

**Міністерство освіти і науки України**  
**Донецький національний університет імені Василя Стуса**

**ПРАКТИКУМ ІЗ СИСТЕМНОЇ БІОЛОГІЇ**

**Математичне моделювання метаболічних процесів**

*для магістрів спеціальності «Біологія»*

**Вінниця 2018**

**УДК 577.3, 57.03.**

**Рекомендовано до друку вченою радою біологічного факультету (протокол № 7 від 16. 02. 2018 р.**

**Практикум із системної біології. Математичне моделювання метаболічних процесів. Для магістрів спеціальності «Біологія» // укл. О. І. Доценко. – Вінниця: ДонНУ імені Василя Стуса, 2018. – 58 с.**

**Укладачі:**

**О. І. Доценко, канд. хім. наук, доцент**

**Рецензенти:**

**Кулик А.Я., д.т.н., зав. кафедрою біологічної фізики, медичної апаратури та інформатики ВНМУ ім. М.І.Пирогова**

**Шендрик О.М., д.х.н., зав. кафедрою біохімії та фізичної хімії ДонНУ імені Василя Стуса**

Представлення складних біологічних систем як мережі (реакційні мережі, мережі взаємодії, регулюючі мережі) дозволяє вивчати їх структуру, динаміку, функціонування та допомагає зрозуміти принципи роботи живих клітин. У методичному посібнику наведені лабораторні роботи та практичні завдання, що допоможуть студенту зрозуміти основні підходи до моделювання складних метаболічних мереж, опанувати спеціальними програмними засобами, для дослідження метаболічних процесів клітини. Практикум розрахований на магістрів -біологів, що вивчають курс «Системна біологія».

## Зміст

	с
РОЗДІЛ 1. КІНЕТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ	
Робота 1. Створення метаболічної моделі у програмі COPASI	4
Робота 2. Модель брюсселятора	11
Робота 3. Мала модель верхнього гліколізу. Аналіз контролю метаболізму (Metabolic Control Analysis) у COPASI	12
Робота 4. Аналіз метаболічного контролю синтезу метіоніну в <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
Робота 5. Математичний аналіз накопичення цукру в <i>Saccharum officinarum</i>	21
Робота 6. Математична модель MAP-кіназного каскаду	28
Робота 7. MAPK каскад. Моделювання коливань	32
Робота 8. Пошук параметрів моделі з використанням експериментальних даних	36
РОЗДІЛ II. СТЕХІОМЕТРИЧНІ МАТЕМАТИЧНІ МОДЕЛІ	39
Робота 9. Створення та редагування моделі метаболізму <i>E. coli</i> в CellNetAnalyzer	44
Список використаної літератури	58

# РОЗДІЛ 1. КІНЕТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ

## Робота 1. Створення метаболічної моделі у програмі COPASI

Математичний опис кінетичної метаболічної моделі може бути заданий у формі диференціального рівняння

$$\frac{dx_i}{dt} = Nv(x_i, y, p), x_i(0) = x_{i-0},$$

яке може бути використано в якості керівництва щодо даних і параметрів, необхідних для створення кінетичної моделі. По-перше,  $N$  — стехіометрична матриця, яка може бути отримана з топології моделі.  $x_i$  — концентрації метаболітів,  $y$  — зовнішні метаболіти, концентрації яких не можуть змінюватися, але впливають на швидкості реакцій. Початкові концентрації як для  $x$ , так і для  $y$  повинні бути визначені, але зверніть увагу, що тільки концентрації  $x$  будуть змінюватися з часом.  $v$  — швидкості реакції; вони залежать від кінетичних механізмів, концентрацій  $x$  і  $y$  і параметрів  $p$ .

### Крок 1. Стехіометрія

На першому етапі кінетичного моделювання визначається цікавий для нас шлях і його межі, які математично відбиваються у стехіометричній матриці. В якості прикладу ми будемо використовувати модель синтезу гліцерину, що містить тільки дві реакції (цю модель описано в літературі, її можна переглянути у публікаціях [5]). У наступних роботах цю процедуру ми будемо використовувати для більш складних систем.

Двома реакціями моделі є:

1. Реакція, що керується гліцерин-3-фосфатдегідрогеназою (GPD), в якій дегідроацетонфосфат (DHAP) перетворюється на 3-фосфогліцерат (G3P):



Ця реакція зворотна, на її швидкість впливають концентрації метаболітів АТР, АDP, F16BP.

Щоб ввести стехіометричні дані в Copasi, послідовно виконайте дії:

*Model* → *Biochemical* → *Reactions* (рис. 1.1)

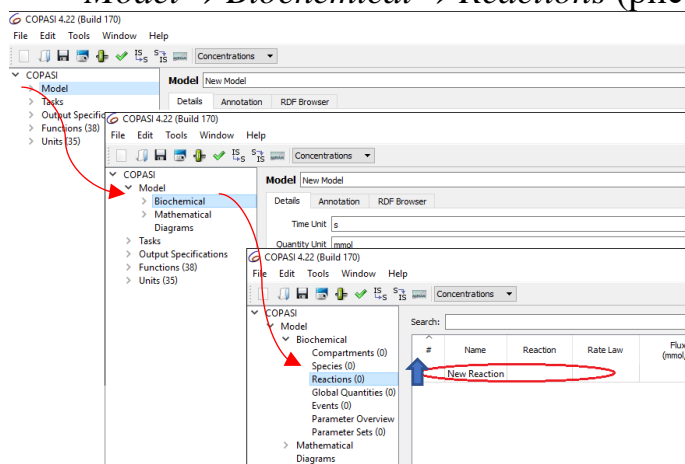


Рис. 1.1. — Введення стехіометричних даних

Двічі клацаємо лівою кнопкою миші по клітинці першого стовпця рядка з назвою *New Reaction*. Починаємо заповнювати вікно, як показано на рисунку 2 а. У це вікно вводимо інформацію про першу реакцію.

У верхньому рядку необхідно ввести назву реакції. Зазвичай вказують назву ферменту, що каталізує реакцію. У другий рядок, вводимо саму реакцію.

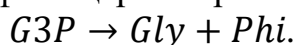
Усі стехіометричні коефіцієнти, назви метаболітів та символи реакції відокремлюємо пробілом. Ця реакція зворотна, тому залишаємо галочку біля

*Reversible*. Якщо концентрації метаболітів впливають на швидкість реакції, та входять до рівняння швидкості, але ці метаболіти не є учасниками реакції, то вони наводяться після точки з комою (рис. 1.2а).

Примітка. Ви можете помітити, що Copasi автоматично визначає закон швидкості реакції (Rate Law). У випадку, що показаний на рис. 1.2а — це закон діючих мас для зворотної реакції. Якщо потрібно описати швидкість реакції іншим законом, то його можна змінити. Ми це зробимо пізніше, а поки залишаємо так.

2. Аналогічно вводимо інформацію про другу реакцію.

Реакція, що керується гліцерин-3-фосфатазою (GPP), у якій 3-фосфогліцерат перетворюється на гліцерин (Gly) і фосфат-йони:



Результат введення показаний на рис. 1.2б. Зверніть увагу, що це незворотна реакція.

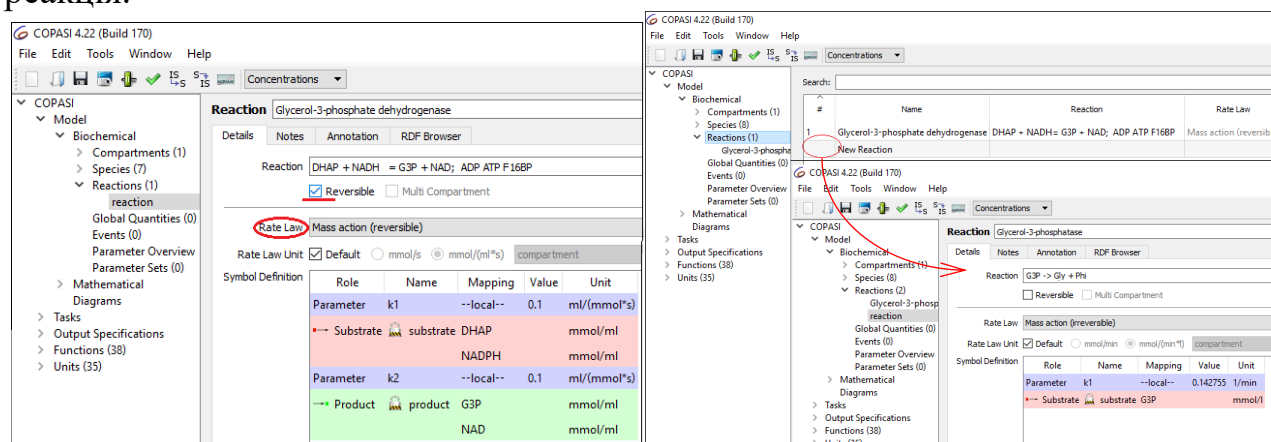


Рис. 1.2а — Введення реакції, що керується гліцерин-3-фосфатдегідрогеназою

Рис. 1.2б — Введення реакції, що керується гліцерин-3-фосфатазою.

### Крок 2. Тип метаболітів і їхні початкові концентрації

Натисніть на вкладку Species на Панелі задач. Ми бачимо, що дев'ять метаболітів додані до моделі. У таблиці, що відкривається справа, треба вказати тип метаболітів та їхні початкові концентрації. Але спочатку треба вказати одиниці вимірювання параметрів, що будуть використані в моделі. Для цього відкрийте вікно Model і встановіть наступні одиниці вимірювання: час – хв (min), об'єм – л (l), концентрації – мМоль (mM) (рис. 1.3а).

Потім відкрийте вікно Species і вкажіть тип і концентрації метаболітів (рис. 1.3б). У цьому прикладі ми не хочемо моделювати зміни в концентрацій зовнішніх метаболітів. Щоб вирішити це питання, змініть тип метаболітів reactions на fixed для метаболітів NAD, NADH, ATP, ADP, F16BP та Phi. Для цих метаболітів розрахунки не будуть здійснюватися.

### Крок 3. Матриця стехіометрії

Здійснити виведення матриці стехіометрії можна за допомогою (рис. 1.4): Model > Mathematical > Matrices.

Як і очікувалося, вона містить G3P, який виробляється в результаті першої реакції і споживається іншою.

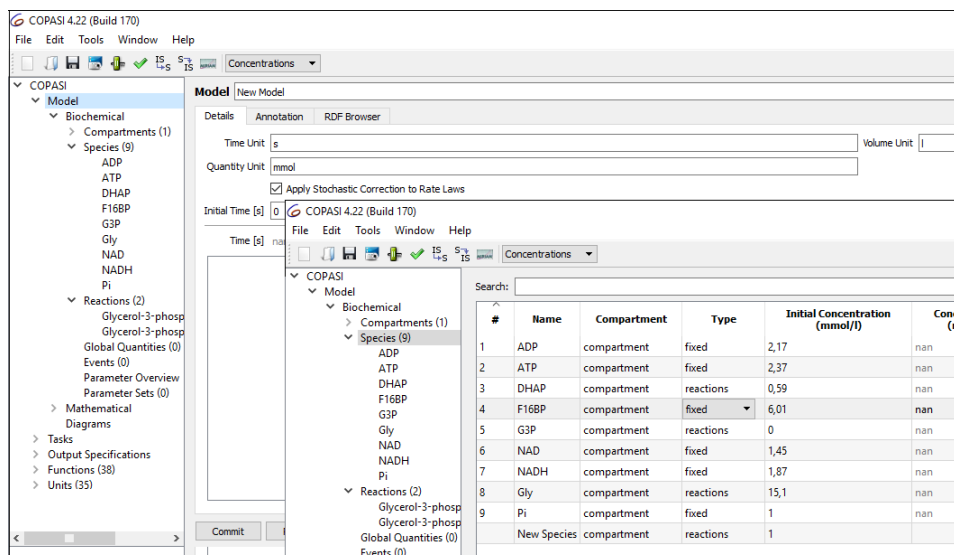


Рис. 1.3. — Введення типу та концентрацій метаболітів

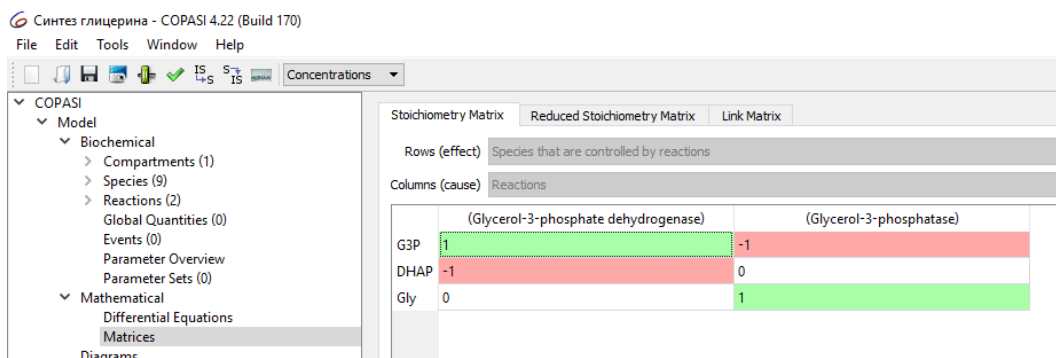



Рис. 1.4. — Матриця стехіометрії моделі

#### Крок 4. Рівняння швидкостей реакції

Кінетичний закон швидкості може бути отриманий зі знань механізму, що лежить в основі ферментативного процесу. В нашій моделі реакція 1 зворотна, бісубстратна, її швидкість залежить від концентрації ATP, ADP, F16BP. За даними досліджень, швидкість цієї реакції описується таким рівнянням:


$$v = \frac{V_f}{K_{NADH} \cdot K_{DHAP}} \cdot \left( NADH \cdot DHAP - \frac{NAD \cdot G3P}{K_{eq}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{F16BP}{K_{F16BP}} + \frac{ATP}{K_{ATP}} + \frac{ADP}{K_{ADP}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{NADH}{K_{NADH}} + \frac{NAD}{K_{NAD}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{DHAP}{K_{DHAP}} + \frac{G3P}{K_{G3P}} \right)$$

COPASI має широкий спектр вбудованих кінетичних функцій, доступ до яких можна отримати через меню Function. Проте рівняння швидкості рівняння, що каталізується GPD, можна ввести тільки вручну. Для цього потрібно натиснути на > біля меню Reactions і вибрати реакцію на панелі задач.

У вікні, що відкривається, потрібно натиснути кнопку  (Edit Rate Law), і у вікні Function потрібно ввести формулу, користуючись дужками для

визначення послідовності операцій (послідовність операцій при введенні рівняння швидкості показано на рис. 1.5):

$$V_f / (K_{nadh} * K_{dhap}) * (NADH * DHAP - NAD * G3P / K_{eq}) / ((1 + F_{16BP} / K_{f16BP} + ATP / K_{atp} + ADP / K_{adp}) * (1 + NADH / K_{nadh} + NAD / K_{nad}) * (1 + DHAP / K_{dhap} + G3P / K_{G3P}))$$

Для перевірки введення користуйтеся кнопкою  і корегуйте формулу, якщо в цьому є потреба.

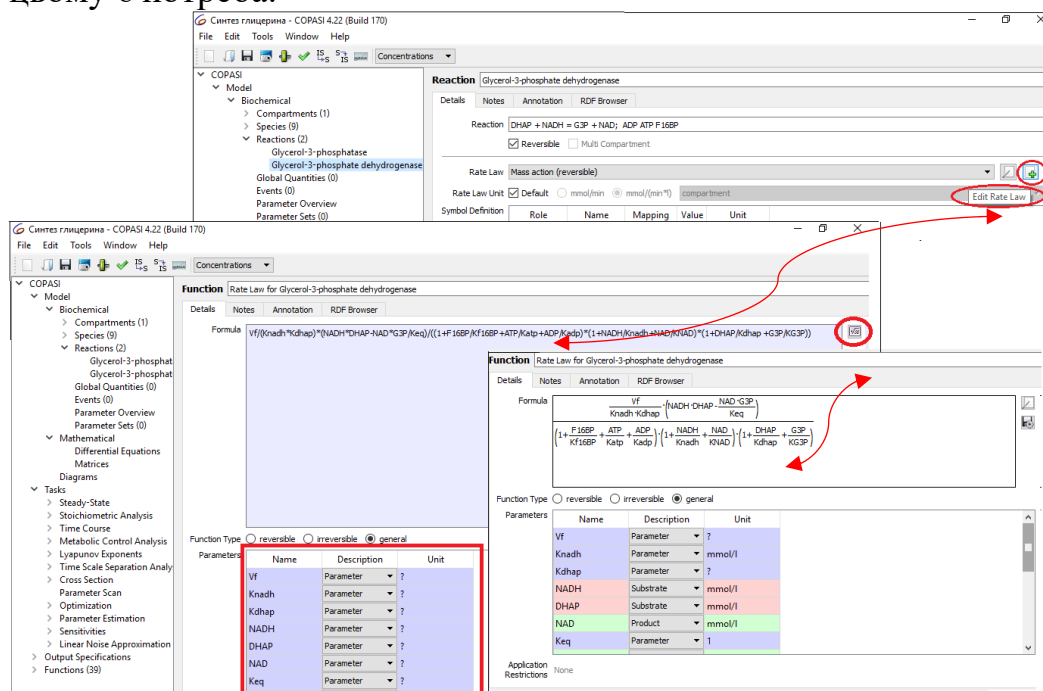


Рис. 1.5. — Введення закону швидкості реакції, що керується гліцерин-3-фосфатдегідрогеназою

Після того, як формула була введена, у вікні Parameters необхідно вказати, що являють собою позначення, які використовувалися в формулі. Встановіть наступне:

Vf	Parameter
Knadh	Parameter
Kdhap	Parameter
NADH	Substrate
DHAP	Substrate
NAD	Product
G3P	Product
Keq	Parameter
F16BP	Modifier
Kf16BP	Parameter
ATP	Modifier
ADP	Modifier
Katp	Parameter
Kadp	Parameter
KG3p	Parameter

і натисніть Commit.

Після цього потрібно повернутися у вікно Reactions, відкрити рядок Rate Law і знайти функцію, що була створена власноруч. Всі операції показані на рис. 1.6. У таблиці нижче, що змінюється, потрібно ввести числові параметри рівняння. Перевірте співпадіння назв метаболітів у стовпцях Name і Mapping. Якщо вони не співпадають, зробіть правки, відкриваючи комірку стовпця Mapping.

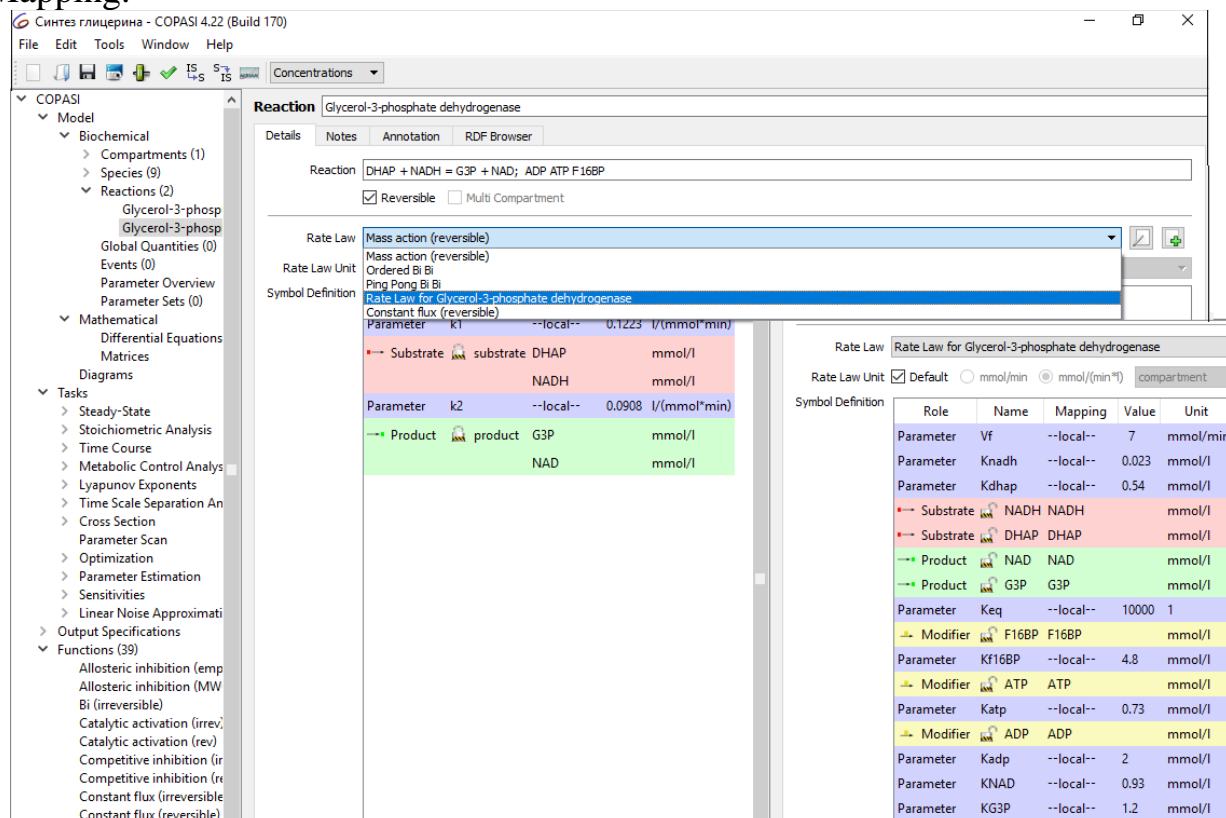


Рис. 1.6. — Підключення рівняння швидкості та введення значень параметрів реакції

Подібним чином введіть рівняння, яке описує швидкість реакції, що керується GPP. Рівняння швидкості таке:

$$v = \frac{V \cdot G3P}{K_{G3P}} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{G3P}{K_{G3P}}\right) \cdot \left(1 + \frac{Phi}{K_{Phi}}\right)}$$

Параметри цього рівняння є такими:  $V = 13$ ,  $K_{G3P} = 3,5$ ,  $K_{Phi} = 1$ .

#### Крок 5. Перевірка моделі

Щоб перевірити модель на відсутність помилок, скористайтеся вкладками Model >Parameter Overview. У вікні Model Parameter буде надана інформація про метаболіти, їхні концентрації та параметри кінетичних рівнянь.

Збережіть модель.



### Крок 6. Розрахунок динаміки змінення концентрацій метаболітів моделі

COPASI надає великий спектр розрахунків для аналізу даних. Ці можливості ми будемо вивчати поступово. У цій роботі зробимо розрахунок динаміки змінення концентрацій метаболітів моделі. Цю можливість надає меню **Tasks>Time course**.

COPASI результат розрахунків виводить на графік. Тому спочатку треба задати графічні залежності, на яких будуть показані результати розрахунків. Скористаємося **Output Specification>Plots**. Клацаємо мишею по першому стовпчику рядка **New Plot**. У вікні **Plot** натискаємо кнопку **New Curve**. Далі виконайте дії так, як показано на рис. 1.7. Зверніть увагу, що на осі у показуємо зміни перехідних концентрацій (**Transient Concentration**). Утримуючи **Ctrl**, виділяємо концентрації тільки метаболітів, що мають тип **reactions**.

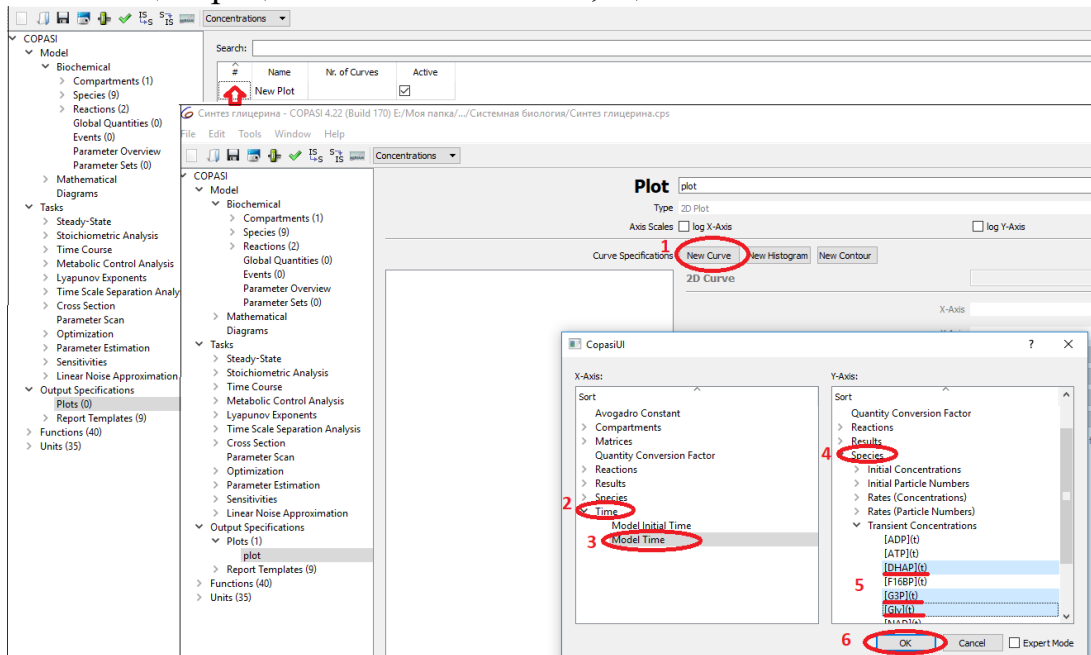


Рис. 1.7. — Оголошення графічної залежності у меню **Plots**

Повертаємось у вікно **Time course**. У рядку **Duration** задаємо час, упродовж якого ми бажаємо дослідити зміни концентрацій метаболітів. Задаємо 10 хв, натискаємо **Run**. У вікні з'являються графіки. Відключаєте кнопки унизу вікна, щоб побачити і проаналізувати отримані залежності (рис. 1.8).

