

На правах рукописи

ПЕСКОВ Кирилл Витальевич

**КИНЕТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЦЕНТРАЛЬНОГО
МЕТАБОЛИЗМА *ESCHERICHIA COLI***

03.00.28 – Биоинформатика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино – 2009

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

Научный руководитель:

Доктор биологических наук

Юрий Георгиевич
Каминский

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук

Михаил Сергеевич Гельфанд

Доктор физико-математических наук

Владимир Гаевич Туманян

Ведущая организация: Учреждение Российской академии медицинских наук Гематологический научный центр РАМН.

Защита состоится 3 декабря 2009 года в 12 часов 30 минут на заседании Диссертационного совета Д 001.010.01 при Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАМН (ИБМХ РАМН) по адресу: 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАМН.

Автореферат разослан «__» _____ 2009 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат химических наук

Е.А. Карпова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Кишечная палочка (*Escherichia coli*) на настоящий момент является одной из самых изученных бактерий. Столь высокий интерес к этому микроорганизму можно объяснить исходя из следующих причин. Во-первых, кишечная палочка достаточно легко культивируется на всех основных углеродных субстратах (как в аэробных, так и в анаэробных условиях). Во-вторых, геном *E. coli* полностью известен, при этом считается, что для 80% генов прослежены их основные функции в метаболизме клетки (Neidhardt F. et al., 1995). В-третьих, эта бактерия очень часто используется в биоинженерных исследованиях, а также в качестве основного компонента значительного числа биотехнологических реакторов. Неудивительно, что столь серьезное внимание к этому микроорганизму позволяет сегодня использовать его в качестве модели для изучения одной из важнейших в биохимии и микробиологии проблем – исследованию жизнедеятельности и развития единичной клетки. Одним из основных аспектов этой проблемы можно считать исследование путей обмена веществ в клетке, или клеточного метаболизма. За более чем пятидесятилетнюю историю изучения метаболизма *E. coli* исследователям удалось собрать значительное количество информации о данном процессе (Neidhardt F. et al., 1995). Более того, с развитием в XXI веке таких экспериментальных методик, как метаболомика, транскриптомика, протеомика и флаксномика, удалось накопить немало информации и о функционировании метаболизма в целом как единой комплексной системы. На сегодняшний день одним из сдерживающих факторов в исследовании данной проблемы можно считать недостаточное развитие теоретических подходов для анализа и интерпретации экспериментальных данных этого типа. Именно эту задачу и призвано решать кинетическое моделирование биохимических путей как наиболее перспективный подход метаболического моделирования, ведь кинетические модели способны не только описывать большинство типов

биохимических данных, используя всю информацию о структуре, стехиометрии и регуляции, реализуемой в системе, но и получать предсказания, характеризующие функционирование метаболических путей. Создание подобной модели центрального метаболизма *E. coli*, которая, с одной стороны, способна выступить в роли депозитария максимально возможного количества биологической информации о свойствах исследуемой системы, а с другой, может быть применена для получения достоверных предсказаний о ее функционировании, является на сегодняшний день одним из важнейших направлений в системной биологии.

Цель данной работы состояла в создании кинетической модели, содержащей в себе максимально возможное количество биологической информации о структуре, регуляции и других биохимических свойствах центрального метаболизма *E. coli*, и применение данной модели для нахождения основных регуляторных механизмов, лежащих в основе согласованного ответа генетической и метаболической регуляторных систем.

Для достижения поставленной цели в ходе работы решались следующие задачи:

1. Реконструкция путей центрального метаболизма *E. coli*, а также сетей его метаболической и генетической регуляции.
2. Построение кинетических моделей отдельных ферментов и элементов генетической регуляции, составляющих пути центрального метаболизма *E. coli*. Верификация данных моделей при помощи различных типов *in vitro* экспериментальных данных.
3. Построение кинетических моделей центрального метаболизма *E. coli*, описывающих регуляцию как на метаболическом, так и на генном уровне. Верификация данных моделей при помощи различных типов *in vivo* данных.
4. Анализ поведения модели и соотношения потоков между различными анаэробными реакциями при культивировании *E. coli* в проточном ферментере и лимитированном росте на глюкозе.

5. Предсказание роли регуляторных механизмов, лежащих в основе функционирования центрального метаболизма *E. coli*, таких как дублирование ряда реакций изозимами ферментов, а также нахождение новых регуляторных взаимодействий, оказывающих существенное влияние на поведение центрального метаболизма *E. coli*.

Научная новизна. В отличие от большинства существующих математических моделей метаболических путей модель, разработанная в процессе нашей работы, не имеет на сегодняшний день аналогов по уровню детализации и верификации экспериментальными данными, а следовательно, и уровню предсказательной способности и достоверности. В частности, на настоящий момент при создании кинетических моделей бактериального метаболизма не предпринималось попыток описания столь крупных систем, когда помимо гликолиза и пентозомонофосфатного шунта в единой системе детально учитываются цикл Кребса, глиоксилатный шунт и глюконеогенез, а также подробным образом отражается регуляторная нагрузка, на уровне как метаболической, так и генной регуляции. Кроме того, только в разработанной нами модели приняты в рассмотрение такие аспекты функционирования метаболизма, как дублирование реакций изозимами, детальное описание аллостерических свойств ферментов, влияние на скорости реакций таких биохимических факторов, как pH и внутриклеточная концентрация ионов магния. Данная модель позволяет оценить степень воздействия на систему различных регуляторных элементов, относящихся как к метаболическому, так и генетическому уровням регуляции. Построенная модель также не имеет аналогов по степени верифицирования экспериментальными данными, т. к. в процессе ее построения мы использовали *in vitro* данные о свойствах ферментов и элементов генной регуляции центрального метаболизма, а также *in vivo* данные по транскриптомике, протеомике, метаболомике и флаксомике системы. При помощи кинетической модели, разработанной в ходе данного исследования, сделан ряд предсказаний о функции изозимов, регуляторных элементов и анаплеротических реакций центрального метаболизма *E. coli*.

