutarat-/Malat-Transporter [DH77, WDSL91, PPP⁺02].

Für eine vollständige Auflistung der Reaktionen, die in dem Stoffwechselmodell enthalten sind, sei auf den Anhang (CD) verwiesen.

4.1.2 *Modellrekonstruktion*

Das stöchiometrische Modell des endospermalen Primärstoffwechsels von Gerste wurde entsprechend dem in Abschnitt 2.3.2.1 skizzierten Vorgehen zur Rekonstruktion pflanzenbiologischer FBA-Modelle iterativ erstellt. Nur Stoffwechselwege des zentralen Samenstoffwechsels, die für die Synthese der Hauptbiomassekomponenten (>1% des Gesamtrockengewichts) notwendig sind, wurden in das Modell integriert. Grundlage hierfür war die in [OECO4] aufgeführte Biomassezusammensetzung von Gerstenkörnern. Die Literaturreferenzen, welche die einzelnen Netzwerkreaktionen belegen, sind im Anhang (CD) aufgeführt. In den Fällen, in denen das gerstensamenspezifische Vorkommen einer Reaktion durch keine Literaturquellen belegt werden konnte, wurden Daten aus nahverwandten monokotylen Arten wie Weizen, Reis und Mais hinzugezogen, um die Netzwerkreaktion zu belegen. Für den Fall, dass keine Angaben zu der Irreversibilität einer Reaktion verfügbar waren, wurden diese als reversibel definiert. Multienzymkomplexe, wie die Pyruvatdehydrogenase, wurden als Einzelreaktion modelliert, indem die einzelnen Reaktionen der verschiedenen Untereinheiten zusammengefasst wurden.

In Bezug auf die Kompartimentierung wurden Reaktionen, die nicht im extrazellulären Medium, dem Cytosol, dem Mitochondrium oder dem Amyloplast lokalisiert waren, sowie Reaktionen ohne Angabe einer Lokalisierung, als cytosolisch berücksichtigt. Grund hierfür war die sehr geringe Anzahl an Reaktionen, die in anderen Kompartimenten vorkamen. Eine Liste der Reaktionen, die in dem Netzwerk enthalten sind, sowie eine SBML-Version des Modells, sind im Anhang (CD) aufgeführt. Die Modellerstellung wurde unter Verwendung von METACROP durchgeführt.

4.1.3 *Modelleigenschaften*

Das erstellte stöchiometrische Modell umfasst 234 Metabolite, die in insgesamt 194 Reaktionen ab-, um- oder aufgebaut werden. Weitere 65 Reaktionen beschreiben intrazelluläre Transportprozesse zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten (Cytosol, Mitochondrium, Amyloplast) sowie den Austausch von Stoffen mit dem extrazellulären Medium

² Di- bzw. Tricarboxylate sind Salze von Carbonsäuren, die über zwei bzw. drei Carboxy-Gruppen (-COOH) verfügen.

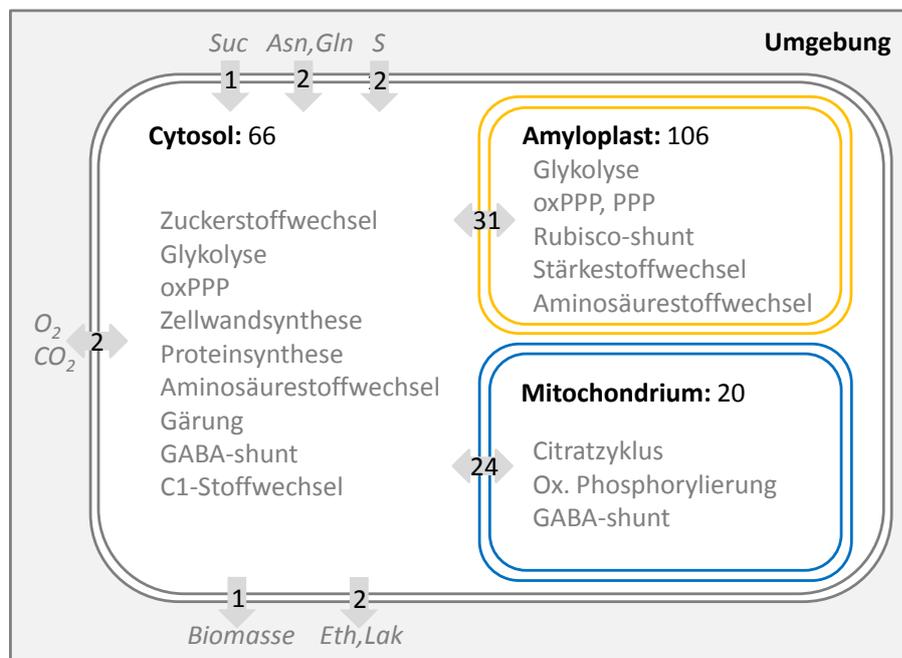


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Gerstensamen-Modells. Die Darstellung umfasst für jedes Zellkompartiment die wesentlichen, in einem Zellkompartiment ablaufenden Stoffwechselprozesse, sowie die Anzahl der biochemischen Reaktionen. Der Stoffaustausch (Transportreaktionen) zwischen Endospermzelle und Umgebung bzw. zwischen den einzelnen Zellkompartimenten ist in Form grauer Pfeile dargestellt. Die Anzahl der Transportreaktionen ist innerhalb der Pfeile wiedergegeben. *Abkürzungen:* Asn: Asparagin, C1-Stoffwechsel: Folatstoffwechsel; Eth: Ethanol; Gln: Glutamin, Lak: Laktat; ox. Phosphorylierung: oxidative Phosphorylierung; oxPPP: oxidativer Pentosephosphatweg; PPP: Pentosephosphatweg; Suc: Saccharose, S: H₂S

und binden damit die Endospermzelle in ihre natürliche Umgebung ein. Die in dem Modell abgebildeten Stoffwechselfvorgänge umfassen neben dem Primärstoffwechsel (u.a. Glykolyse, Citratzyklus, Pentosephosphatweg) zentrale Reaktionswege des endospermalen Speicherstoffwechsels (u.a. Aminosäure-, Stärkestoffwechsel). Die grundlegenden Netzwerkeigenschaften des Modells sind in [Abbildung 17](#) aufgeführt. Eine grafische Darstellung des gesamten Modells ist im Anhang ([Abbildung 31](#)) gegeben.

4.2 PRIMÄRSTOFFWECHSEL

Mit dem Ziel, grundlegende Erkenntnisse über die zellulären Prozesse des endospermalen Speicherstoffwechsels von Gerste zu gewinnen, wurde der Primärstoffwechsel in Abhängigkeit umweltbedingter und genetischer Störungen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Wachstumssimulationen unter variablen Saccharose- und Sauerstoffbedingungen ([Abschnitt 4.2.2.1](#)) sowie *in silico* *Knockout*-Analysen durchgeführt ([Abschnitt 4.2.2.2](#)).

4.2.1 Material und Methoden

Optimierungsbasierte Modellanalyse

Im Rahmen der optimierungsbasierten Modellanalyse wurde folgende, in [Tabelle 13](#) aufgeführten, Simulationsexperimente durchgeführt. Nähere Erläuterungen zu den angewandten Analysemethoden, der Zielfunktion sowie der Modellparametrisierung werden im Folgenden gegeben.

Nr.	Beschreibung	Ergebnisse	Diskussion
<i>Wachstumssimulationen in Abhängigkeit umweltbedingter Störungen</i>			
S1	PhPP-Analyse (Suc-/O ₂ -PhPP)	4.2.2.1	4.2.3.2
S2	Kornwachstum unter variablen O ₂ -Bedingungen	4.2.2.1	4.2.3.2
S3	Berechnung phasenspezifischer Flusskarten	4.2.2.1	4.2.3.2
S4	Berechnung phasenspezifischer Flusskarten	4.2.2.1	4.2.3.2
S5	Schattenpreisanalyse der Schlüsselmetabolite	4.2.2.1	4.2.3.2
<i>Wachstumssimulationen in Abhängigkeit genetischer Störungen</i>			
S6	Knockout-Analyse	4.2.2.2	4.2.3.3

Tabelle 13: Simulationsexperimente der optimierungsbasierten Modellanalyse

Zielfunktion

Alle Simulationsexperimente wurden auf Grundlage der im Folgenden als Z₁ bezeichneten Zielfunktion der *Maximierung der Biomasse pro Flusseinheit* durchgeführt. Mathematisch ist diese Zielfunktion wie folgt als zweistufiger Optimierungsprozess implementiert (siehe Abschnitt 2.3.3.2):

	Optimierung	Zielfunktion	Math. Definition	Erläuterung
1. Schritt:	linear	Max Biomasse	$\max v_{\text{biomass}}$	2.3.3.2
2. Schritt:	nichtlinear	Min Gesamtfluss	$\min \sum_{i=1}^n v_i^2$	2.3.3.2

Tabelle 14: Mathematische Definition der Zielfunktion Z₁: Maximierung der Biomasse pro Flusseinheit

Wachstum bzw. Produktion von Biomasse wurde in Form der in Abschnitt 2.3.3.2 näher spezifizierten Biomassereaktion modelliert. Die Abschätzung des Bedarfs der einzelnen biosynthetischen Ausgangsstoffe (d_M) wurde auf Grundlage der in [OEC04] aufgeführten Biomassezusammensetzung von Gerstensamen durchgeführt. Eine Liste der Biomassekomponenten sowie den dazugehörigen stöchiometrischen Koeffizienten in der Biomassegleichung des Modells ist im Anhang (Abschnitt A.3.2.2) aufgeführt. Der Energiebedarf für Wachstum und Erhalt der Biomasse wurde auf Grundlage einer Überprüfung der relevanten Literatur bestimmt. Aufgrund des Mangels an experimentellen Daten wurde ein wachstumsassoziierter Energiebedarf von $5.36 \text{ mmol ATP g}^{-1} \text{ TG}$ auf Grundlage der von Amthor [Amtoo] publizierten Berechnungsgrundlage ermittelt. Eine detaillierte Darstellung der zugrunde liegenden Berechnung ist im Anhang (Abschnitt A.3.2.2) aufgeführt. Die mittels Literaturrecherche ermittelten experimentell bestimmten Werte der Erhaltungsenergie lagen zwischen 7×10^{-6} und $14 \times 10^{-6} \text{ mmol ATP g}^{-1} \text{ TG}$ [dV75]. Diese wurden aufgrund der Geringfügigkeit der Werte nicht berücksichtigt.

	OBA	Z	O ₂	Suc	R _{del}
S ₁	PhPP	Z ₁	0–30	0–40	.
S ₂	FBA	+	0–30	8*	.
S ₃ : P ₁	FBA	+	0	8	.
S ₃ : P ₂	+	+	1	8	.
S ₃ : P ₃	+	+	4	8	.
S ₃ : P ₄	+	+	8.5	8	.
S ₃ : LO	+	+	8.9	8	.
S ₄ : P ₁	+	+	0	5	.
S ₄ : P ₂	+	+	0.8	5.3	.
S ₄ : P ₃	+	+	3.5	6.1	.
S ₄ : P ₄	+	+	8.4	7.7	.
S ₄ : LO	+	+	8.9	8	.
S ₅	SPA	+	S ₃	S ₃	.
S ₆	KA	+	S ₃	S ₃	s.T.

Tabelle 15: Modellparameter der Simulationsexperimente S₁ bis S₆. Einheiten: $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$. *Die Aufnahme von Suc wurde auf $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$ begrenzt. Grundlage hierfür waren [¹⁴C]Suc-Labeling Experimente [FPN84] in sich entwickelnden Gerstensamen, bei denen eine Suc-Aufnahmerate von 5 und $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$ für den 17. bzw. 5. DAF gemessen wurde. Abkürzungen: OBA: optimierungsbasierte Analysemethode; Z: Zielfunktion; SPA: Schattenpreisanalyse; KA: *Knockout*-Analyse; R_{del}: *Knockout*-Reaktion; s.T.: siehe Text; P₁ - P₄: phänotypische Phasen 1 bis 4, LO: Optimalitätslinie.

Modellparametrisierung

Alle Simulationsexperimente wurden auf Grundlage des in Abschnitt 4.1 erläuterten Modells unter Anwendung der in Tabelle 15 aufgeführten Modellparameter durchgeführt. Soweit nicht anderweitig in Tabelle 15 vermerkt, wurden die Austauschflüsse der Metabolite, denen die Aufnahme in das System (d.h. Asn, Gln, O₂, H₂S) bzw. der Austritt aus dem System (d.h. Laktat, Ethanol, CO₂) erlaubt war, in der Hin- bzw. Rückrichtung nicht begrenzt. Alle Flüsse durch interne Reaktionen waren unbegrenzt.

Mit dem Ziel, das Stoffwechselverhalten der im Rahmen der PhPP-Analyse (Simulationsexperiment S₁) identifizierten phänotypischen Phasen darzustellen und zu veranschaulichen, wurden die Simulationsexperimente S₃ und S₄ auf Grundlage der in Tabelle 15 aufgeführten Parameter durchgeführt. Die Simulationen der Schattenpreisanalyse (Simulationsexperiment S₅) und der *in silico Knockout*-Analyse (Simulationsexperiment S₆) wurden auf Grundlage der für Simulationsexperiment S₃ spezifizierten Parameter ausgeführt. Alle Simulationen wurden mit FBA-SIMVis durchgeführt.

PhPP- und Schattenpreisanalyse

Die PhPP-Analyse (Simulationsexperiment S₁) wurde durchgeführt, indem der Schattenpreis für jeden Punkt (Intervall, $1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$) der Saccharose-Sauerstoff-Ebene berechnet wurde. Zusätzlich wurde eine Schattenpreisanalyse der Schlüsselmetabolite (Suc, O₂, ATP, H⁺, NADH und NADPH) ausgeführt (Simulationsexperiment S₅), um die Interpretation der aus der PhPP-Analyse resultierenden phänotypischen Phasen zu unterstützen. Für eine detaillierte Beschreibung der eingesetzten Methoden sei auf Abschnitt 2.3.3.2 verwiesen.

Knockout-Analyse

Um essentielle Reaktionen der phasenspezifischen Netzwerke vorhersagen zu können, wurden Enzymreaktionen des Zentralstoffwechsels einer Deletion unterzogen (Simulationsexperiment S6). Die Analyse wurde auf zentrale Bereiche (d.h. Glykolyse, Citratzyklus, Pentosephosphatweg, Gärung, Oxidative Phosphorylierung und Stärkesynthese) des metabolischen Modells beschränkt, da eine Enzymdeletion in einer der zumeist linearen und nicht-redundanten Stoffwechselwege der Aminosäure- und Cofaktorbiosynthese naturgemäß den Verlust der Wachstumsfähigkeit zur Folge hat. Anzumerken ist weiterhin, dass der durchgeführte *in silico* Knockout nicht analog zu einer Gendeletion ist, da eine Genfamilie aus mehr als einem Mitglied bestehen kann und damit die Deletion nur eines Familienmitglieds das Wachstum nicht beeinflussen würde.

Knockout-Simulationen wurden entsprechend der in Abschnitt 2.3.3.2 aufgeführten Methodik durchgeführt. Die Beeinträchtigung der Wachstumseffizienz bzw. Wachstumsfähigkeit W der Samen durch eine Deletion wurde wie folgt berechnet:

$$W = \frac{z^{\text{del}} \cdot 100}{z^{\text{opt}}}, \quad (4.1)$$

wobei z^{opt} dem Zielwert der Simulation unter optimalen Bedingungen (d.h., über alle Reaktionen des Systems) und z^{del} dem Zielwert der entsprechenden *Knockout*-Simulation entspricht. Auf Grundlage der berechneten Wachstumseffizienz wurden die enzymatischen Reaktionen der *Knockout*-Analyse wie folgt kategorisiert:

Kategorie	Wachstumseffizienz W
Essentielle Reaktionen	$W = 0$
Wachstumshemmende Reaktionen	$W < 95$
Nicht-essentielle Reaktionen	$W > 95$

Tabelle 16: Kategorisierung der Modellreaktionen auf Grundlage der Wachstumseffizienz

4.2.2 Ergebnisse

4.2.2.1 Speicherstoffwechsel in Abhängigkeit von Sauerstofflimitierung

Die Samenentwicklung von Gerste findet in der Hauptspeicherphase unter hypoxischen Bedingungen statt [RWW⁺o₄]. Um die Rolle der Sauerstoff- und Saccharoseversorgung auf den Speicherstoffwechsel in sich entwickelnden Gerstensamen zu untersuchen, wurde eine phänotypische Phasenebene (PhPP) berechnet, welche das Stoffwechselverhalten von Gerstensamen in Abhängigkeit unterschiedlicher Sauerstoff- und Suc-Verfügbarkeit wiedergibt (Simulationsexperiment S1).

Wie in Abbildung 18 dargestellt ist die zweidimensionale PhPP in fünf Phasen (P₁-P₅) unterteilt, wobei jede Phase durch ein spezifisches Muster an aktiven Stoffwechselwegen charakterisiert ist [EIPo₁]. Phase eins bis vier sind durch duale Substratlimitierung gekennzeichnet. In diesen Phasen führt die Zunahme sowohl der O₂- als auch der Suc-Verfügbarkeit zu einer Steigerung der Biomasseproduktion. Phase fünf, die durch

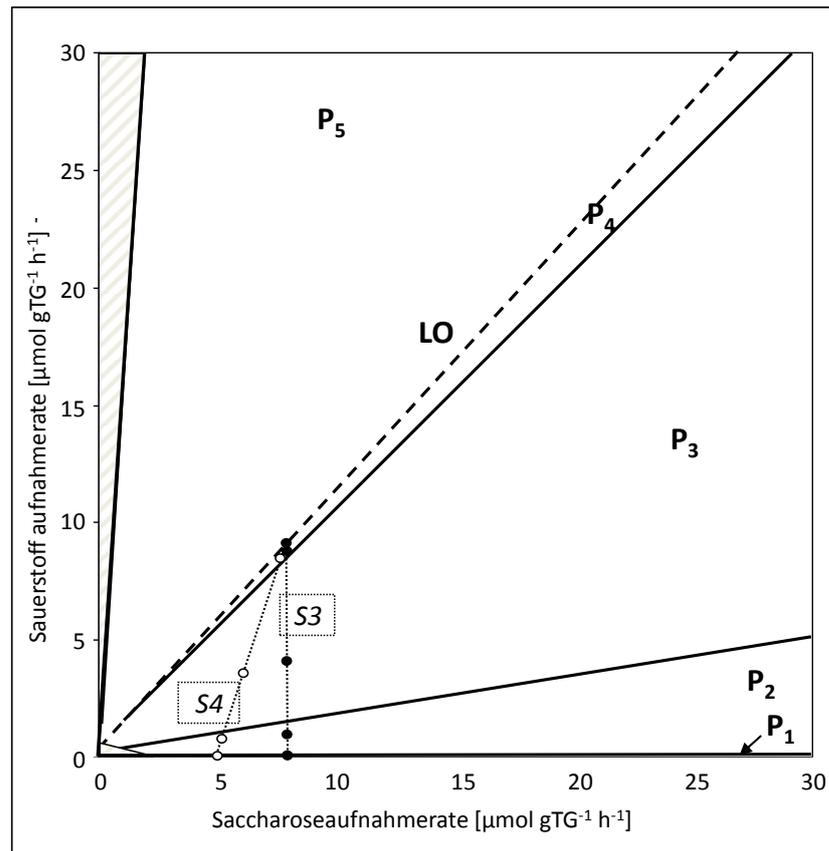


Abbildung 18: PhPP-Analyse. Visualisierung der PhPP, welche das Stoffwechselverhalten von Gerstensamen in Abhängigkeit unterschiedlicher O_2 - und Suc-Verfügbarkeit wiedergibt. Die PhPP ist in fünf Phasen unterteilt (P_1 - P_5), wobei jede Phase durch ein spezifisches Muster an aktiven Stoffwechselwegen charakterisiert ist. Die LO, dargestellt als gestrichelte Linie, definiert das optimale Verhältnis der Substrataufnahmeraten zum maximalen Biomasseertrag. Die gepunkteten Linien geben die Wachstumsbedingungen (Modellparameter) der Simulationsexperimente S_3 und S_4 wieder. Punkte auf den Linien entsprechen den Substrataufnahmeraten (Suc- und O_2 -Aufnahmerate), die für die Simulation der metabolischen Flussverteilungen, welche die einzelnen Phasen charakterisieren, verwendet wurden (Simulationsexperimente S_3 und S_4 , siehe Material und Methoden, Abschnitt 4.2.1 für Details)

das Auftreten von Substratzyklen³ gekennzeichnet ist, entspricht einer als Substratzklusphase (engl. futile phase) bezeichneten Phase [EIP01]. In dieser Phase führt eine Zunahme der Suc-Verfügbarkeit zu einer Steigerung der Biomasseproduktion, während eine Zunahme der O_2 -Verfügbarkeit zu einer Verringerung der Wachstumsrate führt. Die auf der Grenzlinie zwischen P_4 und P_5 liegende Optimalitätslinie (LO) gibt das optimale Verhältnis zwischen Substrataufnahmeraten und maximaler Biomasseproduktion wieder. Für den Fall aerober Wachstumsbedingungen beziffert LO die optimale Sauerstoffaufnahme, d.h. die Sauerstoffaufnahme, die notwendig ist, um durch eine vollständige Oxidation⁴ von Suc eine Maximierung der Biomasseproduktion zu erreichen.

3 Substratzyklen (engl. futile cycles) sind Kohlenstoffzyklen, in denen katabole und anabole Reaktionen gleichzeitig ablaufen, wobei Energie verbraucht wird. Die physiologische Bedeutung dieser Zyklen ist weiterhin umstritten und wird kontrovers diskutiert (siehe u.a. Portais *et al.* [PD02])

4 Oxidation: chemische Reaktion, bei der ein chemischer Stoff Elektronen abgibt

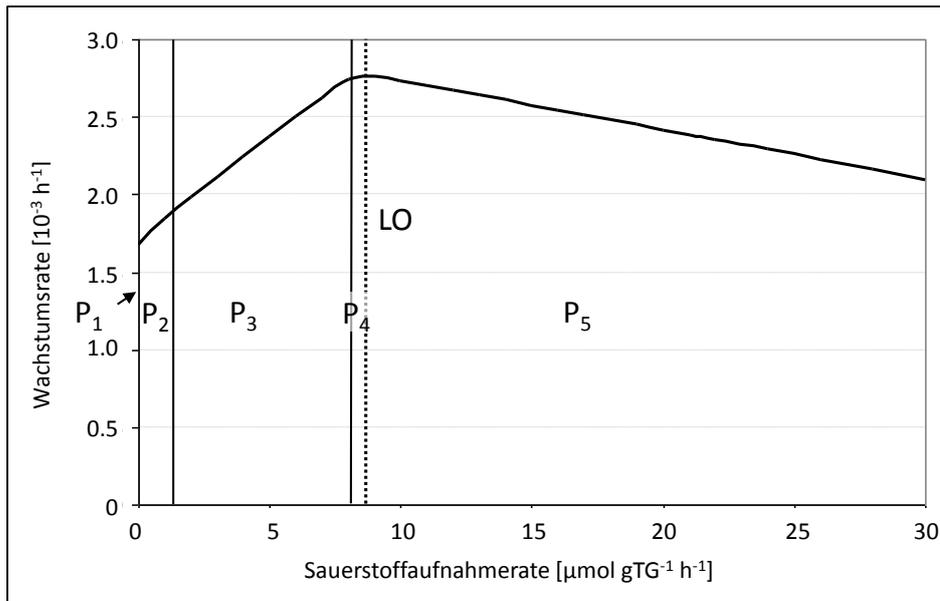


Abbildung 19: Kornwachstum in Abhängigkeit der Sauerstoffverfügbarkeit (Simulationsexperiment S2). Die vertikalen Linien begrenzen die phänotypischen Phasen P₁ bis P₅. LO, dargestellt als gepunktete Linie, definiert das optimale Verhältnis der Substrataufnahmerate zum maximalen Biomassertrag.

Kornwachstum

Um den Einfluss einer Sauerstofflimitierung auf das Kornwachstum zu untersuchen, wurden Wachstumssimulationen unter variablen Sauerstoffbedingungen durchgeführt (Simulationsexperiment S2). Die Ergebnisse der *in silico* Analyse zeigen, dass die Wachstumsrate linear mit zunehmender Sauerstoffaufnahme ansteigt (Abbildung 19, P₁-P₄). Die maximale Wachstumsrate (μ_{sim}) von 0.003 h^{-1} wird unter optimalen Wachstumsbedingungen erreicht (Abbildung 19, LO). Eine weitere Steigerung der O₂-Aufnahmerate führt zu einer Verringerung der Wachstumsrate aufgrund von Substratzyklen (Abbildung 19, P₅). Insgesamt weisen die in der Simulation vorhergesagten Wachstumsraten gute Übereinstimmungen mit den experimentellen Werten (μ_{exp} (14. DAF): $0.003 - 0.007 \text{ h}^{-1}$ [FPN83, QTL88]) auf.

Flusskarten der metabolischen Stoffflussanalyse

Mit dem Ziel, das Stoffwechselverhalten der im Rahmen der PhPP-Analyse identifizierten phänotypische Phasen darzustellen, wurden Simulationen auf der Grundlage phasenspezifischer Aufnahmeraten (siehe Tabelle 15) durchgeführt (Simulationsexperimente S3). Die Flusskarten der entsprechenden *in silico* Stoffflussanalysen, basierend auf den berechneten Kohlenstoffflüssen, sind in Abbildung 20 wiedergegeben. Eine Auflistung der simulierten Flusswerte ist im Anhang (CD) gegeben. Für eine weiterführende Charakterisierung der einzelnen Phasen wurde eine Schattenpreisanalyse der Schlüsselmetabolite durchgeführt (Simulationsexperiment S5). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 17 aufgeführt. Im Folgenden werden die einzelnen Phasen der berechneten PhPP beschrieben und Änderungen innerhalb des Stoffwechselverhaltens spezifiziert.

	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4	LO	Phase 5
Suc	-0.2087	-0.2112	-0.2158	-0.2807	/	-0.3814
O ₂	-0.1918	-0.151	-0.1285	-0.019	/	0.0318
ATP	-0.0447	-0.0453	-0.0463	-0.0123	-0.0123	0
H ⁺	-0.0149	-0.0151	-0.0154	-0.0041	-0.0018	0
NADH (c, m)	0.0356	0.0151	0.0026	-0.0068	-0.0128	-0.0159
NADH (p)	-0.0097	-0.0302	-0.0380	-0.0265	-0.0264	-0.0556
NADPH (c, m, p)	0.0356	0.0151	0.0026	-0.0068	-0.0128	-0.0159

Tabelle 17: Schattenpreise berechnet für die phänotypischen Phasenebenen: Phase 1 bis Phase 5 und die Optimalitätslinie (LO). Ein negativer (resp. positiver) Schattenpreis zeigt an, dass ein Metabolit limitierend (resp. im Überschuss vorhanden) ist. Abkürzungen: c: cytosolisch, m: mitochondrial, p: plastidär.

Anoxie: Phase 1

Die metabolische Flussverteilung unter anoxischen Wachstumsbedingungen ist durch das Fehlen der Respiration und die Induktion der Gärung gekennzeichnet (Abbildung 20A). Der niedrige Fluss durch ATP-verbrauchende anabole Prozesse wie Aminosäure- und Stärkesynthese bedingt eine geringe Biomasseproduktion. Die Aminosäuresynthese beruht auf dem Import von Asn und Gln. Die Synthese von ADPglc, dem Ausgangsstoff der Stärkesynthese, ist auf die cytosolische AGPase beschränkt, da die plastidäre AGPase in Richtung Glykolyse und damit in Richtung ADPglc-Verbrauch operiert. Der Fluss durch die Glykolyse ist hoch und im Wesentlichen durch die ATP-verbrauchenden Reaktionen von PFK und Pyruvatkinase (PK, EC 2.7.1.40) gelenkt. PFP und PFK bilden einen Substratzyklus, in dem ATP zu anorganischem Pyrophosphat (PP_i) umgewandelt wird (Abbildung 21A). Ein zyklischer Fluss durch den Citratzyklus ist nicht vorhanden. Mit Ausnahme von plastidärem NADH sind die Redoxäquivalente NADH und NADPH im Überschuss vorhanden, während Energie in Form von ATP limitiert ist (Tabelle 17).

Hypoxie: Phase 2

Der Beginn der Sauerstoffaufnahme ist durch die Induktion der Respiration und die Abnahme des glykolytischen Flusses gekennzeichnet. Bedingt durch eine weiterhin starke Sauerstofflimitierung sind Änderungen in der metabolischen Flussverteilung minimal.

Hypoxie: Phase 3

Die weitere Zunahme der Sauerstoffversorgung führt zu einer Verwendung des vollständigen Citratzyklus, begleitet durch die Abnahme des fermentativen Flusses und einer Zunahme der ATP-konsumierenden Prozesse wie Stärkesynthese (Abbildung 20B). Im Unterschied zu Phase 1 und 2 ist der durch PFK und PFP gebildete Substratzyklus nicht länger aktiv und der glykolytische Fluss wird zusätzlich durch den PP_i-verwendenden *Bypass* von PFP und Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase (PPDK, EC 2.7.9.1; Abbildung 21B) getragen. Die Suc-Verfügbarkeit nimmt mit zunehmender O₂-Verfügbarkeit ab, woraus hervorgeht, dass Suc eine wachsende Bedeutung als limitierender Faktor bei zunehmender Sauerstoffversorgung hat.

Hypoxie: Phase 4

Die metabolische Flussverteilung dieser Phase ist durch die Einstellung der Gärung gekennzeichnet: Ethanol (Eth) und Laktat (Lac) werden nicht länger von der Zelle abge-

geben, so dass mehr Kohlenstoff in Wachstumsprozesse einfließen kann. Der Citratzyklus stellt in dieser Phase die Hauptenergiequelle dar. Im Unterschied zu Phase 1 bis 3 ist der glykolytische Fluss auf den PP_i -verwendenden *Bypass* von PFP und PPDK beschränkt (Abbildung 21C). Darüber hinaus reagiert die plastidäre AGPase nun in Richtung Stärke-synthese, woraus sich eine höhere Biomasseproduktion ergibt. Im Unterschied zu den Phasen 1 bis 3 sind die Redoxäquivalente limitierend (Tabelle 17).

Aerobiose: LO

Unter vollständig aeroben Wachstumsbedingungen entspricht die metabolische Flussverteilung dem optimalen Stofffluss, der dadurch gekennzeichnet ist, dass die uneingeschränkte Sauerstoffverfügbarkeit eine maximal mögliche Biomasseproduktion ermöglicht. Im Unterschied zu den Phasen 1 bis 4, ist Gln die einzige Form von Stickstoff, die in das Endosperm aufgenommen wird. Zudem wird ATP in den Amyloplasten importiert, um Energie für ATP-konsumierenden anabole Prozess zu liefern.

Hyperoxie: Phase 5

In der Substratzyklusphase wirkt sich der Sauerstoffüberfluss hemmend auf das Erreichen einer maximalen Biomasseproduktion aus (Tabelle 17). Da die physiologische Bedingung des Sauerstoffüberschusses unter *in vivo* Bedingungen nicht auftritt, wird Phase 5 in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Kohlenstoffaufnahme in Samen unter hypoxischen und anoxischen Wachstumsbedingungen stark abnimmt [vDRD⁺04]. Um dieser Beobachtung Rechnung zu tragen, wurde ein zweites Simulationsexperiment (Simulationsexperiment S₄) durchgeführt, indem die Suc-Aufnahme parallel zu der Abnahme der O₂-Verbrauchsrate verringert wurde (siehe Tabelle 15). Die Flusswerte dieser *in silico* Analyse sind im Anhang (CD) aufgeführt. Wie aus diesen Daten sowie Abbildung 18 ersichtlich stimmen die aus den Simualtionsexperimenten S₃ und S₄ resultierenden Muster der aktiven Stoffwechselwege überein. Unterschiede zwischen den Simulationsergebnissen der beiden Simulationsexperimente sind auf Unterschiede hinsichtlich der Stärke des Gesamtflusses beschränkt, die in Simulationsszenario S₄ reduziert ist.

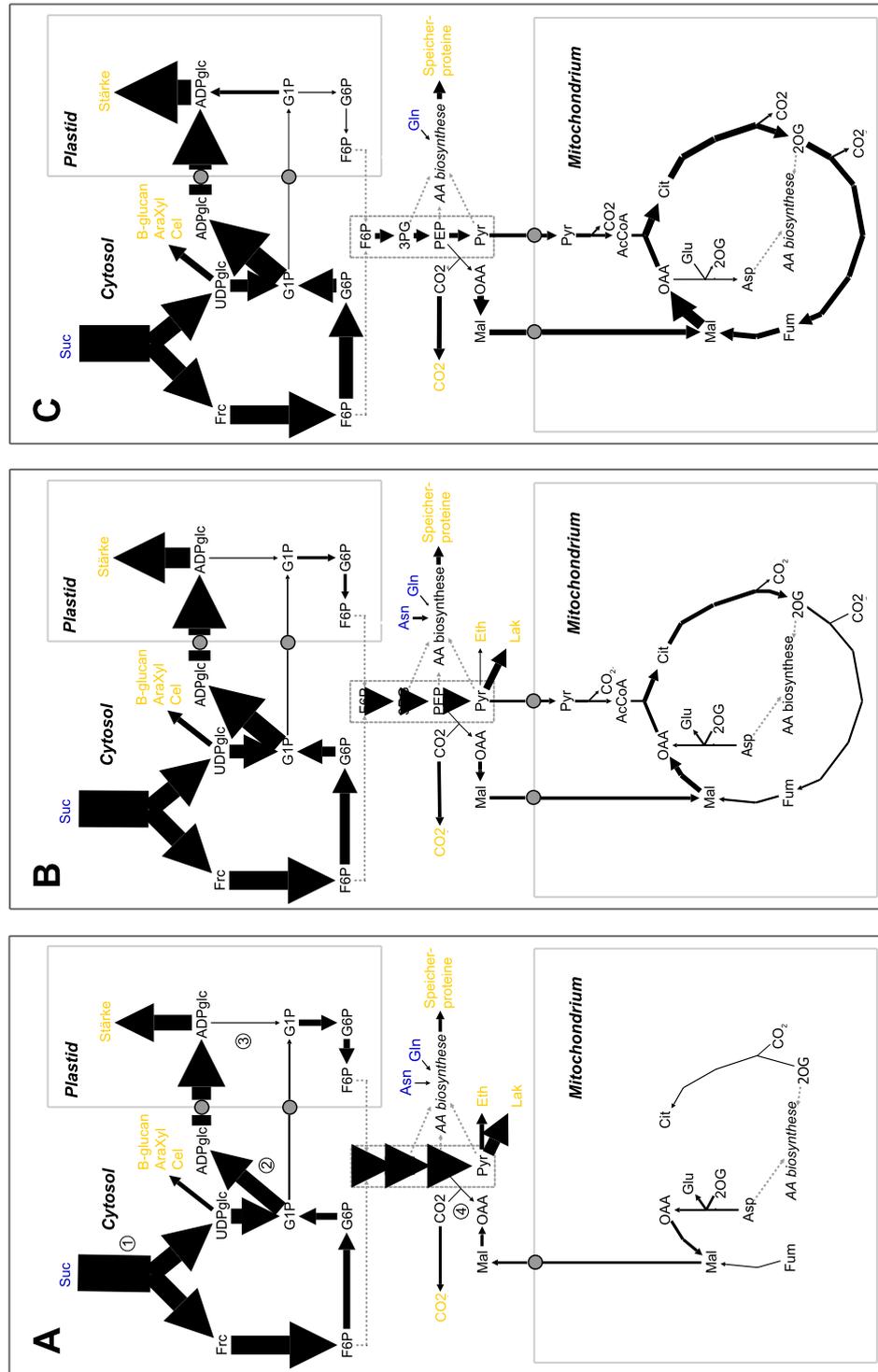


Abbildung 20: Flussprofil des Primärstoffwechsels des sich entwickelnden Endosperm der aeroben Phase, LO (C); Simulationsexperiment S3. Die Darstellung der metabolischen Flussverteilungen beschränkt sich auf zentrale Stoffwechselprozesse. Cytosolische und plastidäre Glykolyse wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit zusammengefasst (Abgrenzung: gestrichelte graue Linie). Schlüsselmetabolite, die von dem Modell aufgenommen werden oder in die Biomasse inkorporiert werden sind in gelb gekennzeichnet. Die Dicke der Pfeile entspricht den Flusswerten. Abkürzungen: 1: SuSy; 2: cAGPase; 3: pAGPase; 4: PEPC. Eine Erläuterung der Metabolit-, Transporter- und Enzymnamen ist im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt

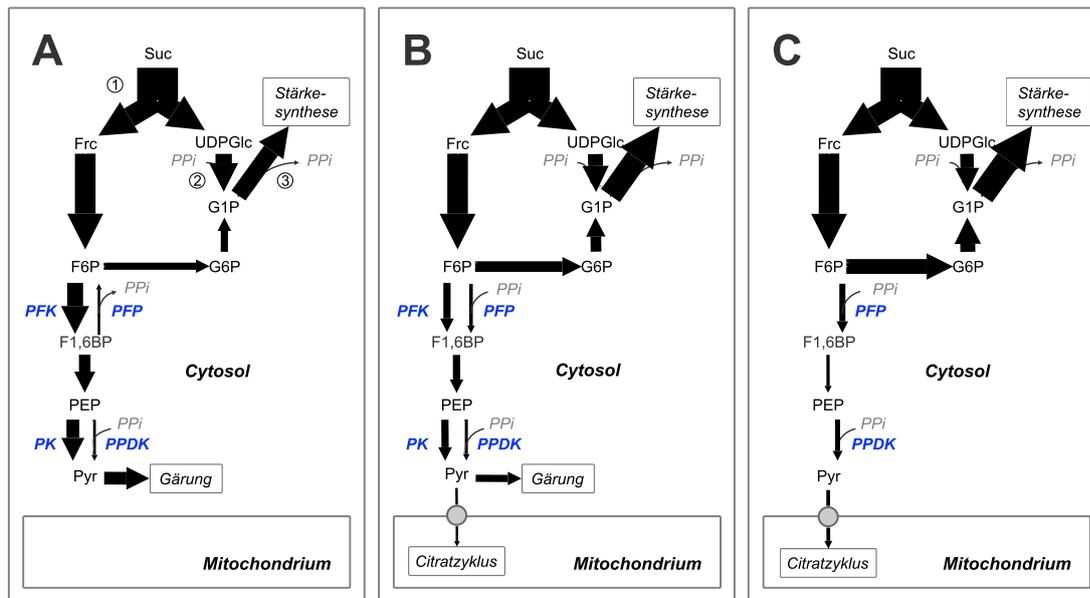


Abbildung 21: Flussprofil des Primärstoffwechsels des sich entwickelnden Endosperm der anoxischen Phase, Phase 1 (A); der hypoxischen Phase, Phase 3 (B) und der aeroben Phase, LO (C); Simulationsexperiment S3. Die Darstellung der metabolischen Flussverteilungen beschränkt sich auf die ATP-verwendenden Reaktionen PFK und PK, sowie den PP_i -verwendenden Bypass von PFP und PPDK, um Unterschiede zwischen ATP- und PP_i -abhängiger Glykolyse als Antwort auf die Sauerstoffversorgung hervorzuheben. Die Dicke der Pfeile entspricht den Flusswerten. Abkürzungen: 1: SuSy; 2: cAGPase; 3: pAGPase. Eine Erläuterung der Metabolit-, Transporter- und Enzymnamen ist im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt

4.2.2.2 Effekt der Enzymdeletion auf den Samenspeicherstoffwechsel

Mit dem Ziel, die Bedeutung der enzymkatalysierten Reaktionen des Primärstoffwechsels hinsichtlich der Wachstumsfähigkeit von Gerstensamen zu untersuchen, wurde eine *in silico Knockout*-Analyse unter verschiedenen Wachstumsbedingungen durchgeführt (Simulationsexperiment S6).

Wie aus Tabelle 18 ersichtlich, ist nur eine geringe Anzahl der ausgewählten Reaktionen essentiell für das Wachstum von Gerstensamen⁵. Drei enzymatische Reaktionen aus drei verschiedenen Stoffwechselwegen wurden unter allen Wachstumsbedingungen als essentiell eingestuft: (i) Fumarathydratase (FUM, EC 4.2.1.2) (Citratzyklus), (ii) Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) (Anaplerosis) und (iii) Fructokinase (FK, EC 2.7.1.4) (Suc-Abbau). Zusätzlich wurden alle Reaktionen der nicht-oxidativen Phase des Pentosephosphatwegs, des RubisCO-Bypass und eine Reaktion der oxidativen Phosphorylierung (H^+ -exportierende ATPase) als essentiell unter anoxischen Bedingungen (Phase 1) identifiziert.

