

Расчёт скоростей метаболических реакций в живой растущей клетке методом баланса стационарных метаболических потоков (метод БСМП)

©2007 Н.Н. Назипова¹, Ю.Е. Елькин¹, В.В. Панюков¹,

Л.Н. Дроздов-Тихомиров^{2*}

¹Институт математических проблем биологии РАН, Пущино

²Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Аннотация. Разработано программное обеспечение для построения математической модели стационарного метаболизма растущей клетки, позволяющее производить расчёт оптимальных экономических коэффициентов роста биомассы и выделения продуктов биосинтеза, достижимых при идеальной регуляции процессов, и соответствующее этим оптимальным режимам метаболизма распределение скоростей реакций внутри клетки и в её компартментах, включая скорости обмена метаболитами между компартментами. Созданная программа FLUX II работает в среде Windows. Программа имеет удобный интерфейс, обеспечена средствами, исключающими заикливание алгоритма и позволяющими производить содержательный анализ построенной модели. Программа обеспечивает также представление результатов расчета и анализа модели в цифровой и графической форме. С помощью созданной программы построена математическая модель стационарного метаболизма клетки *E.coli*, и рассчитан наилучший возможный экономический коэффициент для роста биомассы этой клетки в аэробных условиях на глюкозе и соответствующее этому режиму метаболизма распределение скоростей реакций. Показано удовлетворительное согласие результатов расчетов и анализа с данными, полученными в эксперименте. Обсуждены возможные пути использования программы при решении практических задач современной биотехнологии.

Ключевые слова: математическое моделирование, модель стационарного клеточного метаболизма, экономический коэффициент биосинтеза, оптимизационные задачи, линейное программирование

Введение

Существование живой клетки полностью определяется её метаболизмом - совокупностью большого числа взаимозависимых химических реакций, протекающих согласованно во времени, скорость протекания которых определяется белками-ферментами. В результате метаболических реакций осуществляется воспроизведение всех структурных и функциональных молекулярных компонентов клетки, определяющих её существование в качестве живой системы, т.е. реализуется основное свойство живой клетки – её способность к самовоспроизведению. Метаболизм клетки включает в себя сотни реакций и является сложной саморегулирующейся системой.

В настоящее время метаболизм клеток многих прокариотических организмов (таких как *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium acetobutylicum* и ряда других)

*drozdov@img.ras.ru

подробно и всесторонне изучен. Накопленные знания используются для построения математических моделей происходящего в них обмена веществ. С помощью таких моделей можно решать не только фундаментальные, но и прикладные задачи.

Известно, что эволюционное развитие организма и формирование его генотипа происходит, в конечном счете, в результате случайного мутагенеза и фенотипической селекции. Генная инженерия позволяет искусственно изменять генотип клетки и, следовательно, её свойства в нужном направлении. При этом используется итеративный подход, который заключается в выделении фрагмента метаболизма, который определяет некоторое свойство клетки, последующего проведения определенных генноинженерных манипуляций для модификации, исключения или создания заново генов ферментов, которые определяют функционирование выделенного фрагмента метаболизма. В результате получается усиление или ослабление интересующего свойства клетки.

Как правило, один и тот же продукт биосинтеза может быть получен несколькими метаболическими путями, проходящими через разные промежуточные этапы и отличающихся распределением скоростей реакций на этих этапах. Математическое моделирование позволяет найти и проанализировать все возможные варианты получения продуктов биосинтеза и найти среди них тот, который является в определенном смысле оптимальным.

Процесс моделирования метаболизма клетки предполагает то или иное количественное описание биохимических реакций, составляющих процесс её жизнедеятельности, системой уравнений.

Можно моделировать метаболизм, используя традиционный кинетический метод, обычно применяемый в химии. При этом составляются дифференциальные уравнения, описывающие изменения во времени *концентраций* метаболитов, участвующих в реакциях. Модель метаболизма клетки в этом случае, будет представлять собой систему нелинейных дифференциальных уравнений, включающих большое число кинетических констант, величины которых должны быть получены из эксперимента. Решение таких систем нелинейных уравнений связано с большими математическими трудностями, которые до появления современных вычислительных мощностей представлялись вообще непреодолимыми. Дело ещё серьёзнее осложняется тем, что получение достоверных экспериментальных данных для всех входящих в уравнения кинетических констант практически невозможно. По данным статьи [1] только для нескольких метаболических путей, а именно для путей гликолиза и метаболизма аденина в эритроцитах человека, известны все входящие во все уравнения кинетические константы.

Далее, упомянутый в нашей задаче критерий оптимальности, который должен обеспечить изучаемый объект, например, максимальный выход некоторого продукта, означает, что объект должен находиться в стационарном состоянии. В самом деле, пусть выход продукта изменяется во времени, например, растёт. Тогда максимум выхода ещё не достигнут, то есть, изучаемый объект ещё не находится в нужном для нас состоянии и так далее. Широко известны два способа получения стационарных решений системы дифференциальных уравнений. Нужно либо решать задачу Коши на большом интервале времени, либо находить корни правых частей уравнений. В нашем случае ни один из указанных способов практически не осуществим.

Это делает кинетический подход практически непригодным для математического моделирования метаболизма клетки в целом в настоящее время.

Другим, значительно более эффективным подходом, позволяющим уже в настоящее время построить модель метаболизма клетки в целом, является метод баланса стационарных метаболических потоков. Этот подход отличается от кинетического тем, что при нём моделируется не изменение *концентраций метаболитов* во времени, а картина распределения *скоростей метаболических реакций*. При таком подходе модель метаболизма представляет собой систему

линейных алгебраических уравнений, переменными которой являются скорости метаболических реакций в стационарном состоянии метаболической системы. Параметрами модели в этом случае являются стехиометрические константы метаболических реакций, хорошо известные в настоящее время.

В 1984 г. Papoutsakis [2] предложил использовать метод баланса стационарных метаболических потоков для построения математической модели метаболизма *Clostridium acetobutylicum*, продуцента ряда органических растворителей. Построенная модель, включающая 14 реакций, позволила количественно описать процесс биосинтеза растворителей культурой продуцента *Clostridium acetobutylicum* и некоторых его штаммов при росте на глюкозе в хорошем соответствии с экспериментом. Предложенный подход был развит в 1999 г [3] путем введения и учета некоторого количества нелинейных ограничений, полученных с использованием измеренных в эксперименте кинетических констант.

Независимо метод баланса стационарных метаболических потоков был применён другими исследователями [4, 5] для построения математической модели метаболизма глюкозы. В этих моделях моделировался лишь небольшой фрагмент метаболизма клетки, и они, разумеется, еще не могут считаться моделью метаболизма клетки в целом.

Стационарное течение метаболических реакций (т.е. протекание всех реакций с постоянной скоростью) наблюдается в клетках растущих с постоянной скоростью (например, бактериальные клетки на экспоненциальной стадии роста). Для этого случая метод баланса стационарных метаболических потоков, в принципе, позволяет построить полную модель метаболизма, происходящего в живой растущей клетке.

Подход к моделированию метаболизма клетки в целом с использованием метода баланса стационарных метаболических потоков был впервые предложен и осуществлён в 1986 в России Л.Н. Дроздовым–Тихомировым с сотр. [6] (объект моделирования – метаболизм продуцента лизина *Corynebacterium glutamicum*). Эта работа была продолжена в последующие годы и её результаты частично опубликована [7, 8].

В западной литературе подход к моделированию метаболизма клетки, основанный на методе баланса стационарных метаболических потоков, в начале 90-х годов был предложен Стефаном Шустером [9], а затем получил независимое развитие в многочисленных работах Б. Палсона с соавторами [10-31] под названием Flux Balance Analysis (FBA). В работах группы Б. Палсона потоковый подход был широко использован для конструирования математических моделей метаболизма кишечной палочки *Escherichia coli* и пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и анализа с помощью построенных моделей экономических характеристик метаболизма этих микроорганизмов. Использование метода баланса стационарных метаболических потоков при исследовании метаболизма различных микроорганизмов в работах групп Б. Палсона и Л.Н. Дроздова-Тихомирова с сотрудниками продемонстрировало большие возможности этого подхода для построения математических моделей метаболизма растущей клетки в целом.

Эффективность применения потокового подхода для построения математических моделей метаболизма клетки и исследования с их помощью свойств клетки как сложной биохимической системы, во многом, зависит от используемых математических методов и программ. Последние должны быть разработаны с учетом необходимости максимальной автоматизации сложной процедуры построения модели, решения соответствующих систем уравнений и представления полученных результатов в удобном для понимания виде.

