

Моделирование метаболических путей

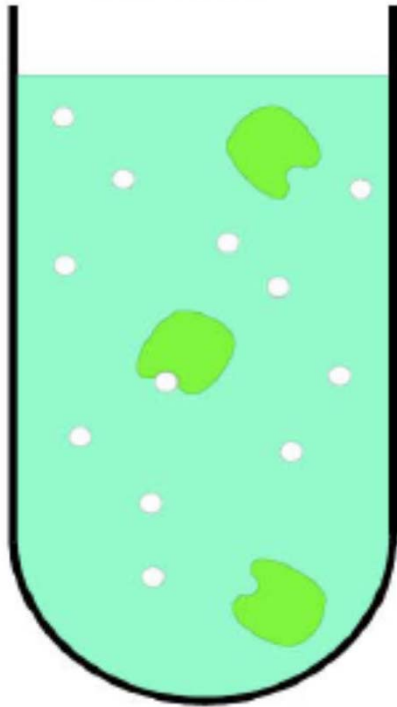
Плюснина Татьяна Юрьевна
Доц-т каф.биофизики
Биологического ф-та МГУ

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

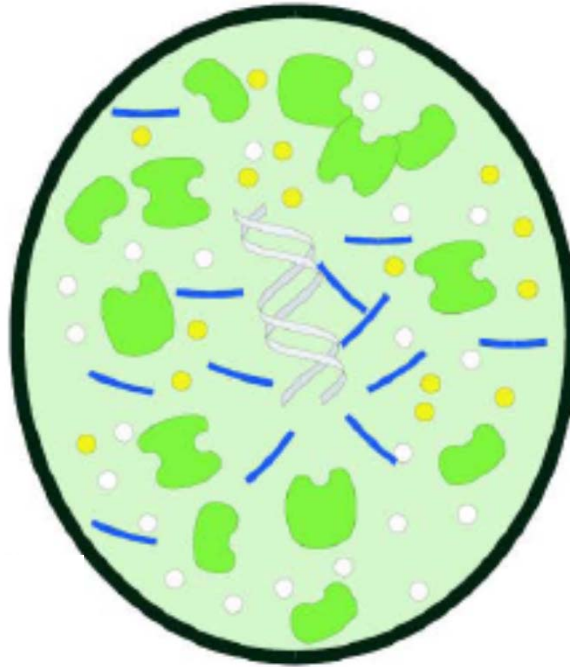
Метаболический путь — совокупность метаболических реакций

Уровни исследования метаболических реакций

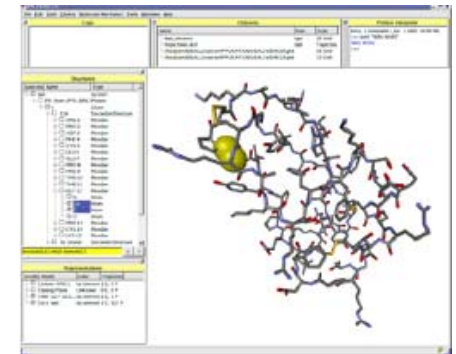
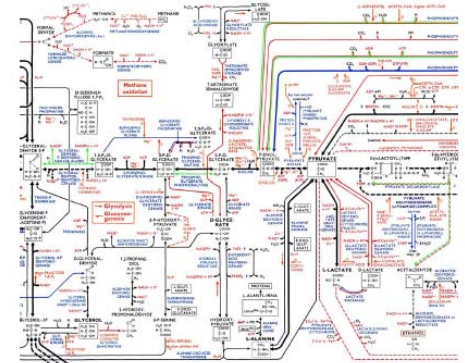
In vitro



