



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ
ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΤΟΥ
ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ WARBURG ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΡΑΝΙΚΟΛΑ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

Επιβλέπων: Κολίσης Φραγκίσκος
Καθηγητής ΕΜΠ

Αθήνα, Φεβρουάριος 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	7
ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ.....	7
1.1 Εισαγωγή	7
1.2 Μεταβολική ροή και μεταβολικό μονοπάτι	8
1.3 Σημαντικότητες και κάποιες σύγχρονες εφαρμογές	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	13
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	13
2.1 Γενικά στοιχεία μεταβολισμού	13
2.2 Βασικά μεταβολικά μονοπάτια.....	15
2.3 Καρκινικός μεταβολισμός και το φαινόμενο Warburg	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	24
ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ.....	24
3.1 Γενικά Στοιχεία Μεταβολικής Μοντελοποίησης.....	24
3.2 Διαδικασία Μοντελοποίησης Γονιδιακής Κλίμακας	25
3.3 Μαθηματική αναπαράσταση μεταβολικών μοντέλων γονιδιακής κλίμακας.....	28
3.4 Ανασκόπηση κυτταρικών μεταβολικών γονιδιωματικών μοντέλων του ανθρώπου.....	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	40
ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΥΠΟ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥΣ	40
4.1 Εισαγωγή στις μεθόδους ανάλυσης υπό περιορισμούς.....	40
4.2 Ανάλυση Ισορροπίας Ροών (Flux Balance Analysis).....	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	52
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ ΡΟΩΝ (FBA).....	52
5.1 Εισαγωγή	52
5.2 Υλικά και μέθοδοι.....	53
5.3 Αποτελέσματα.....	54
5.4 Συμπεράσματα	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	64

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το παρόν τεύχος περιέχει την διπλωματική εργασία της φοιτήτριας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ Καρανικόλα Αλεξάνδρας. Υπεύθυνος της εργασίας ήταν ο καθηγητής Φραγκίσκος Κολίσης. Μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών & Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και συγκεκριμένα στην ερευνητική ομάδα Μεταβολικής Μηχανικής και Βιοπληροφορικής βοηθώντας του ερευνητή Ελευθέριου Πιλάλη.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Φραγκίσκο Κολίση για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ με το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και τον ερευνητή Ελευθέριο Πιλάλη για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήση του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζονται πρώτα οι βασικές αρχές της μεταβολικής μηχανικής, όπως η μεταβολική ροή, το μεταβολικό μονοπάτι και ο μεταβολισμός και στη συνέχεια οι τρόποι που αυτές οι έννοιες μπορούν να μοντελοποιηθούν και να αναλυθούν.

Σκοπός είναι η μοντελοποίηση της ανάπτυξης του ηπατοκυττάρου, υπό διαφόρων ειδών βιολογικούς περιορισμούς και ποικίλες συνθήκες περιβάλλοντος. Αυτό επιτυγχάνεται με την ενοποίηση δύο ανθρωπίνων κυτταρικών μεταβολικών μοντέλων, του Recon1 και Hepatonet1, σε ένα λειτουργικό μοντέλο. Επιπλέον, εξετάζεται εάν το νέο αυτό μοντέλο έχει την ικανότητα να προσομοιώνει το φαινόμενο Warburg, το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου.

Η ενοποίηση των μοντέλων επιτεύχθηκε μέσω της προσθήκης μιας συνάρτησης αναπτυσσόμενης βιομάζας από το Recon1 στο Hepatonet1 και δέκα αντιδράσεων ανταλλαγής προϊόντων και υποστρωμάτων του κυττάρου με το περιβάλλον του.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δείχνουν ότι το υβριδικό μοντέλο, κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες, μπορεί να προσομοιώνει ικανοποιητικά τόσο την ανάπτυξη του ηπατοκυττάρου σε διάφορα υποστρώματα, όσο και την παραγωγή γαλακτικού οξέος με την παρουσία οξυγόνου, χαρακτηριστικό γνώρισμα του φαινόμενου Warburg.

ABSTRACT

This thesis addresses basic principles of metabolic engineering and metabolic modeling. Basic concepts such as metabolic flux, metabolic pathway and metabolism are explained and modeling techniques are introduced to analyze them.

The intention of this thesis is the simulation of growth of the hepatocyte under various biological constraints. This is achieved by combining two human metabolic models, Recon1 and Hepatonet1, into one. Moreover, the ability of the hybrid model to simulate the Warburg phenomenon, a hallmark of cancer, is considered.

The combination of the two models was achieved by adding a biomass reaction of proliferative cells from Recon1 to Hepatonet1 and fifteen exchange reactions so the new model can consume and secrete

metabolites.

The results show that the hybrid model can simulate satisfactorily both the hepatocyte growth and the production of lactic acid in presence of oxygen, which is a principal trait of the Warburg effect.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

1.1 Εισαγωγή

Ένας οργανισμός αποδομεί θρεπτικά συστατικά και συνθέτει όλα τα μόρια που θα τον κρατήσουν στη ζωή. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μιας σειράς ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων, οργανωμένων σε μονοπάτια, που λειτουργούν αρμονικά ως ένα σύστημα εξασφαλίζοντας την ομοιόσταση.

Η μεταβολική μηχανική ασχολείται με την ανάλυση και τροποποίηση των μεταβολικών μονοπατιών ενός οργανισμού με σκοπό τη στοχευμένη βελτίωση και αξιοποίηση των κυτταρικών λειτουργιών ή προϊόντων.

Η ανάλυση οδηγεί στον εντοπισμό κάποιων αντιδράσεων στόχων, στις οποίες εφαρμόζονται τεχνικές μοριακής βιολογίας ώστε να ενισχυθούν, να περιοριστούν ή να διαγραφούν τα γονίδια ή τα ένζυμα που συνδέονται με αυτές. Κατ' αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η τροποποίηση και η χειραγώγηση τους.

Η ιδέα χειραγώγησης των μεταβολικών μονοπατιών δεν είναι καινούργια. Οι παλαιότερες μέθοδοι βασίζονταν σε χημικές μεταλλάξεις κυττάρων και στην επιλογή της καλλιέργειας που παρήγαγε το επιθυμητό προϊόν σε ικανοποιητικούς ρυθμούς και ποσότητες. Παρ' όλη την επιτυχία των μεθόδων, το γενετικό και μεταβολικό προφίλ των μεταλλαγμένων οργανισμών παρέμενε σχεδόν άγνωστο και η μεταλλαξιγέννηση, μια τυχαία διαδικασία πάνω στην οποία δεν μπορούσε να βασιστεί εξ' ολοκλήρου η επιστήμη.

Την τυχειότητα αυτή περιόρισε η γενετική μηχανική που σε συνδυασμό με τεχνικές της μοριακής βιολογίας και της ανάπτυξης της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, κατέστησε εφικτή τη τροποποίηση συγκεκριμένων ενζυμικών αντιδράσεων στόχων δίνοντας μια σαφή κατεύθυνση στην διεργασία.

Ο όρος μεταβολική μηχανική καθιερώθηκε ανάμεσα σε πολλούς άλλους, το 1991 από τους Stephanopoulos, Vallino και Bailey, για να περιγράψει τις πολλαπλές εφαρμογές που θα μπορούσε να έχει η νέα αυτή τεχνολογία στη στοχευμένη χειραγώγηση των μεταβολικών μονοπατιών. Κάποιοι από αυτούς τους όρους ήταν μηχανική μεταβολικών μονοπατιών, κυτταρική μηχανική, in vitro εξέλιξη κ.α. Παρ' όλες τις διαφορές στον ορισμό της μεταβολικής μηχανικής οι στόχοι και η ουσία παραμένει η ίδια.

Κατά τη διάρκεια όλων αυτών των χρόνων έχουν αναπτυχθεί νέοι κλάδοι, θεωρίες και τεχνολογίες που σχετίζονται με τη μεταβολική μηχανική τόσο θεωρητικά όσο και πρακτικά. Αυτό καθιστά τη μεταβολική μηχανική ένα διεπιστημονικό κλάδο που επιβάλλει την οργάνωση και συνεργασία ασύνδετων, πρωτίτερα, κλάδων όπως η βιοχημεία, η μοριακή βιολογία, η γενετική, η κυτταρική φυσιολογία κ.α. Ο χαρακτήρας της αυτός είναι ένα πλεονέκτημα για την επίτευξη των στόχων της, καθώς η πληθώρα διαφορετικών γνώσεων και δεδομένων στον 21^ο αιώνα δεν θα μπορούσε να αξιοποιηθεί με άλλο τρόπο.

Ταυτόχρονα, όμως ο διεπιστημονικός χαρακτήρας της προβάλλει την ανάγκη του προσδιορισμού εκείνων των στοιχείων της επιστήμης που την διαφοροποιούν από τις υπόλοιπες, με τις οποίες σχετίζεται. Η διαφοροποίηση προκύπτει από τις έννοιες της μεταβολικής ροής και του μεταβολικού μονοπατιού, καθώς και της έμφασης που δίνεται στην ανάλυση των παραγόντων που τις επηρεάζουν⁽²³⁾. Παρακάτω, εξηγούνται οι κεντρικές έννοιες της επιστήμης και δίνονται κάποιες χαρακτηριστικές εφαρμογές.

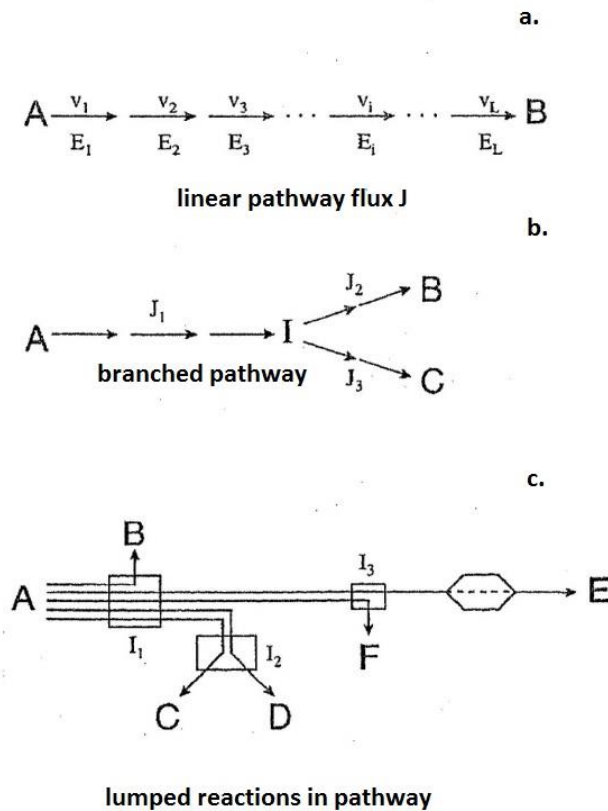
1.2 Μεταβολική ροή και μεταβολικό μονοπάτι

Κεντρική σημασία στη μεταβολική μηχανική έχει το μεταβολικό δίκτυο αντιδράσεων και όχι οι μεμονωμένες αντιδράσεις. Το δίκτυο εμπεριέχει τις έννοιες του μεταβολικού μονοπατιού και της μεταβολικής ροής.

Μεταβολικό μονοπάτι ορίζεται μία ακολουθία πραγματοποιήσιμων και παρατηρήσιμων βιοχημικών, ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων που ενώνουν ένα σύνολο μεταβολιτών εισόδου και εξόδου. Συζευγμένα μεταβολικά μονοπάτια απαρτίζουν ένα μεταβολικό δίκτυο ⁽²³⁾. Ο ρυθμός, με τον οποίο οι μεταβολίτες εισόδου παράγουν μεταβολίτες εξόδου αποτελεί τη μεταβολική ροή του μονοπατιού.

Ένα πολύ σημαντικό στοιχείο κατά τη σύνθεση των μεταβολικών μονοπατιών είναι η εγκυρότητα των αντιδράσεων και κατ' επέκταση των ακολουθιών που αυτές δημιουργούν. Αφενός, πρέπει να αντιστοιχούν σε πραγματικές, ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις και αφετέρου οι ροές τους πρέπει να μπορούν να παρατηρηθούν και να μετρηθούν πειραματικά.

Ακολουθίες αντιδράσεων των οποίων οι ροές δεν μπορούν να μετρηθούν πειραματικά συνίσταται να ενώνονται σε μία (lumped reactions), έτσι ώστε να απλοποιείται το δίκτυο. Το παρακάτω σχήμα επεξηγεί όλες τις έννοιες.



Σχήμα 1.1. Αναπαράσταση των εννοιών της μεταβολικής ροής και του μεταβολικού μονοπατιού (α) μεταβολική ροή J απλού γραμμικού μονοπατιού, (β) μεταβολική ροή J σε διακλαδισμένο μεταβολικό μονοπάτι (γ) ενοποίηση μεταβολικών ροών αντιδράσεων (lumped reactions).

Κεντρικός άξονας της μεταβολικής μηχανικής είναι η μέτρηση όλων των μεταβολικών ροών και η

αποσαφήνιση των μηχανισμών και των παραμέτρων από τις οποίες επηρεάζονται. Η μέτρηση των ροών *in vivo* επιτυγχάνεται με την ανάλυση μεταβολικών ροών (MFA), ενώ η χειραγώγηση τους με τον έλεγχο των μεταβολικών ροών (MCA).

Έτσι, μετά τη συλλογή και σύνθεση των παραπάνω δεδομένων, σε ένα τελικό στάδιο, μελετάται ο μεταβολισμός από τη σκοπιά πλέον ενός δικτύου ή αλλιώς ενός συστήματος. Σε αυτό το στάδιο, συμβάλλουν διάφορες υπολογιστικές μέθοδοι.

1.3 Σημαντικότητα και κάποιες σύγχρονες εφαρμογές

Το ευρύ πεδίο της μεταβολικής μηχανικής έχει συνέπειες πρακτικές και κοινωνικές, καθιστώντας την μία από της σημαντικότερες επιστήμες του 21 ου αιώνα.

Σε πρακτικό επίπεδο, εισάγει νέες θεωρίες και έννοιες για την ανάλυση του μεταβολισμού. Κύριος στόχος της είναι οι ακριβείς μετρήσεις των ροών *in vivo*, ο έλεγχος των παραμέτρων που τις επηρεάζουν και ο συγκερασμός αυτών των δεδομένων καθώς και άλλων μεμονομένων βιολογικών πληροφοριών, σε ένα σύστημα που επηρεάζει και επηρεάζεται από το περιβάλλον του.

Σε κοινωνικό επίπεδο, η μεταβολική μηχανική βάζει τα θεμέλια μιας νέας αγοράς βιοτεχνολογικών προϊόντων λύνοντας προβλήματα βιοιατρικά, περιβαλλοντικά κ.α. Επιπρόσθετα, η διεπιστημονική φύση της δίνει τη δυνατότητα σε ειδικούς διαφόρων ειδικοτήτων να συνεργαστούν δημιουργώντας νέους κλάδους εργασίας και μια νέα βιομηχανία προς όφελος της κοινωνίας.

Οι εφαρμογές μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες και στοχεύουν στη βελτιστοποίηση: 1) της παραγωγής πρωτογενών μεταβολιτών 2) της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών και βιοφαρμακευτικών προϊόντων 3) των κυτταρικών ιδιοτήτων, και 4) του επιστημονικού πεδίου της βιοιατρικής⁽¹⁴⁾. Παρακάτω παρουσιάζονται κάποια παραδείγματα από κάθε κατηγορία.

Παραγωγή πρωτογενών μεταβολιτών

Οι μεταβολίτες αποτελούν τα ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα του μεταβολισμού. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες είναι ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που σχετίζονται άμεσα με την ανάπτυξη, τον

πολλαπλασιασμό και την αναπαραγωγή ενός οργανισμού. Η έλλειψη τους οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο.

Πολλές εφαρμογές, κυρίως βιομηχανικής φύσεως ,σχετίζονται με την μαζική παραγωγή πρωτογενών μεταβολιτών. Η παραγωγή βασίζεται στην υπερέκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται σε ένα μεταβολικό μονοπάτι που υπάρχει ήδη στον οργανισμό, ή στην εισαγωγή ενός νέου, μέσω του οποίου θα αυξηθεί η απόδοση του ζητούμενου προϊόντος.

Κάποιες εφαρμογές είναι: 1) η παραγωγή αιθανόλης με σκοπό τη χρήση της ως βιοκαύσιμο2) παραγωγή αμινοξέων όπως τρυπτοφάνη, θρεονίνη, ισολευκίνη 3) οικονομική παραγωγή 1.3-προπανοδιόλης,ουσίας σημαντικής στη βιομηχανία πολυμερών και 4) παραγωγή β-καροτίνης,πρόδρομος ουσία στη βιοσύνθεση της βιταμίνης c.

Παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι χημικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, παράγονται από τους οργανισμούς και δεν εμπλέκονται άμεσα στην ανάπτυξη ή στην αναπαραγωγή τους.

Οι διεργασίες παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών ενέχουν περισσότερες δυσκολίες λόγω της περίπλοκης φύσης των μορίων που παράγονται αποκλειστικά με βιολογικούς τρόπους σε μικρές ποσότητες. Η πρόκληση δεν αφορά μόνο την αύξηση της απόδοσης και τη μείωση του κόστους των διεργασιών, αλλά και την εισαγωγή νέων καινοτόμων μεθόδων.

Κάποια παραδείγματα αφορούν την παραγωγή:1) αντιβιοτικών όπως πενικιλίνη 2) αντικαρκινικών φάρμακων και 3) φαρμάκων για τον ιό ανθρώπινης ανοσοεπάρκειας (HIV).

Κυτταρική και ιστική μηχανική

Η μεταβολική μηχανική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή κυττάρων με συγκεκριμένες ιδιότητες τροποποιώντας χαρακτηριστικά όπως την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό , την αντοχή σε εξωγενείς παράγοντες, την κατανάλωση υποστρωμάτων κ.α. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι αποτέλεσμα

πολύπλοκων βιολογικών λειτουργιών, στις οποίες συμμετέχουν πολλά και διαφορετικά γονιδιακά προϊόντα. Ο στόχος της σε αυτό τον τομέα, είναι να κατευθύνει την ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων ενός κυττάρου, οδηγώντας το, να εμφανίσει νέους φαινοτύπους που εξυπηρετούν τις ανάγκες της.

Ένα παράδειγμα αφορά τον έλεγχο των κυτταρικών κύκλων και συγκεκριμένα τη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης, που είναι αποτέλεσμα πολύπλοκης και ταυτόχρονης ρύθμισης πολλαπλών γονιδιακών προϊόντων. Συγκεκριμένα, ο επαναπρογραμματισμός αυτών των ρυθμιστικών περιορισμών σε μια καλλιέργεια, ώστε το κύτταρο να πάψει να πολλαπλασιάζεται όταν υπάρχει υψηλή πυκνότητα κυττάρων, οδηγεί σε μία παρατεταμένη περίοδο αυξημένης παραγωγικότητας του επιθυμητού προϊόντος.

Βιοϊατρικές εφαρμογές

Η μεταβολική μηχανική μπορεί να συμβάλει αρκετά στην εξέλιξη της βιοιατρικής. Η τελευταία στοχεύει σε δημιουργία νέων θεραπειών και φαρμάκων που αφορούν συνήθως ένα συγκεκριμένο προβληματικό γονίδιο.

