




Universitetet
i Stavanger

DET TEKNISK-NATURVITENSKAPELIGE FAKULTET

MASTEROPPGAVE

Studieprogram/spesialisering Automatisering og signalbehandling	Vårsemesteret, 2018. Åpen
Forfatter: Even Wee Munzer	 (signatur forfatter)
Fagansvarlig: Tormod Drengstig Veileder(e): Tormod Drengstig	
Tittel på masteroppgaven: Modellering og simulering av biokjemiske motiver som viser ultrasensitivitet Engelsk tittel: Modeling and simulation of biochemical motifs that show ultrasensitivity	
Studiepoeng: 30	
Emneord: Enzymkinetikk Biokjemisk modellering Ultrasensitivitet	Sidetall: 99 +vedlegg/annet: 12 Stavanger, 15.06.2018 dato/år

Innhold

1 Innledning	5
1.1 Oppgavens oppbygning	5
2 Introduksjon til enzymkinetikk og fysiologisk regulering	6
2.1 Enzymkinetikk	6
2.2 Michaelis-Menten ligning	9
2.3 Metningskinetikk	11
2.4 Aktivator	13
2.5 Inhibitor	14
2.6 Approksimasjon til reaksjonsraten	15
2.6.1 Rapid equilibrium assumption	15
2.6.2 Steady state assumption	17
2.6.3 Steady state vs rapid equilibrium vs ekte modell	18
2.7 Kooperativ binding	20
2.8 Hill-kinetikk	21
2.9 Modellering av kontrollmotiv	23
2.9.1 Modell beskrivelse av kontrollmotiver	24
2.9.2 Teoretisk settpunkt	25
3 Strukturerer som viser ultrasensitivitet	26
3.1 Fosforylering og defosforylering	26
3.2 Hva er ultrasensitivitet ?	29
3.3 Metning i kinase og fosfatase viser nulte orden ultrasensitivitet	30
3.4 Effekten av metningskinetikk eller massevirkningsloven i fosforylering og/eller defosforylering	38
3.4.1 Fosforylering og defosforylering beskrevet ved massevirkningsloven	39
3.4.2 Defosforylering beskrevet av metningskinetikk, fosforylering beskrevet ved massevirkningsloven	41
3.4.3 Fosforylering beskrevet av metningskinetikk, defosforylering beskrevet ved massevirkningsloven	43
3.4.4 Fosforylering og defosforylering beskrevet av metningskinetikk	44

3.4.5	Effekten av å endre ratekonstantene k_1 og k_2	46
3.5	Flerstegsreaksjoner av fosforylering viser ultrasensitivitet . . .	48
3.5.1	Dobbel fosforylering	49
3.5.2	n-antall fosforyleringer	52
3.6	Effekten av inhibitor på kinase kan resultere i ultrasensitivitet	54
3.6.1	Effekten av endringer i den totale inhibitor konsentra- sjonen I_{tot}	58
3.6.2	Effekten av å endre ratekonstanten k_2	59
3.7	Konkurrerende substrater i dobbel fosforylering-defosforylering viser bistabilitet	60
3.7.1	Effekten av å endre den totale mengden substrat X_{tot}	65
3.8	Cellesignalisering i kaskade	66
3.8.1	Effekten av å endre ratekonstanten k_1	69
3.8.2	Effekten av å endre ratekonstantene k_1 , k_3 og k_5	70
4	Ultrasensitivitet i kontrollmotiv	72
4.1	Motivstruktur med reaksjon av fosforylering-defosforylering .	72
4.1.1	Rampeperturbasjon og metningskinetikk, eller første orden i signalering fra E til j_3	75
4.2	Motivstruktur med kaskadesignalisering med 2 nivåer	84
4.2.1	Rampeperturbasjon og metningskinetikk, eller første orden i signalering fra E_2 til j_3	86
5	Diskusjon og konklusjon	97
5.1	Fremtidig arbeid	97
6	Bibliografi	99
A	Andre kontrollmotiver og simuleringsresultater	102
A.1	Motivstruktur av fosforylering-defosforylering med outflow kon- troller	102
A.1.1	Forstyrrelse i kinase tilførsel	103
A.2	Motivstruktur av fosforylering-defosforylering med inflow kon- troller	105
A.3	Motivstruktur av kaskadesignalisering med 2 nivåer	105
A.4	Motivstruktur av kaskadesignalisering med 3 nivåer	106
A.5	Motiv av flerstegs fosforylering-defosforylering	107
A.5.1	Dobbel fosforylering	107
A.6	Motiv med Reciprocal regulering	108
A.7	Inhiberende system	108
B	Sensitivitet analyse	109
B.1	Local sensitivitet koeffisient	109

B.2	Alternativ til sensitivitet koeffisient og approksimasjon til Hill-	
	koffisienten	111
B.2.1	Global sensitivitet analyse	113

Forord

Reguleringsteknikk er et av de fagene som har fengst meg mest i studietiden, og jeg tok derfor kontakt med Tormod for å høre om han hadde en oppgave tilgjengelig innenfor dette faget da det skulle velges masteroppgave. Temaet jeg ble tilbudt var innenfor enzymkjenitikk og fysiologisk regulering. Dette var noe som var helt nytt for meg, og jeg synes det var spennende at man kunne kombinere fysiologi og/eller biologi med reguleringsteknikk.

Oppgaven har bitt seg fast i meg, og gitt meg lærerike utfordringer, vist meg nye sider av faget reguleringsteknikk, samtidig som den har gitt meg noen spennende resulater. Jeg vil takke min veileder Tormod for tilbakemeldinger og gode samtaler underveis. På hjemmebane vil jeg takke min familie for støtte, og spesielt min samboer Hanne, som har vært "alene-mamma"i innspurten og har hjulpet meg med korrektur.

Sammendrag

Denne rapporten tar for seg kjemiske strukturer som viser ultrasensitivitet, som vil si at systemet er veldig sensitiv for endringer i konsentrasjonen av et stoff.

Det finnes flere varianter av kjemiske strukturer som viser ultrasensitivitet, der noen er mer sensitive enn andre. Slike systemer er ofte relatert til celledisagregasjon, hvor signalet fra utsiden av cellemembranen kan trigge flere varianter av signalkaskade inni cellen. Det er vist at ultrasensitivitet spiller en stor rolle i biologiske celledisagregasjoner. Egenskapene til kjemiske strukturer, som er ultrasensitive, blir studert ved simulering og analysing av responsene, der enkelte systemer blir studert i tidsresponsene.

Det skal til slutt finnes ut av hva som skjer når et kontrollmotiv blir satt sammen med kjemiske strukturer som er ultrasensitive, der den kjemiske strukturen er en reaksjon av fosforylering-defosforylering av substrater.

Kapittel 1

Innledning

1.1 Oppgavens oppbygning

Kapittel 1: Innledingen som beskriver innholdet i de ulike kapitlene.

Kapittel 2: Gir en introduksjon til enzymkinetikk, og fysiologiske og/eller biologiske reguleringsstrukturer.

Kapittel 3: Gir en introduksjon til ultrasensitivitet, ved å modellere, simulere og analysere kjemiske strukturer som er ultrasensitive.

Kapittel 4: Er et eksperiment på å bruke kontrollmotiv sammen med kjemiske strukturer som viser ultrasensitivitet.

Kapittel 5: Tar for seg diskusjon og konklusjon av oppgaven.

Kapittel 2

Introduksjon til enzymkinetikk og fysiologisk regulering

I dette kapitlet skal det gis en introduksjon til enzymkinetikk, og hvordan dette brukes til å utlede matematiske modeller av fysiologiske systemer og reguleringsstrukturer.

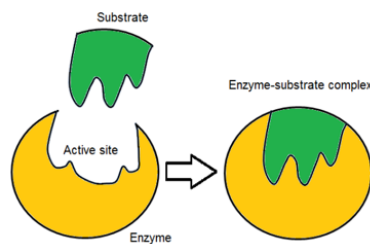
2.1 Enzymkinetikk

Nesten alle enzymer består av proteiner og fungerer som katalysator for fysiologiske og/eller biologiske reaksjoner av levende organismer [1]. Oppgaven til enzymet er derfor å øke hastigheten i den kjemiske reaksjonen, ved at den binder seg til et stoff, for så å omdanne det til et annet stoff.



Figur 2.1: Enzymkatalysert reaksjon: Enzymet E binder seg til substratet S, og danner enzymsubstrat kompleks ES. Substratet omdannes videre til et produkt P, og enzymet slipper seg løs fra produktet. Figur er tatt fra [2]

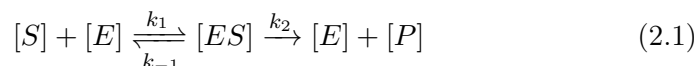
Den enzymkatalyserte reaksjonen starter med at substratet S binder seg med enzymets aktiv sete [3], og danner et enzymsubstrat kompleks ES vist i figur 2.2.



Figur 2.2: Substratet S binder seg til enzymets E aktiv sete, og danner enzymsubstrat kompleks. Figur er tatt fra [4]

Når substratet S er blitt omdannet til et produkt P, slipper enzymet seg løs fra produktet, som det er vist til høyre i figur 2.1. Enzymet blir da gjenvunnet og kan binde seg med et nytt substrat for å utføre den samme prosessen igjen [2].

Reaksjonsligning (2.1) representerer reaksjonen vist i figur 2.1. Her er stoffene i reaksjonsligningen markert med klammeparanteser, som representerer konsentrasjonen eller mengden av et stoff.



Hastigheten som substratet [S] omdannes til produktet [P] kalles reaksjonsrate r [4]. Denne er et produkt av ratekonstanten k_n og konsentrasjonen av stoffene som inngår i den kjemiske reaksjonen [5]. Reaksjonsratene fra reaksjonsligning (2.1) er beskrevet i ligning (2.2), (2.3) og (2.4).

$$r_1 = k_1[E][S] \quad (2.2)$$

$$r_{-1} = k_{-1}[ES] \quad (2.3)$$

$$r_2 = k_2[ES] \quad (2.4)$$

- r_1 : Beskriver dannelsen av komplekset [ES] fra enzymene [E] og substratene [S], hvor ratekonstanten k_1 er med å bestemme reaksjonshastigheten.
- r_{-1} : Løser opp enzymsubstratkomplekset [ES] til [E] + [S]. Ratekonstanten k_{-1} er med å bestemme hastigheten for denne reaksjonen.
- r_2 : Bestemmer raten for dannelsen av produktet [P], sammen med ratekonstanten k_2 og konsentrasjonen av enzymsubstratkomplekset [ES].

Reaksjonsratene blir videre tatt i bruk for å beskrive dynamikken til hvert stoff i reaksjonen (figur 2.1), se differensialligningene vist i ligning (2.5a) - (2.5d).

$$\frac{d[E]}{dt} = r_{-1} + r_2 - r_1 \quad (2.5a)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = r_{-1} - r_1 \quad (2.5b)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = r_1 - r_{-1} - r_2 \quad (2.5c)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = r_2 \quad (2.5d)$$

Ved å ta utgangspunktet i ligning (2.5a), som beskriver dynamikken til enzymet [E], er det reaksjonsratene r_{-1} og r_2 som bestemmer hastigheten av økende enzymkonsentrasjon, der r_1 er raten som bestemmer hastigheten av reduksjonen i enzymkonsentrasjonen.

For å finne reaksjonshastigheten for dannelsen av produktet [P], benyttes ligning (2.5d) som beskriver endringen i produktet [P] over tid, og som også er en definisjon på hastighet v , se ligning 2.6.

$$v = k_2 \cdot [ES] \quad (2.6)$$

Ligning 2.6 blir brukt videre i neste delkapittel, og vil for enkelhets skyld definere raten av dannelsen til produktet P som v , istedenfor den tidsderivate $\frac{d[P]}{dt}$.

2.2 Michaelis-Menten ligning

Leonor Michaelis (1875-1949) og Maud Leonora Menten (1869-1960) samarbeidet i en studie om invertase¹. Samarbeidet var rettet mot medisinsk sammenheng i forbindelse med biokjemi og fysiologi [7].

I dette delkapittelet skal det utledes et uttrykk for dannelsen av produktet [P] som en funksjon av substratkonsentrasjon [S], basert på antagelser som ble gitt av L.Michaelis og M.L.Menten. Utledningen av uttrykket tar utgangspunkt i reaksjonsligning (2.1) og ligning (2.6).

Dersom substratet og enzymet allerede er sammen, vil de ikke være målbare [7], og man må derfor tilføre systemet en fast mengde enzym og substrat, som er definert av den totale enzymkonsentrasjonen E_{tot} , og total substratkonsentrasjonen S_{tot} , se ligning (2.7) og (2.8).

$$E_{tot} = [E] + [ES] \quad (2.7)$$

$$S_{tot} = [S] + [ES] \quad (2.8)$$

Det antas videre at hvis $S_{tot} \gg E_{tot}$, må også $S_{tot} \gg [ES]$, som gjør at konsentrasjonen til enzymsubstratkomplekset [ES] neglisjeres fra S_{tot} . Konsentrasjonen av fritt substrat [S] vil nå være tilnærmet S_{tot} , se ligning (2.9).

$$S_{tot} = [S] \quad (2.9)$$

Ved å anta at reaksjonsligning (2.1) er i stasjonær tilstand², vil dynamikken til enzymsubstratkomplekset [ES] (ligning (2.5c)) være tilnærmet konstant og veldig lav ($\frac{d[ES]}{dt} \approx 0$) [2], se ligning (2.10).

$$k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (2.10)$$

Ligning (2.10) benyttes videre for å finne dissosiasjonskonstanten K_M , også kalt for Michaelis-Menten konstanten, se ligning (2.11).

¹Invertase eller sukrase er en fellesbetegnelse av enzymkatalysering for spalting av sukrose til glukose [6]

²Se delkapittel 2.6.2 for en introduksjon om antagelsen om stasjonær tilstand

$$K_M = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.11)$$

Ligning (2.11) løses for $[E]$ og blir satt inn i ligning (2.7), og resulterende ligning løses for $[ES]$, se ligning (2.12).

$$[ES] = [E]_T \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2.12)$$

Ved å sette ligning (2.12) inn i ligning (2.6), har man nå funnet uttrykket til L.Michaelis og M.L.Menten som beskriver dannelsen av produktet P som en funksjon av substrat konsentrasjonen $[S]$, også kalt for Michaelis-Menten ligning (2.13).

$$v = k_2 E_{tot} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2.13)$$

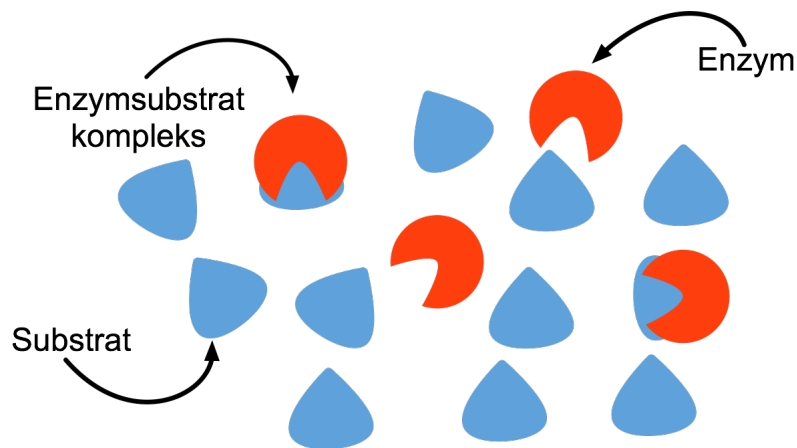
$$V_{max} = k_2 E_{tot} \quad (2.14)$$

V_{max} i ligning (2.14) er et produkt av ratekonstanten k_2 og den totale enzymkonsentrasjonen E_{tot} , og beskriver den maksimale reaksjonshastigheten raten kan oppnå.

2.3 Metningskinetikk

Metningskinetikk, eller nulte ordens kinetikk, skjer når konsentrasjonen av substratet $[S]$ er så høy at alle enzymene er bundet som enzymsubstratkompleks ($[ES] = E_{tot}$), slik at dannelsen av produkt P skjer ved maksimal hastighet V_{max} [2].

Dersom reaksjonsraten er i V_{max} , og mer substratkonsentrasjon $[S]$ blir tilført, vil dette ikke øke reaksjonshastigheten. Derimot vil reaksjonshastigheten øke hvis mer enzymkonsentrasjon $[E]$ blir tilført.



Figur 2.3: Eksempel på mettede enzymer: Dersom den totale enzymkonsentrasjonen er $E_{tot} = 4$, og der enzymet omdanner et substrat S til et produkt P med en rate på $10 \frac{\text{substrat}}{\text{sec}}$, vil systemet oppnå en maksimal hastighet V_{max} på $40 \frac{\text{substrat}}{\text{sec}}$.

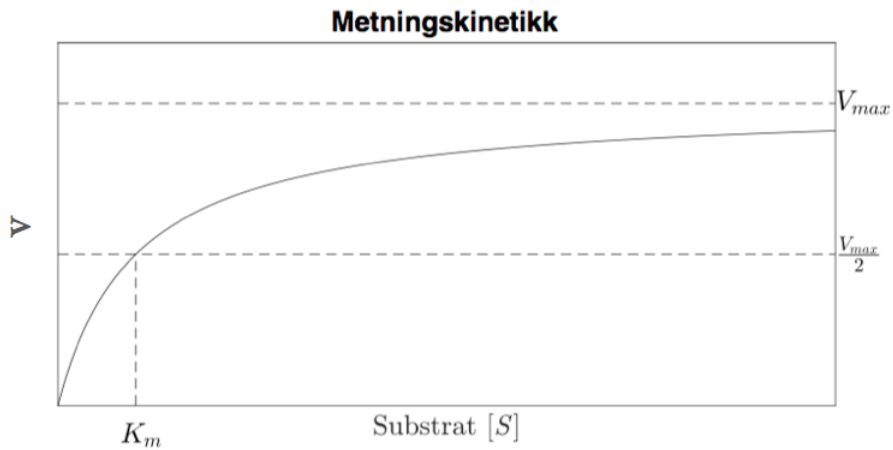
Michaelis-Menten ligning (2.13) er en metningskinetikk, definert av en metningsfunksjon, vist i ligning (2.15). Metningsfunksjonen gir en verdi mellom 0 og 1, og beskriver hvor raskt substratet binder seg til enzymet for å danne enzymsubstratkomplekset ES .

$$\frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2.15)$$

Binding mellom substratet og enzymet kan justeres ved å endre på Michaelis-Menten konstanten K_M .

- Dersom K_M er lav ($K_M < 1$), mettes enzymene ved lav substratkonsentrasjon.
- Dersom K_M er høy ($K_M > 1$), må substratkonsentrasjonen også være høy for å mette enzymene.

Figur 2.4 viser reaksjonsraten fra Michaelis-Menten ligningen (2.13) som en funksjon av substratkonsentrasjon $[S]$. Ved økende substratkonsentrasjon vil reaksjonsraten komme nærmere V_{max} , og vil gå raskere opp i V_{max} dersom K_M er liten.

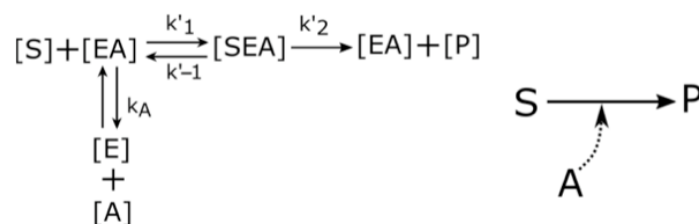


Figur 2.4: Metningskinetikk viser hvordan reaksjonsraten v , som beskriver dannelsen til produktet P, som en funksjon av substratkonsentrasjon $[S]$. V_{max} er den maksimale hastigheten som reaksjonsraten kommer nærmere ved økende substratkonsentrasjon. Når reaksjonsraten har nådd halvparten av maksimal hastighet $\frac{V_{max}}{2}$, er substratkonsentrasjonen $[S]$ lik Michaelis-Menten konstanten ($K_M = [S]$). Figuren er tatt fra [2]

2.4 Aktivator

Det finnes reaksjoner som blir påvirket av andre stoffer, og disse stoffene har egenskaper som å aktivere eller inhibere enzymene i reaksjonen. Aktivatoren vil påvirke reaksjonen ved å aktivere enzymene, slik at flere aktive enzymer E blir tilgjengelige for å katalysere substratene S til produktet P .

Figur 2.5 viser reaksjonsligning (2.1) med en tilleggsreaksjon mellom enzymet E og aktivator A .



Figur 2.5: Aktivator A binder seg til enzymet E og danner enzym-aktivator-komplekset EA . Dette aktiverer enzymet for å kunne binde seg med substratet S , og danner komplekset $[SEA]$. Figuren er tatt fra masteroppgaven til Thorbjørn Johnsen [4]

Dersom konsentrasjonen av aktivator $[A]$ øker, vil også konsentrasjonen av aktive enzymer $[EA]$ øke, som gjør at flere aktive enzymer blir tilgjengelig for substratene $[S]$, som får reaksjonshastigheten som beskriver dannelsen av produktet P til å øke.

Aktivatoren er gitt som en metningsfunksjon (2.16), der $[A]$ er aktivator-konsentrasjonen og K_a er dissosiasjonskonstanten.

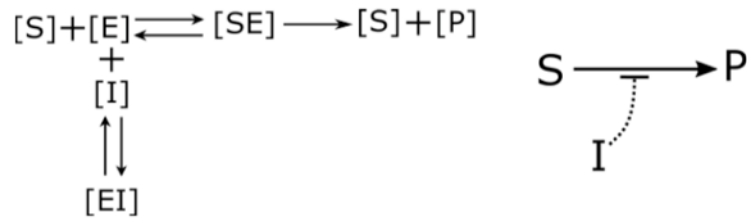
$$v = \underbrace{V_{max} \frac{[S]}{K_M + [S]}}_{\text{Michaelis-Menten ligning}} \cdot \underbrace{\frac{[A]}{K_a + [A]}}_{\text{Aktivator}} \quad (2.16)$$

$$V_{max} = k_2 \cdot E_{tot} \quad (2.17)$$

For å se utledningen av metningsfunksjon (2.16) for aktivatoren, se [8].

2.5 Inhibitor

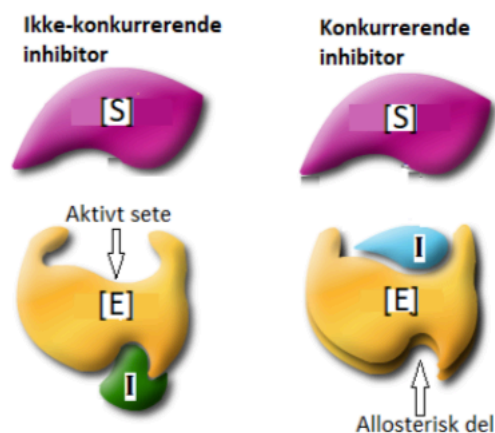
En inhibitor I er en hemningsfunksjon som påvirker systemet ved å redusere enzymets aktivitet. Når flere enzymer E binder seg til en inhibitor I , vil det redusere mengden aktive enzymer i systemet. I dette tilfelle vil substratene ha mindre enzymer å binde seg med, som vil resultere i en saktere reaksjonshastighet for dannelsen av produktet P .



Figur 2.6: Inhibitor I binder seg med enzymet E , som gjør enzymet inaktivt slik at substratene ikke kan binde seg med enzymet. Figuren er tatt fra [4]

Man skiller mellom konkurrerende og ikke-konkurrerende inhibitor som ligger under hovedgruppen reversibel inhibering [2]. Den mest vanlige er konkurrerende inhibitor [9], hvor inhibitor I binder seg til enzymets aktive sete, slik at substratet ikke har mulighet til å binde seg på enzymet [4], se figur 2.7

Ikke-konkurrerende inhibitor I binder seg til det som blir kalt for allosterisk sete på enzymet, eller enzymsubstratkomplekset. Det gjør at enzymets aktive sete låser seg, slik at substratet ikke kan binde seg til enzymet. Dersom substratet allerede er bundet med enzymet, vil inhibitor I låse fast substratet i sitt sete slik at den ikke kan brytes med enzymet, eller omdannes til produktet P [4], se figur 2.7



Figur 2.7: Ikke-konkurrerende: Inhibitor I binder seg til enzymets E allosteriske setet. Konkurrerende: Inhibitor I binder seg til enzymets E aktive sete, slik at den blokkerer eller hindrer substratet S for å binde seg med enzymet. Figuren er hentet fra masteroppgaven til Thorbjørn Johnsen [4]

Inhibitor er representert som en funksjon som hindrer dannelsen av produktet P , se markert del i ligning (2.18). Her vil konsentrasjonen av inhibitor $[I]$, og dissosiasjonskonstanten K_i påvirke reaksjonsraten ved å hemme dannelsen av produktet P .

$$v = \underbrace{V_{max} \frac{[S]}{K_M + [S]}}_{\text{Michaelis-Menten ligning}} \cdot \underbrace{\frac{[A]}{K_a + [A]}}_{\text{Inhibitor}} \quad (2.18)$$

$$V_{max} = k_2 \cdot E_{tot} \quad (2.19)$$

For se utledningen av inhibitor-funksjonen (2.18), se [8].

2.6 Approksimasjon til reaksjonsraten

I dette delkapittelet blir det gitt to forskjellige antagelser for å finne reaksjonsraten for dannelsen av produktet P , som en funksjon av substratet S . Begge metodene går ut på å finne et uttrykk for enzymsubstratkomplekset $[ES]$.

2.6.1 Rapid equilibrium assumption

Antagelsen om Rapid equilibrium (rask likevekt), er at reaksjonen mellom $[E] + [S]$ og $[ES]$ er mye raskere enn reaksjonen mellom $[ES]$ og $[E] + [P]$.

Det vil si at reaksjonen som fører til dannelsen av produktet [P] er antatt å være veldig treg, slik at ratekonstanten k_2 fra ligning (2.1) er neglisjerbar ($k_2 \approx 0$), se reaksjonsligning (2.20).



Ligning (2.20) benyttes til å finne dissosiasjonskonstanten (Michaelis-Menten konstanten) K_M , vist i ligning (3.37b).

$$K_M = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (2.21)$$

Antagelsen om bevaring vil gi en fast mengde enzymer i reaksjon, som sier at summen av den totale enzym konsentrasjonen E_{tot} er gitt av fritt enzym $[E]$ og enzymsubstratkomplekset $[ES]$, se ligning (3.37c).

$$E_{tot} = [E] + [ES] \quad (2.22)$$

Ligning (3.37b) løses for $[E]$ og settes inn i ligning (3.37c), der resulterende ligning løses for $[ES]$, se ligning (2.23)

$$[ES] = E_{tot} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2.23)$$

Ligning (2.23) blir satt inn i ligning (2.6) fra kapittel 2.1, som gir en Michaelis-Menten ligning (2.24).

$$v = V_{max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2.24)$$

$$V_{max} = k_2 \cdot E_{tot} \quad (2.25)$$

- V_{max} beskriver den maksimale reaksjonshastigheten raten kan oppnå.
- K_M er Michaelis-Menten konstanten eller, dissosiasjonskonstanten for rapid equilibrium (rask likevekt).

2.6.2 Steady state assumption

Antagelsen om stasjonær tilstand for reaksjonsligning 2.1 er gitt av at ratekonstanten k_2 er mye raskere enn k_{-1} ($k_2 \gg k_{-1}$), slik at dynamikken av enzymsubstratkomplekset $[ES]$ (ligning (2.5c)) blir konstant og veldig lav ($\frac{d[ES]}{dt} \approx 0$), se ligning (2.26).

$$k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (2.26)$$

Ligning (2.26) benyttes til å finne dissosiasjonskonstant K_M , se ligning (2.27).

$$K_M = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (2.27)$$

Antar at konsentrasjonen av enzymet er bevart, og definerer ligningen (2.28) som beskriver den totale enzymkonsentrasjonen E_{tot} i reaksjonen.

$$E_{tot} = [E] + [ES] \quad (2.28)$$

Løser ligning (2.27) for $[E]$, setter den inn i ligning (2.28), der resulterende ligning løses for $[ES]$, se ligning (2.29).

$$[ES] = E_{tot} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2.29)$$

Ligning (2.29) settes inn i ligning (2.6) fra kapittel 2.1, og man får Michaelis-Menten ligning (2.30) som beskriver reaksjonshastigheten av dannelsen til produktet P .

$$v = V_{max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2.30)$$

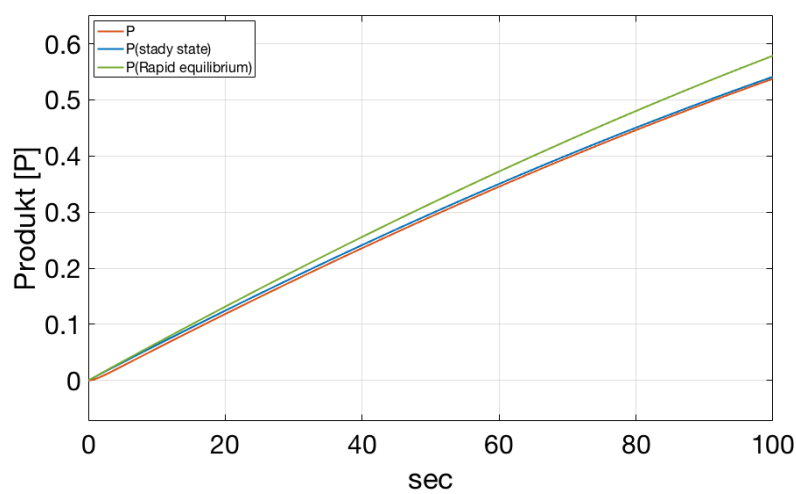
$$V_{max} = k_2 \cdot E_{tot} \quad (2.31)$$

- K_M er Michaelis-Menten konstanten for antagelsen om stasjonærttilstand (Steady state assumption).

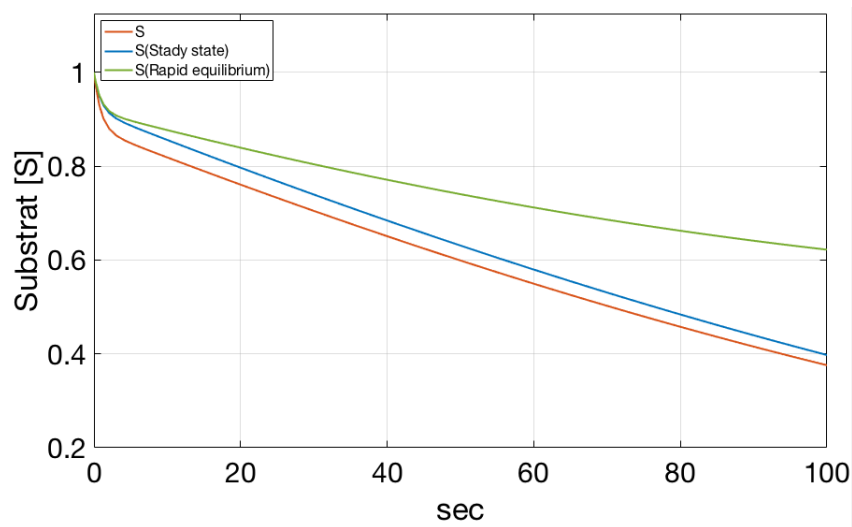
Legg merke til at dissosiasjonskonstanten (2.27) for **antagelsen om stasjonærttilstand** ikke er den samme som dissosiasjonskonstanten (3.37b) for **antagelsen om rask likevekt**. Antagelsen om stasjonærttilstand har mer informasjon om bindingene mellom stoffene i reaksjonen, og vil derfor gi en mer nøyaktig reaksjonsrate. Denne antagelsen er det beste alternativet [10].

2.6.3 Steady state vs rapid equilibrium vs ekte modell

For å sammenligningne antagelsen om stasjonærtilstand (Steady State), antagelsen om rask likevekt (rapid equilibrium) og eksakt modell (ligning (2.5a)-(2.5d)), har reaksjonsratene blitt simulert for dannelsen av produktet P (figur 2.8), og for substratet S (figur 2.9), ved å bruke parameteren: $k_1 = 0.7$, $k_{-1} = 0.3$, $k_2 = 0.05$, $E_{tot} = 0.2$, $S_{tot} = 1$



Figur 2.8: Kurvene representerer dannelsen av produktet P , og viser reaksjonsraten av antagelsen om stasjonærtilstand (Steady State), antagelsen om rask likevekt (rapid equilibrium) og eksakt modell.

