



SJÄLVSTÄNDIGA ARBETEN I MATEMATIK

MATEMATISKA INSTITUTIONEN, STOCKHOLMS UNIVERSITET

Modellering av reaktioner i en lösning innehållande
proteinmolekyler och metalljoner

av

Ulrica Gustafsson

2009 - No 4

Modellering av reaktioner i en lösning innehållande proteinmolekyler och metalljoner

Ulrica Gustafsson

Självständigt arbete i matematik 15 högskolepoäng, grundnivå

Handledare: Hans Rullgård

2009

Sammanfattning

En lösning innehåller proteinmolekyler och metalljoner som reagerar med varandra. Vi bygger upp ett system av differentialekvationer som matematiskt beskriver de reaktioner som sker. Genom att förenkla detta system lyckas vi skapa en modell som beskriver reaktionsförloppet. Modellen möjliggör en kvantitativ tolkning av experimentella data och bestämning av flera reaktionskonstanter.

Innehåll

1	Inledning	4
2	Bakgrund	4
3	Matematiska förklaringar	7
3.1	Linjära ekvationssystem	7
3.2	Newton-Raphsons metod	8
3.3	Minstakvadratanpassning	9
4	Reaktioner i en lösning utan metalljoner	10
5	Reaktioner vid hög ureakoncentration och med metalljoner i lösningen	12
5.1	Med kelator	12
5.2	Utan kelator	14
6	Slutledning	23
A	Matlabkod	25

1 Inledning

Proteinet SOD (superoxiddismutas) finns i alla mänskliga celler där det bryter ner skadliga syreradikaler. För att proteinet ska fungera som det ska måste det binda till koppar- och zinkjoner. Utan metallerna ökar risken att SOD-proteinet veckas fel och antar en skadlig form som orsakar celldöd i det motoriska nervsystemet. Detta kan ge upphov till sjukdomen ALS (amyotrop lateral skleros) som successivt försvagar olika muskler i kroppen.

Mikael Oliveberg, professor i biokemi vid Stockholms Universitet, och hans forskargrupp studerar hur fort SOD-proteinet veckar ut sig med och utan metall. Syftet med denna uppsats är att, med hjälp av deras mätdata, bestämma reaktionshastigheterna för de reaktioner som sker i ett system med protein och metalljoner. Man har hittat en modell som beskriver reaktionsförloppet bra vid ingen eller väldigt hög metallkoncentration, men mindre bra vid låg. Vi vill kunna avgöra om det finns någon bättre modell.

Avsnitt 2 beskriver den bakomliggande teorin, dvs vilka reaktioner som sker och hur dessa kan beskrivas matematiskt med ett system av differentialekvationer. Avsnitt 3 behandlar den matematik som vi använder oss utav. Avsnitt 4 och 5 beskriver hur man löser systemet utan respektive med metalljoner. Det är främst i avsnitt 5 som denna uppsats tillför något nytt till forskningen.

Den som vill veta mer om hur felveckning av proteinet SOD orsakar ALS hänvisas till att läsa artiklarna [4] och [5].

2 Bakgrund

En lösning innehåller proteinmolekyler och metalljoner. Proteinet uppträder i två konfigurationer, den nativa N och den denaturerade D . Proteinet är veckat i en bestämd struktur om det befinner sig i det nativa tillståndet och utvecklat om det är i det denaturerade. Båda konfigurationerna kan binda till en metalljon, och betecknas då NM respektive DM . Koncentrationerna av varje substans ändras med tiden genom ett antal reaktioner. Obundna proteinmolekyler kan associera med en fri metalljon samtidigt som bundna proteinmolekyler kan dissociera från sin:



Dessutom kan proteinet vecka ut och ihop sig, dvs övergå från den ena konfigurationen till den andra:



Detta system kan visualiseras med hjälp av en kvadrat, där hörnen i kvadraten består av proteinmolekylerna D , N , NM och DM . Sidorna svarar mot reaktionerna, där varje reaktion går i båda riktningarna.



Inom kemi betecknar kinetik läran om hur snabbt och på vilket sätt kemiska reaktioner och processer sker. Man utför experiment för att studera hur reaktionshastigheten beror på koncentrationer av berörda substanser. Hastigheten definieras som derivatan av en komponents koncentration över tiden. Om till exempel A reagerar med B och bildar C fås hastigheten:

$$r = \frac{d[C]}{dt} = k[A]^a[B]^b \quad (2.6)$$

där k är reaktionskonstanten och $[]$ betecknar koncentrationer. Exponenterna a och b anger reaktionsordningen för varje reaktant. Den totala reaktionsordningen är summan av exponenterna. En första ordningens reaktion beror på koncentrationen av endast en reaktant. Hastigheten ges av:

$$r = k[A] \quad (2.7)$$

En andra ordningens reaktion beror på koncentrationen av antingen en andra ordningens reaktant, eller två första ordningens. Hastigheten ges av:

$$r = k[A]^2 \quad (2.8)$$

eller

$$r = k[A][B] \quad (2.9)$$

För den intresserade av kemisk kinetik, se [1].

Tabell 1 anger reaktionshastigheterna för de reaktioner som sker i lösningen med protein och metalljoner. Derivatan av koncentrationen för en substans i lösningen beskrivs som summan av reaktionshastigheterna för alla reaktioner som producerar denna, minus summan av de som förbrukar samma substans. Följande uppsättning av differentialekvationer beskriver hur systemet med protein och metall styrs:

Reaktion	Reaktionshastighet
$N + M \longrightarrow NM$	$k_{\text{ass}}^N[N][M]$
$D + M \longrightarrow DM$	$k_{\text{ass}}^D[D][M]$
$NM \longrightarrow N + M$	$k_{\text{diss}}^N[NM]$
$DM \longrightarrow D + M$	$k_{\text{diss}}^D[DM]$
$D \longrightarrow N$	$k_f[D]$
$N \longrightarrow D$	$k_u[N]$
$DM \longrightarrow NM$	$k_f^M[DM]$
$NM \longrightarrow DM$	$k_u^M[NM]$

Tabell 1: De reaktioner som sker i en lösning med proteinmolekyler och metalljoner, samt motsvarande reaktionshastigheter (ass och diss står för association respektive dissociation samt f och u står för folding respektive unfolding).

$$\begin{aligned}
\frac{d[M]}{dt} &= k_{\text{diss}}^N[NM] + k_{\text{diss}}^D[DM] - k_{\text{ass}}^N[N][M] - k_{\text{ass}}^D[D][M] \\
\frac{d[NM]}{dt} &= -(k_{\text{diss}}^N + k_u^M)[NM] + k_f^M[DM] + k_{\text{ass}}^N[N][M] \\
\frac{d[DM]}{dt} &= k_u^M[NM] - (k_{\text{diss}}^D + k_f^M)[DM] + k_{\text{ass}}^D[D][M] \\
\frac{d[N]}{dt} &= k_{\text{diss}}^N[NM] + k_f[D] - (k_{\text{ass}}^N[M] + k_u)[N] \\
\frac{d[D]}{dt} &= k_{\text{diss}}^D[DM] + k_u[N] - (k_{\text{ass}}^D[M] + k_f)[D]
\end{aligned} \tag{2.10}$$

Det huvudsakliga problemet består i att om det är möjligt att bestämma reaktionskonstanterna k_{ass}^N , k_{ass}^D , k_{diss}^N , k_{diss}^D , k_f , k_u , k_f^M och k_u^M . Utgångspunkten är att man kan göra detta genom att observera hur koncentrationerna av proteinet ändras med tiden. Experimentet går till så att man framställer en lösning som innehåller den nativa konfigurationen av proteinet och metalljoner. En bestämd koncentration av denatureringsmedlet urea tillsätts, vilket medför att jämviktsläget för proteinet ändras. Man mäter sedan lösningens fluorescens under en viss tidsperiod, se figur 1. Dessa mätningar ger ett mått på hur koncentrationerna av proteinet förändras, eftersom den nativa och denaturerade konfigurationen har olika fluorescens. Man kan även börja med en lösning med denaturerat protein och hög koncentration av urea, vilken man sedan spär ut för att få en låg ureakoncentration. Mätningarna går till på samma sätt som tidigare. Dessa experiment skiljer inte mellan proteinmolekyler med eller utan metalljon. Reaktionshastigheterna påverkas av mängden urea i lösningen. För varje reaktionskonstant k antas att logaritmen av den beror linjärt på koncentrationen av urea.