Weiterhin sagt das Modell voraus, dass die Deletion spezifischer Reaktionen des Energiestoffwechsels (d.h. oxidative Phosphorylierung, Citratzyklus und Glykolyse) einen wachstumshemmenden Effekt unter den meisten Wachstumsbedingungen hat (Phase 2 - 4, LO). Der *Knockout* von Reaktionen der oxidativen Phosphorylierung (H^+ -exportierende ATPase, NADH-Dehydrogenase, Cytochrom-c-Oxidase) führt zu einer bedeutenden Abnahme der Wachstumseffizienz ($W = 60 - 91$), während die Deletion der Citratzyklus-Enzyme Aconitathydratase, Isocitratdehydrogenase (NAD^+), Pyruvatdehydrogenase und Citratsynthase nur einen geringen wachstumshemmenden Effekt

⁵ Zu Berücksichtigen ist hier, dass nicht alle biochemischen Reaktionen auf Grund der in Abschnitt 4.2.1 aufgeführten Gründe in die *in silico Knockout*-Analyse einbezogen wurden

Enzym	Reaktionsweg	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4	LO
Fructokinase	Suc	0	0	0	0	0
Phosphoenolpyruvatcarboxylase	Ana	0	0	0	0	0
Fumarathydratase	TCA	0	0	0	0	0
Ribose-5-phosphat-Isomerase	PPP	0	99.6	99.3	99.8	99.8
Transketolase 1	PPP	0	99.4	99.7	99.8	99.8
Transketolase 2	PPP	0	99.8	99.7	99.9	99.9
Transaldolase	PPP	0	99.8	99.7	99.9	99.9
Ribulosephosphat-3-Epimerase	PPP	0	99.8	99.9	99.9	99.9
Phosphoribulokinase	Rub	0	100	100	100	100
Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase	Rub	0	100	100	100	100
H ⁺ -exportierende ATPase	oxP	0	89.7*	83.0*	67.5*	67.3*
NADH-Dehydrogenase	oxP	100	90.7*	74.5*	60.6*	60.4*
Cytochrom-c-Oxidase	oxP	100	90.7*	74.5*	60.6*	60.4*
Sucrosesynthase	Suc	78.7*	80.5*	83.7*	87.6*	88.5*
UDP-Glucose-Pyrophosphorylase	Suc	82.5*	84.3*	87.8*	92.0*	92.9*
Cytosolische ADP-Glucose-Pyrophosphorylase	Suc	85.1*	84.9*	84.6*	86.6*	88.2*
Aconitathydratase	TCA	99.8	99.1	95.8	92.7*	93.1*
Isocitratdehydrogenase (NAD ⁺)	TCA	99.8	99.1	95.8	92.7*	93.1*
Pyruvatdehydrogenasekomplex	TCA	100	99.2	95.9	92.6*	92.9*
Citratsynthase	TCA	100	99.2	95.9	92.6*	92.9*
Cytosolische Phosphoglucoseisomerase	Glyc	98.7	97.7	94.8*	94.2*	95.7

Tabelle 18: Ergebnisse der *in silico Knockout*-Analyse angewandt auf zentrale Reaktionen des Primärstoffwechsels der metabolischen Netzwerke von Phase 1 bis 4 und der Optimalitätslinie (LO). Die aufgeführten Werte entsprechend der Wachstumseffizienz *W* (siehe Abschnitt 4.2.1). Essentiellen Reaktionen (*W* = 0) sind in Fettdruck dargestellt, wachstumsinibrierende Reaktionen (*W* < 95) sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet. *Abkürzungen:* Ana: Anaplerosis, Glyc: Glykolyse, oxPP: oxidative Phosphorylierung, PPP: Pentosephosphatweg, Rub: RubisCO-*Bypass*, Suc: Suc-Abbau, TCA: Citratzyklus

($W = 93 - 99$) unter diesen Bedingungen hat. Hinsichtlich der an der Synthese von Biomassekomponenten beteiligten Reaktionen führt die Deletion der cytosolischen AGPase, UDP-Glucose-Phosphorylase (UGPase, EC 2.7.7.9) und SuSy zu einer bedeutenden Abnahme der Wachstumseffizienz ($W = 79 - 89$) unter allen Wachstumsbedingungen. Aufgrund einer fehlenden bzw. nur minimalen Abnahme der Wachstumsfähigkeit ($W = 95 - 100$) wurden alle weiteren Reaktionen der *Knockout*-Analyse als nicht-essentiell eingestuft.

4.2.3 Diskussion

4.2.3.1 Modellierung des Speicherstoffwechsels in Samen

Mit dem Ziel, tiefer gehende Einblicke in die zugrunde liegenden Mechanismen des Speicherstoffwechsels in Getreidesamen zu erhalten, wurde ein stöchiometrisches Modell des endospermalen Primärstoffwechsels von Gerstensamen zum Zeitpunkt der Stärkeakkumulation erstellt. Um die Vorhersagefähigkeit des Modells zu validieren, wurde ein Vergleich zwischen den Simulationsergebnissen und publizierten experimentellen Daten durchgeführt. Hinsichtlich der Vorhersage des Kornertrags konnte eine gute Übereinstimmung zwischen den berechneten Wachstumsraten und experimentell bestimmten Werten aus der Literatur erzielt werden. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die für die Modellsimulation verwendete Zielfunktion geeignet ist, um biologisch sinnvolle Modellvorhersagen zu treffen, und dass das rekonstruierte Modell das Potential hat, den Stoffwechsel von Getreidesamen zu simulieren.

Durch die Etablierung einer Simulationsplattform für die *in silico* Analyse von Stoffwechselfvorgängen in Getreidesamen konnten verschiedene Aspekte des Speicherstoffwechsels rechnergestützt analysiert werden, die in den folgenden Abschnitten näher diskutiert werden.

4.2.3.2 Speicherstoffwechsel in Getreidesamen in Abhängigkeit von Sauerstofflimitierung

Sauerstoffzehrung ist ein bekanntes Merkmal dichter oder metabolisch aktiver Pflanzengewebe, wie sich entwickelnde Samen und Körner [RBK⁺02, Gei03, vDRD⁺04, RWW⁺04]. Um den Effekt der Sauerstoffzehrung auf den Speicherstoffwechsel sich entwickelnder Gerstensamen zu untersuchen, wurden Wachstumssimulationen unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen durchgeführt und die Simulationsergebnisse mit experimentellen Daten aus der Literatur verglichen. Zudem wurden die Modellvorhersagen dazu verwendet, in der Literatur kontrovers diskutierte Hypothesen hinsichtlich der Rolle von PP_i in sauerstofflimitierten Geweben zu überprüfen.

Samenstoffwechsel unter anoxischen Wachstumsbedingungen

Unter vollständig anaeroben Bedingungen wies das Modell charakteristisches anaerobes Stoffwechselverhalten auf [KRF92, Gei03]: (i) Inhibierung der Respiration, (2) Induktion der Gärung und (3) Stimulation der Glykolyse (Pasteur Effekt), resultierend in einer Abnahme des zellulären Energiezustands und einer Zunahme des Redoxzustands. Als Antwort auf das Überangebot an Reduktionsäquivalenten ist der Einsatz von NAD(P)H-generierenden Stoffwechselwegen limitiert, wie durch den unvollständigen Citratzyklus und die Inaktivität des oxidativen Zweiges des Pentosephosphatwegs angezeigt.

Experimentelle Studien über die Bedeutung von Enzymen des Citratzyklus unter anaeroben Wachstumsbedingungen sind selten und beschränken sich im Wesentlichen auf anoxietolerante Pflanzenarten [FK91, KRF92]. In Übereinstimmung mit dem von dem Modell vorhergesagten unvollständigen Citratzyklus konnte jedoch experimentell nachgewiesen werden, dass (i) in Rapsembryonen der Citratzyklus unter den meisten

Wachstumsbedingungen nicht-zyklisch verläuft [SSHO06, JLH⁺07] und (ii) in verschiedenen Pflanzenarten nur ein Teil des Citratzyklus unter anoxischen Wachstumsbedingungen genutzt wird [RLA⁺10, SBN⁺10].

In Bezug auf die Glykolyse sagt das Modell ein PFK-PFP Substratzyklus [Stigo] voraus, in dem Energie von ATP zu PP_i und damit zu PP_i-konsumierenden Reaktionen dirigiert wird. PFP ist im Allgemeinen durch eine hohe Aktivität in jungen sich entwickelnden und stärkespeichernden Geweben gekennzeichnet [XSL⁺89]. Die *in vivo* Stoffwechselfunktion von PFP ist bisher noch unklar und wird kontrovers diskutiert [Stigo, HSV⁺94]. So werden in der Literatur unterschiedlicher Funktionen aufgeführt, einschließlich einer Funktion in der Glykolyse [DMLP89, HDS89], in der Gluconeogenese⁶ [FHML87, PSH⁺95] und in einem Substratzyklus mit PFK [Stigo].

Verschiedene Untersuchungen weisen auf das Vorkommen eines PFK-PFP Substratzyklus im Stoffwechsel von Getreidesamen hin. So zeigen Studien über die Bedeutung von PFP und PFK im endospermalen Samenstoffwechsel von Weizen [MS90, MS92], dass PFP primär an der Generierung von PP_i beteiligt ist. Ein ähnliche Funktion wird für anoxische Reissamen postuliert [GMV⁺00]. Durch die Darlegung von Beweisen für die gluconeogenetische Ausrichtung der PFP in anoxischen Geweben unterstützt diese Studie die Hypothese, dass PFK ein wichtiger Kontrollpunkt der Glykolyse unter anoxischen Wachstumsbedingungen darstellt. Ferner weisen experimentelle Studien in *Arabidopsis* darauf hin, dass PFP unter anoxischen Wachstumsbedingungen in einem Zyklus mit PFK operiert, um PP_i für PP_i-konsumierende Prozesse zu generieren [HCM08].

Samenstoffwechsel unter hypoxischen Wachstumsbedingungen

Im Allgemeinen stimmen die Simulationsergebnisse unter hypoxischen Wachstumsbedingungen mit den in der Literatur aufgeführten qualitativen physiologischen Hauptmerkmalen des hypoxischen Samenstoffwechsels überein [vDRD⁺04, RWW⁺04, RKWB05]. In Bezug auf den Stärkestoffwechsel sagt das Modell den in der Literatur aufgeführten gerstensamenspezifischen Reaktionsweg der Stärkesynthese [TVKO96, WPS⁺00, BSR01, EBH⁺03] korrekt voraus, indem: (i) der Suc-Abbau auf den SuSy-katalysierten Stoffwechselweg beschränkt ist, und (ii) die Synthese von ADPglc, dem Hauptausgangsstoff der Stärkesynthese, im Wesentlichen durch die cytosolische Isoform der AGPase katalysiert wird (siehe Anhang, Abbildung 28).

Mit zunehmender Sauerstoffversorgung sagt das Modell einen Wechsel in der Reaktionsrichtung der PFP-Reaktion vorher. Wie in unterschiedlichen Studien über heterotrophe Gewebe von Getreidepflanzen postuliert [DKF88, RERR98], ist das Enzym nun in Richtung Glykolyse aktiv. Folglich agiert der PP_i-verwendende *Bypass* von PFP und PFK nun parallel zu den ATP-verwendenden Reaktionen von PFK und PK. Obwohl für PPDK eine hohe Abundanz in sich entwickelnden Samen von Gerste, Weizen und Reis nachgewiesen werden konnte [MKL82, KBG84, MNM00, CHC⁺06], ist die Stoffwechselfunktion des Enzyms in diesen Geweben noch unbekannt.

In Bezug auf die Aktivität der cytosolischen PPDK in Richtung Phosphoenolpyruvat-Synthese werden in der Literatur unterschiedliche Funktionen für den Getreidesamenstoffwechsel aufgeführt, wie die Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat (PEP) für die Refixierung des respiratorischen CO₂ oder die Beteiligung an der Umwandlung von Aminosäuren [MKL82, KBG84]. Im Gegensatz dazu postulieren Chastain *et al.* [CHC⁺06] die Aktivität des Enzyms in Richtung Pyruvat-Synthese. Auf der Grundlage von Untersuchungen der Endosperm lokalisierten cytosolischen PPDK in sich entwickelnden Reissamen schlagen die Autoren vor, dass PPDK als effizienter Mechanismus für die glykolytische ATP-Synthese in sauerstoffarmen Geweben fungiert, indem das Enzym AMP zu ATP konvertiert. Im Vergleich zu einem einzelnen, durch PK generierten ATP

⁶ Stoffwechselweg zur Neusynthese von Glucose

ergibt sich dabei netto eine Bildung von zwei ATP [Pla05]. Im Hinblick auf die hypoxische Natur von Getreidesamen und dem daraus resultierenden geringen ATP-ADP Verhältnis [RWW⁺04, vDRD⁺04], wird eine vergleichbare Rolle für PDK im Energiestoffwechsel von hypoxischen Reissamen postuliert [KPMA05].

Unter der Annahme einer wie von dem Modell vorhergesagten PDK- und PFP-verwendenden Glykolyse, ist die bioenergetische Effizienz durch den Gewinn von fünf ATP-Molekülen pro Glc-Molekül anstelle von zwei durch die konventionelle Glykolyse produzierten ATP-Molekülen zusätzlich gesteigert [Mer93, Pla05]. Die Bedeutung von PP_i als alternative Energiequelle im Cytosol von Pflanzen wird in unterschiedlichen Studien thematisiert [GHG⁺98, Sti98, Pla05]. Obwohl verschiedene Untersuchungen auf eine zentrale Rolle des PP_i-Stoffwechsels in jungen wachsenden Geweben und in Stresssituationen, einschließlich Anaerobiose, hinweisen (für ein Übersicht sei auf Stitt [Sti98] verwiesen), sind weitere Studien notwendig, um die Modellvorhersagen zu untermauern.

Die Akkumulation von γ -Aminobutyrat (GABA) wird als eine weitere Antwort des Pflanzenstoffwechsels auf ungünstige Bedingungen wie Hypoxie aufgeführt [KT00, BF04]. In Pflanzen wird GABA durch die Decarboxylierung⁷ von Glutamat (Glu) gebildet und im sogenannten GABA-shunt zu Succinat (Succ) metabolisiert [SBM99]. GABA und der GABA-shunt werden in Pflanzen mit verschiedenen physiologischen Funktionen in Verbindung gebracht (z.B. Regulation des cytosolischen pH, NAD⁺-unabhängiger Kohlenstofffluss in den Citratzyklus, Stickstoffmetabolismus, Abwehr von Insekten, Schutz vor oxidativem Stress, Osmoregulation und Signalfunktion [BLF03, BF04, Pla05, FFW⁺08]). Im Unterschied zu der Beobachtung, dass der GABA-shunt in sich entwickelnden Sojabohnen (*Glycine max*) mit Hypoxie assoziiert ist [SWS⁺95], ist dieser Stoffwechselweg unter den simulierten hypoxischen Bedingungen nicht aktiv. In Übereinstimmung mit den Modellvorhersagen konnte jedoch von Inatomi *et al.* [IS75] gezeigt werden, dass in den Embryonen quellender Gerstensamen GABA nur unter Sauerstoffverfügbarkeit akkumulierte.

Samenstoffwechsel unter aeroben Wachstumsbedingungen

Unter vollständig aeroben Wachstumsbedingungen entsprechen die Modellvorhersagen dem charakteristischen aeroben Stoffwechselverhalten von Getreidesamen [vDRD⁺04]: (i) Hochregulation der respiratorischen Energieproduktion und einer damit verbundenen Anhebung des zellulären Energiezustands, (ii) Steigerung des Speicherstoffwechsels (iii) Zunahme des Korngewichts aufgrund des gesteigerten Speicherstoffwechsels.

In Bezug auf die Glykolyse sagt das Modell voraus, dass die PP_i-abhängige Glykolyse die einzige Form der Glykolyse unter vollständig aeroben Bedingungen ist. Obschon hierzu keine experimentellen Daten für Gerstensamen verfügbar sind, stellen die bioenergetischen Vorteile einer PP_i-abhängigen Glykolyse eine mögliche Erklärung für diese Modellvorhersage dar.

Insgesamt unterstützen die Simulationsergebnisse die in verschiedenen Studien [Sti90, GMV⁺00] postulierte Hypothese, dass die PP_i-Verfügbarkeit den Nettofluss durch PFP und PDK bestimmt: (i) unter anoxischen Bedingungen führt ein substanzieller Bedarf an PP_i dazu, dass PFP in Richtung PP_i-Synthese aktiv ist, um eine PP_i-Defizienz auszugleichen, (ii) unter hypoxischen Bedingungen führt die zunehmende PP_i-Verfügbarkeit zu einem Nettofluss von PFP und PDK in Richtung PP_i-Verbrauch und (iii) unter aeroben Bedingungen führt die Energieeffizienz der PP_i-abhängigen Glykolyse dazu, dass dieser Reaktionsweg die einzige Form der Glykolyse darstellt. Obschon keine experimentellen Daten bezüglich der PP_i-Defizienz in sauerstoffarmen Gerstensamen verfügbar sind, weist der geringe Fluss durch die Hauptquelle der PP_i-Produktion (cytosolische AGPase) in Verbindung mit einem hohen Fluss durch die Hauptquelle der PP_i-Konsumtion (UGPase)

⁷ Decarboxylierung: chemische Reaktion, die zu einer Freisetzung von CO₂ führt

auf eine geringe PP_i -Verfügbarkeit in anoxischen und hypoxischen Geweben hin. Es sind jedoch weitere Experimente notwendig, um die vorgestellte Hypothese zu validieren.

4.2.3.3 Der Effekt der Enzymdeletion auf den Samenspeicherstoffwechsel

Die *in silico Knockout*-Analyse stellt eine effiziente Methode dar, um die Bedeutung der Reaktionen in einem metabolischen Netzwerk zu analysieren und Einblicke in die durch Enzymdeletion hervorgerufenen Stoffwechseländerungen zu erhalten. Die Ergebnisse der *in silico Knockout*-Analysen spiegeln die Flexibilität des gerstenspezifischen Stoffwechselmodells hinsichtlich der Kompensation enzymatischer Störungen wieder. Unter allen untersuchten Wachstumsbedingungen wurden nur drei enzymatische Reaktionen als essentiell bestimmt: (i) FUM (Citratzyklus), (ii) PEPC (Anaplerosis) und (iii) FK (Suc-Abbau)⁸.

Der pflanzlichen FUM wird eine zentrale Bedeutung als Kontrollpunkt des Citratzyklus zugesprochen [BO97]. Im Unterschied zu der Vielzahl an veröffentlichten *Knockout*-Studien in mikrobiellen Systemen [PZGDM99, MEPZ⁺03, KYOK⁺06], wurde in Pflanzen bisher nur eine Studie [NNCG⁺07], die den Effekt der FUM-Inhibierung untersucht, durchgeführt. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Antisens-Inhibierung⁹ der mitochondrialen FUM-Aktivität in Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum*) einen negativen Einfluss auf die Photosynthese hat und zu einer Reduktion der Gesamtpflanzenbiomasse führt. Eine mittels biochemischer Analysen nachgewiesene geringe Änderungen des Blattstoffwechsels zeigt jedoch, dass die verbleibende Aktivität der FUM in den transgenen Pflanzen noch immer ausreichend ist, um eine relativ normale metabolische Funktion zu gewährleisten. Somit sind weitere experimentelle Studien notwendig, um die Modellvorhersagen zu validieren. Nichtsdestotrotz weisen *Knockout*-Analysen in Hefe auf eine zentrale Rolle der FUM im Zentralstoffwechsel hin, da Zellen ohne FUM unfähig sind auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen [PZGDM99, MEPZ⁺03, KYOK⁺06].

In heterotrophen Geweben (i.W. Samen, Früchte) von C_3 -Pflanzen¹⁰ spielt die PEPC eine zentrale Rolle bei der anaplerotischen Ergänzung der Citratzyklus-Zwischenprodukte, indem sie Ausgangsstoffe für verschiedene biosynthetische Stoffwechselwege liefert [CVO96]. Auf der Grundlage einer Überexpression der PEPC war es das Ziel unterschiedlicher Studien die Partitionierung von Assimilaten in heterotrophen Geweben von C_3 -Pflanzen zu manipulieren [LGDP⁺07, RRG⁺07] bzw. die CO_2 -Fixierung in autotrophen Geweben von C_3 -Pflanzen zu verbessern [GPS⁺96, KAN⁺99]. Experimentelle Studien von Pflanzen mit verminderter bzw. fehlender PEPC-Aktivität sind jedoch selten. Anhand von Inhibierungsstudien konnte gezeigt werden, dass die reduzierte PEPC-Aktivität (30% der Wildtypaktivität [RHH⁺02] und 50-70% der Wildtypaktivität [GPS⁺96]) transgener Kartoffelpflanzen keine signifikanten Effekte auf das Gesamtpflanzen- und Knollenwachstum hat. Eine durch Metabolitanalysen nachgewiesene geringe Änderung des Blattstoffwechsels zeigt jedoch an, dass die erzielte Reduktion der PEPC-Aktivität zu gering ist, um den Stoffwechsel zu beeinflussen. Trotz der Anwesenheit weiterer, in Pflanzen nicht vorkommender anaplerotischer Reaktionen, lässt die drastische Reduktion der Wachstumsrate von PEPC-*Knockout Escherichia coli*-Stämmen jedoch vermuten, dass PEPC eine essentielle Rolle im Zentralstoffwechsel zukommt [PABS04, FNPS06].

In Bezug auf die Identifizierung von essentiellen Enzymreaktionen des Suc-Abbaus, weisen Inhibierungsstudien in Kartoffeln auf eine vorherrschende Rolle der FK im Stärke-

⁸ Zu Berücksichtigen ist hier, dass nicht alle biochemischen Reaktionen auf Grund der in Abschnitt 4.2.1 aufgeführten Gründe in die *in silico Knockout*-Analyse einbezogen wurden

⁹ Die Antisens-Inhibierung beruht auf dem Einsatz spezieller RNA-Moleküle, welche die Expression eines Gens gezielt abschwächen bzw. gänzlich verhindern

¹⁰ Pflanzen, bei denen CO_2 in Form der C_3 -Verbindung 3-Phosphoglycerat fixiert wird, werden als C_3 -Pflanzen bezeichnet. Im Gegensatz dazu werden Pflanzen, deren CO_2 -Fixierung über eine C_4 -Verbindung (Verbindung mit 4 Kohlenstoffatomen) erfolgt, als C_4 -Pflanzen bezeichnet

stoffwechsel hin [DSB⁺05] und liefern damit einen experimentellen Nachweis für diese Modellvorhersage.

Insgesamt konnte auf Grundlage der Ergebnisse der *in silico Knockout*-Analyse die metabolische Flexibilität als wichtige Netzwerkeigenschaft des sich entwickelnden Gerstenendosperm identifiziert werden. Die Tatsache, dass nur eine geringe Anzahl essentieller enzymatischer Reaktionen im Zentralstoffwechsel existieren, lässt auf eine hohe Netzwerkflexibilität schließen. Räumliche Kompartimentierung der biochemischen Reaktionswege, die alle höheren Organismen kennzeichnet und Isoformen, die in verschiedenen Kompartimenten aktiv sind, können eine mögliche Erklärung für die beobachtete Netzwerkflexibilität sein. So wurde beispielsweise kein Enzym der Glykolyse, die sowohl als cytosolische und plastidäre Isoenzyme vorliegen, als essentiell vorhergesagt. Im Unterschied dazu wurden in Mikroorganismen, die durch das Fehlen einer Kompartimentierung gekennzeichnet sind, verschiedene Enzyme der Glykolyse auf der Basis von *in silico Knockout*-Studien und experimentellen Beobachtungen als essentiell eingestuft [Fra96, EP00a].

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Redundanz innerhalb pflanzenbiologischer Stoffwechselnetzwerke eine bedeutende Rolle hinsichtlich der Robustheit von Netzwerken spielt [BL97, BO04, Kito4]. Indem die gleichen Schritte eines Stoffwechselwegs auf unterschiedliche Weise durchgeführt werden, unterstützt diese metabolische Flexibilität das Wachstum und/oder das Überleben der Pflanzen unter suboptimalen Umweltbedingungen [Pla96, Pla05].

4.2.4 Zusammenfassung

Mit dem Ziel, den endospermalen Primärstoffwechsel von Gerste in Abhängigkeit umweltbedingter und genetischer Störungen zu untersuchen, wurde eine optimierungsbasierte Modellanalyse unter Anwendung der im ersten Teil der Arbeit entwickelten Modellierungspipeline durchgeführt.

Als Ergebnis der *in silico* Analysen konnte gezeigt werden, dass das rekonstruierte Stoffwechselmodell das Potential hat, die wesentlichen aus der Literatur bekannten biochemischen Eigenschaften des Speicherstoffwechsels von Gerstensamen wiederzugeben. Sowohl in Bezug auf die Kornwachstumsrate als auch in Bezug auf das Muster aktiver Stoffwechselwege unter anoxischen, hypoxischen und aeroben Wachstumsbedingungen konnten gute Übereinstimmungen zwischen Simulationsergebnissen und experimentellen Werten aus der Literatur festgestellt werden.

Auf Grund fehlender experimenteller Daten konnten die Modellvorhersagen der *in silico Knockout*-Analyse nur zum Teil durch Experimentdatensätze bestätigt werden. In diesem Fall liefern die Modellvorhersagen neue Erkenntnisse, die als Anstoß für weiterführende experimentell Studien dienen können. Neue Erkenntnisse konnten auch in Bezug auf die in der Literatur kontrovers diskutierte Rolle von PP_i in sauerstofflimitierten Pflanzengeweben gewonnen werden: so weisen die Simulationsergebnisse darauf hin, dass PP_i als alternative Energiequelle im Speicherstoffwechsel von Gerstensamen von Bedeutung ist, wobei die PP_i -Verfügbarkeit den Nettofluss durch den PP_i -verwendenden Bypass der Glykolyse bestimmt.

Zusammenfassend weisen die Simulationsergebnisse darauf hin, dass das rekonstruierte Modell das Potential zur Simulation des endospermalen Primär- und Speicherstoffwechsels von Gerste hat und damit als valide Simulationsplattform für weiterführende *in silico* Analysen eingesetzt werden kann.

Das FBA-Modell sowie die in den nachfolgenden Abschnitten dargestellten Simulationsergebnisse wurden als erste Anwendungsstudie der *Flux Balance Analysis* auf ein pflanzenbiologisches System veröffentlicht [GBSKJ09]. Seitdem wurden in den vergangenen drei Jahren verschiedene mittelskalige und genomweite FBA-Modelle unterschiedlicher Pflanzenarten wie *Zea mays* (Mais; [dODQP⁺10b, SSM11]), *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand; [PMSF09, dODQP⁺10a, RTD⁺10, WPH⁺10, KAFN12]), *Brassica napus* (Raps; [HS11a, HS11b, PCTK11]) sowie Grünalgen [BM09, CRB⁺11, dODQPN11] und photoautotrophe Bakterien [KZLS10, MNdC⁺10] veröffentlicht. Die zunehmende Anzahl von Publikationen aus dem Gebiet der Pflanzenforschung zeigt das Potential der *Flux Balance Analysis* für diesen Bereich der Lebenswissenschaften.

4.3 SACCHAROSESTOFFWECHSEL

Die Akkumulation von Stärke, Proteinen und Lipiden in Endosperm und Embryo von Gerstensamen setzt eine kontinuierliche Nährstoffversorgung durch die Mutterpflanze voraus, die weitgehend in Form von Saccharose (Suc) erfolgt. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Suc-Versorgung stellen einen Schwerpunkt der ertragssteigernden Nutzpflanzenforschung dar [Bla06]. Unter Verwendung verschiedener experimenteller Ansätze konnten die molekularen Grundlagen der Suc-Abgabe und -Aufnahme in der Zwischenzeit weitgehend aufgedeckt [MSH⁺00, BWL⁺05, BS09, KG10] und verschiedene Modelle bezüglich der Post-Phloem Translokation¹¹ entwickelt werden [PO01, ZCW⁺09]. Weiterhin unzureichend erforscht ist jedoch die Situation in lebenden Zellen.

Mit dem Ziel, die zugrunde liegenden Mechanismen der Suc-Versorgung von filialem Gewebe durch die Mutterpflanze in lebenden Gerstensamen zu untersuchen, wurden im Rahmen einer experimentellen Studie¹² unterschiedliche NMR-Methoden (engl. nuclear magnetic resonance: Kernspinresonanz) in Kombination mit Zellstruktur-, Enzym-, Metabolit- und Genexpressionsanalysen angewandt [MRF⁺11]. Als Ergebnis der experimentellen Studie konnte die Allokation von Suc sowohl in Bezug auf die räumliche Verteilung als auch in Bezug auf die Geschwindigkeit visualisiert und *in vivo* innerhalb sich entwickelnder Samen verfolgt werden. Durch den Vergleich zwischen Wildtyp (WT) und spezifischen Mutanten (Risø13) bzw. transgenen Modellpflanzen (Jekyll) konnten zudem Aussagen bezüglich der maternalen/filialen Kontrolle der Suc-Versorgung unter *in vivo* Bedingungen getroffen werden.

Begleitend zu der experimentellen *in vivo* Studie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine vergleichende *in silico* Analyse (OBA) durchgeführt, mit dem Ziel, den Einfluss der Suc-Verfügbarkeit auf den Speicherstoffwechsel des sich entwickelnden Samens zu untersuchen und damit eine integrative Sicht auf die Transportwege und deren *in vivo* Funktion zu erhalten.

Im Folgenden werden die Methoden (Abschnitt 4.3.1) und Ergebnisse (Abschnitt 4.3.2) der optimierungsbasierten Modellanalyse aufgeführt und in Zusammenhang mit den Ergebnissen der experimentellen Studie diskutiert (Abschnitt 4.3.3).

4.3.1 Material und Methoden

Optimierungsbasierte Modellanalyse

Die optimierungsbasierte Modellanalyse wurde auf Grundlage der in Tabelle 19 aufgeführten Simulationsexperimente unter Anwendung des in Abschnitt 4.1 eingeführten Gerstensamen-Modells durchgeführt. Um den Einfluss der Suc-Verfügbarkeit auf den Primärstoffwechsel des peripheren Endosperms untersuchen zu können, wurde das Modell um folgende Reaktionen erweitert: Zellwandinvertase, Hexosetransporter (Glc, Frc), Akkumulationsreaktionen von ADPGlc und UDPGlc. Das erweiterte Modell ist im Anhang als SBML-Datei verfügbar. Nähere Erläuterungen zu den angewandten Analysemethoden, der Zielfunktion sowie der Modellparametrisierung werden im Folgenden gegeben.

¹¹ Die im Verlauf der Photosynthese in den Blättern (Source-Organen) synthetisierten Photoassimilate (Kohlenhydrate und Aminosäuren) werden in das Phloemgewebe beladen, mit dem Massenstrom in der Pflanze verteilt und aus dem Phloem in nicht-photosynthetisch aktive Gewebe wie Wurzel, Blüten und Samen (Sink-Organen) entladen. Die im Anschluss an die Phloementladung erfolgenden Transportprozesse werden als Post-Phloem Transport bzw. Translokation bezeichnet.

¹² Die aufgeführte experimentelle Studie war nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

	Beschreibung	Ergebnisse	Diskussion
S1	Wachstumssimulation des Wildtyps	4.3.2.1	4.3.3
S2	Wachstumssimulation transgenen Jekyll-Pfl.	4.3.2.2	4.3.3
S3	Wachstumssimulation der Risø13-Mutante	4.3.2.3	4.3.3

Tabelle 19: Simulationsexperimente der optimierungsbasierten Modellanalyse

Zielfunktion

Alle Simulationsexperimente wurden auf Grundlage der in Abschnitt 4.2.1 eingeführten Zielfunktion Z_1 (*Maximierung der Biomasse pro Flusseinheit*) durchgeführt.

Modellparametrisierung

Die Simulationsexperimente wurden auf Grundlage der in Tabelle 20 aufgeführten Modellparameter durchgeführt.

	OBA	Z	O ₂	Suc	Asn	Gln	Ala	AGT	AGA	UGA
S1	FBA	Z_1	10	8
S2	FBA	Z_1	10	3,9	0,1*	0,1*	1*	.	.	.
S3	FBA	Z_1	10	5,8	0,2*	0,1*	1,6*	1	3	1

Tabelle 20: Modellparameter der Simulationsexperimente S1 bis S3. Einheiten: $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$. Abkürzungen: OBA: optimierungsbasierte Analysemethode; Z: Zielfunktion; AGT: ADPGlc Transporter; AGA: Akkumulation von ADPGlc; UGA: Akkumulation von UDPGlc. * Der angegebene Flusswert wurde als Maximalwert (v_i^{max}) eingesetzt.

In Übereinstimmung mit experimentellen Werten aus der Literatur [FPN84] wurde die Suc-Aufnahmerate des Wildtyps auf $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$ festgesetzt. Die Suc-Aufnahmerate von Risø13 und Jekyll wurde entsprechend der experimentellen Werte der *in vivo* NMR-Messungen festgesetzt, indem der WT-Fluss entsprechend der experimentell bestimmten Flussreduktionen (Risø13: 51%, Jekyll 28%) reduziert wurde. Analog dazu wurde die Obergrenze der Aufnahmerate der verbleibenden Kohlenstoffsubstrate (i.e. Asn, Gln, Ala) entsprechend der in Tabelle aufgeführten Werte festgesetzt, indem die simulierten WT-Flüsse (Asp: 0.3, Gln: 0.2, Ala: 2.2 in $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$) auf Grundlage der experimentell bestimmten Flussreduktionen (siehe oben) reduziert wurden.

Um Wachstum unter den im peripheren Endosperm vorherrschenden aeroben Bedingungen zu simulieren, wurde die O₂-Aufnahmerate auf Grundlage experimenteller Daten auf $10 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$ festgesetzt. Der *in silico Knockout* des plastidären ADPGlc-Transporters der Risø13-Mutante wurde durch die Beschränkung der Obergrenze der entsprechenden Reaktion auf $1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$ durchgeführt. Dies entspricht einer 90% Reduktion des entsprechenden Flusses im WT und steht damit in Übereinstimmung mit experimentellen Werten aus der Literatur [PGF⁺04]. Weiterhin wurde die Akkumulationsrate von ADPGlc und UDPglc auf Grundlage des in Patron *et al.* [PGF⁺04] aufgeführten Verhältnisses der beiden Metabolite festgesetzt. Alle Simulationen sowie die Visualisierung der resultierenden metabolischen Flussverteilungen wurden mit FBA-SIMVis durchgeführt.

4.3.2 Ergebnisse

Um Einblicke in die metabolische Antwort des sich entwickelnden Gerstensamen auf Änderungen in der Saccharoseverfügbarkeit zu gewinnen, wurde eine vergleichende *in silico* Analyse (FBA) des Wildtyps, der transgenen Jekyll-Pflanze und der Risø13-Mutante durchgeführt (Simulationsexperimente S1 bis S3). Die resultierenden metabolischen Flussverteilungen sind in Abbildung 22 dargestellt, die berechneten Flusswerte sind im Anhang (CD) aufgeführt. Im Folgenden werden die Simulationsergebnisse beschrieben und Unterschiede in dem Stoffwechselverhalten im Vergleich zum Wildtyp spezifiziert.

4.3.2.1 Wildtyp

Die metabolische Flussverteilung des Wildtyps (Abbildung 22A) ist durch eine gesteigerte Biosynthese von Speicherprodukten gekennzeichnet. Der Suc-Abbau ist im Wesentlichen auf den von SuSy katalysierten Reaktionsweg beschränkt. ADPglc, der Hauptausgangsstoff der Stärkesynthese, wird hauptsächlich durch die cytosolische Isoform der AGPase katalysiert. Der glykolytische Fluss ist auf den PP_i -basierten *Bypass* von PFP und PPK beschränkt, während der Fluss durch den Citratzyklus hoch ist. Der induzierte Fluss durch die anaplerotischen Reaktionen cAla-AT, mAsp-AT und c,mMDH resultiert in der Wiederauffüllung des Citratzyklus, wodurch der Abzug der für die Speicherproduktbiosynthese benötigten Aminosäurevorläufer (z.B. Malat, Oxalacetat, 2-Oxoglutarat) zum Teil kompensiert wird. Zusätzlich wird der Samenspeicherstoffwechsel durch Kohlenstoffgerüste, die durch PEPC bereitgestellt werden, verstärkt.

4.3.2.2 Jekyll

In der transgenen Modellpflanze (Jekyll) bewirkt die Reduktion der endospermalen Suc-Versorgung eine starke Abnahme der Speicherproduktsynthese und eine daraus resultierende starke Verringerung des Endospermwachstums (>50% Reduktion der endospermalen Wachstumsrate). Im Vergleich zum Wildtyp zeigt das metabolische Flussmuster der transgenen Pflanze deutliche Unterschiede in Bezug auf die Flusswerte, jedoch keine Unterschiede in Bezug auf das Muster aktiver Stoffwechselwege (Abbildung 22B).

4.3.2.3 Risø13

In der Risø13-Mutante ist der Fluss durch die cytosolische Isoform der AGPase stark reduziert (Abbildung 22C). Abhängig von dem Import von Glucose-1-Phosphat in den Plastiden stellt die plastidäre Isoform die Hauptquelle der ADPglc-Synthese dar. Im Unterschied zum Wildtyp ist der glykolytische Fluss auf die ATP-abhängigen Reaktionen der PFK und PFP beschränkt. Gleichzeitig reagiert der PP_i -abhängige *Bypass* von PFP und PPK in Richtung PP_i -Synthese mit dem Ziel, die geringe cytosolische PP_i -Synthese, die sich aufgrund des geringen Flusses durch die cAGPase ergibt, zu kompensieren. Aufgrund der Reduktion der Speicherproduktbiosynthese, die sich aus der verringerten plastidären ADPglc-Transportkapazität und der reduzierten Substrataufnahme ergibt, muss der überschüssige Kohlenstoff aus dem System entfernt werden, was zum einen durch die Akkumulation von UDPglc und ADPglc und zum anderen durch die Exkretion von CO_2 (hauptsächlich Respiration) erfolgt. In der Mutante ist die CO_2 -Emission um 40% über den Level des Wildtyps erhöht.

Zusammengefasst bewirkt die Reduktion der plastidären ADPglc-Transportkapazität in Kombination mit der verringerten Suc-Aufnahme eine starke Abnahme der Stärkesynthese und Biomasseproduktion sowie metabolische Änderungen innerhalb des Stärkesynthesewegs.

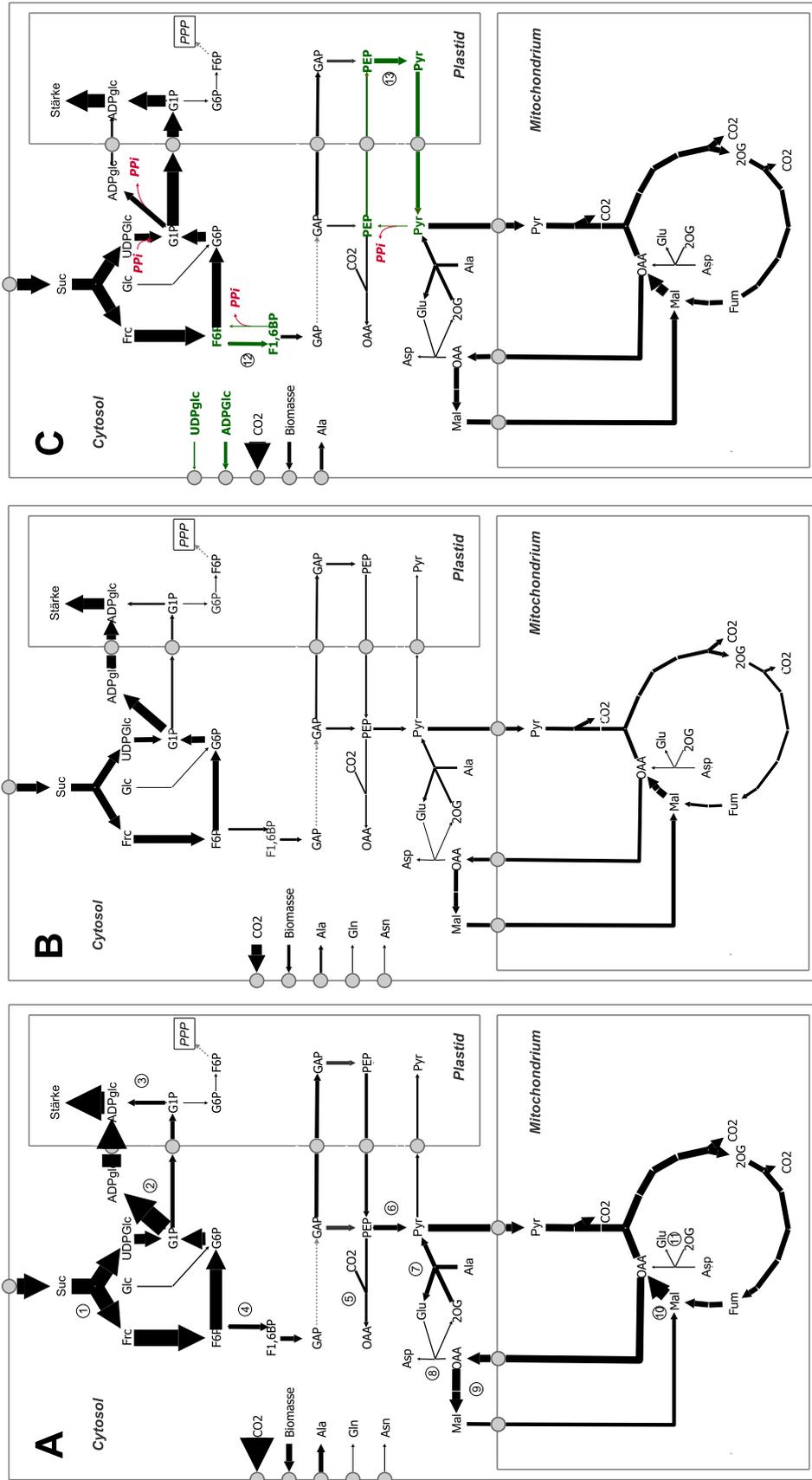


Abbildung 22: Flussprofil des Primärstoffwechsels des peripheren Endosperms des Wildtyps (A), der transgenen Jekyll-Pflanze (B) und Risø13-Mutante (C); Simulationsexperimente S1 - S3. Die Darstellung der metabolischen Flussverteilungen beschränkt sich auf zentralen Stoffwechselprozesse; für eine Auflistung aller berechneten Flusswerte sei auf den Anhang (CD) verwiesen. Die Dicke der Pfeile entspricht den Flusswerten; Unterschiede im Stoffwechselverhalten sind in grün hervorgehoben. *Abkürzungen:* 1: SuSy; 2: cAGPase; 3: pAGPase; 4: PFP; 5: PEPC; 6: PPDK; 7: cAla-AT; 8: cAla-AT; 9: cMDH; 10: mMDH; 11: mAsp-AT; 12: PFK; 13: pPK; PPP: Pentosephosphatweg. Eine Erläuterung der Metabolit-, Transporter- und Enzymnamen ist im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt

4.3.3 Diskussion

Samenwachstum ist abhängig von einer kontinuierlichen Nährstoffversorgung durch die Mutterpflanze, die in Gerste im Wesentlichen in Form von Suc erfolgt. Im Rahmen einer experimentellen Studie [MRF⁺11] konnten zeitlich aufgelöste Karten der Suc-Verteilung generiert und damit die Bewegung von Suc innerhalb lebender Gerstensamen verfolgt werden. Durch die Anwendung nicht-invasiver Untersuchungsmethoden auf transgene Pflanzen (Jekyll) und Mutanten (Risø13) konnten zudem Aussagen bezüglich der maternalen/filialen Kontrolle der Suc-Allokation und -Verteilung getroffen werden. Trotz der Möglichkeit, Unterschiede in der Suc-Allokation zu quantifizieren, ließen sich jedoch auf Grundlage der experimentellen Studie keine Aussagen bezüglich der zugrunde liegenden Stoffwechselprozesse machen. Aus diesem Grund wurde begleitend zu der experimentellen *in vivo* Studie in Rahmen der vorliegenden Arbeit eine *in silico* Analyse (OBA) durchgeführt, um den Einfluss der Suc-Verfügbarkeit auf den Samenspeicherstoffwechsel von Gerste zu untersuchen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der optimierungsbasierten Modellanalyse im Kontext der experimentellen Ergebnisse der *in vivo* Studie diskutiert.