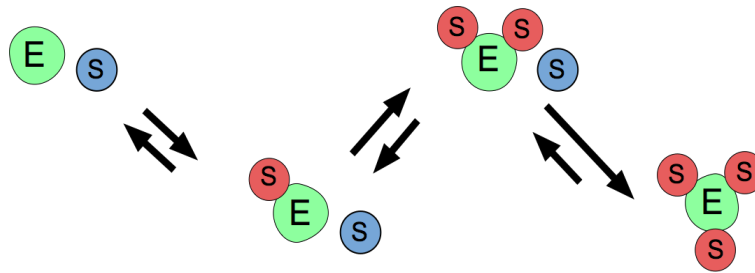


Figur 2.9: Kurvene representerer dynamikken i substrat S , fra antagelsen om stasjonært tilstand (Steady State), antagelsen om rask likevekt (rapid equilibrium) og eksakt modell.

Det viser seg at antagelsen om stasjonært tilstand gir best tilnærming til reaksjonsraten av eksakt modell.

2.7 Kooperativ binding

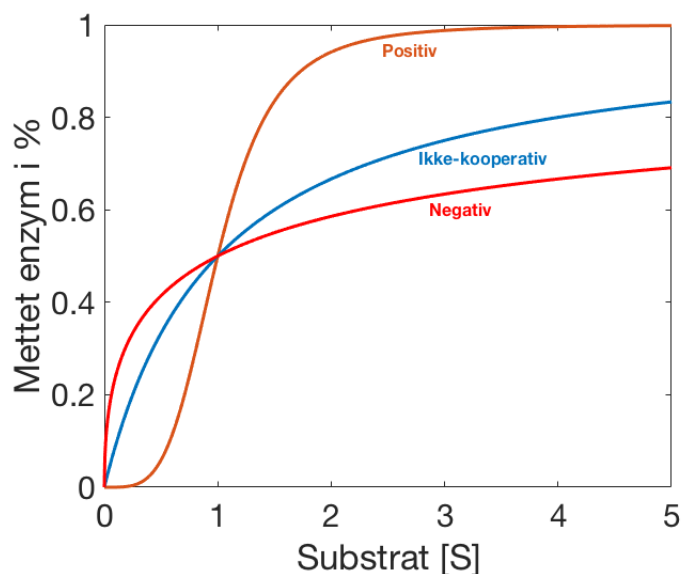
Det finnes enzymer med flere aktive seter, slik at flere substrater kan binde seg på enzymet gjennom flere reaksjoner. Dette er kalt kooperativ binding, se figur 2.10. Det finnes tre forskjellige typer kooperativitet: positiv, negativ og ikke-kooperativ binding.



Figur 2.10: Viser en illustrasjon av kooperativ binding, der enzym E binder seg til flere substrater S gjennom tre forskjellige reaksjoner. Blå sirkel representerer ubundet substrat, og rød sirkel er bundet substrat. Forover reaksjonen (illustrert med pil framover) øker i lengden, som vil si at reaksjonshastigheten øker for hvert substrat som binder seg til enzymet, og derfor er kooperativiteten positiv.

- Når første substrat S binder seg til enzymet E og tiltrekningskraften øker for de neste substratene, er kooperativiteten positiv.
- Hvis det første substratet som binder seg til enzymet sørger for å redusere tiltrekningskraften for de neste substratene, er kooperativiteten negativ.
- Ikke-kooperativ binding er når enzymet har et substrat-sete, og kan bare binde seg til et substrat om gangen.

Figur 2.11 illustrerer responsene av reaksjoner med positiv-, negativ- og ikke-kooperativ binding. Positiv kooperativ binding skjer når substratene binder seg til enzymet raskere enn det substratsetene på enzymet blir opp-tatt, som typisk gir en respons som er sigmoid (ultrasensitiv), se oransj kurve. Ved ikke-kooperativ binding kan enzymet bare binde seg med et substrat om gangen, og gir typisk en Michaelis-Menten respons (blå kurve i figur 2.11).



Figur 2.11: Viser forholdet mellom substratkonsentrasjonen $[S]$ og mettet enzymkonsentrasjonen $[E]$ i prosent, der responsene er illustrert av positiv (oransj kurve), negativ (rød kurve) og ikke-kooperativ (blå kurve) binding.

2.8 Hill-kinetikk

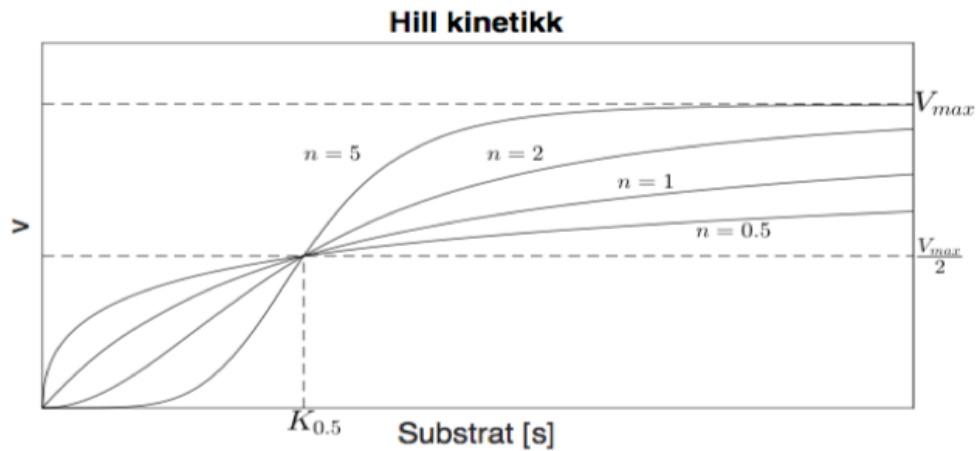
Hill-kinetikk er definert i ligning (2.32), og er en empirisk forklaring på hvordan en reaksjon oppfører seg når enzymene har mer enn et aktivt sete eller kooperativ binding [7]. Hill-funksjonen blir brukt i flere sammenhenger, som for eksempel å gi en approksimasjon av realistiske (data fra en kjemisk reaksjon) responser.

$$Output = \frac{Input^n}{K^n + Input^n} = \frac{[S]^n}{(K_M)^n + [S]^n} \quad (2.32)$$

Ligning (2.32) består av substratkonsentrasjonen $[S]$, Hill-koeffisienten n og en Michaelis-Menten konstant K_M . Hill-funksjonen er gitt som en metningsfunksjon, og dersom den settes inn i ligning (2.6), får man en Hill-funksjon med en begrensning av maksimal hastighet V_{max} , se ligning (2.33).

$$v = V_{max} \frac{[S]^n}{(K_M)^n + [S]^n} \quad (2.33)$$

Dersom $n = 1$, tilsvarer dette en ikke-kooperativ binding, som resulterer i Michaelis-Menten respons, se figur 2.12.



Figur 2.12: Viser Hill-kinetikk ved å bruke ligning (2.33), der grafen viser hvordan responsen blir påvirket ved økende Hill-koeffisient n , med den samme Michaelis-Menten konstanten K_M for alle responsene. Dette gjør at alle kurvene møter $\frac{V_{max}}{2}$ når $[S] = K_M$. Kurvene er satt opp av parametrene: $K_M = 0.5$, $n = 0.5, 1, 2, \text{ og } 5$. Figuren er hentet fra [2]

Nedenfor er det satt opp en liste som beskriver kooperativiteten ut i fra Hill-koeffisient n . Listen nedenfor er hentet fra Thorbjørn Johnsen's masteroppgave [4], side 8.

- $n > 1$; positiv kooperativ binding
- $n < 1$; negativ kooperativ binding
- $n = 1$; (vanlig Michaelis-Menten metningskinetikk)

2.9 Modellering av kontrollmotiv

Regulering av fysiologiske og/eller biologiske systemer er satt opp i form av kontrollmotiver. Figur (2.13) representerer 8 ulike motiver med struktur av negativ tilbakekobling, der stoffet A og E påvirker hverandre ved signalering.

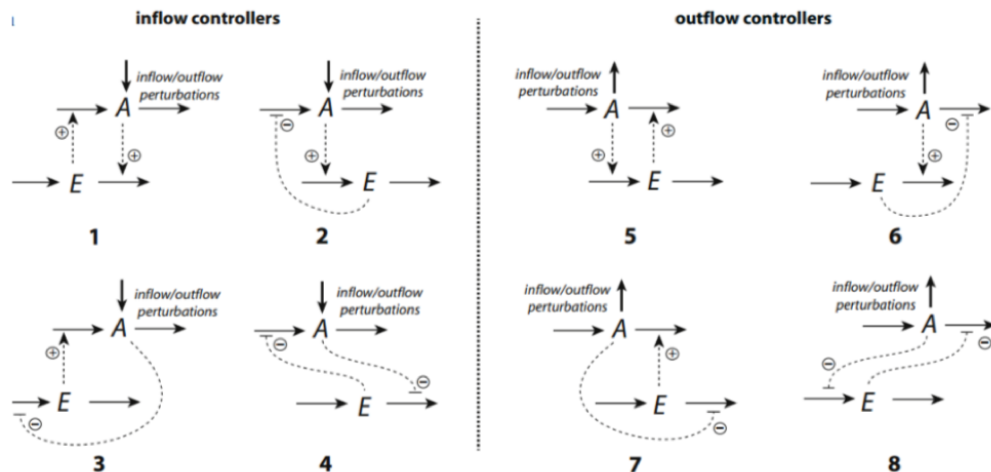
Ved å knytte enzymkinetikk opp mot motivregulering er det viktig at man kjenner til benevningene som blir brukt i dette delkapittelet, se tabell (2.1).

Benevning	Enzymkinetikk	Fysiologisk reguleringsmotiv
A	Aktivator	Stoffet som skal reguleres
E	Enzym	Stoffet som skal regulere A

Tabell 2.1: Tabellen er hentet fra [2]

Kontrollmotiver er normalt satt sammen av to forskjellige typer linjer, heltrukne og stiplede. De heltrukne linjene representerer fluks inn eller fluks ut, som beskriver økningen eller reduksjonen av konsentrasjonen av stoffet A eller E, se figur 2.13.

De stiplede linjene representerer signalering, som enten er med på å aktivere (representert med en pil og plusstegn i en sirkel) eller inhibere (representert med en flate og minus i en sirkel) [11], se figur 2.13.



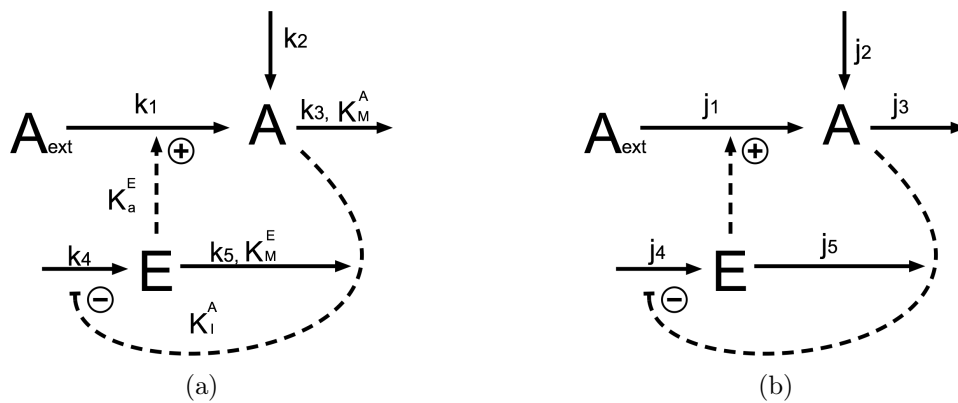
Figur 2.13: Viser 2 grupper med 4 ulike kontrollmotiver, inflow controller og outflow controller. Figur er hentet fra [12]

Figur 2.13 viser kontrollmotiver delt opp i to hovedgrupper, inflow-kontroller og outflow-kontroller. Dersom stoffet E påvirker inn-strømmen (fluks inn) til

stoffet A, er motivet en inflow-kontroller vist i motiv (1-4). Dersom stoffet E påvirker ut-strømmen (fluks ut) til stoffet A, er kontrollmotivet en outflow-kontroller vist i motiv (5-8).

2.9.1 Modell beskrivelse av kontrollmotiver

I dette delkapittelet blir det gitt en introduksjon for hvordan motiver kan utledes som matematiske modeller. Det blir tatt utgangspunkt i motiv 3 i figur 2.13, som både har en inhiberende og aktiverende effekt i motivet.



Figur 2.14: Panel (a) viser motiv 3 fra figur 2.13, hvor fluksene (heltrukket linje) og signalering (stiplede linje) er definert av konstanter og/eller variabler. Figur (b) viser samme motiv, hvor fluksene er definert som j_i , hvor i er nummeret på fluksen.

Figur 2.14 viser to forskjellige oppsett av samme motiv. For å gjøre det enklere å utlede de matematiske modellene av motivet, er det valgt å definere fluksene som j_i , hvor i er det gitte nummeret på fluksen.

Fluksene j_i i figur 2.14b blir satt til å være lik konstantene og/eller variablene for fluksene i figur 2.14a, se ligningene (2.34a)-(2.34e). For å forenkle uttrykket enda mer, er det valgt å la V_{max} være en del av ratekonstantene k_i for fluksene med metningsfunksjon.

$$j_1 = k_1 \cdot \frac{E}{K_a^E + E} \quad (2.34a)$$

$$j_2 = k_2 \quad (2.34b)$$

$$j_3 = k_3 \cdot \frac{A}{K_M^A + A} \quad (2.34c)$$

$$j_4 = k_4 \cdot \frac{K_I^A}{K_I^A + A} \quad (2.34d)$$

$$j_5 = k_5 \cdot \frac{E}{K_M^E + E} \quad (2.34e)$$

Fluksene i ligningene (2.34a)-(2.34e) blir videre brukt til å beskrive dynamikken til stoffet E og A i motivet (figur 2.14), se ligning (2.35) og (2.36).

$$\frac{dA}{dt} = j_1 + j_2 - j_3 \quad (2.35)$$

$$\frac{dE}{dt} = j_4 - j_5 \quad (2.36)$$

Ved å sette opp modellene i ligning (2.35) og (2.36) på denne måten, vil det gi en bedre oversikt ved å implementere modellen inn i Simulink³, der man lettere kan hente ut informasjon for hver fluks i kontrollmotivet.

2.9.2 Teoretisk settpunkt

Når et system skal reguleres blir det ofte valgt et settpunkt for responsen. For å kunne velge nivået i konsentrasjons av stoffet A ved simulering, må man finne et uttrykk for settpunktet A_{set} for kontrollmotivet i figur 2.14.

Ved å anta at $K_M^E \ll E$, slik at verdien i K_M^E er veldig liten ($K_M^E \approx 0$) som medfører at $A = A_{set}$, kan settpunktet utledes av ligning (2.36) under antagelsen om stasjonært tilstand, se ligning (2.37).

$$k_4 \cdot \frac{K_I^A}{K_I^A + A_{set}} - k_5 \cdot \frac{E}{K_M^E + E} = 0 \quad (2.37)$$

Ved å løse ligning (2.37) for A_{set} , er settpunktet til stoffet A utledet, se ligning (2.38).

$$A_{set} = \frac{k_4}{k_5} \cdot K_I^A - K_I^A \quad (2.38)$$

³Simulink er et simuleringsprogram som er en del av Matlab, og brukes til å modellere, simulere og analysere - <https://www.mathworks.com/products/simulink>

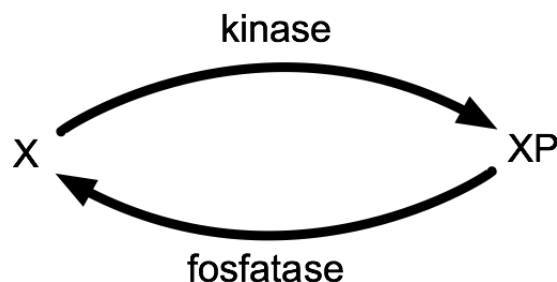
Kapittel 3

Strukturerer som viser ultrasensitivitet

I dette kapitlet blir det gitt en reproduksjon av resultatene fra artiklene [13, 14, 15] til James E. Ferrell, som handler om kjemiske strukturer som viser ultrasensitivitet. I hvert delkapittel vil det bli gitt en introduksjon av en kjemisk struktur(system), og dens matematiske beskrivelse. Modellen blir deretter simulert for å studere tidsresponsen i enkelte systemer, og teste hvordan sensitiviteten blir påvirket av endringer i inngangen.

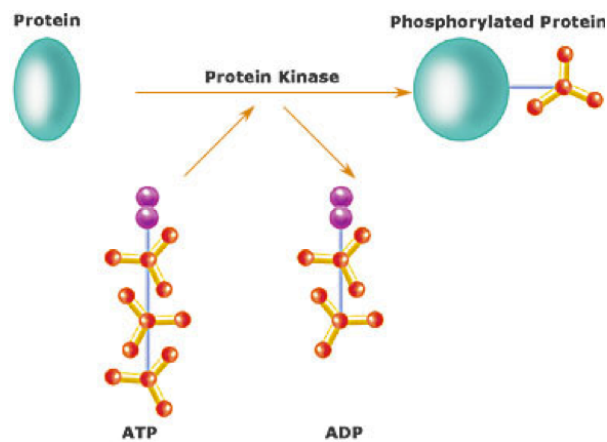
3.1 Fosforylering og defosforylering

De kjemiske strukturerne (se figur 3.5, 3.16, 3.15, 3.15, 3.24) som er beskrevet i dette kapitlet, tar utgangspunktet i en reaksjon hvor substratet X blir fosforylert ved hjelp av protein kinase, og der fosforylert substrat XP blir defosforylert av protinet fosfatase, se figur 3.1.



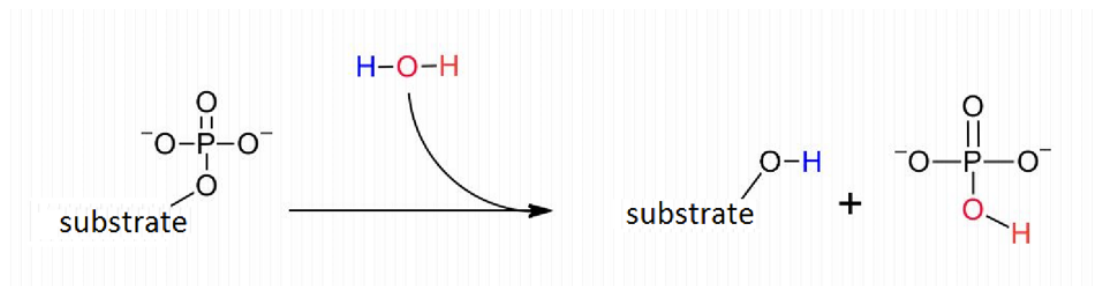
Figur 3.1: Forenklet kjemisk struktur av fosforylering og defosforylering, der substratet X binder seg til kinase, og blir omdannet til et fosforylert substrat XP . Fosforylert substrat XP kan dermed binde seg med fosfatase, som omdanner fosforylert substrat XP tilbake til substratet X .

Fosforylering er en reaksjon som skjer ved at en fosfat-gruppe binder seg til et substrat X ved hjelp av et protein kalt kinase. Kinase er også referert til et enzym(enzym-kinase), som hjelper med å katalysere transporten av fosfat-gruppen mellom fosfat-molekylet (ATP-molekylet) og substratet X [9], se figur 3.2. Når fosforyleringsprosessen er blitt utført, har substratet gått gjennom en strukturendring som aktiverer eller endrer funksjonaliteten til substratet. I dette kapittelet blir det modifiserte substratet definert som fosforylert substrat XP .



Figur 3.2: Eksempel på et substrat som blir fosforylert av ATP molekyl: Substratet binder seg til kinase, som hjelper med å katalysere reaksjonen mellom substratet og ATP molekylet. Etter at proteinet er blitt fosforylert eller har bundet seg med en av fosfat-gruppene til ATP molekylet, vil ATP molekylet som har gitt fra seg en av fosfat-gruppene, bli omdannet til et ADP molekyl. Figuren er tatt fra [9].

Defosforylering er en reaksjon som fjerner fosfat-gruppen fra fosforylert substratet XP , ved hjelp av et protein kalt fosfatase. Virkningen til fosfatase er det motsatte av kinase [9], og dette bidrar til å katalysere reaksjonen som spalter fosfat-gruppen fra fosforylerte substratet XP . Sluttresultatet av å defosforylere XP , er dannelsen av substratet X , se figur 3.1 og eksempelet i figur 3.3.

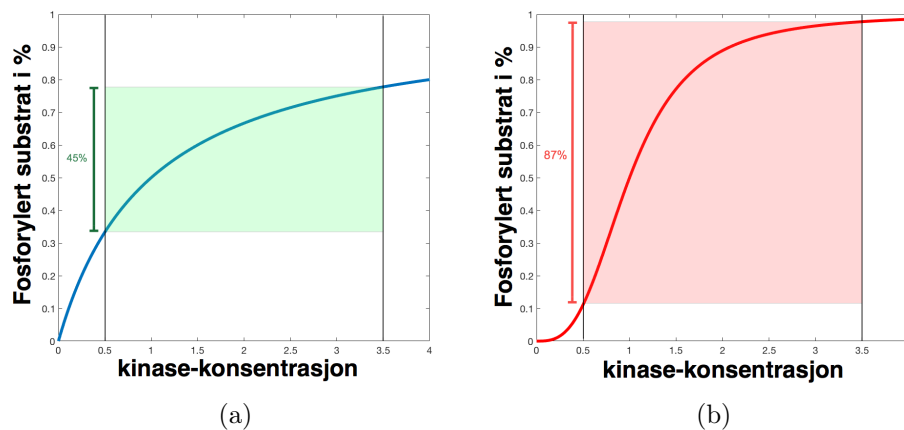


Figur 3.3: Eksempel av defosforylering: Fosfatase bidrar til katalysering av hydrolyse, der substratet reagerer med et vannmolekyl som får fosfatgruppen til å spalte fra substratet, og substratet blir dermed deaktivert. En mer detaljert beskrivelse av reaksjonen er gitt [16].

3.2 Hva er ultrasensitivitet ?

Ultrasensitivitet¹ er beskrevet av utgangsresponsen til et system som er mer sensitiv for endringer i konsentrasjonen av et stoff, enn en Michaelis-Menten respons (hyperbolisk kurve). For et system som er ultrasensitiv, vil reaksjonen skje veldig raskt for en bestemt verdi av stoffet, avhengig av systemets sensitivitet.

Figur 3.4 viser forskjellen mellom ultrasensitivitet (figur 3.4b) og Michaelis-Menten responsen (figur 3.4a). De markerte områdene (grønn og rød) i figur 3.4a og 3.4b, viser hvor mye av den totale substratkonsentrasjonen som er blitt fosforylert mellom kinase-konsentrasjonen 0.5 og 3.5.



Figur 3.4: Panel a) viser en Michaelis-Menten respons (ikke ultrasensitiv) med en Hill-koeffisient $n = 1$, der den viser at 45% av den totale substratkonsentrasjonen er fosforylert i området mellom kinase konsentrasjon 0.5 og 3.5. Panel b) viser ultrasensitiv respons med en Hill-koeffisient $n = 3$, der den viser at 87% av den totale substrat konsentrasjonen er fosforylert i område mellom kinase-konsentrasjon 0.5 og 3.5.

Videre i dette kapittelet blir ultrasensitivitet fremstilt som den stasjonære sammenhengen mellom fosforylerte substrater i prosent (%) og kinase-konsentrasjonen.

¹I følge terminologien til Goldbeter og Koshland, er systemet ultrasensitivt når responsen har en Hill-koeffisient $n > 1$ [13].

3.3 Metning i kinase og fosfatase viser nulte orden ultrasensitivitet

Nulte orden ultrasensitivitet dannes når det er nok substrat i systemet til å både mette kinase og fosfatase i reaksjonen av fosforylering-defosforylering. Under disse forholdene vil små endringer i kinase- eller fosfatase-konsentrasjonen gi stort utslag i responsen av fosforylert substrat XP [17].

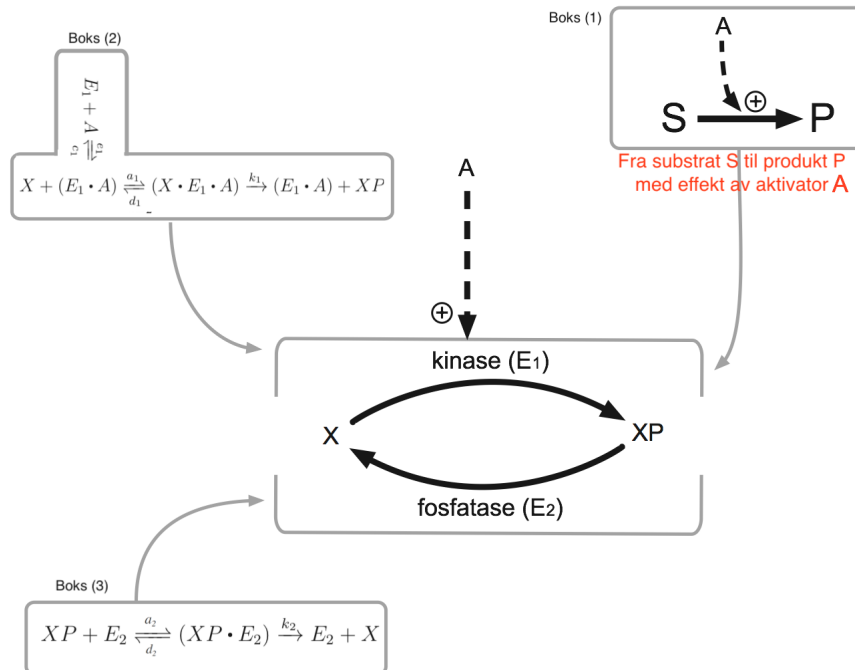
I dette delkapittelet skal man utlede et uttrykk som beskriver den stasjonære sammehengen mellom fosforylert substrat og kinase konsentrasjonen, ved å bruke modellene fra reaksjonene i figur 3.5 boks 2) og 3). Det matematiske uttrykket, og modellene, vil dermed bli simulert for å finne ut om systemet viser ultrasensitivitet.

For å redegjøre for symbolsk bruk i dette kapittelet, er det satt opp en tabell 3.1 som gir en beskrivelse av benevningene.

Benevning	Navn
X	substrat
XP	fosforylert substrat
E_1	kinase
E_2	fosfatase
$(X \cdot E_1)$	kompleks
$(XP \cdot E_2)$	kompleks

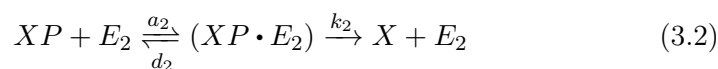
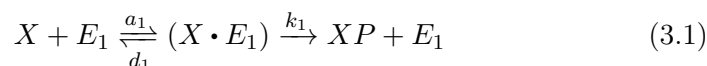
Tabell 3.1: Benevninger for enzymkinetikk og nulte orden ultrasensitivitet

Figur 3.5 representerer en kjemisk struktur av fosforylering og defosforylering med aktivator A på kinase. Effekten av aktivator A på fosforylering er relatert til reaksjonen med enzymaktivering, som ble beskrevet i kapittel 2.4.



Figur 3.5: Kjemisk struktur av fosforylering-defosforylering med effekten av aktivator A på kinase. Hvor substratet X reagerer med kinase (E_1) for å bli fosforylert, og videre omdannet til fosforylert substrat XP . Når fosforylert substrat XP reagerer med fosfatase, blir XP defosforylert tilbake til substratet X . De markerte boksene rundt den kjemiske strukturen, viser reaksjonsligningene av fosforylering-defosforylering og den kjemiske strukturen med aktivator som er relatert til figur 2.5.

For reaksjonen av fosforylering-defosforylering som er vist i figur 3.5, er det valgt å se bort i fra reaksjonen mellom aktivator A og kinase E_1 . Fjerner derfor denne reaksjonen fra reaksjonsligningen i figur 3.5 boks (2), se ligning (3.1). Dette vil minimalisere kompleksiteten ved å utlede det analytiske uttrykket av fosforylert substrat XP , og man velger heller å tilføre kinase ved simulering.



- Ligning (3.1) beskriver fosforylering der substratet X binder seg til kinase E_1 , og danner komplekset $(X \cdot E_1)$. Substrate X omdannes videre til er fosforylert substrat XP .
- Ligning (3.2) beskriver defosforylering av fosforylert substrat XP , som binder seg til fosfatase E_2 for å danne komplekset $(XP \cdot E_2)$, XP omdannes tilbake til substratet X .

Differensialligningene som beskriver dynamikken til hver enkelt stoff i reaksjonsligning (3.1) og (3.2), er definert i ligningene ((3.3a)-(3.3d)).

$$\frac{dX}{dt} = -a_1 \cdot X \cdot E_2 + k_2 \cdot (XP \cdot E_2) + d_1 \cdot (X \cdot E_1) \quad (3.3a)$$

$$\frac{d(X \cdot E_1)}{dt} = a_1 \cdot X \cdot E_1 - (k_1 + d_1)(X \cdot E_1) \quad (3.3b)$$

$$\frac{dXP}{dt} = -a_2 \cdot XP \cdot E_2 + d_2 \cdot (XP \cdot E_2) + k_1 \cdot (X \cdot E_1) \quad (3.3c)$$

$$\frac{d(XP \cdot E_2)}{dt} = a_2 \cdot XP \cdot E_2 - (k_2 + d_2)(XP \cdot E_2) \quad (3.3d)$$

Ved å anta at konsentrasjonen av stoffene i systemet er bevart (bevaringsloven²), må substrat, kinase og fosfatase bli tilført som en fast mengde konsentrasjon i systemet, og må derfor definere ligningene (3.4), (3.5) og (3.6).

$$X_{tot} = X + XP + (X \cdot E_1) + (XP \cdot E_2) \quad (3.4)$$

$$E_{1tot} = E_1 + (X \cdot E_1) \quad (3.5)$$

$$E_{2tot} = E_2 + (XP \cdot E_2) \quad (3.6)$$

Det vil nå bli antatt at den totale substrat konsentrasjonen X_{tot} er mye større enn kinase E_1 og fosfatase E_2 konsentrasjonen ($X_{tot} \gg E_1$ og E_2), slik at kompleksene i ligning (3.4) neglisjeres, se ligning (3.7).

²Bevaringsloven sier at verdien er lik før og etter prosessen er fullført.

$$X_{tot} = X + XP \quad (3.7)$$

Gitt at antagelsen om stasjonærtilstand for reaksjonsligningene (3.1) og (3.2), vil konsentrasjonen av kompleksene i ligning (3.3b) og (3.3d) være konstante og veldig lave ($\frac{dXE_1}{dt} \approx 0$ og $\frac{dXPE_2}{dt} \approx 0$), se ligning (3.8) og (3.9).

$$a_1 \cdot X \cdot E_1 - (k_1 + d_1)(X \cdot E_1) = 0 \quad (3.8)$$

$$a_2 \cdot XP \cdot E_2 - (k_2 + d_2)(XP \cdot E_2) = 0 \quad (3.9)$$

Ligning (3.8) løses for E_1 for å sette den inn i ligning (3.5), deretter løses den resulterende ligningen for komplekset $(X \cdot E_1)$, se ligning (3.10).³

Samme for ligning (3.9), løser for E_2 , setter den inn i ligning (3.6), der resulterende ligning løse for komplekset $(X \cdot E_1)$, se ligning (3.11).

$$(X \cdot E_1) = \frac{E_{1tot} X}{K_{M1} + X} \quad (3.10)$$

$$(XP \cdot E_2) = \frac{E_{2tot} XP}{K_{M2} + XP} \quad (3.11)$$

Ligning (3.10) og (3.11) er gitt som metningsfunksjoner, som beskriver hvor hurtig kompleksene $(X \cdot E_1)$ og $(XP \cdot E_2)$ blir dannet, der K_{M1} og K_{M2} er Michaelis-Menten konstantene.

Reaksjonsligning (3.1) og (3.2) kan nå beskrives som reaksjonsligning (3.12), og brukes til å finne uttrykket som beskriver dynamikken til fosforylert substrat XP , se ligning (3.13).