Man kan tillföra en kelator i lösningen för att förenkla systemet. Kelatorer är speciella kemikalier som formar komplexa molekyler med särskilda metalljoner, vilket förhindrar dessa från att reagera med andra element. I vårt fall försvinner alla komponenter i systemet som innehåller $[M]$ och (2.10) får istället följande utseende:

$$\begin{aligned}\frac{d[NM]}{dt} &= -(k_{\text{diss}}^N + k_u^M) [NM] + k_f^M [DM] \\ \frac{d[DM]}{dt} &= k_u^M [NM] - (k_{\text{diss}}^D + k_f^M) [DM] \\ \frac{d[N]}{dt} &= k_{\text{diss}}^N [NM] + k_f [D] - k_u [N] \\ \frac{d[D]}{dt} &= k_{\text{diss}}^D [DM] + k_u [N] - k_f [D]\end{aligned}\tag{2.11}$$

I verkligheten är man egentligen intresserad av ett system som innehåller två olika metalljoner, Zn^{2+} och Cu^{2+} . Lösningen kommer att innehålla åtta olika former av proteinmolekyler, nämligen N , $N\text{Zn}^{2+}$, $N\text{Cu}^{2+}$, $N\text{Zn}^{2+}\text{Cu}^{2+}$, D , $D\text{Zn}^{2+}$, $D\text{Cu}^{2+}$ och $D\text{Zn}^{2+}\text{Cu}^{2+}$. Detta innebär att vi lägger till en dimension i vår kvadrat (2.5), och får istället en kub. Hörnen i kuben svarar fortfarande mot de olika proteinmolekylerna och sidorna mot reaktionerna. Istället för att som i vårt tidigare system ha totalt åtta reaktioner, har vi nu tjugofyra sådana. Detta försvårar problemet ytterligare.

Denna uppsats behandlar endast systemet med en metalljon.

3 Matematiska förklaringar

3.1 Linjära ekvationssystem

Man söker en lösning till det homogena linjära systemet

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= a_1x + b_1y \\ \frac{dy}{dt} &= a_2x + b_2y\end{aligned}\tag{3.1}$$

där a_1 , a_2 , b_1 och b_2 är givna konstanter. I analogi med studier av första ordningens linjära differentialekvationer, ansätter man att systemet har en lösning på formen

$$\begin{aligned}x &= Ae^{\lambda t} \\ y &= Be^{\lambda t}\end{aligned}\tag{3.2}$$

Insättning av (3.2) i (3.1) ger

$$\begin{aligned}A\lambda e^{\lambda t} &= a_1Ae^{\lambda t} + b_1Be^{\lambda t} \\ B\lambda e^{\lambda t} &= a_2Ae^{\lambda t} + b_2Be^{\lambda t}\end{aligned}\tag{3.3}$$

Division med den gemensamma faktorn $e^{\lambda t}$ resulterar i följande linjära algebraiska system

$$\begin{aligned}(a_1 - \lambda)A + b_1B &= 0 \\ a_2A + (b_2 - \lambda)B &= 0\end{aligned}\tag{3.4}$$

där A och B är de okända variablerna (det är värt att nämna att λ är ett egenvärde till differentialoperatoren). Man söker en icke-trivial lösning till (3.4), vilket inträffar precis när determinanten försvinner.

$$\begin{vmatrix} a_1 - \lambda & b_1 \\ a_2 & b_2 - \lambda \end{vmatrix} = 0\tag{3.5}$$

Utveckling av determinanten (3.5) ger den så kallade karaktäristiska ekvationen för det ursprungliga systemet (3.1):

$$\lambda^2 - (a_1 + b_2)\lambda + (a_1b_2 - a_2b_1) = 0\tag{3.6}$$

Låt λ_1 och λ_2 vara rötter till (3.6). Om man ersätter λ med λ_1 respektive λ_2 i (3.4), får man två icke-triviala lösningar till (3.1):

$$\begin{aligned}x &= A_1 e^{\lambda_1 t} \\ y &= B_1 e^{\lambda_1 t}\end{aligned}\tag{3.7}$$

och

$$\begin{aligned}x &= A_2 e^{\lambda_2 t} \\ y &= B_2 e^{\lambda_2 t}\end{aligned}\tag{3.8}$$

Om λ_1 och λ_2 är distinkta reella tal, är lösningarna (3.7) och (3.8) linjärt oberoende. Med andra ord är

$$\begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} = c_1 \begin{pmatrix} A_1 \\ B_1 \end{pmatrix} e^{\lambda_1 t} + c_2 \begin{pmatrix} A_2 \\ B_2 \end{pmatrix} e^{\lambda_2 t}\tag{3.9}$$

den allmänna lösningen till (3.1). För fler detaljer om hur man löser linjära ekvationssystem av differentialekvationer, se [2].

3.2 Newton-Raphsons metod

När man vill lösa en ekvation numeriskt används oftast iteration, dvs man upprepar en beräkning tills man funnit en tillräckligt bra skattning av roten. Newton-Raphson är en av metoderna som använder sig utav denna grundidé. Man börjar med ett startvärde x_0 som ligger relativt nära roten a till $f(x) = 0$. Tangenten till kurvan genom punkten $(x_0, f(x_0))$ skär x -axeln i en ny punkt x_1 . Ekvationen för en tangent

$$y = y_0 + y'(x_0)(x - x_0)\tag{3.10}$$

med $y = 0$ insatt ger

$$x_1 = x_0 - \frac{f(x_0)}{f'(x_0)} \quad (3.11)$$

Förväntningen är att x_1 utgör en bättre skattning av roten än vad x_0 gör. Detta är sant om $f(x)$ låter sig approximeras hyfsat med en rät linje i det aktuella området. Man befinner sig nu i samma situation som med x_0 , men en något förbättrad sådan. I nästa steg bestäms x_2 på samma sätt och sedan x_3 osv. Man har funnit en iterativ metod:

$$x_{n+1} = x_n - \frac{f(x_n)}{f'(x_n)}; \quad n = 0, 1, 2, \dots \quad (3.12)$$

och denna kallas för Newton-Raphsons metod. För att denna ska fungera väl bör inte $|f'|$ vara för litet, eftersom någon iteration då kan skickas långt bort. Ovanstående finns mer utförligt beskrivet i [3].

Newton-Raphsons metod kan även användas till att hitta extrempunkter till funktioner. Det man gör då är att sätta derivatan till 0 istället för funktionen själv. I fallet där man vill minimera en funktion F av flera variabler, utgår man från

$$x_{n+1} = x_n - (f'(x_n))^{-1} f(x_n) \quad (3.13)$$

där $f'(x_n)$ är en kvadratisk matris med de partiella andraderivatorna och $f(x_n)$ är en vektor med de partiella förstaderivatorna.