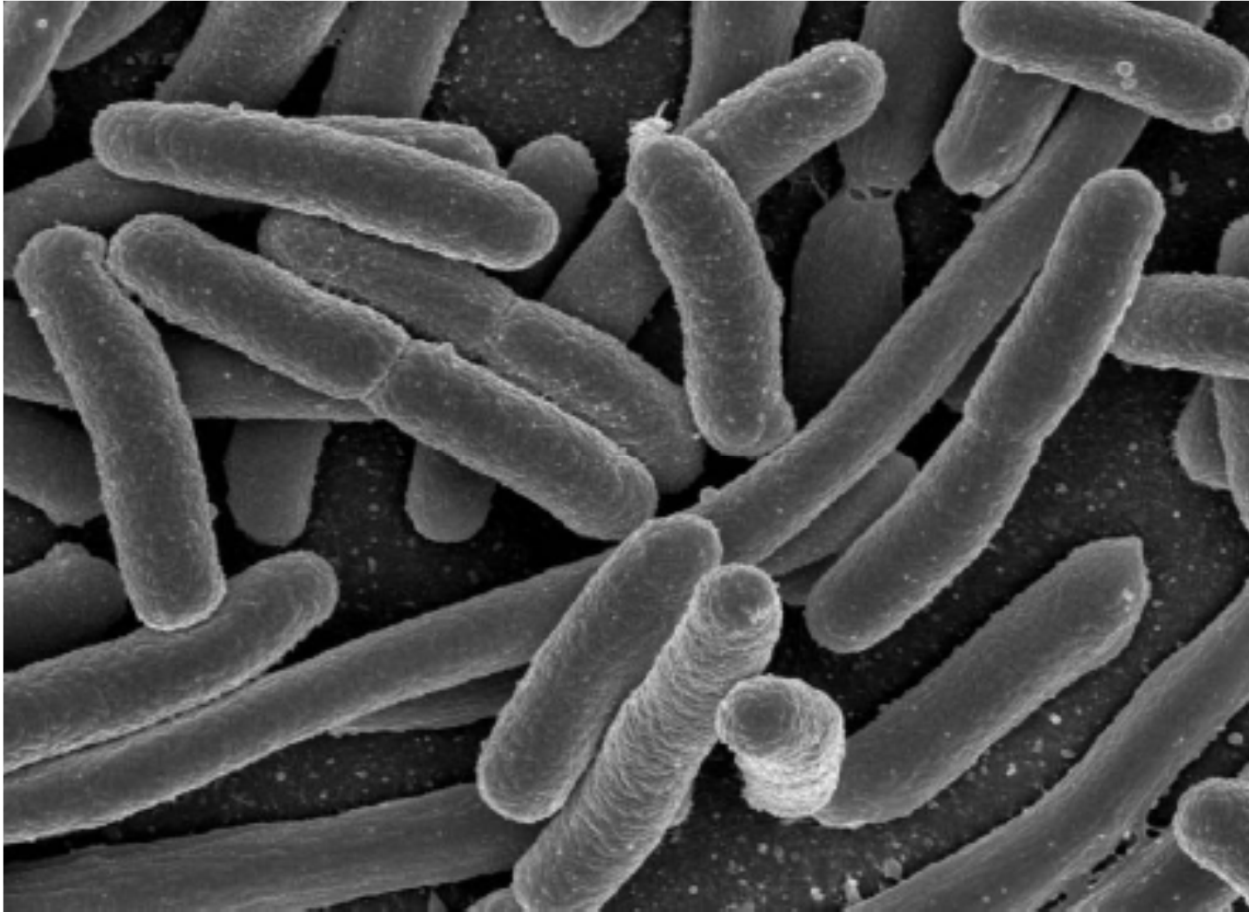
In vivo



In silico



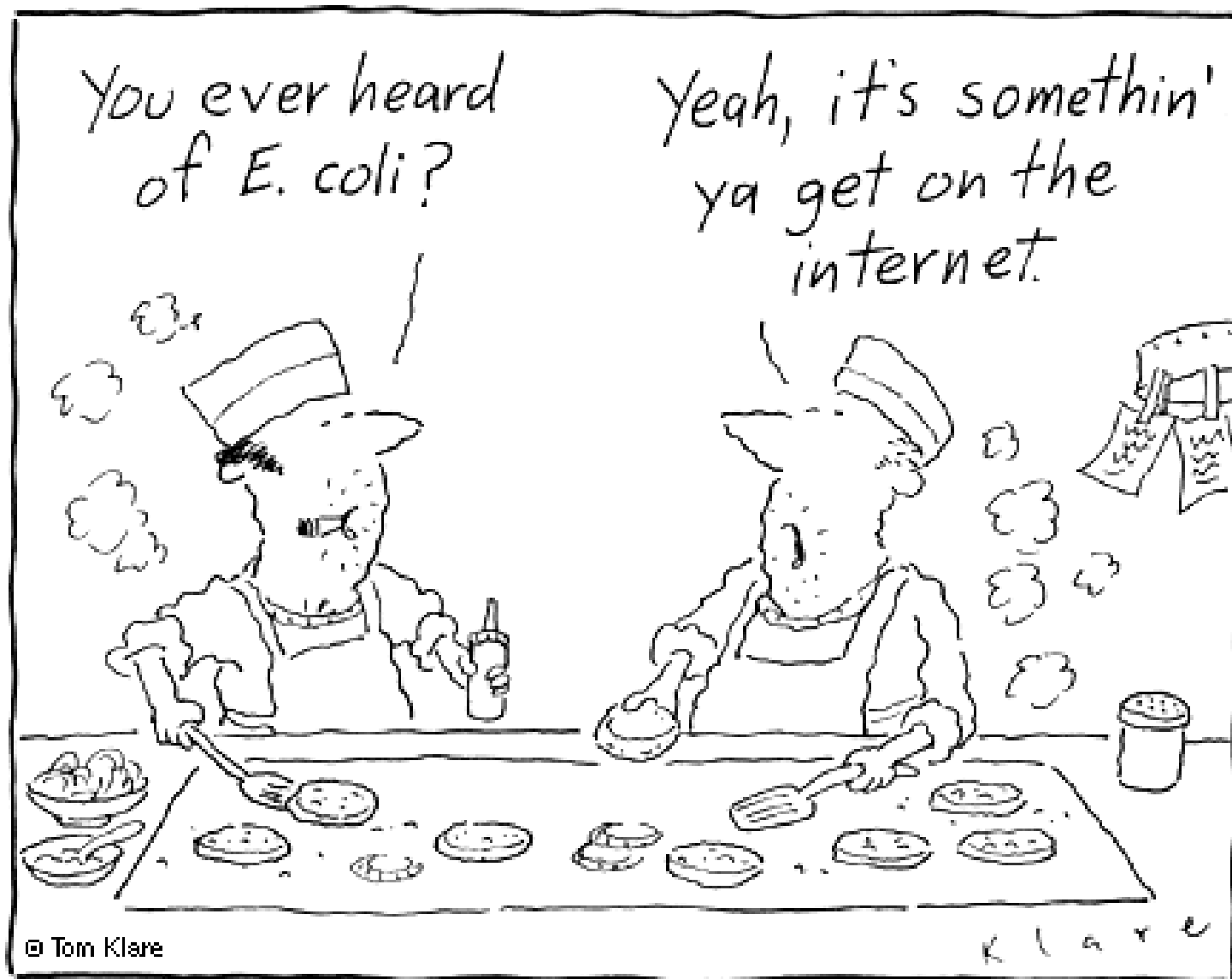
Моделирование метаболических путей *Escherichia coli*



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

Escherichia coli – удобный объект для моделирования клеточного метаболизма

Электронная клетка: миф или реальность?



“The simplest living cell is so complex that supercomputer models may never simulate its behavior perfectly.
But even imperfect models could shake the foundations of biology.”

W.Wayt Gibbs. Scientific American, 2001

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

Цели и задачи метаболического моделирования

Научные задачи:

- систематизация накопленных экспериментальных данных
- исследование механизмов клеточной регуляции в сложных биохимических системах
- объяснение экспериментально установленных фактов и предсказание новых ещё не выявленных внутриклеточных явлений

Биоинженерные задачи:

- разработка новых лекарств
- оптимизация получения необходимых веществ из бактериальных клеток
- разработка новых штаммов с наперед заданными свойствами
- оптимизация уже существующих промышленных штаммов

Экспериментальные методы модификации штамма:

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

Теоретические подходы и концепции метаболического моделирования

Классический системный подход

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

Данные для верификации метаболической модели

1. Многие (но не все) внутриклеточные концентрации метаболитов могут быть измерены.
2. В стационарном состоянии большинство метаболических потоков может быть определено с помощью изотопа ^{13}C .
3. Активности ферментов могут быть определены из клеточных экстрактов.
4. Кинетические константы большинства ферментов собраны в базы данных.