Ωστόσο, η θεώρηση αυτή, που αφορά μία ενζυμικά καταλυόμενη αντίδραση, δεν εξασφαλίζει απαραίτητα την ίαση. Αυτό διότι, ακόμα και να επιδιορθωθεί το γονίδιο, δε σημαίνει ότι θα υπάρχει ανάλογη ανταπόκριση σε συστημικό επίπεδο. Έτσι, η μεταβολική μηχανική, προσεγγίζοντας το μεταβολισμό ως ένα σύστημα, που απαρτίζεται μεν από τα μέρη, αλλά συγχρόνως αντιδρά δυναμικά με το περιβάλλον του ως ολότητα, δίνει τη δυνατότητα για μια πιο ολοκληρωμένη θεραπεία.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η εφαρμογή της ανάλυσης και ελέγχου μεταβολικών ροών τόσο σε κληρονομικές μεταβολικές ασθενείς όπως είναι ο διαβήτης, η δυσανεξία στη φρουκτόζη κ.α. όσο και σε άλλες, που επηρεάζουν τον μεταβολισμό και τη φυσιολογία του κυττάρου, αλλά δεν σχετίζονται απαραίτητα με κάποιο γονίδιο, όπως ο καρκίνος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

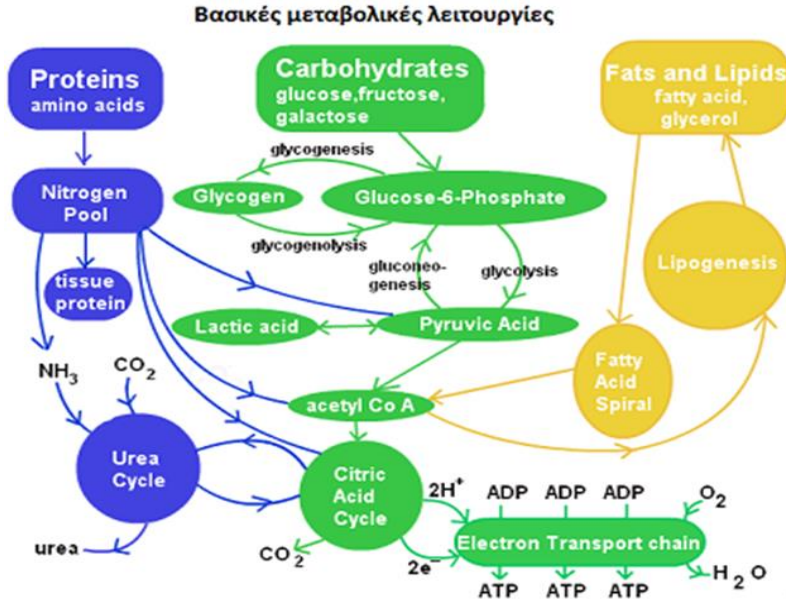
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

2.1 Γενικά στοιχεία μεταβολισμού

Τα κύτταρα απαιτούν συνεχή παροχή ενέργειας για να δημιουργούν και να συντηρούν τη βιολογική τάξη που τα διατηρεί στη ζωή. Το σύνολο των βιοχημικών αντιδράσεων που πραγματοποιεί το κύτταρο, με το σκοπό αυτό, ονομάζεται κυτταρικός μεταβολισμός. Οι αντιδράσεις αυτές οργανώνονται σε μεταβολικά μονοπάτια, που το καθένα επιτελεί μια συγκεκριμένη λειτουργία.

Οι δύο γενικές κατηγορίες μονοπατιών είναι ο καταβολισμός και ο αναβολισμός. Στις καταβολικές διεργασίες διασπώνται οργανικές ενώσεις σε μικρότερα μόρια με ταυτόχρονη παραγωγή ενέργειας, ενώ στις αναβολικές συντίθενται σύνθετες ενώσεις απ' τα μικρότερα μόρια με ταυτόχρονη κατανάλωση ενέργειας.

Η ενέργεια που καταναλώνεται ή παράγεται, προέρχεται από τους χημικούς δεσμούς των μεγαλομορίων της τροφής, η οποία οξειδώνεται χρησιμεύοντας ως καύσιμο. Τα πιο συχνά καύσιμα είναι οι πολυσακχαρίτες που οξειδώνονται σε σάκχαρα, οι πρωτεΐνες που δίνουν αμινοξέα και τα λίπη απ' τα οποία προέρχονται τα λιπαρά οξέα. Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται οι βασικές μεταβολικές λειτουργίες όπου διασπώνται και συντίθενται τα παραπάνω μόρια.

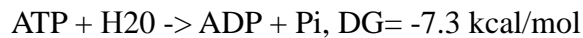


Σχήμα 2.1. Συνοπτική παρουσίαση των βασικών μεταβολικών λειτουργιών της αποσύνθεσης πρωτεϊνών, υδατανθράκων και λιπιδίων.

Η διάσπαση των παραπάνω μεγαλομορίων απελευθερώνει ενέργεια που αποθηκεύεται με τη μορφή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) ,σύμφωνα με την αντίδραση:



Το ATP περιέχει υψηλής ενέργειας φωσφορικούς δεσμούς που μεταφέρονται σε ενώσεις χαμηλότερης ενέργειας συμβάλλοντας στην πραγματοποίηση των αντιδράσεων. Πολλές αντιδράσεις δεν θα ήταν εφικτές εάν δεν υπήρχε το ATP. Η μεταφορά της ενέργειας πραγματοποιείται με την υδρόλυση του ATP και γίνεται σύμφωνα με την αντίδραση:



Ανάλογες ενώσεις, που μεταφέρουν ενέργεια αλλά όχι σε τόσο μεγάλη έκταση είναι: 1) η τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP) 2) η τριφωσφορική ουριδίνη (UTP) και 3) η τριφωσφορική κυτιδίνη(CTP).

Η πλειοψηφία των βιολογικών αντιδράσεων είναι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής γεγονός που συνεπάγεται την ύπαρξη μορίων δεκτών-δοτών ηλεκτρονίων. Κάποια από τα σημαντικότερα μόρια είναι τα: νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδιο (NAD⁺), φωσφορικό-νικοτιναμιδο-δινουκλεοτιδιο (NADP⁺) και το φλάβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδιο (FAD⁺).

Η παραγωγή λοιπόν ATP, NADH και άλλων μορίων φορέων είναι από τις σημαντικότερες λειτουργίες του κυττάρου καθώς αποτελούν τη βάση για κάθε αντίδραση. Επιπρόσθετα, λειτουργούν ως παράγοντες συνοχής ενός δικτύου καθώς μεταφέροντας τις ιδιότητες τους εξασφαλίζουν την ομαλή λειτουργία του. Ωστόσο, η παραγωγή τους δεν γίνεται τυχαία με ένα σταθερό ρυθμό αλλά επηρεάζεται από το περιβάλλον μέσα από περίπλοκα συστήματα ρύθμισης και ελέγχου που εξασφαλίζουν την ομοιόσταση. Για τη μεταβολική μηχανική, η μελέτη της ρύθμισης είναι καθοριστικής σημασίας γιατί σχετίζεται με την ενεργότητα των ενζύμων η οποία με τη σειρά της επηρεάζει την παραγωγή κάποιου επιθυμητού προϊόντος ή την εμφάνιση κάποιων φαινοτύπων. Εάν οι μεταβολές στην ενεργότητα των ενζύμων δεν επηρεάζουν δραστικά τις ροές του μεταβολικού μονοπατιού ενδιαφέροντος τότε αυτό το ένζυμο δεν θεωρείται κρίσιμο για μια διεργασία.

2.2 Βασικά μεταβολικά μονοπάτια

Κυτταρική αναπνοή

Κυτταρική αναπνοή ονομάζεται η καταβολική διεργασία κατά την οποία το κύτταρο απελευθερώνει την χημική ενέργεια των τροφών, μέσω μιας σειράς αντιδράσεων, και τη δεσμεύει στη μορφή του ATP. Μπορεί να λαμβάνει χώρα είτε υπό αερόβιες, είτε υπό αναερόβιες συνθήκες.

Η κυτταρική αναπνοή χωρίζεται σε τρία διαφορετικά μονοπάτια:

- 1. Γλυκόλυση.** Πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα όπου διασπάται η γλυκόζη σε πυροσταφιλικό οξύ
- 2. Κύκλος του Krebs.** Πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια, όπου το πυροσταφιλικό οξύ μετατρέπεται σε CO₂ και NADH.
- 3. Αναπνευστική αλυσίδα (οξειδωτική φωσφορυλίωση).** Πραγματοποιείται στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων μέσω αντιδράσεων οξειδοαναγωγής, όπου μεταφέρονται ηλεκτρόνια από το NADH σε ένα δέκτη ηλεκτρονίων και παράγεται ATP.

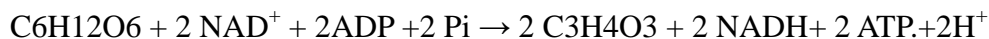
Η τελική φάση μετατρέπει την αναγωγική ισχύ σε μια βιολογικά χρήσιμη ενεργειακή μορφή το ATP. Το ATP παράγεται και στα άλλα στάδια αλλά σε μικρότερες ποσότητες. Ο δέκτης ηλεκτρονίων του τελευταίου σταδίου καθορίζει και τις αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες της όλης διεργασίας. Αν ο δέκτης είναι το οξυγόνο τότε η αναπνοή είναι αερόβια, ενώ αν χρησιμοποιούνται άλλοι δέκτες όπως NO^{3-} , SO^{4-} , Fe^{3+} κ.α. είναι αναερόβια.

Μία ειδική περίπτωση καταβολισμού της γλυκόζης και γενικότερα των υδατανθράκων είναι η ζύμωση. Πραγματοποιείται εν απουσία οξυγόνου και το τελικό της προϊόν δεν είναι το πυροσταφυλικό αλλά παράγωγα του που έχουν προκύψει από περαιτέρω οξείδωση, συνήθως ένα οξύ ή μία αλκοόλη.

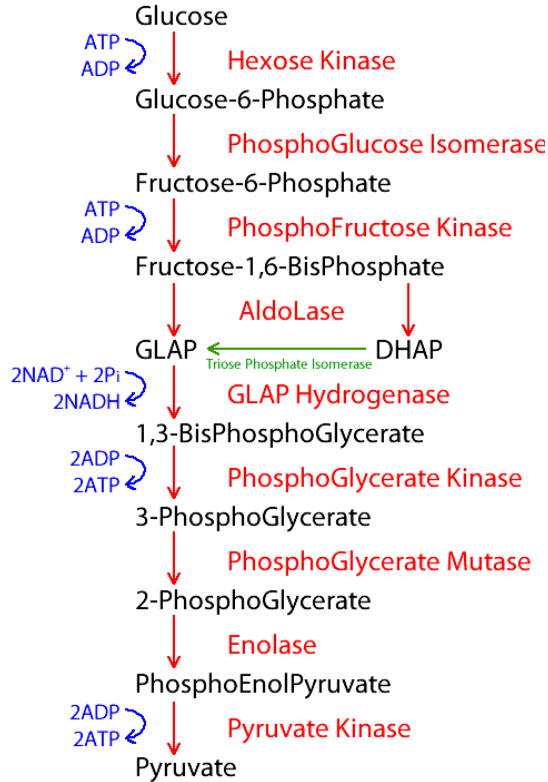
Γλυκόλυση

Η γλυκόλυση είναι το αρχικό στάδιο του καταβολισμού της γλυκόζης. Αποτελείται από μια σειρά ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων που πραγματοποιούνται στο κυτταρόπλασμα, με ή χωρίς την παρουσία οξυγόνου.

Η συνολική αντίδραση είναι:



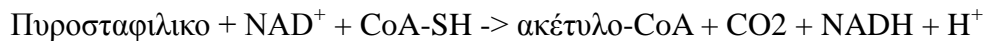
Η καθαρή απόδοση της γλυκόλυσης είναι 2 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες. Στις αερόβιες συνθήκες το τελικό προϊόν είναι το πυροσταφυλικό οξύ και εισέρχεται στο μιτοχόνδριο όπου οξειδώνεται προς CO_2 , ενώ σε αναερόβιες μπορεί να μετατραπεί σε γαλακτικό οξύ, αιθανόλη ή άλλα προϊόντα ζύμωσης. Το συνολικό μονοπάτι παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα:



Σχήμα 2.2 Το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης.

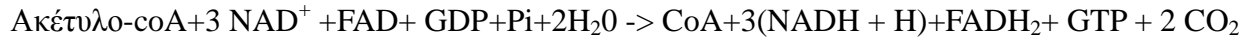
Κύκλος του κιτρικού οξέος (κύκλος του Krebs)

Παρουσία οξυγόνου και του συνενζύμου CoA το πυροσταφυλικό οξειδώνεται περαιτέρω σε ακέτυλο-CoA και CO₂ σύμφωνα με την αντίδραση:

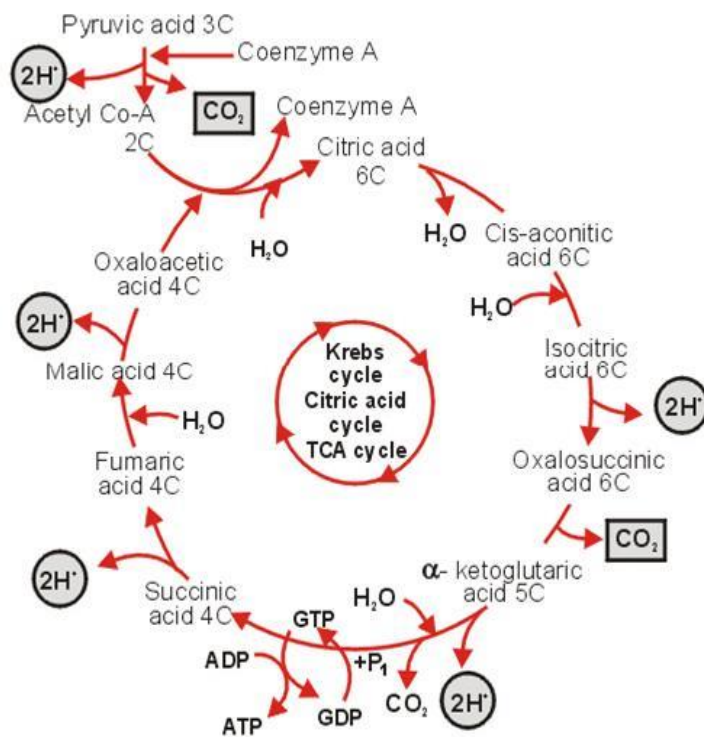


Η οξείδωση αυτή σηματοδοτεί την έναρξη του δεύτερου σταδίου της κυτταρικής αναπνοής που πραγματοποιείται στο μιτοχόνδριο και ονομάζεται κύκλος του Krebs. Ονομάζεται κύκλος διότι οι αντιδράσεις ξεκινούν και τελειώνουν με το κιτρικό οξύ που αναγεννάται συνεχώς από τη συμπύκνωση του ακέτυλο-CoA με το οξαλικό οξύ. Έτσι, τα άτομα άνθρακα της ακετυλομάδας οξειδώνονται πλήρως και μετατρέπονται σε CO₂.

Η συνολική αντίδραση του κύκλου είναι:



Η καθαρή απόδοση είναι τρία μόρια CO_2 , τέσσερα μόρια NADH και H , ένα FADH_2 ανά μόριο πυροσταφυλικού οξέος. Παρακάτω φαίνονται όλες οι αντιδράσεις του κύκλου.

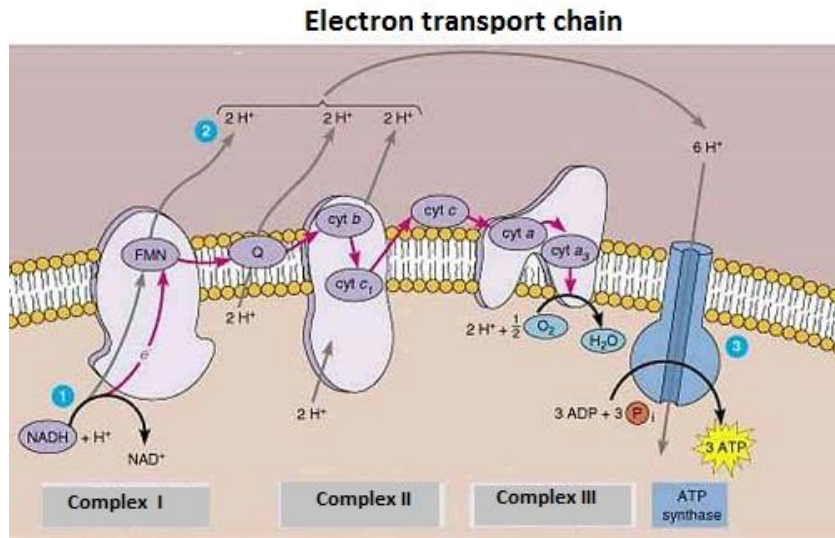


Σχήμα 2.3. Ο κύκλος του Krebs

Οι σημαντικότεροι ρόλοι του κύκλου είναι (1) η παροχή ηλεκτρονίων (NADH), (2) η παροχή σκελετών C (3) η παραγωγή ενέργειας. Σημαντικό ρόλο παίζουν κάποια ενδιάμεσα του κύκλου που χρησιμοποιούνται ως πρόδρομοι για τη βιοσύνθεση ορισμένων αμινοξέων.

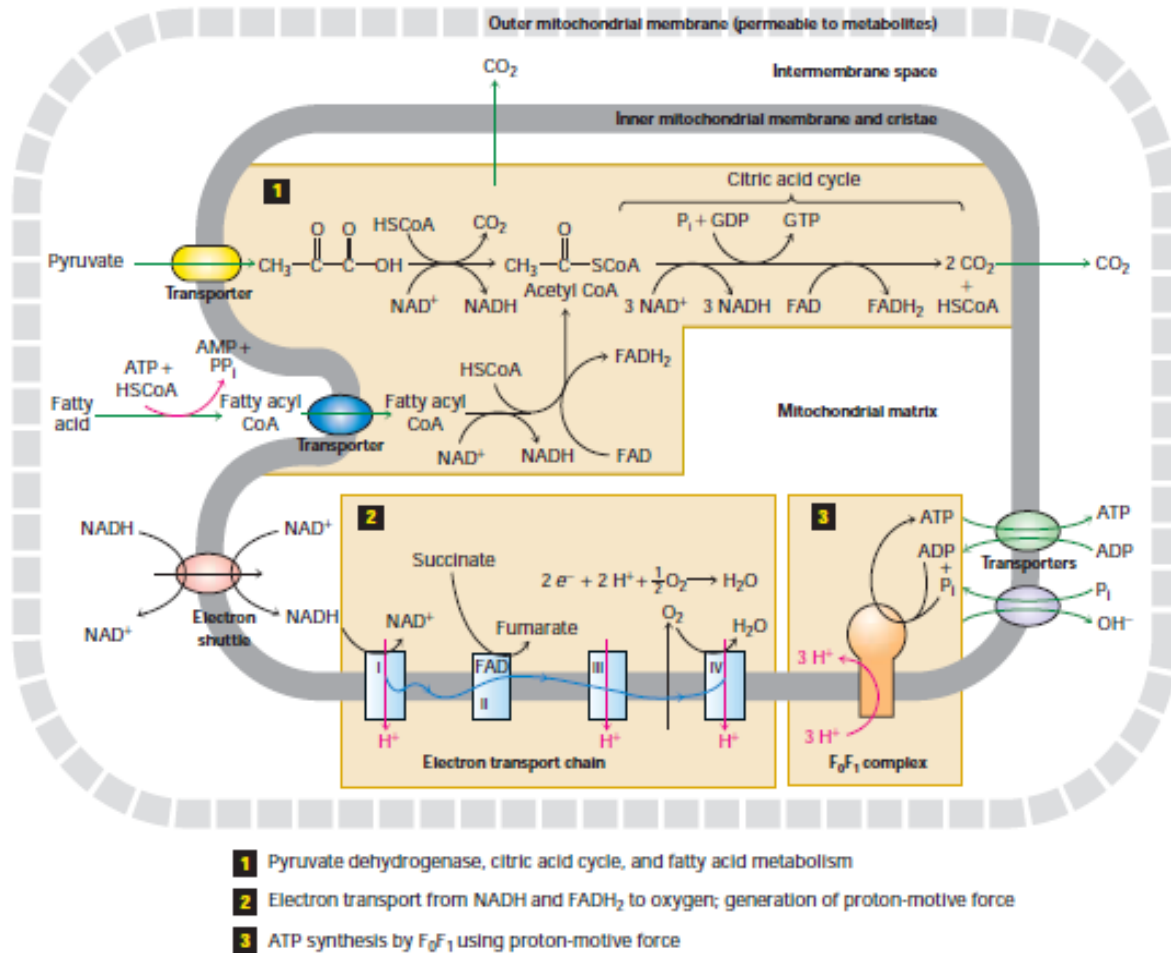
Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (αναπνοή)

Το τρίτο, και τελευταίο στάδιο της αναπνοής, αφορά την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Κεντρικός ρόλος είναι η παραγωγή του ATP. Η διεργασία αυτή πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου μέσω εξειδικευμένων μορίων που λειτουργούν ως δέκτες και δότες ηλεκτρονίων (συμπλέγματα πρωτεϊνών) στην παρακάτω εικόνα). Τα ηλεκτρόνια των NADH και FADH₂ από το δεύτερο στάδιο προχωρούν κατά μήκος της αλυσίδας από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο χάνοντας προοδευτικά ενέργεια. Έτσι, δημιουργείται μια βαθμίδωση ιόντων H⁺ που λειτουργεί ως πηγή ενέργειας για διάφορες αντιδράσεις που δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν με άλλο τρόπο. Η σημαντικότερη από αυτές είναι και η παραγωγή ATP. Στο τέλος της αλυσίδας τα ηλεκτρόνια περνούν σε μόρια δέκτες ηλεκτρονίων όπως είναι το οξυγόνο στην αερόβια αναπνοή. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων.