Эта важная при использовании подхода для решения конкретных задач сторона дела практически не освещена в опубликованных работах Б. Палсона. В работах Л.Н. Дроздова-Тихомирова используется разработанный в 1985 году пакет программ FLUX, ориентированный на работу в среде DOS. Программное обеспечение FLUX имело неудобный интерфейс и обладало серьезным недостатком – чувствительностью к тому,

в каком порядке перечислены реакции моделируемой системы в задающем моделируемую систему списке биохимических реакций. Подбор вручную порядка перечисления реакций, при котором программа FLUX находит решение задачи распределения скоростей в системе, может занять неопределённо большое время, что в некоторых случаях сильно затрудняет работу. Кроме того, результаты расчета представляются программой FLUX в не очень удобном для понимания и сравнения виде.

Задачей настоящей работы было создать программу, работающую в среде Windows, максимально автоматизирующую построение модели с удобным интерфейсом, с возможностью представления результатов в любом виде по выбору исследователя (в том числе, и в графическом) и, что самое главное, свободную от указанного выше недостатка программы FLUX, связанного с заикливанием в некоторых случаях алгоритма линейного программирования.

Принципы построения потоковой модели полиферментной системы

Потоковый подход (метод баланса стационарных метаболических потоков), который может быть использован для построения математической модели метаболизма клетки, опирается на закон сохранения материи. Уравнения потоковой модели составляются для системы взаимодействующих метаболитов, являющейся открытой термодинамической системой, находящейся в стационарном состоянии обмена с внешней средой. В этом состоянии система с постоянной скоростью включает в себя определённые метаболиты из внешней среды – субстраты. Поток субстратов является *входным материальным потоком*. Вошедшие в клетку субстраты вступают между собой в реакции, образуя множество внутренних компонентов системы – промежуточных метаболитов, или интермедиатов. Концентрация каждого интермедиата в системе в стационарном состоянии остаётся постоянной за счёт того, что суммарная скорость притока из всех реакций, в которых он образуется, равна суммарной скорости оттока в реакциях, в которых он потребляется. На определенном этапе в системе происходят необратимые реакции, в результате которых образуются “продукты” – метаболиты, не вступающие более в реакции с промежуточными метаболитами. Эти продукты накапливаются с постоянной скоростью, образуя *выходной материальный поток* метаболизма. Согласно закону сохранения материи атомарный состав и количество атомов вещества в выходном потоке должны быть равны атомарному составу и количеству атомов во входном потоке.

Уравнения потоковой модели представляют собой, фактически, запись закона сохранения материи для пула каждого из метаболитов рассматриваемой метаболической системы, включая субстраты и продукты. Для интермедиатов, концентрации которых в системе остаются постоянными, уравнения баланса потоков записываются как равенство между суммарной скоростью притока из всех реакций, в которых они образуются, и суммарной скоростью оттока во все реакции, в которых они потребляются. Для продуктов и субстратов, уравнения баланса записываются как равенство скоростей их притока (или оттока) некоторым постоянным величинам, задаваемым при постановке задачи. Ясно, что величины задаваемых скоростей накопления продуктов (выходной поток) и притока субстратов (входной поток) не должны противоречить закону сохранения материи.

Совокупность уравнений баланса потоков, написанных для каждого из компонентов метаболической системы, образует систему уравнений, являющуюся потоковой математической моделью рассматриваемой метаболической системы.

Построение потоковой модели метаболизма клетки

Метаболизм клетки, находящейся в стадии стационарного роста, можно считать стационарным. Для построения потоковой математической модели стационарного метаболизма некоторой конкретной клетки требуются следующие данные:

- список метаболитов, являющихся компонентами метаболической системы клетки;
- список реакций, которые могут происходить между метаболитами клетки, определяемый составом ферментов, имеющихся в клетке;
- список субстратов, которые клетка использует для роста;
- список молекулярного состава биомассы клетки и удельных скоростей выделения клеткой продуктов биосинтеза в среду;
- величина удельной скорости роста клетки на заданных субстратах.

Эти данные являются входной информацией, на основе которой строится математическая потоковая модель метаболизма рассматриваемой клетки, представляющая собой систему уравнений:

$$\sum_{i=1}^n S_{ij} v_i = F_j, j = 1, 2, \dots, m, \text{ где}$$

n – число возможных реакций (различных ферментов) в клетке;

m – число различных метаболитов в клетке;

S_{ij} – стехиометрические коэффициенты i -ой реакции (число молекул j -го метаболита, которое потребляется (-) или образуется (+) в одном акте i -ой реакции);

v_i – скорость i -ой реакции;

F_j – результирующий поток (приток/отток) j -го метаболита (скорость изменения концентрации метаболита в клетке).

Уравнения модели описывают баланс метаболитов трех типов.

1. Метаболиты–продукты. Это – целевые продукты метаболизма (ферменты, структурные белки, РНК, ДНК, компоненты мембран и др.), необходимые для самовоспроизведения, и низкомолекулярные продукты биосинтеза, выделяемые клеткой в среду. Величины F_j в уравнениях баланса для этих метаболитов задаются на основе списка молекулярного состава биомассы клетки и скоростей выделения клеткой в среду тех или других продуктов биосинтеза.

2. Внутренние промежуточные метаболиты (интермедиаты) – метаболиты, концентрация которых в стационарном состоянии остается постоянной. Образование этих метаболитов в клетке уравновешено их расходом. Величины F_j в уравнениях баланса этих метаболитов равны нулю.

3. Внешние метаболиты – метаболиты, поступающие из среды в клетку или выходящие из клетки в среду за счёт транспорта через мембрану. Все субстраты роста являются внешними метаболитами. Величины потоков потребления субстратов F_j , если они измерены, могут быть указаны в списке субстратов.

Если величины F_j определены для всех метаболитов рассматриваемой метаболической системы (включая внешние метаболиты), то полученная система уравнений будет **полной** потоковой моделью метаболизма клетки.

Система уравнений полной модели метаболизма клетки, как правило, имеет однозначное решение, позволяющее получить действительную картину распределения скоростей реакций в метаболической сети рассматриваемой клетки, если измерены все входные и выходные потоки и определён молекулярный состав биомассы клетки.

Определение максимально возможных значений экономических коэффициентов метаболической системы клетки (оптимизационная задача)

Для построения полной математической модели какой-либо конкретной клетки в настоящее время, к сожалению, не хватает требующегося для этой цели набора экспериментальных данных.

Однако, располагая данными только о молекулярном составе биомассы и о ферментном составе клетки, которые в настоящее время известны для клеток многих организмов, можно решать очень важные задачи, относящиеся к проблемам экономики метаболизма клетки, так называемые *оптимизационные задачи*.

Одной из уникальных возможностей, которые дает метод БСМП, является возможность определения *потенциальных* возможностей продуктивной работы метаболической машины клетки, т.е. определения значений предельно возможных экономических коэффициентов для различных продуктов биосинтеза клетки. Потребляя субстрат роста (источник углерода) из среды, растущая клетка синтезирует определенное количество продуктов: биополимеры, образующие основную часть биомассы клетки, и низкомолекулярные продукты биосинтеза, выделяемые в среду. Выход того или другого продукта на единицу потребленного клеткой субстрата называют *экономическим коэффициентом* его биосинтеза. Величина экономических коэффициентов зависит от совершенства регуляции скоростей происходящих в клетке взаимосвязанных ферментативных реакций.

Для решения оптимизационной задачи производится редукция математической модели исследуемой метаболической системы, которая осуществляется путём исключения из исходной полной модели уравнений баланса всех внешних метаболитов, в том числе субстратов роста. Полученная редуцированная система линейных уравнений содержит меньше уравнений, чем исходная, и то же число переменных (скоростей реакций), т.е. становится недоопределенной. Решение такой оптимизационной задачи при заданной целевой функции может быть получено с использованием методов линейного программирования. Целевая функция оптимизационной задачи очевидна – это либо поток потребления субстрата (субстратов) при заданном потоке образования продукта (минимизация), либо поток образования продукта при заданном потоке потребления субстрата (максимизация).

Программное обеспечение для математического моделирования метаболизма клетки и решения оптимизационных задач

Итак, мы поставили очень интересную и важную задачу – найти такое распределение скоростей в метаболической сети клетки, при котором синтез целевых продуктов клетки, обеспечивающих её самовоспроизведение, и выделение некоторых побочных продуктов биосинтеза в среду будет осуществляться при минимально возможном входном потоке заданных субстратов роста. В общем случае, это может быть любая комбинация субстратов роста, в том числе, и просто один из них. Программный комплекс FLUX II предназначен для решения таких *оптимизационных* задач метаболизма клетки.