Практическое значение. В ходе работы при помощи методов кинетического моделирования было предложено объяснение проблемы разного метаболического поведения К и В штаммов *E. coli*, когда при одинаковых условиях культивирования бактерии разных штаммов по-разному потребляют и метаболизируют основные углеродные субстраты (глюкоза, ацетат). Кроме того, на базе разработанной модели показан путь создания единого депозитария биохимической информации метаболической системы, содержащего как *in vivo*, так и *in vitro* экспериментальные данные. Разработан ряд методик для анализа и интерпретации при помощи кинетических моделей экспериментальных данных по метаболомике и флаксомике. Разработанная кинетическая модель центрального метаболизма *E. coli* может быть использована для решения широкого спектра биоинженерных задач, таких как оптимизация штаммов-продуцентов и условий культивирования микроорганизмов, что позволит существенным образом сократить объем средств и времени, затрачиваемых на проведение подобных исследований.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на 12-ой и 15-ой международных конференциях «Математика. Компьютер. Образование» (Пушино, 2005 год; Дубна, 2008); на конференции «Российская биоэнергетика: от молекул к клетке» (Москва, 2005); на 12-ой международной конференции по биотермокинетики (Тракай, 2006); на седьмой международной конференции по системной биологии (Йокогама, 2006); на третьей международной конференции по системной биологии *E. coli* (о. Джеджу, 2006); на конференции молодых ученых «Перспективы развития инноваций в биологии» (Москва, 2007); на российско-немецком симпозиуме по системной биологии (Москва, 2008).

Публикации. По материалам работы опубликовано 13 работ в отечественных и зарубежных научных журналах, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах, 2 статьи в сборниках статей и 9 публикаций в сборниках научных конференций.

Структура и объем работы. Работа состоит из введения, шести глав исследований, заключения, списка литературы и приложения. Работа представляет собой рукопись на 181 странице, включая 38 рисунков и 39 таблиц. Список литературы содержит 285 работ.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Под словами «кинетическая модель» мы будем подразумевать систему обыкновенных дифференциальных уравнений, которая в каждый момент времени определяет состояние рассматриваемой системы химических реакций, т. е. задает изменения концентрации метаболитов как функции времени (Demin O. et al., 2008). Эти уравнения записываются следующим образом:

$$\frac{dX}{dt} = V_{\text{продукции}} - V_{\text{потребления}};$$

Здесь, X – концентрация компонента системы (метаболита, мРНК, белка) $V_{\text{продукции}}$ и $V_{\text{потребления}}$ суммарные скорости его производства и потребления. В зависимости от степени детализации модели данные скорости могут представлять собой функции различной степени сложности – от простого количественного описания по закону действующих масс до более сложных выражений, описывающих всевозможные типы метаболической регуляции и аллостерических эффектов.

Процесс построения детальной кинетической модели метаболического пути можно подразделить на несколько этапов (рис. 1). Начальный этап работы можно назвать реконструкцией исследуемого пути, а также сетей его метаболической и генетической регуляции. На этом этапе собирается вся информация о структуре, топологии и стехиометрии реакций системы, оценивается количество реакций втока в систему и оттока из нее, а также рециркуляции метаболитов. По возможности устанавливается наличие регуляторных связей как на метаболическом, так и генном уровне. Также на данном этапе собирается вся информация, качественно и количественно

характеризующая исследуемый метаболический путь. Исходя из объемов информации, оценивается уровень доступной детализации, с которым можно описать процессы, протекающие в системе. На основе собранной информации создается первичная стехиометрическая модель и составляется соответствующая ей система дифференциальных уравнений.



Рис. 1. Этапы построения кинетической модели и методы ее анализа.

Следующим после создания первичной модели этапом является создание кинетических моделей отдельных ферментов, то есть вывод уравнений скорости (нахождение алгебраических выражений, описывающих зависимость скоростей отдельных реакций от концентраций интермедиатов системы) и идентификация параметров, входящих в эти уравнения. Именно на этом этапе принимается в рассмотрение метаболическая регуляция. Это осуществляется за счет модифицирования уравнений скоростей реакций, путем введения в них дополнительных выражений, описывающих

ингибирование или активацию. Результатом данного этапа работы является создание неverified метаболической модели. В такой модели только часть параметров (K_m , K_d , k_{cat} и др.) поставлена в соответствие с экспериментальными данными, остальные (V_m , параметры втоков, оттоков и рециркуляции метаболитов) остаются свободными, так как зависят от условий культивирования и инкубации клеток. Для идентификации таких параметров необходимы экспериментальные данные, полученные *in vivo*. После того, как все значения параметров модели поставлены в соответствие с теми или иными экспериментальными данными, модель можно считать полностью verified и приступать к анализу ее поведения и получению предсказаний. Для этого в программном обеспечении, используемом нами при моделировании (пакеты программ DBSolve7 и ModelCreator2), существует пять вычислительных инструментов: ODE solver (решение систем дифференциальных уравнений), Implicit solver (нахождение зависимостей стационарных значений переменных от величины того или иного параметра), Explicit solver (вычисление явнозаданных функций), Fitting (оценка параметров модели исходя из максимально возможного соответствия между теоретическими и экспериментальными точками) и Model Testing (элементы для тестирования предсказательной способности модели).

После создания и исследования метаболической модели на ее базе аналогичным образом надстраивается модель, учитывающая генетическую регуляцию, реализуемую в системе. При этом переменными в модели становятся не только концентрации метаболитов, но также мРНК и белков, кодируемых генами, экспрессия которых регулируется на уровне транскрипции или трансляции.

Для верификации модели мы используем различные типы экспериментальных данных, полученных как *in vitro*, так и *in vivo*. При этом на разных стадиях разработки модели используются разные типы данных (рис. 2).

