

# Inhaltsverzeichnis

Verwendete Symbole	5
<b>I Einleitung &amp; Methoden</b>	<b>11</b>
<b>1 Metabolic Engineering</b>	<b>13</b>
1.1 Entwicklung der weißen Biotechnologie . . . . .	13
1.2 Motivation und Methoden des Metabolic Engineering . . . . .	14
1.3 Modellierung im Metabolic Engineering . . . . .	16
<b>2 Ziele und Gliederung</b>	<b>19</b>
2.1 Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit . . . . .	19
2.2 Gliederung der Arbeit . . . . .	20
<b>3 Untersuchte biologische Systeme</b>	<b>25</b>
3.1 Bakterieller Stoffwechsel und Regulationsmechanismen . . . . .	26
3.2 L-Phenylalanin Produzenten . . . . .	29
<b>4 Experimentelles Vorgehen</b>	<b>33</b>
4.1 Überblick der experimentellen Bedingungen . . . . .	33
4.2 Stationäre Stoffflussanalyse (SFA) . . . . .	35
4.3 Stationäre Markierungsexperimente ( $^{13}\text{C}$ SFA) . . . . .	36
4.4 Stimulus-Response Experimente . . . . .	37
4.5 LC-MS/MS Messtechnik . . . . .	39
<b>5 Modellbildung</b>	<b>43</b>
<b>6 Metabolische Netzwerk-Modelle</b>	<b>49</b>
6.1 Beispielsystem zur Verdeutlichung der Modellerstellung . . . . .	49
6.2 Massenbilanzen . . . . .	49
6.3 Enzym-Kinetiken . . . . .	51
6.4 Vereinfachte Kinetische Ansätze . . . . .	53
6.5 Bilanzen für $^{13}\text{C}$ Markierungszustände . . . . .	56

<b>7</b>	<b>Simulation, Systemanalyse und Statistische Methoden</b>	<b>61</b>
7.1	Schema der Simulation und Systemanalyse . . . . .	61
7.2	Fehlerübertragung . . . . .	65
<b>8</b>	<b>Anwendung der verschiedenen Modellansätze</b>	<b>71</b>
8.1	Metabolisch stationäre Modelle . . . . .	71
8.2	Stöchiometrische Stoffflussanalyse . . . . .	71
8.3	Metabolische Netzwerk Analyse . . . . .	74
8.4	<sup>13</sup> C Stoffflussanalyse . . . . .	74
8.5	Instationäre <sup>13</sup> C Stoffflussanalyse . . . . .	79
8.6	Metabolisch instationärer Zustand . . . . .	79
<b>9</b>	<b>Auswertung mit Visuellen Werkzeugen</b>	<b>85</b>
9.1	Visualisierung von Sensitivitäten . . . . .	85
9.2	Kovarianz-Matrizen . . . . .	86
9.3	Multidimensionale Skalierung . . . . .	88
<b>II</b>	<b>Stationäre Modellierung und Methoden zur Auswertung</b>	<b>91</b>
<b>10</b>	<b>Auswertung von <sup>13</sup>C Markierungsexperimenten</b>	<b>93</b>
10.1	Sensor-Reaktor Konzept . . . . .	93
10.2	Schätzung der extrazellulären Flüsse . . . . .	94
10.3	Korrektur der <sup>13</sup> C Markierungsmessung . . . . .	97
10.4	Netzwerk zur Auswertung . . . . .	98
10.5	Flussschätzungen und statistische Auswertung . . . . .	100
10.6	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	103
10.7	Möglichkeiten zur Steigerung der Bestimmtheit . . . . .	105
<b>11</b>	<b>Interpretation stationärer Stoffflusslagen</b>	<b>107</b>
11.1	Sensitivitätsanalyse stationärer Netzwerke . . . . .	108
11.2	Limitierungs-Potenzial: Reduzierung des theoretischen Maximums . . . . .	110
11.3	Sensitivität des beschränkenden Flusses . . . . .	112
11.4	Auswertung der L-Phenylalanin Experimente . . . . .	114
11.5	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	118