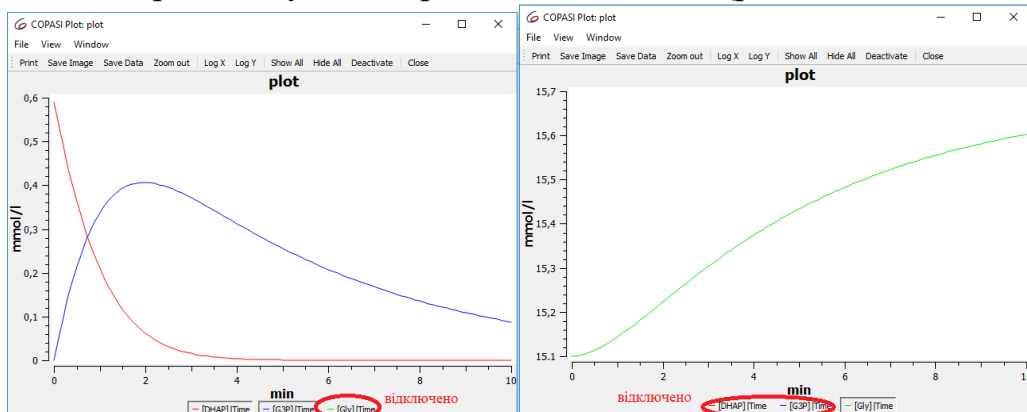
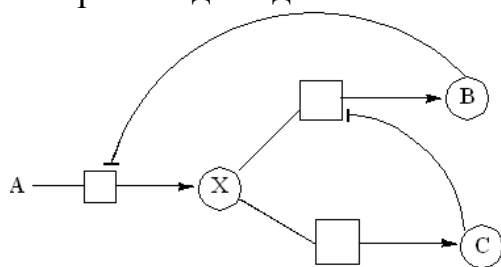


Рис. 1.8. — Зміни концентрацій метаболітів з часом

Завдання для самостійної роботи.

1. Створіть модель для такої метаболічної мережі:



Метаболічна мережа складається із трьох реакцій, у яких речовина А перетворюється на речовину X, яка потім може перетворюватись на В або С. Квадрати – це ферменти, що керують цими реакціями. Накопичення В приводить до гальмування реакції утворення X, а накопичення С гальмує реакцію перетворення X на В. Початкові концентрації речовин:

$$[A]_0 = 1\text{mM}, [B]_0 = 0,1\text{mM}, [C]_0 = 0,1\text{mM}, [X]_0 = 0.$$

<p>1. Реакція 1 являє собою оборотну реакцію Міхаеліса—Ментен з неконкурентним інгібітором В, кінетичне рівняння якої має вигляд:</p> $v = \frac{V^f \cdot \frac{[S]}{K_m S} - V^r \cdot \frac{[P]}{K_m P}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_m S} + \frac{[P]}{K_m P}\right) \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)},$ <p>де [S]—концентрація субстрату, [P]—концентрація продукту, [I]—концентрація інгібітора.</p> <p><i>Примітка.</i> Поміркуйте, що у цій реакції є субстратом, а що продуктом. Замість[S], [P] та [I] використовуйте в рівнянні позначення цих метаболітів.</p>	<p style="text-align: center;">R1</p> <p>Параметри:  <math>K_{ms} = 0,1 \text{ mM}</math>,  <math>K_{mp} = 0,1 \text{ mM}</math>, <math>V_f = 10 \text{ mM}/(1*s)</math>,  <math>V_r = 0,1 \text{ mM}/(1*s)</math>,  <math>K_i = 0,01 \text{ mM}</math>.</p>
<p>2. Реакція 2 являє собою необоротну реакцію Міхаеліса—Ментен з неконкурентним інгібітором 2-го порядку, кінетичне рівняння якої має вигляд:</p> $v = \frac{V_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_m}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) \cdot \left(1 + \left(\frac{[I]}{K_i}\right)^2\right)}$	<p style="text-align: center;">R2</p> <p>Параметри:  <math>K_m = 0,1\text{mM}</math>,  <math>V_{\max} = 2\text{mM}/(1*s)</math>,  <math>K_i = 0,1\text{mM}</math>.</p>
<p>3. Реакція 3 являє собою необоротну реакцію Міхаеліса—Ментен:</p> $v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$ <p><i>Примітка.</i> Кінетика рівняння 3 описується стандартним рівнянням, що є у базі COPASI. У</p>	<p style="text-align: center;">R3</p> <p>Параметри:</p>

рядку Rate Law виберіть Henri—Michaelis-Menten (irreversible).	$K_m = 0,1\text{mM}$ , $V_{\max} = 2\text{mM}/(1*s)$
--	---

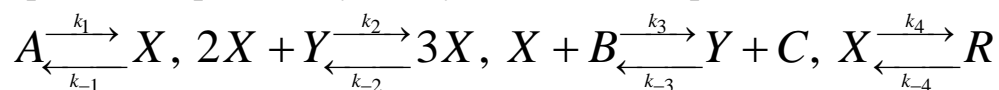
2. Побудуйте кінетичні залежності якщо 1) А, В, С є потоки, Х—метаболіт, 2) А, В, С, Х—внутрішні метаболіти.

## Робота 2. Модель брюсселятора

Якщо коливання мають постійний період і амплітуду, що встановлюються незалежно від початкових умов і підтримуються властивостями самої системи, без впливу періодичної сили, система називається автоколивальною. На фазовій площині такому типу поведінки відповідає стійкий граничний цикл.

Брюсселятор — базова модель, яка є класичним прикладом автоколивальної поведінки змінних (концентрацій) у системі хімічних реакцій.

Брюсселятор має таку схему гіпотетичних реакцій:



Тут А, В – вихідні речовини, С, D – продукти, Х, Y – інтермедіати. Нехай С та R вилучаються з реакційного середовища. Це означає, що зворотні константи  $k_{-3} = k_{-4} = 0$ . Якщо субстрат А знаходиться у надлишку, то  $k_{-1} = 0$ . Вважають також, що  $k_{-2} = 0$ . Значення інших констант прирівнюють до 1.

Тоді схема реакцій, що розглядається, описується системою рівнянь:

$$\frac{dX}{dt} = A - X \cdot (B+1) + X^2 \cdot Y$$

$$\frac{dY}{dt} = X \cdot (B - X \cdot Y)$$

$$A, B > 0, X, Y > 0.$$

Відтворимо модель брюсселятора у COPASI. Дані для моделі наведені у таблиці:


	Реакція	Параметри
R1	$A \xrightarrow{k_1} X$	[A] = 0,5mM, [X] = 3mM, [Y] = 3mM, [B] = 3mM, [C] = 0, [R] = 0. $k_1 = k_2 = k_3 = k_4 = 1$ . Тип А, В, С, R – fixed, X, Y – reaction.
R2	$2X + Y \xrightarrow{k_2} 3X$	
R3	$X + B \xrightarrow{k_3} Y + C$	
R4	$X \xrightarrow{k_4} R$	

Кінетика усіх реакцій описується законом діючих мас (Mass Action (irreversible)).

### Завдання:

- Отримайте часові зміни речовин Х та Y.
- Побудуйте фазовий портрет системи (залежність Х від Y).

3. Дослідить, як впливає зміна величин констант  $k_2$  та  $k_3$  на характер коливань  $X$  та  $Y$  у досліджуваній системі.

*Примітка.* З цією метою можна скористатися функцією Sliders. Виберіть меню Tools/Show sliders у меню або натисніть кнопку значка повзунка  на панелі інструментів. Виконайте дії, зображені на рис. 2.1.

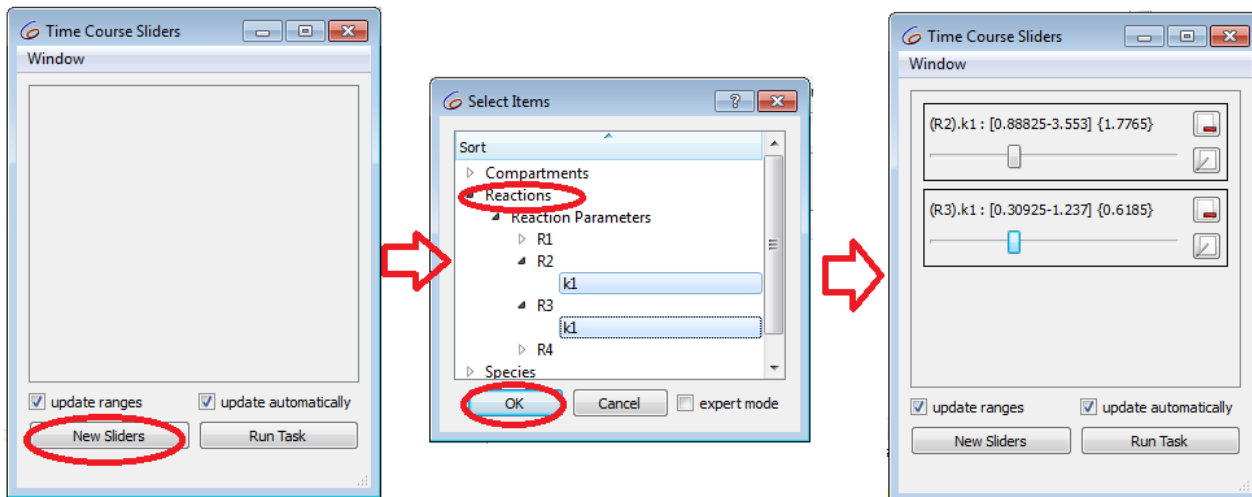


Рис. 2.1. — Процедура Time Course Sliders у COPASI

Переміщуйте повзунки за допомогою миші. Встановіть, за яких значень  $k_2$  та  $k_3$  у системі встановлюються а) регулярні коливання, б) затухаючі коливання.

4. Зробіть звіт по роботі.

### Робота 3. Мала модель верхнього гліколізу. Аналіз контролю метаболізму (Metabolic Control Analysis) у COPASI

Модель верхньої частини гліколізу зображена на рис. 3.1. Вона включає в себе шість реакцій і шість метаболітів. Зверніть увагу, що тут ми нехтуємо утворенням фосфату  $P_i$ . Модель включає реакції поглинання глюкози ( $v_1$ ), фосфорилування глюкози при перетворенні ATP в ADP під дією ферменту гексокінази ( $v_2$ ), внутрішньо-молекулярні перегрупування при дії ферменту фосфоглюкоізомераз (phosphoglucosomerase) ( $v_3$ ), друга стадія фосфорилування (і ATP/ADP конверсія) за участю фосфофруктокінази ( $v_4$ ), дефосфорилування без участі ATP/ADP за участю фруктозобісфосфатази (fructosebisphosphatase) ( $v_5$ ), і розщеплення гексози (C6-цукру) на дві триози (C3-цукри) за допомогою альдолази ( $v_6$ ).

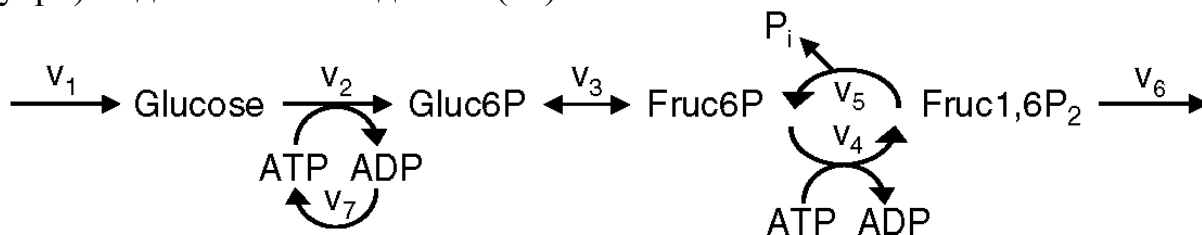


Рис. 3.1. — Мала модель верхнього гліколізу. Скорочення: Gluc-6P – глюкозо-6-фосфат, Fruc-6P — фруктозо-6-фосфат, Fruc-1,6P2 — фруктозо-1,6-бісфосфат.

Система диференціальних рівнянь (ODE) подана так:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \text{Glucose} &= v_1 - v_2 \\ \frac{d}{dt} \text{Gluc6P} &= v_2 - v_3 \\ \frac{d}{dt} \text{Fruc6P} &= v_3 - v_4 + v_5 \\ \frac{d}{dt} \text{Fruc1,6P}_2 &= v_4 - v_5 - v_6 \\ \frac{d}{dt} \text{ATP} &= -\frac{d}{dt} \text{ADP} = -v_2 - v_4 + v_7. \end{aligned}$$

Виходячи з кінетики діючих мас, рівняння швидкості мають такий вигляд:

$v_1 = \text{const} = k_1$	$k_1 = 0.25,$
$v_2 = k_2 \cdot \text{Glucose} \cdot \text{ATP}$	$k_2 = 1, \text{Glucose}(0.01) = 0, \text{ATP}(0) = 0.5$
$v_3 = k_3 \cdot \text{Gluc6P} - k_{-3} \cdot \text{Fruc6P}$	$k_3 = 1, k_{-3} = 1, \text{Gluc-6P}(0.02) = \text{Fruc-6P}(0) = 0.01$
$v_4 = k_4 \cdot \text{Fruc6P} \cdot \text{ATP}$	$k_4 = 1$
$v_5 = k_5 \cdot \text{Fruc1,6P}_2$	$k_5 = 1, \text{Fruc-1,6P}_2(0) = 0.01$
$v_6 = k_6 \cdot \text{Fruc1,6P}_2$	$k_6 = 1$
$v_7 = k_7 \cdot \text{ADP}$	$k_7 = 2.5, \text{ADP}(0) = 0.5$

**Завдання:**

1. Створити модель. Одиниці, що використовуються в моделі: час – с, об'єм – л, одиниці концентрацій – мМ.
2. Побудувати часові залежності зміни концентрацій метаболітів з часом.
3. Побудувати фазові портрети (залежності концентрацій усіх метаболітів від концентрації АТФ).
4. Розрахуйте стаціонарні значення концентрацій і потоків реакцій.
5. Якщо модель складена правильно, то ви повинні отримати залежності, показані на рис. 3.2.

Ми бачимо, що, починаючи з нуля концентрації усіх гексоз (глюкози, фруктози та їхніх фосфорильованих метаболітів), зростають доти, поки виробництво і деградація АТФ не збалансовані. З часом вони наближаються до стаціонарного стану. Вміст АТФ зростає, а потім зменшується таким же чином, як вміст АДФ зменшується і підвищується, в той час як їх сума залишається постійною. Це пов'язано зі збереженням загального пулу аденіннуклеотидів.

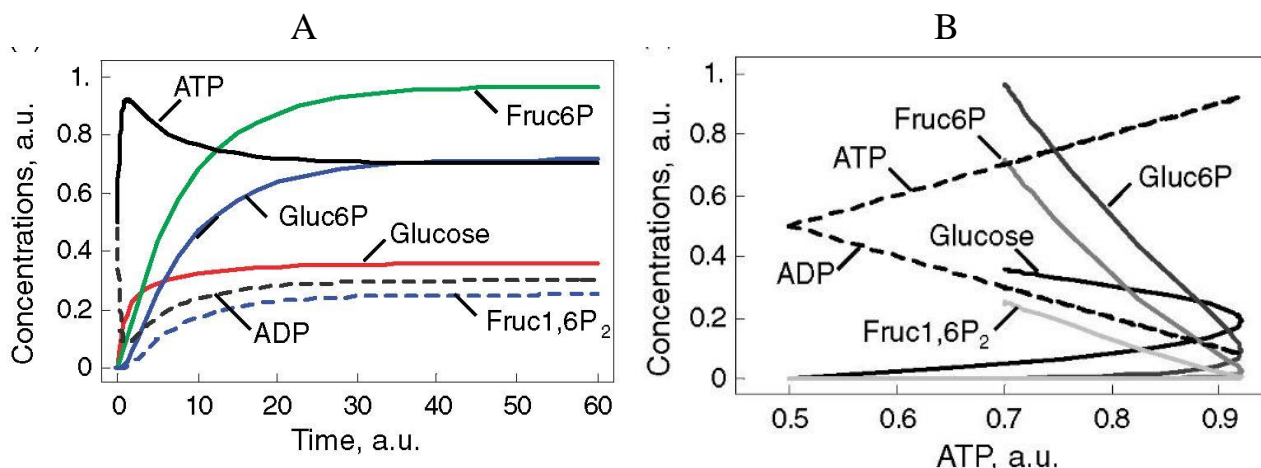


Рис. 3.2. — Динамічна поведінка моделі верхньої частини гліколізу: а — зміна концентрацій метаболітів у часі, б — фазовий портрет (зміна в часі концентрації метаболітів залежно від концентрації АТФ); всі криві починаються з точки АТФ = 0.5 для  $t = 0$

### Аналіз контролю метаболізму

COPASI обчислює коефіцієнти еластичності, коефіцієнти контролю потоків і коефіцієнти контролю концентрацій. Розрахувати ці показники для моделі можна за умови наявності стаціонарного стану, користуючись Task > Metabolic Control Analysis.

Коефіцієнти еластичності визначають зміну швидкості реакції при зміні концентрації окремого метаболіту. Еластичності всіх реакцій щодо метаболітів моделі обчислюються та виводяться в COPASI у вигляді таблиці, стовпці якої відповідають метаболітам, а рядки — реакціям. Якщо коефіцієнт еластичності менший нуля, то це означає, що зростання концентрації метаболіту приводить до зниження величини потоку реакції. Якщо еластичність дорівнює нулю, то це означає, що концентрація метаболіту не має ніякого впливу на швидкість реакції. Еластичність — властивість суворо однієї реакції і не залежить від іншої частини системи. Обчислення коефіцієнта еластичності виконується тільки з кінетичного закону швидкості відповідної реакції. Аналогічно, в експерименті еластичність може бути виміряна *in vitro*, при використанні очищеного ферменту, і за умови, що концентрації субстратів і продуктів знаходяться в межах фізіологічних величин (і за умови, що властивості ферменту залишаються тими ж після очищення).

На рисунку 3.3 наведено результат розрахунків коефіцієнтів еластичності для моделі верхньої частини гліколізу. Видно, що ці коефіцієнти відображають кінетичні рівняння, наведені в роботі. Наприклад, у другому рядку для R2 для АТФ і глюкози маємо коефіцієнт еластичності 1, що співпадає зі ступенем, в який введено концентрацію цього метаболіту у законі діючих мас:

$$v_2 = k_2 \cdot \text{Glucose} \cdot \text{ATP}.$$

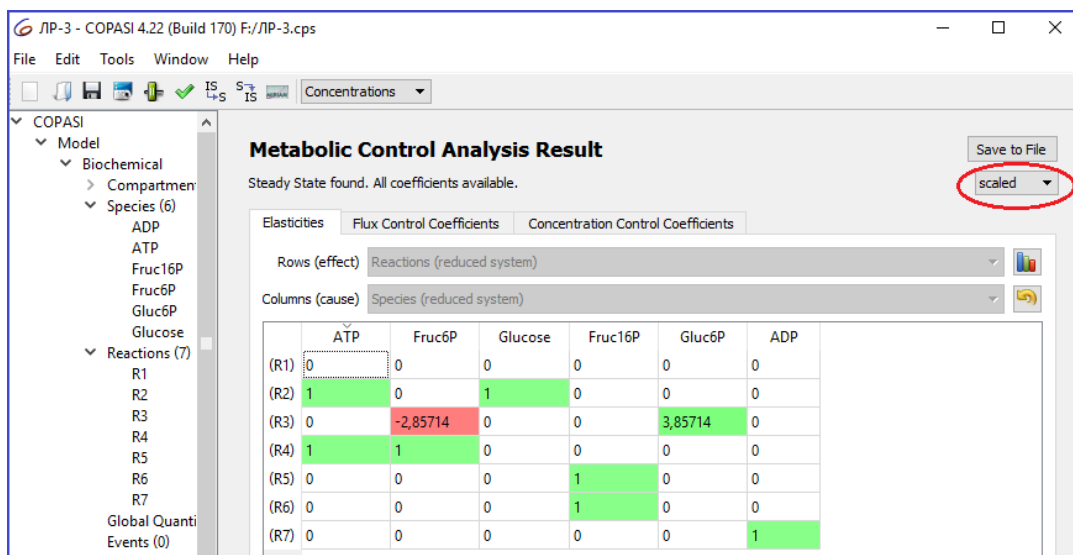


Рис. 3.3. — Розрахунок коефіцієнтів еластичності

У COPASI коефіцієнти чутливості можуть бути показані нормованими або ненормованими величинами. Нормовані величини (scaled) описують відносні зміни, наприклад, нормована чутливість 0,5 означає, що, якщо параметр збільшений на 10 %, цільова величина збільшиться на 5 % (на половину від 10 %). Ненормована чутливість описує абсолютні зміни, наприклад, ненормована еластичність 0,5 може означати, що збільшення концентрації субстрату на 1 мМ призведе до збільшення потоку реакції на 0,5 мМ/с (якщо ті будуть у тих одиницях, що використовуються в моделі). Відносна чутливість найбільш часто використовується в літературі, особливо в аналізі метаболічного контролю.

На відміну від еластичностей, коефіцієнти контролю — глобальні властивості, які залежать від цілої системи. Вони визначають ступінь зміни стаціонарного потоку однієї реакції, коли інша реакція стає повільнішою або швидшою. Для формалізму МСА не має значення, за яких умов реакція протікає швидше або повільніше, але практично це відбувається при зміні концентрації ферменту. Наприклад, у системі, що знаходиться в стійкому стані, в певний момент ми збільшуємо концентрацію одного з ферментів на 1 %. Після певного часу буде досягнуто новий стійкий стан, при цьому всі концентрації і потоки в системі зміняться. Відносна зміна одного з потоків реакції — коефіцієнт контролю за потоком цієї реакції щодо реакції зі зміненою концентрацією ферменту. Як і в разі еластичностей, всі комбінації коефіцієнтів контролю за потоком, що обчислюються в COPASI, показані в таблиці (рис. 3.4), де стовпчик вказує на швидкість реакції, яка змінена, а рядок вказує на потік реакції, який було порушено. Той факт, що таблиця практично не містить нулів, вказує, що коефіцієнти — глобальні властивості системи: зміна в одній реакції змінює стаціонарні всі реакції. Сума всіх нормованих коефіцієнтів контролю за певним потоком (сума коефіцієнтів по рядку) дорівнює 1.

Так, реакція R1, що проходить зі швидкістю  $v_1$ , має коефіцієнти контролю в 1 над усіма стаціонарними потоками, реакції R2, R3, R4, R7 (їх швидкості  $v_2$ ,  $v_3$ ,  $v_4$ , і  $v_7$ ) не мають ніякого контролю над потоками. Реакції R5, R6 (їх швидкості

$v_5$  і  $v_6$ ) мають позитивний або негативний контроль над потоками  $J_4$ ,  $J_5$  і  $J_7$ , оскільки вони контролюють обіг фруктози і фосфатів.