3.3 Minstakvadratanpassning

Antag att man har ett överbestämt ekvationssystem. Generellt finns ingen lösning som satisfierar systemet, utan man får försöka hitta en lösning approximativt. Givet en uppsättning data (x_i, y_i) , $i = 1, 2, \dots, m$ ansätter man en modellfunktion $F(x) \approx y$ som beror av ett antal parametrar $c_1, c_2, \dots, c_n$. Om ekvationssystemet är linjärt kan man skriva:

$$F(x) = c_1 f_1(x) + c_2 f_2(x) + \dots + c_n f_n(x) \quad (3.14)$$

där $f_1(x), f_2(x), \dots, f_n(x)$ är givna basfunktioner. Modellfunktionen $F(x)$ måste skrivas som en linjärkombination av basfunktionerna $f_1(x), f_2(x), \dots, f_n(x)$ vilka ska vara linjärt oberoende. Problemet är att bestämma parametrarna $c_1, c_2, \dots, c_n$ som minimerar summan av kvadraterna på avvikelserna $y_i - F(x_i)$, dvs minimerar uttrycket

$$Q(c_1, c_2, \dots, c_n) = \sum_{i=1}^m (y_i - F(x_i))^2 \quad (3.15)$$

Det linjära överbestämda ekvationssystemet kan skrivas på matrisform som $Ac \approx y$, där

$$A = \begin{pmatrix} f_1(x_1) & \cdots & f_n(x_1) \\ \vdots & & \vdots \\ f_1(x_m) & \cdots & f_n(x_m) \end{pmatrix}, \quad c = \begin{pmatrix} c_1 \\ \vdots \\ c_n \end{pmatrix}, \quad y = \begin{pmatrix} y_1 \\ \vdots \\ y_m \end{pmatrix}$$

Uttrycket (3.15) får nu utseendet $Q(c) = \|Ac - y\|_2^2$ och derivering med avseende på c ger:

$$\frac{dQ}{dc} = 2A^T (Ac - y) \quad (3.16)$$

Villkoret $\frac{dQ}{dc} = 0$ insatt i (3.16) ger:

$$A^T (Ac - y) = 0 \quad (3.17)$$

eller

$$A^T Ac = A^T y \quad (3.18)$$

Minstakvadratanpassning i fallet med linjärt ekvationssystem innebär att man erhåller parametrarna $c_1, c_2, \dots, c_n$ genom att lösa (3.18).

I fallet med icke linjär minstakvadratanpassning beror $F(x)$ icke linjärt på $c_1, c_2, \dots, c_n$, vilket betyder att man inte kan använda (3.18). En explicit formel kan inte bestämmas, men man kan använda Newton-Raphsons metod för att minimera $Q(c_1, c_2, \dots, c_n)$.

Man kan läsa mer om minstakvadratanpassning i [3].

4 Reaktionen i en lösning utan metalljoner

Vi börjar med att studera ett förenklat system som endast innehåller den nativa och denaturerade konfigurationen av protein. Proteinmolekylerna övergår från den ena konfigurationen till den andra enligt följande reaktioner:



Reaktionshastigheterna för (4.1) är $k_u[N]$ respektive $k_f[D]$. Koncentrationerna av de båda konfigurationerna varierar med tiden enligt följande system av differentialekvationer:

$$\begin{aligned} \frac{d[N]}{dt} &= -k_u[N] + k_f[D] \\ \frac{d[D]}{dt} &= k_u[N] - k_f[D] \end{aligned} \quad (4.2)$$

Ekvationerna är linjära, och kan därmed lösas analytiskt. Den karakteristiska ekvationen för systemet

$$\begin{vmatrix} -(k_u + \lambda) & k_f \\ k_u & -(k_f + \lambda) \end{vmatrix} = \lambda (\lambda + k_f + k_u) = 0 \quad (4.3)$$

har rötterna $\lambda = 0$ och $\lambda = -(k_f + k_u)$. Motsvarande egenvektorer blir då $v_1 = c_1 \begin{pmatrix} k_f \\ k_u \end{pmatrix}$ och $v_2 = c_2 \begin{pmatrix} 1 \\ -1 \end{pmatrix}$, där c_1 och c_2 är konstanter. Den allmänna lösningen till systemet är:

$$\begin{pmatrix} [N] \\ [D] \end{pmatrix} = c_1 \begin{pmatrix} k_f \\ k_u \end{pmatrix} + c_2 \begin{pmatrix} 1 \\ -1 \end{pmatrix} e^{-(k_f + k_u)t} \quad (4.4)$$

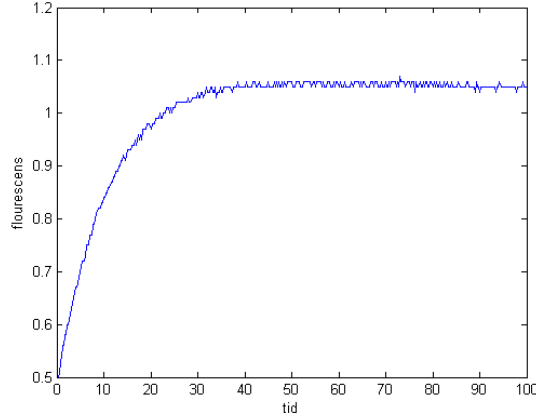


Figure 1: Mätdata över flouescensen i en lösning med endast proteinmolekyler vid 7,57 M urea.

Den andra termen i (4.4) försvinner då tiden går mot oändligheten, dvs

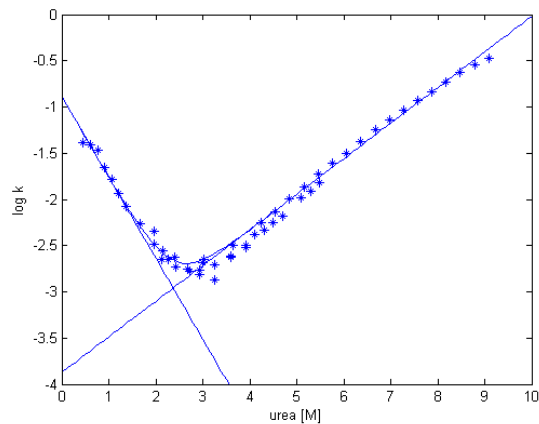
$$[N] \rightarrow c_1 k_f \quad (4.5)$$

$$[D] \rightarrow c_1 k_u \quad (4.6)$$

då $t \rightarrow \infty$.

Det man gör rent praktiskt är att mäta lösningens flouescens vid olika tidpunkter, se figur 1. Flouescensen kan vi skriva som $F = F_N[N] + F_D[D]$, där F_N och F_D är konstanter. Utifrån detta och ekvation (4.4) erhåller vi att $F = Be^{-kt} + C$, där $k = k_f + k_u$. Det är med andra ord rimligt att anpassa en exponentialfunktion till mätdata. På så sätt får man ut ett värde för exponenten $k = k_f + k_u$. Detta upprepas för olika koncentrationer av urea. Figur 2 visar en så kallad chevronplot där $\log_{10} k$ visas som en funktion av ureakoncentrationen. Vid låga koncentrationer av urea är k_f mycket större än k_u . Detta innebär att $\log_{10} k \approx \log_{10} k_f$ vid låga ureakoncentrationer. På motsvarande sätt är $\log_{10} k \approx \log_{10} k_u$ vid höga ureakoncentrationer. Både $\log_{10} k_f$ och $\log_{10} k_u$ antas vara linjära funktioner av urea. En anpassning till mätdata av bägge dessa linjära funktioner visas i figuren.