На первом этапе работы программы строится исходная система уравнений, представляющая собой полную модель исследуемой метаболической системы, правые части которой пока не определены. Для этого используется полная стехиометрическая матрица всех реакций, происходящих в клетке (включая транспортные реакции обмена со средой). Затем исходная система уравнений редуцируется путем исключения из неё всех уравнений баланса, которые составлены для внешних метаболитов. В результате, число уравнений редуцированной системы становится меньше числа переменных, равного числу происходящих в системе реакций. Подчеркнем, что число реакций в редуцированной системе остается тем же, что было в исходной.

Далее, на основе данных о молекулярном составе биомассы и скорости выделения заданных продуктов биосинтеза в среду, определяются правые части редуцированной системы уравнений, и формируется целевая функция задачи.

Целевая функция оптимизационной задачи задаётся как сумма входных потоков рассматриваемых субстратов роста, уравнения баланса которых не присутствуют в редуцированной системе уравнений. В зависимости от того, в каких единицах

предполагается определять экономические коэффициенты (в молях субстратов на 1 моль продукта, в граммах субстратов на 1 грамм продукта или каких-либо других), величины входных потоков входят в целевую функцию с различным весовыми коэффициентами, которые задаются исследователем.

Рассматриваемая оптимизационная задача является канонической задачей линейного программирования и может быть записана в матричной форме в следующем виде:

$$Sv = f \quad (1)$$

$$Q(v) = \sum_{1 \leq j \leq n} q_j v_j \rightarrow optimum \quad (2)$$

$$v_j \geq 0, 1 \leq j \leq n \quad (3)$$

Система уравнений (1) описывает баланс потоков. Здесь

$f^T = (f_1, \dots, f_m)$ - вектор-столбец потоков (символ транспонирования T переводит столбец в строку);

$S = (S_{ij}), 1 \leq i \leq m, 1 \leq j \leq n$ – матрица коэффициентов, в данном случае это стехиометрическая матрица;

$v = (v_1, \dots, v_n)$ – скорости реакций.

Уравнение системы с номером k - это уравнение материального баланса для k -го метаболита

$$\sum_{1 \leq j \leq n} S_{kj} v_j = f_k$$

Мы говорим, что метаболит с номером k имеет положительный, отрицательный или нулевой материальный баланс соответственно при $f_k > 0, f_k < 0, f_k = 0$. Неравенства (3) – типичные условия канонической задачи линейного программирования. Содержательный смысл этих ограничений заключается в том, что скорости всех реакций должны быть неотрицательны. Однако, скорости обратимых реакций могут иметь произвольные знаки. Для того, чтобы не выходить за рамки канонической задачи линейного программирования, каждая обратимая реакция заменяется двумя, прямой и обратной. Обе они имеют неотрицательные скорости. Этот приём позволяет удовлетворить условиям (3).

Из сказанного следует, что данная задача линейного программирования (1)-(3) соответствует m метаболитам (m уравнений баланса), участвующим в n химических реакциях (n переменных, скоростей реакций). В оптимизационной задаче всегда имеет место неравенство $n \geq m$.

Условие (2) задает целевую функцию $Q(v)$, в которую входят весовые коэффициенты q_j . Для общности целевая функция задаётся, как взвешенная линейная комбинация всех потоков. При решении задачи нахождения максимальных/минимальных значений экономических коэффициентов используется самый простой вид целевой функции с весовыми коэффициентами, равными 1 для потоков заданных субстратов, и равными 0 для всех остальных.

Оптимизационная задача может рассматриваться, как задача поиска либо максимума, либо минимума целевой функции. При этом оптимизируется или выход биомассы при заданном потреблении субстрата (субстратов), или расход субстрата (или их комбинации) на производство заданного количества биомассы.

Таким образом, сформулированная задача является задачей линейного программирования. Линейное программирование представляет собой математический аппарат, разработанный для решения оптимальных задач с линейными выражениями для критерия оптимальности и линейными ограничениями на область изменения переменных. Для решения большого круга задач линейного программирования имеется практически универсальный алгоритм - *симплекс-метод*, позволяющий за конечное

число итераций находить оптимальное решение. Тип используемых ограничений (равенства или неравенства) не сказывается на возможности применения указанного алгоритма. Дополнительной проверки на оптимальность для получаемых решений не требуется.

Особенностями задачи является то, что стехиометрическая матрица и вектор потоков сильно разрежены, а погрешности экспериментальных измерений значений потокового вектора иногда могут привести к несовместности системы.

В задаче линейного программирования (1)-(3) фигурирует два векторных пространства. Одно из них размерности n – оно содержит все векторы v , которые являются решением системы (1). Второе пространство имеет размерность m и содержит вектор потоков f и векторы-столбцы матрицы S . При рассмотрении классического алгоритма мы будем считать, что ранг матрицы S равен m ($\text{rank}(S) = m$).

Множество решений системы (1) образует многогранник, обозначим его Ph , (многогранник решений) размерности $(n-m)$, $f_k \geq 0 \quad \forall k$. Так как целевая функция достигает своего экстремума в одной из вершин Ph , то нужно осуществить некоторый просмотр этих вершин.

Каждому решению $v = (v_1, v_2, \dots, v_n)$ системы (1) сопоставим множество индексов положительных компонент вектора v , которое обозначим $I^+(v)$. Такой вектор v является вершиной Ph тогда и только тогда, когда векторы-столбцы S_j , с индексами $j \in I^+(v)$ линейно независимы. Так как $\text{rank}(S) = m$, то вершина имеет не более m положительных компонент. Вершина v называется *невырожденной*, если она имеет m положительных компонент, в противном случае она называется *вырожденной*. Всякое подмножество из m независимых столбцов матрицы S называется *базисом задачи линейного программирования*, далее, кратко, *базисом*.

Из вышесказанного следует, что выбор очередной вершины многогранника Ph для просмотра можно заменить выбором базиса. Находясь в текущей вершине, симплекс-метод определяет правило выбора базиса и вычисления вершины многогранника Ph , отвечающей этому базису. Полученная вершина объявляется *текущей*. Если текущая вершина не вырождена, то вершина, вычисленная по выбранному базису, отлична от текущей, и целевая функция в ней уменьшается. Понятно, что если Ph состоит только из невырожденных вершин, то симплекс-метод обязательно приведёт нас к минимуму целевой функции, поскольку число вершин многогранника Ph конечно.

Если текущая вершина вырождена, то вершина, вычисленная по выбранному базису, может совпадать с текущей вершиной. В этом случае симплекс-метод может заиклиться, что иногда и наблюдается на практике. В таком случае последовательность выбираемых базисов циклически повторяется, а значение целевой функции не меняется. Сделав шаг симплекс-метода, мы остаемся в той же точке, лишь заменив один ее базис на другой базис. Это может быть обусловлено особенностями решаемой задачи, например, погрешностями при задании метаболической системы списком биохимических реакций, влиянием погрешностей входных экспериментальных данных и погрешностями округления при построении симплекс-таблиц.

Антициклин – это метод выбора очередного базиса, гарантированно спасающий программу от заикливания на этапе выбора очередного базиса. Известен ряд антициклинов [35]. Однако, использование тех или иных методов борьбы с заикливаниями бывает связано с затратами оперативной памяти, занятыми громоздкими таблицами, дублирующими столбцы симплекс-таблицы, либо с дополнительными вычислительными временами, необходимыми для постоянного перепорядочивания столбцов.

В связи с тем, что реализация антициклинов более трудоёмка, чем классический выбор базиса, в литературе рекомендуется включать антициклин только при

подозрении на заикливание, например, если значения целевой функции не изменяется на большом числе итераций. Здесь необходимо выбирать между эффективностью программного кода и удобством пользователя. Мы сделали выбор в пользу последнего. Созданное нами программное обеспечение содержит антициклин, это обеспечивает удобство для пользователя, не обязанного ничего знать о трудностях симплекс-метода и особенностях задачи.

Созданное программное обеспечение FLUX II осуществляет построение математической модели стационарного метаболизма живой клетки на основе данных о биохимической структуре клетки с использованием метода БСМП. Программа производит решение заданной оптимизационной задачи и расчет распределения скоростей реакций, обеспечивающих предельные значения экономических коэффициентов для заданных продуктов биосинтеза при росте на заданных субстратах. Программа обладает развитым пользовательским интерфейсом и большими возможностями при исследовании метаболических систем различных клеток.