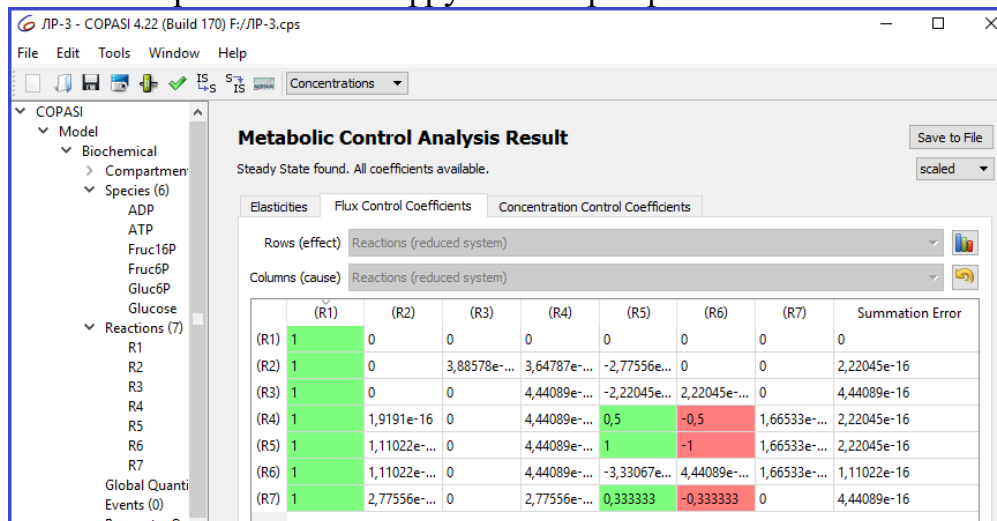


Рис. 3.4. — Розрахунок коефіцієнтів контролю за потоком

Коефіцієнти контролю за концентраціями описують, як стаціонарні концентрації змінюються залежно від змін певних показників реакції. Основна відмінність між ними і коефіцієнтами контролю за потоком — те, що вони складають у сумі 0, а не 1.

Контроль концентрацій показує більш цікаву закономірність. Як правило, він показує, що реакції, які виробляють метаболіт, мають позитивний контроль, а реакції, у яких метаболіт витрачається, мають негативний контроль, (наприклад, реакції R1 і R2 для глюкози). Але і віддалені реакції можуть здійснювати контроль над концентраціями, наприклад, реакції R4 і R6 над Gluc6P.

Важливо мати на увазі, що еластичності і коефіцієнти контролю надають інформацію тільки про невеликі зміни в моделі. Виходячи з коефіцієнтів контролю, можна достовірно передбачити, яким буде ефект 5 % -ого збільшення експресії одного з ферментів, але неможливо передбачити ефект десятикратного збільшення або зменшення.

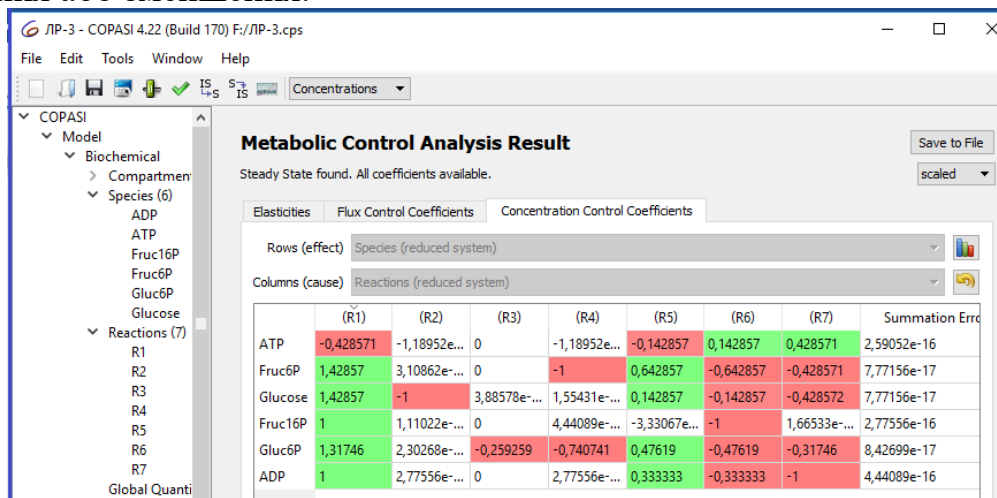


Рис. 3.5. — Розрахунок коефіцієнтів контролю за концентраціями метаболітів



Більш повні моделі гліколізу можуть бути використані для вивчення деталей динаміки, таких як виникнення коливань або вплив збурень. Прикладами є моделі Нунне з колегами [6] або групи Рейсс [7].

#### **Робота 4. Аналіз метаболічного контролю синтезу метіоніну в *Arabidopsis thaliana***

Різушка Таля (лат. *Arabidópsis thaliána*) — рослина сімейства Капустяні. Це невеликі квіткові рослини, що виростають в Європі, Азії і на північному заході Африки. Зважаючи на відносно короткий річний цикл розвитку, є зручним модельним організмом у біологічних дослідженнях, де відома під транслітерацією родового латинської назви — *арабідопсис*. Геном арабідопсиса є найменшим відомим геномом квіткової рослини і першим секвенованим геномом рослини. Арабідопсис — популярний об'єкт для дослідження життєдіяльності рослин, у тому числі розвитку квітки і фототропізму.

##### **Опис моделі біосинтезу метіоніну і треоніну в *Arabidopsis thaliana***

На рис. 4.1 показані всі кінетичні зв'язки, ідентифіковані в дослідженнях, виконаних *in vitro*. У рослинах і мікроорганізмах аспартат служить попередником для синтезу лізину, метіоніну і треоніну. Треонін — попередник для синтезу ізолейцину, а метіонін — прямий попередник S-аденозилметіоніну (AdoMet). У рослинах перехід між шляхами синтезу метіоніну і треоніну відбувається на рівні фосфогомосерину (Phser) і залучає цистіонін- $\gamma$ -синтазу (CGS) і треонінсинтазу (TS). Виробництвом одержуваних з аспартату амінокислот у рослинах, як вважають, керують чисельні алостеричні ефектори, ідентифіковані *in vitro* (показані на рис. 4.1 у вигляді пунктиру). Область, позначена пунктиром, вказує на межі системи точки поділу потоку Phser, робота якої аналізується у цьому практикумі. У мікроорганізмах поділ між шляхами біосинтезу метіоніну і треоніну відбувається на рівні гомосерину із залученням різних ферментів та алостеричних ефекторів.

Відомо, що (а) гомосеринкіназа, що поставляє фосфогомосерин (Phser), каталізує необоротну реакцію і не гальмується своїм продуктом Phser в рослинах; (б) CGS і TS каталізують незворотні реакції; (в) активність CGS залежить від концентрації Phser і цистеїну і не піддається алостеричному контролю в рослинах; (г) активність TS стимулюється AdoMet і гальмується АМФ *in vitro*; (д) Pi пригнічує активність і CGS і TS; (е) цистіонін і треонін не гальмують активність CGS і TS і (ж) Phser не є алостеричним ефектором прямої ферментативної реакції. Дійсно, концентрація Phser значно змінювалася (20-кратне збільшення) у трансгенних рослинах зі збільшеною активністю CGS. Тому концентрація Phser залежить виключно від потоку Phser і від активностей CGS і TS. Отже, можна моделювати кінетику точки поділу потоків, якщо відомі рівняння швидкостей реакцій, що каталізують CGS і TS, швидкість потоку Phser і концентрації AdoMet, цистеїну, Pi і цих двох ферментів у метаболічному контексті.

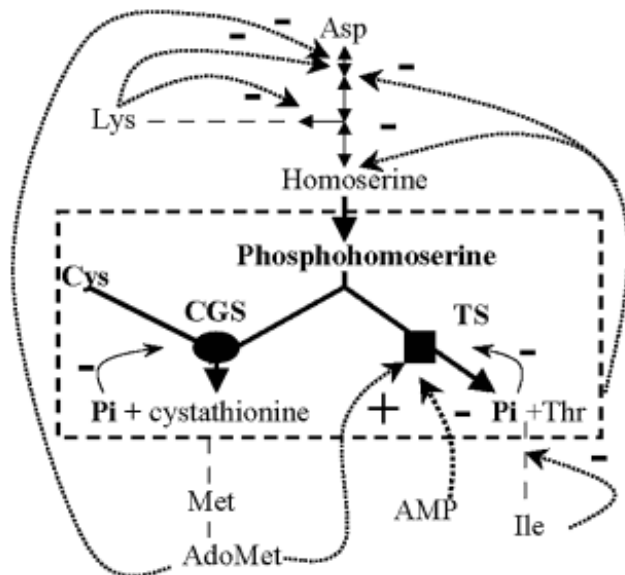


Рис. 4.1. — Точка поділу потоку Phser в аспартат-амінокислотному шляху в рослинах [8]

### **Завдання для виконання роботи.**

1. Завантажити модель із сайту BioModels Database. У рядку пошуку введіть ім'я моделі MetThr\_synthesis. Код моделі BIOMD0000000068. Клацніть по ньому мишею. Скористайтеся меню Download SBML і скачайте файл SBML L2V1 (curated).

2. Завантажте файл у Copasi, використовуючи команди Files, Import SBML. Збережіть файл у форматі Copasi.

3. Виконайте аналіз контролю метаболізму. Проаналізуйте коефіцієнти контролю потоків і коефіцієнти контролю концентрацій.

3.1. Проаналізуйте вплив величин потоків реакцій, які каталізуються гомосерінкіназою, цистатіонін- $\gamma$ -синтазою і треонінсинтазою на інші реакційні потоки.

3.2. Проаналізуйте вплив величин потоків реакцій, які каталізуються Phser (гомосерінкіназой), цистатіонін- $\gamma$ -синтазою на концентрацію фосфогомосерину (Phser).

4. Використовуючи процедуру «Parameter Scan», дослідить вплив на величини потоків цистатіоніну і треоніну, та стаціонарну концентрацію фосфогомосерину наступних параметрів:

4.1. Концентрації Pi (концентрацію даного метаболіту варіюйте від 0 до 20000 мкМ).

4.2. Концентрації Cys (концентрацію даного метаболіту варіюйте від 0 до 29 мкМ).

4.3. Концентрації AdoMet (концентрацію даного метаболіту варіюйте від 0 до 40 мкМ).

4.4. Концентрації цистатіонін- $\gamma$ -синтази (концентрацію ферменту варіюйте від 0 до 20 мкМ).

4.5. Концентрації треонінсинтази (концентрацію ферменту варіюйте від 0 до 20 мкМ).

4.6. Величини вхідного потоку фосфогомесеріна (величину потоку варіюйте від 0 до 2 мкМ/с).

5. Зробіть висновки про роботу даної метаболічної мережі.

### Процедура «Parameter Scan» у COPASI

Розберемо, як виконати процедуру «Parameter Scan» у COPASI на прикладі завдання 4.3. Тобто нам потрібно дослідити, як концентрація аденозинметіоніну (AdoMet) впливає на розподіл між потоками цистатіоніну і треоніну, а також на концентрацію фосфогомосерину.

Послідовно виконуємо операції, показані на рисунку 4.2. Зверніть увагу, що ми повинні вказати, вплив чого будемо досліджувати. У нашому випадку це початкові концентрації AdoMet. Натисніть ок. Після виконання усіх попередніх операцій потрапляємо у вікно Parameter Scan (рис. 4.3), де вже показаний об'єкт дослідження. Корегуємо кількість інтервалів, максимальне і мінімальне значення концентрації AdoMet відповідно до завдання.

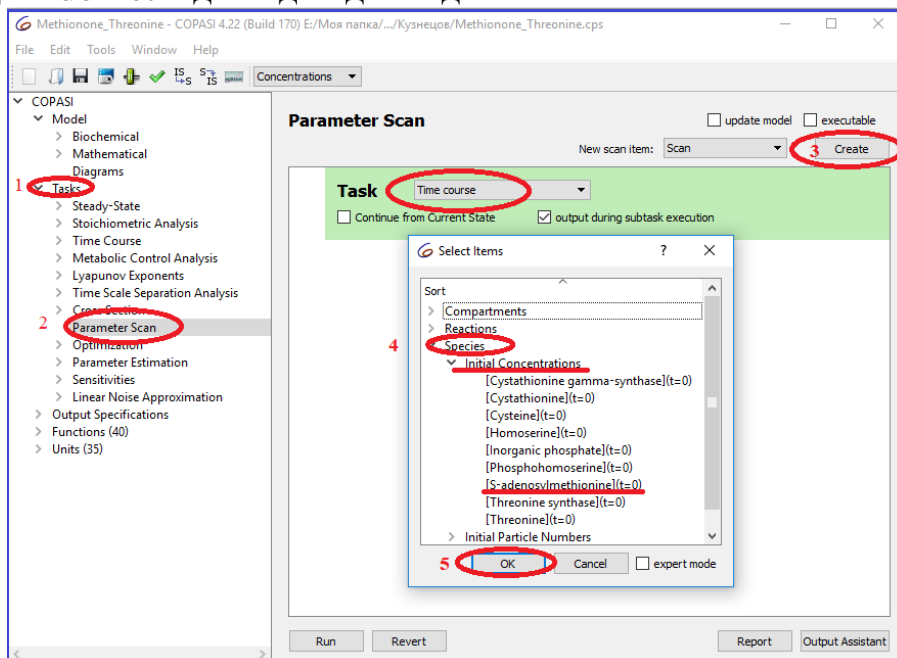


Рис. 4.2. — Вибір параметрів сканування

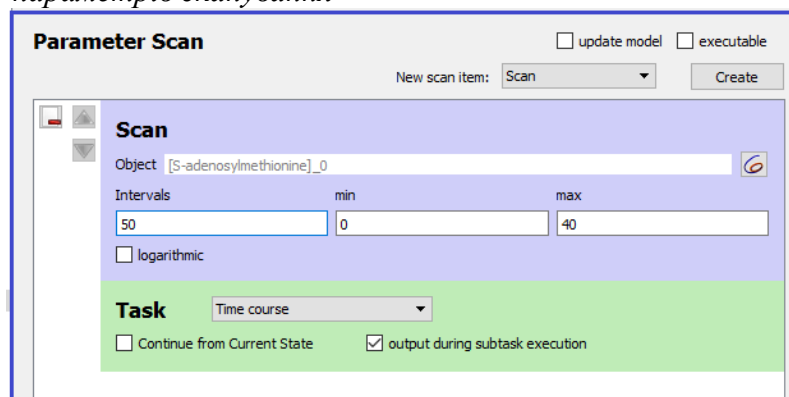


Рис. 4.3. — Вікно Parameter Scan у COPASI

Увага! Перед тим, як натиснути Run, потрібно задати графічні залежності, на яких будуть показані результати розрахунків. Це можна зробити за

допомогою Output Specifications> Plots. У вікні справа двічі клацаємо по рядку New Plot і у вікні Plot робимо установки, як на рис. 4.4. Зверніть увагу, що на осі  $x$  будуть відкладатися значення **початкових** концентрацій AdoMet, а на осі  $y$  – значення потоків реакцій, що надходять через цистатіонін- $\gamma$ -синтазу (CGS) і треонінсинтазу (TS). Аналогічно задайте другу залежність **перехідної** концентрації фосфогомосерину від **початкової** концентрації AdoMet.

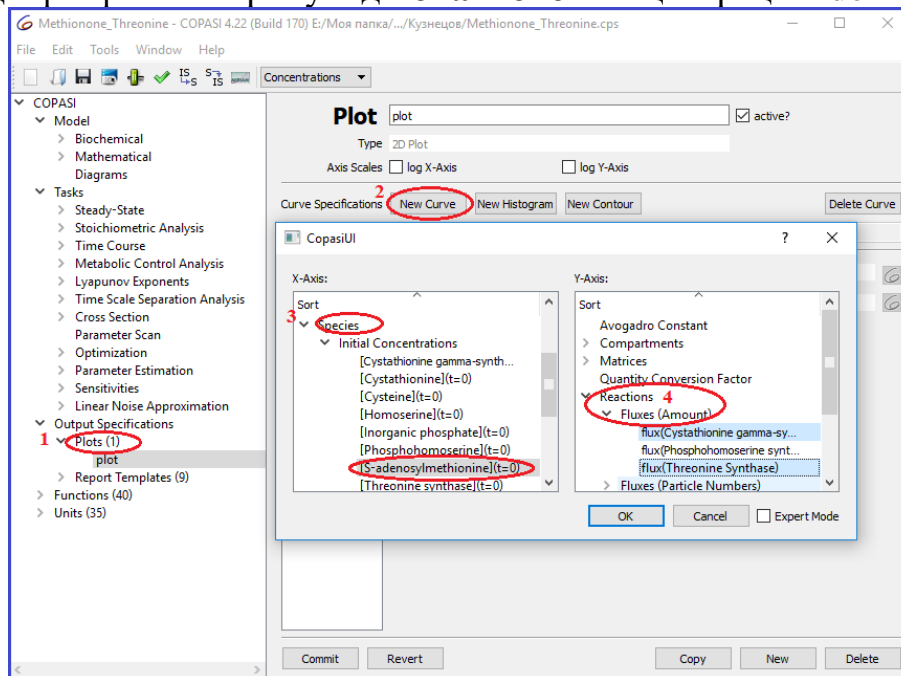


Рис. 4.4. — Підготовка графічних залежностей для процедури Parameter Scan

Ви повинні отримати залежності, як на рис. 4.5. Розрахунки показують, що концентрація AdoMet істотно впливає на розподіл потоку Phser.

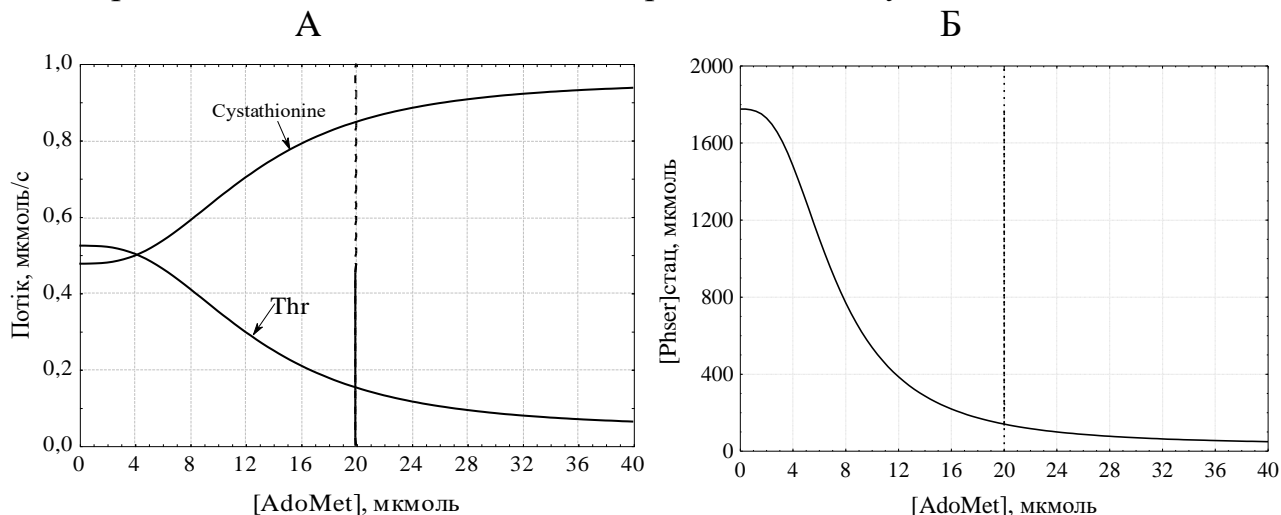


Рис. 4.5. — А– Вплив концентрації AdoMet на величини потоків цистатіонину і треоніну. Б– Вплив концентрації AdoMet на стаціонарну концентрацію фосфогомосерину

При фізіологічній концентрації AdoMet 20  $\mu\text{M}$  потік треоніну ( $J_{\text{Thr}}$ ) більше, ніж цистатіоніну ( $J_{\text{cystathionine}}$ ), що підтверджено експериментально [8]. Отже, зміна концентрації AdoMet сприяє кількісно еквівалентним протилежним змінам

потоків треоніну і цистатіоніну. При концентрації AdoMet 20  $\mu\text{M}$  потік Jcystathionine в шість разів більш чутливий до AdoMet, ніж JThr. Ці обчислення висувають на перший план асиметрію в точці розділення потоків. JThr і Jcystathionine не еквівалентні щодо змін концентрацій AdoMet.

Крім того, зростання концентрації AdoMet призводить до істотного зниження стаціонарної концентрації фосфогомосеріна (рис. 4.5Б).

### Робота 5. Математичний аналіз накопичення цукру в *Saccharum officinarum*

Модель описує накопичення сахарози у стеблі цукрової тростини. Сахароза як продукт фотосинтезу транспортується по флоемі від листя до стебла, де значна частина гідролізується до глюкози і фруктози. Модель описана в роботі [9] і знаходиться в базі biochem database під номером BIOMD0000000023.

У цитоплазмі клітин стебла сахароза синтезується в багатьох реакціях і потім транспортується у вакуоль, де накопичується. Наведена модель розглядає реакції, які безпосередньо залучаються до синтезу сахарози і її накопичення. У зв'язку з цим, реакції більш низької частини гліколізу, починаючи від фруктозо-6-фосфату, являють один реакційний блок. На рисунку 5.1 показана метаболічна мережа накопичення цукру у тканинах стебла цукрової тростини.

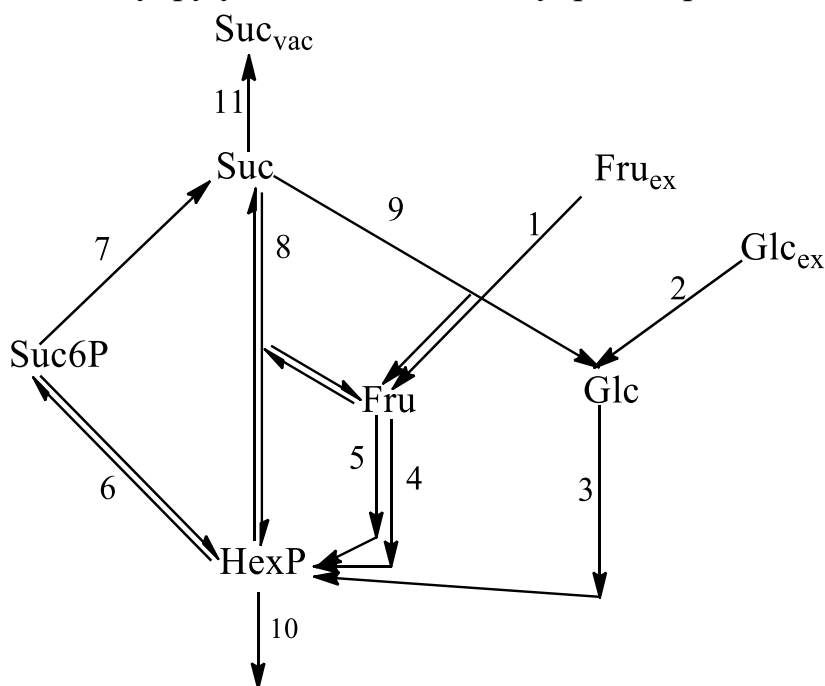


Рис. 5.1. — Накопичення цукру у тканинах стебла цукрової тростини [9]

На схемі показані такі реакції:

1 – надходження фруктози (Fru)	$\text{Fru}_{\text{ex}} \rightarrow \text{Fru}$	незворотні потоки, що описуються кінетикою Міхаеліса—Ментен, із внутрішньоклітинним
2 – надходження глюкози (Glu) ззовні	$\text{Glc}_{\text{ex}} \rightarrow \text{Glc}$	

		цукром, що діє як конкурентний інгібітор відповідної транспортної системи
3 – гексокіназна реакція (фосфорилування глюкози)	$\text{Glc} + \text{ATP} \rightarrow \text{HexP} + \text{ADP}$	необоротна бі-субстратна реакція
4 – гексокіназна реакція (фосфорилування фруктози)	$\text{Fru} + \text{ATP} \rightarrow \text{HexP} + \text{ADP}$	необоротна бі-субстратна реакція
5 – реакція, що каталізується фруктокіназою	$\text{Fru} + \text{ATP} \rightarrow \text{HexP} + \text{ADP}$	необоротний бі-субстратний механізм
6 – реакція, що каталізується сахарозофосфатсинтазою	$2 \text{HexP} = \text{UDP} + \text{Suc6P}$	оборотний бі-субстратний механізм
7 – сахарозофосфатфосфатазна реакція	$\text{Suc6P} \rightarrow \text{Suc} + \text{phos}$	необоротна реакція, кінетика Міхаеліса—Ментен
8 – сахарозосинтазна реакція	$\text{HexP} + \text{Fru} = \text{Suc} + \text{UDP}$	оборотний бімолекулярний механізм
9 – інвертазна реакція	$\text{Suc} \rightarrow \text{Fru} + \text{Glc}$	необоротна реакція, кінетика Міхаеліса—Ментен
10 – гліколіз	$\text{HexP} \rightarrow \text{glycolysis}$	нижня частина гліколізу
11 – транспорт сахарози у вакуоль	$\text{Suc} \rightarrow \text{Sucvac}$	необоротна реакція, кінетика Міхаеліса—Ментен

Реакція 6 у прямому напрямку йде з утворенням сахарозо-6-фосфату (Suc6P) і має стехіометрію 2 для HexP (фруктозо-6-фосфату і UDP-глюкози). Реакція 8 у прямому напрямку йде з утворенням сахарози (Suc). Гексозо-фосфатний басейн розглядається як рівноважний блок, до складу якого входять UDP-глюкоза, глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат і фруктозо-6-фосфат. У схемі прийняті такі позначення: HexP – гексозофосфат; індекс «ex» – позаклітинний; індекс «vac» – вакуоль.

