

ПРИМЕНЕНИЕ ПОТОКОВОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА *Escherichia coli**

© 2006 г. А.В. Любецкая^{1**}, Л.И. Рубанов², М.С. Гельфанд^{1,2}

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ
им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва; факс: (495)939-3158,
электронная почта: lyubetsky.anna@mail.ru

² Институт проблем передачи информации РАН,
127994 Москва, Большой Каретный пер., 19; факс: (495)209-0579,
электронная почта: gelfand@iitp.ru, rubanov@iitp.ru

Поступила в редакцию 07.04.06
После доработки 25.07.06

С помощью программы, реализующей потоковую модель метаболизма *Escherichia coli*, выяснено, как реагирует ее метаболизм на добавление аминокислот (триптофан, тирозин, фенилаланин, лейцин, изолейцин, валин, гистидин, лизин, треонин, цистеин, метионин, аргинин, пролин) к бедной среде, а также к среде, лишенной источников углерода, азота или углерода и азота одновременно. В результате показана сходная реакция метаболической системы на добавление различных аминокислот к бедной среде. Отмечено, что увеличиваются потоки гликолитического пути и синтез пирувата с последующей деградацией до ацетата через ацетилкофермент А, уменьшаются потоки через пентозофосфатный путь и цитратный цикл. Установлено, что при росте на аминокислотах как единственных источниках углерода и/или азота перестройка потоков определяется недостатком углерода, увеличивается путь от фосфоенолпирувата к глюкозо-6-фосфату, поток через пентозофосфатный путь направлен в сторону рибулозо-5-фосфата, а остальные изменения зависят от того, какие базовые метаболиты являются продуктами данной аминокислоты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: потоковая модель, *Escherichia coli*, метаболизм аминокислот, моделирование метаболизма.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Функционирование организма – сложный процесс, и согласованное функционирование биологических систем осуществляется за счет многоступенчатых взаимодействий молекулярных компонентов клетки. Для исследования генома организма разработаны различные компьютерные модели, одна из которых связывает свойства генома как последовательности со свойствами внутриклеточных систем, основываясь на фундаментальных физико-химических законах. Это, например, потоковая модель – описание совокупности метаболических потоков, которые характеризуют интенсивность химических реакций, происходящих в организме в равновесном состоянии.

Потоковая модель создается в две стадии. На первой стадии ее построения по набору генов организма определяют множество химических

реакций, реализованных в геноме. На второй стадии моделирования задают состав биомассы (или другой оптимизируемый функционал) и состав среды, на которой моделируется рост клетки. Решение задачи состоит в максимизации прироста биомассы при различном составе среды и наборе реакций.

Наиболее полно разработана потоковая модель бактерии *Escherichia coli*. При воспроизведении и дальнейшем изучении этой модели был получен ряд нетривиальных результатов о метаболизме кишечной палочки.

Считается, что мутантная клетка изменяет потоки так, чтобы максимально нивелировать отсутствие соответствующего фермента и достичь первоначального значения прироста [1]. Потоковая модель позволяет численно оценить изменения потоков при ингибировании того или иного гена. В частности, изменения в потоках можно наблюдать при последовательном ингибировании генов центрального метаболизма *E. coli*. Если известны параметры, описывающие репрессию или активацию генов, можно напрямую учесть их как дополнительные ограничения на потоки.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 06-096, 30.09.2006.

** Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

Было выяснено, что семь ферментов центрального метаболизма необходимы для того, чтобы клетка была способна к аэробному росту при минимальном количестве глюкозы. Для роста в анаэробных условиях при минимуме глюкозы клетке необходимо 15 ферментов. Исследование проводилось всего для 49 основных ферментов центрального метаболизма кишечной палочки [2, 3]. Относительно небольшое число ферментов, необходимых клетке для роста, свидетельствует о низкой «требовательности» метаболизма и высокой выживаемости организма.