Программное обеспечение представляет собой специализированную систему управления базой данных по метаболическим системам клеток и их фрагментам, включающую в себя расчетный модуль и пользовательский интерфейс. Программа имеет удобный оконный интерфейс. С программой может работать как начинающий, так и продвинутый пользователь. Начинаящий пользователь может изменять параметры метаболических систем, собранных в прилагаемую к программной компоненте базу данных tasks.mbd. Таким образом, он может моделировать различные сценарии работы реальных метаболических систем. Продвинутый пользователь может вводить данные о новых метаболических системах, записывать созданные метаболические системы в базу данных, моделировать различные сценарии и т.д. Созданный оконный интерфейс с помощью подсвечивания доступных в данный момент работы кнопок подсказывает пользователю дальнейшие шаги работы.

Программная разработка представляет собой две подсистемы:

1. подсистема управления базой данных (БД)
2. подсистема построения, анализа и расчета потоковой модели по данным из БД, включающая в себя:
 - подпрограмму автоматического формирования системы уравнений модели
 - подпрограмму анализа системы уравнений и проведения диагностики ошибок
 - подпрограмму решения системы уравнений модели.
 - подпрограмму представления результатов расчета в заданном виде (цифровом и графическом).

Обе подсистемы реализованы в виде одной расчетно-информационной оболочки, которая имеет 4 уровня вложенности (рис. 1): *задача, реакции, анализ, результат*. Уровень «задача» первоначально реализует работу с БД по метаболическим системам, он является основным в процессе работы программы. Все связи между данными и процессами отражаются на этом уровне работы приложения. Например, когда пользователь выбрал метаболическую систему в БД и нажал кнопку «загрузить» на экране появляются новые кнопки и доступные уровни («реакции», «анализ»), когда после этого он нажимает кнопку «произвести вычисления» становится доступным новый уровень «результаты».

Вид представления результатов (рис. 2.) определяет пользователь. Выходные данные - скорости реакций и значения балансов потоков метаболитов. Имеется возможность выдачи результатов в числовом виде или в виде диаграмм. Численные значения результатов, а также значения входных данных в любом объеме (задается пользователем) могут быть записаны в текстовый файл протокола, который можно хранить, редактировать, распечатывать по желанию пользователя. Содержимое протокола можно скомпоновать из полного множества, включающего:

- контрольную полную копию входных данных задачи;

- список величин скоростей реакций в искомом состоянии метаболической системе, при котором система синтезирует заданные продукты, потребляя заданные субстраты с предельным значением (максимальным или минимальным) экономического коэффициента;
- сформированная стехиометрическая матрица системы;
- список ферментативных реакций с указанием рассчитанной скорости для каждой из реакций;
- полный список величин балансов потоков образования/расхода для всех метаболитов системы.

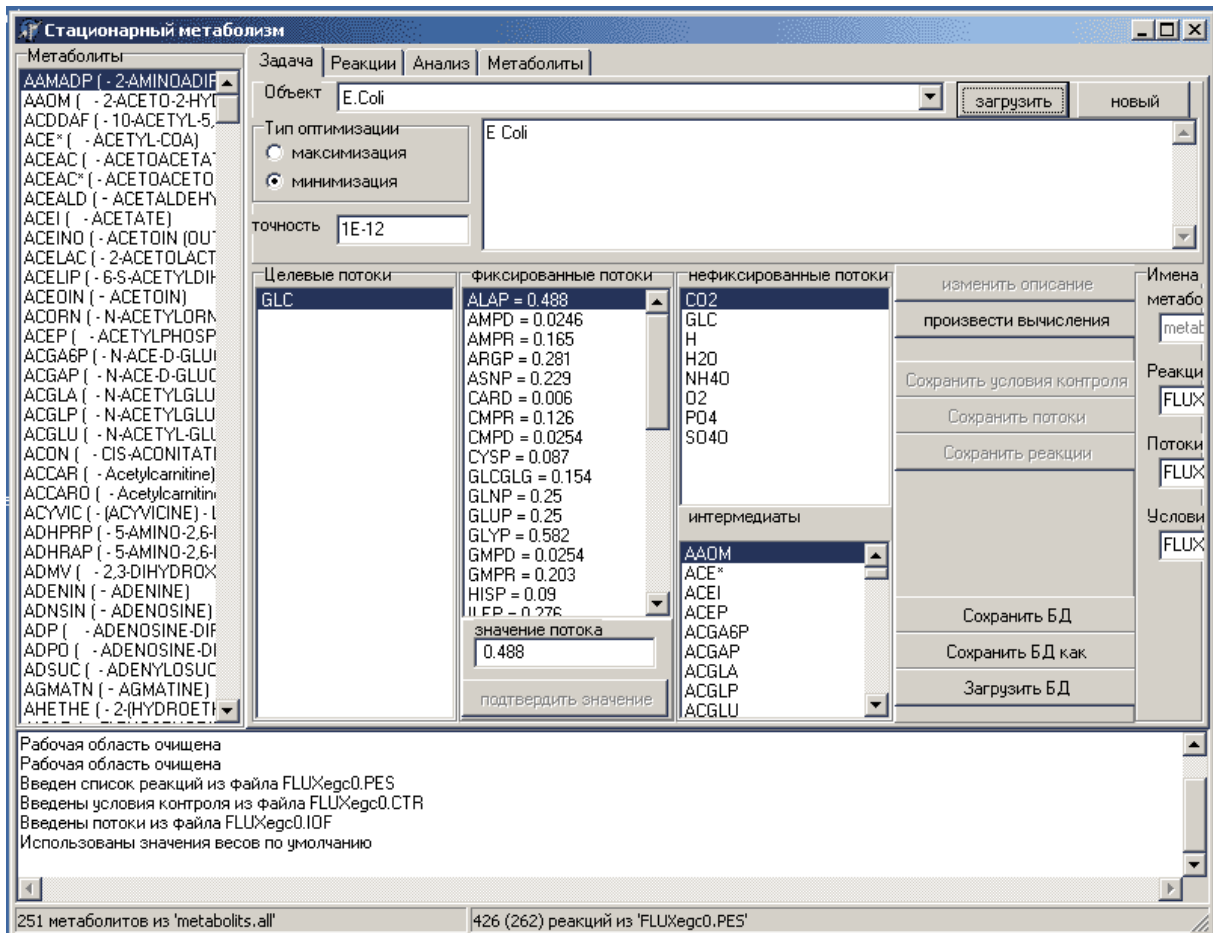


Рис. 1. Вид интерфейса программы FLUX II. Загружена метаболическая система кишечной палочки *E. coli*, растущей на глюкозе в аэробных условиях. Доступны сервисы *Анализ, Реакции, Метаболиты, Задача.*

Экранный вывод результатов включает дополнительно графическое представление распределения скоростей и величин потоков в искомом оптимальном состоянии системы.

Исследуемая метаболическая система задается заданием 4-х текстовых файлов:

- список ферментативных реакций, которые могут происходить в клетке (файл с расширением .PES);
- список метаболитов, участвующих в реакциях (файл с расширением .MET);
- список величин фиксированных потоков метаболитов (файл с расширением .IOF);
- список метаболитов, баланс потоков расхода/образования которых не фиксируется (файл с расширением .CTR), в него входят также те метаболиты, сумма величин потоков расхода/образования которых образует целевую функцию;

Для пользователя существуют две возможности формирования метаболической системы - создание новой метаболической системы с использованием интерфейса программы FLUX II и модификация существующей метаболической системы и запоминание ее под новым именем. Программа включает в себя базу данных (БД), включающую в себя в настоящее время входные данные для построения модели метаболизма, происходящего в клетке кишечной палочки *E. coli*, в митохондриях дрожжей *S. cerevisiae* и во фрагменте метаболического пути окислительного фосфорилирования дрожжевой митохондрии. Встроенная БД обеспечивает неограниченное накопление входных данных для новых объектов моделирования.