Математична модель досліджуваного процесу описується такою системою диференціальних рівнянь:

$$\frac{d[\text{Glc}]}{dt} = v_2 - v_3 + v_9$$

$$\frac{d[\text{Fru}]}{dt} = v_1 - v_4 - v_5 - v_8 + v_9$$

$$\frac{d[\text{HexP}]}{dt} = v_3 + v_4 + v_5 - 2v_6 - v_8 - v_{10}$$

$$\frac{d[Su\text{c}6P]}{dt} = v_6 - v_7$$

$$\frac{d[Su\text{c}]}{dt} = v_7 + v_8 - v_9 - v_{11}.$$

### Розрахунок кількості елементарних мод у програмі COPASI

**Метод елементарних мод** розглядає всі можливі спрямовані шляхи від одного зовнішнього метаболіту до іншого (при цьому внутрішні метаболіти накопичуватися не повинні). Метод розглядає стаціонарні стани, не вимагає оптимізації і враховує оборотність реакцій. Елементарна мода — спрямований шлях, що включає мінімальний набір реакцій від одного зовнішнього метаболіту до іншого.

Метаболічна мережа синтезу сахарози (рис. 5.1) надзвичайно розгалужена. Важко передбачити візуально розподіл потоку через цю систему для різних умов, вже не кажучи про фактори, які визначають цей розподіл. Корисним інструментом у подібному аналізі є обчислення елементарних потоків, які визначаються як мінімальний набір реакцій, які можуть брати участь в утворенні стаціонарного потоку в метаболічній системі [10]. Будь-який встановлений розподіл потоку може бути представлений як лінійна комбінація різних елементарних способів потоку, і крім того, повний набір елементарних потоків унікальний для кожної метаболічної системи. Повний аналіз елементарних потоків необхідний: (а) для виявлення непотрібних циклів у системі; (б) визначення всіх можливих маршрутів від даного субстрату шляху до продукту; і (в) виявлення тих метаболічних маршрутів, які виробляють продукт з найвищим виходом.

У програмі COPASI ця процедура знаходиться під вкладкою Tasks, Stoichiometric Analysis, Elementary Modes. Запустити обчислення — кнопка Run у відповідному вікні.

Результат обчислення способів реалізації елементарних потоків (мод) для системи сахарози показаний у табл. 5.1.

Таблиця 5.1. Елементарні потоки в біосинтезі сахарози. В () вказані номери мод, що збігаються з нумерацією мод в COPASI.

№ моди	Послідовність реакцій	Брутто реакція
1	R3→R8→R9	ATP = UDP + ADP
2 (4)	R4→R6→R7→(−R8)	Pi + ADP = ATP
3 (2)	R5→R6→R7→(−R8)	Pi + ADP = ATP
4 (5)	R3→R4→R6→R7→R9	2ATP = UDP + 2ADP + Pi
5 (3)	R3→R5→R6→R7→R9	2ATP = UDP + 2ADP + Pi
6 (8)	R1→R4→R10	Fru <sub>ex</sub> →glicolis
7 (7)	R1→R5→R10	Fru <sub>ex</sub> →glicolis
8 (6)	R2→R3→R10	Glc <sub>ex</sub> →glicolis

9 (12)	(2R1)→(2R4)→R6→R7→R11	2Fru <sub>ex</sub> →Suc <sub>vac</sub>
10 (11)	(2R1)→(2R5)→R6→R7→R11	2Fru <sub>ex</sub> →Suc <sub>vac</sub>
11 (9)	(2R2)→(2R3)→R6→R7→R11	2Glc <sub>ex</sub> →Suc <sub>vac</sub>
12 (14)	(2R1)→R4→R8→R11	2Fru <sub>ex</sub> →Suc <sub>vac</sub>
13 (13)	(2R1)→R5→R8→R11	2Fru <sub>ex</sub> →Suc <sub>vac</sub>
14 (10)	R1→R2→R3→R8→R11	Fru <sub>ex</sub> +Glc <sub>ex</sub> →Suc <sub>vac</sub>

Видно, що п'ять із цих 14 способів (1—5) є марними циклами, що не приводять до утворення будь-якого продукту. В одному з них (мода 1) сахарозосинтазна реакція йде в напрямку синтезу сахарози, тоді як у двох інших (моди 2 і 3) фермент працює в іншому напрямку. У всіх непотрібних циклах сахароза синтезується і витрачається знову (в інвертазних реакціях (моди 1, 4 і 5) або сахарозосинтазній (моди 2 і 3)). Тобто, бруто реакція непотрібних циклів не нуль, а скоріше гідроліз АТФ до АДФ (Рис. 5.1, реакції 3—5), або УТФ до Рі (реакції 6 і 8), або обидва ці процеси. Це підтверджує факт, що даремні цикли – енергетично коштовні процеси. Залишаються елементарні способи, які або втягують гексози у процес гліколізу (моди 6—8) або синтезують сахарозу з гексоз (способи 9—14). Як очікувалося, два моля гексози завжди потрібні для синтезу сахарози; для синтезу може використовуватися тільки фруктоза (моди 9, 10, 12 і 13), або тільки глюкоза (мода 11), або один моль глюкози і фруктози (мода 14).

На рисунку 5.2 показані деякі з розрахованих елементарних шляхів.

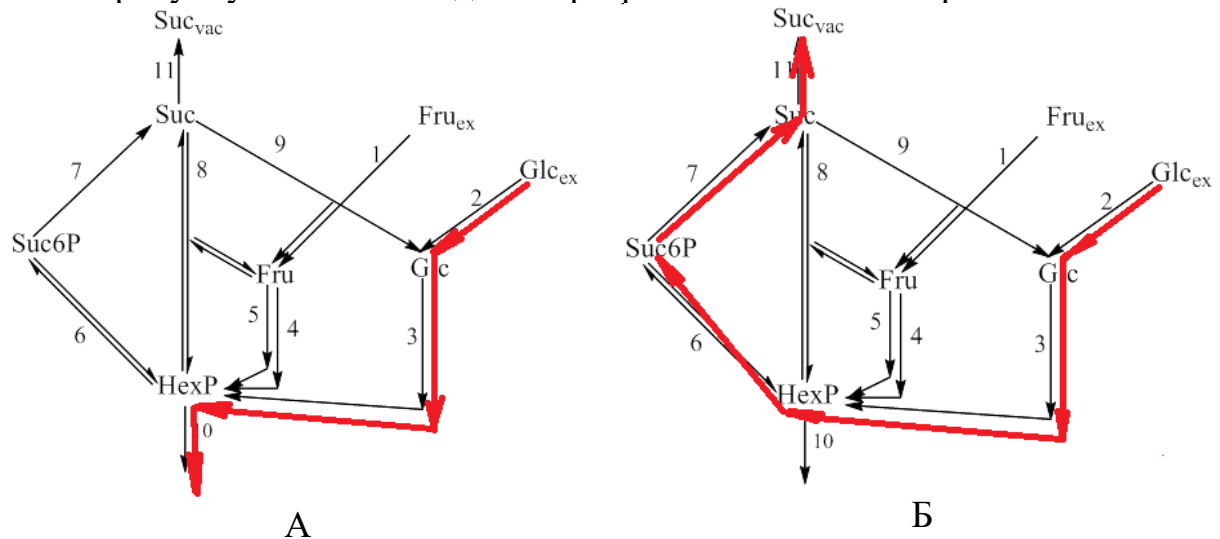


Рис. 5.2. — А – мода 8 (6) і Б – мода 11 (9).

У той час, коли аналіз елементарних потоків дозволяє знайти непотрібні цикли і оптимальні шляхи для синтезу продукту, він не може встановити, які фактори будуть впливати на розподіл потоку в метаболічній мережі і викликати перехід від одного способу до іншого, оскільки цей метод розглядає тільки стехіометричну інформацію. Все ж метаболічна поведінка залежить не тільки від стехіометрії, але також і від термодинаміки і кінетики. Щоб зрозуміти динаміку



накопичення сахарози більш повно, потрібно розглядати кінетичні і термодинамічні властивості ферментів, залучених у модель.

### ***Завдання до лабораторної роботи.***

1. Для роботи використовуйте файл викладача.
2. Розрахуйте зміни концентрацій внутрішніх метаболітів у часі. Встановіть верхню межу часу 600 хв. Зверніть увагу на значення стаціонарних концентрацій глюкози і фруктози.
3. Проведіть аналіз контролю метаболізму. Визначте, потоки яких реакцій істотно впливають на процес накопичення сахарози у вакуолі і реакцію гідролізу сахарози.
4. Припустимо, необхідно підвищити накопичення сахарози в цукровій тростині. Для цього ми будемо впливати на експресію генів, які кодуєть ферменти, що керують реакціями 1, 2, 3, 4, 5. Кількість ферменту відображає величина  $V_{\max}$  кінетичного рівняння. Дослідіть, використовуючи процедуру Parameter Scan, вплив  $V_{\max}$  реакцій 1—5 на потоки  $J_{11}$  і  $J_9$  (процесів накопичення сахарози і її гідролізу).  $V_{\max}$  варіюйте в інтервалі від 0 до 0,6. Побудуйте графіки і зробіть відповідні висновки.
5. Використовуючи процедуру Optimization, виконайте дослідження, яким чином потрібно змінити  $V_{\max}$  реакцій 1—5 для того, щоб звести до мінімуму процес гідролізу сахарози і максимізувати накопичення сахарози у вакуолях цукрової тростини.

### **Опис процедури Optimization**

Оптимізація полягає в пошуку максимальних або мінімальних значень деякої функції, яку називають *цільовою функцією*. В біохімічному моделюванні оптимізація може бути використана для пошуку умов, при яких модель поводить ся в деякому бажаному напрямку. Оскільки біохімічні моделі складаються з нелінійних функцій і їхні змінні можуть мати кілька мінімумів або максимумів, існує проблема глобальної оптимізації, тобто пошуку глобального максимуму або мінімуму. Рішення задач глобальної оптимізації пов'язано з певними складнощами, одже добре відомо, що жоден алгоритм не є оптимальним для пошуку глобального екстремуму функції. COPASI оснащений різноманітними алгоритмами оптимізації, в основі яких знаходяться дуже різні стратегії, у зв'язку з цим слід шукати найкраще рішення, використовуючи більше ніж один алгоритм.

Щоб продемонструвати застосування методів оптимізації, ми продовжимо аналізувати модель накопичення сахарози в цукровій тростині. Накопичення сахарози вимірюється стаціонарним потоком реакції  $J_{v11}$ , проте деяка кількість сахарози гідролізується в інвертазній реакції  $v_9$ , що знижує ефективність накопичення сахарози. Таким чином виникає проблема, пов'язана із з'ясуванням умов, що приводять до максимального накопичення сахарози при мінімальному гідролізі. Цю проблему можна розглядати як типову проблему оптимізації, де ми зацікавлені у мінімізації відношення потоків  $J_{v9}/J_{v11}$  — нашої цільової функції. У всіх завданнях оптимізації повинно бути вказано, які параметри моделі можуть

змінюватися для досягнення мети. У цьому конкретному прикладі, уявимо, що ми могли б змінювати стаціонарний рівень реакцій  $v_1$ ,  $v_2$ ,  $v_3$ ,  $v_4$  і  $v_5$  (наприклад, шляхом надекспресії ферментів або шляхом зміни регуляторних послідовностей їхніх генів). Тоді виникає питання, яким буде оптимальне поєднання рівнів цих ферментів для досягнення мінімально можливого співвідношення  $J_{v9}/J_{v11}$ . В якості параметрів, що дозволяють змінити співвідношення потоків, які нас цікавлять, будемо використовувати  $V_{\max}$  п'яти реакцій.

У COPASI завдання оптимізації знаходиться під вкладкою *Tasks*, *Optimization*. Застосування оптимізації в біохімічному моделюванні зазвичай складається з трьох частин:

(1) визначення цільової функції, (2) вибір регульованих параметрів, і (3) вибір алгоритму пошуку. Це відбивається в інтерфейсі COPASI, як показано на рис. 5.3. По-перше, цільова функція повинна бути задана шляхом введення математичного виразу  $J_{v9}/J_{v11}$ , це робиться шляхом вибору потрібних об'єктів з меню, яке активується натисканням кнопки із позначкою COPASI (праворуч) (рис. 5.3).  $J_{v9}$  відображається у вікні як  $\{(v9).Flux\}$ , знак ділення вводиться з клавіатури, і, нарешті, потрібно вибрати  $J_{v11}$ , який виглядає як  $\{(v11).Flux\}$ .

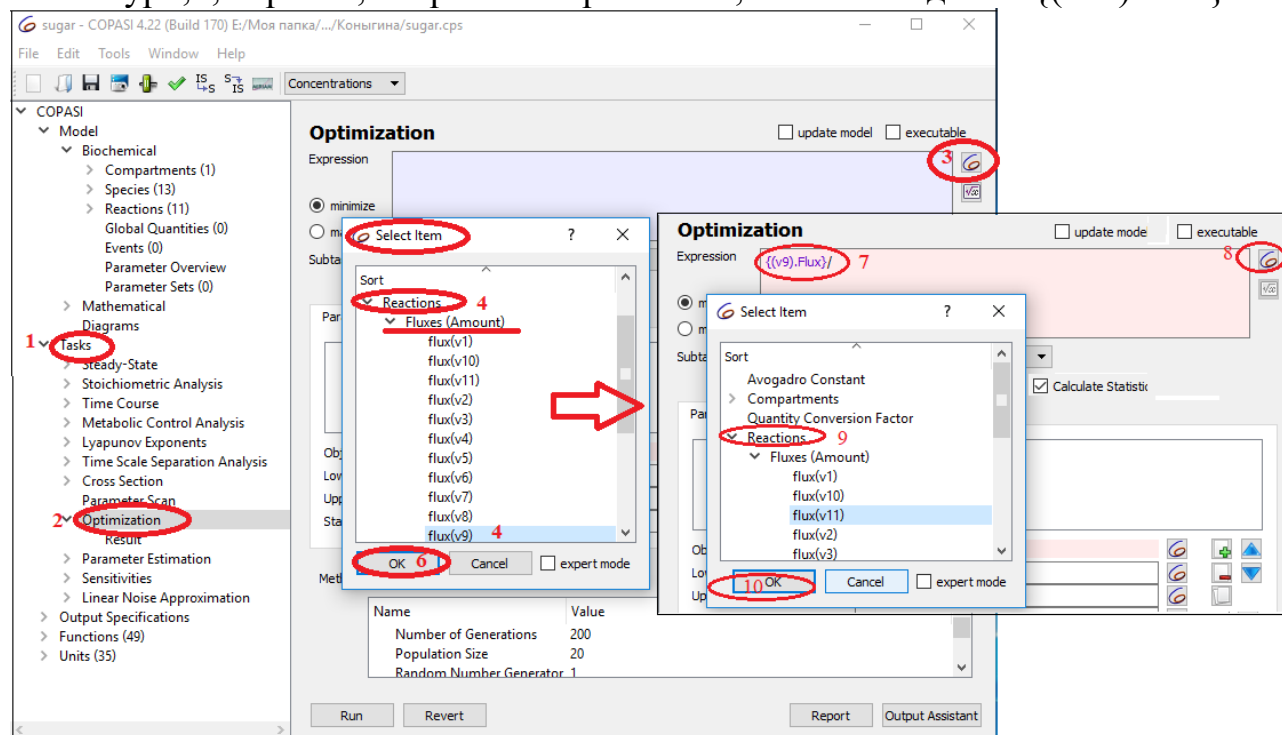



Рис. 5.3. — Введення цільової функції

Далі вам необхідно вказати параметри, які будуть змінюватися в ході оптимізації. Щоб додати один параметр в список, натисніть кнопку  (Створити), а потім кнопку зі значком COPASI, щоб вибрати фактичний параметр. COPASI надає меню для додавання всіх параметрів: виберіть перший параметр, використовуючи пункти *Reactions*, *Reaction Parameters*, потім  $v_1$ , де ви вибираєте  $V_{\max 1}$ . Не закриваючи меню, розкрийте вкладки біля інших реакцій і виберіть увсі потрібні параметри ( $V_{\max 2}$ ,  $V_{\max 3}$ ,  $V_{\max 4}$  і  $V_{\max 5}$ ), утримуючи

клавішу CTRL. Натисніть ОК, і всі параметри з'являться у відповідному вікні програми (рис. 5.6).

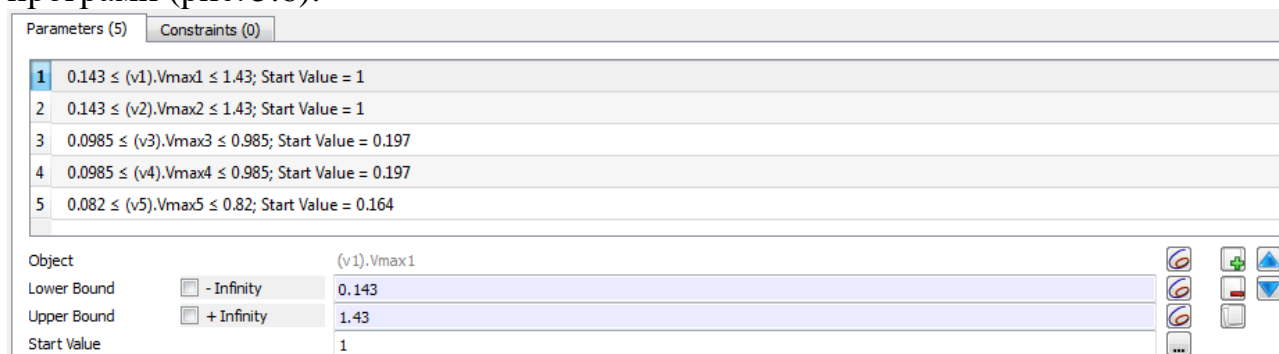


Рис. 5.6. — Вікно параметрів

Далі потрібно вказати діапазон варіювання кожного параметра. Клацніть мишею по першому рядку. У вікні нижче напишіть нижню межу і верхню межу варіювання параметра. Встановіть діапазон варіювання відповідно до малюнка.

Вибираємо метод оптимізації і натискаємо Run. Для першої спроби можна використовувати метод Ньютон (Truncated Newton). Результати розрахунку виводяться у вкладці Optimization, Result (на дереві зліва, нижче оптимізації).

Вікно результатів показано на рисунку 5.7.

**Optimization Result**

Objective Value  
0.0199107

Function Evaluations: 147      CPU Time [s]: 7.55045

	Parameter	Lower Bound	Start Value	Value	Upper Bound	Gradient
1	(v1).Vmax1	0.143	1	1.02073	1.43	-0.0191716
2	(v2).Vmax2	0.143	1	1.0175	1.43	-0.0183813
3	(v3).Vmax3	0.0985	0.197	0.0985007	0.985	0.231127
4	(v4).Vmax4	0.0985	0.197	0.196996	0.985	3.63039e-06
5	(v5).Vmax5	0.082	0.164	0.0910255	0.82	0.133834

Рис. 5.7. — Вікно результатів процедури оптимізації

Вгорі у вікні показано значення цільової функції, нижче у стовпці Value наведено знайдені значення Vmax для кожної з реакцій. Видно, що значення Vmax1 і Vmax2 близькі до верхньої межі вказаного значення, а Vmax3, Vmax4 і Vmax5 знаходяться поблизу мінімальної межі зазначеної величини. Це означає, ми повинні шляхом гіперекспресії перших двох ферментів призупинити остаточні три.

Перейдемо на вкладку Steady-State, поставимо галочку у вікні Update model (це означає, що розрахунок буде виконаний з оптимізованими параметрами). Розрахуйте стаціонарні концентрації метаболітів.

Зверніть увагу, що фруктоза і глюкоза знаходяться в дуже високих концентраціях, яка не може бути досягнутою.

Введемо обмеження, не дозволяючи концентраціям глюкози і фруктози перевищувати значення вище 100 мМ. Ці обмеження дозволять шукати рішення

в обмеженій області. Для того, щоб додати обмеження, поверніться на сторінку оптимізації, і виберіть вкладку з ім'ям Обмеження (Constraints) у центрі сторінки. Додайте обмеження, як ми додавали регульовані параметри.

Встановіть нижню межу 0, а верхню 100. Результат повинен виглядати так:  $0 < Fru < 100$ ,  $0 < Glc < 100$ . Тепер натисніть Run знову і перевірте результат. Розрахуйте стаціонарні концентрації глюкози і фруктози. Переконайтеся, що концентрації Fru і Glc становлять 99.

Проведіть розрахунки, використовуючи кілька методів оптимізації. Знайдіть найкраще рішення (те, якому буде відповідати найменше значення цільової функції).

## Робота 6. Математична модель MAP-кіназного каскаду

Мітоген-активуєчі протеїн-кінази (MAPKs) являють собою сімейство серин / треонінових кіназ, що перетворюють біохімічний сигнал від мембрани клітини до ядра у відповідь на різні стимули. Незалежні або пов'язані каскади кіназ беруть участь у багатьох різних внутрішньоклітинних сигнальних шляхах, які контролюють широкий спектр клітинних процесів, включаючи ріст клітин, їх диференціацію, трансформацію й апоптоз. MAPK каскади беруть участь в еукаріотичній сигнальній трансдукції. MAP-кіназні шляхи зберігаються від дріжджів до ссавців.

Загальна схема MAPK каскаду зображена на рисунку 6.1. Цей шлях складається з декількох рівнів (як правило, від трьох до чотирьох), де активуюча кіназа на кожному рівні фосфорилує кіназу на наступному рівні каскаду. MAP-кіназа (MAPK) знаходиться на нижньому рівні каскаду. Вона активується за допомогою MAPK-кінази (MAPKK) за допомогою фосфорилування двох сайтів, що є залишками треоніну і тирозину. MAPKK сама фосфорилується по залишкам серину і треоніну MAPKK-кіназою (MAPKKK). Деякі механізми, як відомо, активують MAPKKKs фосфорилуванням залишків тирозину. У деяких випадках, у напрямку вгору, кіназа може розглядатися як кіназа MAPKKK (MAPKKKK). Дефосфорилування залишку, як вважають, інактивує кіназу, і мутанти, позбавлені залишків цих амінокислот, практично неактивні. На кожному рівні каскаду білкові фосфатази можуть інактивувати кінази, хоча в деяких випадках нез'ясована (і є предметом дискусій), виконується дефосфорилування незалежним білком або самою кіназою як аутодефосфорилування. Також повідомляється про убіквітин-залежну деградацію фосфорильованих білків.

Незважаючи на те, MAPK-кінази високо консервативні і зустрічаються у різних видів, елементи каскаду MAPK отримали різні назви в різних вивчених системах.

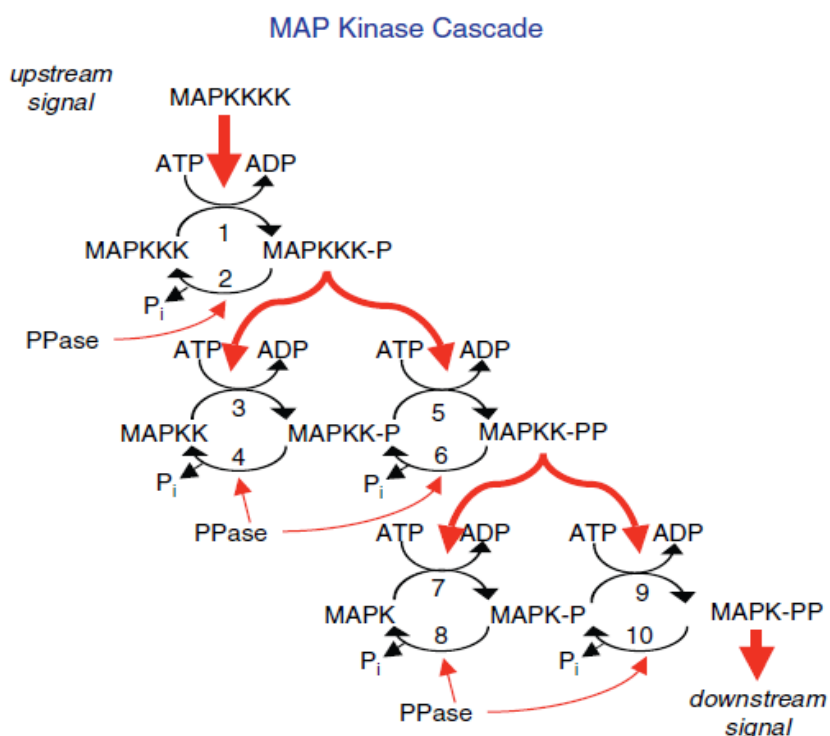


Рис. 6.1. — Схематичне уявлення MAP-кіназного каскаду

Сигнал висхідного потоку (відомий під назвою кінази кінази кінази кінази) викликає фосфорилування MAPKKK. Фосфорильована MAPKKK у свою чергу, фосфорилує білок на наступному рівні. Передбачається, що дефосфорилування безперервно відбувається під дією фосфатази або в результаті аутодефосфорилування.

