



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

---

Σχολή Χημικών Μηχανικών

*Μελέτη μοντελοποίησης του  
μεταβολικού δικτύου της  
ελαιοκράμβης*

Διπλωματική εργασία

**Κατσούδας Κυπριανός**

Υπεύθυνος καθηγητής: Κολίσης Φραγκίσκος

Ιούνιος 2012



## Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	4
Περίληψη.....	4
1. Μεταβολική μηχανική.....	5
1.1 Εξέλιξη και ορισμός.....	5
1.2 Αναλυτικό και συνθετικό στάδιο στην μεταβολική μηχανική.....	6
1.3 Μεταβολική ροή και μεταβολικό μονοπάτι.....	7
1.4 Διεπιστημονικότητα κλάδου.....	11
1.5 Σημαντικότητα της μεταβολικής μηχανικής.....	12
2. Βασικά μεταβολικά μονοπάτια.....	15
2.1 Επισκόπηση του κυτταρικού μεταβολισμού.....	15
2.2 Ενέργεια στα κύτταρα.....	18
2.3 Γλυκόλυση.....	19
2.4 Μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης.....	21
2.5 Κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος.....	23
2.6 Αναπνοή.....	25
3. Ανάλυση μεταβολικών ροών (MFA).....	27
3.1 Εισαγωγή.....	27
3.2 Θεωρία.....	29
3.3 Αδυναμίες της κλασσικής MFA.....	33
4. MFA με Ισοτοπική Ιχνηθέτηση (Isotope Labeling).....	35
4.1 Ιχνηθέτες και ισοτοπομερή.....	35
4.2 Διάδοση ιχνηθέτη.....	38
4.3 Μεθοδολογία υπολογισμών.....	40
4.4 Ερμηνεία πειραματικών μετρήσεων.....	42
5. Υπολογιστικό πλαίσιο MFA.....	45
5.1 Υπολογιστικά πακέτα .....	45
5.2 Μαθηματική θεμελίωση OpenFLUX .....	46
5.3 Περιγραφή λειτουργίας OpenFLUX .....	51
6. Μεταβολικό μοντέλο ελαιοκράμβης.....	56
6.1 Ελαιοκράμβη.....	56
6.2 Ανάπτυξη μεταβολικού μοντέλου ελαιοκράμβης.....	57
6.3 Συμπεράσματα.....	68
Βιβλιογραφία.....	69

## Πρόλογος

Το παρόν τεύχος περιέχει την διπλωματική εργασία του φοιτητή της ανώτατης Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ Κυπριανού Κατσούδα. 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 διευθύνοντας του καθηγητή κ. Φ. Κολίση και βοηθώντας του ερευνητή Αριστοτέλη Χατζηϊωάννου. Τέλος, στο πλαίσιο συνεργασίας με το γαλλικό εργαστήριο *Laboratoire de Technologie Enzymatique, Centre National de la Recherche Scientifique 6022, Universite de Technologie de Compiègne*, κατέστη δυνατή η λήψη και αξιοποίηση πειραματικών μετρήσεων.

Ο φοιτητής  
Κυπριανός Κατσούδας

## Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματεύεται τις βασικές αρχές της μεταβολικής μηχανικής και της ανάλυσης μεταβολικών ροών με ισοτοπική ιχνηθέτηση. Στη συνέχεια και με την αξιοποίηση δεδομένων μεταβολικών μετρήσεων επιχειρείται η δόμηση του μεταβολικού μοντέλου της ελαιοκράμβης. Πιο συγκεκριμένα, στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζεται η ιστορική εξέλιξη της μεταβολικής μηχανικής, εξηγούνται βασικές έννοιες αυτής (όπως είναι η μεταβολική ροή και το μεταβολικό μονοπάτι) και γίνεται λόγος για τη σημαντικότητα του κλάδου. Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται επισκόπηση του κυτταρικού μεταβολισμού, με έμφαση στην ενέργεια, και περιγράφεται η λειτουργία των μεταβολικών μονοπατιών της γλυκόλυσης και της φωσφορικής πεντόζης, του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος και της αναπνοής. Στο τρίτο κεφάλαιο περιγράφεται η θεωρία της ανάλυσης μεταβολικών ροών (MFA) και εξηγούνται οι αδυναμίες αυτής έναντι της MFA με ισοτοπική ιχνηθέτηση (και συγκεκριμένα  $^{13}\text{C}$  MFA) η οποία περιγράφεται στο τέταρτο κεφάλαιο, στο οποίο επίσης εξηγείται ο τρόπος διάδοσης του ιχνηθέτη στα βιολογικά συστήματα και πώς μπορούν να ληφθούν ποσοτικά πειραματικά δεδομένα μέσω μετρήσεων NMR και MS. Στο πέμπτο κεφάλαιο παρατίθεται το υπολογιστικό πλαίσιο για την MFA και περιγράφεται περιληπτικά η λειτουργία των 13C-FLUX και FiatFLux, ενώ γίνεται αναλυτική αναφορά για το OpenFLUX το οποίο χρησιμοποιείται στην εργασία αυτή. Στο έκτο και τελευταίο κεφάλαιο περιγράφεται ο τρόπος δόμησης του μεταβολικού μοντέλου της ελαιοκράμβης το οποίο αποτελείται από 310 αντιδράσεις. Τα τμήματα του μεταβολισμού που λαμβάνονται υπ' όψιν είναι η γλυκόλυση, το μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης – κύκλος του Calvin, ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος, και η βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και αμινοξέων. Στο τέλος αναφέρονται συμπεράσματα.

## *Abstract*

This thesis addresses the basic principles of metabolic engineering and metabolic flux analysis with isotope labeling. Then, using metabolic measurements data, it is attempted to construct the metabolic model of rapeseed (*Brassica napus*). More specifically, in the first chapter the historical development of metabolic engineering is presented, basic concepts are explained (such as metabolic flux and metabolic pathway) and refers to the importance of metabolic engineering. The second chapter gives an overview of cell metabolism, with emphasis on energy, and describes the function of metabolic pathways of glycolysis and pentose phosphate, the tricarboxylic acid cycle and respiration. The third chapter describes the theory of metabolic flux analysis (MFA) and its weaknesses compared to MFA with isotope labeling (ie  $^{13}\text{C}$  MFA) which is described in chapter four, in which is also explained how the tracer spreads in biological systems and how to take quantitative experimental data measured by NMR and MS. The fifth chapter deals with the computational framework for MFA, outlines the function of 13C-FLUX and FiatFLux, while there is a detailed reference for OpenFLUX, which is used in this work. The sixth and final chapter describes how the metabolic model of rapeseed is structured, which consists of 310 reactions. The parts of metabolism taken into account are glycolysis, the pentose phosphate pathway – Calvin cycle, the tricarboxylic acid cycle, and biosynthesis of fatty acids and amino acids. In the end, conclusions are mentioned.

# 1. Μεταβολική μηχανική

## 1.1 Εξέλιξη και ορισμός

Η μεταβολική μηχανική αποτελεί ένα σύγχρονο διεπιστημονικό κλάδο της μηχανικής ο οποίος ασχολείται με την ανάλυση και την τροποποίηση μεταβολικών μονοπατιών και κατ' επέκταση δικτύων. Η εξέλιξη ήταν ραγδαία τα τελευταία είκοσι χρόνια. Μέσω των τεχνικών της μοριακής βιολογίας και της μηχανικής χημικών διεργασιών η μεταβολική μηχανική αποτελεί πλέον κομβικό σημείο ερευνητικής δραστηριότητας στη χημική μηχανική, βιοχημική μηχανική, εφαρμοσμένη μικροβιολογία και κυτταρική φυσιολογία (cell physiology). Αν και η ιδέα της χειραγώγησης των μονοπατιών είχε ξανασυζητηθεί στο παρελθόν, το όραμα της αυτοτελούς ύπαρξης της μεταβολικής μηχανικής ως επιστημονικό κλάδο προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Bailey το 1991. Σύντομα έγινε αποδεκτή από μηχανικούς και βιολόγους, οι οποίοι διέκριναν την ευκαιρία για αξιοποίηση των πληροφοριών που προέκυπταν από τα πορίσματα της γονιδιωματικής έρευνας.

Η ιδέα της χειραγώγησης των μεταβολικών μονοπατιών με σκοπό την πρόσδοση επιθυμητών ιδιοτήτων σε μικροοργανισμούς είναι πολύ παλιά. Η στρατηγική αυτή έχει οδηγήσει σε θαυμαστά αποτελέσματα παραγωγής βιολογικών προϊόντων (βιταμίνες, πρωτεΐνες, αμινοξέα, αντιβιοτικά κ.α.). Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται κυρίως στη χρήση χημικών μεταλλαξιόνων και τεχνικών διαλογής των ισχυρότερων στελεχών για την επίτευξη συγκεκριμένων σκοπών. Παρά την επιτυχία και την ευρεία αποδοχή τους, τα γενετικά και μεταβολικά προφίλ των μεταλλαγμένων στελεχών ήταν πολύ πτωχά χαρακτηρισμένα και οι μεταλλαξιογενέσεις αντιμετωπίζονταν ως τυχαίες διαδικασίες χωρίς σημαντικό επιστημονικό υπόβαθρο.

Σημαντική ώθηση στη χειραγώγηση των μονοπατιών έδωσε η ανάπτυξη τεχνικών της μοριακής βιολογίας για τον ανασυνδυασμό του DNA. Η γενετική μηχανική επέτρεψε την τροποποίηση συγκεκριμένων ενζυμικών αντιδράσεων στα μεταβολικά μονοπάτια, με αποτέλεσμα την κατασκευή καλά ορισμένων γενετικών υποβάθρων. Λίγο χρόνο αφού κατέστη κατορθώσιμη η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, άρχισαν να εμφανίζονται νέοι όροι για την περιγραφή των πιθανών εφαρμογών αυτής της τεχνολογίας σχετικά με την τροποποίηση μονοπατιών. Κάποιοι από αυτούς είναι “Εξέλιξη *in vitro*”, “Κυτταρική μηχανική” κ.α. Ο όρος “Μεταβολική μηχανική” προτάθηκε το 1991 από τον Bailey.

Η μεταβολική μηχανική μπορεί να οριστεί ως: η στοχευμένη βελτίωση της παραγωγής προϊόντων ή κυτταρικών ιδιοτήτων μέσω της τροποποίησης συγκεκριμένων βιοχημικών αντιδράσεων ή μέσω της εισαγωγής νέων αντιδράσεων χρησιμοποιώντας την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA <sup>[1]</sup>. Το σημαντικό στον ορισμό αυτό είναι η τροποποίηση ή εισαγωγή “συγκεκριμένων” αντιδράσεων. Αφού επιλεχθούν αυτές οι αντιδράσεις-στόχοι, χρησιμοποιούνται καθιερωμένες τεχνικές μοριακής βιολογίας ώστε να ενισχυθεί, ανασταλεί ή διαγραφεί, μεταφερθεί, ή απορυθμιστεί το συγκεκριμένο γονίδιο ή ένζυμο που αντιστοιχεί στις συγκεκριμένες αντιδράσεις.

---

Τα νούμερα εντός αγκυλών [ ] παραπέμπουν στον βιβλιογραφικό πίνακα στο τέλος της εργασίας

## **1.2 Αναλυτικό και συνθετικό στάδιο στην μεταβολική μηχανική**

Η μεταβολική μηχανική, όπως και κάθε παραδοσιακός κλάδος της μηχανικής, εμπεριέχει τα δύο καθοριστικά στάδια της *ανάλυσης* και της *σύνθεσης*. Αρχικά δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην συνθετική πλευρά του κλάδου. Αυτό συνέβη επειδή βρέθηκε πρόσφορο έδαφος για εφαρμογές της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA, από την οποία και απέρρευσε η μεταβολική μηχανική. Κάποιες από τις εφαρμογές αυτές ήταν: έκφραση νέων γονιδίων σε διάφορα κύτταρα-ξενιστές, ενίσχυση ενδογενών ενζύμων, διαγραφή γονιδίων ή διαμόρφωση γονιδιακής δραστηριότητας, μεταγραφική ή ενζυμική απορύθμιση κλπ. Μέσω της αρχικής αυτής προσέγγισης όμως, η μεταβολική μηχανική μπορούσε να χαρακτηριστεί περισσότερο ως τεχνολογική έκφραση των εφαρμογών της μοριακής βιολογίας και λιγότερο ως κλάδος της μηχανικής. Η μηχανική πλευρά αρχίζει να διαφαίνεται περισσότερο εστιάζοντας στο αναλυτικό στάδιο.

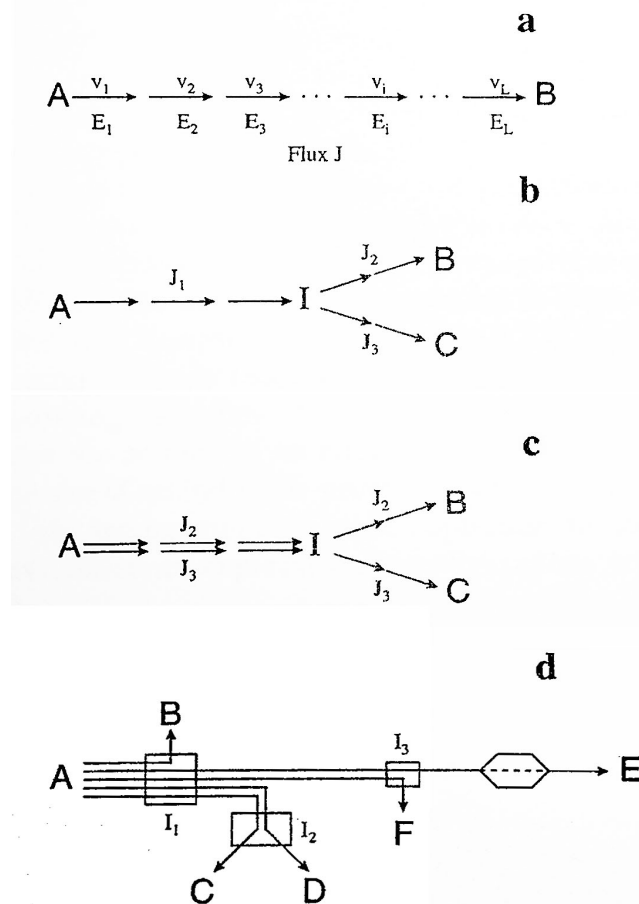
Μέσω της ανάλυσης μπορούν να αναγνωριστούν οι σημαντικές παράμετροι που καθορίζουν την φυσιολογία ενός βιολογικού συστήματος. Οι πληροφορίες αυτές μπορούν να αξιοποιηθούν ώστε να αναγνωριστεί ο μηχανισμός ρύθμισης ενός μεταβολικού δικτύου και να προταθούν συγκεκριμένα σημεία-στόχοι, τα οποία αν τροποποιηθούν μπορούν να επιτευχθούν συγκεκριμένοι σκοποί. Έπειτα μπορεί να ερευνηθεί το πλήρες βιοχημικό αντίκτυπο των γενετικών και ενζυμικών τροποποιήσεων με σκοπό να σχεδιαστεί ένας νέος γύρος τροποποιήσεων κ.ο.κ., έως ότου επιτευχθεί ο ζητούμενος σκοπός. Επίσης, μπορεί να καθοριστεί διαδικασία επιλογής των σημείων που μέλλουν να τροποποιηθούν ώστε να επιτευχθεί το ζητούμενο ταχύτερα. Αυτά είναι μερικά μόνο από τα ζητήματα που εξετάζονται κατά την ανάλυση στην μεταβολική μηχανική.

Μέσω της σύνθεσης γίνεται περισσότερο φανερό ότι η μεταβολική μηχανική εστιάζει σε ολοκληρωμένα μεταβολικά μονοπάτια αντί σε μεμονωμένες αντιδράσεις. Ως εκ τούτου, εξετάζει ολοκληρωμένα βιοχημικά δίκτυα αντιδράσεων, μονοπάτια και ροές κατά μήκος αυτών, καθώς και τη ρύθμιση τους (λαμβάνοντας υπ' όψιν θέματα ως προς τη σύνθεση των μονοπατιών, τη θερμοδυναμική εφικτότητα, κ.α.). Παρατηρείται επομένως μία μετατόπιση ενδιαφέροντος από μεμονωμένες ενζυματικές αντιδράσεις προς συστήματα βιοχημικών αντιδράσεων που αλληλεπιδρούν. Στο πλαίσιο αυτό, ο όρος μεταβολικό δίκτυο αποδεικνύεται ήσσονος σημασίας υπό την έννοια ότι ένα σύστημα αντιδράσεων στο σύνολό του μπορεί να περιγράψει τον μεταβολισμό και την κυτταρική λειτουργία καλύτερα έναντι αντιδράσεων απομονωμένων μεταξύ τους. Μέσω της μεταβολικής μηχανικής η προσοχή στρέφεται προς το σύστημα αντί προς τα αποτελούντα αυτό μέρη. Επομένως, η μεταβολική μηχανική επιδιώκει να σχεδιάσει και να συνθέσει, αξιοποιώντας δεδομένα και τεχνικές που έχουν προκύψει από εκτενή αναγωγιστική (reductionist) έρευνα. Με τη σειρά τους, οι παρατηρήσεις σχετικά με τη συμπεριφορά του όλου συστήματος είναι ο καλύτερος οδηγός για περαιτέρω ορθολογική αποδόμηση και ανάλυση.

### 1.3 Μεταβολική ροή και μεταβολικό μονοπάτι

Μία από τις σημαντικότερες έννοιες της μεταβολικής μηχανικής είναι η μεταβολική ροή (metabolic flux). Η έννοια αυτή και η ρύθμισή της μελετάται εδώ και σαράντα χρόνια από αρκετούς βιοχημικούς και τα πορίσματα της έρευνας βρίσκουν εφαρμογή στην μεταβολική μηχανική. Μπορεί να λεχθεί ότι: ο συνδυασμός αναλυτικών τεχνικών για την ποσοτικοποίηση των ροών και της ρύθμισής τους, μαζί με τεχνικές μοριακής βιολογίας για την εφαρμογή προτεινόμενων γενετικών τροποποιήσεων, αποτελούν την ουσία της μεταβολικής μηχανικής <sup>[1]</sup>. Όταν τα ανωτέρω χρησιμοποιηθούν με επαναληπτικό τρόπο, προκύπτει μία ισχυρή μέθοδος για την συστηματική βελτίωση κυτταρικών ιδιοτήτων σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών.

Η ροή αποτελεί ένα θεμελιώδη παράγοντα καθορισμού της φυσιολογίας του κυττάρου και την πιο κρίσιμη παράμετρο ενός μεταβολικού μονοπατιού.



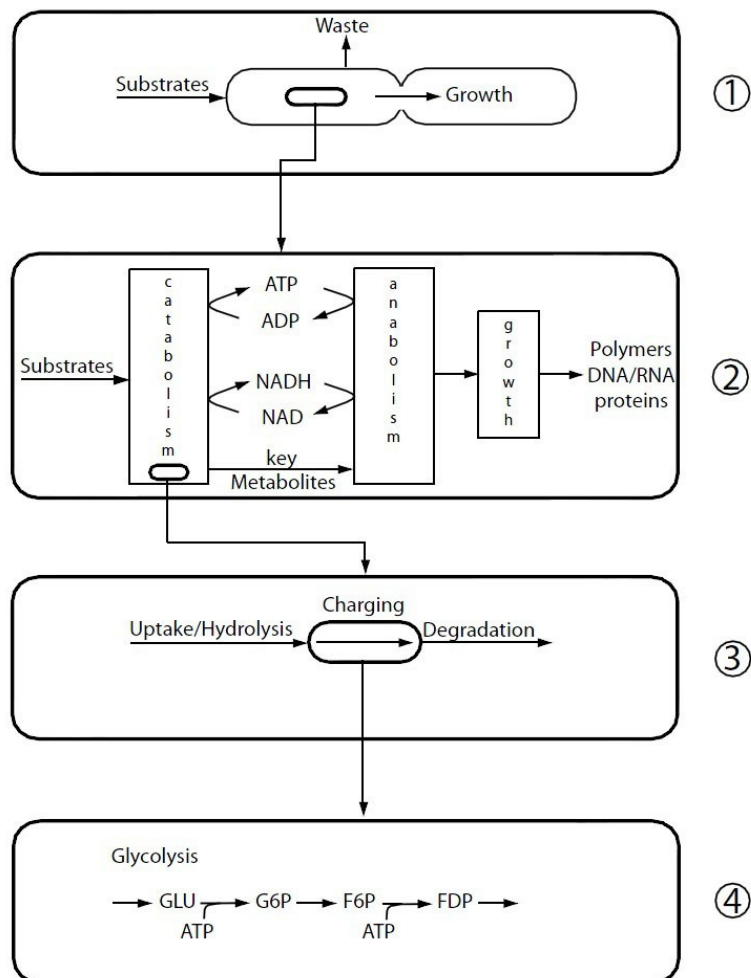
Εικόνα 1. Παραδείγματα απλών μονοπατιών <sup>[1]</sup>.

Για το γραμμικό μονοπάτι της Εικ. 1a, η ροής του,  $J$ , ισούται με τους ρυθμούς των επιμέρους αντιδράσεων σε σταθερή κατάσταση. Προφανώς, η σταθερή κατάσταση επιτυγχάνεται όταν μετά από αυξομείωση των συγκεντρώσεων των ενδιάμεσων μεταβολιτών προκύψει εξίσωση των ρυθμών των αντιδράσεων ( $v_1 = v_2 = \dots v_i \dots = v_L$ ). Κατά τη διάρκεια μιας μεταβατικής κατάστασης, οι επιμέρους ρυθμοί δεν είναι ίσοι μεταξύ τους και η ροή του μονοπατιού είναι μεταβλητή και όχι σαφώς καθορισμένη. Για το διακλαδισμένο μονοπάτι της Εικ. 1b (διάσπαση στο ενδιάμεσο I) εμφανίζονται δύο επιπλέον ροές για κάθε ένα από τα δύο μονοπάτια-κλάδους. Σε



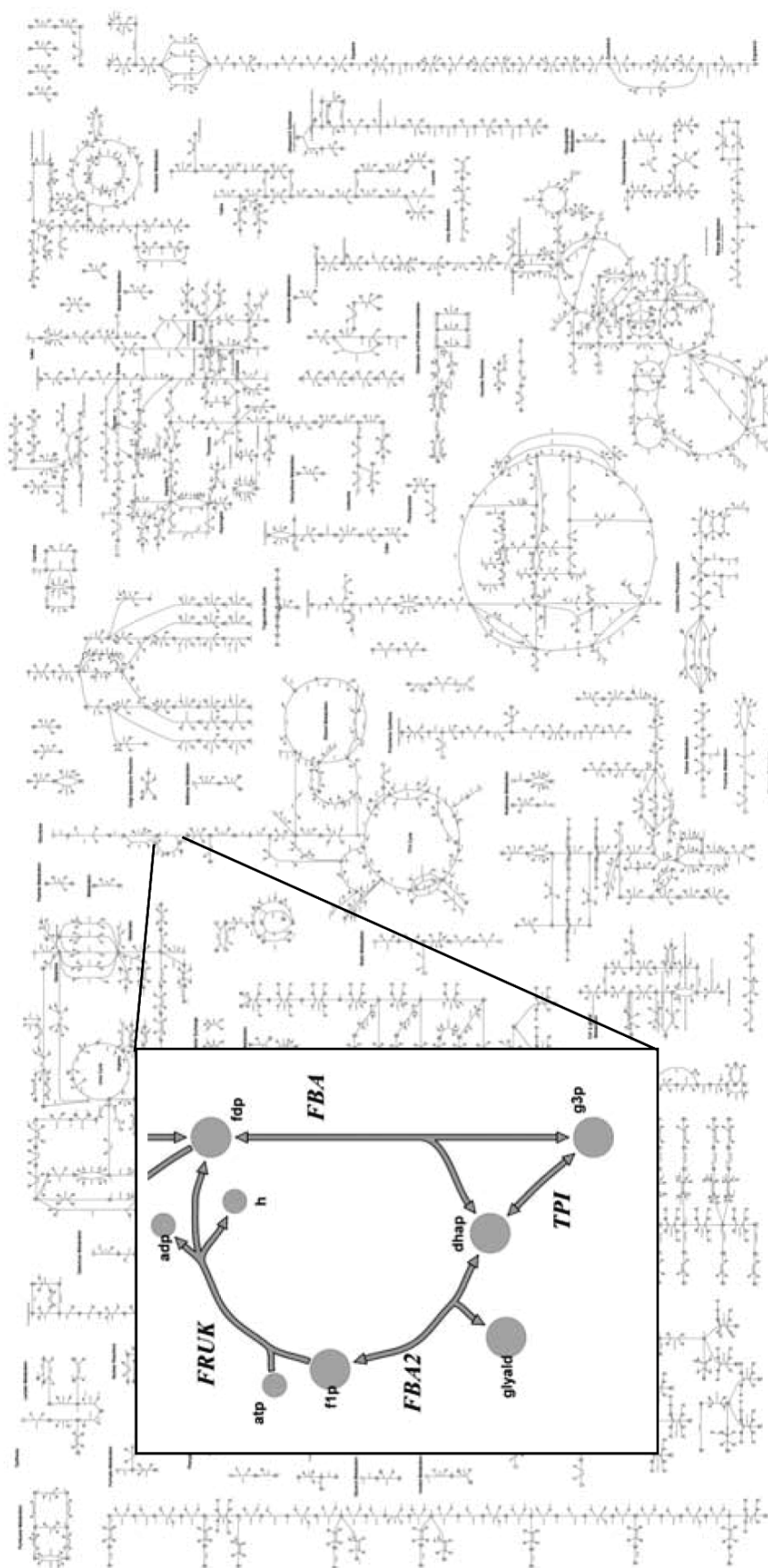
σταθερή κατάσταση οι ροές συνδέονται μέσω της σχέσης:  $J_1 = J_2 + J_3$ , με τις ροές κάθε κλάδου να ισούνται με τους αντίστοιχους ρυθμούς αντιδράσεων του κλάδου. Είναι συχνά βολικό η ροή  $J_1$  να θεωρείται ως ο συνδυασμός των ροών  $J_2$  και  $J_3$  (Εικ. 1c). Με τον τρόπο αυτό, ένα πολύπλοκο δίκτυο (Εικ. 1d) μπορεί να διασπαστεί σε αρκετά γραμμικά μονοπάτια, καθένα από τα οποία έχει τη δική του ροή. Πρέπει να σημειωθεί ότι για κάθε μονοπάτι της Εικ. 1 μία αναγκαία συνθήκη για την επίτευξη σταθερής κατάστασης είναι οι ρυθμοί των αρχικών και τελικών αντιδράσεων (ή ισοδύναμα, οι συγκεντρώσεις των αρχικών και τελικών μεταβολιτών A, B και C αντίστοιχα) να είναι σταθεροί. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται διατηρώντας σταθερές τις εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις των μεταβολιτών σε ένα βιοαντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας (συνεχής καλλιέργεια – chemostat).

Καθώς τα μεταβολικά μονοπάτια (ή οδοί) και οι ροές τους βρίσκονται στο επίκεντρο της μεταβολικής μηχανικής είναι σημαντικό να δοθούν οι ορισμοί τους και να εξηγηθεί κατά το δυνατόν η σημασία τους. Ως *μεταβολικό μονοπάτι ορίζεται κάθε ακολουθία εφικτών και παρατηρήσιμων αντιδράσεων-βημάτων που συνδέουν ένα καθορισμένο σύνολο μεταβολιτών εισόδου και εξόδου* [1]. Η ροή του μονοπατιού ορίζεται έπειτα ως ο ρυθμός κατά τον οποίο οι μεταβολίτες εισόδου αντιδρούν ώστε να σχηματιστούν οι μεταβολίτες εξόδου. Τα σημαντικά σημεία στους ορισμούς αυτούς είναι η *εφικτότητα* και η *παρατηρησιμότητα*. Πρώτον, δεν θα είχε νόημα να συμπεριληφθούν αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα τα οποία δεν υφίστανται σε ένα κύτταρο. Ομοίως, δεν έχει νόημα η συγκαταρίθμηση εφικτών αντιδράσεων μεταξύ υποστρωμάτων και προϊόντων οι οποίες, ωστόσο, δεν μπορούν να παρατηρηθούν πειραματικά. Τα σημεία αυτά είναι πολύ σημαντικά και είναι ενδεικτικά της ποικιλίας και της πολυπλοκότητας των μεταβολικών χαρτών που έχουν κατασκευαστεί, ως αποτέλεσμα πρωτοπόρας έρευνας στη βιοχημεία, τα προηγούμενα εξήντα χρόνια. Πολύ συχνά υπάρχουν περισσότερες από μία ακολουθίες αντιδράσεων μεταξύ συγκεκριμένων μεταβολιτών εισόδου και εξόδου. Αν όμως οι ροές των ενδιάμεσων αυτών ακολουθιών δεν μπορούν ανεξάρτητα να προσδιοριστούν, τότε η ένταξή τους στο δίκτυο δεν θα προσφέρει επιπλέον χρήσιμες πληροφορίες. Για τον λόγο αυτό είναι συνήθως προτιμότερο οι αντιδράσεις αυτές να συμπυκνωθούν σε μικρότερο αριθμό μονοπατιών των οποίων οι ροές μπορούν να παρατηρηθούν. Αντικείμενο συνεχούς έρευνας είναι η προσπάθεια (π.χ. μέσω πειραματικών μετρήσεων) να διαφωτιστεί η λειτουργία των συνεπτυγμένων αυτών μονοπατιών καθώς με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η ανάλυση (resolution) του βιοχημικού δικτύου. Η έννοια της μεταβολικής ροής, των μεθόδων για τον προσδιορισμό των ροών in vivo, η υπολογιστική μοντελοποίηση των μεταβολικών δικτύων in silico, και των συμπερασμάτων που μπορούν να εξαχθούν από τη συστηματική μελέτη των μεταβολικών ροών αποκαλούνται συλλήβδην *ανάλυση μεταβολικών ροών (Metabolic Flux Analysis – MFA)*. Στην Εικόνα 2 δίνεται μία σχηματική αναπαράσταση των σχετικών μεγεθών των εννοιών που συζητούνται. Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται, ως παράδειγμα, το μεταβολικό δίκτυο (αποτελούμενο από πολλά μεταβολικά μονοπάτια) της ζύμης [2].



Εικόνα 2. Εξέταση του μεταβολισμού ενός κυττάρου σε τέσσερα επίπεδα. 1: Κύτταρο, 2: Μεταβολικός τομέας, 3: Μεταβολικό μονοπάτι, 4: Μεμονωμένες αντιδράσεις [2]

Στο πλαίσιο της ανάλυσης των μεταβολικών μονοπατιών και ροών, θεμελιώδη στόχο στη μεταβολική μηχανική, αποτελεί ο προσδιορισμός των παραγόντων και των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για την ρύθμιση των μεταβολικών ροών. Η καλύτερη κατανόηση του τρόπου ρύθμισης των ροών παρέχει τη βάση για την ορθολογική τροποποίηση των μεταβολικών οδών. Υπάρχουν τρία βήματα στη διαδικασία για τη συστηματική διερεύνηση των μεταβολικών ροών και τη ρύθμισή τους. Το πρώτο βήμα είναι η ανάπτυξη μέσων για την παρατήρηση όσο το δυνατόν περισσότερων μεταβολικών μονοπατιών και για τη μέτρηση των ροών τους. Για το σκοπό αυτό, λαμβάνονται αρχικά υπ' όψιν απλά ισοζύγια συστατικών που βασίζονται σε μετρήσεις συγκεντρώσεων των εξωκυτταρικών μεταβολιτών. Στο δεύτερο βήμα, εισάγονται στο βιοχημικό δίκτυο καλά καθορισμένες διαταραχές, το σύστημα αφήνεται να ηρεμήσει σε νέα σταθερή κατάσταση και έπειτα προσδιορίζονται οι μεταβολικές ροές. Στο τρίτο και τελευταίο βήμα αναλύονται τα αποτελέσματα της διαταραχής των ροών. Εξαιτίας της σημαντικότητας της ρύθμισης των μεταβολικών δικτύων έχει ήδη αναπτυχθεί από τη δεκαετία του 1970 το πλαίσιο της ανάλυσης μεταβολικής ρύθμισης (*Metabolic Control Analysis*).



Εικόνα 3. Μεταβολικό δίκτυο ζύμης [2].