При загрузке программы загружается ранее сформированная база данных метаболических систем (рис.1). Список биологических объектов, модели которых имеются в базе данных, приведен в окошке «объект». Описание метаболической системы для выбранного объекта находится в единственном на экране непоименованном окошке. Для загрузки выбранной системы нужно нажать кнопку «загрузить». Тогда в окошках «целевые потоки», «фиксированные потоки», «нефиксированные потоки», «интермедиаты» появятся соответствующие потоки. Фиксированные потоки появляются в виде значений их балансов. Все эти окошки позволяют передвижение вверх/вниз по спискам с помощью компьютерной мыши. В окошке «значение потока» высвечивается значение баланса потоков для текущего фиксированного потока или для интермедиата. Для последних это значение всегда нулевое, но путем задания ненулевого значения баланса для интермедиата можно перевести его в список фиксированных потоков. Чтобы заменить значение потока, необходимо поменять его значение в соответствующем окошке и нажать кнопку «подтвердить значение». Кроме того, с помощью процедуры *drag&drop* можно переместить метаболит из списка «метаболиты» в любое из 4-х вышеназванных окошек. При этом для всех метаболитов, кроме целевых, идет проверка, не содержится ли уже метаболит в одном из окошек «фиксированные потоки», «нефиксированные потоки», «интермедиаты», участвует ли он вообще в ферментативных реакциях данной системы. Метаболит может иметь фиксированный, либо нефиксированный, либо нулевой баланс. Если эти условия выполнены, то перемещение будет успешным. Можно удалять метаболит (кнопка клавиатуры *Del*) в одном окне и заводить его (*drag&drop* мышью) в другом. Все эти изменения можно запоминать в базу данных с помощью кнопок «сохранить потоки» и «сохранить условия контроля», которые сделаются функциональными, как только будут сделаны изменения в соответствующих окошках.

В окошке «реакции» высвечиваются все ферментативные реакции заданной метаболической системы. При этом можно дописывать новые реакции и изменять существующие. Для редактирования нужно щелчком левой кнопки мыши выбрать редактируемую реакцию. Тогда в окошках «реагенты» и «продукты» появятся метаболиты, записанные соответственно в левой и правой частях уравнения реакции. В окошках реагентов и продуктов можно перебирать метаболиты и приписывать им различные коэффициенты. Окошко «обратимая реакция» позволяет выставить атрибут обратимости реакции. Аналогично можно внести в список новую реакцию. Метаболиты в окошки реагентов и продуктов нужно с помощью процедуры *drag&drop* перетащить из окна «метаболиты». Все эти изменения можно запоминать в базу данных с помощью кнопки «сохранить реакции», которая сделается функциональной, как только будут сделаны изменения в реакциях системы.

Программа может создавать новые записи в существующей базе метаболических систем путем нажатия кнопки «новый». Тогда появится окно наименования нового объекта. Для содержательного описания новой метаболической системы надо сделать запись в единственном непоименованном окне на вкладке «задача». Как только это будет сделано, сделается функциональной кнопка «изменить описание». Далее можно загрузить входные текстовые файлы с описанием системы или формировать систему с

Обсуждение

Создано программное обеспечение FLUX II, осуществляющее на основе метода БСМП построение математической модели метаболизма клетки, находящейся в состоянии стационарного роста (самовоспроизведения), и производящее расчет такого распределения скоростей метаболических реакций клетки, при котором экономический коэффициент для некоторого заданного продукта биосинтеза (в том числе для биомассы клетки) при росте на заданной комбинации субстратов имеет максимальное значение.

С помощью программы FLUX II была построена математическая модель метаболизма, и проведено решение задачи нахождения максимальной величины экономического коэффициента роста, возможного для метаболической системы *E.coli* при аэробном росте на глюкозе, и проведен расчет распределения скоростей внутренних реакций, соответствующего решению оптимизационной задачи. Полученные расчетные данные находятся в разумном согласии с величинами этих потоков, измеренными в эксперименте (табл. 1).

Некоторое превышение величин экспериментально измеренных потоков над расчетными величинами, очевидно, указывает на то, что у использованных в эксперименте клеток *E.coli* механизмы регуляции активности ферментов, которые должны обеспечивать согласование скоростей реакций в метаболической сети, не являются идеальными, но достаточно близки к ним. Естественно, что величина рассчитанного максимально возможного экономического коэффициента роста (0.70) оказалась выше измеренного в эксперименте (0.53).

Таблица 1. Потоки потребления (-) и выделения (+) в среду некоторых метаболитов при росте клетки *E.coli* штамм К-12 в аэробных условиях на глюкозе (в ммоль на 1г сухого веса клетки) и экономический коэффициент роста K_{GLC} (в г сухого веса клетки на 1 г субстрата) в тех же условиях

Метаболит	Глюкоза	АТФ	Молекулярн. кислород	Углекисл. газ	Экономич. коэф-т K_{GLC}
Расчет	- 7.86	-12.04	-14.39	+ 5.13	0.70
Эксперимент	-10.50 [32]	-13.90 [33]	-24.90 [34]	+52.30 [32]	0.53

Величина рассчитанного максимально возможного экономического коэффициента роста биомассы превышает экспериментальное значение, что указывает на существование принципиальной возможности оптимизации работы метаболической машины рассмотренного штамма *E. coli* при синтезе биомассы на глюкозе и, следовательно, на целесообразность поиска мутантов, имеющих более высокий, чем штамм К-12, экономический коэффициент.

Полученное при решении оптимизационной задачи распределение скоростей реакций в метаболической сети *E.coli* К-12 (рис. 3) показывает, каким должно быть это распределение, чтобы использование глюкозы на образование биомассы было наиболее экономным.

Если бы было известно реальное распределение скоростей реакций в исследуемой клетке, то можно было бы более детально оптимизировать метаболическую систему. Реальное распределение скоростей в заданной метаболической системе можно получить, решив систему уравнений *полной* модели, распределение *разности* скоростей между оптимальным распределением и реальным дает дифференциальный спектр скоростей. Детальное изучение дифференциального спектра скоростей позволило бы обнаружить реакции (ферменты), ответственные за неэкономное использование субстрата, выявить узкие места изучаемой метаболической системы. Полученная при анализе дифференциального спектра скоростей информация могла бы быть

использована для проведения модификации генома *E.coli* K-12 современными генно-инженерными методами для получения регуляторных мутантов с более высоким экономическим коэффициентом роста на глюкозе.

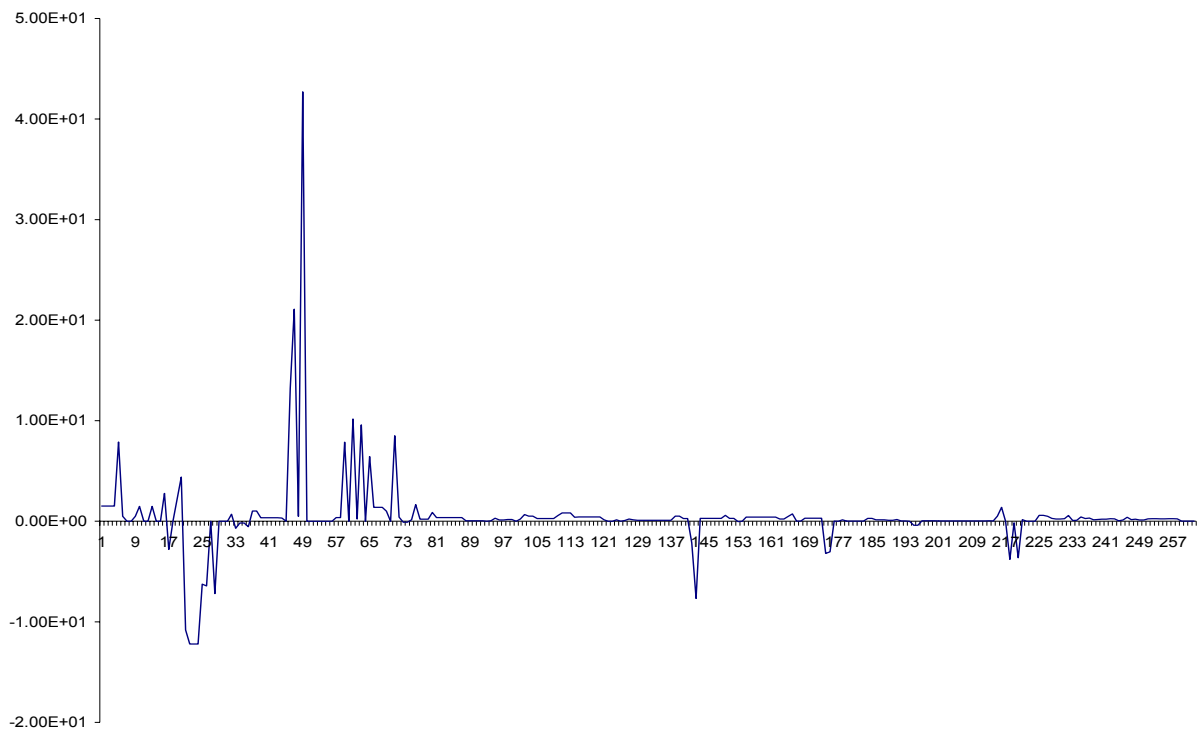


Рис. 3. Распределение скоростей реакций в метаболической системе кишечной палочки, растущей на глюкозе в аэробных условиях, обеспечивающее максимально возможный экономический коэффициент образования биомассы. По оси абсцисс отложены номера реакций (см. приложение 1), по оси ординат - значения скоростей (в ммоль на 1г сухого веса клетки в час).