Ланцюг реакцій представлений рівняннями нижче. У першій частині роботи для описування швидкостей реакцій ми будемо використовувати закон діючих мас хімічної кінетики.

1.	$MAPKKK + ATP \rightarrow MAPKKK - P + ADP$ $v_1 = k_1[MAPKKK] \cdot [MAPKKK]$ , вводити як функцію користувача в COPASI.	Активатор MAPKKK , $C_{MAPKKK} = 0,001 \mu M$ $C_{MAPKKK} = 0,1 \mu M$ $k_1 = 15$
2.	$MAPKKK - P \rightarrow MAPKKK + P_i$ $v_2 = k_2[MAPKKK - P]$ , використовувати функцію mass action	Фермент PPase $C_{MAPKKK - P} = 0,0 \mu M$ $k_2 = 0,15$
3.	$MAPKK + ATP \rightarrow MAPKK - P + ADP$ $v_3 = k_3[MAPKK] \cdot [MAPKKK - P]$	Активатор [MAPKKK-P] $C_{MAPKK} = 0,3 \mu M$ $k_3 = 15$
4.	$MAPKK - P \rightarrow MAPKK + P_i$ $v_4 = k_4[MAPKK - P]$	Фермент PPase $k_4 = 0,15$

5.	$MAPKK - P + ATP \rightarrow MAPKK - PP + ADP$ $v_5 = k_5[MAPKK - P] \cdot [MAPKKK - P]$	Активатор [MAPKKK - P] $k_5 = 15$
6.	$MAPKK - PP \rightarrow MAPKK - P + P_i$ $v_6 = k_6[MAPKK - PP]$	Фермент PPase $k_6 = 0,15$
7.	$MAPK + ATP \rightarrow MAPK - P + ADP$ $v_7 = k_7[MAPK] \cdot [MAPKK - PP]$	Активатор [MAPKK - PP] $C_{MAPK} = 0,3 \mu M$ $k_7 = 15$
8.	$MAPK - P \rightarrow MAPK + P_i$ $v_8 = k_8[MAPK - P]$	Фермент PPase $k_8 = 0,15$
9.	$MAPK - P + ATP \rightarrow MAPK - PP + ADP$ $v_9 = k_9[MAPK - P] \cdot [MAPKK - PP]$	Активатор [MAPKK - PP] $k_9 = 15$
10.	$MAPK - PP \rightarrow MAPK - P + P_i$ $v_{10} = k_{10}[MAPK - PP]$	$k_{10} = 0,15$

Математична модель уявляє собою систему диференціальних рівнянь:

$$\frac{d[MAPKKK]}{dt} = -v_1 + v_2$$

$$\frac{d[MAPKKK - P]}{dt} = v_1 - v_2$$

$$\frac{d[MAPKK]}{dt} = -v_3 + v_4$$

$$\frac{d[MAPKK - P]}{dt} = v_3 - v_4 - v_5 + v_6$$

$$\frac{d[MAPKK - PP]}{dt} = v_5 - v_6$$

$$\frac{d[MAPK]}{dt} = -v_7 + v_8$$

$$\frac{d[MAPK - P]}{dt} = v_7 - v_8 - v_9 + v_{10}$$

$$\frac{d[MAPK - PP]}{dt} = v_9 - v_{10}$$

### ***Завдання до лабораторної роботи.***

Застосуйте типові методи моделювання для MAPK каскадів і обговоріть їх функціональні властивості.

1. Створіть два типи моделей. Модель 1 відповідає таблиці. ATP, ADP, P<sub>i</sub>, MAPKKK Створити фіксовані, їхні концентрації не змінюються в часі, швидкість реакцій фосфорилування не залежить від концентрації ATP.

У моделі 1 ви можете не вводити до рівняння ATP і ADP, і тоді рівняння, що керуються кіназами, будуть виглядати так, як, наприклад, рівняння 1:



Початкові концентрації фосфорильованих форм МАРКККР, МАРККР, МАРККРР, МАРКР, МАРКРР встановити рівними 0.

У моделі 2 необхідно врахувати вплив концентрації АТР на швидкість реакцій фосфорилування. Вважайте, що швидкість кіназної реакції залежить не тільки від кількості активованого ферменту, а й від концентрації АТР. Наприклад, швидкість першої реакції:  $v_1 = k_1[\text{МАРККК}] \cdot [\text{МАРКККК}] \cdot [\text{АТР}]$ .

Концентрація АТР 5 мМ. Тип змінних АТР, АDР, P<sub>i</sub> – reaction.

Одиниці виміру: час — с, концентрація — μМ, об'єм — л.

2. Проаналізуйте зміну концентрацій фосфорильованих форм кіназ протягом часу.

### Робота з глобальними величинами

Якщо у ході моделювання необхідно виконувати додаткові обчислення, ми можемо скористатися вкладкою Глобальні величини.

Наприклад, нам необхідно розрахувати мольну частку фосфорильованих форм МАР-кіназ, які беруть участь у передачі сигналу в клітину. Цими формами є МАРККК-Р, МАРКК-РР, МАРК-РР.

Частка кожної з цих форм визначаються співвідношеннями:

$$q(\text{МАРККК} - \text{P}) = \frac{[\text{МАРККК} - \text{P}]}{[\text{МАРККК} - \text{P}] + [\text{МАРКК} - \text{РР}] + [\text{МАРК} - \text{РР}]},$$

$$q(\text{МАРКК} - \text{РР}) = \frac{[\text{МАРКК} - \text{РР}]}{[\text{МАРККК} - \text{P}] + [\text{МАРКК} - \text{РР}] + [\text{МАРК} - \text{РР}]},$$

$$q(\text{МАРК} - \text{РР}) = \frac{[\text{МАРК} - \text{РР}]}{[\text{МАРККК} - \text{P}] + [\text{МАРКК} - \text{РР}] + [\text{МАРК} - \text{РР}]}.$$

Задамо також в якості глобальних змінних нормовані показники фосфорильованих форм МАР-кіназ:

$$\text{МАРККК} - \text{P} \_norm = \frac{[\text{МАРККК} - \text{P}]}{[\text{МАРККК}] + [\text{МАРКК}] + [\text{МАРК}]},$$

$$\text{МАРКК} - \text{РР} \_norm = \frac{[\text{МАРКК} - \text{РР}]}{[\text{МАРККК}] + [\text{МАРКК}] + [\text{МАРК}]},$$

$$\text{МАРК} - \text{РР} \_norm = \frac{[\text{МАРК} - \text{РР}]}{[\text{МАРККК}] + [\text{МАРКК}] + [\text{МАРК}]}.$$

Відкрийте вкладку Global Quantities. У вікні праворуч клацаємо двічі по рядку New Quantity. У рядку Global Quantity вводимо ім'я глобальної змінної, в рядку Simulation Type задаємо assignment (буде обчислюватися), у вікні Expression вводимо вираз, використовуючи кнопку зі значком Copasi (рис. 6.2).

Для набору формул використовуйте вкладки Species, Transient Concentrations.

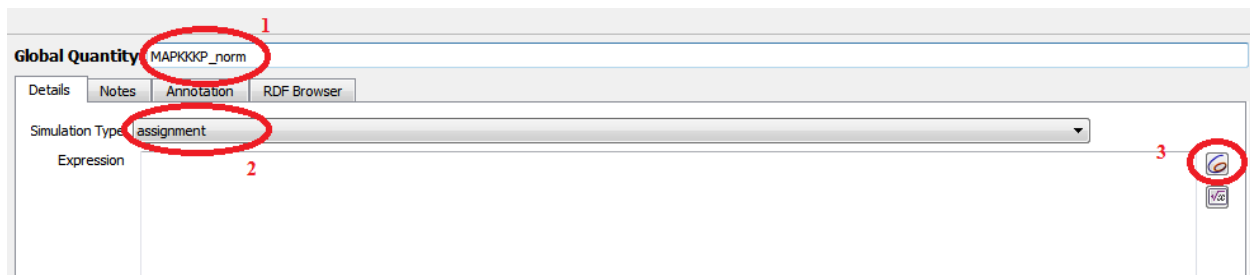


Рис. 6.2. — Вікно введення глобальних змінних

3. Проаналізуйте вплив активатора каскаду на молярні частки та нормовані значення фосфорильованих форм кіназ. Для цього концентрацію MAPKKKK варіюйте в діапазоні 0,000001 до 0,1  $\mu\text{M}$ . Зробіть відповідні висновки.

*Примітка.* Виконайте розрахунки, задаючи спочатку інтервал 0,000001—0,00001, потім 0,00001—0,0001 і далі до 0,01—0.1. Кожен раз записуйте зроблений розрахунок у файл. Об'єднайте розрахунки в одному файлі програми Excel і побудуйте графічні залежності.

4. Проаналізуйте вплив співвідношення констант кіназної і фосфотазної реакцій ( $k_1/k_2$ ,  $k_5/k_6$ ,  $k_9/k_{10}$ ) на молярні частки фосфорильованих форм кіназ. Співвідношення констант задайте у вигляді глобальної змінної, а у вікні Parameter Scan задайте сканування одночасно двох параметрів (наприклад,  $k_1$  від 1 до 50, а  $k_2$  — від 0,01 до 1). Зробіть відповідні висновки.

5. Виконайте аналогічні розрахунки для другої моделі.

Просте time course моделювання показує очікувану тимчасову послідовність активації кінази, від MAPKKKK до кінцевої ефекторної MAPK. Це показує, що активність MAPK досягає свого максимального рівня, відповідного MAPKKKK, а також те, що чутливість за рівнями каскаду збільшується.

Графік доза-реакція безпосередньо показує суттєве збільшення чутливості уздовж рівнів каскаду. Крива MAPK за прогнозами буде найкрутішою.

## Робота 7. MAPK каскад. Моделювання коливань

Ця модель описана в роботі [11], модель знаходиться у базі biomodels (<http://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/BIOMD0000000010>).

Гальмуюче фосфорилування SOS від p42/p44 MAPK (ERK) забезпечує механізм для відключення сигналізації Ras. Це гальмування створює негативний зворотний зв'язок у MAPK каскаді (рис. 7.1). Дійсно, в той час як фосфорилування тирозину Raf призводить до утворення ERK, ERK опосередковане гальмування стимуляції Raf SOS зменшує ERK фосфорилування. Поєднання негативного зворотного зв'язку з ультрочутливістю може привести до стійких біохімічних коливань.



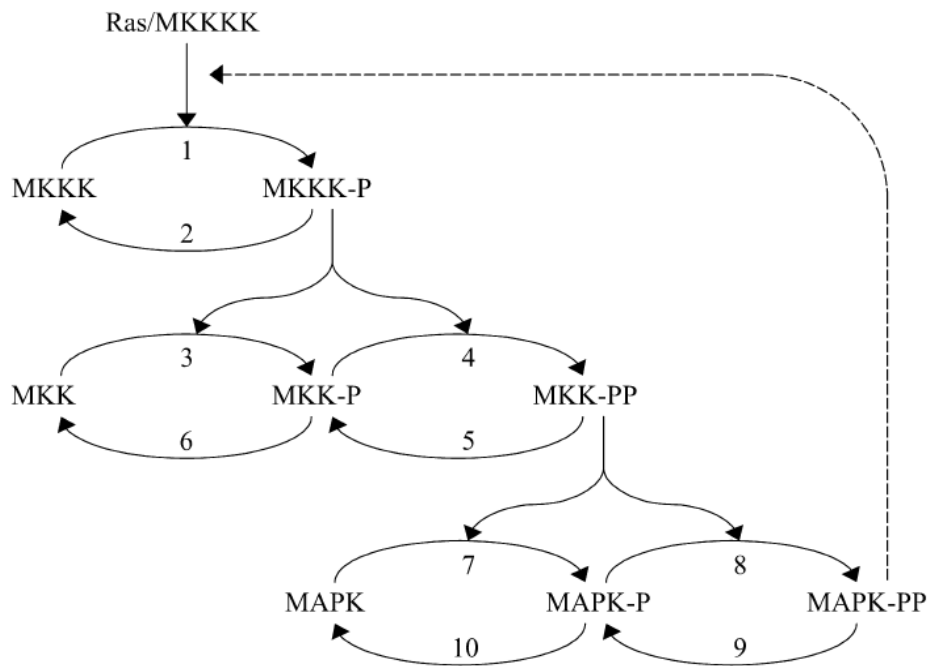


Рис. 7.1. — Кінетична схема MAPK каскаду з ефектом негативного зворотного зв'язку

Топологія мережі реакцій цієї моделі ідентична моделі Huang і Ferrel, крім негативного зворотного зв'язку. Для цієї моделі всі реакції будуть змодельовані як проста кінетика Міхаеліса—Ментен. Одиниці вимірювання параметрів встановити наступними: час — с, об'єм — л, концентрації — нмоль.

Концентрації MAPKK = 280, MAPK = 280 нМ.

1.	$MAPKKK \rightarrow MAPKKK - P$ $v_1 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{Km + [S]}$ , використовувати стандартну функцію COPASI- Henri-Michaelis-Menten (irreversible)	Активатор MAPKKK , $C_{MAPKKK} = 90 \text{ nM}$ $V_{max} = 2,5 \text{ nM} / \text{s}$ , $Km = 10 \text{ nM}$
2.	$MAPKKK - P \rightarrow MAPKKK$ використовувати стандартну функцію COPASI- Henri-Michaelis-Menten (irreversible)	Фермент PPase $C_{MAPKKK-P} = 10 \text{ nM}$ $V_{max} = 0,25 \text{ nM} / \text{s}$ , $Km = 8 \text{ nM}$
3.	$MAPKK \rightarrow MAPKK - P; MAPKKK - P$ $v_3 = \frac{k_{cat} \cdot [E] \cdot [S]}{Km + [S]}$ ( вводимо як функцію користувача)	Активатор [MAPKKK-P] $E \rightarrow MAPKKK - P$ $k_{cat} = 0,025$ , $Km = 15 \text{ nM}$
4.	$MAPKK - P \rightarrow MAPKK$ $v_4$ — стандартна функція COPASI- Henri-Michaelis-Menten (irreversible)	Фермент PPase $C_{MAPKK-P} = 10 \text{ nM}$ $V_{max} = 0,75 \text{ nM} / \text{s}$ , $Km = 15 \text{ nM}$

5.	$MAPKK - P \rightarrow MAPKK - PP; MAPKKK - P$ $v_5$ - функція користувача	Активатор [MAPKKK-P] $E \rightarrow MAPKKK - P$ $k_{cat} = 0,025, Km = 15 nM$
6.	$MAPKK - PP \rightarrow MAPKK - P$ $v_6$ - стандартна функція COPASI- Henri-Michaelis-Menten (irreversible)	Фермент PPase $C_{MAPKK-PP} = 10 nM$ $V_{max} = 0,75 nM / s, Km = 15 nM$
7.	$MAPK \rightarrow MAPK - P; MAPKK - PP$ $v_7$ - функція користувача	Активатор [MAPKK-PP] $E \rightarrow MAPKK - PP 10 nM$ $k_{cat} = 0,025, Km = 15 nM$
8.	$MAPK - P \rightarrow MAPK$ $v_8$ - стандартна функція COPASI- Henri-Michaelis-Menten (irreversible)	Фермент PPase $C_{MAPK-P} = 10 nM$ $V_{max} = 0,5 nM / s, Km = 15 nM$
9.	$MAPK - P \rightarrow MAPK - PP; MAPKK - PP$ $v_9$ - функція користувача	Активатор [MAPKK-PP] $E \rightarrow MAPKK - PP 10 nM$ $k_{cat} = 0,025, Km = 15 nM$
10.	$MAPK - PP \rightarrow MAPK - P$ $v_{10}$ - стандартна функція COPASI- Henri-Michaelis-Menten (irreversible)	$C_{MAPK-PP} = 10 nM$ $V_{max} = 0,5 nM / s, Km = 15 nM$

### Завдання до роботи:

1. Розрахуйте зміну концентрацій метаболітів у часі упродовж 400 секунд, використовуючи алгоритм Tasks > Time Course.

2. Проаналізуйте зміни активних форм MAPK (MAPK-PP), MAPKK (MAPKK-PP) і MAPKKK (MAPKKK-P) як функції часу. Проаналізуйте зміни нормованих показників фосфорильованих форм MAPK з часом.

3. Виконайте процедуру сканування параметрів, імітуючи різну силу сигналу. Для цього встановити значення  $V_{max}$  реакції 1 в діапазоні від 0,001 до 1, послідовно задаючи інтервали від 0,001 до 0,01, від 0,01 до 0,1 та від 0,1 до 1. Об'єднайте розрахунки в один файл і побудуйте графічні залежності. Режим сканування Steady State.

4. Проаналізуйте графічні залежності зміни концентрацій активних форм MAPK - MAPK-PP, MAPKK-PP і MAPKKK-P та їхніх нормованих показників від вихідної активності Ras ( $V_{max1}$ ).

## Моделювання зворотного зв'язку.

1. Змініть кінетичний опис реакції 1. У кінетичному рівнянні врахуємо інгібування МАРККК МАРК-РР.



$$v_1 = \frac{V_{\max} \cdot [\text{S}]}{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)^n \cdot (K_m + [\text{S}])}, \text{ де } V_{\max} = 2,5 \text{ nM} / \text{s}, K_m = 10 \text{ nM},$$
$$S = \text{МАРККК} = 90 \text{ nM},$$
$$K_i = 1 \text{ nM}, n = 1.$$


2. Виконайте моделювання, як описано вище, але протягом періоду часу до 9000 с. Проаналізуйте графічні залежності концентрацій активних форм МАРК- МАРК-РР, МАРКК-РР і МАРККК-Р, ті їхніх нормованих показників від часу. Поєднання ультрачутливого і негативного зворотного зв'язку призводить до стійких біохімічних коливань.

3. Побудуйте залежність кількості активної форми МАРК від кількості МАРККК та залежність активної форми МАРК від МАРКК (фазові портрети).

4. Проаналізуйте залежність поведінки системи від ступеня гальмування:

• Задайте зміну  $K_i$  (Reactions-> Reaction Parameters-> v1 (МАРККК activation) ->  $K_i$ ) від 1 до 50.

**Увага.** Тут ми не використовуємо процедуру *Parameter Scan!* Ми імітуємо зменшення інгібіторного зворотного зв'язку ( $K_i$  позначає концентрацію інгібітора, необхідного для зниження швидкості реакції у два рази).

З цією метою скористуйтеся функцією Sliders. Виберіть меню Tools/Show sliders у меню або натисніть кнопку значка повзунка  на панелі інструментів. Виконайте дії, що зображені на рисунку 7.2.

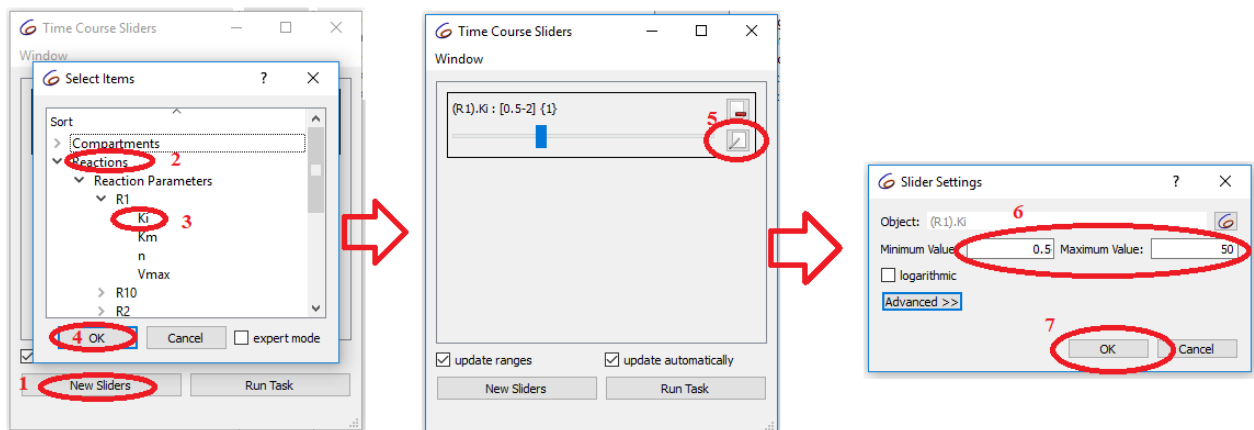


Рис. 7.2. — Завдання інтервалу змінення  $K_i$  у вікні Time Course Sliders

Зверніть увагу на зміну часових залежностей та фазового портрета в порівнянні з результатами моделювання, отриманими в попередньому розділі.

За допомогою включення простого негативного зворотного зв'язку система може демонструвати коливальну поведінку при постійній стимуляції. При менших значеннях константи гальмування, рівень максимальної активації

зменшується, а частота коливань збільшується. Система втрачає коливальну поведінку при значеннях  $K_i$  між 25 і 27.

## Робота 8. Пошук параметрів моделі з використанням експериментальних даних

Для виконання цієї лабораторної роботи використовуйте модель роботи 7 зі зворотнім зв'язком. Візьміть у викладача файл з експериментальними даними. Файл `МАРК_data` містить результати вимірювань кількості двох фосфорильованих форм МАР-кінази (МАРККК-Р і МАРК-Р) протягом часового інтервалу від 50 до 1000 с. Дані файлу наведені в таблиці 8.1.

У цьому випадку завдання полягає з пошуку таких значень  $V_{\max}$  декількох реакцій, які якнайкраще будуть описувати експериментальні залежності.

Таблиця 8.1. Експериментальні дані для пошуку параметрів моделі

Time	МАРККК-Р	МАРК-Р
50	65.71	13.2
100	98.34	20.48
150	91.86	43.14
200	88.49	66.36
300	80.44	2.03
400	49.17	0.6
500	37.84	2.03
600	24.79	1.45
800	8.56	4.79
1000	3.8	17.02

Оцінка параметрів є окремим випадком задачі оптимізації, в якій намагаються знайти набір значень параметрів моделі, при яких відстань між поведінкою моделі (результатами моделювання) й експериментальними даними зведені до мінімуму. COPASI надає певні функціональні можливості оцінки параметрів, заснованих на методах оптимізації. COPASI вимірює відстань між теоретичними (отримані при моделюванні) та експериментальними даними, використовуючи вираз, який є похідним методу найменших квадратів. Цільова функція має вигляд:

$$O(p) = \sum_i \sum_j \sum_k \omega_{k,i} (x_{k,i,j} - y_{k,i,j}(p))^2,$$

де  $x_{k,i,j}$  — експериментальна величина змінної  $i$  при вимірі  $j$  в експерименті  $k$  і відповідне розрахункове значення  $y_{k,i,j}(p)$ , де  $p$  — вектор оцінюваних параметрів. Важливо, що дані для різних змінних, що використовуються при порівнянні величин, і кожна група значень для кожної змінної в кожному експерименті, множиться на ваговий коефіцієнт  $\omega_{k,i}$ .

COPASI дозволяє проводити підгонку параметрів моделі за кількома експериментальними залежностями одночасно. Програмне забезпечення також дозволяє здійснювати пошук параметрів, використовуючи дані в стаціонарному стані або часові залежності. Експериментальні дані повинні бути представлені у файлах даних ASCII з колонками даних, розділених комами або знаками табуляції. Оскільки COPASI нічого не знає про ваші файли даних, то файл повинен включати рядок заголовків стовпців.