³Denne framgangsmåten er basert på antagelsen om stasjonærtilstand for en enzym katalysert reaksjonsligning som er beskrevet i delkapittel 2.6.

$$\frac{dXP}{dt} = k_1 \cdot (X \cdot E_1) - k_2 \cdot (XP \cdot E_2) \quad (3.13)$$

Ved å sette ligning (3.10) og (3.11) inn i ligning (3.13), har vi nå definert metningskinetikk for fosforylering og defosforylering, se ligning (3.14) .

$$\frac{dXP}{dt} = k_1 \cdot E_{1_{tot}} \frac{X}{K_{M1} + X} - k_2 \cdot E_{2_{tot}} \frac{XP}{K_{M2} + XP} \quad (3.14)$$

Ligning (3.14) blir tilpasset som en funksjon av kinase konsentrasjonen ($E_{1_{tot}} = E_1$), og en fast mengde substrat konsentrasjon ($X = X_{tot} - XP$), se ligning (3.15).

$$\frac{dXP}{dt} = k_1 \cdot E_1 \frac{X_{tot} - XP}{K_{M1} + X_{tot} - XP} - k_2 \cdot E_{2_{tot}} \frac{XP}{K_{M2} + XP} \quad (3.15)$$

Ligning (3.15) blir brukt videre til å utlede det analytiske uttrykket som beskriver fosforylert substrat XP i stasjonærtilstanden, der man setter $\frac{dXP}{dt} = 0$, og løser den for XP ($XP = XP_{ss}$). Dette resulterer i et kvadratisk uttrykk, vist i ligning (3.16).

$$XP = \frac{-(X_{tot} + K_{M1} + V_1/V_2 - V_1/V_2 \cdot X_{tot})}{2 \cdot (1 - V_1/V_2)} + \frac{\sqrt{(W_T + K_{M1} + V_1/V_2 \cdot K_{M2} - V_1/V_2 \cdot X_T)^2 - 4(1 - V_1/V_2)(V_1/V_2 \cdot W_T K_{M2})}}{2 \cdot (1 - V_1/V_2)} \quad (3.16)$$

$$V_1 = k_1 E_1, \quad V_2 = k_2 E_2 \quad (3.17)$$

For å finne et uttrykk som beskriver fosforylert substrat i prosent, som i ligning (3.18), dividerer vi hele uttrykket i ligning (3.16) med X_{tot} . Ligning (3.18) er hentet fra [13].

$$\frac{XP}{X_{tot}} = \frac{V_1/V_2(1 - \hat{K}_{M2}) - \hat{K}_{M1} - 1 + \sqrt{4\hat{K}_{M2}V_1/V_2(V_1/V_2 - 1) + (V_1/V_2(\hat{K}_{M2} - 1) + \hat{K}_{M1} + 1)^2}}{2 \cdot (V_1/V_2 - 1)} \quad (3.18)$$

$$\hat{K}_{M1} = K_{M1}/X_{tot} \quad (3.19)$$

$$\hat{K}_{M2} = K_{M2}/X_{tot} \quad (3.20)$$

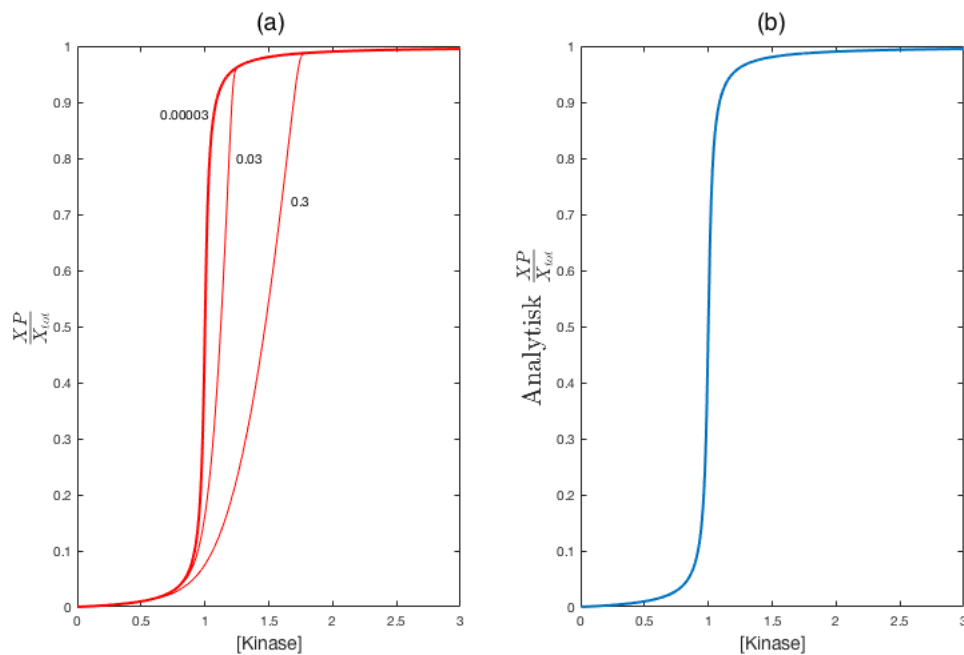
Ved å simulere modellene ((3.3a)-(3.3d)) og det analytiske uttrykket i ligning (3.18), som en funksjon av kinase konsentrasjon, vil dette resultere i at den stasjonære sammenhengen mellom kinase konsentrasjonen $[kinase]$ og utgangen $\frac{XP}{X_{tot}}$ danner nulte orden ultrasensitivitet, se figur 3.6.

Parameter	verdi
k_1	1
k_2	1
$E_{2_{tot}}$	1
E_1	rampe m. stiging 0.00003
X_{tot}	1
K_{M2}	0.01
K_{M1}	0.01

Tabell 3.2: Parameterne som er brukt ved simulering.

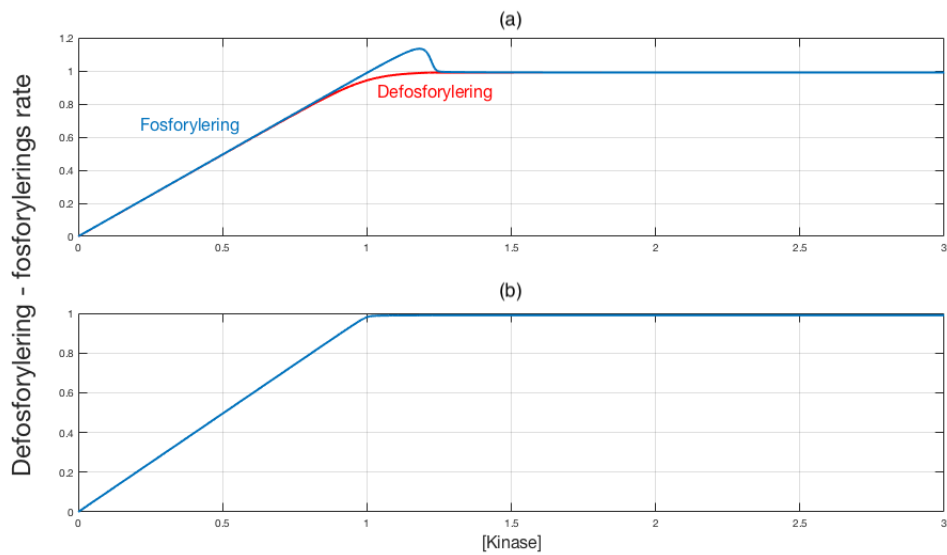
Figur 3.6 viser at responsen gir veldig lite utslag i utgangen $\frac{XP}{X_{tot}}$ ved lav kinase konsentrasjon ($[kinase] < 1$). Når kinase konsentrasjonen er $[kinase] \approx 1$, stiger utgangen $\frac{XP}{X_{tot}}$ veldig raskt til maksimal verdi, og kurven vil deretter være nulte orden ved høyere kinase konsentrasjon ($[kinase] > 1$).

For å holde systemet i stasjonærtilstand, er det viktig å simulere systemet langsomt, slik at raten av fosforylering og defosforylering er antatt å være i likevekt, se figur 3.7. Dette kan gjennomføres ved å redusere kinasetilførselen, som er satt opp av en rampe i Simulink, der stigningstallet i rampen må ha en veldig lav verdi, se figur 3.6a).



Figur 3.6: Panel a) viser responsene ved å simulere modellene i ligning (3.3a)-(3.3d), der de 3 kurvene er simulert med forskjellige stigningstall i rampen i Simulink, som representerer kinasetilførsel. Ved å simulere modellene med stigningstall 0.3 og 0.03 i rampen, vil stigningen skje for raskt, slik at antagelsen om likevekt ikke gjelder, og responsen vil derfor ikke være i stasjonært tilstand. Med et stigningstall på 0.00003 i rampen, er stigningen sakte nok til at det gir en tilnærmet likevekt i raten av fosforylering-defosforylering, og responsen vil derfor være i stasjonært tilstand. Panel b) representerer responsen av det analytiske uttrykket i ligning (3.18), og blir ikke påvirket av de forskjellige endringene i stigningstallet i rampen.

Figuren 3.7a) viser fosforylering-defosforyleringsraten når stigningen i rampen (kinasetilførsel) er for rask. Dette danner oversving i fosforyleringsraten, og antagelsen om likevekt vil derfor ikke gjelde. Figur 3.7b) viser fosforylering-defosforyleringsraten, når systemet er tilnærmet i likevekt.



Figur 3.7: Panel a) og b) representerer raten av fosforylering og defosforylering ved å simulere modellene (ligning (3.3a)-(3.3d)). Panel a) er simulert med stigningstall 0.03 i rampen som representerer kinasetilførsel, som stiger for raskt, og danner oversving ved $[kinase] \approx 1$. Derfor vil antagelsen om likevekt ikke gjelde. Panel b) er simulert med stigningstall på 0.00003 i rampen, som resulterer i en saktere stigning av fosforylering og defosforylering, og vil derfor være tilnærmet i likevekt.

For å få en bedre forståelse for hvorfor systemet i figur 3.5 danner nulte orden ultrasensitiv respons, som i figur 3.6. Det blir kapittel 3.4 vist hva som skjer når systemet blir beskrevet ved metningskinetikk og massevirkningsloven⁴ i fosforylering og/eller defosforyleringsraten.

⁴Massevirkningsloven beskriver at raten i reaksjon, er proporsjonal med konsentrasjonen av et stoff som er involvert i reaksjonen [18].

3.4 Effekten av metningskinetikk eller massevirkningsloven i fosforylering og/eller defosforylering

For å få en bedre forståelse på hvorfor nulte orden ultrasensitivitet blir dannet fra den kjemiske strukturen i figur 3.5, skal man se hvordan responsen blir påvirket at reaksjonen av fosforylering og/eller defosforylering blir definert ved massevirkningsloven (første orden) eller metningskinetikk.

Det blir også gitt en introduksjon til ratebalansen som er en graf (se figurene 3.8a), 3.10a), 3.11a) og 3.12a)) som er satt opp som forholdet mellom $\frac{XP}{X_{tot}}$ og ratene i reaksjonsligning (3.21). Her blir ratebalansen benyttet til å finne stasjonærverdiene for systemet, som leses av hvor raten av fosforylering (FR) og defosforylering (BR) krysser hverandre ($FR = BR$), se for eksempel figur 3.8a).



$$\frac{dXP}{dt} = FR - BR \quad (3.22)$$

I dette delkapittelet defineres FR (forover reaksjon) for raten av fosforylering, og BR (bakover reaksjon) for raten av defosforylering.

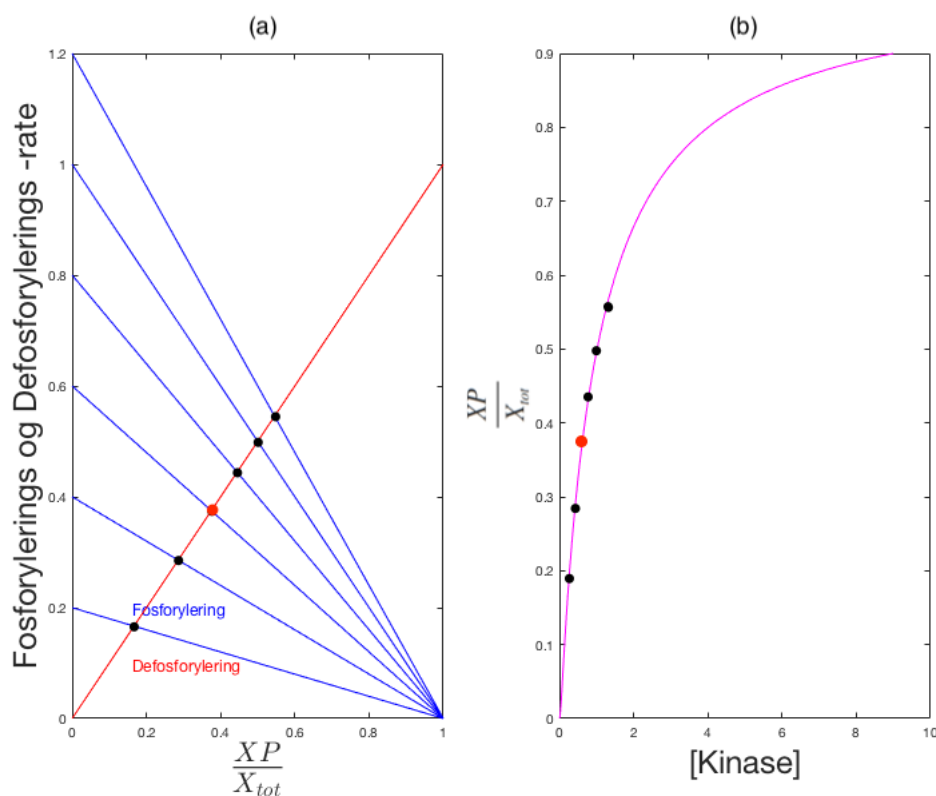
Parameter	verdi
k_1	1
k_2	1
E_2	1
$E_{1_{tot}}$	0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2
E_1	rampe m. stiging 0.00003
X_{tot}	1
K_{M2}	0.01
K_{M1}	0.01

Tabell 3.3: Parameterne som er brukt ved simulering.

3.4.1 Fosforylering og defosforylering beskrevet ved massevirkningsloven

Figur 3.8 viser resultatet av at raten FR og BR er beskrevet ved massevirkningsloven, som vil si at ratene er avhengig av ratekonstanten (k_1 og k_2) og konsentrasjonen av kinase (E_1) eller fosfatase (E_2). Fosforyleringsraten (FR) i ratebalansen i figur 3.8a), er blitt simulert med forskjellige verdier i kinase konsentrasjonen E_1 , som gir en oversikt over de stasjonære verdiene i systemet, se de svarte punktene i figur 3.8.

Det viser seg at fosforyleringsraten i figur 3.8a), som er av første orden, vil lineært gå mot null når substratene X blir fosforylert. Defosforyleringsraten i 3.8a) vil øke lineært når mer fosforylert substrat XP dannes.

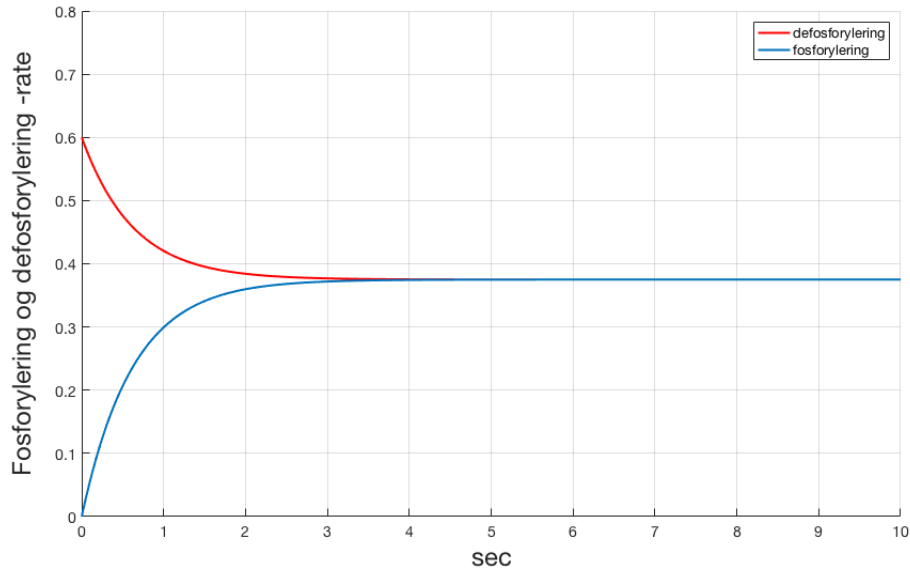


Figur 3.8: Panel a) representerer ratebalansen av systemet, hvor de svarte punktene på kurvene viser hvor utgangen $\frac{XP}{X_{tot}}$ er i stasjonært tilstand. Panel b) representerer responsen av den stasjonære sammenhengen mellom $\frac{XP}{X_{tot}}$ og kinase konsentrasjonen [*kinase*].

$$FR = k_1 \cdot E_1(X_{tot} - XP) \quad (3.23)$$

$$BR = k_2 \cdot E_{2_{tot}} XP \quad (3.24)$$

Ved å ta utgangspunkt i de stasjonære verdiene av utgangen $\frac{XP}{X_{tot}}$, som er funnet i ratebalansen (svarte punktene i figur 3.8a)), og plotter de sammen med verdiene av kinase konsentrasjonene ($E_1 = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2$) som ble brukt til å danne fosforyleringsratene i figur 3.8a), vil man finne den stasjonære responsen i figur 3.8b).

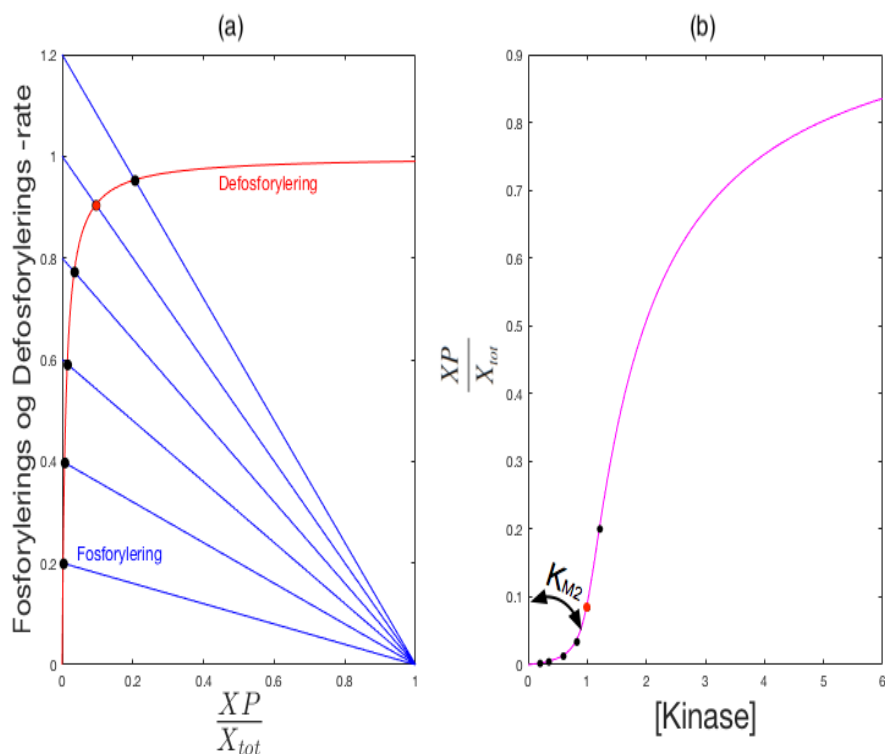


Figur 3.9: Viser raten av fosforylering og defosforylering i tidsplanet, der kinase konsentrasjonen er $E_1 = 0.6$, som resulterer i en stasjonærverdi på 0.375

Figur 3.9 viser raten av fosforylering FR og defosforylering BR i tidsplanet med en gitt kinase konsentrasjon $E_1 = 0.6$, som resulterer i at ratene er i stasjonært tilstand ved 0.375. Denne informasjonen kan også leses ut i fra ratebalansen, se rødt punkt i figur 3.8a).

3.4.2 Defosforylering beskrevet av metningskintekikk, fosforylering beskrevet ved massevirkningsloven

Figur 3.10 viser resultatet av at fosforyleringsraten (FR) er beskrevet ved massevirkningsloven, og defosforyleringsraten (BR) er gitt som metningskintekikk, se ligning (3.25) og (3.26).



Figur 3.10: Panel a) representerer ratebalansen av systemet, hvor de svarte punktene på kurvene viser hvor i $\frac{XP}{X_{tot}}$ systemet er i stasjonærtilstand. Panel b) representerer responsen av den stasjonære sammenhengen mellom $\frac{XP}{X_{tot}}$ og kinase konsentrasjonen [*kinase*].

$$FR = k_1 \cdot E_1(X_{tot} - XP) \quad (3.25)$$

$$BR = k_2 \cdot E_{2_{tot}} \frac{XP}{K_{M2} + XP} \quad (3.26)$$

Ved lav kinase konsentrasjon [*kinase*], er det lite utslag i utgangen $\frac{XP}{X_{tot}}$, se figur 3.10b). Når fosfatase blir mettet av substrater (dette skjer ved de rødmarkerte punktene i figur 3.10 a) og b)), vil defosforyleringsraten i figur 3.10a) ende opp i nulte orden. Når defosforyleringsraten er i nulte orden, sammen med økende kinasekonsentrasjon, vil utgangen $\frac{XP}{X_{tot}}$ få en kraftig stigning.

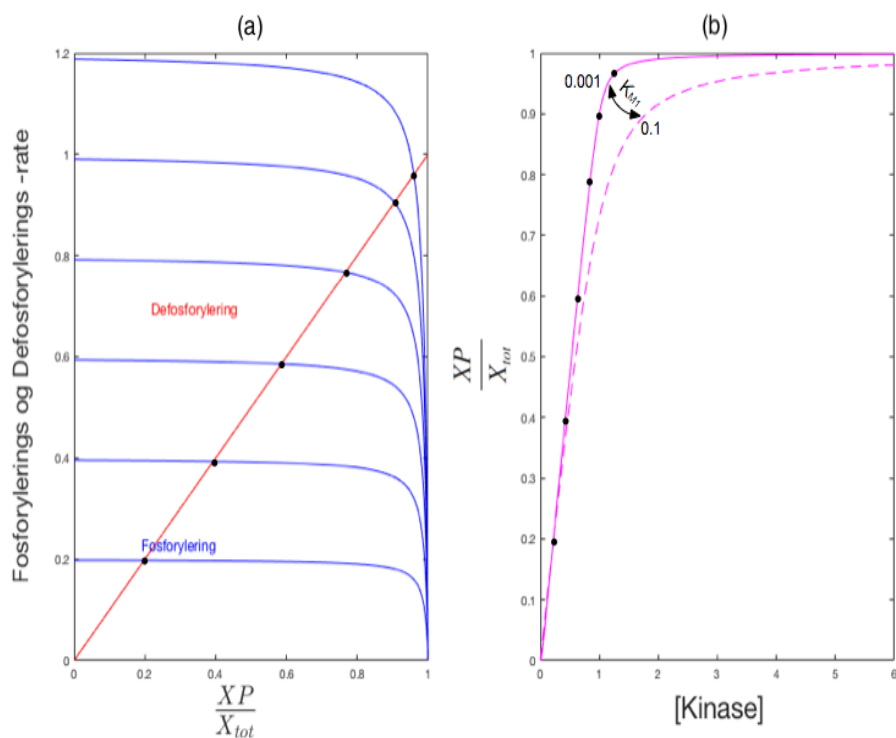
Raten av fosforylering vil derimot fortsatt lineært ned mot null, sammen med økende kinase konsentrasjon og minkende substratkonsentrasjon X , se de blå kurvene i figur 3.10a).

Ved å endre Michaelis-Menten konstanten K_{M2} i *BR* ligning (3.26), kan man bestemme bindingsforholdet mellom fosforylert substrat XP og fosfatasen, som vil påvirke den nederste delen i responsen, se figur 3.10b).

- Øker man verdien i K_{M2} ($K_{M2} > 1$) blir bindingsforholdet dårligere, og kurven vil bli mer hyperbolsk (Michaelis-Menten respons).
- Ved å redusere verdien i K_{M2} ($K_{M2} < 1$), vil defosforyleringsraten gå raskere inn i nulte orden, og den stasjonære responsen i figur 3.10b) vil gi mindre utslag i utgangen $\frac{XP}{X_{tot}}$. Dette skjer ved lav kinase konsentrasjon, til fosfatasen er blitt mettet, og den vil derfor stige kraftig.

3.4.3 Fosforylering beskrevet av metningskinetikk, defosforylering beskrevet ved massevirkningsloven

Figur 3.11 viser resultatet av metningskinetikk i fosforyleringsraten (FR), og der raten av defosforylering (BR) er beskrevet ved massevirkningsloven, se ligning (3.27).



Figur 3.11: Panel a) representerer ratebalansen, hvor de svarte punktene viser hvor i utgangen $\frac{XP}{X_{tot}}$ systemet er i stasjonærtilstand. Panel b) representerer responsen av den stasjonære sammenhengen mellom $\frac{XP}{X_{tot}}$ og kinase konsentrasjonen [kinase].

$$FR = k_1 \cdot E_1 \frac{X_{tot} - XP}{K_{M1} + X_{tot} - XP} \quad (3.27)$$

$$BR = k_2 \cdot E_{2_{tot}} XP \quad (3.28)$$

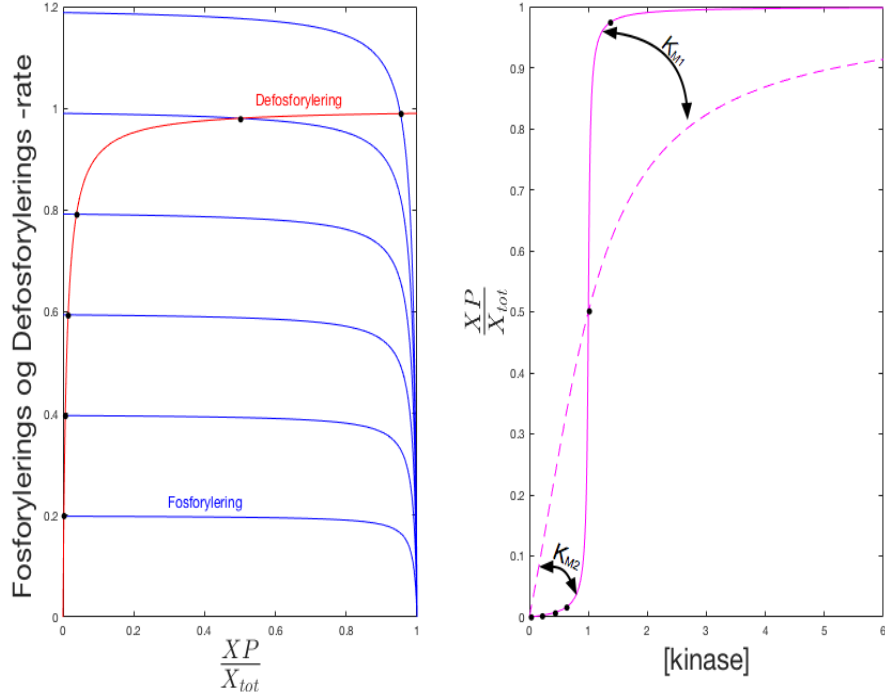
Den stasjonære responsen i figur 3.11b), går raskt opp i maksimal verdi, som vil si at alt substratet X blir raskt fosforylert til substratet XP . Årsaken er at fosforyleringsraten i ratebalansen (figur 3.11a)) er en flat kurve

mellom utgangsverdien $\frac{XP}{X_{tot}}$ 0 og 0.8, som gjør at kinase konsentrasjonen $[kinase]$, sammen med fosforyleringsraten, får fosforylert substrat XP til å øke momentant [13].

- Ved å sette en lav verdi i K_{M1} ($K_{M1} < 1$) blir bindingsforholdet mellom substratet og kinasen sterkere, og vil raskere gå opp i maksimalverdi.
- Ved å øke K_{M1} ($K_{M1} > 1$) vil responsen bli mer hyperbolsk (Michaelis-Menten respons), se figur 3.11b).

3.4.4 Fosforylering og defosforylering beskrevet av metningskinetikk

Figur 3.12 viser resultatet av metningskinetikk i både fosforyleringsraten (FR) og defosforyleringsraten (BR), som gir den uttrykket som ble funnet i kapittel 3.3, vist i ligning (3.14). Den stasjonære responsen mellom utgangen $\frac{XP}{X_{tot}}$ og konsentrasjonen $[kinase]$ i figur 3.12, er den samme som ble presentert i figur 3.6b).



Figur 3.12: Panel a) representerer ratebalansen av systemet, hvor de svarte punktene på kurvene viser hvor systemet er i stasjonærtilstand. Panel b) representerer responsen av den stasjonære sammenhengen mellom utgangen $\frac{XP}{X_{tot}}$ og kinase konsentrasjonen $[kinase]$, hvor den stiplede lilla kurven representerer en Michaelis-Menten respons, og lilla kurve er av nulte orden ultrasensitivitet.

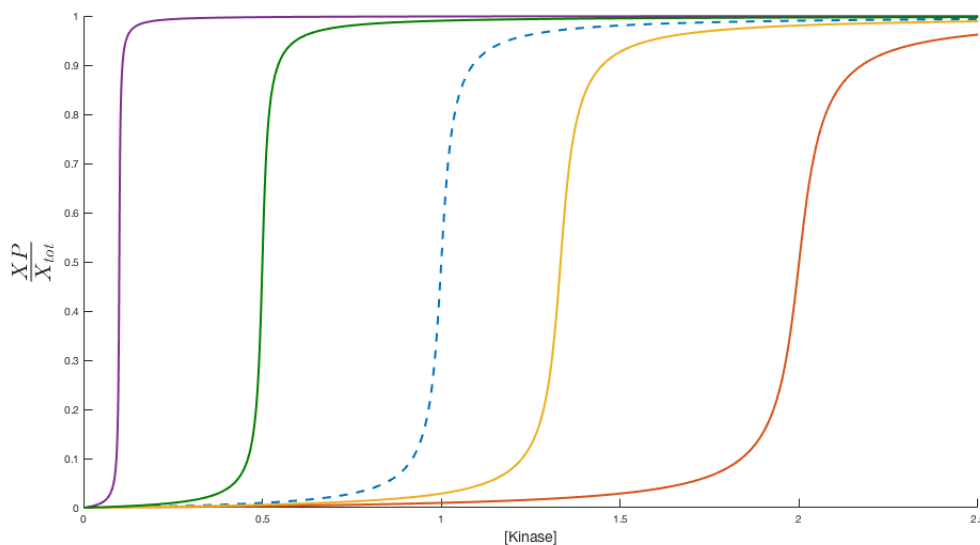
$$FR = k_1 \cdot E_1 \frac{X_{tot} - XP}{K_{M1} + X_{tot} - XP} \quad (3.29)$$

$$BR = k_2 \cdot E_{2_{tot}} \frac{XP}{K_{M2} + XP} \quad (3.30)$$

Dersom $K_{M1} < 1$ og $K_{M2} < 1$, vil fosforyleringsraten og defosforyleringsraten gå raskere inn i nulte orden, og den stasjonære responsen vil resultere i en brattere sigmoid kurve, se figur 3.12b).

3.4.5 Effekten av å endre ratekonstantene k_1 og k_2

Nå som man har sett at metningskinetikken for fosforylering og defosforylering er årsaken til nulte orden ultrasensitivitet i systemet (figur 3.5), skal man nå se på effekten av å endre ratekonstantene k_1 og k_2 i reaksjonsratene, ved å simulere modellen i ligning (3.15), se figur 3.13.



Figur 3.13: Viser hvordan det stasjonære forholdet i reaksjonen som er vist i figur 3.5 blir påvirket av endringer i rate konstanten k_1 og k_2 . Blå stiplet kurver viser samme respons som er vist i figur 3.12b), for å gi en relasjon for hvordan endringene i rate konstantene påvirker responsen. Parameterne som danner de forskjellige kurvene er gitt: $E_2 = 1$, $K_{M1} = K_{M2} = 0.01$, $E_1 = 1$, $X_{tot} = 1$.

Kurve	k_1	k_2
Blå stiplet	1	1
Lilla	1	0.1
Grønn	1	0.5
Oransj	1	2
Gul	1.5	2

Tabell 3.4: Ratekonstantene som danner kurvene

Dersom $k_1 > k_2$ vil det si at fosforylering av substratet X er mye raske enn defosforylering av fosforylert substrat XP , som gir et resultat av en brattere sigmoid kurve ved lav kinase konsentrasjon, se lilla kurve i figur 3.13.

Dersom $k_1 < k_2$ vil reaksjonen av defosforylering være raskere enn fosforylering. Dette vil få systemet til å reagere ved en høyere kinase konsentrasjon (responsen er forskjøvet mot høyre i grafen, se figur 3.13). I tillegg er stigningen/brattheten til responsen blitt redusert, se forskjellen mellom lilla, grønn og gul kurve i figur 3.13.