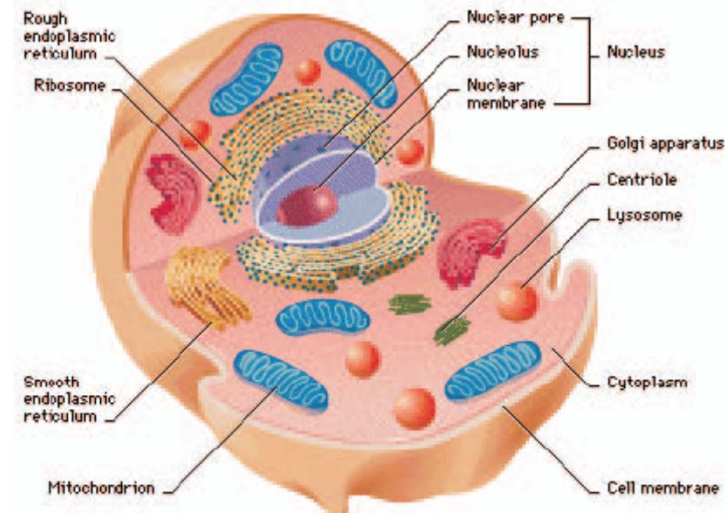
Количественные знания ограничены

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

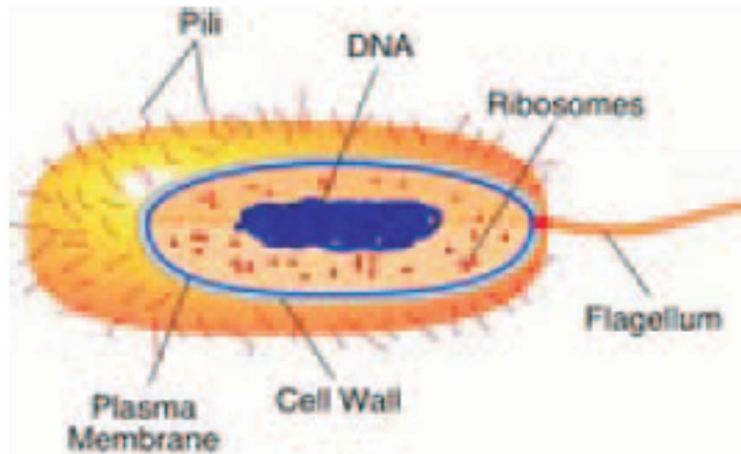
Разные уровни сложности организации клеток

Клетка эукариот

Клеточные процессы локализованы в разных компартментах



Microsoft Encarta Encyclopedia,
http://encarta.msn.com/media_461540224_761568585_-1_1/Animal_Cell.html