Σχήμα 2.4 Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων

Στο σχήμα παρακάτω φαίνεται συγκεντρωτικά η αερόβια αναπνοή μετά το στάδιο της γλυκόλυσης και πως συνδέονται τα μονοπάτια μεταξύ τους με σκοπό τη μέγιστη παραγωγή ATP και NADH. Στην διεργασία, όπως φαίνεται στο σχήμα, εμπλέκονται εκτός από το πυροσταφυλικό και τα λιπαρά οξέα προερχόμενα από άλλο καταβολικό μονοπάτι.



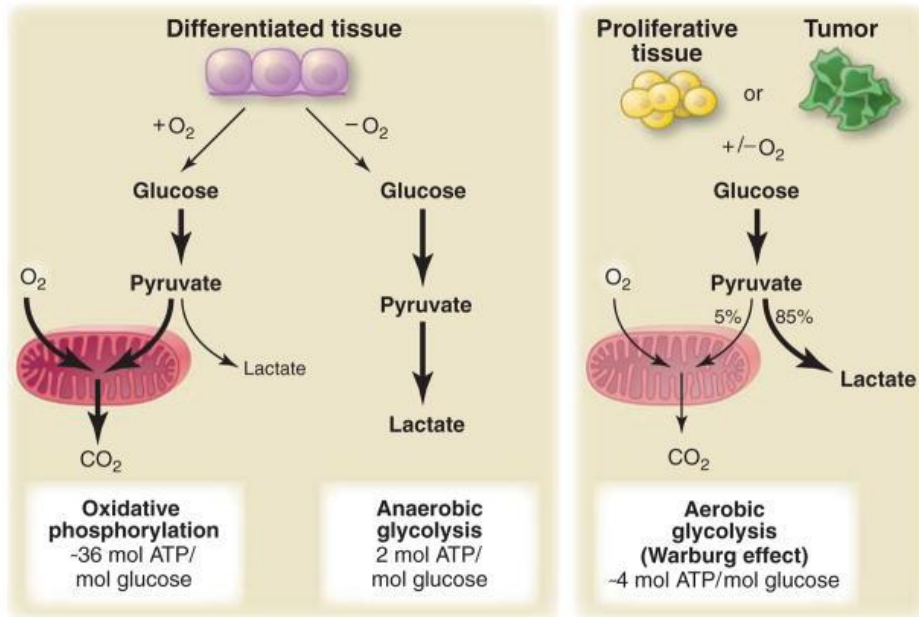
Σχήμα 2.5 Αερόβια αναπνοή (1) μεταβολισμός πυροσταφυλικού οξέος και λιπαρών οξέων, κύκλος του Krebs, (2) αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων από το NADH, FADH₂ στο οξυγόνο, (3) σύνθεση ATP από το σύμπλεγμα πρωτεϊνών FoF1

2.3 Καρκινικός μεταβολισμός και το φαινόμενο Warburg

Όπως παρουσιάστηκε παραπάνω, η κυτταρική αναπνοή εξασφαλίζει την απαραίτητη ενέργεια σε ένα κύτταρο για να επιβιώσει κάτω από τις διαφορετικές συνθήκες που μπορούν να προκύψουν. Οι ενεργειακές ανάγκες των κυττάρων διαφοροποιούνται κάτω από συνθήκες συντήρησης, πολλαπλασιασμού ή ανάπτυξης και κάθε φορά ο μεταβολισμός πρέπει να προσαρμόζεται ώστε να τις ικανοποιεί.

Μια ιδιαίτερη περίπτωση τροποποίησης του μεταβολισμού παρατηρείται στον καρκίνο. Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε αντίθεση όμως με τα φυσιολογικά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, που βασίζονται κυρίως στην οξειδωτική φωσφορυλίωση για την παραγωγή του ATP, τα καρκινικά στρέφονται προς την ανεπαρκή, ως προς την ποσότητα παραγωγής ATP, αερόβια γλυκόλυση. Έτσι, η γλυκόζη ζυμώνεται προς γαλακτικό οξύ με υπερέκφραση των γονιδίων της γλυκόλυσης.

Το φαινόμενο αυτό που παρατηρείται είτε παρουσία, είτε απουσία οξυγόνου, ονομάζεται 'φαινόμενο Warburg', από τον άνθρωπο που το παρατήρησε για πρώτη φορά, πριν από ενενήντα χρόνια, και αποτελεί τον πιο συχνό και τον πιο μελετημένο φαινότυπο στον καρκίνο. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η διαφοροποίηση των φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων όσον αφορά τη γλυκόλυση.



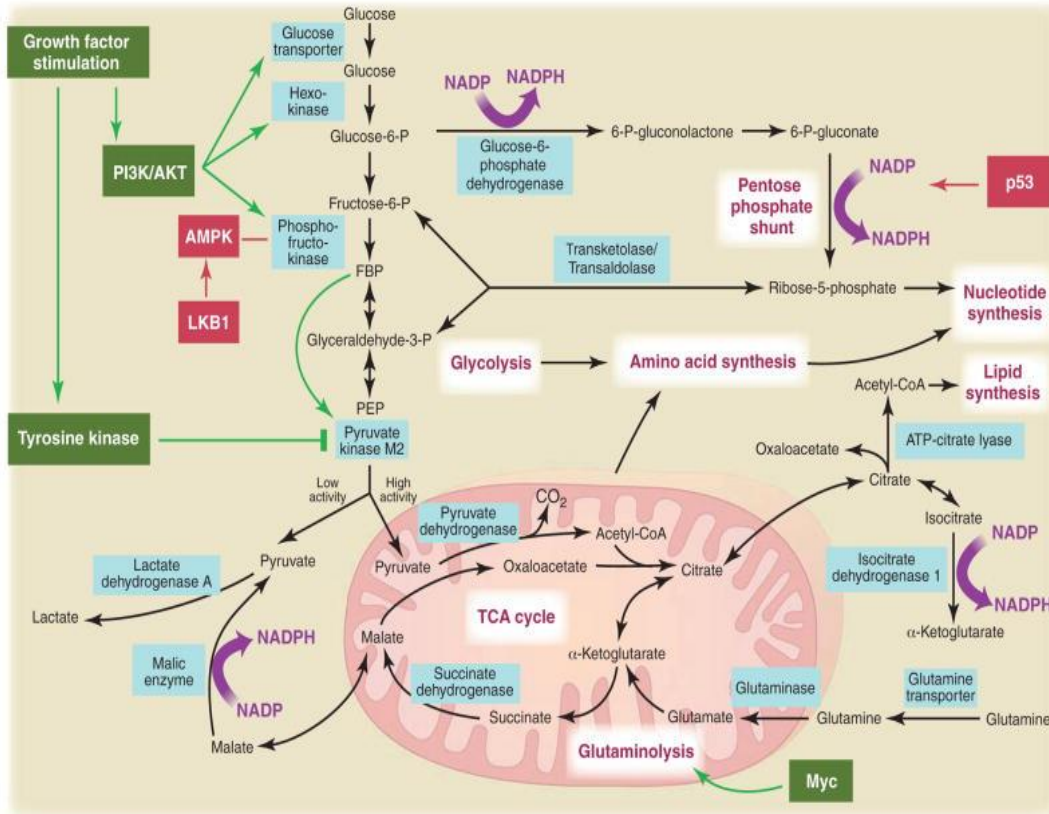
Σχήμα 2.6 Σύγκριση της γλυκόλυσης σε φυσιολογικά (differentiated) και πολλαπλασιαζόμενα (proliferative) ή καρκινικά (tumor) κύτταρα.

Όλα αυτά τα χρόνια έχουν γίνει αρκετές υποθέσεις σχετικά με τις αιτίες του φαινομένου αυτού κάποιες από τις οποίες είναι: 1) αλλοιώσεις στα μιτοχόνδρια που οδηγούν σε προβληματική οξειδωτική φωσφορυλίωση άρα και παραγωγή ενέργειας, 2) προτίμηση των καρκινικών κυττάρων σε αναερόβιες μεταβολικές οδούς λόγω συνθηκών υποξίας στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου, 3) στροφή στην

αερόβια γλυκόλυση με σκοπό την αποφυγή βλαβών στο DNA και την απόπτωση που προκαλούνται απ' την παραγωγή ελευθέρων ριζών στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, 4) προσαρμογή του μεταβολισμού στους γρήγορους ρυθμούς των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων με σκοπό τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας⁽²⁶⁾.

Ωστόσο, στον εικοστό πρώτο αιώνα με την ανάπτυξη της τεχνολογίας και την παροχή ολοένα και περισσότερο βιολογικών πληροφοριών τα ερωτήματα γύρω από την ανάπτυξη του συγκεκριμένου φαινοτύπου έχουν αλλάξει και οι διάφορες θεωρίες είτε έχουν κατατριφθεί είτε έχουν επεκταθεί⁽²⁷⁾. Πλέον, τίθεται το ζήτημα του αν το φαινόμενο προκαλείται από ή προκαλεί τον καρκίνο και η απάντηση είναι σημαντική καθώς καθορίζει και τον ανάλογο τρόπο αντιμετώπισης. Νέες έρευνες έχουν επεκτείνει τη μελέτη του καρκίνου εξετάζοντας τη σχέση των γονιδίων και του μεταβολισμού ανοίγοντας νέους δρόμους για την αντιμετώπιση της ασθένειας. Η μεγαλύτερη πρόκληση είναι να κατανοηθεί η ρύθμιση και έκφραση των γονιδίων και πως σχετίζεται με τα μεταβολικά και σηματοδοτικά μονοπάτια αφενός στα φυσιολογικά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και αφετέρου στα καρκινικά κύτταρα.

Για παράδειγμα, τα μεταβολικά μονοπάτια που είναι ενεργά κάτω από συνθήκες πολλαπλασιασμού ενός κυττάρου, ρυθμίζονται άμεσα από σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω γνωστών ογκογονιδίων και αναστολέων ογκογονιδίων. Το παρακάτω σχήμα απεικονίζει τη σχέση που έχουν τα μεταβολικά μονοπάτια της γλυκόλυσης, του κύκλου του Krebs, το μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης σε ένα πολλαπλασιαζόμενο κύτταρο. Σημεία κλειδιά των μονοπατιών αυτών αποτελούν ήδη στόχους για την αντιμετώπιση του καρκίνου⁽¹⁵⁾. Αυτό αποκαλύπτει το πόσο σημαντική είναι η αποσαφήνιση τέτοιου είδους σχέσεων ρύθμισης και μεταβολισμού για την ολοκληρωμένη έρευνα και αντιμετώπιση των ασθενειών.



Σχήμα 2.7 Επίδραση σηματοδοτικών μονοπατιών στα μεταβολικά μονοπάτια της γλυκόλυσης και του κύκλου του Krebs. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα ογκογονίδια ενώ με κόκκινο οι αναστολείς των ογκογονιδίων.

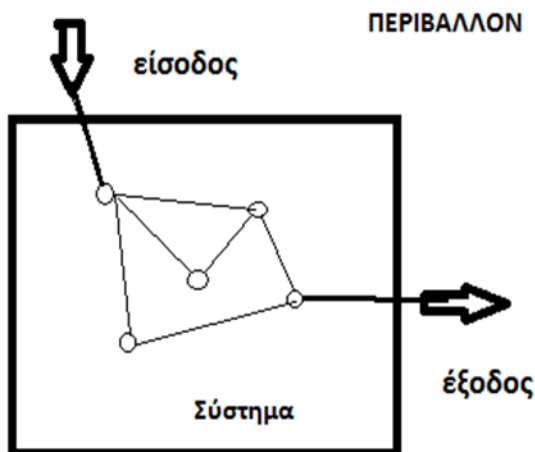
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ

3.1 Γενικά Στοιχεία Μεταβολικής Μοντελοποίησης

Η χρήση μοντέλων βοηθάει στη γενίκευση και τη δημιουργία αφηρημένων εννοιών που είναι και το ζητούμενο για την κατανόηση των ζωντανών συστημάτων. Τα μοντέλα θεωρούνται αναπόσπαστο στοιχείο της μεταβολικής μηχανικής και γενικότερα της επιστημονικής σκέψης καθώς προσφέρουν την καταλληλότερη βάση για συστημικές αναλύσεις.

Ένα σύστημα αποτελεί ένα δίκτυο στοιχείων που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, μέσω σχέσεων και ορίζουν ένα πολύπλοκα δομημένο σύνολο με συγκεκριμένα όρια. Μπορεί να είναι ανοικτό ή κλειστό ανάλογα με το αν αλληλεπιδρά με το περιβάλλον του. Κάποιες συνυφασμένες έννοιες με αυτή του συστήματος είναι η ευρωστία, οι αναδυόμενες ιδιότητες, ο μετασχηματισμός, η ανάδραση, ο σκοπός, η ομοιόσταση, η επικοινωνία, ο έλεγχος και η ιεραρχία. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται ένα απλό σύστημα.



Σχήμα 3.1 Αναπαράσταση ενός απλού συστήματος. Οι κύκλοι αποτελούν τους κόμβους του συστήματος και οι ακμές τις σχέσεις που τους ενώνουν.

Από τις έννοιες αυτές ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στις αναδυόμενες ιδιότητες (emergent properties) ενός συστήματος διότι αυτές καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την συμπεριφορά και κατ' επέκταση την ανάλυση του. Οι ιδιότητες αυτές δεν εξηγούνται άμεσα από τις επιμέρους ιδιότητες των στοιχείων αλλά προκύπτουν μέσω των πολύπλοκων σχέσεων τους. Έτσι, ένα σύστημα δεν είναι να δυνατόν να αναλυθεί εάν δεν μοντελοποιηθεί ώστε να μπορέσει να εξεταστεί ολιστικά.

Στη μεταβολική μηχανική το υπό εξέταση σύστημα είναι το μεταβολικό δίκτυο βιοχημικών αντιδράσεων ενός οργανισμού και η μοντελοποίηση του δικτύου αυτού οδηγεί στα Μεταβολικά Μοντέλα Γονιδιακής Κλίμακας (ΜΜΓΚ) (Genome-scale Network Reconstruction).

Τα μοντέλα αυτά στηρίζονται στο γονιδίωμα ενός οργανισμού και συγκεκριμένα στα γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό του. Έτσι, το χάσμα μεταξύ των γενετικών πληροφοριών και των μεταβολικών φαινοτύπων κλείνει μέσω ενός μοντέλου που αποτελεί ουσιαστικά μια βιοχημική, γενετική και γενομική βάση δεδομένων (BiGG Knowledge base).

Τα Μεταβολικά Μοντέλα Γονιδιακής Κλίμακας μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: τα Περιοριστικά Μοντέλα (ΠΜ) και τα Δυναμικά Μοντέλα (ΔΜ). Ο πιο συχνός τρόπος μοντελοποίησης είναι ο πρώτος λόγω της απλότητας και των παραδοχών που μπορούν να γίνουν χωρίς να επηρεάζεται η λειτουργικότητα του μοντέλου.

Το είδος της μοντελοποίησης (δυναμική ή περιοριστική) καθορίζεται από το πως θα περιγραφεί μαθηματικά το μεταβολικό δίκτυο. Η βασική διαφορά είναι η παράμετρος του χρόνου που εισάγει την έννοια της μεταβολής στο σύστημα και συνεπώς δημιουργεί μη γραμμικά φαινόμενα σε ένα δυναμικό μοντέλο. Παρακάτω, περιγράφεται η διαδικασία μοντελοποίησης σε γονιδιακή κλίμακα.

3.2 Διαδικασία Μοντελοποίησης Γονιδιακής Κλίμακας

Τα μεταβολικά μοντέλα μπορούν να κατασκευαστούν με δύο διαφορετικούς τρόπους ⁽¹⁰⁾: 1) ακολουθώντας μια από κάτω προς τα πάνω διαδικασία (bottom up approach) με βάση γονιδιωματικές

και βιβλιογραφικές πληροφορίες και 2) ακολουθώντας την αντίστροφη διαδικασία από πάνω προς τα κάτω (top down approach) με βάση την εξαγωγή μοντέλων από διάφορες προσεγγίσεις και δεδομένα από μεθόδους υψηλής τροφοδοσίας/απόδοσης (high throughput). Ο πρώτος τρόπος οδηγεί στα μεταβολικά μοντέλα γονιδιακής κλίμακας που είναι απολύτως λειτουργικά, σε σχέση με την δεύτερη περίπτωση όπου συνήθως τα μοντέλα υστερούν.

Συνολικά, η από κάτω προς τα πάνω διαδικασία κατασκευής αποτελείται από τέσσερα στάδια με επιμέρους βήματα το καθένα. Είναι επαναληπτική και χρονοβόρα διαρκώντας από έξι μήνες μέχρι και δύο χρόνια, απαιτώντας μια πληθώρα δεδομένων που πολλές φορές δεν είναι διαθέσιμα. Γενικά, όσο περισσότερες πληροφορίες για τη φυσιολογία, τη βιοχημεία και τη γενετική του οργανισμού είναι διαθέσιμες τόσο πιο αξιόπιστο θα είναι το μοντέλο.

Οι βάσεις δεδομένων που αξιοποιούνται σε ολόκληρη τη διαδικασία μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις γενικές κατηγορίες:

- 1.Βιοχημεία.** Πληροφορίες από εργαστηριακά πειράματα για την ύπαρξη και λειτουργία ενός ενζύμου σε έναν οργανισμό.
- 2.Γενομική.** Συσχετισμοί του γονιδιώματος ενός οργανισμού με τις λειτουργίες που επιτελεί.
- 3.Φυσιολογία.** Δομικές και λειτουργικές πληροφορίες.
- 4.In silico δεδομένα.** Δεδομένα που έχουν προκύψει από τις in silico αναλύσεις και μαρτυρούν κενά του δικτύου που πρέπει να καλυφθούν.

Τα τέσσερα στάδια είναι τα εξής:

1. Δημιουργία προσχεδίου (draft reconstruction)
2. Μη αυτοματοποιημένη (χειροκίνητη) βελτίωση του προσχεδίου (manual refinement of reconstruction)
3. Μετατροπή του προσχεδίου σε μαθηματική/υπολογιστική μορφή (model conversion into computable format)
4. Αξιολόγηση του μοντέλου (network evaluation)

ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΑΔΙΩΝ

Το πρώτο αφορά την κατασκευή ενός προσχεδίου βασιζόμενο σε γονιδιακές και βιοχημικές βάσεις δεδομένων. Αποτελεί μια αρχική συλλογή υποψήφιων μεταβολικών λειτουργιών του οργανισμού που προκύπτουν άμεσα με το γονιδίωμα του. Μπορεί να αυτοματοποιηθεί μερικώς με κατάλληλα υπολογιστικά εργαλεία, μα δεν μπορεί να αντικατασταθεί εξ' ολοκλήρου από μια αυτοματοποιημένη διαδικασία καθώς απαιτείται η ανθρώπινη κρίση για την έγκυρη επιλογή και συλλογή των δεδομένων.