### Процедура пошуку параметрів моделі у COPASI

1. Завантажте модель у програму COPASI.
2. Виберіть команду Task, Parameter Estimation. Усі наступні установки повинні бути зроблені у вікні Experimental data.
  - 2.1. Використовуючи +, виберіть файл із даними.
  - 2.2. У рядку Experiment type – встановіть точку на пункт Time course.
  - 2.3. Далі повинні бути описані типи усіх змінних, зазначених у файлі. Концентрації MAPKKK-P і MAPK-P — це залежні змінні від часу. Через кнопку Copasi, Species вказуємо, що це перехідні концентрації. Послідовність дій показана на рисунку 8.1.

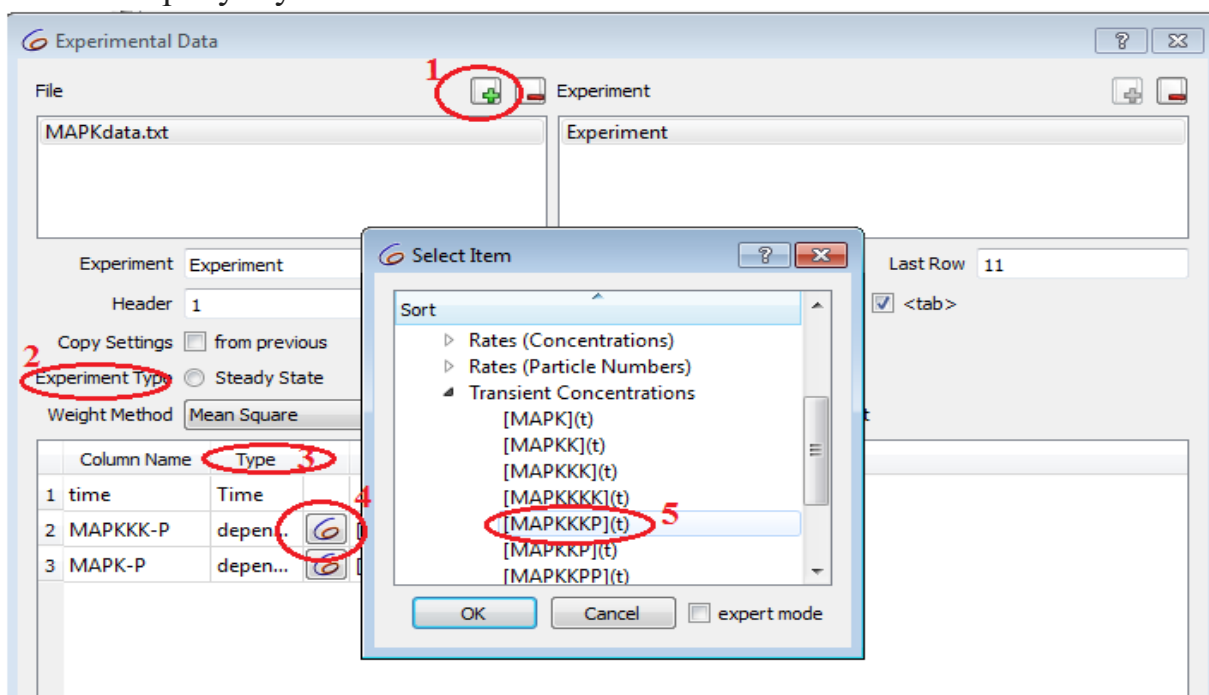


Рис. 8.1. — Вікно підключення експериментальних даних до моделі

Після натискання кнопки ОК повертаємося у вікно Parameter Estimation (рис. 8.2). У цьому вікні ми повинні вказати параметри, які будуть уточнюватися. Ми будемо уточнювати значення  $V_{max}$  для кожної реакції.

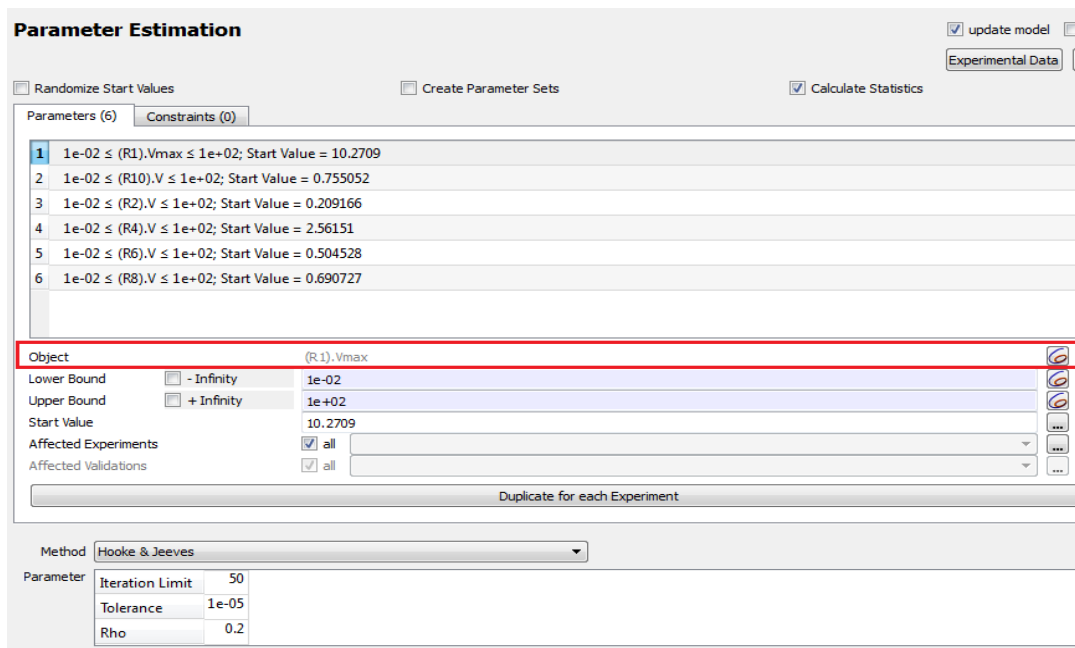


Рис. 8.2. — Встановлення меж варіювання параметрів моделі у вікні *Parameter Estimation*

У вікні *Parameter Estimation* у рядку *Object* натискаємо кнопку *Copy*, у випадяючому меню вибираємо пункт *Reaction*, і розширюючи вкладки біля назв реакцій, знаходимо значки з *V* для кожної з реакцій (у нашій моделі це *R1*, *R10*, *R2*, *R4*, *R6*, *R8*). Їх можна вибрати одночасно, утримуючи кнопку *Ctrl*. Встановіть верхню і нижню межі для кожного параметра, активуючи мишею відповідний рядок у вікні *Parameter*. Виберіть метод розрахунку.

Натисніть кнопку *Output Assistant* і у вікні та виберіть пункт *Parameter Estimation Result, Create*. Ця команда додає в *Plots* відповідну вкладку з графічними залежностями, за допомогою якої ми будемо бачити якість оптимізації. Поставте галочку у віконці *Update model*. Це дасть вам можливість продовжити оптимізацію, починаючи від знайдених параметрів. Натискаємо кнопку *Run*. Після закінчення процедури пошуку параметрів можна ще раз повторити процедуру. Ми повинні добитися найкращого співпадіння експериментальної і розрахункової залежностей.

Величину цільової функції можна подивитися на сторінці *Parameter Estimation Result*. Ця функція повинна бути мінімальною. Наприклад, цільова функція 85,2 дає опис як на рис. 8.3; + показані експериментальні точки, суцільні лінії — розрахунок за моделлю.

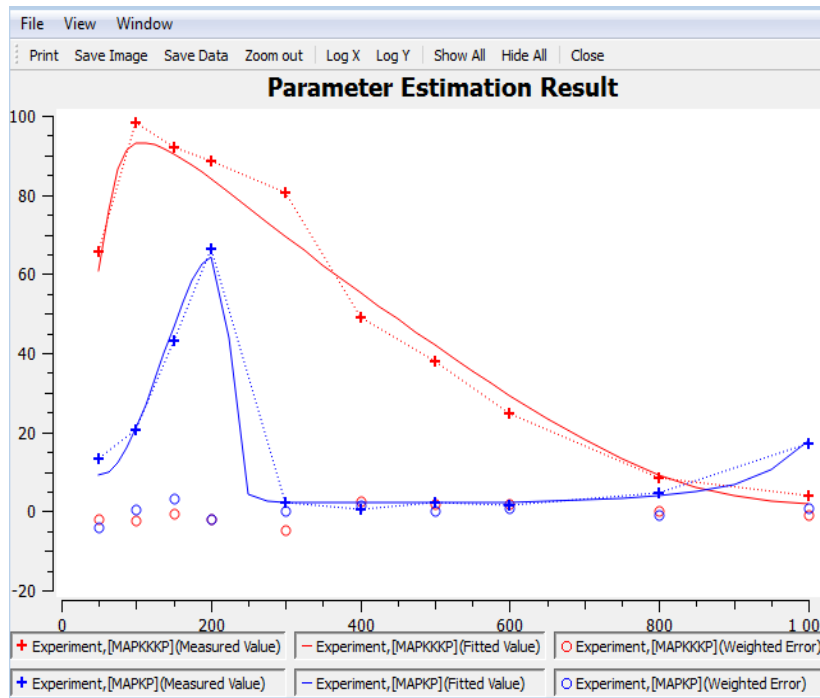


Рис. 8.3. — Вікно результатів пошуку параметрів

Виконайте розрахунки змін концентрацій метаболітів у часі зі знайденими параметрами. Чи зберігається коливальний режим поширення сигналу?

## РОЗДІЛ II. СТЕХІОМЕТРИЧНІ МАТЕМАТИЧНІ МОДЕЛІ

Існує велика кількість моделей, побудованих на основі аналізу метаболічних потоків (Flux Balance Analysis — FBA). FBA не вимагає складних математичних викладок і легко реалізується у вигляді програм для проведення обчислювальних експериментів.

Незважаючи на широке застосування, метод аналізу метаболічних потоків, строго кажучи, обмежений ситуацією стаціонарного стану. До того ж, FBA дозволяє визначати лише «чисті» потоки від одного метаболіту до іншого і не здатний оцінити внесок потоку, спрямованого у зворотний бік.

Для експериментального вимірювання метаболічних потоків використовуються методи ЯМР, газової хроматографії (ГХ), мас-спектрометрії (МС). Ці методи дають додаткову інформацію для FBA про співвідношення метаболічних потоків у клітині. Їх комбіноване застосування в поєднанні з використанням міченого вуглецю  $^{13}\text{C}$  дозволяє розрахувати співвідношення потоків у ключових точках метаболічних шляхів і визначити ступінь оборотності окремих стадій у метаболічній мережі. Однак і в цьому випадку FBA застосовується тільки для випадків стаціонарного стану.

Для того, щоб передбачити поведінку системи в часі (зміна концентрацій метаболітів і ферментів у часі) стехіометрична модель повинна бути доповнена описом кінетичних властивостей системи.

Ключовою відмінністю між розглянутою вище традиційною системою хімічних реакцій і метаболічною мережею є наявність регуляторних зв'язків і генетичний контроль активності метаболітів. У біологічних системах усі рівні метаболічного функціонування (транскрипція, трансляція і каталітична активність) тісно пов'язані між собою, забезпечуючи тим самим можливість адаптації до зовнішніх умов.

У тих випадках, коли існує докладна інформація про механізми генетичної і посттрансляційної регуляції на рівні закону діючих мас, можуть бути побудовані загальні кінетичні моделі, що описують регуляцію ферментативної активності.

Складання стехіометричної моделі включає кілька етапів:

- створення схеми метаболічного шляху,
- отримання рівнянь балансу для кожного метаболіту і об'єднання в систему диференціальних рівнянь,
- розгляд стаціонарних станів, отримання системи алгебраїчних рівнянь,
- постановка задачі оптимізації,
- аналіз розподілу стаціонарних метаболічних потоків.

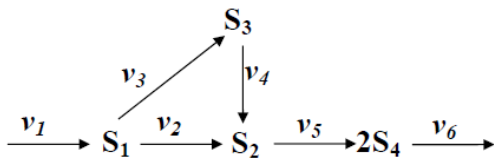
Для математичного опису та аналізу метаболічних потоків використовується підхід, заснований на припущенні про баланс метаболітів і застосуванні методу лінійного програмування, названий **методом аналізу стаціонарних метаболічних потоків** (в англійській літературі Flux Balance Analysis, FBA). Під метаболічним потоком розуміється швидкість перетворення речовини в метаболічному шляху. Одним зі способів опису метаболічних реакцій клітини є побудова поточкових моделей, заснованих на припущенні про



стаціонарний стан концентрацій метаболітів. Стаціонарний стан метаболічної системи реалізується у клітинах, що ростуть з постійною швидкістю, і відповідає експоненціальній фазі росту. При такому підході модель метаболізму являє собою систему лінійних алгебраїчних рівнянь, змінними якої є самі швидкості метаболічних реакцій.

Для побудови математичної моделі стаціонарного метаболізму необхідно знати тільки список метаболітів, що беруть участь у даній метаболічній системі, і реакції, що зв'язують їх.

Проілюструємо цей метод на простому прикладі. Розглянемо схему метаболічних реакцій  $v_1 \dots v_6$ , у результаті яких вихідний метаболіт  $S_1$  перетворюється в метаболіт  $S_4$ , що є кінцевим продуктом.



Тут  $S_i$  – метаболіти,  $v_i$  – швидкості реакцій.

Будемо вважати, що швидкості, спрямовані на утворення метаболіту, мають позитивний знак, а швидкості реакцій, в яких метаболіт витрачається, мають негативний знак. Запишемо у загальному вигляді систему диференціальних рівнянь, що описує змінення в часі всіх метаболітів:

$$\begin{aligned} \frac{dS_1}{dt} &= v_1 - v_2 - v_3 \\ \frac{dS_2}{dt} &= v_2 + v_4 - v_5 \\ \frac{dS_3}{dt} &= v_3 - v_4 \\ \frac{dS_4}{dt} &= 2v_5 - v_6 \end{aligned} \tag{1}$$

Метод аналізу стаціонарних потоків (FBA) розглядає стаціонарну ситуацію, коли в системі встановилася рівновага. Для кожного метаболіту існує баланс метаболічних потоків, тобто всі потоки, спрямовані на утворення конкретного метаболіту, врівноважені потоками, в результаті яких концентрація цього метаболіту зменшується. Сума всіх потоків, які беруть участь у зміні концентрації даного метаболіту, таким чином дорівнює нулю. Для системи диференціальних рівнянь це означає, що сума всіх швидкостей реакцій, в яких бере участь даний метаболіт, дорівнює нулю. Тоді всі праві частини рівнянь прирівнюються до нуля, і система диференціальних рівнянь вироджується в систему алгебраїчних рівнянь. Такий підхід дозволяє оцінити розподіл метаболічних потоків (або стаціонарних швидкостей) і їхній відносний внесок в утворення даного метаболіту.

Побудуємо матрицю стехіометричних коефіцієнтів, що відповідає наведеній схемі. Стовпці матриці відповідають швидкостям реакцій, рядки — метаболітам.

$$N = \begin{matrix} & v_1 & v_2 & v_3 & v_4 & v_5 & v_6 \\ \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & -1 \end{pmatrix} & S_1 \\ & S_2 \\ & S_3 \\ & S_4 \end{matrix}.$$

Проаналізуємо рядки матриці. Коефіцієнти першого рядка означають, що метаболіт  $S_1$  утворюється в реакції  $v_1$  і витрачається в реакціях  $v_2$  і  $v_3$ . Коефіцієнти другого рядка означають, що метаболіт  $S_2$  утворюється в реакції  $v_2$  і  $v_4$  і витрачається в реакції  $v_5$ . Коефіцієнти третього рядка означають, що метаболіт  $S_3$  утворюється в реакції  $v_3$  і витрачається в реакції  $v_4$ . Коефіцієнти четвертого рядка означають, що 2 молекули метаболіту  $S_4$  утворюються в реакції  $v_5$ , при цьому в реакції  $v_6$  витрачається тільки 1 молекула метаболіту  $S_4$ . Запишемо вектор швидкостей реакцій:

$$v = \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \end{pmatrix}. \quad (2)$$

Тоді систему рівнянь можна подати в матричному вигляді:

$$\begin{matrix} \frac{dS_1}{dt} \\ \frac{dS_2}{dt} \\ \frac{dS_3}{dt} \\ \frac{dS_4}{dt} \end{matrix} = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & -1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \end{pmatrix}.$$

Рівняння (1—2) називаються **рівняннями балансу**, оскільки вони відображають усі процеси, в результаті яких метаболіт утворюється або витрачається. У стаціонарному стані всі потоки, що спрямовані на утворення конкретного метаболіту, врівноважені потоками, в результаті яких концентрація цього метаболіту зменшується. Сума всіх потоків, які беруть участь у зміні концентрації даного метаболіту, дорівнює нулю. Для системи диференціальних рівнянь це означає, що сума всіх швидкостей реакцій, в яких бере участь даний метаболіт, дорівнює нулю. Тоді всі праві частини рівнянь прирівнюються нулю, і система диференціальних рівнянь вироджується в систему алгебраїчних рівнянь:

$$\begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & -1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \end{pmatrix} = 0. \quad (3)$$

За правилом множення матриці на вектор елемент рядка матриці множиться на елемент вектора-стовпчика. Кожна колонка стехіометричної матриці представляє реакцію, а елементи ряду представляють внесок певного метаболіту з урахуванням стехіометрії в кожен з реакцій. Помноживши матрицю стехіометричних коефіцієнтів на вектор швидкостей, отримаємо систему алгебраїчних рівнянь (4):

$$\begin{aligned} v_1 - v_2 - v_3 &= 0 \\ v_2 + v_4 - v_5 &= 0. \\ v_3 - v_4 &= 0 \\ 2v_5 - v_6 &= 0 \end{aligned} \quad (4)$$

Представляючи вектор метаболітів як  $S = (S_1, S_2, S_3, S_4)$ , вихідну систему диференціальних рівнянь (1) можна записати як

$$\frac{dS}{dt} = Nv, \quad (5)$$

$$i \text{ в стаціонарних умовах: } Nv = 0. \quad (6)$$

Такий вид запису використовується в більшості обчислювальних програм, розроблених для розрахунку розподілу метаболічних потоків у стаціонарному стані. Таким чином сформульована задача для пошуку стаціонарних метаболічних потоків (стаціонарних швидкостей реакцій) —  $v_1 \dots v_6$ .

Отримана для цієї схеми система рівнянь не може бути вирішена однозначно, оскільки число змінних, яке дорівнює кількості стаціонарних швидкостей (6) в ній більше, ніж число рівнянь, яке дорівнює кількості метаболітів (4). Однак можна поставити задачу оптимізації (завдання лінійного програмування), тобто виділити якийсь простір, в якому ми зможемо знайти максимум або мінімум функціоналу, який визначається з нашої системи. Такий простір виділяється звичайним способом, оскільки величини потоків завжди обмежені позитивними значеннями. Для оптимізації вибирається цільова функція, зазвичай це один або сума декількох потоків, сумарна величина яких за біологічним змістом задачі повинна бути максимальна (мінімальна). Нехай в даній схемі нас цікавить максимальний вихід кінцевого продукту  $S_4$ , який визначається швидкістю  $v_6$ . Тоді завдання лінійного програмування для цієї схеми буде виглядати так:

знайти максимум цільової функції  $z$ ,

$$z = v_6 \rightarrow \max$$

при наступних умовах:

$$\begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & -1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \end{pmatrix} = 0, \quad 0 \leq v_1 \dots v_6 \leq \infty.$$

**Метод елементарних мод** розглядає всі можливі напрямлення шляху від одного зовнішнього метаболіту до іншого (при цьому внутрішні метаболіти накопичуватися не повинні). Метод розглядає стаціонарні стани, не вимагає оптимізації і враховує оборотність реакцій. Елементарна мода — спрямований шлях, що включає мінімальний набір реакцій від одного зовнішнього метаболіту до іншого.

Наприклад, метаболічний процес можна описати схемами *a* та *б*, показаними на рисунку 1. Тоді кількість елементарних мод для схем *a* і *б* показано на рисунку 1в, д і г, е відповідно. З рисунка 1д, е видно, що число елементарних мод дорівнює числу власних векторів стехіометричної матриці. Будь-який шлях може бути зображений як лінійна комбінація елементарних мод, при цьому елементарна мода характеризується своїм унікальним набором ферментів.

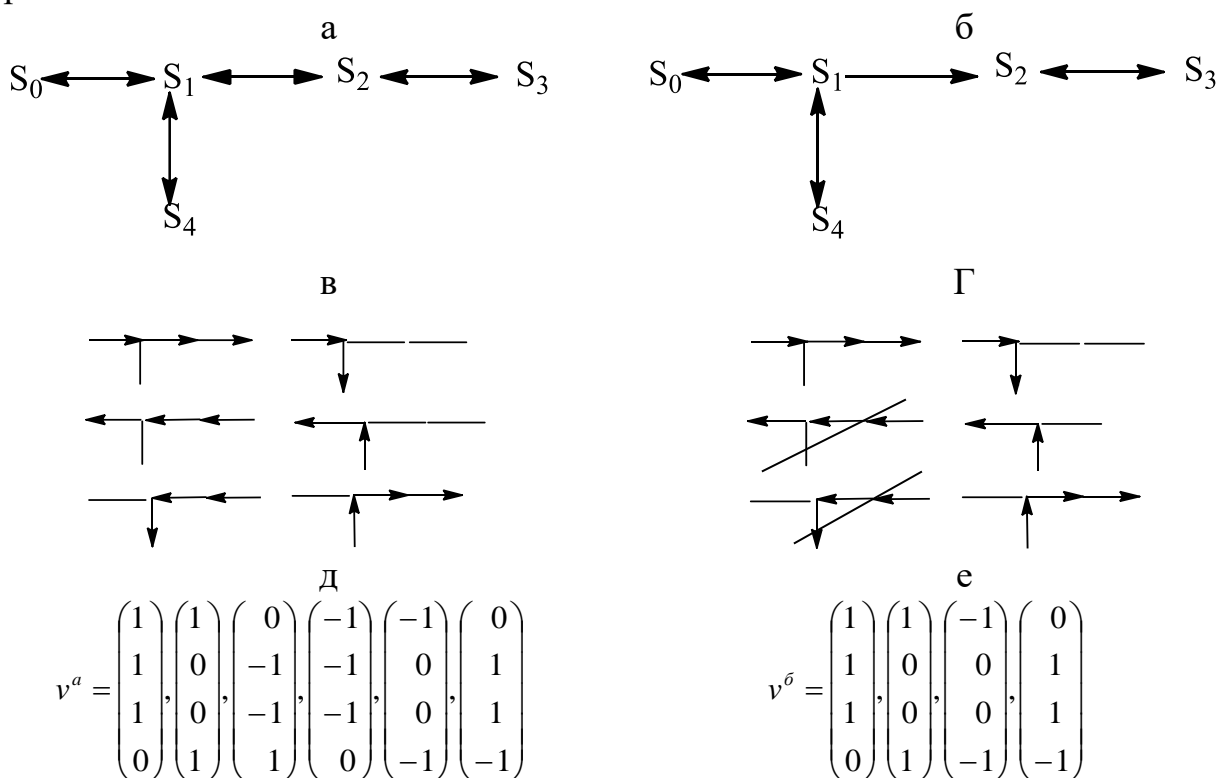


Рис. 1. — Отримання елементарних мод для метаболічних процесів *a* та *б*

## Робота 9. Створення та редагування моделі метаболізму Ecolі в Cell Net Analyzer

Введення даних в Cell Net Analyzer (CNA):

## Запуск CNA

- ▶ Запустити Matlab. Відзначте: в папці з MatLab вже повинна бути створена піддиректорія, в яку інстальований CNA.
- ▶ Ввести в командному рядку MatLab команду *startcna*.
- ▶ Натиснути ОК у вікні CNA. На екрані має з'явитися вікно CellNetAnalyzer: Network Projects (рис. 9.1).

Наступний крок — завантаження моделі циклу трикарбонових кислот (ЦТК) у програму CellNetAnalyzer. Створіть у директорії CellNetAnalyzer папку Ecolі. Скопіюйте в неї попередньо створений в будь-якому графічному редакторі файл, який містить малюнок схеми реакцій циклу ТК. У вікні Network Projects виконайте послідовно команди Project, New, натискаючи мишею на відповідні кнопки.

У наступному вікні заповніть області як на рис. 9.2. Заповніть обведені області як визначено нижче:

> У рядку Network title вкажіть назву моделі — Ecolі.

> У рядку Name of Subdirectory вкажіть назву папки (в межах директорії CellNetAnalyzer) — Ecolі.