## 1.4 Διεπιστημονικότητα κλάδου

Η μεταβολική μηχανική, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι ένας ιδιαίτερα διεπιστημονικός κλάδος ο οποίος συνδέεται με βιολογικές επιστήμες, μαθηματικές επιστήμες, τεχνολογία υπολογιστών και κλάδους μηχανικής (κυρίως χημική μηχανική). Η *βιοχημεία* έχει παράσχει βασικούς μεταβολικούς χάρτες και ένα πλούτο πληροφοριών σχετικά με τους μηχανισμούς των βιοχημικών αντιδράσεων, την κινητική και τη ρύθμισή τους. Επιπλέον, ολόκληρο το πεδίο της μεταβολικής ρύθμισης (MCA) ξεκίνησε από τη βιοχημεία πριν γίνει αποδεκτό από τους κύκλους των μηχανικών. Η γενετική και η μοριακή βιολογία παρέχουν τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται κατά την κατασκευή καλά χαρακτηρισμένων γενετικών υποβάθρων, ένα σημαντικό βήμα κατά τη μελέτη της μεταβολικής ρύθμισης. Επιπροσθέτως, οι δύο αυτοί επιστημονικοί κλάδοι παίζουν καθοριστικό ρόλο στις απαραίτητες γενετικές τροποποιήσεις ώστε να κατασκευαστούν υπερέχοντα παραγωγικά στελέχη οργανισμών. Η *τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA* ήταν εξ' αρχής σημαντική εφόσον αυτή ήταν που έδωσε την αρχική ώθηση για τον καθορισμό και την εξέλιξη της μεταβολικής μηχανικής. Η *κυτταρική φυσιολογία (cell physiology)* έχει δώσει μία πιο ολοκληρωμένη εικόνα της λειτουργίας του κυτταρικού μεταβολισμού, καθορίζοντας έτσι τη βάση για τη μελέτη των μεταβολικών ρυθμών και την αναπαράσταση των φυσιολογικών καταστάσεων οργανισμών (physiological states). Η *χημική μηχανική* αποδεικνύεται ως ο πλέον κατάλληλος κλάδος της μηχανικής για να αξιοποιηθεί στη μελέτη των βιολογικών συστημάτων. Σε γενικές γραμμές, η μηχανιστική προσέγγιση αυτή, εμποτίζει τις έννοιες της *ολοκλήρωσης (integration)*, *ποσοτικοποίησης (quantitation)* και *σχετικότητας (relevance)* στη μελέτη των βιολογικών συστημάτων. Πιο συγκεκριμένα, παρέχει την εμπειρία και τα εργαλεία για την ανάλυση συστημάτων τα οποία περιορίζονται από τους ρυθμούς των διεργασιών, πεδίο στο οποίο έχει συμβάλει δυναμικά η χημική μηχανική και στο οποίο έχει συχνά διαπρέψει. Τέλος, η τεχνολογία υπολογιστών, παρέχει τα πλέον σύγχρονα εργαλεία για την κατασκευή και ανάλυση μεταβολικών δικτύων, των οποίων η λειτουργία *in silico* απαιτεί συχνά μεγάλη επεξεργαστική ισχύ.

Η διεπιστημονική φύση της μεταβολικής μηχανικής αποτελεί σίγουρα πλεονέκτημα για την επίτευξη των στόχων της. Την ίδια στιγμή όμως, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη εντοπισμού των στοιχείων που την διαφοροποιούν από άλλα συναφή πεδία. Σύμφωνα με [1] τα ιδιαίτερα αυτά χαρακτηριστικά είναι οι έννοιες του μεταβολικού μονοπατιού, της ροής αυτού, και των παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμιση των μεταβολικών ροών τόσο σε απλά μονοπάτια όσο και σε πιο ρεαλιστικά μεταβολικά δίκτυα. Επιπλέον, πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν θεωρητικές και πειραματικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των μεταβολικών ροών *in vivo*, συμπεριλαμβανομένων ισοζυγίων συστατικών, χρήση ισοτοπικής ιχνηθέτησης, και εφαρμογή φασματοσκοπικών μεθόδων (π.χ. φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού – NMR) και των παραλλαγών τους (π.χ. αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας – GC-MS) για τον πειραματικό υπολογισμό του ισοτοπικού εμπλουτισμού και των κατανομών μοριακών βαρών βασικών μεταβολιτών. Τα ιδιαίτερα αυτά χαρακτηριστικά αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της μεταβολικής μηχανικής και εξηγούνται κατά το δυνατόν στις επόμενες ενότητες της εργασίας αυτής.

## 1.5 Σημαντικότητα της μεταβολικής μηχανικής

Η μεταβολική μηχανική είναι ένας κλάδος με μεγάλη θεωρητική και πρακτική σημασία. Οι βασικές συνεισφορές της σχετίζονται με την κατανόηση και τον υπολογισμό των μεταβολικών ροών, την λειτουργία των μεταβολικών οδών και την συμπεριφορά των μεταβολικών δικτύων.

Η μεταβολική μηχανική προσφέρει έναν από τους καλύτερους τρόπους για την ουσιαστική συμμετοχή των χημικών μηχανικών στη βιολογική έρευνα, καθώς επιτρέπει την άμεση εφαρμογή των βασικών θεμάτων της κινητικής, των φαινομένων μεταφοράς και της θερμοδυναμικής στην ανάλυση των αντιδράσεων των μεταβολικών δικτύων. Στο πλαίσιο αυτό, τα δίκτυα (και κατ' επέκταση τα κύτταρα) μπορούν να θεωρηθούν ως βιοχημικά εργοστάσια των οποίων οι μονάδες είναι τα μεμονωμένα ένζυμα, λαμβάνοντας υπ' όψιν παρόμοια (προς τα χημικά εργοστάσια) θέματα σχεδιασμού, ρύθμισης και βελτιστοποίησης. Έτσι παραδείγματος χάριν, κατά την προσπάθεια κλιμάκωσης της ροής του άνθρακα που επεξεργάζεται ένας μικροοργανισμός, επιλέγεται να ενισχυθεί η λειτουργία συγκεκριμένων ενζύμων. Η προσπάθεια αυτή μπορεί να επωφεληθεί από τις ήδη αποδεκτές αρχές κλιμάκωσης των χημικών εργοστασίων, κατά την οποία μεγεθύνονται συντονισμένα κάποιες βασικές μονάδες επεξεργασίας. Ομοίως, η βελτιστοποίηση της απόδοσης εξαρτάται από την ελαχιστοποίηση της παραγωγής παραπροϊόντων που μπορεί να επιτευχθεί μέσω βέλτιστης κατανομής των ροών. Φυσικά, η βελτιστοποίηση της ροής καθίσταται δυνατή μόνο αφού εντοπιστούν και εξηγηθούν οι παράγοντες που ρυθμίζουν τη ροή.

Όπως έχει αναφερθεί, η διαλεύκανση του τρόπου ρύθμισης της ροής προσφέρει μεγάλες ευκαιρίες ορθολογικού σχεδιασμού του ενζυματικού προφίλ ενός κυτταρικού καταλύτη. Η δραστηριότητα αυτή πρέπει να θεωρηθεί ως συμπληρωματική στις εργαλειοθήκες της μοριακής βιολογίας για την πραγματοποίηση μεταφοράς γονιδίων και άλλες παρόμοιες τροποποιήσεις. Στην πραγματικότητα, το τελευταίο έχει αναπτυχθεί ταχύτατα τα τελευταία χρόνια, σε σημείο που η ορθολογική ανάλυση των μεταβολικών μονοπατιών για τον εντοπισμό των γονιδίων και ενζύμων-στόχων να αποτελεί περιοριστική συνιστώσα στο δρόμο προς την επίτευξη της βελτιστοποίησης της κυτταρικής λειτουργίας. Απόδειξη για τον ισχυρισμό αυτό, είναι η παρατήρηση ότι σήμερα, σχεδόν 30 χρόνια μετά τις πρωτοποριακές εξελίξεις στον τομέα της γενετικής μηχανικής, έχουμε πολύ λίγες σημαντικές εφαρμογές της σύγχρονης βιοτεχνολογίας στους τομείς των καυσίμων, χημικών, ή παραγωγής προϊόντων (με την εξαίρεση πιθανώς των βιομηχανικών ενζύμων). Αυτό συμβαίνει παρά το γεγονός ότι δύο εκ των τεσσάρων πρώτων εταιρειών βιοτεχνολογίας είχαν εξαρχής επικεντρώσει τους επιχειρηματικούς τους στόχους σε αυτούς τους τομείς. Μετέπειτα το ενδιαφέρον στράφηκε προς ιατρικές εφαρμογές καθώς αποδείχθηκαν τεχνικά ευκολότερες και οικονομικά ελκυστικότερες.

Μπορεί να υποστηριχθεί ότι το τοπίο βιοτεχνολογικών εφαρμογών αλλάζει με ταχείς ρυθμούς και ότι στο μέλλον θα δοθούν ευκαιρίες για εφαρμογές στον βιομηχανικό τομέα. Υπάρχουν τρεις κινητήριες δυνάμεις υποστηρικτικές αυτού του ισχυρισμού, δύο εκ των οποίων είναι οικονομικές και μία τεχνική

Η πρώτη κινητήρια δύναμη πίσω από τις βιομηχανικές εφαρμογές είναι η συνεχής αύξηση του όγκου παραγωγής υδατανθράκων σε διεθνές επίπεδο. Ο πόρος αυτός είναι πολύ φυσικό να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή παραγώγων προϊόντων μέσω της βιοτεχνολογίας. Κάποια από τα

προϊόντα αυτά έχουν αναπτύξει συγκεκριμένες αγορές, αρκετά άλλα όμως, ιδίως στον τομέα των υλικών, θα αποτελούν εντελώς νέες εφαρμογές με αρκετά σημαντικές επιχειρηματικές ευκαιρίες.

Η δεύτερη κινητήρια δύναμη εντοπίζεται στη συνεχώς καθοδική πορεία του κόστους παραγωγής βιοτεχνολογικών προϊόντων σε σύγκριση με την αυξανόμενη τάση του κόστους προϊόντων που παράγονται από χημικές διεργασίες. Οι λόγοι για αυτές τις τάσεις δεν είναι απολύτως σαφείς. Ωστόσο, η αξιοποίηση οικονομιών κλίμακας σε μονάδες ζύμωσης σε βιομηχανικό επίπεδο καθώς και το αυξανόμενο οικονομικό βάρος για τη συμμόρφωση των χημικών διεργασιών σε περιβαλλοντικά πρότυπα, έχουν οπωσδήποτε συνεισφέρει στη διαμόρφωση των τάσεων αυτών. Αν και ακόμη δεν είναι όλες οι βιοτεχνολογικές εφαρμογές πλήρως ανταγωνιστικές με τις χημικές, ωστόσο, υπάρχει μία γενική αίσθηση ότι οι καμπύλες κόστους των δύο μεταβάλλονται με διαφορετικές κλίσεις και σύντομα θα διασταυρωθούν. Σύμφωνα με βιομηχανικούς επιστήμονες, ο πιο σημαντικός παράγοντας επιτάχυνσης της τάσης αυτής είναι οι βελτιώσεις στην επιλεκτικότητα των προϊόντων που εισήχθη στις βιοδιεργασίες από τη μεταβολική μηχανική.

Η τελευταία κινητήρια δύναμη βρίσκεται στην ισχύ των τεχνολογιών που αναπτύσσονται από τη σύγχρονη μοριακή βιολογία. Οι τεχνολογίες αυτές δεν έχουν ακόμη συνδυαστεί με μια ανάλογη δυνατότητα επιλογής κρίσιμων ενζύμων προς χειραγώγηση. Η πρόοδος των τελευταίων ετών, όμως, παρέχει αισιοδοξία σχετικά με την ανάπτυξη μεθοδολογιών που θα επιτρέψουν την επιλογή των ενζύμων αυτών στα μεταβολικά δίκτυα, καθώς και το είδος των τροποποιήσεων που απαιτούνται ώστε να αλλάξουν σημαντικά οι αποδόσεις παραγωγής επιθυμητών προϊόντων.

Η μεταβολική μηχανική μπορεί να συνεισφέρει στη βιομηχανική παραγωγή διαφόρων προϊόντων όπως είναι τα παράγωγα του πετρελαίου (π.χ. παραγωγή θερμοπλαστικών μέσω ζύμωσης), στην παραγωγή νέων προϊόντων, και στην παραγωγή νέων βιολογικά ενεργών ουσιών όπως τα πολυκετίδια (polyketides). Επιπλέον, η παραγωγή κόμμεων, διαλυτών, πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών, διαφόρων αντιβιοτικών, τροφίμων, βιοαερίου, ολιγοπεπτιδίων, αλκοολών, οργανικών οξέων, βιταμινών και αμινοξέων, βακτηριακών κυτταρινασών, παραγώγων της γλουταθειόνης, λιπιδίων, ελαίων και χρωστικών ουσιών είναι μόνο κάποιες από τις κατηγορίες προϊόντων που έχουν ήδη παραχθεί βιολογικά και τη στιγμή αυτή βρίσκονται στο στόχαστρο των μεταβολικών τροποποιήσεων, κατά κύριο λόγο σε μικροοργανισμούς. Νέα επιτεύγματα στις αρχές της μεταβολικής μηχανικής, θα έχουν άμεσο αντίκτυπο στην απόδοση και την οικονομία αυτών των διεργασιών.

Ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στο ότι, σε βιομηχανικό επίπεδο, ο απώτερος πρακτικός σκοπός της μεταβολικής μηχανικής είναι ο σχεδιασμός και η κατασκευή βέλτιστων βιοκαταλυτών. Βέλτιστων όσον αφορά τη μεγιστοποίηση της απόδοσης και της παραγωγικότητας των επιθυμητών προϊόντων. Με αυτή την έννοια, η μεταβολική μηχανική είναι ισοδύναμη με την κατάλυση στη χημική βιομηχανία, και αν και μπορεί να είναι δύσκολο να προβλεφθούν με ακρίβεια οι βραχυπρόθεσμες κατευθύνσεις του τομέα, η προηγούμενη αναλογία καθιστά ευκολότερη την εκτίμηση του μακροπρόθεσμου αντίκτυπου της μεταβολικής μηχανικής. Ο αντίκτυπος αυτός θα προέλθει κυρίως από την ανάπτυξη μιας εντελώς νέας βιομηχανίας γύρω από το θεμελιώδη πυρήνα της εφαρμοσμένης μοριακής βιολογίας και γύρω από τις τεχνολογίες που προκύπτουν από αυτήν. Όπως ακριβώς η χημική μηχανική εξελίχθηκε κατά τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα ως ο κλάδος των βιομηχανικών εφαρμογών που σαν κέντρο είχαν την χημεία, με τον ίδιο

τρόπο μπορεί να εμφανιστεί στον 21<sup>ο</sup> αιώνα ένας νέος κλάδο βιοχημικής (ή βιολογικής-μεταβολικής) μηχανικής με σκοπό την ανάπτυξη βιομηχανικών εφαρμογών της μοριακής βιολογίας. Το κεντρικό μοντέλο της μεταβολικής μηχανικής διαμορφώνεται σύμφωνα με αυτό της χημικής μηχανικής. Από την άποψη αυτή, η μεταβολική μηχανική, στοχεύοντας στην ανάπτυξη βιοκαταλυτών για την αριστοποίηση των διεργασιών, θα παίξει τον ίδιο ρόλο στις βιολογικές διεργασίες τον οποίο έχει παίξει για πολλά χρόνια η κατάλυση στις χημικές διεργασίες. Ακριβώς όπως πολλές χημικές διεργασίες έγιναν πραγματικότητα μόνο αφότου αναπτύχθηκαν κατάλληλοι χημικοί καταλύτες, η τεράστια δυναμική της βιοτεχνολογίας θα γίνει πλήρως αντιληπτή όταν θα αναπτυχθούν βιοκαταλύτες, σε σημαντικό βαθμό μέσω της μεταβολικής μηχανικής. Η τρέχουσα ερευνητική δραστηριότητα πάνω σε θέματα αλληλουχίας των γονιδιωμάτων πολλών διαφορετικών μικροοργανισμών, φυτών και άλλων ειδών φέρνει αυτές τις δυνατότητες πολύ κοντά στην πραγματικότητα. Αυτή είναι η βάση πάνω στην πρέπει να αξιολογείται η μακροπρόθεσμη δυναμική της μεταβολικής μηχανικής.

Πέραν των βιομηχανικών εφαρμογών που αναφέρθηκαν, η μεταβολική μηχανική θα έχει σημαντικό αντίκτυπο και στον ιατρικό τομέα. Κύριος στόχος εδώ είναι ο σχεδιασμός νέων θεραπειών προσδιορίζοντας συγκεκριμένους στόχους για ανάπτυξη φαρμάκων και συμβάλλοντας στο σχεδιασμό γονιδιακών θεραπειών. Κατά την παραγωγή φαρμάκων θα ήταν επιθυμητό να συμπεριληφθούν όλα τα βήματα σύνθεσης του φαρμάκου σε ένα μικροοργανισμό. Για τον σκοπό αυτό μεταφέρονται στον μικροοργανισμό γονίδια των οποίων η έκφραση οδηγεί σε δημιουργία όλων των ενζύμων που είναι απαραίτητα για τη εξ' ολοκλήρου σύνθεση του φαρμάκου. Η ανάπτυξη τέτοιων τεχνολογιών θα διευκολύνει την παραγωγή φαρμάκων που ενδέχεται να χρειάζονται σε σημαντικές ποσότητες. Τέλος, μία ακόμη ιατρική εφαρμογή παρατηρείται στην ανάλυση της λειτουργίας και του γενικού μεταβολισμού ιστών, οργάνων και πολύ αργότερα ολόκληρων οργανισμών.

## 2. Βασικά μεταβολικά μονοπάτια

### 2.1 Επισκόπηση του κυτταρικού μεταβολισμού

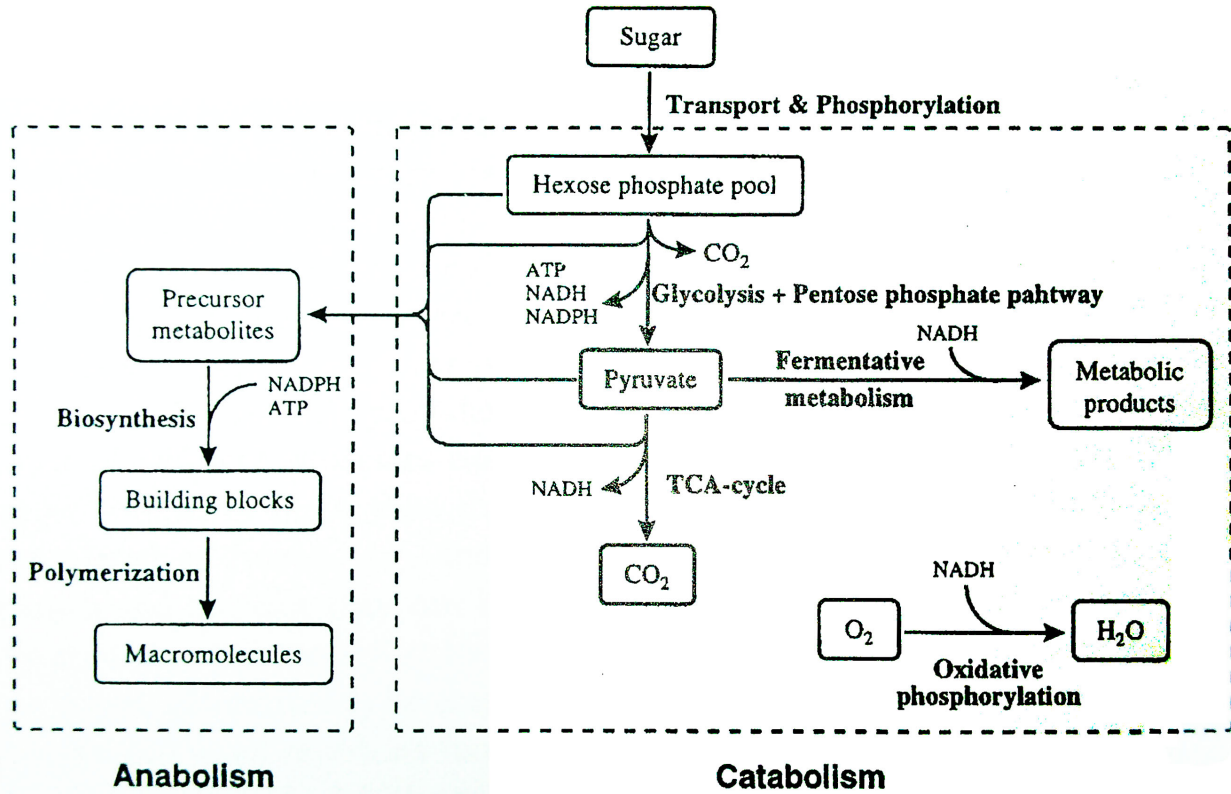
Ένα ζωντανό κύτταρο περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό ενώσεων και μεταβολιτών. Από αυτά, το πιο άφθονο στοιχείο είναι το νερό, το οποίο αντιπροσωπεύει περίπου το 70% του κυτταρικού υλικού. Το υπόλοιπο της κυτταρικής μάζας, το οποίο συνήθως αναφέρεται ως ξηρό κυτταρικό βάρος βιομάζας (dry cell weight biomass), κατανέμεται κυρίως μεταξύ των μακρομορίων DNA, ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA), πρωτεϊνών, λιπιδίων και υδατανθράκων (παράδειγμα κυτταρική σύνθεση σε μακρομόρια του *E. Coli* στον Πίνακα 1). Η σύνθεση και οργάνωση των μακρομορίων αυτών σε ένα λειτουργικό κύτταρο πραγματοποιείται μέσω διαφόρων ανεξάρτητων αντιδράσεων. Οι πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση των μακρομορίων αυτών είναι μικρές ομάδες ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίες αναλώνονται και αναπληρώνονται συνεχώς. Η αναπλήρωση αυτή προκύπτει από βιοσύνθεση μεταβολιτών οι οποίοι έχουν τελικά προέλθει από τη γλυκόζη ή από άλλη πηγή άνθρακα.

Πίνακας 1. Μακρομοριακή σύσταση ενός τυπικού κυττάρου *Escherichia Coli* [1].

Macromolecule	Percentage of total dry weight	Different kinds of molecules
Protein	55.0	1050
RNA	20.5	
rRNA	16.7	3
tRNA	3.0	60
mRNA	0.8	400
DNA	3.1	1
Lipid	9.1	4
Lipopolysaccharide	3.4	1
Peptidoglycan	2.5	1
Glycogen	2.5	1
Soluble pool	3.9	

Ο κυτταρικός μεταβολισμός διακρίνεται σε δύο βασικές λειτουργίες, τον καταβολισμό και τον αναβολισμό. Ο καταβολισμός περιλαμβάνει την ενδοκυτταρική διαδικασία κατά την οποία μια ένωση διασπάται σε μικρότερα, απλούστερα και πιο οξειδωμένα προϊόντα (π.χ. γλυκόζη σε CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O) και παράγει ενέργεια για το κύτταρο. Ο αναβολισμός είναι η βιοσύνθεση σύνθετων ενώσεων από απλούστερες (π.χ. γλυκογόνο από γλυκόζη), συνήθως με κατανάλωση ενέργειας και αναγωγικής ισχύος. Στην εικόνα 4 παρουσιάζονται συνοπτικά κάποια τμήματα του μεταβολισμού σακχάρων.





Εικόνα 4. Συνοπτική παρουσίαση κυτταρικού μεταβολισμού σχετικά με βιοσύνθεση από σάκχαρα [1].

Στην ανωτέρω εικόνα, παρουσιάζεται στα δεξιά μία γενική δομή του καταβολισμού των σακχάρων (sugars) με τα κυριότερα μονοπάτια αυτού, ενώ στα αριστερά η σύνθεση μακρομορίων μεταβολιτών μέσω του αναβολισμού. Αρχικά, το σάκχαρο (π.χ. γλυκόζη) μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου όπου φωσφορυλιώνεται και εντάσσεται στην ομάδα των μονοφωσφορικών εξοζών (hexose phosphate pool). Η φωσφορυλίωση μπορεί να συμβεί ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό με τη διαδικασία της μεταφοράς. Οι μονοφωσφορικές εξόζες, έπειτα, αντιδρούν κατά μήκος του μονοπατιού της γλυκόλυσης και μετατρέπονται σε πυροσταφυλικό οξύ (pyruvate), ή χρησιμοποιούνται στη σύνθεση υδατανθράκων. Το πυροσταφυλικό οξύ, με τη σειρά του, μπορεί να οξειδωθεί σε διοξείδιο του άνθρακα μέσω του αναπνευστικού κύκλου ή να μετατραπεί σε μεταβολικά προϊόντα μέσω μονοπατιών ζύμωσης (fermentative pathways). Για αερόβιους οργανισμούς, τα αναγωγικά ισοδύναμα με τη μορφή του NADH που παράγονται κατά την γλυκόλυση και τον κύκλο TCA μπορούν να οξειδωθούν προς NAD<sup>+</sup> στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (oxidative phosphorylation). Για αναερόβιους οργανισμούς, αντίθετα, η αναγέννηση του NAD<sup>+</sup> πραγματοποιείται κατά τα μονοπάτια της ζύμωσης. Κάποια από τα ενδιάμεσα της γλυκόλυσης και του κύκλου TCA λειτουργούν ως πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση δομικών στοιχείων. Τα δομικά στοιχεία αυτά πολυμερίζονται σε μακρομόρια, τα οποία τελικά συνενώνονται προς δημιουργία διαφόρων κυτταρικών δομών.

Τα διάφορα βιοχημικά μονοπάτια είναι εν δυνάμει αλληλοεξαρτώμενα. Αυτό συμβαίνει, καταρχάς, επειδή οι μεταβολίτες συμμετέχουν σε περισσότερα από ένα μονοπάτια, με αποτέλεσμα να συνδέουν τις διάφορες αλληλουχίες αντιδράσεων μεταξύ τους. Επιπλέον, τα παγκόσμια μόρια-νομίσματα ATP, NADH, και NADPH κατέχουν κεντρικό ρόλο στις διάφορες

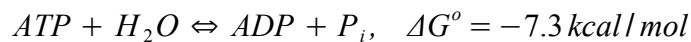
αντιδράσεις, συνεχώς σχηματιζόμενα και αξιοποιούμενα, ώστε να συνδέουν αντιδράσεις τόσο μέσα στο ίδιο μονοπάτι όσο και μεταξύ διαφορετικών μονοπατιών. Η σύνδεση αυτή γίνεται φανερή στην εικόνα 4.

Τα βιοχημικά μονοπάτια συνδέονται με χημικό τρόπο μέσω της διαδοχικής μετατροπής μεταβολιτών σε μια μακρά αλυσίδα αντιδράσεων, και με φυσικό τρόπο λειτουργώντας σε διαφορετικά τμήματα και δομές του κυττάρου. Η φυσική οργάνωση αυτή γίνεται περισσότερο φανερή στα ευκαρυωτικά κύτταρα, στα οποία οι μεμβρανικές δομές συντελούν στη δημιουργία διαμερισμάτων εντός του κυττάρου, μέσα στα οποία πραγματοποιούνται αντιδράσεις και διαμέσου των μεμβρανών των οποίων ανταλλάσσονται μεταβολίτες. Κατά συνέπεια, η σύνθεση των DNA και RNA λαμβάνει χώρα στον πυρήνα, οι βιοσυνθετικές αντιδράσεις στα μιτοχόνδρια κλπ. Η οργανωμένη αυτή δομή έχει σημαντικό αντίκτυπο στη λειτουργία του μεταβολισμού *in vivo* και αυξάνει ομοίως την πολυπλοκότητα της λειτουργίας των μεταβολικών δικτύων *in silico*.

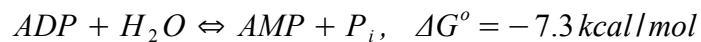
## 2.2 Ενέργεια στα κύτταρα

Τα ζωντανά κύτταρα χρειάζονται ενέργεια για τη βιοσύνθεση, τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών, την κίνηση και τη συντήρηση. Αυτή η ενέργεια λαμβάνεται από τον καταβολισμό ενώσεων άνθρακα, κυρίως τους υδατάνθρακες. Οι υδατάνθρακες συντίθενται από το CO<sub>2</sub> και το H<sub>2</sub>O παρουσία φωτός κατά τη φωτοσύνθεση. Ο ήλιος είναι η βασική πηγή ενέργειας για τις διεργασίες της ζωής στη γη.

Η ενέργεια στα βιολογικά συστήματα αποθηκεύεται και μεταφέρεται κυρίως μέσω της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) που περιέχει υψηλής ενέργειας φωσφορικούς δεσμούς. Η ενεργός μορφή του ATP είναι ενωμένη με Mg<sup>2+</sup>. Η σταθερή ελεύθερη ενέργεια που παράγεται κατά την υδρόλυση του ATP είναι 7.3 kcal/mol. Η πραγματική ελεύθερη ενέργεια που απελευθερώνεται στο κύτταρο μπορεί να είναι ουσιαστικά υψηλότερη, επειδή η συγκέντρωση του ATP είναι συχνά πολύ μεγαλύτερη από αυτή του ADP.



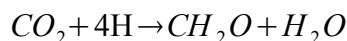
Βιολογική ενέργεια αποθηκεύεται στο ATP με την αντιστροφή της αντίδρασης αυτής για να παραχθεί ATP από ADP και το P<sub>i</sub>. Ομοίως, το ADP διασπάται για να απελευθερώσει ενέργεια.



Ανάλογες ενώσεις με το ATP, όπως ή τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP), η τριφωσφορική ουριδίνη (UTP) και η τριφωσφορική κυτιδίνη (CTP), αποθηκεύουν και μεταφέρουν υψηλής ενέργειας φωσφορικούς δεσμούς, όχι όμως στην έκταση του ATP. Υψηλής ενέργειας φωσφορικές ενώσεις που παράγονται κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού, όπως το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ και το 1,3-διφωσφογλυκερικό οξύ, μεταφέρουν την ομάδα P<sub>i</sub> στο ATP. Η ενέργεια που αποθηκεύεται στο ATP μεταφέρεται κατόπιν σε φωσφορικές ενώσεις χαμηλότερης ενέργειας, όπως η 6-φωσφορική γλυκόζη και η 3-φωσφορική γλυκερόλη.

Τα άτομα υδρογόνου που απελευθερώνονται κατά τις βιολογικές αντιδράσεις οξειδωσης-αναγωγής μεταφέρονται από παράγωγα νουκλεοτιδίων, ειδικά από το νικοτιναμιδο-αδενινω-δινουκλεοτίδιο (NAD<sup>+</sup>) και το φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινω-δινουκλεοτίδιο (NADP<sup>+</sup>). Αυτές οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις είναι εύκολα αντιστρεπτές. Το NADH μπορεί να δώσει ηλεκτρόνια σε ορισμένες ενώσεις και να δεχθεί από άλλες ανάλογα με το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των ενώσεων αυτών. Το NADH επιτελεί δύο σημαντικές λειτουργίες στα βιολογικά συστήματα:

1. *Αναγωγική ισχύς*: Το NADH και το NADPH εφοδιάζουν με υδρογόνο βιοσυνθετικές αντιδράσεις, όπως η καθήλωση του CO<sub>2</sub>, στους αυτότροφους οργανισμούς.