Το δεύτερο στάδιο είναι αυτό που απαιτεί τη μεγαλύτερη ακρίβεια καθώς το δίκτυο παίρνει την τελική του μορφή. Αν δεν είναι έγκυρη τότε ακυρώνεται η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου. Έτσι, επανεξετάζονται τα δεδομένα του πρώτου, προστίθενται καινούργια και συντίθενται ένα ολοκληρωμένο μεταβολικό δίκτυο. Οι πληροφορίες που αξιοποιούνται προέρχονται εκτός από τις βάσεις δεδομένων, από τη βιβλιογραφία και τις πειραματικές μετρήσεις. Αφορούν, πιο συγκεκριμένα δεδομένα, όπως τον τύπο των αντιδράσεων και το χώρο στον οποίο πραγματοποιούνται, τις συνθήκες κάτω από τις οποίες αυτές είναι εφικτές (στοιχειομετρία, pH, υποστρώματα, ενέργεια Gibbs κ.α.), τις σχέσεις γονιδίων-αντιδράσεων (GPR associations), κ.α. Δύο από τις σημαντικότερες αντιδράσεις που καθορίζονται εδώ είναι αυτή της βιομάζας (biomass reaction) και των ενεργειακών απαιτήσεων ενός κυττάρου τόσο για την ανάπτυξη (Growth-associated ATP maintenance reaction-GAM) όσο και για τη συντήρηση του (Non-GAM reactions).

Το τρίτο αφορά τη μαθηματική αναπαράσταση του δικτύου και τον καθορισμό των ορίων του συστήματος που αυτό αντιπροσωπεύει. Αυτό το στάδιο είναι κυρίως αυτοματοποιημένο και καθορίζει το είδος της μοντελοποίησης που ακολουθείται καθώς η μαθηματική περιγραφή συνδέεται άμεσα με το σύστημα που εξετάζεται και τους σκοπούς της ανάλυσης. Συγκεκριμένα, αυτό το στάδιο μπορεί να οδηγήσει είτε σε περιοριστικά μοντέλα, είτε σε δυναμικά μοντέλα .

Στο τέταρτο και τελευταίο στάδιο γίνεται αξιολόγηση του μοντέλου *in silico* για τυχόν κενά που μπορεί να παρουσιάζει. Εάν υπάρχουν, καλύπτονται μέσω μιας επαναληπτικής διαδικασίας των τριών τελευταίων σταδίων. Τα πιο κρίσιμα ζητούμενα για να λήξει η επαναληπτική διαδικασία και να θεωρηθεί ολοκληρωμένο το μοντέλο, είναι να μπορεί να αναπαραχθεί και να επιβεβαιώνει τους φαινοτύπους που έχουν αποδειχθεί πειραματικά κάτω από διάφορες συνθήκες.

Σε ένα πέμπτο στάδιο, εάν το μοντέλο ανταποκρίνεται με επιτυχία σε όλα τα παραπάνω, τότε μπορεί να λειτουργήσει και ως προβλεπτικό εργαλείο.

Όλα τα στάδια παρουσιάζουν τις δυσκολίες και τους περιορισμούς τους, γεγονός που επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα. Μία σημαντική μέριμνα είναι η χρήση αξιόπιστων βάσεων δεδομένων και δη της γονιδιακής καθώς η κατασκευή ξεκινά από το γονιδίωμα κάθε οργανισμού. Οι σημαντικότερες αδυναμίες αφορούν την έλλειψη συγκεκριμένων βιολογικών δεδομένων των οργανισμών και μιας καθολικής, πρότυπης διαδικασίας κατασκευής που μπορεί να αυτοματοποιηθεί για να καλύψει τις ανάγκες μιας ραγδαίας αύξησης των γονιδιωμάτων που γίνονται γνωστά.

3.3 Μαθηματική αναπαράσταση μεταβολικών μοντέλων γονιδιακής κλίμακας

Η αναπαράσταση ενός συστήματος με μαθηματικούς φορμαλισμούς οδηγεί στα μαθηματικά/υπολογιστικά μοντέλα. Επιτρέπει την ακριβή και ξεκάθαρη ανάλυση τους μέσω της αναγωγής των μαθηματικών ιδιοτήτων συστημικές ιδιότητες και αντίστροφα.

Συγκεκριμένα, η μεταβολική μοντελοποίηση βασίζεται στην αναπαράσταση του δικτύου με τη μορφή ενός στοιχειομετρικού πίνακα S , την μετατροπή των βιολογικών περιορισμών, όπως η αρχή διατήρησης της μάζας, σε εξισώσεις και ανισότητες και τη λύση του συστήματος εξισώσεων που προκύπτει τελικά από τη σύνθεση των παραπάνω σε ένα μαθηματικό πρόβλημα. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων βασίζεται στην αναγωγή των μαθηματικών ιδιοτήτων του πίνακα σε βιοχημικές/βιολογικές ιδιότητες του δικτύου.

Παρακάτω παρουσιάζεται η δομή αυτή του πίνακα και οι ιδιότητες του. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι παρακάτω μαθηματικοί φορμαλισμοί χρησιμοποιούνται κατά κανόνα στην κατασκευή περιοριστικών μοντέλων. Ενώ ισχύουν για τα δυναμικά μοντέλα, η περιγραφή τους είναι μία περίπλοκη διαδικασία που πολλές φορές θέλει μια διαφορετική προσέγγιση από αυτή του στοιχειομετρικού πίνακα ή τουλάχιστον μία επέκταση της ώστε να συμπεριλαμβάνει και τις αμέτρητες παραμέτρους που καθορίζουν τη συμπεριφορά ενός δυναμικού μοντέλου.

Διαστάσεις S

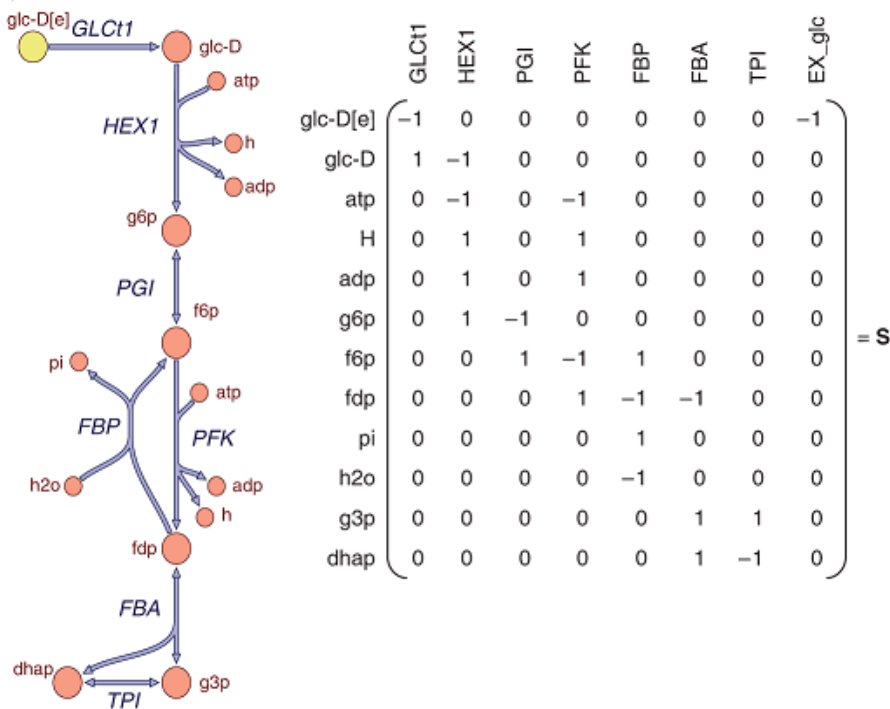
Ο S, έχει διαστάσεις $m \times n$ όπου m οι μεταβολίτες και n οι αντιδράσεις του δικτύου. Κάθε γραμμή του πίνακα παριστάνει ένα μεταβολίτη και κάθε στήλη μία αντίδραση. Τα στοιχεία του πίνακα είναι οι στοιχειομετρικοί συντελεστές των μεταβολιτών της κάθε αντίδρασης που λαμβάνει μέρος στο δίκτυο. Είναι αρνητικοί για τα αντιδρώντα, θετικοί για τα προϊόντα και μηδενικοί για οποιονδήποτε μεταβολίτη δε συμμετέχει σε μια αντίδραση.

Οι ροές των αντιδράσεων του δικτύου παριστάνονται με ένα διάνυσμα v , μεγέθους n , ενώ οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών με ένα διάνυσμα x , μεγέθους m . Έτσι τα διανύσματα έχουν διαστάσεις:

$$\dim(x) = m \quad \dim(v) = n \quad \text{και} \quad \dim(S) = m \times n$$

Για ένα τυπικό μεταβολικό δίκτυο οι αντιδράσεις είναι περισσότερες από τους μεταβολίτες, δηλαδή $n > m$. Τότε ο πίνακας S είναι ανεπαρκούς τάξης και ισχύει $\text{Rank}(s) = r < m$.

Παρακάτω παρουσιάζεται η μετατροπή ενός απλού δικτύου σε πίνακα.



Σχήμα 3.2. Ο στοιχειομετρικός πίνακας S που προκύπτει από το μονοπάτι της γλυκόλυσης.

Ο S και τα ισοζύγια μάζας

Το μεγαλύτερο μέρος μιας *in silico* ανάλυσης βασίζεται στην εφαρμογή ισοζυγίων μάζας για κάθε μεταβολίτη. Τα ισοζύγια οδηγούν σε ένα σύστημα εξισώσεων η λύση του οποίου δίνει τις μεταβολικές ροές.

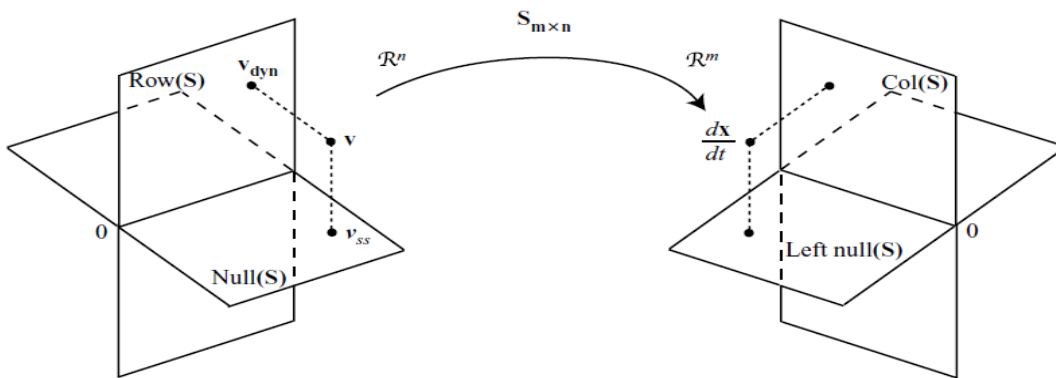
Κάθε σύστημα εξισώσεων μπορεί να αναπαρασταθεί με τη χρήση πινάκων και με τη σειρά τους οι πίνακες μπορούν να αποτελέσουν ένα γραμμικό μετασχηματισμό ανάμεσα σε δύο διανυσματικούς χώρους. Οι αναπαραστάσεις αυτές είναι σημαντικές διότι διευκολύνουν την επίλυση του συστήματος και συνεπώς την ανάλυση του μεταβολικού μοντέλου.

Παρακάτω παρουσιάζεται πως τα ισοζύγια μάζας συνδέονται με τον S ως γραμμικό μετασχηματισμό και τους τέσσερις γνωστούς υπόχωρους του.

Ο S ως γραμμικός μετασχηματισμός

Ο S μπορεί να θεωρηθεί ως ένας γραμμικός μετασχηματισμός του διανύσματος $v(x,k) = (v_1(x,k), v_2(x,k), \dots)$, που αντιπροσωπεύει τις ροές του δικτύου σε ένα διάνυσμα $x(t) = (x_1(t), x_2(t), \dots)$, που αντιπροσωπεύει τις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών. Ο γραμμικός μετασχηματισμός αφορά τους υπόχωρους του πίνακα S που θα παρουσιαστούν παρακάτω. Ισχύει :

$$\frac{dx(t)}{dt} = S * v(x, k) \quad (3.3.1)$$



Σχήμα 3.3 Ο πίνακας S ως γραμμικός μετασχηματισμός και οι τέσσερις θεμελιώδεις υπόχωροι (γραμμών, στηλών, μηδενόχωρος, αριστερός μηδενόχωρος).

Η εξίσωση (1) αναπαριστά το θεμελιώδες ισοζύγιο μάζας που χαρακτηρίζει όλες τις λειτουργικές καταστάσεις ενός μεταβολικού δικτύου. Αφορά τη δυναμική κατάσταση του δικτύου, καθώς αφενός εμπεριέχει την μεταβολή των συγκεντρώσεων με το χρόνο (αριστερό μέλος) και αφετέρου την εξάρτηση των ροών από τις συγκεντρώσεις και τις κινητικές παραμέτρους (δεξί μέλος). Για κάθε μεταβολίτη ξεχωριστά γράφεται:

$$\frac{dx_i(t)}{dt} = \sum s_i * v_i(x_i, k_i) \quad (3.3.2)$$

όπου Σ είναι το άθροισμα όλων εκείνων των ροών που δημιουργούν και αποσυνθέτουν τον μεταβολίτη i στο χρονικό διάστημα dt . Η εφαρμογή της (2) για όλους τους μεταβολίτες ξεχωριστά οδηγεί στο μη γραμμικό σύστημα εξισώσεων που περιγράφει ένα δυναμικό μοντέλο.

Για να επιλυθεί το σύστημα (2) είναι απαραίτητη η γνώση κινητικών παραμέτρων οι οποίες πολλές φορές είναι άγνωστες και έτσι είναι αναγκαίες κάποιες ρεαλιστικές παραδοχές. Στα μεταβολικά δίκτυα, μία τέτοια παραδοχή είναι η υπόθεση της σταθερής κατάστασης η οποία τελικά μετατρέπει το δυναμικό σε περιοριστικό μοντέλο.

Η παραδοχή της σταθερής κατάστασης επιβάλλει στις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών $x_i(t)$, να μην αλλάζουν με το χρόνο. Είναι λογική λόγω των πολύ μεγάλων διαφορών στους χρόνους αντίδρασης των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων και των μεταβολών στους κυτταρικούς φαινοτύπους όπως είναι η κυτταρική ανάπτυξη. Έτσι, η σχέση (1) γίνεται:

$$S * v = 0 \quad (3.3.3)$$

Από την (3) προκύπτει ένα γραμμικό σύστημα εξισώσεων η λύση του οποίου είναι πιο απλή καθώς δεν υπάρχει η παράμετρος του χρόνου άρα και η ανάγκη χρήσης των κινητικών παραμέτρων. Το σύστημα αυτό, που περιγράφει ένα περιοριστικό μοντέλο, μπορεί να είναι πλήρως ορισμένο (determined), υπερ-ορισμένο (overdetermined) ή υπό-ορισμένο (underdetermined).

Στα βιολογικά συστήματα είναι σχεδόν πάντα υπο-ορισμένο (underdetermined system) διότι δεν υπάρχουν αρκετές μετρημένες πειραματικά εξωτερικές ροές και έτσι οι εξισώσεις είναι λιγότερες απ' ότι οι άγνωστοι. Αυτό το σύστημα που έχει πολλούς βαθμούς ελευθερίας για να λυθεί χρησιμοποιούνται

υπολογιστικές μέθοδοι ανάλυσης υπό περιορισμούς όπως θα φανεί παρακάτω.

Υπόχωροι πίνακα

Από τον πίνακα S που ορίζει ένα σύνολο διανυσμάτων δηλαδή ένα διανυσματικό χώρο, προκύπτουν τέσσερις θεμελιώδεις υπόχωροι. Για να οριστεί ένας υπόχωρος είτε πρέπει να είναι γνωστό ένα σύνολο διανυσμάτων που τον παράγουν, είτε κάποιες συνθήκες που πρέπει να ικανοποιούν τα διανύσματα που βρίσκονται μέσα σε αυτόν.

Το θεμελιώδες ισοζύγιο μάζας που παρουσιάστηκε παραπάνω αποτελεί μία συνθήκη που συνδέεται άρρηκτα με τους υπόχωρους ενός πίνακα. Μάλιστα, ο γραμμικός μετασχηματισμός παράγει τους υπόχωρους του πίνακα με αποτέλεσμα να συσχετίζει δυναμικές και σταθερές καταστάσεις όπως θα φανεί παρακάτω ⁽²⁰⁾. Οι τέσσερις υπόχωροι είναι:

Χώρος Στηλών (Column Space). Προκύπτει από το σύνολο των διανυσμάτων που ορίζουν οι στήλες του πίνακα S και έχει διαστάσεις $\dim(\text{Col}(S))=r$. Περιέχει όλες τις πιθανές χρονικές παραγώγους του διανύσματος των συγκεντρώσεων $x(t)$, (dx/dt) , και δείχνει τις θερμοδυναμικές επιρροές στις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών του δικτύου (concentration states of the network).

Χώρος Γραμμών (Row Space). Προκύπτει από το σύνολο των διανυσμάτων που ορίζουν οι γραμμές του S και έχει διαστάσεις $\dim(\text{Row}(S))=r$. Περιέχει τα διανύσματα των ροών $v(x,k)$ δηλαδή όλες τις δυναμικές κατανομές ροών των αντιδράσεων και δείχνει τις θερμοδυναμικές επιρροές στο ρυθμό των αντιδράσεων.

Μηδενόχωρος (Null Space). Προκύπτει από τη συνθήκη $S*v=0$ που ορίζει ένα ομογενές σύστημα εξισώσεων, οι λύσεις του οποίου αποτελούν τον υπόχωρο $\dim(\text{Null}(S))=n-r$. Στα μεταβολικά συστήματα η συνθήκη αυτή αντιπροσωπεύει τη σταθερή κατάσταση και έτσι δίνει το σύνολο των κατανομών των ροών υπό σταθερή κατάσταση.

Αριστερός μηδενόχωρος (Left Null). Προκύπτει από τη συνθήκη $L*S=0$ και έχει διαστάσεις $\dim(\text{LeftNull}(S))=m-r$. Περιγράφει όλες τις σχέσεις συντήρησης (μεταβλητές που δεν αλλάζουν με το χρόνο) σε ένα μεταβολικό δίκτυο, για παράδειγμα το άθροισμα των μεταβολιτών που δεν αλλάζουν με

το χρόνο.

Από τα παραπάνω συνάγεται ότι οι δύο πρώτοι υπόχωροι αφορούν συστήματα αφενός σε μη σταθερή κατάσταση και αφετέρου σε μη θερμοδυναμική ισορροπία (δυναμικά συστήματα). Η ανάλυση τους απαιτεί τη γνώση κινητικών παραμέτρων και είναι πολύπλοκη σε μεγάλης κλίμακας μεταβολικά δίκτυα. Αντίθετα, οι δύο τελευταίοι αναφέρονται στην σταθερή κατάσταση και η ανάλυση τους είναι πιο απλή.

Μέχρι στιγμής, λόγω της απλότητας, η ανάλυση των υπόχωρων ενός πίνακα έχει περιοριστεί σε αυτούς που αναφέρονται σε σταθερές καταστάσεις. Αν και δυναμικές προσομοιώσεις έχουν υπάρξει αρκετές, ακόμα δεν έχει εδραιωθεί η σχέση τους και η ανάλυση τους μέσω των υπόχωρων. Ωστόσο, εάν λαμβάνονταν υπόψη το γεγονός ότι οι υπόχωροι προκύπτουν ο ένας από τον άλλο (σχήμα 3.3) και δεν υπάρχουν ξεχωριστά τότε οι αναλύσεις θα μπορούσαν να εξελιχθούν ακόμα περισσότερο ⁽²⁰⁾.