<b>III Kinetische Modellierung und Auswertung</b>	<b>121</b>
<b>12 SRE Auswertungsstrategie</b>	<b>123</b>
12.1 Auswertungsstrategie . . . . .	123
12.2 Messdaten Aufarbeitung . . . . .	126
12.3 Eingesetzte Spline-Glättung . . . . .	129
12.4 Fokussierte Modellierung . . . . .	130
12.5 Modellfamilien . . . . .	131
12.6 Parameteranpassung . . . . .	131
12.7 Statistische Untersuchung . . . . .	132
12.8 Modell-Ranking . . . . .	132
<b>13 Dynamische Modelle</b>	<b>133</b>
13.1 Zeitlich versetzte Korrelationsanalyse der Messdaten . . . . .	133
13.2 Untersuchte Modell Varianten . . . . .	136
13.3 Auswertung der mechanistischen Modellfamilie . . . . .	138
13.4 Modelle mit generischen Michaelis-Menten Termen . . . . .	139
13.5 LinLog Modellfamilie . . . . .	139
<b>14 Statistische Untersuchung</b>	<b>147</b>
14.1 Parameterbestimmtheit im mechanistischen Modellierungsansatz . . . . .	147
14.2 Bestimmtheit im LinLog Modellansatz . . . . .	149
14.3 Effektor-Einflüsse . . . . .	151
14.4 Einfluss der Eingangsgößen (Splines) in fokussierten Modellen . . . . .	152
<b>IV Erweiterte Auswertung</b>	<b>157</b>
<b>15 Steigerung der Parameterbestimmtheit</b>	<b>159</b>
15.1 Messung des Steady-State Flusses . . . . .	160
15.2 Gekoppelte Anpassung mehrerer Datensätze . . . . .	161
<b>16 Modell-Analyse und -Konsistenz</b>	<b>167</b>
16.1 Abschätzung maximaler Flussraten . . . . .	167
16.2 Vergleich simulierter und notwendiger Flüsse . . . . .	168
16.3 Optimierung der Enzymexpression für den Steady State . . . . .	171
16.4 Einfluss der extrazellulären Konzentrationen . . . . .	173
16.5 Thermodynamische Betrachtung . . . . .	174

<b>V</b>	<b>Metabolisch und Isotopisch Instationäre Modellierung</b>	<b>179</b>
<b>17</b>	<b>Simulationsstudie: Instationäre <sup>13</sup>C Experimente</b>	<b>181</b>
17.1	Modellaufbau . . . . .	181
17.2	Untersuchte Szenarien . . . . .	183
17.3	Ergebnisse aus dem Statistischen Vergleich . . . . .	186
17.4	Versuchsplanung . . . . .	187
17.5	Vereinfachte <sup>13</sup> C Modelle . . . . .	190
<b>18</b>	<b>MS/MS Messmodell</b>	<b>197</b>
18.1	Keine Fragmentierung . . . . .	198
18.2	Mit Fragmentierung in Q2 . . . . .	198
18.3	Kompakte Darstellung des Messmodells . . . . .	200
18.4	Massenisotopen-Korrektur für MS/MS Daten . . . . .	200
18.5	Zusammenfassung . . . . .	204
<b>19</b>	<b>Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick</b>	<b>205</b>
<b>A</b>	<b>Auswertung der <sup>13</sup>C Markierungsexperimente</b>	<b>211</b>
A.1	Reaktionen und Ergebnisse der Flusschätzungen . . . . .	211
<b>B</b>	<b>Anhang zu den Dynamischen Modellen</b>	<b>217</b>
B.1	. . . . .	222
<b>C</b>	<b>Simulation von dynamischen Markierungsexperimenten</b>	<b>225</b>
C.1	Stöchiometrie, Kinetik und C-Atom Transitionen - Spirallus . . . . .	225