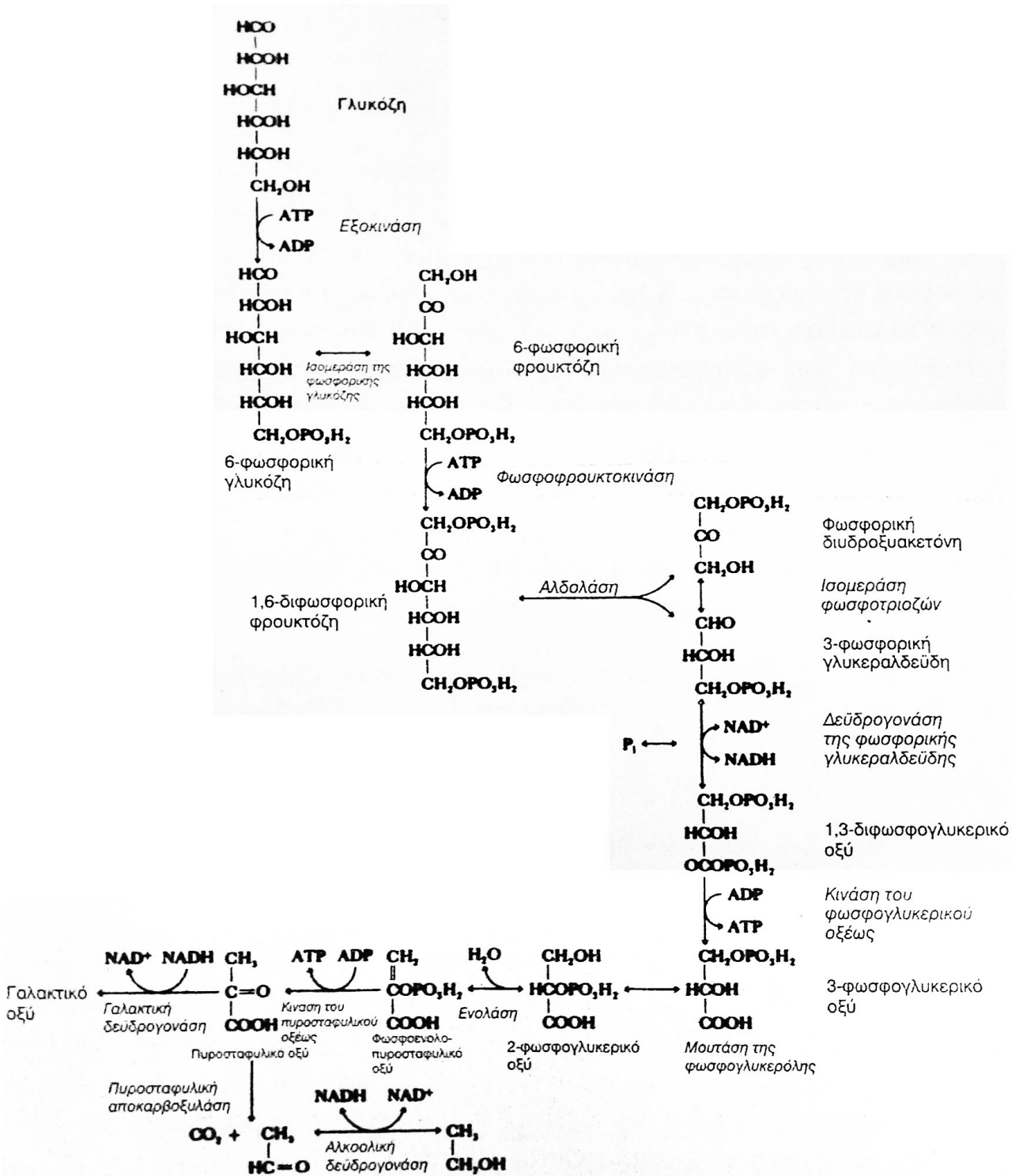
2. *Σχηματισμός ATP στον αναπνευστικό μεταβολισμό*: Τα ηλεκτρόνια (ή άτομα H) του NADH μεταφέρονται στο οξυγόνο μέσω μιας σειράς ενδιάμεσων ενώσεων (αναπνευστική αλυσίδα). Η ενέργεια που απελευθερώνεται από αυτή τη μεταφορά ηλεκτρονίων οδηγεί στο σχηματισμό μέχρι τριών μορίων ATP. Το ATP μπορεί να σχηματιστεί από την αναγωγική ισχύ του NADH απουσία οξυγόνου, όταν είναι διαθέσιμος ένας εναλλακτικός δέκτης ηλεκτρονίων (π.χ. το NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

## 2.3 Γλυκόλυση

Η γλυκόζη αποτελεί βασική πηγή άνθρακα και ενέργειας για πολλούς οργανισμούς. Διάφορα μεταβολικά μονοπάτια χρησιμοποιούνται από διαφορετικούς οργανισμούς για τον καταβολισμό της γλυκόζης. Η *γλυκόλυση* ή μονοπάτι *Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)* αποτελείται από το άθροισμα όλων των αντιδράσεων μέσω των οποίων η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ, και είναι μία από τις συνιστώσες του κεντρικού μεταβολισμού. Οι άλλες δύο είναι το *μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης (Pentose Phosphate Pathway – PPP)* και ο *κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος (Tricarboxylic acid cycle – TCA cycle)*.

Η γλυκόλυση οδηγεί στη διάσπαση της γλυκόζης σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος και λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα. Στην εικόνα 5 παρουσιάζεται η αλληλουχία των ενζυμικών αντιδράσεων της γλυκόλυσης. Αρχικά, εισάγεται στο κύτταρο η γλυκόζη (μέσω ειδικών πρωτεϊνών) και φωσφορυλιώνεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη (G-6P) από την εξωκινάση. Η φωσφορυλιωμένη γλυκόζη μπορεί να παραμείνει μέσα στο κύτταρο. Η 6-φωσφορική γλυκόζη μετατρέπεται σε 6-φωσφορική φρουκτόζη (F-6P) από την ισομεράση της φωσφορικής γλυκόζης και στη συνέχεια σε 1,6 διφωσφορική φρουκτόζη από τη φωσφοφρουκτοκινάση. Η πρώτη και η τρίτη αντίδραση είναι οι μόνες αντιδράσεις της γλυκόλυσης που χρησιμοποιούν ATP και είναι μη αντιστρεπτές. Η διάσπαση της 1,6 διφωσφορικής φρουκτόζης σε φωσφορική διϋδροξυακετόνη (DHAP) και 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη (GA-3P) από την αλδολάση είναι ένα από τα στάδια-κλειδιά της γλυκόλυσης (διάσπαση C<sub>6</sub> σε 2 C<sub>3</sub>). Οι DHAP και GA-3P βρίσκονται σε ισορροπία. Καθώς η GA-3P χρησιμοποιείται στη γλυκόλυση, η DHAP μετατρέπεται συνεχώς σε GA-3P. Η τελευταία οξειδώνεται πρώτα με την προσθήκη ανόργανου φωσφόρου (Pi), σε 1,3-διφωσφογλυκερικό οξύ (1,3-dP-GA) από τη δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης. Το 1,3-dP-GA παρέχει μια φωσφορική ομάδα για δημιουργηθεί ATP από το ADP και μετατρέπεται σε 3-φωσφογλυκερικό οξύ (3P-GA) από την κινάση του 3-φωσφογλυκερικού οξέος. Το 3P-GA μετατρέπεται περαιτέρω σε 2-φωσφογλυκερικό οξύ (2P-GA) από τη μούταση της φωσφογλυκερόλης. Το επόμενο βήμα είναι η αφυδάτωση του 2P-GA σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ (PEP). Το PEP αποφωσφορυλιώνεται περαιτέρω σε πυροσταφυλικό οξύ (Pyr) από την κινάση του πυροσταφυλικού οξέος με τον σχηματισμό ενός ATP. Οι αντιδράσεις μετά από τις DHAP και GA-3P επαναλαμβάνονται δύο φορές κατά τη διάρκεια της γλυκόλυσης (παραγωγή δύο μορίων ATP).

Το τελικό προϊόν, το πυροσταφυλικό οξύ, είναι ένας κομβικός μεταβολίτης του μεταβολισμού. Υπό αναερόβιες συνθήκες, το πυροσταφυλικό οξύ μπορεί να μετατραπεί σε γαλακτικό οξύ, αιθανόλη ή άλλα προϊόντα, όπως ακετόνη, βουτανόλη και οξικό οξύ. Η αναερόβια μετατροπή της γλυκόζης στις ανωτέρω ενώσεις παλαιότερα ήταν γνωστή ως ζύμωση. Εντούτοις, ο όρος αυτός καλύπτει σήμερα ένα σύνολο ενζυμικών και μικροβιακών μετατροπών. Υπό αερόβιες συνθήκες, το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε CO<sub>2</sub> και NADH μέσω του κύκλου TCA.



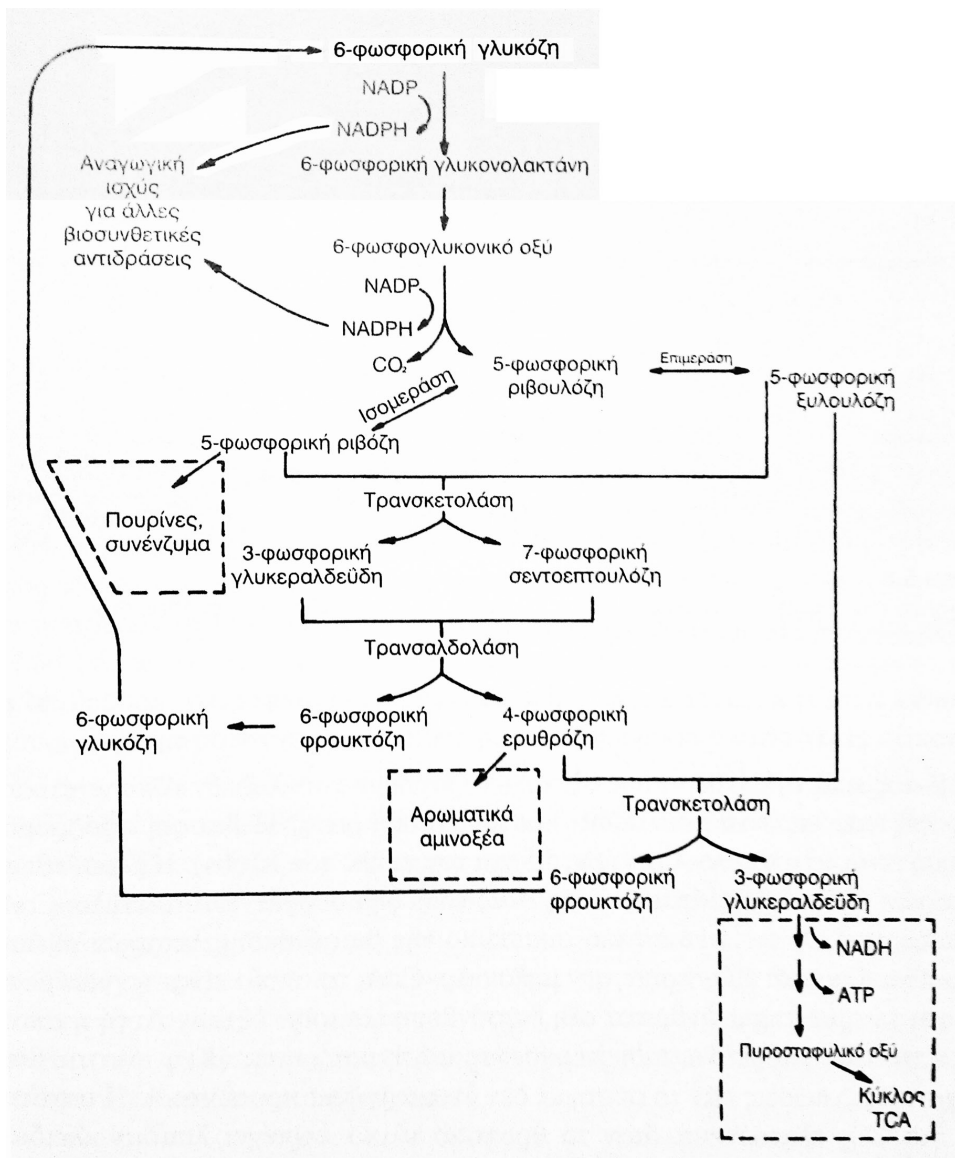
Εικόνα 5. Αντιδράσεις διάσπασης της γλυκόζης κατά τη διάρκεια της γλυκόλυσης [6].

Η καθαρή απόδοση της γλυκόλυσης είναι 2 μόρια ATP / μόριο γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης. Συνοπτικά, η γενική αντίδραση της γλυκόλυσης μπορεί να γραφεί ως εξής:



## 2.4 Μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης

Το μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης (*Pentose Phosphate Pathway – PPP*) ή μονοπάτι της μονοφωσφορικής εξόξης (*Hexose Monophosphate Pathway – HMP*) είναι ένα από τα μονοπάτια του κεντρικού μεταβολισμού και συνδέεται στενά με τη γλυκόλυση. Αν και το μονοπάτι αυτό παράγει σημαντική αναγωγική ισχύ η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί γενικά για να δώσει ενέργεια στο κύτταρο, ο κύριος ρόλος του είναι η προμήθεια σκελετών άνθρακα σε βιοσυνθετικές αντιδράσεις και αναγωγικής ισχύος για στήριξη του μεταβολισμού. Τα πεντανθρακικά σάκχαρα, που παράγονται μέσω του PPP, είναι συστατικά των RNA, DNA, ATP, NADH, FAD και συνενζύμου A (CoA).



Εικόνα 6. Μονοπάτι PP και συνδέσεις με άλλες κυτταρικές διεργασίες εκτός του μονοπατιού (αντιδράσεις στα πλαίσια με διακεκομμένες γραμμές) [6].

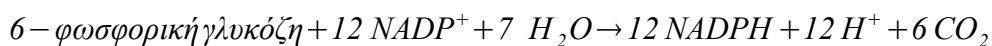
Στο μονοπάτι PP, αρχικά, η 6-φωσφορική γλυκόζη (η οποία έχει δημιουργηθεί στα αρχικά στάδια της γλυκόλυσης) οξειδώνεται προς 6-φωσφογλυκονικό οξύ, το οποίο περαιτέρω μετατρέπεται σε 5-φωσφορική ριβουλόζη και διοξείδιο του άνθρακα. Σε κάθε μία από αυτές τις αντιδράσεις, παράγεται ένα μόριο NADPH για κάθε μόριο 6-φωσφορικής γλυκόζης που εισέρχεται στο μονοπάτι. Στα επόμενα βήματα, η 5-φωσφορική ριβουλόζη μετατρέπεται σε 5-φωσφορική ριβόζη ή 4-φωσφορική ερυθρόζη, τα οποία αποτελούν πρόδρομους μεταβολίτες για τη βιοσύνθεση δομικών μονάδων, όπως είναι τα αρωματικά αμινοξέα και τα νουκλεοτίδια. Μέσω έτερης ακολουθίας αντιδράσεων, η 5-φωσφορική ριβουλόζη μπορεί να μετατραπεί σε 6-φωσφορική φρουκτόζη και 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και ως εκ τούτου να εισέλθει ξανά στο μονοπάτι EMP.

Οι επιμέρους αντιδράσεις του μονοπατιού PP είναι οι εξής:

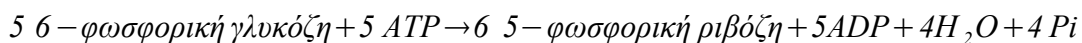
1.  $6\text{-φωσφορική γλυκόζη} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 6\text{-φωσφογλυκονικό οξύ} + \text{NADPH} + \text{H}^+$
2.  $6\text{-φωσφογλυκονικό οξύ} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 5\text{-φωσφορική ριβουλόζη} + \text{CO}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+$
3.  $5\text{-φωσφορική ριβουλόζη} \rightarrow 5\text{-φωσφορική ριβόζη}$
4.  $5\text{-φωσφορική ριβουλόζη} \rightarrow 5\text{-φωσφορική ξυλουλόζη}$
5.  $5\text{-φ. ξυλουλόζη} + 5\text{-φ. ριβόζη} \rightarrow 3\text{-φ. γλυκεραλδεΐδη} + 7\text{-φ. σεντοεπτουλόζη}$
6.  $7\text{-φ. σεντοεπτουλόζη} + 3\text{-φ. γλυκεραλδεΐδη} \rightarrow 6\text{-φ. φρουκτόζη} + 4\text{-φ. ερυθρόζη}$
7.  $5\text{-φ. ξυλουλόζη} + 4\text{-φ. ερυθρόζη} \rightarrow 6\text{-φ. φρουκτόζη} + 3\text{-φ. γλυκεραλδεΐδη}$

Η συνολική στοιχειομετρία του μονοπατιού PP εξαρτάται από το βαθμό με τον οποίο ο εισερχόμενος στο μονοπάτι PP άνθρακας, ανακυκλώνεται πίσω στο μονοπάτι EMP για να οξειδωθεί προς διοξείδιο του άνθρακα (με παράλληλη παραγωγή αναγωγικής ισχύος με τη μορφή του NADPH), ή καταναλώνεται για το σχηματισμό πρόδρομων ενώσεων για τη βιοσύνθεση (όπως τα πεντανθρακικά σάκχαρα για τη ριβονουκλεοτιδική σύνθεση). Για το λόγο αυτό, το μονοπάτι PP εξυπηρετεί δύο λειτουργίες, μία οξειδωτική και μία αναπληρωτική. Οι συνολικές αντιδράσεις για τις δύο αυτές λειτουργίες είναι:

Οξειδωτική λειτουργία PPP:



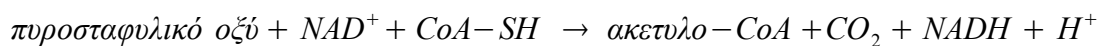
Αναπληρωτική λειτουργία PPP:



## 2.5 Κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος

Ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA cycle) ή κύκλος του κιτρικού οξέος ή κύκλος του Krebs αποτελεί ένα από τα βασικότερα μονοπάτια του κεντρικού μεταβολισμού. Στα μεν ευκαρυωτικά κύτταρα πραγματοποιείται στη μήτρα των μιτοχονδρίων, στα δε προκαρυωτικά καταλύεται από ένζυμα που είναι συνδεδεμένα με την κυτταρική μεμβράνη. Ο κύκλος αυτός αποτελεί συνέχεια της γλυκόλυσης, η οποία λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα. Το πυροσταφυλικό οξύ που παράγεται στη γλυκόλυση οξειδώνεται πλήρως στον κύκλο TCA (Εικ. 7).

Το πρώτο βήμα είναι μία οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση η οποία οδηγεί σε παραγωγή ακετυλο-συνενζύμου Α (ακετυλο-CoA). Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο πυροσταφυλική δεϋδρογονάση.

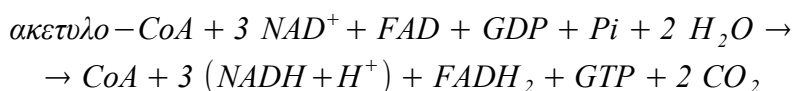


Το ακετυλο-CoA μεταφέρεται μέσω της μιτοχονδριακής μεμβράνης χρησιμοποιώντας τα δύο NADH που παρήχθησαν κατά τη γλυκόλυση για την παραγωγή 2 FADH. Το ακετυλο-CoA είναι ένας ενδιάμεσος μεταβολίτης κλειδί για το μεταβολισμό των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων.

Στα επόμενα βήματα του κύκλου TCA συμβαίνουν τα εξής. Το ακετυλο-CoA συμπυκνώνεται με το οξαλοξικό οξύ και παράγεται κιτρικό οξύ, το οποίο μετατρέπεται περαιτέρω σε ισοκιτρικό οξύ και κατόπιν σε α-κετογλουταρικό οξύ με παράλληλη απελευθέρωση CO<sub>2</sub>. Το α-κετογλουταρικό οξύ αποκαρβοξυλιώνεται και οξειδώνεται σε ηλεκτρικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια οξειδώνεται σε φουμαρικό οξύ. Η ενυδάτωση του τελευταίου σε μηλικό οξύ και η οξείδωση αυτού σε οξαλοξικό οξύ είναι τα δύο τελευταία βήματα του κύκλου TCA.

Για κάθε μόριο πυροσταφυλικού οξέος που εισάγεται στον κύκλο παράγονται 3 CO<sub>2</sub>, 4 NADH + H<sup>+</sup> και ένα FADH<sub>2</sub>. Η παραχθείσα αναγωγική ισχύς (NADH + H<sup>+</sup> και FADH<sub>2</sub>) χρησιμοποιείται είτε για τα βιοσυνθετικά μονοπάτια είτε για την παραγωγή ATP μέσω της αναπνοής.

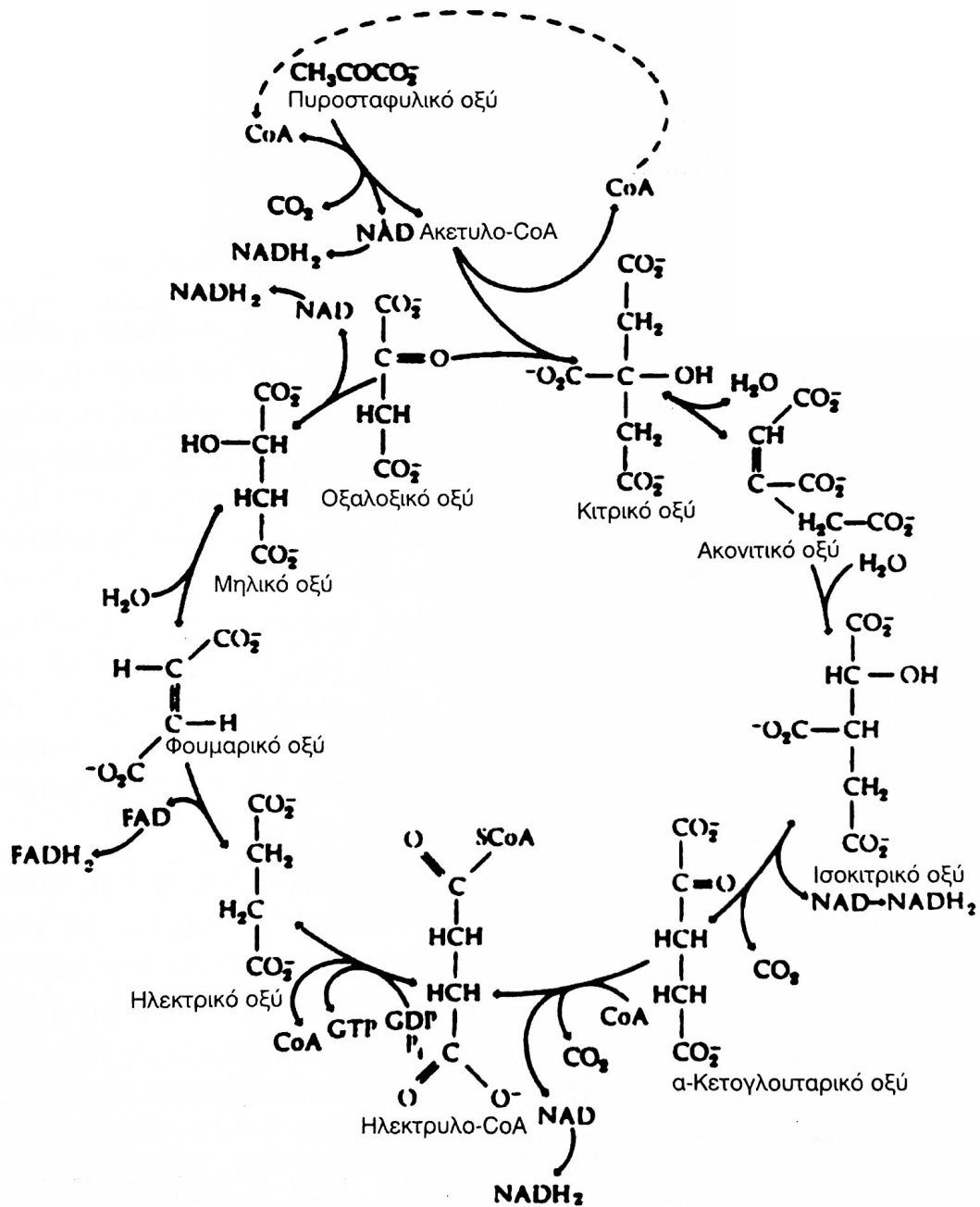
Η συνολική αντίδραση του TCA κύκλου είναι η εξής:



Το οξαλοξικό και το α-κετογλουταρικό οξύ που παράγονται κατά τη διάρκεια του κύκλου χρησιμοποιούνται ως πρόδρομοι για τη βιοσύνθεση αμινοξέων και νουκλεοτιδίων. Κατά τη λειτουργία του κύκλου δεν υπάρχει καθαρή παραγωγή των δύο αυτών οργανικών οξέων, επομένως η αφαίρεσή τους για άλλες κυτταρικές διεργασίες πρέπει με κάποιο τρόπο να αντισταθμίζεται. Τον αντισταθμιστικό ρόλο αυτό παίζουν κάποιες αλληλουχίες αντιδράσεων, οι οποίες συνοπτικά καλούνται *αναπληρωτικά μονοπάτια*. Στα μονοπάτια αυτά περιλαμβάνονται οι ακόλουθες αντιδράσεις: (α) καρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος μέσω της πυροσταφυλικής καρβοξυλάσης, (β) καρβοξυλίωση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος από την PEP καρβοξυλάση, (γ) οξείδωση του μηλικού οξέος προς πυροσταφυλικό οξύ μέσω του μηλικού ενζύμου, και (δ) κύκλος του γλυοξυλικού οξέος (glyoxylate cycle).

Οι σημαντικότεροι ρόλοι του TCA κύκλου είναι (α) η παροχή ηλεκτρονίων (NADH) στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (αναπνοή) και στη βιοσύνθεση, (β) η παροχή σκελετών άνθρακα για τη σύνθεση αμινοξέων και (γ) η παραγωγή ενέργειας.



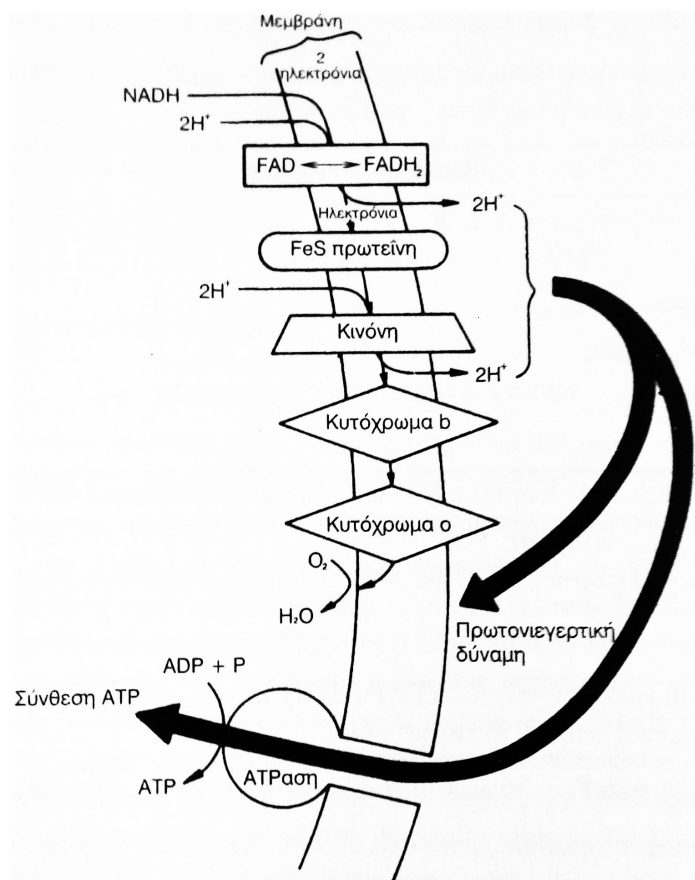


Συνολική αντίδραση:  $\text{Πυροσταφυλικό οξύ} + 4 \text{NAD} + \text{FAD} \rightarrow 3\text{CO}_2 + 4 \text{NADH}_2 + \text{FADH}_2$   
 $\text{GDP} + \text{φωσφορικό οξύ} \rightarrow \text{GTP}$

Εικόνα 7. Επισκόπηση του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) των ευκαρυωτικών κυττάρων [6].

## 2.6 Αναπνοή

Η αλληλουχία των αντιδράσεων της αναπνοής, γνωστή επίσης και ως αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, η οποία διεκπεραιώνει την οξειδωτική φωσφορυλίωση (από την οποία παράγεται ATP), βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη σε πολλά αντίγραφα. Περιέχει πάνω από 40 πρωτεΐνες, από τις οποίες περίπου 15 εμπλέκονται άμεσα στη μεταφορά ηλεκτρονίων [8]. Ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το  $\text{NADH} + \text{H}^+$  και το  $\text{FADH}_2$  στο οξυγόνο μέσω μιας σειράς μεταφορέων ηλεκτρονίων και παράγεται ATP. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, παράγονται τρία ATP από κάθε  $\text{NADH} + \text{H}^+$  και δύο ATP από κάθε  $\text{FADH}_2$ . Η λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας απεικονίζονται στην εικόνα 8.



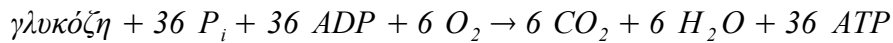
Εικόνα 8. Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και οξειδωτική φωσφορυλίωση [6].

Στο άνω τμήμα της εικόνας 8 φαίνεται η οξείδωση του  $\text{NADH}$  και η ροή ηλεκτρονίων μέσω του συστήματος μεταφοράς τους, που έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά πρωτονίων ( $\text{H}^+$ ) από το εσωτερικό προς το εξωτερικό της μεμβράνης. Η τάση των πρωτονίων να επιστρέψουν στο εσωτερικό της μεμβράνης καλείται πρωτονιογενετική δύναμη. Στο κάτω τμήμα της εικόνας απεικονίζεται η σύνθεση ATP κατά την επάνοδο των πρωτονίων. Το ένζυμο ATPase χρησιμοποιεί την πρωτονιογενετική δύναμη για τη σύνθεση ATP.

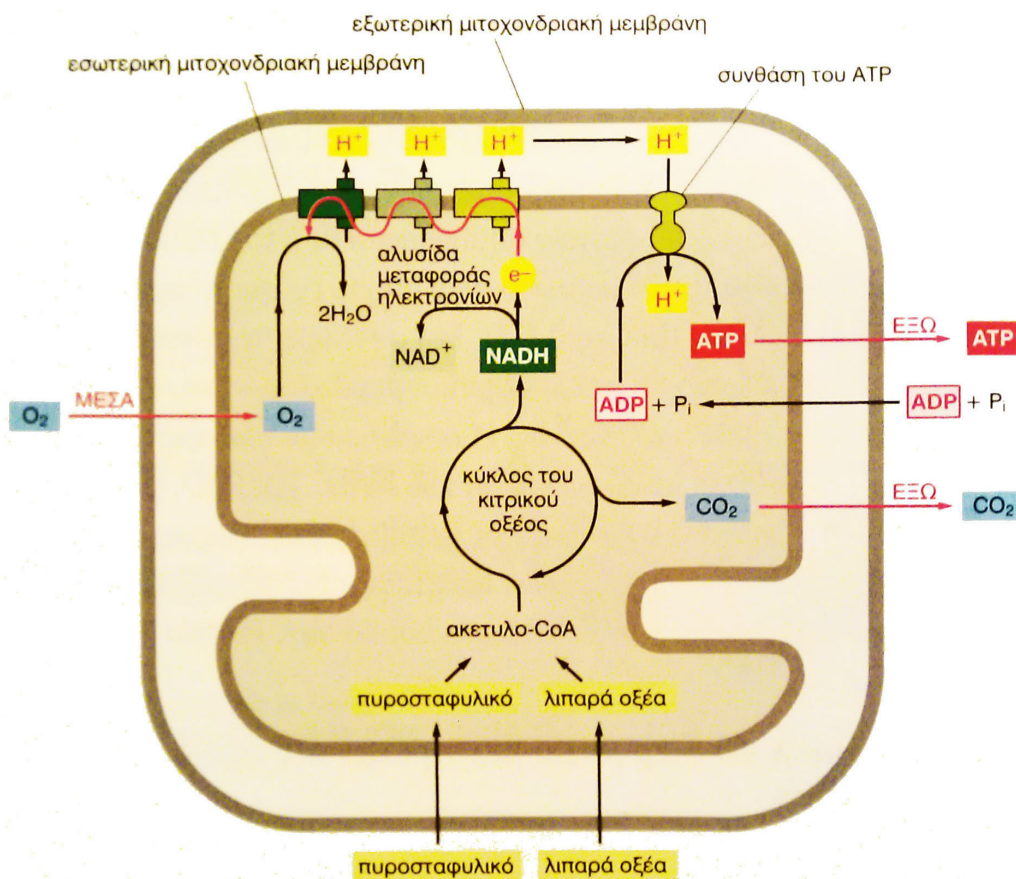
Ο κύριος ρόλος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι η παραγωγή  $\text{NAD}$  για τις

ανάγκες της γλυκόλυσης και ATP για τις ανάγκες της βιοσύνθεσης. Η σχέση P/O χρησιμοποιείται για να δείξει τον αριθμό των φωσφορικών δεσμών που χρησιμοποιούνται ( $ADP + P_i \rightarrow ATP$ ) για κάθε άτομο οξυγόνου που χρησιμοποιείται ως δέκτης ηλεκτρονίων.

Η συνολική αντίδραση (υποθέτοντας 3 ATP/NADH) του αερόβιου καταβολισμού της γλυκόζης στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι:



Η ενέργεια που αποθηκεύεται στα 36 mol ATP είναι 263 kcal/mol γλυκόζης. Οι μεταβολές της ελεύθερης ενέργειας κατά την άμεση οξείδωση της γλυκόζης είναι 686 kcal/mol γλυκόζης. Επομένως, η ενεργειακή απόδοση της γλυκόλυσης είναι 36% υπό σταθερές συνθήκες, ενώ η υπόλοιπη αποθηκευμένη στη γλυκόζη ενέργεια μετατρέπεται σε θερμότητα. Ωστόσο, στα προκαρυωτικά κύτταρα η μετατροπή της αναγωγικής ισχύος σε ATP είναι λιγότερο αποδοτική. Ο αριθμός των ATP που παράγεται από  $NADH + H^+$  είναι συνήθως μικρότερος ή ίσος με 2 και μόνο 1 ATP μπορεί να παραχθεί από ένα  $FADH_2$ . Κατά συνέπεια, στα προκαρυωτικά κύτταρα ένα μόριο γλυκόζης θα παράγει λιγότερα από 24 ATP και η σχέση P/O κυμαίνεται γενικά μεταξύ 1 και 2.