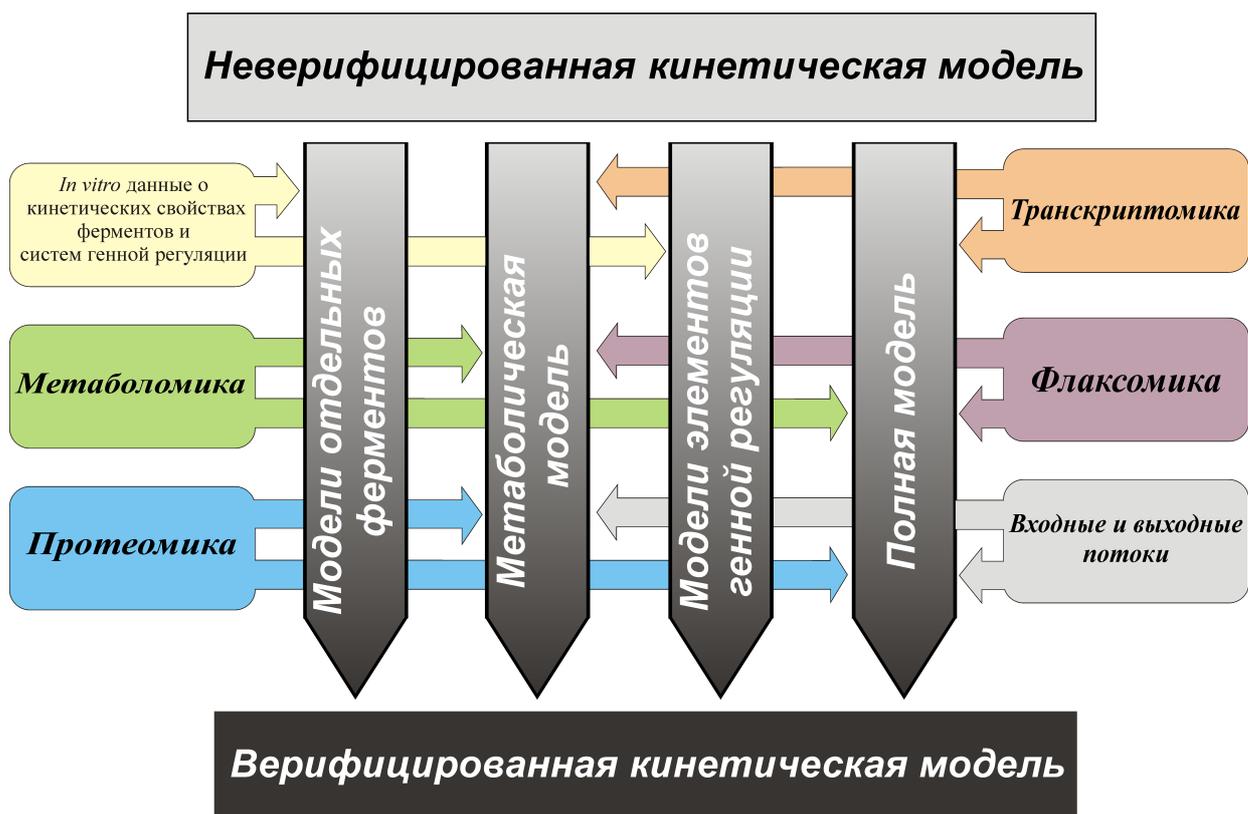


Рис. 2. Верификация кинетической модели биохимического пути различными типами экспериментальных данных.

Так, при верификации моделей отдельных ферментов и элементов генетической регуляции преимущественно используются *in vitro* данные, представляющие собой кинетику потребления субстратов и образования продуктов реакции, зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстратов, продуктов и эффекторов, а также зависимости максимальной скорости фермента от pH среды. В то время как *in vivo* экспериментальные данные используются при верификации полных кинетических моделей биохимических путей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

История изучения центрального метаболизма *E. coli*

Центральный метаболизм – комплексное понятие. Как правило, под ним подразумевают объединение путей транспорта и окисления основных источников углерода в клетке. Для *E. coli* это – гликолиз, глюконеогенез, пентозо-монофосфатный шунт, путь Энтнера-Дудорова, цикл Кребса, глиоксилатный шунт, дыхательная цепь и фосфотрансферная система (рис. 3). Это сложно организованная система, обладающая помимо большого количества интермедиатов разветвленными сетями метаболической и генной регуляции.