Ett system med väldigt hög koncentration av metalljoner kan anses vara förskjutet åt metallsidan, det vill säga lösningen innehåller nästan bara NM och DM . Med samma tillvägagångssätt som ovanstående kan vi alltså bestämma k_f^M och k_u^M .



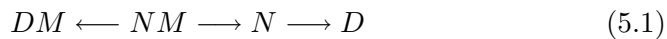
Figur 2: Chevronplot över de värden man fått fram för exponenten k i en lösning utan metalljoner och vid olika ureakoncentrationer, samt linjära anpassningar av $\log_{10} k_f$ och $\log_{10} k_u$.

5 Reaktioner vid hög ureakoncentration och med metalljoner i lösningen

För att kunna lösa systemet med metalljoner måste vi göra en del förenklingar. Man vet ganska säkert att vid hög koncentration av urea är både $DM \rightarrow NM$ och $D \rightarrow N$ väldigt långsamma eller näst intill obefintliga reaktioner. Detta innebär att om proteinet väl har denaturerat förblir det utvecklat. I praktiken sätter vi alltså k_f och k_f^M till 0. Vi är därför mest intresserade av vad som händer på den nativa sidan av systemet vid hög koncentration av urea.

5.1 Med kelator

Vi låter en kelator suga upp alla metalljoner som frigörs i lösningen. Detta medför att reaktionen $N + M \rightarrow NM$ inte längre inträffar och vi kan undersöka följande system av reaktioner:



Det bör nämnas att D och DM fortfarande reagerar med varandra, men att dessa reaktioner inte påverkar resultaten nämnvärt av följande analys. Vårt

system av differentialekvationer ser ut enligt:

$$\begin{aligned}\frac{d[NM]}{dt} &= -(k_{\text{diss}}^N + k_u^M) [NM] \\ \frac{d[N]}{dt} &= k_{\text{diss}}^N [NM] - k_u [N] \\ \frac{d([D] + [DM])}{dt} &= k_u [N] + k_u^M [NM]\end{aligned}\tag{5.2}$$

Detta är ett linjärt system och den karaktäristiska ekvationen för systemet blir

$$\begin{vmatrix} -(k_{\text{diss}}^N + k_u^M + \lambda) & 0 & 0 \\ k_{\text{diss}}^N & -(k_u + \lambda) & 0 \\ k_u^M & k_u & -\lambda \end{vmatrix} = \lambda (\lambda + k_{\text{diss}}^N + k_u^M) (\lambda + k_u) = 0\tag{5.3}$$

som har rötterna $\lambda = 0$, $\lambda = -k_u$ och $\lambda = -(k_{\text{diss}}^N + k_u^M)$. Motsvarande egenvektorer blir då

$$v_1 = c_1 \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 1 \end{pmatrix}, \quad v_2 = c_2 \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \\ -1 \end{pmatrix}, \quad v_3 = c_3 \begin{pmatrix} 1 \\ \frac{k_{\text{diss}}^N}{k_u - k_{\text{diss}}^N - k_u^M} \\ -\frac{1}{(k_{\text{diss}}^N + k_u^M)} \left(k_u^M + \frac{k_u k_{\text{diss}}^N}{k_u - k_{\text{diss}}^N - k_u^M} \right) \end{pmatrix}$$

där c_1 , c_2 och c_3 är konstanter. De analytiska lösningarna till systemet (5.2) är alltså:

$$\begin{aligned}[NM] &= c_3 e^{-(k_{\text{diss}}^N + k_u^M)t} \\ [N] &= c_2 e^{-k_u t} + c_3 \frac{k_{\text{diss}}^N}{k_u - k_{\text{diss}}^N - k_u^M} e^{-(k_{\text{diss}}^N + k_u^M)t} \\ [D] + [DM] &= c_1 - c_2 e^{-k_u t} \\ &\quad - \frac{c_3}{(k_{\text{diss}}^N + k_u^M)} \left(k_u^M + \frac{k_u k_{\text{diss}}^N}{k_u - k_{\text{diss}}^N - k_u^M} \right) e^{-(k_{\text{diss}}^N + k_u^M)t}\end{aligned}\tag{5.4}$$

Termerna som innehåller $e^{-k_u t}$ avtar snabbt, eftersom man vet att k_u är stor. Genom att anpassa en exponentialfunktion till den uppmätta fluorescensen får man ut ett värde på $k = k_{\text{diss}}^N + k_u^M$. Man kan anta att k_u^M (som är känd från experiment med hög metallkoncentration) är mycket mindre än k_{diss}^N , vilket betyder att mätningen i praktiken bestämmer ett värde på k_{diss}^N .

En annan ansats är att använda steady state-approximation. När NM övergår i N och M , suges metalljonen direkt upp av kelatorn och N övergår nästan omedelbart till D . Detta innebär att koncentrationen av N är väldigt låg och därmed är även variationen i dess koncentration liten. Steady state-approximation innebär att vi sätter $\frac{d[N]}{dt}$ till 0.

$$0 = \frac{d[N]}{dt} = k_{\text{diss}}^N [NM] - k_u [N] \Rightarrow [N] = \frac{k_{\text{diss}}^N [NM]}{k_u}\tag{5.5}$$

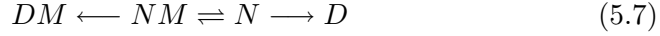
Detta sätts in i sista ekvationen i (5.2) :

$$\frac{d([D] + [DM])}{dt} = (k_{\text{diss}}^N + k_u^M) [NM] \Rightarrow [D] + [DM] = c_1 - c_3 e^{-(k_{\text{diss}}^N + k_u^M)t} \quad (5.6)$$

Som vi tidigare har påpekat avtar termerna som innehåller $e^{-k_u t}$ snabbt, vilket innebär att (5.6) är på samma form som sista ekvationen i (5.4). Detta innebär att även steady state-approximation leder till en anpassning av en exponentialfunktion som ger $k = k_{\text{diss}}^N + k_u^M$.

5.2 Utan kelator

Hur blir det om vi inte låter en kelator suga upp metalljonerna. Systemet med reaktioner ser istället ut enligt följande:



och systemet med differentialekvationer blir:

$$\begin{aligned} \frac{d[NM]}{dt} &= k_{\text{ass}}^N [N][M] - (k_{\text{diss}}^N + k_u^M) [NM] \\ \frac{d[N]}{dt} &= k_{\text{diss}}^N [NM] - (k_u + k_{\text{ass}}^N [M]) [N] \\ \frac{d([D] + [DM])}{dt} &= k_u [N] + k_u^M [NM] \end{aligned} \quad (5.8)$$

Detta är ett icke-linjärt system av differentialekvationer. Vi gör återigen approximationen att $\frac{d[N]}{dt}$ är 0 och får att:

$$0 = \frac{d[N]}{dt} = k_{\text{diss}}^N [NM] - (k_u + k_{\text{ass}}^N [M]) [N] \Rightarrow [N] = \frac{k_{\text{diss}}^N [NM]}{(k_u + k_{\text{ass}}^N [M])} \quad (5.9)$$

och

$$\frac{d[NM]}{dt} = \frac{k_{\text{ass}}^N k_{\text{diss}}^N [NM]}{k_u + k_{\text{ass}}^N [M]} [M] - (k_{\text{diss}}^N + k_u^M) [NM] \quad (5.10)$$

vilket kan förenklas till:

$$\frac{d[NM]}{dt} = -K[NM] \quad (5.11)$$

där

$$K = \left(\frac{k_{\text{diss}}^N k_u}{k_u + k_{\text{ass}}^N [M]} + k_u^M \right)$$