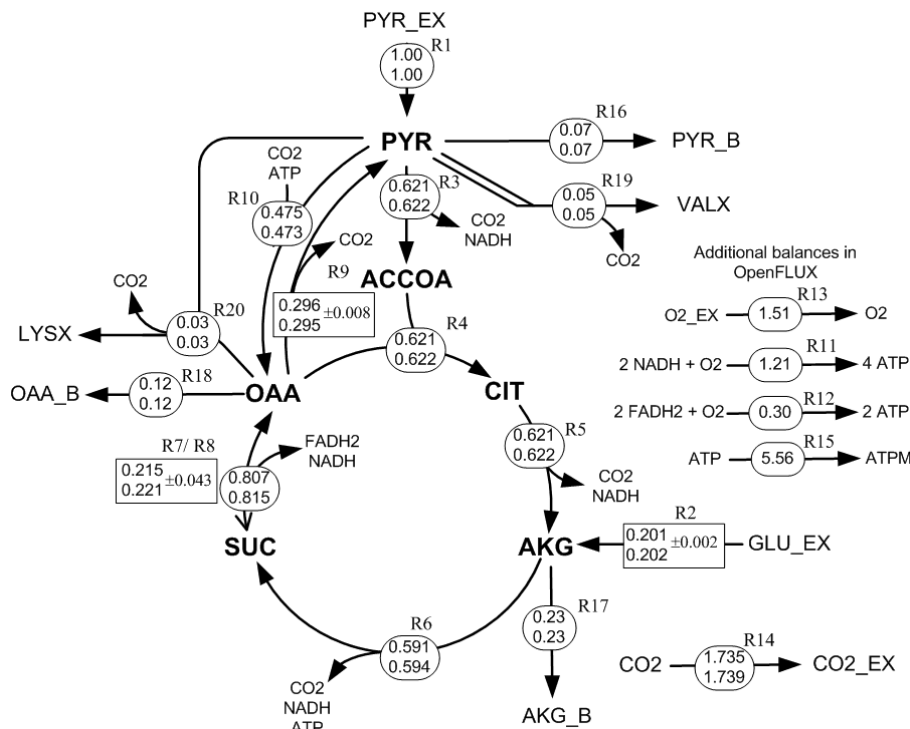
Εικόνα 9. Παραγωγή ενέργειας στα μιτοχόνδρια [8].

Στην εικόνα 9 απεικονίζεται συνοπτικά η παραγωγή ενέργειας στα μιτοχόνδρια, στην οποία φαίνεται ο κύκλος TCA, η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και οι ανταλλαγές ορισμένων μεταβολιτών διαμέσου των μιτοχονδριακών μεμβρανών.

### 3. Ανάλυση μεταβολικών ροών (MFA)

#### 3.1 Εισαγωγή

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην ενότητα 1.3, η μεταβολική ροή αποτελεί θεμελιώδη παράγοντα καθορισμού της φυσιολογίας του κυττάρου, κυρίως διότι είναι ενδεικτική του βαθμού συνεισφοράς των διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών στις επιμέρους μεταβολικές διεργασίες και στη γενικότερη λειτουργία του κυττάρου. Επομένως, ο ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός των ροών *in vivo* αποτελεί για τη μεταβολική μηχανική ένα σημαντικό στόχο, ιδίως στο πλαίσιο της παραγωγής μεταβολιτών, όπου το ζητούμενο είναι η όσο το δυνατόν υψηλότερη μετατροπή υποστρωμάτων σε χρήσιμα προϊόντα. Προς την κατεύθυνση αυτή, η *ανάλυση μεταβολικών ροών* (*Metabolic Flux Analysis – MFA*) αναδεικνύεται ως μία πολύ ισχυρή μεθοδολογία. Κατά την MFA, υπολογίζονται οι ενδοκυτταρικές ροές χρησιμοποιώντας ένα στοιχειομετρικό μοντέλο για τις σημαντικότερες ενδοκυτταρικές αντιδράσεις και ισοζύγια μάζας για τους ενδοκυτταρικούς μεταβολίτες. Ως δεδομένα εισόδου στους υπολογισμούς λαμβάνονται πειραματικές μετρήσεις εξωκυτταρικών ροών, οι οποίες συνήθως είναι ρυθμοί κατανάλωσης υποστρωμάτων και ρυθμοί έκκρισης προϊόντων. Ως δεδομένα εξόδου προκύπτουν οι ζητούμενες μεταβολικές ροές για δεδομένο μεταβολικό δίκτυο σε σταθερή κατάσταση. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να συγκεντρωθούν σε απεικονίσεις που καλούνται *μεταβολικοί χάρτες ροών* (*metabolic flux maps*) (Εικόνα 10). Οι μεταβολικοί χάρτες ροών περιέχουν σημαντικές πληροφορίες για τη συνεισφορά



Εικόνα 10. Παράδειγμα κατανομής ροών για ένα απλοποιημένο μοντέλο κύκλου TCA [10].

των μεταβολικών μονοπατιών στις κυτταρικές διεργασίες αξιοποίησης υποστρωμάτων και σχηματισμού προϊόντων. Ωστόσο, η πραγματική αξία των εν λόγω χαρτών έγκειται στις διαφοροποιήσεις των ροών, οι οποίες γίνονται φανερές κατά τη σύγκριση χαρτών διαφορετικών

στελεχών οργανισμών ή ίδιων στελεχών κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Οι συγκρίσεις αυτές είναι πολύ σημαντικές, καθώς μέσω αυτών μπορεί να γίνει πλήρης αξιολόγηση των επιπτώσεων των γενετικών και περιβαλλοντικών διαταραχών στη λειτουργία του κυττάρου, και να περιγραφεί με ακρίβεια η σημαντικότητα συγκεκριμένων μονοπατιών και των αντιδράσεων που τα αποτελούν.

Εκτός από τον υπολογισμό των ροών των μονοπατιών, η MFA μπορεί να παρέχει πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά της φυσιολογίας του κυττάρου. Τα σημαντικότερα είναι τα εξής:

1. *Προσδιορισμός ρύθμισης σημείων διακλάδωσης (ακαμψία κόμβων – nodal rigidity) σε κυτταρικά μονοπάτια.* Η ευελιξία ή ακαμψία των σημείων διακλάδωσης μπορεί να εξεταστεί, συγκρίνοντας το ποσοστό διαχωρισμού της ροής (flux split ratio) στα σημεία διακλάδωσης, για διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας και για τροποποιημένα στελέχη του ίδιου κυττάρου. Γενικά, τα άκαμπτα σημεία διακλάδωσης, αντίθετα από τα εύελικτα σημεία, αντιστέκονται σε μεταβολές του ποσοστού διαχωρισμού της ροής. Η γνώση των χαρακτηριστικών αυτών είναι σημαντική για τον εξορθολογισμό της επιλογής των κατάλληλων αλλαγών οι οποίες θα οδηγήσουν στην επιθυμητή τροποποίηση των αποδόσεων των παραγόμενων προϊόντων.
2. *Προσδιορισμός εναλλακτικών μονοπατιών.* Η διατύπωση της στοιχειομετρίας των αντιδράσεων, κάτι το οποίο αποτελεί τη βάση της MFA, απαιτεί λεπτομερή γνώση των πραγματικών βιοχημικών οδών μέσω των οποίων τα υποστρώματα μετατρέπονται σε προϊόντα. Αυτό, όμως, μπορεί να μην είναι ξεκάθαρο για πολλούς μικροοργανισμούς, καθώς αρκετά εναλλακτικά μονοπάτια έχουν βρεθεί να υπάρχουν σε διάφορους οργανισμούς τα οποία είναι γνωστό ότι λειτουργούν κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Για την MFA είναι σημαντικό να αναγνωριστούν μονοπάτια που μπορούν να αναπαραγάγουν τις μακροσκοπικές μετρήσεις ροών των εξωκυτταρικών μεταβολιτών εξίσου καλά ή, για το λόγο αυτό, μπορούν να αποκλείσουν εναλλακτικά μονοπάτια τα οποία δεν υφίστανται, δεδομένου ότι δεν ικανοποιούν τα ισοζύγια μάζας.
3. *Υπολογισμός μη μετρήσιμων εξωκυτταρικών ροών.* Ορισμένες φορές, ο αριθμός των εξωκυτταρικών ροών (π.χ. ρυθμοί παραγωγής διαφόρων υποπροϊόντων) που μπορούν να μετρηθούν είναι μικρότερος από τον απαιτούμενο ώστε να υπολογιστούν οι άγνωστες ενδοκυτταρικές ροές. Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιώντας το στοιχειομετρικό μοντέλο, τις ροές που μπορούν να μετρηθούν και ποσοστά διαχωρισμού ροής που έχουν προσδιοριστεί από προηγούμενα πειράματα, είναι δυνατόν να υπολογιστούν οι μη μετρούμενες εξωκυτταρικές ροές. Επιπλέον, αν κάποια στιγμή καταστούν μετρήσιμες οι εν λόγω ροές, οι μετρήσεις αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για επικύρωση ή αναθεώρηση του μοντέλου μετά από σύγκριση τους με τις εκτιμούμενες από το μοντέλο τιμές.
4. *Υπολογισμός των θεωρητικά μέγιστων αποδόσεων.* Ο υπολογισμός των θεωρητικών αποδόσεων βασίζεται σε δόμηση του μεταβολικού δικτύου, τέτοια ώστε να παράγεται η μέγιστη ποσότητα προϊόντος για δεδομένο υπόστρωμα. Για τον λόγο αυτό πρέπει να έχουν επιλεγεί τα κατάλληλα ποσοστά διαχωρισμού ροών και οι κατάλληλοι περιορισμοί

για τη λειτουργία του δικτύου. Οι θεωρητικές αποδόσεις αποτελούν μέτρο αξιολόγησης για τις πραγματικές διεργασίες. Μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση εναλλακτικών μονοπατιών. Επιπλέον, παρέχουν χρήσιμους δείκτες της μεταβολικής δραστηριότητας σε συνθήκες μέγιστης απόδοσης που μπορούν να επιδιωχθούν στην αναζήτηση βέλτιστων στρατηγικών ρύθμισης.

Στην επόμενη ενότητα παρουσιάζεται η μαθηματική θεωρία και οι βασικοί υπολογισμοί για την MFA.

### 3.2 Θεωρία

Το σημείο εκκίνησης για την MFA είναι η στοιχειομετρία του βιοχημικού δικτύου αντιδράσεων μέσω της οποίας περιγράφεται η μετατροπή των υποστρωμάτων σε μεταβολικά προϊόντα και συστατικά της βιομάζας (ή μακρομοριακές ομάδες). Έστω ότι εξετάζεται ένα μεταβολικό δίκτυο με  $n$  ενδοκυτταρικές αντιδράσεις οι οποίες συνδέουν  $m$  μεταβολίτες. Τα ισοζύγια μάζας δίνονται από την εξίσωση 3.1. Επίσης λαμβάνεται υπ' όψιν η αραίωση των μεταβολικών ομάδων, λόγω της κυτταρικής ανάπτυξης, μέσω ενός όρου αραίωσης (σε πολλές περιπτώσεις ο όρος αυτός μπορεί να θεωρηθεί αμελητέος).

$$\frac{dX_{met}}{dt} = r_{met} - \mu X_{met} \quad (3.1)$$

Στην εξίσωση αυτή  $X_{met} = (X_{met,1}, X_{met,2}, \dots, X_{met,m})$  είναι το διάνυσμα των συγκεντρώσεων των ενδοκυτταρικών μεταβολιτών,  $\mu$  είναι ο ρυθμός ανάπτυξης στον όρο αραίωσης και  $r_{met} = (r_{met,1}, r_{met,2}, \dots, r_{met,m})$  είναι ένα διάνυσμα που περιέχει τους καθαρούς ρυθμούς παραγωγής των ενδοκυτταρικών μεταβολιτών στις  $n$  αντιδράσεις. Οι ρυθμοί αυτοί αντιστοιχούν στους προς τα εμπρός ρυθμούς για τις μη αντιστρεπτές αντιδράσεις, ενώ για τις αντιστρεπτές αντιδράσεις είναι η διαφορά μεταξύ των προς τα εμπρός και προς τα πίσω ρυθμών.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι ομάδες των περισσότερων μεταβολιτών μεταβάλλονται πολύ γρήγορα. Ως αποτέλεσμα, οι συγκεντρώσεις των διαφόρων ομάδων μεταβολιτών προσαρμόζονται ταχέως σε νέα επίπεδα, ακόμα και μετά από μεγάλες διαταραχές του περιβάλλοντος τις οποίες βιώνουν τα κύτταρα. Είναι, συνεπώς, λογικό να υποτεθεί ότι οι μεταβολίτες βρίσκονται σε ψευδο-σταθερή κατάσταση. Στην κατάσταση αυτή ο ρυθμός ανάπτυξης και οι μεταβολικές ροές παραμένουν σταθερές, και δεν παρατηρείται συσσώρευση των ενδοκυτταρικών μεταβολιτών. Η εξίσωση (3.1) συνεπώς γίνεται:

$$0 = r_{met} - \mu X_{met} \quad (3.2)$$

Επειδή οι ομάδες των ενδοκυτταρικών μεταβολιτών είναι σε γενικές γραμμές πολύ μικρές, ο όρος αραίωσης είναι πολύ μικρός σε σχέση με τους ρυθμούς παραγωγής και κατανάλωσης μεταβολιτών, ειδικά στον κεντρικό μεταβολισμό του άνθρακα που περιλαμβάνει όλες τις μεγάλες ροές<sup>[1]</sup>. Επομένως, ο όρος αραίωσης μπορεί να θεωρηθεί αμελητέος και η εξίσωση (3.2) γίνεται:

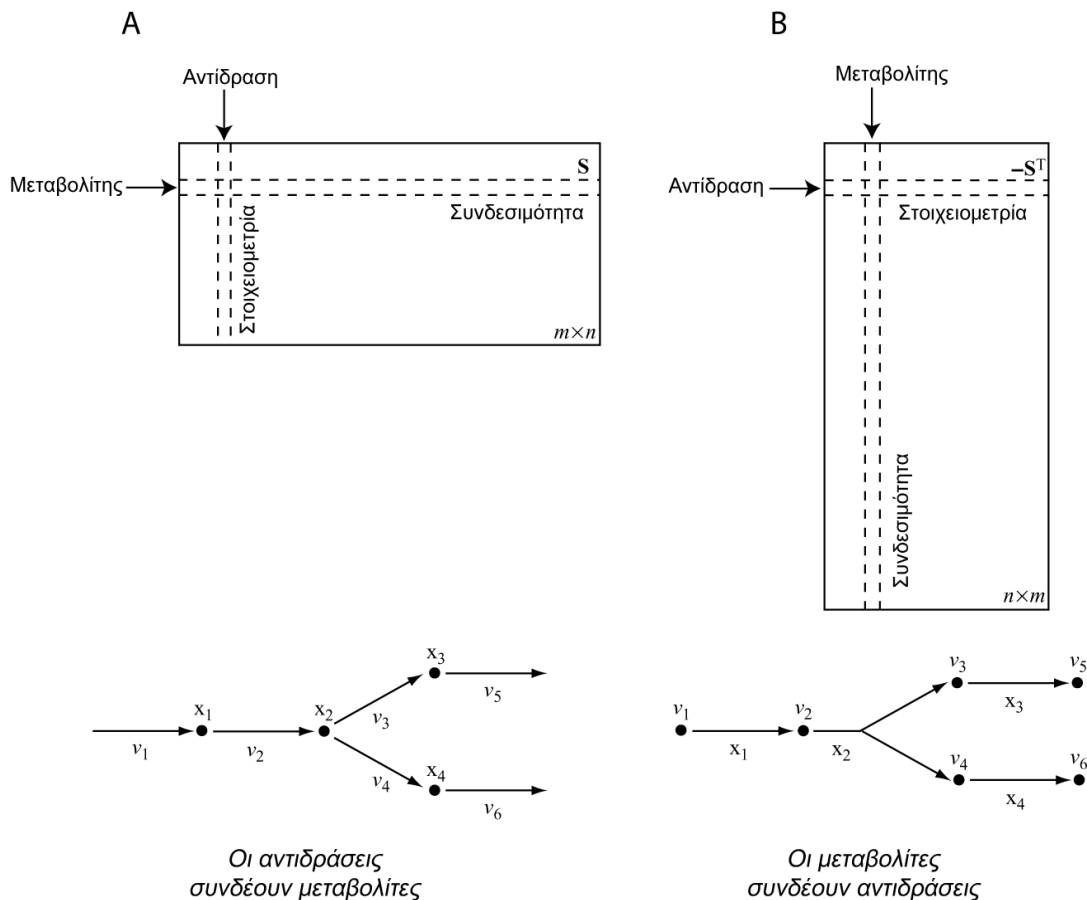
$$0 = r_{met} \quad (3.3)$$

η οποία σε συμβολισμό πινάκων έχει ως εξής:

$$0 = Sv \quad (3.4)$$

όπου  $S$  είναι ο στοιχειομετρικός πίνακας και  $v$  ένα διάνυσμα στήλη που περιέχει τις ροές του συστήματος.

Ο στοιχειομετρικός πίνακας αποτελείται από τους στοιχειομετρικούς συντελεστές των αντιδράσεων που περιλαμβάνονται σε ένα δίκτυο αντιδράσεων. Ο πίνακας είναι οργανωμένος κατά τέτοιο τρόπο ώστε κάθε στήλη να αντιστοιχεί σε μία αντίδραση και κάθε γραμμή να αντιστοιχεί σε ένα μεταβολίτη. Τα στοιχεία του πίνακα είναι οι στοιχειομετρικοί συντελεστές, οι οποίοι είναι ακέραιοι αριθμοί. Κάθε στήλη, η οποία περιγράφει μία αντίδραση, εξαρτάται από τους κανόνες και περιορισμούς της χημείας, όπως είναι η ισορροπία των στοιχείων μεταξύ αντιδρώντων και προϊόντων. Έτσι, κάθε γραμμή περιγράφει τις αντιδράσεις στις οποίες κάθε μεταβολίτης συμμετέχει και επομένως τον τρόπο με τον οποίο διασυνδέονται οι αντιδράσεις. Μαθηματικά, ο στοιχειομετρικός πίνακας  $S (m \times n)$  μετασχηματίζει το διάνυσμα των ροών  $v = (v_1, v_2, \dots, v_n)$  (που περιέχει τους ρυθμούς των αντιδράσεων) σε ένα διάνυσμα που περιέχει τις χρονικές παραγώγους των συγκεντρώσεων. Για σταθερή κατάσταση προκύπτει η εξίσωση (3.4). Ο στοιχειομετρικός πίνακας, επομένως, περιέχει χημικές και συστημικές πληροφορίες του δικτύου [2]. Στην Εικόνα 11 απεικονίζεται η μορφή του στοιχειομετρικού πίνακα και η σχέση του με τα εξεταζόμενα μονοπάτια.

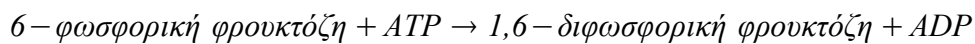


Εικόνα 11. Δομή του στοιχειομετρικού πίνακα και πώς περιγράφει ένα χάρτη. A: Χάρτης αντιδράσεων (κανονικός πίνακας). B: Χάρτης μεταβολιτών (ανάστροφος πίνακας) [2].

Ο στοιχειομετρικός πίνακας  $S$  περιγράφει ένα δίκτυο, το οποίο αναπαριστάται από ένα χάρτη. Κάθε κόμβος του χάρτη αντιστοιχεί σε μία γραμμή του πίνακα, και κάθε στήλη του πίνακα αντιστοιχεί σε μία σύνδεση του χάρτη. Επομένως, ο  $S$  περιγράφει ένα χάρτη στον οποίο κάθε μεταβολίτης είναι ένας κόμβος και οι αντιδράσεις είναι οι συνδέσεις μεταξύ των μεταβολιτών. Ο χάρτης αυτός είναι ένας χάρτης αντιδράσεων (*reaction map*) (Εικόνα 11A).

Ο αρνητικός ανάστροφος στοιχειομετρικός πίνακας,  $-S^T$ , επίσης περιγράφει ένα χάρτη, ο οποίος καλείται χάρτης μεταβολιτών. Ο χάρτης αυτός έχει τις αντιδράσεις (γραμμές πλέον του  $-S^T$ ) ως κόμβους του δικτύου και τους μεταβολίτες (στήλες πλέον του  $-S^T$ ) ως συνδέσεις μεταξύ των κόμβων (Εικόνα 11B). Η απεικόνιση αυτή του βιοχημικού δικτύου, αν και αντισυμβατική, αποδεικνύεται σε πολλές περιπτώσεις χρήσιμη [2].

Μία συνέπεια της παραδοχής της σταθερής κατάστασης είναι ότι είναι αρκετό να λαμβάνονται υπ' όψιν μόνο μεταβολίτες οι οποίοι βρίσκονται σε σημεία διακλάδωσης (branch points). Όλες οι ενδιάμεσες ενώσεις ενός γραμμικού μονοπατιού μπορούν να παραληφθούν. Αυτό μπορεί να γίνει φανερό αν εξεταστεί η μετατροπή της 6-φωσφορικής φρουκτόζης σε φωσφορική διϋδροξυακετόνη και 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη στο μονοπάτι EMP. Η μετατροπή αυτή πραγματοποιείται σε δύο στάδια μέσω των εξής αντιδράσεων:



Οι δύο αυτές αντιδράσεις είναι οι μόνες στις οποίες συμμετέχει η 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη. Το ισοζύγιο μάζας γύρω από αυτόν τον μεταβολίτη είναι:

$$v_1 - v_2 = 0$$

όπου  $v_1$  και  $v_2$  είναι οι ρυθμοί των δύο ανωτέρω αντιδράσεων αντίστοιχα. Ο ρυθμός της πρώτης αντίδρασης είναι ίσος με το ρυθμό της δεύτερης αντίδρασης. Μπορούμε, επομένως, να συμπτύξουμε τις δύο σε μία γενική αντίδραση μετατροπής της 6-φωσφορικής φρουκτόζης σε φωσφορική διϋδροξυακετόνη και 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη, της οποίας ο ρυθμός είναι  $v_1$ . Η σύμπτυξη αυτή δεν μεταβάλλει τους βαθμούς ελευθερίας του συστήματος καθώς η αφαίρεση του ρυθμού μιας αντίδρασης συνοδεύεται από την εξάλειψη ενός ισοζυγίου μάζας (της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης). Παρόμοιες συμπτύξεις μπορούν να πραγματοποιούνται κάθε φορά που αντιμετωπίζονται γραμμικές ακολουθίες αντιδράσεων (άλλο παράδειγμα είναι η μετατροπή του 3-φωσφογλυκερικού οξέος σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ κατά τη γλυκόλυση). Συνεπώς, κατά τον καθορισμό της στοιχειομετρίας των μεταβολικών μονοπατιών, αρκεί να λαμβάνονται υπόψη μόνο μεταβολίτες σε σημεία διακλάδωσης του δικτύου, κάτι το οποίο οδηγεί σε σημαντική μείωση της πολυπλοκότητας του στοιχειομετρικού μοντέλου που χρησιμοποιείται κατά την MFA.

Οι εξισώσεις (3.3) και (3.4) αποτελούν τη βάση για την MFA, ώστε να υπολογιστούν οι άγνωστες μεταβολικές ροές του διανύσματος ενδοκυτταρικών ρυθμών  $v$ . Η εξίσωση (3.4) περιγράφει  $m$  γραμμικά αλγεβρικά ισοζύγια για τους  $m$  μεταβολίτες με  $n$  αγνώστους (τις μεταβολικές ροές). Επειδή ο αριθμός των αντιδράσεων ( $n$ ) είναι πάντοτε μεγαλύτερος από τον αριθμό των μεταβολιτών ( $m$ ), το σύστημα των αλγεβρικών εξισώσεων έχει  $F$  βαθμούς ελευθερίας,



οι οποίοι βρίσκονται από τη σχέση:  $F = n - m$ . Κατά συνέπεια, κάποια από τα στοιχεία του  $v$  πρέπει να μετρούνται ώστε να επιτρέπεται ο υπολογισμός των υπολοίπων. Ένα τυπικό παράδειγμα ρυθμού αντίδρασης που μπορεί να μετρηθεί είναι η μετατροπή της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη, η οποία μπορεί να θεωρηθεί ότι ισούται με το ρυθμό πρόσληψης της γλυκόζης.

Αν οι ροές (ή ρυθμοί αντιδράσεων) του διανύσματος  $v$  που μετρούνται είναι περισσότερες από  $F$ , το σύστημα είναι *υπερορισμένο (overdetermined)*. Οι επιπλέον εξισώσεις που προκύπτουν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ελεγχθούν η συνεκτικότητα (consistency) των ισοζυγίων του μεταβολικού δικτύου, η ακρίβεια των μετρήσεων των ροών, η εγκυρότητα (validity) της υπόθεσης σταθερής κατάστασης, και εν τέλει, ο υπολογισμός τιμών για τις άγνωστες ενδοκυτταρικές ροές με μεγαλύτερη ακρίβεια.

Αν το πλήθος των ροών που μετρούνται ισούται με  $F$ , το σύστημα γίνεται *ορισμένο (determined)* και η λύση που προκύπτει είναι μοναδική. Οι υπόλοιπες ροές του  $v$  μπορούν να υπολογισθούν επιλύοντας το γραμμικό σύστημα της εξίσωσης (3.4). Αν ο στοιχειομετρικός πίνακας χωριστεί σε δύο τμήματα για τις μετρούμενες ροές ( $S_m$ ) και για τις άγνωστες ροές ( $S_c$ ), η εξίσωση μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$Sv = S_m v_m + S_c v_c = 0 \quad (3.5)$$

όπου  $v_m$  ένα διάνυσμα των μετρούμενων ροών και  $v_c$  ένα διάνυσμα των αγνώστων ροών, οι οποίες πρόκειται να υπολογισθούν. Επειδή μετρούνται ακριβώς  $F = n - m$  ροές, ο  $S_c$  είναι ένας τετραγωνικός πίνακας (διαστάσεων  $m \times m$ ), και αν ο πίνακας αυτός μπορεί να αντιστραφεί, τα στοιχεία του  $v_c$  μπορούν να βρεθούν από τη σχέση:

$$v_c = -(S_c)^{-1} S_m v_m \quad (3.6)$$

Προϋπόθεση για την ύπαρξη μοναδικής λύσης αποτελεί ή γραμμική ανεξαρτησία του συστήματος των αλγεβρικών εξισώσεων, δηλαδή να μην είναι κάποια από τις αλγεβρικές εξισώσεις γραμμικός συνδυασμός των υπολοίπων. Η γραμμική ανεξαρτησία είναι απαραίτητη για την αντιστροφή του πίνακα  $S_c$ , και μπορεί να ελεγχθεί εύκολα μέσω του βαθμού του πίνακα. Συνεπώς, αν ο πίνακας έχει πλήρη βαθμό ( $\text{rank}(S_c) = m$ ), δηλαδή η  $\det(S_c)$  είναι μη μηδενική, ο πίνακας είναι αντιστρέψιμος και οι μη μετρήσιμες ροές μπορούν να υπολογισθούν. Αν ο βαθμός του πίνακα  $S_c$  είναι χαμηλότερος από  $m$ , ο πίνακας είναι μη αντιστρέψιμος ή ιδιόμορφος (singular) και  $\det(S_c) = 0$ . Στην περίπτωση αυτή δεν μπορεί να εξαχθεί λύση από την εξίσωση (3.6) καθώς το σύστημα είναι στην ουσία υποορισμένο <sup>[1]</sup>.

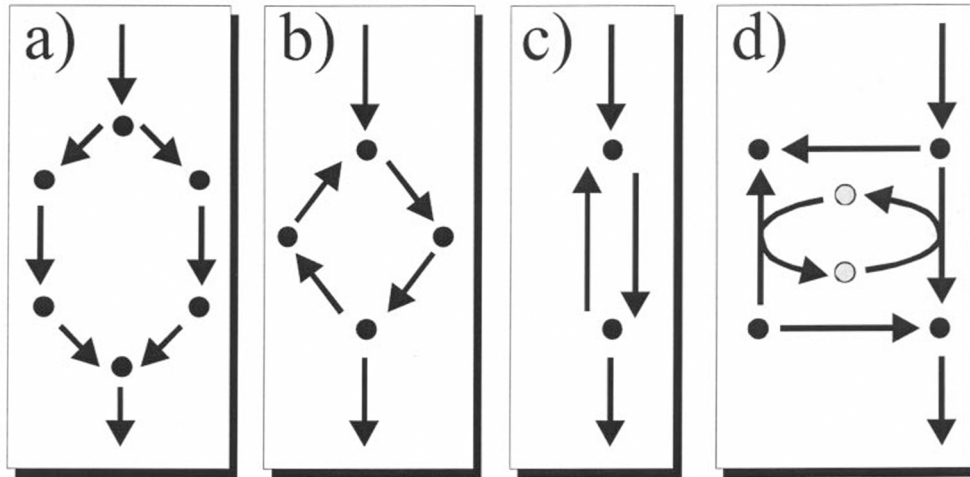
Αν οι μετρούμενες ροές είναι λιγότερες από τους βαθμούς ελευθερίας  $F$ , το σύστημα είναι *υποορισμένο (underdetermined)* και μπορεί να προκύψει άπειρο πλήθος λύσεων. Στην περίπτωση αυτή μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι *γραμμικής αριστοποίησης (linear optimization)* για την εύρεση μίας λύσης για τις ενδοκυτταρικές ροές, δεδομένου ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία κατάλληλη αντικειμενική συνάρτηση (όπως είναι, για παράδειγμα, η μεγιστοποίηση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων). Μέσω της προσέγγισης αυτής είναι δυνατόν να εξαχθεί μία λύση για τις ενδοκυτταρικές ροές, βελτιστοποιώντας την αντικειμενική συνάρτηση η οποία υπόκειται σε συγκεκριμένους περιορισμούς. Κάθε ένας από τους περιορισμούς μπορεί να περιγραφεί

μαθηματικά, παρέχοντας μία γεωμετρική αναπαράσταση της επίδρασης των περιορισμών στην μεταβολική λειτουργία. Κάθε μεταβολική ροή του δικτύου συνιστά μία διάσταση του χώρου των λύσεων και μπορεί κατά συνέπεια να αναπαρασταθεί από ένα άξονα σε ένα γράφημα. Το γράφημα σε συνδυασμό με τους περιορισμούς του δικτύου θα παράγει ένα υπερεπίπεδο, το οποίο αναπαριστά ένα χώρο λύσεων για δεδομένο μεταβολικό δίκτυο με όλες τις πιθανές καταστάσεις στις οποίες μπορεί το δίκτυο να βρεθεί. Η προσέγγιση αυτή καλείται συχνά *ανάλυση εξισορρόπησης ροών (Flux Balance Analysis – FBA)*.

