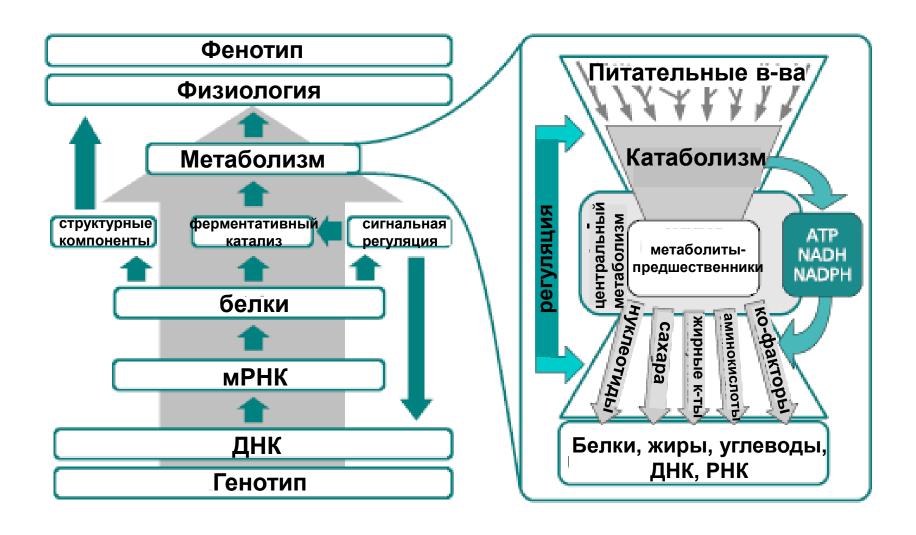
# Моделирование метаболических путей

Метаболи́зм (от греч. μεταβολή — «превращение, изменение»), — набор химических реакций, которые протекают в живом организме и способствуют поддержанию жизни.

**Метаболический путь** – совокупность метаболических реакций

Метаболиты – субстраты и продукты, участвующие в реакциях

# Организация клеточного метаболизма



# Цели и задачи метаболического моделирования

#### Научные задачи:

- •исследование механизмов клеточной регуляции
- •объяснение экспериментально установленных фактов
- •предсказание новых ещё не выявленных внутриклеточных явлений
- •систематизация накопленных экспериментальных данных

#### Биоинженерные задачи:

- •получение необходимых веществ из бактериальных клеток и других организмов
  - -разработка новых лекарств
  - -получение биотоплива
- •разработка новых штаммов с наперед заданными свойствами

#### Уровни исследования метаболических реакций

In silico In vitro In vivo

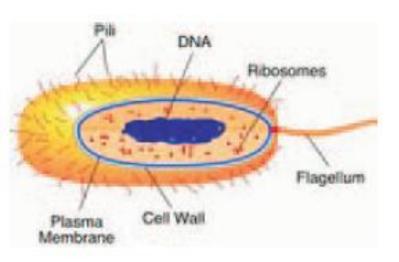
свойства отдельных метаболитов и их динамика

описание характеристик метаболизма клетки в целом

построение «электронной клетки»

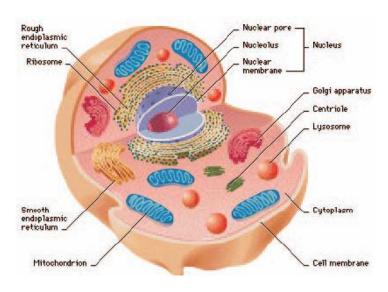
#### Разные уровни сложности организации клеток

#### Клетка прокариот



Все процессы протекают в одном компартменте

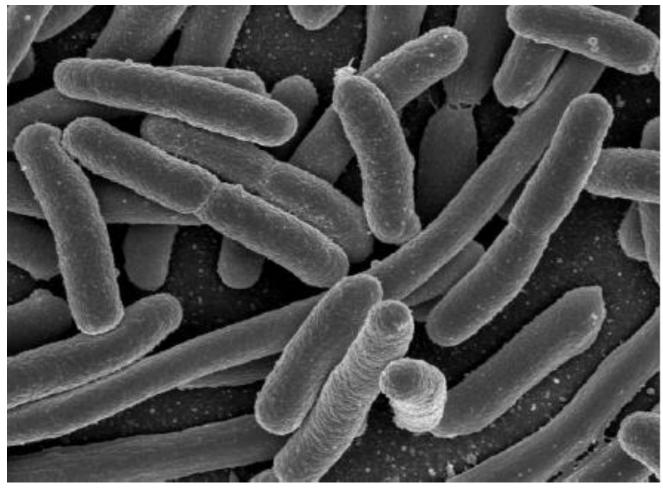
#### Клетка эукариот



Клеточные процессы локализованы в разных компартментах

Первые модели – модели клеток прокариот

#### Escherichia coli



http://www3.niaid.nih.gov/NR/rdonlyres/49477C30-0513-47BE-88FC-17974CB1F952/0/e\_coli.jpg)

Escherichia coli – удобный объект для моделирования клеточного метаболизма

## Метаболические пути Escherichia coli

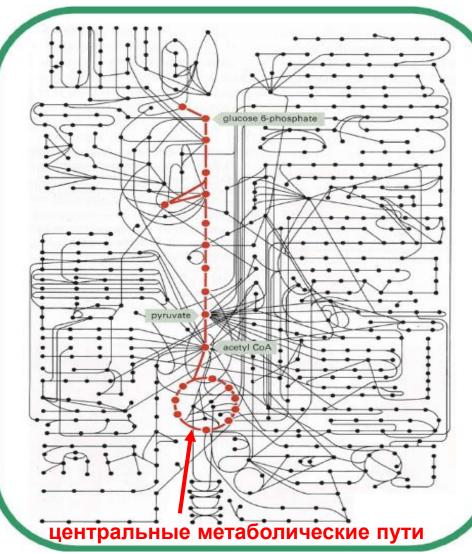


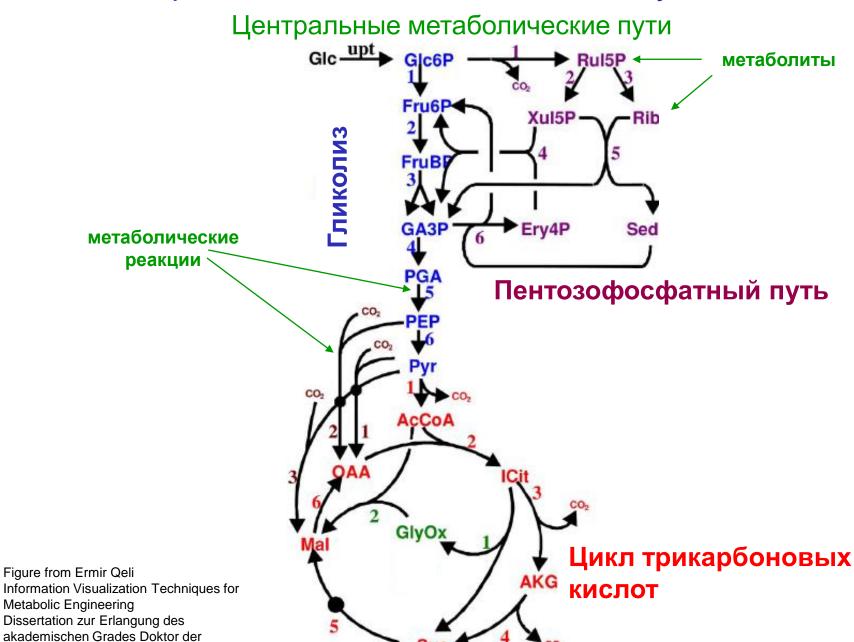
Figure from Ermir Qeli Information Visualization Techniques for Metabolic Engineering Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

- > 800 метаболических процессов
- > 400 метаболитов
- > 500 ферментов

# Описание метаболизма включает:

- •потребление необходимых для роста веществ из среды (мембранные транспортные процессы)
- •центральные катаболические пути
- •биосинтетические пути (продукция всех компонент биомассы)

#### Представление метаболических путей



Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

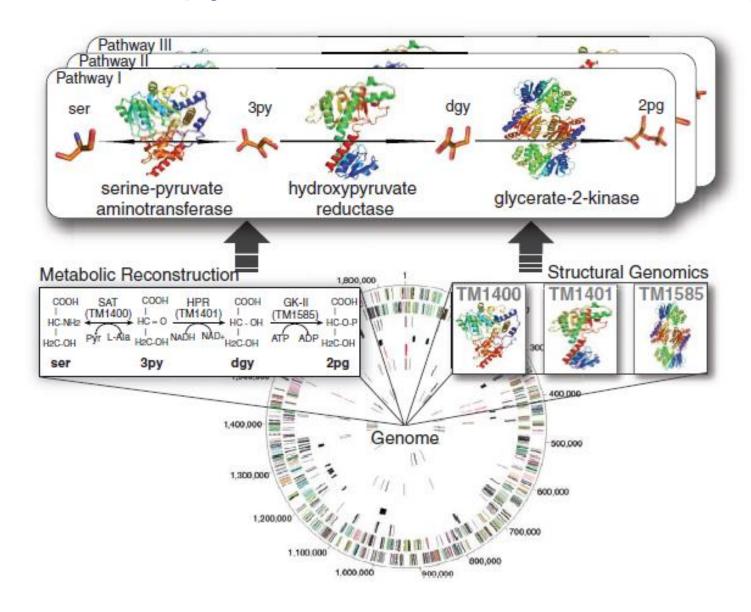
# Построение метаболической модели:

реконструкция метаболических путей: построение общей схемы метаболических путей

#### математическое описание:

вывод уравнений скорости и построение системы уравнений в соответствии с метаболической картой

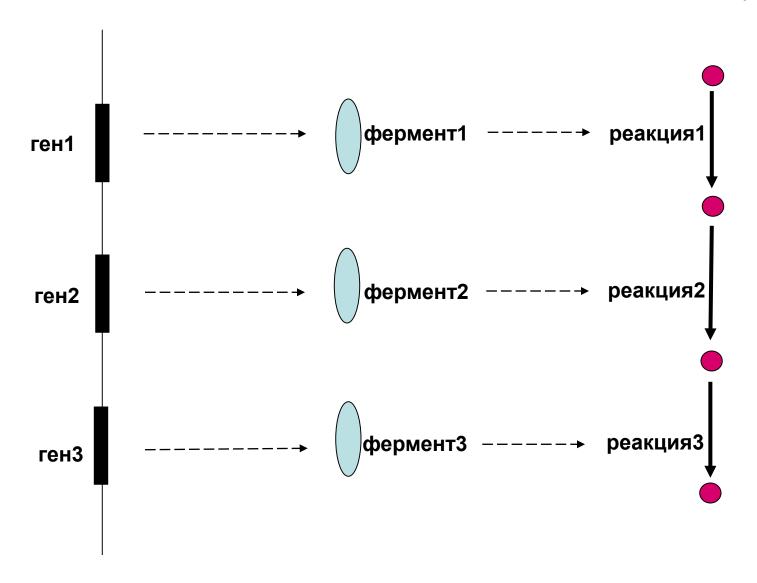
# Реконструкция метаболических путей



**Геном** (совокупность генов)

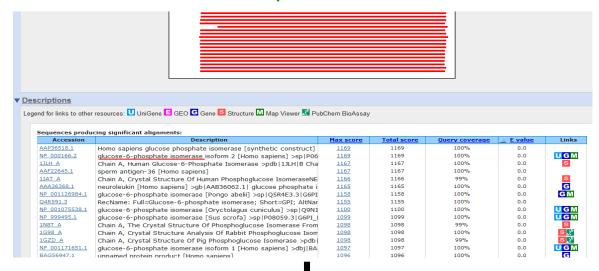
Протеом (совокупность белков)