К сожалению, в настоящее время в мировой литературе ни для каких живых клеток нельзя найти набор экспериментальных данных, необходимых для построения полной модели метаболизма и расчета реально существующего в клетке распределения скоростей метаболических реакций.

В рассмотренном примере решения оптимизационной задачи - нахождения минимально возможного расхода глюкозы на синтез суммарной биомассы клетки *E.coli*, мы имели дело с простейшим случаем задания целевой функции. Целевой функцией в этом случае был просто поток глюкозы из среды в клетку. При этом было неважно, в каких единицах мы определяем экономический коэффициент, в граммах биомассы на 1 ммоль субстрата или в граммах биомассы на 1 г субстрата.

Предусмотренная в программе FLUX II возможность построения целевой функции как суммы потоков нескольких заданных субстратов, каждый из которых вводится со своим весовым коэффициентом, позволяет решать более сложные задачи. Например, можно решать задачу оптимизации распределения скоростей в метаболической системе в случае, когда клетка потребляет из среды не один, а несколько различных субстратов роста. В этом случае, в зависимости от того, в каких единицах мы будем измерять экономический коэффициент (в г/ммоль или г/г), будут определены не один, а два оптимальных режима в метаболической системе.

Первый режим, при котором на образование грамма продукта потребляется наименьшее количество ммоль субстратов, будет получен, если минимизировать *суммарное число молекул* во входных потоках заданных субстратов. Целевая функция при этом должна быть определена как сумма потоков с весами, равными 1.

Второй режим, при котором на образование одного грамма продукта потребляется наименьшая суммарная масса субстратов (г), будет получен, если минимизировать *суммарную массу* входных потоков заданных субстратов. Целевая функция при этом должна быть определена как сумма потоков с весами, равными молекулярным весам заданных субстратов.

Программа FLUX II позволяет решать оптимизационные задачи, связанные с нахождением решений (распределений скоростей) как минимизирующих, так и максимизирующих заданную целевую функцию. Это открывает возможность решать задачу нахождения наиболее экономичного режима путем задания в целевой функции не входных потоков субстратов, а выходных потоков продуктов и искать режимы, максимизирующие целевую функцию.

Мы не обсуждаем здесь различные соображения о возможных вариантах построения и трактовки целевой функции в оптимизационной задаче, высказанные в литературе [1,3,4], потому что это выходит за рамки настоящей статьи.

Считаем своим приятным долгом выразить благодарность академику Е.Д. Свердлову и профессору В.Д. Лахно за интерес и поддержку, которые стимулировали проведение настоящей работы.

Работа была поддержана грантом Министерства Образования и Науки России по Приоритетному направлению «Развитие новых направлений биотехнологии и обеспечение биобезопасности» (госконтракт № 01.106.11.0019) и частично грантами РФФИ №06-07-89274 и №07-07-00313.

Литература

1. H.-G. Holzhütter. The principle of flux minimization and its application to estimate stationary fluxes in metabolic networks. *Eur. J. Biochem.* 2004. **271**. 2905-2922
2. E.T. Papoutsakis. Equations and Calculations for Fermentations of Butyric Acid Bacteria. *Biotechnology and Bioengineering.* 1984. **XXVI**. 174-187
3. R.P. Desai, L.K. Nielsen, E.T. Papoutsakis. Stoichiometric modeling of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. *Journal of Biotechnology.* 1999. **71**. 191-205
4. Watson M.R. A discrete model of bacterial metabolism. *CABIOS.* 1986. **2**(1). 23-27
5. Fell D., Small J.R. Fat synthesis in adipose tissue. *Biochem. J.* 1986. **238**. 781-786
6. Drozdov-Tikhomirov LN, Scurida GI, Serganova VV. Inner metabolic fluxes in multienzyme systems: Lysine synthesis on acetate by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnologia (Moscow).* 1986. **2**(8). 28-37
7. Drozdov-Tikhomirov L.N., Scurida G.I., Serganova V.V. Flux Stoichiometric Models of Cell Metabolism. In: *Reports of International Conference "Modeling and Computer Methods in Molecular Biology and Genetics.* N.Y.: Nova Science Publisher. 1992. 329-334
8. L.N. Drozdov-Tikhomirov, G.I. Scurida, A.V. Davidov, A.A. Alexandrov, R.A. Zvyagil'skaya. Mathematical modeling of living cell metabolism using the method of steady-state stoichiometric flux balance. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology.* 2006. **4**(4). 865-885
9. R.Schuster & S.Schuster. Refined algorithm and computer program for calculating all non-negative fluxes admissible in steady states of biochemical reaction systems with or without some flux rates fixed. *Comput. Appl. Biosci.* 1993. **9**. 79-85
10. Savinell JM, Palsson BO. Network analysis of intermediary metabolism using linear optimization. I. Development of mathematical formalism, *J. Theor. Biol.* 1992. **154**(4). 421-454
11. A.Varma & B.Palsson. Metabolic capabilities of *Escherichia coli*. II. Optimal growth patterns. *J. Theor. Biol.* 1993. **165**. 503-522

12. Varma A, Palsson BO. Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Bio/Technology*. 1994. **12**. 994–998
13. Edwards JS, Ramakrishna R, Schilling CH, Palsson BO. Metabolic flux balance analysis. In: *Metabolic engineering*. Ed. S.Y. Lee and E.T. Papoutsakis. N.Y.: Marcel Dekker. 1999. pp. 13–57
14. Edwards JS, Covert M, Palsson BO. Metabolic modelling of microbes: the flux-balance approach. *Environ. Microbiol.* 2002. **4**. 133–140
15. Foster J, Famili I, Fu PC, Palsson BO and Nielsen I. Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Res.* 2003. **13**. 244-253
16. Forster J, Famili I, Palsson BO, Nielsen J. Large-scale evaluation of *in silico* gene deletions in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS*. 2003. **7**(2). 193-202
17. Famili I, Forster J, Nielsen J, Palsson BO. *Saccharomyces cerevisiae* phenotypes can be predicted by using constraint-based analysis of a genome-scale reconstructed metabolic network. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003. **100**(23). 13134-13139
18. Fong SS, Marciniak JY, Palsson BO. Description and interpretation of adaptive evolution of *Escherichia coli* K-12 MG1655 by using a genome-scale *in silico* metabolic model. *J. Bacteriol.* 2003. **185**(21). 6400-6408
19. Ibarra RU, Fu P, Palsson BO, DiTonno JR, Edwards JS. Quantitative analysis of *Escherichia coli* metabolic phenotypes within the context of phenotypic phase planes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2003. **6**(2). 101-108
20. Allen TE, Herrgard MJ, Liu M, Qiu Y, Glasner JD, Blattner FR, Palsson BO. Genome-scale analysis of the uses of the *Escherichia coli* genome: model-driven analysis of heterogeneous data sets. *J Bacteriol.* 2003. **185**(21). 6392-6399
21. Duarte NC, Herrgard MJ, Palsson BO. Reconstruction and validation of *Saccharomyces* iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model. *Genome Res.* 2004. **14**(7). 1298-1309
22. Reed JL, Palsson BO. Genome-scale *in silico* models of *E. coli* have multiple equivalent phenotypic states: assessment of correlated reaction subsets that comprise network states. *Genome Res.* 2004. **14**(9). 1797-1805
23. Covert MW, Knight EM, Reed JL, Herrgard MJ, Palsson BO. Integrating high-throughput and computational data elucidates bacterial networks. *Nature*. 2004. **429**(6987). 92-96
24. Wiback SJ, Mahadevan R, Palsson BO. Using metabolic flux data to further constrain the metabolic solution space and predict internal flux patterns: the *Escherichia coli* spectrum. *Biotechnol. Bioeng.* 2004. **86**(3). 317-331
25. Reed JL, Vo TD, Schilling CH, Palsson BO. An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR). *Genome Biol.* 2004. **4**(9). R54
26. Famili I, Palsson BO. Systemic metabolic reactions are obtained by singular value decomposition of genome-scale stoichiometric matrices. *J Theor. Biol.* 2004. **224**(1). 87-96
27. Fong SS, Palsson BO. Metabolic gene-deletion strains of *Escherichia coli* evolve to computationally predicted growth phenotypes. *Nat. Genet.* 2004. **36**(10). 1056-1058
28. Duarte NC, Palsson BO, Fu P. Integrated analysis of metabolic phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*. 2004. **5**(1). 63
29. Duarte NC, Herrgard MJ, Palsson BO. Reconstruction and validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model. *Genome Res.* 2004. **14**(7). 1298-1309
30. Fong SS, Burgard AP, Herring CD, Knight EM, Blattner FR, Maranas CD, Palsson BO. *In silico* design and adaptive evolution of *Escherichia coli* for production of lactic acid. *Biotechnol. Bioeng.* 2005. **91**(5). 643-648
31. Mahadevan R, Palsson BO. Properties of metabolic networks: structure versus function. *Biophys. J.* 2005. **88**(1). L07-L09