Помимо этого проводили расчеты [4, 5] при изменении первоначальных условий, в которых клетка должна расти. Результаты расчета для минимума глюкозы оказались удовлетворительными, а для минимума азота сильно расходились с экспериментальными данными. Предполагается, что хороший результат будет получен в среде, обогащенной глюкозой. Это — следствие того, что кишечная палочка в норме получает избыток источников азота, а число источников углерода, как и в используемой модели, ограничивается [6].

Цель настоящей работы — исследование перестройки метаболических потоков при добавлении в бедную среду аминокислот, а также при использовании аминокислот в качестве единственного источника углерода, азота или углерода и азота одновременно. При этом рассмотрены пять групп аминокислот: ароматические (триптофан, тирозин, фенилаланин); разветвленные (лейцин, изолейцин, валин); гистидин, лизин, треонин; серосодержащие (цистеин, метионин); аргинин, пролин.

Описание алгоритма. Метаболические процессы подчиняются ограничениям, связанным с массовыми балансами. На этом основании разработан метод анализа возможностей клеточных систем, известный как анализ потоковых балансов [7]. Ограничения, наложенные на метаболическую систему, можно записать в виде матричного уравнения:

$$S \cdot V = 0.$$

Здесь S — стехиометрическая матрица размером $m \times n$, где m — число метаболитов, а n — число реакций в системе. Вектор $V = v_i$, где $i = 1, 2, \dots, n$, включает в себя все потоки в метаболической системе в форме значений интенсивности.

При составлении метаболической системы кишечной палочки оказывается, что число потоков в модели (n) превышает число ограничений по массам (число метаболитов), т.е. число неизвестных больше числа уравнений ($m < n$).

Значит задача, вообще говоря, имеет бесконечное множество решений, т.е. возможных вариантов распределения потоков.

Для получения единственного решения на потоки накладывают дополнительные ограничения вида

$$\alpha_i \leq v_i \leq \beta_i,$$

где α_i и β_i — постоянные числа. Затем ищут решение, максимизирующее целевой функционал, который описывает, например, прирост биомассы. Ограничения такого вида учитывают обратимость реакций за счет положительного или отрицательного знака α_i и β_i , а также позволяют при необходимости задавать значения потоков. Так, выбором значений v_i из ограничений в виде линейных неравенств ($\alpha_i \leq v_i \leq \beta_i$) в модели задается среда, на которой растет клетка. Например, в наших расчетах бедная среда в системе определяется наличием в ней 20 молярных долей кислорода ($\alpha_{O_2} = -20$), 10 молярных долей глюкозы ($\alpha_{glc} = -10$) и неограниченного числа ионов водорода, натрия, калия, железа, сульфата, фосфата, аммония, а также воды и углекислого газа ($\alpha_j = -10\,000$). Клетка может выводить неограниченное количество веществ, для которых имеется транспортная реакция вывода ($\beta_j = 10\,000$).

Целевая функция определяется следующим образом:

$$Z = \sum c_i v_i = \langle \mathbf{c} \cdot \mathbf{V} \rangle,$$

где вектор \mathbf{c} задан как единичный вектор размерности n , направленный в сторону потока прироста биомассы. Поток прироста, в свою очередь, задан исходя из представлений о биосинтетических нуждах клетки:

$$\sum d_m \cdot X_m \rightarrow \text{биомасса},$$

где d_m — количество вещества X_m , входящего в биомассу. Таким образом, поток прироста задан в виде одной реакции, которая преобразует всех биосинтетических предшественников в биомассу. Параметры уравнения биомассы получены из экспериментальных данных.

Таким образом, модель сводится к задаче линейного программирования, решаемой при предположении, что клетка стремится увеличить свою биомассу, чтобы как можно скорее поделиться.

В настоящей работе расчеты велись с помощью компьютерной системы METABOL, разработанной в лаборатории «Математические методы и модели в биоинформатике» Института

проблем передачи информации РАН. Сведения о программе можно получить по адресу: rubanov@iitp.ru.