### 3.3 Αδυναμίες της κλασσικής MFA

Η ανωτέρω μαθηματική ανάλυση μπορεί να χαρακτηριστεί ως κλασσική MFA ή ως στοιχειομετρική MFA (stoichiometric MFA). Η μέθοδος αυτή βασίζεται αποκλειστικά στην εξισορρόπηση ροών γύρω από μεταβολίτες σε ένα υποτιθέμενο δίκτυο βιοχημικών αντιδράσεων. Ωστόσο, οι στοιχειομετρικοί περιορισμοί και οι εξωτερικές μετρήσεις των ροών συχνά δεν παρέχουν αρκετές πληροφορίες για τον υπολογισμό όλων των ροών που μας ενδιαφέρουν. Η κλασσική MFA αποδεικνύεται σημαντικά περιορισμένη και υστερεί στις ακόλουθες περιπτώσεις:

1. *Παράλληλα μονοπάτια σε ένα μεταβολικό δίκτυο* (Εικ. 12a). Στην περίπτωση αυτή, δεν μπορούν να γίνουν επιμέρους υπολογισμοί των ροών των κλάδων, επειδή οι μετρήσεις που λαμβάνονται πειραματικά αφορούν ροές ανταλλαγής μεταβολιτών του κυττάρου με το περιβάλλον του, οι οποίες δεν δίνουν κανένα στοιχείο για το διαχωρισμό και την επανένωση των παράλληλων αυτών μονοπατιών.
2. *Μεταβολικοί κύκλοι οι οποίοι δεν συνδέονται με μετρήσιμες ροές*. Η εικόνα 12b δείχνει ένα τέτοιο παράδειγμα στο οποίο η μέτρηση μίας ροής εισόδου στον κύκλο δεν αρκεί για τον προσδιορισμό των υπόλοιπων ροών του μεταβολικού κύκλου. Η τιμή της ροής που θα υπολογιστεί θα είναι ενιαία για τον κύκλο, η οποία για δεδομένες τιμές εξωκυτταρικών ροών, θα προκύπτει αρκετά επισφαλής και εν πολλοίς αυθαίρετη.
3. *Αμφίδρομες αντιδράσεις*. Οι αντιδράσεις αυτές είναι μια ειδική κατηγορία μεταβολικού κύκλου η οποία λαμβάνει χώρα και προς τις δύο κατευθύνσεις ταυτόχρονα (Εικ. 12c). Η περίπτωση αυτή δεν αποτελεί εξαίρεση αλλά μάλλον τον κανόνα σε ένα μεταβολικό μονοπάτι, διότι μόνο οι αντιδράσεις που είναι έντονα μη αντιστρέψιμες για θερμοδυναμικούς λόγους, μπορούν να θεωρηθούν ότι είναι μονόδρομες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αμφίδρομων αντιδράσεων είναι τα βήματα του μονοπατιού της φωσφορικής πεντόζης που καταλύονται από τα ένζυμα τρανσκετολάση και τρανσαλδολάση<sup>[12]</sup>. Η αντιστρεψιμότητα των αντιδράσεων και της ροής του άνθρακα μέσω του PPP έχει εξεταστεί τόσο πειραματικά όσο και θεωρητικά<sup>[9]</sup>.
4. Σε ένα τυπικό μεταβολικό δίκτυο (το οποίο μπορεί να περιλαμβάνει τα μονοπάτια της γλυκόλυσης, της φωσφορικής πεντόζης, του κύκλου TCA και αναπληρωτικές οδούς) είναι δυνατόν να υπολογισθούν όλες οι ροές, μέσω στοιχειομετρικής MFA, αν οι ενεργειακοί μεταβολίτες ATP, NADH, NADPH, κ.α. συμμετέχουν στα ισοζύγια όπως όλοι οι υπόλοιποι



Εικόνα 12. Τυπικές περιπτώσεις στις οποίες αποτυγχάνει η στοιχειομετρική MFA: a: Παράλληλα μονοπάτια χωρίς κάποια αντιπροσωπευτική πειραματική μέτρηση ροής, b: Ορισμένοι μεταβολικοί κύκλοι, c: Αμφίδρομες αντιδράσεις, και d: Διαχωρισμός μονοπατιών όταν δεν εξισορροπούνται οι συμπαραγόντες (γκρίζοι κύκλοι) <sup>[12]</sup>.

μεταβολίτες. Κατά συνέπεια, πρέπει να θεωρηθεί ότι όλες οι αντιδράσεις παραγωγής και κατανάλωσης ενέργειας και οι αντιδράσεις μετατροπής μεταξύ των ενεργειακών μεταβολιτών είναι επακριβώς γνωστές. Αντιθέτως, αποτελέσματα των τελευταίων ετών έχουν δείξει επανειλημμένα ότι τα ισοζύγια των NADPH και NADH δεν κλείνουν και η απόδοση μετατροπής του NADH προς ATP δεν είναι ακριβώς γνωστή. Δεν μπορούμε, επομένως, να θεωρήσουμε ικανοποιητική την αρχική προσέγγιση η οποία οδηγεί σε αποτελέσματα με μεγάλα περιθώρια σφάλματος <sup>[12]</sup>.

Μετά την αναγνώριση των αδυναμιών της κλασικής MFA έγινε φανερό ότι απαιτούνται περισσότερα πειραματικά δεδομένα για την καλύτερη περιγραφή του μεταβολικού δικτύου. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκαν τεχνικές που χρησιμοποιούν ισοτοπικούς ιχνηθέτες για την παρακολούθηση της διαδρομής των διαφόρων χημικών στοιχείων στο κύτταρο, ξεκινώντας από την πρόσληψη υποστρωμάτων και καταλήγοντας στην παραγωγή προϊόντων. Στο επόμενο κεφάλαιο περιγράφεται η μέθοδος ισοτοπικής ιχνηθέτησης (isotope labeling) με ιχνηθέτη το ισότοπο <sup>13</sup>C.

## 4. MFA με Ισοτοπική Ιχνηθέτηση (Isotope Labeling)

### 4.1 Ιχνηθέτες και ισοτοπομερή

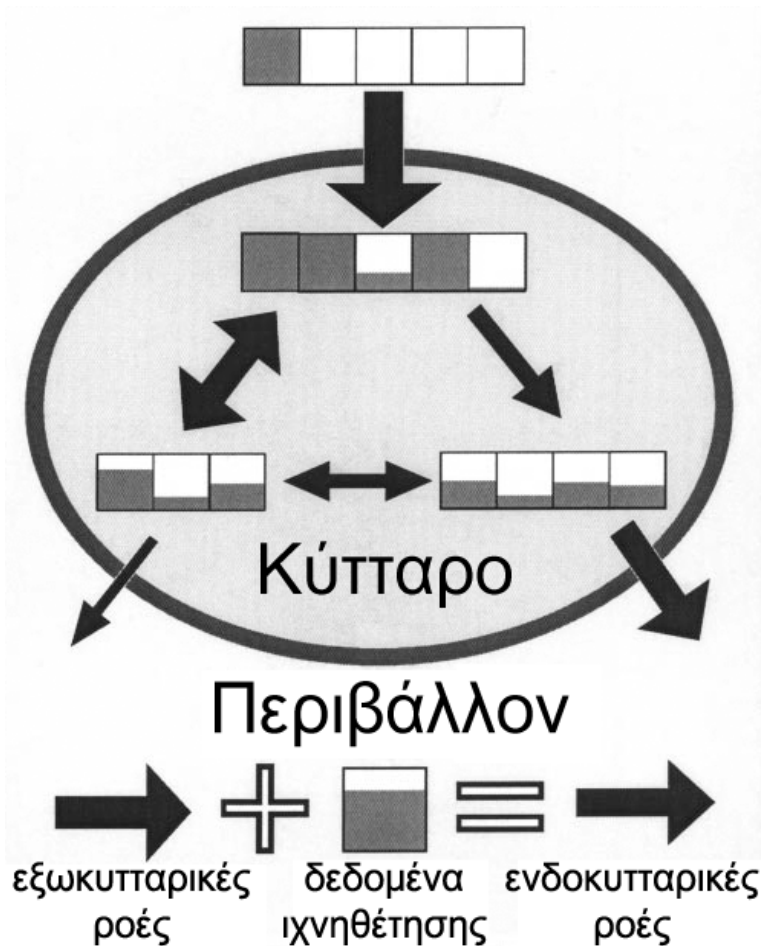
Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην ενότητα 3.3 κατέστη αναγκαία η χρήση ισοτοπικών ιχνηθετών (isotopic tracer/marker/label) για τον υπολογισμό των επιθυμητών ενδοκυτταρικών ροών, δεδομένων των αδυναμιών της στοιχειομετρικής MFA. Οι ιχνηθέτες αυτοί είναι σταθερά ισότοπα στοιχείων τα οποία εισάγονται στο εξεταζόμενο σύστημα και επιτρέπουν στους ιχνηθετημένους παραγόμενους μεταβολίτες να ανιχνευτούν από όργανα φασματομετρίας μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού (NMR) και φασματομετρίας μάζας (MS). Κάποιοι από τους πιο συνήθεις ιχνηθέτες παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Ιδιότητες των ραδιενεργών και σταθερών ισότοπων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ιχνηθέτες [14].

Ισότοπο	Τύπος	Τύπος ακτινοβολίας	Χρόνος ημιζωής	Σχετική φυσική αφθονία
$^2\text{H}$	Σταθερό			0.0154%
$^3\text{H}$	Ραδιενεργό	$\beta^-$	12.1 έτη	
$^{13}\text{C}$	Σταθερό			1.1%
$^{14}\text{C}$	Ραδιενεργό	$\beta^-$	5700 έτη	
$^{15}\text{N}$	Σταθερό			0.365%
$^{18}\text{O}$	Σταθερό			0.204%
$^{24}\text{Na}$	Ραδιενεργό	$\beta^-$ , $\gamma$	15 ώρες	
$^{32}\text{P}$	Ραδιενεργό	$\beta^-$	14.3 ημέρες	
$^{35}\text{S}$	Ραδιενεργό	$\beta^-$	87.1 ημέρες	
$^{36}\text{Cl}$	Ραδιενεργό	$\beta^-$	310,000 έτη	
$^{42}\text{K}$	Ραδιενεργό	$\beta^-$	12.5 ώρες	
$^{45}\text{Ca}$	Ραδιενεργό	$\beta^-$	152 ημέρες	
$^{59}\text{Fe}$	Ραδιενεργό	$\beta^-$ , $\gamma$	45 ημέρες	
$^{131}\text{I}$	Ραδιενεργό	$\beta^-$ , $\gamma$	8 ημέρες	

Εξαιτίας της ύπαρξης ατόμων άνθρακα σε όλους σχεδόν τους μεταβολίτες, τα ισότοπα του, αποδεικνύονται ιδιαίτερος χρήσιμα για την MFA. Ήδη από τη δεκαετία του 1980 είχε χρησιμοποιηθεί ως ιχνηθέτης το ισότοπο  $^{14}\text{C}$ . Άμεσος διάδοχος αυτού αποτελεί η ιχνηθέτηση με  $^{13}\text{C}$ , μια διαδικασία που καλείται  $^{13}\text{C}$  MFA, και περιγράφεται στην ενότητα αυτή. Η μέθοδος αυτή αποδεικνύεται αρκετά ισχυρότερη και καλύπτει όλες τις αδυναμίες της στοιχειομετρικής MFA.

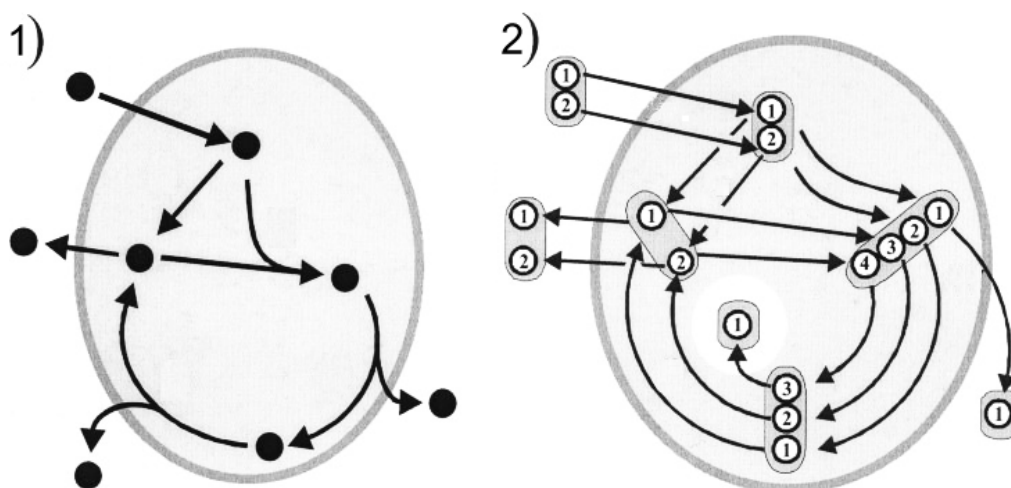
Η  $^{13}\text{C}$  MFA βασίζεται σε ένα πείραμα ιχνηθέτησης με άνθρακα (*Carbon Labeling Experiment, CLE*). Σε ένα τέτοιο πείραμα τροφοδοτείται στο βιολογικό σύστημα ένα υπόστρωμα το οποίο περιέχει τον χρησιμοποιούμενο ιχνηθέτη (π.χ.  $[1-^{13}\text{C}]$  γλυκόζη). Τα ιχνηθετημένα άτομα άνθρακα διανέμονται στη συνέχεια σε όλο το μεταβολικό δίκτυο, έως ότου καταστεί δυνατή η μέτρηση της έντασης (intensity) ή του βαθμού εμπλουτισμού (degree of enrichment) των ενδοκυτταρικών ομάδων μεταβολιτών από όργανα NMR ή MS. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν παρέχουν μεγάλο όγκο επιπλέον πληροφοριών για την ποσοτικοποίηση των ενδοκυτταρικών ροών. Η εικόνα 13 συνοψίζει την αρχή της μεθόδου  $^{13}\text{C}$  MFA: οι ενδοκυτταρικές ροές υπολογίζονται από μετρούμενες εξωκυτταρικές ροές και από μετρούμενα ενδοκυτταρικά δεδομένα ιχνηθέτησης. Ωστόσο, οι υπολογιστικές διαδικασίες πίσω από αυτή την απλή “φόρμουλα” είναι αρκετά πολύπλοκη και μαθηματικά μάλλον σύνθετη. Έτσι, πήρε αρκετά χρόνια έως ότου γίνουν διαθέσιμα ισχυρά υπολογιστικά εργαλεία για την επίλυση προβλημάτων  $^{13}\text{C}$ -MFA <sup>[12]</sup>.



Εικόνα 13. Αρχή της  $^{13}\text{C}$  MFA. Οι ενδοκυτταρικές ροές υπολογίζονται μέσω μετρήσεων εξωκυτταρικών ροών και ενδοκυτταρικών δεδομένων ιχνηθέτησης <sup>[12]</sup>.

Μία κεντρική έννοια στην  $^{13}\text{C}$  MFA είναι το ισοτοπομερές ενός μεταβολίτη. Ο όρος ισοτοπομερές προκύπτει από τη σύνθεση των όρων ισότοπο και ισομερές, και χρησιμοποιείται για να δηλώσει τις διαφορετικές καταστάσεις ιχνηθέτησης στις οποίες μπορεί να βρίσκεται ένας μεταβολίτης. Έστω ένας μεταβολίτης με  $n$  άτομα άνθρακα. Σε κανονικές συνθήκες η αλυσίδα του αποτελείται από άτομα  $^{12}\text{C}$ . Όταν χρησιμοποιείται ιχνηθέτης  $^{13}\text{C}$ , οποιοδήποτε από τα άτομα της αλυσίδας μπορεί να αντικατασταθεί από άτομα  $^{13}\text{C}$ . Στην περίπτωση αυτή παρατηρούνται  $2^n$  διαφορετικές καταστάσεις ιχνηθέτησης, που σημαίνει ότι υπάρχουν  $2^n$  διαφορετικά ισοτοπομερή. Η κατανομή ισοτοπομερούς (isotopomer distribution) ενός μεταβολίτη με  $n$  άτομα άνθρακα μπορεί να χαρακτηριστεί από το ποσοστό που καταλαμβάνει κάθε ισοτοπομερές σε μία ομάδα μεταβολιτών, το οποίο καλείται κλάσμα ισοτοπομερούς (isotopomer fraction). Είναι σαφές ότι το άθροισμα των κλασμάτων για ένα μεταβολίτη θα προκύπτει ίσο με τη μονάδα (100%). Επεκτείνοντας την έννοια αυτή στο επίπεδο του κυττάρου μπορεί να λεχθεί ότι η ιχνηθέτηση για το όλο κύτταρο προσδιορίζεται για γνωστές κατανομές ισοτοπομερών όλων των μεταβολιτών.

Ο τρόπος με τον οποίο παράγονται και καταναλώνονται τα ισοτοπομερή των μεταβολιτών στις διάφορες ενζυματικές αντιδράσεις καθορίζεται από τον τρόπο που ανταλλάσσονται τα άτομα άνθρακα των διαφόρων μεταβολιτών. Η εικόνα 14 δείχνει ένα δίκτυο ανταλλαγής ατόμων άνθρακα για ένα απλό μεταβολικό δίκτυο. Από το δίκτυο ανταλλαγής ατόμων άνθρακα μπορεί να κατασκευαστεί το δίκτυο ισοτοπομερών, τα ισοζύγια του οποίου περιγράφουν το πώς αλληλεπιδρούν τα διάφορα ισοτοπομερή μεταξύ τους.

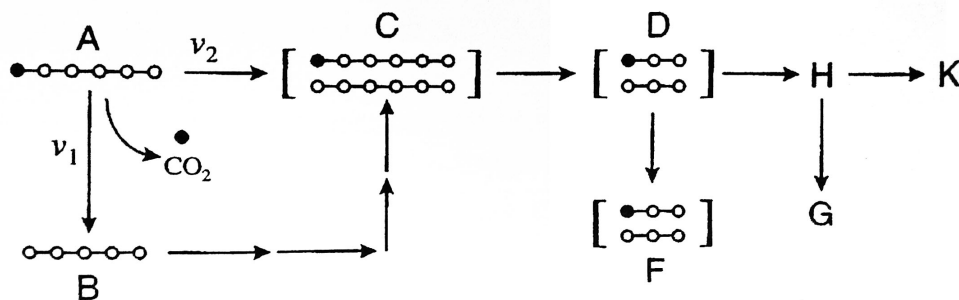


Εικόνα 14. 1: Από το μεταβολικό δίκτυο προκύπτουν τα στοιχειομετρικά ισοζύγια, 2: Από τις ανταλλαγές ατόμων άνθρακα προκύπτουν τα ισοζύγια ισοτοπομερών <sup>[12]</sup>.

## 4.2 Διάδοση ιχνηθέτη

Είναι σημαντικό να γίνει κατανοητός ο τρόπος διάδοσης του ιχνηθέτη μέσα σε ένα βιολογικό σύστημα, πώς δηλαδή καταλήγουν τα άτομα  $^{13}\text{C}$  του υποστρώματος να βρίσκονται σε διάφορες θέσεις της ανθρακικής αλυσίδας των παραγόμενων μεταβολιτών. Για το σκοπό αυτό παρουσιάζονται δύο παραδείγματα μονοπατιών στα οποία εισάγεται κάποιος ιχνηθετημένος μεταβολίτης.

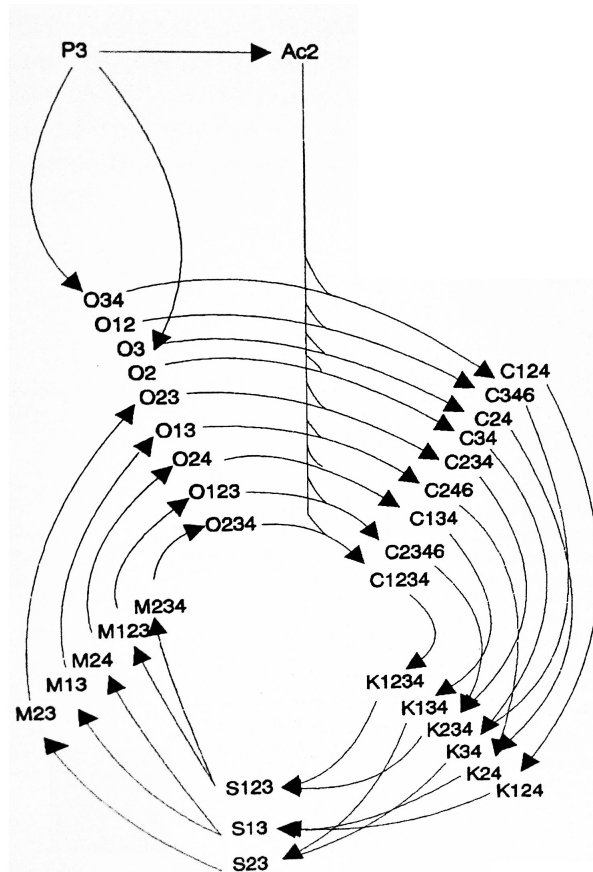
Στην εικόνα 15 παρουσιάζεται ένα απλό παράδειγμα μονοπατιού στο οποίο εμφανίζεται διαχωρισμός ροής (ροές  $v_1$  και  $v_2$ ). Ο μεταβολίτης A αποτελείται από έξι άτομα άνθρακα, το πρώτο



Εικόνα 15. Προσδιορισμός ποσοστού διαχωρισμού ροής (flux split ratio) μέσω ισοτοπικής ιχνηθέτησης (οι μαύροι κύκλοι απεικονίζουν τις θέσεις του ιχνηθέτη) <sup>[1]</sup>.

από τα οποία έχει αντικατασταθεί από  $^{13}\text{C}$ . Υποθέτοντας ότι η αντίδραση που οδηγεί στην παραγωγή του μεταβολίτη B είναι μια αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης ( $v_1$ ), η οποία αφαιρεί από το A τον ιχνηθετημένο άνθρακα, το μόριο του B θα αποτελείται από πέντε άτομα άνθρακα χωρίς ιχνηθέτηση. Έπειτα, η πορεία του μονοπατιού μέσω του μεταβολίτη B θα οδηγήσει στην παραγωγή του μεταβολίτη C ο οποίος δεν περιέχει  $^{13}\text{C}$ . Αντίθετα, τα μόρια του C που προκύπτουν από την άμεση οδό (με ρυθμό  $v_2$ ) θα διατηρούν τον ιχνηθέτη στην ανθρακική θέση 1, όπως φαίνεται και στην εικόνα. Ο εμπλουτισμός του μεταβολίτη C σε  $^{13}\text{C}$  θα είναι ευθέως ανάλογος του ρυθμού της αντίδρασης 2 σε σχέση με τον συνολικό ρυθμό κατανάλωσης του μεταβολίτη A. Το ίδιο ισχύει για τον μεταβολίτη D και, ιδιαίτερα, για τον εκκρινόμενο από το σύστημα μεταβολίτη F, του οποίου η παραγωγή μπορεί να μετρηθεί κατά τη μέτρηση των εξωκυτταρικών ροών. Ο βαθμός εμπλουτισμού  $^{13}\text{C}$  στην πρώτη θέση του μεταβολίτη F, επομένως, μπορεί να δώσει πληροφορίες για το σχετικό ρυθμό της αντίδρασης 2. Ο τελευταίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με το σύνολο των μετρήσεων των ροών ώστε να προκύψει διαφοροποίηση μεταξύ των τιμών  $v_1$  και  $v_2$  <sup>[1]</sup>.

Στην επόμενη εικόνα παρουσιάζεται η διάδοση ιχνηθέτη  $^{13}\text{C}$  στον κύκλο TCA. Οι μεταβολικοί κύκλοι καταλαμβάνουν σημαντικό τμήμα του μεταβολισμού και αυξάνουν την πολυπλοκότητα του μεταβολικού δικτύου. Η σωστή αντιμετώπιση τους αποτελεί μια από τις αδυναμίες της κλασικής MFA. Η λειτουργία τους, όμως, μπορεί να εξηγηθεί αρκετά καλά μέσω της  $^{13}\text{C}$  MFA. Η πολυπλοκότητα αυτή γίνεται φανερή μέσω της περιγραφής μίας περιστροφής του εν λόγω κύκλου ξεκινώντας από το πυροσταφυλικό οξύ το οποίο είναι ιχνηθετημένο στον τρίτο άνθρακα ( $[3-^{13}\text{C}]$  pyruvate) (εικ. 16). Μέσω της αντίδρασης πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, όλο



Εικόνα 16. Διαδοχική ιχνηθέτηση των ατόμων των ενδιάμεσων μεταβολιτών μετά από πολλαπλές περιστροφές του κύκλου TCA χρησιμοποιώντας 100% εμπλουτισμένο  $[3-^{13}\text{C}]$  πυροσταφυλικό οξύ. Συνομογραφίες: Ac: ακετυλο-CoA, O: οξαλοξικό οξύ, C: κιτρικό οξύ, K: α-κετογλουταρικό οξύ, S: ηλεκτρικό οξύ, M: μηλικό οξύ. Οι αριθμοί δίπλα από τους μεταβολίτες αναφέρονται στις ανθρακικές θέσεις που ιχνηθετούνται από  $^{13}\text{C}$  [1].

το ακετυλο-CoA, που παράγεται από το 100%  $[3-^{13}\text{C}]$  πυροσταφυλικό οξύ, θα είναι ιχνηθετημένο στη θέση C2. Το οξαλοξικό οξύ, το οποίο προέρχεται από την αναπληρωτική αντίδραση που καταλύεται από την πυροσταφυλική καρβοξυλάση, θα είναι στη μορφή  $\text{O}_{34}$  αν το διττανθρακικό (bicarbonate) που συμμετέχει είναι ιχνηθετημένο με  $^{13}\text{CO}_2$ , και στη μορφή  $\text{O}_3$  αν το διττανθρακικό δεν είναι ιχνηθετημένο. Επιπλέον, γίνεται η υπόθεση ότι η αντίστροφη αντίδραση του οξαλοξικού προς φουμαρικό οξύ είναι πολύ ταχεία συγκριτικά με τις αντιδράσεις της συνθάσης του κιτρικού οξέος και της PEP καρβοξυκινάσης και, κατά συνέπεια, οδηγεί σε πλήρη συμμετρική εξισορρόπηση της ανθρακικής ιχνηθέτησης μεταξύ των θέσεων C1 και C4 και μεταξύ των θέσεων C2 και C3 στα οξαλοξικό, ηλεκτρικό, μηλικό και φουμαρικό οξέα. Η υπόθεση αυτή οδηγεί σε ίσες συγκεντρώσεις των  $\text{O}_{34}$  και  $\text{O}_{12}$  και των  $\text{O}_3$  και  $\text{O}_2$ . Προχωρώντας περαιτέρω στον κύκλο TCA, η συμπύκνωση του  $\text{O}_{34}$  με  $\text{Ac}_2$  θα παραγάγει διαδοχικά  $\text{C}_{124}$ ,  $\text{K}_{124}$ ,  $\text{S}_{13}$ ,  $0.5\text{F}_{13} + 0.5\text{F}_{24}$ ,  $0.5\text{M}_{13} + 0.5\text{M}_{24}$ , και  $0.5\text{O}_{13} + 0.5\text{O}_{24}$ . Έτσι, διαπιστώνεται ότι τα δύο ισοτοπομερή  $\text{O}_{34}$  και  $\text{O}_3$ , έχουν τώρα παράξει δύο επιπλέον ισοτοπομερή για το οξαλοξικό οξύ, τα οποία είναι τα  $\text{O}_{13}$  και  $\text{O}_{24}$ . Τα τελευταία τροποποιούνται περαιτέρω μετά από επιπλέον περιστροφές του κύκλου, οδηγώντας στην



παραγωγή περισσότερων ισοτοπομερών για τα ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου.

Όπως γίνεται φανερό, η πολυπλοκότητα ανάλυσης ενός μεταβολικού δικτύου αυξάνεται σημαντικά επηρεαζόμενη από το πλήθος των ισοτοπομερών που προκύπτουν και τα οποία πρέπει να συμπεριληφθούν στα ισοζύγια μάζας. Η γενική μεθοδολογία υπολογισμού των επιθυμητών ροών περιγράφεται στην ενότητα 4.3. Το πρώτο βήμα αυτής αποτελεί η απαρίθμηση όλων των πιθανών ισοτοπομερών ενός δικτύου. Για το συγκεκριμένο παράδειγμα του κύκλου TCA, τα πιθανά ισοτοπομερή των μεταβολιτών παρουσιάζονται στην εικόνα 16. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι δεν είναι πάντοτε παρόντα όλα τα θεωρητικά πιθανά ισοτοπομερή. Στην περίπτωση αυτή, για παράδειγμα, υπάρχουν  $2^5 = 32$  χημικά είδη  $\alpha$ -κετογλουταρικού οξέος, αλλά μόνο τα 6 από αυτά είναι παρόντα βάσει της υποτιθέμενης βιοχημείας.

### 4.3 Μεθοδολογία υπολογισμών

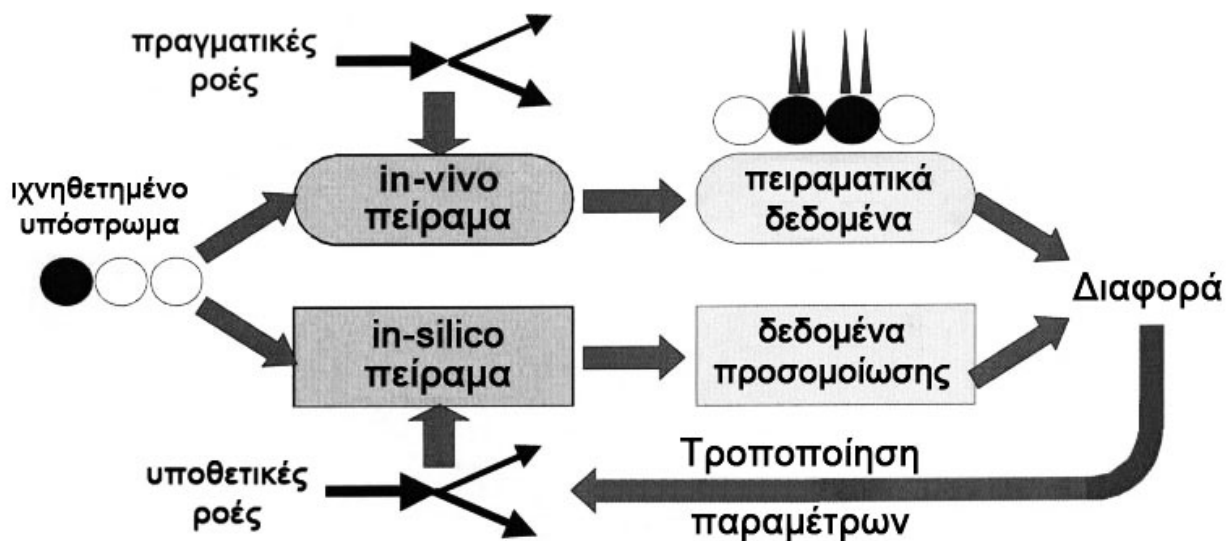
Όπως έχει ήδη ειπωθεί, ο σκοπός της  $^{13}\text{C}$  MFA είναι ο υπολογισμός των άγνωστων ενδοκυτταρικών ροών με τη χρήση ενός ιχνηθέτη, συγκεκριμένα του ισότοπου  $^{13}\text{C}$ , το οποίο εισάγεται σε ένα βιολογικό σύστημα μέσω ενός ιχνηθετημένου υποστρώματος. Πειραματικά, η διαδικασία αυτή αντιμετωπίζεται μέσω ενός CLE, από το οποίο λαμβάνονται πειραματικά δεδομένα μέσω NMR ή MS. Το επόμενο βήμα είναι η μοντελοποίηση του CLE, *in silico*, ώστε να εξαχθούν υπολογιστικά δεδομένα. Η αξιολόγηση των δύο αυτών ομάδων δεδομένων οδηγεί τελικά σε εκτίμηση για τις ζητούμενες ενδοκυτταρικές ροές. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται αναλυτικότερα τα βήματα που ακολουθούνται.

Αρχικά, καθορίζεται το μεταβολικό δίκτυο του οποίου οι ροές θα υπολογιστούν. Δεδομένης της τροφοδότησης του με τον ιχνηθέτη  $^{13}\text{C}$  απαριθμούνται όλα τα πιθανά ισοτοπομερή μεταβολιτών που μπορούν να προκύψουν. Το επόμενο βήμα είναι να γραφούν εξισώσεις ισοζυγίων για όλους τους μεταβολίτες και όλα τα ισοτοπομερή τους που εμφανίζονται στο δίκτυο. Σημειώνεται εδώ ότι το πλήθος των ισοτοπομερών και κατ' επέκταση των ισοζυγίων, μπορεί να προκύψει αρκετά μεγάλο, ανάλογα με το μέγεθος του δικτύου που μελετάται. Έτσι π.χ. για ένα ρεαλιστικά πολύπλοκο μοντέλο μεταβολικού δικτύου, το οποίο περιέχει μονοπάτια κεντρικού μεταβολισμού και βιοσυνθετικές αντιδράσεις, είναι δυνατόν να προκύψει ένα μη γραμμικό σύστημα εξισώσεων διαστάσεων 1000 ή υψηλότερων. Αυτό συμβαίνει επειδή κάποια μεγάλα μόρια έχουν πολλά πιθανά ισοτοπομερή, όπως το χορισμικό (chorismate) που από μόνο του έχει 1024 <sup>[12]</sup>. Οι εξισώσεις αυτές περιλαμβάνουν τις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών και των ισοτοπομερών τους, καθώς επίσης και τους ρυθμούς των ενδοκυτταρικών μετατροπών, οι οποίες τελικά ζητείται να υπολογιστούν (ροές).