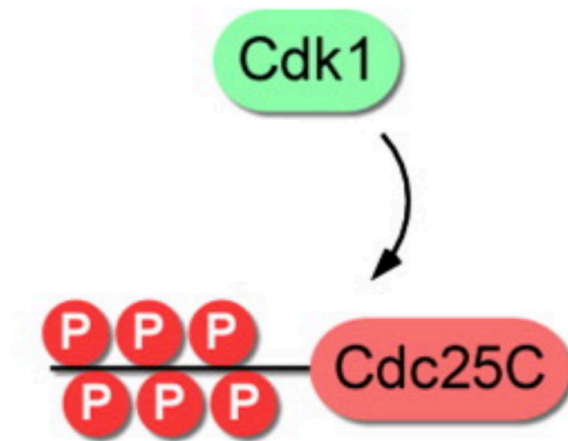
For å teste forholdet mellom k_1 og k_2 , ble det valgt å ta utgangspunkt i ratekonstantene til oransj kurve i figur 3.13, hvor ratekonstanten k_1 ble endret fra 1 til 1.5, som får systemet til å gi en raskere fosforylering av substratene, ved lavere kinase konsentrasjon, se forskjellen mellom gul og oransj kurve i figur 3.13.

Forholdet mellom k_1 og k_2 er avhengig av hvem som er størst. Dersom $k_1 = k_2$ vil du få samme responsen som blå stiplet kurve i figur 3.13, uavhengig av størrelsen.

3.5 Flerstegsreaksjoner av fosforylering viser ultrasensitivitet

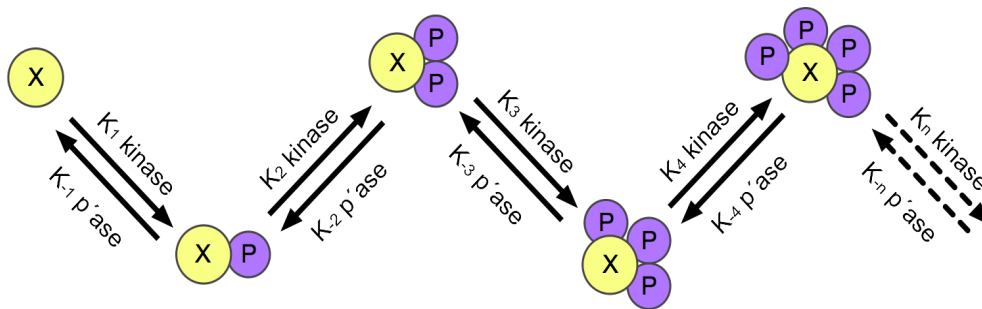
I dette delkapittelet skal man se videre på reaksjoner av fosforylering-defosforylering, men hvor substratet kan bli fosforylert flere ganger i et system. For et slik system er substratene gitt med flere aktive seter, der flere protein kinaser kan binde seg på substratet.

Et system hvor det skjer multiple fosforyleringer kan refereres til en biologisk prosess kalt for mitose. En mitose er en celledelingsprosess, hvor foreldrecellen deler seg for å danne to nye kjerner (datterceller). Aktiviteten av fosfatase proteinet Cdc25C, og protein kinase Cdk1, er med å bidrar til regulere av denne prosessen, se figur 3.14.



Figur 3.14: Viser kjemisk struktur av at Cdc25C blir fosforylert flere ganger, og blir katalysert av protein kinase Cdk1. Et eksperiment (se artikkel [19]) ble utført for å finne responsen av fosfatase Cdc25C ved aktiviteten av Cdk1. Den stasjonære responsen ble sammenlignet med en Hill-koeffisient mellom 11 – 32, som viser at systemet er veldig ultrasensitiv. Årsaken var multiple fosforyleringer av substratene [13]. Illustrasjonen er hentet ut i fra [19].

En kjemisk struktur som viser multiple fosforyleringer av et substrat, er fremstilt som en reaksjonsligning, vist i figur 3.15. I dette delkapittelet antas det at substratet blir aktivert eller deaktivert, dersom alle aktive setene på substratet er bundet med kinase.



Figur 3.15: Viser reaksjonsligning av n -antall reaksjoner av fosforylering-defosforylering. Gul sirkel X representerer substratet, lilla sirkel P som er bundet til substratet X representerer antall ganger substratet er blitt fosforylert.

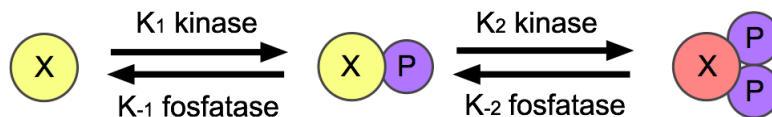
For å redegjøre symbolsk bruk i dette kapittelet, er det satt opp en tabell 3.5 som gir en beskrivelse av benevningene.

Benevning	Navn
X	substrat
XP	fosforylert substrat
XPP	dobbel fosforylert substrat
XP_n	n -antall fosforylert substrat
E_1	kinase
E_2	fosfatase

Tabell 3.5: Beskrivelse av benevningene som er brukt i dette delkapittelet

3.5.1 Dobbel fosforylering

For å gi en introduksjon av flerstegsreaksjoner av fosforylering-defosforylering, tar vi først utgangspunktet i dobbel fosforylering, hvor substratet binder seg til to protein kinaser E_1 , i to forskjellige reaksjoner, vist i figur 3.16.



Figur 3.16: Viser reaksjonsligningen av dobbel fosforylering-defosforylering, der substratet X binder seg med to protein kinaser, og danner dobbel-fosforylert substrat XPP . Gul sirkel X representerer inaktivt substrat, rød sirkel X representerer aktivert substrat, og lilla sirkel P bundet til substratet X representerer antall ganger substratet er blitt fosforylert. Illustrasjonen er reproduisert fra figur i artikkel [14] side 3.

Reaksjonsligningen i figur 3.16 er definert av tre forskjellige differensialligninger ((3.31a)-(3.31c)), som beskriver dynamikken til substratet X , fosforylert substrat XP og dobbel fosforylert substrat XPP .

$$\frac{dX}{dt} = -k_1 \cdot E_1 \cdot X + k_{-1} \cdot E_2 \cdot XP \quad (3.31a)$$

$$\frac{dXP}{dt} = k_1 \cdot E_1 \cdot X - k_{-1} \cdot E_2 \cdot XP - k_2 \cdot E_1 \cdot XP + k_{-2} \cdot E_2 \cdot XPP \quad (3.31b)$$

$$\frac{dXPP}{dt} = k_2 \cdot E_1 \cdot XP - k_{-2} \cdot E_2 \cdot XPP \quad (3.31c)$$

Ratekonstantene k_1 og k_2 beskriver hastigheten av fosforylering, og k_{-1} og k_{-2} er ratekonstantene som beskriver hastigheten av defosforylering, der E_1 og E_2 representerer konsentrasjonen av kinase og fosfatase.

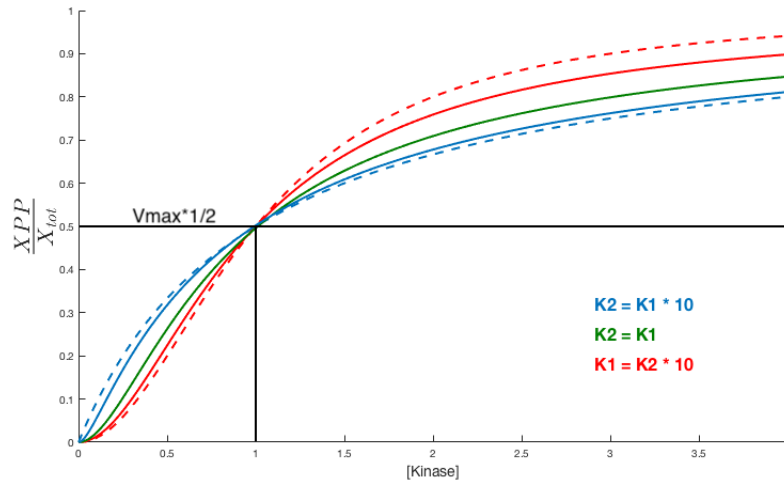
Konsentrasjonen av substratet er antatt å være bevart, og man må derfor definere ligning (3.32) for den totale substrat konsentrasjonen i systemet.

$$X_{tot} = X + XP + XPP \quad (3.32)$$

For å finne uttrykket av dobbel-fosforylert substrat XPP i stasjonære tilstanden, må alle tre differensialligningene settes lik null, slik at vi får tre algebraiske uttrykk i et ligningssystem som må løses for XPP (XPP_{ss}). Deretter blir hele uttrykket dividert med den totale substratkonsentrasjonen X_{tot} , for å få uttrykket som beskriver endringen av XPP i prosent, se ligning 3.33. Dette uttrykket er hentet fra James E. Ferrell i artikkel [14] (box 1). Konstantene K_1 og K_2 i ligning (3.34) beskriver sensitiviteten for hver reaksjon.

$$\frac{XPP}{X_{tot}} = \frac{(E_1)^2}{K_1 K_2 + K_2 \cdot E_1 + (E_1)^2} \quad (3.33)$$

$$K_1 = \frac{k_{-1}(E_2)^2}{k_1}, \quad K_2 = \frac{k_{-2}E_2}{k_2} \quad (3.34)$$



Figur 3.17: Viser responsen av den stasjonære sammenhengen mellom kinase konsentrasjonen $[kinase]$ og utgangen $\frac{XP}{X_{tot}}$, med forskjellige verdier i K_1 og K_2 . Konstantene K_1 og K_2 er valgt med forbehold om at responsen er i EC50 ved $[kinase] = 1$, hvor de stiplede kurvene er generert av Hill-funksjonen. Blå stiplede kurven har en Hill-koeffisient $n = 1$. Rød stiplede kurven har en Hill-koeffisient $n = 2$. Grafen er gjenskapt fra figuren i artikkel [14].

Figur 3.17 viser responsene fra reaksjonen av dobbel fosforylering med forskjellige verdier i K_1 og K_2 , med forbehold om at responsen er i EC50⁵ ved $[kinase] = 1$.

Resultatene i figur 3.17 er reproduksjon fra James E.Ferrel's artikkel [14], og viser at responsen fra en reaksjon av dobbel-fosforylering maksimalt kan oppnå en Hill-koeffisient $n = 2$. Det vil si at systemet er ultrasensitiv i følge Goldbeter og Koshland [13].

⁵EC50: Effektiviteten av stoffets konsentrasjon ved 50% av maksimal effekten. I denne rapporten brukes EC50 for å beskrive verdien av utgangen, nå 50% av den totale substrat konsentrasjonen er blitt fosforylert

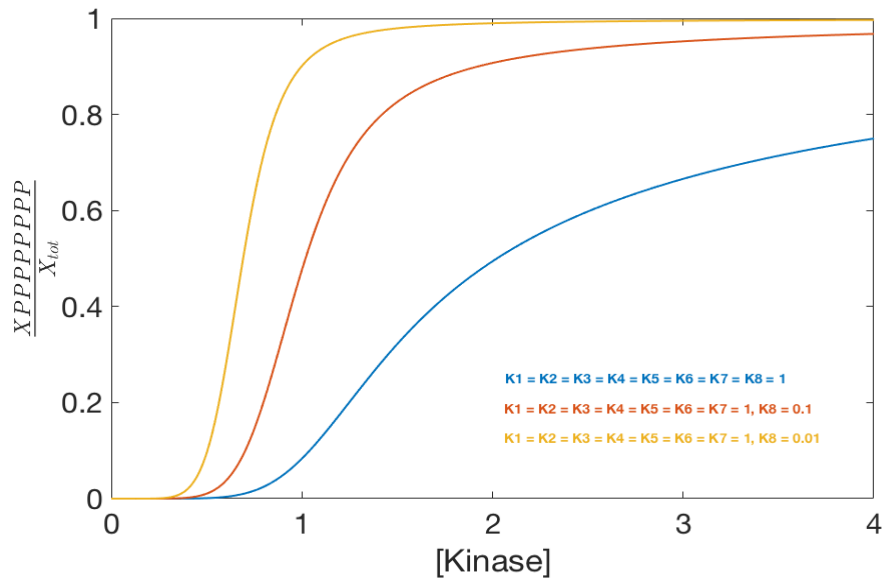
3.5.2 n-antall fosforyleringer

I dette delkapittelet skal vi se på effekten av flere enn bare to reaksjoner av fosforyleringer-defosforylering. Å utlede modeller for et system med flere reaksjoner etter hverandre av fosforylering-defosforylering kan i utgangspunktet ende opp i mange differensialligninger. Istedenfor benyttes det analytiske uttrykket i ligning (3.35), som er hentet ut fra James E. Ferrel's artikkel [14]. Dette gir en beskrivelse av n-antall reaksjoner av fosforylering-defosforylering i stasjonært tilstand.

$$\frac{XP_n}{X_{tot}} = \frac{(E_1)^n}{(K_1 \cdots K_n) + (K_2 \cdots K_n)E_1 + (K_3 \cdots K_n)(E_1)^2 + (E_1)^n} \quad (3.35)$$

$$K_1 = \frac{k_{-1}(E_2)^2}{k_1}, \quad K_2 = \frac{k_{-2}E_2}{k_2} \quad (3.36)$$

n-antall fosforyleringer kan resultere i veldig ultrasensitivitet respons, men dette er avhengig av kooperativiteten i reaksjonen. Ved å justere konstantene K_n i ligning (3.35), kan man selv bestemme kooperativiteten i systemet. Det vil si at dannelsen av ultrasensitivitet, ved å benytte modellen i ligning (3.35), er parameter avhengig, vist i figur 3.18.

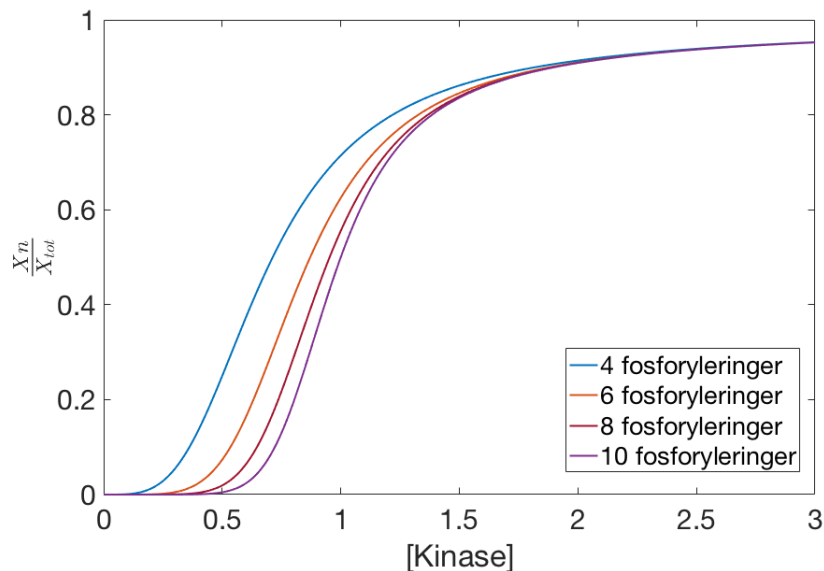


Figur 3.18: Viser responser av åtte fosforyleringer, hvor $K_1 = K_2 = K_3 = K_4 = K_5 = K_6 = K_7 = 1$ med forskjellige verdier i K_8 . Blå kurve er gitt med $K_8 = 1$. Oransj kurve er gitt med $K_8 = 0.1$. Gul kurve er gitt med $K_8 = 0.01$.

Figur 3.18 viser endringer i responsen ved å forandre K_8 . Kriteriene for høy ultrasensitivitet i systemet er når den siste konstanten K_8 blir mindre enn de andre konstantene $K_{n<8}$, som vil si at den siste reaksjonen av fosforylering må være raskere enn de andre reaksjonene, se oransj og gul kurve i figur 3.18.

Effekten av 4, 6, 8 og 10 fosforyleringer

Her skal man se på effekten av å øke antall reaksjoner av fosforylering-defosforylering i systemet, ved at parameterene er satt til å være lik for hver reaksjon.



Figur 3.19: Viser responsene av 4,6,7 og 10 fosforyleringer av et substrat: **Blå kurve** er generert fra 4 fosforyleringer. Oransj kurve er generert fra 6 fosforyleringer. Rød kurve 8 fosforyleringer. Lilla kurve 10 fosforyleringer. Alle konstantene i reaksjonen er satt med $K_n = 0.1$.

Figur 3.19 viser at antall fosforyleringer påvirker den stasjonære responsen, og at system blir mer ultrasensitiv når antall fosforyleringer øker, det vil si at den sigmoide kurven i figur 3.19 blir brattere.

Det viser seg også at responsen forandrer seg mindre når man øker antall fosforyleringer for et system som allerede har mange reaksjoner av fosforylering-defosforylering fra før. Dette kommer godt fram i rød og lilla kurve i figur 3.19, i forhold til blå og oransj kurve, hvor forskjellen (differensen) er større.

3.6 Effekten av inhibitor på kinase kan resultere i ultrasensitivitet

En reaksjon av fosforylering-defosforylering som blir påvirket av inhibitor på kinasen, kan resultere i ultrasensitivitet. En slik kjemisk struktur er presentert i figur 3.20.

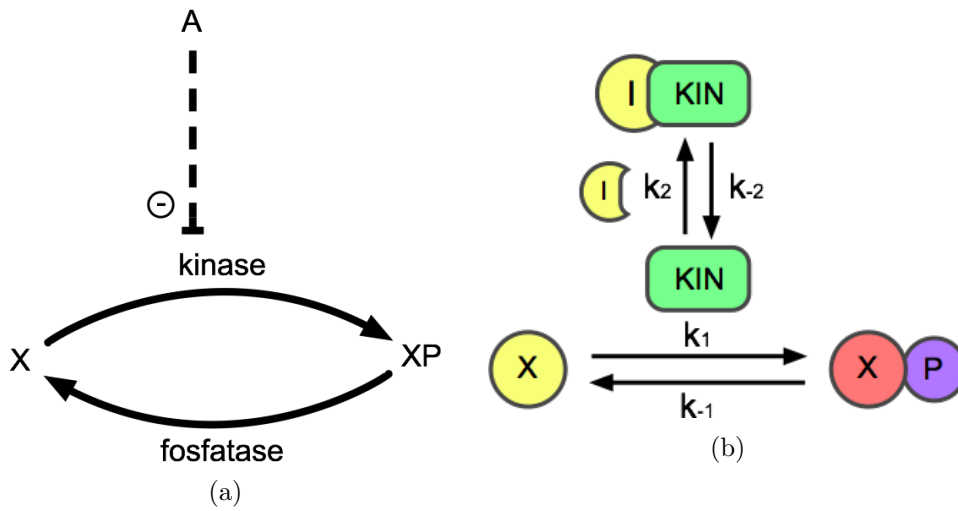
Å utlede et analytisk uttrykk⁶ for fosforylert substrat XP ved stasjonær tilstand av den kjemiske strukturen, vist i figur 3.20, er mer komplisert enn for de andre analytiske uttrykkene som er blitt vist fram i de andre delkapitlene. Det er derfor valgt å bruke modellene (ligning (3.37a)-(3.37d)) til å simulere systemet, som også vil gi mer informasjon om dynamikken til de forskjellige stoffene.

For å redegjøre symbolsk bruk i kapitlet, er det satt opp en tabell 3.6 som gir en beskrivelse av benevningene.

Benevning	Navn
X	substrat
XP	fosforylert substrat
$(I \cdot E_1)$	inhibitor-kinase kompleks
I	inhibitor
E_1	kinase
E_2	fosfatase

Tabell 3.6: Beskrivelse av benevningene som er brukt i dette kapitlet

⁶Det analytiske uttrykket finnes i Ferrell's artikkel [14] box 5.



Figur 3.20: Viser kjemisk struktur av fosforylering-defosforylering hvor inhibitor kan binde seg med kinasen: Substratet X blir fosforylert av kinase KIN , der kinase kan binde seg med inhibitor I for å danne inhibitor-kinase komplekset som gjør at kinasen blir inaktiv. Kinase konsentrasjonen vil derfor bli redusert, slik at antall aktiv kinase for å fosforylere substratet X er begrenset.

Systemet er beskrevet av 4 differensialligninger, som beskriver dynamikken til hvert stoff i systemet. Modellene blir også antatt å være beskrevet ved massevirkningsloven, se ligning (3.37a)-(3.37d).

$$\frac{dX}{dt} = -k_1 \cdot E_1 \cdot X + k_{-1} \cdot XP \quad (3.37a)$$

$$\frac{dXP}{dt} = k_1 \cdot E_1 \cdot X - k_{-1} \cdot XP \quad (3.37b)$$

$$\frac{dE_1}{dt} = -k_2 \cdot E_1 \cdot I + k_{-2} \cdot (I \cdot E_1) \quad (3.37c)$$

$$\frac{d(I \cdot E_1)}{dt} = k_2 \cdot E_1 \cdot I - k_{-2} \cdot (I \cdot E_1) \quad (3.37d)$$

Konsentrasjonen av stoffene er også antatt å være bevart, som gjør at man må definere ligninger som beskriver den totale mengden kinase $kinase_{tot}$ (3.40), inhibitor I_{tot} (3.39) og substrat X_{tot} (3.38).

$$X_{tot} = X + XP \quad (3.38)$$

$$I_{tot} = I + (I \cdot E_1) \quad (3.39)$$

$$kinase_{tot} = E_1 + (I \cdot E_1) \quad (3.40)$$

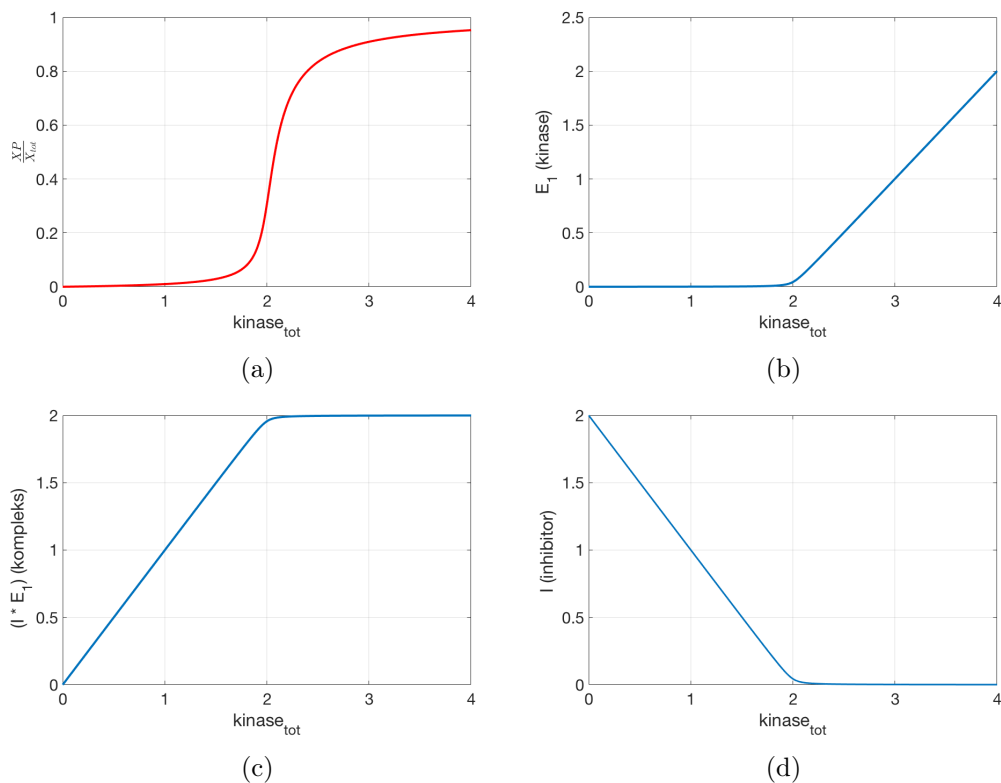
Under simulering ble det valgt å tilføre kinsase konsentrasjon ved å kontinuerlig legge til en veldig lav verdi i dynamikken til kinase konsentrasjonen E_1 , se ligning (3.41). Dette får kinase konsentrasjonen til å stige sakte, slik at antagelsen om likevekt er gitt for systemet.

$$\frac{dE_1}{dt} = -k_2 \cdot E_1 \cdot I + k_{-2} \cdot (I \cdot E_1) + \underbrace{10^{-6}}_{\text{tilfører kinase}} \quad (3.41)$$

Figur 3.21 viser resultatene av å simulere modellene ((3.37a)-(3.37d)), ved å bruke parameterene i tabell 3.7. På grunn av $kinase_{tot}$ (ligning (3.40)) består av dynamikken til fritt kinasen E_1 (ligning (3.37c)) og komplekset $(I \cdot E_1)$ (ligning (3.37d)). Velger man å bruke $kinase_{tot}$ som en funksjon av endringen i kinase konsentrasjonen.

Parameter	Verdi
I_{tot}	2
X_{tot}	1
k_1	10
k_{-1}	1
k_2	1000
k_{-2}	1

Tabell 3.7: Parameterne brukt ved simulering.



Figur 3.21: Viser resultatene av reaksjonen fosforylering-defosforylering med effekt av inhibitor på kinasen: Panel a) representerer den stasjonære sammenhengen av den totale kinase konsentrasjonen $kinase_{tot}$ og fosforylert substrat $\frac{XP}{X_{tot}}$. Panel b) viser endringen (dynamikken) i kinase E_1 . Panel c) viser dynamikken i inhibitor-kinase-komplekset ($I \cdot E_1$). Panel d) viser dynamikken til inhibitor I .

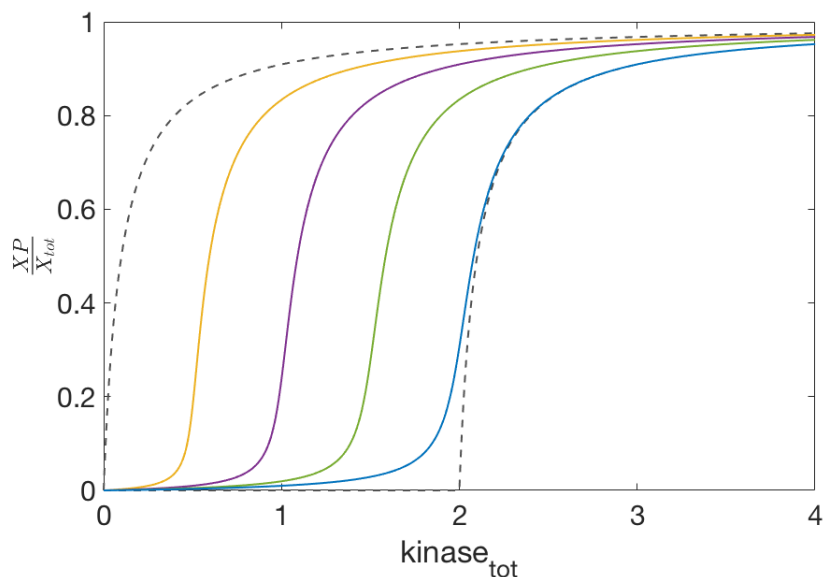
Figur 3.21 viser at reaksjonen mellom kinase E_1 og inhibitor I er mye raskere enn for reaksjonen av fosforylering, altså er $k_2 \gg k_1$. Dette gjør at nesten all kinase E_1 binder seg til inhibitor I for å danne inhibitor-kinase komplekset ($I \cdot E_1$), som gjør at det nesten ikke er mer kinase konsentrasjon igjen for å fosforylere substratet X , se figur 3.21 (b) og (c) ved $kinase_{tot} < 2$.

Når $kinase_{tot} > 2$, er nesten all inhibitor I blitt bundet med kinase E_1 , som vil si at inhibitor I er blitt mettet, se figur 3.21. Dermed vil kinase konsentrasjonen begynne å stige (se figur 3.21b), og dannelsen av XP skjer veldig raskt, se figur 3.21 (a) og (b).

Figur 3.21a viser at den kjemiske strukturen i figur 3.20 er ultrasensitiv, men kriteriene er at reaksjonen mellom inhibitor I og kinasen E_1 må være mye raskere enn for reaksjonen av fosforylering ($k_2 \gg k_1$).

3.6.1 Effekten av endringer i den totale inhibitor konsentrasjonen I_{tot}

For å se effekten av å endre den totale inhibitor konsentrasjonen I_{tot} i systemet, er de samme modellene ((3.37a)-(3.37d)) og parameterne blitt benyttet.



Figur 3.22: Viser responsene av den stasjonære sammenhengen mellom $\frac{XP}{X_{tot}}$ og $kinase_{tot}$ fra reaksjonen av fosforylering-defosforylering med effekten av inhibitor på kinasen, og endringer i den totale inhibitor konsentrasjonen I_{tot} . De to grå stiplede kurvene representerer grensene for hvor den stasjonære responsen blir påvirket ved å endre I_{tot} mellom 0 og 2.

Kurve	I_{tot}
Gul	0.5
Lilla	1
Grønn	1.5
Blå	2

Tabell 3.8: Tabell over kurve og tilhørende I_{tot} verdi.

Ved å redusere den totale inhibitor konsentrasjonen I_{tot} i systemet, vil mindre deler av kinasen konsentrasjonen E_1 bli bundet med inhibitor I , som inhibitor-kinase-kompleks ($I \cdot E_1$), og vil påvirke systemet ved at utgangen $\frac{XP}{X_{tot}}$ stiger ved en lavere kinase konsentrasjon, se gul kurve i figur 3.22. Øker man verdien i I_{tot} blir systemet mer sensitivt ved høyere kinase konsentrasjon $kinase_{tot}$, som forskyver responsen til høyre i grafen, se blå kurve i figur 3.22.

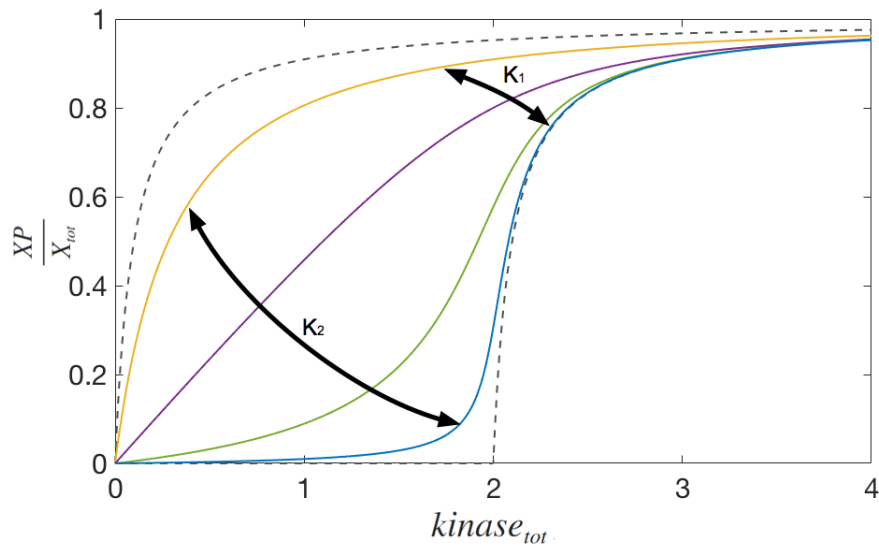
3.6.2 Effekten av å endre ratekonstanten k_2

Igjen benyttes modellene i ligning (3.37a)-(3.37d) og de samme parameterne. Det vil bli påført endringer i ratekonstanten k_2 for å se hvordan dette påvirker den stasjonære responsen av systemet. Ratekonstanten k_1 er lik for alle de simulerte responsene, er figur 3.23.

Isteden for å forholde seg til de 4 rate konstanten, er det valgt å definere K_1 for reaksjonen av fosforylering-defosforylering, og K_2 for bindingen mellom kinase og inhibitor.

$$K_1 = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (3.42)$$

$$K_2 = \frac{k_{-2}}{k_2} \quad (3.43)$$



Figur 3.23: Viser responsene av den stasjonære sammenhengen mellom $\frac{XP}{X_{tot}}$ og $kinase_{tot}$ fra reaksjonen av fosforylering-defosforylering med effekt av inhibitor på kinasen, der systemet er blitt simulert med forskjellige verdier i ratekonstanten k_2 . De to grå stiplede kurvene representerer grensene for hvor den stasjonære responsen blir påvirket ved å endre I_{tot} mellom 0 og 2.

Kurve	K_2
Gul	1
Lilla	0.1
Grønn	0.01
Blå	0.001

Tabell 3.9: Tabell over kurve og tilhørende I_{tot} verdi.

Figur 3.23 viser at systemet blir mer ultrasensitiv når $K_2 < K_1$, som vil si at bindingen mellom kinase E_1 og inhibitor I er sterkere, og dannelsen av inhibitor-kinase-komplekset går raskere, se blå kurve i figur 3.23.

Dersom $K_2 > K_1$ er bindingen mellom kinase E_1 og inhibitor I dårligere, og dannelsen av inhibitor-kinase-komplekset går tregere, se gul kurve i figur 3.23.

De svarte pilene mellom kurvene i figur 3.23 viser hvor kurven blir påvirket av dissosiasjonskonstantene K_1 og K_2 . Der K_1 påvirker den øverste delen av kurven, K_2 den nederste delen på kurven.

