Практична робота 7

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 13С 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 англомовній літературі Flux Balance Analysis, FBA). Під метаболічним потоком розуміється швидкість перетворення речовини в метаболічному шляху. Одним зі способів опису метаболічних реакцій клітини є побудова потокових моделей, заснованих на припущенні про 41 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 v1…v6, у результаті яких вихідний метаболіт S1 перетворюється в метаболіт S4, що є кінцевим продуктом. Тут Si – метаболіти, vi – 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: 1 2 3 1 v v v dt dS = − − 2 4 5 2 v v v dt dS = + − (1) 3 4 1 v v dt dS = − 5 6 1 2v v dt dS = − 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. 42 1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 1 1 1 0 0 0 0 1 0 1 1 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 2 1 v v v v v v S S N S S ⎛ ⎞ − − ⎜ ⎟ ⎜ ⎟ = ⎜ ⎟ ⎜ ⎟ ⎝ ⎠ − . Проаналізуємо рядки матриці. Коефіцієнти першого рядка означають, що метаболіт S1 утворюється в реакції v1 і витрачається в реакціях v2 і v3. Коефіцієнти другого рядка означають, що метаболіт S2 утворюється в реакції v2 і v4 і витрачається в реакції v5. Коефіцієнти третього рядка означають, що метаболіт S3 утворюється в реакції v3 і витрачається в реакції v4. Коефіцієнти четвертого рядка означають, що 2 молекули метаболіту S4 утворюються в реакції v5, при цьому в реакції v6 витрачається тільки 1 молекула метаболіту S4. Запишемо вектор швидкостей реакцій: ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ = 6 5 4 3 2 1 v v v v v v v . (2) Тоді систему рівнянь можна подати в матричному вигляді: 1 1 2 2 3 3 4 5 4 6 1 1 1 0 0 0 0 1 0 1 1 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 2 1 dS v dt v dS v dt dS v dt v dS v dt ⎛ ⎞ ⎜ ⎟ ⎛ ⎞ − − ⎜ ⎟ ⎜ ⎟ ⎜ ⎟ ⎜ ⎟ = ⋅⎜ ⎟ ⎜ ⎟ ⎜ ⎟ ⎜ ⎟ ⎜ ⎟ ⎝ ⎠ − ⎜ ⎟ ⎜ ⎟ ⎝ ⎠ . 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: 43 0 0 0 0 0 2 1 0 0 1 1 0 0 0 1 0 1 1 0 1 1 1 0 0 0 6 5 4 3 2 1 = ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ ⋅ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ − − − v v v v v v . (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 кожну з реакцій. Помноживши матрицю стехіометричних коефіцієнтів на вектор швидкостей, отримаємо систему алгебраїчних рівнянь (4): 0 v1 − v2 − v3 = 0 v2 + v4 − v5 = . (4) 0 v3 − v4 = 2 0 v5 − v6 = Представляючи вектор метаболітів як S = (S1, S2, S3, S4), вихідну систему диференціальних рівнянь (1) можна записати як Nv dt dS = , (5) і в стаціонарних умовах: Nv = 0. (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) — v1…v6. 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 S4, який визначається швидкістю v6. Тоді завдання лінійного програмування для цієї схеми буде виглядати так: знайти максимум цільової функції z, max z = v6 → при наступних умовах: 44 0 0 0 0 0 2 1 0 0 1 1 0 0 0 1 0 1 1 0 1 1 1 0 0 0 6 5 4 3 2 1 = ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ ⋅ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ − − − v v v v v v , 1 6 0 .... . ≤ ≤ ∞ v v Метод елементарних мод розглядає всі можливі направлення 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 а та б, показаними на рисунку 1. Тоді кількість елементарних мод для схем а 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. а б в Г д ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ − ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ − − ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ − − − ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ − − ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ = 1 1 1 0 , 1 0 0 1 , 0 1 1 1 , 1 1 1 0 , 1 0 0 1 , 0 1 1 1 a v е ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ − ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ − − ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎟ ⎠ ⎞ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎜ ⎝ ⎛ = 1 1 1 0 , 1 0 0 1 , 1 0 0 1 , 0 1 1 1 б v Рис. 1. — Отримання елементарних мод для метаболічних процесів а та б Робота 9. Створення та редагування моделі метаболізму Ecoli в Cell Net Analyzer Введення даних в Cell Net Analyzer (CNA): 45 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 OK 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 Еcoli. 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 — Ecoli. > У рядку Name of Subdirectory вкажіть назву папки (в межах директорії CellNetAnalyzer) — Ecoli. > У вікні Name: Ecoli TCA Network Map вкажіть назву графічного файлу, що містить карту мережі. Для цього: > Клацнуть мишею по кнопці browse, в папці Ecoli знайти файл: Ecoli.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 46 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.