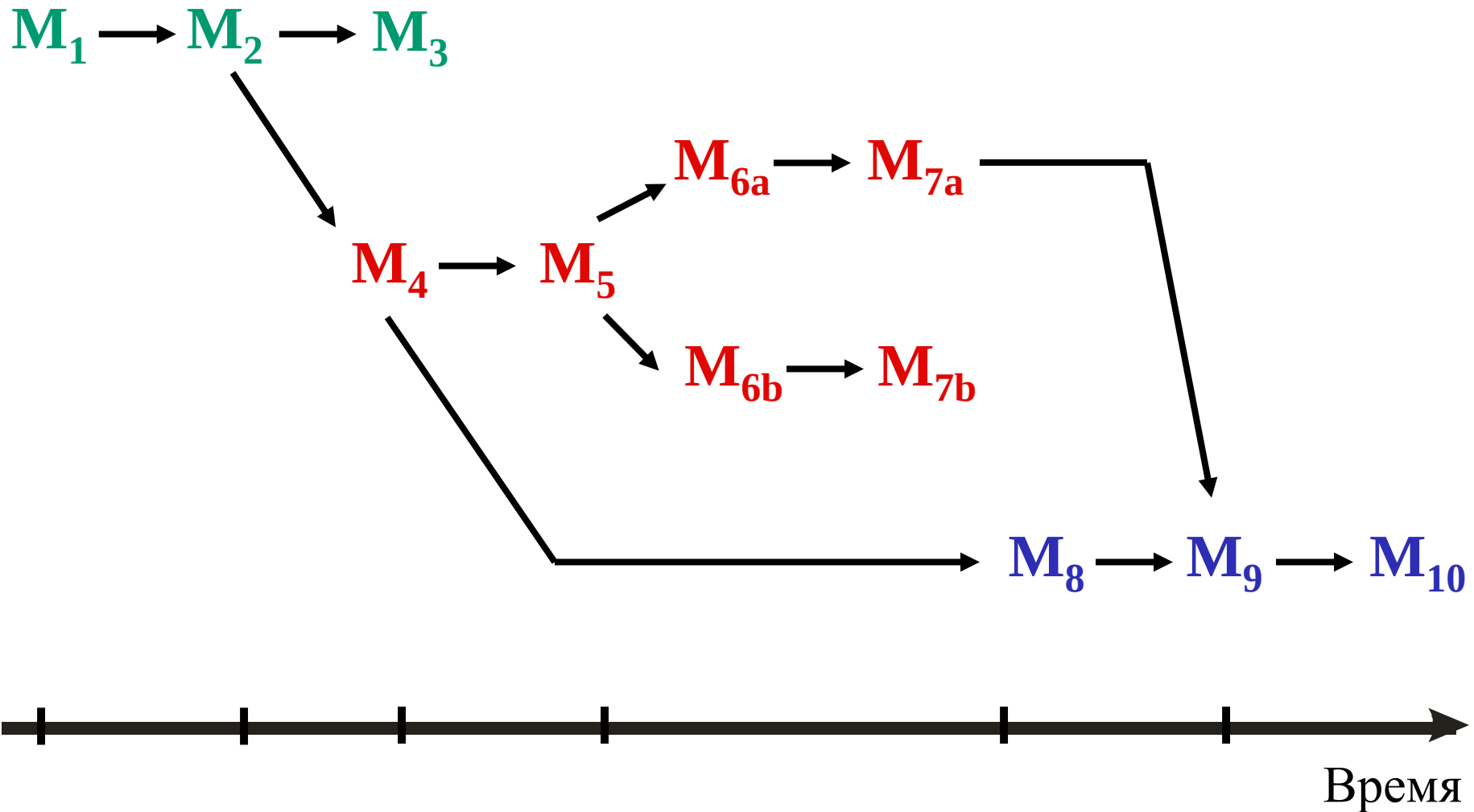
Клетка прокариот

Все процессы протекают в одном компартменте

Как строятся метаболические модели

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

Эволюция модели



Типы метаболических моделей

кинетические модели – системы ОДУ

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

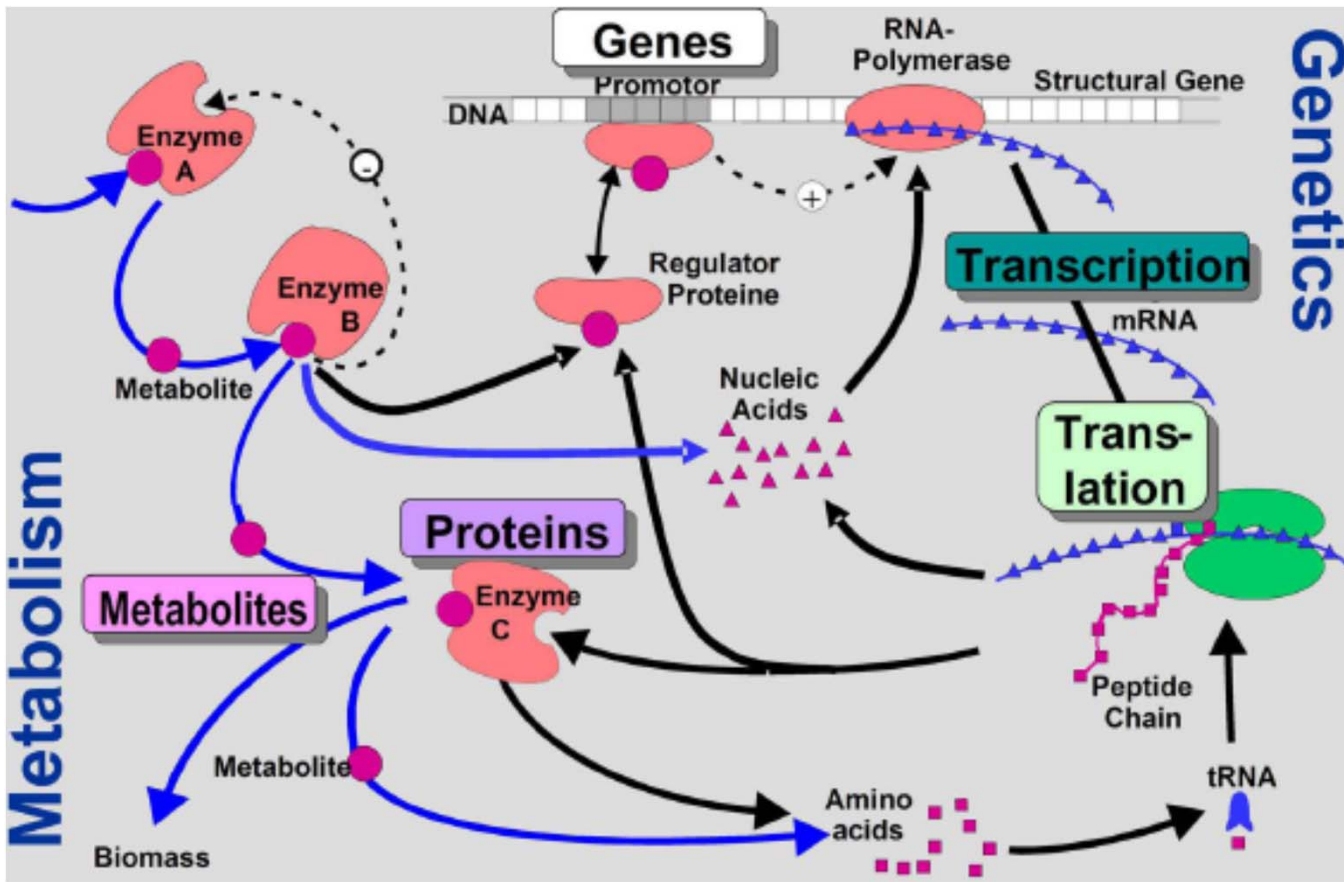
стехиометрические модели – системы линейных алгебраических уравнений

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

Кинетические модели

- построение схемы метаболического пути
- вывод уравнений скорости (по типу Михаэлиса-Ментен) для каждой реакции и объединение в систему дифференциальных уравнений (ОДУ)
- подбор параметров по экспериментальным данным

Escherichia coli



720 метаболических
процессов
436 метаболитов
540 ферментов

Описание метаболизма включает:
мембранные транспортные процессы
центральные катаболические пути
использование альтернативных источников углерода
биосинтетические пути (продукция всех компонент биомассы)