Συμπερασματικά, ο κάθε υπόχωρος παρέχει διαφορετικές πληροφορίες για ένα μεταβολικό δίκτυο και μόνο η ανάλυση όλων των υπόχωρων συνδυαστικά μπορεί να οδηγήσει σε πιο ρεαλιστικές προσομοιώσεις. Τα φυσικά συστήματα μπορούν να απλοποιηθούν μέσα από μία σειρά παραδοχών μα δεν μπορεί να αγνοηθεί η περιπλοκότητα της φύσης και ο δυναμικός χαρακτήρας τους. Έτσι, η ανάλυση μέσω του πίνακα S και των ιδιοτήτων των υπόχωρων του, προσφέρουν μία σημαντική βάση διερεύνησης της συμπεριφοράς του συστήματος.

Γραμμική εξάρτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Μία σημαντική έννοια που σχετίζεται με τον πίνακα S και συνεπώς με τους διανυσματικούς υπόχωρους είναι η γραμμική εξάρτηση. Γραμμικά εξαρτημένα διανύσματα ονομάζονται αυτά που προκύπτουν ως γραμμικός συνδυασμός άλλων διανυσμάτων. Δεν μεγαλώνουν τον διανυσματικό χώρο με αποτέλεσμα να είναι περιττά. Αντίστοιχα, γραμμικά εξαρτημένο είναι ένα σύστημα οι εξισώσεις του οποίου προκύπτουν από άλλες και έτσι δεν προσφέρουν κάποιον επιπλέον περιορισμό.

Ο εντοπισμός των γραμμικά εξαρτημένων διανυσμάτων ή εξισώσεων και η αφαίρεση τους από το σύστημα έχει τεράστια σημασία, τόσο μαθηματική όσο και βιολογική. Αφενός, από τη μαθηματική σκοπιά το πρόβλημα απλουστεύεται γιατί μειώνονται οι εξισώσεις και ο χώρος των λύσεων διευκολύνοντας τους υπολογισμούς και την ανάλυση. Αφετέρου, από βιολογικής σκοπιάς η εξάλειψη της γραμμικής εξάρτησης οδηγεί σε ένα απλουστευμένο μεταβολικό δίκτυο του οποίου οι σχέσεις

μπορούν να αναδειχθούν και να ερμηνευτούν πιο εύκολα.

Ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο για την απλούστευση της ερμηνείας των αποτελεσμάτων, αλλά και για την κάλυψη όλου του χώρου λύσεων και όχι μόνο μίας βέλτιστης ή άλλης λύσης, είναι η επιλογή της βάσης του διανυσματικού χώρου και των υποχώρων του. Μια κατάλληλη βάση αποτελείται από ένα σύνολο γραμμικά ανεξάρτητων διανυσμάτων και περιγράφει όλο το χώρο αποκαλύπτοντας σημαντικά βιολογικά στοιχεία όπως τις τοπολογικές ιδιότητες ενός δικτύου. Για γραμμικούς χώρους συνηθέστερες βάσεις είναι οι γραμμικές/ορθοκανονικές και μία χαρακτηριστική μέθοδος εύρεσης είναι η ανάλυση πίνακα σε ιδιάζουσες τιμές (Singular Value Decomposition).

Μορφές του S

Ο πίνακας μπορεί να πάρει διάφορες μορφές εξυπηρετώντας κάθε φορά το ζητούμενο του προβλήματος και τα όρια που επιβάλλει αυτό στο σύστημα.

Τα όρια αυτά δημιουργούν νοητά ένα εσωτερικό και ένα εξωτερικό χώρο στο κύτταρο και τα μέρη του, χωρίζοντας αντίστοιχα και τις αντιδράσεις σε εσωτερικές που συμβολίζονται με το διάνυσμα v_i και εξωτερικές, b_i . Όμοια και για τους μεταβολίτες όπου x_i , το διάνυσμα των εσωτερικών και c_i , των εξωτερικών. Έτσι, προκύπτει ο συνολικός στοιχειομετρικός πίνακας S.

$$S_{\text{tot}} : \begin{pmatrix} & v_i & b_i \\ x_i & & | \\ \text{---} & \text{---} & \text{---} \\ c_i & \mathbf{0} & | \end{pmatrix}$$

Σχήμα 3.4 Ο συνολικός στοιχειομετρικός πίνακας.

Από το συνολικό πίνακα ανάλογα με το ζητούμενο μπορούμε να πάρουμε κάποιους υποπίνακες. Ο ένας από αυτούς απομονώνει τις εξωτερικές ροές και ο άλλος τις εσωτερικές, όπως φαίνεται στο παρακάτω

σχήμα.

$$S_{\text{exch}} : x_j \begin{pmatrix} v_j & b_j \\ & | \\ & | \\ & | \end{pmatrix} \quad S_{\text{int}} : x_j \begin{pmatrix} v_j \\ & \\ & \\ & \end{pmatrix}$$

Σχήμα 3.5 Ο εξωτερικός S_{exch} και ο εσωτερικός πίνακας S_{int} .

Ακόμα μια χρήσιμη μορφή του πίνακα, που διευκολύνει την εύρεση των τοπολογικών ιδιοτήτων του, είναι η δυαδική μορφή (binary form). Ο S παίρνει τη καινούργια μορφή S' , για τα στοιχεία του οποίου ισχύει:

$$s'_{ij}=0 \text{ if } s_{ij}=0$$

$$s'_{ij}=1 \text{ if } s_{ij} \neq 0$$

Έτσι ο πίνακας S' , αποτελείται μόνο από μηδέν και ένα. Εάν το στοιχείο s'_{ij} είναι μονάδα τότε σημαίνει ότι ο μεταβολίτης i λαμβάνει μέρος στην αντίδραση j .

Ο S ως πίνακας σύνδεσης ενός γραφήματος

Κάθε δίκτυο αναπαριστάται με ένα γράφημα που αποτελείται από κόμβους και συνδέσεις μεταξύ των κόμβων. Στο μεταβολικό δίκτυο οι κόμβοι είναι οι μεταβολίτες και οι σχέσεις οι αντιδράσεις. Αντίστοιχα, στον πίνακα οι αντιδράσεις αποτελούν τις στήλες και οι μεταβολίτες τις γραμμές. Έτσι, ο πίνακας S αναπαριστά και αυτός το ίδιο γράφημα, που ονομάζεται χάρτης αντιδράσεων και λειτουργεί ως πίνακας σύνδεσης του χάρτη αυτού.

Δύο αριθμοί που αποτελούν βασικά τοπολογικά χαρακτηριστικά του πίνακα S , είναι ο αριθμός συμμετοχής (participation number) μιας αντίδρασης και ο αριθμός συνδεσιμότητας (connectivity number) ενός μεταβολίτη. Για να υπολογιστούν πρέπει ο πίνακας S να βρίσκεται σε δυαδική μορφή.

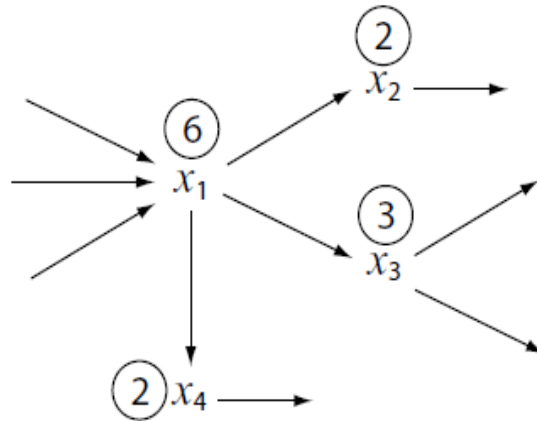
Ο αριθμός συμμετοχής, ορίζει σχέσεις μεταβολιτών σε μία αντίδραση και αποτελεί το άθροισμα όλων των μη μηδενικών στοιχείων μιας στήλης του πίνακα. Ορίζεται ως

$$\pi_j = \sum s_{ij} \quad (3.3.4)$$

ενώ ο αριθμός συνδεσιμότητας, ορίζει σχέσεις αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχει ένας μεταβολίτης και αποτελεί το άθροισμα των μη μηδενικών στοιχείων μιας γραμμής. Ορίζεται ως

$$\rho_i = \sum s_{ij} \quad (3.3.5)$$

Στο σχήμα παρακάτω φαίνεται ένα απλό παράδειγμα συνδεσιμότητας των κόμβων σε ένα δίκτυο.



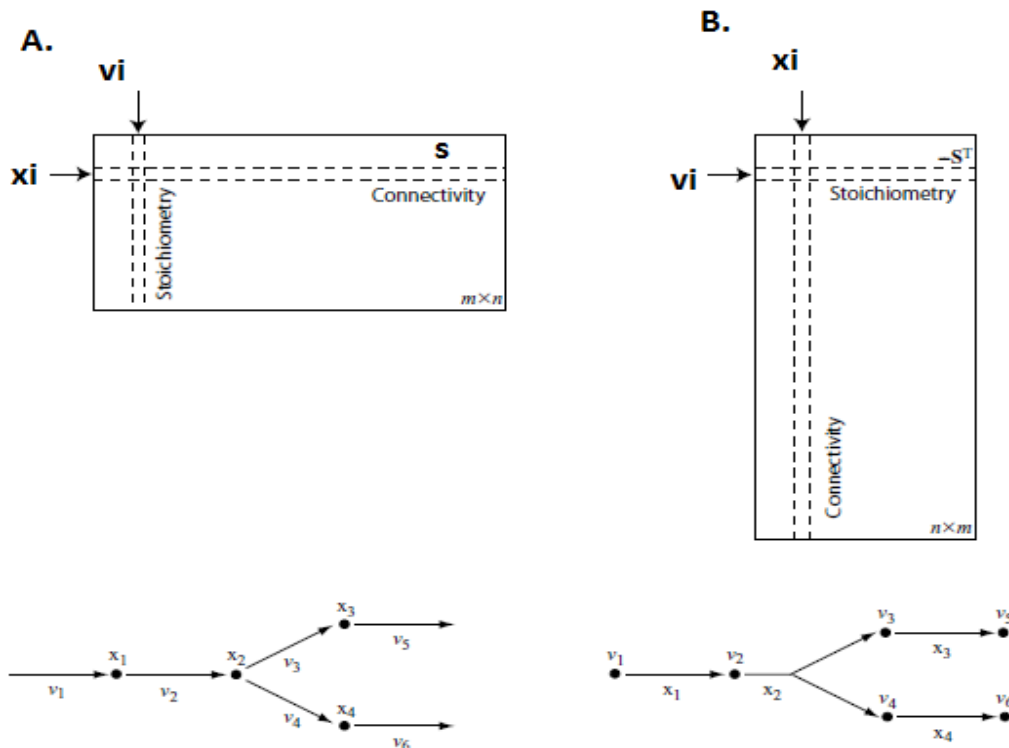
Σχήμα 3.6 Ένα απλό δίκτυο όπου παρουσιάζονται οι σχέσεις των κόμβων του δικτύου. Πάνω από κάθε κόμβο απεικονίζεται ο αριθμός συνδεσιμότητας.

Η φύση των συνδέσεων που ορίζουν οι δύο παραπάνω σχέσεις είναι διαφορετική. Ο αριθμός συμμετοχής ορίζει δεσμευτικές συνδέσεις (hard connections), ενώ ο αριθμός συνδεσιμότητας χαλαρές

συνδέσεις (soft connections). Οι συνδέσεις του πρώτου τύπου είναι αναγκαίες και μη διαπραγματεύσιμες ενώ του δεύτερου το αντίθετο. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι δεν μπορεί να συμβεί μια αντίδραση χωρίς να συμμετέχουν όλοι οι μεταβολίτες της, ενώ μπορεί ένας μεταβολίτης να μη συμμετέχει ταυτόχρονα σε όλες τις αντιδράσεις με τις οποίες συνδέεται.

Οι παραπάνω σχέσεις είναι σημαντικές γιατί αποκαλύπτουν στοιχεία για τη φύση των μεταβολιτών ενός δικτύου. Για παράδειγμα ένας μεταβολίτης με υψηλή συνδεσιμότητα ίσως επηρεάζει περισσότερο τους φαινοτύπους ενός οργανισμού, καθώς συμμετέχει σε μία πληθώρα αντιδράσεων και έτσι μπορεί να αποτελέσει στόχο για την έρευνα φαρμάκων σε παθολογικές καταστάσεις. Ωστόσο, οι σχέσεις αυτές θα πρέπει πάντα να εξετάζονται σε συνάρτηση με τους επιτρεπτούς φαινοτύπους και να υπακούουν στη βιολογία του οργανισμού.

Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ο πίνακας S και ο ανάστροφός του καθώς και πως συνδέονται μεταβολίτες και αντιδράσεις. Ο ανάστροφος του πίνακα S παρόλο που χρησιμοποιείται σπανιότερα αναδεικνύει ανάλογες σχέσεις με αυτές του S .



Σχήμα 3.7 Ο πίνακας S και ο αντίστροφος του, ως πίνακες συνδεσιμότητας (α) στον πίνακα S φαίνεται

πως οι αντιδράσεις συνδέουν τους μεταβολίτες και (β) στον αντίστροφο $-S^T$ φαίνεται πώς οι μεταβολίτες συνδέουν τις αντιδράσεις.

3.4 Ανασκόπηση μεταβολικών γονιδιωματικών μοντέλων ανθρωπίνων κυττάρων

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω ο μεταβολισμός αποτελεί ένα σημαντικό σημείο αναφοράς σε σχέση με την υγεία ενός οργανισμού. Η σύνδεση του με πολλές ανθρώπινες ασθένειες, όπως ο διαβήτης, ο καρκίνος, τα αυτοάνοσα κ.α. οδήγησε στην κατασκευή ανθρωπίνων κυτταρικών μοντέλων για την καλύτερη ανάλυση και τη στοχευμένη παραγωγή φαρμάκων για θεραπεία.

Μέχρι στιγμής έχουν κατασκευαστεί διάφορα μεταβολικά μοντέλα των ανθρωπίνων κυττάρων⁽¹¹⁾. Τρία από αυτά αναπαριστούν τον μεταβολισμό γενικά σε οποιοδήποτε κύτταρο (global reconstructions). Τα πρώτα που δημοσιεύτηκαν ήταν το Recon1 και το EHMN (Edinburgh Human Metabolic Network), ενώ ακολούθησε το Recon2. Εκτός από τα γενικά έχουν κατασκευαστεί και μεταβολικά μοντέλα συγκεκριμένων κυττάρων όπως τα ηπατοκύτταρα (Hepatonet1 κ.α.), τα εντεροκύτταρα του λεπτού εντέρου, τα μακροφάγα, τα νεφρικά κ.α. Επίσης, συγκεκριμένα υπό-μοντέλα που συνδυάζουν μια πληθώρα πειραματικών ομικών δεδομένων (omics data) έχουν προκύψει αυτόματα από το Recon1, ενώ ημι-αυτόματα έχουν προκύψει για άλλα θηλαστικά όπως είναι το ποντίκι.

Ο σκοπός της μεταβολικής μοντελοποίησης είναι η συνεχής εξέλιξη των μοντέλων, είτε σε γενικό είτε σε συγκεκριμένο επίπεδο, η αξιοποίηση όλων των βιολογικών πληροφοριών που προκύπτουν έτσι ώστε τελικά τα μοντέλα να μπορούν να είναι αξιόπιστα προβλεπτικά εργαλεία. Το πιο εξελιγμένο γενικό μεταβολικό μοντέλο, είναι το Recon2, που αποτελεί μια προέκταση του Recon1. Το Recon2 ήταν μια προσπάθεια εξέλιξης του Recon1 ώστε να μπορεί να προσομοιώσει με μεγαλύτερη ακρίβεια περισσότερους φαινοτύπους. Προστέθηκαν αντιδράσεις, μονοπάτια, μεταβολίτες, γονίδια και άλλα βασικά στοιχεία οδηγώντας μετά από μία επαναληπτική διαδικασία στο τελικό μοντέλο.

Ωστόσο, παρά τα φανερά πλεονεκτήματα του και την ικανότητα να προσομοιώνει περισσότερους φαινοτύπους σε σχέση με τον προκάτοχο του, Recon1, δημιουργήθηκαν νέα προβλήματα τονίζοντας την ανάγκη περαιτέρω εξέλιξης του γενικού αυτού μοντέλου⁽¹¹⁾.

Τέλος, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η εξέλιξη των μεταβολικών γονιδιωματικών μοντέλων δεν είναι απλή και απαιτεί τη συνεργασία πολλών επιστημονικών κλάδων. Η μεγαλύτερη πρόκληση που έχει να αντιμετωπιστεί είναι η αποσαφήνιση των ρυθμιστικών σχέσεων που διέπουν το γονιδίωμα και το μεταβολισμό και αυτό διότι η επιλογή των αντιδράσεων στα υπάρχοντα μεταβολικά μοντέλα βασίζεται σε μετρήσεις της έκφρασης γονιδίων κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η έκφραση και η ρύθμιση όμως είναι περίπλοκες και πολυεπίπεδες διεργασίες η λειτουργία των οποίων δεν είναι ακόμα εντελώς ξεκάθαρη. Συνεπώς, μόνο η κατανόηση τέτοιων σχέσεων μπορεί να οδηγήσει σε πιο ακριβή μοντέλα που ανταποκρίνονται σε μία πληθώρα συνθηκών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΥΠΟ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥΣ

4.1 Εισαγωγή στις μεθόδους ανάλυσης υπό περιορισμούς

Μετά την επιτυχή κατασκευή ενός μοντέλου όπου έχει καθοριστεί ο στόχος του άρα και η υπολογιστική μορφή του ακολουθεί η χρήση του για μία σειρά προσομοιώσεων διαφόρων βιολογικών φαινομένων. Οι μέθοδοι προσομοιώσεων διαφέρουν ανάλογα με το σκοπό της ανάλυσης ενός μεταβολικού δικτύου. Παρακάτω παρουσιάζονται οι *in silico* μέθοδοι ανάλυσης υπό περιορισμούς (COBRA methods- Constrained Based Analysis Methods).

Οι μέθοδοι αυτοί περιορίζονταν αρχικά στην ανάλυση των περιοριστικών μοντέλων με σκοπό την διερεύνηση όλων των κατανομών ροών σε σταθερή κατάσταση. Ωστόσο, μετά την επιτυχία τους στόχος είναι η διεύρυνση των εφαρμογών τους ώστε να συμπεριλαμβάνουν και κινητικές παραμέτρους (δυναμικές καταστάσεις).

Τα μεταβολικά μοντέλα γονιδιωματικής κλίμακας εκφράζουν υπό-ορισμένα συστήματα. Οι μέθοδοι (COBRA) προσφέρουν την δυνατότητα να αναλυθούν οι φαινότυποι ενός τέτοιου συστήματος, κάτω από ένα συνεχώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον, τόσο φυσικοχημικό όσο και γενετικό, που υπόκεινται συγκεκριμένους περιορισμούς. Αποτελούνται γενικά από τρία βασικά στάδια:

1. Κατασκευή του Μεταβολικού Μοντέλου Γονιδιωματικής Κλίμακας (Genome Scale Network Reconstruction)
2. Εφαρμογή κατάλληλων περιορισμών *in silico* στο ΜΜΓΚ ώστε να προκύψει ένα περιοριστικό μοντέλο (Genome Scale Model).
3. Εφαρμογή πολλών και διαφορετικών μεθόδων ανάλυσης Cobra των ιδιοτήτων των περιοριστικών μοντέλων GEM.

Οι μέθοδοι Cobra βασίζονται σε διάφορες μεθόδους μαθηματικής βελτιστοποίησης. Η βελτιστοποίηση ενός προβλήματος αφορά την επιλογή της βέλτιστης λύσης ανάμεσα σε πολλές εναλλακτικές κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Βασίζονται στην ανάπτυξη ενός μαθηματικού μοντέλου το οποίο μετατρέπει όλες τις βασικές συνιστώσες του προβλήματος σε μαθηματικές ή/και λογικές σχέσεις. Οι πιο βασικές συνιστώσες είναι η αντικειμενική συνάρτηση, οι μεταβλητές (άγνωστοι) και το σύνολο των περιορισμών που διέπουν το πρόβλημα. Σε πολύπλοκα προβλήματα όπως, είναι τα βιολογικά, τα μοντέλα αυτά μετατρέπονται σε υπολογιστική μορφή για την διευκόλυνση της ανάλυσης τους.

