**Практична робота 2. Системний підхід у вирішенні ключових проблем сучасної біології.**

Робота 1. Створення метаболічної моделі у програмі COPASI Математичний опис кінетичної метаболічної моделі може бути заданий у формі диференціального рівняння 𝑑𝑥𝑖 𝑑𝑡 = 𝑁𝑣(𝑥𝑖 , 𝑦, 𝑝), 𝑥𝑖 (0) = 𝑥𝑖 \_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. 𝑥𝑖 — 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 х і у і параметрів р. 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): 𝐷𝐻𝐴𝑃 + 𝑁𝐴𝐷𝐻←𝐺3𝑃 + 𝑁𝐴𝐷 → . Ця реакція зворотна, на її швидкість впливають концентрації метаболітів АТР, ADP, F16BP. Щоб ввести стехиометричні 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 5 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: 𝐺3𝑃 → 𝐺𝑙𝑦 + 𝑃ℎ𝑖. 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, віна містить G3P, який виробляється в результаті першої реакції і споживається іншою. 6 Рис. 1.3. — Введення типу та концентрацій метаболітів Рис. 1.4. — Матриця стехіометрії моделі Крок 4. Рівняння швидкостей реакцій Кінетичний закон швидкості може бути отриманий зі знань механізму, що лежить в основі ферментативного процесу. В нашій моделі реакція 1 зворотна, бісубстратна, ії швидкість залежить від концентрації ATP, ADP, F16BP. За даними досліджень, швидкість цієї реакції описується таким рівнянням: 16 3 3 16 3 1 1 1 f NADH DHAP eq F BP ATP ADP NADH NAD DHAP G P V NAD G P NADH DHAP K K K v F BP ATP ADP NADH NAD DHAP G P K K K K K K K ⎛ ⎞ ⋅ ⋅ ⋅ − ⎜ ⎟ ⎜ ⎟ ⋅ ⎝ ⎠ = ⎛ ⎞ ⎛ ⎞ ⎛ ⎞ ⎜ ⎟ ⎜ ⎟ ⎜ ⎟ + + + ⋅ + + ⋅ + + ⎝ ⎠ ⎝ ⎠ ⎝ ⎠ . 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 7 визначення послідовності операцій (послідовність операцій при введенні рівняння швидкості показано на рис. 1.5): Vf/(Knadh\*Kdhap)\*(NADH\*DHAP-NAD\*G3P/Keq)/ ((1+F16BP/Kf16BP+ATP/Katp+ADP/Kadp)\*(1+NADH/Knadh+NAD/KNAD)\*(1+ DHAP/Kdhap+G3P/KG3P)). 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 8 і натисніть Соmmit. 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 табличці 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: 3 3 3 1 3 1 1 G P G P Phi V G P v K G P Phi K K ⋅ = ⋅⎛ ⎞ ⎛ ⎞ ⎜ ⎟ ⎜ ⎟ + ⋅ + ⎝ ⎠ ⎝ ⎠ Параметри цього рівняння є такими: V = 13, Kg3p = 3,5, Kphi = 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. 9 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 Тasks>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. Відключайте кнопки унизу вікна, щоб побачити і проаналізувати отримані залежності (рис. 1.8). Рис. 1.8. — Зміни концентрацій метаболітів з часом 10 Завдання для самостійної роботи. 1. Створіть модель для такої метаболічної мережі: Метаболічна мережа складається із трьох реакцій, у яких речовина А перетворюється на речовину Х, яка потім може перетворюватись на В або С. Квадрати – це ферменти, що керують цими реакціями. Накопичення В приводить до гальмування реакції утворення Х, а накопичення С гальмує реакцію перетворення Х на В. Початкові концентрації речовин: [A]0 = 1mM, [B]0 = 0,1mM, [C]0 = 0,1mM, [X]0 = 0. 1. Реакція 1 являє собою оборотну реакцію Міхаеліса—Ментен з неконкурентним інгібітором B, кінетичне рівняння якої має вигляд: ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ ⎟⋅ + ⎠ ⎞ ⎜ ⎝ ⎛ + + ⋅ − ⋅ = I f r K I KmP P KmS S KmP P V KmS S V v [ ] 1 [ ] [ ] 1 [ ] [ ] , де де [S]—концентрація субстрату, [P]—концентрація продукту, [I]—концентрація інгібітора. Примітка. Поміркуйте, що у цій реакції є субстратом, а що продуктом. Замість[S], [P] та [I] використовуйте в рівнянні позначення цих метаболітів. R1 Параметри: Kms = 0,1 mM, Kmp = 0,1 mM, Vf = 10 mM/(l\*s), Vr = 0,1 mM/(l\*s), Ki = 0,01 mM. 2. Реакція 2 являє собою необоротну реакцію Міхаеліса—Ментен з неконкурентним інгібітором 2-го порядку, кінетичне рівняння якої має вигляд: ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ ⎟⋅ + ⎠ ⎞ ⎜ ⎝ ⎛ + ⋅ = 2 [ ] 1 [ ] 1 [ ] max KI I Km S Km S V v R2 Параметри: Km = 0,1mM, Vmax = 2mM/(l\*s), Ki = 0,1mM. 3. Реакція 3 являє собою необоротну реакцію Міхаеліса—Ментен: [ ] max [ ] Km S V S v + ⋅ = Примітка. Кінетика рівняння 3 описується стандартним рівнянням, що є у базі COPASI. У R3 Параметри: 11 рядку Rate Law виберіть Henri—Michaelis-Menten (irreversible). Km = 0,1mM, Vmax = 2mM/(l\*s) 2. Побудуйте кінетичні залежності якщо 1) А, В, С є потоки, X—метаболіт, 2) А, В, С, X—внутрішні метаболіти.