Данные о метаболизме кишечной палочки взяты с сайта (http://gcrp.ucsd.edu/supplementary_data/DeletionAnalysis/main.htm). Предварительные описания метаболических путей были взяты из базы данных MetaCyc (<http://www.metacyc.com/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Были проведены как наблюдения, подтверждающие естественные представления о структуре метаболических потоков, так и ряд относительно нетривиальных наблюдений.

В случаях когда поток представляет собой просто последовательную цепь реакций, каждая из этих реакций должна изменяться так же, как и остальные реакции, что и наблюдалось в вычислительных экспериментах. Аналогично если на определенном метаболите поток расходится на два потока, т.е. метаболит далее участвует в двух различных реакциях, то общий входной поток должен быть равен сумме двух выходных потоков.

Как и следовало ожидать, оказалось, что при добавлении некоторого существенного метаболита к бедной среде клетке проще транспортировать внутрь готовое вещество, чем синтезировать его, поскольку уменьшаются интенсивности реакций, связанных с его синтезом в клетке. Следовательно, высвобождаются потребляемые при этом метаболиты. Если клетка получит метаболита больше, чем нужно для формирования биомассы, то его избыток будет выведен напрямую через мембрану или химически преобразован, а затем выведен.

При обогащении среды увеличивается производство биомассы, что ведет к неспецифичному росту всех потоков, за исключением тех, что относятся к путям синтеза аминокислоты. При большом избытке аминокислоты в среде и при существовании путей ее катаболизма аминокислота используется как субстрат для синтеза некоторых веществ. Так, например, существуют два альтернативных пути синтеза путресцина: из орнитина или аргинина. В случае недостатка аргинина синтез путресцина происходит из орнитина, а в случае избытка — из аргинина. Схематическое изображение этих результатов приведено на схеме 1.

Добавление аминокислот к бедной среде сказывается на интенсивностях потоков гликолиза, глюконеогенеза, цитратного цикла, пентозофосфатного пути, метаболизма пирувата и глутамата (схема 2). При добавлении аминокис-

лоты клетка начинает частично синтезировать D-глицеральдегид-3-фосфат напрямую из D-фруктозо-6-фосфата, минуя промежуточную стадию — фруктозо-1,6-дифосфат. Дигидроксиацетон является побочным продуктом прямого пути катаболизма. Интенсивность катаболизма дигидроксиацетона растет, а интенсивность пентозофосфатного пути уменьшается. По-видимому, это следствие того, что потребление NADPH для синтеза биомассы уменьшается с добавлением аминокислот в среду.

Количество синтезируемого пирувата также увеличивается. Интенсивность потоков деградации пирувата до ацетилкофермента А возрастает. Ацетилкофермент А, в свою очередь, интенсивнее переходит в ацетат. Реакции транспорта ацетата из клетки тоже усиливаются. Таким образом, деградация пирувата до ацетата становится более интенсивной.

Интенсивность потока цитратного цикла увеличивается. При добавлении аминокислот в среду клетке уже не нужно синтезировать вещества в прежних количествах. Значит, можно синтезировать меньшее количество NADH. Поэтому падает напряженность цитратного цикла, являющегося одним из наиболее эффективных источников энергии в клетке. Помимо этого снижается интенсивность реакций, напрямую связанных с цитратным циклом.

Можно предположить, что клетка частично переходит с более выгодного, но относительно протяженного пути производства энергии (цитратный цикл) на менее выгодный, но короткий (деградация до пирувата), потому что при добавлении аминокислот в среду количество требуемой для роста энергии снижается.

Интенсивности реакций преобразования глутамата в α -кетоглутарат, а также реакций транспорта углекислого газа из клетки снижаются. Последнее может происходить из-за снижения эффективности цитратного цикла и уменьшения длины пентозофосфатного пути.