3.7 Konkurrerende substrater i dobbel fosforylering-defosforylering viser bistabilitet

For en kjemisk struktur som er satt opp som en reaksjon av dobbel fosforylering-defosforylering er vist å være ultrasensitiv. Dersom kompleksene av substratet og kinase/fosfatase er med i strukturen, vil dette skape konkurranse mellom substratene, for å bli fosforylert eller defosforylert, se figur 3.24. I dette kapittelet skal et slikt system bli introdusert for å analysere responsene i tidsplanet.

Til nå har man sett på kjemiske strukturer som danner en stabil stasjonært tilstand av utgangen for hver tilført konsentrasjon av et stoff (kinase). Her skal man se på et system som viser bistabilitet, det vil si at systemet har to stabile stasjonære tilstander i utgangen [15].

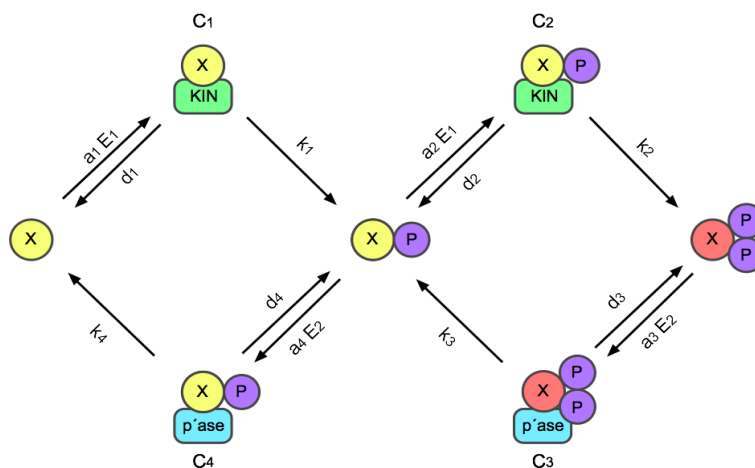
For å redegjøre for symbolsk bruk i dette kapittelet, er det satt opp en tabell 3.10 som gir en beskrivelse av benevningene.

Benevning	Navn
X	substrat
XP	fosforylert substrat
XPP	dobbelt fosforylert substrat
C_1	kompleks
C_2	kompleks
C_3	kompleks
C_4	kompleks
E_1	kinase
E_2	fosfatase

Tabell 3.10: Beskrivelse av benevningene som er brukt i dette kapittelet

Figur 3.24 viser reaksjon av dobbel fosforylering-defosforylering, der substratet X blir fosforylert av kinase for å omdannes til XPP .

- Økende kinase konsentrasjon (E_1) får fosforylert substrat XP til å danne mer XPP , som vil si at fosforylert substrat XP er avhengig av hvor mye fritt kinase som er tilgjengelig i systemet.
- Dersom mesteparten av kinasen er bundet som kompleks (C_1 og C_2), er det mindre kinase å binde seg med, for å kunne danne XP eller XPP .
- Økende fosforylert substrat XP ender opp i uttømming av substratet X , som frigjør mer kinase til å danne XPP .
- XPP kan videre bli defosforylert til XP , som kan enten bli defosforylert til X , eller igjen bli fosforylert til XPP . Her har man en positiv tilbakekobling, hvor XPP sørger for sin egen dannelse [14].



Figur 3.24: Viser kjemisk nettverk av fire sykluser, hvor C_1 , C_2 , C_3 og C_4 representerer kompleksene mellom reaksjonene, hvor reaksjonen mellom C_1 og C_2 danner dobbel fosforylert substrat XPP , og der reaksjonen mellom kompleksene C_3 og C_4 defosforylerer fosforylerte substrater. Eksempel på et slikt system er referert til fosforylering av MAPK (mitogen-activated protein kinase), hvor MAPK er fosforylert av MAPKK, og defosforylert av MKP. En mer detaljert beskrivelse av reaksjonen finner man i artikkel [20].

De matematiske modellene som beskriver strukturen i figur 3.24, er fremstilt av syv differensialligninger ((3.44a) - (3.44g)), hvor C_i representerer endringen i konsentrasjonen av enzymsubstratkompleksene.

$$\frac{dX}{dt} = d_1 C_1 + k_4 C_4 - a_1 \cdot X \cdot E_1 \quad (3.44a)$$

$$\frac{dXP}{dt} = k_1 C_1 + k_3 C_3 + d_2 C_2 + d_4 C_4 - a_2 \cdot XP \cdot E_1 - a_4 \cdot XP \cdot E_2 \quad (3.44b)$$

$$\frac{dXPP}{dt} = k_2 C_2 + d_3 C_3 - a_3 \cdot XPP \cdot E_2 \quad (3.44c)$$

$$\frac{dC_1}{dt} = a_1 \cdot X \cdot E_1 - (d_1 + k_1) \cdot C_1 \quad (3.44d)$$

$$\frac{dC_2}{dt} = a_2 \cdot XP \cdot E_1 - (d_2 + k_2) \cdot C_2 \quad (3.44e)$$

$$\frac{dC_3}{dt} = a_3 \cdot XPP \cdot E_2 - (d_3 + k_3) \cdot C_3 \quad (3.44f)$$

$$\frac{dC_4}{dt} = a_4 \cdot XP \cdot E_2 - (d_4 + k_4) \cdot C_4 \quad (3.44g)$$

Substrat-, kinase- og fosfatase-konsentrasjonen er også antatt å være bevart, og man må definere ligningen for den total mengde substrat (3.45), kinase (3.46) og fosfatase (3.47).

$$X_{tot} = X + XP + XPP + C_1 + C_2 + C_3 + C_4 \quad (3.45)$$

$$kinase_{tot} = E_1 + C_1 + C_2 \quad (3.46)$$

$$fosfatase_{tot} = E_2 + C_3 + C_4 \quad (3.47)$$

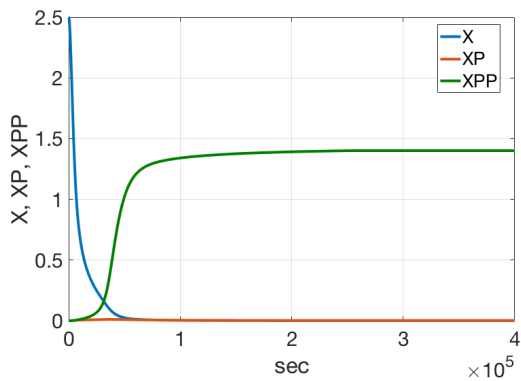
Det vil bli komplisert å finne et uttrykk av dobbel fosforylert substrat XPP analytisk, og det er derfor valgt å bruke modellene i ligning (3.44a)-(3.44g) ved simulering i Simulink.

Valget av parametere ved simulering er vist i tabell 3.11. Disse verdiene er tatt ut fra artikkel [14].

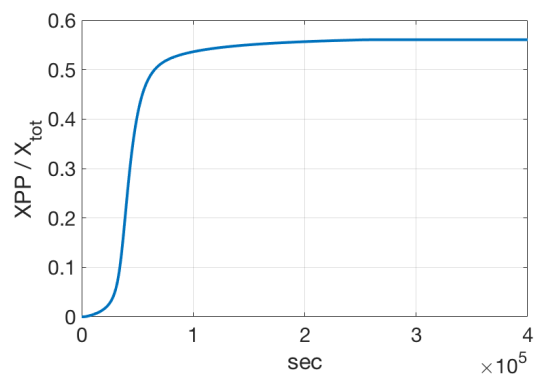
parameter	value
a_1	0.004
d_1	0.00016
k_1	0.00016
a_2	8
d_2	0.32
k_2	0.32
a_3	1
d_3	0.04
k_3	0.04
a_4	0.1
d_4	0.004
k_4	0.004
X_{tot}	2.5
E_2	1

Tabell 3.11: Parameterne brukt ved simulering.

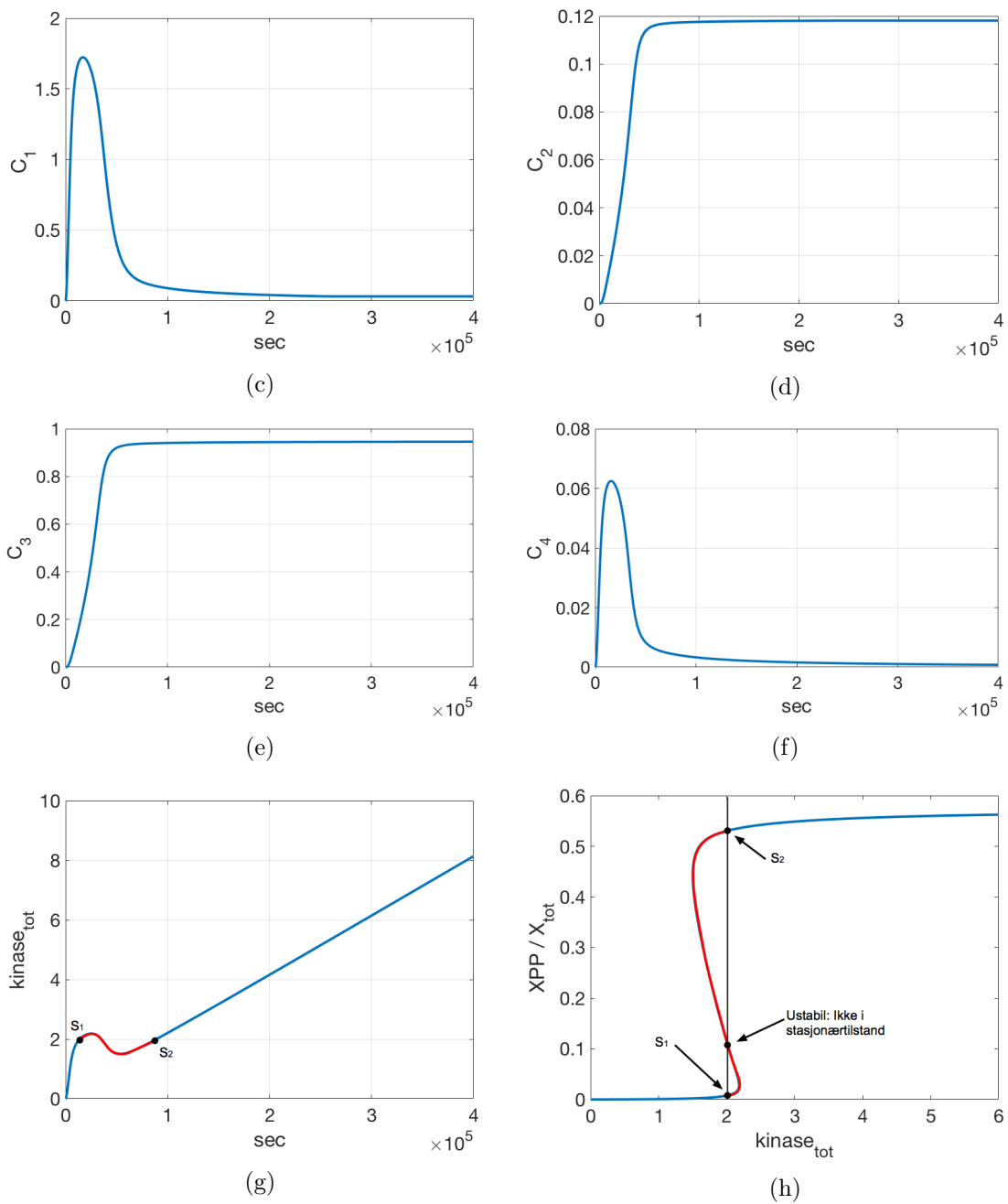
Figur 3.25 viser resultatene ved å simulere modellene i ligning (3.44a)-(3.44g), med parameterene i tabell 3.11. Hovedfokuset er å vise årsaken til bistabiliteten i systemet, i tidsplanet.



(a)



(b)



Figur 3.25: Viser de viktigste responsene som er årsaken til bistabiliteten i systemet.

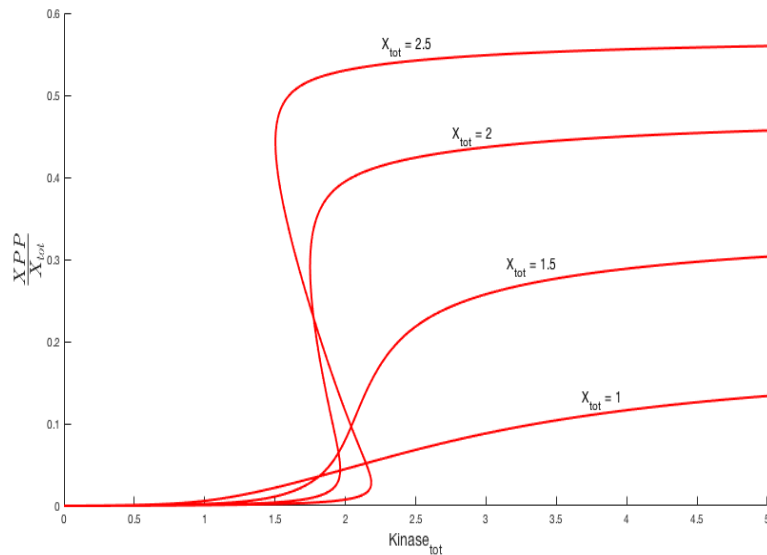
Den totale kinase konsentrasjonen $kinase_{tot}$ blir påvirket av dynamikken i kompleksene C_1 og C_2 . Når kompleksene C_1 og C_2 er i område av metning, skjer det en endring/forstyrrelse i $kinase_{tot}$ (se figur 3.25g) som får systemet

til å bli bistabilt.

Ved $kinase_{tot} = 2$, har systemet to stasjonærtilstander S_1 og S_2 , vist i figur 3.25h. Det vist seg også at bistabiliteten i systemet skjer når alle kompleksene er i nærheten av å bli mettet av substrater, dette kommer godt frem i figur 3.25c, 3.25d, 3.25e og 3.25f.

3.7.1 Effekten av å endre den totale mengden substrat X_{tot}

Figur 3.26 viser effekten i responsen av den stasjonære sammenhengen mellom $kinase_{tot}$ og $\frac{X_{PP}}{X_{tot}}$, ved å endre den totale substratkonsentrasjonen X_{tot} .



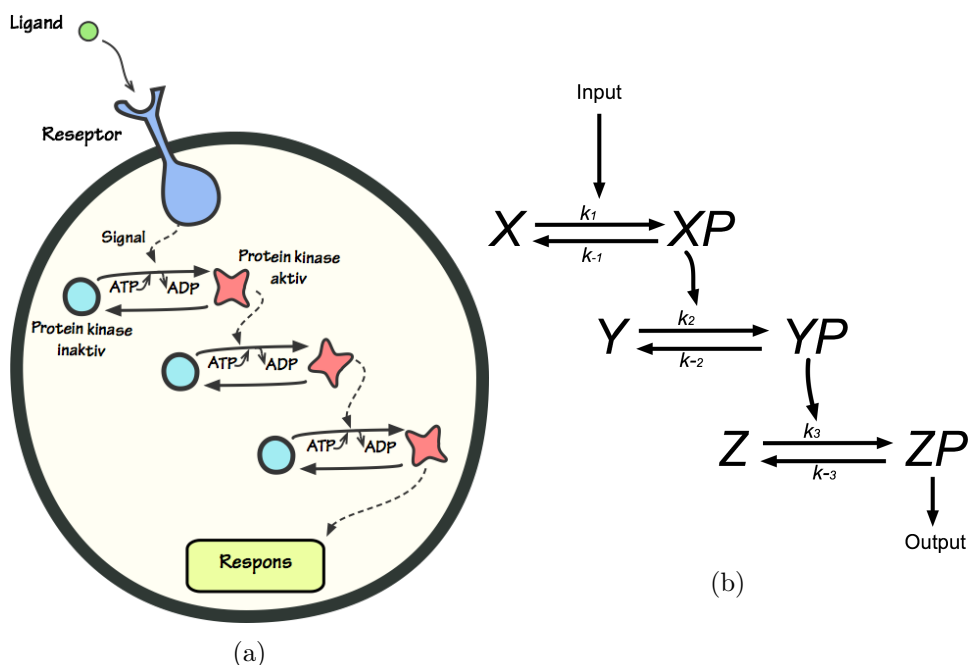
Figur 3.26: Grafen representerer systemets respons for hver økende verdi av den totale substrat konsentrasjonen X_{tot} . Den viser at responsen går fra å være stabil når $X_{tot} = 1$, til å være bistabil når $X_{tot} = 2$.

Ved å øke den totale substrat konsentrasjonen X_{tot} i systemet, vil responsen gå fra å være stabil(mono-stabil), til å bli bistabil. Dette er et samlet resultat av at kinase og fosfatase går raskt opp i tilnærmet metning, og at substratene må konkurrere for å reagere med enzymene.

3.8 Cellesignalisering i kaskade

De fleste systemene som er gjennomgått i de forrige kapitlene, er kjemiske reaksjoner som skjer inni celler. Cellesignalisering er når et signal utenfor cellemembranen blir sendt inn i cellen, og dette kan trigge flere varianter av signalkaskade inni cellen, se figur 3.27. Alle disse variantene av signalkaskade har et mål til felles, som er å danne en respons, som vil få cellen til forandre funksjonalitet eller sin form.

Det har vist seg at responsen fra reaksjoner i kaskade blir mer utlitasensitiv, jo lenger ned i kaskaden signalet går. Et slikt system er relatert til fosforylering av mitogen-aktivert protein kinase (MAPK) i signalkaskade [15].



Figur 3.27: Viser celledisignalisering av signalkaskade med tre nivåer: Panel a) er en illustrasjon av celledisignalisering, der liganden binder seg til reseptoren som aktiverer den, slik at reseptoren nå kan sende signaler inn i cellen. Avhengig av hvilket signal som kommer fra reseptoren, vil signalet aktivere nye reaksjoner inni cellen, som for eksempel reaksjoner av fosforylering-defosforylering. En slik reaksjon kan trigge flere reaksjoner (reaksjoner i kaskade), før en respons blir dannet. Panel b) representerer reaksjonsligninger i kaskade, som signalerer nedover i reaksjonene, der X,Y,Z er substrater, og XP, YP, ZP er fosforylert substrat.

Modellene av reaksjonsligningene som er vist i figur 3.27b, er definert i ligning (3.48a) - (3.48c), og beskriver dynamikken til fosforylert substrat for hver reaksjon. Modellene ((3.48a) - (3.48c)) er basert på ligningen (3.14) av fosforylering-defosforylering som ble presentert i delkapittel 3.3, der inngangssignalet til $Y\dot{P}$ ligning (3.48b), er responsen til XP , og inngangssignalet til $Z\dot{P}$ ligning (3.48c) er responsen til YP .

$$\frac{dXP}{dt} = k_1 \cdot Input \cdot \frac{X}{K_M^X + X} - k_{-1} \cdot E_2^X \cdot \frac{XP}{K_M^{XP} + XP} \quad (3.48a)$$

$$\frac{dYP}{dt} = k_2 \cdot XP \cdot \frac{Y}{K_M^Y + Y} - k_{-2} \cdot E_2^Y \cdot \frac{YP}{K_M^{YP} + YP} \quad (3.48b)$$

$$\frac{dZP}{dt} = k_3 \cdot YP \cdot \frac{Z}{K_M^Z + Z} - k_{-3} \cdot E_2^Z \cdot \frac{ZP}{K_M^{ZP} + ZP} \quad (3.48c)$$

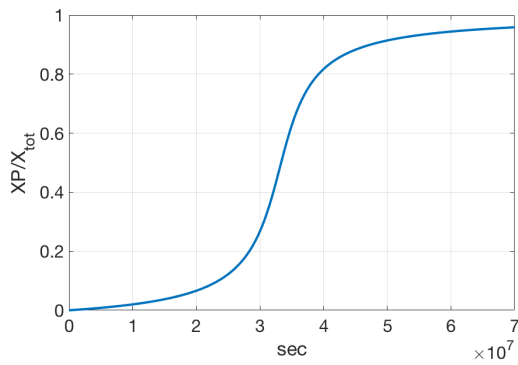
Systemet er også antatt å være bevart, og man må derfor definere ligningene for total mengde substrater X , Y og Z , se ligning (3.49), (3.50) og (3.51).

$$X_{tot} = X + XP \quad (3.49)$$

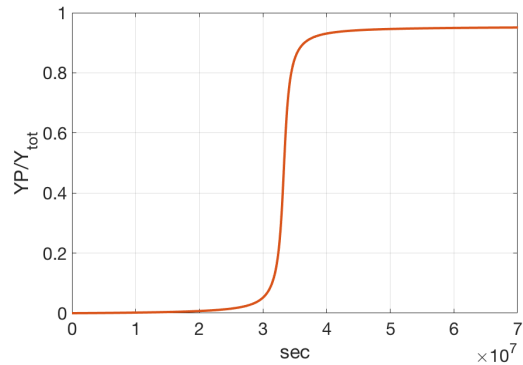
$$Y_{tot} = Y + YP \quad (3.50)$$

$$Z_{tot} = Z + ZP \quad (3.51)$$

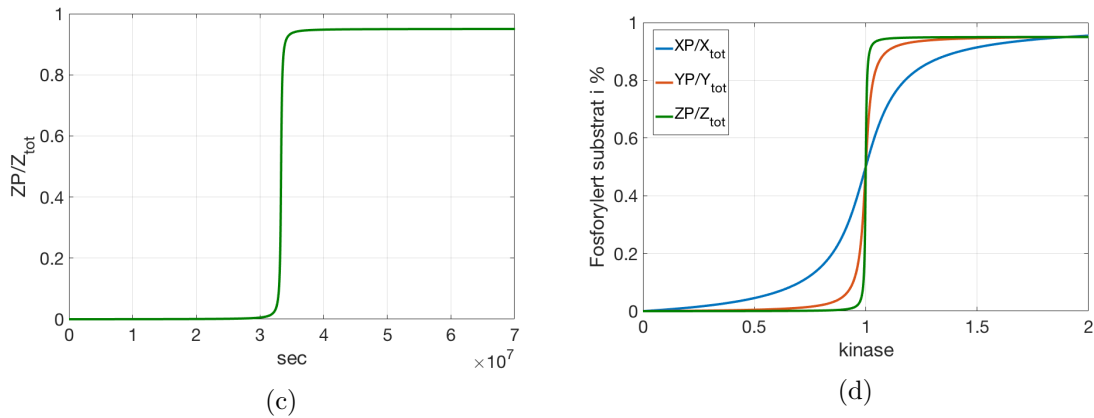
Igjen er det valgt å simulere modellene i ligning (3.48a)-(3.48c), se resultatene i figur 3.28.



(a)



(b)



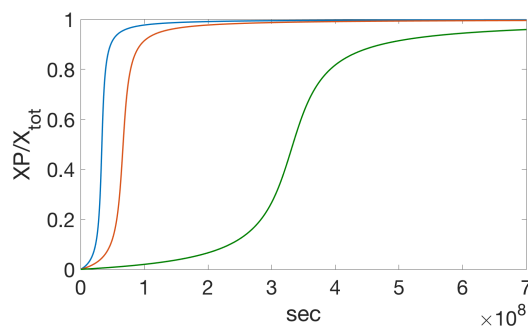
Figur 3.28: Viser resultatene av responsene ved å simulere modellen av signalkaskade: Panel a) b) og c) viser responsen av fosforylert substrat i prosent, i tidsplanet. Panel d) viser den stasjonære sammenhengen av inngangen (kinase) og utgangen (fosforylert substrat i prosent) for hver reaksjon i kaskaden. Kurvene er dannet av å simulere med parameterene: $k_1 = 1$, $k_{-1} = 1$, $k_2 = 1$, $k_{-2} = 1$, $k_3 = 1$, $k_{-3} = 1$, $K_M^X = 0.1$, $K_M^{XP} = 0.1$, $K_M^Y = 0.1$, $K_M^{YP} = 0.1$, $K_M^Z = 0.1$, $K_M^{ZP} = 0.1$, $[kinase] = rampe$.

Figur 3.28 viser resultatet av å simulere modellene i ligning (3.48a)-(3.48c), som består av reaksjoner i kaskade (signalkaskade), der inngangen i figur 3.27b representerer signalet til den første reaksjonen i ligning (3.48a). Den stasjonære sammenhengen mellom inngangen og utgangen er vist i figur 3.28d, og man ser at responsen for hver reaksjon blir mer ultrasensitiv, jo lenger ned i kaskaden signalet går.

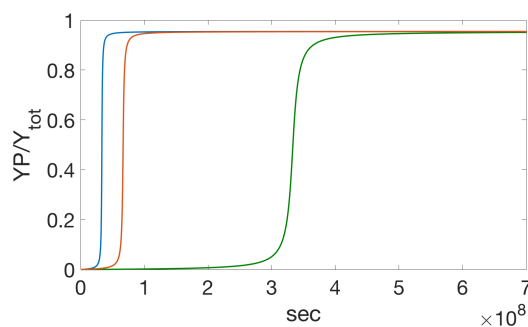
Responsen i figur 3.28c er resultat fra den siste reaksjonen i kaskaden, og viser seg å være den mest sensitive av de tre reaksjonene. Den grønne kurven i figur 3.28d, som representerer den stasjonære sammenhengen av den siste reaksjonen.

3.8.1 Effekten av å endre ratekonstanten k_1

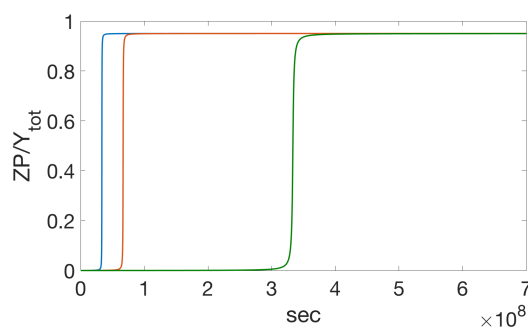
Figur 3.29 viser effekten i responsen av å endre ratekonstanten k_1 , som tilhører fosforyleringsraten i den første reaksjonen av kaskaden.



(a)



(b)



(c)

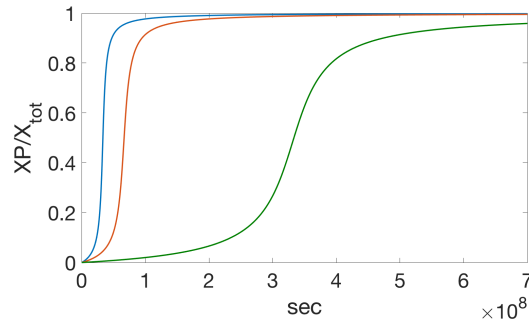
Figur 3.29: Viser responser av fosforylert substrat i kaskadesignalering, simulert med parameterene: $k_1 = 1, 0.5$ og 0.1 .

Dersom ratekonstanten k_1 av fosforylering er tregere enn defosforylering, vil utgangen fra $\frac{XP}{X_{tot}}$ resultere i en langsommere fosforylering av substratet, se figur 3.29. Dette får de andre reaksjonene (ligning (3.50) og (3.51)) til å danne en respons på et senere tidspunkt, der responsen også blir mer

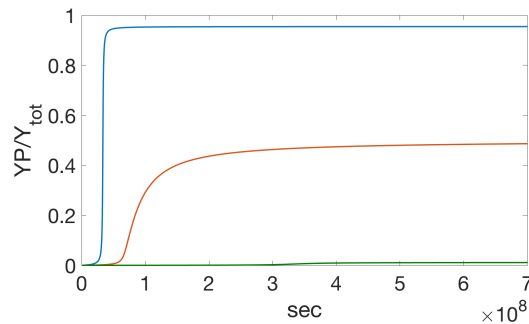
ultrasensitiv for reaksjonen i ligning (3.50) og (3.51).

3.8.2 Effekten av å endre ratekonstantene k_1 , k_3 og k_5

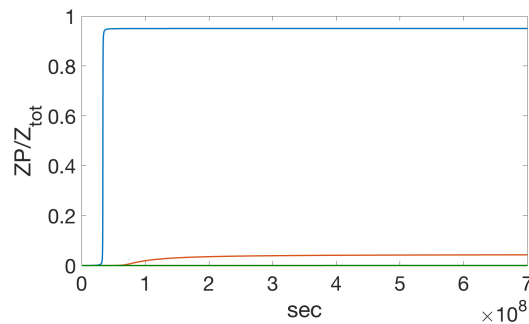
Figur 3.30 viser effekten i responsene XP , YP og ZP i tidsplanet, ved å parallellt gjøre endringer i ratekonstantene k_1 , k_3 og k_5 .



(a)



(b)



(c)

Figur 3.30: Viser responser av fosforylert substrat i kaskadesignalering, simulert med parameterene: $k_1 = k_3 = k_5 = 1, 0.5$ og 0.1 .

Dersom alle ratekonstantene i reaksjonen av fosforylering er satt til å være tregere enn defosforylering, vil det resultere i at dannelsen av fosforylert

substrat YP og ZP blir mindre.

Kapittel 4

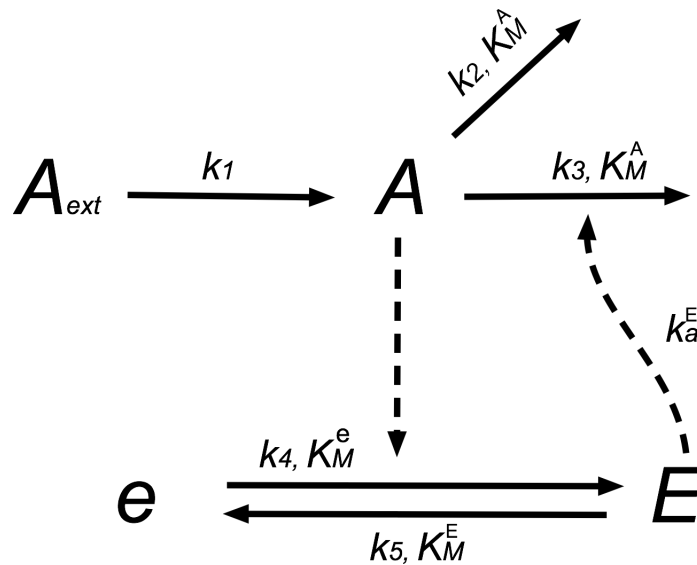
Ultrasensitivitet i kontrollmotiv

I dette kapitlet skal man se på resultatene av å bruke kontrollmotiv sammen med kjemisk struktur som viser ultrasensitivitet¹. Kontrollmotivet vil bli beskrevet av matematiske modeller, for å simulere og teste reguleringsegenskapene ved å benytte ultrasensitiv signalisering. Det vil også bli sett på effekten av å gjøre endringer i modellene, som beskriver motivet.

4.1 Motivstruktur med reaksjon av fosforylering-defosforylering

Figur 4.1 er satt sammen av motiv 5, i figur 2.13, og av reaksjonen av fosforylering-defosforylering, som er vist i figur 3.5. Stoffet A er angitt som kinase konsentrasjon, A_{ext} kinase tilførsel (perturbasjon eller forstyrrelse), e er substrat, og E representerer fosforylert substrat.

¹Se kapittel 3 om motiv modellering



Figur 4.1: Motiv av outflow-kontroller med reaksjon av fosforylering-defosforylering. Stoffet A signalerer til reaksjonen av fosforylering, og utgangen til A blir påvirket av signalering fra E .

Ligning (4.1a)-(4.1e) beskriver fluksene (heltrukne linjer), og signaleringene (stiplede linjer) i motivet, vist i figur 4.1. Ligning (4.2a)-(4.2c) er differensialligningene og beskriver dynamikken til hvert stoff i motivet.

$$j_1 = k_1 \quad (4.1a)$$

$$j_2 = k_2 \cdot \frac{A}{K_M^A + A} \quad (4.1b)$$

$$j_3 = k_3 \cdot \frac{A}{K_M^A + A} \cdot \frac{E}{K_a^E + E} \quad (4.1c)$$

$$j_4 = k_4 \cdot \frac{e}{K_M^e + e} \cdot A \quad (4.1d)$$

$$j_5 = k_5 \cdot \frac{E}{K_M^E + E} \quad (4.1e)$$

- k_n er ratekonstantene
- A representerer konsentrasjonen av kinase
- e representerer konsentrasjonen av substratet
- E representerer konsentrasjonen av fosforylert substrat
- K_M^A er Michealis-konstanten av A
- K_M^e er Michealis-konstanten av e

- K_M^E er Michealis-konstanten av E
- K_a^E er Michealis-konstanten av signalering fra E

$$\frac{dA}{dt} = j_1 - j_2 - j_3 \quad (4.2a)$$

$$\frac{de}{dt} = -j_4 + j_5 \quad (4.2b)$$

$$\frac{dE}{dt} = j_4 - j_5 \quad (4.2c)$$

For å finne teoretisk settpunkt (A_{set}) for stoffet A i motivet (figur 4.1), må antagelsen om stasjonært tilstand av E og signaleringen fra A være gitt, slik at $\frac{dE}{dt} \approx 0$ for differensialligning (4.2c), og ved å anta at $K_M^e \ll e$ og $K_M^E \ll E$, se utledningen av settpunktet i ligning (4.3), (4.4) og (4.5).

$$k_4 \cdot \underbrace{\frac{e}{K_M^e + e}}_{\approx 0} \cdot A_{set} - k_5 \underbrace{\frac{E}{K_M^E + E}}_{\approx 0} = 0 \quad (4.3)$$

$$k_4 \cdot A_{set} - k_5 = 0 \quad (4.4)$$

$$A_{set} = \frac{k_5}{k_4} \quad (4.5)$$

Stoffet A representerer kinase konsentrasjonen, og påvirker fosforylering av substratet e , for så å danne fosforylert substrat E . Det er derfor valgt å ikke begrense signaleringen av A til j_4 med metningsfunksjon, se ligning (4.1d).