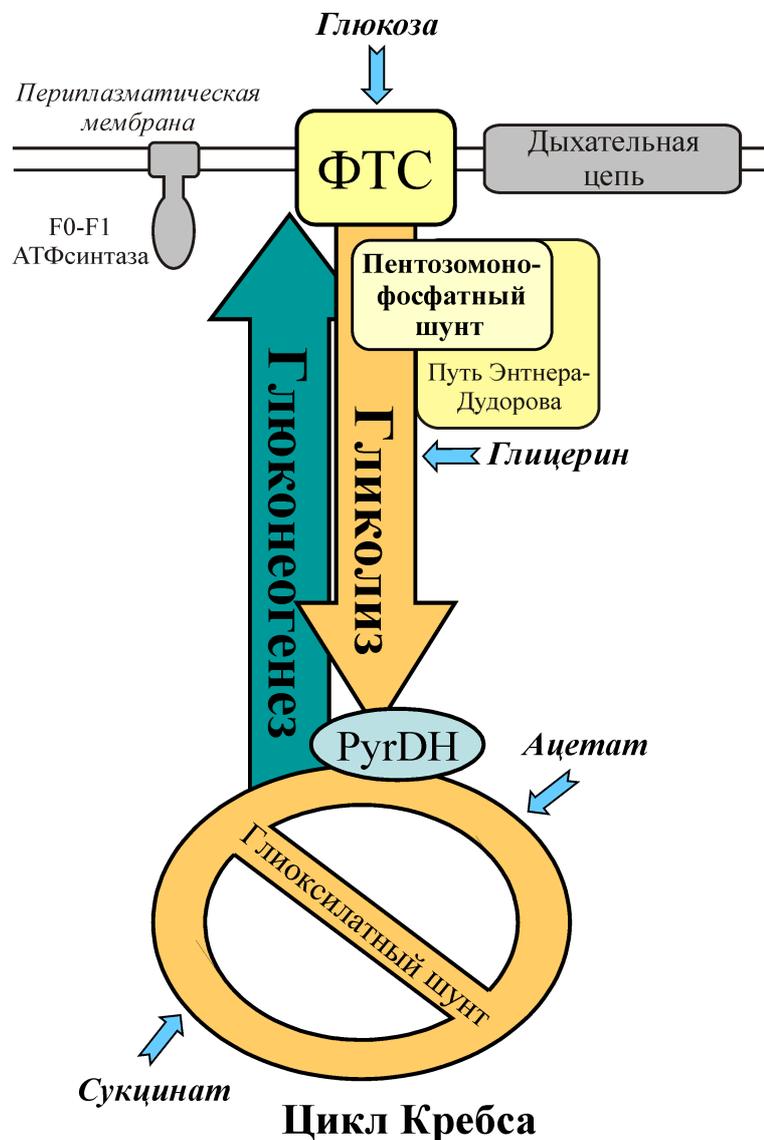


Рис. 3. Общая схема путей центрального метаболизма

Исторически наиболее изученной частью центрального метаболизма можно считать гликолиз (путь Эмбдена-Мейергофа). Можно сказать, что именно интенсивное изучение последовательности реакций этого пути дало старт развитию современной биохимии. Решение этой задачи довлекло надумами биохимиков на протяжении более чем тридцати лет, с момента открытия Эдуардом Бухнером в 1897 году процесса брожения в экстракте дрожжевых клеток и до решения этой задачи в 30-ых годах XX столетия (Отто Варбургом – для дрожжей и Густавом Эмбденом и Отто Мейергофом – для мышечных клеток) (Nelson D. et al., 2005). Во второй половине тридцатых годов Хансом Кребсом была установлена последовательность реакций следующего важнейшего метаболического пути – цикла трикарбоновых кислот (Krebs H. et al., 1937). На протяжении последующих трех десятилетий были описаны и расшифрованы последовательности реакций остальных путей, составляющих центральный метаболизм. Последним, в первой половине 60-ых годов, Хансом Кребсом был определен термин глюконеогенеза как пути синтеза углеводов из веществ неуглеводной природы (Krebs H., 1963).

Следующим этапом изучения центрального метаболизма (60–70-ые годы) стало детальное описание биохимических свойств отдельных ферментов. Именно на этом этапе достаточно значительное внимание было уделено ферментам *E. coli*. Стоит сказать, что практически все ферменты, составляющие центральный метаболизм этого микроорганизма, были подробно изучены в этот период времени. Исключения составили лишь некоторые изоформы ферментов (GlpX, FbaB и др.), дублирующие часть реакций гликолиза, глюконеогенеза и цикла Кребса. Кроме определения биохимических свойств отдельных ферментов (механизмов каталитического цикла, кинетических и биохимических констант и параметров), данные исследования позволили составить схему метаболической регуляции центрального метаболизма, то есть регуляции скорости работы тех или иных ферментов интермедиатами пути.

Тем ни менее, начиная с 80-ых годов исследователям стало очевидно, что подобного рода регуляция ответственна только за изменения в поведении системы на коротких временах (до 1 мин), тогда как на более продолжительном промежутке времени поведение системы определяет генетическая регуляция, когда те или иные факторы влияют на экспрессию генов, кодирующих метаболические ферменты (Bucholz A. Et al., 2002). Данное открытие совместно с анализом нуклеотидной последовательности генов породило новую волну работ, где были подробно изучены процессы генной регуляции. Именно в это время были открыты и описаны транскрипционные факторы – Crp, FruR, IclR и др., показана их связь с различными интермедиатами центрального метаболизма (Saier Jr. M. et al., 1995).

С началом XXI века в исследованиях, связанных с центральным метаболизмом, наметился перелом. Дело в том, что с развитием новых экспериментальных методик появилась возможность взглянуть на метаболические процессы с другой стороны, а именно – с должной степенью достоверности описать *in vivo* поведение системы. Так, транскриптомика позволяет получить зависимости от времени или условий культивирования концентраций мРНК компонентов системы (Danchin A. et al., 2000); протеомика позволяет оценить изменения концентрации различных белков (Han M.-J. et al., 2006); а метаболомика – концентрацию метаболитов (Mori H. et al., 2008). Кроме того, весьма популярной является еще одна методика (флаксомика), позволяющая за счет измерения в среде концентрации транспортируемых внутрь и вне клетки веществ, а также распределения между внутриклеточными метаболитами метки радиоактивного углерода оценить соотношение стационарных потоков, протекающих в клетке (Holms H., 1996).

Первые кинетические модели элементов центрального метаболизма были созданы в 60–70-ых годах XX века. Основными объектами моделирования были в это время гликолиз и пентозомонофосфатный шунт в

эритроцитах и асцитных клетках, переменными в системе ОДУ при этом являлись исключительно концентрации метаболитов (Garfinkel D. et al., 1964). Во второй половине 70-ых годов были созданы модели, описывающие функционирование ЦТК в митохондриях (Дынник В. et al., 1977). Параллельно разрабатывались методы описания скоростей ферментативных реакций. Так, в 1963 году Клеландом была предложена классификация механизмов ферментативных реакций, что позволило в рамках подхода Михаэлиса-Ментен вывести уравнения скоростей для многосубстратных реакций неаллостерических ферментов (Cleland W., 1963). Описание кинетики аллостерических ферментов развивалось сходным курсом (Cornish-Bowden A., 2001). Одно из наиболее ярких событий в разработке этого вопроса произошло в 1956 году, когда Моно, Уаймен и Шанже предложили модель (МУШ) для описания скорости аллостерических ферментов (Monod J. et al., 1965), по сути, данная модель стала первой попыткой описать аллостерические свойства исходя из физически обоснованных допущений. В дальнейшем данное направление получило достаточно широкое развитие, и на протяжении последующих пятнадцати лет был разработан еще ряд моделей различной степени детализации, описывающих всевозможные аллостерические эффекты (Cornish-Bowden A., 2001). Итогом подобных изысканий стала разработка Поповой и Сельковым обобщения модели МУШ, что позволило описать кинетику многосубстратных и обратимых реакций, катализируемых аллостерическими ферментами при минимально возможном при этом формализме и количестве кинетических параметров (Иваницкий Г. et al., 1978). Таким образом, к началу 80-ых годов математический аппарат кинетического моделирования метаболических путей был разработан практически в полном объеме.