При отсутствии в среде глюкозы, азота или азота и глюкозы использование аминокислоты в качестве источника углерода и/или азота возможно в том случае, когда существует путь катаболизма данной аминокислоты. В нашей модели таких аминокислот три: аргинин, треонин и триптофан. Оптимальное решение задачи возможно только при условии, что количество аминокислоты взято с избытком по сравнению с минимальным количеством, при котором возможен рост клетки. Это минимальное количество должно быть таким, чтобы одна часть аминокислоты уходила в чистом виде в биомассу, а другой было достаточно для снабжения всего клеточного метаболизма. Как следствие, интен-

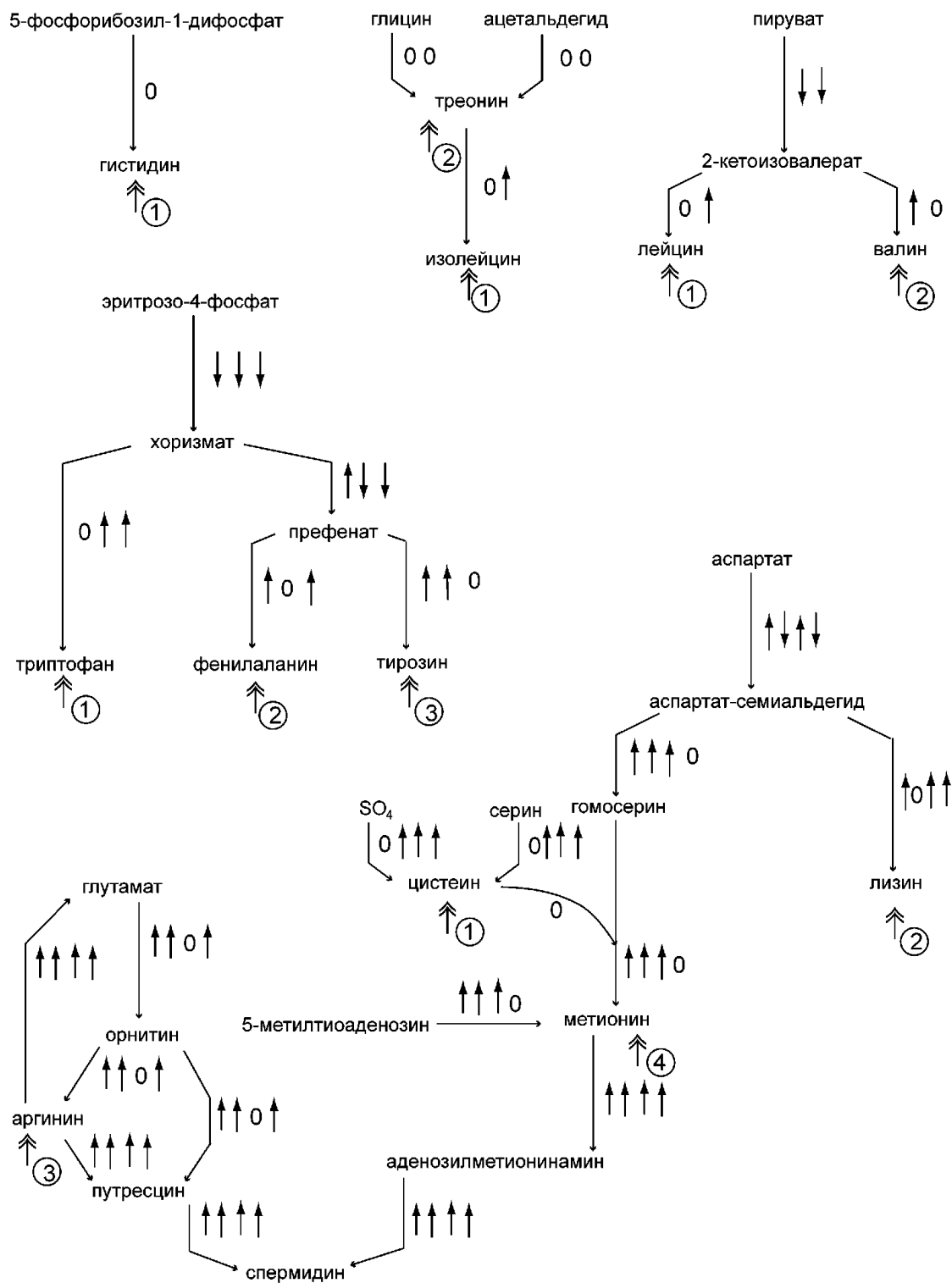


Схема 1. Метаболические пути синтеза и катаболизма аминокислот. Пять графов иллюстрируют изменения интенсивностей потоков, связанных с метаболизмом некоторых аминокислот. Многие промежуточные стадии синтеза пропущены. В узлах указаны наиболее важные исходные и промежуточные метаболиты, а также полученные аминокислоты. Справа от ребер указаны изменения в потоках при добавлении той или иной аминокислоты. Знак «0» показывает, что с добавлением все большего количества аминокислоты интенсивность потока стремится к нулю. Одинарные стрелки вверх и вниз означают, что поток усиливается и ослабевает соответственно. Двойные стрелки указывают на добавляемую аминокислоту. На схемах, отображающих изменения метаболизма при добавлении аминокислот, порядок стрелок соответствует цифрам у двойных стрелок (добавляемых аминокислот)