32. Tempest D.W., Neussell O.M. Growth Yield and Energy Distribution In *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimurium*. In: *Cellular and Molecular Biology*. Ed. F.C.Neidhard. Washington: Am.Soc.for Microbiology, N.W. 1987. **1**. p. 797
33. Stouthamer A.N. The search for correlation between theoretical and experimental growth yield. *Int .Rev. Biochem.* 1979. **21**. 1-47
34. С. Дж. Перт. *Основы культивирования микроорганизмов и клеток*. М.: Мир. 1978. с.104
35. Васильев Ф.П., Иваницкий А.Ю. *Линейное программирование*. М.: Факториал Пресс. 2003

Материал поступил в редакцию 27.03.2007, опубликован 03.05.2007

Приложение 1

Список реакций, использованных при расчете модели метаболизма, происходящего в клетке кишечной палочки *E. coli*

- > ACE* + OXA + H2O = CIT + COA
- CIT = ACON + H2O
- ACON + H2O = ICIT
- > ICIT = AKG + NADP + CO2
- > AKG + NADP + NH3I = GLU + H2O
- > AKG + COA = SUC* + NADH + CO2
- > SUC* + GDP + PI = SUC + COA + GTP + H2O
- GTP + ADP = ATP + GDP
- SUC = FUM + FADH
- FUM + H2O = MAL
- ICIT = GLOX + SUC
- > GLOX + ACE* + H2O = MAL + COA
- MAL = OXA + NADH
- MAL = PYR + NADP + CO2
- MAL = PYR + NADH + CO2
- OXA + GLU = ASP + AKG
- OXA + ADP + PI = PYR + ATP + CO2 + H2O
- OXA + PI = PEP + CO2 + H2O
- > PEP + ADP = PYR + ATP
- > PYR + COA = ACE* + NADH + CO2
- PEP + H2O = PG2
- PG2 = PG3
- PG3 + ATP = DPG + ADP
- DPG + NADH = G3P + PI
- G3P = DOAP
- DOAP + G3P = F16P
- > F16P + H2O = F6P + PI
- F6P = G6P
- G6P = P6GL + NADP
- P6GL + H2O = P6GC
- > P6GC = RL5P + NADP + CO2
- RL5P = RB5P
- RL5P = XY5P
- RB5P + XY5P = SH7P + G3P
- SH7P + G3P = E4P + F6P
- E4P + XY5P = G3P + F6P
- ASP + ATP = ASPP + ADP
- ASPP + NADP = ASPS + PI
- PYR + ASPS = DHP + 2H2O
- DHP + NADP = THP
- SUC* + THP + H2O = SUAP + COA
- SUAP + GLU = SDAP + AKG
- SDAP + H2O = SUC + DAP
- DAP = LYSI + CO2
- > NADP = NADH
- > NADH + ATP + H2O = NADP + ADP + PI
- > NADH + 2H + 1/2O2 = 2(H) + H2O
- > FADH + H + 1/2O2 = (H) + H2O
- > ADP + PI + (H) = ATP + H2O
- > ATP + H2O = ADP + PI
- > NADH + 1/2O2 = H2O
- > NADP + 1/2O2 = H2O
- > FADH + 1/2O2 = H2O
- > SUCO + ATP + H2O = SUC + ADP + PI
- > ACEO + ATP + H2O = ACEI + ADP + PI
- > GLUCO + PEP = P6GC + PYR
- ACEI + ATP = ACEP + ADP
- ACEP + COA = ACE* + PI
- > GLC + PEP = PYR + G6P

> $GLUO + ATP + H_2O = GLU + ADP + PI$
 > $NH_4O + 1/2ATP + 1/2H_2O = NH_4 + 1/2ADP + 1/2PI$
 > $SO_4O + 1/2ATP + 1/2H_2O = SO_4 + 1/2ADP + 1/2PI$
 $NH_4 = NH_3I + H$
 > $PYR + ATP = PEP + AMP + PI$
 > $F_6P + ATP = F_1_6P + ADP$
 $PG_2 = POPYR + NADH$
 $POPYR + GLU = P_5SER + AKG$
 $P_5SER + H_2O = SER + PI$
 $SER + THF = CH_2 + GLY + H_2O$
 > $GLY + THF = CH_2 + NADH + CO_2 + NH_3I$
 $CH_2 = MTLTHF + NADH$
 $MTLTHF + H_2O = FTHF$
 $FTHF + ADP + PI = THF + FORM + ATP$
 $FORM = CO_2 + NADH$
 $CH_2 + NADH = MTHF$
 $GLU + ATP + NH_3I = GLN + ADP + PI$
 $GLU + NADH = GLUA + H_2O$
 $GLUA = PIRL$
 $PIRL + NADH = PRO$
 $RB_5P + ATP = PRPP + AMP$
 > $E_4P + PEP + H_2O = HEPTL + PI$
 > $HEPTL = HQUIN + PI$
 $HQUIN = HSHIK + H_2O$
 $HSHIK + NADP = SHIK$
 > $SHIK + ATP = SHIKP + ADP$
 $SHIKP + PEP = EPSHP + PI$
 > $EPSHP = CHOR + PI$
 > $CHOR + GLN = GLU + PYR + ANTHR$
 > $ANTHR + PRPP = PRANTH + PPI$
 > $PRANTH = DRBLP$
 > $DRBLP = INDGLP + CO_2 + H_2O$
 $INDGLP + H_2O = G_3P + IND$
 > $IND + SER = TRP + H_2O$
 $IND + PYR + NH_3I = TRP + H_2O$
 > $CHOR = PREPH$
 > $PREPH = PHPYR + CO_2 + NADH$
 $PHPYR + GLU = TYR + AKG$
 > $PREPH = PHEPYR + CO_2 + H_2O$
 $PHEPYR + GLU = PHE + AKG$
 > $PHE + NADP + O_2 = TYR + H_2O$
 $ASP + ATP + NH_3I = ASN + ADP + PI$
 $ASPS + NADH = HSER$
 $HSER + ATP = HSERP + ADP$
 $HSERP + H_2O = THR + PI$
 $THR = AKM + NH_3I + H_2O$
 $AKM + PYR = AAOM + CO_2$
 $AAOM + NADH = ADMW$
 $ADMW = AKMW + H_2O$
 $AKMW + GLU = ILE + AKG$
 $PYR + GLU = ALA + AKG$
 > $PYR + PYR = AM + CO_2$
 > $AM + NADH = DIW$
 > $DIW = KIW + H_2O$
 $KIW + GLU = VAL + AKG$
 $KIW + ACE^* + H_2O = IPA + COA$
 $IPA = IPM + H_2O$
 $IPM + H_2O = OKK$
 $OKK = KKK + NADP$
 $KKK = KK + CO_2$
 $KK + GLU = LEU + AKG$
 > $HSER + SUC^* = SUHSER + COA$
 > $SUHSER + CYS = SUC + CYSN$
 > $CYSN + H_2O = PYR + NH_3I + HCYS$