> У вікні Name: Ecolі TCA Network Map вкажіть назву графічного файлу, що містить карту мережі. Для цього:

> Клацнуть мишею по кнопці browse, в папці Ecolі знайти файл: Ecolі.bmp, клацнути по ньому мишею, потім по команді «Відкрити».

Ви можете також змінити розмір вікон і шрифтів, як показано на рис. 9.2. Клацніть по кнопці Save. Вікно, показане на рис. 9.3 буде виведено на екран. Виберіть команду Yes.

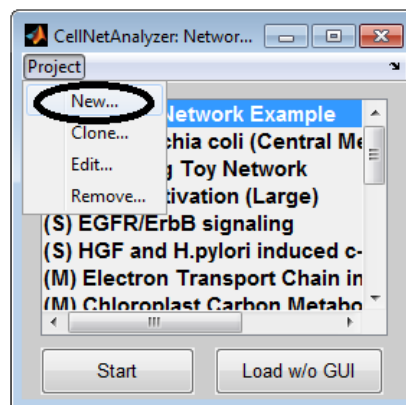


Рис. 9.1. — Вид вікна CellNetAnalyzer: Network Projects

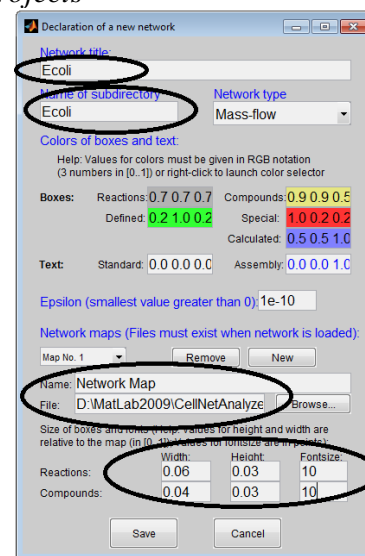


Рис. 9.2. — Робота з вікном Declaration of a new network

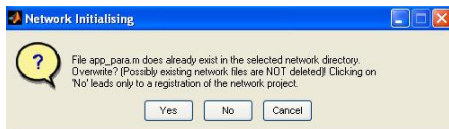


Рис. 9.3. — Вікно Network initializing

Наступний крок — Вибір Моделі. У вікні CellNetAnalyzer: Network Projects представлений список всіх доступних моделей. Знайдіть модель Ecoli і натисніть на кнопку Start (рис. 9.4).

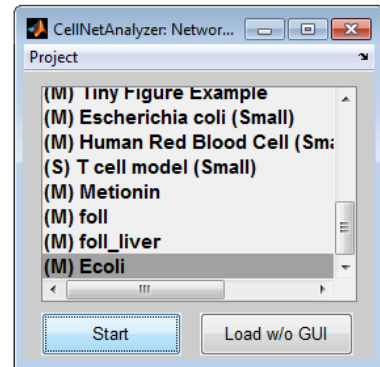


Рис. 9.4. — Завантаження моделі

При цьому карта потоків основного метаболізму E. Coli (рис. 9.5) буде показана у вікні Network map. До моделі залучені реакції гліколізу, глюконеогенезу і циклу трикарбонових кислот в E coli.

• **Метаболіти:**

Метаболіти представлені текстовими іменами. Ми використовуємо такі кольори шрифтів:

- чорний шрифт — проміжні метаболіти,
- червоний шрифт — поживні джерела: (в цій моделі глюкоза і ацетат),
- синій шрифт — метаболіт «кінцевого продукту»: (в цій моделі Біомаса).

• **Реакції:**

Реакції показані стрілками між метаболітами, що представляють собою продукт і субстрат.

- реакції з двома стрілками зворотні;
- стрілка для незворотних реакцій вказує на метаболіт продукту.

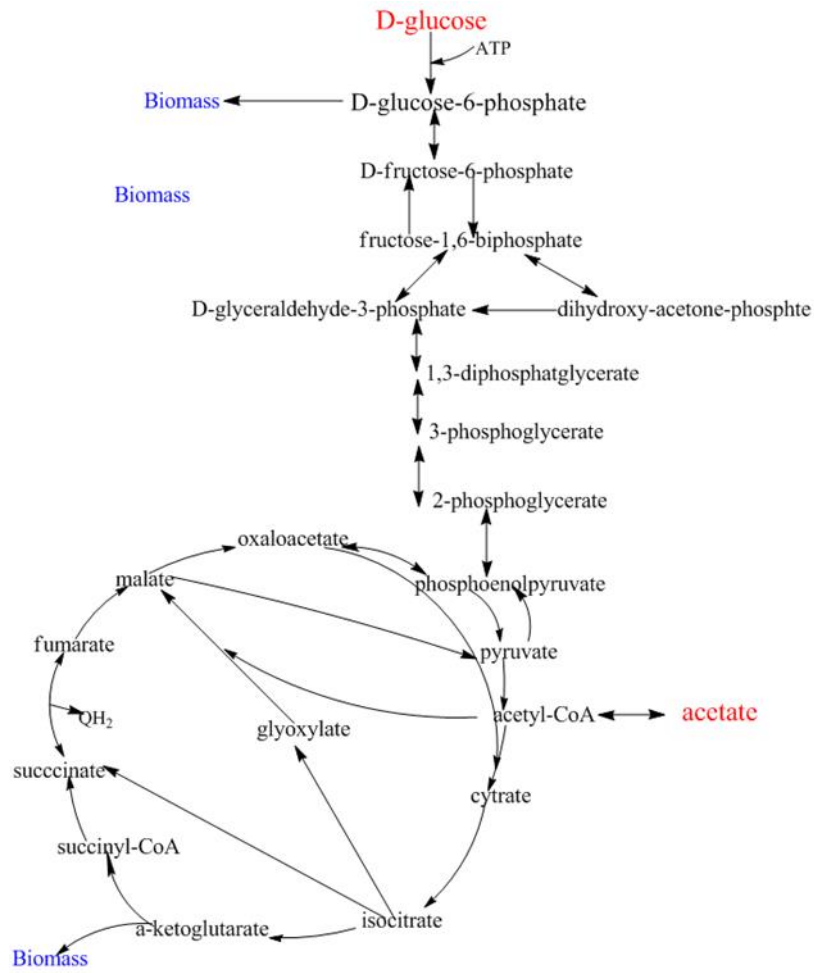


Рис. 9.5. — Карта основного метаболізму *E. coli*

• **Введення реакцій і метаболітів у CellNetAnalyzer:**

Обираємо Network, Network composer. На вкладці Network composer чотири вікна. Перше Reactions використовуємо для введення реакцій, а вікно Metabolites — для введення метаболітів (рис. 9.6).

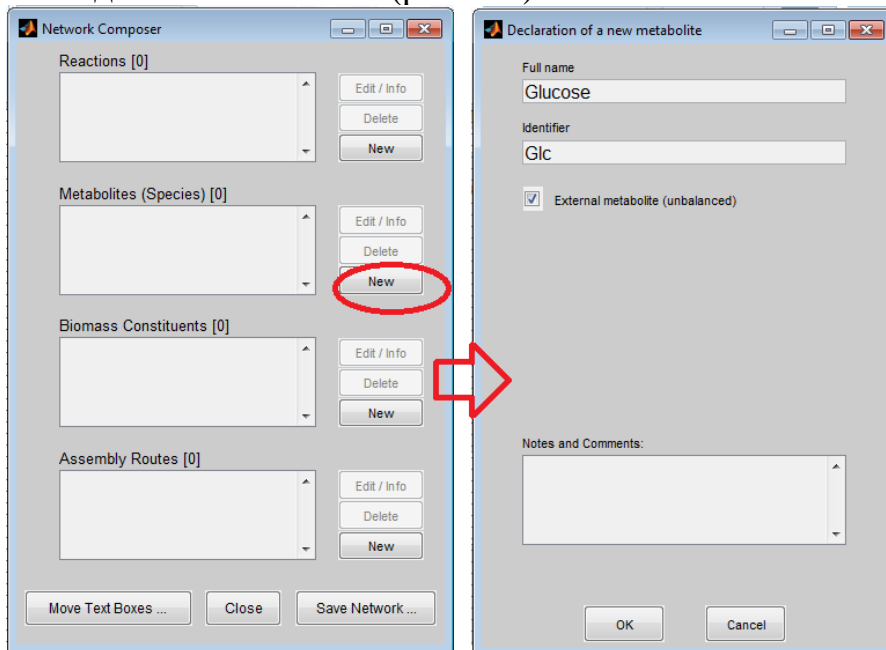


Рис. 9.6. — Введення метаболітів у вікно Metabolites

Наприклад, нам потрібно додати реакцію  $\text{ATP} + \text{Glc} \rightarrow 1 \text{ G6P}$ . Це незворотна реакція, що каталізується гексокіназою. Завжди потрібно починати введення реакції з введення метаболітів. Натискаємо New у вікні Metabolites. У вікні Declaration of a new metabolites у рядку Full name вводимо повну назву метаболіту (за потреби, вона може бути скороченою), у рядку Identifier вводимо назву метаболіту, яка співпадає з назвою у реакції, і визначаємо тип метаболіту (якщо він зовнішній, то потрібно поставити галочку у віконці External metabolite (рис. 9.6). Таким чином вводимо усі метаболіти.

Після введення переліку метаболітів вводимо реакцію. Для цього потрібно виконати кроки, показані на рисунку 9.7.

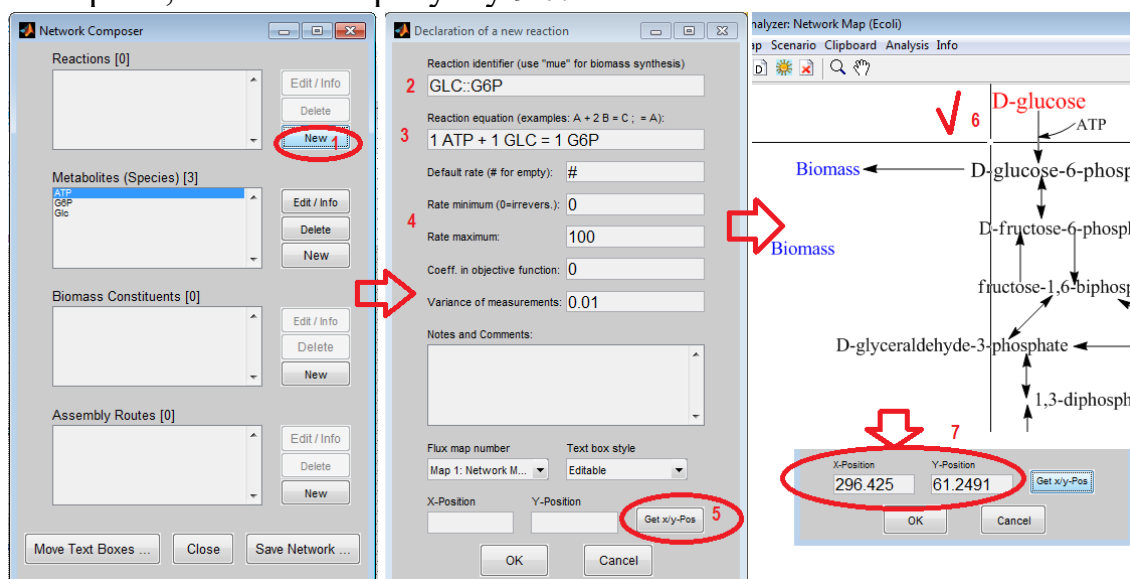


Рис. 9.7. — Кроки введення реакції

Крок 1. Натиснути New у вікні Reactions.

Крок 2. Заповнюємо рядки у вікні Declaration of a new reactions. Рядок перший (позначено 2 на рисунку 9.6) – назва реакції. В якості назви можна використовувати скорочену назву ферменту, що каталізує реакцію. Рядок 2 – вводимо реакцію. Обов'язково вказуємо усі коефіцієнти. Усі символи відокремлюємо пробілом. Рядок 3 – залишаємо символ #, якщо швидкість реакції невідома і буде розраховуватись. Далі (позначено 4 на рис. 9.6) встановлюємо мінімальну і максимальну межу потоку реакції. Для зворотної реакції вказуємо мінімальний потік -100, максимальний +100. Наша реакція незворотна, тому встановлюємо межу нижнього потоку як 0.

Крок 3. Натиснути Get x-y-Pos. При цьому на карті метаболічної мережі з'являється курсор, за допомогою якого ми повинні вказати положення вікна, у якому будуть показані параметри моделі та результати розрахунків. Клацаємо курсором біля стрілки цієї реакції. З цієї позиції буде встановлено вікно, координати нижнього лівого кута якого будуть показані у вікні Declaration of a new reactions. Якщо положення вікна не влаштовує, цю операцію можна виконати ще раз.

Крок 4. Після виконання усіх дій натискаємо ОК.



## Вікна

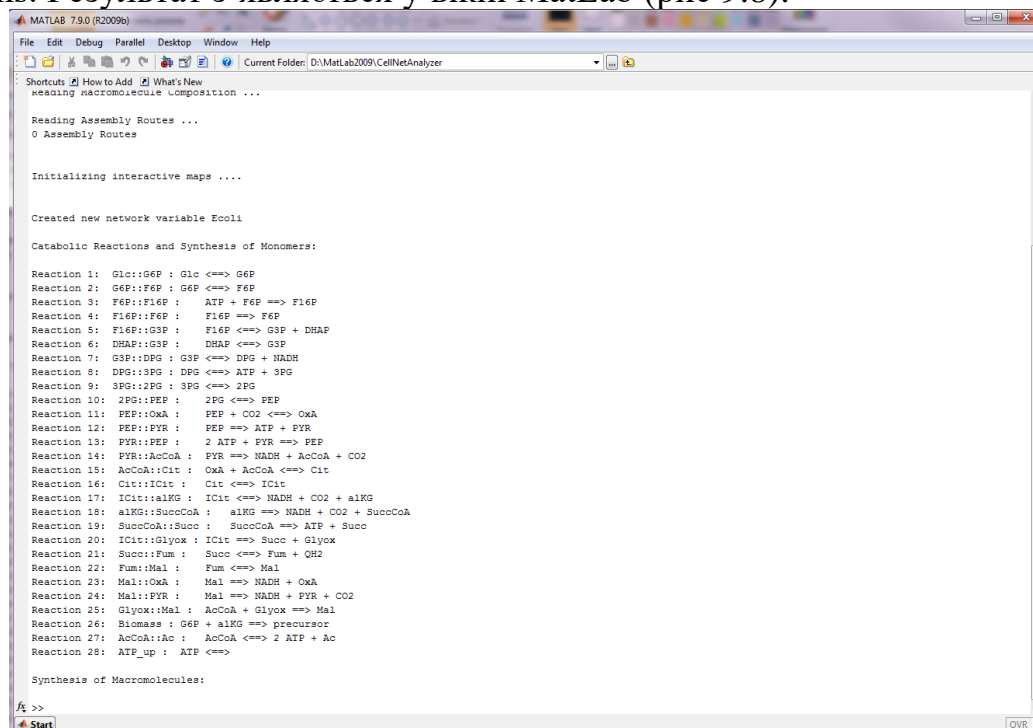
Вікна використовуються (зазвичай виводяться над чи під стрілкою реакції), щоб показати і встановити параметри моделі (відповідні пункти меню Network згадані нижче), а саме — імена реакцій: за допомогою команд Network, Show names of network elements вікна Network map.

Вікна в 3-D форматі дозволяють користувачам встановлювати і змінювати величини параметрів моделі. «Flat» вікна показують величини, які не можуть бути відредаговані. У вікні буде виведений знак «#», щоб вказати, що величина параметра невідома.

Виконання команд CNA здійснюється за допомогою меню команд рядка меню вікна Network map. Для вибору команд меню потрібно використовувати стрілку миші.

## Показати всі рівняння реакцій моделі

Для цього потрібно використовувати команди Network, Show all reaction equations. Результат з'являється у вікні MatLab (рис 9.8).



```
MATLAB 7.9.0 (R2009b)
File Edit Debug Parallel Desktop Window Help
Current Folder: D:\MatLab2009\CellNetAnalyzer
Shortcuts: How to Add What's New
Reading Assembly Routes ...
0 Assembly Routes
Initializing interactive maps ...
Created new network variable Ecoli
Catabolic Reactions and Synthesis of Monomers:
Reaction 1: Glc::G6P : Glc <=> G6P
Reaction 2: G6P::F6P : G6P <=> F6P
Reaction 3: F6P::F16P : ATP + F6P ==> F16P
Reaction 4: F16P::F6P : F16P ==> F6P
Reaction 5: F16P::G3P : F16P <=> G3P + DHAP
Reaction 6: DHAP::G3P : DHAP <=> G3P
Reaction 7: G3P::DPG : G3P <=> DPG + NADH
Reaction 8: DPG::3PG : DPG <=> ATP + 3PG
Reaction 9: 3PG::2PG : 3PG <=> 2PG
Reaction 10: 2PG::PEP : 2PG <=> PEP
Reaction 11: PEP::OxkA : PEP + CO2 <=> OxkA
Reaction 12: PEP::PYR : PEP ==> ATP + PYR
Reaction 13: PYR::PEP : 2 ATP + PYR ==> PEP
Reaction 14: PYR::AcCoA : PYR ==> NADH + AcCoA + CO2
Reaction 15: AcCoA::Cit : OxkA + AcCoA <=> Cit
Reaction 16: Cit::ICit : Cit <=> ICit
Reaction 17: ICit::alKG : ICit <=> NADH + CO2 + alKG
Reaction 18: alKG::SuccCoA : alKG ==> NADH + CO2 + SuccCoA
Reaction 19: SuccCoA::Succ : SuccCoA ==> ATP + Succ
Reaction 20: ICit::Glyox : ICit ==> Succ + Glyox
Reaction 21: Succ::Fum : Succ <=> Fum + OH2
Reaction 22: Fum::Mal : Fum <=> Mal
Reaction 23: Mal::OxkA : Mal ==> NADH + OxkA
Reaction 24: Mal::PYR : Mal ==> NADH + PYR + CO2
Reaction 25: Glyox::Mal : AcCoA + Glyox ==> Mal
Reaction 26: Biomass : G6P + alKG ==> precursor
Reaction 27: AcCoA::Ac : AcCoA <=> 2 ATP + Ac
Reaction 28: ATP_up : ATP <=>
Synthesis of Macromolecules:
f1 >>
```

Рис. 9.8. — Результат виконання команди Network, Show all reaction equations

При цьому:

- назви реакцій (наприклад, AcCoA :: Ac) показані після номера реакції;
- оборотні реакції позначені символом <=>;
- якщо оборотна реакція представлена однією, а не двома реакціями, то для неї може бути визначений негативний потік;
- метаболіти біомаси -  $\alpha$ -кетоглутарат ( $\alpha$ -ketoglutarate) і глюкозо-6-фосфат (glucose-6-phosphate).

## Показати імена реакцій

Цю дію виконують команди Network, Show names of Network. При цьому:

- назви реакцій з'являються у вікнах карти мережі;

- відзначте: команда використовує загальний термін «Елементи Мережі», скільки деякі моделі можуть показати назви компонентів або сигнальних елементів шляху.

### Очистити вікна реакцій

За допомогою команд Scenario, Clear all values.

- Не вдала спроба очистити величини викличе повідомлення про помилку.
- Якщо операція виконана, то у вікнах карти мережі буде показаний значок «#»;
- Ця команда виконується завжди перед виконанням обчислень (оптимізацією або обчисленням набору елементарних мод або екстремальних шляхів).

### Виведення стехіометричної матриці

Стехіометрична матриця S (рис. 9.9) показує внесок окремих потоків в накопичення метаболіту і обмеження в балансі мас. Знизу під стехіометричною матрицею вказана реакція зліва вказані метаболіти.

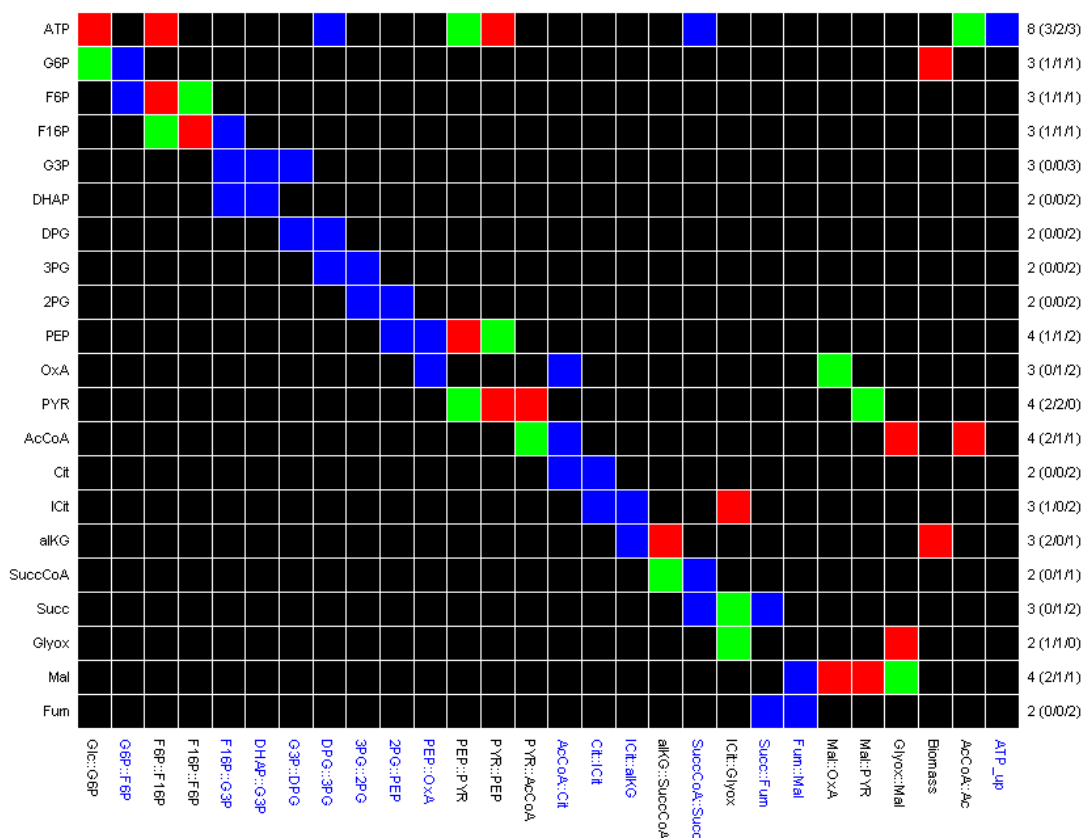


Рис. 9.9. — Стехіометрична матриця метаболізму E. Coli

Стехіометрична матриця виводиться в CellNetAnalyzer у вигляді рисунку для швидкого короткого огляду стехіометрії мережі. Рядки матриці відповідають метаболітам (імена, показані в лівій межі вікна), а стовпці — реакції (імена, наведені внизу вікна). Червоний матричний елемент  $e_{ij}$  відповідає метаболіту  $i$ , який витрачається в незворотній реакції  $j$ . Таким же чином зелений матричний елемент  $e_{ij}$  відповідає метаболіту  $i$ , який утворюється в незворотній реакції  $j$ . Синій матричний елемент  $e_{ij}$  відповідає метаболіту  $i$ , який бере участь у

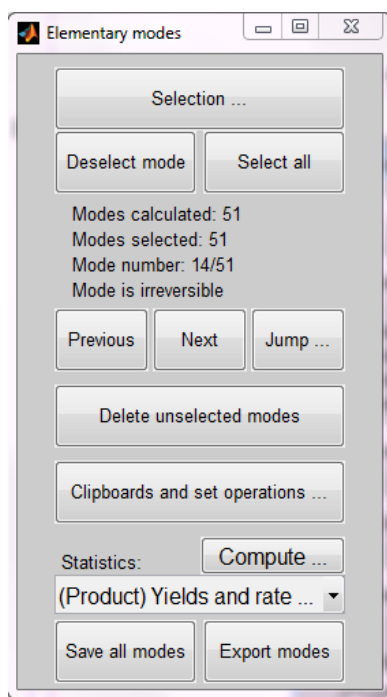
зворотній реакції  $j$ . Чорний елемент матриці  $e_{ij}$  вказує, що метаболіт  $i$  не витрачається і не утворюється в реакції  $j$ . Число реакцій, в яких бере участь даний метаболіт, показано на правій межі вікна (в дужках: число реакцій, в яких метаболіт витрачається (субстрат) [незворотна реакція] / утворюється (продукт) [незворотна реакція] / бере участь [зворотна реакція]). Назви зворотних реакцій показують синім кольором. Якщо мережа є дуже велика (більше ніж 120 реакцій або / та метаболітів), показ цієї матриці може бути ускладнений.