Transgene Jekyll-Pflanzen sind dadurch gekennzeichnet, dass die Unterdrückung des Jekyll-Gens die Abgabe von Suc in die Endospermhöhle (engl. endosperm cavity) hemmt, mit dem Ergebnis, dass die endospermale Kohlenstoffverfügbarkeit reduziert und die Stärkeakkumulation beeinträchtigt wird [RBR⁺06]. Charakteristische phänotypische Eigenschaften der transgenen Pflanze sind durch die reduzierte Größe des reifen Endosperms sowie den reduzierten Stärkegehalt gegeben [RBR⁺06]. In Übereinstimmung mit der experimentell nachgewiesenen Reduktion der Stärkeakkumulation zeigten die Ergebnisse der Simulationsexperimente, dass die Herunterregulation der Jekyll-Expression eine deutliche Abnahme der Biomasse- und Stärkeakkumulation zur Folge hat. Während die absoluten Flusswerte signifikant reduziert und die Stärkesynthese damit stark verringert war, blieb das Verhältnis der internen Flüsse jedoch nahezu konstant; ein Hinweis darauf, dass keine großen Änderungen innerhalb des endospermalen Stoffwechsels stattfanden. Ähnliche proportionale Änderungen konnten in *Arabidopsis* und anderen Arten festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass die Netzwerkstabilität ein grundlegendes Merkmal des Kohlenstoffwechsels in Pflanzen ist.

Die morphologisch normal erscheinende Risø13-Mutante ist durch eine Mutationsbedingte Reduktion der Transportkapazität des plastidären ADPglc-Transporters gekennzeichnet [PGF⁺04], deren wesentlichen Folge eine verringerte endospermale Stärkeakkumulation ist. Auf Grundlage von Wachstumssimulationen der Risø13-Mutante konnte ein deutlicher Wechsel innerhalb des Primärstoffwechsels (z.B. PP_i-Cycling) nachgewiesen und damit neue Ziele für weiterführende metabolische Untersuchungen ermittelt werden. In Übereinstimmung mit der experimentell beobachteten Störung der Stärkeakkumulation, die für die Mutante charakteristisch ist [PGF⁺04], war der simulierte Fluss in Richtung Stärke erheblich reduziert. Die daraus resultierende Abnahme des Kohlenstoffbedarfs führt schlussendlich zu einer Reduktion der Sink-Aktivität [Mar96]. Insgesamt bestätigten die Simulationsergebnisse, dass das kooperative Zusammenwirken von Enzymen, welche die Partitionierung von Suc in Stärke kontrollieren, die Sink-Stärke regulieren und damit schlussendlich den Samenertrag bestimmen [Koc04, FS10].

4.3.4 Zusammenfassung

Mit dem Ziel, den Einfluss der Suc-Verfügbarkeit auf den endospermalen Speicherstoffwechsel von Gerste zu untersuchen, wurde eine vergleichende optimierungsbasierte Analyse zwischen Wildtyp, spezifischer Mutante (Risø13) bzw. transgener Modellpflanze

(Jekyll) basierend auf der im ersten Teil der Arbeit entwickelten Modellierungspipeline durchgeführt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der experimentellen Studie konnte eine deutliche Reduktion der Biomasse- und Stärkeakkumulation in Jekyll- und Risø13-Pflanzen auf Grundlage der Simulationsexperimente nachgewiesen werden. Neue Erkenntnisse konnten in Bezug auf die zugrunde liegenden Stoffwechselprozesse gewonnen werden: so weisen die Simulationsergebnisse darauf hin, dass die Herunterregulation der Jekyll-Expression keine Änderungen in Bezug auf das Muster aktiver Stoffwechselwege des endospermalen Speicherstoffwechsels zur Folge hat während die Reduktion der Transportkapazität des plastidären ADPglc-Transporters einen deutlichen Wechsel innerhalb des Primärstoffwechsels der Risø13-Mutante bedingt. Die Modellvorhersagen liefern damit sowohl neue Ansatzpunkte für weiterführende experimentell Studien als auch für zukünftige *in silico* Analysen. So konnte die cytosolische AGPase und der plastidäre ADPglc-Transporter auf Grundlage der Simulationsergebnisse als potentielle Ziele für weiterführende *in vivo* Analysen, mit dem Ziel der Ertragssteigerung, identifiziert werden.

Zusammenfassend weisen die Simualtionsergebnisse darauf hin, dass die Kombination von *in silico* Modellierung von Stoffwechselprozessen und experimentellen nicht-invasiven Technologien zu einem verbesserten Verständnis der Regulation des Samenwachstums führt. Die dargestellten Simulationsergebnisse wurde veröffentlicht [MRF⁺ 11].

4.4 ALANINSTOFFWECHSEL

Alanin (Ala) stellt eine der Hauptaminosäuren in Pflanzen und Tieren dar. Die Akkumulation von Ala kann in vielen Pflanzen als adaptive Anpassung des Stoffwechsels an sauerstofflimitierende Bedingungen beobachtet werden [dSS03, MDIG07]. In der Literatur werden verschiedene Vorteile der Ala-Akkumulation unter hypoxischen Wachstumsbedingungen aufgeführt: (i) Verhinderung der Akkumulation von Pyruvat (Pyr) und der damit verbundenen Aktivierung des respiratorischen Sauerstoffverbrauchs, (ii) Reduktion der Pyr-Verfügbarkeit für die Eth- und Lac-Gärung und den damit verbundenen nachteiligen Nebeneffekten¹³, und (iii) Aufrechterhaltung der pH-Balance [GC89, MDIG07, MGo8, RLA⁺10]. Die genauen Vorteile sowie die zugrunde liegenden Mechanismen des adaptiven Antwortverhaltens sind jedoch noch nicht vollständig geklärt und werden weiterhin diskutiert.

Das Enzym Alanin-Aminotransferase (Ala-AT, EC 2.6.1.2) katalysiert die Synthese von Ala aus Pyr. Die sowohl im Cytosol als auch im Mitochondrium ablaufende reversible Reaktion wird als kritischer Knotenpunkt zwischen aerobem und anaerobem Metabolismus angesehen [GC89, MDIG07, MGo8, RLA⁺10]. Da sich eine Änderung der lokalen *in vivo* Bedingungen (O₂-, Ala-, Pyr-Gehalt) sowohl auf die Flußstärke als auch auf die Reaktionsrichtung der reversiblen Ala-AT auswirken kann, ist die Regulation des *in vivo* Stoffwechsels von Ala durch einen hohen Grad an Komplexität gekennzeichnet.

Mit dem Ziel, die Bedeutung des Ala-Stoffwechsels in lebenden Gerstensamen zu untersuchen, wurde im Rahmen einer experimentellen Studie¹⁴ ¹³C/¹H-Magnetresonanz Imaging (MRI) in Kombination mit biochemischen Analysen angewandt [MRF⁺11]. Als Ergebnis der experimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass die Ala-Synthese bzw. -Akkumulation auf die zentrale hypoxische Region des Endosperm beschränkt ist. Auf der Grundlage von Untersuchungen an transgenen Modellpflanzen (Jekyll) konnten zudem gezeigt werden, dass die Akkumulation von Ala eine Folge der Sauerstoffversorgung und damit unabhängig von Gewebetyp und Suc-Verfügbarkeit ist. Begleitend zu der experimentellen *in vivo* Studie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine vergleichende *in silico* Analyse (OBA) durchgeführt, mit dem Ziel, den Einfluss der Sauerstoffverfügbarkeit auf den Ala-Stoffwechsel des sich entwickelnden Samens zu untersuchen und damit eine integrative Sicht auf die *in vivo* Funktion und die räumliche Anordnung des Ala-Stoffwechsels zu erhalten.

Im Folgenden werden die Methoden (Abschnitt 4.4.1) und Ergebnisse (Abschnitt 4.4.2) der optimierungsbasierten Modellanalyse aufgeführt und im Kontext experimenteller Ergebnisse aus der *in vivo* Studie sowie der Literatur diskutiert (Abschnitt 4.4.3).

4.4.1 Material und Methoden

Optimierungsbasierte Modellanalyse

Die optimierungsbasierte Modellanalyse wurde auf Grundlage der in Tabelle 21 aufgeführten Simulationsexperimente unter Anwendung des in Abschnitt 4.1 eingeführten Gerstensamen-Modells durchgeführt. Um den Einfluss der Ala-Akkumulation in Samengeweben mit unterschiedlicher Sauerstoffverfügbarkeit untersuchen zu können, wurde das Modell um folgende Reaktionen erweitert: Ala-Export, mitochondriale Ala-AT, Export von Citratzyklus-Intermediaten und GABA-Export. Das Modell ist im Anhang als

¹³ Nachteiligen Nebeneffekten der Eth- und Lac-Gärung sind u.a. die Toxizität von Lac und der Verlust von Kohlenstoffgerüsten aufgrund des hohen Diffusionsvermögens von Eth

¹⁴ Die experimentelle Studie war nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit

	Beschreibung	Ergebnisse	Diskussion
S1	Wachstumssimulationen unter variablen O ₂ -Bedingungen	4.4.2.1	4.4.3
S2	Wachstumssimulation des peripheren Endosperm	4.4.2.2	4.4.3
S3	Wachstumssimulation des zentralen Endosperm	4.4.2.2	4.4.3

Tabelle 21: Simulationsexperimente der optimierungsbasierten Modellanalyse

SBML-Datei verfügbar. Nähere Erläuterungen zu den angewandten Analysemethoden, der Zielfunktion sowie der Modellparametrisierung werden im Folgenden gegeben.

Zielfunktion

Die Simulationsexperimente S₁ und S₂ wurden auf Grundlage der in Abschnitt 4.2.1 eingeführten Zielfunktion Z₁ (*Maximierung der Biomasse pro Flusseinheit*) durchgeführt. Simulationsexperiment S₃ wurde unter Anwendung der im Folgenden als Z₂ bezeichneten Zielfunktion der *Minimierung der ATP-Produktion pro Flusseinheit* durchgeführt. Grund hierfür war die Annahme, dass Energieeffizienz das Hauptziel des Stoffwechsels im zentralen hypoxischen Endosperm ist. Mathematisch ist diese Zielfunktion wie folgt als zweistufiger Optimierungsprozess implementiert (siehe Abschnitt 2.3.3.2):

	Optimierung	Zielfunktion	Math. Definition	Erläuterung
1. Schritt:	linear	Min ATP	$\min v_{\text{ATP}}$	siehe Text
2. Schritt:	nichtlinear	Min Gesamtfluss	$\min \sum_{i=1}^n v_i^2$	2.3.3.2

Tabelle 22: Mathematische Definition der Zielfunktion Z₂: Minimierung der ATP-Produktion pro Flusseinheit

Die Zielfunktion *Minimierung der ATP-Produktion* ($\min v_{\text{ATP}}$) setzt sich dabei aus der Menge der ATP-verbrauchenden Modellreaktionen AR mit $AR = \{\text{ATP}_1, \dots, \text{ATP}_n\}$ zusammen:

$$\min v_{\text{ATP}} = \min \sum_{i=1}^n v_{\text{ATP}_i} + \dots + v_{\text{ATP}_n} \quad (4.2)$$

Die biologische Annahme der Zielfunktion besteht darin, dass Zellen wachsen, während sie die minimale Menge an Energie verwenden (Energiekonservierung).

Modellparametrisierung

Alle Simulationsexperimente wurden auf Grundlage der in Tabelle 23 aufgeführten Modellparameter durchgeführt. In Übereinstimmung mit experimentellen Werten aus der Literatur [FPN84] wurde die Suc-Aufnahmerate für alle Simulationsexperimente auf einem Maximalwert von 8 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$ begrenzt. Aufgrund fehlender gerstenspezifischer Werte wurde die Aufnahmerate von Asn und Gln auf der Grundlage von experimentellen Untersuchungen in Sojabohnensamen (*Glycine max*) [ISF⁺o8, AOSH09]

	OBA	Z	O ₂	Suc	Asn	Gln	Ala	Eth	Lac
S ₁	FBA	Z ₁	0–10	8*	4*	4*	6*	0	0.4*
S ₂	FBA	Z ₁	10	8*	4*	4*	6*	.	.
S ₃	FBA	Z ₂	3	8*	4*	4*	0	0	0.4*

Tabelle 23: Modellparameter der Simulationsexperimente S₁ bis S₃. Einheiten: $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$. Abkürzungen: OBA: optimierungsbasierte Analyseverfahren; Z: Zielfunktion. * Der angegebene Flusswert wurde als Maximalwert (v_i^{max}) eingesetzt

auf $4 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$ begrenzt. Zusätzlich wurde die Aufnahme von Ala unter aeroben Wachstumsbedingungen zugelassen. Hierzu wurde die Ala-Aufnahmerate auf $6 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$, der maximalen Ala-Akkumulationsrate unter hypoxischen Bedingungen, begrenzt. In Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen der biochemischen Analyse wurde die Akkumulation der klassischen fermentativen Produkte (Eth, Lac) unter hypoxischen Wachstumsbedingungen verhindert oder auf einen minimalen Wert begrenzt (siehe Tabelle 23). Um Wachstum unter verschiedenen O₂-Bedingungen zu simulieren, wurde die O₂-Aufnahmerate auf die in den unterschiedlichen Geweben vorherrschenden O₂-Bedingungen festgesetzt: (i) zentrales Endosperm: $3 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$, (ii) peripheres Endosperm: $10 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$. Der zweite Wert entspricht den für ganze Samen gemessenen Respirationsraten (10 bis $13 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$ für den hier analysierten Zustand, [TBRR11]). Die Simulationsexperimente S₁ und S₂ wurden mit FBA-SIMVIS durchgeführt. Das MATLAB-Skript für Simulationsexperiment S₃ ist im Anhang (CD) verfügbar¹⁵.

4.4.2 Ergebnisse

4.4.2.1 Alaninstoffwechsel in Abhängigkeit variierender Sauerstoffverfügbarkeit

Die *in vivo* Funktion der Ala-AT ist abhängig von lokalen Sauerstoffbedingungen und der relativen Konzentration von Ala und Pyr. Als Ergebnis der experimentellen Studie konnten sauerstoffabhängige Änderungen der Metabolitkonzentrationen nachgewiesen werden, die auf eine veränderte Aktivität der Ala-AT im zentralen versus peripheren Endosperm hinweisen. Es konnte jedoch keine sauerstoffabhängige Änderung der Enzymaktivität nachgewiesen werden. Um dennoch Rückschlüsse auf die *in vivo* Funktion der Ala-AT zu ermöglichen wurden Wachstumssimulationen unter variablen Sauerstoffbedingungen durchgeführt (Simulationsexperiment S₁).

Die in Abbildung 23 zusammengefassten Ergebnisse von Simulationsexperiment S₁ prognostizieren, dass Ala unter hypoxischen Bedingungen akkumuliert, wobei ein Ala-Gradient entgegen dem O₂-Gradienten erzeugt wird. Mit zunehmender Sauerstoffverfügbarkeit nimmt die Akkumulation von Ala ab. Grund hierfür ist ein reduzierter Fluss durch die cytosolische und mitochondriale Ala-AT, die in Richtung Ala-Synthese reagieren. Als Folge der Inaktivität der mitochondrialen Ala-AT und der in Richtung Pyr-Synthese reagierenden cytosolischen Ala-AT endet die Akkumulation von Ala ab einer O₂-Aufnahmerate von $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$.

¹⁵ Die GUI-basierte Version von FBA-SIMVIS unterstützt keine zusammengesetzten (d.h. aus mehr als einer Reaktion bestehenden) Zielfunktionen. Simulationen mit zusammengesetzter Zielfunktion wurden auf Grundlage einer entsprechend erweiterten Version von FBA-SIMVIS in MATLAB durchgeführt

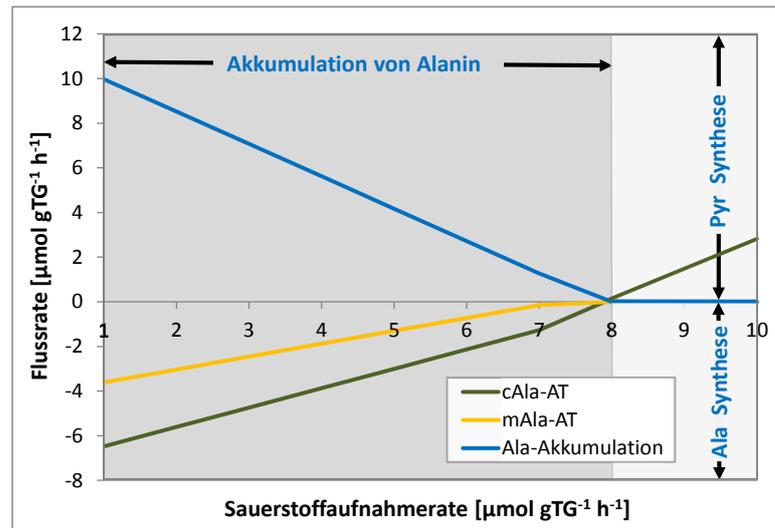


Abbildung 23: Simulation des Alaninstoffwechsels in Abhängigkeit der Sauerstoffverfügbarkeit; Simulationsexperiment S1. *Abkürzungen:* Ala: Alanin; c/mAla-AT: cytosolische/mitochondriale Isoform der Alanin-Aminotransferase; Pyr: Pyruvat; TG - Trockengewicht

4.4.2.2 Simulation von gewebespezifischem Stoffwechsel

Mit dem Ziel, metabolische Flussverteilungen des zentralen und peripheren Endosperms zu modellieren, wurden Flusssimulationen unter gewebespezifischen O_2 -Bedingungen durchgeführt (Simulationsexperimente S2 und S3). Die resultierenden metabolischen Flussverteilungen sind in Abbildung 24 dargestellt. Die simulierten Flusswerte sind im Anhang (CD) aufgeführt. Im Folgenden werden die gewebespezifischen Flussverteilungen beschrieben und Unterschiede innerhalb der Stoffwechselforgänge spezifiziert.

Stoffwechsel im zentralen hypoxischen Endosperm

Die metabolische Flussverteilung im zentralen Endosperm ist durch eine Limitierung der Respiration, Aktivierung der Gärung und Stimulation der Glykolyse (fermentativer Pasteur Effekt) gekennzeichnet (Abbildung 24A). Der Citratzyklus ist nicht-zyklisch, bedingt durch die Inaktivität der Succinatdehydrogenase (SDH, EC 1.3.5.1). Die Aktivierung der cytosolischen und mitochondrialen Ala-AT führt zu einer Akkumulation von Ala, Abnahme von Pyr und Produktion von 2-Oxoglutarat (2OG), das im Mitochondrium als Cosubstrat der Glutamatdehydrogenase (GDH, 1.4.1.3) metabolisiert werden kann. Aufgrund der starken Inhibierung der mitochondrialen Respiration stellt GDH die Hauptquelle der mitochondrialen NAD^+ -Regenerierung dar und liefert damit die für den Citratzyklus notwendigen Redoxäquivalente. Im Cytosol reagiert 2OG mit Asp *via* Asp-AT zu Glu und Oxalacetat (OAA). Die cytosolische Malatdehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37), welche die Reaktion von OAA zu Malat (Mal) katalysiert, ist die Hauptquelle der cytosolischen NAD^+ -Regenerierung. Eine kontinuierliche Regeneration von cytosolischem NAD^+ ist notwendig, um die Glykolyse, die Hauptenergiequelle unter hypoxischen Bedingungen, zu stimulieren. Zusätzlich wird die von der cytosolischen MDH katalysierte NAD^+ -Produktion durch den Import von OAA, das im Mitochondrium durch die mitochondriale MDH synthetisiert wird, verstärkt.

Zusätzlich zu einer Akkumulation von Ala führt die reverse Aktivität der FUM in Richtung Fumaratsynthese zu einer Akkumulation von Fumarat (Fum). Zudem kommt es zu einer geringen Akkumulation von Succ durch Reaktionen des Citratzyklus, der

GABA-shunt ist jedoch nicht beteiligt. Weder der GABA-shunt noch GAD sind aktiv, was zur Folge hat, dass GABA nicht akkumuliert.

Stoffwechsel im peripheren aeroben Endosperm

Der Stoffwechsel im peripheren Endosperm ist im Wesentlichen durch eine Steigerung des Citratzyklus, Einstellung der Gärung und Abnahme der Glykolyse gekennzeichnet (Abbildung 24B). Der Citratzyklus folgt dem bekannten zyklischen Modus. Weder Ala, Fum, noch Succ akkumulieren in diesem Teil des Endosperms. Ala dient als Ausgangsstoff für die Proteinsynthese oder wird *via* Ala-AT zu Pyr umgewandelt. Die mitochondriale Ala-AT ist nicht länger aktiv. Die Induktion der anaplerotischen Reaktion von PEPC führt zu einer Allokation von Kohlenstoff, der für die Biosynthese von Speicherprodukten benötigt wird. Im Cytosol ist der Fluss durch cMDH stark reduziert, woraus sich ein stark reduzierter Bedarf an NAD⁺ ableiten lässt. Im Mitochondrium stellt die oxidative Phosphorylierung die Hauptquelle der NAD⁺-Regenerierung dar, während GDH nun in Richtung NAD⁺-Synthese reagiert.

4.4.3 *Diskussion*

4.4.3.1 *Simulation des Ala-Stoffwechsels im zentralen und peripheren Endosperm*

Mit dem Ziel, die Rolle des Ala-Stoffwechsels in Samengeweben mit unterschiedlicher Sauerstoffverfügbarkeit näher zu beleuchten, wurden begleitend zu einer experimentellen Studie im Rahmen der vorliegenden Arbeit *in silico* Analysen (OBA) unter hypoxischen und aeroben Wachstumsbedingungen des zentralen bzw. peripheren Endosperms durchgeführt. Die Simulationsergebnisse wiesen insgesamt gute Übereinstimmungen mit den Ergebnissen der experimentellen Studie auf. So wurden die charakteristischen Hauptmerkmale des hypoxischen Stoffwechsels (u.a. Limitation der Respiration, Stimulation der Glykolyse, Induktion der Gärung) durch das Modell des zentralen Endosperms korrekt wiedergegeben und die Akkumulation von Ala, Fum und Succ sowie das Fehlen der Pyr-Akkumulation in Übereinstimmung mit den experimentellen Werten vorausgesagt. Neben qualitativen Hauptmerkmalen des aeroben Stoffwechsels (u.a. Einstellung der Gärung, Abnahme der Glykolyse, Steigerung des Citratzyklus) wurde das Fehlen der Akkumulation von Ala, Fum und Succ, sowie die Aufnahme von Ala und der damit einhergehenden Resynthese von Pyr aus Ala *via* Ala-AT durch das Modell des peripheren Endosperms (aerobe Wachstumsbedingungen) korrekt wiedergegeben.

4.4.3.2 *Ala-AT ist von grundlegender Bedeutung für Stoffwechsellanpassungen des zentralen Endosperm*

In Übereinstimmung mit der experimentellen Studie weisen die Modellvorhersagen auf eine zentrale Bedeutung der Ala-AT hin. So verhindert die vorhergesagte hohe Ala-Syntheserate der Ala-AT im zentralen Endosperm die Akkumulation von Pyr, welches unter hypoxischen Bedingungen in zunehmendem Maße durch die Aktivierung der Glykolyse (fermentativer Pasteur Effekt) synthetisiert wird. Durch das Entfernen von Pyr wird die Aktivierung der Eth/Lac-Gärung inhibiert und die Stimulation einer alternativen Oxygenaseaktivität verhindert [OLUW⁺08]. Darüber hinaus wird zusätzliches ATP gebildet, indem das durch die Ala-AT synthetisierte 2OG im Mitochondrium von der Oxoglutaratdehydrogenase und SuccCo-Ligase unter gleichzeitiger Produktion von ATP metabolisiert wird. Auf diese Weise kann die reduzierte Versorgung durch respiratorisches ATP zum Teil kompensiert und ein hoher Level an ATP und anderen energiereichen Intermediaten in der inneren Endospermregion aufrecht erhalten werden. Unter Bedingungen, in denen die respiratorische Energieversorgung limitiert ist, stellt ein hoher Fluss durch die Ala-AT damit eine vorteilhafte Alternative dar. Ähnliche Schlussfolgerungen

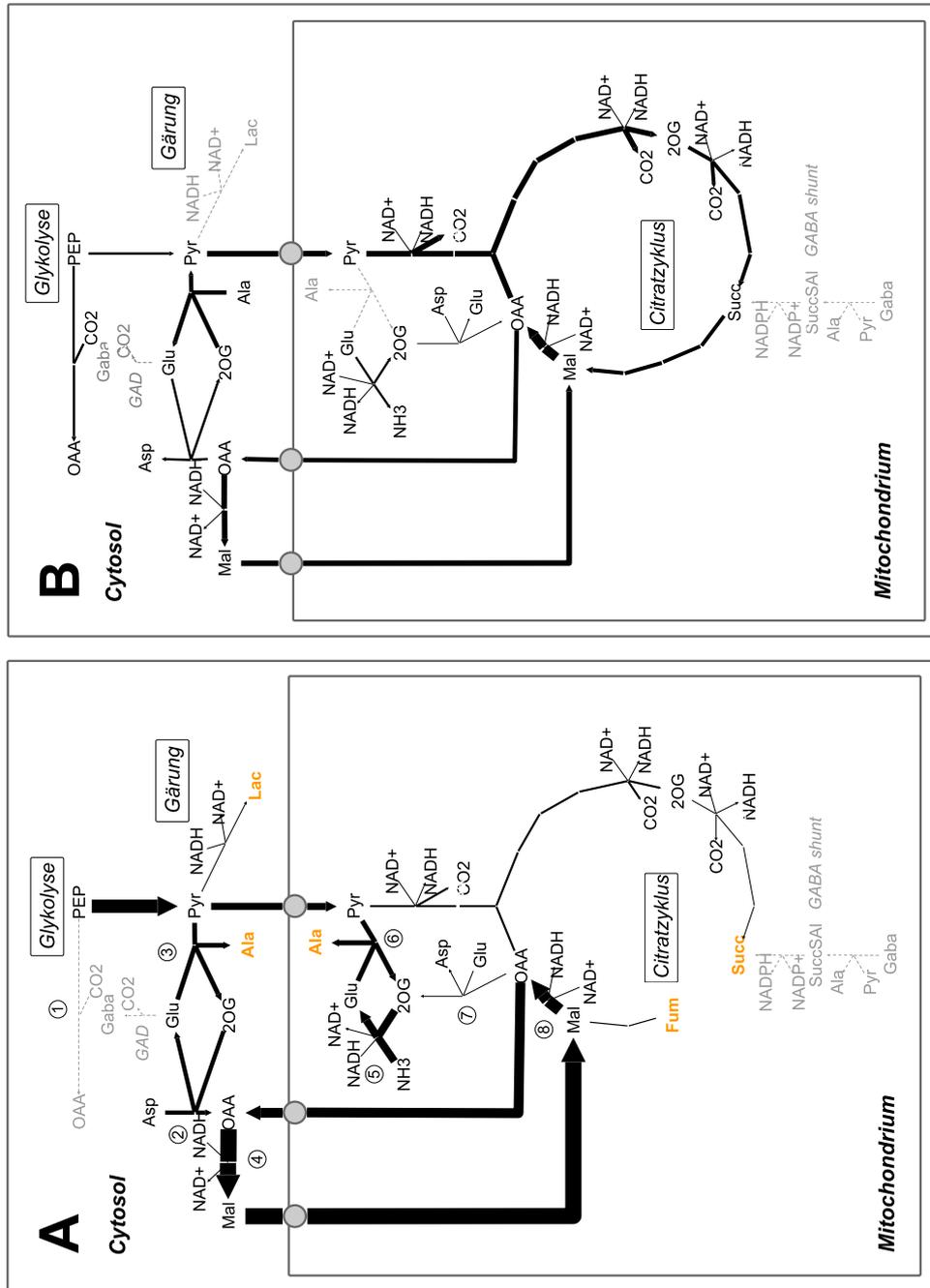


Abbildung 24: Flussprofil des zentralen (hypoxische Region; [A]) und des peripheren (aerobe Region; [B]) Endosperm; Simulationsexperimente S₂, S₃. Die Darstellung der metabolischen Flussverteilungen beschränkt sich auf zentralen Stoffwechselprozesse; für eine Auflistung aller berechneten Flusswerte sei auf den Anhang (CD) verwiesen. Die Dicke der Pfeile entspricht den Flusswerten. Die Akkumulation von Metaboliten ist in orang dargestellt. **Abkürzungen:** 1: PEPc; 2: cAla-AT; 3: cAla-AT; 4: cMDH; 5: GDH; 6: mAla-AT; 7: mAsp-AT; 8: mMDH. Eine Erläuterung der Metabolit-, Transporter- und Enzymnamen ist im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt

wurden aus Untersuchungen an photosynthetisch aktiven *Arabidopsis*-Gewebe [LEOM08] und vernässungsbedingten Stoffwechseländerungen in *Lotus japonicus* [RLA⁺10] gezogen. Unter endogener Sauerstofflimitierung stellt die Ala-Synthese damit ein geeignetes Mittel dar, um die Glykolyse und Energieversorgung aufrecht zu erhalten. Der Samen kann seine Energieeffizienz/Homeostasis verbessern und dabei seine Produktivität steigern [dBvL11].

Neben der insgesamt guten Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der experimentellen Studie und den Simulationsexperimenten konnten auf Grundlage der *in silico* Analyse folgende neue Erkenntnisse gewonnen werden.

Erstens weisen die Simulationsergebnisse darauf hin, dass die cytosolische MDH eine zentrale Rolle bei der Regenerierung von NAD⁺ spielt, während die Lac/Eth-Gärung von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint. Die Ergebnisse bieten dabei eine mögliche Antwort auf die bisher ungeklärte Frage, wie die Produktion von Ala, die durch das Fehlen einer NADH-Oxidation gekennzeichnet ist, den hypoxischen Stoffwechsel unterstützt bzw. welche alternative NAD⁺-Quelle die Abnahme des glykolytischen Flusses aufgrund von NAD⁺-Limitation verhindert. Darüber hinaus weisen die Simulationsergebnisse auf eine mögliche Bedeutung des Citratzyklus hinsichtlich der Redox-Balance hin, indem die Interaktion zwischen mMDH (NADH-Synthese), OAA/Mal-shuttle und cMDH (NAD⁺-Synthese) den Transport bzw. Ausgleich von Redoxäquivalenten zur Folge hat [SBN⁺10].

Zweitens sagt die *in silico* Analyse voraus, dass die Assimilation von Ammonium im Wesentlichen über GDH und nicht über GS/GOGAT erfolgt. GDH gehört zu den Genen, die unter Hypoxia hoch reguliert sind [BSV08, BPKJ⁺08] und dessen Produkt eine energieeffizientere Assimilation als GS/GOGAT liefert [QXLZ09]. In der zentralen hypoxischen Region des Endosperms wird Ammonium verwendet, um Glu *via* GDH zu generieren (Abbildung 24B), während in der peripheren oxygenierten Region, Ammonium *via* GDH abgegeben wird. Die experimentell bestimmten Konzentrationen an Glu, Ala und Ammonium stimmen mit dieser Vorhersage überein.

Drittens postuliert die FBA, dass Gerstensamen im Unterschied zu -wurzeln [ABJ94, BSV08, MGO8] weder GABA akkumulieren noch den GABA-shunt nutzen. In Übereinstimmung mit der Modellvorhersage weisen die experimentellen Ergebnisse der integrativen Studie darauf hin, dass ein signifikanter Fluss durch den GABA-shunt im Endosperm sehr unwahrscheinlich ist. Dies stellt möglicherweise eine endospermspezifische Anpassung an eine Situation dar, in der Sauerstofflimitierung eher lang andauernd als kurzzeitig ist [RWW⁺04].

Viertens sagt die *in silico* Analyse voraus, dass SDH unter hypoxischen Bedingungen inaktiv ist. SDH ist sowohl am Citratzyklus als auch an der Atmungskette beteiligt. In Übereinstimmung mit den Simulationsergebnissen konnte gezeigt werden, dass SDH unter verschiedenen Bedingungen, darunter auch Sauerstofflimitierung, inaktiv wird [SBN⁺10]. Die Verringerung der Aktivität von SDH reduziert den Fluss durch den Citratzyklus [ANNO⁺11] und produziert damit eine kompensatorische Steigerung des glykolytischen Flusses. Die erzielten Erkenntnisse liefern Ansatzpunkte für weiterführende experimentelle Studien bzw. konnten zum Teil bereits durch Laborexperimente bestätigt werden. So konnte die Modellvorhersage, dass die Assimilation von Ammonium im Wesentlichen über GDH und nicht über GS/GOGAT erfolgt bereits durch experimentelle Untersuchungen bestätigt werden [Rol12].

4.4.3.3 *Metabolische Kompartimentierung des Endosperms und seine Folgen für die Samenfüllung*

Auf Grundlage der experimentellen und *in silico* Analysen konnte gezeigt werden, dass das Endosperm von Gerste kein metabolisch einheitliches Gewebe darstellt, sondern als Folge abiotischer/biotischer Gradienten (u.a. Suc-, O₂- und Entwicklungsgradienten [RWW⁺04, MRF⁺11]) durch eine metabolische Kompartimentierung gekennzeichnet

ist, wobei die lokal vorherrschenden Bedingungen durch lokale Stoffwechsellanpassungen ausgeglichen werden. Im zentralen Endosperm ist der Stoffwechsel durch beträchtliche hypoxische Einschränkungen charakterisiert. Ein signifikant hoher Level an Ala-AT-Aktivität führt zu einer Akkumulation von Ala, wobei die Akkumulation von Pyr sowie die klassische Gärung eingeschränkt und zusätzlich ATP gebildet wird. Ala bewegt sich entlang eines Konzentrationsgradienten in Richtung des peripheren aeroben Endosperms. Unter aeroben Wachstumsbedingungen wird Ala *via* Ala-AT zurück zu Pyr umgewandelt. Die metabolische Kompartimentierung des stärkehaltigen Endosperms stellt einen möglichen Mechanismus dar, der metabolische Flexibilität gewährleistet und der schlussendlich zu der hohen Kohlenstoffumwandlungseffizienz des stärkehaltigen Endosperm von Getreide beiträgt [AVSH11].

4.4.4 Zusammenfassung

Mit dem Ziel, den Einfluss der Sauerstoffverfügbarkeit auf den Ala-Stoffwechsel des sich entwickelnden Gerstensamen zu untersuchen, wurde eine optimierungsbasierte Modellanalyse basierend auf der im ersten Teil der Arbeit entwickelten Modellierungspipeline durchgeführt.

Insgesamt konnte eine gute Übereinstimmung zwischen den Simulationsergebnissen und den Ergebnissen der experimentellen Studie festgestellt und Ala-AT als zentraler Kontrollpunkt zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel identifiziert werden. Neue Erkenntnisse konnten unter anderem in Bezug auf die cytosolische MDH als NAD⁺-Quelle, die mitochondriale GDH als Quelle der hypoxischen Ammonium-Assimilation und der Auswirkung der Inaktivität der SDH auf den endospermalen Stoffwechsel unter hypoxischen Bedingungen gewonnen werden. Die erzielten Erkenntnisse konnten zum Teil bereits durch Experimente bestätigt werden. Schlussendlich konnte auf Grundlage der *in silico* Analysen in Kombination mit der experimentellen Studie eine Kompartimentierung des Gerstenendosperms nachgewiesen und ein hypothetisches Modell der zugrunde liegenden Stoffwechselprozesse entwickelt werden. Die dargestellten Simulationsergebnisse wurde veröffentlicht [RMGB⁺11].

MODELLE UND MODELLVORHERSAGEN: GERSTENHALM VERSUS -SAMEN

Die Kornfüllung von Getreidesamen ist ein hoch komplexer Prozess, der durch die Interaktion vegetativer und generativer Organe¹ gekennzeichnet ist. Eine wichtige Kohlenstoffquelle für das Kornwachstum zum Zeitpunkt der Hauptspeicherphase bilden Fruktane, die als lösliche Reservestoffe in der Vakuole des Speicherparenchyms von Getreidehalmen zwischengespeichert und als Antwort auf eine unzureichende Versorgung der Samen mit Photosynthaten² remobilisiert werden [Bl93a, Sch93, XMJ⁺08].

Mit dem Ziel, den Einfluss der halmbürtigen Fruktanremobilisierung auf die Kornfüllung von Gerstensamen zum Zeitpunkt der Hauptspeicherphase näher zu beleuchten, wurde eine modellgestützte Stoffwechselanalyse auf der Grundlage eines kombinierten Multiorgan-Modells (Samen-/Halm-Modell) durchgeführt. Als Ausgangspunkt für die *in silico* Analyse wurde zunächst ein stöchiometrisches Modell des Primär- und Speicherstoffwechsels von Gerstenhalmen erstellt (Abschnitt 5.1) und in Abhängigkeit verschiedener Entwicklungsstadien analysiert (Abschnitt 5.2). Durch Verknüpfung des Gerstenhalm-Modells mit dem in Kapitel 4 eingeführten Gerstensamen-Modell wurde in weiterführenden Analysen ein kombiniertes Samen-/Halm-Modell erstellt und auf der Grundlage von experimentellen Werten aus der Literatur analysiert und validiert (Abschnitt 5.3).

5.1 GERSTENHALM-MODELL

5.1.1 *Biologische Grundlagen*

Schwerpunkt des in der vorliegenden Arbeit entwickelten Getreidehalm-Modells ist der Primär- und Speicherstoffwechsel in dem sich entwickelnden Speicherparenchym von Gerstenhalmen. Eine Beschreibung der wesentlichen, durch das Modell abgebildeten Stoffwechselvorgänge wird im Folgenden gegeben. Nachfolgende Beschreibung beschränkt sich auf Unterschiede zu dem in Abschnitt 4.1 aufgeführten endospermalen Speicherstoffwechsel von Gerstensamen. Für eine detaillierte Beschreibung der in den folgenden Abschnitten verwendeten Begriffe aus dem Bereich der Stoffwechselbiochemie, Samenmorphologie und -entwicklung sei auf das Grundlagenkapitel (Abschnitte 2.1.1 und 2.1.2) verwiesen. Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist im Anhang Abbildung 32 bis 36 gegeben.

Zuckerstoffwechsel

Fruktane, lösliche Polyfructosen, sind von zentraler Bedeutung als Kohlenstoffspeicher in Getreidehalmen, wo sie bis zu 40% des Trockengewichts ausmachen können [Sch93, XMJ⁺08, Bl93a]. Ausgehend von Suc werden Fruktane in einer mehrstufigen Reaktionskette in der Vakuole synthetisiert und gespeichert. Die Remobilisierung der Fruktanreserven erfolgt während der späten Samenreife als Antwort auf eine unzureichende Versorgung der Samen mit Photosynthaten [Sch93]. Unter normalen Wachstumsbedin-

¹ Im Unterschied zu generativen bzw. reproduktiven Organen (u.a. Blüten, Samen, Früchte), die der Vermehrung dienen, sind vegetative Organe (u.a. Wurzel, Blätter, Halme) essentiell für den Erhalt des Lebens der Pflanze.

² Photosynthat: chemisches Produkt der Photosynthese

gungen können Fruktane bis zu 20% des Kornertrags ausmachen und stellen damit eine wichtige Kohlenstoffquelle für Weizen- [BI81, Blu98, WW00] und Gerstensamen [GBS75, BI92] dar. Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist in Abbildung 32 gegeben.

Photosynthese

Die oxygene Photosynthese verläuft in zwei räumlich und funktionell getrennten Teilreaktionen: (i) der Lichtreaktion, die in den Thylakoiden³ der Chloroplasten abläuft, und (ii) der Dunkelreaktion, die im Stroma⁴ der Chloroplasten abläuft. Unter Ausnutzung der Sonnenenergie werden im Verlauf der Lichtreaktion Elektronen von Wasser auf NADP⁺ übertragen, wobei Sauerstoff freigesetzt wird [HP08b]. Durch Kopplung dieses Elektronentransports mit einem Protonentransport über die Membran wird ein Protonengradient erzeugt, der zur Speicherung von Energie in Form von ATP genutzt wird. Die entstandenen Reduktions- (NADPH) und Energieäquivalente (ATP) dienen im Verlauf der Dunkelreaktion (Calvin-Zyklus) der lichtunabhängigen Fixierung von Kohlenstoffdioxid durch die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (RubisCO, EC 4.1.1.39) [BGJ00]. Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist in Abbildung 33 und 34 gegeben.

Photorespiration

Als Folge der Oxygenierungsaktivität der RubisCO entsteht neben 3-Phosphoglycerat das Nebenprodukt 2-Phosphoglycolat, das in der 9-stufigen Reaktionskette der Photorespiration unter Beteiligung des Cytosols im Mitochondrium, Peroxisom und Chloroplast zu 3-Phosphoglycerat recycelt wird, wobei große Mengen an Energie verbraucht werden [HP08a]. Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist in Abbildung 35 gegeben.

Transportprozesse

In der Literatur werden drei verschiedene Wege der Suc-Aufnahme in Speicherparenchymzellen aufgeführt [PO96, LTT⁺03, Shio7]: (i) der apoplastische Transport *via* Plasmodesmata, sowie der symplastische Transport *via* (ii) Suc-Transporter und (iii) Zellwandinvertase. Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist in Abbildung 36 gegeben.

Für eine vollständige Auflistung der Reaktionen, die in dem Stoffwechselmodell enthalten sind, sei auf den Anhang (CD) verwiesen.

5.1.2 Modellrekonstruktion

Das Netzwerk des Primär- und Speicherstoffwechsels von Gerstenhalmen wurde analog zu der in Abschnitt 4.1.2 aufgeführten Vorgehensweise erstellt. Die Herleitung und Berechnung der Biomassezusammensetzung sowie der in dem Modell eingesetzten Biomassegleichung ist im Anhang (Abschnitt A.4.2.2) aufgeführt. Die Erhaltungsenergie wurde nach Galeriu [Gal12] auf 0.067 mmol ATP gTW⁻¹ h⁻¹ festgesetzt und als ATP-Exportreaktion in das Modell integriert. Eine Liste der Reaktionen, die in dem Netzwerk enthalten sind, sowie eine SBML-Version des Modells, sind im Anhang (CD) aufgeführt. Die Modellerstellung wurde unter Verwendung von METACROP durchgeführt.