Det vi nu vill göra är att uttrycka $[M]$ i termer av $[NM]$. Antalet metalljoner, fria eller bundna till protein, ändras inte och därför antar vi att $[M] + [NM] + [DM]$ är konstant. Med andra ord:

$$[M] = M_{\text{tot}} - [NM] - [DM] \quad (5.12)$$

där M_{tot} är den totala metallkoncentrationen i lösningen. För att bestämma $[DM]$ måste vi göra ytterligare approximationer. Vi antar att reaktionerna mellan $D + M$ och DM går så snabbt att de i stort sett är i jämvikt hela tiden, dvs:

$$k_{diss}^D[DM] = k_{ass}^D[D][M] \quad (5.13)$$

Vi har tidigare antagit att $[N]$ är nära 0 och detta innebär att

$$[D] + [DM] = P - [NM] \quad (5.14)$$

där P är totala mängden protein. Utifrån sambanden (5.13) och (5.14) kan vi nu lösa ut $[M]$ som en funktion av enbart $[NM]$. Vi kan uttrycka $[DM]$ som

$$[DM] = P - [NM] - [D] \quad (5.15)$$

och därmed får vi att

$$[M] = M_{tot} - P + [D] \quad (5.16)$$

eller att

$$[D] = [M] - M_{tot} + P \quad (5.17)$$

Sätter vi in detta i (5.13) erhålles:

$$k_{diss}^D(M_{tot} - [NM] - [M]) = k_{ass}^D([M] - M_{tot} + P)[M] \quad (5.18)$$

Detta är en andragradsekvation för $[M]$

$$k_{ass}^D[M]^2 + (k_{diss}^D + k_{ass}^D(P - M_{tot}))[M] + k_{ass}^D([NM] - M_{tot}) = 0 \quad (5.19)$$

som har två lösningar. Produkten av rötterna bildar den konstanta termen i andragradsekvationen. Den totala metallkoncentrationen M_{tot} är alltid större eller lika stor som $[NM]$, vilket innebär att $[NM] - M_{tot} \leq 0$. Med andra ord måste en av rötterna till (5.19) vara negativ. Vi är endast intresserade av den positiva roten.

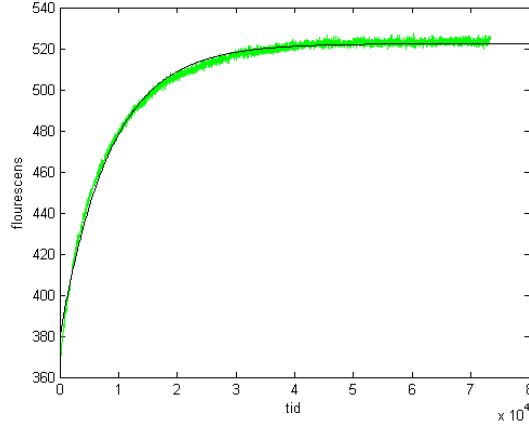
Nu har vi en differentialekvation för $[NM]$ (5.11) där $[M]$ kan skrivas som en funktion av $[NM]$. Högerledet blir dock allt för komplicerat för att man skulle vilja lösa det analytiskt. Istället väljer vi att göra ytterligare en approximation. Den enklaste approximationen är att ersätta högerledet mot

$$\frac{d[NM]}{dt} = -k[NM] \quad (5.20)$$

där k är en konstant. Detta är en linjär differentialekvation av första graden och kan därmed lösas analytiskt:

$$[NM] = Ae^{-kt} + C \quad (5.21)$$

Detta är troligen en rimlig approximation då lösningen innehåller hög koncentration av metalljoner. $[M]$ varierar inte särskilt mycket, vilket medför



Figur 3: Exempel på en exponentialanpassning till mätdata vid lika delar metall som protein och 7,4 M urea. Man ser en tydlig avvikelse av exponentialfunktionen från mätdata.

att K i (5.11) kan approximeras med en konstant. När systemet består av ungefär lika delar protein som metall varierar $[M]$ betydligt mer och approximationen fungerar sämre, se figur 3. En något bättre approximation borde vara att ansätta nämnaren i K som en linjär funktion av $[NM]$

$$\frac{d[NM]}{dt} = -\frac{1}{b + c[NM]}[NM] \quad (5.22)$$

Detta är en separabel differentialekvation och lösningen kan skrivas som en implicit funktion

$$\ln[NM] = \frac{1}{b}(-t + d) - \frac{c}{b}[NM] \quad (5.23)$$

där d är en konstant. Ett annat sätt att uttrycka (5.23) är:

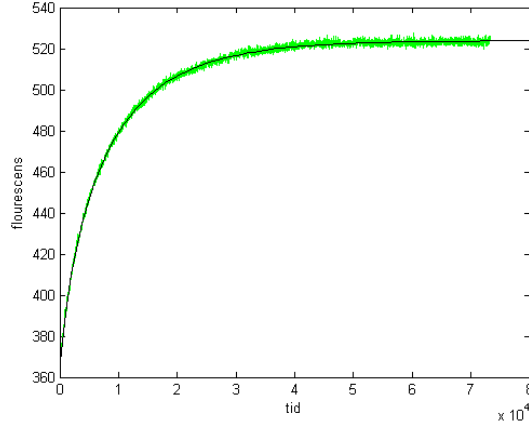
$$[NM] = Ae^{-kt - \frac{c}{b}[NM]} \quad (5.24)$$

Här är $k = \frac{1}{b}$. Man kan observera att k är värdet på faktorn $\frac{1}{b+c[NM]}$ när $[NM] = 0$. Detta borde i sin tur vara ungefär lika med värdet av K , där $[M]$ ges av (5.19) med $[NM] = 0$. Om vi antar att $[NM]$ är en linjär funktion av våra mätdata y , dvs $[NM] = sy + m$ får vi istället

$$y = Be^{-kt - ry} + C \quad (5.25)$$

där $B = \frac{Ae^{-\frac{cm}{b}}}{s}$, $r = \frac{cs}{b}$ och $C = -\frac{m}{s}$. Vi vill nu bestämma konstanterna B , C , r och k givet en serie mätdata. Detta görs genom att minimera uttrycket

$$F(B, C, r, k) = \sum_i \left(y_i - Be^{-kt_i - ry_i} - C \right)^2 \quad (5.26)$$



Figur 4: Exempel på mätdata med kurvanpassningen (5.25) vid 7,4 M urea samt lika delar protein som metall. Man ser att kurvan följer mätdata väldigt bra.

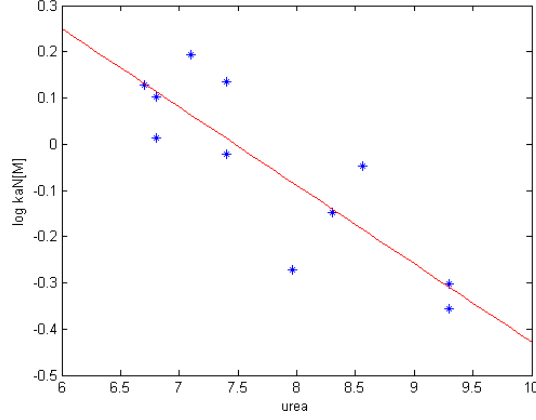
med hjälp av Newton-Raphsons metod. För att göra detta måste vi derivera (5.26) två gånger med avseende på variablerna B , k , r och C . Figur 4 visar mätdata när lösningen innehåller lika delar protein som metalljoner, samt vår kurvanpassning (5.25) till dessa.