4.1.1 Rampeperturbasjon og metningskinetikk, eller første orden i signalering fra E til j_3

Her er det valgt å se hva som skjer i responsene når kontrollmotivet i figur 4.1 blir påvirket av signalering fra E til j_3 , med og uten metningsfunksjon. Kinase konsentrasjon blir tilført med rampe (perturbasjon A_{ext}) i k_1 , for å finne ut hvor god den ultrasensitive signaleringen er til å regulere stoffet A . Det er også valgt å stenge fluksen j_2 ved å sette $k_2 = 0$.

Parameterene som er brukt ved simulering av modellene i ligning (4.2a)-(4.2c), er vist i tabell 4.1.

Benevning	Navn
k_1	rampe m. stigning 1/400000
k_2	0
k_3	1
k_4	1
k_5	1
K_M^A	0.1
K_M^e	0.01
K_M^E	0.01
K_a^E	0.01
e_{tot}	1.5
A_{set}	1

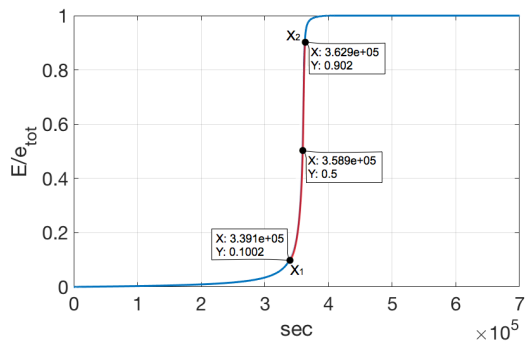
Tabell 4.1: Parameter oppsett

Metningsfunksjon i signalering fra E til j_3

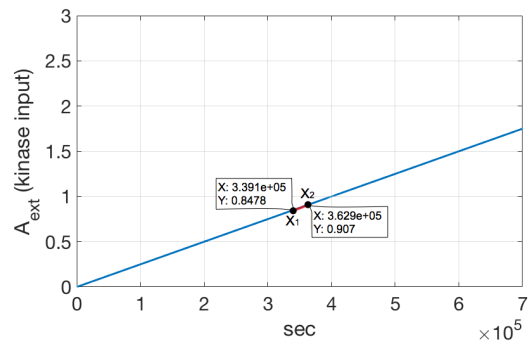
Figur 4.2 viser resultatet av å simulere modellen med metningsfunksjon i signalering fra E til j_3 , se ligning (4.6). Responsene i figur 4.2 er markert med X_1 og X_2 , for å vise hvor i tidsplanet den stasjonære responsen i figur 4.2f blir dannet. Posisjonen til X_1 og X_2 ble valgt ut i fra den stasjonære responsen i figur 4.2f, hvor verdien av utgangen $\frac{E}{e_{tot}}$ er i EC10 og EC90, som kommer fra metoden til Goldbeter og Koshland, for å finne sensitivitetsfaktoren² [13].

$$j_3 = k_3 \cdot \frac{A}{K_M^A + A} \cdot \frac{E}{K_a^E + E} \quad (4.6)$$

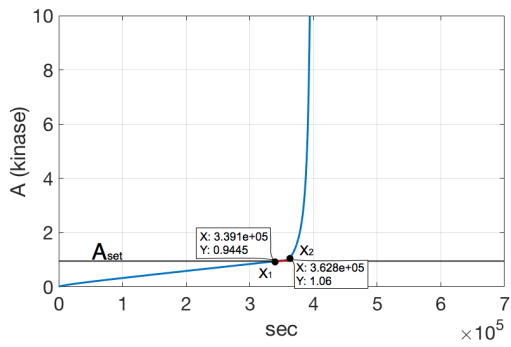
²Se vedlegg Goldbeter og Koshland for å finne sensitivitetsfaktoren,



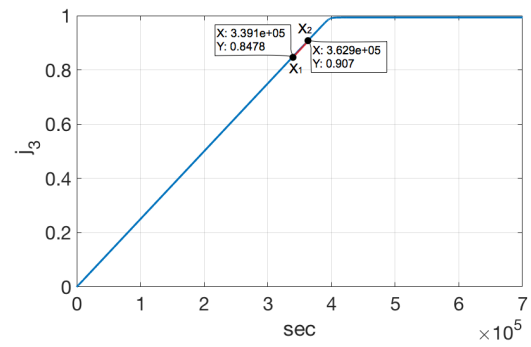
(a)



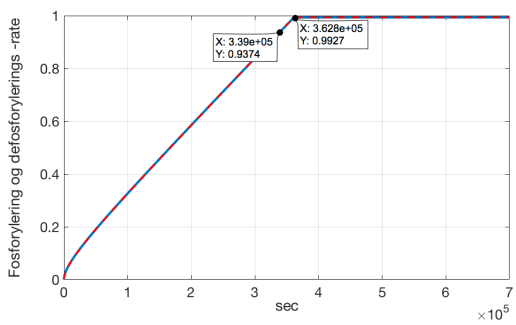
(b)



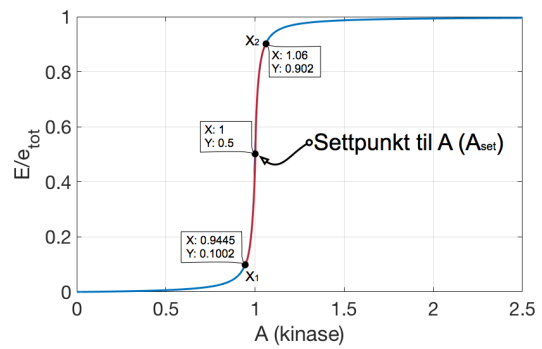
(c)



(d)

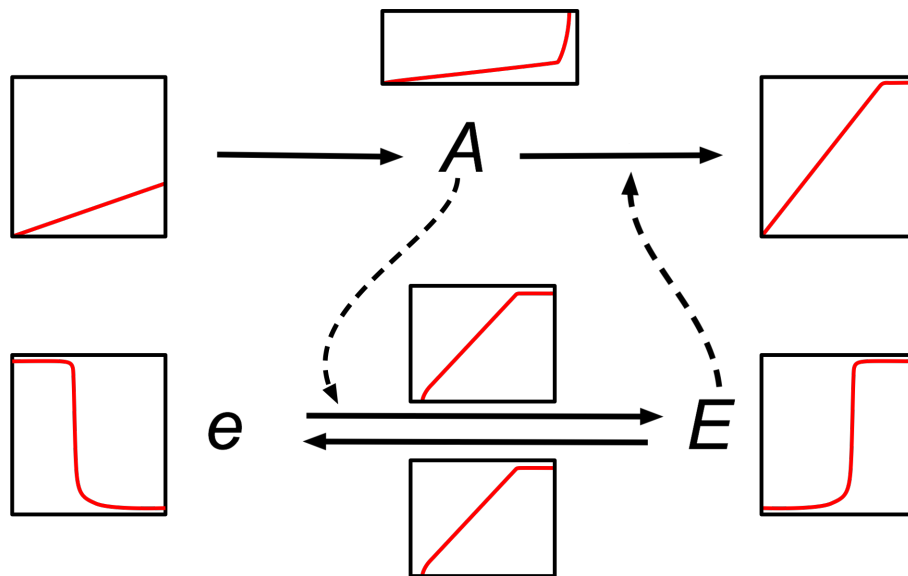


(e)



(f)

Figur 4.2: Viser resultatene av å simulere kontrollmotivet i figur 4.1 med metningskunsksjon av E i j_3 .



Figur 4.3: Viser responskart av kontrollmotivet i figur 4.1, med illustrasjon av responsene fra figur 4.2.

Responsen i figur 4.2a viser at stigningen i utgangen $\frac{E}{e_{tot}}$ er minimal før den er ved X_1 . Når kinase og fosfatase i reaksjon av fosforylering-defosforylering blir mettet av substrater, vil utgangen $\frac{E}{e_{tot}}$ stige raskt opp i maksimalverdi. Dette skjer i området til X_1 , og resulterer i en respons av nulte orden ultrasensitivitet³.

Kinase konsentrasjonen A i figur 4.2a er i settpunktet når kurven er midt mellom X_1 og X_2 , som er i området hvor 50% av substratene ($\frac{E}{e_{tot}} = 0.5$) i systemet er blitt fosforylert, se figur 4.2c og 4.2f. Det vil si at systemet ikke er i stand til å holde settpunktet over lang tid, dersom kinase tilførselen fortsetter å stige.

Figur 4.2d viser også at kinase konsentrasjonen A stiger som en rampe, til kurven treffer X_2 , som er i området hvor systemet bryter sammen. Årsaken er gitt i metningsfunksjonene $\frac{A}{K_M^A + A}$ og $\frac{E}{K_a^E + E}$ i j_3 , som er vist i figur 4.4a og 4.4b. Disse to metningsfunksjonene har stor påvirkning på tidsresponsene.

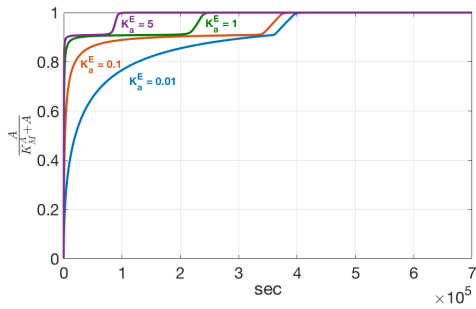
Fluksen j_3 i figur 4.4c, viser at stigningen i responsen er akkurat lik, uavhengig av hvilke endringer som blir gjort i metningsfunksjonene $\frac{A}{K_M^A + A}$ og $\frac{E}{K_a^E + E}$ i j_3 . Det vil si at det er en sammenheng mellom disse to funksjonene, og at dersom man justerer Michaelis-konstanten K_a^E eller K_M^A , vil dette også

³Se kapittel 3.4, som beskriver hvorfor reaksjonen av fosforylering-defosforylering av metningskinetikk, danner nulte orden ultrasensitivitet.

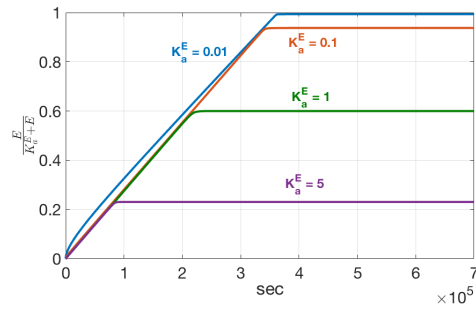
påvirke begge responsene av metningsfunksjonene, der j_3 beholder stigningen i kurven, se figur 4.4a, 4.4b og 4.4c.

Effekten av å endre K_a^E

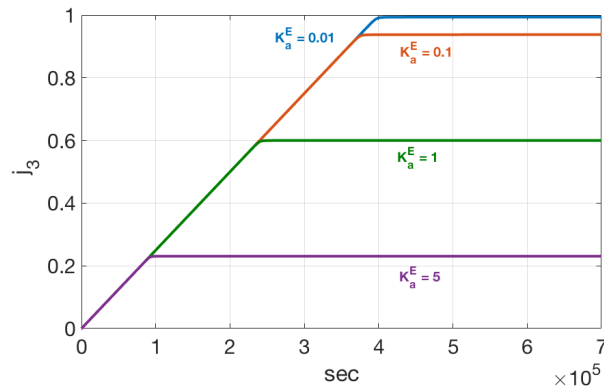
Effekten av å øke K_a^E , får responsen av A til å gå raskere opp i settpunktet før systemet bryter sammen, men dette vil også få systemet til å bryte sammen tidligere, se figur 4.4d og 4.4e.



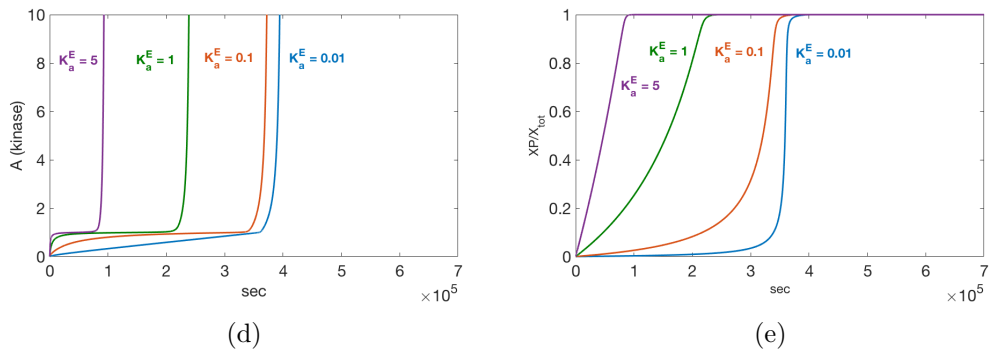
(a)



(b)



(c)



Figur 4.4: Viser effekten av å endre K_a^E i modellen med metning av E i j_3 . Panel a) og b) viser responsen av metningsfunksjonene som er i j_3 . Panel d) er responsene av kinase konsentrasjonen A . Panel e) fosforylert substrat i % $\frac{XP}{X_{tot}}$.

Når K_a^E er gitt med større verdi i metningsfunksjonen i signaleringen fra E til j_3 , begrenser dette utstrømmen av A , se figur 4.4c. Dette gjør at kinase konsentrasjonen A vil øke raskere inn i settpunktet.

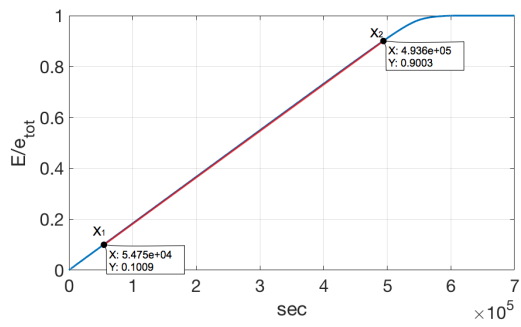
Ligning (4.7) viser eksempel på dersom $E = 1.5$ og $K_a^E = 5$ som gir en åpning i j_3 på 0.23, som er vist i figur 4.4b og 4.4c.

$$\frac{E}{K_a^E + E} = \frac{1.5}{5 + 1.5} = 0.23 \quad (4.7)$$

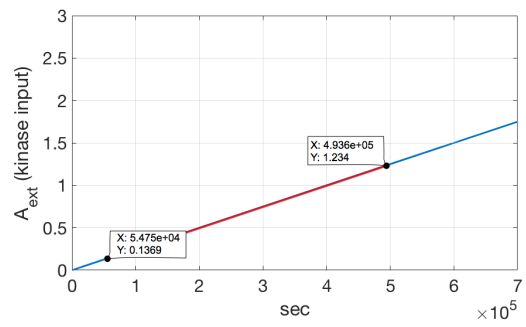
Første orden i signalering fra E til j_3

Figur 4.6, viser responsene av første orden i signaleringen fra E til j_3 , se ligning (4.8). Dette gir veldig forskjellige resultater i responsene, enn for modellen med metning i signaleringen fra E til j_3 , ligning (4.6).

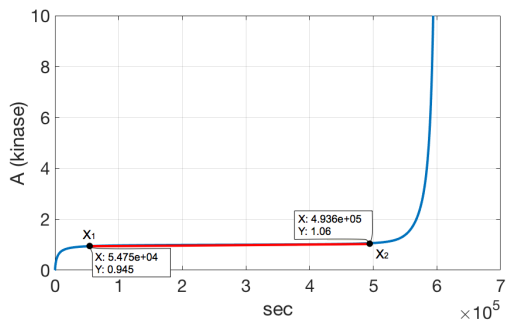
$$j_3 = k_3 \cdot \frac{A}{K_M^A + A} \cdot E \quad (4.8)$$



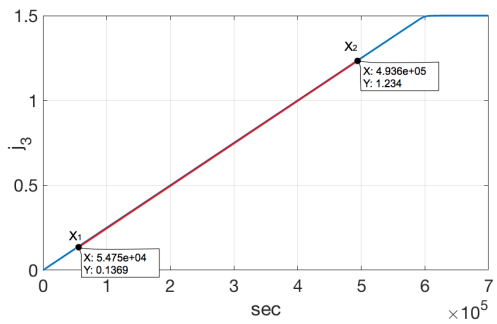
(a)



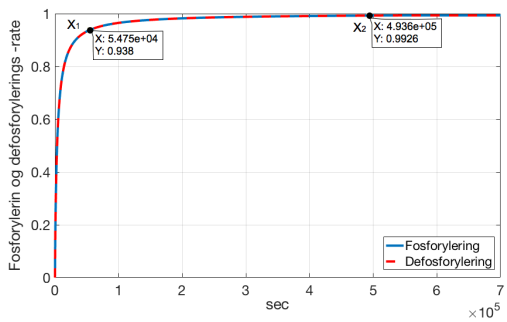
(b)



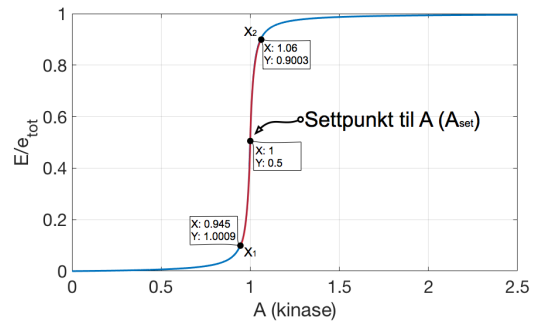
(c)



(d)

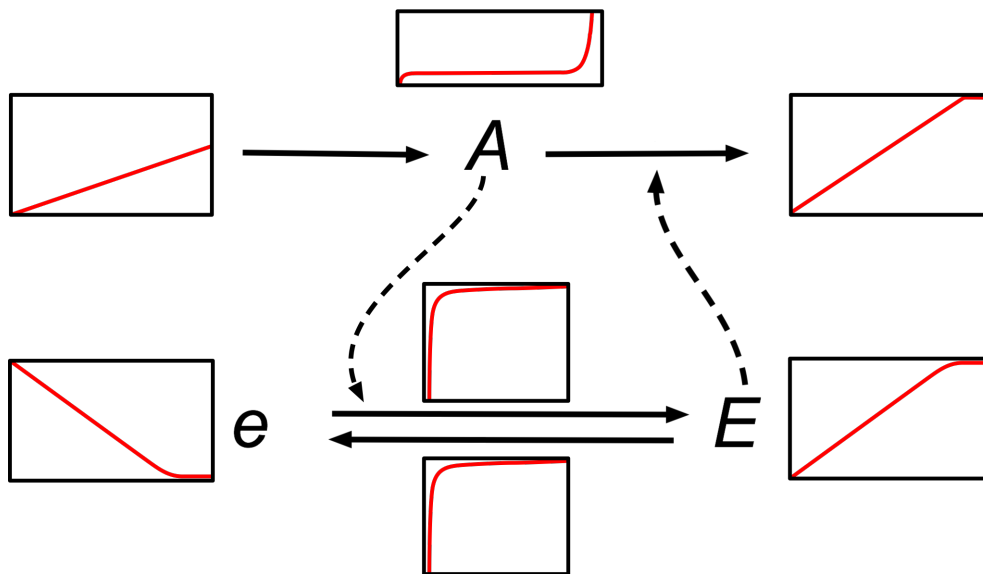


(e)



(f)

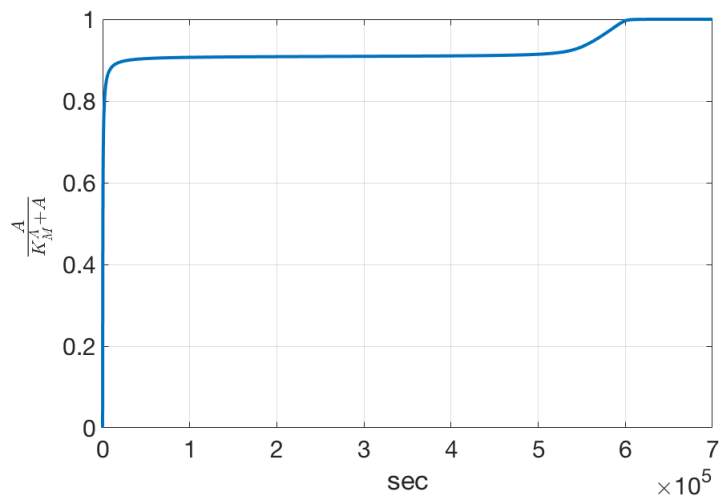
Figur 4.5: Viser resultatene av å simulere kontrollmotivet i figur 4.1 med første orden i signalering fra E til j_3 .



Figur 4.6: Viser kontrollmotivet fra figur 4.1 som illustrerer responsene av modellen med første orden av E i j_3 .

Første orden i signaleringen fra E i j_3 , gir bedre regulering av kinase konsentrasjon A , der konsentrasjonen av A nå ligger tilnærmet stabilt i sett-punktet A_{set} over en lengre tidsperiode, se den røde linja mellom X_1 og X_2 i figur 4.5c.

Årsaken til bedre regulering, er på grunn av at modellen ikke lenger blir begrenset av en ekstra metningsfunksjon i j_3 . Dette gjør at metningsfunksjonen av A i j_3 (se figur 4.7) går raskere opp i nærheten av maksimalverdi, og gjør at kinase konsentrasjonen A raskt stiger inn i settpunktet, se figur 4.5c.



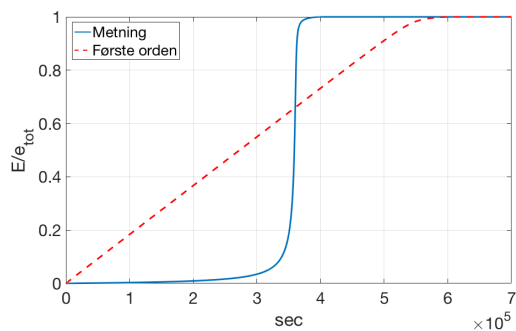
Figur 4.7: Viser responsen av metningsfunksjon til A i j_3 .

Når responsen i kinase konsentrasjonen A i figur 4.5c går raskere opp i settpunktet, påvirker dette fosforylering-defosforyleringsraten, ved at de raskt stiger til maksimalverdi, se figur 4.5e. Sammen med kinase konsentrasjone A i settpunktet, får dette responsen i E til å stige lineært (figur 4.5d), til det ikke er mer substrat å fosforylere, som skjer ved $sec = 6e5$.

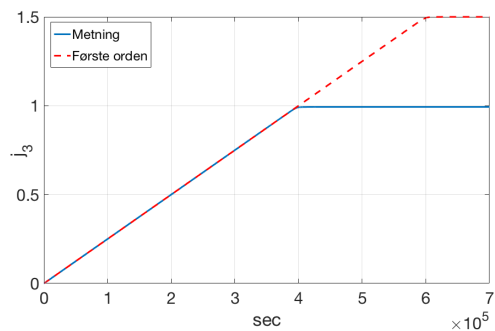
Dette ser ut til å gi en lignende respons som når $K_a^E = 5$, for modellen med metning i signalering fra E til j_3 , vist i figur 4.4e. Forskjellen her, er at åpningen av utgangen j_3 ikke vil bli begrenset av metningsfunksjonen i signalering fra E til j_3 , men vil stige til det ikke er mer substrat igjen å fosforylere, som gjør at nok kinase A stømmer ut for å holde A i settpunktet (A_{set}), se rød linje mellom X_1 og X_2 i figur 4.5c.

Sammenligning av responser i figur 4.2 og 4.5

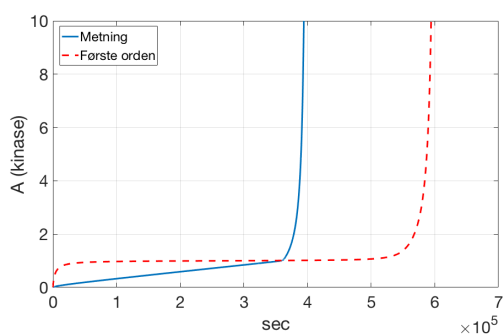
For å sammenligne noen av responsene mellom modellene, med og uten metningsfunksjon i signaleringen fra E til j_3 , er det satt opp grafer som inneholder responsene fra begge modellene, se figur 4.8.



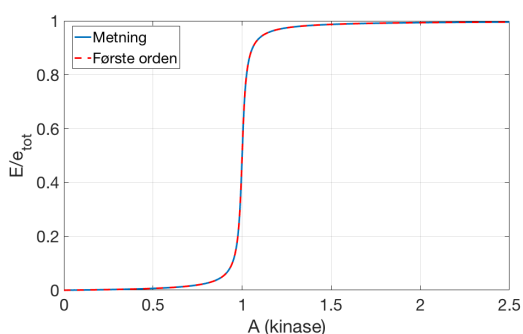
(a)



(b)



(c)



(d)

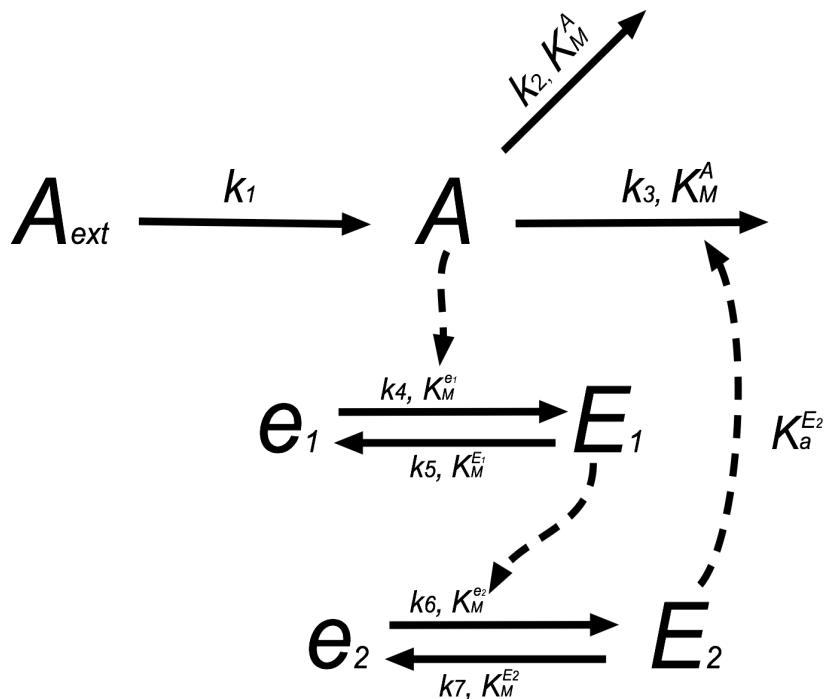
Figur 4.8: Viser forskjellen i responsene, ved å simulere modellene i ligning (4.1a)-(4.1e), med (blå kurve) og uten (rød stiplet kurve) metningsfunksjon i signalering fra E til j_3 (se ligning (4.6) og (4.8)).

Figur 4.8 viser at endringer i j_3 gir store forskjeller i tidsresponsene, men likevel viser den stasjonære sammenhengen mellom inngangen A og utgangen $\frac{E}{e_{tot}}$, at begge responsene er ultrasensitive, som var årsaken til at det ble valgt å se nærmere på dannelsen av disse tidsresponsene, vist i figur 4.2 og 4.5.

4.2 Motivstruktur med kaskadesignalisering med 2 nivåer

Her fortsettes det å bygge videre på kontrollmotivet i figur 4.1, med en ekstra reaksjon av fosforylering-defosforylering, satt opp i kaskade med 2 nivåer. Vi fortsetter med å finne ut reguleringssegenskapene, og effekten av metningsfunksjon i signaleringen fra fosforylert substrat til stoffet A .

For å gi en sammenligning av responsene i figur 4.3 og 4.5, blir de samme parametrene som ble brukt i simulering av modellene som beskriver motivet i figur 4.1, brukt i simuleringen av modellene som beskriver motivet i figur 4.9.



Figur 4.9: Viser kontrollmotiv med to reaksjoner av fosforylering-defosforylering i kaskade. Her vil A signalere fosforylering j_4 , E_1 vil signalere fosforylering j_6 av E_2 , og E_2 signalerer utgangen til A .

Ligningene (4.9a)-(4.9g) beskriver fluksene og signaleringene av motivet i figur 4.9, og ligningene (4.10a)-(4.10e) beskriver dynamikken til hvert stoff i motivet.

$$j_1 = k_1 \quad (4.9a)$$

$$j_2 = k_2 \cdot \frac{A}{K_M^A + A} \quad (4.9b)$$

$$j_3 = k_3 \cdot \frac{A}{K_M^A + A} \cdot \frac{E}{K_a^E + E} \quad (4.9c)$$

$$j_4 = k_4 \cdot \frac{e_1}{K_M^{e_1} + e_1} \cdot A \quad (4.9d)$$

$$j_5 = k_5 \cdot \frac{E_1}{K_M^{E_1} + E_1} \quad (4.9e)$$

$$j_6 = k_6 \cdot \frac{e_2}{K_M^{e_2} + e_2} \cdot E_1 \quad (4.9f)$$

$$j_7 = k_7 \cdot \frac{E_1}{K_M^{E_1} + E_1} \quad (4.9g)$$

- k_n er ratekonstantene
- A representerer konsentrasjonen av kinase
- e_1 representerer konsentrasjonen av substratet
- E_1 representerer konsentrasjonen av fosforylert substrat
- e_2 representerer konsentrasjonen av substratet
- E_2 representerer konsentrasjonen av fosforylert substrat
- K_M^A er Michealis-konstanten av A
- $K_M^{e_1}$ er Michealis-konstanten av e_1
- $K_M^{E_1}$ er Michealis-konstanten av E_1
- $K_M^{e_2}$ er Michealis-konstanten av e_2
- $K_M^{E_2}$ er Michealis-konstanten av E_2
- $K_a^{E_2}$ er Michealis-konstanten for aktivatoren av E_2

$$\frac{dA}{dt} = j_1 - j_2 - j_3 \quad (4.10a)$$

$$\frac{de_1}{dt} = -j_4 + j_5 \quad (4.10b)$$

$$\frac{dE_1}{dt} = j_4 - j_5 \quad (4.10c)$$

$$\frac{de_1}{dt} = -j_6 + j_7 \quad (4.10d)$$

$$\frac{dE_1}{dt} = j_6 - j_7 \quad (4.10e)$$

Settpunktet til kontrollmotivet i figur 4.9, er akkurat den samme som ble funnet for kontrollmotivet i figur 4.1, se ligning (4.11).

$$A_{set} = \frac{k_5}{k_4} \quad (4.11)$$

4.2.1 Rampeperturbasjon og metningskinetikk, eller første orden i signalering fra E_2 til j_3

For å se effekten av å beskrive signaleringen fra E_2 til j_3 , med og uten metningsfunksjon, blir samme stigning i rampen som ble brukt for å simulere modellene av motivet i figur 4.1 benyttet.

Parameterene som er brukt ved simulering av modellene i ligningene (4.10a)-(4.10e), er vist i tabell 4.2.