³ Thylakoide: Membransysteme, die den Chloroplasten-Innenraum, das sogenannte Stroma, durchziehen

⁴ Stroma: Innenraum bzw. plasmatische Phase des Chloroplasten

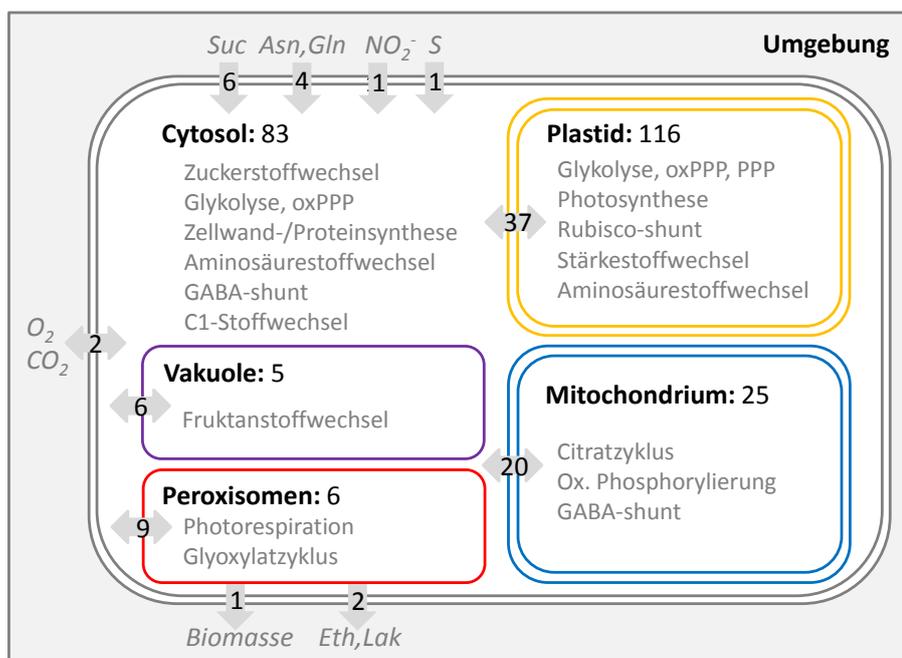


Abbildung 25: Schematische Darstellung des Gerstenhalm-Modells. Die Darstellung umfasst für jedes Zellkompartiment die wesentlichen, in einem Zellkompartiment ablaufenden Stoffwechselprozesse, sowie die Anzahl der biochemischen Reaktionen. Der Stoffaustausch (Transportreaktionen) zwischen Speicherparenchymzelle und Umgebung bzw. zwischen den einzelnen Zellkompartimenten ist in Form grauer Pfeile dargestellt. Die Anzahl der Transportreaktionen ist innerhalb der Pfeile wiedergegeben. *Abkürzungen:* Asn: Asparagin, C₁-Stoffwechsel: Folatstoffwechsel; Eth: Ethanol; Gln: Glutamin, Lak: Laktat; ox. Phosphorylierung: oxidative Phosphorylierung; oxPPP: oxidativer Pentosephosphatweg; PPP: Pentosephosphatweg; Suc: Saccharose, S: Sulfat

5.1.3 Modelleigenschaften

Das erstellte stöchiometrische Modell umfasst 303 Metabolite, die in insgesamt 235 Reaktionen ab-, um- oder aufgebaut werden. Weitere 90 Reaktionen beschreiben intrazelluläre Transportprozesse zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten (Cytosol, Mitochondrium, Plastid, Vakuole, Peroxisom) sowie den Austausch von Stoffen mit dem extrazellulären Medium. Die in dem Modell abgebildeten Stoffwechselvorgänge umfassen neben dem Primärstoffwechsel (u.a. Glykolyse, Citratzyklus, Pentosephosphatweg) zentrale Reaktionswege des Speicherstoffwechsels von Gerstenhalmen (u.a. Aminosäure-, Fruktanstoffwechsel) sowie Photosynthese und Photorespiration. Die grundlegenden Netzwerkeigenschaften des Modells sind in [Abbildung 25](#) aufgeführt. Eine grafische Darstellung des gesamten Modells ist im Anhang ([Abbildung 37](#)) gegeben.

5.2 PRIMÄRSTOFFWECHSEL IN GERSTENHALMEN

In Verlauf der Entwicklung der Gerstenpflanze erfüllt der Gerstenhalm unterschiedliche Funktionen in Bezug auf den Ganzpflanzenstoffwechsel. Nachfolgende Analysen des Gerstenhalmstoffwechsels basieren auf folgenden Entwicklungsstadien:

FRÜHE SAMENENTWICKLUNG (0 - 5 DAF) Während der frühen Samenentwicklung, zwischen Anthese⁵ und Ende des Halmwachstums, werden die Assimilate (Suc) der photosynthetisch aktiven Gerstenpflanze im Wesentlichen in den vegetativen Organen gespeichert [[Sch93](#), [XMJ⁺08](#)]. Die Photosynthate liefern ausreichend

5 Anthese: Zeitraum des Blühens

Kohlenhydrate für die beginnende Kornfüllung, so dass überschüssiger Kohlenstoff u.a. in Form von Fruktanen im Halm der Pflanze akkumulieren kann [Sch93]. Der Gerstenhalm stellt zu diesem Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung ein *Sink*-Organ dar.

HAUPTSPEICHERPHASE DES SAMEN (10-25 DAF) Während der Hauptspeicherphase reichen die Assimilate der zu diesem Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung stark reduzierten Nettphotosynthese nicht aus, um den Kohlenstoffbedarf der Samen zu decken [Sch93]. Die Kohlenhydratspeicher (Fruktane) des Gerstenhalmes werden remobilisiert, um die Rate der Kornfüllung aufrecht zu erhalten. Der Gerstenhalm stellt zu diesem Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung eine Kohlenstoffquelle (*Source*-Organ) dar.

5.2.1 Material und Methoden

Optimierungsbasierte Modellanalyse

Im Rahmen der optimierungsbasierten Modellanalyse wurden die in Tabelle 24 aufgeführten Simulationsexperimente auf Grundlage des in Abschnitt 5.1.2 eingeführten Gerstenhalm-Modells durchgeführt.

	Beschreibung	Ergebnisse	Diskussion
S1	Wachstumssimulation – frühe Samenreife	5.2.2.1	5.2.3
S2	Wachstumssimulation – späte Samenreife	5.2.2.2	5.2.3

Tabelle 24: Simulationsexperimente der optimierungsbasierten Modellanalyse

Nähere Erläuterungen zu den angewandten Analysemethoden, der Zielfunktion sowie der Modellparametrisierung werden im Folgenden gegeben.

Zielfunktion

Simulationsexperiment S1 wurde unter Anwendung der im Folgenden als Z_3 bezeichneten Zielfunktion der *Minimierung der Nährstoff- und Lichtaufnahme pro Flusseinheit* durchgeführt. Mathematisch ist diese Zielfunktion wie folgt als zweistufiger Optimierungsprozess implementiert (siehe Abschnitt 2.3.3.2):

	Optimierung	Zielfunktion	Math. Definition	Erläuterung
1. Schritt:	linear	Min Nährstoff/Licht	$\min v_{N,L}$	siehe Text
2. Schritt:	nichtlinear	Min Gesamtfluss	$\min \sum_{i=1}^n v_i^2$	2.3.3.2

Tabelle 25: Mathematische Definition der Zielfunktion Z_3 : Minimierung der Nährstoff- und Lichtaufnahme pro Flusseinheit

Die Zielfunktion *Minimierung der Nährstoff- und Lichtaufnahme* (Min Nährstoff/Licht) setzt sich aus den Austauschreaktionen der in das Speicherparenchym aufgenommenen Nährstoffe N mit $N = \text{Suc}, \text{Asn}, \text{Gln}, \text{SO}_4^{2-}$ und Licht L zusammen:

$$\min v_{N,L} = \min \sum_{i=1}^n v_{N_i} + \dots + v_{N_n} + v_L \quad (5.1)$$

Die biologische Annahme dieser Zielfunktion besteht darin, dass Zellen wachsen, während sie die minimale Menge an Ressourcen verwenden (Ressourcenkonservierung).

Simulationsexperiment S2 wurde unter Anwendung der im Folgenden als Z_4 bezeichneten Zielfunktion der *Maximierung der Suc-Abgabe pro Flusseinheit* durchgeführt. Mathematisch ist diese Zielfunktion wie folgt als zweistufiger Optimierungsprozess implementiert (siehe Abschnitt 2.3.3.2):

	Optimierung	Zielfunktion	Math. Definition	Erläuterung
1. Schritt:	linear	Max Suc	$\max v_{\text{Suc}}$	siehe Text
2. Schritt:	nichtlinear	Min Gesamtfluss	$\min \sum_{i=1}^n v_i^2$	2.3.3.2

Tabelle 26: Mathematische Definition der Zielfunktion Z_4 : Maximierung der Suc-Abgabe pro Flusseinheit

Auf Grundlage der Zielfunktion *Maximierung der Suc-Abgabe* (Max Suc) lässt sich die Effizienz des Gerstenhalms im Hinblick auf die maximal mögliche Suc-Abgabe ermitteln.

Modellparametrisierung

Alle Simulationsexperimente wurden auf Grundlage der in Tabelle 27 aufgeführten Modellparameter durchgeführt.

Für Simulationsexperiment S1 wurde die Carboxylase- und Oxygenasereaktion der RubisCO entsprechend experimenteller Werte [Tsc12] auf ein Verhältnis von 6:1 festgesetzt. Dies war notwendig, da aufgrund der Ineffizienz der Oxygenasereaktion der Reaktionsweg der Photorespiration nicht optimal und damit nicht aktiv ist [SR11]. Als weitere Nebenbedingung wurde die Wachstumsrate (μ) auf einen für den Gerstenhalm zum Zeitpunkt der frühen Samenreife repräsentativen Wert von 0.00151 h^{-1} [Bl93b] festgesetzt. Die Erhaltungsenergie wurde nach Galeriu [Gal12] auf $0.067 \text{ mmol ATP g}^{-1} \text{ TW h}^{-1}$ festgesetzt und als ATP-Exportreaktion in das Modell integriert. Unter der Annahme, dass die photosynthetische Aktivität des Gerstenhalms zum Zeitpunkt der Hauptspeicherphase zu vernachlässigen ist (siehe Abschnitt 5.2), wurde in Simulationsexperiment S2 die Fruktanremobilisierung als einzige Kohlenstoffquelle für die Suc-Abgabe der Parenchymzelle in das Phloem festgesetzt. Entsprechend wurde die Aufnahme von Licht und Suc aus dem externen Medium unterbunden (siehe Tabelle 27).

Das Simulationsexperiment S2 wurde mit FBA-SIMVIS durchgeführt. Das MATLAB-Skript für Simulationsexperiment S1 ist im Anhang (CD) verfügbar⁶.

⁶ Die GUI-basierte Version von FBA-SIMVIS unterstützt keine zusammengesetzten (d.h. aus mehr als einer Reaktion bestehenden) Zielfunktionen. Simulationen mit zusammengesetzter Zielfunktion wurden auf Grundlage einer entsprechend erweiterten Version von FBA-SIMVIS in MATLAB durchgeführt

Nr.	OBA	Z	Suc	Ph	RubisCO	ATP	μ
S1	FBA	Z ₃	.	.	6:1*	0.067	0.00151 h ⁻¹
S2	FBA	Z ₄	0	0	.	0.067	.

Tabelle 27: Modellparameter der Simulationsexperimente S1 und S2. Einheiten: $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG h}^{-1}$. *Abkürzungen:* OBA: optimierungsbasierte Analysemethode; Z: Zielfunktion; ATP: ATP-Export zur Modellierung der Erhaltungsenergie (siehe Text) μ : Wachstumsrate. * Die Werte der RubisCO entsprechen Verhältniszahlen (siehe Text) und keinen Flusswerten

5.2.2 Ergebnisse

Um Einblicke in das Stoffwechselverhalten des sich entwickelnden Gerstenhalmes zum Zeitpunkt der frühen bzw. späten Samenentwicklung zu gewinnen, wurde eine vergleichende *in silico* Analyse (FBA) des *Sink-* versus *Source-*Stadiums durchgeführt (Simulationsexperimente S1 und S2). Die resultierenden metabolischen Flussverteilungen sind in Abbildung 26 dargestellt, die berechneten Flusswerte sind im Anhang (CD) aufgeführt. Im Folgenden werden die Simulationsergebnisse beschrieben und Unterschiede in dem Stoffwechselverhalten in Abhängigkeit des Entwicklungszeitpunktes spezifiziert.

5.2.2.1 Sink: Primärstoffwechsel zum Zeitpunkt der frühen Samenreife

Zum Zeitpunkt der frühen Samenreife ist die metabolische Flussverteilung des sich entwickelnden Gerstenhalmes durch eine hohe photosynthetische Aktivität bestimmt: der Fluss durch Licht- und Dunkelreaktion ist hoch (Abbildung 26A). Die Elektronentransportkette der Lichtreaktion basiert auf einem nicht-zyklischen Elektronentransport und resultiert damit in der Erzeugung von NADPH und O₂. Kohlendioxid wird über den Calvin-Zyklus fixiert, wobei die Effizienz der Kohlenstofffixierung durch die Oxygenaseaktivität der RubisCO bzw. den Reaktionsweg der Photorespiration reduziert ist.

Neben der photosynthetischen Kohlenstofffixierung spielt die Aufnahme von Suc aus dem Phloem als Kohlenstofflieferant für Biomasse und Reservestoffe eine Rolle. Suc wird über Plasmodesmata (symplastischer Transport) in das Speicherparenchym aufgenommen, wo es entweder direkt als Vorläufer für die vakuoläre Fruktansynthese oder über entsprechende Zwischenstufen (u.a. UDPGlc, PEP, Pyr) der Synthese von Biomassekomponenten dient. Die Aufnahme von Stickstoff beruht auf der symplastischen Translokation von Asn und Gln. Der Citratzyklus ist nicht-zyklisch und dient im Wesentlichen der Redox-Balance. Hauptenergielieferant für (nicht-)wachstumsassoziierte Erhaltungsprozesse ist die Photophosphorylierung (Photosynthese) sowie die oxidative Phosphorylierung.

Das Modell sagt voraus, dass die Reduktionsäquivalente der Photosynthese über die Interaktion von plastidärer (NADP-GAPDH, EC 1.2.1.13) und cytosolischer Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (NAD-GAPDH, EC 1.2.1.12) von dem Plastiden in das Cytosol transportiert werden. Durch die Interaktion der cytosolischen und mitochondrialen MDH wird NAD⁺ in das Mitochondrium transportiert und dort über die oxidative Phosphorylierung regeneriert. Der durch die cytosolische und mitochondriale MDH angetriebene OAA/Malat-shuttle dient damit der Funktion der Redox-Balance.

5.2.2.2 Source: Primärstoffwechsel zum Zeitpunkt der Hauptspeicherphase

Die metabolische Flussverteilung zum Zeitpunkt der Hauptspeicherphase ist durch einen hohen Fluss fruktanabbauender Prozesse in der Vakuole gekennzeichnet (Abbildung 26B). Die Abbauprodukte der Fruktanremobilisierung (Glc, Frc, Suc) werden in das Cytosol exportiert und dort für die Resynthese von Suc über Fructokinase (FK, EC 2.7.1.4)/Hexo-

kinase (HK, EC 2.7.1.1) und die reverse Aktion der UGPase und SuSy verwendet. Suc wird aus dem Speicherparenchym in das Phloem exportiert. Ein Teil der remobilisierten Zucker wird in der Glykolyse metabolisiert und in den Citratzyklus eingespeist. Die Hauptfunktion des zyklisch ablaufenden Citratzyklus besteht in der Bereitstellung von Energie für nicht-wachstumsassoziierte Erhaltungsprozesse. Der glykolytische Fluss ist auf den PP_i -basierten *Bypass* von PFP und PPDK beschränkt, wobei das durch die Reaktion der UGPase anfallende PP_i verbraucht wird.

5.2.3 Diskussion

Mit dem Ziel, den Einfluss der halmbürtigen Fruktanremobilisierung auf die Kornfüllung von Gerstensamen auf der Grundlage eines kombinierten Multiorgan-Modells zu analysieren, wurde ein Modell des Primär- und Speicherstoffwechsels von Gerstenhalmen erstellt und in Abhängigkeit verschiedener Entwicklungsstadien analysiert und validiert.

Aufgrund fehlender experimenteller Flusswerte (u.a. Aufnahme- und Exkretionsraten) war die Modellvalidierung im Wesentlichen auf den Vergleich aktiver Stoffwechselwege beschränkt. Die Ergebnisse der Wachstumssimulation der frühen Samenreife wiesen insgesamt gute Übereinstimmungen mit den aus der Literatur bekannten qualitativen Hauptmerkmalen des Primärstoffwechsels photosynthetisch aktiver Gewebe auf. So wurde die photosynthetische Aktivität des Halms durch den angezeigten hohen Fluss der Licht- und Dunkelredaktion durch das Modell korrekt wiedergegeben und ein nicht-zyklischer Citratzyklus in Übereinstimmung mit Literaturangaben [SBN⁺10] vorausgesagt. Neben qualitativen Hauptmerkmalen des aeroben, heterotrophen Stoffwechsels (u.a. zyklischer Citratzyklus [SBN⁺10], oxidative Phosphorylierung als Hauptenergielieferant) wurde die Remobilisierung der Fruktanreserven durch die Ergebnisse der Wachstumssimulationen der späten Samenreife korrekt wiedergegeben.

Zusammenfassend weisen die Simualtionsergebnisse darauf hin, dass das rekonstruierte Modell das Potential zur Simulation des Primär- und Speicherstoffwechsels von Gerstenhalmen hat und damit als valides Ausgangsmodell für die in Abschnitt 5.3 dargestellte Modellverknüpfung eingesetzt werden kann.

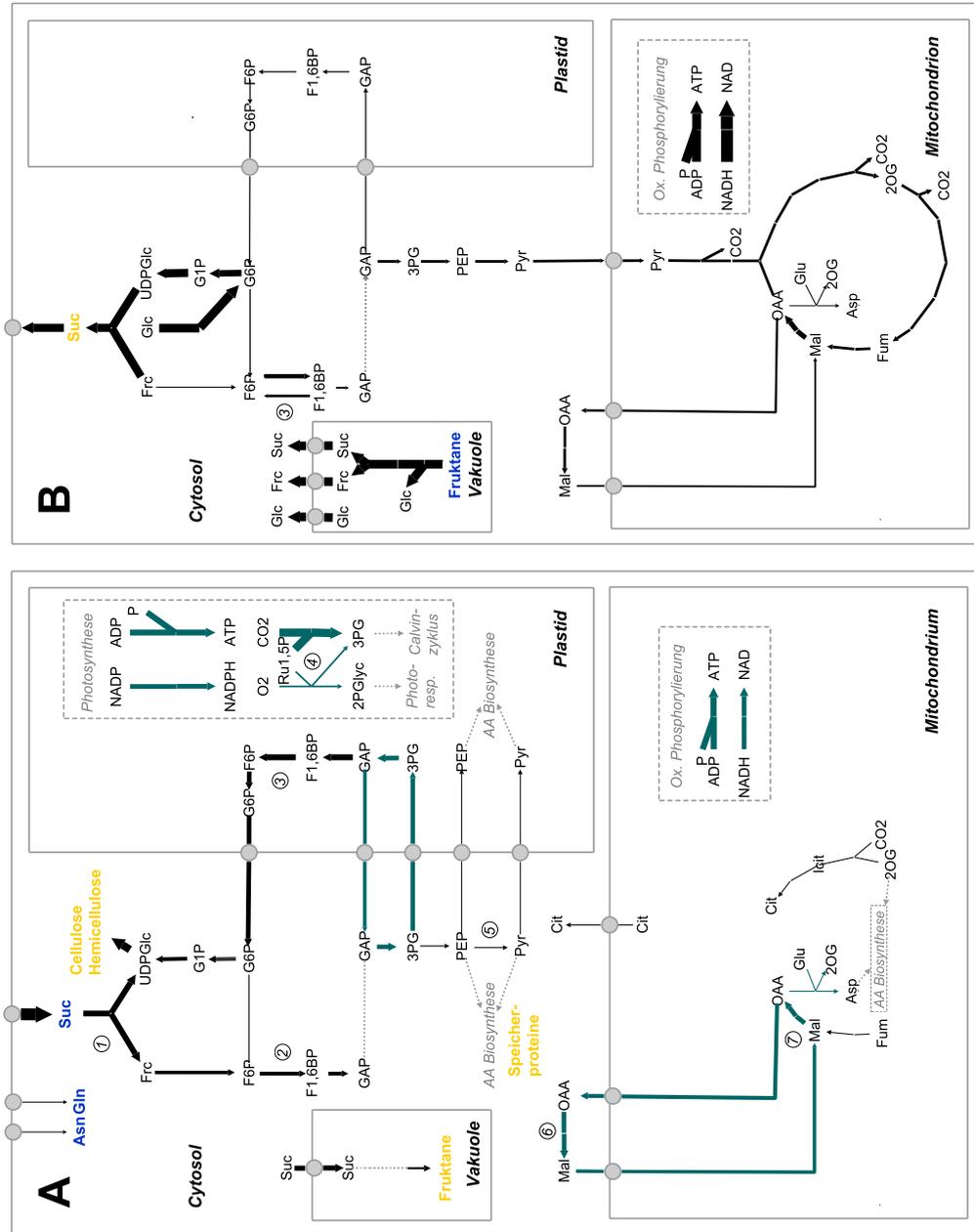


Abbildung 26: Flussprofil des Primärstoffwechsels des Speicherparenchyms zum Zeitpunkt der frühen (A) bzw. späten Samenreife (B); Simulationsexperimente S1, S2. Die Darstellung der metabolischen Flussverteilungen beschränkt sich auf zentralen Stoffwechselprozesse. Für eine Auflistung aller berechneten Flusswerte sei auf den Anhang (CD) verwiesen. Die Dicke der Pfeile entspricht den Flusswerten. **Abkürzungen:** (1) SuSy; (2) PFP; (3) FBPAse; (4) RubisCO; (5) PPDK; (6) cMDH; (7) mMDH; AA: Aminosäuren; ox. Phosphorylierung: oxidative Phosphorylierung; Photoresp: Photorespiration; Eine Erläuterung der Metabolit-, Transporter- und Enzymnamen ist im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt

5.3 VERKNÜPFUNG ORGANSPEZIFISCHER MODELLE: SAMEN-/HALM-MODELL

Mit dem Ziel, tiefer gehende Einblicke in die Kornfüllung von Gerstensamen zu erhalten, wurde ein kombiniertes Samen-/Halm-Modell erstellt und eine erste Analyse im Hinblick auf den Einfluss der halmbürtigen Fruktanremobilisierung auf den Speicherstoffwechsel von Gerstensamen zum Zeitpunkt der Hauptspeicherphase durchgeführt. Im Folgenden wird die Erstellung und Simulation des kombinierten Multiorgan-Modells dargestellt und erste Analyseergebnisse im Rahmen einer initialen Modellvalidierung diskutiert.

5.3.1 *Material und Methoden*5.3.1.1 *Modellrekonstruktion*

Das stöchiometrische Modell des Primär- und Speicherstoffwechsels von Gerstensamen und -halm wurde durch Verknüpfung des in Abschnitt 4.1 eingeführten Gerstensamen-Modells mit dem in Abschnitt 5.1 erläuterten *Source*-Modell des Gerstenhalmstoffwechsels erstellt. Die Modellverknüpfung wurde entsprechend der in Abschnitt 2.3.2.3 skizzierten Methode durch Integration des Phloem als Schnittstelle zwischen den Einzelmodellen durchgeführt. Eine stark vereinfachte Version der Nährstoffversorgung durch das Gerstenblatt wurde durch die Integration symplastischen Transportreaktionen von Suc, Asn und Gln zwischen Blattparenchym und Phloem modelliert.

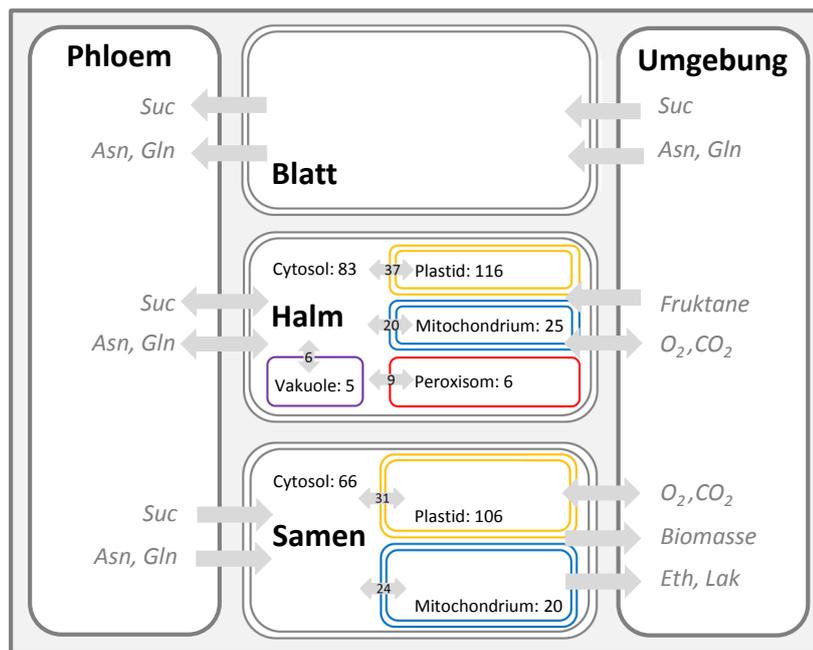


Abbildung 27: Schematische Darstellung des Samen-/Halm-Modells. Die Darstellung umfasst für jedes Zellkompartiment die Anzahl der biochemischen Reaktionen. Der Stoffaustausch (Transportreaktionen) zwischen den Organen (Samen, Halm, Blatt) und Phloem bzw. Umgebung sowie der Stoffaustausch zwischen den einzelnen Zellkompartimenten ist in Form grauer Pfeile dargestellt. Die Anzahl der Transportreaktionen zwischen den Zellkompartimenten ist innerhalb der Pfeile wiedergegeben. *Abkürzungen:* Eth: Ethanol; Gln: Glutamin, Lak: Laktat; Suc: Saccharose

	Beschreibung	Ergebnisse	Diskussion
S1	Simulation normaler Wachstumsbedingungen	5.3.2	5.3.3
S2	Simulation der Reduktion der <i>Sink</i> -Stärke	5.3.2	5.3.3
S3	Simulation der Reduktion der <i>Source</i> -Stärke	5.3.2	5.3.3

Tabelle 28: Simulationsexperimente der optimierungsbasierten Modellanalyse

5.3.1.2 Modelleigenschaften

Das erstellte stöchiometrische Samen-/Halm-Modell umfasst 555 Metabolite und 438 Reaktionen. Weitere 163 Reaktionen beschreiben intrazelluläre Transportprozesse zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten (u.a. Cytosol, Mitochondrium, Plastid, Vakuole, Peroxisom) eines Organs sowie den Phloem-basierten Stoffaustausch zwischen den Organen. Die grundlegenden Netzwerkeigenschaften des Modells sind in Abbildung 27 aufgeführt.

5.3.1.3 Optimierungsbasierte Modellanalyse

Im Rahmen der optimierungsbasierten Modellanalyse wurden die in Tabelle 28 aufgeführten Simulationsexperimente unter Anwendung des in Abschnitt 5.3.1.1 eingeführten Samen-/Halm-Modells durchgeführt.

Nähere Erläuterungen zu den angewandten Analysemethoden, der Zielfunktion sowie der Modellparametrisierung werden im Folgenden gegeben.

Zielfunktion

Alle Simulationsexperimente wurde unter Anwendung der im Folgenden als Z_5 bezeichneten Zielfunktion der *Minimierung der samenspezifischen Suc-Aufnahme pro Flusseinheit* durchgeführt. Mathematisch ist diese Zielfunktion wie folgt als zweistufiger Optimierungsprozess implementiert (siehe Abschnitt 2.3.3.2):

	Optimierung	Zielfunktion	Math. Definition	Erläuterung
1. Schritt:	linear	Min Suc_{Samen}	$\min v_{Suc}$	siehe Text
2. Schritt:	nichtlinear	Min Gesamtfluss	$\min \sum_{i=1}^n v_i^2$	2.3.3.2

Tabelle 29: Mathematische Definition der Zielfunktion Z_5 : Minimierung der samenspezifischen Suc-Aufnahme pro Flusseinheit

Die biologische Annahme dieser Zielfunktion besteht darin, dass Zellen wachsen, während sie die minimale Menge an Ressourcen (Suc) verwenden (Ressourcenkonservierung).

Modellparametrisierung

Alle Simulationsexperimente wurden auf Grundlage der in Tabelle aufgeführten Modellparameter durchgeführt.

Nr.	OBA	Z	Suc _H	Asn _H	Asn _H	SO ₄ ²⁻ _H	Ph _H	Suc _B	μ _S
S1	FBA	Z5	0	0	0	0	0	.	0.003 h ⁻¹
S2	FBA	Z5	0	0	0	0	0	.	0.002 h ⁻¹
S3	FBA	Z5	0	0	0	0	0	0.005	0.003 h ⁻¹

Tabelle 30: Modellparameter der Simulationsexperimente S1, S2 und S3. Einheiten: μmol g⁻¹ TG h⁻¹. Abkürzungen: OBA: optimierungsbasierte Analyse; Z: Zielfunktion; μ: Wachstumsrate, Einheit: h⁻¹; Suc_H, Asn_H, Gln_H, SO₄²⁻_H, Ph_H: Aufnahmeraten von Suc, Asn, Gln, SO₄²⁻ und Licht (Photonen) des Gerstenhalms; Suc_B: Suc-Abgaberate bzw. Phloembeladungsrate des Gerstenblatts

Simulationsexperimente S1 und S3 wurden durchgeführt, indem die Kornwachstumsrate μ_S auf eine für den Gerstensamen zum Zeitpunkt der Stärkeakkumulation experimentell bestimmte Wachstumsrate von 0.003 h⁻¹ [FPN83, QTL88] festgelegt wurde. Die experimentell durch das Entfernen der Gerstenähre hervorgerufene Reduktion der *Sink*-Stärke (Simulationsexperiment S2) wurde durch eine 30% Reduktion der unter normalen Wachstumsbedingungen vorherrschenden Wachstumsrate simuliert. Die experimentell durch Beschattung der Gerstenpflanze durchgeführte Reduktion der Bereitstellung von Assimilaten wurde im Rahmen der *in silico* Analyse (Simulationsexperiment S3) durch eine Reduktion des blattbürtigen Suc-Abgabe um 30% des entsprechenden Flusses unter normalen Wachstumsbedingungen simuliert.

5.3.2 Ergebnisse

Als Ergebnis verschiedener experimenteller Studien [BI93a, BI93b] konnte gezeigt werden, dass Angebot und Nachfrage von Assimilaten einen wesentlichen Effekt auf die Remobilisierung von Fruktanen im Gerstenhalm ausüben. So konnte durch die Manipulation von *Source*- und *Sink*-Stärke (Reduktion der *Source*-Stärke durch Beschattung der Gerstenpflanze; Reduktion der *Sink*-Stärke durch Entfernen der Ähre) der regulierende Einfluss der Kohlenstoffverfügbarkeit auf die Fruktanremobilisierung nachgewiesen werden. Mit dem Ziel, das erstellte Samen-/Halm-Modell auf der Grundlage experimenteller Ergebnisse zu validieren, wurden die auf experimenteller Ebene durchgeführte Manipulation der *Source*- und *Sink*-Stärke [BI93a, BI93b] im Rahmen der *in silico* Analyse entsprechend der in Abschnitt 5.3.1.3 spezifizierten Modellparameter simuliert. Die Ergebnisse der *in silico* Analyse sind in Tabelle 31 aufgeführt.

	NW	<i>Sink</i> -Reduktion	<i>Source</i> -Reduktion
Phloembeladung (Blatt)	0.0071	0.0050	0.0050*
Phloembeladung (Halm)	0.0011	0.0007	0.0032
Wachstumsrate	0.0028	0.0020*	0.0028
Fruktanremobilisierung	0.00053	0.0004	0.0016

Tabelle 31: Ergebnisse der *in silico* Analyse. Abkürzungen: NW: normale Wachstumsbedingungen (Simulationsexperiment S1); *Sink*-Reduktion: Simulationsexperiment S2; *Source*-Reduktion: Simulationsexperiment S3; *: fixierte Flusswerte

Wie aus Tabelle 31 ersichtlich entsprechen die Modellvorhersagen den Ergebnissen der experimentellen Studie in dem (i) die Reduktion der *Sink*-Stärke analog zu der experimentell nachgewiesenen später einsetzenden Mobilisierung der Fruktanreserven eine deutlich verringerte Fruktanremobilisierung (25 % Reduktion) bedingt und (ii) die Reduktion der *Source*-Stärke eine analog zu der experimentell nachgewiesenen früher einsetzenden Mobilisierung der Fruktanreserven eine deutlich gesteigerte Fruktanremobilisierung (300 % Steigerung) zur Folge hat.

5.3.3 Diskussion

Viele pflanzenspezifische Stoffwechselfunktionen beruhen auf Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen, Geweben und Organen. Die Erstellung gewebe- bzw. organspezifischer Modelle und die Verknüpfung dieser Modelle zu kombinierten Multiorgan-Netzwerken stellt eine Möglichkeit dar, um tiefer gehende Einblicke in die komplexe Organisation pflanzenbiologischer Stoffwechselprozesse zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein kombiniertes Samen-/Halm-Modell des Primär- und Speicherstoffwechsels von Gerstenpflanzen zum Zeitpunkt der Hauptspeicherphase erstellt, mit dem Ziel, den Einfluss der halmbürtigen Fruktanremobilisierung auf die Kornfüllung von Gerstensamen näher zu beleuchten. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen verschiedener experimenteller Studien [BI93a, BI93b] konnte dabei der Einfluss der Manipulation von *Source*- und *Sink*-Stärke auf die vakuoläre Fruktanremobilisierung reproduziert und damit die experimentellen Ergebnisse aus der Literatur bestätigt werden. Insgesamt weisen die Simualtionsergebnisse darauf hin, dass das rekonstruierte Multiorgan-Modell das Potential zur Simulation des Primär- und Speicherstoffwechsels von Gerstensamen und -halm hat und damit als validierte Simulationsplattform für weiterführende Analysen eingesetzt werden kann.

5.3.4 Zusammenfassung

Mit dem Ziel, den Einfluss der halmbürtigen Fruktanremobilisierung auf die Kornfüllung von Gerstensamen näher zu beleuchten wurde ein kombiniertes Samen-/Halm-Modell des Primär- und Speicherstoffwechsels von Gerstenpflanzen unter Anwendung der im ersten Teil der Arbeit entwickelten Modellierungspipeline rekonstruiert und analysiert.

Insgesamt weisen die Simualtionsergebnisse darauf hin, dass der in der vorliegenden Arbeit entwickelte Ansatz zur Integration organspezifischer Stoffwechselmodelle geeignet ist um Aussagen bezüglich komplex organisierter und mehrere Organe übergreifender Stoffwechselprozesse zu treffen. Das rekonstruierte Multiorgan-Modell hat das Potential zur Simulation des Primär- und Speicherstoffwechsels von Gerstensamen und -halm und kann damit als valide Simulationsplattform für weiterführende Anwendungen eingesetzt werden.

6.1 ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzen zeigen eine unvergleichliche Diversität in ihrem Stoffwechselverhalten [SSK10]. Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung als Nahrungs-, Energie- und Rohstoffquelle besteht ein wachsendes Interesse daran, das Verhalten und die Regulation pflanzenbiologischer Stoffwechselprozesse zu verstehen und vorherzusagen. Die hoch komplexe Organisation pflanzenbiologischer Stoffwechselprozesse erfordert jedoch neue Methoden, welche den traditionellen, auf einzelne Systemkomponenten beschränkten reduktionistischen Ansatz der Biowissenschaften ergänzen. Mögliche Lösungsansätze bietet hierbei die mathematische Modellierung als Kerndisziplin der systembiologischen Forschung.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Anwendung optimierungsbasierter Ansätze der mathematischen Modellierung auf pflanzenbiologische Stoffwechselsysteme. Der Fokus der Arbeit war auf die Entwicklung einer Modellierungspipeline zur Rekonstruktion, Analyse und Visualisierung von Stoffwechselmodellen (Teil I) und deren Anwendung auf gewebe- und organspezifische Stoffwechselmodelle der monokotyledonen Nutzpflanze *Hordeum vulgare* (Gerste) (Teil II) gerichtet.

6.1.1 Teil I: Modellierungspipeline

Mit dem Ziel, die einzelnen Teilschritte der *Flux Balance Analysis* möglichst weitgehend durch rechnergestützte Methoden zu unterstützen, wurden Softwarekomponenten zur Rekonstruktion, Analyse und Visualisierung von pflanzenbiologischen Stoffwechselmodell entwickelt und zu einer Pipeline integriert. Hierzu wurden zunächst Anforderungen an Systeme der Netzwerkrekonstruktion und -analyse ausgearbeitet und bestehende Systeme im Hinblick auf diese Anforderungen evaluiert. Aufgrund der mangelhaften Eignung der existierende Systeme war die Entwicklung neuer Softwarekomponenten notwendig.

In Bezug auf die Netzwerkrekonstruktion wurde METACROP, ein Informationssystem zur Verwaltung und Repräsentation metabolischer Netzwerkdaten in Pflanzen auf der Grundlage eines bereits am IPK bestehenden Informationssystems entwickelt. Neben einer detaillierten Repräsentation biochemischer Reaktionen und Reaktionswege des Primärstoffwechsels mono- und dikotyle Nutzpflanzen unterstützt das System die Rekonstruktion, Verwaltung und den Export individueller, nutzerspezifischer Netzwerkmodelle. Die Anwendung der Datenbank als integraler Bestandteil der entwickelten Modellierungspipeline wurde anhand verschiedener Anwendungsstudien im zweiten Teil der Arbeit dokumentiert.

In Bezug auf die Analyse und Visualisierung pflanzenbiologischer FBA-Modelle wurde FBA-SIMVIS, ein VANTED Add-on zur optimierungsbasierten Analyse von Stoffwechselmodellen entwickelt. Mit dem Schwerpunkt der visuellen Darstellung und Analyse metabolischer Flüsse unterstützt die Software neben der Rekonstruktion und Analyse optimierungsbasierter Modelle eine interaktive, dynamischen Visualisierung der Simulationsergebnisse. Die Anwendung von FBA-SIMVIS im Rahmen der entwickelten Modellierungspipeline wurde am Beispiel gewebe- und organspezifischer Stoffwechselmodelle von Gerste im zweiten Teil der Arbeit dokumentiert.

6.1.2 Teil II: Modelle und Modellvorhersagen

Unter Anwendung der in Teil I der Arbeit entwickelten Modellierungspipeline wurde das Konzept der *Flux Balance Analysis* auf verschiedene gewebe- und organspezifische Stoffwechselmodelle des Primärstoffwechsels von Gerste angewandt. Basierend auf einem Modell des endospermalen Primärstoffwechsels von Gerstensamen zum Zeitpunkt der Stärkeakkumulation, wurden in einer ersten Anwendungsstudie grundlegende Prozesse des Speicherstoffwechsels in Abhängigkeit umweltbedingter und genetischer Störungen untersucht. Insgesamt konnten gute Übereinstimmungen zwischen den Modellvorhersagen und den in der Literatur aufgeführten qualitativen, physiologischen Hauptmerkmalen des Samenstoffwechsels unter den gegebenen Wachstumsbedingungen festgestellt werden. Somit konnte das Modell als valide Simulationsplattform für weiterführende *in silico* Analysen eingesetzt werden. Das Modell sowie die damit erzielten Modellvorhersagen wurden als erste Anwendungsstudie der *Flux Balance Analysis* auf ein pflanzenbiologisches System veröffentlicht.

Mit dem Ziel, den Einfluss der Saccharoseverfügbarkeit auf den Speicherstoffwechsel des sich entwickelnden Gerstensamen zu untersuchen, wurde begleitend zu einer experimentellen NMR-Untersuchung als zweite Anwendungsstudie eine vergleichende *in silico* Analyse auf Grundlage des validierten Gerstensamen-Modells durchgeführt. Basierend auf den Simulationsergebnissen konnten sowohl experimentelle Ergebnisse der NMR-Studie bestätigt als auch neue potentielle Ziele für *Metabolic Engineering*-Ansätze identifiziert werden.

In einer dritten Anwendungsstudie des Gerstensamen-Modells wurden, begleitend zu einer weiteren experimentellen Untersuchung, gewebespezifische Simulationen des endospermalen Primärstoffwechsels durchgeführt, mit dem Ziel die Bedeutung des Alaninstoffwechsels im zentralen hypoxischen Endosperm versus peripheren aeroben Endosperm zu untersuchen. Als Ergebnis der *in silico* Analyse konnte in Verbindung mit experimentellen Ergebnissen der experimentellen Studie eine metabolische Kompartimentierung des Gerstenendosperms nachgewiesen und in diesem Zusammenhang eine grundlegende Bedeutung des Alaninstoffwechsels für Stoffwechselanpassungen in Samengeweben mit unterschiedlicher Sauerstoffverfügbarkeit aufgezeigt werden. Zudem konnten einige unerwarteten Modellvorhersagen durch nachfolgende experimentelle Untersuchungen im Labor zum Teil verifiziert werden. Die Simulationsergebnisse dieser als auch der vorherigen Anwendungsstudie wurden publiziert.

Mit dem Ziel, den Einfluss der halmbürtigen Fruktanremobilisierung auf die Kornfüllung von Gerstensamen zu untersuchen, wurde ein kombiniertes Multiorgan-Modell (Samen-/Halm-Modell) des Primär- und Speicherstoffwechsels von Gerstenpflanzen erstellt und auf der Grundlage von experimentellen Werten aus der Literatur analysiert und validiert. Insgesamt weisen die Simulationsergebnisse darauf hin, dass das rekonstruierte Multiorgan-Modell das Potential zur Simulation des Primär- und Speicherstoffwechsels von Gerstensamen und -halm hat und damit als validierte Simulationsplattform für weiterführende Analysen eingesetzt werden kann.

6.2 AUSBLICK

Als Ergebnis der vorliegenden Arbeit sowie jüngst publizierter Anwendungsstudien aus dem Bereich der Pflanzenforschung (u.a. [WPH⁺10, PMSF09, RTD⁺10, HS11b, PCTK11]) konnte dargestellt werden, dass die *Flux Balance Analysis* eine sinnvolle Erweiterung der traditionellen Methodik zur Analyse pflanzenbiologischer Stoffwechselnetzwerke darstellt [SR11]. Mit Blick auf die zunehmende Bedeutung der mathematischen Modellierung in den verschiedenen Teildisziplinen der Biowissenschaften und einer daraus resultierenden stetig wachsende Zunahme neuer Methoden besteht aus technischer Sicht eine zukünftige Herausforderung in der Anpassung der Modellierungspipeline an neu entwickelte Analysemethoden. Mögliche Ansatzpunkte bestehen hier unter anderem im Bereich der Modellvalidierung und -analyse im Hinblick auf immer größer und komplexer werdende Stoffwechselmodelle.