### Розрахунок екстремальних шляхів / елементарних мод

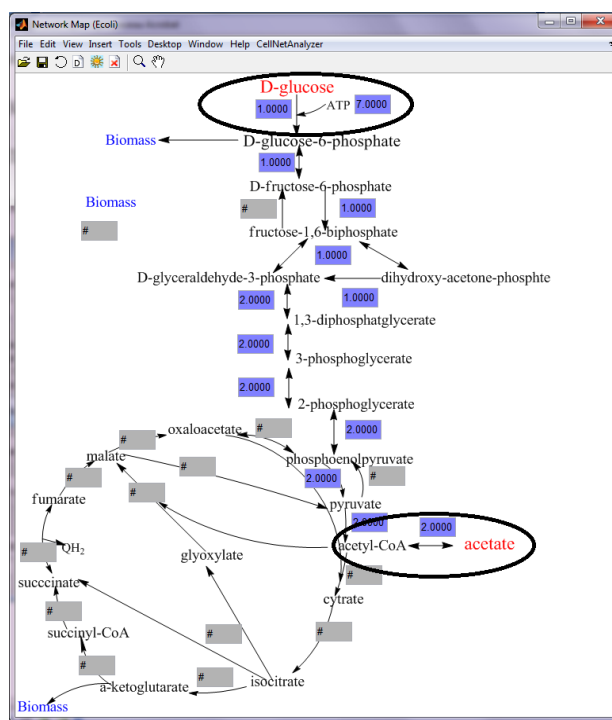
З цією метою виконуються послідовно команди, перераховані нижче:

- ▶ Scenario, Clear all values,
- ▶ Analysis, Elementary modes and pathway analysis, Compute modes,
- ▶ Вибрати метод розрахунку (METATOOL, або CNA), натиснути Start Computation у вікні Calculate elementary modes.

При цьому на екран виводиться вікно «Елементарні моди» (рис. 9.10а), за допомогою якого можна виконувати такі операції:



а



б

Рис. 9.10. а — вигляд вікна «Елементарні моди», б — зображення елементарного шляху в програмі CellNetAnalyzer.

- Кнопки «Next» або «Previous» використовуються, щоб перегорнути всі елементарні способи.
- Кнопка «Jump» використовується, щоб показати певний елементарний спосіб. Для цього потрібно натиснути кнопку «Jump» і у вікно ввести номер елементарної моди. При цьому вікна карти мережі для зазначеної елементарної моди позначаються синім кольором. Числа у вікнах вказують на відносний внесок кожного потоку.

Наприклад, на рис. 9.10б показана елементарна мода 11. У ній зв'язування глюкози призводить до виділення ацетату. При цьому з одного моля глюкози виробляється 2 моля ацетату. Крім того, оскільки знак усіх реакцій позитивний, процес йде в бік ацетату з утворенням ацетил-СоА. У зв'язку з цим при моделюванні зв'язування ацетату будемо мати негативний потік.

### **Об'єктивна функція CellNetAnalyzer:**

Коефіцієнт для цільової (об'єктивної) функції: це (за замовчуванням) коефіцієнт лінійної цільової функції для процедури оптимізації (примітка: цільова функція мінімальна). Зазвичай більшість коефіцієнтів об'єктивної функції реакцій дорівнюють нулю, лише деякі реакції мають коефіцієнт, не рівний нулю. Для максимізації темпу зростання встановлюють цей коефіцієнт — 1. Якщо об'єктивну функцію потрібно мінімізувати, то початкове значення встановлюють рівним 1.

### **Оптимізація потоку**

Виконується за допомогою команд:

- ▶ Scenario, Clear all values.
- ▶ Analysis, Flux Optimization.

Matlab попросить, щоб Ви вибрали програмний пакет для лінійного програмування, виберіть MATLABs linprog для розрахунку. Після ОК у вікнах карти метаболічної мережі будуть показані потоки, що забезпечують максимальне або мінімальне значення об'єктивної функції.

Широко використовується FBA [12] — стехіометричний підхід моделювання для недовизначеної реакційної системи, де число невідомих (потоків) більше числа незалежних рівнянь (масовий баланс для метаболітів). Беручи оптимальну поведінку метаболізму, FBA використовує лінійне програмування з певними обмеженнями і об'єктивною функцією, щоб обчислити розподіл потоку в стаціонарному стані. Аналіз балансу потоку (FBA) — метод оптимізації, який використовується для обчислення розподілу потоку у стаціонарному стані ( $v$ ) при максимізації об'єктивної функції ( $f$ ). Завдання оптимізації формується так:  $\max f^T \cdot v$

$$\text{s.t. } S \cdot v = b, v_{\min} \leq v \leq v_{\max}$$

### ***Завдання до роботи.***

#### ***1. Створити модель гліколізу, глікогенезу і ЦТК для E.Coli у CellNetAnalyzer.***

*Опис моделі:*

Модель включає 28 реакцій і 27 метаболітів, з яких 21 є внутрішніми. 15 реакцій моделі є оборотними. Реакції, включені в модель, і початкові наближення моделі описані в таблиці 9.1. Обмеження для потоків, що йдуть через цикл Кребса засновані на *in vivo* даних по розподілу стаціонарних потоків у циклі Кребса. Зовнішніми метаболітами є: CO<sub>2</sub>, Ac, Glc, QH<sub>2</sub>, NADH, precursor.

Таблиця 9.1. Реакції, метаболіти і початкові наближення моделі мережі основного метаболізму E.Coli

№	Ген	Назва реакції	Реакція	Початкові наближення		
				Def. rate	Min Flux	Max Flux
1		ATP_up	1 ATP<=>	0	-100	100
2	glk	Glc::G6P	1 ATP+1 Glc <=>1 G6P	0	-100	100
3	pgi	G6P::F6P	1 G6P <=> 1 F6P	#	-100	100
4	pfkA	F6P::F16P	1 F6P+ 1 ATP => 1 F16P	#	0	100
5	fbp	F16P:: F6P	1 F16P => 1 F6P	#	0	100
6	fbaA	F16P::G3P	1 F16P <=> 1 DHAP + 1 G3P	#	-100	100
7	tpiA	G3P::DPG	1 G3P <=> 1 DPG + 1 NADH	#	-100	100
8	gapA	DHAP::G3P	1 DHAP<=> 1 G3P	#	-100	100
9	pgk	DPG::3PG	1 DPG<=> 1 3PG + 1 ATP	#	-100	100
10	gpmA	3PG::2PG	1 3PG <=> 1 2PG	#	-100	100
11	eno	2PG::PEP	1 2PG <=> 1 PEP	#	-100	100
12	ppc	PEP::OxA	1 PEP + 1 CO2 <=> 1 OxA	#	-100	100
13	pykA	PEP::PYR	1 PEP => 1 Pyr + 1 ATP	#	0	100
14	pps	PYR:: PEP	1 Pyr + 2 ATP => 1 PEP	#	0	100
15	aceF	PYR::AcCoA	1 Pyr => 1 AcCoA + 1 NADH + 1 CO2	#	0	100
16	getA	AcCoA::Cit	1 AcCoA + 1 OxA <=> 1 Cit	#	-64.8	4
17	acnA	Cit:: ICit	1 Cit <=> 1 ICit	#	-31.2	100
18	Icd	ICit::alKG	1 ICit <=> 1 alKG + 1 NADH	#	-10.2	10.2
19	sucAB	alKG::SuccCoA	1 alKG => 1 SuccCoA + 1 NADH + 1 CO2	#	0	48.3
20	aceA	ICit::Glyox	1 ICit => 1 Glyox + 1 Succ	#	0	100
21	sucCD	SuccCoA::Succ	1 SuccCoA <=> 1 Succ + 1 ATP	#	-100	100
22	aceB	Glyox::Mal	1 AcCoA + 1 Glyox => 1 Mal	#	0	20
23	sdhAB, frdA	Succ::Fum	1 Succ <=> 1 Fum+ 1 QH2	#	-1.02	100
24	fumA	Fum::Mal	1 Fum <=> 1 Mal	#	-87.7	100
25	mdh	Mal::OxA	1Mal => 1 OxA+ 1 NADH	#	0	184
26	maeA	Mal::PYR	1 Mal => 1 PYR+ 1 NADH + 1 CO2	#	0	100
27		AcCoA::Ac	1 AcCoA <=>1 ATP + 1 Ac	#	-100	100
28		Biomass	1 G6P + alKG => precursor	#	0	2

## 2. Виконати моделювання росту E.coli на різних поживних середовищах.

### 2.1. Моделювання росту E.coli на середовищі з глюкози.

З метою моделювання росту E.coli на середовищах із глюкози й ацетату встановлюємо обмеження на реакції зв'язування субстрату. Для моделювання росту E. Coli на глюкозі виконаємо команди:

► Редагуємо межі величини потоку для реакції acetyl-CoA ↔ acetate.

► Обираємо Network, Network composer. У вікні Reaction відмічаємо потрібну реакцію й обираємо Edit.

► Змініть мінімальну межу потоку (-100) на 0 (оскільки зв'язування ацетату відповідає негативному потоку, така заміна означає, що ацетат може тепер бути виділений, але не зв'язаний).

► Для реакції зв'язування глюкози так само встановлюємо мінімальну межу потоку 0. Для реакції зв'язування глюкози характерна позитивна величина потоку, що означає, що глюкоза буде зв'язуватися, а не виділятися. У цьому випадку ми обмежуємо потік глюкози й ацетату, межі для цих потоків відповідають величинам від 0 до 100.

► Для біомаси встановлюємо значення об'єктивної функції -1. Це означає, що ми будемо шукати значення потоків реакцій, що приведуть до максимального накопичення біомаси.

Далі виконуємо команди:

► Analysis, Flux balance analysis, Flux Optimization.

► Результати оптимізації занесіть у таблицю, щоб по закінченню роботи проаналізувати результати моделювання. Введіть кількість біомаси, виробленої при культивуванні дикого типу Ecolі на глюкозі та ацетаті.

Клітини	Кількість біомаси	
	Глюкоза	Ацетат
Дикий тип Ecolі		

Результати розрахунку показані на рис.9.11. З нього видно, що стимульований ріст на глюкозі забезпечує позитивний потік через пентозофосфатний шлях. Потік через гліюксилатний шунт незначний. Однак потік, що йде через гліюксилатний шунт у 17 разів більше потоку, що йде через  $\alpha$ -кетоглутарат. Ацетат при цьому виділяється. Використання в якості джерела живлення глюкози забезпечує приріст біомаси. Однак на ці процеси витрачається АТФ.

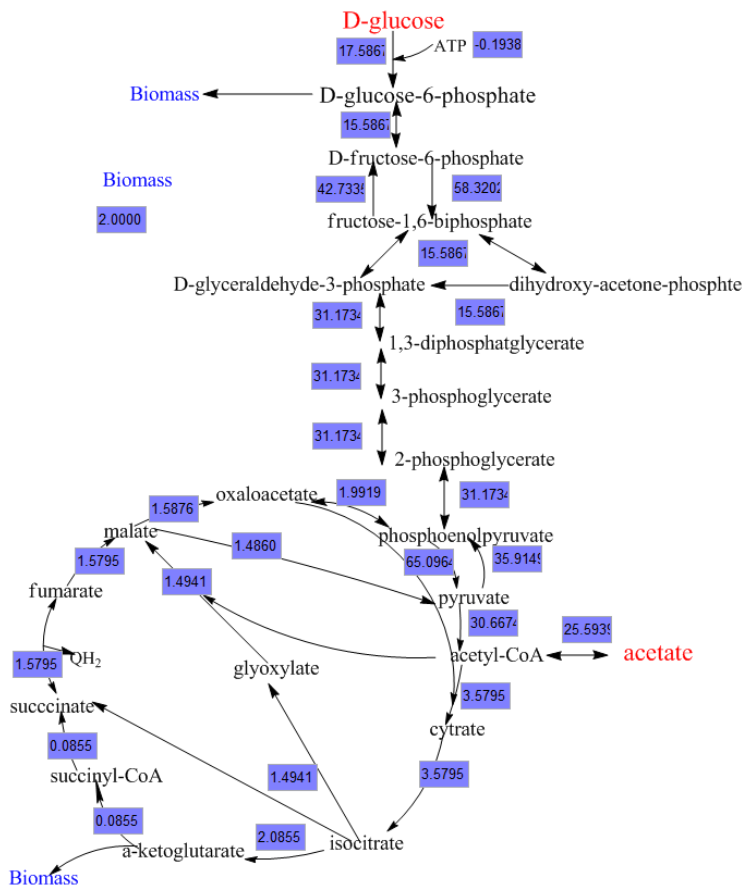


Рис. 9.11. — Результати моделювання росту *E.coli* на глюкозі

## 2.2. Моделювання росту *E.coli* на середовищі з ацетату. Виконайте розрахунки, дайте відповіді на запитання.

- Виконайте моделювання зростання *E. Coli* на ацетатному середовищі, встановивши межі потоків від -100 до 0 для обох реакцій зв'язування субстратів.
- Встановіть, чи буде приріст біомаси на ацетатному середовищі, чи виділяється глюкоза?
- Порівняйте потоки через гліоксилатний шунт при рості глюкозі та ацетаті.
- Як використовується АТФ?

Зверніть увагу, що при рості *E. coli* на ацетаті експресуються ферменти гліоксилатного шунта — ізоцитратліаза (*aceA*) і малатсинтаза (*aceB*) — з'являється розгалуження на рівні ізоцитрату, який споживається або ізоцитратдегідрогеназою (*icd*, IDH, або ізоцитратліазою).

Розподіл ізоцитрату між цими двома реакціями регулюється кіназою / фосфатазою IDH (*aceK*). Якщо велика частина IDH фосфорильована, тобто є неактивною (IDHP), ізоцитрат в основному спрямовується у гліоксилатний шунт для поповнення сукцинату (Suc) і малату (Mal), які витрачаються на біосинтез. З іншого боку, якщо IDH знаходиться в нефосфорильованій (активній) формі, ізоцитрат надходить у нижній сегмент циклу Кребса і двічі декарбоксилюється ферментами IDH і KGDH. В останньому випадку цикл Кребса реалізує свою енергетичну функцію, забезпечуючи відновними еквівалентами дихальний

ланцюг. Виконані розрахунки свідчать про синтез АТФ, на що вказує негативна величина потоку цього метаболіту.

### **3. Застосувати методи нокаутування генів і балансу стаціонарних потоків для аналізу процесів центрального метаболізму *E. Coli*.**

Здатність *E. Coli* адаптуватися до втрати функціональності гена може бути проаналізована шляхом видалення гена з основного набору.

#### **3.1. Моделювання нокауту ацетатно-гліоксилатного шунта.**

Цей метаболічний шлях дозволяє *E. coli* перенаправляти потік від глюконогенетичних вуглецевих субстратів (ацетат, цитрат та ін.) з ЦТК у глюконогенез. У цьому випадку іCit за допомогою ізоцитратліази (AceA) розщеплюється на Succ і Glyox, який у свою чергу під дією малатсинтази (AceB) зв'язується з AcCoA, що приводить до утворення Mal і CoA. Як бачимо при функціонуванні гліоксилатного шунта цикл трикарбонових кислот істотно змінюється, в цьому випадку його прийнято називати гліоксилатним циклом, або циклом Кребса—Корнберга.

Ми моделюємо ефект нокаутування гена, який виробляє фермент, що каталізує першу реакцію гліоксилатного шунта. Ген aceA виробляє ізоцитратліазу, яка каталізує реакцію



Для цього виконують такі операції:

- ▶ Очистити попередні величини за допомогою команд Scenario, Clear all values.
- ▶ Обираємо Network, Network composer. У вікні Reaction відмічаємо потрібну реакцію та обираємо Edit.
- ▶ У вікні реакції гліоксилатного шунта вручну змінюють знак «#» на 0.0.
- ▶ Для встановлення змін вибрати Scenario, Set default scenario.
- ▶ Виконують процедуру оптимізації потоків за допомогою команд Analysis, Flux balance analysis, Flux Optimization.
- ▶ Занесіть результати моделювання у таблицю.

Результати моделювання нокауту ацетатно-гліоксилатного шунта при рості мутантної форми *E.coli* на ацетатному середовищі показано на рисунку 9.12. При моделюванні росту мутантної форми *E.coli* на ацетатному середовищі (рис. 9.12) величина біомаси дорівнює 0.0, що означає, що жоден ріст неможливий. Хоча деякі потоки відмінні від нуля, немає глюкогенезу (виробництво глюкозо-6-фосфату). Оскільки глюкозо-6-фосфат частина біомаси, то ніяка біомаса не може бути вироблена, тому що потік виробництва G6P дорівнює нулю.

• Виконайте моделювання росту мутантної форми *E.coli* на глюкозному середовищі.



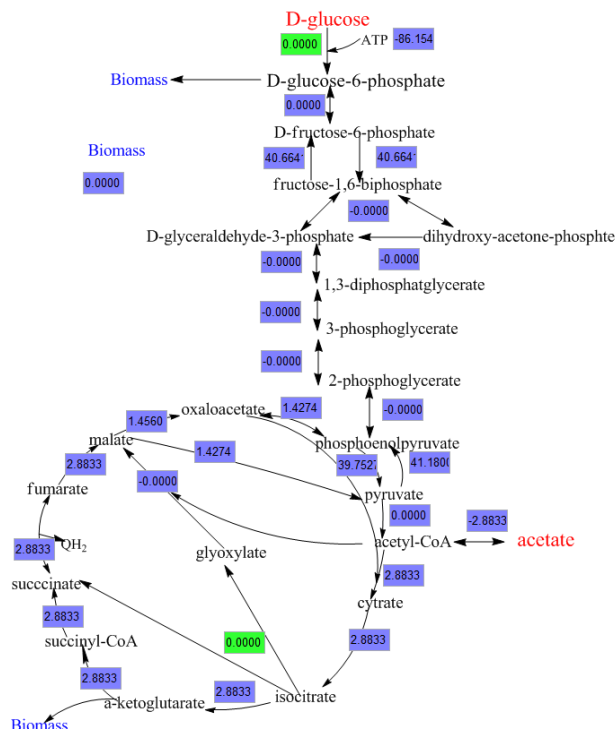
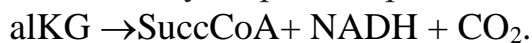


Рис. 9.12. — Результати моделювання росту мутантної форми *E.coli* з відсутністю гена *aceA* на ацетаті

### 3.2. Виконайте моделювання нокауту гена *sucAB*.

Ген *sucAB* кодує  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназу, яка каталізує реакцію окисного декарбоксилювання  $\alpha$ -кетоглутарату з утворенням сукциніл-СоА, вуглекислого газу, поряд з виробництвом NADH і  $H^+$ .



Нокаутування цього гену теоретично може дати максимальний приріст біомаси, оскільки  $\alpha$ -кетоглутарат перетвориться в біомасу. Однак, як відомо, крім участі в циклі трикарбонових кислот, SuccCoA використовується як проміжна ланка в багатьох метаболічних процесах, основним з них є біосинтез лізину. У цьому процесі SuccCoA використовується у виробництві діамінопімелату, важливого компоненту в біосинтезі пептидогліканів. У зв'язку з цим SuccCoA виробляється у двох послідовних реакціях, одна з яких каталізується  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназою, інша – SuccCoA-синтазою (реакція оборотна).

Результати розрахунків наведіть у вигляді таблиці:

Клітини	Кількість біомаси	
	Глюкоза	Ацетат
Дикий тип <i>E.coli</i>		
<i>aceA</i> , нокаут		
<i>sucAB</i> , нокаут		

За даними літератури, мутантна форма *E.coli*, з відсутнім геном *sucAB*, може бути отримана як на глюкозному, так і на ацетатному середовищі. Мутантна форма *E.coli* при культивуванні на глюкозі виробляє біомасу, однак

для цього необхідний додатковий АТФ. У системі виділяється ацетат і не виробляється SuccCoA, який важливий для життєздатності E.coli.

При культивуванні мутантної форми E.coli на ацетатному середовищі приріст біомаси менше, проте потік реакції SuccCoA  $\leftrightarrow$  Succ + АТФ обернений у бік утворення SuccCoA. З літературних даних відомо, що E.coli з відсутнім геном sucAB або sucCD мають дуже низьку швидкість росту, що може пояснюватися участю SuccCoA у багатьох метаболічних реакціях.

*Порівняйте отримані результати моделювання з відомостями, що наведені вище.*

### 3.3. Виконайте моделювання нокауту гена *icd* та *рукA*.

Ген *icd* виробляє ізоцитратдегідрогеназу, яка каталізує реакцію  $\text{isocitrate} + \text{NADP}^+ \leftrightarrow \text{NADPH} + \alpha\text{-ketoglutarate} + \text{CO}_2$ .

Icd є, мабуть, основним регуляторним елементом у ЦТК на метаболічному рівні, оскільки саме на цій ділянці відбувається управління розподілом потоків між ЦТК і глиоксилатним шунтом. У E. coli для регуляції *icd* залучена спеціальна система, заснована на фосфорилуванні активного ферменту за допомогою регуляторної кінази / фосфатази (AceK).

Результати моделювання нокауту реакції, що виробляє  $\alpha$ -кетоглутарат з ізоцитрату при зростанні E.coli на різних поживних середовищах свідчать, що в жодному з випадків отримати мутантну форму, у якій відсутній ген *icd*, неможливо.

Результати розрахунків наведіть у вигляді таблиці:

Клітини	Кількість біомаси	
	Глюкоза	Ацетат
Дикий тип Ecolі		
<i>aceA</i> , нокаут		
<i>sucAB</i> , нокаут		
<i>Icd</i> , нокаут		
<i>рукA</i> , нокаут		

Одна з переваг аналізу балансу стаціонарних потоків полягає в тому, що він може передбачити умовні нокауту. Ефект нокауту умовний, якщо зростання тільки відбувається за певних умов живлення. Зроблені розрахунки свідчать, що нокаутування гена *aceA* умовно, в той час як нокаутування гена *icd* безумовне (за відсутності цього гена організм існувати не може).

## Література

1. Системная компьютерная биология / Под редакцией: Н. А. Колчанов, В. А. Лихошвай, С. С. Гончаров, В. А. Иванисенко. — Новосибирск: Сибирское отделение Российской академии наук, 2008. — 768 с.
2. Systems Biology. A Textbook / E. Klipp, W. Liebermeister, C. Wierling, A. Kowald, H. Lehrach, R. Herwig. — Wiley-VCH, Weinheim, 2009. — 592с.
3. An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits. Uri Alon, Chapman & Hall / CRC Mathematical & Computational Biology, 2006. — 320с.
4. Computational Modeling of Biochemical Networks Using COPASI / P. Mendes, S. Hoops, S. Sahle, R. Gauges, J. Dada, U. Kummer. // Methods in Molecular Biology, Systems Biology. — Vol. 500. — 2. — P. 17—59.
5. Stanford N. J. Kinetic modelling of metabolic pathways. / N. J. Stanford, K. Smallbone. // The Bioinformatics Knowledgeblog. <http://bioinformatics.knowledgeblog.org/2011/06/21/kinetic-modelling-of-metabolic-pathways/>
6. Hynne F. Full-scale model of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae* / F. Hynne, S. Danø, P. G. Sørensen // Biophysical Chemistry. — 2001 — 94. — P. 121—163.
7. Rizzi M. In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II. Mathematical model / M. Rizzi, M. Baltes, U. Theobald, M. Reuss // Biotechnology and Bioengineering. — 1997. — 55. — P. 592—608.
8. Curien G. Kinetic model of the branch-point between the methionine and threonine biosynthesis pathways in *Arabidopsis thaliana* / G. Curien, S. Ravanel, R. Dumas // Eur. J. Biochem. — 2003. — 270. — P. 4615—4627.
9. Rohwer J. M. Analysis of sucrose accumulation in the sugar cane culm on the basis of in vitro kinetic data / J. M. Rohwer, F. C. Botha // Biochem. J. — 2001. 358. — P. 437—445.
10. Schuster S. A. Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering./ S. Schuster, T. Dandekar, D. Fell // Trends Biotechnol. — 1999. — 17. — P. 53—60.
11. Kholodenko B.N. Negative feedback and ultrasensitivity can bring about oscillations in the mitogen-activated protein kinase cascades / B. N. Kholodenko // Eur J Biochem. — 2000. — 267(6). — P.1583—8.
12. Kauffman K. J. Advances in flux balance analysis / K. J. Kauffman, P. Prakash, J. S. Edwards // Curr. Opin. Biotechnol. — 2003. — 14. — P. 491—496.
13. von Kamp A. Use of CellNetAnalyzer in biotechnology and metabolic engineering / A. von Kamp, S. Thiele, O. Hädicke, S. Klamt // Journal of Biotechnology. — 2017. — V. 261, 10. — P. 221—228.