Метаболом (совокупность метаболических реакций)



Пример аминокислотной последовательности маантерратем манитерратем ма RERMFNGEKINYTEGRAVLHVALRNRSNTPILVDGKDVMPEVNKVLDKMKSFCQRVRSGDWKGYTGKTITDVINIGIGGSD LGPLMVTEALKPYSSGGPRVWYVSNIDGTHIAKTLAQLNPESSLFIIASKTFTTQETITNAETAKEWFLQAAKDPSAVA KHFVALSTNTTKVKEFGIDPQNMFEFWDWVGGRYSLWSAIGLSIALHVGFDNFEQLLSGAHWMDQHFRTTPLEKNAPVLL ALLGIWYINCFGCETHAMLPYDQYLHRFAAYFQQGDMESNGKYITKSGTRVDHQTGPIVWGEPGTNGQHAFYQLIHQGT KMIPCDFLIPVQTQHPIRKGLHHKILLANFLAQTEALMRGKSTEEARKELQAAGKSPEDLERLLPHKVFEGNRPTNSIVFT KLTPFMLGALVAMYEHKIFVQGIIWDINSFDQWGVELGKQLAKKIEPELDGSAQVTSHDASTNGLINFIKQQREARVQ

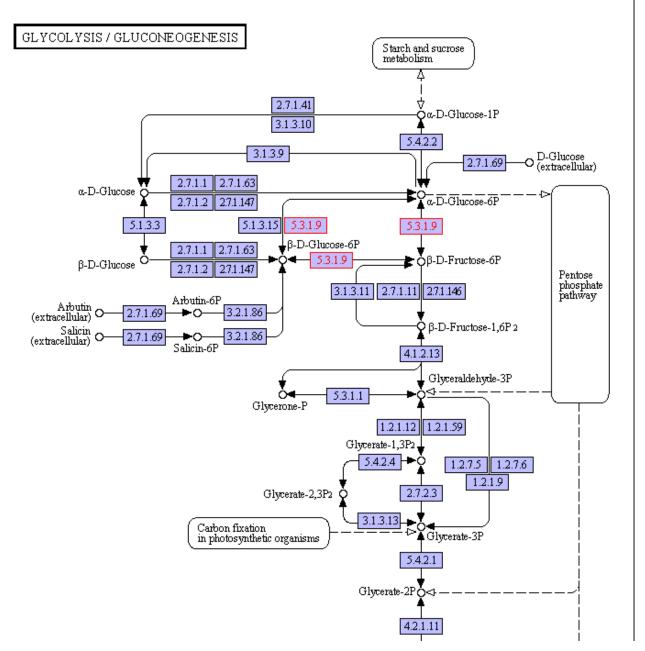
#### BLAST База данных по сравнению последовательностей



фермент, соответствующий выбранной последовательности

glucose-6-phosphate isomerase

реакция, катализируемая ферментом определение всех реакций метаболического пути





Search ENZYME

▼ for glucose-6-phosphate isomerase

Go

Clear

Database: ENZYME - Search term: glucose-6-phosphate isomerase (Total 1 hit)

5.3.1.9

glucose-6-phosphate isomerase; phosphohexose isomerase; phosphohexomutase; oxoisomerase; hexosephosphate isomerase; phosphosaccharomutase; phosphoglucoisomerase; phosphohexoisomerase; phosphoglucose isomerase; glucose phosphate isomerase; hexose pho • • •

DBGET integrated database retrieval system

Help

ENZYME: 5.3.1.9

	· ioib					
Entry	EC 5.3.1.9 Enzyme					
Name	glucose-6-phosphate isomerase;					
	phosphohexose isomerase;					
	phosphohexomutase;					
	oxoisomerase;					
	hexosephosphate isomerase;					
	phosphosaccharomutase;					
	phosphoglucoisomerase;					
	phosphohexoisomerase; phosphoglucose isomerase;					
	phosphoglucose isomerase; glucose phosphate isomerase;					
	hexose phosphate isomerase;					
	D-glucose-6-phosphate ketol-isomerase					
Class	Isomerases:					
CIASS	Intramolecular oxidoreductases:					
	Intramolecular oxidoreductases; Interconverting aldoses and ketoses, and related compounds					
	(BRITE hierarchy)					
-						
Sysname	D-glucose-6-phosphate aldose-ketose-isomerase					
	D-glucose 6-phosphate = D-fructose 6-phosphate [RN:R00771]					
Reaction (KEGG)	R00771 > R02740 R03321;					
	(other) R02739					
	Show all					
Substrate	D-glucose 6-phosphate [CPD:C00092]					
Product	D-fructose 6-phosphate [CPD:C00085]					
Comment	Also catalyses the anomerization of D-glucose 6-phosphate.					
Pathway	ec00010 Glycolysis / Gluconeogenesis					
	ec00030 Pentose phosphate pathway					
	ec00500 Starch and sucrose metabolism					
	ec00520 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism					
	ec01100 Metabolic pathways					
	ec01110 Biosynthesis of secondary metabolites					
	ec01120 Microbial metabolism in diverse environments					
Orthology	K01810 glucose-6-phosphate isomerase					
	K06859 glucose-6-phosphate isomerase, archaeal					
	K13810 transaldolase / glucose-6-phosphate isomerase					
Genes	HSA: 2821(GPI)					
	PTR: 455941(GPI)					
	PON: 100174006 (GPI)					
	Mcc. 717980					

```
All links
Ontology (5)
   KEGG BRITE (5)
Pathway (8421)
  KEGG PATHWAY (5587)
   KEGG MODULE (2834)
Disease (1)
   OMIM (1)
Chemical substance (5)
  KEGG COMPOUND (5)
Chemical reaction (14)
  KEGG ENZYME (1)
  KEGG REACTION (5)
  KEGG RPAIR (4)
  KEGG RCLASS (4)
   KEGG GENOME (3)
Gene (2209)
  KEGG ORTHOLOGY (3)
  KEGG GENES (1494)
  KEGG DGENES (27)
   KEGG EGENES (450)
   KEGG MGENES (235)
Protein sequence (6112)
  UniProt (3930)
  PRF (180)
  RefSeg(pep) (1868)
  PDBSTR (126)
   PMD (8)
DNA sequence (4921)
  RefSeg(nuc) (1843)
   GenBank (1541)
   EMBL (1537)
3D Structure (64)
   PDB (64)
Protein domain (11)
  InterPro (7)
   Pfam (3)
   PROSITE (DOC) (1)
Literature (5)
   PubMed (5)
Engyme (4)
  BRENDA (1)
   EXPASY-ENZYME (1)
  EXPLORENZ (1)
  IUBMB (1)
All databases (21775)
```

Help

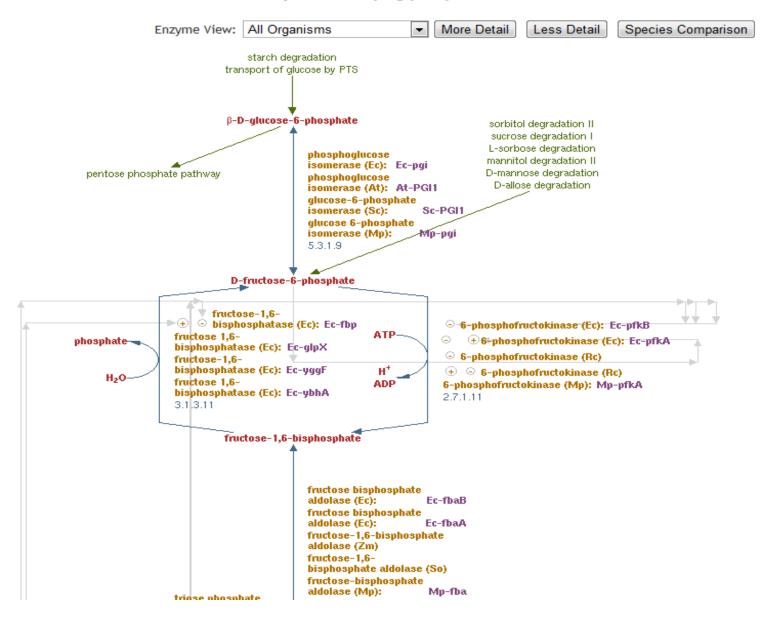
# KEGG

#### REACTION: R00771

Entry	R00771 Reaction						
Name	D-glucose-6-phosphate aldose-ketose-isomerase						
Definition	D-Glucose 6-phosphate <=> D-Fructose 6-phosphate						
Equation	C00092 <=> C00085						
	HO-P-O HO OH HO OH OH HO OH C00085						
RPair	RP01093 C00085_C00092 main						
Enzyme	5.3.1.9						

#### MetaCyc База данных по метаболическим путям

#### MetaCyc Pathway: glycolysis I



#### BRENDA База данных по белкам

#### http://www.brenda-enzymes.info/index.php4



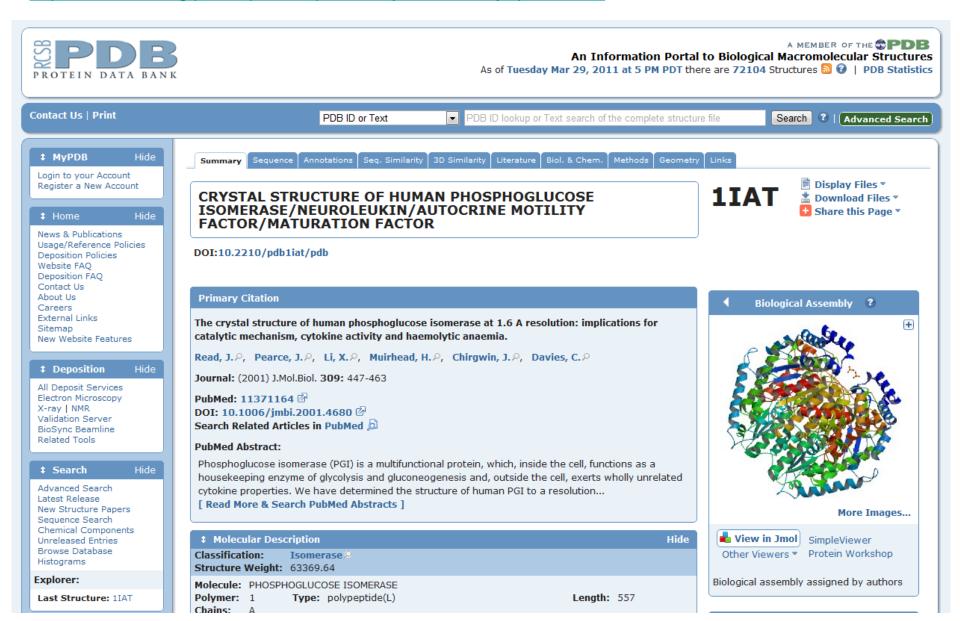
#### BRENDA База данных по белкам

#### http://www.brenda-enzymes.info/index.php4

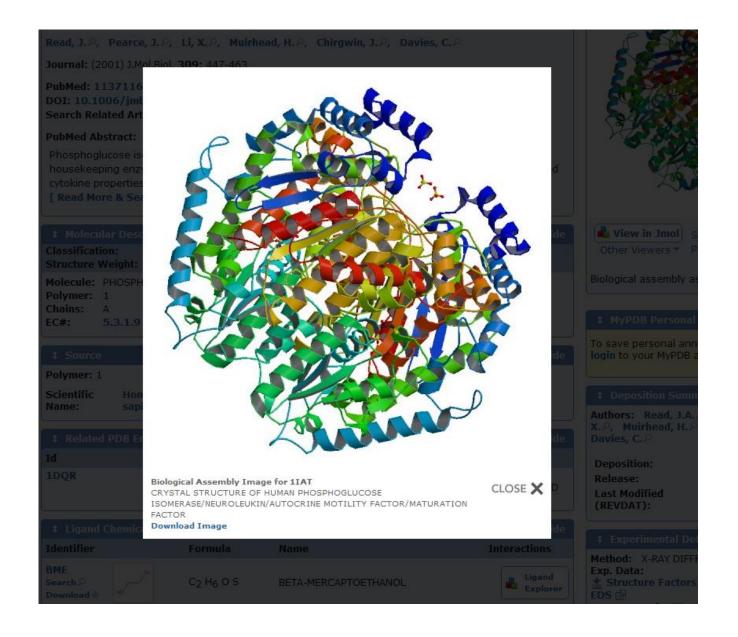


#### PDB База данных по структуре белков

http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?job=summary&pdbld=1iat



## PDB База данных по структуре белков



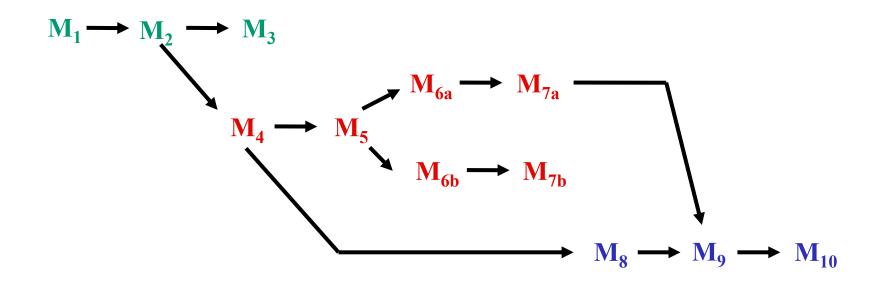
# Теоретические подходы и концепции метаболического моделирования