Ein wesentliches Merkmal systembiologischer Forschungsansätze ist die interdisziplinäre Zusammenarbeit von Wissenschaftlern unterschiedlicher Fachdisziplinen [GM08]. Um die Ergebnisse der *Flux Balance Analysis* allen Partnern interdisziplinärer Projekte kommunizierbar zu machen, ist eine Aufarbeitung der Simulationsergebnisse durch Methoden der Visualisierung notwendig. Standardisierte Darstellungsformen wie SBGN ermöglichen dabei eine vereinfachte intra- und interdisziplinäre Kommunikation. In diesem Zusammenhang kann eine Erweiterung der bereits in FBA-SIMVIS verfügbaren Visualisierungsmethoden um SBGN-basierte Darstellungsformen sinnvoll sein. Hinsichtlich des Trends zu immer größer und komplexer werdenden Modellen besteht ein weiterer potentieller Ansatzpunkt in der Entwicklung von Visualisierungsmethoden, die eine Darstellung und visuelle Analyse großskaliger Stoffwechselnetzwerke (> 500 Reaktionen) unterstützen.

Weitere zukünftige technische Herausforderungen bestehen in der Adaptation der Modellierungspipeline an andere Bereiche der Lebenswissenschaften (u.a. Medizin), sowie der Weiterentwicklung der Flexibilität in Bezug auf die Integration externer Simulationstools. Wesentlich für die Anwendung der Pipeline durch Wissenschaftler anderer Teildisziplinen ist dabei neben einer guten Dokumentation auch das Angebot vordefinierter Workflows.

In Anbetracht des breiten Spektrums möglicher Anwendungen der *Flux Balance Analysis* auf dem Gebiet der Pflanzenforschung kann im Folgenden nur ein kurzer Ausblick auf zukünftige Herausforderungen gegeben werden. Mit dem Ziel, spezifische Stoffwechselleistungen zu optimieren besteht ein Hauptanwendungsgebiet der mathematischen Modellierung pflanzenbiologischer Stoffwechselprozesse in der Identifizierung potentieller Ziele für das *Plant Metabolic Engineering*. In diesem Zusammenhang bietet das einzigartige Spektrum der natürlichen Synthesefähigkeit von Pflanzen ein breites Anwendungsgebiet. Mögliche Ansatzpunkte im Hinblick auf die am IPK in Gatersleben im Zentrum der Forschung stehenden Samen mono- und dikotyler Nutzpflanzen bestehen unter anderem in der gezielten Modifikation von Synthesewegen relevanter Reservestoffe in öl-, protein und stärkehaltigen Samen. Zudem kann das diverse Artenspektrum der Pflanzenwelt genutzt werden, um anhand von taxonomischen Vergleichsstudien neue Einblicke in Stoffwechselprozesse und damit einhergehend potentielle Ziele für das *Plant Metabolic Engineering* zu liefern. Mögliche Ansatzpunkte im Bereich der Nutzpflanzenforschung bestehen hierbei in dem Vergleich mono- zu dikotyledoner Arten sowie C₃- und C₄-Pflanzen. Erste interessante Ergebnisse auf der Grundlage von Analysen bereits bestehender Samen-Modelle monokotyler (Gerste, Weizen) und dikotyler (Medicago, Erbse) Arten weisen auf das mögliche Potential dieser Fragestellung hin.

Ziel der systembiologischen Forschung ist es, das Verhalten und die Dynamik eines biologischen Systems, wie beispielsweise einer Zelle oder – in ferner Zukunft – eines Organismus in seiner Gesamtheit zu verstehen [GM08]. Auch auf dem Gebiet der Pflanzenforschung wird ein zukünftiges Ziel darin bestehen, die Rekonstruktion von Stoffwechselm-

odellen auf Ganzpflanzenebene zu ermöglichen. Einzelne Arbeiten, die eine Verknüpfung verschiedener Zelltypen berücksichtigen, wurden bereits publiziert [dODQP⁺10b] und erste Versuche, Modelle verschiedener Pflanzenorgane zu koppeln, in der vorliegenden Arbeit unternommen. In Anbetracht des breiten Spektrums möglicher Optimalitätskriterien, die der Pflanzenstoffwechsel auf Zelltyp-, Gewebe-, Organ- und Organismusebene im Lebenszyklus der Pflanze zu erfüllen hat, besteht in diesem Zusammenhang eine zukünftige Herausforderung in einer systematischen Evaluierung möglicher Nebenbedingungen und Zielfunktionen. Ähnliche Untersuchungen wurden bereits für Bakterien durchgeführt [SKS07], stehen jedoch für pflanzenbiologische System noch aus.

Unabdingbar für die Rekonstruktion immer komplexer werdender Modelle ist die Verfügbarkeit feingranularer experimenteller Daten, die das Wachstum und die Biomassezusammensetzung auf Zell-, Organ- und Ganzpflanzenebene wiedergeben. Durch die Integration verschiedener -omics Daten (u.a. Transcriptom-, Proteomdaten) sind von experimenteller Seite zudem Fortschritte bei der Erzeugung bzw. Verfeinerung von gewebespezifischen Modellen zu erwarten. Erste Arbeiten aus diesem Bereich zeigen bereits Erfolge [BP08, SCH⁺08b, JP11]. Weitere Herausforderungen in Bezug auf die Integration experimenteller Daten bestehen unter anderem in Zusammenhang mit der Integration regulatorischer Elemente bzw. der Integration von Regulations- und Signaltransduktionsnetzwerke mit dem Ziel, den Pflanzenstoffwechsel in seiner Gesamtheit besser zu verstehen.

A.1 BESTEHENDE ANSÄTZE DER MODELLREKONSTRUKTION UND -ANALYSE

A.1.1 *Metabolische Datenbanken mit pflanzenbiologischem Inhalt*A.1.1.1 *Datenbanken mit Vertretern aller Domänen*

KEGG Die *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* KEGG [KG00, KGF⁺10] umfasst 16 Datenbanken, die neben chemischen und genomischen Informationen auch Stoffwechsellinformatoren beinhalten. Die in der KEGG PATHWAY Datenbank enthaltenen kuriierten Stoffwechselwege sind als vorgefertigte klickbare Stoffwechselkarten (KEGG-Referenzkarten) abgelegt, die Verlinkungen zu Informationen über Metabolite, Enzyme, Reaktionen und Gene enthalten. Auf Grundlage dieser vorgefertigten Referenzkarten lassen sich artspezifische Stoffwechselwege erzeugen, indem Enzyme (Gene), deren Expression in dem spezifischen Organismus bekannt sind, in der Referenzkarte farblich markiert werden. Die aktuelle Version der Datenbank umfasst über 198.000 artspezifische Stoffwechselwege, generiert aus 427 Referenzkarten. In Bezug auf die Pflanzenforschung, bietet KEGG verschiedene Ressourcen, wie die EGENE Datenbank [MNGJ⁺07, MNGEK07], welche genomische Informationen aus 64 Pflanzenarten enthält und die GENE Datenbank [MNGEK07], welche Genkataloge für alle komplett sequenzierten Genome (12 Pflanzenarten) enthält. Zusätzlich bietet das KEGG Plant Interface verschiedene pflanzenbiosynthetische Stoffwechselkarten des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels.

METACYC Die zu der BioCyc Sammlung [KOMK⁺05] von Pathway/Genom-Datenbanken (PGDB) gehörende metabolische Datenbank MetaCyc [CAD⁺10] beinhaltet experimentell bestimmte Stoffwechselwege aus der wissenschaftlichen Primärliteratur. Neben einer Auflistung der zu einem Stoffwechselweg gehörenden Metabolite, Enzymen, Reaktionen, Genen und Proteinen, bietet MetaCyc zahlreiche Querverweise zu externen biologischen Datenbanken. Darüber hinaus sind Stoffwechselwege und Enzyme mit Literaturreferenzen annotiert. Mit über 1800 Stoffwechselwegen aus über 2300 verschiedenen Arten ist MetaCyc (Version 16.1) eine der größten derzeit verfügbaren Sammlung an Stoffwechselwegen, wobei die Mehrzahl der Stoffwechselwege in Mikroorganismen und Pflanzen vorkommen.

WIKIPATHWAYS WikiPathways [PKVI⁺08] ist eine öffentlich zugängliche Kollaborationsplattform zur Kuration biologischer Reaktionswege. In Abhängigkeit des Kurators sind die in der Datenbank verfügbaren Stoffwechselwege durch einen unterschiedlichen Informationsgehalt gekennzeichnet, der von sehr einfachen bis zu sehr detaillierten Beschreibungen mit Berücksichtigung subzellulärer Kompartimente und Transportprozessen variieren kann. Die aktuelle Version von WikiPathways umfasst 23 pflanzenspezifische Stoffwechselwege aus drei Arten (*A. thaliana*, *Z. mays* und *O. sativa*).

PATHCASE Die metabolische Datenbank PathCASE [EKA⁺08] umfasst neben manuell kuriierten Stoffwechselwegen eine Sammlung von Stoffwechselwegen aus KEGG und BioCyc Human Pathways. Neben Verlinkungen zu verschiedenen biologischen Datenbanken, ist eine funktionelle Annotation der Stoffwechselwege durch Informationen über Metabolite, Cofaktoren, Aktivatoren, Inhibitoren, Enzymen und

kodierende Gene der Genprodukte gegeben. Zur Zeit beinhaltet PathCASE (Version 4.0) 414 Stoffwechselwege mit assoziierten Daten aus 855 Organismen. In Bezug auf den pflanzlichen Stoffwechsel bietet die Datenbank Zugang zu organismenspezifischen Stoffwechselwegen aus KEGG mit assoziierten Daten aus 50 Pflanzenarten. Die aus der Literatur abgeleiteten Stoffwechselwege können in Beziehung zu einer Referenzpflanze gesetzt werden.

A.1.1.2 Pflanzenspezifische Datenbanken mit Vertretern verschiedener Arten

PLANTCYC Die im Rahmen des Plant Metabolic Network (PMN¹) entwickelte PlantCyc [Pla12b] ist eine auf Pflanzen spezialisierte metabolische Datenbank. PlantCyc umfasst kuriierte Informationen über Gene, Enzyme, Metabolite, Reaktionen und Reaktionswege des pflanzlichen Primär- und Sekundärstoffwechsels. Neben intern kurierten Stoffwechselwegen beinhaltet die Datenbank alle Stoffwechselwege aus AraCyc, sämtliche pflanzenspezifische Stoffwechselwege aus MetaCyc und zahlreiche Stoffwechselwege weiterer Pflanzendatenbanken wie RiceCyc und MetaCyc. Darüber hinaus werden hypothetische Stoffwechselwege aus der Literatur sowie automatisch vorhergesagte Stoffwechselwege, die manuell von PMN Kuratoren validiert wurden, zur Verfügung gestellt. PlantCyc (Version 5.0) umfasst momentan 737 Stoffwechselwege aus 366 Pflanzenarten.

ARABIDOPSIS REACTOME Die ursprünglich zur Repräsentation von biologischen Prozessen in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* entwickelte Datenbank Arabidopsis Reactome [TCH⁺08] enthält Stoffwechselwege aus 12 Pflanzenarten. Die Datenbank umfasst sowohl intern kurierte Stoffwechselwege, als auch importierte Stoffwechselwege aus AraCyc und KEGG. Neben Querverweisen zu externen biologischen Datenbanken bietet Arabidopsis Reactome detaillierte Pathway-Informationen inklusive Pathway-Beschreibungen und Angaben bezüglich der subzellulären Lokalisierung. Die aktuelle Version der Datenbank (Version 3.0) umfasst für jede der 12 Pflanzenarten zwischen 990 und 1100 Stoffwechselwege.

A.1.1.3 Pflanzenspezifische Datenbanken einer Pflanzenart

ARACYC Die Pathway/Genom-Datenbank (PGDB) AraCyc [MZR03] enthält Stoffwechselwege der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, die nach der automatischen Erstellung der Datenbank zum großen Teil manuell validiert bzw. im Nachhinein als handkurierte Stoffwechselwege hinzugefügt wurden. Die Stoffwechselwege und Enzyme sind durch Literaturreferenzen, Pathway-Beschreibungen und zum Teil auch räumlichen Informationen wie Organ-/Gewebespezifität annotiert. AraCyc (Version 8.0) umfasst zur Zeit 393 Stoffwechselwege und über 3346 Literaturreferenzen.

METNETDB MetNetDB [YEW⁺05] enthält Informationen über metabolische und genregulatorische Netzwerke der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*. Die Datenbank umfasst sowohl intern kurierte Reaktionswege, als auch importierte Reaktionswege aus MetaCyc und AraCyc. Pathway-assoziierte Informationen wie Informationen über Komponenten (z.B Metabolite, Proteine, DNA, RNA), Interaktionen (z.B Translation, Transkription, Assemblierung) und Metadaten (Konfidenz, Evidenz, Synonyme) sind zum Teil mit externen biologischen Datenbanken quer referenziert oder von Experten annotiert. Die aktuelle Version von MetNetDB (Version 3.0) umfasst 334 Reaktionswege, die zu einer metabolischen und genregulatorischen Karte von *Arabidopsis* zusammengefasst sind.

¹ Das Plant Metabolic Network (PMN) ist ein Gemeinschaftsprojekt zur Entwicklung und Kuration pflanzenspezifischer metabolischer Datenbanken und Enzym-Datenbanken

A.1.2 Programme der optimierungsbasierten Modellanalyse

A.1.2.1 Eigenständige Programme

SBRT Das Systems Biology Research Tool (SBRT) [WWo8] ist eine open-source Software Plattform zur Simulation und Analyse stöchiometrischer Modelle. Neben verschiedenen anderen Methoden der stöchiometrischen Netzwerkanalyse, unterstützt SBRT eine große Anzahl constraintbasierter Analyseverfahren. Die Plugin-basierte Software bietet zudem die Möglichkeit, weitere Methoden zu integrieren, sowie mit externen Softwarepaketen wie METATOOL, MATHEMATICA und R zu interagieren, wodurch ein hohes Maß an Flexibilität gegeben ist. Die Anwendung von SBRT kann sowohl über die Kommandozeile als auch über eine sehr einfach gehaltenen GUI erfolgen. SBRT ist auf lineare Optimierung beschränkt und bietet keine Möglichkeit der visuellen Darstellung von Flussprofilen.

METAFLUXNET MetaFluxNet [LLH⁺03] ist ein Softwarepaket zur quantitativen Berechnung metabolischer Flüsse. Die Software umfasst im Wesentlichen Methoden der MFA, bietet jedoch auch die Möglichkeit der FBA-Berechnung. Stoffwechselmodelle können in MetaFluxNet entweder als SBML-Datei importiert oder in einer Rekonstruktionsumgebung auf nutzer- bzw. referenzbasierte Weise durch Integration von Daten aus unterschiedlichen Online-Datenbanken erstellt werden. Zudem bietet die Software eine grafische Nutzeroberfläche, welche die Visualisierung der berechneten metabolischen Flusskarten sowie eine automatische Pathway-Layout-Erstellung ermöglicht. Die limitierte Funktionalität der akademischen Version der kommerziellen Software schränkt die Anwendbarkeit der Software jedoch stark ein.

PATHWAYANALYZER Das open-source Programm PathwayAnalyzer [Pat] ist eine Linux-basierte Software zur Flussanalyse von Stoffwechselmodellen. Das einfache kommandozeilenbasierte Programm verwendet SBML als Eingabeformat und bietet zwei Methoden der optimierungsbasierten Netzwerkanalyse (FBA, MOMA). Eine visuelle Darstellung der berechneten Flüsse wird von PathwayAnalyzer nicht unterstützt.

FLUXOR Fluxor [Flu] ist ein einfaches kommandozeilenbasiertes Python-Programm zur Berechnung von FBA. Ausgangspunkt der linearen Optimierung ist ein SBML-Modell. Fluxor ist Bestandteil der Bio-SPICE (Biological Simulation Program for Intra- and Inter-Cellular Evaluation) Software [Bio12], einer open-source Plattform der Systembiologie. Fluxor ist auf lineare Optimierung beschränkt und bietet keine Möglichkeit der visuellen Darstellung von Simulationsergebnissen.

A.1.2.2 Add-ons kommerzieller Plattformen

CELLNETANALYZER CellNetAnalyzer (CNA) [KSRGo7] ist eine auf MATLAB basierende Software, welche die Modellierung und Analyse von Stoffwechsel-, Genregulations- und Signaltransduktionsnetzwerken unterstützt. Neben topologischen Analysemethoden bietet CNA eine Vielzahl unterschiedlicher stöchiometrischer Verfahren wie EMA, EPA und MFA. Optimierungsbasierte Analysemethoden beschränken sich auf die Berechnung von FBA. Eine grafische Darstellung der berechneten Flusswerte erfolgt über interaktive Netzwerkkarten: Netzwerkgrafiken mit verlinkten Textboxen, in denen die berechneten Flusswerte angezeigt werden ². CNA bietet Import/Export-Funktionalitäten für verschiedene Flatfile-Formate (inklusive SBML). Zudem können Modelle in einer GUI-basierte Rekonstruktionsumgebung erstellt

² Trotz der Möglichkeit der visuellen Darstellung von Flussprofilen, sind die entsprechenden interaktiven Netzwerkkarten wenig nutzerfreundlich. Die zugrunde liegenden Netzwerkgrafiken müssen extern erstellt und importiert werden und die Textboxen durch Angabe der x-/y-Koordinaten sehr zeitaufwendig auf der Netzwerkkarte positioniert werden.

und editiert werden. Die Anwendung von CNA kann sowohl über eine grafische Nutzeroberfläche als auch über die Kommandozeilen erfolgen. Wesentlicher Nachteil der sehr umfassenden Analysesoftware besteht in der MATLAB-Abhängigkeit.

COBRA TOOLBOX Die COBRA (Constraint-Based Reconstruction and Analysis) Toolbox [BFM⁺07] ist ein auf MATLAB basierendes Softwarepaket für die constraintbasierte Analyse von Stoffwechselmodellen. Neben einem umfangreichen Angebot an constraintbasierten Analysemethoden bietet die Toolbox eine Schnittstelle für freie und kommerzielle LP Solver, sowie Methoden zum Lesen und Manipulieren constraintbasierter Modelle. Durch die Möglichkeit der Integration nutzerspezifischer MATLAB-Routinen, bietet das Softwarepaket ein hohes Maß an Flexibilität, setzt jedoch Programmierfähigkeiten voraus. Die COBRA Toolbox bietet keine programm-interne Methoden zur Visualisierung der Simulationsergebnisse³.

SNA SNA (Stoichiometric Network Analysis) [Urbo6] ist eine MATHEMATICA Toolbox zur stöchiometrischen Analyse metabolischer Netzwerke. Der Schwerpunkt der Software liegt auf der Berechnung von EFMs, SNA bietet jedoch auch die Möglichkeit der FBA-Berechnung auf der Grundlage importierter SBML-Modelle. SNA ist auf eine kommandozeilenbasierte Nutzung beschränkt, erfordert Programmierfähigkeiten und läuft nur unter dem Betriebssystem Linux.

³ Neuere Versionen der Software unterstützen die Visualisierung metabolischer Flussprofile

A.2 OPTIMIERUNGSBASIERTE MODELLANALYSE

Im Folgenden werden die in FBA-SIMVIS implementierten optimierungsbasierten Analysemethoden aufgeführt und getrennt nach der Art der generierten Simulationsdaten näher erläutert.

A.2.1 *Metabolische Flusswerte*

Die Vorhersage stationärer Flüsse erfolgt durch die Anwendung der *Flux Balance Analysis* (FBA), Robustheitsanalyse (RA), *Knockout*-Analyse (KA) und Flussvariabilitätsanalyse (FVA). Tabelle 32 fasst die wesentlichen Schritte der im Verlauf der einzelnen Analysemethoden erfolgenden Schritte der Eingabe (In), Simulation (Sim) und Ausgabe (Out) zusammen.

	FBA	RA	KA	FVA
In Modell, $v_i^{\min}, v_i^{\max}, Z$			
	v_j	v_j	v_j	
Sim	for all $p_k \in P$	$\max c^T v^{\text{opt}}$	$\max c^T v^{\text{opt}}$	$\max c^T v^{\text{opt}}$
	$\max c^T v_k$	$N_{1,2}$	$N_{1,2}$	$N_{1,2}$
	N_{1-3}			
	end for	for all $p_k \in P$	$\max c^T v_{\text{del}}$	$\max v_i$
		$\max c^T v_k$	$N_{1,2}$	$N_{1,2}, z = z^{\text{opt}}$
		N_{1-3}		
		end for		$\min v_i$
				$N_{1,2}, z = z^{\text{opt}}$
N1 $S \cdot v = 0$			
N2 $v_i^{\min} \leq v_i \leq v_i^{\max}$ mit $i = 1, \dots, n$			
N3 $v_j^{\min} = v_j^{\max} = p_k$ $v_j^{\min} = v_j^{\max} = 0$			
Out	$v_k; k = 1, \dots, l$	$v_k; k = 1, \dots, l$	v_{del}	v^{\min}, v^{\max}

Tabelle 32: Mathematische Beschreibung der im Rahmen der optimierungsbasierten Modellanalyse erfolgenden Eingabe (In), Simulation (Sim) und Ausgabe (Out). FBA und RA bieten die Möglichkeit der Parameteravariation durch Vorgabe von Parametersätzen $P = \{p_1, \dots, p_l\}$, $p_k \in \mathbb{R}$ für $k = 1, \dots, l$, wobei für für FBA gilt: $p_1 = v_j^{\min}$; $p_l = v_j^{\max}$. Für RA gilt: $p_1 = 0$; $p_l = v_j^{\text{opt}}$. *Abkürzungen:* N_1 - N_3 : Nebenbedingungen 1 bis 3; v_{del} : Flussvektor der *Knockout*-Analyse; v_j : Reaktionsrate der zu variierenden Reaktion; v_j^{\min} bzw. v_j^{\max} : minimale bzw. maximale Flusskapazität der zu variierende Reaktion; v_k : Flussvektor für einen gegebenen Parametersatz p_k ; Z : Zielfunktion. Alle weiteren Abkürzungen entsprechen den in Abschnitt 2.3.3.2 aufgeführten mathematischen Begriffen

A.2.2 *Sensitivität und Sensitivitätskurven*

Eine detaillierte Beschreibung der im Rahmen der RA und KA erfolgenden Erzeugung von Sensitivitätswerten und -kurven ist in Abschnitt 2.3.3.2 gegeben.

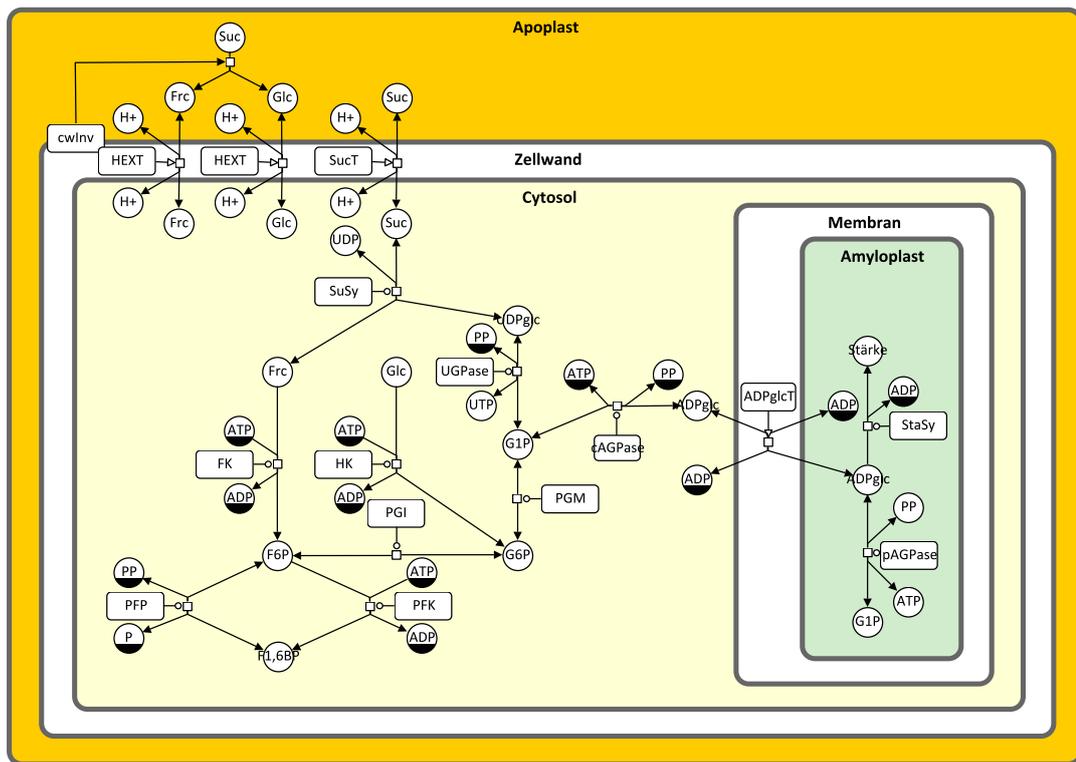


Abbildung 28: Grafische Darstellung des Zucker- und Stärkestoffwechsels in dem sich entwickelnden Endosperm von Gerste. Die biochemischen Prozesse sind in SBN-Notation in Form eines Prozess-Diagramms dargestellt. *Abkürzungen - Metabolite:* ADPglc: ADP-Glucose; F1,6P: Fructose-1,6-Bisphosphat; F6P: Fructose-6-Phosphat; Frc: Fructose; G1P: Glucose-1-Phosphat; G6P: Glucose-6-Phosphat; Glc: Glucose; P: Phosphat; PP: anorganisches Pyrophosphat; Suc: Saccharose; UDPglc: UDP-Glucose; *Abkürzungen - Enzyme/Transporter:* AGPase: ADP-Glucose-Pyrophosphorylase; cwInv: Zellwandinvertase; FK: Fructokinase; HK: Hexokinase; HEXT: Hexose-4-transporter; PFK: Phosphofruktokinase; PFP: Fructose-6-phosphat-1-Phosphotransferase; PGI: Phosphoglucose-Isomerase; PGM: Phosphoglucomutase; SucT: H^+ / Suc-Cotransporter; SuSy: Saccharosesynthase; UGPase: UDP-Glucose-Phosphorylase

A.3 GERSTENSAMEN-MODELL

A.3.1 Stoffwechselwege des endospermalen Primärstoffwechsels

Im Folgenden werden die zentralen Stoffwechselwege des endospermalen Primärstoffwechsels grafisch dargestellt und wesentliche biochemische Prozesse beschrieben. Die in Form von SBN-Graphen (PD-Notation) dargestellten Reaktionswege wurden zum Teil aus METACROP exportiert und modifiziert.

A.3.1.1 Zucker- und Stärkestoffwechsel

In der Hauptspeicherphase der Endospermentwicklung von Gerste basiert die Akkumulation von Speicherstoffen im Wesentlichen auf dem Import von Saccharose (Suc). Der aktive Transport von Suc in das Endosperm erfolgt mittels eines H^+ / Suc-Cotransporters. Im Unterschied zu der Invertase-katalysierten Suc-Spaltung der Vorspeicherphase, erfolgt die Spaltung von Suc während der Hauptspeicherphase im Wesentlichen durch die Saccharosesynthase. Die Produkte der Suc-Spaltung werden entweder in der Glykolyse metabolisiert und/oder für die Stärkesynthese in den Amyloplasten transportiert. Die Verbindung zwischen Glykolyse und Hexosephosphatpool erfolgt durch die cytosolische Pyrophosphat-Fruktose-6-phosphat-1-Phosphotransferase und/oder die cytosolisch/plas-

tidäre Phosphofruktokinase. Kennzeichnend für die Stärkesynthese in Getreidesamen ist die Existenz einer cytosolischen Isoform der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase, zusätzlich zu der in den Stärke-synthetisierenden Geweben aller Pflanzen vorkommenden plastidären Isoform. Diese stellt in dem getreidespezifischen Reaktionsweg der Stärkesynthese den Hauptlieferant von ADP-Glucose, dem Ausgangsstoff der Stärkesynthese, dar. Der Import von ADP-Glucose in den Amyloplasten, dem Ort der Stärkesynthese, erfolgt mittels eines ADPglc-Transporters. Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist in Abbildung 28 gegeben.

A.3.1.2 Aminosäurestoffwechsel

Die samenspezifische Aminosäurebiosynthese, eine Hauptdeterminante der Akkumulation von Speicherproteinen, basiert im Wesentlichen auf dem Import von Asparagin und Glutamin, welche die Stickstoffkomponente für die *de novo* Aminosäurebiosynthese liefern. Während die meisten Reaktionswege des Aminosäurestoffwechsels auf die Plastiden beschränkt sind (u.a. Histidin, Valin, Leucin, Isoleucin), werden eine Reihe von Aminosäuren (u.a. Arginin, Methionin, Glycin, Aspartat) in verschiedenen und/oder mehr als einem Zellkompartiment synthetisiert. Beispielsweise erfolgt die Synthese von Aspartat aus Oxalacetat in verschiedenen Kompartimenten (Cytosol, Mitochondrium, Plastid) durch die unterschiedlichen Isoformen der Aspartat-Transaminase. Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist in Abbildung 29 gegeben.

A.3.1.3 Energiestoffwechsel

Die Akkumulation von Speicherstoffen ist durch eine hohe transkriptionelle Aktivität von Genen des Energiestoffwechsels (Glykolyse, Gärung, Citratzyklus) gekennzeichnet. Zusätzlich zu der Produktion von Energie- und Reduktionsäquivalenten, liefern diese Reaktionswege Ausgangsstoffe für den Glucose- und Aminosäurestoffwechsel. Kennzeichnend für die Glykolyse ist die subzelluläre Lokalisierung der glykolytischen Enzyme im Cytosol und Plastid, sowie das Vorhandensein PP_i -abhängiger Bypass-Reaktionen (PFP, PPDK). Verschiedene anaplerotische Enzyme (u.a. Phosphoenolpyruvatcarboxylase, Malatdehydrogenase) sorgen durch die Bereitstellung von Citratzyklus-Intermediaten dafür, dass der Abzug von Ausgangsstoffen für die Speicherstoffbiosynthese kompensiert und der Citratzyklus ausbalanciert wird. Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist in Abbildung 30 gegeben.

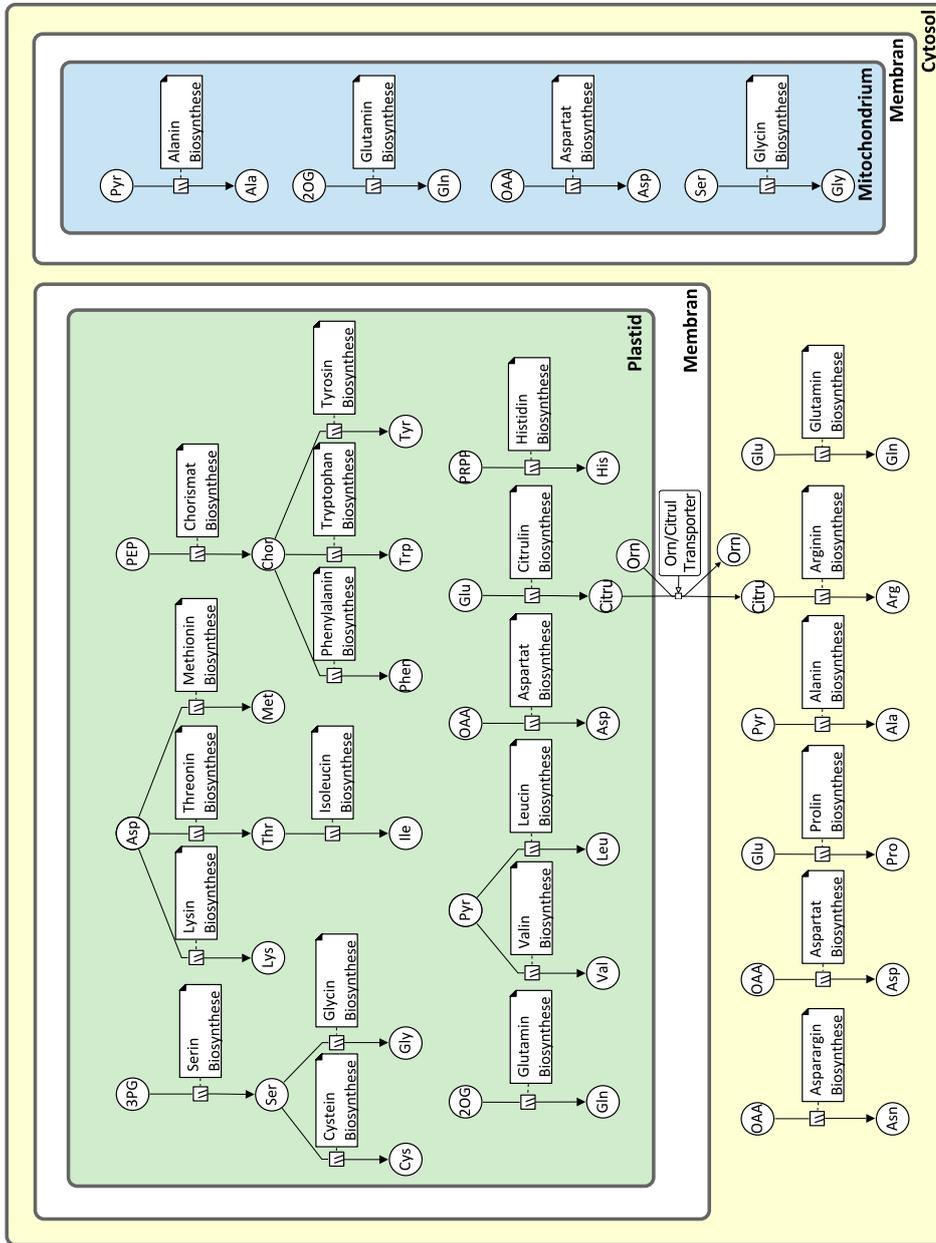


Abbildung 29: Grafische Darstellung des Aminosäurestoffwechsels in dem sich entwickelnden Endosperm von Gerste. Die biochemischen Prozesse sind in SBGN-Notation in Form eines Prozess-Diagramms dargestellt. *Abkürzungen - Metabolite:* 2OG: 2-Oxoglutarat; 3PG: 3-Phosphoglycerat; Ala: Alanin; Arg: Arginin; Asn: Asparagin; Asp: Aspartat; Citrul: Citrullin; Cys: Cystein; Gln: Glutamin; Glu: Glutamat; Gly: Glycin; His: Histidin; Ile: Isoleucin; Leu: Leucin; Lys: Lysin; Met: Methionin; OAA: Oxalacetat; Orn: Ornithin; PEP: Phosphoenolpyruvat; Phe: Phenylalanin; Pro: Prolin; PRPP: Phosphoribosylpyrophosphat; Pyr: Pyruvat; Ser: Serin; Thr: Threonin; Trp: Tryptophan; Tyr: Tyrosin; Val: Valin

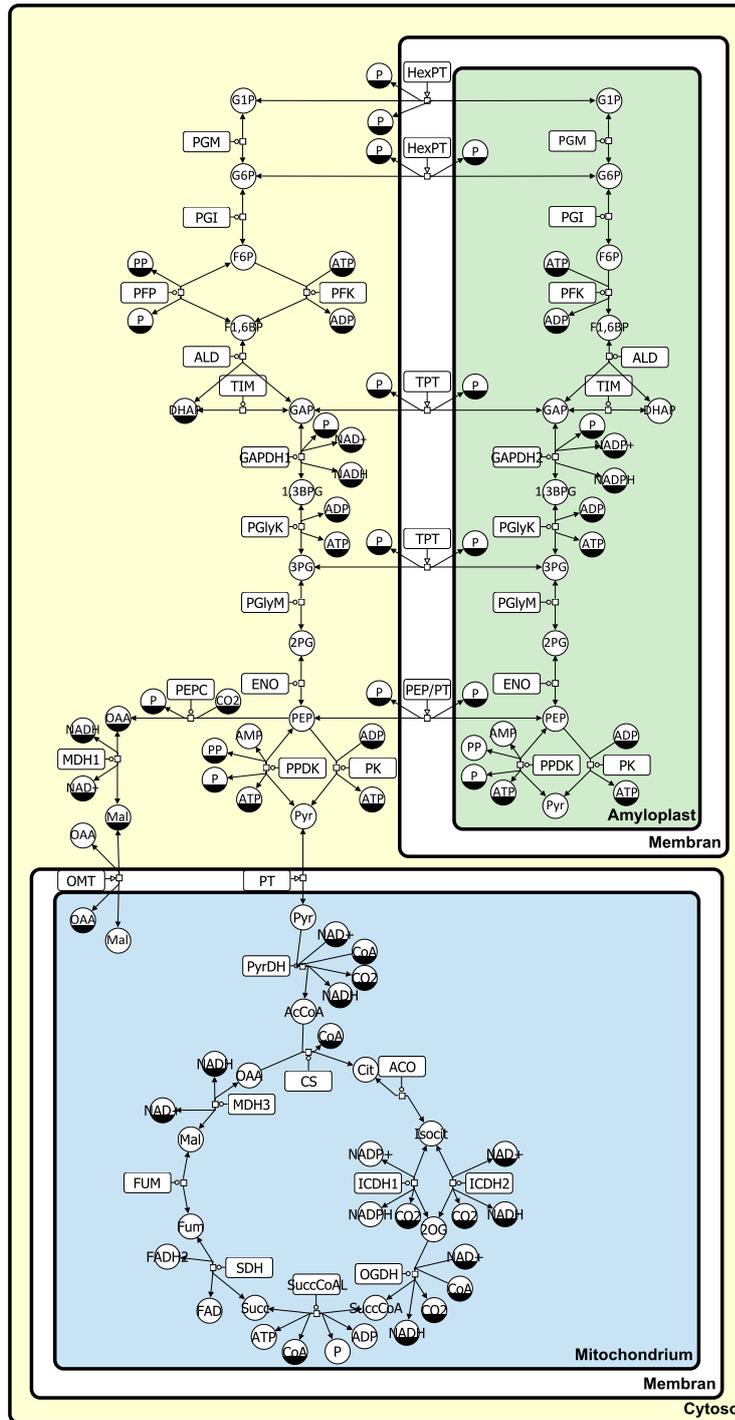


Abbildung 30: Grafische Darstellung der Glykolyse und des Citratzyklus in dem sich entwickelnden Endosperm von Gerste. Die biochemischen Prozesse sind in SBN-Notation in Form eines Prozess-Diagramms dargestellt. *Abkürzungen - Metabolite:* 1,3BPG: 1,3-Bisphosphoglycerat; 2OG: 2-Oxoglutarat; 2PG: 2-Phosphoglycerat; 3PG: 3-Phosphoglycerat; AcCoA: Acetyl-CoA; Cit: Citrat; F1,6BP: Fruktose-1,6-Bisphosphat; F6P: Fruktose-6-Phosphat; Frc: Fruktose; Fum: Fumarat; G1P: Glucose-1-Phosphat; G6P: Glucose-6-Phosphat; GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; Isocit: Isocitrat; Mal: Malat; OAA: Oxalacetat; P: Phosphat; PEP: Phosphoenolpyruvat; PP: anorganisches Pyrophosphat; Pyr: Pyruvat; Succ: Succinat; SuccCoA: Succinyl-CoA; *Abkürzungen - Enzyme/Transporter:* ACO: Aconitase; ALD:Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase; CS: Citratsynthase; ENO: Enolase; FUM: Fumarase; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; HexPT: Hexosephosphat-transporter; ICDH: Isocitratdehydrogenase; MDH: Malatdehydrogenase; OGDH: α -Ketoglutarat-Dehydrogenase; OMT: OAA/Mal-Transporter; PEPC: Phosphoenolpyruvat-Carboxylase; PFK: Phosphofruktokinase; PFP: Fruktose-6-phosphat-1-Phosphotransferase; PGI: Phosphoglucose-Isomerase; PGlyK: Phosphoglyceratkinase; PGlyM: Phosphoglyceratmutase; PGM: Phosphoglucomutase; PK: Pyruvatkinase; PPK: Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase; PT: Pyruvattransporter; PyrDH: Pyruvatdehydrogenase; SDH: Succinatdehydrogenase; SuccCoAL: Succinyl-CoA-Ligase; TIM: Triosephosphatisomerase

A.3.2 Modellrekonstruktion

A.3.2.1 Grafische Darstellung des Gerstensamen-Modells

Eine grafische Darstellung des gesamten Gerstensamen-Modells ist Abbildung 31 gegeben. Die bipartite Darstellung der biochemischen Prozesse entspricht der in Abschnitt 3.3.3 erläuterten Darstellungsform eines ModellGraphen, der durch FBA-SimVis unterstützt wird.