Vi har att $k = \frac{k_{\text{diss}}^N k_u}{k_u + k_{\text{ass}}^N[M]} + k_u^M$ i vår anpassning (5.25) enligt (5.22) och (5.11) när $[NM] = 0$. Vi känner till k_{diss}^N , k_u och k_u^M sedan tidigare studier. Med andra ord kan vi bestämma ett uttryck för $k_{\text{ass}}^N[M]$, nämligen

$$k_{\text{ass}}^N[M] = \frac{k_{\text{diss}}^N k_u}{k - k_u^M} - k_u \quad (5.27)$$

Vi vet inte värdet på $[M]$, eftersom metallkoncentrationen beror av k_{ass}^D och k_{diss}^D vilka vi inte känner till. Vi kan dock erhålla en undre begränsning för k_{ass}^N genom att dividera högerledet i (5.27) med M_{tot} . Figur 5 visar värden för $k_{\text{ass}}^N[M]$ vid höga koncentrationer av urea.

Vi vill avgöra om ekvation (5.11) bäst anpassas av en exponentialfunktion (5.21) eller av vår kurvanpassning (5.25). För att göra detta kan vi försöka bestämma inom vilket intervall $\frac{1}{b+c[NM]}$ varierar under reaktionsförloppet. Om intervallet är litet, innebär det att den är mer eller mindre konstant, och då fungerar (5.21) bra. Om intervallet däremot är stort, betyder det att $[M]$ varierar mycket under reaktionsförloppet och (5.25) kanske passar lite bättre. En rimlig gissning borde vara att intervallen blir små när lösningen innehåller hög $[M]$ eller ingen alls. Vid låg metallkoncentration varierar $[M]$ mer vilket ger att K i (5.11) också varierar mer. Vi kan



Figur 5: Beräknade värden för $\log_{10} k_{\text{ass}}^N[M]$ vid låg metallkoncentration och höga koncentrationer av urea (vi fick två väldigt avvikande värden som vi tagit bort). Denna ser ut att variera kring 0 vilket betyder att $k_{\text{ass}}^N[M]$ varierar kring 1. Dividerar man sedan $k_{\text{ass}}^N[M] = 1$ med metallkoncentrationen 5×10^{-6} fås en undre begränsning för k_{ass}^N som blir 2×10^5 . Värden på parametrarna för den anpassade linjen finns i tabell 2.

uttrycka $\frac{1}{b+c[NM]}$ i termer av våra anpassade värden på C , r , k och y :

$$\frac{1}{b+c[NM]} = \frac{1}{b+c(sy+m)} = \frac{1}{\frac{1}{k} + \frac{r}{sk}(sy+m)} = \frac{k}{1+r(y-C)} \quad (5.28)$$

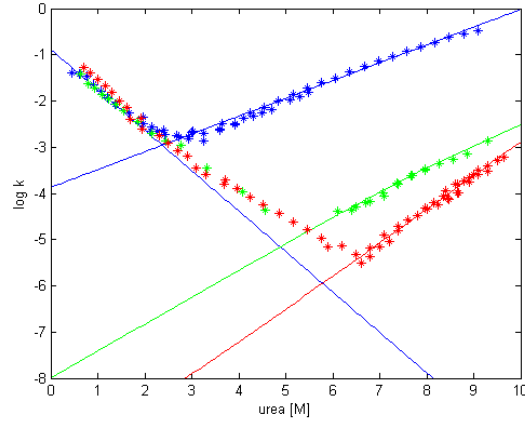
Ena intervallgränsen fås genom att sätta in värdet på y som svarar mot $t = 0$. När $t \rightarrow \infty$ går $[NM]$ mot 0, vilket innebär att den andra intervallgränsen blir k . Intervallgränserna kan användas i en variant av en chevron-plot, där man istället för punkter plottar intervall som visar mellan vilka gränser $\frac{1}{b+c[NM]}$ varierar. Figur 9, 10 och 11 visar sådana plottar för olika koncentrationer av metalljoner. I dessa kan man se att intervallen är långa för låg metallkoncentration och små för hög, vilket styrker vårt antagande ovan om att exponentialanpassning fungerar bra vid hög $[M]$ men sämre vid låg. Man kan även se att $\frac{1}{b+c[NM]}$ minskar med tiden, vilket borde vara rimligt eftersom $[M]$ ökar när $[NM]$ minskar.

Man kan kontrollera att den härledda modellen är rimlig genom att jämföra den med numeriska lösningar av systemet. Systemet (2.10) kan lösas numeriskt i Matlab om man ansätter värden på alla reaktionskonstanter, se tabell 2 och figur 7. Den numeriska lösningen kan behandlas som experimentella data, vilket betyder att vi kan göra kurvanpassningar (5.25) till numeriska data. Resultatet kan sedan jämföras med kurvanpassningar till experimentella mätdata, se figur 8. Figur 9, 10 och 11 visar anpassade samt simulerade intervallgränser. Den numeriska lösningen bekräftar även att $[N]$ är nära 0 under hela reaktionsförloppet, vilket styrker att steady

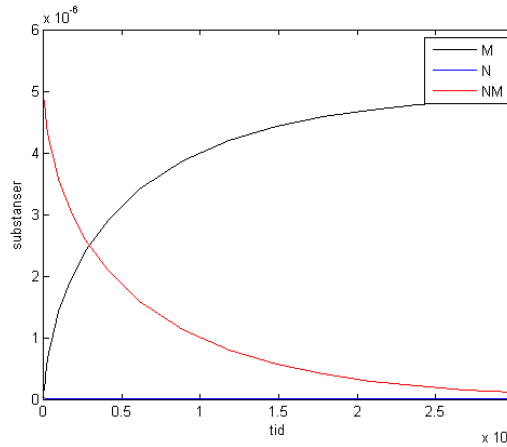
state-approximationen är rimlig att använda i vår analys.

k	m_1	m_2
k_{ass}^N	6.7047	-0.1697
k_{ass}^D	5.0000	0
k_{diss}^N	-4.5603	0.1952
k_{diss}^D	0	0
k_f	-0.8850	-0.8751
k_u	-3.8717	0.3854
k_f^M	-0.9649	-0.7343
k_u^M	-10.3050	0.7412
$k_{\text{ass}}^N[M]$	1.2682	-0.1697

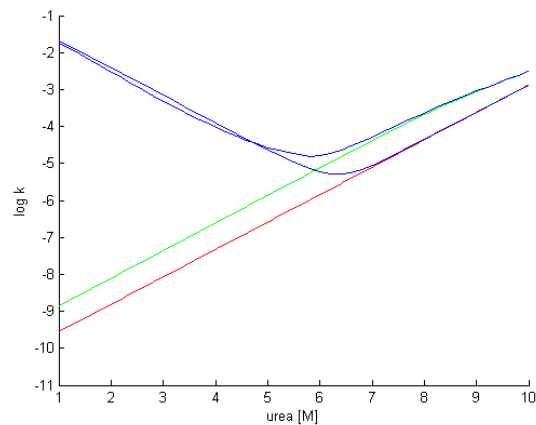
Tabell 2: Logaritmerna av reaktionskonstanterna beror linjärt på koncentrationen av urea: $\log_{10} k = m_1 + m_2[U]$. Värden på k_f , k_f^M , k_u , k_u^M och k_{diss}^N kommer från experimentella mätdata och kan därför anses som relativt säkra. Mätdata som användes för att bestämma k_{diss}^N tas inte upp i den här uppsatsen. Värden på k_{ass}^D och k_{diss}^D är rena gissningar och värdet på k_{ass}^N beror av dessa (vi använder värdet på $[M]$ från (5.19) när $[NM] = 0$ för att lösa ut k_{ass}^N ur $k_{\text{ass}}^N[M]$). I figur 5 ser man att punkterna för $k_{\text{ass}}^N[M]$ är ganska spridda kring den anpassade linjen, och därför är $k_{\text{ass}}^N[M]$ kanske mer känslig. I figur 6 har vi använt oss av andra värden på k_{ass}^N ($m_1 = 5.0$, $m_2 = 0$) för att få kurvorna att passa till data.