Οι διάφορες μέθοδοι βελτιστοποίησης που εφαρμόζονται στα πλαίσια μιας ανάλυσης υπό περιορισμούς διαφέρουν ως προς τη μαθηματική μορφή των περιορισμών και της αντικειμενικής συνάρτησης συνεπώς και των λύσεων του συστήματος που προκύπτει. Οι πιο χαρακτηριστικές είναι :

1. **Γραμμικός προγραμματισμός (Linear Programming)**. Γραμμική αντικειμενική συνάρτηση και περιορισμοί.
2. **Τετραγωνικός προγραμματισμός (Quadratic programming)**. Τετραγωνική αντικειμενική συνάρτηση και γραμμικοί περιορισμοί.
3. **Μη γραμμικός προγραμματισμός (Nonlinear programming, NLP)**. Μη γραμμικοί περιορισμοί και/ή μη γραμμική συνάρτηση.
4. **Μικτός ακέραιος γραμμικός προγραμματισμός (Mixed integer linear programming, MILP)**. Οποιαδήποτε μορφή αντικειμενικής συνάρτησης και περιορισμών από τους παραπάνω.

Οι παραπάνω μέθοδοι ανάλυσης των ιδιοτήτων ενός μοντέλου μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις γενικές κατηγορίες ανάλογα με το σκοπό τους. Αποσκοπούν γενικά στον προσδιορισμό:

- 1) της βέλτιστης λύσης ενός προβλήματος και των ισοδύναμων της,
- 2) των μεταβολών που προκύπτουν στις ροές από τη μεταβολή διαφόρων παραμέτρων και την επιρροή των μεταβολών αυτών σε ολόκληρο το μοντέλο,
- 3) των διαφόρων φαινοτύπων μετά από αφαίρεση ή πρόσθεση κάποιων γονιδίων (δηλαδή αντιδράσεων που σχετίζονται με αυτά), και
- 4) επιπρόσθετων μαθηματικών περιορισμών ώστε να πλησιάζει το μοντέλο την πραγματικότητα .

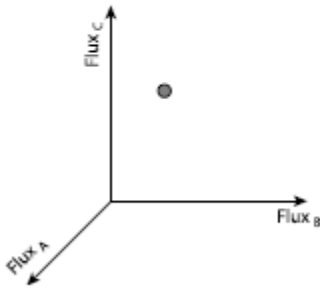
Περιορισμοί και Αντικειμενική Συνάρτηση

Όπως είναι φανερό παραπάνω, η επιτυχία της *in silico* cobra ανάλυσης κρίνεται από την επιλογή της αντικειμενικής συνάρτησης και την καταλληλότητα των περιορισμών που διέπουν το υπό εξέταση πρόβλημα.

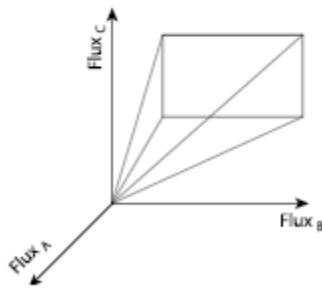
Η επιβολή περιορισμών σε ένα πρόβλημα είναι αυτό που διαχωρίζει τις θεωρητικές αναλύσεις (theory based analysis) από τις αναλύσεις υπό περιορισμούς (constrained based analysis). Οι πρώτες επιδιώκουν την εύρεση μιας λύσης για το σύστημα που εξετάζουν και απαιτούν την ακριβή γνώση των εξισώσεων και των μεταβλητών που το περιγράφουν. Αντίθετα, οι δεύτερες βασίζονται περισσότερο στα όρια και τους περιορισμούς που διέπουν ένα πρόβλημα δίνοντας ένα σύνολο λύσεων, τον διανυσματικό χώρο των λύσεων, όπως φαίνεται στο σχήμα.

Theory-based Constraint-based

- Complete knowledge
- Solution a single point



- Incomplete constraints
- Solution space



Σχήμα 4.1. Σύγκριση ανάμεσα σε θεωρητικές και υπό περιορισμούς αναλύσεις ενός προβλήματος.

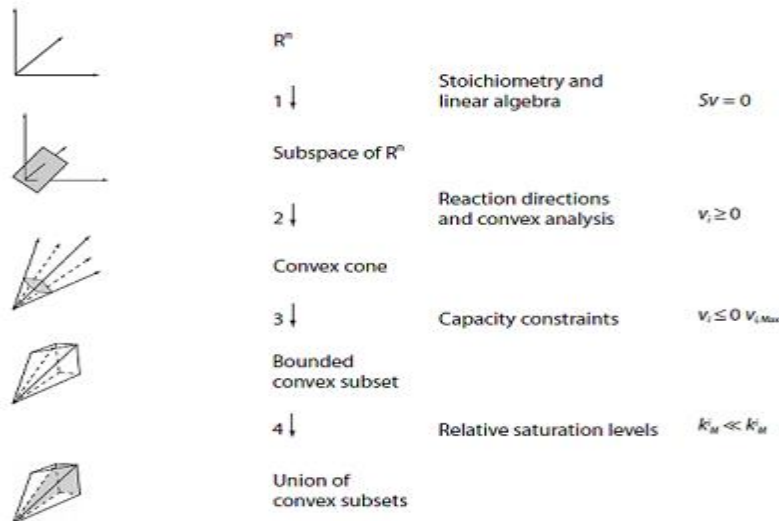
Στα βιολογικά συστήματα που διαφέρουν από τα φυσικοχημικά οι θεωρητικές αναλύσεις δεν έχουν καμία αξία. Αυτό διότι, αφενός, σπάνια είναι γνωστές όλες οι εξισώσεις και οι μεταβλητές που διέπουν ένα πρόβλημα (υπό-ορισμένο σύστημα) και αφετέρου, μία μοναδική λύση δεν έχει νόημα στη φύση όπου τα συστήματα μεταβάλλονται συνεχώς μέσω περίπλοκων διαδικασιών. Επομένως, επιλέγεται η ανάλυση υπό περιορισμούς και τίθεται το ζήτημα της κατάλληλης επιλογής τους.

Έτσι, λοιπόν η επιλογή των περιορισμών δεν γίνεται τυχαία και καθορίζεται από τη βιολογία του οργανισμού και τις συνθήκες του περιβάλλοντος του. Οι περιορισμοί αυτοί εντάσσονται σε τέσσερις γενικές κατηγορίες:

- 1. Φυσικοχημικοί.** Αφορούν τη διατήρηση μάζας, ενέργειας και ορμής.
- 2. Τοπολογικοί.** Αφορούν τη διευθέτηση του χώρου σε ένα κύτταρο (π.χ. την αναδίπλωση του DNA ώστε να χωράει στον πυρήνα).
- 3. Περιβαλλοντικοί.** Αφορούν τις συνθήκες περιβάλλοντος όπως pH , θερμοκρασία, υποστρώματα κ.α.
- 4. Ρυθμιστικοί.** Αφορούν διεργασίες ρύθμισης του κυττάρου ώστε κάθε στιγμή να εξασφαλίζεται η ομοιόσταση.

Μαθηματικά, οι περιορισμοί αναπαρίστανται είτε ως ισορροπίες, είτε ως όρια. Οι ισορροπίες εκφράζονται με εξισώσεις, ενώ τα όρια με ανισότητες. Οι εξισώσεις μπορούν να αφορούν σχέσεις διατήρησης, όπως της μάζας και της ενέργειας και οι ανισότητες όρια στις τιμές των ροών των αντιδράσεων.

Οι περιορισμοί, όπως αναφέρθηκε, καθορίζουν το χώρο των επιτρεπόμενων λύσεων. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η επιρροή και μεταβολή του χώρου των λύσεων καθώς επιβάλλονται διάφοροι περιορισμοί.



Σχήμα 4.2 Επιρροή εφαρμογής διαφόρων περιορισμών στη μορφή του χώρου των λύσεων.

Όσον αφορά την αντικειμενική συνάρτηση, αυτή ουσιαστικά αποτελεί μία υπόθεση σχετικά με το “σκοπό” ενός κυττάρου ή οργανισμού. Η επιλογή της αν και είναι αποτέλεσμα πολλών πειραμάτων και παρατηρήσεων στην ουσία ο ακριβής σκοπός του κυττάρου δεν είναι ποτέ γνωστός και έτσι είναι βασισμένη σε λογικές προσεγγίσεις. Οι πιο χαρακτηριστικές αντικειμενικές συναρτήσεις που έχουν εξεταστεί στα μεταβολικά δίκτυα είναι:

- **Ελαχιστοποίηση παραγωγής ATP:** περιγράφει τις συνθήκες κάτω απ' τις οποίες το κύτταρο χρησιμοποιεί με βέλτιστο τρόπο την ενέργεια του.
- **Ελαχιστοποίηση κατανάλωσης υποστρωμάτων:** αντικατοπτρίζει το πως ένα κύτταρο επιτελεί μία μεταβολική λειτουργία καταναλώνοντας την ελάχιστη ποσότητα υποστρωμάτων.
- **Μεγιστοποίηση παραγωγής μεταβολιτών:** αντικατοπτρίζει την ικανότητα ενός κυττάρου να παράγει ένα μεταβολίτη ενδιαφέροντος .
- **Μεγιστοποίηση της βιομάζας:** χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης ενός οργανισμού κάτω από δεδομένες συνθήκες.
- **Μεγιστοποίηση βιομάζας και παραγωγής μεταβολιτών:** αντικατοπτρίζει την ανταγωνιστική σχέση που μπορεί να υπάρξει στο κύτταρο μεταξύ της ανάπτυξης του και της παραγωγής μεταβολιτών όταν είναι αναγκαία η βελτιστοποίηση και των δύο.

Από αυτές, μία από τις σημαντικότερες αντιδράσεις και ίσως η πιο δύσκολα προσδιοριζόμενη είναι η αντίδραση της βιομάζας. Βασίζεται στην ακριβή γνώση της σύστασης του κυττάρου και των ενεργειακών απαιτήσεων ώστε να παράγεται βιομάζα από βασικούς μεταβολίτες. Ο προσδιορισμός αυτής της αντίδρασης μπορεί να γίνει σε τρία επίπεδα, ανάλογα με τις λεπτομέρειες που απαιτούνται στην τελική μορφή της. Έτσι, προκύπτουν τα παρακάτω επίπεδα⁽³⁾:

1. **Βασικό επίπεδο.** Προσδιορίζονται η σύσταση του κυττάρου σε μακρομόρια (DNA, RNA, λιπίδια, πρωτεΐνες κ.α. καθώς επίσης το είδος και η ποσότητα των δομικών μονάδων (building blocks) που απαρτίζουν κάθε είδος μακρομορίων (νουκλεοτίδια, αμινοξέα, λιπαρά οξέα κ.α.)

2. **Μεσαίο επίπεδο.** Προσδιορίζεται η ενέργεια που απαιτείται για την σύνθεση των μακρομορίων από τις δομικές τους μονάδες καθώς και η ενέργεια συντήρησης του κυττάρου και των βασικών του λειτουργιών. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι σε μία αντίδραση βιομάζας πρέπει πάντα να υπάρχουν τα μακρομόρια που προκύπτουν από βιοσυνθετικές αντιδράσεις (π.χ. νερό από σύνθεση πρωτεϊνών) και αυτό γιατί με αυτό τον τρόπο το κύτταρο τα χρησιμοποιεί και δεν αναγκάζεται να καταναλώσει επιπλέον υπόστρωμα άρα να παρουσιάζεται μεγαλύτερη αύξηση από τη φυσιολογική.
3. **Προχωρημένο επίπεδο.** Αφορά την προσθήκη επιπλέον στοιχείων όπως βιταμίνες, μόρια φορείς κ.α. που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη. Με την προσθήκη τέτοιου είδους στοιχείων η αντίδραση της βιομάζας ολοκληρώνεται και αντικατοπτρίζει καλύτερα την πραγματικότητα ενός κυττάρου.

Όπως είναι φανερό η σύνθεση της αντίδρασης δεν είναι εύκολη καθώς απαιτεί πολλές πληροφορίες που πολλές φορές δεν είναι διαθέσιμες και αφορούν μεταβαλλόμενες καταστάσεις. Η ανάπτυξη ενός κυττάρου επηρεάζεται από τις συνθήκες και είναι φυσικό ότι όσο πιο πολλές λεπτομέρειες απαιτούνται τόσο πιο δύσκολο είναι να προσδιοριστούν τα κατάλληλα δεδομένα.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα δυσκολίας είναι η επιλογή και ο προσδιορισμός των λιπιδίων και των φωσφολιπιδίων ενός κυττάρου. Σε σύγκριση με τις άλλες δομικές μονάδες που μπορούν να προσδιοριστούν ακόμα και αν δεν υπάρχουν πειραματικές μετρήσεις⁽¹⁰⁾, τα λιπίδια και τα φωσφολιπίδια προσδιορίζονται μόνο μέσω πειραμάτων. Συγκεκριμένα, μόρια όπως τα φωσφολιπίδια αποτελούνται από πολλά, διαφορετικά λιπαρά οξέα (διαφορετικό μήκος, κορεσμένα, ακόρεστα) των οποίων η σύσταση δεν είναι ακριβής αλλά αφορά μία μέση σύσταση. Έτσι, η συνάρτηση δεν καλύπτει όλους τους πιθανούς συνδυασμούς και δεν ανταποκρίνεται πλήρως στην πραγματικότητα. Ωστόσο, ο ρυθμός ανάπτυξης έχει προσομοιωθεί με επιτυχία σε πολλές περιπτώσεις⁽³⁾.

Συμπερασματικά, η προσπάθεια κατάστρωσης μιας κατάλληλης αντίδρασης βιομάζας πρέπει να είναι ο κύριος στόχος για τις έγκυρες προσομοιώσεις ενός μοντέλου, καθώς δεν νοείται κύτταρο χωρίς ανάπτυξη.

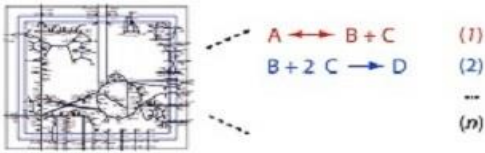
4.2 Ανάλυση Ισορροπίας Ροών (Flux Balance Analysis)

Η ανάλυση ισορροπίας ροών (flux balance analysis) είναι μια υπολογιστική μέθοδος ανάλυσης υπό περιορισμούς που βασίζεται στο γραμμικό προγραμματισμό. Υπολογίζει τις ροές των αντιδράσεων του μεταβολικού μοντέλου μεγιστοποιώντας ή ελαχιστοποιώντας μία αντικειμενική συνάρτηση που αντικατοπτρίζει τον στόχο που εξυπηρετεί το μοντέλο. Η λύση οριοθετείται από τους βιολογικούς περιορισμούς του προβλήματος.

Περίληπτικά, τα βήματα που ακολουθούνται για τη λύση ενός τέτοιου προβλήματος είναι τα παρακάτω:

1. Προσδιορισμός του μεταβολικού συστήματος, καταγραφή των βιοχημικών αντιδράσεων, σύνθεση τους σε δίκτυο.
2. Μετατροπή του δικτύου σε μαθηματικό μοντέλο μέσω του πίνακα S .
3. Εφαρμογή περιορισμών που διέπουν το πρόβλημα.
4. Προσδιορισμός αντικειμενικής συνάρτησης.
5. Βελτιστοποίηση

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται όλα τα βήματα.

α . Metabolic Network**b. Formulation of S**

	reactions			
	1	2	...	n
A	-1			
B	1	-1		
C	1	-2		
D				1
...				
m				

S

c. Apply mass Balance Constraints

-1
1
1
1

 $S(m \times n)$
 \times

v_1
v_2
\vdots
v_n

 $v(n \times 1)$
 $= 0$
 \rightarrow

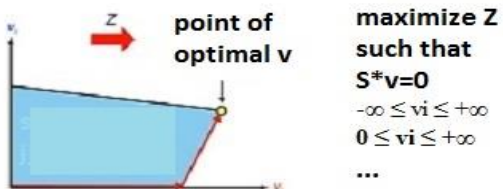
m balance equations
 $-v_1 + \dots = 0$
 $v_1 - v_2 + \dots = 0$
 ...

d. Define objective function Z

$$Z = c^T(1 \times n) * v(n \times 1)$$

$\left[\begin{array}{cccc} 1 & 0 & \dots & 0 \end{array} \right]$

 sets reaction 1 as objective

e. optimize Z with linear programming

Σχήμα 4.3. Στάδια δημιουργίας ενός προβλήματος ανάλυσης ισορροπίας ροών (FBA).

Ανάλυση Βημάτων

Στα πρώτα δύο βήματα έχει γίνει αναφορά στο κεφάλαιο 3, όπου εξηγήθηκε η κατασκευή του S από ένα μεταβολικό δίκτυο. Τα δύο αυτά βήματα εξασφαλίζουν ένα λειτουργικό μοντέλο.

Στο τρίτο βήμα καθορίζονται οι φυσικοί περιορισμοί που διέπουν το πρόβλημα (βιολογικοί, φυσικοχημικοί, κ.α.) οι οποίοι εκφράζονται μαθηματικά. Στην περίπτωση της FBA, οι περιορισμοί που εκφράζονται ως ισότητες αφορούν τα ισοζύγια μάζας ενώ οι ανισότητες αφορούν όρια στις τιμές των ροών αντιδράσεων και την κατεύθυνση τους. Κατά την εφαρμογή των ισοζυγίων μάζας, θεωρείται σταθερή κατάσταση:

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = \mathbf{0} \quad (4.2.1)$$

Η εξίσωση (1) αποτελεί τον κύριο περιορισμό της μεθόδου και όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο τρία αναπαριστά ένα περιοριστικό μοντέλο. Από αυτήν προκύπτει μία εξίσωση διατήρησης για κάθε μεταβολίτη και το σύνολο των εξισώσεων αυτών απαρτίζουν το σύστημα προς επίλυση. Το σύστημα αυτό υπό-ορισμένο (underdetermined).

Στο τέταρτο, προσδιορίζεται μία γραμμική αντικειμενική συνάρτηση της μορφής:

$$\mathbf{Z} = \mathbf{w} \times \mathbf{v} = \sum \mathbf{w}_i \times \mathbf{v}_i \quad (4.4.2)$$

Όπου \mathbf{w} είναι το διάνυσμα των συντελεστών της αντικειμενικής συνάρτησης και \mathbf{v} , το διάνυσμα των ροών. Οι τιμές των συντελεστών αντικατοπτρίζουν το πόσο συμμετέχει κάθε αντίδραση στην αντικειμενική συνάρτηση.