Первой попыткой кинетического моделирования элементов центрального метаболизма *E. coli* можно считать работу Эль-Манси с соавторами, разработавшими модель ЦТК *E. coli* (El-Mansi M. et al., 1994). Целью данной работы являлось описание функционирования ЦТК при росте

клеток *E. coli* на ацетате. Позже, начиная с 1999 года, работы по кинетическому моделированию элементов центрального метаболизма стали появляться чаще, однако всем этим работам свойственны одни и те же методические недостатки. В частности, в данных работах используются упрощенные уравнения скоростей отдельных ферментов, не рассматриваются аллостерические эффекты и дублирование реакций изозимами. Кроме того, модели, описывающие генетическую регуляцию, были представлены только в последних двух работах. При этом внимание в данных работах было сконцентрировано исключительно на особенностях функционирования фосфотрансферазной системы (Bettenbrock K. et al., 2006) и регуляции экспрессии *lac* оперона (Santillan M., 2004). Таким образом, можно сказать, что представленная в данной работе кинетическая модель не имеет на данный момент аналогов по уровню детализации описания биохимических процессов и спектру принимаемых в рассмотрение экспериментальных данных. Данные аспекты позволяют использовать представленную модель для исследования различных особенностей функционирования центрального метаболизма *E. coli* и получать предсказания с высокой степенью достоверности.

Построение кинетических моделей отдельных ферментов.

Схема построения кинетических моделей отдельных ферментов не сильно отличается от таковой для полных моделей биохимических путей, изложенной в предыдущей главе. При описании кинетических моделей отдельных ферментов мы используем четыре различных уровня детализации. Степень детализации математического описания функционирования фермента зависит от трех факторов – сложности механизма и регуляции, а также количества экспериментальных данных, характеризующих эти процессы. Можно сказать, что данная проблема является общей для любого вида моделирования в биологии, когда при создании моделей исследователю приходится все время выбирать уровень детализации таким образом, чтобы с

одной стороны учесть максимально возможное количество физических свойств моделируемого объекта, а с другой – на достаточном уровне связать полученное описание с существующими по рассматриваемому вопросу экспериментальными данными (Cornish-Bowden A., 2001). В связи с этим при описании скоростей реакций отдельных ферментов мы используем четыре уровня детализации:

1. по классификации Клееланда с минимальным числом параметров в уравнении скорости (Cleland W., 1963);
2. по классификации Клееланда с максимально возможным числом принятых в рассмотрение экспериментально установленных фактов и данных о регуляции и каталитическом цикле фермента (Demin O. et al., 2008);
3. при помощи обобщения модели Моно-Уаймена-Шанже, предложенного Поповой и Сельковым (Иваницкий Г. et al., 1978);
4. при помощи отдельной системы ОДУ для описания сложных мультиферментных систем (Demin O. et al., 2008).

Всего для рассматриваемого нами участка метаболизма *E. coli* были построены 44 кинетических модели отдельных ферментов: 17 из них – используя первый уровень детализации; 17 – второй; 8 – третий и 2 – четвертый.

Стоит отдельно добавить, что при построении ряда моделей нам удалось не только вывести и верифицировать уравнения скоростей реакций, но и получить ряд предсказаний, позволяющих прояснить некоторые аспекты каталитического и регуляторного механизмов ферментов, а также их функции в метаболизме. Данные предсказания не получили еще экспериментального подтверждения, но полностью следуют из каталитического цикла фермента и значений параметров модели. В качестве примера подобных предсказаний мы можем привести сравнения свойств двух изозимов фосфофруктокиназы (PfkA и PfkB), представленных в метаболизме *E. coli*. Данные ферменты имеют ряд ярко выраженных

расхождений в биохимических свойствах (Parducci R. et al., 2006). Более того, экспрессия генов, кодирующих фосфофруктокиназы, регулируется разными способами (Saier Jr. M. et al., 1995), а для самих ферментов характерны разные метаболические регуляторы. PfkA активируется при помощи пуриновых динуклеотидов (ADP и GDP) и ингибируется фосфоенолпируватом (Babul J., 1978), в то время как PfkB обладает сложной субстратной регуляцией (Parducci R. et al., 2006).