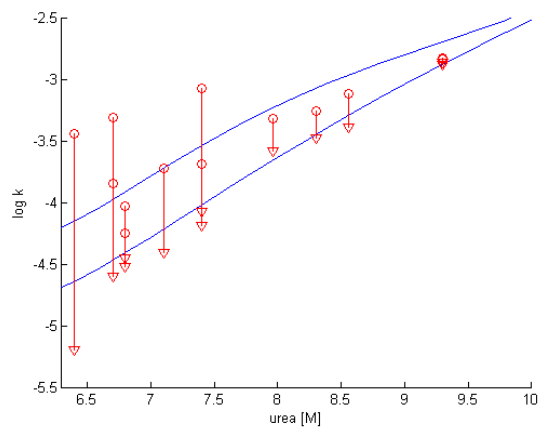
Figur 6: Chevronplot med k -värden från anpassning av exponentialfunktion. De översta punkterna är från en lösning som inte innehåller några metalljoner. De mittersta är från en lösning som består av lika delar protein som metalljoner och de understa från en med väldigt mycket metalljoner jämfört med protein. Linjerna som går genom de översta punkterna visar linjära anpassningar av $\log_{10} k_f$ och $\log_{10} k_u$. De andra linjerna visar K i (5.11) (med den metallkoncentration som fås av (5.19) när $[NM] = 0$) som en funktion av urea.



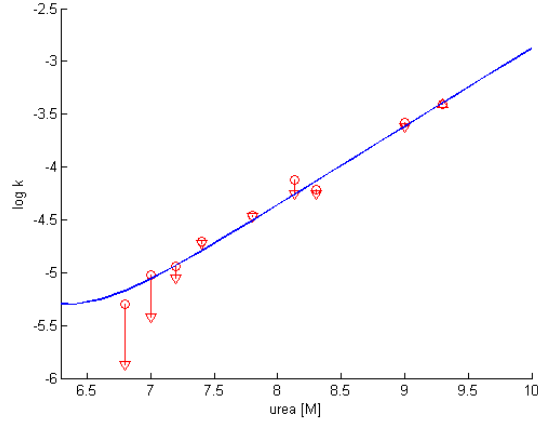
Figur 7: Numerisk lösning av $[N]$, $[NM]$ och $[M]$ i vårt ursprungliga system av differentialekvationer med värden på reaktionskonstanter från tabell 2 och 8 M urea.



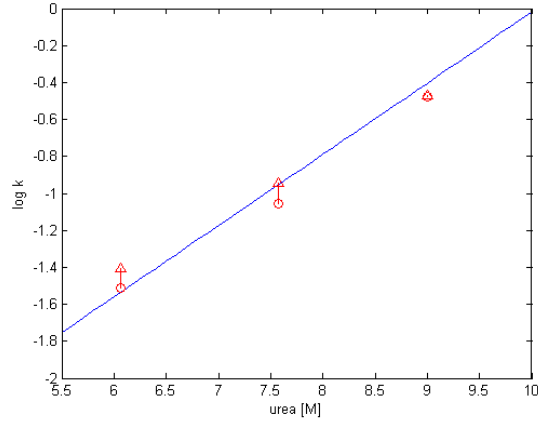
Figur 8: Jämförelse av numerisk och analytisk lösning av $\log_{10} k$ vid två olika metallkoncentrationer. Lösningarna avviker för låga ureakoncentrationer, vilket inte är konstigt eftersom den analytiska lösningen endast gäller för höga ureakoncentrationer.



Figur 9: Längden av pilarna visar inom vilka intervall $\frac{1}{b+c[NM]}$ varierar och riktingen om den ökar eller minskar, när vi har lika andel protein som metall. Kurvorna visar motsvarande simulerade intervall.



Figur 10: Längden av pilarna visar inom vilka intervall $\frac{1}{b+c[NM]}$ varierar och riktingen om den ökar eller minskar, när vi har hög koncentration av metalljoner. Vi har klippt bort en del av mätdata då dessa sett konstiga ut, se figur 12 som ett exempel. De flesta intervallen är små utom de två första, vilket kan bero på mätfel eller liknande. Kurvorna visar motsvarande simulerade intervall.



Figur 11: Längden av pilarna visar inom vilka intervall koefficienten i (5.22) ligger och riktingen om den ökar eller minskar, när vi har rent protein. De två första intervallen ser långa ut, men är ändå små om man jämför med figur 9. Dessa ökar dessutom, vilket inte är fallet i figur 9 och 10.

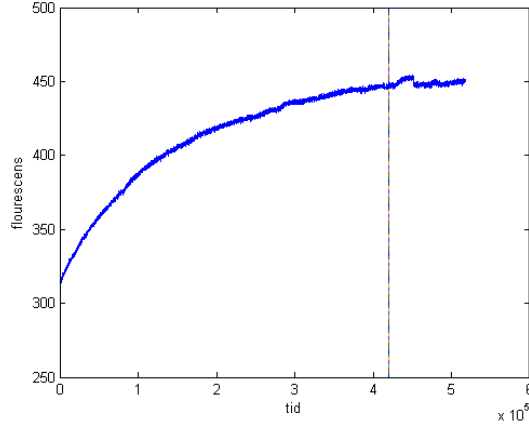


Figure 12: Ett exempel på mätdata som vi klippt bort värden på slutet efter den lodräta linjen.

6 Slutledning

Vi har kommit fram till följande modell som beskriver reaktionsförloppet för $[NM]$:

$$\frac{d[NM]}{dt} = - \left(\frac{k_{\text{diss}}^N k_u}{k_u + k_{\text{ass}}^N [M]} + k_u^M \right) [NM] \quad (6.1)$$

Vi har behandlat fyra fall:

1. En lösning utan metalljoner
2. En lösning med metalljoner och kelator
3. En lösning med låg koncentration av metalljoner
4. En lösning med hög koncentration av metalljoner

Det andra fallet innebär att det inte finns några fria metalljoner i lösningen. Med andra ord är $[M] = 0$ och ekvationen (6.1) reduceras till

$$\frac{d[NM]}{dt} = - (k_{\text{diss}}^N + k_u^M) [NM] \quad (6.2)$$

Detta är samma resultat som vi fick i avsnitt 5.1, vilket ger en indikation på att modellen är rimlig. I det sista fallet är $[M]$ väldigt stor, vilket medför att $\frac{k_{\text{diss}}^N k_u}{k_u + k_{\text{ass}}^N [M]}$ är väldigt liten i jämförelse med k_u^M . Detta innebär att (6.1) blir

$$\frac{d[NM]}{dt} \approx -k_u^M [NM] \quad (6.3)$$

vilket stämmer överens med vårt antagande i slutet av avsnitt 4 att vid hög metallkoncentration kan vi behandla ett system med bara NM och DM . Vi

kan alltså använda exponentialfunktioner för att beskriva reaktionsförloppet vid hög metallkoncentration. Bägge dessa fall ger en indikation på att modellen (6.1) stämmer bra även för fall tre, dvs vid låg metallkoncentration. Här kan vi inte förenkla (6.1).

Vi har jämfört experimentella mätdata, analytiska och numeriska lösningar av systemet (2.10) och alla tre stämmer bra överens om man väljer värden på reaktionskonstanterna enligt tabell 2.