Για την επίλυση των ανωτέρω ισοζυγίων γίνεται η υπόθεση ότι το σύστημα βρίσκεται σε μεταβολική και ισοτοπική σταθερή κατάσταση. Η *μεταβολική σταθερή κατάσταση (metabolic steady state)* είναι μία κατάσταση κατά την οποία οι συγκεντρώσεις όλων των ενδοκυτταρικών μεταβολιτών που συμμετέχουν στο δίκτυο παραμένουν σταθερές. Στην *ισοτοπική σταθερή κατάσταση (isotopic steady state)* οι σχετικοί πληθυσμοί των ισοτοπομερών μεταβολιτών θεωρούνται επίσης σταθερές <sup>[1]</sup>. Πειραματικά, κατά τη διάρκεια ενός CLE οι δύο σταθερές

καταστάσεις παρατηρούνται ως εξής. Η εισαγωγή του ιχνηθετημένου υποστρώματος πραγματοποιείται σε μια κυτταρική καλλιέργεια η οποία βρίσκεται σε μεταβολική σταθερή κατάσταση και στη συνέχεια το σύστημα αφήνεται να ηρεμήσει και να φτάσει σε ισοτοπική σταθερή κατάσταση. Έπειτα, με πειραματικές τεχνικές λαμβάνονται μετρήσεις ιχνηθέτησης των προϊόντων του μεταβολισμού (NMR, MS) <sup>[13]</sup>.

Σύμφωνα με την υπόθεση για μεταβολική και ισοτοπική σταθερή κατάσταση, τα ισοζύγια είναι γραμμικές εξισώσεις σε σχέση με τις άγνωστες μεταβολικές ροές και μπορούν να λυθούν για τις σχετικές συγκεντρώσεις των ισοτοπομερών των μεταβολιτών ως συνάρτηση των ροών. Το τελικό βήμα είναι μία επαναληπτική διαδικασία δοκιμής και σφάλματος από την οποία καθορίζονται οι άγνωστες ροές, ούτως ώστε να επαληθεύονται με τον καλύτερο τρόπο τα πειραματικά δεδομένα. Ξεκινώντας από υποθετικές τιμές για τις άγνωστες μεταβολικές ροές, υπολογίζονται αρχικά οι σχετικοί πληθυσμοί των ισοτοπομερών, οι οποίοι στη συνέχεια αξιοποιούνται ώστε να υπολογιστούν ένα ή περισσότερα από τα επόμενα: (α) ο εμπλουτισμός σε ιχνηθέτη διαφόρων ατόμων άνθρακα των μεταβολιτών, (β) οι κατανομές μοριακών βαρών των μεταβολιτών μετρήσιμων από GC-MS, ή (γ) η λεπτή υφή (fine structure) των φασμάτων NMR των μεταβολιτών. Η σύγκριση των προβλέψεων του μοντέλου με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές για τον ιχνηθετικό εμπλουτισμό, τις κατανομές μοριακών βαρών, και τις εντάσεις (intensities) των γραμμών των φασμάτων NMR παράγει νέες εκτιμήσεις για τις άγνωστες ροές. Η επαναληπτική διαδικασία αυτή (εικ. 17) επαναλαμβάνεται έως ότου προκύψει ικανοποιητική συμφωνία μεταξύ των προβλέψεων του μοντέλου και των πειραματικών τιμών, συγκλίνοντας εν τέλει στον καθορισμό των κατά τα άλλα απαρατήρητων μεταβολικών ροών.



Εικόνα 17. Επαναληπτική διαδικασία προσδιορισμού επιθυμητών μεταβολικών ροών χρησιμοποιώντας MFA με ισοτοπική ιχνηθέτηση <sup>[12]</sup>.

Συνοψίζοντας τα ανωτέρω μπορεί να λεχθεί ότι η <sup>13</sup>C MFA ασχολείται με την επίλυση ενός “αντίστροφου προβλήματος” στο οποίο γίνεται εκτίμηση των ροών ξεκινώντας από δεδομένα κατανομών ιχνηθέτησης μέσω μιας επαναληπτικής διαδικασίας. Σε κάθε επανάληψη επιλύεται το

“προς τα εμπρός πρόβλημα” στο οποίο γίνεται εκτίμηση των κατανομών ιχνηθέτησης για δεδομένο μεταβολικό δίκτυο και για δεδομένες εκτιμήσεις παραμέτρων. Η ασυμφωνία μεταξύ προσομοιωμένων και πειραματικών δεδομένων οδηγεί σε επικαιροποίηση της εκτίμησης παραμέτρων ώστε να επιτευχθεί όσο το δυνατόν καλύτερη σύγκλιση <sup>[13]</sup>.

#### 4.4 Ερμηνεία πειραματικών μετρήσεων

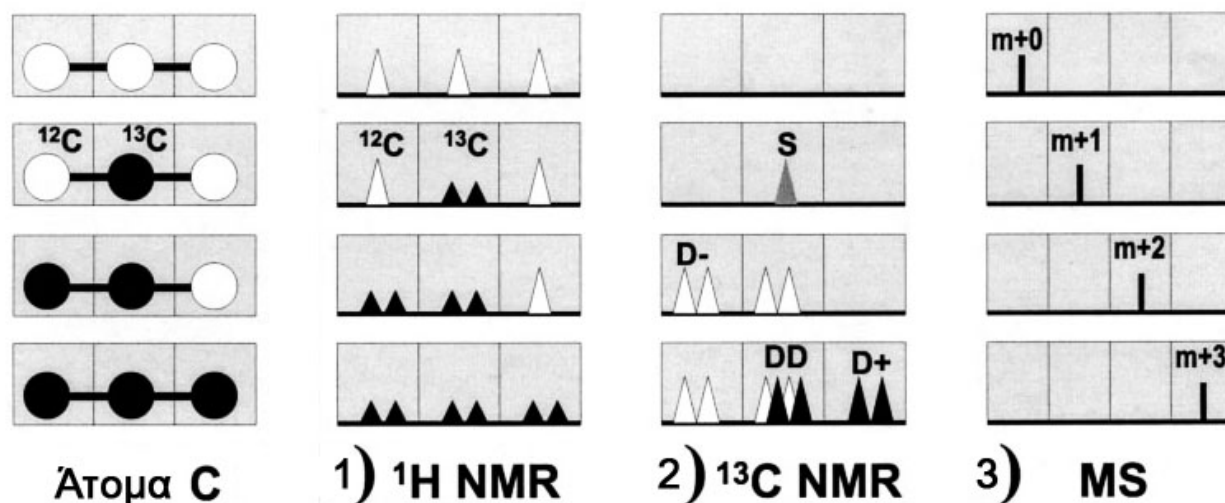
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, εκτός από τη σωστή μοντελοποίηση του μεταβολικού δικτύου απαιτούνται και αξιόπιστες πειραματικές μετρήσεις για την υποστήριξη των υπολογισμών των μεταβολικών ροών. Τα δεδομένα αυτά είναι δυνατόν να προκύψουν από οποιοδήποτε όργανο ικανό να ανιχνεύσει διαφορές μεταξύ των ισοτοπομερών ενός δικτύου. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές που βασίζονται στα όργανα NMR και MS και οι οποίες περιγράφονται με συντομία στις παραγράφους που ακολουθούν.

Αρχικά περιγράφονται οι τεχνικές φασματομετρίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Η <sup>1</sup>H ή πρωτονιακή NMR (proton NMR) ήταν η πρώτη μέθοδος που εφαρμόστηκε ευρέως σε πειράματα ιχνηθέτησης με <sup>13</sup>C. Μέσω της μεθόδου αυτής, κάθε πρωτονιωμένη θέση άνθρακα, μέσα σε μια συγκεκριμένη ομάδα μεταβολιτών, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί χωριστά από τις άλλες θέσεις. Στην περίπτωση αυτή, οι πειραματικές μετρήσεις είναι ενδεικτικές του εμπλουτισμού σε κάθε ανθρακική θέση ο οποίος αποτελεί το ποσοστό των ιχνηθετημένων ισοτοπομερών στη συγκεκριμένη αυτή θέση. Είναι σαφές, ότι αν υπάρχουν *n* άτομα άνθρακα σε ένα μεταβολίτη, μέσω του τρόπου αυτού παράγονται το πολύ *n* διαφορετικές τιμές εμπλουτισμού, κάτι το οποίο δεν είναι παρά ένα μικρό τμήμα της συνολικής ισοτοπομερικής πληροφορίας. Από την άλλη πλευρά, η αξιολόγηση των πειραμάτων <sup>1</sup>H NMR είναι πολύ ευκολότερη σε σύγκριση με άλλα πειράματα με περισσότερη ισοτοπομερική πληροφορία. Το γεγονός αυτό εξηγεί γιατί αξιοποιήθηκε εξ' αρχής σε πειράματα <sup>13</sup>C MFA.

Σε ένα φάσμα <sup>13</sup>C NMR η ισοτοπομερική κατανομή παρουσιάζεται με περισσότερη λεπτομέρεια επειδή ένα ιχνηθετημένο άτομο άνθρακα παράγει διαφορετικά υπέρλεπτα σήματα διαχωρισμού (hyperfine splitting signals) ανάλογα με την ιχνηθετική κατάσταση των άμεσων γειτονικών ατόμων στο μόριο. Συνήθως, αν οι γειτονικοί άνθρακες δεν είναι ιχνηθετημένοι προκύπτει μία μονή κορυφή (singlet peak). Αν μόνο ένας από τους γείτονες είναι ιχνηθετημένος, προκύπτει μία διπλή κορυφή (doublet peak), κάτι που επηρεάζεται από τη δραστική ομάδα (functional group) στην οποία ανήκει ο γειτονικός άνθρακας. Τελικά, αν και οι δύο γειτονικοί άνθρακες είναι ιχνηθετημένοι, προκύπτει μία δυάδα διπλών κορυφών (doublet of doublets). Δυστυχώς, ένας μη ιχνηθετημένος μεταβολίτης δεν παράγει σήμα στο φάσμα <sup>13</sup>C NMR. Αυτό σημαίνει ότι τα παρατηρούμενα σήματα NMR αποτυπώνουν μέρος μόνο της ισοτοπομερικής κατανομής και έτσι δεν μπορεί να αποδοθεί ποσοστιαία τιμή στους παρατηρούμενους τύπους κορυφών. Συνήθως, λαμβάνονται υπ' όψιν οι λόγοι επιφανειών διαφορετικών κορυφών ώστε να προκύψει μία αδιάστατη ποσότητα η οποία δεν εξαρτάται από τη συνολική ισχύ των σημάτων.

Ο συνδυασμός των <sup>1</sup>H και <sup>13</sup>C NMR δίνει μία δισδιάστατη τεχνική NMR. Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι, αντίθετα με τις προαναφερθείσες, οι διάφορες χημικές ενώσεις δεν

χρειάζεται να απομονωθούν από το υδρόλυμα (hydrolysate) πριν πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις. Αυτό συμβαίνει επειδή οι κορυφές των διαφόρων μεταβολιτών διαχωρίζονται σε ένα δισδιάστατο φάσμα, και κατά συνέπεια κάθε φάσμα μπορεί να αξιολογηθεί χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά από φάσματα άλλων ενώσεων. Από την άλλη πλευρά, κάποιιοι άνθρακες μπορεί να παραμένουν απαρατήρητοι στην  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  2D COSY NMR επειδή δεν έχουν συνδεδεμένα πρωτόνια. Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνονται οι κορυφές των φασμάτων NMR για ένα τριανθρακικό μεταβολίτη και για διαφορετικές καταστάσεις ιχνηθέτησης <sup>[12]</sup>.



Εικόνα 18. Τρεις τύποι σημάτων για τέσσερα από τα οκτώ ισοτοπομερή ενός μορίου με τρία άτομα άνθρακα: 1:  $^1\text{H}$  NMR με ξεχωριστές μονές και διπλές κορυφές για κάθε θέση ατόμων άνθρακα, 2:  $^{13}\text{C}$  NMR με singlet (S), αριστερό doublet (D-), δεξί doublet (D+) και double doublet (DD) κορυφές, 3: MS με κορυφές μάζας ισοτοπομερών (εξιδανικευμένο χωρίς ισοτοπική επίδραση των O, H, N,...) <sup>[15]</sup>.

Έπειτα περιγράφονται οι τεχνικές φασματομετρίας μάζας (MS). Η φασματομετρία μάζας επιδεικνύει μεγαλύτερη ευαισθησία και τείνει να εφαρμόζεται όλο και περισσότερο από την NMR τα τελευταία χρόνια.

Στην GC-MS, το φασματόμετρο μάζας είναι συνδεδεμένο με ένα αέριο χρωματογράφο για το διαχωρισμό των διαφόρων ενώσεων του υδρολύματος. Οι ενώσεις που εκλύονται από τη χρωματογραφική στήλη ιονίζονται και παράλληλα επέρχεται κλασμάτωση των μορίων τους. Με το τρόπο αυτό, μετρούνται οι μάζες των ισοτοπομερών των μοριακών ιόντων και επίσης λαμβάνονται τα φάσματα ισοτοπομερών αρκετών κλασμάτων. Το γεγονός αυτό αυξάνει σημαντικά τον όγκο των πληροφοριών που λαμβάνονται. Στην LC-MS, ο αέριος χρωματογράφος αντικαθίσταται από ένα υγρό χρωματογράφο. Η μόνη διαφορά είναι ότι δεν απαιτείται παραγωγοποίηση (derivatization). Μία επέκταση της τεχνικής αυτής είναι η LC-MS-MS με συζευγμένα φίλτρα μαζών για επίτευξη υψηλής διαχωριστότητας παραπλήσιων λόγων m/z. Μία επίσης πολλά υποσχόμενη τεχνική είναι η MALDI-TOF-MS η οποία εφαρμόζεται συνήθως για ανάλυση πρωτεϊνών.

Σε κάθε περίπτωση, το όργανο MS διαιρεί μία συγκεκριμένη κατανομή ισοτοπομερών βάσει των μοριακών βαρών. Αυτό σημαίνει ότι όλα τα ισοτοπομερή ενός συγκεκριμένου

μεταβολίτη που περιέχουν τον ίδιο αριθμό ιχνηθετημένων ατόμων άνθρακα συνοψίζονται κάτω από την ίδια κορυφή ενός σήματος. Επειδή κάθε ισοτοπομερές (ειδικά τα μη ιχνηθετημένα) συνεισφέρει σε μόνο μία κορυφή του φάσματος MS, είναι δυνατόν να υπολογισθεί ένα ποσοστό για κάθε μία από τις κορυφές αυτές. Για ένα μεταβολίτη με  $n$  άτομα άνθρακα, θα προκύψουν  $n+1$  μετρήσεις. Τα ποσοστά των επιμέρους  $n+1$  μετρήσεων (κορυφών) αθροιζόμενα πρέπει να αποδίδουν μονάδα, δηλαδή το 100% της ποσότητας του εξεταζόμενου μεταβολίτη. Αυτό φαίνεται και στην εικόνα 18-3, στην οποία προκύπτουν τέσσερις κορυφές για το τριανθρακικό μόριο που εξετάζεται. Το σύμβολο  $m$  δηλώνει το μοριακό βάρος του μεταβολίτη και αντιστοιχεί στην πρώτη κορυφή του φάσματος. Η επόμενη κορυφή έχει μοριακό βάρος  $m+1$  και συγκεντρώνει όλα τα ισοτοπομερή που είναι ιχνηθετημένα σε μία ανθρακική θέση (εξ' ου και η αύξηση του μοριακού βάρους), άσχετα με το ποια είναι αυτή η θέση. Η επόμενη κορυφή  $m+2$  αντιστοιχεί σε κατάληψη δύο θέσεων από τον ιχνηθέτη  $^{13}\text{C}$  κ.ο.κ. Η ομαδοποίηση των ποσοστών των κορυφών για τα ισοτοπομερή ενός μεταβολίτη καλείται *κατανομή μάζας ισοτοπομερών (Mass Isotopomer Distribution, MID)*.

## 5. Υπολογιστικό πλαίσιο MFA

### 5.1 Υπολογιστικά πακέτα

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται σημαντική ανάπτυξη στον πειραματικό τομέα της  $^{13}\text{C}$  MFA και εφαρμογή σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά συστήματα κυρίως σε μικρή κλίμακα. Τα συστήματα αυτά εμφανίζουν μεγάλη πολυπλοκότητα. Για τα ευκαρυωτικά κύτταρα η πολυπλοκότητα είναι μεγαλύτερη λόγω της διαμερισματοποίησης η οποία πρέπει να περιγράφεται επαρκώς από το χρησιμοποιούμενο μοντέλο του δικτύου. Ωστόσο, κυριαρχεί η τάση για μελέτη συστημάτων μεγάλης κλίμακας, τόσο για  $^{13}\text{C}$  MFA σταθερής κατάστασης, όσο και για μη σταθερής κατάστασης (δυναμική  $^{13}\text{C}$  MFA) <sup>[13]</sup>. Τα μεγάλης κλίμακας μεταβολικά μοντέλα γίνεται προσπάθεια ώστε να περιέχουν όσο το δυνατόν περισσότερες βιοχημικές αντιδράσεις, να περιλαμβάνουν περισσότερα αποτελέσματα ιχνηθέτησης ενώ παράλληλα να διατηρείται συνεκτικότητα (consistency) κατά την εκτίμηση των μεταβολικών ροών. Λαμβάνοντας υπ' όψιν το μεταβολισμό μόνο σε μεμονωμένα τμήματα του κυττάρου ή χρησιμοποιώντας απλοϊκά μεταβολικά μοντέλα μπορεί να προκύψει στρέβλωση των αποτελεσμάτων. Εντούτοις, η εκτίμηση ροών σε μεγάλα συστήματα ισοζυγίων ισοτοπομερών είναι αρκετά δαπανηρή.

Πολλά πακέτα λογισμικού έχουν αναπτυχθεί για τη διευκόλυνση της ανάλυσης ροών. Τα πιο δημοφιλή είναι τα FiatFlux, 13C-FLUX και OpenFLUX. Το FiatFlux αντιμετωπίζει περιπτώσεις  $^{13}\text{C}$  MFA μέσω της προσέγγισης του ποσοστού ροής (flux ratio). Το λογισμικό είναι προρυθμισμένο να εξαγάγει ποσοστά ροών και καθαρές ροές (net fluxes) για πειράματα με υπόστρωμα [1- $^{13}\text{C}$ ]- και [U- $^{13}\text{C}$ ]-γλυκόζη, και για ανάλυση πρωτεϊνογενών αμινοξέων για αρκετούς μικροοργανισμούς μέσω μετρήσεων GC-MS. Πρόσφατες εξελίξεις επιτρέπουν τη αυτόματη δημιουργία συστημάτων εξισώσεων, που διευκολύνουν την επέκταση της προσέγγισης ποσοστού ροής σε διάφορα μεταβολικά μοντέλα, υποστρώματα εισόδου και δεδομένα ιχνηθέτησης <sup>[10]</sup>.

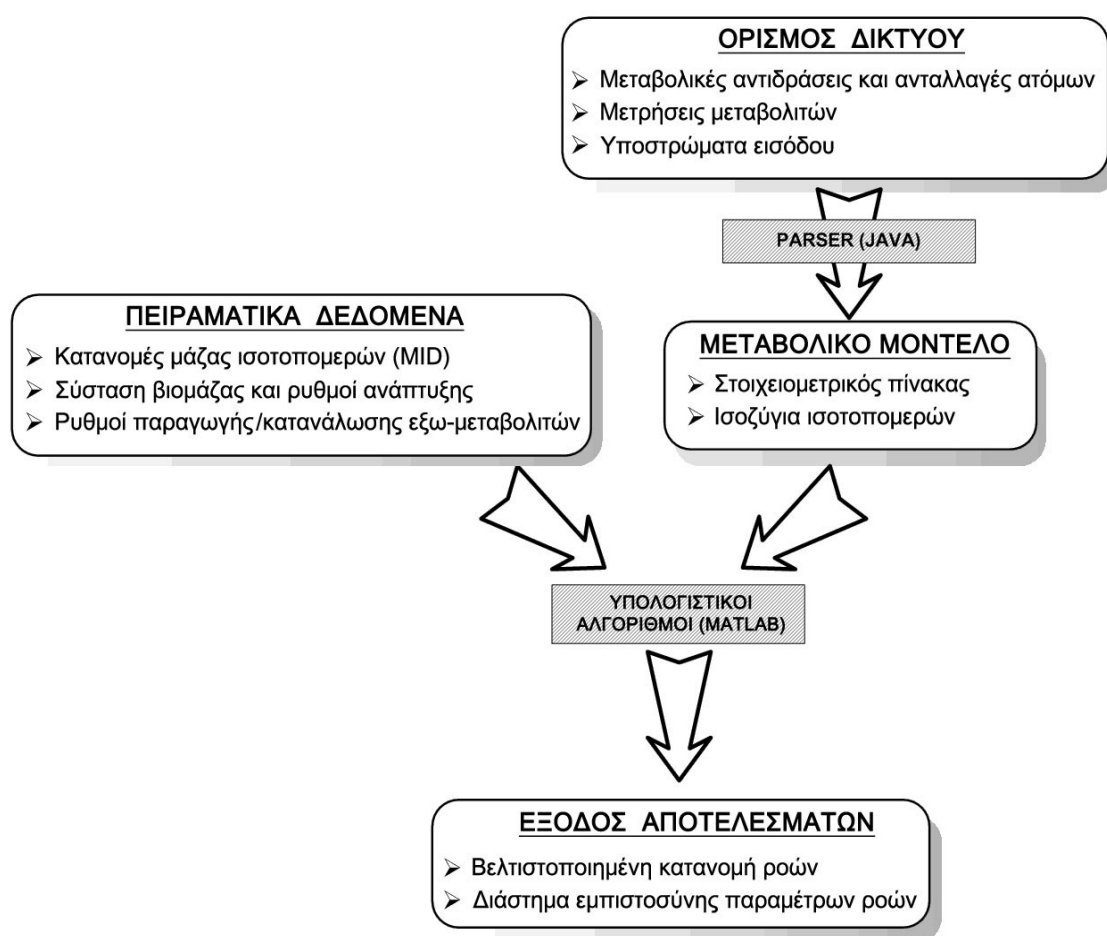
Σε αντίθεση, το 13C-FLUX είναι ένα γενικό πακέτο που σκοπό έχει την μοντελοποίηση, προσομοίωση, σχεδιασμό, αξιολόγηση και στατιστική ανάλυση των πειραμάτων ιχνηθέτησης με  $^{13}\text{C}$ . Δεν περιορίζεται στην επίλυση ενός τύπου πειραμάτων και δεν απαιτεί προγραμματιστική εμπειρία από την πλευρά του χρήστη. Επίσης, μπορεί να διαχειριστεί πειραματικά δεδομένα από NMR και MS <sup>[15]</sup>. Παρά τη γενική του κατεύθυνση, είναι σχετικά δύσκολο ως προς τη χρήση, διότι απαιτείται ο χρήστης να προσδιορίσει τις ελεύθερες ροές, να συστήσει την αρχική λύση, να εκκινήσει και να τερματίσει κάθε βελτιστοποίηση χειροκίνητα. Απαιτείται συχνή επίβλεψη ώστε να ελέγχεται η σύγκλιση των αποτελεσμάτων βελτιστοποίησης. Τέλος, όσον αφορά έμπειρους χρήστες, υπάρχει περιορισμένη δυνατότητα τροποποίησης του πηγαίου κώδικα και εφαρμογής νέων αλγορίθμων για την επίλυση διαφορετικών προβλημάτων ιχνηθέτησης.

Το τρίτο λογισμικό που εξετάζεται είναι το OpenFLUX. Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιείται για την επίλυση προβλημάτων  $^{13}\text{C}$  MFA σταθερής κατάστασης χρησιμοποιώντας δεδομένα κατανομών μάζας ισοτοπομερών (mass isotopomer distribution, MID) που προκύπτουν από μετρήσεις φασματομετρίας μάζας (MS). Το OpenFLUX είναι λογισμικό ανοικτού κώδικα και ανάλογα με την εμπειρία του χρήστη μπορούν να εισαχθούν διαφορετικοί αλγόριθμοι για την επίλυση συγκεκριμένων προβλημάτων. Το μεταβολικό μοντέλο εισάγεται σε ένα απλό αρχείο εισόδου και στη συνέχεια το OpenFLUX παράγει ισοζύγια ισοτοπομερών χρησιμοποιώντας

αλγόριθμο βασισμένο στο EMU. Η χρήση μεταβλητών EMU είναι υπολογιστικά πιο αποδοτική επειδή ο αριθμός των ισοζυγίων ισοτοπομερών μειώνεται σημαντικά σε σχέση με εναλλακτικές αναπαραστάσεις κατανομών ιχνηθέτησης, όπως των AAV (atom activity vector), IDV (isotopomer distribution vector) κ.α. Το OpenFLUX v. 2.1 επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί στην εργασία αυτή για τη μελέτη του μεταβολισμού της ελαιοκράμβης. Στις επόμενες ενότητες περιγράφεται το μαθηματικό υπόβαθρο και η λειτουργία του.

## 5.2 Μαθηματική θεμελίωση OpenFLUX

Το λογισμικό OpenFLUX αποτελείται από δύο μέρη. Το πρώτο μέρος αποτελείται από μία εφαρμογή JAVA (parser) για την αυτοματοποιημένη δημιουργία ή τροποποίηση μοντέλων ισοζυγίων μεταβολιτών και ισοτοπομερών (αναγνώσιμων από το MATLAB), τα οποία προκύπτουν από δεδομένα αντιδράσεων που εισάγονται από το χρήστη. Το δεύτερο μέρος αποτελείται από υπολογιστικούς αλγορίθμους που είναι βασισμένοι στο MATLAB. Οι αλγόριθμοι αυτοί χρησιμοποιούν τα μοντέλα που έχουν δημιουργηθεί και σε συνδυασμό με πειραματικά δεδομένα διενεργούν την ανάλυση ροών και τη στατιστική ανάλυση των παραμέτρων (Εικόνα 19). Το αρχείο εισόδου είναι ένα αρχείο προγράμματος λογιστικών φύλλων (π.χ. Microsoft Excel), στο οποίο εισάγονται από το χρήστη το μεταβολικό μοντέλο αντιδράσεων και τα πειραματικά δεδομένα.



Εικόνα 19. Διάγραμμα ροής εργασίας για το πρόγραμμα OpenFLUX. Τα δύο μέρη του προγράμματος εμφανίζονται μέσα στα γκριζα πλαίσια <sup>[1]</sup>.

Το OpenFLUX (μέσω του JAVA parser) διαβάζει το μεταβολικό μοντέλο του αρχείου εισόδου, το οποίο είναι αποθηκευμένο σε tab delimited μορφή, και δημιουργεί ένα μοντέλο ισοζυγίων μεταβολιτών, το οποίο είναι ο στοιχειομετρικός πίνακας ( $S$ ) στο ισοζύγιο μάζας:

$$S \cdot v = 0 \quad (5.1)$$

και ένα μοντέλο ισοζυγίων ισοτοπομερών το οποίο είναι μία μη γραμμική συνάρτηση ( $F$ ) που συνδέει τις κατανομές μάζας ισοτοπομερών (MIDs) των υποστρωμάτων εισόδου ( $x^{input}$ ) με τα προσομοιωμένα MIDs ( $x^{calc}$ ) χρησιμοποιώντας το διάνυσμα των ροών ( $v$ ) ως παράμετρο:

$$x^{calc} = F(x^{input}; v) \quad (5.2)$$

Η κατασκευή του μοντέλου ισοζυγίων ισοτοπομερών βασίζεται στο πλαίσιο *στοιχειώδους μονάδας μεταβολίτη (Elementary Metabolite Unit, EMU)*. Σύμφωνα με το πλαίσιο αυτό, ο αλγόριθμος κατασκευής του μοντέλου σταδιακά δημιουργεί ισοζύγια EMU αναγνωρίζοντας όλα τα αντιδρώντα EMUs που συμβάλουν στην παραγωγή ενός δεδομένου προϊόντος EMU. Ο αλγόριθμος προχωρά έως ότου κάθε ένα από τα προσομοιωμένα προϊόντα EMU μπορεί να αντιστοιχηθεί στα EMUs των υποστρωμάτων εισόδου μέσω μίας σειράς εξισώσεων ισοζυγίων. Οι εξισώσεις αυτές, στη συνέχεια, οργανώνονται σε εξισώσεις πινάκων <sup>[10]</sup>.

Εν συντομία, το EMU μίας ένωσης ορίζεται ως μία μοριακή οντότητα που αποτελείται από κάθε ξεχωριστό υποσύνολο (ή συνδυασμούς) των ατόμων της ένωσης αυτής, και παρουσιάζεται με τη μορφή ενός διανύσματος που εκφράζει ποσοτικά τα MIDs της οντότητας. Γενικά, για ένα μεταβολίτη με  $N$  άτομα, το πλήθος των πιθανών EMUs είναι  $2^N - 1$ . Αν για παράδειγμα ένας μεταβολίτης  $A$  αποτελείται από τρία άτομα, το EMU είναι ένα υποσύνολο οποιουδήποτε αριθμού των τριών ατόμων αυτών. Το μέγεθος ενός EMU είναι ίσο με τον αριθμό των ατόμων που περιλαμβάνει. Για τον μεταβολίτη  $A$  υπάρχουν 7 πιθανά EMUs: 3 EMUs μεγέθους 1 ( $A_1, A_2, A_3$ ), 3 EMUs μεγέθους 2 ( $A_{12}, A_{13}, A_{23}$ ) και 1 EMU μεγέθους 3 ( $A_{123}$ ), όπου ο δείκτης δηλώνει τα άτομα που περιλαμβάνονται στο EMU. Σημειώνεται ότι τα άτομα σε ένα EMU δεν είναι υποχρεωτικά συνδεδεμένα με χημικούς δεσμούς, όπως είναι για παράδειγμα το EMU  $A_{13}$  <sup>[16]</sup>.

Κάθε βιοχημική αντίδραση μπορεί να αναλυθεί σε  $2^N - 1$  αντιδράσεις EMU βασισμένες στις ανταλλαγές ατόμων, όπου  $N$  είναι το πλήθος των ατόμων που εμπλέκονται. Κάθε αντίδραση EMU αναπαριστά είτε μία αντίδραση συμπύκνωσης (condensation) ή μια μονομοριακή (unimolecular) αντίδραση. Για παράδειγμα, για την αντίδραση " $A + B = C + D$ ", με ανταλλαγές ατόμων " $ab + cde = ade + bc$ ", μπορεί να προκύψει η λίστα αντιδράσεων EMU του πίνακα 3.

Ομοίως, ένα βιοχημικό δίκτυο μπορεί να αναλυθεί σε πολλαπλά δίκτυα EMU ανάλογα με το μέγεθος EMU και τη συνδεσιμότητα του δικτύου. Κάθε δίκτυο EMU περιέχει EMUs ίδιου μεγέθους, αλλά είναι πιθανό να παραχθούν περισσότερα από ένα δίκτυα EMU με το ίδιο μέγεθος επειδή κάποια υποσύνολα των EMUs με το ίδιο μέγεθος δεν είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους. Το πλεονέκτημα της χρήσης του αλγορίθμου αποδόμησης EMU (EMU decomposition algorithm) είναι ότι, αντί να χρησιμοποιούνται όλες οι  $2^N - 1$  αντιδράσεις EMU, τα δίκτυα EMU δημιουργούνται από τον ελάχιστο αριθμό αντιδράσεων EMU που απαιτούνται ώστε να συνδεθούν τα προσομοιωμένα EMUs εξόδου με τα γνωστά EMUs εισόδου. Απαιτείται, δηλαδή, μόνο ένα μικρό μέρος από όλα τα πιθανά ισοτοπομερή ώστε να προσομοιωθεί η ισοτοπική ιχνηθέτηση <sup>[17]</sup>.



Πίνακας 3. Αντιδράσεις EMU για τη βιοχημική αντίδραση  
 $A + B = C + D$  [17].

Αντίδραση	Τύπος	Μέγεθος EMU
A#1 = C#1	Μονομοριακή	1
B#2 = C#2	Μονομοριακή	1
B#3 = C#3	Μονομοριακή	1
A#1 + B#2 = C#12	Συμπύκνωση	2
A#1 + B#3 = C#13	Συμπύκνωση	2
B#23 = C#23	Μονομοριακή	2
A#1 + B#23 = C#123	Συμπύκνωση	3
A#2 = D#1	Μονομοριακή	1
B#1 = D#2	Μονομοριακή	1
A#2 + B#1 = D#12	Συμπύκνωση	2

Η χρήση ισοζυγίων EMU αποδεικνύεται ανώτερη και υπολογιστικά οικονομικότερη από τη χρήση ισοζυγίων ισοτοπομερών, καθώς στην τελευταία το μοντέλο προσομοίωσης χρησιμοποιεί πάντοτε το πλήρες σύνολο όλων των πιθανών ισοτοπομερών.