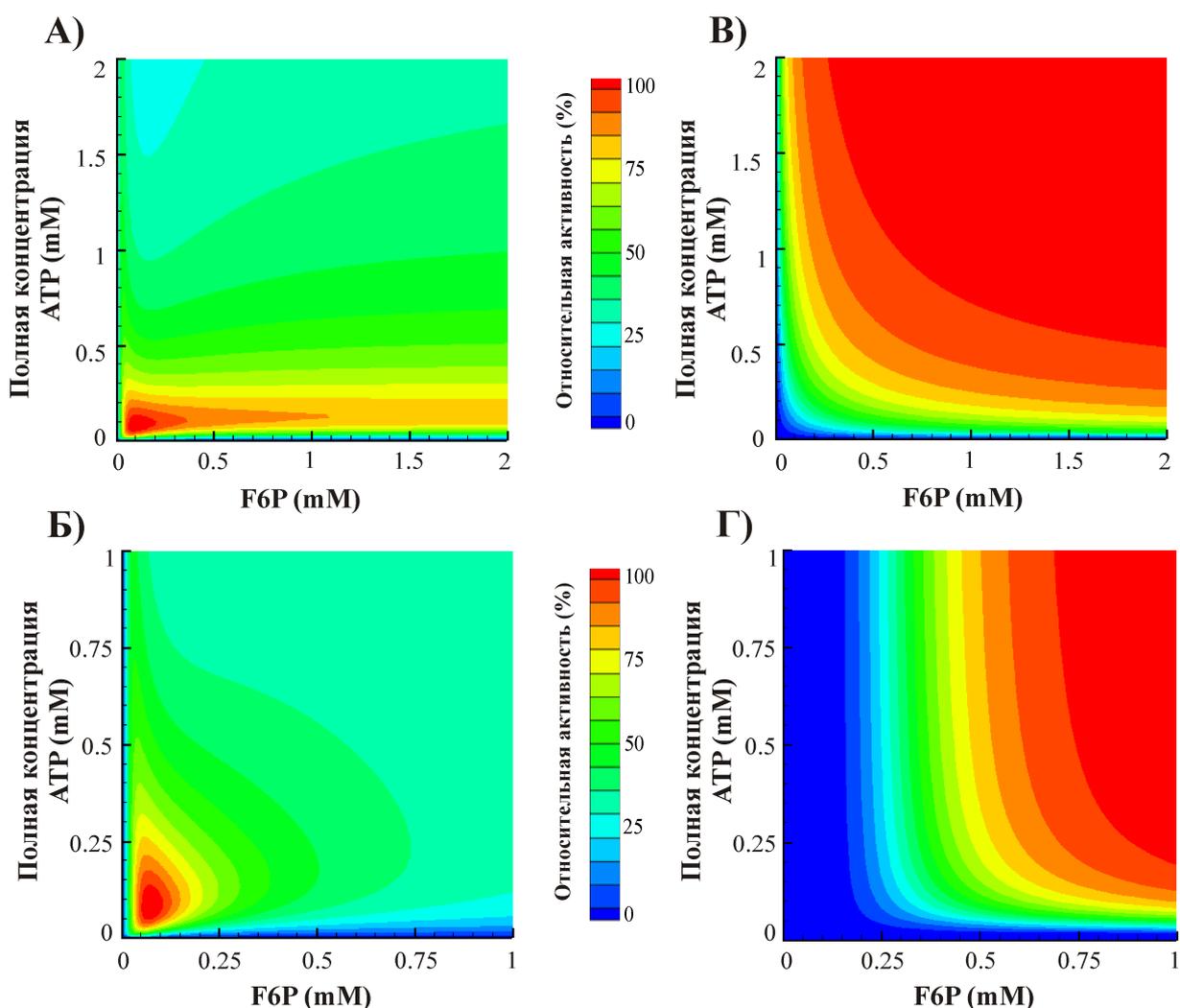


Рис. 4. Сравнение зависимостей начальной скорости реакции от концентрации субстратов, АТФ и фруктозо-6-фосфата (F6P) для двух изозимов фосфофруктокиназы (А,Б – PfkB; В,Г - PfkA) при разных концентрациях АДФ (А,В – ADP = 1mM; Б,Д – ADP = 0 mM).

В соответствии с предложенным подходом нами были построены кинетические модели данных ферментов, анализ поведения моделей позволил нам предсказать возможную метаболическую функцию дублирования данной реакции изозимами с разным регуляторным профилем. Как видно из рис. 4, при различных концентрациях субстратов активности двух изозимов дополняют друг друга. Вероятнее всего, функция второго изозима состоит в том, чтобы осуществлять активность фосфофруктокиназной реакции при тех метаболических условиях, когда основная фосфофруктокиназа не функционирует, например, при росте *E. coli* на глюконеогенетических субстратах.

Построение и исследование метаболической модели центрального метаболизма *E. coli*.

Метаболическая модель исследуемого участка биохимического пути представляет собой систему дифференциальных уравнений, переменными которой являются концентрации метаболитов-участников пути, а также состояния ферментов, скорость работы которых описана при помощи отдельных систем ОДУ (четвертый уровень детализации). Данная модель принимает в рассмотрение всю метаболическую регуляцию, реализуемую в системе, что позволяет описывать процессы, происходящие при культивировании клеток *E. coli* в проточном ферментере, а также данные по метаболомике на коротких временах (до 1 мин).

Таблица 1. Соотношения потоков ряда реакций центрального метаболизма *E. coli* при аэробном лимитированном росте на глюкозе.

Фермент	PfkA	PfkB	PykA	PykF	LdhA	Ppc	PckA
Относительная величина потока (%)	82	0	50	16.5	0	9	25

В построенной нами метаболической модели центрального метаболизма *E. coli* фигурируют 48 переменных, 76 скоростей реакций (из

которых 8 представляют реакции рециркуляции метаболитов, а 15 – реакции оттоков из системы) и 8 законов сохранения. Для верификации модели мы использовали данные по метаболомике и флаксомике, полученные для культуры клеток дикого типа *E. coli* при лимитированном росте на глюкозе в проточном ферментере.