I figur 6 och 9 har värdet på k_{ass}^N anpassats så att den analytiska och den numeriska kurvan passar så bra som möjligt till experimentella data. Vi fick två värden som skiljer sig något beroende på om en exponentialfunktion (figur 6) eller vår förfinade modell (figur 9) användes. I fallet med hög metallkoncentration spelade det ingen roll vilket värde vi valde för k_{ass}^N , medan det blev skillnader i fallet med låg. Detta ger en antydning på att vi borde använda oss utav den förfinade modellen (5.25) i stället för vanlig exponentialanpassning vid låg metallkoncentration. Vi fick fram en undre begränsning för k_{ass}^N , och båda de värden vi använt oss utav är större eller åtminstone i samma storleksordning som denna begränsning.

Vi har i denna uppsats kunnat bestämma reaktionskonstanterna k_f , k_u , k_f^M , k_u^M och k_{diss}^N samt fått en undre begränsning på k_{ass}^N . Vi har inte kunnat säga någonting om k_{ass}^D eller k_{diss}^D .

Referenser

- [1] H.Gutfreund, Kinetics for the life science: receptors, transmitters and catalysts, Cambridge University Press, 1995
- [2] G.F.Simmons, S.G.Krantz, Differential Equations: Theory, Technique and Practice, McGraw-Hill, 2007
- [3] P.Pohl, Grunderna i numeriska metoder, NADA KTH, 1995
- [4] F.Rousseau, J.Schymkowitz, M.Oliveberg, ALS precursor finally shaken into fibrils, PNAS, 2008, vol 105, no 48, sid 18649–18650
- [5] M.Oliveberg, ALS ger kunskap om alzheimer och parkinson, Forskning och Framsteg, 6/06, sid 54–59

APPENDIX

A Matlabkod

Följande Matlabkod beskriver minstakvadratanpassningen (5.26) med Newton-Raphsons metod:

```
function x = kurvanp(t,y,id)
% x = kurvanp(t,y,id)
% Anpassar koefficienterna i  $y = B e^{(-kt-ry)} + C$ 

%skalar y och t för att undvika illakonditionerade matriser
sy=std(y);
st=std(t);
y=y./sy;
t=t/st;

% startgissning, värden från anpassning av en exponentialfunktion
f=expanp(t,y);
B=f(1); k=f(2); C=f(3);
r=0;
x = [B;r;k;C];
dx = x;
maxiter=100;
i=0;

while any(abs(dx) > 1e-6*(1+abs(x))) & i<maxiter
    [first,second] = derivata(x,t,y);
    dx = second\first;
    step = 1;
    h = summa(x,t,y);
    hnew = summa(x-dx, t, y);
    while hnew > h
        step = 0.5*step;
        hnew = summa(x-step*dx, t, y);
    end
    x = x - step*dx;
    i=i+1;
    %fprintf(1, '%i \t%f \t%f\n', i, norm(dx), step);
end;

%Kontrollerar konvergens
if i==maxiter
    if nargin < 3
```

```

        warning('Konvergerar ej');
    else
        warning(sprintf('Kurvan %i konvergerar ej', id));
    end
end

x(1)=x(1)*sy; %B
x(2)=x(2)/sy; %r
x(3)=x(3)/st; %k
x(4)=x(4)*sy; %C

```

```

function h = summa(x,t,y)
h=sum((y - x(1)*exp(-x(3)*t - x(2)*y) - x(4)).^2);

```

```

function [first,second] = derivata(x,t,y)
B=x(1); C=x(4); r=x(2); k=x(3);
e = exp(-k*t -r*y);
v = (y - B*e -C);
u = y-2*B*e -C;
first = zeros(4,1);
second = zeros(4,4);
first(1) = -2 *sum(e .* v);
first(2) = 2 * sum(B * y.*e.*v);
first(3) = 2* sum(B * t.*e.*v);
first(4) = -2* sum(v);
second(1,1) = 2* sum(e.^2);
second(1,2) = 2 *sum(y.*e.*u);
second(1,3) = 2*sum(t.*e.*u);
second(1,4) = 2*sum(e);
second(2,1) = second(1,2);
second(2,2) = -2*sum(B*y.^2.*e.*u);
second(2,3) = -2*sum(B*y.*t.*e.*u);
second(2,4) = -2*sum(B*y.*e);
second(3,1) = second(1,3);
second(3,2) = second(2,3);
second(3,3) = -2*sum(B*t.^2.*e.*u);
second(3,4) = -2*sum(B*t.*e);
second(4,1) = second(1,4);
second(4,2) = second(2,4);
second(4,3) = second(3,4);
second(4,4) = 2 *length(t);

```

Exponentialanpassningen med Newton-Raphsons metod:

```

function x = expanp(t,y)

```

```

%x=expap(t,y)
%Anpassar koefficienterna i  $y = Be^{(-kt)} + C$ 

% startgissning
n = length(t);
I = ceil(0.75*n):n;
J = 1:floor(ceil(0.1*n));
C = mean(y(I));
k = (mean(y(J)) - C)/sum(diff(t).*(y(1:end-1) - C));
B = (mean(y(J)) - C)*exp(mean(t(J))*k);

x = [B;k;C];
dx = x;
i=0;

while any(abs(dx) > 1e-6*(1+abs(x))) & i<100
    [first,second] = derivata(x,t,y);
    dx = second\first;
    step = 1;
    h = summa(x,t,y);
    hnew = summa(x-dx, t, y);
    while hnew > h
        step = 0.5*step;
        hnew = summa(x-step*dx, t, y);
    end
    x = x - step*dx;
    i=i+1;
    fprintf(1, '%i \t%f \t%f\n', i, norm(dx), step);
end;

function h = summa(x,t,y)
h=sum((y - (x(1)*exp(-x(2)*t) + x(3))).^2);

function [first,second] = derivata(x,t,y)
B=x(1); k=x(2);C=x(3);
e = exp(-k*t );
first = zeros(3,1);
second = zeros(3,3);
e = exp(-k*t);
v = (y - B*e -C);
u = y-2*B*e -C;
first = zeros(3,1);
second = zeros(3,3);

```

```

first(1) = -2 *sum(e .* v);
first(2) = 2* sum(B * t.*e.*v);
first(3) = -2* sum(v);
second(1,1) = 2* sum(e.^2);
second(1,2) = 2*sum(t.*e.*u);
second(1,3) = 2*sum(e);
second(2,1) = second(1,2);
second(2,2) = -2*sum(B*t.^2.*e.*u);
second(2,3) = -2*sum(B*t.*e);
second(3,1) = second(1,3);
second(3,2) = second(2,3);
second(3,3) = 2 *length(t);

```

Nedanstående kod genererar den numeriska lösningen till systemet (2.10):

```

function [T,U] = prot2(Ustart,urea,tid)

fanonym = @(t,u) func3(t, u, urea);
[T,U]=ode23s(fanonym,[0,tid],Ustart,odeset('AbsTol', 1e-8));

function f = func3(t,u,urea)

kan=kanf(urea);
kad=kanf(urea);
kdn=kdnf(urea);
kdd=kddf(urea);
kf=kff(urea);
ku=kuf(urea);
kfm=kfmf(urea);
kum=kumf(urea);

f=[ kdn*u(4)+kdd*u(5)-kan*u(1)*u(2)-kad*u(1)*u(3);
    kdn*u(4)+kf*u(3)-kan*u(1)*u(2)-ku*u(2);
    kdd*u(5)+ku*u(2)-kad*u(1)*u(3)-kf*u(3);
    kan*u(1)*u(2)+kfm*u(5)-kdn*u(4)-kum*u(4);
    kad*u(1)*u(3)+kum*u(4)-kdd*u(5)-kfm*u(5) ];

```