#### Классический системный подход

- 1. выделить элементарные единицы системы
- 2. охарактеризовать все значимые взаимодействия между единицами
- 3. организовать единицы как иерархию взаимодействующих модулей
- 4. описать состояние каждой единицы и каждого взаимодействия количественно

# Эволюция метаболической модели

- 1. Метаболическая реакция добавляется, убирается или заменяется на другую.
- 2. Механизм реакции усложняется, упрощается, заменяется другим.
- 3. Неизвестные кинетические параметры оцениваются с помощью фитирования.



# Представление скорости реакции

#### В соответствии с законом действующих масс

(скорость реакции пропорциональна вероятности столкновения реагентов, а вероятность в свою очередь пропорциональна концентрации реагентов с учетом молекулярности реакции)

$$S_1 + S_2 \xrightarrow{k_1} 2P$$

$$v = k_1 S_1 S_2 - k_{-1} P^2 = v_+ - v_-$$

V - общая скорость реакции  $V_{+}$  - скорость прямой реакции  $V_{-}$  - скорость обратной реакции

В общем виде:

$$v = v_{+} - v_{-} = k_{+} \prod_{i} S_{i}^{m_{i}} - k_{-} \prod_{j} P_{j}^{m_{j}}$$

 $m_i$  и  $m_j$  соответсвуют молекулярности  $S_i$  и  $P_j$ 

Скорость реакции может быть выражена как через **концентрации** реагирующих веществ, так и в виде баланса **скоростей** прямых и обратных реакций.

# Типы метаболических моделей

#### кинетические модели – системы ОДУ

- (~10-50 уравнений, ~100-500 параметров)
- переменная модели метаболит
- описание отдельных метаболических путей
- решение модели динамическое поведение метаболитов во времени

# **стехиометрические (потоковые) модели** — системы линейных алгебраических уравнений

- (~100-1000 уравнений)
- переменная модели метаболический поток
- описание метаболизма целой клетки
- решение модели стационарное распределение метаболических потоков

# Стехиометрические коэффициенты

Стехиометрические коэффициенты обозначают пропорции субстратов и продуктов, участвующих в реакции.

Пример: 
$$S_1 + S_2 \xrightarrow{v} 2P$$

Стехиометрические коэффициенты для  $S_1$   $S_2$  и P: -1, -1 и 2.

Набор стехиометрических коэффициентов не единственен:

если считать, что для получения одного моля используется по половине моля каждого субстрата  $S_1$  и  $S_2$ , можно записать: -1/2, -1/2 и 1;

или если изменить направление реакции, тогда можно записать: 1,1 и -2.

# ОДУ для одной и нескольких реакций

для реакции

$$S_1 + S_2 \xrightarrow{v} 2P$$

 $v = v_+ - v_-$ 

имеем ОДУ:

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{dS_2}{dt} = -v$$

$$\frac{dP}{dt} = 2v$$

убыль субстрата S<sub>1</sub> со скоростью *v* сопровождается убылью субстрата S<sub>2</sub> с той же скоростью и удвоенной скоростью увеличения концентрации продукта Р

$$\frac{dS_i}{dt} = \sum_{j=1}^r n_{ij} v_j$$

 $n_{ij}$  — стехиометрические коэффициенты метаболита i в реакции j i=1,...,m

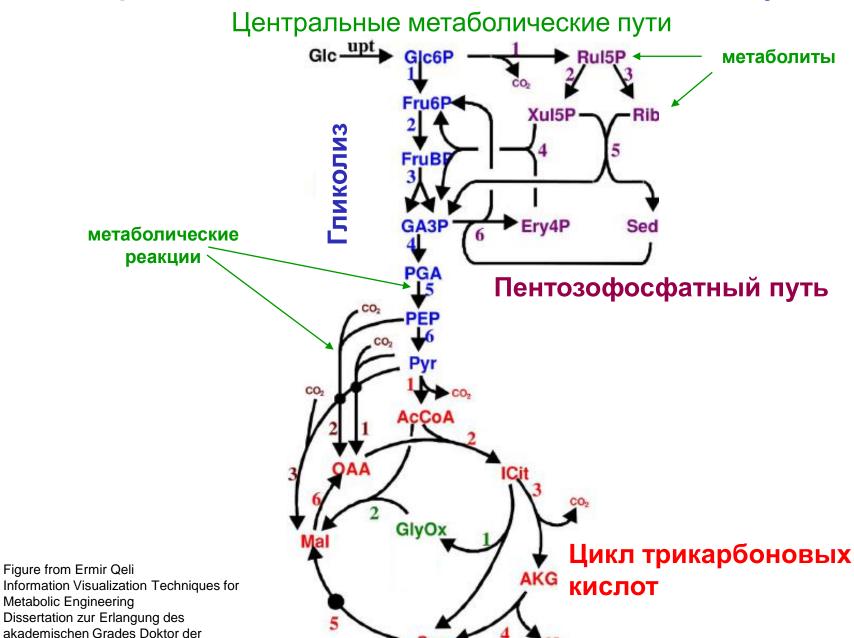
Для метаболической сети, состоящей из *m* метаболитов и *r* реакций, динамика системы описывается системой *m* уравнений.

Уравнения наз. уравнениями баланса, поскольку рассматривается баланс между синтезом и распадом метаболита:

# Кинетические модели

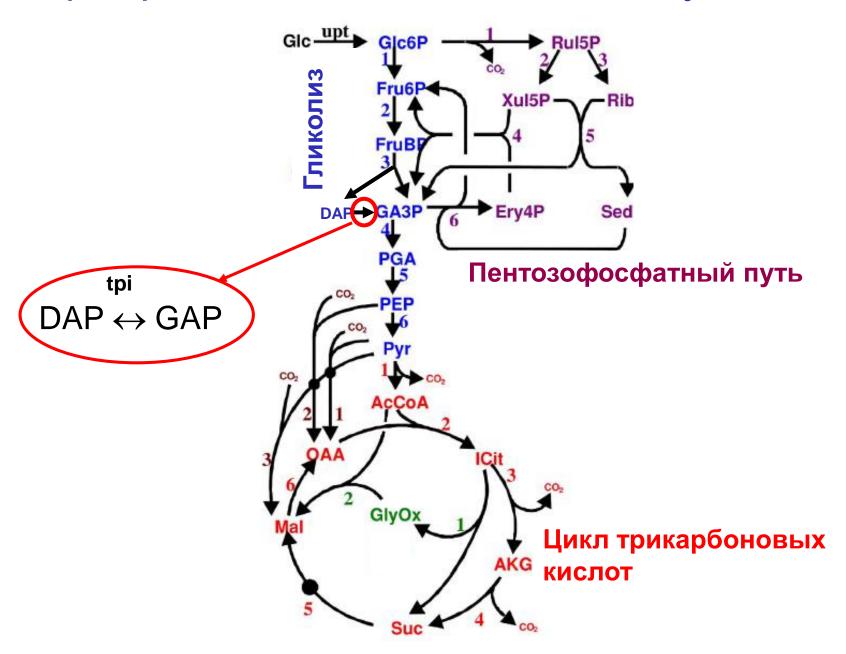
- построение схемы метаболического пути
- вывод уравнения скорости для каждой реакции
- объединение в систему дифференциальных уравнений
- -подбор параметров
- -верификация модели по экспериментальным данным

# Представление метаболических путей

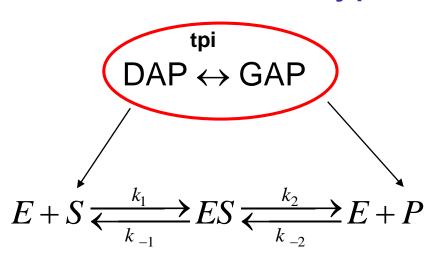


Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

# Центральные метаболические пути



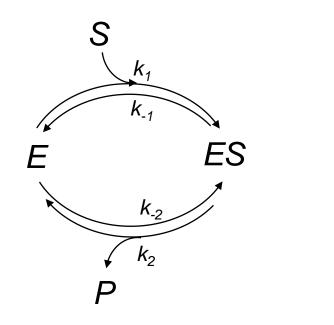
## Вывод уравнения скорости

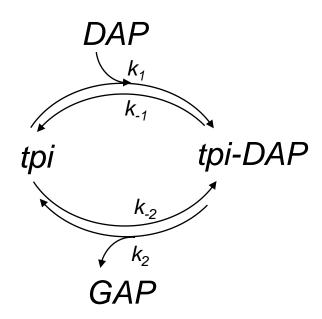


#### Кинетическая схема

взаимодействия субстрата и продукта с ферментом

#### Каталитический цикл фермента





# Вывод уравнения скорости Метод квази-стационарных концентраций

Кинетическая схема взаимодействия субстрата и продукта с ферментом:

$$E + S \xrightarrow{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Соответствующая система дифференциальных уравнений:

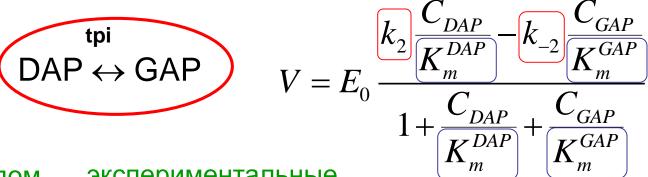
$$\frac{dS}{dt} = -k_1 \cdot S \cdot E + k_{-1} \cdot ES$$
 медленные переменные 
$$\frac{dP}{dt} = k_2 \cdot ES - k_{-2} \cdot E \cdot P$$
 медленные переменные 
$$\frac{dE}{dt} = -k_1 \cdot S \cdot E + k_{-1} \cdot ES + k_2 \cdot ES - k_{-2} \cdot E \cdot P$$
 быстрые переменные 
$$\frac{dES}{dt} = k_1 \cdot S \cdot E - k_{-1} \cdot ES - k_2 \cdot ES + k_{-2} \cdot E \cdot P$$

Уравнение скорости:

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{dS}{dt} = V = E_0 \frac{k_2 \frac{S}{K_m^S} - k_{-2} \frac{P}{K_m^P}}{1 + \frac{S}{K_m^S} + \frac{P}{K_m^P}}$$