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

Метаболические пути *Escherichia coli*

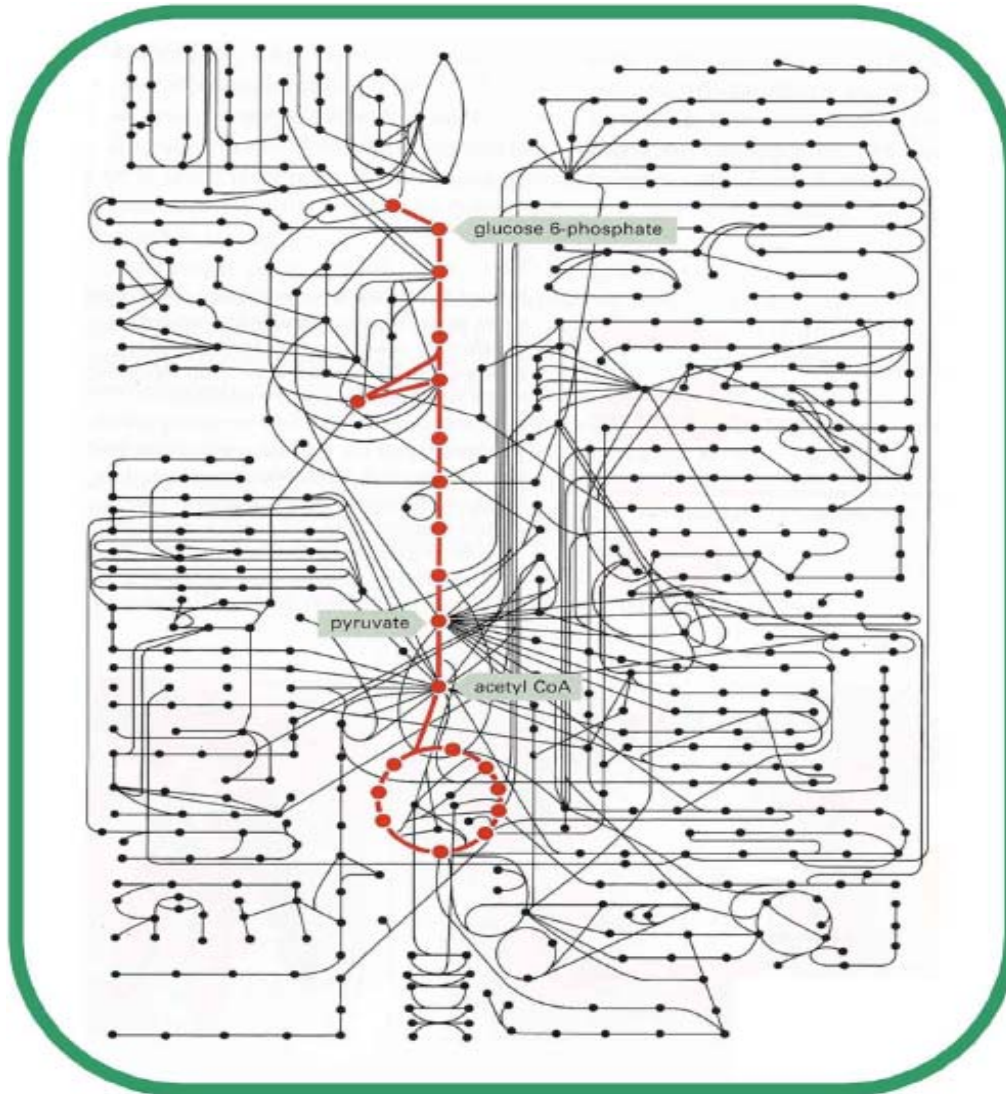
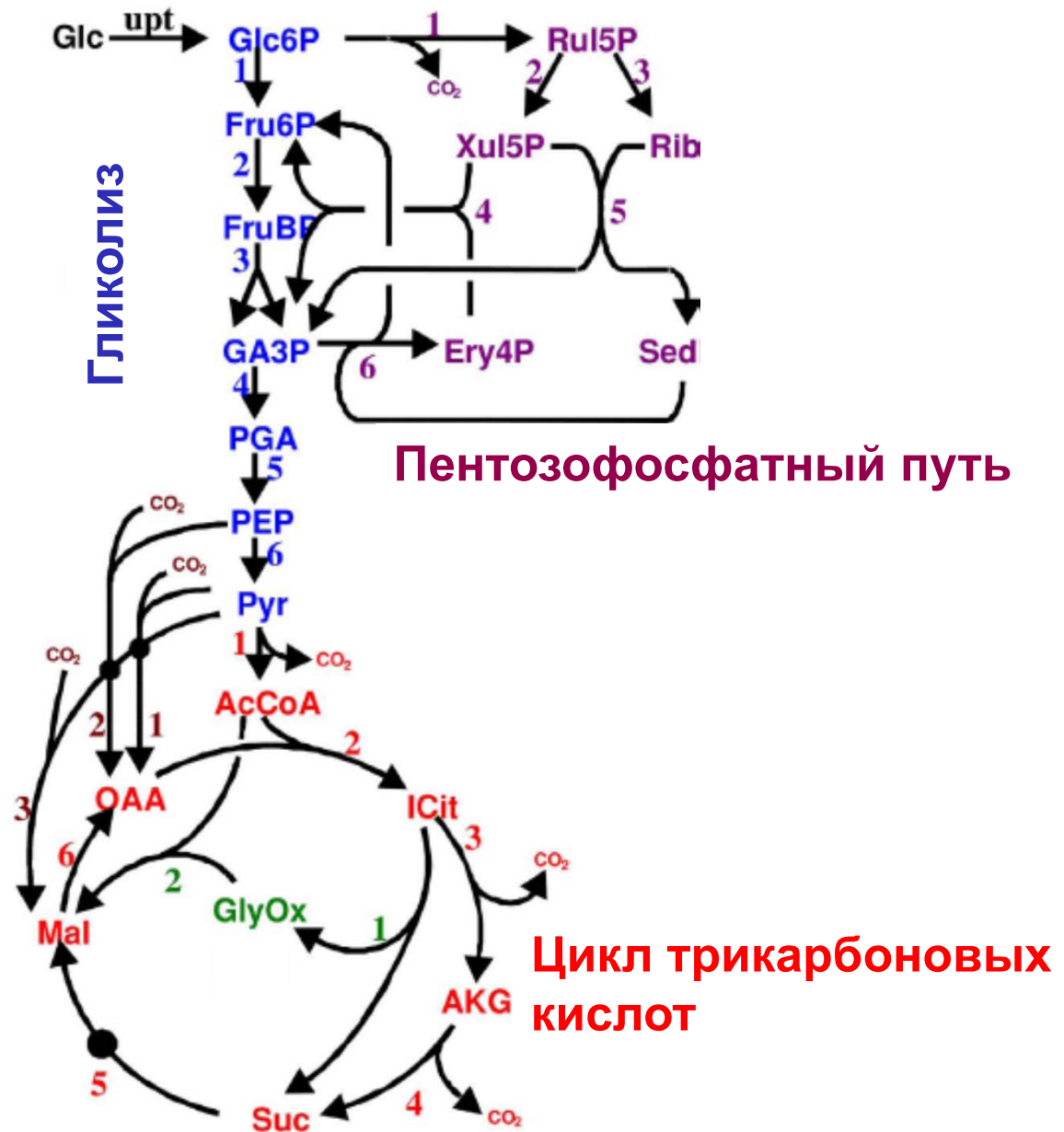