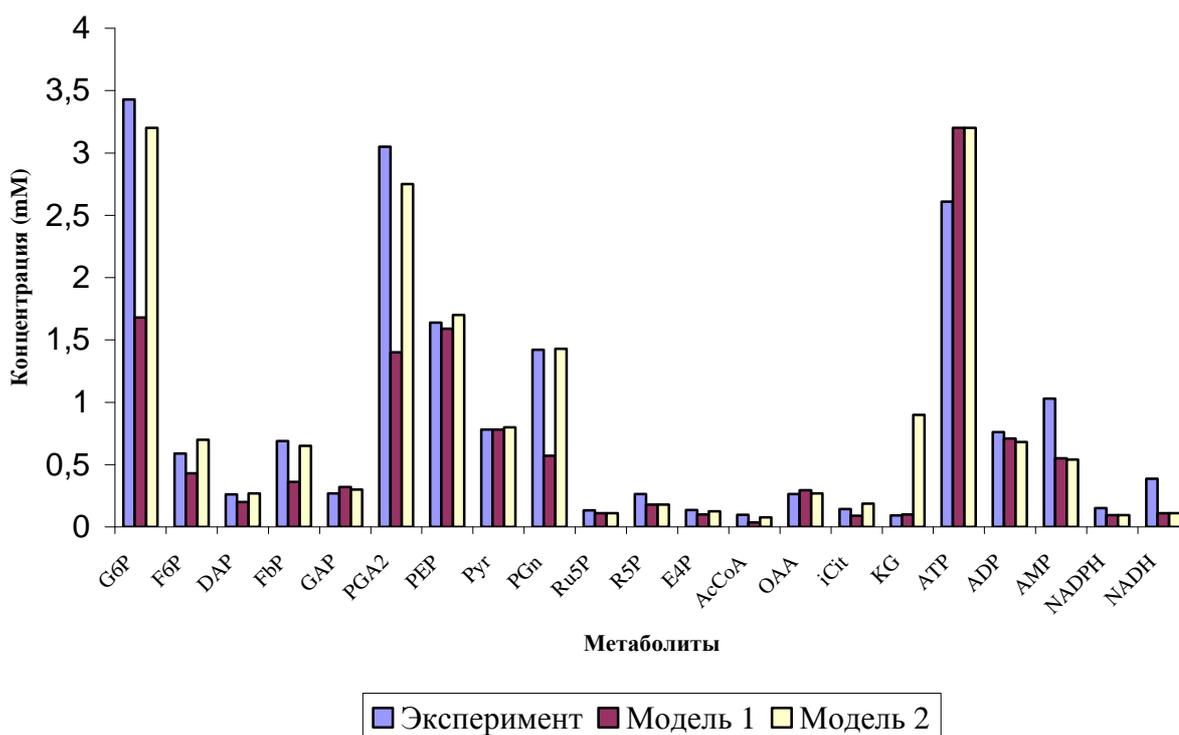


Рис. 5. Сравнение стационарных концентраций основных метаболитов центрального метаболизма мутанта *E. coli*, содержащего нокаут по гену *rukA*, полученных при помощи модели (модель 1 – без дополнительной метаболической регуляторной связи; модель 2 – с учетом действия данного элемента) и экспериментальных значений, опубликованных в (Hoque M. et al., 2005).

При помощи метаболической модели мы сделали ряд предсказаний о соотношении потоков между реакциями, катализируемыми изозимами ферментов, в стационарном состоянии (Таблица 1). Так, в рассмотренных условиях, функционирует только одна фосфофруктокиназа – PfkA, тогда как

другая пара изозимов гликолиза (пируваткиназы PycA и PycF) работает синхронно. При этом поток через пируваткиназу-2 в три раза больше, чем через ее изозим PycF. Это достаточно интересный вывод, так как ранее считалось, что основной при питании *E. coli* на глюкозе считается PycF. Еще одним интересным предсказанием нашей модели можно считать соотношение потоков между Ppc и PckA. При лимитированном росте на глюкозе превалирует фосфоенолпируваткиназная реакция (PckA), тогда как общепринятым считается факт, что при питании *E. coli* на глюкозе основная нагрузка лежит на реакции, катализируемой фосфоенолпируваткарбоксилазой (Ppc). Кроме того, ни в одном из исследованных нами метаболических режимов или их смене не был обнаружен поток по лактатдегидрогеназной реакции (LdhA).

На базе данной модели была построена метаболическая модель мутанта *E. coli*, содержащего нокаут по гену *pykA*, кодирующему пируваткиназу-2. Исходя из сопоставления модельных значений стационарных концентраций интермедиатов пути с экспериментальными (рис. 5) нами было сделано предположение о существовании дополнительной метаболической регуляторной связи, заключающейся в ингибировании фосфоглюконатдегидрогеназы (Gnd) при помощи PEP. Данная связь необходима для адекватного совпадения между модельными и экспериментальными значениями стационарных концентраций метаболитов.

Построение кинетических моделей элементов генетической регуляции.

Центральный метаболизм *E. coli* обладает сложной сетью генетической регуляции (Saier Jr. M. et al., 1995). Аналогично уравнениям скоростей ферментов мы построили кинетические модели элементов генетической регуляции, оказывающих наибольшее влияние на центральный метаболизм в рассматриваемых нами условиях. Стоит добавить, что не для всех транскрипционных факторов нами было построено детальное описание. Так,

только в случае IclR удалось создать кинетическую модель, подробно описывающую взаимодействие транскрипционного фактора с оператором и низкомолекулярным эффектором. Для Crp и FruR были построены упрощенные описания, тогда как для PdhR данных оказалось недостаточно даже для построения упрощенной модели.

Используемый нами для описания генетической регуляции подход так же как, и в случае описания кинетики ферментов, иногда позволяет получить ряд предсказаний о свойствах системы. Для иллюстрации данного утверждения, помимо кинетических моделей элементов регуляции, мы разработали кинетическую модель экспрессии генов *ace* оперона, при помощи которой нам удалось получить ряд интересных предсказаний о свойствах одного из исследованных транскрипционных факторов – IclR.

В частности при анализе экспериментальных данных, характеризующих IclR, мы обнаружили ряд несовпадений в свойствах транскрипционного фактора, выделенного из К и В штаммов *E. coli*. Можно выделить три наиболее ярких отличия: разные наборы коэффициентов; разные константы диссоциации транскрипционного фактора с оператором; кроме того, аминокислотная последовательность IclR из К имеет ряд отличий в С-концевом домене, ответственном за связывание коэффициента, с сиквенированными последовательностями IclR из других штаммов *E. coli*. Мы считаем, что все эти факты указывают на наличие у разных штаммов *E. coli* различных форм IclR, обладающих разными регуляторными свойствами, что в свою очередь может быть причиной разного механизма потребления глюкозы и ацетата у В и К штаммов *E. coli*, что было обнаружено экспериментально (Phue J.-N. et al., 2004).

Построение и исследование полной модели центрального метаболизма *E. coli*.

Полная кинетическая модель исследуемого пути представляет собой систему ОДУ, где переменными помимо концентраций интермедиатов пути являются концентрации мРНК и белков, экспрессия которых зависит от генетических регуляторных связей. Данное условие позволяет принять в рассмотрение модели генетическую регуляцию, реализуемую в системе. Благодаря этому факту полные кинетические модели биохимических путей способны описывать данные по транскриптомике, протеомике, а также метаболомике на больших временах (более 10 мин). Это дает возможность детально исследовать метаболические процессы, протекающие при культивировании *E. coli* в ферментере периодического действия (батч-ферментер) и ферментере периодического действия с подпиткой (фидбатч-ферментер), а также анализировать нестационарные метаболические состояния, наблюдаемые при переходе с одного источника углерода на другой или при росте клеток на нескольких субстратах одновременно. В построенной нами полной кинетической модели фигурируют 92 переменных, 163 скорости реакций и 7 законов сохранения. Для верификации модели мы использовали данные по метаболомике, транскриптомике и протеомике.