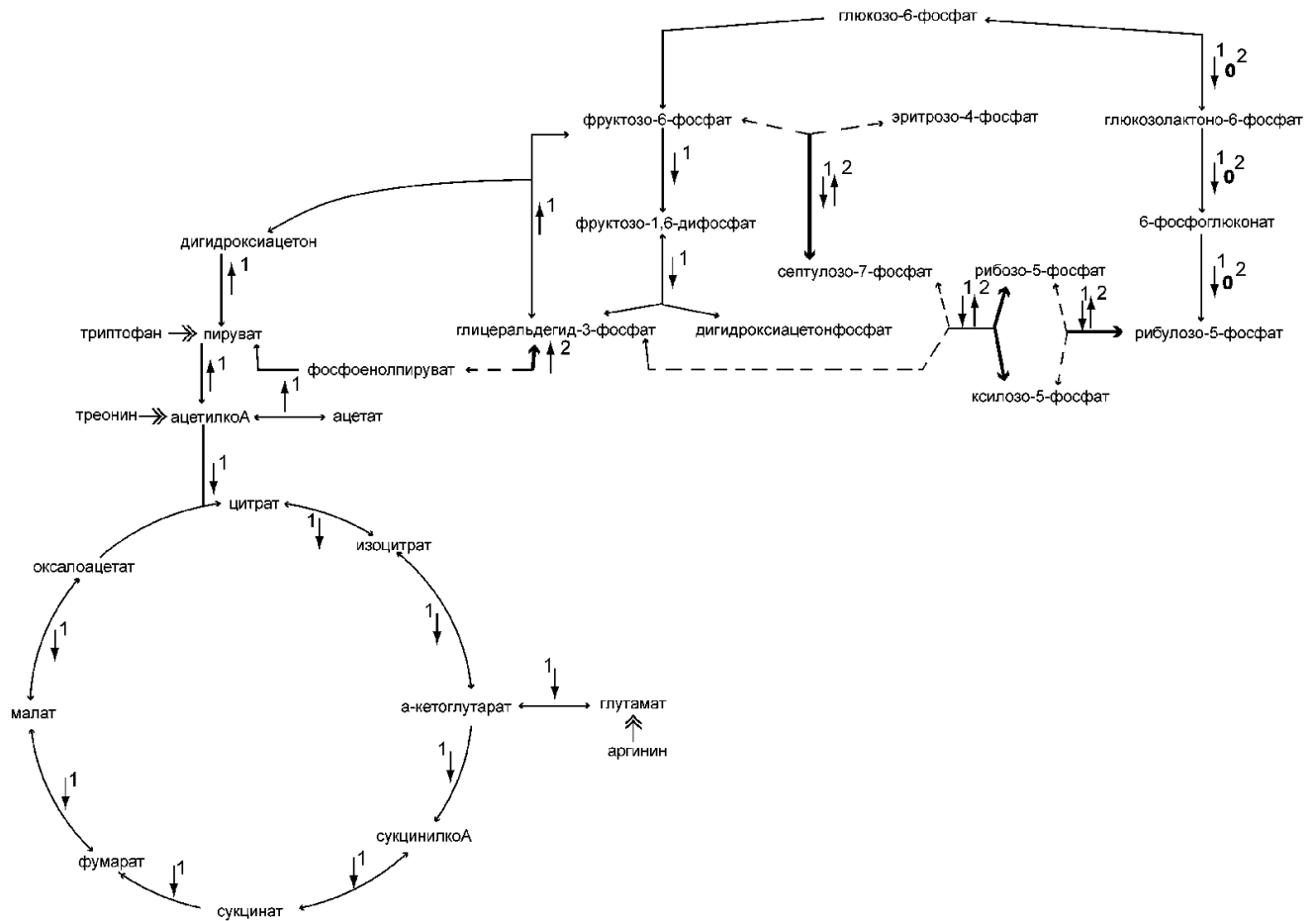


Схема 2. Изменения центрального метаболизма кишечной палочки в ответ на добавление аминокислот к бедной среде (1) и к среде, лишенной углерода (2). Одинарные стрелки вверх и вниз означают, что поток усиливается и ослабевает соответственно. Показаны ребра, соответствующие тем обратным реакциям, направление которых меняется в зависимости от условий среды. Направления потоков для бедной среды и среды, лишенной углерода, обозначены штрихами и выделены жирным соответственно. Двойными стрелками обозначены точки входа при катаболизме данной аминокислоты

сивности потоков синтеза аминокислоты всегда равны нулю.

В зависимости от того, чего не хватает в среде, аминокислота может быть источником как азота, так и углерода. Если аминокислота является источником углерода, образуются следующие базовые метаболиты: из аргинина — глутамат, из треонина — ацетилкофермент А, из триптофана — пируват. При отсутствии азота из аминокислот синтезируются ионы аммония.

В случае отсутствия глюкозы в среде, независимо от того, какая аминокислота добавлена, одинаково изменяются интенсивности гликолиза и пентозофосфатных путей: путь от фосфоенолпирувата к глюкозо-6-фосфату увеличивается, пентозофосфатный путь направлен в сторону рибулозо-5-фосфата. Потоки цитратного цикла и метаболизма пирувата и глутамата ме-

няются в зависимости от того, какие базовые метаболиты получают при катаболизме аминокислот.

Исходный прирост биомассы, соответствующий десяти долям глюкозы, достигается при последовательных вычислениях, в которых увеличивалась молярная доля аминокислот в среде, очень медленно. Наиболее эффективными можно считать пути катаболизма триптофана, а наименее эффективными — аргинина.

При отсутствии источников азота в среде при небольших количествах добавленной аминокислоты потоки изменяются таким образом, что компенсируется недостаток аммония. При дальнейшем добавлении аминокислоты появляется избыток аммония, который выводится из клетки. В то же время в большом количестве синтезируются вещества, способные заменить

глюкозу (этот случай описан выше). Таким образом, клетка получает возможность быстрее наращивать биомассу. Этот процесс ограничивается лишь количеством кислорода в среде. При большом избытке аминокислоты в отсутствие источников азота мы приходим к случаю отсутствия глюкозы в среде, потому что пути катаболизма аминокислоты заведомо компенсируют недостаток азота, а количество глюкозы в среде пренебрежимо мало по сравнению с количеством аминокислоты.