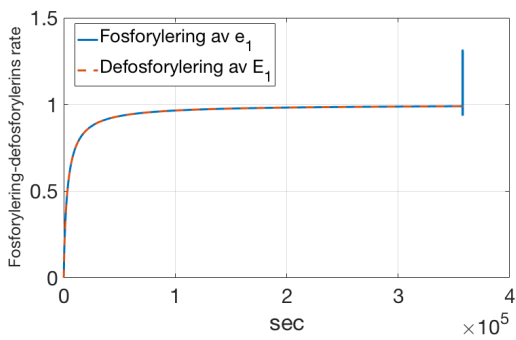
Benevning	Navn
k_1	rampe m. stigning 1/400000
k_2	0
k_3	1
k_4	1
k_5	1
K_M^A	0.1
$K_M^{e_1}$	0.01
$K_M^{E_1}$	0.01
$K_M^{e_2}$	0.01
$K_M^{E_2}$	0.01
$K_a^{E_2}$	0.01
e_{tot}	1.5
A_{set}	1

Tabell 4.2: Parameter oppsett

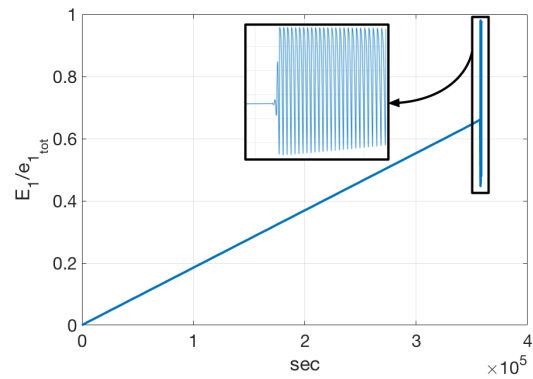
Metningsfunksjon i signalering fra E_2 til j_3

Figur 4.10 viser resultatet av å simulere modellene av motivit i figur 4.9, med metningsfunksjon i signalering fra E_2 til j_3 , der K_a^E er Michaelis-Menten konstanten for signaleringen, se ligning (4.12).

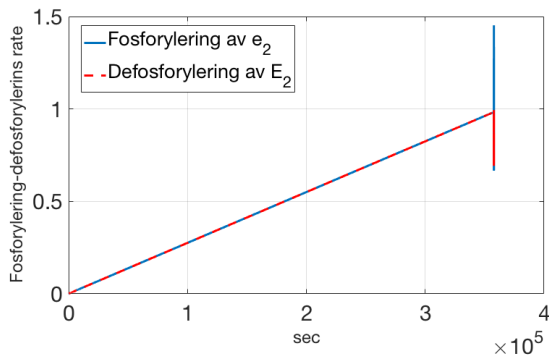
$$j_3 = k_3 \cdot \frac{A}{K_M^A + A} \cdot \frac{E_2}{K_a^{E_2} + E_2} \quad (4.12)$$



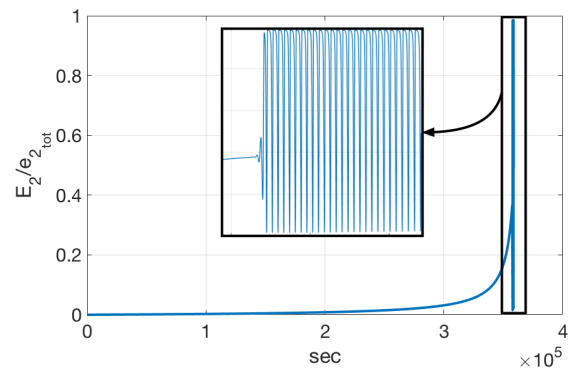
(a)



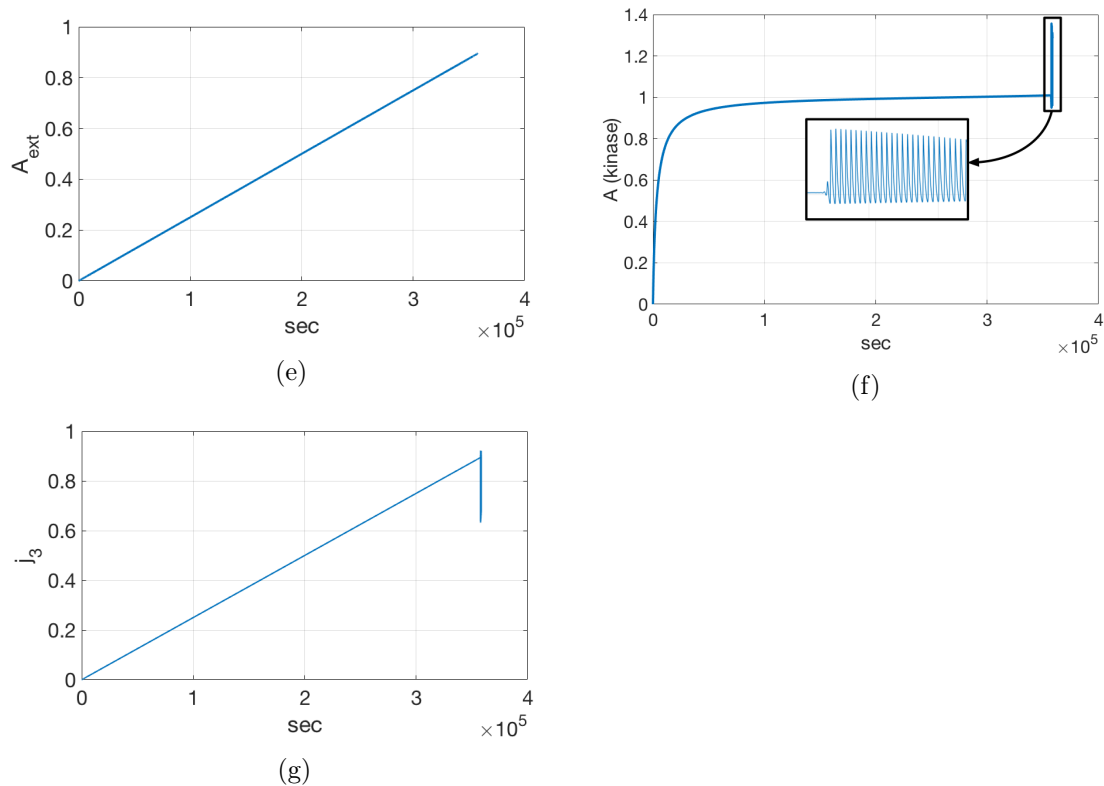
(b)



(c)



(d)



Figur 4.10: Viser tidsresponsene av å simulere kontrollmotivet i figur 4.9 med metning i signalering fra E_2 til j_3 .

Responsene som er vist i figur 4.10 ender opp i oscillering, som skjer når systemet bryter sammen.

Kinase konsentrasjonen A i figur 4.10f går raskt opp i settpunktet, som får fosforylering-defosforyleringsraten av E_1 , vist i figur 4.10a, til å stige raskt opp i maksimalverdi, og får responsen av fosforylert substrat $\frac{E_1}{e_{1tot}}$ i figur 4.10b til å stige lineært⁴.

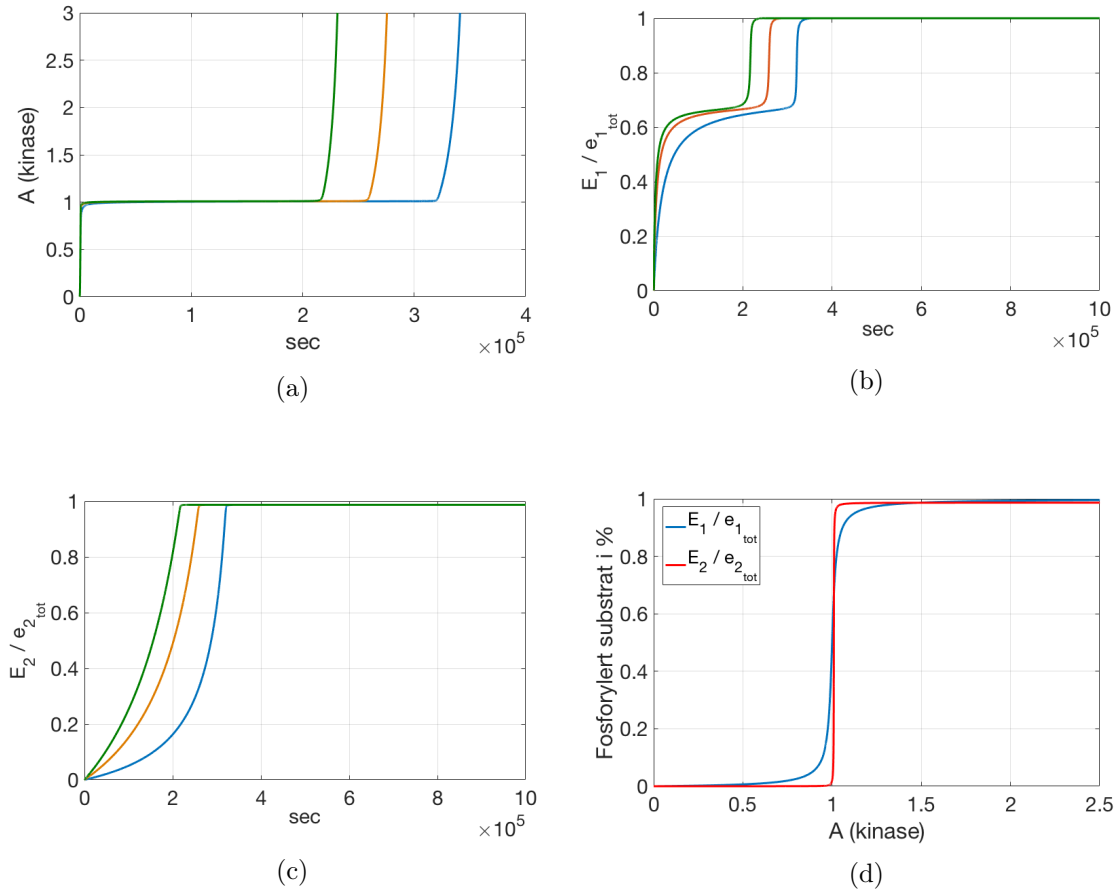
Signaleringen fra E_1 til neste reaksjon av fosforylering, får resonsen av $\frac{E_2}{e_{2tot}}$ til å begynne på en dannelse av en sigmoid kurve, før den bryter sammen i oscillering, se figur 4.10b.

Det ble forsøkt å fjerne oscilleringene ved å endre løseren⁵ i Simulink, for finne ut om det kunne være numerisk feil. Løsningen var å redusere met-

⁴Responsene til første reaksjon av fosforylering-defosofrylering i motivet vist i figur 4.9, kan refereres til responsene i figur 4.5

⁵Simulink: Configuration Options > Solver options

ningsfunksjonens sensitivitet i signaleringen fra E_2 til j_3 , som ble utført ved å øke $K_a^{E_2}$, se figur 4.11.



Figur 4.11: Viser effekten i responsene av å simulere med $K_a^{E_2} = 0.2$ (blå kurve), $K_a^{E_2} = 0.6$ (oransj kurve) og $K_a^{E_2} = 1$ (grønn kurve).

Figur 4.11 viser effekten av å øke $K_a^{E_2}$ i j_3 , som får responsene til å ikke oscillere når systemet bryter sammen, og responsene i $\frac{E_1}{e_{1,tot}}$ (figur 4.11b) og $\frac{E_2}{e_{2,tot}}$ (figur 4.11c) har blitt endret.

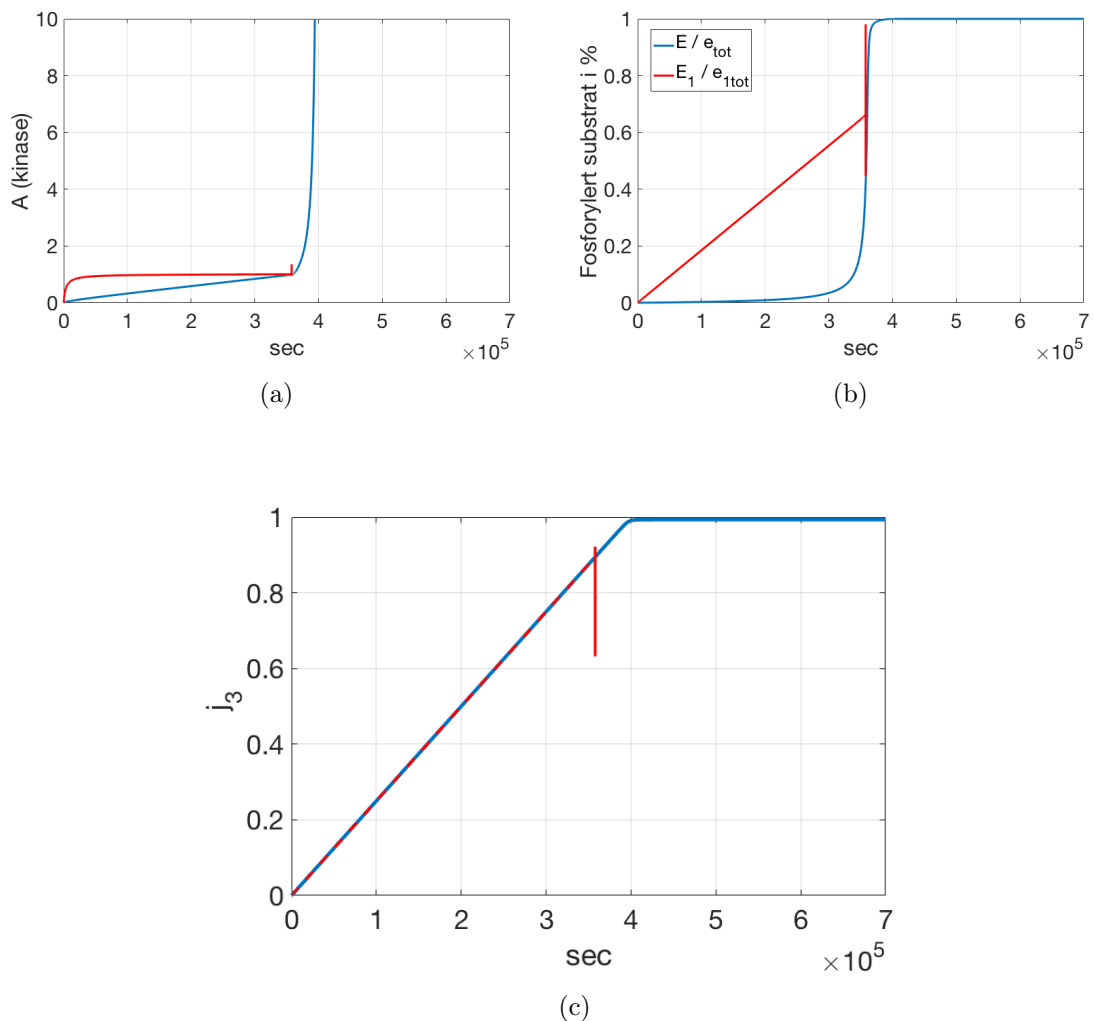
Figur 4.11d viser den stasjonære sammenhengen mellom fosforylert substrat ($\frac{E_1}{e_{1,tot}}$ og $\frac{E_2}{e_{2,tot}}$) og kinase konsentrasjonen A . Begge reaksjonene viser ultrasensitivitet, hvor den siste reaksjonen (rød kurve i figur 4.11d) av fosforylering-defosforylering er mer sensitiv enn den første reaksjonen (blå kurve i figur 4.11d)⁶.

⁶ Dette er et fenomen som skjer i kaskade signalering og er beskrevet i kapittel 3.8.

Sammenligning av responser i figur 4.3 og 4.10

Figur 4.12 sammenligner noen av responsene i figur 4.10 og 4.3, som er simulert med metningsfunksjon i signaleringen fra fosforylert substrat til j_3 . Det er valgt å vise forskjellene i responsen av kinase konsentrasjonen A (figur 4.12a), fosforylert substrat (figur 4.12b) og utgangen j_3 (figur 4.12c).

Til tross for oscilleringene for responsene i figur 4.10, er vi hovedsaklig mest interessert i formen på responsene.



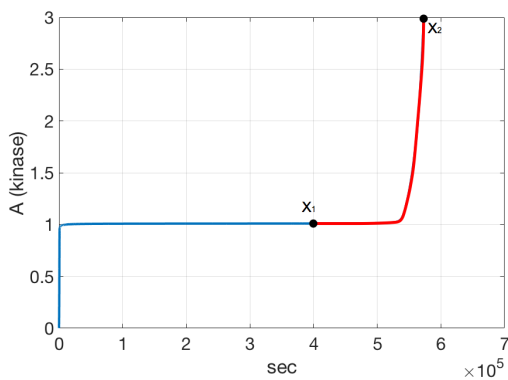
Figur 4.12: Sammenligner responser fra figur 4.10 (rød kurve) og 4.3 (blå kurve). Panel a) viser forskjellen i kinase konsentrasjon A . Panel b) viser forskjellen i fosforylert substrat i prosent. Panel c) viser forskjellen i utgangen til A (j_3)

- Det er forskjell i responsene av kinase konsentrasjonen A (figur 4.12a), ved at rød kurve går raskere opp i settpunktet.
- Reguleringen av A bryter sammen på det samme tidspunktet for begge responsene, se figur 4.12a.
- Det er stor forskjell mellom responsene av fosforylert substrat, se figur 4.12b, og det blir vist at kurven til kinase konsentrasjonen A (figur 4.12a), har mye å si for dannelsen av responsen av fosforylert substrat.
- Stigningen i responsene av j_3 er helt like, men forskjellen er at rød kurve begynner å oscillere når regulatoren bryter sammen, mens blå kurve vil stige til maksimalverdi.

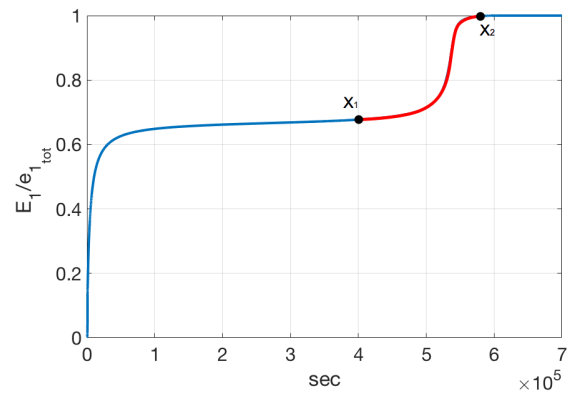
Første orden i signalering fra E_2 til j_3

Figur 4.13 viser resultatene av å simulere modellene som beskriver motivet i figur 4.9, med første orden i signaleringen fra E_2 til j_3 , se ligning (4.13).

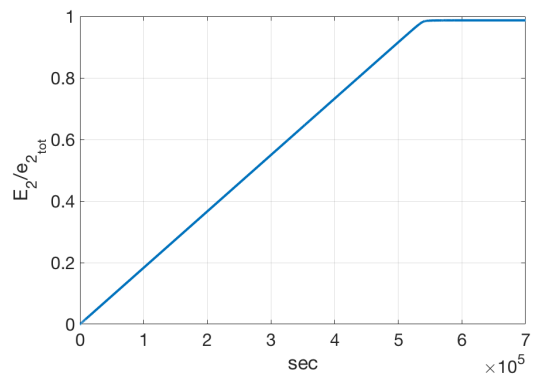
$$j_3 = k_3 \cdot \frac{A}{K_M^A + A} \cdot E_2 \quad (4.13)$$



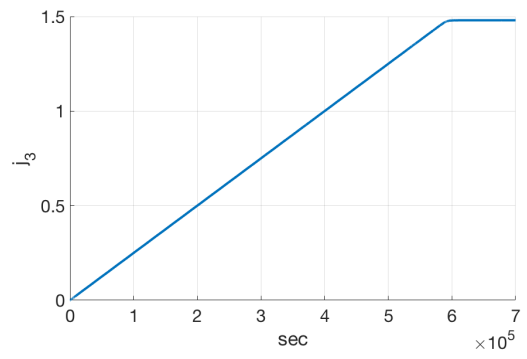
(a)



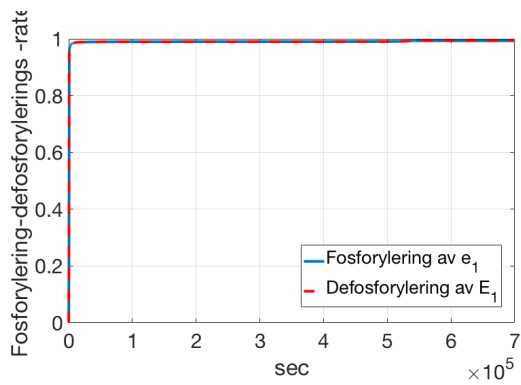
(b)



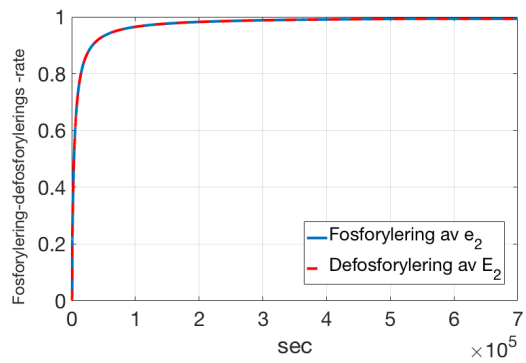
(c)



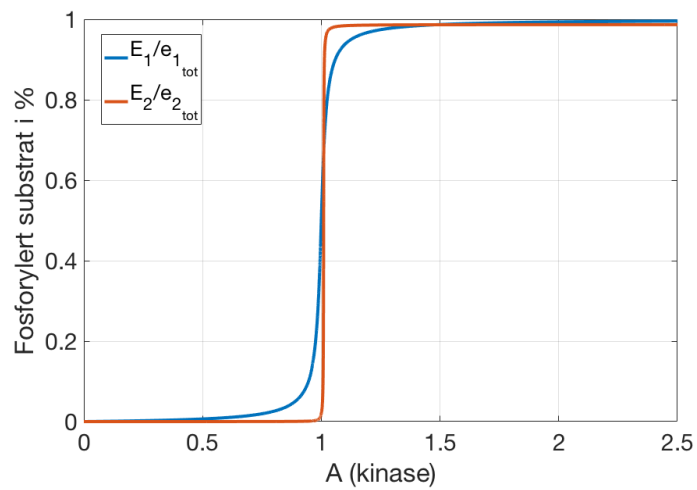
(d)



(e)

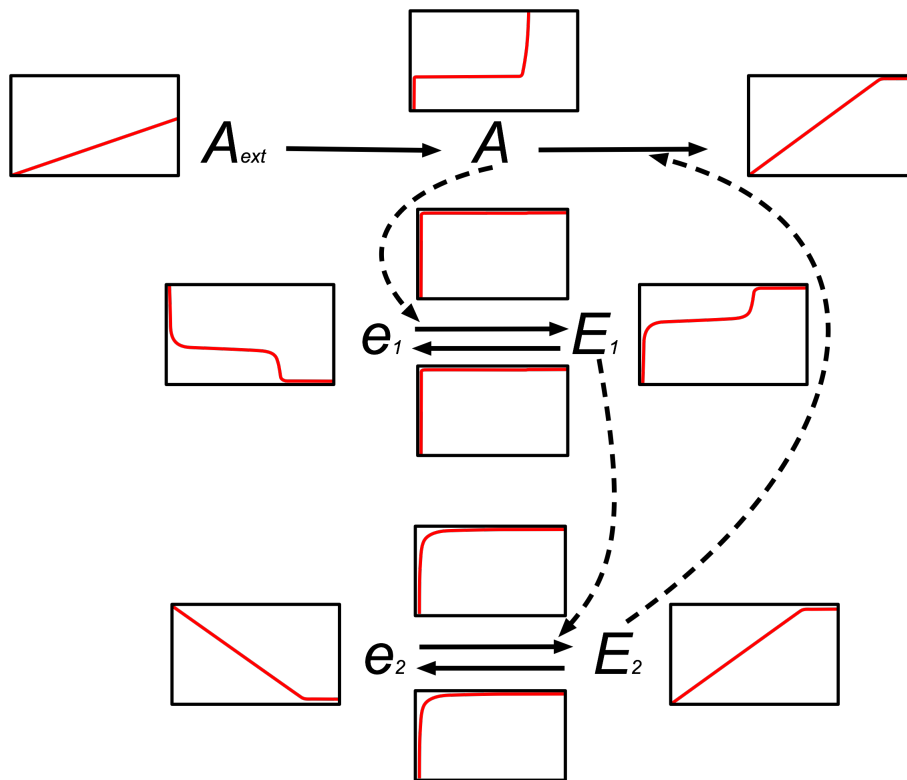


(f)



(g)

Figur 4.13: Viser tidsresponsene og responsen av den stasjonære sammenhengene (panel g)), ved å simulere modellene som beskriver kontrollmotivet i figur 4.9, med første orden i signalering fra E_2 til j_3 .

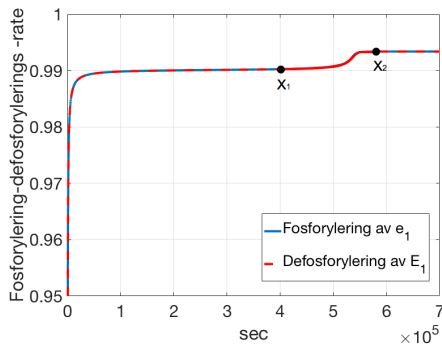


Figur 4.14: Viser responskart av kontrollmotivet i figur 4.9, med illustrasjon av responsene fra figur 4.13.

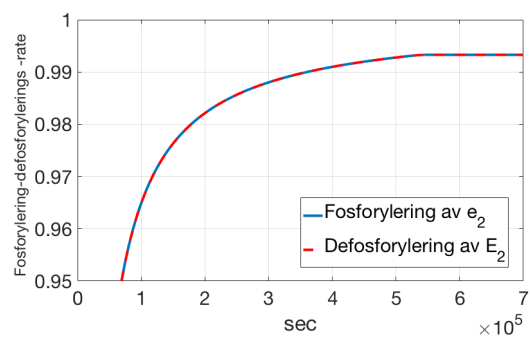
Kinase konsentrasjonen A i figur 4.13a stiger veldig raskt opp i settpunktet, som også får fosforylering-defosforyleringsraten i figur 4.13e, til å stige veldig raskt opp i nærheten av maksimalverdien, se figur 4.15a.

De resterende substratene e_1 blir fosforylert når fosforyleringsraten stiger til maksimalverdi, som skjer ved X_1 og X_2 på kurven, som er i området hvor systemet bryter sammen, se X_1 og X_2 i figur 4.13a, 4.13b og 4.15a.

Den lille endringen fra 0.99 til 0.993 i fosforylering-defosforyleringsraten i figur 4.15a i X_1 og X_2 , viser stor utslag i responsen av $\frac{E_1}{e_{1tot}}$ (figur 4.13b), som er typiske for reaksjoner som er ultrasensitive.



(a)



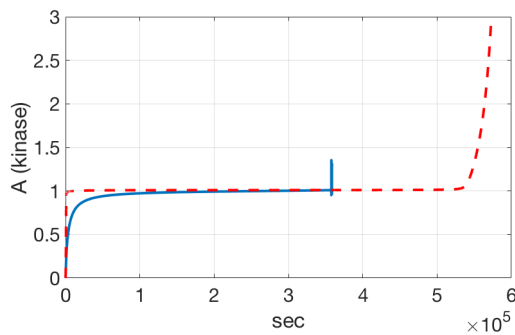
(b)

Figur 4.15: Viser forstørret versjon av fosforylering-defosforyleringsratene. Panel a) er ratene fra figur 4.13e. Panel b) er ratene fra figur 4.13f.

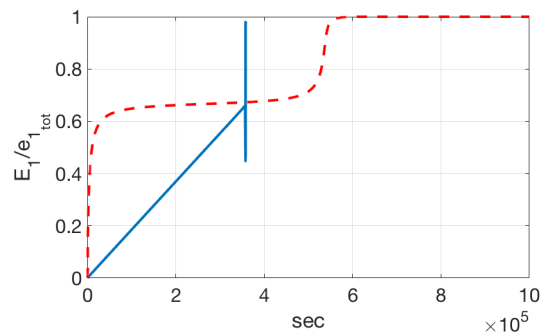
Signaleringen fra E_1 (figur 4.13b) til neste reaksjon av fosforylering, danner responsen $\frac{E_2}{e_{2tot}}$ (figur 4.13c), og viser seg å være helt forskjellige fra responsen av $\frac{E_1}{e_{1tot}}$.

Sammenligning av responser i figur 4.13 og 4.11

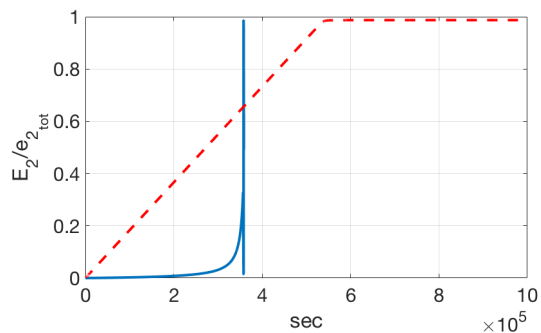
Figur 4.16 viser sammenligning i noen av responsene i figur 4.13 og 4.11



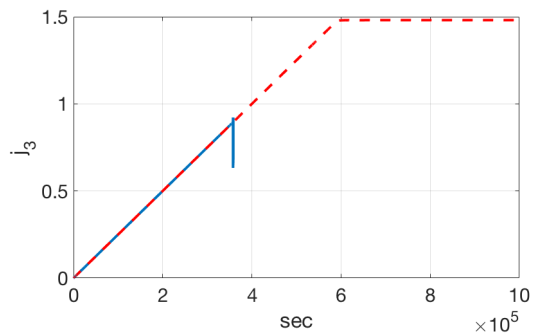
(a)



(b)



(c)



(d)

Figur 4.16: Sammenligning av responser fra figur 4.13 og 4.11, som er resultatet av å simulere modellene som beskriver motivet i figur 4.9, med (blå kurve) og uten (rød kurve) metningsfunksjon i signaleringen fra E_2 til j_3 .

Til tross for at for at responsene med metningskinetikk i signaleringen fra E_2 til j_3 (blå kurve i figur 4.16) begynner å oscillere når systemet bryter sammen, er det forskjellen i responsen som er interessant, og at et slikt system kan danne to helt forskjellige responser ved å endre egenskapen til j_3 .

Kapittel 5

Diskusjon og konklusjon

I denne oppgaven var målet å sette seg inn i hva ultrasensitivitet er. Dette ble gjort ved å modellere, simulere og analysere kjemiske strukturer som er ultrasensitive. Det ble undersøkt effektene av å benytte kjemiske strukturer som er ultrasensitive til signalering i et kontrollmotiv. Ferrel sine resultater ble reprodusert, hvor disse ble brukt i de videre testene for å finne de? parameterene som ga størst forandringer i responsen.

Det ble funnet ut at kontrollmotiv, sammen med reaksjon av fosforylering-defosforylering, med og uten metningsfunksjon i signaleringen fra fosforylert substrat til utgangen j_3 , ga helt forskjellige tidsresponser. Det interessante med dette var at det var så store forskjeller i tidsresponsen, men at begge modellene viste at den stasjonære sammenhengen er ultrasensitiv. Dette viser at stasjonære sammenhenger inneholder skjult informasjon i tidsresponsene.

Det ble også funnet ut av at flere reaksjoner som er satt i kaskade for et kontrollmotiv, kan ende opp i oscillere dersom signaleringen fra fosforylert substrat til j_3 er for sensitiv. Dette ble løst ved å øke verdien i K_a^E , som reduserer sensitiviteten i signaleringen, og gjør at systemet blir mer stabilt. Dette viser at motiver med ultrasensitiv signalering er veldig parameteravhengig.

5.1 Fremtidig arbeid

I denne oppgaven ble det eksperimentert med en type motiv sammen med to forskjellige kjemiske strukturer, og det er derfor mange kjemiske strukturer igjen som viser ultrasensitivitet. Disse kan settes sammen med de 8 ulike kontrollmotivene. Det kan for eksempel fortsettes videre med kontrollmotivet i denne oppgaven, ved å legge til en ekstra reaksjon av fosforylering-defosforylering i kaskade, og for å se effekten av å endre egenskapen til signaleringen fra fosforylert substrat til j_3 . Se vedlegget A for andre motivstrukturer

som er modulert og prøvd ut i Simulink.

Kapittel 6

Bibliografi

- [1] J. M. B. Gregory J. Gatto, John L. Tymoczko, *Biochemistry*. 8th ed. ed., 2015.
- [2] K. A. J. Svein H vard Stokka, *Fysiologisk modellering og regulering av en industriell tankprosess*. Mai 2017. Bachelor oppgave.
- [3] G. V.-K. Jens Gabriel Hauge, “Enzymer.” <https://snl.no/enzymer> (Accessed on 06/02/2018).
- [4] T. Johnsen, *Matematisk modellering og simulering av blodsukkeret til person med type 1 diabetes*. 15. Juni 2017.
- [5] R. Firestone, “An introduction to enzyme kinetics.”
- [6] D. N. A. ordbok, “Sukrase.” <https://www.naob.no/ordbok/sukrase> (Accessed on 04/03/2018).
- [7] A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Wiley-Blackwell, 4th, completely rev. and greatly enl. ed. ed., February 2013.
- [8] T. Drengstig, I. Jolma, X. Ni, K. Thorsen, X. Xu, and P. Ruoff, “Supporting material a set of basic homeostatic controller motifs,”
- [9] Lakna, “Difference between kinase and phosphatase.” <http://pediaa.com/difference-between-kinase-and-phosphatase/Kinase> (Accessed on 25/02/2018).
- [10] T. Drengstig, *Enzyme kinetics*. 29. November 2015.
- [11] T. Drengstig, K. Thorsen, I. Jolma, and P. Ruoff, “Fysiologiske reguleringsmekanismer,” *Naturen*, vol. 137, no. 04, pp. 128–137, 2013.
- [12] A. G. G. J rgensen, *Modelling of biochemical reaction networks*. June 2011.