РАСЧЕТ СКОРОСТЕЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ МЕТОДОМ БАЛАНСА СТАЦИОНАРНЫХ ПОТОКОВ

> HCYS + MTHF = MET + THF
 CH2 + NADH = MTHF
 > SER + ACE* + H2S = CYS + ACEI + COA + H2O
 SO4 + 2ATP + 4NADP = H2S + PPI + PI + ADP + AMP
 SUHSER + H2S = HCYS + SUC
 PRPP + ATP = PRATP + PPI
 PRATP = PRAMP + PPI
 PRAMP + H2O = PRFP
 PRFP = PRLFP
 PRLFP + GLN = IGLP + GLU + AICAR
 IGLP = IAP + H2O
 IAP + GLU = HISLP + AKG
 HISLP + H2O = HISL + PI
 HISL = HIS + 2 NADH
 AICAR + FTHF = FAICAR + THF
 FAICAR = INP + H2O
 INP + ASP + GTP = ADSUC + GDP + PI
 ADSUC = FUM + AMP
 ADP + ADP = ATP + AMP
 CH2 + NADH = MTLTHF
 GLU + ACE* = ACGLU + COA
 ACGLU + ATP = ACGLP + ADP
 ACGLP + NADP = ACGLA + PI
 ACGLA + GLU = ACEORN + AKG
 ACEORN + H2O = ORN + ACEI
 ORN + CARBAM = CITRUL + PI
 HCO3 + NH4 + ATP = CARBAM + ADP + H2O
 CITRUL + ASP + ATP = ARGSUC + AMP + PPI
 ARGSUC = ARG + FUM
 THF = DHF + NADP
 FTHF + H2O = MTLTHF
 PRPP + GLN + H2O = RIBAM + GLU + PPI
 RIBAM + GLY + ATP = GAR + ADP + PI
 > GAR + MTLTHF + H2O = FGAR + THF
 > FGAR + GLN + ATP + H2O = FGAM + GLU + ADP + PI
 > FGAM + ATP = AIR + ADP + PI
 AIR + CO2 = CAIR
 CAIR + ATP + ASP = SCAIR + ADP + PI
 SCAIR = AICAR + FUM
 INP + H2O = XANTHP + NADH
 XANTHP + GLN + ATP + H2O = GMP + GLU + AMP + PPI
 GMP + ATP = GDP + ADP
 GDP + ATP = GTP + ADP
 GDP + ATP + NADP = dGTP + ADP + H2O
 ATP + NADP = dATP + H2O
 ASP + CARBAM = CARASP + PI
 CARASP = DOROT + H2O
 DOROT = OROT + NADH
 PRPP + OROT = OROTP + PPI
 OROTP = UMP + CO2
 UMP + ATP = UDP + ADP
 UDP + ATP = UTP + ADP
 UDP + NADP = dUDP
 dUDP + ATP = dUTP + ADP
 > UTP + GLN + ATP = CTP + GLU + PI + ADP
 > CTP + NADP = dCTP + H2O
 dUDP + ADP = dUMP + ATP
 > dUMP + CH2 = dTMP + DHF
 dTMP + ATP = dTDP + ADP
 dTDP + ATP = dTTP + ADP
 > 4ACE* + 7NADP + 7/2ATP = 1/2PALM + 7/2COA + 7/2ADP + 7/2PI
 > 9/2ACE* + 8 NADP + 4ATP = 1/2VAKC + 4COA + 4ADP + 4PI
 PALM + GL3P = LISPD + COA
 LISPD + VAKC = PHD + COA

$\text{PHD} + \text{CTP} = \text{CDPDG} + \text{PPI}$
 $\text{CDPDG} + \text{SER} = \text{PHLSER} + \text{CMP}$
 $\text{PHLSER} = \text{PEA} + \text{CO}_2$
 $\text{DOAP} + \text{NADH} = \text{GL3P}$
 $\text{CDPDG} + \text{GL3P} = \text{CMP} + \text{PGP}$
 $\text{PGP} + \text{H}_2\text{O} = \text{PG} + \text{PI}$
 $\text{CDPDG} + \text{PG} = \text{CARD} + \text{CMP}$
 $\text{CTP} + \text{ADP} = \text{CDP} + \text{ATP}$
 $\text{CDP} + \text{ADP} = \text{CMP} + \text{ATP}$
 $\text{F6P} + \text{GLN} = \text{GLU} + \text{DGA6P}$
 $\text{DGA6P} + \text{ACE}^* = \text{ACGA6P} + \text{COA}$
 $\text{ACGA6P} = \text{ACGAP}$
 $\text{ACGAP} + \text{UTP} = \text{PPI} + \text{UAGAP}$
 $\text{UAGAP} + \text{PEP} = \text{PI} + \text{UAGAPC}$
 $\text{UAGAPC} + \text{NADH} = \text{UAMUR}$
 $\text{UAMUR} + \text{ALA} + \text{ATP} = \text{UAMAL} + \text{ADP} + \text{PI}$
 $\text{UAMAL} + \text{DGLU} + \text{ATP} = \text{UAMAG} + \text{ADP} + \text{PI}$
 $\text{UAMAG} + \text{DAP} + \text{ATP} = \text{UAMAGD} + \text{ADP} + \text{PI}$
 $\text{UAMAGD} + \text{DALA} + \text{ATP} = \text{UAM1} + \text{ADP} + \text{PI}$
 $\text{UAM1} + \text{DALA} + \text{ATP} = \text{UAM2} + \text{ADP} + \text{PI}$
 $\text{UAM2} + \text{PL} = \text{MAPPL} + \text{UMP}$
 $\text{MAPPL} + \text{UAGAP} = \text{MUR1} + \text{UDP}$
 $\text{MUR1} + \text{NH}_3\text{I} + \text{ATP} = \text{MUR2} + \text{ADP} + \text{PI}$
 $\text{MUR2} = \text{MUR} + \text{PPL}$
 $\text{PPL} + \text{H}_2\text{O} = \text{PL} + \text{PI}$
 $\text{ALA} = \text{DALA}$
 $\text{GLU} = \text{DGLU}$
 $\text{G6P} + \text{ATP} = \text{LPS} + \text{ADP} + \text{PI}$
 $\text{PO}_4 + \text{ATP} = \text{ADP} + 2\text{PI} + \text{H}_2\text{O}$
 $\text{PPI} + \text{H}_2\text{O} = 2\text{PI}$
 $\text{UDPGLC} = \text{G1P} + \text{UMP}$
 $\text{G1P} = \text{G6P}$
 $\text{G1P} + \text{UTP} = \text{UDPGLC} + \text{PPI}$
 $> \text{UDPGLC} = \text{GLCGLG} + \text{UDP}$
 $> \text{ARG} + \text{H}_2\text{O} = \text{ORN} + \text{URI}$
 $> \text{URI} + 2\text{H}_2\text{O} = \text{HCO}_3 + 2\text{NH}_3\text{I}$
 $> \text{UR} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} = \text{URI} + \text{ADP} + \text{PI}$
 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{CO}_3$
 $\text{H}_2\text{CO}_3 = \text{HCO}_3 + \text{H}$
 $> \text{ALA} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{ALAP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{ARG} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{ARGP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{ASN} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{ASNP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{ASP} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{ASPB} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{GLU} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{GLUP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{GLY} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{GLYP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{CYS} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{CYSP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{HIS} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{HISP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{LEU} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{LEUP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{ILE} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{ILEP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{LYSI} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{LYSP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{MET} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{METP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{PHE} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{PHEP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{PRO} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{PROP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{SER} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{SERP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{GLN} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{GLNP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{THR} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{THRP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{TRP} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{TRPP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{TYR} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{TYRP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{VAL} + 7/2\text{ATP} + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{VALP} + 7/2\text{ADP} + 7/2\text{PI}$
 $> \text{ATP} = \text{AMPR} + \text{PPI}$
 $> \text{GTP} = \text{GMPR} + \text{PPI}$
 $> \text{CTP} = \text{CMPR} + \text{PPI}$
 $> \text{UTP} = \text{UMPR} + \text{PPI}$
 $> \text{ATP} = \text{AMPRm} + \text{PPI}$

РАСЧЕТ СКОРОСТЕЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ МЕТОДОМ БАЛАНСА СТАЦИОНАРНЫХ ПОТОКОВ

- > $GTP = GMPr_m + PPI$
- > $CTP = CMPr_m + PPI$
- > $UTP = UMP_r_m + PPI$
- > $AMP_r_m + H_2O = AMP + mamp_x$
- > $GMPr_m + H_2O = GMP + mgm_x$
- > $CMPr_m + H_2O = CMP + mcm_x$
- > $UMPr_m + H_2O = UMP + mum_x$
- > $dATP + 2ATP = AMPD + 2ADP + 2PI + PPI$
- > $dGTP + 2ATP = GMPD + 2ADP + 2PI + PPI$
- > $dCTP + 2ATP = CMPD + 2ADP + 2PI + PPI$
- > $dTTP + 2ATP = TMPD + 2ADP + 2PI + PPI$