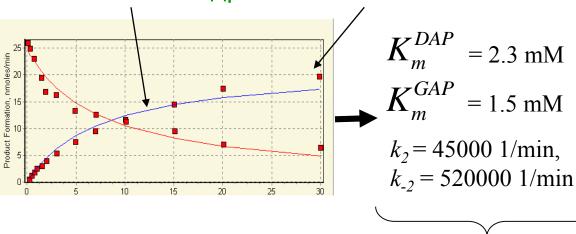
#### Определение констант скорости

для триозофосфат изомеразы (tpi)



фитирование методом наименьших квадратов

экспериментальные точки



константы Михаэлиса для субстрата и продукта

каталитические константы для прямой и обратной реакций (число оборотов фермента)



базы данных

#### BRENDA База данных по белкам

S	KM VALUE [mM]	KM VALUE [mM]	SUBSTRATE	ORGANISM	COMMENTARY	LITERATURE	INAGE
mpound		Maximum					
er	0.031	-	D-fructose 6- phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant S278L	<u>702456</u>	● 2D- image
	0.034	-	D-fructose 6- phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant I525T	702456	● 2D- image
	0.037	-	D-fructose 6- phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant wild-type enzyme	<u>702456</u>	● 2D- image
	0.038	-	D-fructose 6- phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant R347H; pH 7.5, 30°C, recombinant mutant R75G	702456	● 2D- image
n	0.039	-	D-fructose 6- phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant L487F	<u>702456</u>	● 2D- image
e	0.04	-	D-fructose 6- phosphate	Methanocaldococcus jannaschii	50°C, pH 6.3	<u>649517</u>	● 2D- image
	0.045	-	D-fructose 6- phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant A300P; pH 7.5, 30°C, recombinant mutant L339P	702456	● 2D- image
	0.046	-	D-fructose 6- phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant R347C; pH 7.5, 30°C, recombinant mutant T375R	<u>702456</u>	● 2D- image
	0.05	-	D-fructose 6- phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant E495K	<u>702456</u>	● 2D- image
is .	0.06	-	D-fructose 6- phosphate	Pyrobaculum aerophilum	pH 7.4, 80°C	<u>661679</u>	● 2D- image
	0.061	-	D-fructose 6- phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant R83W	<u>702456</u>	● 2D- image
	0.063	-	D-fructose 6- phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant T195I; pH 7.5, 30°C, recombinant mutant V101M	<u>702456</u>	● 2D- image
s	0.068	-	D-fructose 6- phosphate	<u>Homo sapiens</u>	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant R472H	<u>702456</u>	● 2D- image
ity	0.147	-	D-fructose 6- phosphate	Escherichia coli	22°C, pH 7.4	<u>661902</u>	● 2D- image
ability	0.2	-	D-fructose 6- phosphate	Thermoplasma acidophilum	80°C, pH 7.4	662220	● 2D- image
	0.21	-	D-fructose 6- phosphate	Aeropyrum pernix	50°C, pH 7.4	662220	● 2D- image
	0.27	-	D-fructose 6- phosphate	Mycobacterium tuberculosis	pH 7.6, 25°C	<u>682664</u>	● 2D- image

#### База данных по публикациям в биологии и медицине

Effects of inherited mutations on catalytic activity and structural stability of human glucose-6-phosphate isomerase expressed in Escherichia coli

< 83 <u>A</u>

coupled with haemolytic anat [Hum Genet, 1998]

d [Baillieres Best Pract Res Clin Haematol, 20...]

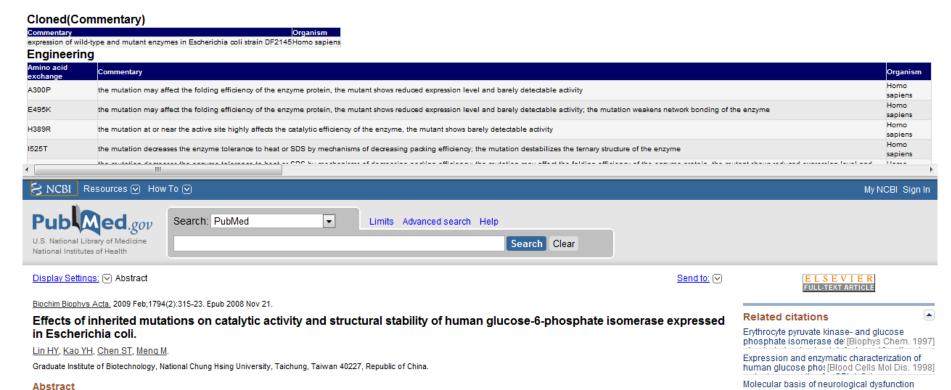
Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 200...1

Review Glucose-6-phosphate isomerase

Review Red cell glycolytic enzyme disorders

Lin, H.; Kao, Y.; Chen, S.; Meng, M.; Biochim. Biophys. Acta 1794, 315-323 (2009)

#### Data extracted from this reference:



Glucose-6-phosphate isomerase (GPI), a homodimeric enzyme, catalyzes the interconversion between glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate. In mammals, it can

human. To gain a more complete understanding of the molecular basis for the hemolytic anemia due to the GPI-deficiency, the wild-type enzyme and sixteen genetic variants

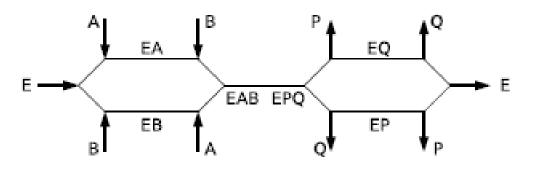
particularly k(cat), as well as structure stability. (2) mutations at or close to the active site, including R273H, H389R, and S278L, cause great damage to the catalytic function, yet

also act as an autocrine motility factor, neuroleukin, and maturation factor. Deficiency of the enzymatic activity in red blood cells causes nonspherocytic hemolytic anemia in

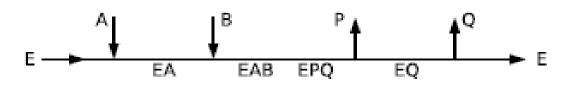
were expressed in Escherichia coli and functionally characterized. Conclusions are as follows: (1) mutations usually have negative influences on catalytic parameters.

#### ссылки на сходные публикации

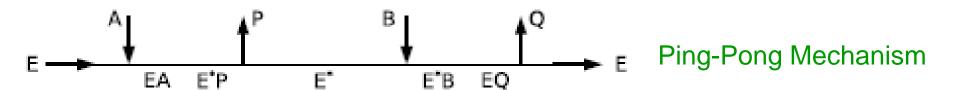
# Классификация метаболических реакций (Cleland 1963)



Random Bi Bi Mechanism



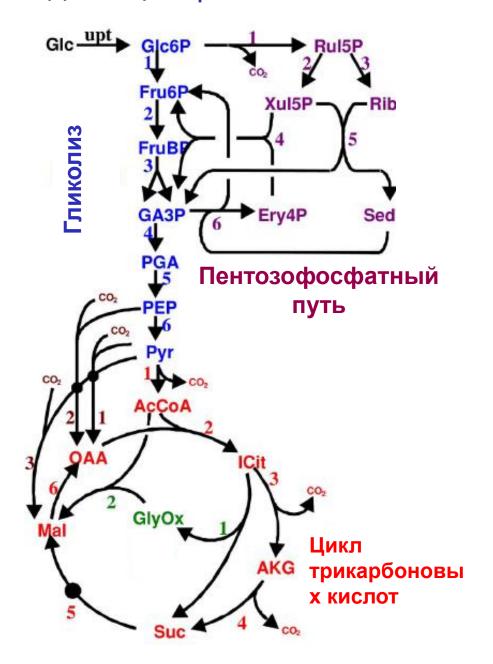
Sequential Bi Bi Mechanism



Как выводится уравнение скорости в случае более, чем одного субстрата и продукта?

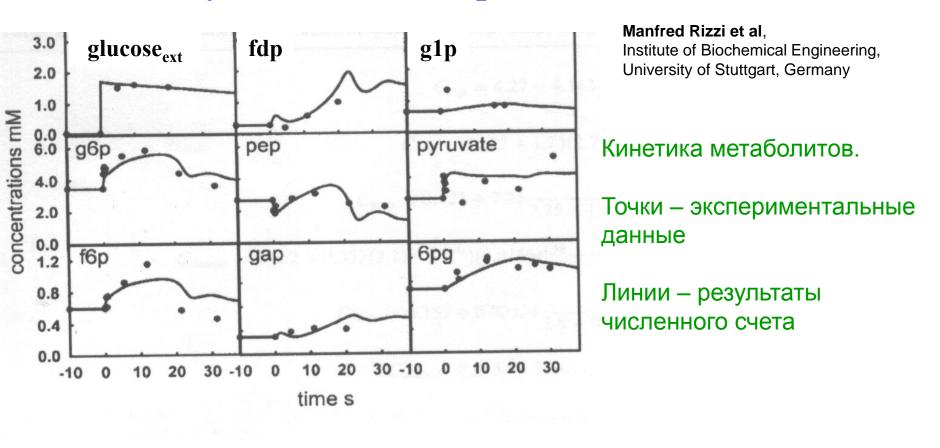
#### Модель центрального метаболизма *E.coli*

Manfred Rizzi et al,
Institute of Biochemical Engineering,
University of Stuttgart, Germany



- 1. Вывели уравнения скорости для каждого фермента.
- 2. Объединили в систему уравнений для всего пути.
- 3. Оценили параметры модели (константы скоростей)
- 4. Верифицировали по экспериментальным данным

### Результаты моделирования



- •Описана экспериментально наблюдаемая динамика (в том числе и колебательный процесс).
- •Показано, что поглощение глюкозы в основном контролируется двумя системами: транспортной (PTS) и ее ингибиторами.

# Количественные знания ограничены

- 1. Существует большая разница между дискретными данными, получаемыми в экспериментах и непрерывными физиологическими процессами.
- 2. Данные о некоторых важных клеточных процессах пока отсутствуют.
- 3. Принципиальное ограничение доступной информации.
- 4. Данные собираются для разных штаммов разных организмов в разных экспериментальных условиях.

# Стехиометрические модели

# Представление скорости реакции

### В соответствии с законом действующих масс

(скорость реакции пропорциональна вероятности столкновения реагентов, а вероятность в свою очередь пропорциональна концентрации реагентов с учетом молекулярности реакции)

$$S_1 + S_2 \xrightarrow{k_1} 2P$$

$$v = k_1 S_1 S_2 - k_{-1} P^2 = v_+ - v_-$$

V - общая скорость реакции  $V_{+}$  - скорость прямой реакции  $V_{-}$  - скорость обратной реакции

В общем виде:

$$v = v_{+} - v_{-} = k_{+} \prod_{i} S_{i}^{m_{i}} - k_{i} \prod_{j} P_{j}^{m_{j}}$$

 $m_i$  и  $m_j$  соответсвуют молекулярности  $S_i$  и  $P_j$ 

Скорость реакции может быть выражена как через **концентрации** реагирующих веществ, так и в виде баланса **скоростей** прямых и обратных реакций.