Таким образом, при помощи методов кинетического моделирования мы учитываем в нашей модели генетическую регуляцию, реализуемую в системе. Это позволяет еще больше расширить сферу применения модели и диапазон описываемых ею экспериментальных данных. Предсказания подобной модели могут послужить достаточно весомым инструментом для изучения свойств центрального метаболизма *E. coli*, принципов организации данной системы, а также механизмов ее функционирования и регуляции.

ВЫВОДЫ

1. Реконструированы пути центрального метаболизма *E. coli*, а также сети метаболической и генетической регуляции этой бактерии.
2. Построены и верифицированы *in vitro* экспериментальными данными кинетические модели отдельных ферментов и элементов генетической регуляции центрального метаболизма.
3. Построена и верифицирована *in vivo* экспериментальными данными различных типов (метабономики, транскриптомики, протеомики, флаксномики и др.) метаболическая кинетическая модель, которая способна описывать процессы, протекающие в проточном ферментере, и полная кинетическая модель, способная описывать процессы, протекающие в периодических ферментерах.
4. Основываясь на анализе поведения модели, мы оценили соотношение потоков между различными анаплеротическими реакциями при культивировании *E. coli* в проточном ферментере и лимитированном росте на глюкозе.
5. Сделан ряд предсказаний о регуляторных свойствах исследуемой системы. В частности показано, что в условиях аэробного лимитированного роста на глюкозе в проточном ферментере функционирует только один из изозимов фосфофруктокиназы – PfkA, тогда как между изозимами пируваткиназы происходит разделение потоков, при этом более активной является PucA. Кроме того, при помощи модели нам удалось предсказать новую регуляторную связь – ингибирование фосфоглюконат дегидрогеназы (Gnd) при помощи фосфоенолпирувата.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Песков К. Демин О. Кинетическая модель фруктозобисфосфатазы из клеток печени быка. // «Математика, Компьютер, Образование». Труды XII международной конференции. – Пушкино (Россия). – 2005. – Т. 3. – с. 203.
2. Песков К., Демин О. Кинетическая модель фруктозобисфосфатазы из клеток *Escherichia coli*. // Тезисы конференции «Российская биоэнергетика: от молекул к клетке» – Москва (Россия). – 2005. – с. 57.
3. Peskov K., Demin O. Acetate operon expression in *Escherichia coli* cells. Kinetic modeling of genetic regulation. // The 12th Meeting of the BioThermoKinetics: Systems Biology: redefining BioThermoKinetics. – Trakai (Lithuania). – 2006. – p. 61-64.
4. Demin O., Dorodnov A., Peskov K., Karelina T., Gizzatkulov N., Metelkin E., Moglevskaya E., Kosinsky Y., Plusnina T., Dubinsky A. Development of large-scale kinetic models on the basis of enzyme structural and functional information: progress and problems. Kinetic modeling of genetic regulation. // The 12th Meeting of the BioThermoKinetics: Systems Biology: redefining BioThermoKinetics. – Trakai (Lithuania). – 2006. – p. 25–26.
5. Peskov K., Demin O. Kinetic Modeling of Gene Expression. Study of ace Operon Genetic Regulation in *Escherichia coli* cells. // The Seventh International Conference on Systems Biology (ISCB). – Yokohama (Japan). – 2006. – p. 105.
6. Peskov K, Demin O. Kinetic modeling of *ace* Operon Genetic Regulation in *Escherichia coli* cells. // The third IECA Conference on Systems Biology of *Escherichia coli*. – Jeju Island (Republic of Korea). – 2006. – p. 149.
7. Песков К.В. Построение математических моделей основных путей бактериального метаболизма и их применение для разработки нового подхода к оптимизации штаммов-продуцентов. // Тезисы 1-ой научно-

- практической конференции «Перспективы развития инноваций в биологии» – Москва (Россия). – 2007. – с. 112.
8. Песков К.В, Демин О.В. Кинетическая модель фосфофруктокиназы-2 из клеток *Escherichia coli*. // «Математика, Компьютер, Образование». Труды XV международной конференции. – Дубна (Россия). – 2008. – Т. 3. – с. 202.
 9. Peskov K., Demin O. Kinetic modeling of *Escherichia coli* central carbon metabolism // Helmholtz German-Russian Workshop on Systems Biology. – Moscow (Russia). – 2008. – p. 58.
 10. Peskov K. V., Goryanin I. I., Demin O.V. Kinetic Model of Phosphofruktokinase-1 from *Escherichia coli*. // Journal of Bioinformatics and Computational Biology. – 2008. – V. 6. № 4. – p. 843–867.
 11. Peskov K. V., Goryanin I. I., Prank K., Tobin F., Demin O.V. Kinetic model of *ace* operon genetic regulation of *E. coli*. // Journal of Bioinformatics and Computational Biology. – 2008. – V. 6. № 5. – p. 933–959.
 12. Mogilevskaya E., Peskov K., Metelkin E., Plyusnina T., Lebedeva G., Goryanin I., Demin O. Kinetic Modeling of *E. coli* Enzymes: Integration of *in vitro* Experimental Data. // Systems Biology and Biotechnology of *E. coli*. (Отв. ред. Sang Yup Lee) – 2009. – p. 177–207.
 13. Mogilevskaya E., Bagrova N., Plyusnina T., Gizzatkulov N., Metelkin E., Goryacheva E., Smirnov S., Kosinsky Y., Dorodnov A., Peskov K., Karelina T., Lebedeva G., Goryanin I. and Demin O. Kinetic modeling as a tool to integrate multilevel dynamic experimental data. // Methods Mol. Biol. – 2009. – 563. – p. 197–218.