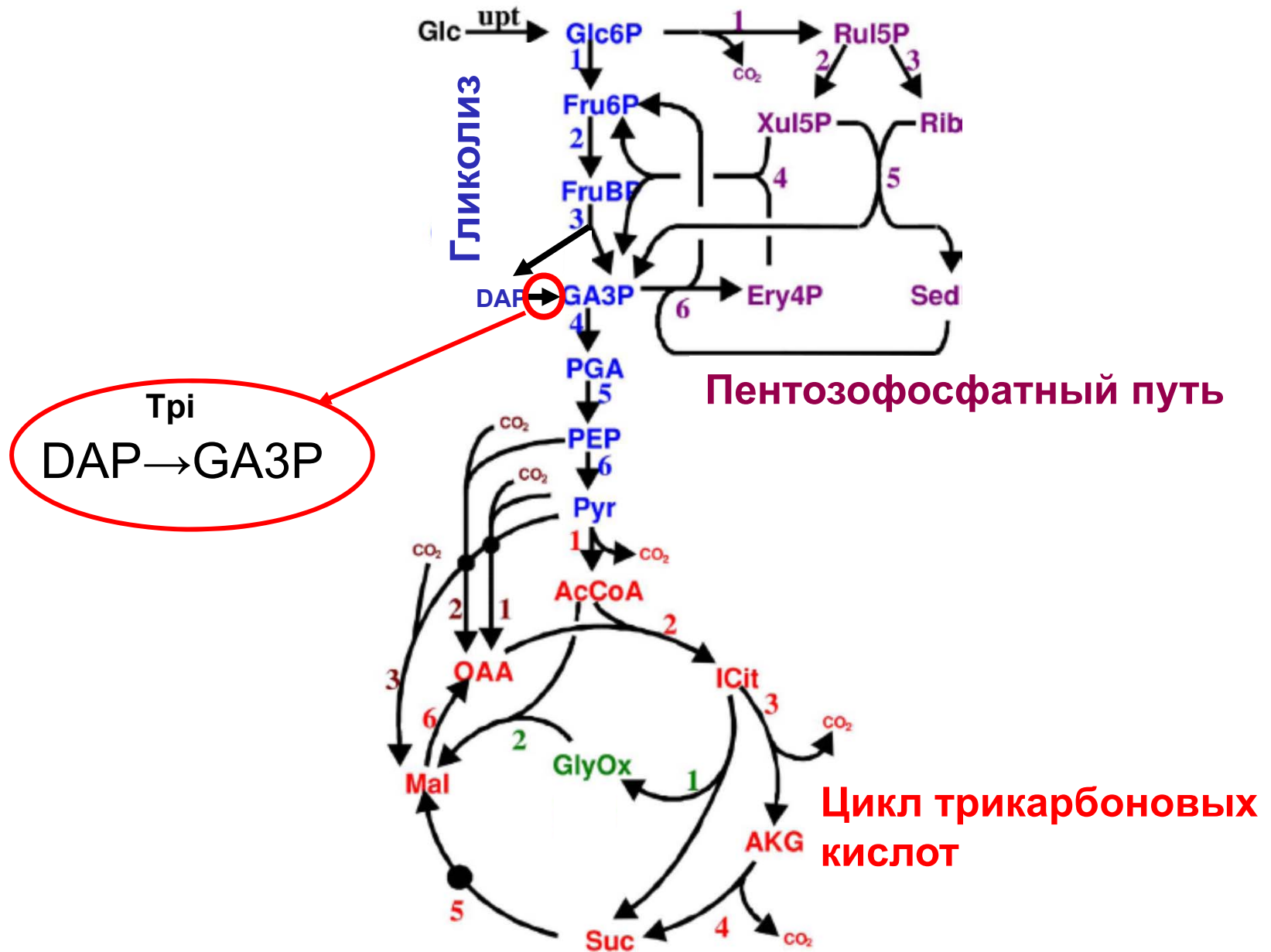
Figure from Ermir Qeli
Information Visualization Techniques for
Metabolic Engineering
Dissertation zur Erlangung des
akademischen Grades Doktor der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

Красным цветом выделены центральные метаболические пути

Центральные метаболические пути

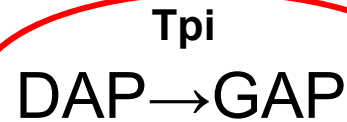


Центральные метаболические пути



Вывод уравнений скорости

Для триозофосфат изомеразы (Tri)



$$V = \frac{V_m}{K_m^{DAP}} \cdot \frac{C_{DAP} - \frac{C_{GAP}}{K_{eq}}}{1 + \frac{C_{DAP}}{K_m^{DAP}} + \frac{C_{GAP}}{K_m^{GAP}}}$$

Уравнение скорости выводится в соответствии с каталитическим циклом фермента

$$K_m^{DAP} = 2.3 \text{ mM}$$

$$K_m^{GAP} = 1.5 \text{ mM}$$

константы Михаэлиса для прямой и обратной реакций

$$k_{cat}^{+} = 45000 \text{ 1/min}, k_{cat}^{-} = 520000 \text{ 1/min}$$

каталитические константы для прямой и обратной реакций

+ субстрат – дигидроксиацетон фосфат, DAP.

- субстрат – глицеральдегид фосфат, GAP.

K_{eq} , V_m - рассчитываются по k_{cat} и равновесным значениям концентраций субстратов.

Определение констант:

1. из баз данных
2. из литературы
3. фитирование модели

Вывод системы уравнений

В общем случае

Уравнения, описывающие изменения во времени каждого метаболита:

$$\frac{dC_j}{dt} = \sum r_{ij} - \mu C_j$$

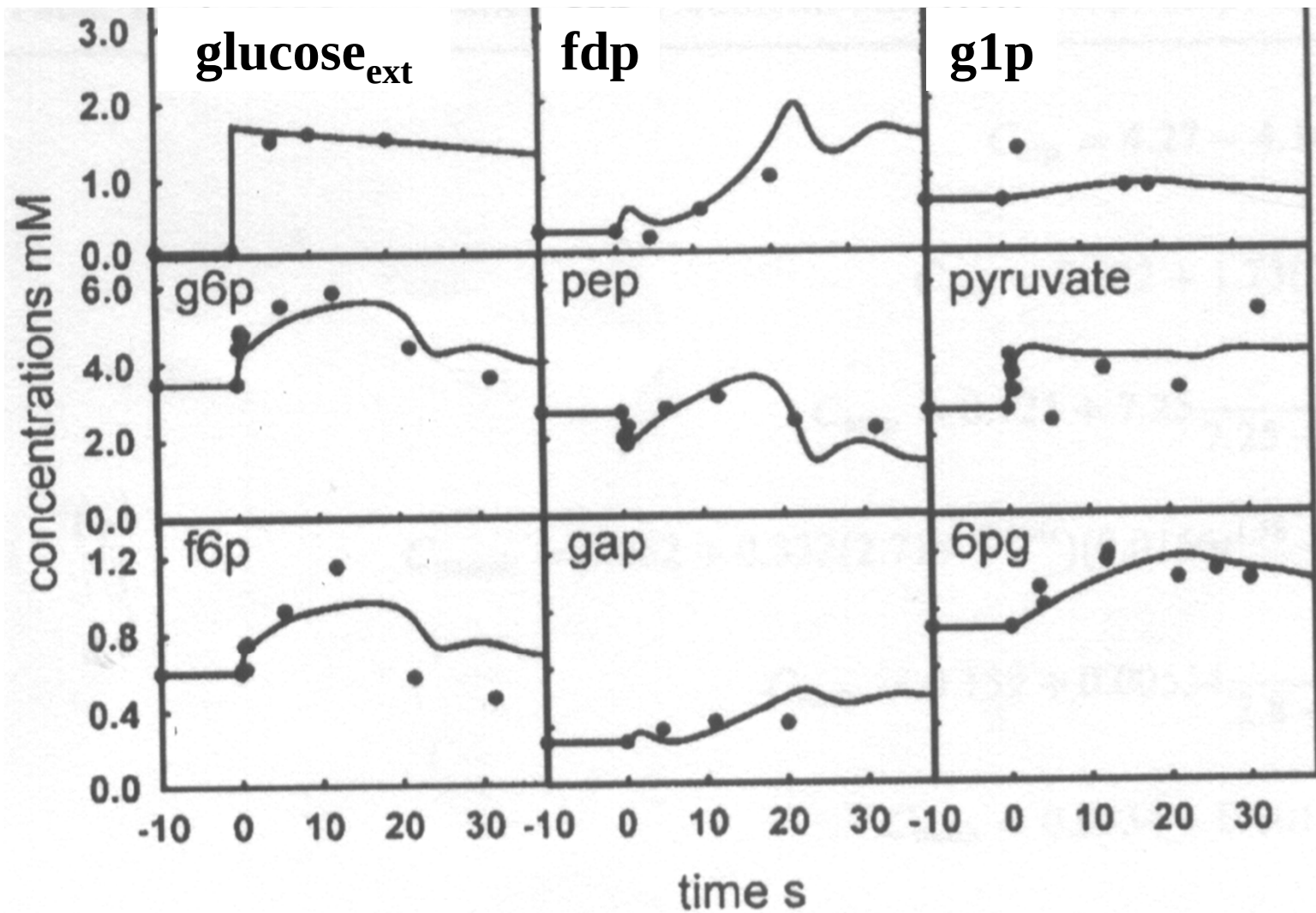
C_j – концентрация j -го метаболита

r_{ij} – скорость образования или распада j -го метаболита в i -той реакции

μC_j – уменьшение концентрации за счет клеточного роста

Система уравнений была применена для моделирования реакций центрального метаболизма *E.coli*

Результаты фитирования модели



Подбор параметров в результате численного счета с помощью метода наименьших квадратов

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

Результаты моделирования

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

“History teaches us that simulation can help explore particular questions, but there won’t be any master model that answers all questions. Eventually the models will become as complicated as cell itself and as difficult to understand.”

James E.Baily, Institute of Biotechnology, Zurich

«История учит нас, что моделирование может ответить на часть вопросов, но невозможно создать некую главную модель, которая отвечала бы на все вопросы. В конечном итоге модели становятся настолько же сложными, как и сама клетка и настолько же трудными для понимания.»

Стехиометрические модели

(модели стационарных состояний)

- построение схемы метаболического пути
- вывод уравнений баланса для каждого метаболита и объединение в систему дифференциальных уравнений
- рассмотрение стационарных состояний, получение системы алгебраических уравнений
- постановка задачи оптимизации
- анализ распределения стационарных метаболических потоков

Представление скорости реакции

В соответствии с законом действующих масс

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



скорость записывается как

$$v = v_+ - v_- = k_+ S_1 \cdot S_2 - k_- P^2$$

v - общая скорость реакции

v_+ - скорость прямой реакции

v_- - скорость обратной реакции

В общем виде:

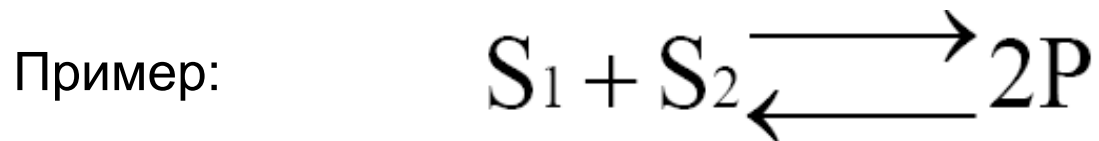
$$v = v_+ - v_- = k_+ \prod_i S_i^{m_i} - k_- \prod_j P_j^{m_j}$$

m_i и m_j соответствуют молекулярности S_i и P_j

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

Стехиометрические коэффициенты

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



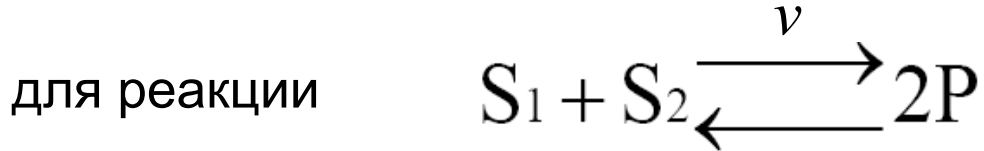
Стехиометрические коэффициенты для S_1 , S_2 и P : -1, -1 и 2.

Набор стехиометрических коэффициентов не единственен:

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

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

ОДУ для одной и нескольких реакций



имеем ОДУ:

$$\frac{d}{dt} S_1 = \frac{d}{dt} S_2 = -v$$

$$\frac{d}{dt} P = 2v$$

убыль субстрата S_1 со скоростью v
сопровождается убылью субстрата S_2 с той же
скоростью и удвоенной скоростью увеличения
концентрации продукта P

Для метаболической сети, состоящей из m метаболитов и r реакций, динамика системы описывается системой уравнений (или уравнениями баланса, поскольку рассматривается баланс между синтезом и распадом метаболита):

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

$$i = 1, \dots, m$$

n_{ij} – стехиометрические коэффициенты
метаболита i в реакции j

Стехиометрическая матрица

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

$$N = \begin{pmatrix} & v_1 & v_2 & \dots & v_r \\ n_{11} & n_{12} & \dots & n_{1r} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ n_{m1} & n_{m2} & \dots & n_{mr} \end{pmatrix} \begin{matrix} S_1 \\ \\ S_m \end{matrix}$$

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

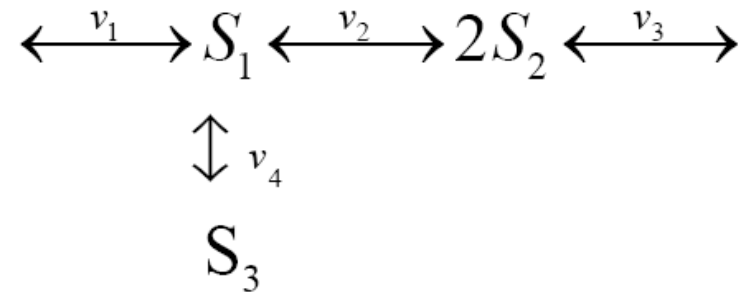
каждая колонка соответствует реакции (r реакций)

каждая строка соответствует метаболиту (m метаболитов)

Стехиометрическая матрица

Пример

Для простейшей сети:



Стехиометрическая матрица:

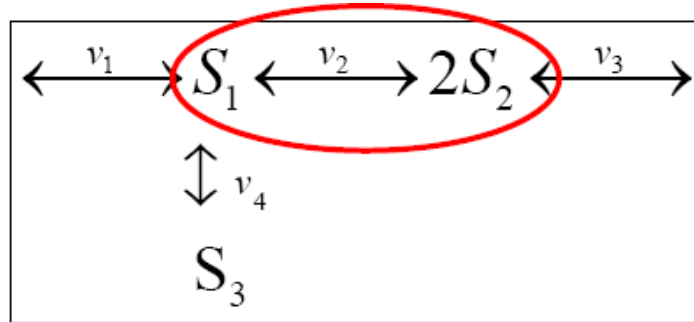
$$N = \begin{array}{cccc} v_1 & v_2 & v_3 & v_4 \\ \left(\begin{array}{cccc} 1 & -1 & 0 & -1 \\ 0 & 2 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{array} \right) & \begin{array}{l} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{array} \end{array}$$

Реакции метаболической сети могут быть обратимы.