# Стехиометрическая матрица

Стехиометрические коэффициенты  $n_{ij}$ , соответствующие метаболиту  $S_i$  и реакции  $v_j$  могут быть объединены в стехиометрическую матрицу:

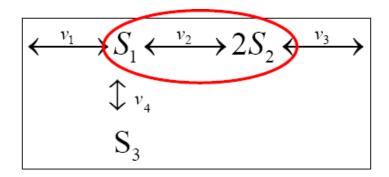
$$N = \begin{pmatrix} n_{11} & n_{12} & \dots & n_{1r} \\ \dots & \dots & \dots \\ n_{m1} & n_{m2} & \dots & n_{mr} \end{pmatrix} S_{1}$$

$$N = \begin{cases} n_{ij}, \\ i = 1, \dots, m; j = 1, \dots, r \end{cases}$$

каждый столбец соответствует реакции (*r* реакций) каждая строка соответствует метаболиту (*m* метаболитов)

# Стехиометрическая матрица

для реакции  $v_2$ :



$$N = egin{pmatrix} V_1 & V_2 & V_3 & V_4 \\ 1 & -1 & 0 & -1 \\ 0 & 2 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} S_1$$
 Строка 1: 1 молекула  $S_1$  расходуется (-1)  $S_2$  Строка 2: 2 молекулы  $S_2$  образуются (2)  $S_3$  Строка 3:  $S_3$  в этой реакции не участвует (0)

Реакции метаболической сети могут быть обратимы.

Чтобы определить знак коэффициентов, направление стрелок искусственно выбирается как положительное «слева направо» и «сверху вниз».

$$S_1+S_2+S_3 \xrightarrow{V_1} S_4+S_5$$

$$\xrightarrow{V_1} S_1 \xrightarrow{V_2} S_2 \xrightarrow{V_3} S_3 \xrightarrow{V_4} S_4 \xrightarrow{V_5}$$

$$\begin{array}{c}
V_1 \\
V_2 \\
V_3
\end{array}$$

$$S_2$$

$$S_3$$

$$S_1+S_2+S_3 \xrightarrow{V_1} S_4+S_5$$

$$N = \begin{pmatrix} -1 \\ -1 \\ -1 \\ 1 \\ 1 \end{pmatrix}$$

$$\xrightarrow{V_1} S_1 \xrightarrow{V_2} S_2 \xrightarrow{V_3} S_3 \xrightarrow{V_4} S_4 \xrightarrow{V_5}$$

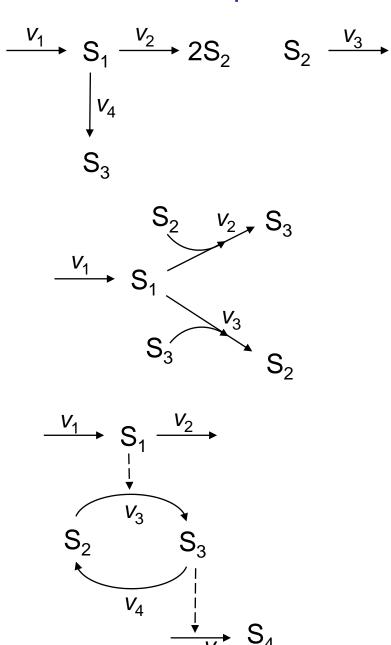
$$N = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 \end{pmatrix}$$

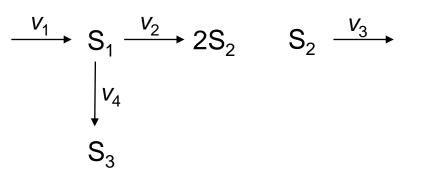
$$\begin{array}{c}
V_1 \\
V_2 \\
V_3
\end{array}$$

$$S_2$$

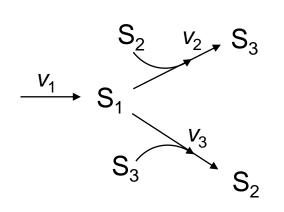
$$S_3$$

$$N = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$





$$N = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & -1 \\ 0 & 2 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$



$$N = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 \\ 0 & -1 & 1 \\ 0 & 1 & -1 \end{pmatrix}$$

$$N = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

# Построение уравнений баланса

Пример: 
$$\stackrel{v_1}{\longleftrightarrow} S_1 \stackrel{v_2}{\longleftrightarrow} 2S_2 \stackrel{v_3}{\longleftrightarrow}$$
  $\downarrow v_4$   $\downarrow$ 

вектор метаболитов

вектор скоростей стехиометрическая матрица

$$\begin{pmatrix} \frac{dS_1}{dt} \\ \frac{dS_2}{dt} \\ \frac{dS_3}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & -1 \\ 0 & 2 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \cdot v_1 - 1 \cdot v_2 + 0 \cdot v_3 - 1 \cdot v_4 \\ 0 \cdot v_1 + 2 \cdot v_2 - 1 \cdot v_3 + 0 \cdot v_4 \\ 0 \cdot v_1 + 0 \cdot v_2 + 0 \cdot v_3 + 1 \cdot v_4 \end{pmatrix}$$

уравнения баланса

$$S_1+S_2+S_3 \longleftrightarrow S_4+S_5$$

$$\longrightarrow$$
  $S_1 \longrightarrow S_2 \longrightarrow S_3 \longrightarrow S_4 \longrightarrow$ 

$$\longrightarrow S_1$$
 $S_2$ 
 $S_3$ 

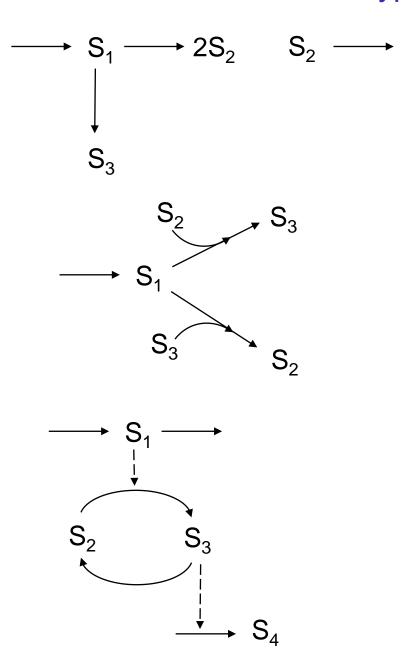
$$S_1+S_2+S_3 \longleftrightarrow S_4+S_5$$

$$\begin{pmatrix}
\frac{dS_1}{dt} \\
\frac{dS_2}{dt} \\
\frac{dS_3}{dt} \\
\frac{dS_4}{dt} \\
\frac{dS_5}{dt}
\end{pmatrix} = \begin{pmatrix}
-1 \\
-1 \\
-1 \\
1 \\
1
\end{pmatrix} \cdot (v_1) = \begin{pmatrix}
-v_1 \\
-v_1 \\
-v_1 \\
v_1 \\
v_1
\end{pmatrix}$$

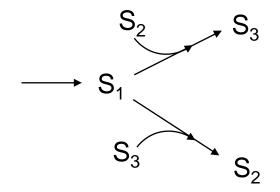
$$S_{1} \longrightarrow S_{2} \longrightarrow S_{3} \longrightarrow S_{4} \longrightarrow \begin{pmatrix} \frac{dS_{1}}{dt} \\ \frac{dS_{2}}{dt} \\ \frac{dS_{3}}{dt} \\ \frac{dS_{4}}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} v_{1} \\ v_{2} \\ v_{3} \\ v_{4} \\ v_{5} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} v_{1} - v_{2} \\ v_{2} - v_{3} \\ v_{3} - v_{4} \\ v_{4} - v_{5} \end{pmatrix}$$

$$\longrightarrow$$
  $S_1$   $S_2$   $S_3$ 

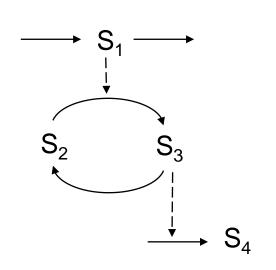
$$\begin{pmatrix}
\frac{dS_1}{dt} \\
\frac{dS_2}{dt} \\
\frac{dS_3}{dt}
\end{pmatrix} = \begin{pmatrix}
1 & -1 & -1 \\
0 & 1 & 0 \\
0 & 0 & 1
\end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix}
v_1 \\
v_2 \\
v_3
\end{pmatrix} = \begin{pmatrix}
v_1 - v_2 - v_3 \\
v_2 \\
v_3
\end{pmatrix}$$



$$\begin{pmatrix}
\frac{dS_1}{dt} \\
\frac{dS_2}{dt} \\
\frac{dS_3}{dt}
\end{pmatrix} = \begin{pmatrix}
1 & -1 & 0 & -1 \\
0 & 2 & -1 & 0 \\
0 & 0 & 0 & 1
\end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix}
v_1 \\
v_2 \\
v_3 \\
v_4
\end{pmatrix} = \begin{pmatrix}
v_1 - v_2 - v_4 \\
2v_2 - v_3 \\
v_4
\end{pmatrix}$$



$$\begin{pmatrix} \frac{dS_1}{dt} \\ \frac{dS_2}{dt} \\ \frac{dS_3}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 \\ 0 & -1 & 1 \\ 0 & 1 & -1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} v_1 - v_2 - v_3 \\ -v_2 + v_3 \\ v_2 - v_3 \end{pmatrix}$$



$$\begin{pmatrix} \frac{dS_1}{dt} \\ \frac{dS_2}{dt} \\ \frac{dS_3}{dt} \\ \frac{dS_4}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} v_1 - v_2 \\ -v_3 + v_4 \\ v_3 - v_4 \\ v_5 \end{pmatrix}$$

# Построение стехиометрической модели

$$S = (S_1, S_2, ..., S_n)^T$$

$$v = (v_1, v_2, ..., v_n)^T$$

N

вектор скоростей реакций

стехиометрическая матрица

$$\frac{dS}{dt} = Nv$$

$$\frac{dS}{dt} = 0$$

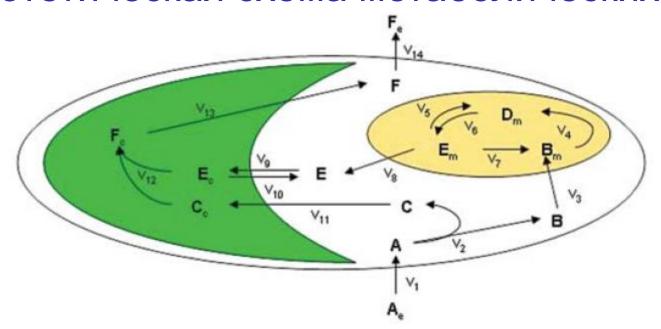
$$Nv = 0$$

уравнения баланса

стационарное состояние

система алгебраических уравнений

### Гипотетическая схема метаболических потоков



Метаболиты

внешние:

 $A_e, F_e$ 

внутренние:

A, B, C, E, F,— в цитоплазме  $B_m$ ,  $D_m$ ,  $E_m$ — в митохондрии  $C_c$ ,  $E_c$ ,  $F_c$ — в хлоропласте

Процессы

транспорт через внешнюю мембрану:

 $V_1, V_{14}$ 

транспорт через внутренние мембраны:

 $V_3$ ,  $V_8$  – через мембрану митохондрии

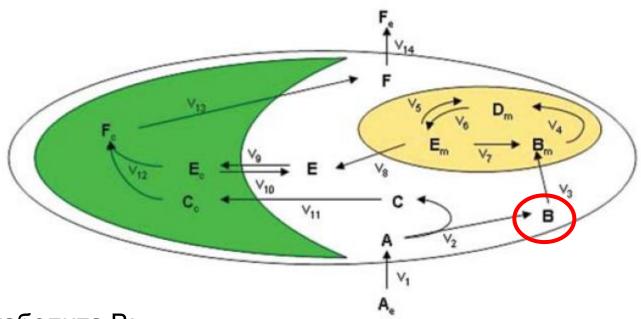
 $V_9$ ,  $V_{10}$ ,  $V_{11}$ ,  $V_{13}$  – через мембрану

хлоропласта

реакции превращения субстрата в продукт

 $V_4$ ,  $V_5$ ,  $V_6$ ,  $V_7$ ,  $V_{12}$ 

### Гипотетическая схема метаболических потоков



для метаболита В:

$$\frac{{
m d} X_{
m B}}{{
m d} t}$$
 =  $v_2 - v_3$  (Общая скорость образования метаболита В) = (скорость образования В) – (скорость потребления В)

Метаболический поток – нормированная скорость реакции.