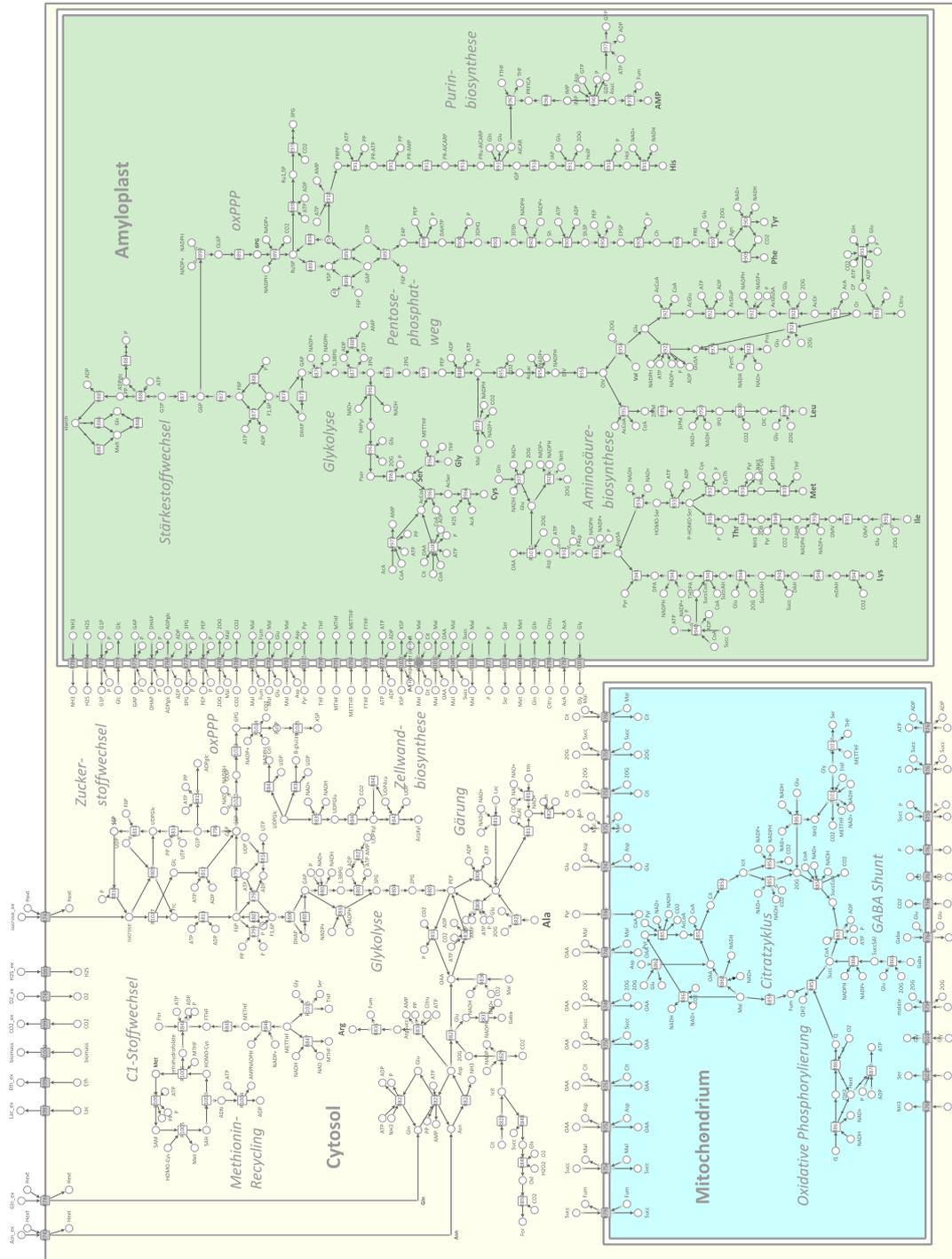


Abbildung 31: Grafische Darstellung des Gerstensamen-Modells. Eine elektronische Version der Abbildung inklusive einer detaillierten Auflistung der in dem Modell enthaltenen Reaktionen und Reaktionsteilnehmern ist auf der beiliegenden CD enthalten

A.3.2.2 Herleitung und Definition der Biomassereaktion

Biomassezusammensetzung des Gerstensamen

Der Bedarf an biosynthetischen Ausgangsstoffen, die für die Synthese von einem Gramm Biomasse Gerstensamen notwendig ist, wurde auf Grundlage der in [OEC04] aufgeführte Biomassezusammensetzung von Gerstensamen berechnet.

Biomassekomponente	% an TG
Kohlenhydrate	80.8
Stärke	64.0
Saccharose	1.5
Arabinoxylane	6.7
Cellulose	4.0
β -Glukane	4.6
Lipide	2.5
Proteine	11.0
Nukleinsäuren	0.3
Mineralien	2.0
Sonstige	3.4

Tabelle 33: Chemische Zusammensetzung des Gerstensamen nach [OEC04]

Zelluläre Komponenten, die nur einen geringen Anteil der Biomasse (< 1% des Gesamt-trockengewichts) ausmachen, wurden nicht in der Zielfunktion Z_1 berücksichtigt. Des Weiteren wurden Lipide auf Grund ihrer zu vernachlässigenden Bedeutung im Endosperm nicht einbezogen [OEC04]. Somit wurden nur Kohlenhydrate (80.8%) und Proteine (11%), die insgesamt 91.8% des Trockengewichts ausmachen, in der Zielfunktion berücksichtigt. Durch Extrapolation dieser Komponenten auf 100%, wurde für die weiteren Berechnungen von einem Kohlenhydratanteil von 88% und einem Proteinanteil von 12 % ausgegangen.

Die Proteinzusammensetzung wurde auf Grundlage der in Bewley *et al.* [BB94b] aufgeführten Aminosäurezusammensetzung von Gerstensamen bestimmt.

Aminosäuren	% an Samenproteinen
L-Alanin	4.1
L-Arginin	4.9
L-Aspartat	6.3
L-Cystein	1.4
L-Glutamat	26.8
L-Glycin	3.9
L-Histidin	2.1
L-Isoleucin	3.7
L-Leucin	7.0
L-Lysin	3.7
L-Methionin	1.5
L-Phenylalanin	5.9
L-Prolin	12.6
L-Serin	4.6
L-Threonin	3.7
L-Tyrosin	2.8
L-Valin	5.0

Tabelle 34: Aminosäurezusammensetzung des Gerstensamen nach [BB94b]

Berechnung der stöchiometrischen Koeffizienten der Zielfunktion

	% an TG	% an TG ¹	g/g Zelle	MW [g/mol]	mmol/g TG
Stärke	64	69.703	0.697	180.156	3.869
Saccharose	1.5	1.634	0.016	342.296	0.048
Arabinoxylane	6.7	7.297	0.073	150.130	0.486
β-Glukane	4.6	5.010	0.050	180.156	0.278
Cellulose	4	4.356	0.044	180.156	0.242
	80.8	88			

Tabelle 35: Berechnung der stöchiometrischen Koeffizienten der Kohlenhydratkomponenten der Zielfunktion. Grundlage der Berechnung ist die Annahme eines durchschnittlichen Kohlenhydratanteils von 88% (siehe oben). *Abkürzungen:* ¹: in Bezug auf 88%

	% an TG	% an TG ¹	g/g Zelle	MW [g/mol]	mmol/g TG
L-Alanin	4.1	0.492	0.005	89.090	0.055
L-Arginin	4.9	0.588	0.006	174.200	0.034
L-Aspartat	6.3	0.756	0.008	133.100	0.057
L-Cystein	1.4	0.168	0.002	232.250	0.007
L-Glutamat	26.8	3.216	0.032	147.130	0.219
L-Glycin	3.9	0.468	0.005	75.070	0.062
L-Histidin	2.1	0.252	0.003	155.160	0.016
L-Isoleucin	3.7	0.444	0.004	131.170	0.034
L-Leucin	7.0	0.840	0.008	131.170	0.064
L-Lysin	3.7	0.444	0.004	146.180	0.030
L-Methionin	1.5	0.180	0.002	149.210	0.012
L-Phenylalanin	5.9	0.708	0.007	165.190	0.043
L-Prolin	12.6	1.512	0.015	115.130	0.131
L-Serin	4.6	0.552	0.006	105.090	0.053
L-Threonin	3.7	0.444	0.004	119.120	0.037
L-Tyrosin	2.8	0.336	0.003	181.190	0.019
L-Valin	5.0	0.600	0.006	117.150	0.051

Tabelle 36: Berechnung der stöchiometrischen Koeffizienten der Proteinkomponenten der Zielfunktion. Grundlage der Berechnung ist die Annahme eines durchschnittlichen Proteinanteils von 12% (siehe oben). *Abkürzungen:* ¹: in Bezug auf 12%

Substrate		Produkte	
Komponente	[mmol/g TG]	Komponente	[mmol/g TG]
L-Alanin	0.0552	ADP	5.36
L-Arginin	0.0338	P	5.36
L-Aspartat	0.0568	Biomasse	1
L-Cystein	0.0072		
L-Glutamat	0.2186		
L-Glycin	0.0623		
L-Histidin	0.0162		
L-Isoleucin	0.0338		
L-Leucin	0.0640		
L-Lysin	0.0304		
L-Methionin	0.0121		
L-Phenylalanin	0.0429		
L-Prolin	0.1313		
L-Serin	0.0525		
L-Threonin	0.0373		
L-Tyrosin	0.0185		
L-Valin	0.0512		
Stärke	3.8690		
Saccharose	0.0477		
Arabinoxylane	0.4860		
β -Glukane	0.2781		
Cellulose	0.2418		
ATP ¹	5.3600		

Tabelle 37: Biosynthetische Ausgangsstoffe und Cofaktoren, die für die Synthese von einem Gramm Biomasse Gerstensamen benötigt werden, inklusive der dazugehörigen stöchiometrischen Koeffizienten der Biomassegleichung. *Abkürzungen:* ¹: Die Berechnung der wachstumsassoziierten Erhaltungsenergie von 5.36 mmol ATP pro g TG basiert auf der im nachfolgenden Abschnitt aufgeführten Berechnungsgrundlage von [Amtoo]

Berechnung der wachstumsassoziierten Erhaltungsenergie

Nach Penning de Vries [dV75] kann Wachstum in fünf Teilprozesse unterteilt werden, die Kohlenstoffe und/oder Energie verbrauchen:

1. Chemische Reduktion von NO_3^- und SO_4^{2-} , die aus dem Boden aufgenommen werden;
2. Aktive Aufnahme von Mineralien und organischen Substraten in die wachsende Zelle;
3. Biosynthese von Monomeren;
4. Polymerisierung
5. Tool Maintenance (Turnover von RNA und Enzymen);

wobei die Teilprozesse (2) bis (5) für wachsende Organe, wie sich entwickelnde Samen, von Bedeutung sind.

Mit dem Ziel, die wachstumsassoziierte Erhaltungsenergie zu bestimmen, wurden die Energiekosten für jeden dieser Teilprozesse wie folgt berechnet:

Teilprozess	Kommentar	Energiekosten [mmol ATP g ⁻¹ TG]
2	Die Aufnahme von Stickstoff und Kohlenstoff sind bereits als energieabhängige Transportprozesse in dem Modell enthalten	0
3 ^α	Die Monomersynthesen der Kohlenhydrate und Proteine (d.h. Aminosäuren) sind bereits als energieabhängige Prozesse in dem Modell enthalten	0
4 & 5 ^α	Die Polymerisierung der Kohlenhydrate (Biosynthese von Stärke, Arabinoxylanen, β-Glukane und Cellulose) ist bereits als energieabhängiger Prozess in dem Modell enthalten. Die spezifischen Kosten des Protein Turnover (d.h. Polymerisierung und Tool Maintenance) umfassen durchschnittlich 6.3 ATP pro Aminosäure [Amtoo] bzw. 0.277 g Glucose g ⁻¹ Protein und damit 5.36 mmol ATP g ⁻¹ TW ^β	5.36
		5.36

Tabelle 38: Berechnung der wachstumsabhängigen Erhaltungsenergie. *Abkürzungen:* ^α: Wie in Abschnitt A.3.2.2 näher erläutert, sind die Kohlenhydrate und Proteine die einzigen Biomassekomponenten, die in Bezug auf die Teilprozesse 3 bis 5 berücksichtigte werden müssen. ^β: Wie in Abschnitt A.3.2.2 näher erläutert, macht der Proteinanteil 12% der Gesamtbioasse des Gerstensamen aus

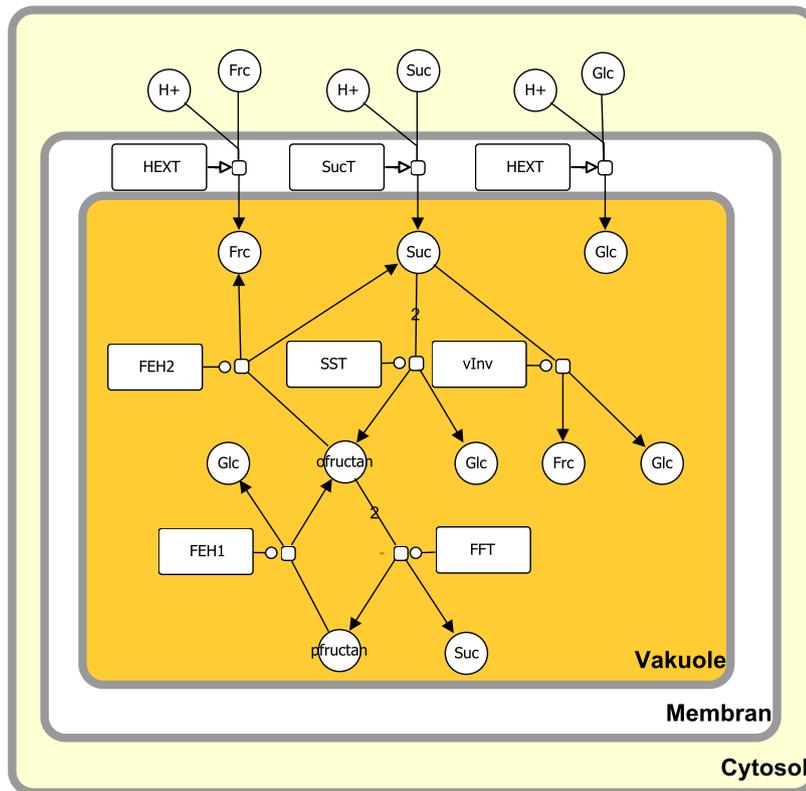


Abbildung 32: Grafische Darstellung des Fruktanstoffwechsels in dem Speicherparenchym des Gerstenhalms. *Abkürzungen - Metabolite:* Frc: Fruktose; Glc: Glucose; ofruktan: Oligofruktane; pfruktan: Polyfruktane; Suc: Saccharose; *Abkürzungen - Enzyme/Transporter:* FEH: Fruktan- β -Fruktosidase; FFT: 2,1-Fruktan:2,1-Fruktan-1-Fruktosyltransferase; HEXT: Hexosetransporter; SucT: Saccharosetransporter; SST: Saccharose:Saccharose-Fruktosyltransferase; vInv: vakuoläre Invertase

A.4 GERSTENHALM-MODELL

A.4.1 Stoffwechselwege des Primärstoffwechsel des Gerstenhalms

Im Folgenden werden die zentralen Stoffwechselwege des Primärstoffwechsels des Gerstenhalms grafisch dargestellt und wesentliche biochemische Prozesse beschrieben. Die in Form von SBGN-Graphen (PD-Notation) dargestellten Reaktionswege wurden zum Teil aus METACROP exportiert und modifiziert.

Fruktanstoffwechsel

Fruktane, lösliche Polyfructosen, sind von zentraler Bedeutung als Kohlenstoffspeicher in Getreidehalmen, wo sie bis zu 40% des Trockengewichts ausmachen können. Ausgehend von Suc werden Fruktane in einer mehrstufigen Reaktionskette in der Vakuole synthetisiert und gespeichert. Die Remobilisierung der Fruktanreserven erfolgt während der späten Samenreife als Antwort auf eine unzureichende Versorgung der Samen mit Photosynthaten. Unter normalen Wachstumsbedingungen können Fruktane bis zu 20% des Kornertrags ausmachen und stellen damit eine wichtige Kohlenstoffquelle für Weizen- und Gerstensamen dar. Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist in [Abbildung 32](#) gegeben.

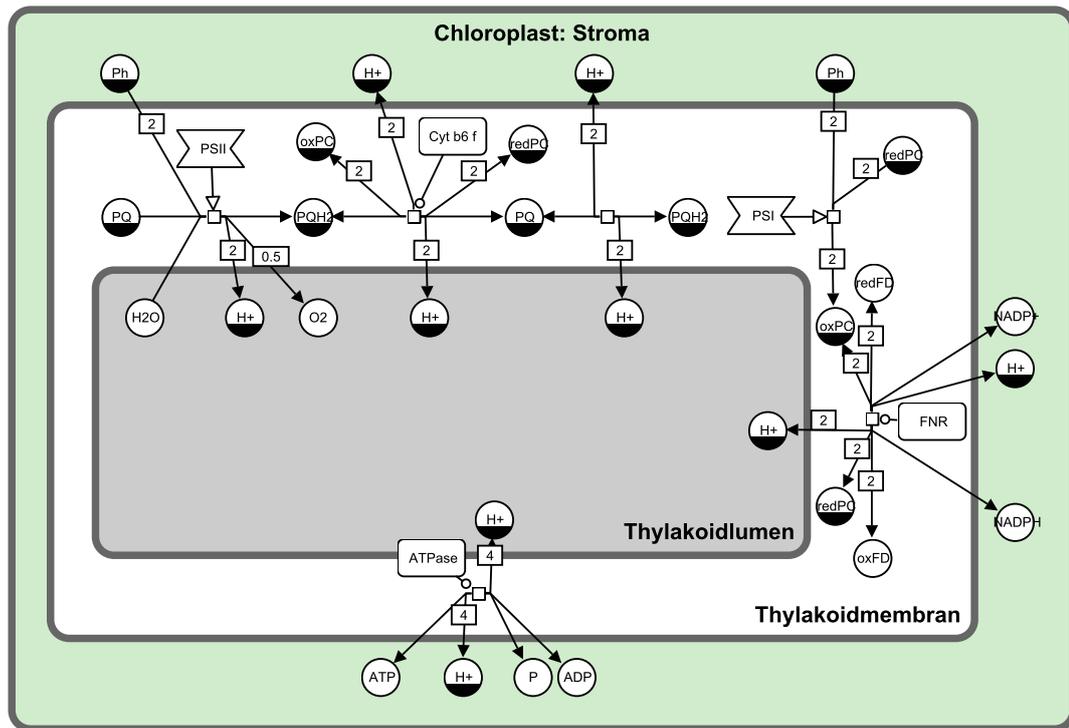


Abbildung 33: Grafische Darstellung der Lichtreaktion. Die biochemischen Prozesse sind in SBN-Notation in Form eines Prozess-Diagramms dargestellt. *Abkürzungen - Metabolite:* oxFD: oxidiertes Ferredoxin; oxPC: oxidiertes Plastocyanin; Ph: Photonen; PQ: Plastoquinon; PQH₂: Plastoquinol; redFD: reduziertes Ferredoxin; redPC: reduziertes Plastocyanin; *Abkürzungen - Enzyme:* ATPase: ATPase; Cyt b6 f: Cytochrom-b6f-Komplex; FNR: Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase; PSI: Photosystem I; PSII: Photosystem II

Photosynthese

Die oxygene Photosynthese verläuft in zwei räumlich und funktionell getrennten Teilreaktionen: (i) der Lichtreaktion, die in den Thylakoiden der Chloroplasten abläuft, und (ii) der Dunkelreaktion, die im Stroma der Chloroplasten abläuft. Unter Ausnutzung der Sonnenenergie werden im Verlauf der Lichtreaktion Elektronen von Wasser auf NADP⁺ übertragen, wobei Sauerstoff freigesetzt wird. Durch Kopplung dieses Elektronentransports mit einem Protonentransport über die Membran wird ein Protonengradient erzeugt, der zur Speicherung von Energie in Form von ATP genutzt wird. Die entstandenen Reduktions- (NADPH) und Energieäquivalente (ATP) dienen im Verlauf der Dunkelreaktion (Calvin-Zyklus) der lichtunabhängigen Fixierung von Kohlenstoffdioxid durch die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (RubisCO, EC 4.1.1.39). Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist in [Abbildung 33](#) und [34](#) gegeben.

Photorespiration

Als Folge der Oxygenierungsaktivität der RubisCO entsteht neben 3-Phosphoglycerat das Nebenprodukt 2-Phosphoglycolat, das in der 9-stufigen Reaktionskette der Photorespiration unter Beteiligung des Cytosols im Mitochondrium, Peroxisom und Chloroplast zu 3-Phosphoglycerat recycelt wird, wobei große Mengen an Energie verbraucht werden. Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist in [Abbildung 35](#) gegeben.

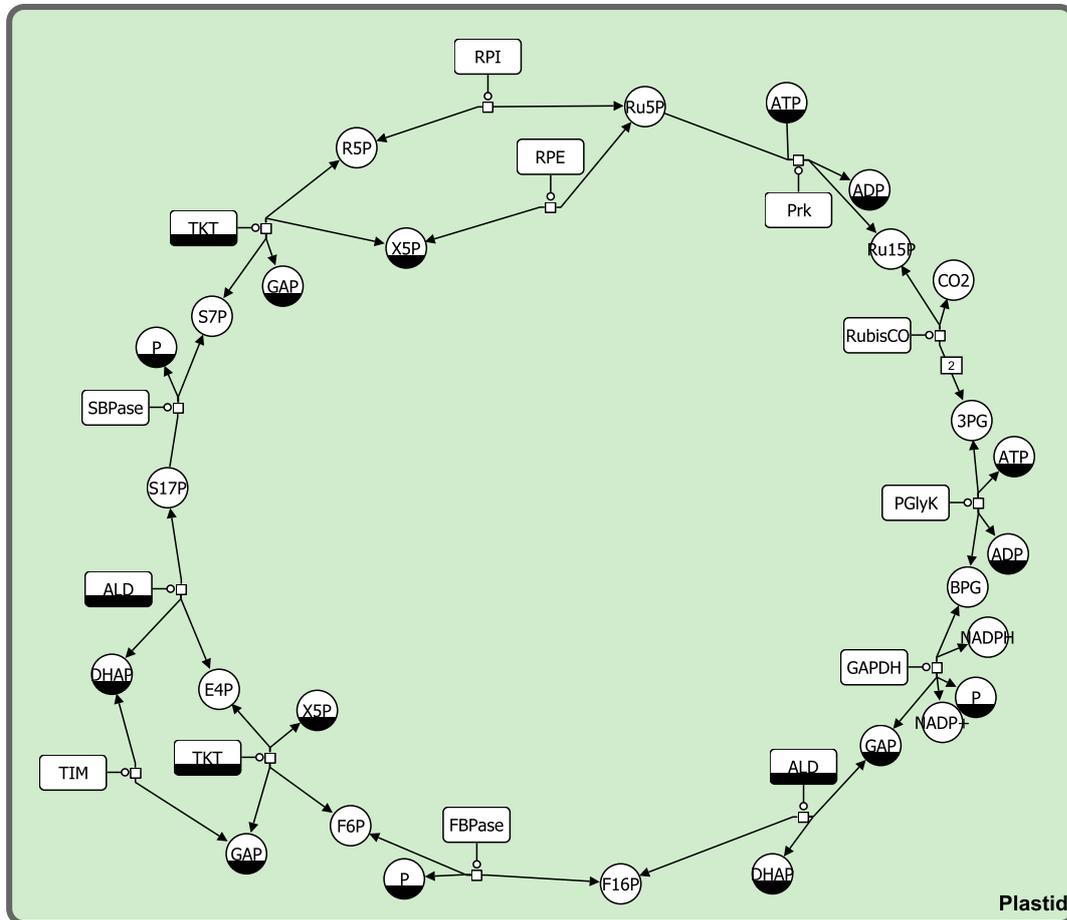


Abbildung 34: Grafische Darstellung der Dunkelreaktion (Calvinzyklus). Die biochemischen Prozesse sind in SBGN-Notation in Form eines Prozess-Diagramms dargestellt. *Abkürzungen - Metabolite:* R5P: Ribose-5-Phosphat; 3PG: 3-Phosphoglycerat; BPG: 1,3-Bisphosphoglycerat; DHAP: Dihydroxyacetonphosphat; E4P: Erythrose-4-Phosphat; F16P: Fructose-1,6-Bisphosphat; F6P: Fructose-6-Phosphat; GAP: Glyceraldehyd-3-Phosphat; Ru15P: Ribulose-1,5-Bisphosphat; Ru5P: Ribulose-5-Phosphat; S17P: Sedoheptulose-1,7-Bisphosphat; S7P: Sedoheptulose-7-Phosphat; X5P: Xylulose-5-Phosphat; *Abkürzungen - Enzyme:* ALD: Fructose-Bisphosphataldolase; FBPase: Fructose-1,6-Bisphosphatase; GAPDH: Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase; PGlyK: Phosphoglyceratkinase; Prk: Phosphoribulokinase; RPE: Ribulose-Phosphat-3-Epimerase; RPI: Ribose-5-Phosphat-Isomerase; RubisCO: Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase; SBPase: Sedoheptulose-Bisphosphatase; TAL: Transaldolase; TIM: Triosephosphatisomerase; TKT: Transketolase

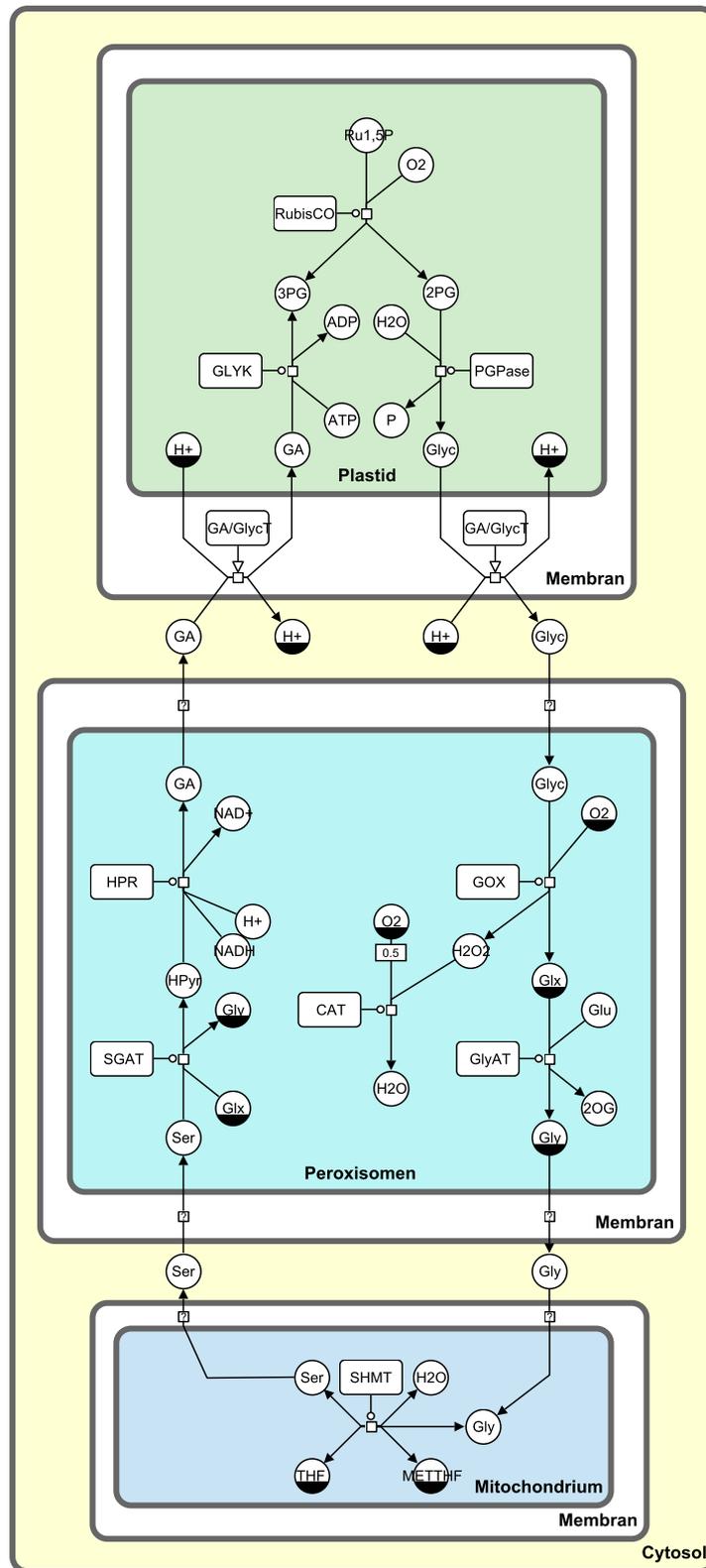


Abbildung 35: Grafische Darstellung der Photorespiration. Die biochemischen Prozesse sind in SBN-Notation in Form eines Prozess-Diagramms dargestellt. *Abkürzungen - Metabolite:* 2OG: 2-Oxoglutarat; 2PG: 2-Phosphoglycolat; 3PG: 3-Phosphoglycerat; GA: Glycerat; Glu: Glutamat; Glx: Glyoxylat; Gly: Glycin; Glycolat: Glyc; HPyr: Hydroxypyruvat; METTHF: 5,10-Methylen tetrahydrofolat; Ru1,5P: Ribulose-1,5-Bisphosphat; Ser: Serin; THF: Tetrahydrofolat; *Abkürzungen - Enzyme/Transporter:* CAT: Catalase; GA/GlycT: Glycolat/Glycerat-Transporter; GlyAT: Glutamat-Glyoxylataminotransferase; GLYK: Glyceratkinase; GOX: Glycolatoxidase; HPR: Hydroxypyruvatreduktase; PGPase: Glycolatphosphatphosphatase; RubisCO: Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase; SGAT: Serin-Glyoxylataminotransferase; SHMT: Glycinhydroxymethyltransferase

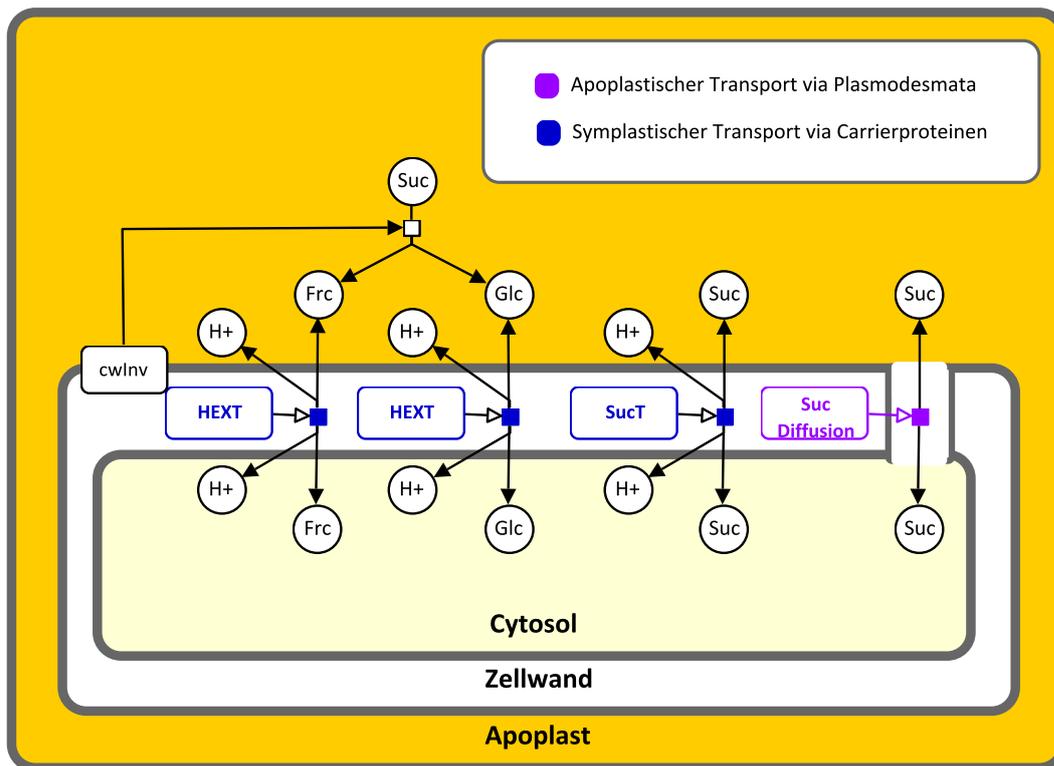


Abbildung 36: Grafische Darstellung der Transportprozesse. Die biochemischen Prozesse sind in SBGN-Notation in Form eines Prozess-Diagramms dargestellt. *Abkürzungen - Metabolite:* Frc: Fruktose; Glc: Glukose; Suc: Saccharose; *Abkürzungen - Enzyme/Transporter:* cwInv: Zellwandinvertase; HEXT: Hexosetransporter; SucT: Saccharosetransporter; Suc Diffusion: Diffusion der Saccharose via Plasmodesmata

Transportprozesse

In der Literatur werden drei verschiedene Wege der Suc-Aufnahme in Speicherparenchymzellen aufgeführt: (1) der apoplastische Transport via Plasmodesmata, sowie der symplastische Transport via (2) Suc-Transporter und (3) Zellwandinvertase. Eine grafische Darstellung der beschriebenen biochemischen Vorgänge ist in [Abbildung 36](#) gegeben.

A.4.2 Modellrekonstruktion

A.4.2.1 Grafische Darstellung des Gerstenhalm-Modells

Eine grafische Darstellung des gesamten Gerstenhalm-Modells ist [Abbildung 37](#) gegeben. Die bipartite Darstellung der biochemischen Prozesse entspricht der in [Abschnitt 3.3.3](#) erläuterten Darstellungsform eines ModellGraphen, der durch FBA-SIMVIS unterstützt wird.

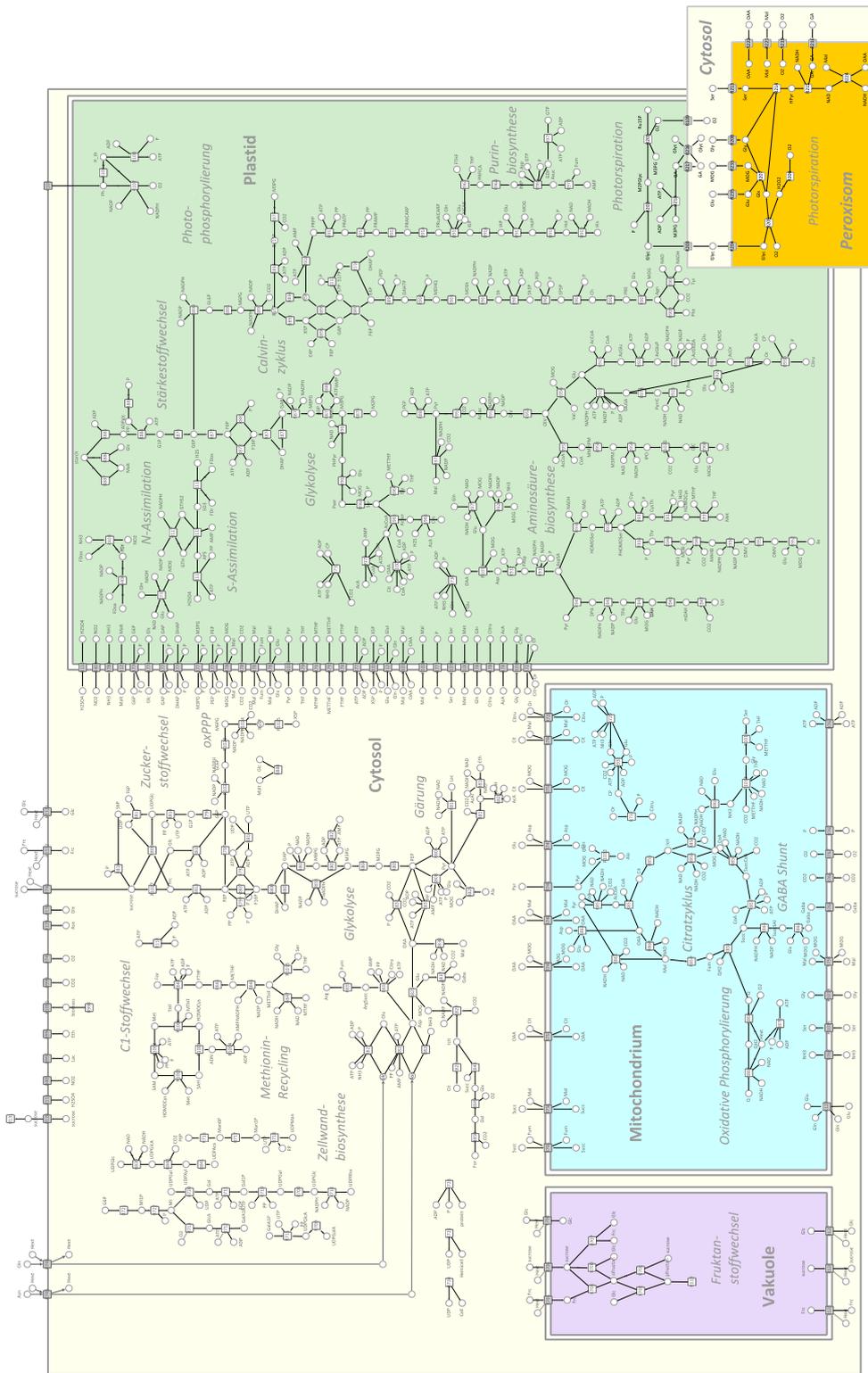


Abbildung 37: Grafische Darstellung des Gerstenhalm-Modells. Eine elektronische Version der Abbildung inklusive einer detaillierten Auflistung der in dem Modell enthaltenen Reaktionen und Reaktionsteilnehmern ist auf der beiliegenden CD enthalten

A.4.2.2 Herleitung und Definition der Biomassereaktion

Biomassezusammensetzung des Gerstenhalms

Der Bedarf an biosynthetischen Ausgangsstoffen, die für die Synthese von einem Gramm Biomasse Gerstenhalm notwendig ist, wurde auf Grundlage der in Tabelle aufgeführten Biomassezusammensetzung von Gerstenhalmen berechnet.

Biomassekomponente	% an TG	Referenz
Saccharose	6,1	[BI93b, BI93a]
Glucose	7,7	[BI93b, BI93a]
Fruktose	7,1	[BI93b, BI93a]
Fruktane	16,8	[BI93b, BI93a]
Cellulose	38,9	[AS91]
Hemicellulose	21,8	[AS91]
Proteine	1,5	[AS91]

Tabelle 39: Chemische Zusammensetzung des Gerstenhalms

Die Proteinzusammensetzung wurde auf Grundlage der in [Var86] aufgeführten Aminosäurezusammensetzung von Gerstenhalmen bestimmt.

Aminosäuren	% an Halmproteinen	Aminosäuren	% an Halmproteinen
L-Alanin	7.8	L-Lysin	7.0
L-Arginin	4.4	L-Methionin	1.8
L-Aspartat	9.8	L-Phenylalanin	5.4
L-Cystein	0.1	L-Prolin	6.3
L-Glutamat	14.3	L-Serin	6.7
L-Glycin	5.8	L-Threonin	6.2
L-Histidin	0.2	L-Tyrosin	3.4
L-Isoleucin	5.0	L-Valin	7.6
L-Leucin	8.2		

Tabelle 40: Aminosäurezusammensetzung des Gerstenhalms nach [Var86]

Berechnung der stöchiometrischen Koeffizienten der Zielfunktion

	% an TG	g/g Zelle	MW [g/mol]	mmol/g TG
Saccharose	6,125	0,061	342,296	0,179
Glucose	7,656	0,077	180,1559	0,425
Fruktose	7,146	0,071	260,0297	0,275
Fruktane	16,843	0,168	882,76418	0,191
Cellulose	38,939	0,389	546,4336613	0,713
Hemicellulose	21,763	0,218	546,4336613	0,398
Protein	1,529	0,015	129,3389008	0,118

Tabelle 41: Berechnung der stöchiometrischen Koeffizienten der Zielfunktion

Substrate		Produkte	
Komponente	[mmol/g TG]	Komponente	[mmol/g TG]
Saccharose	0,1789	Biomasse	1
Glucose	0,4250		
Fruktose	0,2748		
Fruktane	0,1908		
Cellulose	0,7126		
Hemicellulose	0,3983		
Proteine	0,1182		

Tabelle 42: Biosynthetische Ausgangsstoffe und Cofaktoren, die für die Synthese von einem Gramm Biomasse Gerstenhalm benötigt werden, inklusive der dazugehörigen stöchiometrischen Koeffizienten der Biomassegleichung

LITERATURVERZEICHNIS

- [ABJ94] ARMSTRONG, W., R. BRÄNDLE und M. B. JACKSON: *Mechanisms of flood tolerance in plants*. Acta Botanica Neerlandica, 43:307–358, 1994.
- [Amt00] AMTHOR, J. S.: *The McCree-de Wit-Penning de Vries-Thornley Respiration Paradigms: 30 Years Later*. Annals of Botany, 86:1–20, 2000.
- [ANNO⁺11] ARAÚJO, W. L., A. NUNES-NESE, S. OSORIO, B. USADEL, D. FUENTES, R. NAGY, I. BALBO, M. LEHMANN, C. STUDART-WITKOWSKI, T. TOHGE, E. MARTINOIA, X. JORDANA, F. M. DAMATTA und A. R. FERNIE: *Antisense inhibition of the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase enhances photosynthesis and growth in tomato via an organic acid-mediated effect on stomatal aperture*. Plant Cell, 23(2):600–627, 2011.
- [AOSH09] ALLEN, D. K., J. B. OHLROGGE und Y. SHACHAR-HILL: *The role of light in soybean seed filling metabolism*. Plant Journal, 58(2):220–234, 2009.
- [Ara12a] *Arabidopsis Reactome: A Foundation Knowledgebase for Plant Systems Biology*. Webpage: <http://www.arabidopsisreactome.org/>, 2012.
- [Ara12b] *AraCyc: a biochemical pathway database for Arabidopsis*. Webpage: <http://www.arabidopsis.org/biocyc/index.jsp>, 2012.
- [AS91] ANTONGIOVANNI, M. und C. SARGENTINI: *Variability in chemical composition of straws*. Options Méditerranéennes - Série Séminaires, 16:49–53, 1991.
- [AVSH11] ALONSO, A. P., D. L. VAL und Y. SHACHAR-HILL: *Central metabolic fluxes in the endosperm of developing maize seeds and their implications for metabolic engineering*. Metabolic Engineering, 13(1):96–107, 2011.
- [Bai91] BAILEY, J. E.: *Toward a science of metabolic engineering*. Science, 252(5013):1668–1675, 1991.
- [Bas10] BASSLER, A.: *Die Visualisierung von Daten im Controlling*. Doktorarbeit, Universität der Bundeswehr München, 2010.
- [BB94a] BEWLEY, J. D. und M. BLACK: *Seed Development and Maturation*. In: *Seeds: Physiology Of Development And Germination*, Kapitel 2, Seite 48. Springer-Verlag, 1994.
- [BB94b] BEWLEY, J. D. und M. BLACK: *Seeds: Physiology Of Development And Germination*. Springer-Verlag, 2. Auflage, 1994.
- [BCSo6] BADER, G. D., M. P. CARY und C. SANDER: *Pathguide: a pathway resource list*. Nucleic Acids Research, 34(Database issue):D504–D506, 2006.
- [Ber83] BERTIN, J.: *Semiology of Graphics: Diagrams, Networks, Maps*. University of Wisconsin Press, 1983.
- [BFo4] BOUCHÉ, N. und H. FROMM: *GABA in plants: just a metabolite?* Trends in Plant Science, 9(3):110–115, 2004.
- [BFM⁺07] BECKER, S. A., A. M. FEIST, M. L. MO, G. HANNUM, B. Ø. PALSSON und M. J. HERRGARD: *Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox*. Nature Protocols, 2(3):727–738, 2007.