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

Стехиометрическая матрица

для реакции v_2 :



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

Строка 1: 1 молекула S_1 расходуется (-1)

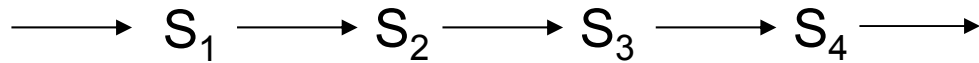
Строка 2: 2 молекулы S_2 образуются (2)

Строка 3: S_3 в этой реакции не участвует (0)

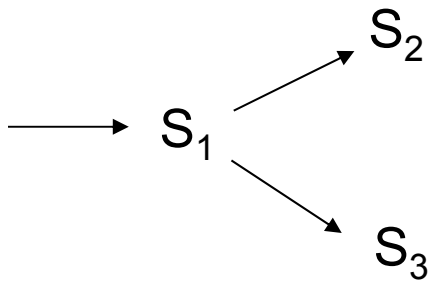
Примеры

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

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

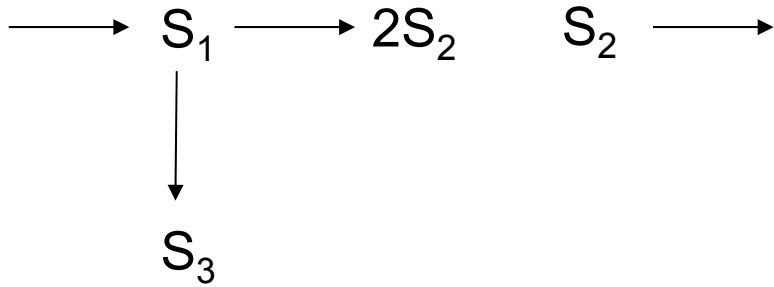


$$N = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 \end{pmatrix}$$

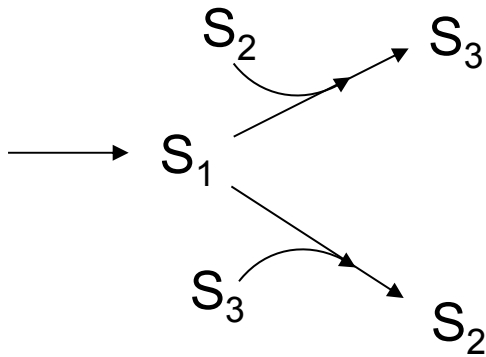


$$N = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

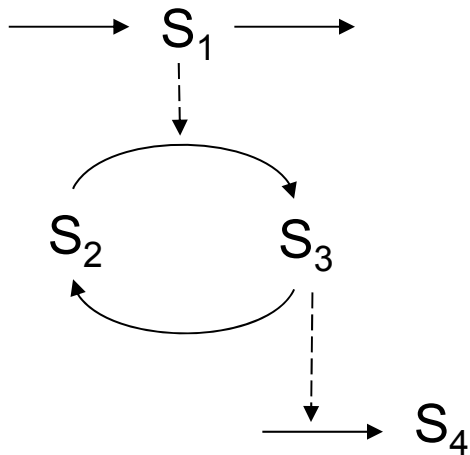
Примеры



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



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



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

Математическое описание метаболической системы

$$\mathbf{S} = (S_1, S_2, \dots, S_n)^T \quad \text{вектор концентраций метаболитов}$$

$$\mathbf{v} = (v_1, v_2, \dots, v_n)^T \quad \text{вектора скоростей реакций}$$

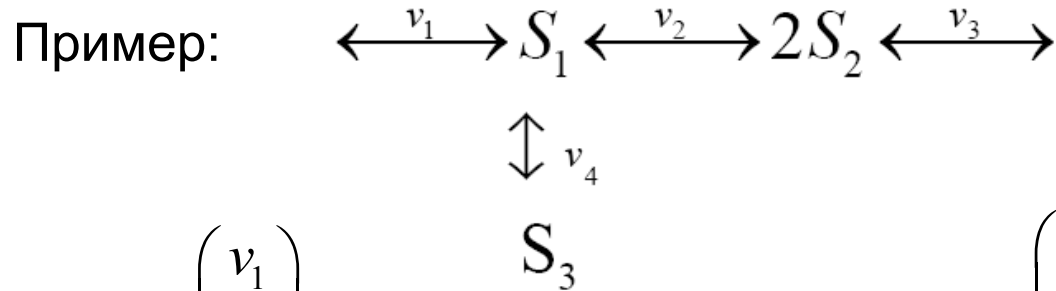
$$\mathbf{p} = (p_1, p_2, \dots, p_n)^T \quad \text{вектор параметров}$$

$$\mathbf{N} \quad \text{стехиометрическая матрица}$$

Тогда уравнения баланса можно записать:

$$\frac{d\mathbf{S}}{dt} = \mathbf{N}\mathbf{v}$$

Математическое описание метаболической системы



$$S = \begin{pmatrix} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix}$$

вектор
метаболитов

$$v = \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \end{pmatrix}$$

вектор
скоростей

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

стехиометрическая
матрица

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

уравнения баланса

Построение стехиометрической модели

1. Определить систему, для которой будет построена стехиометрическая модель (отдельный метаболический путь, органелла, клетка, целый организм).
2. Для каждого метаболита записать уравнения баланса массы.
3. Записать условия стационарного состояния.

Строго, с учетом роста (и следовательно изменения объема) уравнение для i -го метаболита записываются как

$$\frac{dS_i}{dt} = \sum_j n_{ij} v_j - \mu S_i$$

Без учета фактора разведения

$$\frac{dS_i}{dt} = \sum_j n_{ij} v_j$$

В стационарном состоянии

$$\frac{dS_i}{dt} = 0 \quad \sum_j n_{ij} v_j = 0$$

S_i – концентрация i -го метаболита

v_j – скорость образования (или потребления) метаболита

n_{ij} – стехиометрический коэффициент i -го метаболита в j -й реакции

μS_i – фактор разведения

система алгебраических уравнений