Размерность потока – моль/время/ед.биомассы.

# В матричном виде систему дифференциальных уравнений можно записать как :

$$\frac{dX_{A}}{dt} = v_{1} - v_{2}$$

$$\frac{dX_{B}}{dt} = v_{2} - v_{3}$$

$$\frac{dX_{B_{a}}}{dt} = v_{3} - v_{4} + v_{7}$$

$$\frac{dX_{C_{a}}}{dt} = v_{11} - v_{12}$$

$$\vdots$$

$$\frac{dX_{F}}{dt} = v_{13} - v_{14}$$

$$\frac{dX_{E_{a}}}{dt} = v_{12} - v_{13}$$

$$\frac{dX_{E_{a}}}{dt} = v_{12} - v_{13}$$

$$X$$

$$\frac{dX_{B_{a}}}{dt} = N_{V}$$

$$N$$

$$V$$

$$V_{ij}$$

$$CKOPOCTE j-Й реакции, В которой участвует i-й метаболита, в сторой участвует i-й метаболита. 
$$\frac{dX_{B_{a}}}{dt} = V_{12} - V_{13}$$$$

Размерность **N** в общем виде можно записать  $m \times r$ , m - это число метаболитов, участвующих в реакциях, r - число реакций.

### Соотношение числа метаболитов m и числа потоков r

В условиях стационарного состояния: Nv=0

m – количество уравнений r – количество переменных

### Возможны три варианта:

- 1. m = r полностью определенная система. Решение единственно.
- 2. m < r недоопределенная система.

Означает, что недостаточно уравнений баланса для определения всех потоков.

Система уравнений может иметь бесконечное число решений.

(Наиболее часто встречаемый случай)

Используется метод линейного программирования.

3. m > r переопределенная система.

В случае, когда доступно множество экспериментальных измерений.

Решается методом псевдо-инверсий Мура-Пенроуза (Moore-Penrose)

# Постановка задачи линейного программирования для метаболической сети

(Метод анализа стационарных потоков, Flux Balance Analysis, FBA)

- I. Определить пространство решений:
- Уравнения баланса массы для всех метаболитов.

$$Nv = 0$$

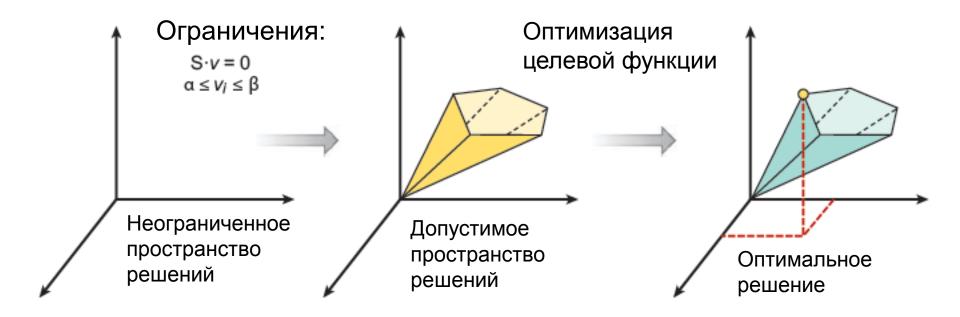
• Ограничения на потоки - максимальные и минимальные значения потоков (если известно).

$$\alpha_i \le \nu_i \le \beta_i$$

II. Определить целевую функцию.

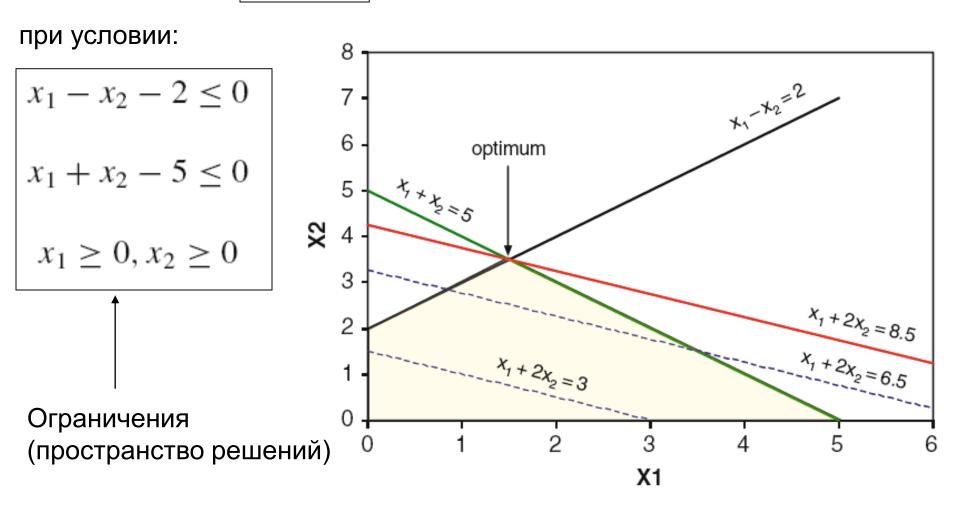
$$z = \sum_{j} c_{ij} v_{j}$$

# Поиск оптимального решения



# Задача линейного программирования

#### Пример:



# Выбор целевой функции

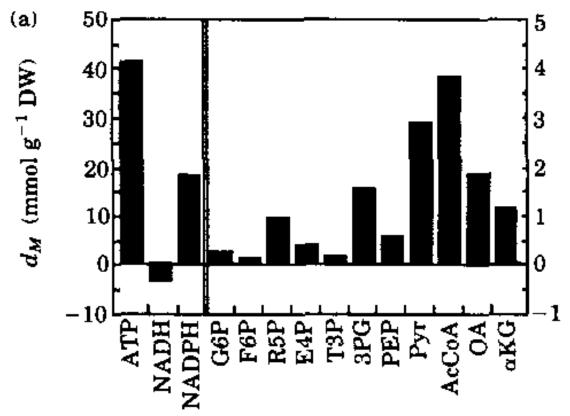
Целевая функция определяется:

- 1. биологическими потребностями клетки,
- 2. биотехнологической задачей.

# Примеры целевой функции:

- 1. Максимизировать биомассу.
- 2. Минимизировать поток питательных веществ из среды.
- 3. Максимизировать продукцию определенного метаболита.
- 4. Максимизировать продукцию АТФ.

### Расчет биомассы



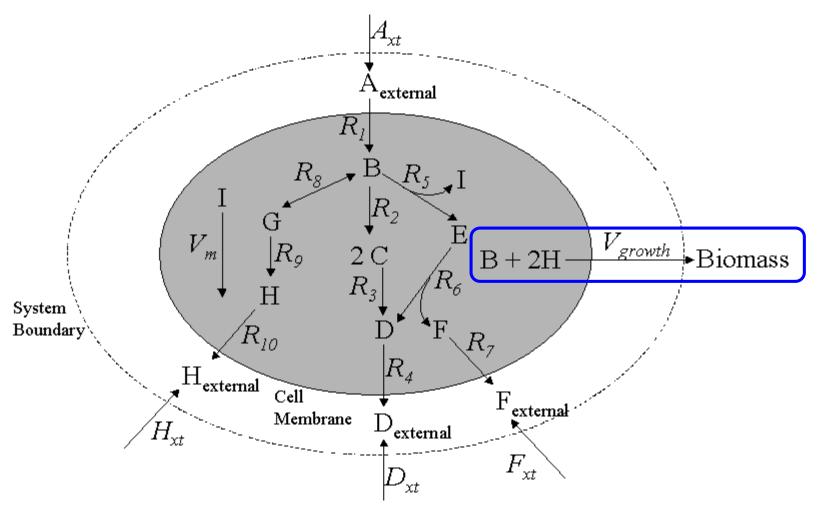
Metabolic requirements for the production of 1 g of E. coli cells, from Ingraham et al. (1983).

#### Расчет биомассы:

 $a_1$  белок +  $a_2$  углеводы +  $a_3$  липиды +  $a_4$  ДНК +  $a_5$ РНК + b АТФ  $\rightarrow$  с биомассы+ b АДФ+ продукты

# Анализ стационарных потоков http://www.nature.com/nbt/web\_extras/supp\_info/nbt02

com/nbt/web extras/supp info/nbt0201 125/info\_frame.html



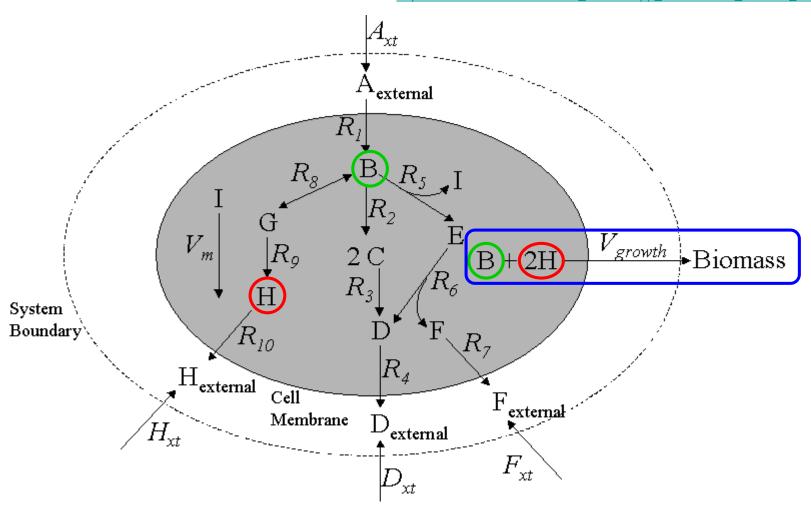
1. Выписываем все метаболиты и объединяем их в схему

Gene	Enzyme	Flux
Gene <sub>1</sub>	A Transporter	$R_1$
Gene <sub>2</sub>	Enzyme <sub>2</sub>	$R_2$
Gene <sub>3</sub>	Enzyme₃	$R_3$
Gene <sub>4</sub>	D Transporter	$R_4$
Gene₅	Enzyme₅	$R_5$
Gene <sub>6</sub>	Enzyme <sub>6</sub>	$R_6$
Gene <sub>7</sub>	F Transporter	$R_7$
Gene <sub>8</sub>	Enzyme <sub>8</sub>	R <sub>8</sub>
Gene <sub>9</sub>	Enzyme <sub>9</sub>	$R_9$
Gene <sub>10</sub>	H Transporter	$R_{10}$
-	A Exchange	$A_{xt}$
-	D Exchange	$D_{xt}$
-	F Exchange	$F_{\mathtt{xt}}$
-	H Exchange	$H_{xt}$

#### 2. Выписываем все метаболические потоки

		$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R_5$	$R_6$	$R_7$	$R_8$	$R_9$	$R_{10}$	$V_m$	$V_{ m growth}$	$A_{xt}$	$D_{xt}$	$F_{\rm xt}$	H <sub>st</sub>	R <sub>1</sub> R <sub>2</sub>		_ ¬	
Α	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$R_3$		0	
В	1	-1	0	0	-1	0	0	-1	0	0	0	-1	0	0	0	0	$R_4$		0	
С	0	2	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R <sub>5</sub>		0	
D	0	0	1	-1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R <sub>6</sub>		0	
E	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R <sub>7</sub>		0	
F	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R <sub>8</sub>		0	
G	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	R <sub>9</sub>	=	0	
Н	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	-2	0	0	0	0	R <sub>10</sub>		0	
I	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	V <sub>m</sub>		0	
$\mathbf{A}_{external}$	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1 37 1		0	
$\mathbf{D}_{external}$	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	l Annun l		0	
F <sub>external</sub>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	$egin{array}{c} \mathbf{A}_{\mathrm{xt}} \\ \mathbf{D}_{\mathrm{xt}} \end{array}$		0	
H <sub>external</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	F <sub>xt</sub>		<b>└</b> 0_	
ı											'		'				Txt			

3. Записываем стехиометрическую матрицу и уравнения баланса в матричном виде



Как записать поток на биомассу ( $V_{growth}$ )?