- [BGJ00] BUCHANAN, B. B., W. GRUISSEM und R. L. JONES (Herausgeber): *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 2000.
- [BHBW07] BRUGGEMAN, F. J., J. J. HORNBERG, F. C. BOOGERD und H. V. WESTERHOFF: *Introduction to systems biology*. In: BAGINSKY, S. und A. R. FERNIE (Herausgeber): *Plant Systems Biology*, Seiten 1 – 19. Birkhäuser Verlag, 2007.
- [BHM⁺96] BONARIUS, H. P., V. HATZIMANIKATIS, K. P. MEESTERS, C. D. DE GOOIJER, G. SCHMID und J. TRAMPER: *Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances*. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(3):299–318, 1996.
- [BI81] BLACKLOW, W. M. und L. D. INCOLL: *Nitrogen Stress of Winter Wheat Changed the Determinants of Yield and the Distribution of Nitrogen and Total Dry Matter During Grain Filling*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 8(2):191–200, 1981.
- [BI92] BONNETT, G. D. und L. D. INCOLL: *The Potential Pre-anthesis and Post-anthesis Contributions of Stem Internodes to Grain Yield in Crops of Winter Barley*. *Annals of Botany*, 69:219–225, 1992.
- [BI93a] BONNETT, G. D. und L. D. INCOLL: *Effects on the Stem of Winter Barley of Manipulating the Source and Sink during Grain-filling I. Changes in the composition of water-soluble carbohydrates of internodes*. *Journal of Experimental Botany*, 44(258):83–91, 1993.
- [BI93b] BONNETT, G. D. und L. D. INCOLL: *Effects on the Stem of Winter Barley of Manipulating the Source and Sink during Grain-filling II. Changes in accumulation and loss of mass from internodes*. *Journal of Experimental Botany*, 44(258):75–82, 1993.
- [Bio12] *Bio-SPICE: Biological Simulation Program for Intra- and Inter-Cellular Evaluation*. Webpage: <http://www.biospice.sourceforge.net/>, 2012.
- [BK05] BALUNAS, M. J. und A. D. KINGHORN: *Drug discovery from medicinal plants*. *Life Science*, 78(5):431–441, 2005.
- [BKS05] BLANK, L. M., L. KUEPFER und U. SAUER: *Large-scale ¹³C-flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast*. *Genome Biology*, 6(6):R49, 2005.
- [BL97] BARKAI, N. und S. LEIBLER: *Robustness in simple biochemical networks*. *Nature*, 387(6636):913–917, 1997.
- [Bla06] BLACK, M.; BEWLEY, J. D.; HALMER P.: *The encyclopedia of seeds: science, technology and uses*. Wallingford: CABI, 2006.
- [BLF03] BOUCHÉ, N., B. LACOMBE und H. FROMM: *GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism*. *Trends in Cell Biology*, 13(12):607–610, 2003.
- [BLO94] BROWN, R. C., B. E. LEMMON und O. A. OLSEN: *Endosperm Development in Barley: Microtubule Involvement in the Morphogenetic Pathway*. *Plant Cell*, 6(9):1241–1252, 1994.
- [Blu98] BLUM, A.: *Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilisation*. *Euphytica*, 100:77–83, 1998.

- [BM09] BOYLE, N. R. und J. A. MORGAN: *Flux balance analysis of primary metabolism in Chlamydomonas reinhardtii*. BMC Systems Biology, 3:4, 2009.
- [BO97] BEHAL, R. H. und D. J. OLIVER: *Biochemical and molecular characterization of fumarase from plants: purification and characterization of the enzyme—cloning, sequencing, and expression of the gene*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 348(1):65–74, 1997.
- [BO04] BARABÁSI, A. und Z. N. OLTVAI: *Network biology: understanding the cell's functional organization*. Nature Reviews Genetics, 5(2):101–113, 2004.
- [BP08] BECKER, S. A. und B. Ø. PALSSON: *Context-specific metabolic networks are consistent with experiments*. PLoS Computational Biology, 4(5):e1000082, 2008.
- [BPKJ⁺08] BRANCO-PRICE, C., K. A. KAISER, C. J. H. JANG, C. K. LARIVE und J. BAILEY-SERRES: *Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in Arabidopsis thaliana*. Plant Journal, 56(5):743–755, 2008.
- [Bri78] BRIGGS, D. E. (Herausgeber): *Barley*. Chapman and Hall, London, 1978.
- [BRR⁺04] BORISJUK, L., H. ROLLETSCHKE, R. RADCHUK, W. WESCHKE, U. WOBUS und H. WEBER: *Seed development and differentiation: a role for metabolic regulation*. Plant Biology (Stuttgart, Germany), 6(4):375–386, 2004.
- [BS09] BRAUN, D. M. und T. L. SLEWINSKI: *Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading*. Plant Physiology, 149(1):71–81, 2009.
- [BSR01] BECKLES, D. M., A. M. SMITH und T. A. REES: *A cytosolic ADP-glucose pyrophosphorylase is a feature of graminaceous endosperms, but not of other starch-storing organs*. Plant Physiology, 125(2):818–827, 2001.
- [BSV08] BAILEY-SERRES, J. und L. A. C. J. VOESENEK: *Flooding stress: acclimations and genetic diversity*. Annual Review of Plant Biology, 59:313–339, 2008.
- [BWL⁺05] BAUD, S., S. WUILLÈME, R. LEMOINE, J. KRONENBERGER, M. CABOCHE, L. LEPINIEC und C. ROCHAT: *The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in Arabidopsis*. Plant Journal, 43(6):824–836, 2005.
- [CAD⁺10] CASPI, R., T. ALTMAN, J. M. DALE, K. DREHER, C. A. FULCHER, F. GILHAM, P. KAIPA, A. S. KARTHIKEYAN, A. KOTHARI, M. KRUMMENACKER, M. LATENDRESSE, L. A. MUELLER, S. PALEY, L. POPESCU, A. PUJAR, A. G. SHEARER, P. ZHANG und P.D. KARP: *The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases*. Nucleic Acids Research, 38(Database issue):D473–D479, 2010.
- [cASuKOU07] ÇAKIR, T., S. ALSAN, H. SAYBAILI und A. AKIN und K. O. ULGEN: *Reconstruction and flux analysis of coupling between metabolic pathways of astrocytes and neurons: application to cerebral hypoxia*. Theoretical Biology and Medical Modelling, 4:48, 2007.
- [CBC00] CORNISH-BOWDEN, A. und M. L. CÁRDENAS: *Irreversible Reactions in Metabolic Simulations: how Reversible is Irreversible?* In: HOFMEYR, J.-H. S., J. M. ROHWER und J. L. SNOEP (Herausgeber): *Animating the Cellular Map*, Seiten 65 – 71. Stellenbosch University Press, 2000.

- [Chao7] CHAOUIYA, C.: *Petri net modelling of biological networks*. Briefings in Bioinformatics, 8(4):210–219, 2007.
- [CHC⁺06] CHASTAIN, C. J., J. W. HECK, T. A. COLQUHOUN, D. G. VOGEL und X. GU: *Posttranslational regulation of pyruvate, orthophosphate dikinase in developing rice (Oryza sativa) seeds*. Planta, 224(4):924–934, 2006.
- [ChE12] ChEBI (Chemical Entities of Biological Interest). Webpage: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/>, 2012.
- [CMS99] CARD, S. T., J. D. MACKINLAY und B. SHNEIDERMAN: *Readings in Information Visualization: Using Vision to Think*. Morgan Kaufmann Publishers, 1999.
- [COHA⁺10] CVIJOVIC, M., R. OLIVARES-HERNÁNDEZ, R. AGREN, N. DAHR, W. VONGSANGNAK, I. NOOKAEW, K. R. PATIL und J. NIELSEN: *BioMet Toolbox: genome-wide analysis of metabolism*. Nucleic Acids Research, 38 Suppl(Web Server issue):W144–W149, 2010.
- [CRB⁺11] COGNE, G., M. RÜGEN, A. BOCKMAYR, M. TITICA, C. DUSSAP, J. CORNET und J. LEGRAND: *A model-based method for investigating bioenergetic processes in autotrophically growing eukaryotic microalgae: application to the green algae Chlamydomonas reinhardtii*. Biotechnology Progress, 27(3):631–640, 2011.
- [Cro12] *Schematic cross section of the mature stem of a monocot plant*. Webpage: <http://www.kentsimmons.uwinnipeg.ca/cm1504/15lab42006/lb4pg4.htm>, 2012.
- [CVO96] CHOLLET, R., J. VIDAL und M. H. O'LEARY: *Phosphoenolpyruvate carboxylase: A Ubiquitous, Highly Regulated Enzyme in Plants*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 47:273–298, 1996.
- [Dan63] DANTZIG, GEORGE B.: *Linear Programming and Extensions*. Princeton University Press, 1963.
- [DAN03] DAVID, H., M. AKESSON und J. NIELSEN: *Reconstruction of the central carbon metabolism of Aspergillus niger*. European Journal of Biochemistry, 270(21):4243–4253, 2003.
- [DBBO04] DOBRIN, R., Q. K. BEG, A. BARABÁSI und Z. N. OLTVAI: *Aggregation of topological motifs in the Escherichia coli transcriptional regulatory network*. BMC Bioinformatics, 5:10, 2004.
- [DBJ⁺07] DUARTE, N. C., S. A. BECKER, N. JAMSHIDI, I. THIELE, M. L. MO, T. D. VO, R. SRIVAS und B. Ø. PALSSON: *Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 104(6):1777–1782, 2007.
- [dBvL11] BLOCK, M. DE und M. VAN LIJSEBETTENS: *Energy efficiency and energy homeostasis as genetic and epigenetic components of plant performance and crop productivity*. Current Opinion in Plant Biology, 14(3):275–282, 2011.
- [DH77] DAY, D. A. und J. B. HANSON: *Pyruvate and malate transport and oxidation in corn mitochondria*. Plant Physiology, 59(4):630–635, 1977.
- [DH10] DELCOUR, J. A. und R. C. HOSENEY: *Kapitel 1: Structure of Cereals*. In: DELCOUR, J. A. und R. C. HOSENEY (Herausgeber): *Principles of Cereal Science and Technology*, Seiten 1–22. AACC International PRESS, 3. Auflage, 2010.

- [DJSS10] D.KOSCHÜTZKI, B. H. JUNKER, J. SCHWENDER und F. SCHREIBER: *Structural analysis of metabolic networks based on flux centrality*. Journal of Theoretical Biology, 265(3):261–269, 2010.
- [DKF88] DOEHLERT, D. C., T. M. KUO und F. C. FELKER: *Enzymes of Sucrose and Hexose Metabolism in Developing Kernels of Two Inbreds of Maize*. Plant Physiology, 86(4):1013–1019, 1988.
- [DMLP89] DUFF, S. M. G., G. B. G. MOORHEAD, D. D. LEFEBVRE und W. C. PLAXTON: *Phosphate Starvation Inducible 'Bypasses' of Adenylate and Phosphate Dependent Glycolytic Enzymes in Brassica nigra Suspension Cells*. Plant Physiology, 90(4):1275–1278, 1989.
- [dODQP⁺10a] OLIVEIRA DAL'MOLIN, C. GOMES DE, L.-E. QUEK, R. W. PALFREYMAN, S. M. BRUMBLEY und L. K. NIELSEN: *AraGEM, a genome-scale reconstruction of the primary metabolic network in Arabidopsis*. Plant Physiology, 152(2):579–589, 2010.
- [dODQP⁺10b] OLIVEIRA DAL'MOLIN, C. GOMES DE, L.-E. QUEK, R. W. PALFREYMAN, S. M. BRUMBLEY und L. K. NIELSEN: *C₄GEM, a genome-scale metabolic model to study C₄ plant metabolism*. Plant Physiology, 154(4):1871–1885, 2010.
- [dODQPN11] OLIVEIRA DAL'MOLIN, C. GOMES DE, L.-E. QUEK, R. W. PALFREYMAN und L. K. NIELSEN: *AlgaGEM—a genome-scale metabolic reconstruction of algae based on the Chlamydomonas reinhardtii genome*. BMC Genomics, 12 Suppl 4:S5, 2011.
- [DR77] DUFFUS, C. M. und R. ROSIE: *Carbohydrate oxidation in developing barley endosperm*. New Phytologist, 78(2):391–395, 1977.
- [DR78] DUFFUS, C. M. und R. ROSIE: *Metabolism of Ammonium Ion and Glutamate in Relation to Nitrogen Supply and Utilization during Grain Development in Barley*. Plant Physiology, 61(4):570–574, 1978.
- [DSB⁺05] DAVIES, H. V., L. V. T. SHEPHERD, M. M. BURRELL, F. CARRARI, E. URBANCZYK-WOCHNIAK, A. LEISSE, R. D. HANCOCK, M. TAYLOR, R. VIOLA, H. ROSS, D. MCRAE, L. WILLMITZER und A. R. FERNIE: *Modulation of fructokinase activity of potato (Solanum tuberosum) results in substantial shifts in tuber metabolism*. Plant and Cell Physiology, 46(7):1103–1115, 2005.
- [dSS03] SOUSA, C. A. F. DE und L. SODEK: *Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (Glycine max) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia*. Environmental and Experimental Botany, 50(1):1–8, 2003.
- [dV75] VRIES, F. W. T. P. DE: *The Cost of Maintenance Processes in Plant Cells*. Annals of Botany, 39:77–92, 1975.
- [EBH⁺03] EMES, M. J., C. G. BOWSHER, C. HEDLEY, M. M. BURRELL, E. S. F. SCRASEFIELD und I. J. TETLOW: *Starch synthesis and carbon partitioning in developing endosperm*. Journal of Experimental Botany, 54(382):569–575, 2003.
- [EGK08] ECK, C., H. GARCKE und P. KNABNER: *Vorwort*. In: ECK, C., H. GARCKE und P. KNABNER (Herausgeber): *Mathematische Modellierung*, Seiten V – IX. Springer-Verlag, 2008.

- [EIP01] EDWARDS, J. S., R. U. IBARRA und B. Ø. PALSSON: *In silico predictions of Escherichia coli metabolic capabilities are consistent with experimental data.* Nature Biotechnology, 19(2):125–130, 2001.
- [EKA⁺08] ELLIOTT, B., M. KIRAC, A. CAKMAK, G. YAVAS, S. MAYES, E. CHENG, Y. WANG, C. GUPTA, G. OZSOYOGLU und Z. M. OZSOYOGLU: *PathCase: pathways database system.* Bioinformatics, 24(21):2526–2533, 2008.
- [EP98] EDWARDS, J. S. und B. Ø. PALSSON: *How will bioinformatics influence metabolic engineering?* Biotechnology and Bioengineering, 58(2-3):162–169, 1998.
- [EP99] EDWARDS, J. S. und B. Ø. PALSSON: *Systems properties of the Haemophilus influenzae Rd metabolic genotype.* Journal of Biological Chemistry, 274(25):17410–17416, 1999.
- [EP00a] EDWARDS, J. S. und B. Ø. PALSSON: *The Escherichia coli MG1655 in silico metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities.* Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 97(10):5528–5533, 2000.
- [EP00b] EDWARDS, J. S. und B. Ø. PALSSON: *Robustness analysis of the Escherichia coli metabolic network.* Biotechnology Progress, 16(6):927–939, 2000.
- [ERP02] EDWARDS, J. S., R. RAMAKRISHNA und B. Ø. PALSSON: *Characterizing the metabolic phenotype: a phenotype phase plane analysis.* Biotechnology and Bioengineering, 77(1):27–36, 2002.
- [ERSP99] EDWARDS, J. S., R. RAMAKRISHNA, C. SCHILLING und B. Ø. PALSSON: *Metabolic flux balance analysis.* In: LEE, S.Y. und E. T. PAPOUTSAKIS (Herausgeber): *Metabolic Engineering*, Seiten 13–57. Marcel Dekker, 1999.
- [FBJL⁺06] FINNIE, C., K. BAK-JENSEN, S. LAUGESSEN, P. ROEPSTORFF und B. SVENSSON.: *Differential appearance of isoforms and cultivar variation in protein temporal profiles revealed in the maturing barley grain proteome.* Plant Science, 170:808–821, 2006.
- [FFF⁺03] FÖRSTER, J., I. FAMILI, P. FU, B. Ø. PALSSON und J. NIELSEN: *Large-scale evaluation of in silico gene deletions in Saccharomyces cerevisiae.* OMICS, 7(2):193–202, 2003.
- [FFNP03] FAMILI, I., J. FORSTER, J. NIELSEN und B. Ø. PALSSON: *Saccharomyces cerevisiae phenotypes can be predicted by using constraint-based analysis of a genome-scale reconstructed metabolic network.* Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 100(23):13134–13139, 2003.
- [FFW⁺08] FAIT, A., H. FROMM, D. WALTER, G. GALILI und A. R. FERNIE: *Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants.* Trends in Plant Science, 13(1):14–19, 2008.
- [FGS05] FERNIE, A. R., P. GEIGENBERGER und M. STITT: *Flux an important, but neglected, component of functional genomics.* Current Opinion in Plant Biology, 8(2):174–182, 2005.
- [FHML87] FAHRENDORF, T., J. A. M. HOLTUM, U. MUKHERJEE und E. LATZKO: *Fructose 2,6-Bisphosphate, Carbohydrate Partitioning, and Crassulacean Acid Metabolism.* Plant Physiology, 84(1):182–187, 1987.

- [FK91] FOX, T. C. und R. A. KENNEDY: *Mitochondrial enzymes in aerobically and anaerobically germinated seedlings of Echinochloa and rice*. *Planta*, 184(4):510–514, 1991.
- [FKG⁺97] FISCHER, K., B. KAMMERER, M. GUTENSOHN, B. ARBINGER, A. WEBER, R. E. HÄUSLER und U. I. FLÜGGE: *A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter*. *Plant Cell*, 9(3):453–462, 1997.
- [Flu] *Fluxor: Metabolic Flux Analysis Tool*. Webpage: <http://www.sourceforge.net/projects/fluxor/>.
- [FMRS02] FINNIE, C., S. MELCHIOR, P. ROEPSTORFF und B. SVENSSON: *Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley*. *Plant Physiology*, 129(3):1308–1319, 2002.
- [FNPS06] FONG, S. S., A. NANCHEN, B. Ø. PALSSON und U. SAUER: *Latent pathway activation and increased pathway capacity enable Escherichia coli adaptation to loss of key metabolic enzymes*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(12):8024–8033, 2006.
- [FPN83] FELKER, F. C., D. M. PETERSON und O. E. NELSON: *Growth Characteristics, Grain Filling, and Assimilate Transport in a Shrunken Endosperm Mutant of Barley*. *Plant Physiology*, 72(3):679–684, 1983.
- [FPN84] FELKER, F. C., D. M. PETERSON und O. E. NELSON: *[C]Sucrose Uptake and Labeling of Starch in Developing Grains of Normal and segl Barley*. *Plant Physiology*, 74(1):43–46, 1984.
- [Frag6] FRAENKEL, D. G.: *Glycolysis*. In: NEIDHARDT, F. C. (Herausgeber): *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, Seiten 189–198. American Society for Microbiology, 1996.
- [FS86] FELL, D. A. und J. R. SMALL: *Fat synthesis in adipose tissue. An examination of stoichiometric constraints*. *Biochemical Journal*, 238(3):781–786, 1986.
- [FS10] FROMMER, W. B. und U. SONNEWALD: *Progress in physiological research and its relevance for agriculture and ecology*. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(3):227–232, 2010.
- [FSC⁺09] FÈVRE, F. LE, S. SMIDTAS, C. COMBE, M. DUROT, F. D'ALCHÉ BUC und V. SCHACHTER: *CycSim—an online tool for exploring and experimenting with genome-scale metabolic models*. *Bioinformatics*, 25(15):1987–1988, 2009.
- [Gal12] GALERIU, D.: *Growth modeling, role of photosynthesis, respiration, partition of new dry matter, role of reserves*. Webpage: <http://www-ns.iaea.org>, 2012.
- [GBARK11] GEVORGYAN, A., M. E. BUSHELL, C. AVIGNONE-ROSSA und A. M. KIERZEK: *SurreyFBA: a command line tool and graphics user interface for constraint-based modeling of genome-scale metabolic reaction networks*. *Bioinformatics*, 27(3):433–434, 2011.
- [GBJK⁺09] GRAFAHREND-BELAU, E., B.H. JUNKER, C. KLUKAS, D. KOSCHÜTZKI, F. SCHREIBER und H. SCHWÖBBERMEYER: *Topology of Plant Metabolic Networks*. In: SCHWENDER, J. (Herausgeber): *Plant Metabolic Networks*, Seiten 173 – 209. Springer Verlag, 2009.

- [GBKJS09] GRAFAHREND-BELAU, E., C. KLUKAS, B. H. JUNKER und F. SCHREIBER: *FBA-SimVis: interactive visualization of constraint-based metabolic models*. *Bioinformatics*, 25(20):2755–2757, 2009.
- [GBS75] GALLAGHER, J. N., P. V. BISCOE und R. K. SCOTT: *Barley and its environment. V. Stability of grain weight*. *Journal of Applied Ecology*, 12:319–336, 1975.
- [GBSKJ09] GRAFAHREND-BELAU, E., F. SCHREIBER, D. KOSCHÜTZKI und B. H. JUNKER: *Flux balance analysis of barley seeds: a computational approach to study systemic properties of central metabolism*. *Plant Physiology*, 149(1):585–598, 2009.
- [GBWK⁺08] GRAFAHREND-BELAU, E., S. WEISE, D. KOSCHÜTZKI, U. SCHOLZ, B. H. JUNKER und F. SCHREIBER: *MetaCrop: a detailed database of crop plant metabolism*. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue):D954–D958, 2008.
- [GC89] GOOD, A. G. und W. L. CROSBY: *Anaerobic induction of alanine aminotransferase in barley root tissue*. *Plant Physiology*, 90(4):1305–1309, 1989.
- [GCE98] GERSHON, N., S. CARD und S. G. EICK: *Information Visualization Tutorial*. In: *CHI 98 Conference Summary on Human Factors in Computing Systems*. ACM Press, New York, USA, 1998.
- [GD99] GRUSAK, M. A. und D. DELLAPENNA: *Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50:133–161, 1999.
- [Gei03] GEIGENBERGER, P.: *Response of plant metabolism to too little oxygen*. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3):247–256, 2003.
- [Gen12] *The Gene Ontology*. Webpage: <http://www.geneontology.org/>, 2012.
- [GGH⁺03] GASTEIGER, E., A. GATTIKER, C. HOOGLAND, I. IVANYI, R. D. APPEL und A. BAIROCH: *ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis*. *Nucleic Acids Research*, 31(13):3784–3788, 2003.
- [GHG⁺98] GEIGENBERGER, P., M. HAJIREZAEI, M. GEIGER, U. DEITING, U. SONNEWALD und M. STITT: *Overexpression of pyrophosphatase leads to increased sucrose degradation and starch synthesis, increased activities of enzymes for sucrose-starch interconversions, and increased levels of nucleotides in growing potato tubers*. *Planta*, 205(3):428–437, 1998.
- [Gie00] GIERSCH, C.: *Mathematical modelling of metabolism*. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3):249–253, 2000.
- [GJCO3] GAGNEUR, J., D. B. JACKSON und G. CASARI: *Hierarchical analysis of dependency in metabolic networks*. *Bioinformatics*, 19(8):1027–1034, 2003.
- [GK04] GAGNEUR, J. und S. KLAMT: *Computation of elementary modes: a unifying framework and the new binary approach*. *BMC Bioinformatics*, 5:175, 2004.
- [GM08] GROLLE, S. und G. MICZKA: *Systembiologie: Ergebnisse, Fortschritte, und Innovationen aus der BMBF-Förderung*. Forschungszentrum Jülich GmbH Projektträger Jülich (PtJ), 2008.
- [GMBG⁺10] GEER, L. Y., A. MARCHLER-BAUER, R. C. GEER, L. HAN, J. HE, S. HE, C. LIU, W. SHI und S. H. BRYANT: *The NCBI BioSystems database*. *Nucleic Acids Research*, 38(Database issue):D492–D496, 2010.

- [GMV⁺00] GIBBS, J., S. MORRELL, A. VALDEZ, T. L. SETTER und H. GREENWAY: *Regulation of alcoholic fermentation in coleoptiles of two rice cultivars differing in tolerance to anoxia*. *Journal of Experimental Botany*, 51(345):785–796, 2000.
- [GOH⁺02] GOTO, S., Y. OKUNO, M. HATTORI, T. NISHIOKA und M. KANEHISA: *LI-GAND: database of chemical compounds and reactions in biological pathways*. *Nucleic Acids Research*, 30(1):402–404, 2002.
- [GPS⁺96] GEHLEN, J., R. PANSTRUGA, H. SMETS, S. MERKELBACH, M. KLEINES, P. PORSCH, M. FLADUNG, I. BECKER, T. RADEMACHER, R. E. HÄUSLER und H. J. HIRSCH: *Effects of altered phosphoenolpyruvate carboxylase activities on transgenic C₃ plant *Solanum tuberosum**. *Plant Molecular Biology*, 32(5):831–848, 1996.
- [GRD05] GRDC: *Cereal Growth Stages*. In: GRDC (Herausgeber): *GRDC (Grains Research & Development Corporation) publication*, Seiten 1–40, New Zealand, 2005.
- [HCM08] HUANG, S., T. D. COLMER und A. H. MILLAR: *Does anoxia tolerance involve altering the energy currency towards P_{Pi}?* *Trends in Plant Science*, 13(5):221–227, 2008.
- [HDS89] HATZFELD, W. D., J. DANCER und M. STITT: *Direct evidence that pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase can act as a glycolytic enzyme in plants*. *FEBS Letters*, 254:215–218, 1989.
- [HGCo6] HGCA: *The barley growth guide*. In: HGCA (Herausgeber): *HGCA (Home Grown Cereals Authority) publication*, Seiten 1–28, London, 2006.
- [HHG⁺11] HOPPE, A., S. HOFFMANN, A. GERASCH, C. GILLE und H. HOLZHÜTTER: *FASIMU: flexible software for flux-balance computation series in large metabolic networks*. *BMC Bioinformatics*, 12:28, 2011.
- [HH]03] HOLME, P., M. HUSS und H. JEONG: *Subnetwork hierarchies of biochemical pathways*. *Bioinformatics*, 19(4):532–538, 2003.
- [HHLM99] HARTWELL, L. H., J. J. HOPFIELD, S. LEIBLER und A. W. MURRAY: *From molecular to modular cell biology*. *Nature*, 402(6761 Suppl):C47–C52, 1999.
- [H]92] HRAZDINA, G. und R. A. JENSEN: *Spatial organization of enzymes in plant metabolic pathways*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43:241–267, 1992.
- [Holo4] HOLZHÜTTER, H.: *The principle of flux minimization and its application to estimate stationary fluxes in metabolic networks*. *European Journal of Biochemistry*, 271(14):2905–2922, 2004.
- [HPo8a] HELDT, H.-W. und B. PIECHULLA: *Über den Photorespirationsweg wird das durch die Oxygenaseaktivität der RubisCO gebildete Phosphoglycolat recycelt*. In: HELDT, H.-W. und B. PIECHULLA (Herausgeber): *Pflanzenbiochemie*, Seiten 187–203. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2008.
- [HPo8b] HELDT, H. W. und B. PIECHULLA: *Die Photosynthese ist ein Elektronentransportprozess*. In: HELDT, H. W. und B. PIECHULLA (Herausgeber): *Pflanzenbiochemie*, Seiten 67–112. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2008.

- [HPo8c] HELDT, H. W. und B. PIECHULLA: *Pflanzenbiochemie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2008.
- [HR74] HEINRICH, R. und T. A. RAPOPORT: *A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength*. European Journal of Biochemistry, 42(1):89–95, 1974.
- [HRo4] HARDY, S. und P. N. ROBILLARD: *Modeling and simulation of molecular biology systems using petri nets: modeling goals of various approaches*. Journal of Bioinformatics and Computational Biology, 2(4):595–613, 2004.
- [HS96] HEINRICH, R. und S. SCHUSTER (Herausgeber): *The Regulation of Cellular Systems*. Chapman and Hall, New York, 1996.
- [HS11a] HAY, J. und J. SCHWENDER: *Computational analysis of storage synthesis in developing Brassica napus L. (oilseed rape) embryos: flux variability analysis in relation to ¹³C metabolic flux analysis*. Plant Journal, 67(3):513–525, 2011.
- [HS11b] HAY, J. und J. SCHWENDER: *Metabolic network reconstruction and flux variability analysis of storage synthesis in developing oilseed rape (Brassica napus L.) embryos*. Plant Journal, 67(3):526–541, 2011.
- [HSV⁺94] HAJIREZAEI, M., U. SONNEWALD, R. VIOLA, S. CARLISLE, D. DENNIS und M. STITT: *Transgenic potato plants with strongly decreased expression of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphor-transferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers*. Planta, 192:16–30, 1994.
- [HWBZ04] HONG-WU, M., J. BUER und A.-P. ZENG: *Hierarchical structure and modules in the Escherichia coli transcriptional regulatory network revealed by a new top-down approach*. BMC Bioinformatics, 5:199, 2004.
- [IEP02] IBARRA, R. U., J. S. EDWARDS und B. Ø. PALSSON: *Escherichia coli K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth*. Nature, 420(6912):186–189, 2002.
- [inf] *Basic types of zooming*. Webpage: <http://www.infovis-wiki.net/index.php?title=Zoom>.
- [InS] *In Silico Discovery software*. Webpage: <http://www.insilico-biotechnology.com/>.
- [IS75] INATOMI, K. und J. C. SLAUGHTER: *Glutamate decarboxylase from barley embryos and roots. General properties and the occurrence of three enzymic forms*. Biochemical Journal, 147(3):479–484, 1975.
- [ISF⁺08] IYER, V. V., G. SRIRAM, D. B. FULTON, R. ZHOU, M. E. WESTGATE und J. V. SHANKS: *Metabolic flux maps comparing the effect of temperature on protein and oil biosynthesis in developing soybean cotyledons*. Plant, Cell and Environment, 31(4):506–517, 2008.
- [JDM03] JAMES, M. G., K. DENYER und A. M. MYERS: *Starch synthesis in the cereal endosperm*. Current Opinion in Plant Biology, 6(3):215–222, 2003.
- [JKSo6] JUNKER, B. H., C. KLUKAS und F. SCHREIBER: *VANTED: a system for advanced data analysis and visualization in the context of biological networks*. BMC Bioinformatics, 7:109, 2006.

- [JLH⁺07] JUNKER, B. H., J. LONIEN, L. E. HEADY, A. ROGERS und J. SCHWENDER: *Parallel determination of enzyme activities and in vivo fluxes in Brassica napus embryos grown on organic or inorganic nitrogen source*. *Phytochemistry*, 68(16-18):2232–2242, 2007.
- [JP11] JENSEN, P. A. und J. A. PAPIN: *Functional integration of a metabolic network model and expression data without arbitrary thresholding*. *Bioinformatics*, 27(4):541–547, 2011.
- [Jun05] JUNGnickel, D.: *Basic Graph Theory*. In: BRONSTEIN, M., A. M. COHEN, H. COHEN, D. EISENBUD und B. STURMFELS (Herausgeber): *Graphs, Networks and Algorithms*, Band 5 der Reihe *Algorithms and Computation in Mathematics*, Seiten 1–28. Springer, 2. Auflage, 2005.
- [KAFN12] KLEESSEN, S., W. L. ARAUJO, A. R. FERNIE und Z. NIKOLOSKI: *Model-based confirmation of alternative substrates of mitochondrial electron transport chain*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14):11122–11131, 2012.
- [KAN⁺99] KU, M. S., S. AGARIE, M. NOMURA, H. FUKAYAMA, H. TSUCHIDA, K. ONO, S. HIROSE, S. TOKI, M. MIYAO und M. MATSUOKA: *High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants*. *Nature Biotechnology*, 17(1):76–80, 1999.
- [Kar98] KARP, P. D.: *Metabolic databases*. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(3):114–116, 1998.
- [KBG84] KAZUKO, A., J. A. BASSHAM und F. C. GREENE: *Pyruvate Orthophosphate Dikinase Gene Expression in Developing Wheat Seeds*. *Plant Physiology*, 75(2):393–396, 1984.
- [KEG12] KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Webpage: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>, 2012.
- [KG00] KANEHISA, M. und S. GOTO: *KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes*. *Nucleic Acids Research*, 28(1):27–30, 2000.
- [KG10] KÜHN, C. und C. P. L. GROF: *Sucrose transporters of higher plants*. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(3):288–298, 2010.
- [KGF⁺10] KANEHISA, M., S. GOTO, M. FURUMICHI, M. TANABE und M. HIRAKAWA: *KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs*. *Nucleic Acids Research*, 38(Database issue):D355–D360, 2010.
- [K GK⁺04] KANEHISA, M., S. GOTO, S. KAWASHIMA, Y. OKUNO und M. HATTORI: *The KEGG resource for deciphering the genome*. *Nucleic Acids Research*, 32(Database issue):D277–D280, 2004.
- [KH08] KOCH, I. und M. HEINER: *Petri Nets in Biological Network Analysis*. In: JUNKER, B. H. und F. SCHREIBER (Herausgeber): *Analysis of biological networks*, Seiten 139–179. Wiley & Sons Book Series on Bioinformatics, 2008.
- [KHK⁺05] KLIPP, E., R. HERWIG, A. KOWALD, C. WIERLING und H. LEHRACH: *Systems Biology in Practice: Concepts, Implementation and Application*. Wiley-VCH, 2005.
- [Kito2a] KITANO, H.: *Computational systems biology*. *Nature*, 420(6912):206–210, 2002.

- [Kito2b] KITANO, H.: *Systems Biology: a brief overview*. Science, 295:1662–1664, 2002.
- [Kito4] KITANO, H.: *Biological robustness*. Nature Reviews Genetics, 5(11):826–837, 2004.
- [KKPW99] KARP, P. D., M. KRUMMENACKER, S. PALEY und J. WAGG: *Integrated pathway-genome databases and their role in drug discovery*. Trends in Biotechnology, 17(7):275–281, 1999.
- [KN05] KRUMKE, S. O. und H. NOLTEMEIER: *Graphentheoretische Konzepte und Algorithmen*. Vieweg +Teubner Verlag, 2005.
- [Koco4] KOCH, K.: *Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development*. Current Opinion in Plant Biology, 7(3):235–246, 2004.
- [KOMK⁺05] KARP, P. D., C. A. OUZOUNIS, C. MOORE-KOCHLACS, L. GOLDOVSKY, P. KAIPA, D. AHRÉN, S. TSOKA, N. DARZENTAS, V. KUNIN und N. LÓPEZ-BIGAS: *Expansion of the BioCyc collection of pathway/genome databases to 160 genomes*. Nucleic Acids Research, 33(19):6083–6089, 2005.
- [KPE03] KAUFFMAN, K. J., P. PRAKASH und J. S. EDWARDS: *Advances in flux balance analysis*. Current Opinion in Biotechnology, 14(5):491–496, 2003.
- [KPFC11] KINGHORN, A. D., L. PAN, J. N. FLETCHER und H. CHAI: *The relevance of higher plants in lead compound discovery programs*. Journal of Natural Products, 74(6):1539–1555, 2011.
- [KPMA05] KANG, H., S. PARK, M. MATSUOKA und G. AN: *White-core endosperm floury endosperm-4 in rice is generated by knockout mutations in the C-type pyruvate orthophosphate dikinase gene (OsPPDKB)*. Plant Journal, 42(6):901–911, 2005.
- [KRF92] KENNEDY, R. A., M. E. RUMPHO und T. C. FOX: *Anaerobic Metabolism in Plants*. Plant Physiology, 100(1):1–6, 1992.
- [KS03] KLAMT, S. und J. STELLING: *Two approaches for metabolic pathway analysis?* Trends in Biotechnology, 21(2):64–69, 2003.
- [KS08] KOSCHÜTZKI, D. und F. SCHREIBER: *Centrality analysis methods for biological networks and their application to gene regulatory networks*. Gene Regulation and Systems Biology, 2:193–201, 2008.
- [KSRG07] KLAMT, S., J. SAEZ-RODRIGUEZ und E. D. GILLES: *Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer*. BMC Systems Biology, 1:2, 2007.
- [KT00] KINNERSLEY, A. M. und F. J. TURANO: *Gamma Aminobutyric Acid (GABA) and Plant Responses to Stress*. Critical Reviews in Plant Sciences, 19(6):479–509, 2000.
- [KYOK⁺06] KOKKO, A., S. S. K. YLISAUKKO-OJA, M. KIURU, M. S. TAKATALO, P. SALMIKANGAS, J. TUIMALA, D. ARANGO, A. KARHU, L. A. AALTONEN und J. JÄNTTI: *Modeling tumor predisposing FH mutations in yeast: effects on fumarase activity, growth phenotype and gene expression profile*. International Journal of Cancer, 118(6):1340–1345, 2006.
- [KZLS10] KNOOP, H., Y. ZILLIGES, W. LOCKAU und R. STEUER: *The metabolic network of Synechocystis sp. PCC 6803: Systemic properties of autotrophic growth*. Plant Physiology, 154(1):410–422, 2010.

- [LDR⁺10] LI, C., M. DONIZELLI, N. RODRIGUEZ, H. DHARURI, L. ENDLER, V. CHELLIAH, L. LI, E. HE, A. HENRY, M. I. STEFAN, J. L. SNOEP, M. HUCKA, N. LE NOVÈRE und C. LAIBE: *BioModels Database: An enhanced, curated and annotated resource for published quantitative kinetic models*. BMC Systems Biology, 4:92, 2010.
- [LEOMo8] LEE, C., H. EUBEL, N. O'TOOLE und A. H. MILLAR: *Heterogeneity of the mitochondrial proteome for photosynthetic and non-photosynthetic Arabidopsis metabolism*. Molecular and Cellular Proteomics, 7(7):1297–1316, 2008.
- [LGDP⁺07] LEBOUTEILLER, B., A. GOUSSET-DUPONT, J. PIERRE, J. BLETON, A. TCHAPLA, M. MAUCOURT, A. MOING, D. ROLIN und J. VIDAL: *Physiological impacts of modulating phosphoenolpyruvate carboxylase levels in leaves and seeds of Arabidopsis thaliana*. Plant Science, 172(2):265–272, 2007.
- [LGPo6] LEE, J., E. P. GIANCHANDANI und J. A. PAPIN: *Flux balance analysis in the era of metabolomics*. Briefings in Bioinformatics, 7(2):140–150, 2006.
- [LLH⁺03] LEE, S., D. LEE, S. H. HONG, T. Y. KIM, H. YUN, Y. OH und S. PARK: *MetaFluxNet, a program package for metabolic pathway construction and analysis, and its use in large-scale metabolic flux analysis of Escherichia coli*. Genome Informatics. International Conference on Genome Informatics, 14:23–33, 2003.
- [LNCC11] LU, C., J. A. NAPIER, T. E. CLEMENTE und E. B. CAHOON: *New frontiers in oilseed biotechnology: meeting the global demand for vegetable oils for food, feed, biofuel, and industrial applications*. Current Opinion in Biotechnology, 22(2):252–259, 2011.
- [LPo8] LLANERAS, F. und J. PICÓ: *Stoichiometric modelling of cell metabolism*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 105(1):1–11, 2008.
- [LSB⁺10] LEWIS, N. E., G. SCHRAMM, A. BORDBAR, J. SCHELLENBERGER, M. P. ANDERSEN, J. K. CHENG, N. PATEL, A. YEE, R. A. LEWIS, R. EILS, R. KÖNIG und B. Ø. PALSSON: *Large-scale in silico modeling of metabolic interactions between cell types in the human brain*. Nature Biotechnology, 28(12):1279–1285, 2010.
- [LTT⁺03] LALONDE, L., M. TEGEDER, M. THORNEHOLST, W. B. FROMMER und J. W. PATRICK: *Phloem loading and unloading of sugars and amino acids*. Plant, Cell and Environment, 26(1):37–56, 2003.
- [Lun07] LUNN, J. E.: *Compartmentation in plant metabolism*. Journal of Experimental Botany, 58(1):35–47, 2007.
- [LW10] LINKA, N. und A. P. M. WEBER: *Intracellular metabolite transporters in plants*. Molecular Plant, 3(1):21–53, 2010.
- [MA03] MANGAN, S. und U. ALON: *Structure and function of the feed-forward loop network motif*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 100(21):11980–11985, 2003.
- [Mah50] MAHESHWARI, P.: *An introduction to the embryology of angiosperms*. McGraw-Hill publications in the botanical sciences. McGraw-Hill, New York, NY, 1 Auflage, 1950.
- [Mar96] MARCELIS, L. F.: *Sink strength as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant*. Journal of Experimental Botany, 47 Spec No:1281–1291, 1996.

- [MBo6] METZGER, J. O. und U. BORNSCHEUER: *Lipids as renewable resources: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification*. Applied and Environmental Microbiology, 71(1):13–22, 2006.
- [MC11] MAGRANE, M. und UNIPROT CONSORTIUM: *UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data*. Database (Oxford), 2011:bar009, 2011.
- [MDIG07] MIYASHITA, Y., R. DOLFERUS, K. P. ISMOND und A. G. GOOD: *Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in Arabidopsis thaliana*. Plant Journal, 49(6):1108–1121, 2007.
- [MEPZ⁺03] MCCAMMON, M. T., C. B. EPSTEIN, B. PRZYBYLA-ZAWISLAK, L. MCALISTER-HENN und R. A. BUTOW: *Global transcription analysis of Krebs tricarboxylic acid cycle mutants reveals an alternating pattern of gene expression and effects on hypoxic and oxidative genes*. Molecular Biology of the Cell, 14(3):958–972, 2003.
- [Mer93] MERTENS, E.: *ATP versus pyrophosphate: glycolysis revisited in parasitic protists*. Parasitology Today, 9(4):122–126, 1993.
- [Met12a] *MetaCyc Encyclopedia of Metabolic Pathways*. Webpage: <http://www.metacyc.org/>, 2012.
- [Met12b] *The MetNet database (MetNetDB)*. Webpage: http://www.metnetdb.org/MetNet_db.htm, 2012.
- [MF93] MACGREGOR, A. W. und G. B. FINCHER: *Barley Chemistry and Technology*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, USA, 1993.
- [MG08] MIYASHITA, Y. und A. G. GOOD: *Contribution of the GABA shunt to hypoxia-induced alanine accumulation in roots of Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology, 49(1):92–102, 2008.
- [MKL82] MEYER, A. O., G. J. KELLY und E. LATZKO: *Pyruvate Orthophosphate Dikinase from the Immature Grains of Cereal Grasses*. Plant Physiology, 69(1):7–10, 1982.
- [MNdC⁺10] MONTAGUD, A., E. NAVARRO, P. F. DE CÓRDOBA, J. F. URCHUEGUÍA und K. R. PATIL: *Reconstruction and analysis of genome-scale metabolic model of a photosynthetic bacterium*. BMC Systems Biology, 4:156, 2010.
- [MNGEK07] MASOUDI-NEJAD, A., S. GOTO, T. R. ENDO und M. KANEHISA: *KEGG bioinformatics resource for plant genomics research*. Methods in Molecular Biology, 406:437–458, 2007.
- [MNGJ⁺07] MASOUDI-NEJAD, A., S. GOTO, R. JAUREGUI, M. ITO, S. KAWASHIMA, Y. MORIYA, T. R. ENDO und M. KANEHISA: *EGENES: transcriptome-based plant database of genes with metabolic pathway information and expressed sequence tag indices in KEGG*. Plant Physiology, 144(2):857–866, 2007.
- [MNM00] M. NOMURA, N. SENTOKU, S. TAJIMA und M. MATSUOKA: *Expression patterns of cytoplasmic pyruvate, orthophosphate dikinase of rice (C3) and maize (C4) in a C3 plant, rice*. Australian Journal of Plant Physiology, 27(4):343–347, 2000.
- [Mor93] MORRISON, W. R.: *Barley Chemistry and Technology*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, USA, 1993.