Η λύση της εξίσωσης (5.1) μπορεί να εκφρασθεί ως γραμμικός συνδυασμός του διανύσματος ελεύθερων ρών:

$$v = NS \cdot v^{free} \quad (5.3)$$

όπου  $NS$  είναι ο μηδενικός χώρος (null space) του  $S$  και η διάσταση του διανύσματος  $v^{free}$  ισούται με τη μηδενικότητα (nullity) του  $S$ , δηλαδή τους βαθμούς ελευθερίας του συστήματος. Η χειραγώγηση των ελεύθερων ρών αυτών από το πρόγραμμα βελτιστοποίησης θα οδηγήσει στην όσο το δυνατόν καλύτερη σύγκλιση των πειραματικών δεδομένων [10].

Η επιλογή των ελεύθερων ρών στην εξίσωση (5.3) δεν είναι μοναδική. Στο OpenFLUX, το διάνυσμα των ρών αρχικά διασπάται σε τέσσερις διαφορετικούς τύπους αντιδράσεων: αμφίδρομες εμπρός και πίσω αντιδράσεις ( $v^{\rightarrow}$  και  $v^{\leftarrow}$ ), και μη αντιστρέψιμες αντιδράσεις που είναι είτε ελεύθερες ροές ( $v_{free}^{irr}$ ) είτε εξαρτημένες ροές ( $v_{dep}^{irr}$ ), και αναδιατάσσεται στη μορφή:

$$v = \begin{bmatrix} v^{\leftarrow} \\ v_{free}^{irr} \\ v_{dep}^{irr} \\ v^{\rightarrow} \end{bmatrix} \quad (5.4)$$

Χρησιμοποιώντας αυτή τη μορφή, η ελαττωμένη κλιμακωτή μορφή στηλών (reduced column echelon form) πίνακα ( $NS$ )

$$NS = (\text{null}(S))_{\text{column reduced}} = \begin{bmatrix} I & 0 \\ 0 & I \\ 0 & M_{net}^{irr} \\ I & M_{net}^{rev} \end{bmatrix} \quad (5.5)$$

ρητά περιγράφει τις ελεύθερες ροές, οι οποίες ορίζονται ως:

$$v^{free} = \begin{bmatrix} v^{\leftarrow} \\ v_{free}^{irr} \end{bmatrix} \quad (5.6)$$

Ο μετασχηματισμός αυτός προσφέρει δύο βασικά πλεονεκτήματα. Καταρχάς, ο καθορισμός των ελεύθερων ροών αυτοματοποιείται ώστε να περιλαμβάνει όλες τις αντίστροφες ροές και ένα υποσύνολο των αναντίστρεπτων (εξ. 5.6). Οι αντίστροφες ροές καθορίζονται στο αρχείο εισόδου, στο οποίο έχουν οριστεί οι αντιστρέψιμες αντιδράσεις του δικτύου με τις προς τα εμπρός και προς τα πίσω συνιστώσες τους. Μπορούν επίσης να εισαχθούν επιπλέον πληροφορίες, όπως π.χ. γνωστοί ρυθμοί αντιδράσεων από πειραματικά δεδομένα, ή κάποια συγκεκριμένη προτίμηση μιας αναντίστρεπτης ροής ως ελεύθερης. Το OpenFLUX, έπειτα, ιεραρχεί τον προσδιορισμό των ελεύθερων ροών, αλλά τελικά, ο προσδιορισμός καθορίζεται από το στοιχειομετρικό πίνακα.

Ένα δεύτερο πλεονέκτημα είναι ότι το διάνυσμα  $v$  υπολογίζεται από το  $v^{free}$  μέσω μιας μόνο πράξης πινάκων (εξ. 5.3). Αυτό εμποδίζει τη χρήση του στοιχειομετρικού πίνακα ως έμμεσου περιορισμού κατά τη βελτιστοποίηση. Η διαμόρφωση του συστήματος εξισώσεων για τον υπολογισμό των απόλυτων ροών απλοποιείται σημαντικά και, επιπλέον, η αναλυτική εξαγωγή της κλίσης του πίνακα είναι άμεση ( $dv/dv^{free} = NS$ ).

Ο υπολογισμός των ροών πραγματοποιείται μέσω αριθμητικής βελτιστοποίησης. Το OpenFLUX χρησιμοποιεί τη συνάρτηση FMINCON (gradient based minimization search function), που περιλαμβάνεται στην εργαλειοθήκη βελτιστοποίησης (optimization toolbox) του MATLAB, για την πραγματοποίηση εκτίμησης παραμέτρων και ανάλυσης ευαισθησίας. Η FMINCON χρησιμοποιεί μία quasi-Newton μέθοδο ακολουθιακού τετραγωνικού προγραμματισμού (Sequential Quadratic Programming, SQP) για μη γραμμική βελτιστοποίηση με περιορισμούς. Ο αλγόριθμος είναι κατάλληλος για την MFA, στην οποία υπάρχουν ουσιαστικοί φυσιολογικοί (physiological) περιορισμοί για τις ελεύθερες ροές.

Για την εκτίμηση παραμέτρων (εικόνα 20), σε κάθε επανάληψη το πρόγραμμα εκτιμά τιμές για τις ελεύθερες ροές, δεδομένων κάποιων περιορισμών, ώστε να ελαχιστοποιείται το σταθμισμένο άθροισμα των τετραγώνων των εναπομενόντων σφαλμάτων (residual errors) ( $\varepsilon$ ) μεταξύ των πειραματικών MIDs ( $x^{mea}$ ) και των υπολογισμένων MIDs ( $x^{calc}$ ), όπου η στάθμιση (weight) είναι ο αντίστροφος του πίνακα διακύμανσης-συνδιακύμανσης (variance-covariance matrix)  $D$ :

$$\min_{\begin{bmatrix} v_{free}^{irr} \\ v^{\leftarrow, [0,1]} \end{bmatrix}} (\varepsilon' D^{-1} \varepsilon), \text{ όπου } \varepsilon = (x^{calc} - x^{mea}) \quad (5.7)$$

Το πρόγραμμα υποθέτει ότι οι μετρήσεις είναι ασυσχέτιστες (uncorrelated), δηλαδή η διαγώνιος του πίνακα D περιλαμβάνει τις αποκλίσεις των μετρήσεων ( $\sigma^2$ ). Οι περιορισμοί που χρησιμοποιούνται κατά τη βελτιστοποίηση βασίζονται στο ότι όλες οι ροές πρέπει να είναι θετικές, δεδομένου ότι οι αντιστρεπτές αντιδράσεις έχουν χωριστεί στις προς τα εμπρός και προς τα πίσω συνιστώσες τους. Ισχύει δηλαδή ο πρώτος περιορισμός:

$$v = NS \cdot v^{free} \geq 0 \quad (5.8)$$

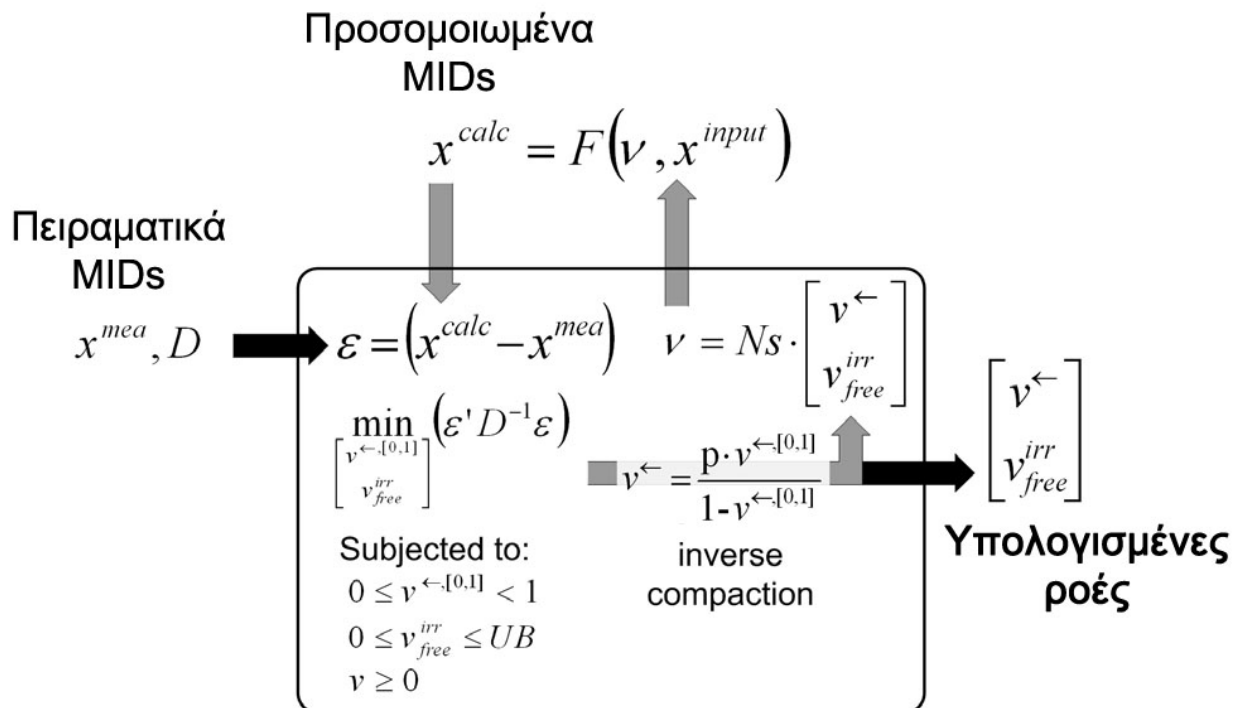
Επιπλέον λαμβάνονται υπ' όψιν περιορισμοί ώστε να βελτιωθεί η αριθμητική σταθερότητα. Οι μη αντιστρέψιμες ελεύθερες ροές  $v_{free}^{irr}$  είναι μη αρνητικές και άνω φραγμένες από την καθαρή ροή (net flux) στο σύστημα. Το άνω όριο (UB) λαμβάνεται από προεπιλογή να είναι είκοσι φορές μεγαλύτερο από τη μέγιστη τιμή πρόσληψης υποστρώματος, κάτι το οποίο όμως μπορεί να μεταβληθεί ανάλογα με τις επιλογές του χρήστη. Ο δεύτερος περιορισμός είναι:

$$0 \leq v_{free}^{irr} \leq UB \quad (5.9)$$

Οι προς τα πίσω ελεύθερες ροές  $v^{\leftarrow}$  είναι μη αρνητικές, χωρίς όμως φυσικό άνω όριο. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται μία διαδικασία συμπαγοποίησης (compactification) ώστε να μεταβούμε από μία φυσική κλίμακα  $[0, \infty]$  σε μία αριθμητική κλίμακα  $[0, 1]$ . Ο τρίτος περιορισμός:

$$0 \leq v^{\leftarrow, [0,1]} < 1, \text{ όπου } v^{\leftarrow, [0,1]} = \frac{v^{\leftarrow}}{P + v^{\leftarrow}} \quad (5.10)$$

Η τιμή του παράγοντα P είναι συνήθως της ίδιας τάξης μεγέθους με την τιμή της μεγαλύτερης ροής πρόσληψης υποστρώματος. Εναλλακτικά, η τιμή του P μπορεί να τροποποιείται κατά τη βελτιστοποίηση ώστε να λαμβάνονται καλύτερες τιμές του ιακωβιανού πίνακα.



Εικόνα 20. Αλγόριθμος για την εκτίμηση παραμέτρων μέσω ελαχίστων τετραγώνων (OpenFLUX) <sup>[10]</sup>.

Σε κάθε επανάληψη, η νέα εκτίμηση ελεύθερων ρών  $(v^{\leftarrow, [0,1]}, v_{free}^{irr})$  χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί (μέσω του NS) το διάνυσμα των ρών  $v$ . Τέλος, μέσω του  $v$  και των γνωστών MIDs των υποστρωμάτων εισόδου  $x^{input}$ , υπολογίζεται το  $x^{calc}$  και το νέο σφάλμα. Η συνάρτηση FMINCON τερματίζει την ελαχιστοποίηση όταν βρεθεί ένα τοπικό ελάχιστο, εμφανίζοντας τις βέλτιστες ελεύθερες ροές<sup>[10]</sup>.

### 5.3 Περιγραφή λειτουργίας OpenFLUX

Στην ενότητα αυτή θα περιγραφούν τα βήματα που ακολουθούνται ώστε να υπολογισθούν οι παράμετροι των ρών ενός μεταβολικού δικτύου μέσω του OpenFLUX. Πιο συγκεκριμένα, θα περιγραφούν η διαμόρφωση του αρχείου εισόδου, η λειτουργία της εφαρμογής JAVA (parser), καθώς και οι εργασίες (tasks) που διενεργούνται κατά τη λειτουργία του Open FLUX.

#### Αρχείο εισόδου

Το αρχείο εισόδου δημιουργείται σε ένα πρόγραμμα λογιστικών φύλλων (π.χ. Microsoft Excel) και πρέπει να έχει συγκεκριμένη μορφή. Στους πίνακες 5 και 6 παρουσιάζεται το αρχείο εισόδου Excel για την περίπτωση του φυτού ελαιοκράμβη. Η δημιουργία του μεταβολικού μοντέλου της ελαιοκράμβης περιγράφεται στο κεφάλαιο 6. Το αρχείο εισόδου χωρίζεται σε δύο τμήματα, στο πρώτο (πάνω) τμήμα (πίνακας 5) στο οποίο περιλαμβάνεται ένας πίνακας που περιέχει το μεταβολικό δίκτυο αντιδράσεων, και στο δεύτερο (κάτω) τμήμα (πίνακας 6) στο οποίο περιλαμβάνονται κάποιες λίστες με τα αναγκαία πειραματικά δεδομένα για την εκτίμηση ρών.

Ο πίνακας του πρώτου τμήματος περιέχει επτά στήλες.

1. Η στήλη “*rxnID*” περιλαμβάνει την ονομασία και αρίθμηση των αντιδράσεων.
2. Η στήλη “*rxnEq*” περιλαμβάνει τις εξισώσεις των βιοχημικών αντιδράσεων του μεταβολικού μοντέλου. Για τις αμφίδρομες αντιδράσεις πρέπει να σημειώνονται χωριστά οι προς τα εμπρός και πίσω συνιστώσες, δεδομένου ότι οι τιμές όλων των ρών λαμβάνονται ως θετικές.
3. Η στήλη “*rxnCTrans*” περιλαμβάνει τις εξισώσεις ανταλλαγής ατόμων άνθρακα για τις αντιδράσεις της δεύτερης στήλης. Ο συμβολισμός των ατόμων γίνεται με τα μικρά γράμματα του λατινικού αλφαβήτου (a,b,c, κ.ο.κ). Ωστόσο, τα σύμβολα “X” ή “x” χρησιμοποιούνται για να δηλώσουν μεταβολίτες, συμπαράγοντες και άλλα μόρια, όπως NADH, FADH<sub>2</sub>, ATP κ.α, που δεν θα περιληφθούν στα ισοζύγια EMU.
4. Η στήλη “*rates*” περιλαμβάνει τις τιμές των ρών των αντίστοιχων αντιδράσεων αν αυτές είναι γνωστές. Η πλήρωσή της είναι προαιρετική.
5. Η στήλη “*rxnType*” χρησιμοποιείται για να δηλωθεί ο τύπος της κάθε αντίδρασης. Συνολικά υποστηρίζονται επτά τύποι αντιδράσεων.
  - F: Μονόδρομες αντιδράσεις που κινούνται προς τα εμπρός (forward reactions).
  - FR: Προς τα εμπρός συνιστώσα των αμφίδρομων αντιδράσεων.
  - R: Προς τα πίσω συνιστώσα των αμφίδρομων αντιδράσεων. Οι αντιδράσεις αυτές

λαμβάνονται υπ' όψιν πάντα ως ελεύθερες ροές (free fluxes).

- B: Αντιδράσεις που απορροφούν πρόδρομες ενώσεις βιομάζας και δεν θα συμπεριληφθούν στα ισοζύγια ισοτοπομερών. Οι αντιδράσεις αυτές δεν συμβάλλουν στην διάδοση του ιχνηθέτη και συνεπώς δεν αναγράφονται ανταλλαγές ατόμων άνθρακα γι' αυτές στην τρίτη στήλη.
  - BR: Αντιδράσεις που δεν συμπεριλαμβάνονται στα ισοζύγια ισοτοπομερών (ως άνω), αλλά επίσης μπορούν να λάβουν αρνητική τιμή ροής.
  - S: Αντιδράσεις που δεν θα συμπεριληφθούν στα ισοζύγια μεταβολιτών. Ο τύπος αυτός χρησιμοποιείται για να αντιστοιχηθεί η κατανομή ιχνηθέτησης ενός μετρούμενου μεταβολίτη στον πρόδρομό του, χωρίς να προστίθενται επιπλέον βαθμοί ελευθερίας στο σύστημα. Οι ρυθμοί των αντιδράσεων αυτών ("rates") είναι πάντοτε 1.
  - SF: Ίδιες με τις αντιδράσεις τύπου "S", αλλά χρησιμοποιείται για να δηλώσει το διαφορετικό βαθμό συνεισφοράς από τον ίδιο πρόδρομο δε διαφορετικά μεταβολικά διαμερίσματα.
6. Η στήλη "*basis*" χρησιμοποιείται για τον καθορισμό των ελεύθερων ροών. Η σήμανση "X" δηλώνει ότι μία αντίδραση μπορεί να επιλεγεί ως ελεύθερη. Κατά σύμβαση τίθεται "X" σε κάθε "R" αντίδραση. Αν η ροή είναι γνωστή μπορεί χρησιμοποιηθεί ως ελεύθερη να δηλωθεί η αριθμητική τιμή της.
7. Η στήλη "*deviation*" περιλαμβάνει τα πειραματικά τυπικά σφάλματα (standard errors) για κάθε γνωστή ροή της στήλης "*basis*".

Στο δεύτερο τμήμα του αρχείου εισόδου περιλαμβάνονται πέντε λίστες με τα αναγκαία πειραματικά δεδομένα. Η πρώτη στήλη κάθε λίστας περιέχει τα σύμβολα "##" ή "#". Ο σκοπός της στήλης αυτής είναι να υποδείξει στην εφαρμογή JAVA να λάβει υπ' όψιν τα εφαπτόμενα στην πρώτη στήλη κελιά. Το "##" δηλώνει τον τίτλο της λίστας, ενώ το "#" δηλώνει τα στοιχεία που ανήκουν σε αυτήν. Οι λίστες αυτές πρέπει να είναι τοποθετημένες στην πιο αριστερή στήλη του φύλλου εργασίας του Excel, και πρέπει να χωρίζεται η μία από την άλλη με μία κενή γραμμή. Οι λίστες που πρέπει να περιέχονται είναι οι εξής:

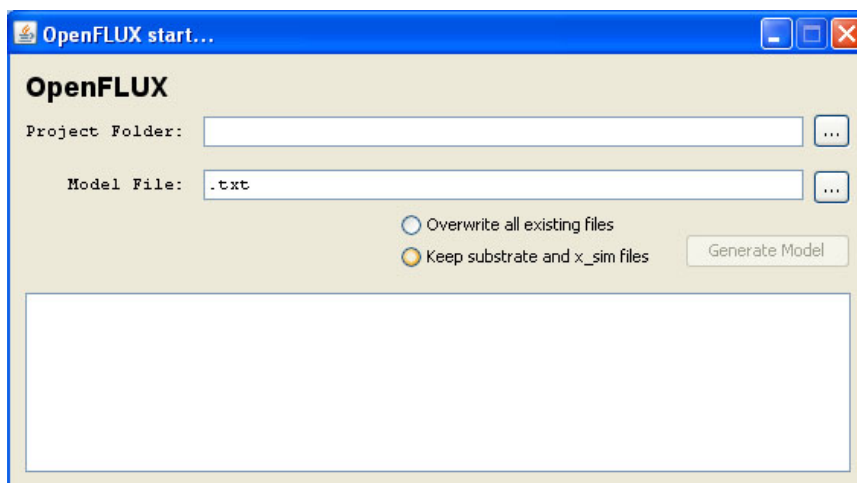
1. *excludedMetabolites*: Η λίστα αυτή περιέχει τα ονόματα των μεταβολιτών, όπως αυτά ορίζονται στο μεταβολικό μοντέλο, τα οποία θα εξαιρεθούν από το μοντέλο ισοζυγίων μεταβολιτών. Οι μεταβολίτες αυτοί είναι εξω-μεταβολίτες και πρόδρομοι βιομάζας που εξέρχονται από το σύστημα. Οι συμπαραγόντες (ATP, NADH) μπορούν επίσης να συμπεριληφθούν στη λίστα αυτή.
2. *simulatedMDVs*: Η λίστα αυτή περιέχει τα ονόματα των μεταβολιτών που θα προσομοιωθούν από το μοντέλο, αντιστοιχούν δηλαδή στα MIDs των μεταβολιτών που έχουν μετρηθεί. Κάθε στοιχείο της λίστας δηλώνεται με τη μορφή "metabolite name"#"fragment". Ο δυαδικός κώδικας "1" και "0" χρησιμοποιείται για να δηλώσει τα άτομα της ανθρακικής αλυσίδας που θα ληφθούν υπ' όψιν.
3. *inputSubstrates*: Η λίστα αυτή περιέχει τα υποστρώματα εισόδου που συνεισφέρουν στη διάδοση ιχνηθέτη στους μεταβολίτες.
4. *measurements*: Η λίστα αυτή περιέχει τα MIDs των μεταβολιτών της λίστας "*simulatedMDs*".

5. *error*: Η λίστα αυτή περιέχει τα πειραματικά σφάλματα για τις μετρήσεις της λίστας “measurements”

Το αρχείο excel, τέλος, αποθηκεύεται ως αρχείο κειμένου οριοθετημένο με tab ώστε να είναι αναγνώσιμο από την εφαρμογή JAVA.

### Εφαρμογή JAVA

Η εφαρμογή JAVA (OpenFlux\_v2.1.jar) αναλαμβάνει να καταστήσει το μεταβολικό μοντέλο του αρχείου εισόδου σε αναγνώσιμα από το MATLAB αρχεία.



Εικόνα 21. Παράθυρο λειτουργίας JAVA parser [17].

Μετά τη λειτουργία της εφαρμογής JAVA δημιουργούνται 18 νέα αρχεία, 5 από τα οποία τοποθετούνται στον φάκελο εργασίας (project folder), ενώ τα υπόλοιπα τοποθετούνται στον φάκελο του μοντέλου (model folder).

### Εργασίες OpenFLUX

Το OpenFLUX μπορεί να επιτελέσει 5 εργασίες (tasks) όπως φαίνεται στην εικόνα 22.

```
Command Window
Initializing OpenFLUX
note: leave blank to use default value in square bracket []

*****
OpenFLUX task options
  1: parameter estimation
  2: sensitivity analysis (non-linear)
  3: sensitivity analysis (Monte Carlo)
  4: regenerate parameter estimation report
  5: regenerate sensitivity analysis report (non-linear)
  6: regenerate sensitivity analysis report (Monte Carlo)
  7: check metabolic network
  8: load model for forward isotopomer simulation
Specify OpenFLUX task (type 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) [exit] >>
```

Εικόνα 22. Εργασίες που μπορεί να επιτελέσει το OpenFLUX [17].

Το OpenFLUX λειτουργεί στο περιβάλλον εργασίας του MATLAB και για το λόγο αυτό πρέπει εξ αρχής να καθοριστεί ο φάκελος του OpenFLUX ως σημείο άντλησης των αναγκαίων m files. Για να ενεργοποιηθεί το OpenFLUX, ο χρήστης πληκτρολογεί “start13OF” στη γραμμή εντολών MATLAB και εμφανίζονται οι επιλογές της εικόνας 22.

➤ **Task 1: parameter estimation**

Στο στάδιο αυτό αρχικά ορίζονται από το χρήστη τα MIDs των υποστρωμάτων εισόδου, και οι παράμετροι λειτουργίας του αλγορίθμου βελτιστοποίησης. Ο αλγόριθμος αυτός επιτελεί σταθμισμένη βελτιστοποίηση ελαχίστων τετραγώνων με περιορισμούς, όπως έχει περιγραφεί στην ενότητα 5.2. Ως αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής λαμβάνεται το αρχείο “results\_PE.txt”, το οποίο περιέχει την εκτίμηση για τις ροές του δικτύου. Επίσης λαμβάνονται τα αρχεία του πίνακα 4, τα οποία περιέχουν όλα τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης.

*Πίνακας 4. Αρχεία αποτελεσμάτων που παράγονται κατά την εκτίμηση των ροών [17].*

Αρχείο	Περιγραφή
results_exitflag.txt	Συνθήκη τερματισμού βελτιστοποίησης
results_flux.txt	Λύση κατανομής ροών από κάθε επανάληψη
results_fval.txt	Εναπομένον σφάλμα (residual error) από κάθε επανάληψη
results_x.txt	Εκτίμηση ελεύθερων ροών από κάθε επανάληψη
results_x0.txt	Τυχαίες αρχικές ελεύθερες ροές που χρησιμοποιεί η FMINCON
results_MID.txt	Υπολογισμένα MIDs από κάθε επανάληψη
x_solution.txt	Ελεύθερες ροές που έδωσαν το καλύτερο εναπομένον σφάλμα (residual error)
MID_solution.txt	Υπολογισμένα MIDs που αντιστοιχούν στις ελεύθερες ροές του αρχείου x_solution.txt
allBasis_soln.txt	Περιλαμβάνει τόσο τις βελτιστοποιημένες όσο και τις αμετάβλητες ελεύθερες ροές

➤ **Task 2: sensitivity analysis (non-linear)**

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται ανάλυση ευαισθησίας για τις ροές που έχουν εκτιμηθεί στο task 1. Ως είσοδο στο task 2 χρησιμοποιούνται οι βελτιστοποιημένες ελεύθερες ροές που περιέχονται στο αρχείο “x\_solution.txt” και επιλέγονται τα διαστήματα εμπιστοσύνης και οι ροές για τις οποίες μας ενδιαφέρουν. Τα αποτελέσματα του task 2 περιέχονται στο νέο αρχείο “results\_CI.txt”.

➤ **Task 3: sensitivity analysis (Monte Carlo)**

Εκτός από τη χρήση της μη γραμμικής προσέγγισης για την εύρεση των διαστημάτων εμπιστοσύνης (task 2) μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία προσέγγιση Monte Carlo. Στην προσέγγιση αυτή, τα δεδομένα MID και/ή η βάση των ελεύθερων ροών αλλοιώνονται βάσει κάποιων προκαθορισμένων σφαλμάτων, και στη συνέχεια υπόκεινται σε ανάλυση

ελαχίστων τετραγώνων. Αυτό πραγματοποιείται επαναληπτικά σε “ανεξάρτητα δείγματα” ώστε να εκτιμηθούν οι μέσες τιμές και αποκλίσεις των ελεύθερων ροών, οι οποίες εν συνεχεία χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των διαστημάτων εμπιστοσύνης. Τα δεδομένα εισόδου είναι παρόμοια με το task 1, και ο χρήστης πρέπει να καθορίσει το % διάστημα εμπιστοσύνης και τις επιθυμητές προς ανάλυση ροές, όπως στο task 2. Επίσης, πρέπει να καθοριστεί ο αριθμός των επαναλήψεων, των ανεξάρτητων δηλαδή δειγμάτων. Τα αποτελέσματα περιέχονται στο αρχείο “results\_MC.txt”

➤ **Task 4: regenerate parameter estimation report**

Αναπαραγωγή του αρχείου “results\_PE.txt” που έχει δημιουργηθεί στο Task 1.

➤ **Task 5: regenerate sensitivity analysis report (non-linear)**

Αναπαραγωγή του αρχείου “results\_CI.txt” που έχει δημιουργηθεί στο task 2.

➤ **Task 6: regenerate sensitivity analysis report (Monte Carlo)**

Αναπαραγωγή του αρχείου “results\_MC.txt” που έχει δημιουργηθεί στο task 3.

➤ **Task 7: check metabolic network**

Στο στάδιο αυτό γίνεται έλεγχος της συνεκτικότητας του μεταβολικού δικτύου καθώς είναι πολύ πιθανό να έχουν γίνει λάθη κατά τη σύνταξη του αρχείου εισόδου. Κατά τον έλεγχο εξετάζεται αν κλείνουν τα ισοζύγια και αν όλες οι ροές είναι δυνητικά μη μηδενικές. Επίσης ελέγχεται η συνέπεια των ονομάτων των μεταβολιτών. Αν δεν βρεθεί κάποιο λάθος, το πρόγραμμα ενημερώνει το χρήστη για την επιλογή των ελεύθερων ροών δεδομένων και των επιλογών που έχουν γίνει. Είναι καλό το task 7 να πραγματοποιείται πριν από κάθε εκτίμηση παραμέτρων.

➤ **Task 8: load model for forward isotopomer simulation**

Το Task αυτό χρησιμοποιείται για την παραγωγή υποθετικών MIDs (που περιλαμβάνονται στο αρχείο “x\_sim.m”) βάσει μιας κατανομής ροών που εισάγεται από το χρήστη <sup>[17]</sup>.



## 6. Μεταβολικό μοντέλο ελαιοκράμβης

### 6.1 Ελαιοκράμβη

Στα προηγούμενα κεφάλαια έχουν περιγραφεί οι βασικές αρχές ανάλυσης ροών, οι οποίες επιλέγεται να εφαρμοστούν στο φυτό ελαιοκράμβη (*brassica napus, rapeseed*) και συγκεκριμένα σε αναπτυσσόμενα έμβρυα αυτού. Η *brassica napus* είναι ένα πλατύφυλλο είδος της οικογένειας *brassicaceae* και του γένους *brassica*. Η επιλογή της ελαιοκράμβης βασίζεται σε δύο κυρίως λόγους.

Ο πρώτος λόγος είναι ότι η ελαιοκράμβη αποτελεί ένα φυτικό οργανισμό μεγάλου βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος κυρίως λόγω της μεγάλης ζήτησης του ελαίου που βγαίνει από τον σπόρο της (η βιομάζα των σπόρων της αποτελείται μέχρι και 60% από λιπίδια) και της ευκολίας με την οποία μπορεί να τροποποιηθεί γενετικά <sup>[19]</sup>. Κάθε σπόρος αποτελείται από το έμβρυο, το ενδοσπέρμιο και το περίβλημα. Ο μεταβολισμός του εμβρύου κατά το στάδιο της ανάπτυξής του είναι στοχευμένος προς την παραγωγή ελαίου (τριγλυκεριδίων) και πρωτεϊνών λαμβάνοντας σάκχαρα και αμινοξέα από το ενδοσπέρμιο <sup>[18]</sup>. Το έλαιο αυτό χρησιμοποιείται είτε ως λάδι (κραμβέλαιο) για ανθρώπινη κατανάλωση είτε ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμου (βιοντίζελ) κάτι που καθιστά την ελαιοκράμβη σημαντικό ενεργειακό φυτό. Επιπλέον, τα υποπροϊόντα της έχουν μεγάλη θρεπτική αξία και χρησιμοποιούνται για ζωοτροφή.



Εικόνα 23. Άνθη ελαιοκράμβης.



Εικόνα 24. Τμήματα φυτού ελαιοκράμβης.

Ο δεύτερος λόγος είναι ότι στο πλαίσιο συνεργασίας με το γαλλικό βιοτεχνολογικό εργαστήριο “*Laboratoire de Technologie Enzymatique, Centre National de la Recherche Scientifique 6022, Universite de Technologie de Compiègne*” κατέστη δυνατή η λήψη ποσοτικών πειραματικών δεδομένων (δεδομένα ιχνηθέτησης από MS) για διάφορα μεταβολικά προϊόντα (λιπαρά οξέα, αμινοξέα, κ.α.) από αναπτυσσόμενα έμβρυα ελαιοκράμβης. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση του μεταβολικού μοντέλου και τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων της *in silico* λειτουργίας αυτού. Στην επόμενη ενότητα περιγράφεται ο τρόπος δημιουργίας του μεταβολικού μοντέλου της ελαιοκράμβης.

## 6.2 Ανάπτυξη μεταβολικού μοντέλου ελαιοκράμβης

Στην ενότητα αυτή περιγράφονται τα βήματα που ακολουθήθηκαν κατά τη δημιουργία του μεταβολικού μοντέλου των αναπτυσσομένων εμβρύων της ελαιοκράμβης, το οποίο παρουσιάζεται αναλυτικά στους πίνακες 5 και 6 ως αρχείο εισόδου στο πρόγραμμα OpenFLUX. Η τελευταία στήλη του πίνακα 5 περιέχει τα ένζυμα που καταλύουν τις αντίστοιχες αντιδράσεις, τα οποία, όμως, δεν έχουν πρακτική σημασία κατά τη διεξαγωγή υπολογισμών μέσω του OpenFLUX.