A B	R <sub>1</sub> 0 1	R <sub>2</sub> 0 -1	<i>R</i> ₃ 0 0	R <sub>4</sub> 0 0	R <sub>5</sub> 0 -1	R <sub>6</sub> 0	R <sub>7</sub> 0 0	R <sub>8</sub> 0 -1	R <sub>9</sub> 0 0	R <sub>10</sub> 0	V <sub>**</sub>	V <sub>growth</sub> 0 -1	A <sub>xt</sub> 0 0	D <sub>nt</sub> 0 0	F <sub>xt</sub> 0	H <sub>xt</sub> 0	$egin{array}{c} R_1 \ R_2 \ R_3 \ R_4 \ \end{array}$		
С	0	2	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$R_5$	0	
D	0	0	1	-1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R <sub>6</sub>	0	
E	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R <sub>7</sub>	1 1	
F	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R <sub>8</sub>	 0	
G	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	R <sub>9</sub>	 0	
H	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	(-2)	0	0	0	0	R <sub>10</sub>	0	
I	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	v	0	
A <sub>enternal</sub>	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	V m V mounts	0	
D <sub>external</sub>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	Y growth A <sub>xt</sub>	0	
F <sub>external</sub>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	D <sub>xt</sub>	0	
H <sub>enternal</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	F <sub>xt</sub>	L0_	
																	12**		

На формирование биомассы,  $V_{
m growth}$  , идет одна молекула В и две молекулы Н

# Анализ стационарных потоков

уравнения баланса

ограничения на потоки

целевая функция

**B**: 
$$R_1 - R_2 - R_5 - R_8 - V_{growth} = 0$$
  
**C**:  $2R_2 - R_3 = 0$   
**D**:  $R_3 + R_6 - R_4 = 0$ 

$$\mathbf{E}: R_{\rm S} - R_{\rm 6} = \mathbf{0}$$

$$\mathbf{F}: R_6 - R_7 = \mathbf{0}$$

$$\mathbf{G}: R_{\mathrm{s}} - R_{\mathrm{o}} = \mathbf{0}$$

**G**: 
$$R_8 - R_9 = 0$$
**H**  $R_9 - R_{10} - 2V_{growth} = 0$ 

$$I: R_5 - V_m = 0$$

$$\mathbf{A}_{external}$$
:  $A_{xt} - R_1 = \mathbf{0}$ 

$$\mathbf{D}_{external}$$
:  $D_{xt} + R_4 = \mathbf{0}$ 

$$\mathbf{F}_{external}$$
:  $F_{xt} + R_7 = \mathbf{0}$ 

$$\mathbf{H}_{external}: H_{xt} + R_{10} = \mathbf{0}$$

$$0 \le R_i \le \infty$$
  
 $0 \le R_i \le \infty$   
 $0 \le R_j \le \infty$ 

 $-\infty \le H_{\omega} \le 0$ 

$$Z=V_{growth} \longrightarrow max$$

4. Ставим задачу линейного программирования

### Анализ метаболических потоков



# Экспериментальные методы модификации штамма

- нокаутирование генов
- мутация генов с частичным изменением каталитических и регуляторных свойств
- амплификация генов
- вставка генов из других (микро)организмов

# Применение анализа метаболических путей

### Метаболизм E.coli

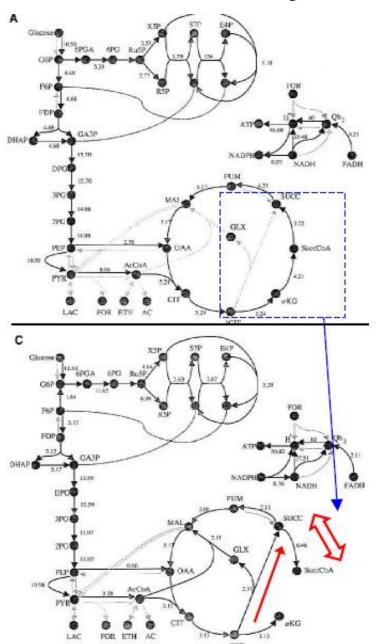
Распределение метаболических потоков для полного набора генов. Целевая функция – максимум биомассы при росте на глюкозе.

Способность E.coli адаптироваться к утрате функциональности гена может быть проанализирована путем удаления гена из основного набора

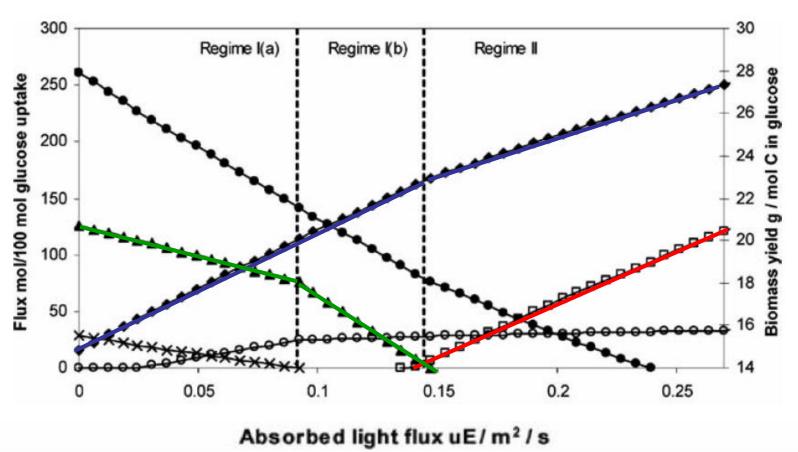
Распределение метаболических потоков, когда «выключен» ген sucA.

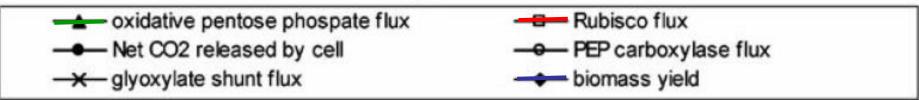
(ген sucA кодирует необходимый компонент реакции в ЦТК)

Поток перенаправляется через глиоксилатный шунт. Реакция Succ—SucCoA обращается.



# Применение анализа метаболических путей Метаболизм синезеленых водорослей





#### Введение «динамики» в стационарную модель

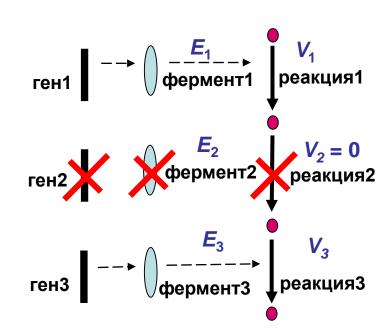
1. Временной отрезок разбивается на интервалы.



2. На выбранном временном интервале  $t_1 \le t \le t_2$  определяется наличие или отсутствие фермента для каждой реакции.

Если фермент  $E_i$  «не присутствует», тогда соответствующий метаболический поток равен нулю:  $V_i = 0$ , при  $t_1 \le t \le t_2$ .

Если фермент  $E_i$  «присутствует» на выбранном интервале времени, тогда соответствующий метаболический поток рассчитывается как результат оптимизации.



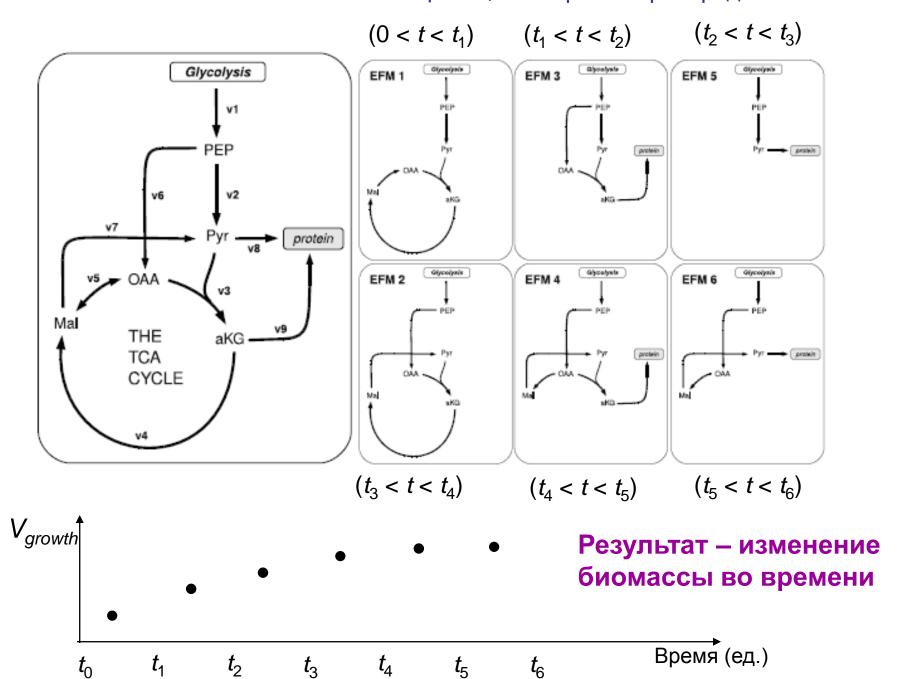
## Разные интервалы времени характеризуются разной активностью генов

#### Экспериментальные данные

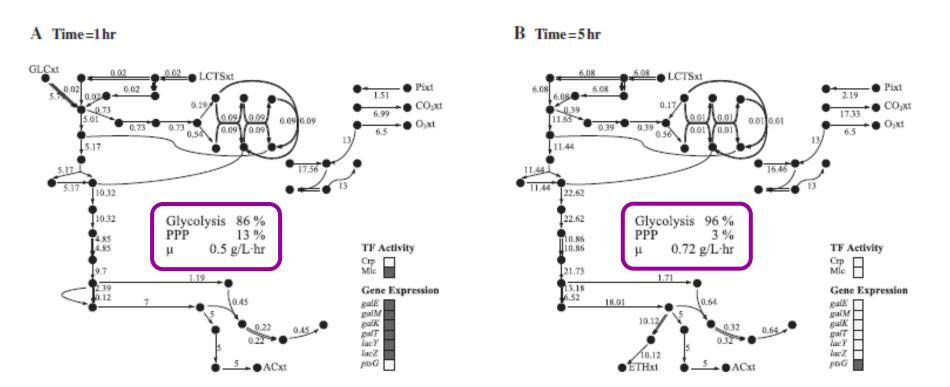
Gene	0:00	Time 8:00	8:27
aceA	0	1	1
aceB	0	1	1
acs	0	1	1
adhE	1	1	0
crr	<b>1</b>	1	0
ppsA	0	0	1
ppsA ptsG	1	1	0
ptsH	1	1	0
pts/	1	1	0
pykF	1	1	0

В соответствии с активностью гена на выбранном временном интервале определяется наличие или отсутствие фермента для каждой реакции

*Темно-серый*, активность = 1 *Светло-серый*, активность = 0



# Распределения метаболических потоков в процессе диауксического роста



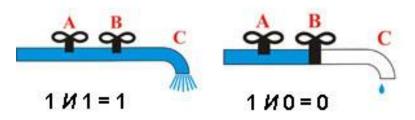
# Учет регуляции на уровне транскрипции в стехиометрических моделях

Математический аппарат:

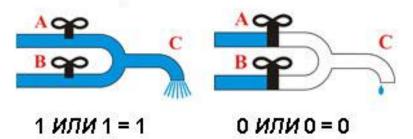
линейное программирование + булева алгебра

#### Булева алгебра

a) 
$$C = A U B$$

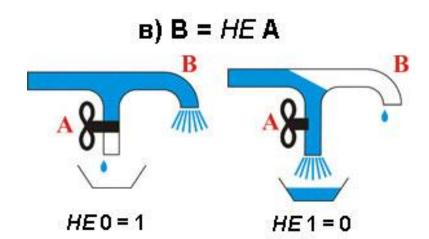


#### б) C = A ИЛИ В



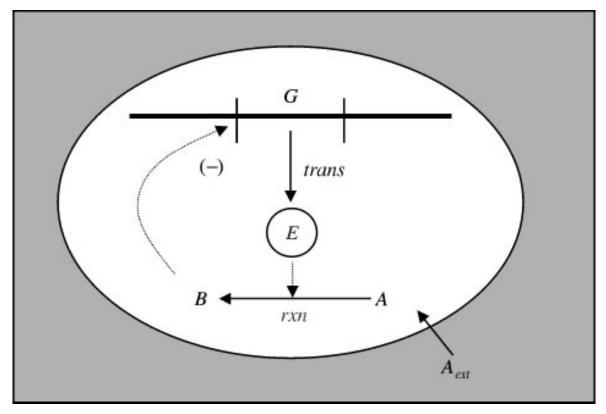
Значение **булевой** величины можно представлять как ложность или истинность какого-либо утверждения

(0 - ложь, 1 - истина).