- [MR02] MORGAN, J. A. und D. RHODES: *Mathematical modeling of plant metabolic pathways*. *Metabolic Engineering*, 4(1):80–89, 2002.
- [MRF⁺11] MELKUS, G., H. ROLLETSCHEK, J. FUCHS, V. RADCHUK, E. GRAFAHREND-BELAU, N. SREENIVASULU, T. RUTTEN, D. WEIER, N. HEINZEL, F. SCHREIBER, T. ALTMANN, P. M. JAKOB und L. BORISJUK: *Dynamic ¹³C/¹H NMR imaging uncovers sugar allocation in the living seed*. *Plant Biotechnology Journal*, 9(9):1022–1037, 2011.
- [MS90] MAHAJAN, R. und R. SINGH: *Sucrose metabolism in developing endosperm of immature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain*. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 27(5):324–328, 1990.
- [MS92] MAHAJAN, R. und R. SINGH: *Properties of ATP-dependent phosphofructokinase from endosperm of developing wheat (*Triticum aestivum* L.) grains*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 1:45–48, 1992.
- [MS03] MAHADEVAN, R. und C. H. SCHILLING: *The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models*. *Metabolic Engineering*, 5(4):264–276, 2003.
- [MSH⁺00] MATSUKURA, C., T. SAITOH, T. HIROSE, R. OHSUGI, P. PERATA und J. YAMAGUCHI: *Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companion cell-specific sucrose transporter (*OsSUT1*) induced by sugar and light*. *Plant Physiology*, 124(1):85–93, 2000.
- [MZ03] MA, H. und A. ZENG: *Reconstruction of metabolic networks from genome data and analysis of their global structure for various organisms*. *Bioinformatics*, 19(2):270–277, 2003.
- [MZR03] MUELLER, L. A., P. ZHANG und S. Y. RHEE: *AraCyc: a biochemical pathway database for *Arabidopsis**. *Plant Physiology*, 132(2):453–460, 2003.
- [NC01] NELSON, D. und M. COX (Herausgeber): *Lehninger Biochemie*. Springer, Berlin, 3. Auflage, 2001.
- [NHM⁺09] NOVÈRE, N. LE, M. HUCKA, H. MI, S. MOODIE, F. SCHREIBER, A. SOROKIN, E. DEMIR, K. WEGNER, M. I. ALADJEM, S. M. WIMALARATNE, F. T. BERGMAN, R. GAUGES, P. GHAZAL, H. KAWAJI, L. LI, Y. MATSUOKA, A. VILLÉGER, S. E. BOYD, L. CALZONE, M. COURTOT, U. DOGRUSOZ, T. C. FREEMAN, A. FUNAHASHI, S. GHOSH, A. JOURAKU, S. KIM, F. KOLPAKOV, A. LUNA, S. SAHLE, E. SCHMIDT, S. WATTERSON, G. WU, I. GORYANIN, D. B. KELL, C. SANDER, H. SAURO, J. L. SNOEP, K. KOHN und H. KITANO: *The Systems Biology Graphical Notation*. *Nature Biotechnology*, 27(8):735–741, 2009.
- [Nie94] NIELSEN, T. H.: *Pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from barley seedlings. Isolation, subunit composition and kinetic characterization*. *Physiologia Plantarum*, 92(2):311–321, 1994.
- [NN92] NEWMAN, C.W. und R. K. NEWMAN: *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*. CAB International, Wallingford, UK, 1992.
- [NNCG⁺07] NUNES-NESE, A., F. CARRARI, Y. GIBON, R. SULPICE, A. LYTOVCHENKO, J. FISAHN, J. GRAHAM, R. G. RATCLIFFE, L. J. SWEETLOVE und A. R. FERNIE: *Deficiency of mitochondrial fumarate activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function*. *Plant Journal*, 50(6):1093–1106, 2007.

- [Nuro03] NURSE, P.: *Systems biology: understanding cells*. Nature, 424(6951):883, 2003.
- [Oano03] OANCEA, I.: *Topological analysis of metabolic and regulatory networks by decomposition methods*. Doktorarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, 2003.
- [OEC04] OECD: *Consensus document on compositional considerations for new variety of barley (Hordeum vulgare): key food and feed nutrients and anti-nutrients*. In: OECD (Herausgeber): *OECD Environmental Health and Safety Publications*, Band 12 der Reihe *Series on the Safety of Novel Foods and Feeds*, Seiten 1–42, Paris, 2004.
- [OKHo2] OWEN, O. E., S. C. KALHAN und R. W. HANSON: *The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function*. Journal of Biological Chemistry, 277(34):30409–30412, 2002.
- [OLUW⁺08] OLIVER, S. N., J. E. LUNN, E. URBANCZYK-WOCHNIAK, A. LYTOVCHENKO, J. T. VAN DONGEN, B. FAIX, E. SCHMÄLZLIN, A. R. FERNIE und P. GEIGENBERGER: *Decreased expression of cytosolic pyruvate kinase in potato tubers leads to a decline in pyruvate resulting in an in vivo repression of the alternative oxidase*. Plant Physiology, 148(3):1640–1654, 2008.
- [OPK92] OLSEN, O.-A., R. H. POTTER und R. KALLA: *Histo-differentiation and molecular biology of developing cereal endosperm*. Seed Science Research, 3:117–131, 1992.
- [OS04] OLIVIER, B. G. und J. L. SNOEP: *Web-based kinetic modelling using JWS Online*. Bioinformatics, 20(13):2143–2144, 2004.
- [PABS04] PENG, L., M. J. ARAUZO-BRAVO und K. SHIMIZU: *Metabolic flux analysis for a ppc mutant Escherichia coli based on ¹³C-labelling experiments together with enzyme activity assays and intracellular metabolite measurements*. FEMS Microbiology Letters, 235(1):17–23, 2004.
- [PAFo4] POOLMAN, M. G., H. E. ASSMUS und D. A. FELL: *Applications of metabolic modelling to plant metabolism*. Journal of Experimental Botany, 55(400):1177–1186, 2004.
- [Palo6a] PALSSON, B. Ø.: *Parametric Sensitivity*. In: PALSSON, B. Ø. (Herausgeber): *Systems Biology: Properties of Reconstructed Networks*, Kapitel 16, Seiten 265–281. Cambridge University Press, 2006.
- [Palo6b] PALSSON, B. Ø.: *Systems Biology: Properties of Reconstructed Networks*. Cambridge University Press, 2006.
- [Pat] *Pathway Analyzer*. Webpage: <http://www.sourceforge.net/projects/pathwayanalyser/>.
- [Pat12] *The PathCase Database: Genomic Pathways Database and Biological Data Management*. Webpage: <http://www.nashua.cwru.edu/PathwaysWeb/>, 2012.
- [PCTK11] PILALIS, E., A. CHATZIOANNOU, B. THOMASSET und F. KOLISIS: *An in silico compartmentalized metabolic model of Brassica napus enables the systemic study of regulatory aspects of plant central metabolism*. Biotechnology and Bioengineering, 108(7):1673–1682, 2011.
- [PD02] PORTAIS, J. und A. DELORT: *Carbohydrate cycling in micro-organisms: what can ¹³C-NMR tell us?* FEMS Microbiology Reviews, 26(4):375–402, 2002.

- [PGF⁺04] PATRON, N. J., B. GREBER, B. F. FAHY, D. A. LAURIE, M. L. PARKER und K. DENYER: *The lys5 mutations of barley reveal the nature and importance of plastidial ADP-Glc transporters for starch synthesis in cereal endosperm*. *Plant Physiology*, 135(4):2088–2097, 2004.
- [PKvI⁺08] PICO, A. R., T. KELDER, M. P. VAN IERSEL, K. HANSPERS, B. R. CONKLIN und C. EVELO: *WikiPathways: pathway editing for the people*. *PLoS Biology*, 6(7):e184, 2008.
- [Pla96] PLAXTON, W. C.: *The organization and regulation of plant glycolysis*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47:185–214, 1996.
- [Pla05] PLAXTON, W. C.: *Metabolic flexibility helps plants to survive stress*. In: TAIZ, L. und E. ZEIGLER (Herausgeber): *Plant Physiology*. Sinauer, 5. Auflage, 2005.
- [Pla12a] *Plant Ontology Consortium*. Webpage: <http://www.plantontology.org/>, 2012.
- [Pla12b] *PlantCyc: a plant metabolic pathway database*. Webpage: <http://www.plantcyc.org/>, 2012.
- [PMSF09] POOLMAN, M. G., L. MIGUET, L. J. SWEETLOVE und D. A. FELL: *A genome-scale metabolic model of Arabidopsis and some of its properties*. *Plant Physiology*, 151(3):1570–1581, 2009.
- [PO96] PATRICK, J. W. und C. E. OFFLER: *Post-sieve element transport of photoassimilates in sink regions*. *Journal of Experimental Botany*, 47 Spec No:1165–1177, 1996.
- [PO01] PATRICK, J. W. und C. E. OFFLER: *Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds*. *Journal of Experimental Botany*, 52(356):551–564, 2001.
- [PPP⁺02] PICAULT, N., L. PALMIERI, I. PISANO, M. HODGES und F. PALMIERI: *Identification of a novel transporter for dicarboxylates and tricarboxylates in plant mitochondria. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27):24204–24211, 2002.
- [PRP04] PRICE, N. D., J. L. REED und B. Ø. PALSSON: *Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(11):886–897, 2004.
- [PSH⁺95] PAUL, M., U. SONNEWALD, M. HAJIREZAEI, D. DENNIS und M. STITT: *Transgenic tobacco plants with strongly decreased expression of pyrophosphate: Fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase do not differ significantly from wild type in photosynthate partitioning, plant growth or their ability to cope with limiting phosphate, limiting nitrogen and suboptimal temperatures*. *Planta*, 196:277–283, 1995.
- [PSP⁺04] PAPIN, J. A., J. STELLING, N. D. PRICE, S. KLAMT, S. SCHUSTER und B. Ø. PALSSON: *Comparison of network-based pathway analysis methods*. *Trends in Biotechnology*, 22(8):400–405, 2004.

- [PSP⁺11] PARMAR, A., N. K. SINGH, A. PANDEY, E. GNANSOUNOU und D. MADAMWAR: *Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels*. *Bioresource Technology*, 102(22):10163–10172, 2011.
- [pub12] *PubMed*. Webpage: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, 2012.
- [PZGDM99] PRZYBYLA-ZAWISLAK, B., D. M. GADDE, K. DUCHARME und M. T. MCCAMMON: *Genetic and biochemical interactions involving tricarboxylic acid cycle (TCA) function using a collection of mutants defective in all TCA cycle genes*. *Genetics*, 152(1):153–166, 1999.
- [QTL88] QUARRIE, S. A., R. TUBEROSA und P. G. LISTER: *Abscisic acid in developing grains of wheat and barley genotypes differing in grain weight*. *Plant Growth Regulation*, 7:3–17, 1988.
- [QXLZ09] QIU, X., W. XIE, X. LIAN und Q. ZHANG: *Molecular analyses of the rice glutamate dehydrogenase gene family and their response to nitrogen and phosphorous deprivation*. *Plant Cell Reports*, 28(7):1115–1126, 2009.
- [RBK⁺02] ROLLETSCHKE, H., L. BORISJUK, M. KOSCHORRECK, U. WOBUS und H. WEBER: *Legume embryos develop in a hypoxic environment*. *Journal of Experimental Botany*, 53(371):1099–1107, 2002.
- [RBR⁺06] RADCHUK, V., L. BORISJUK, R. RADCHUK, H. STEINBISS, H. ROLLETSCHKE, S. BROEDERS und U. WOBUS: *Jekyll encodes a novel protein involved in the sexual reproduction of barley*. *Plant Cell*, 18(7):1652–1666, 2006.
- [RC11] ROGALSKI, M. und H. CARRER: *Engineering plastid fatty acid biosynthesis to improve food quality and biofuel production in higher plants*. *Plant Biotechnology Journal*, 9(5):554–564, 2011.
- [REL07] RIOS-ESTEPA, R. und B. M. LANGE: *Experimental and mathematical approaches to modeling plant metabolic networks*. *Phytochemistry*, 68(16-18):2351–2374, 2007.
- [REMP01] RAMAKRISHNA, R., J. S. EDWARDS, A. MCCULLOCH und B. Ø. PALSSON: *Flux-balance analysis of mitochondrial energy metabolism: consequences of systemic stoichiometric constraints*. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 280(3):R695–R704, 2001.
- [RERR98] ROSCHER, A., L. EMSLEY, P. RAYMOND und C. ROBY: *Unidirectional steady state rates of central metabolism enzymes measured simultaneously in a living plant tissue*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(39):25053–25061, 1998.
- [rhe12] *Rhea: Annotated reactions database*. Webpage: <http://www.ebi.ac.uk/rhea/>, 2012.
- [RHH⁺02] RADEMACHER, T., R. E. HÄUSLER, H. HIRSCH, L. ZHANG, V. LIPKA, D. WEIER, F. KREUZALER und C. PETERHÄNSEL: *An engineered phosphoenolpyruvate carboxylase redirects carbon and nitrogen flow in transgenic potato plants*. *Plant Journal*, 32(1):25–39, 2002.
- [Ric96] RICHTER, GERHARD (Herausgeber): *Biochemie der Pflanzen*. Thieme, Stuttgart, New York, 1996.
- [RKWB05] ROLLETSCHKE, H., K. KOCH, U. WOBUS und L. BORISJUK: *Positional cues for the starch/lipid balance in maize kernels and resource partitioning to the embryo*. *Plant Journal*, 42(1):69–83, 2005.

- [RLA⁺10] ROCHA, M., F. LICAUSI, W. L. ARAÚJO, A. NUNES-NESE, L. SODEK, A. R. FERNIE und J. T. VAN DONGEN: *Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 152(3):1501–1513, 2010.
- [RME⁺10] ROCHA, I., P. MAIA, P. EVANGELISTA, P. VILAÇA, S. SOARES, J. P. PINTO, J. NIELSEN, K. R. PATIL, E. C. FERREIRA und M. ROCHA: *OptFlux: an open-source software platform for in silico metabolic engineering*. *BMC Systems Biology*, 4:45, 2010.
- [RMGB⁺11] ROLLETSCHKE, H., G. MELKUS, E. GRAFAHREND-BELAU, J. FUCHS, N. HEINZEL, F. SCHREIBER, P. M. JAKOB und L. BORISJUK: *Combined noninvasive imaging and modeling approaches reveal metabolic compartmentation in the barley endosperm*. *Plant Cell*, 23(8):3041–3054, 2011.
- [Rol12] ROLLETSCHKE, H.: *Persönliche Kommunikation*, 2012.
- [RP03] REED, J. L. und B. Ø. PALSSON: *Thirteen years of building constraint-based in silico models of Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 185(9):2692–2699, 2003.
- [RRG⁺07] RADCHUK, R., V. RADCHUK, K. GÖTZ, H. WEICHERT, A. RICHTER, R. J. N. EMERY, W. WESCHKE und H. WEBER: *Ectopic expression of phosphoenolpyruvate carboxylase in Vicia narbonensis seeds: effects of improved nutrient status on seed maturation and transcriptional regulatory networks*. *Plant Journal*, 51(5):819–839, 2007.
- [RSM⁺02] RAVASZ, E., A. L. SOMERA, D. A. MONGRU, Z. N. OLTVAI und A.-L. BARABÁSI: *Hierarchical Organization of Modularity in Metabolic Networks*. *Science*, 297(5586):1551 – 1555, 2002.
- [RTD⁺10] RADRICH, K., Y. TSURUOKA, P. DOBSON, A. GEVORGYAN, N. SWAINSTON, G. BAART und J. SCHWARTZ: *Integration of metabolic databases for the reconstruction of genome-scale metabolic networks*. *BMC Systems Biology*, 4:114, 2010.
- [RWW⁺04] ROLLETSCHKE, H., W. WESCHKE, H. WEBER, U. WOBUS und L. BORISJUK: *Energy state and its control on seed development: starch accumulation is associated with high ATP and steep oxygen gradients within barley grains*. *Journal of Experimental Botany*, 55(401):1351–1359, 2004.
- [SAR⁺04] SREENIVASULU, N., L. ALTSCHMIED, V. RADCHUK, S. GUBATZ, U. WOBUS und W. WESCHKE: *Transcript profiles and deduced changes of metabolic pathways in maternal and filial tissues of developing barley grains*. *Plant Journal*, 37(4):539–553, 2004.
- [SBM99] SHELP, B. J., A. W. BOWN und M. D. MCLEAN: *Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid*. *Trends in Plant Science*, 4(11):446–452, 1999.
- [SBN⁺10] SWEETLOVE, L. J., K. F. M. BEARD, A. N. NESI, A. R. FERNIE und R. G. RATCLIFFE: *Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle*. *Trends in Plant Science*, 15(8):462–470, 2010.
- [SCC⁺11] SCHREIBER, F., C. COLMSEE, T. CZAUDERNA, E. GRAFAHREND-BELAU, A. HARTMANN, A. JUNKER, B. H. JUNKER, M. KLAPPERSTÜCK, U. SCHOLZ und S. WEISE: *MetaCrop 2.0: managing and exploring information about crop plant metabolism*. *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue):D1173–D1177, 2011.

- [SCF⁺02] SCHILLING, C. H., M. W. COVERT, I. FAMILI, G. M. CHURCH, J. S. EDWARDS und B. Ø. PALSSON: *Genome-scale metabolic model of Helicobacter pylori* 26695. *Journal of Bacteriology*, 184(16):4582–4593, 2002.
- [Sch93] SCHNYDER, H.: *The role of carbohydrate storage and redistribution in the source-sink relations of wheat and barley during grain filling a review*. *New Phytologist*, 123(2):233–245, 1993.
- [Scho8a] SCHWENDER, J.: *Metabolic flux analysis as a tool in metabolic engineering of plants*. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2):131–137, 2008.
- [SCH⁺08b] SHLOMI, T., M. N. CABILI, M. J. HERRGÅRD, B. Ø. PALSSON und E. RUPPIN: *Network-based prediction of human tissue-specific metabolism*. *Nature Biotechnology*, 26(9):1003–1010, 2008.
- [Scho9] SCHWENDER, J.: *Kinetic Properties of metabolic Networks*. In: SCHWENDER, J. (Herausgeber): *Plant Metabolic Networks*, Seiten 307 – 322. Springer Verlag, 2009.
- [SDF99] SCHUSTER, S., T. DANDEKAR und D. A. FELL: *Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering*. *Trends in Biotechnology*, 17(2):53–60, 1999.
- [SELP00] SCHILLING, C. H., J. S. EDWARDS, D. LETSCHER und B. Ø. PALSSON: *Combining pathway analysis with flux balance analysis for the comprehensive study of metabolic systems*. *Biotechnology and Bioengineering*, 71(4):286–306, 2000.
- [SFD00] SCHUSTER, S., D. A. FELL und T. DANDEKAR: *A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks*. *Nature Biotechnology*, 18(3):326–332, 2000.
- [SFF08] SWEETLOVE, L. J., D. FELL und A. R. FERNIE: *Getting to grips with the plant metabolic network*. *Biochemical Journal*, 409(1):27–41, 2008.
- [SGC⁺11] SCHEER, M., A. GROTE, A. CHANG, I. SCHOMBURG, C. MUNARETTO, M. L. ROTHER, C. SÖHNGEN, M. STELZER, J. THIELE und D. SCHOMBURG: *BRENDA, the enzyme information system in 2011*. *Nucleic Acids Research*, 39(Database issue):D670–D676, 2011.
- [SGOSH04] SCHWENDER, J., F. GOFFMAN, J. B. OHLROGGE und Y. SHACHAR-HILL: *Ru-bisco without the Calvin cycle improves the carbon efficiency of developing green seeds*. *Nature*, 432(7018):779–782, 2004.
- [SH94] SCHUSTER, S. und C. HILGETAG: *On elementary flux modes in biochemical reaction systems at steady state*. *Journal of Biological Systems*, 2(2):165–182, 1994.
- [Sha09] SHANKS, J. V.: *Foreword*. In: J., SCHWENDER (Herausgeber): *Plant Metabolic Networks*, Seiten 5–6. Springer Verlag, 2009.
- [She92] SHEWRY, P. R.: *Nitrogen Metabolism of Plants*. Clarendon Press, Oxford, 1992.
- [Shio7] SHIRATAKE, K.: *Genetics of Sucrose Transporter in Plants*. *Genes, Genomes and Genomics*, 1(1):73–80, 2007.

- [SHWF02] SCHUSTER, S., C. HILGETAG, J. H. WOODS und D. A. FELL: *Reaction routes in biochemical reaction systems: algebraic properties, validated calculation procedure and example from nucleotide metabolism*. *Journal of Mathematical Biology*, 45(2):153–181, 2002.
- [Sim] *SimPheny: A Computational Infrastructure for Systems Biology*. Webpage: <http://www.genomatica.com/>.
- [Sing99] SINGH, B. K.: *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*. Marcel Dekker, New York, 1999.
- [SJ10] SCHALLAU, K. und B. H. JUNKER: *Simulating plant metabolic pathways with enzyme-kinetic models*. *Plant Physiology*, 152(4):1763–1771, 2010.
- [SKS07] SCHUETZ, R., L. KUEPFER und U. SAUER: *Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*, 3:119, 2007.
- [SLP00] SCHILLING, C. H., D. LETSCHER und B. Ø. PALSSON: *Theory for the systemic definition of metabolic pathways and their use in interpreting metabolic function from a pathway-oriented perspective*. *Journal of Theoretical Biology*, 203(3):229–248, 2000.
- [SM05] SHASTRI, A. A. und J. A. MORGAN: *Flux balance analysis of photoautotrophic metabolism*. *Biotechnology Progress*, 21(6):1617–1626, 2005.
- [SOMMA02] SHEN-ORR, S. S., R. MILO, S. MANGAN und U. ALON: *Network motifs in the transcriptional regulation network of Escherichia coli*. *Nature Genetics*, 31(1):64–68, 2002.
- [SR11] SWEETLOVE, L. J. und R. G. RATCLIFFE: *Flux-balance modeling of plant metabolism*. *Frontiers in Plant Science*, 2:1 – 10, August 2011.
- [SRS⁺06] SREENIVASULU, N., V. RADCHUK, M. STRICKERT, O. MIERSCH, W. WESCHKE und U. WOBUS: *Gene expression patterns reveal tissue-specific signaling networks controlling programmed cell death and ABA-regulated maturation in developing barley seeds*. *Plant Journal*, 47(2):310–327, 2006.
- [SS07] SMITH, A. M. und M. STITT: *Coordination of carbon supply and plant growth*. *Plant, Cell and Environment*, 30(9):1126–1149, 2007.
- [SSHO06] SCHWENDER, J., Y. SHACHAR-HILL und J. B. OHLROGGE: *Mitochondrial metabolism in developing embryos of Brassica napus*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(45):34040–34047, 2006.
- [SSK10] STITT, M., R. SULPICE und J. KEURENTJES: *Metabolic networks: how to identify key components in the regulation of metabolism and growth*. *Plant Physiology*, 152(2):428–444, 2010.
- [SSM11] SAHA, R., P. F. SUTHERS und C. D. MARANAS: *Zea mays iRS1563: a comprehensive genome-scale metabolic reconstruction of maize metabolism*. *PLoS ONE*, 6(7):e21784, 2011.
- [SSPH99] SCHILLING, C. H., S. SCHUSTER, B. Ø. PALSSON und R. HEINRICH: *Metabolic pathway analysis: basic concepts and scientific applications in the post-genomic era*. *Biotechnology Progress*, 15(3):296–303, 1999.

- [SSvdG⁺03] SCHWACKE, R., A. SCHNEIDER, E. VAN DER GRAAFF, K. FISCHER, E. CATONI, M. DESIMONE, W. B. FROMMER, U. FLÜGGE und R. KUNZE: *ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins*. *Plant Physiology*, 131(1):16–26, 2003.
- [Ste04] STELLING, J.: *Mathematical models in microbial systems biology*. *Current Opinion in Microbiology*, 7(5):513–518, 2004.
- [Sti90] STITT, M.: *Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41:153–158, 1990.
- [Sti98] STITT, M.: *Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP*. *Botanica Acta*, 111:167–175, 1998.
- [Str95] STRYER, LUBERT (Herausgeber): *Biochemistry*. Freeman, New York, NY, 4. Auflage, 1995.
- [SWS⁺95] SHELP, B. J., C. S. WALTON, W. A. SNEDDEN, L. G. TUIN, I. J. ORESNIK und D. B. LAZZELL: *Gaba shunt in developing soybean seeds is associated with hypoxia*. *Physiologia Plantarum*, 94(2):219–228, 1995.
- [Sym82] *Symbolism and Terminology in Enzyme Kinetics Recommendations 1981*. *European Journal of Biochemistry*, 128:281–291, 1982.
- [TBRR11] TSCHIRSCH, H., L. BORISJUK, T. RUTTEN und H. ROLLETSCHKE: *Gradients of seed photosynthesis and its role for oxygen balancing*. *Biosystems*, 103(2):302–308, 2011.
- [TCH⁺08] TSEMETZIS, N., M. COUCHMAN, J. HIGGINS, A. SMITH, J. H. DOONAN, G. J. SEIFERT, E. E. SCHMIDT, I. VASTRIK, E. BIRNEY, G. WU, P. D'EUSTACHIO, L. D. STEIN, R. J. MORRIS, M. W. BEVAN und S. V. WALSH: *Arabidopsis reactome: a foundation knowledgebase for plant systems biology*. *Plant Cell*, 20(6):1426–1436, 2008.
- [THL06] TILMAN, D., J. HILL und C. LEHMAN: *Carbon-negative biofuels from low-input high-diversity grassland biomass*. *Science*, 314(5805):1598–1600, 2006.
- [Tito3] TITTMANN, P.: *Graphentheorie: Eine anwendungsorientierte Einführung*. Fachbuchverlag Leipzig, 2003.
- [TP10] THIELE, I. und B. Ø. PALSSON: *A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction*. *Nature Protocols*, 5(1):93–121, 2010.
- [Tsc12] TSCHIRSCH, H.: *Persönliche Kommunikation*, 2012.
- [TTON06] TOYOTA, K., M. TAMURA, T. OH DAN und Y. NAKAMURA: *Expression profiling of starch metabolism-related plastidic translocator genes in rice*. *Planta*, 223(2):248–257, 2006.
- [TVD⁺02] THORBJORNSEN, T., P. VILLAND, K. DENYER, O. OLSEN und A. M. SMITH: *Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphorylase occur inside and outside the amyloplasts in barley endosperm*. *The Plant Journal*, 10(2):243–250, 2002.
- [TVKO96] THORBJORNSEN, T., P. VILLAND, L. A. KLECZKOWSKI und O. A. OLSEN: *A single gene encodes two different transcripts for the ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit from barley (*Hordeum vulgare*)*. *Biochemical Journal*, 313 (Pt 1):149–154, 1996.

- [TWo6] TEGEDER, M. und A. P. M. WEBER: *Metabolite transporters in the control of plant primary metabolism*. In: PLAXTON, W. und M. MCMANUS (Herausgeber): *Control of Primary Metabolism in Plants*, Seiten 85 – 120. Blackwell Publishing, 2006.
- [Urbo6] URBANCZIK, R.: *SNA—a toolbox for the stoichiometric analysis of metabolic networks*. BMC Bioinformatics, 7:129, 2006.
- [Var86] VARVIKKO, T.: *Microbially corrected amino acid composition of rumen-undegraded feed protein and amino acid degradability in the rumen of feeds enclosed in nylon bags*. British Journal of Nutrition, 56:131–140, 1986.
- [VBP93a] VARMA, A., B. W. BOESCH und B. Ø. PALSSON: *Biochemical production capabilities of Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering, 42(1):59–73, 1993.
- [VBP93b] VARMA, A., B. W. BOESCH und B. Ø. PALSSON: *Stoichiometric interpretation of Escherichia coli glucose catabolism under various oxygenation rates*. Applied and Environmental Microbiology, 59(8):2465–2473, 1993.
- [vDL02] DIEN, S. J. VAN und M. E. LIDSTROM: *Stoichiometric model for evaluating the metabolic capabilities of the facultative methylotroph Methylobacterium extorquens AM1, with application to reconstruction of C(3) and C(4) metabolism*. Biotechnology and Bioengineering, 78(3):296–312, 2002.
- [vDRD⁺04] DONGEN, J. T. VAN, G. W. ROEB, M. DAUTZENBERG, A. FROEHLICH, H. VI-GEOLAS, P. E. H. MINCHIN und P. GEIGENBERGER: *Phloem import and storage metabolism are highly coordinated by the low oxygen concentrations within developing wheat seeds*. Plant Physiology, 135(3):1809–1821, 2004.
- [VP93] VARMA, A. und B. Ø. PALSSON: *Metabolic Capabilities of Escherichia coli II. Optimal Growth Patterns*. Journal of Theoretical Biology, 165(4):503–522, 1993.
- [VP94a] VARMA, A. und B. Ø. PALSSON: *Metabolic Flux Balancing: Basic Concepts, Scientific and Practical Use*. Nature Biotechnology, 12:994–998, 1994.
- [VP94b] VARMA, A. und B. Ø. PALSSON: *Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type Escherichia coli W3110*. Applied and Environmental Microbiology, 60(10):3724–3731, 1994.
- [VVP10] V., DONALD J., J. G. VOET und C. W. PRATT (Herausgeber): *Lehrbuch der Biochemie*. Wiley-VCH, Weinheim, 2. Auflage, 2010.
- [WA03] WOLF, D. M. und A. P. ARKIN: *Motifs, modules and games in bacteria*. Current Opinion in Microbiology, 6(2):125–134, 2003.
- [WBo1] WITTIG, U. und A. DE BEUCKELAER: *Analysis and comparison of metabolic pathway databases*. Briefings in Bioinformatics, 2(2):126–142, 2001.
- [WBWW98] WILLENBRINK, J., G. D. BONNETT, S. WILLENBRINK und I. F. WARDLAW: *Changes of enzyme activities associated with the mobilization of carbohydrate reserves (fructans) from the stem of wheat during kernel filling*. New Phytologist, 139:471–478, 1998.
- [WDSL91] WINNING, B. M., C. D. DAY, C. J. SARAH und C. J. LEAVER: *Nucleotide sequence of two cDNAs encoding the adenine nucleotide translocator from Zea mays L*. Plant Molecular Biology, 17(2):305–307, 1991.

- [Web09] WEBER, A. P. M.: *Definition of plant metabolic networks*. In: SCHWENDER, J. (Herausgeber): *Plant Metabolic Networks*, Seiten 9 – 38. Springer Verlag, 2009.
- [web12] *Web of Knowledge*. Webpage: <http://www.apps.webofknowledge.com/>, 2012.
- [WF95] WANG, N. und D. B. FISHER: *Sucrose Release into the Endosperm Cavity of Wheat Grains Apparently Occurs by Facilitated Diffusion across the Nucellar Cell Membranes*. *Plant Physiology*, 109(2):579–585, 1995.
- [WGH⁺98] WEBER, H., S. GOLOMBEK, U. HEIM, L. BORISJUK, R. PANITZ, R. MANTEUFEL und U. WOBUS: *Integration of carbohydrate and nitrogen metabolism during legume seed development: implication for storage product synthesis*. *Journal of plant physiology*, 152(6):641–648, 1998.
- [WKG⁺06] WEISE, S., I. GROSSE, C. KLUKAS, D. KOSCHÜTZKI, U. SCHOLZ, F. SCHREIBER und B. H. JUNKER: *Meta-All: a system for managing metabolic pathway information*. *BMC Bioinformatics*, 7:465, 2006.
- [Wik12] *WikiPathways: Pathway Editing for the People*. Webpage: <http://www.wikipathways.org/>, 2012.
- [WKG⁺11] WITTIG, U., R. KANIA, M. GOLEBIEWSKI, M. REY, L. SHI, L. JONG, E. ALGAA, A. WEIDEMANN, H. SAUER-DANZWITZ, S. MIR, O. KREBS, M. BITTKOWSKI, E. WETSCH, I. ROJAS und W. MÜLLER: *SABIO-RK–database for biochemical reaction kinetics*. *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue):D790–D796, 2011.
- [WPG⁺03] WESCHKE, W., R. PANITZ, S. GUBATZ, Q. WANG, R. RADCHUK, H. WEBER und U. WOBUS: *The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development*. *Plant Journal*, 33(2):395–411, 2003.
- [WPH⁺10] WILLIAMS, T. C. R., M. G. POOLMAN, A. J. M. HOWDEN, M. SCHWARZLANDER, D. A. FELL, R. G. RATCLIFFE und L. J. SWEETLOVE: *A genome-scale metabolic model accurately predicts fluxes in central carbon metabolism under stress conditions*. *Plant Physiology*, 154(1):311–323, 2010.
- [WPS⁺00] WESCHKE, W., R. PANITZ, N. SAUER, Q. WANG, B. NEUBOHN, H. WEBER und U. WOBUS: *Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation*. *Plant Journal*, 21(5):455–467, 2000.
- [WSB⁺05] WOBUS, U., N. SREENIVASULU, L. BORISJUK, H. ROLLETSCHKE, R. PANITZ, S. GUBATZ und W. WESCHKE: *Molecular physiology and genomics of developing barley grains*. *Recent research developments in plant molecular biology*, 2:1–29, 2005.
- [WW00] WARDLAW, I. F. und J. WILLENBRINK: *Mobilization of fructan reserves and changes in enzyme activities in wheat stems correlate with water stress during kernel filling*. *New Phytologist*, 148:413–422, 2000.
- [WW08] WRIGHT, J. und A. WAGNER: *The Systems Biology Research Tool: evolvable open-source software*. *BMC Systems Biology*, 2:55, 2008.

- [WXS⁺09] WANG, Y., J. XIAO, T. O. SUZEK, J. ZHANG, J. WANG und S. H. BRYANT: *PubChem: a public information system for analyzing bioactivities of small molecules*. *Nucleic Acids Research*, 37(Web Server issue):W623–W633, 2009.
- [XMJ⁺08] XUE, G., C. L. MCINTYRE, C. L. D. JENKINS, D. GLASSOP, A. F. VAN HERWAARDEN und R. SHORTER: *Molecular dissection of variation in carbohydrate metabolism related to water-soluble carbohydrate accumulation in stems of wheat*. *Plant Physiology*, 146(2):441–454, 2008.
- [XSL⁺89] XU, D., S. S. SUNG, T. LOBODA, P. P. KORMANIK und C. C. BLACK: *Characterization of Sucrolysis via the Uridine Diphosphate and Pyrophosphate-Dependent Sucrose Synthase Pathway*. *Plant Physiology*, 90(2):635–642, 1989.
- [YEW⁺05] YANG, Y., L. ENGIN, E. S. WURTELE, C. CRUZ-NEIRA und J. A. DICKERSON: *Integration of metabolic networks and gene expression in virtual reality*. *Bioinformatics*, 21(18):3645–3650, 2005.
- [ZCW⁺09] ZHOU, Y., K. CHAN, T. L. WANG, C. L. HEDLEY, C. E. OFFLER und J. W. PATRICK: *Intracellular sucrose communicates metabolic demand to sucrose transporters in developing pea cotyledons*. *Journal of Experimental Botany*, 60(1):71–85, 2009.
- [ZOSo3] ZEVEDEI-OANCEA, I. und S. SCHUSTER: *Topological analysis of metabolic networks based on Petri net theory*. In *Silico Biology*, 3(3):323–345, 2003.
- [ZSAvL09] ZUDILOVA-SEINSTRAS, E., T. ADRIAANSEN und R. VAN LIERE: *Overview of Interactive Visualization*. In: ZUDILOVA-SEINSTRAS, E., T. ADRIAANSEN und R. VAN LIERE (Herausgeber): *Trends in Interactive Visualization: State-of-the-Art Survey*, Seiten 3–18. Springer, 2009.

PUBLIKATIONEN

1. SCHREIBER F., C. COLMSEE, T. CZAUDERNA, E. GRAFAHREND-BELAU, A. HARTMANN, A. JUNKER, B.H. JUNKER, M. KLAPPERSTÜCK, U. SCHOLZ und S. WEISE: *MetaCrop 2.0: managing and exploring information about crop plant metabolism*. Nucleic Acids Research 40(Database issue):D1173-7, 2012.
2. GRAFAHREND-BELAU E., B.H. JUNKER und F. SCHREIBER: Plant metabolic pathways: Database and pipeline for stoichiometric analysis. In: AGRAWAL G.K., RAKWAL R. (Herausgeber): *Seed development: omics technologies toward improvement of seed quality and crop yield*. Springer, 2012.
3. KRACH C., E. GRAFAHREND-BELAU, H. POSKAR, K. SCHALLAU, F. SCHREIBER und B.H. JUNKER: *Using systems approaches to analyze metabolic networks involved in storage reserve synthesis in developing seeds*. In: AGRAWAL G.K., RAKWAL R. (Herausgeber): *Seed development: omics technologies toward improvement of seed quality and crop yield*. Springer, 2012.
4. LOTZ K, A. HARTMANN, E. GRAFAHREND-BELAU, F. SCHREIBER und B.H. JUNKER: *Flux balance analysis, elementary flux modes and their applications to plant metabolism*. In: SRIRAM G. (Herausgeber): *Plant Metabolism: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology, 2012.
5. SCHREIBER F, E. GRAFAHREND-BELAU, O. KOHLBACHER und H. MI: *Metabolic pathways and networks*. In: O'DONOGHUE S.I., PROCTER J.B. (Herausgeber): *Visualizing biological data - a practical guide*. Cambridge University Press, 2012.
6. ROLLETSCHKE H, G. MELKUS, E. GRAFAHREND-BELAU, J. FUCHS, N. HEINZEL, F. SCHREIBER, P.M. JAKOB und L. BORISJUK: *Combined noninvasive imaging and modeling approaches reveal metabolic compartmentation in the barley endosperm*. Plant Cell 23(8):3041-54, 2011.
7. MELKUS G, H. ROLLETSCHKE, J. FUCHS, V. RADCHUK, E. GRAFAHREND-BELAU, N. SREENIVASULU, T. RUTTEN, D. WEIER, N. HEINZEL, F. SCHREIBER, T. ALTMANN, P.M. JAKOB und L. BORISJUK: *Dynamic $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ NMR imaging uncovers sugar allocation in the living seed*. Plant Biotechnology Journal 9(9):1022-37, 2011.
8. HIPPE K, C. COLMSEE, T. CZAUDERNA, E. GRAFAHREND-BELAU, B.H. JUNKER, C. KLUKAS, U. SCHOLZ, F. SCHREIBER und S. WEISE: *Novel developments of the MetaCrop information system for facilitating systems biological approaches*. Journal of Integrative Bioinformatics 7(3), 2010.
9. GRAFAHREND-BELAU E., C. KLUKAS C, B.H. JUNKER und SCHREIBER F: *FBA-SimVis: interactive visualization of constraint-based metabolic models*. Bioinformatics 25(20):2755-7, 2009.
10. GRAFAHREND-BELAU E., F. SCHREIBER, D. KOSCHÜTZKI und B.H. JUNKER: *Flux balance analysis of barley seeds: a computational approach to study systemic properties of central metabolism*. Plant Physiology 149(1):585-98, 2009.
11. GRAFAHREND-BELAU E., B.H. JUNKER, C. KLUKAS, D. KOSCHÜTZKI, F. SCHREIBER und H. SCHWÖBBEMEYER: *Topology of plant metabolic networks*. In: SCHWENDER J. (Herausgeber): *Plant Metabolic Networks*. Springer, 2009.

12. GRAFAHREND-BELAU E., S. WEISE, D. KOSCHÜTZKI, U. SCHOLZ, B.H. JUNKER und F. SCHREIBER: *MetaCrop: a detailed database of crop plant metabolism*. Nucleic Acids Research 36(Database issue):D954-8, 2008.
13. GRAFAHREND-BELAU E., B.H. JUNKER, D. KOSCHÜTZKI, C. KLUKAS, S. WEISE, U. SCHOLZ und F. SCHREIBER: *Towards systems biology of developing barley grains: a framework for modeling metabolism*. Proceedings of the 5th International Workshop on Computational Systems Biology (WCSB 2008), 11.-13.06.2008, Leipzig. TICSP Series 41-44, 2008.
14. GRAFAHREND-BELAU E., F. SCHREIBER, M. HEINER, A. SACKMANN, B.H. JUNKER, S. GRUNWALD, A. SPEER, K. WINDER und I. KOCH: *Modularization of biochemical networks based on classification of Petri net t-invariants*. BMC Bioinformatics 9:90, 2008.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die den benutzten Werken anderer Autoren wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht wurden. Ich habe mich um keinen weiteren Doktorgrad beworben und auch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen.

Gatersleben, September 2012

Eva Grafahrend-Belau

LEBENS LAUF

Eva Grafahrend-Belau

Adresse: Gernröder Weg 3
06484 Quedlinburg
E-Mail: grafahr@ipk-gatersleben.de
Geboren am: 22.12.1974
Ort: Freiburg im Breisgau
Familienstand: Ledig, 2 Töchter
Nationalität: Deutsch

Berufliche Tätigkeit

seit 06/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiterin und Doktorandin, Institut für Pflanzen-
genetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben
11/2003 bis 08/2004 Freie Mitarbeiterin am Institut für Gewässerökologie und Binnen-
fischerei Berlin

Ausbildung und Studium

10/2004 bis 05/2006 Master-Studiengang Bioinformatik, Technischen Fachhochschule Berlin,
Abschluss mit Master of Science, Gesamtprädikat *sehr gut mit Auszeichnung*
10/1998 bis 09/2003 Hauptstudium Biologie, Freie Universität Berlin, Abschluss mit Diplom,
Gesamtprädikat *sehr gut*
10/1996 bis 07/1998 Grundstudium Biologie an der Universität Konstanz
bis 06/1995 Erlangung der Hochschulreife, Droste-Hülshoff-Gymnasium Freiburg,
Abschlussnote: 1,5