Отметим, что для достижения максимально-го прироста в условиях относительного недостатка кислорода клетка частично переходит с аэробного метаболизма на анаэробный. В условиях недостатка азота наиболее эффективным субстратом является аргинин. Таким образом, при добавлении аминокислоты быстрее компенсируется нехватка ионов аммония, после чего клетка начинает использовать аминокислоты как дополнительный субстрат для роста. В случае отсутствия как глюкозы, так и ионов аммония рост биомассы определяется потоками,

компенсирующими нехватку глюкозы. Таким образом, лимитирующим фактором является недостаток углерода, а не азота.

Итак, результаты моделирования показывают сходную реакцию метаболической системы на добавление к бедной среде различных аминокислот.

При использовании аминокислот как единственного источника углерода одна часть путей перестраивается одинаково, а другая — в зависимости от того, какое вещество из основных метаболитов является результатом катаболизма аминокислоты, т.е. от «точка входа» катаболического пути в основной метаболизм.

Мы благодарны В.А. Любецкому и А.А. Миронову за поддержку и многочисленные ценные обсуждения.

Эта работа выполнена при финансовой поддержке Медицинского института Ховарда Хьюза (грант 55005610) и РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Edwards, J.S., and Palsson, B.O. (2000) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **97**, 5528–5533.
2. Edwards, J.S., and Palsson, B.O. (2000a) *BMC Bioinformatics*, **1**, 1–10.
3. Edwards, J.S., Ibarra, R.U., and Palsson, B.O. (2001) *Nat. Biotechnol.*, **19**, 125–130.
4. Ibarra, R.U., Edwards, J.S., and Palsson, B.O. (2002) *Nature*, **420**, 186–189.
5. Гельфанд М.С. (2005) *Информационные процессы*, **5**, 33–39.
6. Papin, J.A., Price, N.D., and Palsson, B.O. (2004) in *Metabolic Engineering in the Post Genomic Era* (Kholodenko, B.N., and Westerhoff, H.V., eds), Horizon Bioscience, Norfolk, pp. 209–234.
7. Moreira dos Santos, M., Akesson, M., and Nielsen, J. (2004) in *Metabolic Engineering in the Post Genomic Era* (Kholodenko, B.N., and Westerhoff, H.V., eds), Horizon Bioscience, Norfolk, pp. 89–105.

USE OF THE FLUX MODEL OF AMINO ACID METABOLISM OF *Escherichia coli*

A. V. Lyubetskaya¹, L. I. Rubanov², M. S. Gelfand^{1, 2}

¹ Department of Bioengineering and Bioinformatics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119992, Russia; fax: (495)939-3158; E-mail: lyubetsky.anna@mail.ru

² Institute for Information Transmission Problems Russian Academy of Sciences, Bolshoi Karetnyi per. 19, Moscow 127994, Russia; fax: (495)209-0579, E-mail: gelfand@iitp.ru, rubanov@iitp.ru

Received April 7, 2006

Revision received July 25, 2006

A program implementing a flux model of *Escherichia coli* metabolism was used to analyze the effects of the addition of amino acids (tryptophan, tyrosine, phenylalanine, leucine, isoleucine, valine, histidine, lysine, threonine, cysteine, methionine, arginine, proline) to minimal medium or media lacking nitrogen, carbon, or both. The overall response of the metabolic system to the addition of various amino acids to the minimal medium is similar. The glycolysis and the synthesis of pyruvate with its subsequent degradation to acetate via acetyl-CoA become more efficient, whereas the fluxes through the pentose phosphate pathway and the TCA cycle decrease. If amino acids are used as the sole source of carbon, nitrogen, or both, the changes in the flux distribution are determined mainly by the carbon limitation. The phosphoenolpyruvate to glucose-6-phosphate flux increases; the flux through the pentose phosphate path is directed towards ribulose-5-phosphate. Other changes are determined by the compounds that are the primary products of the catabolism of the added amino acid.

Key words: flux balance analysis, *Escherichia coli*, metabolism of amino acids, metabolism modeling