Рассматриваются величины, принимающие только два значения - 0 или 1.

#### Регуляторная единица

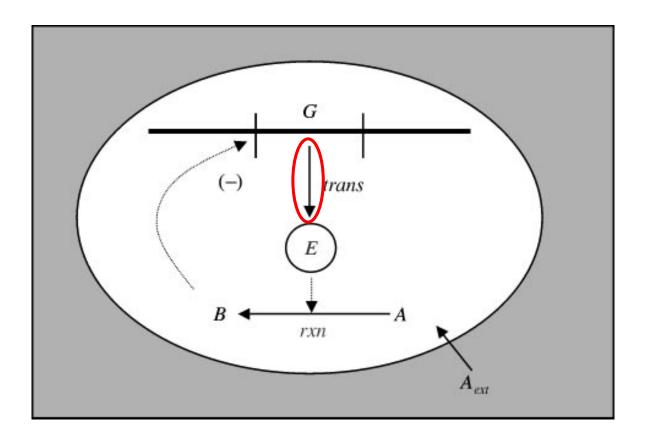


Транскрипция гена G(trans) приводит к синтезу фермента E.

Фермент E катализирует реакцию rxn в которой субстрат A превращается в продукт B.

Продукт B затем репрессирует транскрипцию гена G, что ведет к подавлению синтеза E.

#### Регуляторная единица

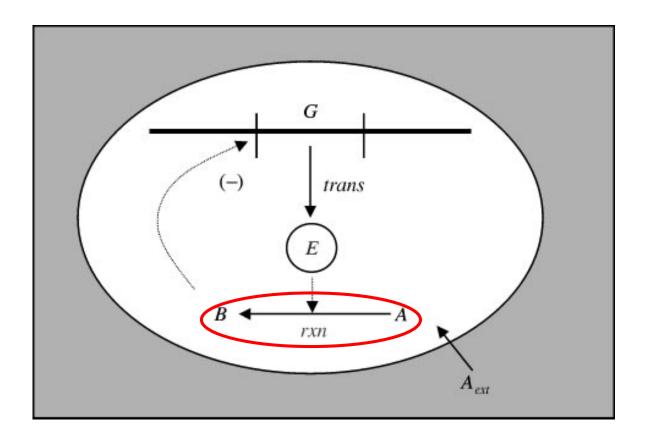


Событие trans (транскрипция) будет иметь место:

- 1. если F присутствует в F геноме,
- 2. продукт В еще не наработан.

Соответствующее логическое уравнение: trans = IF(G) AND NOT(B)

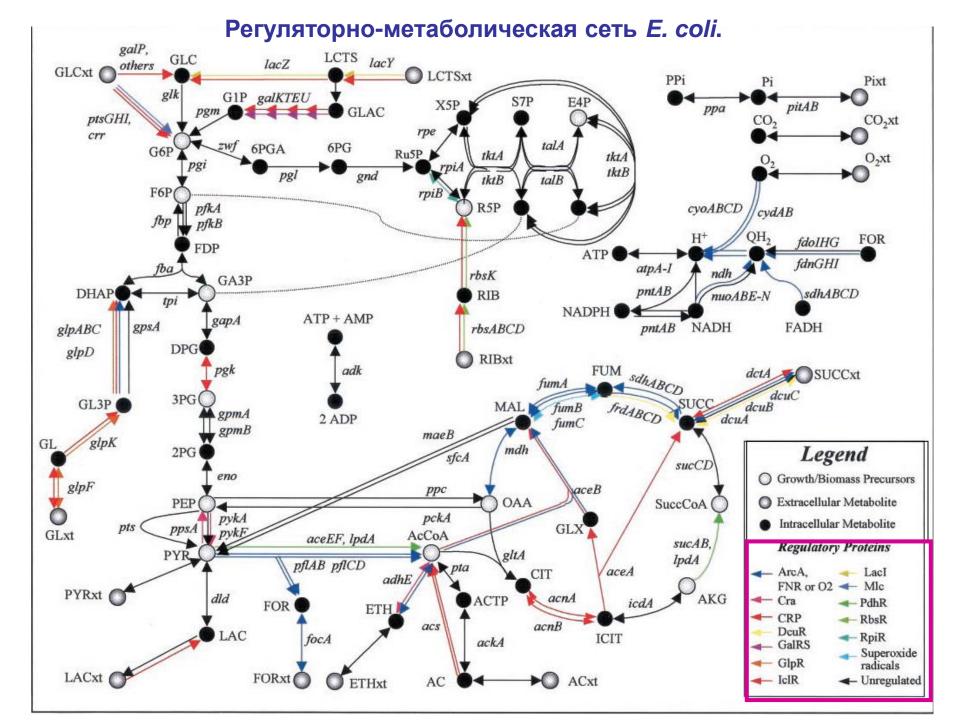
#### Регуляторная единица



Реакция rxn будет протекать, если одновременно присутствуют субстрат A и фермент E.

Соответствующее логическое уравнение:

rxn = IF(A) AND(E)



## Метод элементарных мод

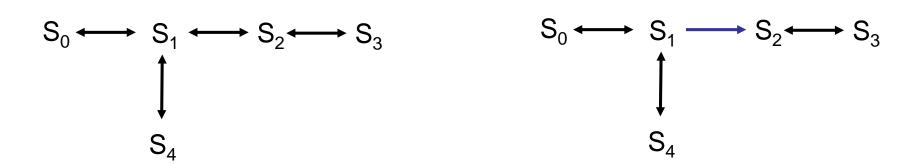
Рассматривает стационарные состояния.

Не требует оптимизации.

Учитывает обратимость реакций.

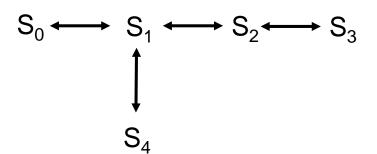
Рассматривает все возможные направленные пути от одного внешнего метаболита к другому (при этом внутренние метаболиты накапливаться не должны).

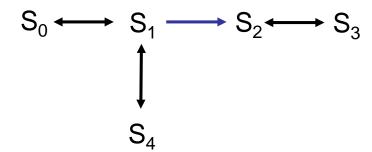
Элементарная мода – направленный путь, включающий набор реакций от одного внешнего метаболита к другому.



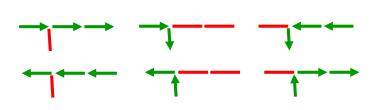
#### Метод элементарных мод

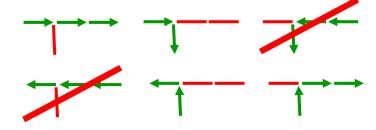
Внешние метаболиты:  $S_0$ ,  $S_3$ ,  $S_4$ 



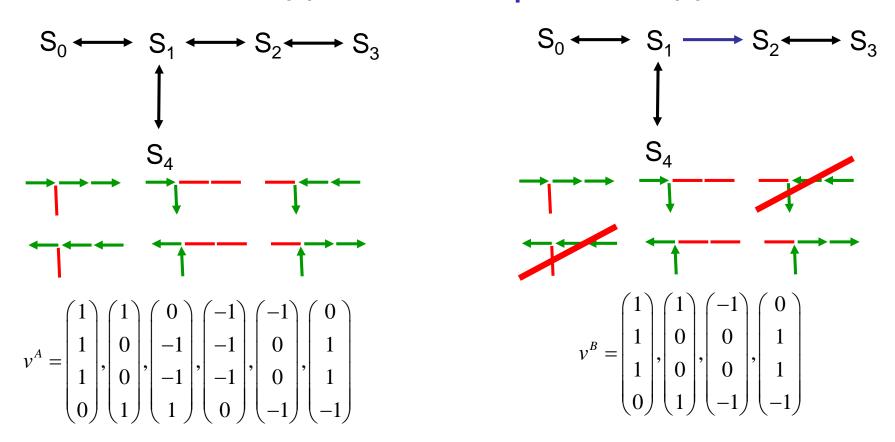


Элементарные моды





## Метод элементарных мод

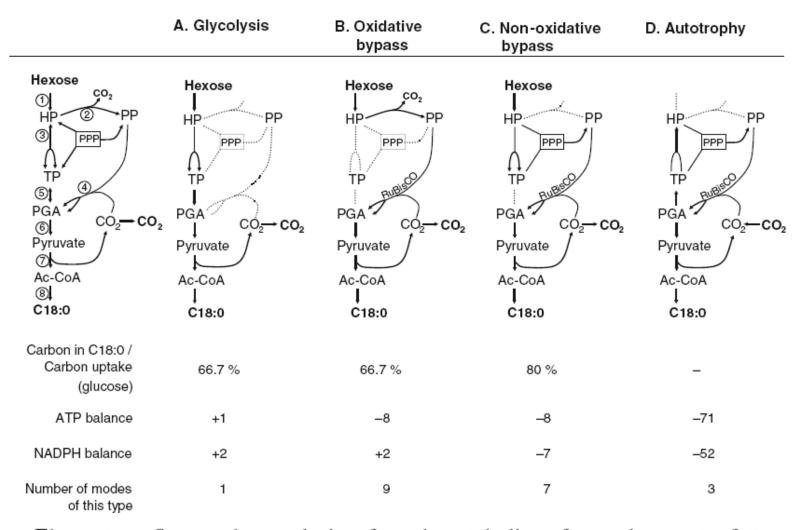


Число элементарных мод равно числу собственных векторов стехиометрической матрицы.

Любой путь может быть представлен как линейная комбинация элементарных мод.

Элементарная мода характеризуется своим уникальным набором ферментов

#### Применение метода элементарных мод



**Fig. 8.7** Elementary flux-modes analysis of seed metabolism from glucose to fatty acids using a network of 26 reactions. Carbon use efficiency (carbon stored in oil/carbon uptake as glucose), cofactor balances, and four characteristic fluxes are shown relative to the formation of 1 mol C18:0. Of the 28 elementary modes, 20 produce stearic acid (C18:0).

"The simplest living cell is so complex that supercomputer models may never simulate its behavior perfectly.

But even imperfect models could shake the foundations of biology."

W. Wayt Gibbs. Scientific American, 2001

«Простейшая клетка настолько сложна, что даже моделирование на суперкомпьютерах никогда не воспроизведет ее поведение в совершенстве. Но даже несовершенные модели могут потрясти основы биологии.»