- [13] J. E. Ferrell Jr and S. H. Ha, "Ultrasensitivity part i: Michaelian responses and zero-order ultrasensitivity," *Trends in biochemical sciences*, vol. 39, no. 10, pp. 496–503, 2014.
- [14] J. E. Ferrell, S. H. Ha, *et al.*, "Ultrasensitivity part ii: multisite phosphorylation, stoichiometric inhibitors, and positive feedback," *Trends in biochemical sciences*, vol. 39, no. 11, pp. 556–569, 2014.
- [15] J. E. Ferrell Jr and S. H. Ha, "Ultrasensitivity part iii: cascades, bistable switches, and oscillators," *Trends in biochemical sciences*, vol. 39, no. 12, pp. 612–618, "10 November 2014".
- [16] "Phosphatase." <https://en.wikipedia.org/wiki/Phosphatase> (Accessed on 11/04/2018), 6 Mai 2018. Online; (Accessed on 11/04/2018).
- [17] "Ultrasensitivity." <https://en.wikipedia.org/wiki/Ultrasensitivity> (Accessed on 05/05/2018), 16 Mai 2018. Online; (Accessed on 05/05/2018).
- [18] I. ye, "Massevirkningsloven." <https://sml.snl.no/massevirkningsloven> (Accessed on 15/04/2018).
- [19] N. B. Trunnell, A. C. Poon, S. Y. Kim, and J. E. Ferrell Jr, "Ultrasensitivity in the regulation of cdc25c by cdk1," *Molecular cell*, vol. 41, no. 3, pp. 263–274, 2011.
- [20] F. Ortega, J. L. Garcés, F. Mas, B. N. Kholodenko, and M. Cascante, "Bistability from double phosphorylation in signal transduction," *The FEBS journal*, vol. 273, no. 17, pp. 3915–3926, 2006.
- [21] J. G. H. (NMBU), *Enzymkinetikk*. 25. Februar 2016. [Online; accessed 25. februar 2016].
- [22] B. P. Helmer Fjellv g, "Dissosiasjon." <https://snl.no/dissosiasjon-kjemi> (Accessed on 07/01/2018).
- [23] B. Pedersen, "St kiometri." <https://snl.no/st%C3%B8kiometri> (Accessed on 17/02/2018).
- [24] P. Kierulf, "Atp(adenosintrifosfat)." <https://sml.snl.no/ATP> (Accessed on 15/02/2018).
- [25] Lakna, "What is the structural difference between atp and adp." <http://pediaa.com/what-is-the-structural-difference-between-atp-and-adp/> (Accessed on 15/02/2018).
- [26] S. H. H. James E. Ferrell, "Cooperativity, journal of biology." <https://jbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/jbiol157> (Accessed on 21/02/2018).

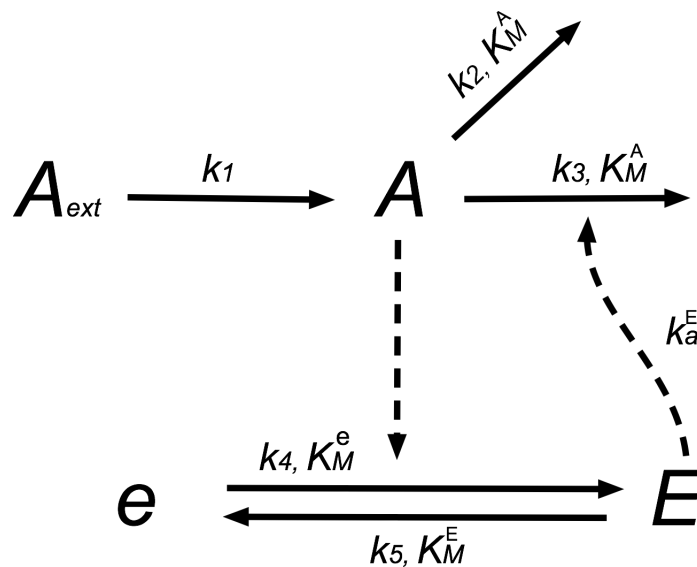
- [27] I. for biovitenskap, “Kooperativ.” <http://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/k/kooperativ.html> (Accessed on 21/02/2018).
- [28] A. Goldbeter and D. E. Koshland, “An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 78, no. 11, pp. 6840–6844, 1981.
- [29] A. Goldbeter and D. Koshland, “Sensitivity amplification in biochemical systems,” *Quarterly reviews of biophysics*, vol. 15, no. 3, pp. 555–591, 1982.
- [30] J. E. Ferrell Jr and W. Xiong, “Bistability in cell signaling: How to make continuous processes discontinuous, and reversible processes irreversible,” *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*, vol. 11, no. 1, pp. 227–236, 2001.
- [31] S. Legewie, N. Blüthgen, and H. Herzog, “Quantitative analysis of ultrasensitive responses,” *The FEBS journal*, vol. 272, no. 16, pp. 4071–4079, 2005.
- [32] N. I. Markevich, J. B. Hoek, and B. N. Kholodenko, “Signaling switches and bistability arising from multisite phosphorylation in protein kinase cascades,” *The Journal of cell biology*, vol. 164, no. 3, pp. 353–359, "26. Januar 2004".
- [33] T. Drengstig, I. Jolma, X. Ni, K. Thorsen, X. Xu, and P. Ruoff, “A basic set of homeostatic controller motifs,” *Biophysical journal*, vol. 103, no. 9, pp. 2000–2010, 2012.
- [34] K. Thorsen, P. Ruoff, and T. Drengstig, “Control theoretic properties of physiological controller motifs,” in *System Science and Engineering (ICSSE), 2013 International Conference on*, pp. 165–170, IEEE, 2013.
- [35] K. Thorsen, G. B. Risvoll, D. M. Tveit, P. Ruoff, and T. Drengstig, “Tuning of physiological controller motifs,” in *2016 9th EUROSIM Congress on Modelling and Simulation*, pp. 28–33, 2016.
- [36] G. B. Risvoll, K. Thorsen, P. Ruoff, and T. Drengstig, “Variable set-point as a relaxing component in physiological control,” *Physiological reports*, vol. 5, no. 17, p. e13408, 2017.

Tillegg A

Andre kontrollmotiver og simuleringsresultater

Disse kontrollmotivene er modellert i Simulink, som man finner i vedlegget i denne rapporten.

A.1 Motivstruktur av fosforylering-defosforylering med outflow kontroller



Figur A.1: Motiv struktur av fosforylering-defosforylering:

$$j_1 = k_1 \quad (\text{A.1a})$$

$$j_2 = k_2 \cdot \frac{A}{K_M^A + A} \quad (\text{A.1b})$$

$$j_3 = k_3 \cdot \frac{A}{K_M^A + A} \cdot \frac{E}{K_a^E + E} \quad (\text{A.1c})$$

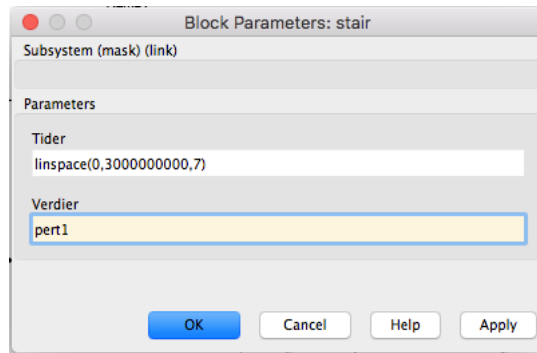
$$j_4 = k_4 \cdot \frac{e}{K_M^e + e} \cdot A \quad (\text{A.1d})$$

$$j_5 = k_5 \cdot \frac{E}{K_M^E + E} \quad (\text{A.1e})$$

A.1.1 Forstyrrelse i kinase tilførsel

For å se hvordan motivet i figur A.1 håndterer forstyrrelser i inngangen til A , er det gitt forskjellige sprang i j_1 for å se hvordan systemet håndterer endringene. Det er valgt å simulere modellene med metningsfunksjon av E i j_3 .

Forstyrrelsen er gitt i kinase tilførsel $A_{ext}(k_1)$, der det er valgt å benytte en trappeblokk (stair block) i Simulink laget av Tormod Drengstig. Trappeblokk gjør det mulig å simulere forstyrrelsen ved å gi forskjellige små sprang, ved forskjellige tidspunkter. For å teste terskelen for hvor godt systemet håndterer forstyrrelsene, er systemet blitt simulert med tre forskjellige forsterkninger i sprang k_1 , se figur A.2.



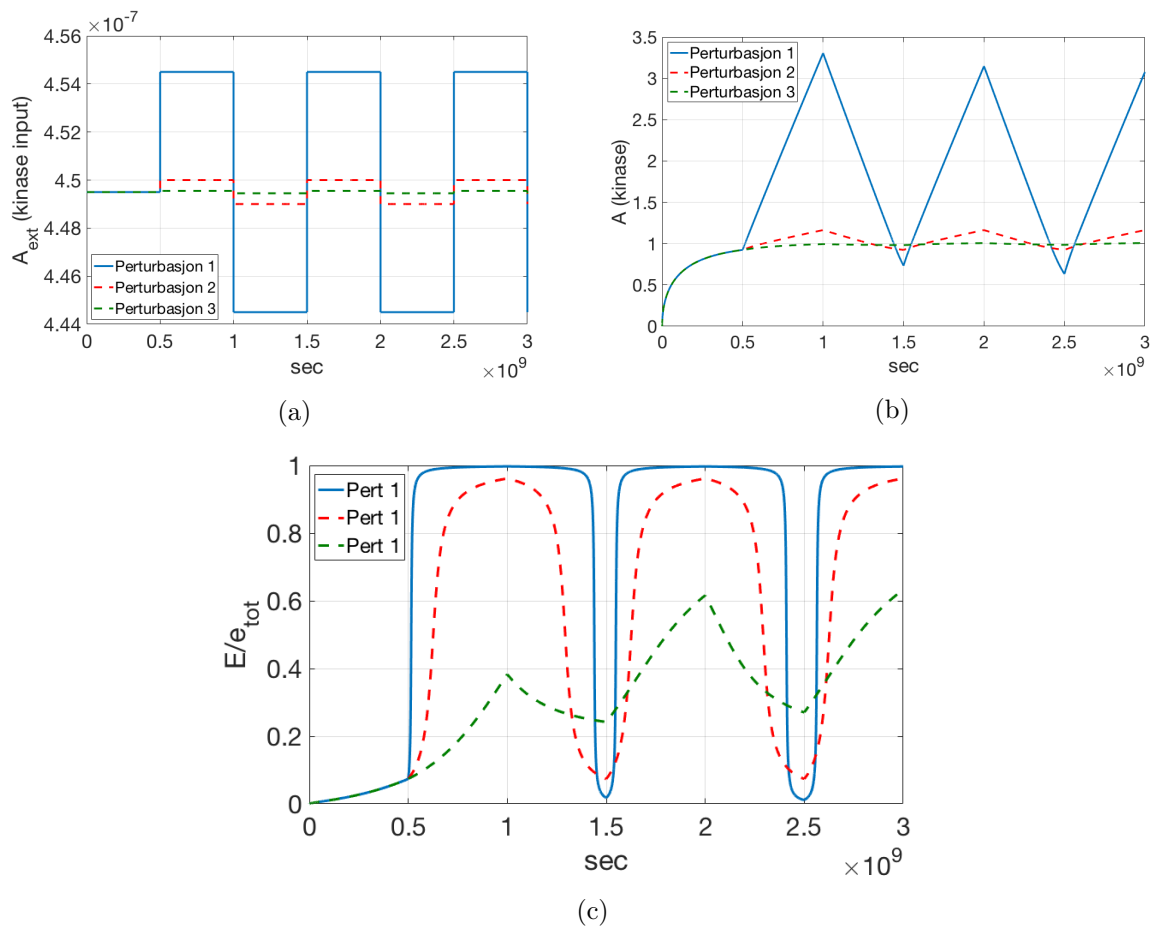
Figur A.2: Konfigurasjonsvindu for trappeblokk i Simulink

$$\text{pert1} = [0 \ 5\text{e-}9 \ -5\text{e-}9 \ 5\text{e-}9 \ -5\text{e-}9 \ 5\text{e-}9 \ -5\text{e-}9] \quad (\text{A.2a})$$

$$\text{pert2} = [0 \ 5\text{e-}10 \ -5\text{e-}10 \ 5\text{e-}10 \ -5\text{e-}9 \ 5\text{e-}10 \ -5\text{e-}10] \quad (\text{A.2b})$$

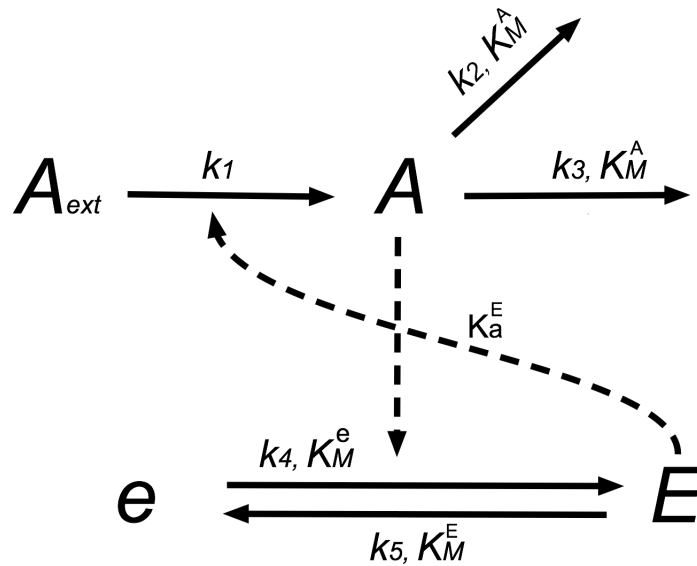
$$\text{pert3} = [0 \ 5\text{e-}11 \ -5\text{e-}11 \ 5\text{e-}11 \ -5\text{e-}11 \ 5\text{e-}11 \ -5\text{e-}11] \quad (\text{A.2c})$$

På grunn av ultrasensitiviteten i reaksjonen av fosforylering-defosforylering motivet (figur 4.1), gir det stor utslag i responsen ($\frac{E}{e_{tot}}$), se figur A.3b.



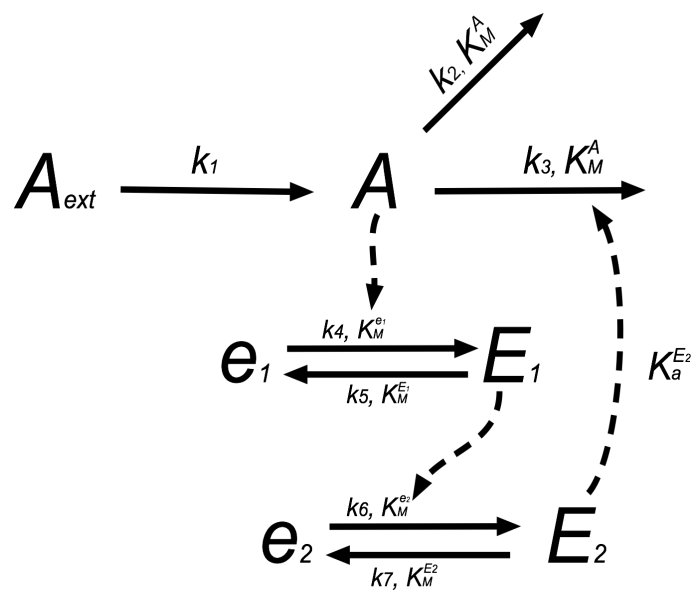
Figur A.3: Viser resultatet av utgangene fra motivet i figur A.1 ved å gi forskjellige sprang i inngangen (A_{ext}) til A . Panel a) viser sprangene som blir gitt i A_{ext} . Panel b) viser endringen i A (kinasen). Panel c) viser responsen av faktoren fosforylert substrat $\frac{E}{e_{tot}}$. Motivet er simulert av parameterne: $k_1 = ((4.4950e-04) + \text{pert})$, $k_2 = (15e-7)$, $k_3 = (3e-7)$, $k_4 = 1$, $k_5 = 1$, $K_M^A = 0.001$, $K_M^e = 0.01$, $K_M^E = 0.01$, $K_a^E = 0.0001$ og $e_{tot} = 1.5$

A.2 Motivstruktur av fosforylering-defosforylering med inflow kontroller



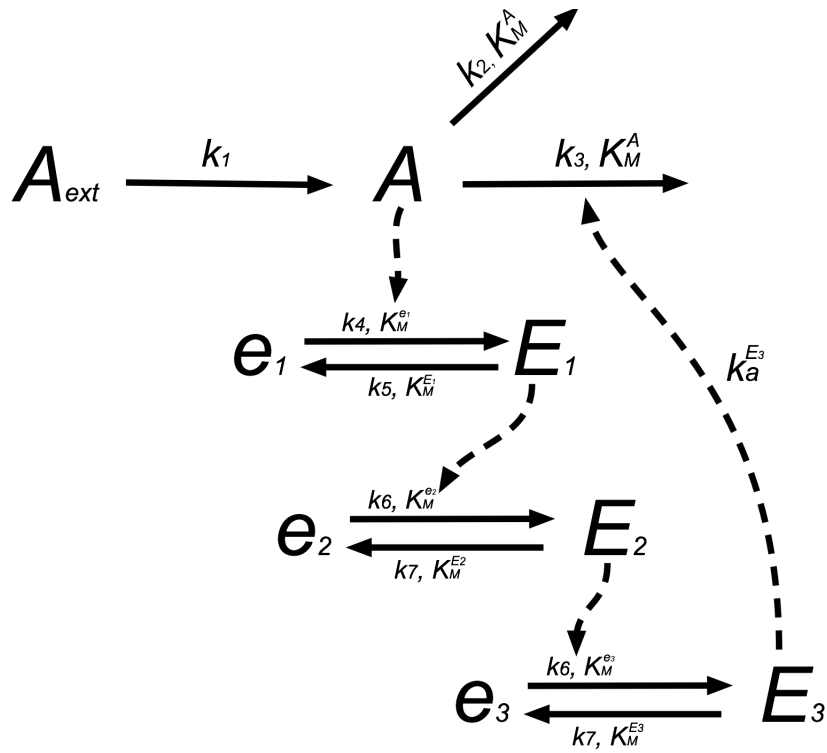
Figur A.4: Inflow-kontroller med reaksjon av fosforylering-defosforylering

A.3 Motivstruktur av kaskadesignalisering med 2 nivåer



Figur A.5: Kontrollmotiv med reaksjoner i kaskade

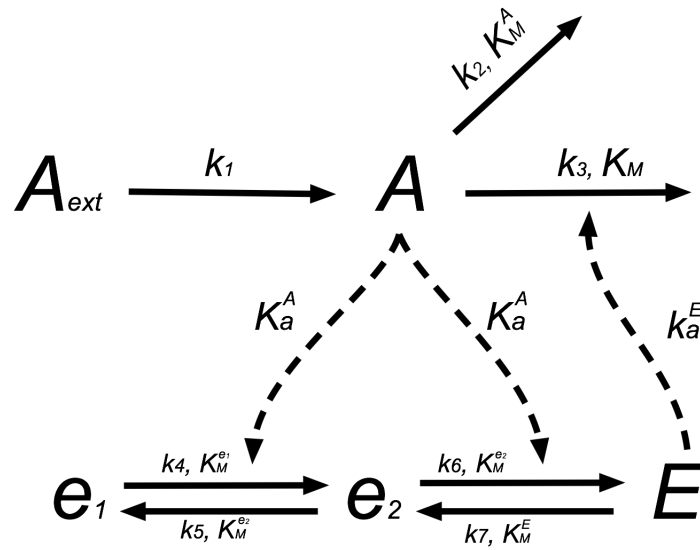
A.4 Motivstruktur av kaskadesignalisering med 3 nivåer



Figur A.6: Kontrollmotiv med raksjoner i kaskade

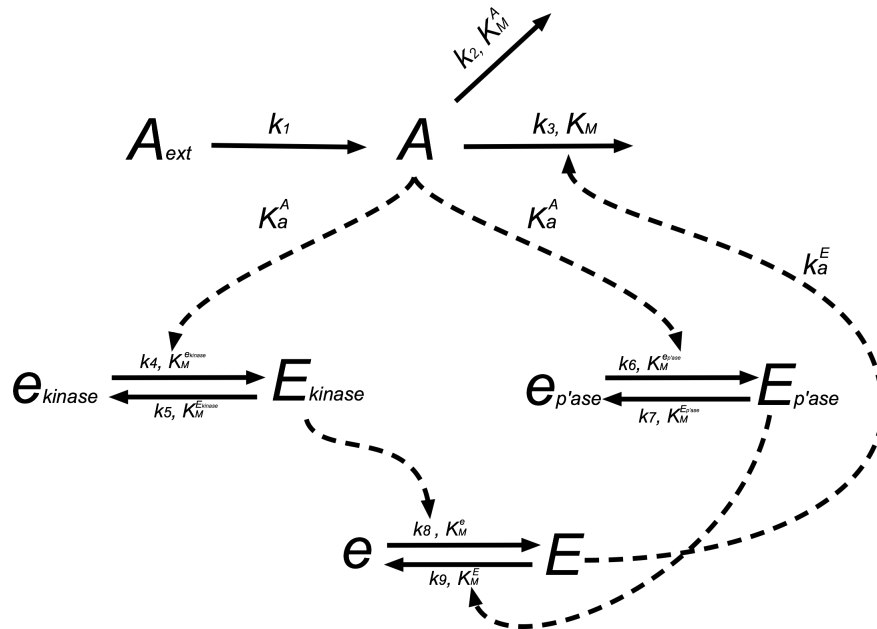
A.5 Motiv av flerestegs fosforylering-defosforylering

A.5.1 Dobbel fosforylering



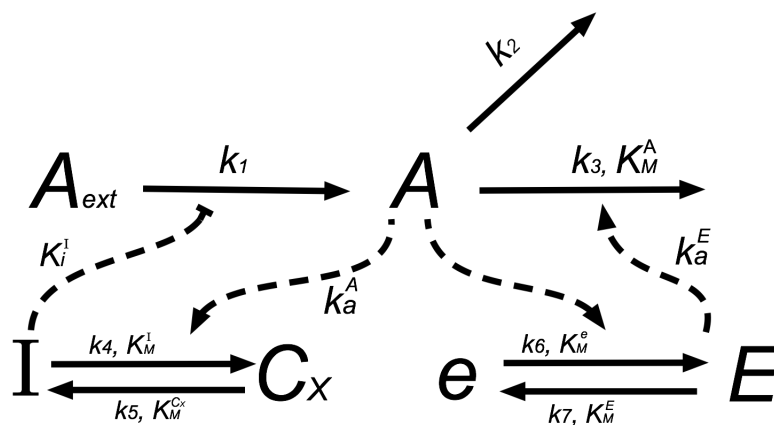
Figur A.7: Outflow-kontroller med dobbel fosforylering

A.6 Motiv med Reciprocal regulering



Figur A.8: Outflow-kontoller med Reciprocal regulering

A.7 Inhiberende system



Figur A.9: Motivkontoller med reaksjon av fosforylering-defosforylering med inhiberte effekt på kinase

Tillegg B

Sensitivitet analyse

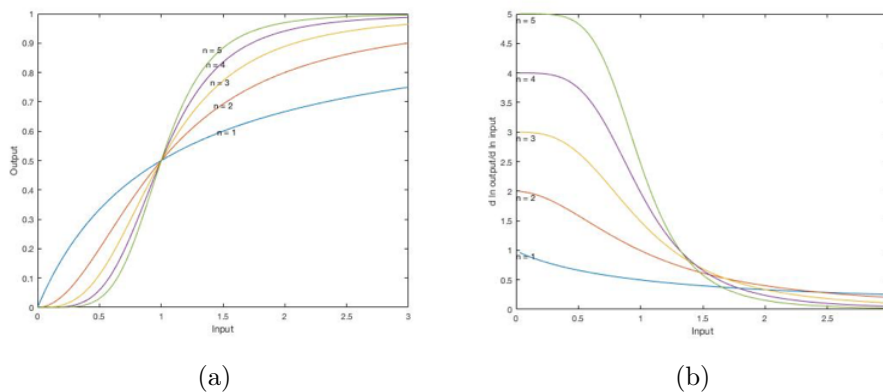
For en ultrasensitiv respons, vil små endringer i input (stimuli) resultere i en stor relativ endring i responsen. I dette kapitlet blir det gitt en introduksjon til metoder som beskriver sensitiviteten til responsen i form av grafer og koeffisienter. Disse metodene benyttes til å identifisere hvor sensitiv responsen er for endringer i input(stimuli).

B.1 Local sensitivitet koeffisient

Lokal sensitiviteten beskriver endringene i prosent av utgangen, relativ til endringene i prosent av inngangen, som gir et uttrykk uavhengig av enhetene til inngangen og utgangen, se ligning B.1.

$$S_l = \lim_{\Delta Input \rightarrow 0} \frac{\frac{\Delta Output}{Output}}{\frac{\Delta Input}{Input}} = \frac{dOutput}{dInput} \frac{Input}{Output} = \frac{d \ln Output}{d \ln Input} \quad (\text{B.1})$$

Hvis sensitivitet koeffisienten S_l er større enn relativ sensitivitet koeffisient S_{lr} (dev. forgie koeffisient, før endringen i stimuli), vil det si at relativ endring i input har økt.



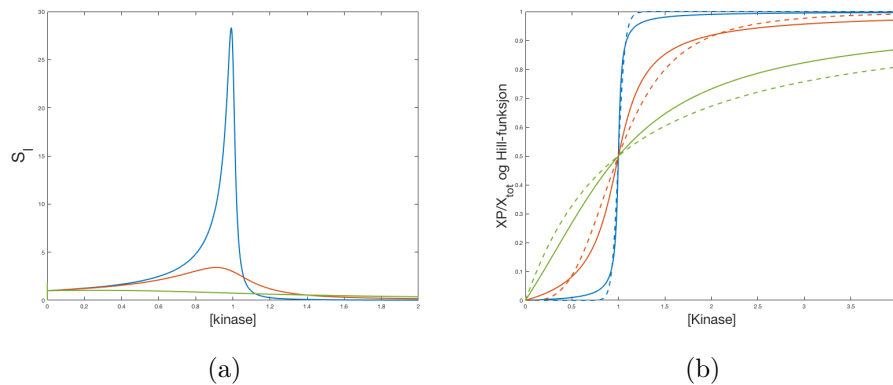
Figur B.1: Grafen representerer Hill-funksjonen med forskjellige Hill-koeffisienter (fra 1 til 5). Graf (b) er satt opp av 5 kurver som beskriver lokalsensitiviteten til Hill-funksjonene. Disse resultatene er en gjenskapelse fra Ferrell's artikkel [13].

Fra figur (B.1 b), er lokal sensitiviteten høyest når input er lav, og blir mindre når input øker.

Fra Ferrell's artikkel [13], ble det nevnt at lokal sensitiviteten S_l for en Hill-funksjon kan benyttes som en approksimasjon for Hill-koeffisienten n , hvor sensitiviteten er høyest. For å se om dette stemmer, er det valgt å utføre en test som tar utgangspunktet i ultrasensitive responser fra et system.

Kan lokal sensitivitet benyttes til å finne Hill-koeffisienten av en respons fra fosforylering-defosforylering reaksjon

For å se om det er mulig å finne en tilnærming til Hill-koeffisienten fra lokal sensitiviteten fra stasjonære responser, er det valgt å ta utgangspunktet i systemet i figur 3.5, se figur B.2.

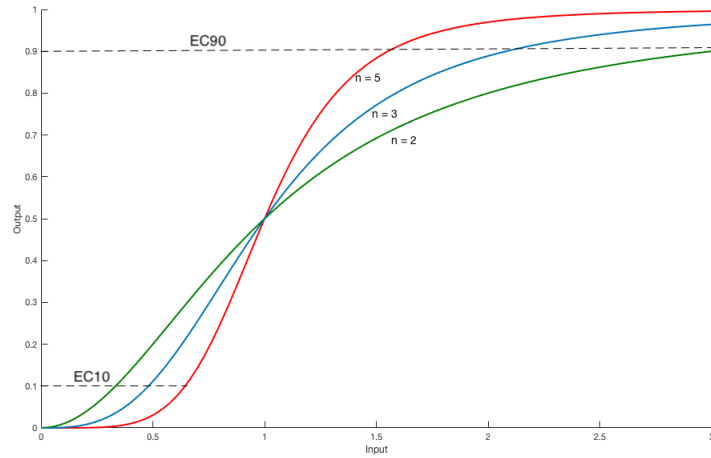


Figur B.2: Panel a) resprerterer lokal sensitiviteten S_l av responsene i graf (b). Graf (b) representerer ulike responser av fosforylering-defosforylering fra kapittel 3.7. Satt opp av parameter: $k_1 = 1$, $k_2 = 1$, $K_{M1} = 0.01, 0.1, 1$, $K_{M2} = 0.01, 0.1, 1$, $E_2 = 1$ (fosfatase). De stiplede kurve er fra Hill-funksjonen med en tilnærmet Hill-koeffisienten basert på lokal sensitiviteten fra responsene. Kurvene er satt opp av Hill-koeffisientene $n = 28.32, 3.41$ og 1.036 .

B.2 Alternativ til sensitivitet koeffisient og approximasjon til Hill-koeffisienten

Det finnes en generell metode som ble utviklet av Goldbeter og Koshland for å identifisere globalt (hele responsen) om en respons er ultrasensitiv ved å ta utgangspunktet i en Michealis-respons. Dette går ut på at man finner faktoren EC_{90}/EC_{10} av en Michealis-respons, som i følge Goldbeter og Koshland skal alltid ha verdi lik 81 [17].

Denne koeffisienten blir brukt som en referanse, eller et mål for om responsen er ultrasensitiv. Dersom responsen får en lavere verdi enn 81, er det i følge Goldbeter og Koshland definert som en ultrasensitiv respons.



Figur B.3: Viser 3 responser generert fra Hill-funksjonen med koeffisientene $n = 2, 3$ og 5

Figuren B.3 representerer tre kurver av Hill-funksjonen med koeffisientene $n = 2, 3$ og 5 . Verdien av stimuli (Input) konsentrasjonen blir lest av responsen ved EC10 og EC90, vist i tabellen under. Her er det tydelig at jo nærmere kurven er en Michealis lik respons, jo høyere verdi får man i faktoren EC90/EC10.

n	EC90	EC10	$\frac{EC90}{EC10}$
1	9	0.111	81.081
2	3	0.333	9
3	2	0.48	4.166
5	1.57	0.65	2.415

Tabell B.1

Etter å ha prøvd denne metoden på forskjellige systemer, er det vist at en Michaelien-respons ikke alltid får verdien 81 ved å beregne EC90/EC10. Goldbeter og Koshland tok utgangspunktet i Hill-funksjonen men en koeffisient $n = 1$, som ikke passer inn for alle systemer.

Skal denne metoden brukes for å utlyse om responsen er ultrasensitiv for et system, kan man først få systemer til å danne en Michaelien-respons, å så beregne EC90/EC10 koeffisient. Hvor verdien ut i fra å beregne blir benyttet som referansen for om neste respons er ultrasensitiv.

B.2.1 Global sensitivitet analyse

Det er tilfeller hvor global sensitivitetsanalysen fra Goldbeter og Koshland ikke fungerer så optimalt for responser som gir dårlig approksimasjoner for en Hill-funksjon, og for responser som har mye variasjon eller starte med en høyere utgangsverdi.

I slike tilfeller må det brukes en annen metode, som baserer seg på å integrere sensitivitet responsen. Hvor integral koeffisienten (Arealet av sensitivitet responsen) blir brukt til å karakterisere den globale ultrasensitiviteten [13], denne metoden blir kaldt for Relativ sensitivitet koeffisient, vist i ligning (B.2)

$$n_R = \frac{|\int_b^a S_l|}{|\int_b^a S_{l_R}|} \quad (\text{B.2})$$

Her er fH og fL spesifisert som grense verdiene for sensitivitet responsen S som blir sammenlignet med en referanse respons Sr. Referanse responsen blir som regel tatt utgangspunktet i en Michealis respons, for så å sammenligne med de andre responsene. Slik at en respons er ultrasensitiv dersom Relativ sensitivitet koeffisient er > 1 .