Τέλος, επιβάλλονται επιπλέον περιορισμοί στις ροές των αντιδράσεων με τη μορφή ανισοτήτων και βελτιστοποιείται το πρόβλημα. Η κανονική μορφή ενός τέτοιου προβλήματος είναι:

$$\begin{aligned} & \text{maximize} && \mathbf{c}^T \mathbf{v} \\ & \text{subject to} && \mathbf{S} \mathbf{v} = \mathbf{0} \\ & \text{and} && \text{lowerbound} \leq \mathbf{v} \leq \text{upperbound} \end{aligned}$$

όπου \mathbf{S} , γνωστός στοιχειομετρικός πίνακας

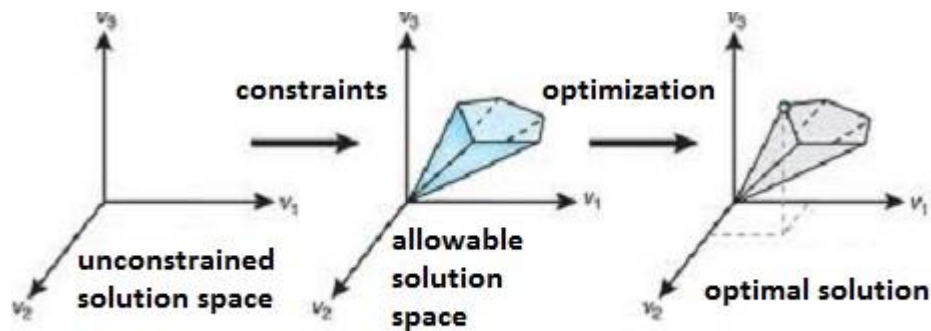
\mathbf{c}^T , διάνυσμα πραγματικών αριθμών

\mathbf{v} , διάνυσμα των άγνωστων ροών

$\mathbf{Z} = \mathbf{c}^T \times \mathbf{v}$, αντικειμενική συνάρτηση

Είδη λύσεων

Σε ένα πρόβλημα γραμμικού προγραμματισμού συνήθως υπάρχουν άπειρες λύσεις και επιδιώκεται η βέλτιστη μέσω της επιβολής κατάλληλων περιορισμών και μιας αντικειμενικής συνάρτησης. Η εφικτή περιοχή λύσεων βρίσκεται μέσα στον μηδενόχωρο του πίνακα S καθώς αυτός περιγράφει συστήματα σε σταθερή κατάσταση. Μετά την επιβολή περιορισμών, ο μηδενόχωρος συρρικνώνεται και αποκτά τη μορφή ενός κυρτού πολύγωνου όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 4.4. Επίδραση περιορισμών στο χώρο των λύσεων του συστήματος γραμμικού προγραμματισμού.

Σε ένα πρόβλημα LP υπάρχουν τρεις τύποι δυνατών λύσεων (feasible solutions).

1. **Μοναδική Βέλτιστη Λύση (unique solutions).**
2. **Άπειρες βέλτιστες λύσεις (Degenerate solution).**
3. **Καμία λύση (unbounded solution) .**

Βιολογική σημασία λύσεων

1. Μοναδικές Λύσεις. Εμφανίζονται μόνο σε μικρά δίκτυα τα οποία δεν χρειάζονται και δεν έχουν πολλές εναλλακτικές οδούς και έτσι παρουσιάζουν μία βέλτιστη οδό για να επιτύχουν ένα φαινότυπο.

2. Άπειρες Λύσεις. Οι λύσεις αυτές αντιστοιχούν σε ίδιους φαινοτύπους που έχουν αποκτηθεί με διαφορετικό τρόπο. Αποδεικνύουν την ικανότητα ενός οργανισμού να καταλήγει στον ίδιο φαινότυπο από διαφορετικά μονοπάτια πράγμα που συνδέεται με την ομοιόσταση και επιβίωση του κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Είναι η συνηθέστερη περίπτωση σε μεγάλης κλίμακας δίκτυα.

3. Καμία Λύση. Δεν αντιστοιχούν σε κάποιο βιολογικά ρεαλιστικό πρόβλημα. Είναι ένδειξη λάθους είτε κατά τη διάρκεια της κατασκευής του δικτύου, είτε κατά την επιβολή των περιορισμών.

Υπολογιστικά εργαλεία της μεθόδου

Η ανάλυση ισορροπίας ροών υπό περιορισμούς ανήκει στην κατηγορία μεθόδων ανάλυσης υπό περιορισμούς (COBRAMethods) και μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια πολλών εργαλείων. Ένα από τα πιο κοινά είναι το COBRATOOLBOX που μπορεί να ενσωματωθεί ως εργαλείο του MATLAB. Έχει πολλαπλές εφαρμογές συμπεριλαμβανόμενων και πολλών μεθόδων ανάλυσης ισορροπίας ροών. Τα μοντέλα που χρησιμοποιεί το COBRATOOLBOX, είναι αποθηκευμένα στη μορφή SBML και εισάγονται στο MATLAB για μια *in silico* ανάλυση. Τα δεδομένα εισόδου και εξόδου αφορούν τις εξωτερικές ροές αντιδράσεων που είναι μετρημένες πειραματικά. Τιμές για τις εσωτερικές ροές είναι πολύ σπάνιες λόγω της δυσκολίας που παρουσιάζουν στη μέτρηση τους.

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου

Η ανάλυση ισορροπίας ροών είναι γρήγορη και οικονομική μέθοδος καθώς μπορεί σε ειδικές περιπτώσεις να συμβάλλει και ως προβλεπτικό εργαλείο δίνοντας μια κατεύθυνση σε διάφορα πειράματα. Επειδή δεν απαιτεί κινητικές παραμέτρους απλουστεύει την ανάλυση ενός μεταβολικού δικτύου δίνοντας μία πρώτη εικόνα για τη συμπεριφορά του. Τέλος, συμβάλλει στη διαδικασία ελέγχου της λειτουργικότητας ενός μοντέλου αναδεικνύοντας τυχόν κενά που πρέπει να καλυφθούν (gap filling)

Το σημαντικότερο μειονέκτημα της γραμμικής βελτιστοποίησης είναι ότι δεν δίνει μοναδική λύση για

τις μεταβολικές ροές. Έτσι, είναι αναγκαία η χρήση άλλων μεθόδων για την ανάλυση του συνολικού χώρου των λύσεων και της δυναμικής συμπεριφοράς του μοντέλου που αντικατοπτρίζει καλύτερα το πως αυτό ρυθμίζεται από το περιβάλλον του.

Παραλλαγές της μεθόδου

Η επιτυχία της μεθόδου οδήγησε στην ανάγκη παραλλαγών της με σκοπό να καλύψει και άλλες ανάγκες προσομοιώσεων όπως είναι η εισαγωγή της παραμέτρου του χρόνου ή ο περιορισμός κάποιων αντιδράσεων ώστε να ικανοποιούν πιο ρεαλιστικά την αντικειμενική συνάρτηση.

Κάποιες προεκτάσεις της είναι η ανάλυση διαφοροποίησης ροών (Flux Variability Analysis), η ελαχιστοποίηση μεταβολικών προσαρμογών (Minimization of Metabolic Adjustments), η δυναμική ανάλυση ισορροπίας ροών (Dynamic Flux Balance Analysis) κ.α.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ ΡΟΩΝ (FBA)

5.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εφαρμόζεται η ανάλυση ισορροπίας μεταβολικών ροών υπό περιορισμούς, όπως παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο τέσσερα, σε ένα υβριδικό στοιχειομετρικό μοντέλο που προέκυψε από τα μεταβολικά μοντέλα Hepatonet1, που αφορά τα ηπατοκύτταρα και Recon1, που είναι κοινό για όλα τα ανθρώπινα κύτταρα. Στόχος είναι το μοντέλο να προσομοιώνει: 1) την αναπαραγωγή του ηπατοκυττάρου κάτω από διάφορες συνθήκες και 2) το φαινόμενο Warburg.

Στο πρώτο στάδιο, όπου εξετάζεται η ικανότητα αναπαραγωγής του μοντέλου, προστίθεται μία συνάρτηση βιομάζας από το Recon1 στο Hepatonet1 και καθορίζονται οι αντιδράσεις ανταλλαγής υποστρωμάτων και προϊόντων του κυττάρου με το περιβάλλον του (exchange reactions). Η σύσταση της βιομάζας αφορά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και αποτελείται από μία σειρά αμινοξέων, λιπιδίων, σακχάρων κ.α. Στο δεύτερο στάδιο, εξετάζεται το φαινόμενο Warburg σε δύο διαφορετικές περιπτώσεις: 1) υπό περιβαλλοντικούς και φυσικοχημικούς περιορισμούς και 2) υπό περιβαλλοντικούς, φυσικοχημικούς και έναν τοπολογικό περιορισμό (solvent capacity constraint).

Οι περιβαλλοντικοί και φυσικοχημικοί περιορισμοί ορίζονται από τη στοιχειομετρία των αντιδράσεων (στοιχειομετρικός πίνακας S), τα όρια στις τιμές των εξωτερικών ροών και τα ισοζύγια μάζας. Ο τοπολογικός περιορισμός αφορά τη μέγιστη ποσότητα ενζύμων που μπορεί να υπάρχει μέσα στο κυτταρόπλασμα ώστε να αποφεύγεται το φαινόμενο του μαρκομοριακού συνωστισμού (macromolecular crowding). Περιγράφεται μέσω μιας παραμέτρου που ορίζεται παρακάτω.

Το φαινόμενο αυτό αφορά τη μεταβολή της φυσιολογίας του κυττάρου όταν οι συγκεντρώσεις των μακρομορίων (π.χ. πρωτεΐνες) στο κυτταρόπλασμα αρχίζουν να αυξάνονται, γεγονός που προκαλεί έναν συνωστισμό και συνεπώς την αντίδραση του κυττάρου για να ελέγξει το χώρο του. Αυτό έχει σαν συνέπεια να μεταβάλλει τις ροές στα μεταβολικά μονοπάτια, ώστε να παράγονται τα κατάλληλα μόρια

ακριβώς στις ποσότητες που χρειάζεται κάτω από δεδομένες συνθήκες. Κατ' αυτό τον τρόπο μεταβάλλονται και οι φαινότυποι του κυττάρου.

Το φαινόμενο αυτό σχετίζεται με τον καρκίνο διότι οι καρκινικοί φαινότυποι τύπου 'Warburg' παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση των γονιδίων της γλυκόλυσης, συνεπώς αντίστοιχα αυξημένη συγκέντρωση των ενζύμων που καταλύουν τις αντιδράσεις. Έτσι, τα ένζυμα και οι μεταβολίτες 'διεκδικούν' τον ίδιο χώρο στο κύτταρο, αναγκάζοντας το να προσαρμοστεί σε μία νέα κατάσταση.

5.2 Υλικά και μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πακέτο του Matlab R2011a και το υπολογιστικό εργαλείο Cobra toolbox που ενσωματώνεται στο Matlab με σκοπό την ανάλυση ισορροπίας των μεταβολικών ροών ενός μοντέλου.

Προσομοίωση παραγωγής βιομάζας

Για την προσομοίωση του ρυθμού ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε το υβριδικό μοντέλο των Hepatonet1 και Recon1. Προστέθηκε η συνάρτηση βιομάζας του Recon1 στο Hepatonet1 και χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση ισορροπίας μεταβολικών ροών (FBA) όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η αντικειμενική συνάρτηση ήταν η βιομάζα και επιδιώχθηκε η μεγιστοποίηση της υπό τους περιβαλλοντικούς και φυσικοχημικούς περιορισμούς της σταθερής κατάστασης, της θερμοδυναμικής και των υποστρωμάτων :

$$\max v_{\text{biomass}} \quad (1)$$

subject to

$$\mathbf{S} \times \mathbf{v} = 0 \text{ and} \quad (2)$$

$$v_{\min} \leq v \leq v_{\max} \quad (3)$$

Αρχικά, καθορίστηκαν οι αντιδράσεις ανταλλαγής του κυττάρου με το περιβάλλον του (exchange reactions) που ορίζουν τις εξωτερικές ροές και συνεπώς τα υποστρώματα και τα προϊόντα. Πηγές άνθρακα ήταν η γλυκόζη, η χολίνη, το αραχιδονικό οξύ, η αιθανολαμίνη και η θρεονίνη ενώ κύρια προϊόντα το διοξείδιο του άνθρακα και το γαλακτικό οξύ. Οι τιμές των εξωτερικών ροών κυμαίνονταν από -3000 mmol/mgDW*h έως 3000 mmol/mgDW*h, τιμές που αντιστοιχούν σε μη περιορισμένο

σύστημα όσον αφορά τις ροές. Από αυτές περιορίστηκαν σε χαμηλότερες τιμές μόνο τα υποστρώματα για να ελεγχθεί η εξάρτηση του ρυθμού ανάπτυξης από αυτά. Έτσι καλύφθηκε ένα εύρος τιμών από 0 mmol/mgDW*h έως -150 mmol/mgDW*h.

Προσομοίωση με την επιβολή του περιορισμού στην ποσότητα των ενζύμων (solvent capacity constraint)

Στο δεύτερο μέρος προστέθηκε ένας ακόμα περιορισμός στο πρόβλημα της βελτιστοποίησης και αφορά τη συνολική συγκέντρωση των ενζύμων. Ορίζεται ως εξής:

$$\sum_{i=1}^N \frac{MW_i v_i}{k_{cat_i}} \leq C$$

όπου MW_i , το μοριακό βάρος του ενζύμου i (mg/mmol)

k_{cat_i} , αριθμός ανακύκλωσης (1/h)

v_i , ροή της i αντίδρασης (mmol/mgDW*h)

C , όριο συνολικής μάζας ενζύμων

Ο περιορισμός αυτός αφορά την απαιτούμενη συγκέντρωση του ενζύμου ώστε αφενός να πραγματοποιείται μία αντίδραση και αφετέρου να μην υπάρχει το φαινόμενο του μακρομοριακού συνωστισμού (macromolecular crowding). Μαθηματικά συντίθεται ένα νέο γραμμικό πρόβλημα, παρόμοιο με το πρώτο και λύνεται και αυτό με τη μέθοδο της ανάλυσης ισορροπίας ροών (FBAwMC-flux balance analysis with molecular crowding). Τιμές για τα παραπάνω μεγέθη βρέθηκαν στη βιβλιογραφία ⁽²⁶⁾. Συγκεκριμένα, για την προσομοίωση, λόγω έλλειψης δεδομένων, θεωρήθηκε μία μέση τιμή τόσο για τον αριθμό ανακύκλωσης K_{cat} (90001/h) όσο και για το μοριακό βάρος MW (229364785 mg/mmol). Το όριο στη συνολική μάζα είναι C (0.078 (mg/mgDW) ⁽²⁶⁾.

5.3 Αποτελέσματα

Το πρώτο στάδιο των προσομοιώσεων όπως προαναφέρθηκε αφορούσε την εισαγωγή της αντίδρασης βιομάζας από το Recon1 στο Hepatonet1 και τον καθορισμό των αντιδράσεων ανταλλαγής του

κυττάρου με το περιβάλλον του (exchange reactions) έτσι ώστε το μοντέλο να παρουσιάζει λογικές σχέσεις ρυθμού ανάπτυξης και υποστρωμάτων. Η αντίδραση βιομάζας και οι αντιδράσεις ανταλλαγής δίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Μεταβολίτης		Μοριακό Βάρος	mmol/grDW βιομάζας
'ala-L[c]	'HC00048_c'	89,094	0,53602
'amp[c]	'HC00030_c'	132,119	0,023165
Asn-L[c]	'HC00148_c'	132,095	0,05444
Asp-L[c]	'HC00055_c'	121,16	3,1282
atp[c]	'HC00012_c'	146,146	100
chsterd[c]	'HC00178_c'	146,122	0,044228
clpn-hs[c]	'HC02087_m'	75,067	6
cmp[c]	'HC00060_c'	115,132	0,038608
dag-hs[c]	'HC02085_c'	105,093	0,016827
damp[c]	'HC00304_c'	329,209	0,0094984
dcmp[c]	'HC00217_c'	303,167	0,0063323
dgmp[c]	'HC00306_c'	345,208	0,0063323
dtmp[c]	'HC00308_c'	320,194	0,0094984
gln-L[c]	'HC00067_c'	321,182	0,75797
glu-L[c]	'HC00034_c'	361,207	0,86266
gly[c]	'HC00045_c'	322,166	0,62815
gmp[c]	'HC00141_c'	345,208	0,043755
h2o[c]	'HC00011_c'	463,62	100
lpchd-hs[c]	'HCO2016_c'	386,664	0,00676
mag-hs[c]	'HC02072_c'	413,666	0,020642
pail-hs[c]	'HCO2009_c'	119,096	0,016562
pchd-hs[c]	'HC02080_c'	146,098	0,09182
pe-hs[c]	'HC02079_c'	387,21	0,10722
Pro-L[c]	'HC00145_c'	269,146	0,081241
ps-hs[c]	'HC02006_c'	312,147	0,031502
Ser-L[c]	'HC00068_c'	335,249	0,16751
sphmyln-hs[c]	'HCO2007_c'	316,223	0,01291
tag-hs[c]	'HC02062_c'	418,184	0,14696
ump[c]	'HC00105_c'	224,061	0,023165
xdest-hs[c]	'HC01969_c'	173,1	0,03514

Πίνακας 1. Συστατικά Βιομάζα

Αντίδραση		Κατεύθυνση
'biomass'	biomass	
'Ex_HC00011[s]'	H2O	both
'Ex_HC00017[s]'	O2	import
'Ex_HC00019[s]'	Pi	both
'Ex_HC00021[s]'	CO2	export
'Ex_HC00024[s]'	NH3	import
'Ex_HC00040[s]'	Glucose	import
'Ex_HC00062[s]'	Sulfate	both
'Ex_HC00089[s]'	Urea	export
'Ex_HC00112[c]'	Choline	both
'Ex_HC00179[s]'	Threonine	import
'Ex_HC00180[c]'	Ethanolamine	both
'Ex_HC00202[s]'	Arachidonate	both
'Ex_HC01846[s]'	Fe2+	import
'Ex_HC01981[s]'	Palmitolate	import
'Ex_HC00177[s]'	lactate	export

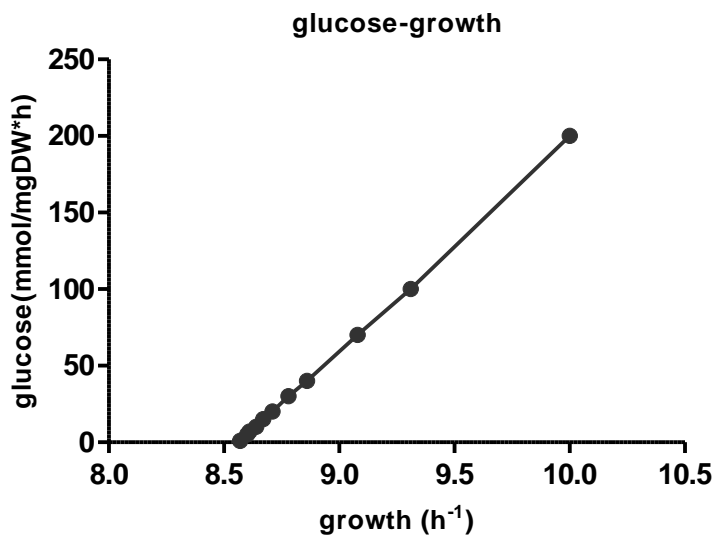
Πίνακας 2. Αντιδράσεις ανταλλαγής (exchange reactions)

Μετά από μία σειρά προσομοιώσεων αναδείχθηκε η ικανότητα του μοντέλου να αναπαράγεται κάτω από διάφορες πηγές άνθρακα καθώς επίσης και η εξάρτηση του ρυθμού ανάπτυξης από το οξυγόνο. Τα όρια στις αντιδράσεις, άνω και κάτω, καθορίζονται ανάλογα με τον αν αυτές είναι εισόδου (import), εξόδου (export), ή αμφίδρομες (both). Στις συγκεκριμένες προσομοιώσεις το όριο 10 (mmol/mgDW*h) τέθηκε σε όλες τις αντιδράσεις του πίνακα 2 εκτός από τα υποστρώματα των οποίων οι ροές μεταβάλλονταν για να φανεί η εξάρτηση του ρυθμού ανάπτυξης από αυτά.

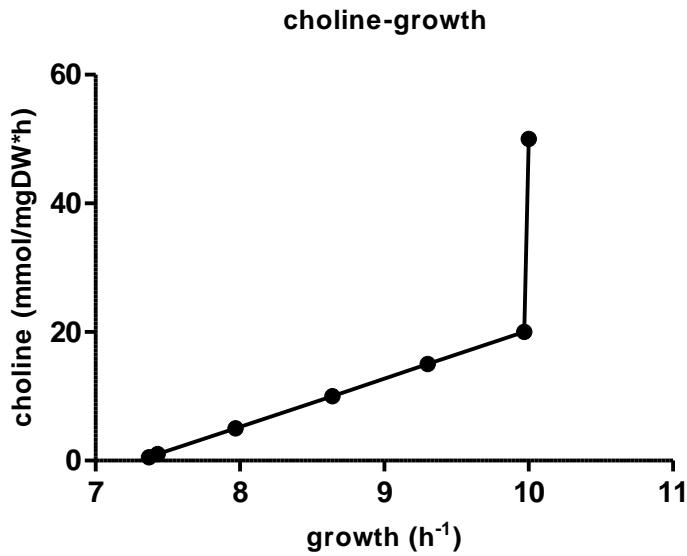
Είδος Αντίδρασης	Κάτω όριο (lb)	Άνω όριο(ub)
Εισόδου (import)	-10	0
Εξόδου (export)	0	10
Αμφίδρομες (both)	-10	10

Πίνακας 3. Όρια αντιδράσεων

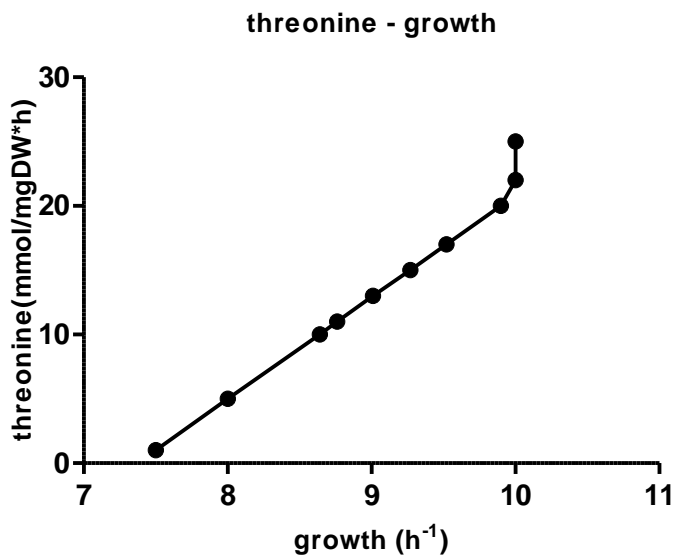
Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται η εξάρτηση του ρυθμού ανάπτυξης από τα διάφορα υποστρώματα. Σε όλα τα διαγράμματα για μηδενική ροή υποστρώματος παρατηρείται ανάπτυξη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι σε κάθε προσομοίωση υπήρχε πάντα μία δεύτερη πηγή άνθρακα εκτός από αυτήν που εξετάζονταν κάθε φορά. Αυτό συμβαίνει διότι κάποιοι μεταβολίτες που λειτουργούν ως πηγές άνθρακα είναι απαραίτητες για τη λειτουργικότητα του μοντέλου όσον αφορά άλλες μεταβολικές ηπατικές λειτουργίες εκτός από αυτή της βιομάζας (παραγωγή χολής, αποτοξίνωση αμμωνίας κ.α.).



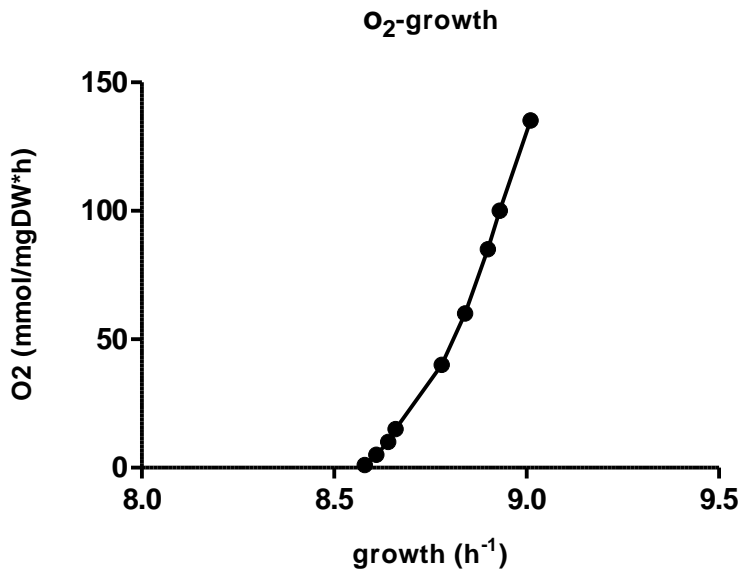
Διάγραμμα 5.1. Σχέση ρυθμού ανάπτυξης (h^{-1}) και κατανάλωσης γλυκόζης με όρια αντιδράσεων -10 (mmol/mgDW*h) έως 10 (mmol/mgDW*h).



Διάγραμμα 5.2 Σχέση ρυθμού ανάπτυξης (h^{-1}) και χολίνης με όρια αντιδράσεων -10 (mmol/mgDW*h) έως 10 (mmol/mgDW*h).

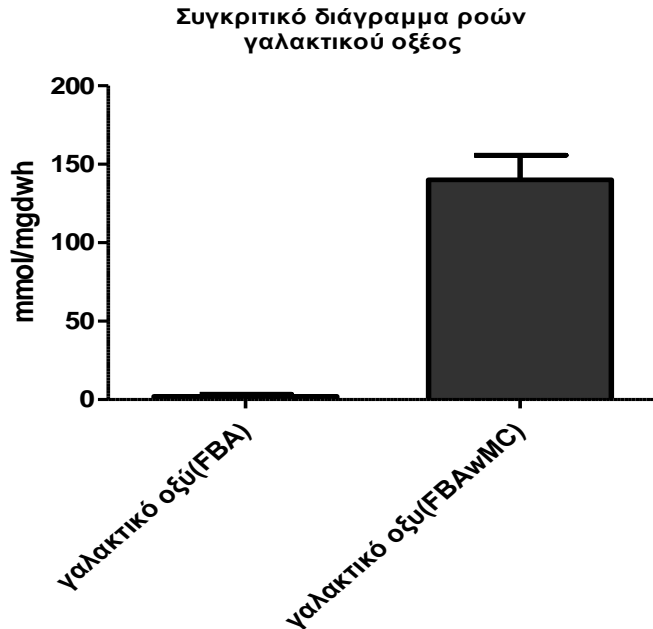


Διάγραμμα 5.3 Σχέση ρυθμού ανάπτυξης (h^{-1}) και θρεονίνης με όρια αντιδράσεων -10 (mmol/mgDW*h) έως 10 (mmol/mgDW*h).

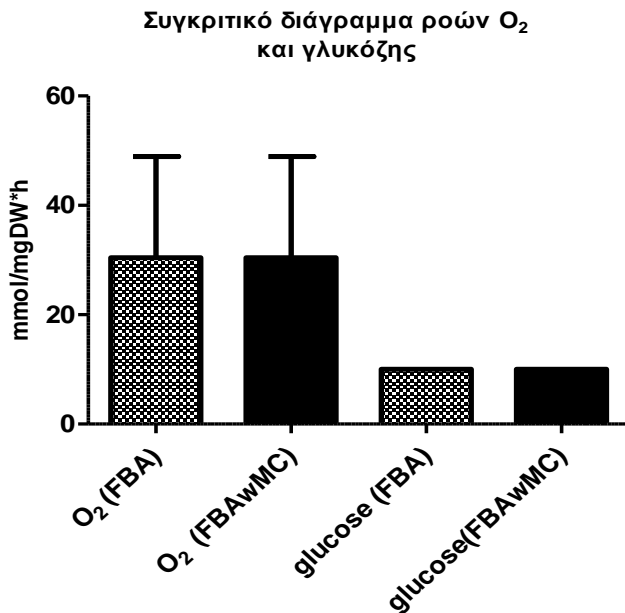


Διάγραμμα 5.4 Σχέση ρυθμού ανάπτυξης και οξυγόνου με όρια αντιδράσεων -10 (mmol/mgDW*h) έως 10 (mmol/mgDW*h).

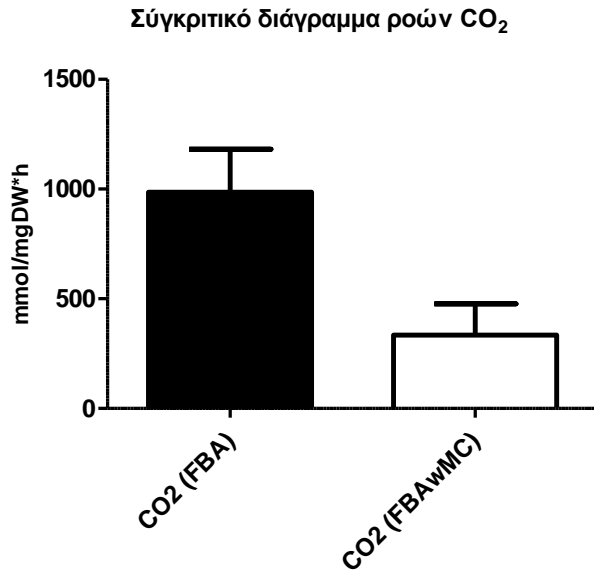
Το δεύτερο μέρος των προσομοιώσεων αφορούσε το φαινόμενο Warburg. Για τις προσομοιώσεις χρησιμοποιήθηκαν τα ελάχιστα υποστρώματα γλυκόζη και χολίνη τα οποία περιορίστηκαν σε μία σταθερή τιμή ροής ($v = -10 \text{ mmol/mgDW} \cdot \text{h}$) ενώ μεταβάλλονταν το οξυγόνο από $-10 \text{ mmol/mgDW} \cdot \text{h}$ έως $-200 \text{ mmol/mgDW} \cdot \text{h}$. Κατά την ανάλυση ισορροπίας ροών χωρίς τον περιορισμό που αφορά το μακρομοριακό συνωστισμό δεν παρατηρείται παραγωγή γαλακτικού οξέος σε αντίθεση με την ανάλυση ισορροπίας με τον περιορισμό. Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνονται τα αποτελέσματα από τις προσομοιώσεις όπου συγκρίνονται οι αλλαγές στις ροές των μεταβολιτών πριν και μετά την προσθήκη του περιορισμού (solvent capacity constraint).



Διάγραμμα 5.5 Σύγκριση ροών γαλακτικού οξέος στην ανάλυση ισορροπίας ροών με (FBAwMC) και χωρίς (FBA) τον περιορισμό στην ποσότητα των ενζύμων με κατανάλωση γλυκόζης -10 (mmol/mgDW*h).



Διάγραμμα 5.5 Διάγραμμα σύγκρισης της κατανάλωσης οξυγόνου και γλυκόζης στην ανάλυση ισορροπίας ροών με (FBAwMC) και χωρίς (FBA) τον περιορισμό στην ποσότητα των ενζύμων με κατανάλωση γλυκόζης -10 (mmol/mgDW*h).



Διάγραμμα 5.5 Διάγραμμα σύγκρισης παραγωγής CO₂ στην ανάλυση ισορροπίας ροών με (FBA) και χωρίς τον περιορισμό (FBAwMC) στην ποσότητα των ενζύμων με κατανάλωση γλυκόζης -10 (mmol/mgDW*h).

5.4 Συμπεράσματα

Η συνένωση των δύο μεταβολικών μοντέλων και η προσομοίωση τόσο του ρυθμούς ανάπτυξης όσο και του φαινομένου Warburg παρουσίασαν διάφορες δυσκολίες που οφείλονταν τόσο στη φύση των μοντέλων όσο και στην έλλειψη δεδομένων.

Συγκεκριμένα, ξεκινώντας από τη σύγκριση της δομής των δύο μοντέλων πρέπει να τονιστεί ότι το Recon1 είναι ένα ολοκληρωμένο μοντέλο η σύνταξη και η σημειωτική (sbml semantics) του οποίου έχει ελεγχθεί σε πολλά επίπεδα (curated model). Αυτό δεν ισχύει για το Hepatonet1 (non curated model) με αποτέλεσμα τα ονόματα μεταβολιτών και αντιδράσεων να είναι ασύμβατα μεταξύ τους. Έτσι, χρειάστηκε κάποιος χρόνος για να ταυτοποιηθούν τα ονόματα, να εισαχθούν μεταβολίτες και αντιδράσεις από το ένα στο άλλο.

Μία ακόμα δυσκολία αφορούσε τη διαφορά στο εύρος των προσομοιώσεων που μπορεί να καλύψει το κάθε μοντέλο. Το Recon1 είναι ένα μεταβολικό μοντέλο, κοινό για όλα τα ανθρώπινα κύτταρα (global reconstruction), δομημένο με σκοπό να προσομοιώσει μια πληθώρα φαινοτύπων. Αντίθετα, το

Hepatonet1 , είναι μια συλλογή αντιδράσεων και μονοπατιών που συνδέονται με χαρακτηριστικές λειτουργίες των ηπατοκυττάρων συνεπώς ο κύριος σκοπός του είναι να προσομοιώνει συγκεκριμένες λειτουργίες (παραγωγή χολής, αποτοξίνωση αμμωνίας κ.α.) και όχι την ανάπτυξη του κυττάρου. Έτσι, η προσομοίωση της ανάπτυξης ήταν μία πρόκληση καθώς οι δύο σκοποί αυτοί μπορούν να λειτουργούν ανταγωνιστικά επηρεάζοντας τα αποτελέσματα. Τέτοιου είδους προβλήματα, λύνονται μόνο με την ύπαρξη μεγαλύτερης ακρίβειας δεδομένων από εργαστηριακά πειράματα που καθοδηγούν και επιβεβαιώνουν τις προσομοιώσεις συνεπώς και τις προβλεπτικές ικανότητες του μοντέλου. Σε αυτή την εργασία έγινε προσπάθεια να επιλεγθούν οι καταλληλότερες αντιδράσεις ανταλλαγής (εξωτερικές ροές) ώστε να μην καταργείται η λειτουργικότητα του μοντέλου αλλά να προσομοιώνεται με επιτυχία η ανάπτυξη.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αδυναμίας του μοντέλου να ανταποκριθεί μόνον στις προσομοιώσεις που αφορούν την κυτταρική ανάπτυξη ήταν η ανικανότητα του να προσομοιώνει την ανάπτυξη μόνο με μία πηγή άνθρακα. Αυτό φαίνεται καθαρά στα διαγράμματα που παρουσιάζουν τη σχέση των υποστρωμάτων με την ανάπτυξη. Για μηδενική ροή υποστρώματος υπάρχει ρυθμός ανάπτυξης και αυτό γιατί πάντα υπάρχουν περισσότερες από μία πηγές άνθρακα. Η αδυναμία αυτή μπορεί να λυθεί μόνο με συγκεκριμένα δεδομένα.

Όσον αφορά, το δεύτερο μέρος, την προσομοίωση του φαινομένου Warburg η μεγαλύτερη δυσκολία ήταν η έλλειψη βιοχημικών δεδομένων. Ωστόσο, οι μέσες τιμές που θεωρήθηκαν έδωσαν ένα ικανοποιητικό αποτέλεσμα για το κύριο χαρακτηριστικό του φαινομένου που είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος. Όσον αφορά τις μεταβολές στο οξυγόνο και τη γλυκόζη, στην μία περίπτωση και την άλλη, αυτές είναι πιο δύσκολο να προσδιοριστούν καθώς δεν είναι τόσο μεγάλες ούτε και σε εργαστηριακά πειράματα όπως αυτή του γαλακτικού οξέος. Αυτό συνεπάγεται ότι για να παρατηρηθούν τέτοιες μεταβολές, θα πρέπει να υπάρχουν οι ανάλογες εργαστηριακές μετρήσεις, ώστε τα όρια των αντιδράσεων να τεθούν σωστά και να μπορούν να παρατηρηθούν εκτός από μεγάλες (γαλακτικό οξύ) και μικρότερες μεταβολές (βιομάζα, γλυκόζη, οξυγόνο).

Τέλος, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι όλες οι προσομοιώσεις της εργασίας αναδεικνύουν κυρίως ποιοτικές και ημιποσοτικές σχέσεις. Η λειτουργία ενός μοντέλου ως προβλεπτικό εργαλείο βασίζεται στα δεδομένα εισόδου και στις έγκυρες πειραματικές μετρήσεις που βοηθούν στη σύγκριση των

φαινοτύπων εργαστηριακά και υπολογιστικά. Συμπερασματικά, οι ποιοτικές αυτές σχέσεις είναι μία καλή ένδειξη για τη λειτουργικότητα του μοντέλου αλλά δεν αποτελούν ποσοτικό αποτέλεσμα. Αποτελούν όμως μία βάση για περαιτέρω προσομοιώσεις με αξιοποίηση διάφορων πειραματικών μετρήσεων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Andrew Finney, Michael Hucka, Systems Biology Markup Language (SBML) Level 2: Structures and Facilities for Model Definitions.
2. Alexei Vazquez¹, Zoltan N.Oltvai², Molecular Crowding Defines a Common Origin for the Warburg Effect in Proliferating Cells and the Lactate Threshold in Muscle Physiology
3. Adam M. Feista and Bernhard O. Palsson^b, The Biomass Objective Function
4. Bernhard, Palsson, Systems Biology (Properties of Reconstructed Networks), Cambridge University Press, April 2006
5. Christian Knöpfer, Clemens Beckstein¹, Peter Dittrich² and Nicolas Le Novre³, Structure, function, and behavior of computational models in systems biology
6. Gregory Stephanopoulos, Metabolic Fluxes and Metabolic Engineering
7. Gille C, Bölling C et al, HepatoNet1: a comprehensive metabolic reconstruction of the human hepatocyte for the analysis of liver physiology
8. Hiraoki Kitano, Perspectives on Systems Biology
9. Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition
10. Ines Thiele^{1,2} & Bernhard Palsson¹, A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction
11. Ines Thiele, Neil Swainston, Ronan M T Fleming, Andreas Hoppe et.al, A community-driven global reconstruction of human metabolism
12. Jong Min Lee, Erwin P.Gianchandani and Jason A. Papin, Flux balance analysis in the era of Metabolomics
13. Jeffrey D. Orth, Ines Thiele, and Bernhard Palson, What is flux balance analysis?
14. M. Koffas, C. Roberge, K. Lee, and G. Stephanopoulos, Metabolic Engineering

15. Matthew G. Vander Heiden^{1,2}, Lewis C. Cantley², and Craig B. Thompson³, Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation
16. Matthew A Oberhardt¹, Bernhard Palsson² and Jason A Papin¹, Applications of genome-scale metabolic reconstructions
17. Michael L. Shuler, Fikret Kargi, Μηχανική Βιοδιεργασιών, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ε.Μ.Π
18. Nathan D. Price, Jennifer L. Reed and Bernhard Palsson, Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints.
19. Natalie C. Duarte, Scott A. Becker, Neema Jamshidi, Ines Thiele, Monica L. Mo, Thuy D. Vo, Rohith Srivas, and Bernhard Palsson, Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data.
20. Neema Jamshidi and Bernhard Ø. Palsson, Metabolic Network Dynamics: Properties and Principles, ch2
21. Osbaldo Resendis-Antonio, Alberto Checa, Sergio Encarnacio, Modeling Core Metabolism in Cancer Cells: Surveying the Topology Underlying the Warburg Effect.
22. Peggy P. Hsu^{1,2} and David M. Sabatini¹, Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond
23. Gregory N. Stephanopoulos; Aristos A. Aristidou; Jens Nielsen, Metabolic Engineering (Principles and methodologies), Academic Press, 1998, ch, 1,2.
24. Q. K. Beg, A. Vazquez, J. Ernst, M. A. de Menezes, Z. Bar-Joseph, A.-L. Barabási, and Z. N. Oltvai, Intracellular crowding defines the mode and sequence of substrate uptake by Escherichia coli and constrains its metabolic activity.
25. Robert A. Gatenby and Robert J. Gillies, Why do cancers have high aerobic glycolysis?
26. Tomer Shlomi, Tomer Benyamini, Eyal Gottlieb, Eytan Ruppin, Genome-Scale Metabolic Modeling Elucidates the Role of Proliferative Adaptation in Causing the Warburg Effect.
27. Upadhyay M, Samal J, Kandpal M, Singh OV, Vivekanandan P., The Warburg effect: insights from the past decade.

28. Χρήστος Κουρουνιώτης, Γραμμική Άλγεβρα Ι, Σημειώσεις του μαθήματος M1122 βασισμένες στο βιβλίο του G.Strang, 2011