Το μοντέλο (πίνακας 5) βασίστηκε κατ' αρχάς στο βιοχημικό δίκτυο αντιδράσεων κεντρικού μεταβολισμού που περιγράφεται στο άρθρο [18]. Έπειτα, εμπλουτίστηκε και επεκτάθηκε αξιοποιώντας βιβλιογραφικές πηγές ([1], [2], [6], [7], [8], [14], [20], [21], κ.α.) και διαδικτυακές βάσεις δεδομένων (KEGG, BioCyc, MetaCyc, AraCyc, BRENDA, κ.α.). Συνολικά αποτελείται από 310 βιοχημικές αντιδράσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα σε τρία κυτταρικά διαμερίσματα. Η διαμερισματοποίηση αυτή γίνεται φανερή από την προέκταση των ονομάτων των μεταβολιτών. Οι προεκτάσεις που χρησιμοποιούνται είναι "cyt", "mit", "pl" και δηλώνουν μεταβολίτες στο κυτταρόπλασμα, μιτοχόνδριο και χλωροπλάστη αντίστοιχα. Η προέκταση "ex" χρησιμοποιείται για να δηλώσει τους εξω-μεταβολίτες. Επιπλέον, οι αντιδράσεις είναι ομαδοποιημένες ανάλογα με τα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία ανήκουν. Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται η εξής κατηγοριοποίηση:

- **Πρόσληψη υποστρωμάτων:** Περιλαμβάνει 4 αντιδράσεις (R01 – R04). Τα υποστρώματα που επιλέχθηκαν είναι οι ενώσεις γλυκόζη, γλουταμίνη, σερίνη και σορβιτόλη, η επιλογή των οποίων καθορίστηκε από τα πειραματικά στοιχεία.
- **Αντιδράσεις μεταφοράς:** Οι αντιδράσεις αυτές είναι συνολικά 58 (R05 – R13, R261 – R286 και R288 – R310). Οι αντιδράσεις αυτές αφορούν στη μετακίνηση των διαφόρων μεταβολιτών στα κυτταρικά διαμερίσματα.
- **Γλυκόλυση:** Περιλαμβάνει 12 αντιδράσεις (R14 – R25). Γίνεται η παραδοχή ότι η γλυκόλυση πραγματοποιείται μόνο στο κυτταρόπλασμα.
- **Μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης – Κύκλος Calvin:** Περιλαμβάνει 14 αντιδράσεις (R26 – R39) και πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα.
- **Κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος:** Περιλαμβάνει 32 αντιδράσεις (R40 – R71) και πραγματοποιείται στο μιτοχόνδριο.
- **Βιοσύνθεση αμινοξέων:** Περιλαμβάνει 134 αντιδράσεις (R72 – R205) και λαμβάνει χώρα σε όλα τα διαμερίσματα.
- **Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων:** Περιλαμβάνει 55 αντιδράσεις (R206 – R260) και λαμβάνει χώρα κυρίως στον χλωροπλάστη.
- **Παραγωγή βιομάζας:** Περιγράφεται από την αντίδραση R287.

Στη συνέχεια αναφέρονται οι παραδοχές που έγιναν κατά τη δόμηση του μοντέλου. Πρώτον, οι αντιδράσεις θεωρούνται ότι είναι όλες αμφίδρομες, εκτός από τις αντιδράσεις μεταφοράς οι οποίες επιλέγονται να είναι μονόδρομες. Η επιλογή αυτή γίνεται ώστε να διατηρείται η φυσική αντιστρεψιμότητα των αντιδράσεων και να προσδίδεται στο μοντέλο ευκαμψία. Ο ορισμός των αμφίδρομων αντιδράσεων, στο OpenFLUX, πρέπει να γίνεται

γράφοντας χωριστά το προς τα εμπρός και προς τα πίσω τμήμα της αντίδρασης, και να συμβολίζονται ως FR και R τύποι αντιδράσεων αντίστοιχα (π.χ. η παραγωγή της 6-φωσφορικής φρουκτόζης στις αντιδράσεις R15 και R16 του μοντέλου). Το γεγονός αυτό αυξάνει τον αριθμό των αντιδράσεων του μοντέλου, ο οποίος συχνά δεν ανταποκρίνεται στον αριθμό των βιοχημικά παρατηρούμενων αντιδράσεων. Οι R τύπου αντιδράσεις λαμβάνονται από το OpenFLUX ως ελεύθερες ροές. Τα αναγραφόμενα ένζυμα δηλώνονται για τις FR αντιδράσεις και ισχύουν για την πλήρη αντίδραση.

Σε πολλά σημεία του μοντέλου έχει γίνει σύμπτυξη πολλών αντιδράσεων σε μία. Τα σημεία αυτά γίνονται φανερά από την αναγραφή περισσοτέρων του ενός ενζύμων για την αντίδραση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η αντίδραση R21 στην οποία έχει γίνει σύμπτυξη δύο αντιδράσεων, η αντίδραση R26 στην οποία έχει γίνει σύμπτυξη τριών αντιδράσεων και η αντίδραση R196 στην οποία έχει γίνει σύμπτυξη τεσσάρων αντιδράσεων.

Κατά τη δόμηση του μοντέλου παρατηρήθηκε έλλειψη βιοχημικών πληροφοριών για αντιδράσεις που αφορούν συγκεκριμένα τον οργανισμό *Brassica napus*. Η ανάπτυξή του βασίστηκε αρκετά στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, λόγω του πλήθους των διαθέσιμων μεταβολικών πληροφοριών. Το *Arabidopsis thaliana* είναι, εξάλλου, ένας τυπικός εκπρόσωπος της οικογένειας των *Brassicaceae* και συνεπώς η στενή φυλογενετική συγγένεια ανάμεσα στα δύο φυτά δικαιολογεί απόλυτα την επιλογή αυτή. Αναφέρεται χαρακτηριστικά ότι πολλές αντιδράσεις βιοσύνθεσης αμινοξέων προέρχονται από μεταβολικά μονοπάτια του *Arabidopsis thaliana* και η αντίδραση παραγωγής βιομάζας (R287) έχει ληφθεί από μεταβολικό μοντέλο του οργανισμού αυτού.

Τέλος, η διαμερισματοποίηση στο μοντέλο δυσχεραίνει την εκτίμηση παραμέτρων, καθώς ορισμένοι μεταβολίτες παράγονται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα, ενώ τα πειραματικά δεδομένα εμπλουτισμού αυτών αναφέρονται στη συνολική ποσότητα των παραγόμενων μεταβολιτών. Για το λόγο αυτό, στο τέλος του μοντέλου έχουν προστεθεί αντιδράσεις, οι οποίες αντιστοιχούν τους διαμερισματοποιημένους μεταβολίτες σε μία κοινή οντότητα στην οποία αποδίδονται οι πειραματικές μετρήσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι τρεις αντιδράσεις R299, R300 και R301, οι οποίες αντιστοιχούν στο "AKG" τη συνολική παραγωγή του ακετογλουταρικού οξέος στο κύτταρο.

Στον πίνακα 6 παρουσιάζεται το δεύτερο τμήμα του αρχείου εισόδου στο OpenFLUX, το οποίο περιέχει τις λίστες των εξω-μεταβολιτών, των μεταβολιτών των οποίων προσομοιώνονται τα MIDs, καθώς και κάποια ενδεικτικά πειραματικά MIDs (αποτελέσματα πειραματικών μετρήσεων μέσω φασματομετρίας μάζας) για μια ομάδα αμινοξέων με τα σφάλματά τους.

Στο τέλος της ενότητας δίνεται μία σχηματική αναπαράσταση του μεταβολικού δικτύου της ελαιοκράμβης (εικόνα 25) σε συνεπτυγμένη μορφή. Στην εικόνα αυτή παρουσιάζεται η πρόσληψη των υποστρωμάτων και η παραγωγή κάποιων από τους μεταβολίτες στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα που εξετάζονται.

## Μελέτη μοντελοποίησης του μεταβολικού δικτύου της ελαιοκράμβης

Πίνακας 5. Πρώτο τμήμα του αρχείου εισόδου για το OpenFLUX στο οποίο περιέχεται το μεταβολικό μοντέλο της ελαιοκράμβης. Η επεξήγηση των στηλών παρέχεται στην ενότητα 5.3.

RxnID	rxnEq	rxnC Trans	rates	rxnType	basis	deviation	// Enzymes
							// <b>Uptake of substrates</b>
R01	GLC_ex = GLC_cyt	abcdef = abcdef		F	1		(transport)
R02	GLN_ex = GLN_cyt	abcde = abcde		F			(transport)
R03	SER_ex = SER_cyt	abc = abc		F			(transport)
R04	SOR_ex = SOR_cyt	abcdef = abcdef		F			(transport)
							// <b>Transport</b>
R05	ATP_cyt = ATP_mit			BR			(transport)
R06	ATP_cyt = ATP_pl			BR			(transport)
R07	COA_cyt = COA_mit			BR			(transport)
R08	COA_cyt = COA_pl			BR			(transport)
R09	NADPH_cyt = NADPH_pl			BR			(transport)
R10	NADH_cyt = NADH_mit			BR			(transport)
R11	NADH_cyt = NADH_pl			BR			(transport)
R12	CO2_cyt = CO2_mit	a = a		F			(transport)
R13	CO2_cyt = CO2_pl	a = a		F			(transport)
							// <b>Glycolysis (cytosol)</b>
R14	GLC_cyt + ATP_cyt = GLC6P_cyt	abcdef + X = abcdef		F			[Hexokinase]
R15	GLC6P_cyt = F6P_cyt	abcdef = abcdef		FR			[Phosphoglucose isomerase]
R16	F6P_cyt = GLC6P_cyt	abcdef = abcdef		R	X		
R17	SOR_cyt = FRU_cyt + NADH_cyt	abcdef = abcdef + X		F			[Oxidoreductase]
R18	FRU_cyt + ATP_cyt = F6P_cyt	abcdef + X = abcdef		F			[D – fructokinase]
R19	F6P_cyt + ATP_cyt = G3P_cyt + G3P_cyt	abcdef + X = cba + def		FR			[Phosphofructokinase, Aldolase, TPI]
R20	G3P_cyt + G3P_cyt = F6P_cyt + ATP_cyt	cba + def = abcdef + X		R	X		
R21	G3P_cyt = 3PG_cyt + NADH_cyt + ATP_cyt	abc = abc + X + X		FR			[Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Phosphoglycerate kinase]
R22	3PG_cyt + NADH_cyt + ATP_cyt = G3P_cyt	abc + X + X = abc		R	X		
R23	3PG_cyt = PEP_cyt	abc = abc		FR			[Phosphoglycerate mutase, Enolase]
R24	PEP_cyt = 3PG_cyt	abc = abc		R	X		
R25	SER_cyt = PEP_cyt	abc = abc		F			[L-serine deaminase]
							// <b>Pentose Phosphate Pathway – Calvin Cycle (cytosol)</b>
R26	GLC6P_cyt = RU5P_cyt + CO2_cyt + 2 NADPH_cyt	abcdef = bcdef + a + 2 X		FR			[Glucose-6-phosphate dehydrogenase, lactonase, phosphogluconate dehydrogenase]
R27	RU5P_cyt + CO2_cyt + NADPH_cyt + NADPH_cyt = GLC6P_cyt	bcdef + a + X + X = abcdef		R	X		
R28	RU5P_cyt = R5P_cyt	abcde = abcde		FR			[Ribose-5-phosphate isomerase]
R29	R5P_cyt = RU5P_cyt	abcde = abcde		R	X		
R30	RU5P_cyt = X5P_cyt	abcde = abcde		FR			[Ribulose-phosphate 3-epimerase]
R31	X5P_cyt = RU5P_cyt	abcde = abcde		R	X		
R32	X5P_cyt + R5P_cyt = S7P_cyt + G3P_cyt	abcde + fghij = abfghij + cde		FR			[Transketolase]
R33	S7P_cyt + G3P_cyt = X5P_cyt + R5P_cyt	abfghij + cde = abcde + fghij		R	X		
R34	S7P_cyt + G3P_cyt = E4P_cyt + F6P_cyt	abcdefg + hij = defg + abchij		FR			[Transaldolase]
R35	E4P_cyt + F6P_cyt = S7P_cyt + G3P_cyt	defg + abchij = abcdefg + hij		R	X		
R36	X5P_cyt + E4P_cyt = G3P_cyt + F6P_cyt	abcde + fghi = cde + abfghi		FR			[Transketolase]
R37	G3P_cyt + F6P_cyt = X5P_cyt + E4P_cyt	cde + abfghi = abcde + fghi		R	X		
R38	RU5P_cyt + CO2_cyt = 3PG_cyt + 3PG_cyt	abcde + f = fba + cde		FR			[RuBisCO]
R39	3PG_cyt + 3PG_cyt = RU5P_cyt + CO2_cyt	fba + cde = abcde + f		R	X		

## Μελέτη μοντελοποίησης του μεταβολικού δικτύου της ελαιοκράμβης

						<b>// TCA Cycle (mitochondrion)</b>
R40	PEP_cyt = PYR_cyt + ATP_cyt	$abc = abc + X$		FR		cytosolic [Pyruvate kinase]
R41	PYR_cyt + ATP_cyt = PEP_cyt	$abc + X = abc$		R	X	
R42	PEP_cyt + CO2_cyt = ATP_cyt + OAA_cyt	$abc + d = X + abcd$		FR		[Phosphoenolpyruvate carboxykinase]
R43	ATP_cyt + OAA_cyt = PEP_cyt + CO2_cyt	$X + abcd = abc + d$		R	X	
R44	PYR_cyt = PYR_pl	$abc = abc$		F		(transport)
R45	PYR_cyt = PYR_mit	$abc = abc$		F		(transport)
R46	PYR_mit + COA_mit = ACCOA_mit + CO2_mit + NADH_mit	$abc + X = bc + a + X$		FR		mitochondrial [Pyruvate dehydrogenase]
R47	ACCOA_mit + CO2_mit + NADH_mit = PYR_mit + COA_mit	$bc + a + X = abc + X$		R	X	
R48	ACCOA_mit + OAA_mit = COA + CIT_mit	$ab + cdef = X + fedbac$		FR		[Citrate Synthase]
R49	COA + CIT_mit = ACCOA_mit + OAA_mit	$X + fedbac = ab + cdef$		R	X	
R50	CIT_mit = ICIT_mit	$abcdef = edcbaf$		FR		[Citrate dehydratase, Aconitate dehydratase]
R51	ICIT_mit = CIT_mit	$edcbaf = abcdef$		R	X	
R52	CIT_mit = CIT_cyt	$abcdef = abcdef$		F		(transport)
R53	CIT_cyt + ATP_cyt + COA_cyt = OAA_cyt + ACCOA_cyt	$abcdef + X + X = fcde + ab$		FR		[ATP-citrate lyase]
R54	OAA_cyt + ACCOA_cyt = CIT_cyt + ATP_cyt + COA_cyt	$fcde + ab = abcdef + X + X$		R	X	
R55	OAA_cyt + NADH_cyt = MAL_cyt	$abcd + X = abcd$		FR		[Malate dehydrogenase] cytosol
R56	MAL_cyt = OAA_cyt + NADH_cyt	$abcd = abcd + X$		R	X	
R57	MAL_cyt = MAL_mit	$abcd = abcd$		F		(transport)
R58	MAL_cyt = PYR_cyt + CO2_cyt + NADPH_cyt	$abcd = abc + d + X$		FR		[NADP-linked malate enzyme / Malic enzyme]
R59	PYR_cyt + CO2_cyt + NADPH_cyt = MAL_cyt	$abc + d + X = abcd$		R	X	
R60	PYR_mit + CO2_mit + ATP_mit = OAA_mit	$abc + d + X = abcd$		FR		[Pyruvate carboxylase]
R61	OAA_mit = PYR_mit + CO2_mit + ATP_mit	$abcd = abc + d + X$		R	X	
R62	ICIT_mit = AKG_mit + CO2_mit + NADH_mit	$abcdef = abcde + f + X$		FR		[Isocitrate dehydrogenase]
R63	AKG_mit + CO2_mit + NADH_mit = ICIT_mit	$abcde + f + X = abcdef$		R	X	
R64	AKG_mit = 0.5 SUCC_mit + 0.5 SUCC_mit + CO2_mit + NADH_mit + ATP_mit	$abcde = 0.5 abcd + 0.5 dcba + e + X + X$		FR		[ $\alpha$ Ketoglutarate dehydrogenase, Succinyl-CoA synthetase]
R65	SUCC_mit + CO2_mit + NADH_mit + ATP_mit = AKG_mit	$abcd + e + X + X = abcde$		R	X	
R66	SUCC_mit = 0.5 FUM_mit + 0.5 FUM_mit	$abcd = 0.5 abcd + 0.5 dcba$		FR		[Fumarate hydratase]
R67	FUM_mit = 0.5 SUCC_mit + 0.5 SUCC_mit	$abcd = 0.5 abcd + 0.5 dcba$		R	X	
R68	FUM_mit = MAL_mit	$abcd = abcd$		FR		[Succinate dehydrogenase]
R69	MAL_mit = 0.5 FUM_mit + 0.5 FUM_mit	$abcd = 0.5 abcd + 0.5 dcba$		R	X	
R70	MAL_mit = OAA_mit + NADH_mit	$abcd = abcd + X$		FR		[Malate dehydrogenase]
R71	OAA_mit + NADH_mit = MAL_mit	$abcd + X = abcd$		R	X	
						<b>// Amino acid biosynthesis (multi compartment)</b>
R72	AKG_mit = AKG_cyt	$abcde = abcde$		F		(transport)
R73	AKG_cyt = AKG_pl	$abcde = abcde$		F		(transport)
R74	GLN_cyt + AKG_cyt + NADH_cyt = GLU_cyt + GLU_cyt	$abcde + fghij + X = abcde + fghij$		FR		[Glutamate synthase (NADH)]
R75	GLU_cyt + GLU_cyt = GLN_cyt + AKG_cyt + NADH_cyt	$abcde + fghij = abcde + fghij + X$		R	X	
R76	GLU_mit = AKG_mit + NADH_mit	$abcde = abcde + X$		FR		[Glutamate dehydrogenase (NADH-dependent)]
R77	AKG_mit + NADH_mit = GLU_mit	$abcde + X = abcde$		R	X	
R78	GLU_cyt + ATP_cyt = GLN_cyt	$abcde + X = abcde$		FR		[Glutamine synthetase]
R79	GLN_cyt = GLU_cyt + ATP_cyt	$abcde = abcde + X$		R	X	
R80	OAA_cyt + GLU_cyt = ASP_cyt + AKG_cyt	$abcd + efghi = abcd + efghi$		FR		[Aspartate transaminase]
R81	ASP_cyt + AKG_cyt = OAA_cyt + GLU_cyt	$abcd + efghi = abcd + efghi$		R	X	
R82	GLU_cyt + ACCOA_cyt + ATP_cyt + NADPH_cyt = acGLUSEMI_cyt + COA_cyt	$abcde + fg + X + X = abcdefg + X$		FR		[2.3.1.1, Acetylglutamate kinase, Acetylornithine transaminase]
R83	acGLUSEMI_cyt + COA_cyt = GLU_cyt + ACCOA_cyt + ATP_cyt + NADPH_cyt	$abcdefg + X = abcde + fg + X + X$		R	X	
R84	acGLUSEMI_cyt + GLU_cyt = ORNITH_cyt + ACETATE_cyt + AKG_cyt	$abcdefg + hijkl = abcde + fg + hijkl$		FR		[Acetylornithine transaminase, 3.5.1.16]
R85	ORNITH_cyt + ACETATE_cyt + AKG_cyt = acGLUSEMI_cyt + GLU_cyt	$abcde + fg + hijkl = abcdefg + hijkl$		R	X	
R86	GLN_cyt + CO2_cyt + ATP_cyt + ATP_cyt = GLU_cyt + CARB_PHOSPH_cyt	$abcde + f + X + X = abcde + f$		FR		[Carbanoyl-phosphate synthase]
R87	GLU_cyt + CARB_PHOSPH_cyt = GLN_cyt + CO2_cyt + ATP_cyt + ATP_cyt	$abcde + f = abcde + f + X + X$		R	X	

Μελέτη μοντελοποίησης του μεταβολικού δικτύου της ελαιοκράμβης

R88	ORNITH_cyt + CARB_PHOSPH_cyt + ASP_cyt + ATP_cyt = ARG_cyt + FUM_cyt	abcde + f + ghij + X = abcdef + ghij	FR			[Ornithine carbanoyltransferase, 6.3.4.5, Arginosuccinate lyase]
R89	ARG_cyt + FUM_cyt = ORNITH_cyt + CARB_PHOSPH_cyt + ASP_cyt + ATP_cyt	abcdef + ghij = abcde + f + ghij + X	R	X		
R90	GLU_pl + ATP_pl = GLU_5_PHOSPHATE_pl	abcde + X = abcde	FR			[gamma-glutamyl kinase]
R91	GLU_5_PHOSPHATE_pl = GLU_pl + ATP_pl	abcde = abcde + X	R	X		
R92	GLU_5_PHOSPHATE_pl + NADPH_pl = GLU_gamma_SEMIALDEHYDE_pl	abcde + X = abcde	FR			[Glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase]
R93	GLU_gamma_SEMIALDEHYDE_pl = GLU_5_PHOSPHATE_pl + NADPH_pl	abcde = abcde + X	R	X		
R94	GLU_gamma_SEMIALDEHYDE_pl = PYRROLINE_5_CARBOXYLATE_pl	abcde = abcde	FR			[spontaneous]
R95	PYRROLINE_5_CARBOXYLATE_pl = GLU_gamma_SEMIALDEHYDE_pl	abcde = abcde	R	X		
R96	PYRROLINE_5_CARBOXYLATE_pl + NADPH_pl = PRO_pl	abcde + X = abcde	FR			[Pyrroline-5-carboxylate reductase]
R97	PRO_pl = PYRROLINE_5_CARBOXYLATE_pl + NADPH_pl	abcde = abcde + X	R	X		
R98	ASP_cyt + GLN_cyt + ATP_cyt = ASN_cyt + GLU_cyt	abcd + efghi + X = abcd + efghi	FR			[Asparagine synthase]
R99	ASN_cyt + GLU_cyt = ASP_cyt + GLN_cyt + ATP_cyt	abcd + efghi = abcd + efghi + X	R	X		
R100	ASP_pl + ATP_pl = L_ASPARTYL_4_PHOSPHATE_pl	abcd + X = abcd	FR			[Aspartate kinase]
R101	L_ASPARTYL_4_PHOSPHATE_pl = ASP_pl + ATP_pl	abcd = abcd + X	R	X		
R102	L_ASPARTYL_4_PHOSPHATE_pl + NADPH_pl = L_ASPARTATE_SEMIALDEHYDE_pl	abcd + X = abcd	FR			[Aspartate semialdehyde dehydrogenase]
R103	L_ASPARTATE_SEMIALDEHYDE_pl = L_ASPARTYL_4_PHOSPHATE_pl + NADPH_pl	abcd = abcd + X	R	X		
R104	L_ASPARTATE_SEMIALDEHYDE_pl + NADPH_pl = HOMOSERINE_pl	abcd + X = abcd	FR			[Homoserine dehydrogenase]
R105	HOMOSERINE_pl = L_ASPARTATE_SEMIALDEHYDE_pl + NADPH_pl	abcd = abcd + X	R	X		
R106	HOMOSERINE_pl + ATP_pl = O_PHOSPHO_L_HOMOSERINE_pl	abcd + X = abcd	FR			[Homoserine kinase]
R107	O_PHOSPHO_L_HOMOSERINE_pl = HOMOSERINE_pl + ATP_pl	abcd = abcd + X	R	X		
R108	O_PHOSPHO_L_HOMOSERINE_pl = THR_pl	abcd = abcd	FR			[Threonine synthase]
R109	THR_pl = O_PHOSPHO_L_HOMOSERINE_pl	abcd = abcd	R	X		
R110	3PG_pl = 3_PHOSPHO_HYDROXYPYRUVATE_pl + NADH_pl	abc = abc + X	FR			[3-phosphoglycerate dehydrogenase]
R111	3_PHOSPHO_HYDROXYPYRUVATE_pl + NADH_pl = 3PG_pl	abc + X = abc	R	X		
R112	3_PHOSPHO_HYDROXYPYRUVATE_pl + GLU_pl = 3_PHOSPHO_L_SERINE_pl + AKG_pl	abc + defgh = abc + defgh	FR			[Phosphoserine aminotransferase]
R113	3_PHOSPHO_L_SERINE_pl + AKG_pl = 3_PHOSPHO_HYDROXYPYRUVATE_pl + GLU_pl	abc + defgh = abc + defgh	R	X		
R114	3_PHOSPHO_L_SERINE_pl = SER_pl	abc = abc	FR			[3-phosphoserine phosphatase]
R115	SER_pl = 3_PHOSPHO_L_SERINE_pl	abc = abc	R	X		
R116	SER_cyt = GLY_cyt + MTHF_cyt	abc = ab + c	FR			[Serine hydroxymethyltransferase]
R117	GLY_cyt + MTHF_cyt = SER_cyt	ab + c = abc	R	X		
R118	SER_pl + ACCOA_pl = O_ACETYL_L_SERINE_pl + COA_pl	abc + de = abcde + X	FR			[Serine O-acetyltransferase, cysteine synthase]
R119	O_ACETYL_L_SERINE_pl + COA_pl = SER_pl + ACCOA_pl	abcde + X = abc + de	R	X		
R120	O_ACETYL_L_SERINE_pl = CYS_pl + ACETATE_pl	abcde = abc + de	FR			[O-acetylserine (thiol) lyase]
R121	CYS_pl + ACETATE_pl = O_ACETYL_L_SERINE_pl	abc + de = abcde	R	X		
R122	PYR_cyt + GLU_cyt = ALA_cyt + AKG_cyt	abc + defgh = abc + defgh	FR			[Alanine transaminase]
R123	ALA_cyt + AKG_cyt = PYR_cyt + GLU_cyt	abc + defgh = abc + defgh	R	X		
R124	AKG_pl + ALA_pl = GLU_pl + PYR_pl	abcde + fgh = abcde + fgh	FR			[Alanine transaminase]
R125	GLU_pl + PYR_pl = AKG_pl + ALA_pl	abcde + fgh = abcde + fgh	R	X		
R126	PYR_pl + PYR_pl = 2_ACETOLACTATE_pl + CO2_pl	abc + def = abcef + d	FR			[Acetolactate synthase]
R127	2_ACETOLACTATE_pl + CO2_pl = PYR_pl + PYR_pl	abcef + d = abc + def	R	X		
R128	2_ACETOLACTATE_pl + NADPH_pl = 2_3_DIHYDROXY_ISOVALERATE_pl	abcde + X = abcde	FR			[1.1.1.86]
R129	2_3_DIHYDROXY_ISOVALERATE_pl = 2_ACETOLACTATE_pl + NADPH_pl	abcde = abcde + X	R	X		
R130	2_3_DIHYDROXY_ISOVALERATE_pl = 2_KETO_ISOVALERATE_pl	abcde = abcde	FR			[4.2.1.9]
R131	2_KETO_ISOVALERATE_pl = 2_3_DIHYDROXY_ISOVALERATE_pl	abcde = abcde	R	X		
R132	2_KETO_ISOVALERATE_pl + GLU_pl = VAL_pl + AKG_pl	abcde + fghij = abcde + fghij	FR			[Branched-chain-amino-acid transaminase]
R133	VAL_pl + AKG_pl = 2_KETO_ISOVALERATE_pl + GLU_pl	abcde + fghij = abcde + fghij	R	X		
R134	2_KETO_ISOVALERATE_pl + ACCOA_pl = 2_ISOPROPYLMALATE_pl + COA_pl	abcde + fg = fgabcde + X	FR			[2-isopropylmalate synthase]
R135	2_ISOPROPYLMALATE_pl + COA_pl = 2_KETO_ISOVALERATE_pl + ACCOA_pl	fgabcde + X = abcde + fg	R	X		

Μελέτη μοντελοποίησης του μεταβολικού δικτύου της ελαιοκράμβης

R136	2_ISOPROPYLMALATE_pl = 3_ISOPROPYLMALATE_pl	abcdefg = abcdefg		FR		[4.2.1.33]
R137	3_ISOPROPYLMALATE_pl = 2_ISOPROPYLMALATE_pl	abcdefg = abcdefg		R	X	
R138	3_ISOPROPYLMALATE_pl = 2_ISOPROPYL_3_OXOSUCCINATE_pl + NADH_pl	abcdefg = abcdefg + X		FR		[3-isopropylmalate dehydrogenase]
R139	2_ISOPROPYL_3_OXOSUCCINATE_pl + NADH_pl = 3_ISOPROPYLMALATE_pl	abcdefg + X = abcdefg		R	X	
R140	2_ISOPROPYL_3_OXOSUCCINATE_pl = 2_KETOISOCAPROATE_pl + CO2_pl	abcdefg = bcdefg + a		FR		[spontaneous]
R141	2_KETOISOCAPROATE_pl + CO2_pl = 2_ISOPROPYL_3_OXOSUCCINATE_pl	bcdefg + a = abcdefg		R	X	
R142	2_KETOISOCAPROATE_pl + GLU_pl = LEU_pl + AKG_pl	abcdef + ghijk = abcdef + ghijk		FR		[Branched-chain-amino-acid transaminase]
R143	LEU_pl + AKG_pl = 2_KETOISOCAPROATE_pl + GLU_pl	abcdef + ghijk = abcdef + ghijk		R	X	
R144	E4P_pl + PEP_pl + NADPH_pl = SHIKIMATE_pl	abcd + efg + X = efgabcd		FR		[3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase, 3-dehydroquininate synthase, 4.2.1.10, Shikimate 5-dehydrogenase]
R145	SHIKIMATE_pl = E4P_pl + PEP_pl + NADPH_pl	efgabcd = abcd + efg + X		R	X	
R146	SHIKIMATE_pl + ATP_pl = SHIKIMATE_3_PHOSPHATE_pl	abcdefg + X = abcdefg		FR		[Shikimate kinase]
R147	SHIKIMATE_3_PHOSPHATE_pl = SHIKIMATE_pl + ATP_pl	abcdefg = abcdefg + X		R	X	
R148	SHIKIMATE_3_PHOSPHATE_pl + PEP_pl = 5_ENOLPYRUVYL_SHIKIMATE_3_PHOSPHATE_pl	abcdefg + hij = abcdefghij		FR		[3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase]
R149	5_ENOLPYRUVYL_SHIKIMATE_3_PHOSPHATE_pl = SHIKIMATE_3_PHOSPHATE_pl + PEP_pl	abcdefghij = abcdefg + hij		R	X	
R150	5_ENOLPYRUVYL_SHIKIMATE_3_PHOSPHATE_pl = CHORISMATE_pl	abcdefghij = abcdefghij		FR		[Chorismate synthase]
R151	CHORISMATE_pl = 5_ENOLPYRUVYL_SHIKIMATE_3_PHOSPHATE_pl	abcdefghij = abcdefghij		R	X	
R152	CHORISMATE_pl = PREPHENATE_pl	abcdefghij = abcdefghij		FR		[Chorismate mutase]
R153	PREPHENATE_pl = CHORISMATE_pl	abcdefghij = abcdefghij		R	X	
R154	PREPHENATE_pl + GLU_pl = L_AROGENATE_pl + AKG_pl	abcdefghij + klmno = hijabcdefg + klmno		FR		[2.6.1.79]
R155	L_AROGENATE_pl + AKG_pl = PREPHENATE_pl + GLU_pl	hijabcdefg + klmno = abcdefghij + klmno		R	X	
R156	L_AROGENATE_pl = PHE_pl + CO2_pl	abcdefghij = abcefghij + d		FR		[Arogenate dehydratase]
R157	PHE_pl + CO2_pl = L_AROGENATE_pl	abcefghij + d = abcdefghij		R	X	
R158	L_AROGENATE_pl = TYR_pl + NADPH_pl + CO2_pl	abcdefghij = abcefghij + X + d		FR		[L-tyrosine:2-oxoglutarate aminotransferase]
R159	TYR_pl + NADPH_pl + CO2_pl = L_AROGENATE_pl	abcefghij + X + d = abcdefghij		R	X	
R160	R5P_cyt + ATP_cyt = PRPP_cyt	abcde + X = abcde		FR		[Ribose-phosphate diphosphokinase]
R161	PRPP_cyt = R5P_cyt + ATP_cyt	abcde = abcde + X		R	X	
R162	CHORISMATE_pl + GLN_pl = ANTHRALINATE_pl + PYR_pl + GLU_pl	abcdefghij + klmno = abcdefg + hij + klmno		FR		[Anthranilate synthase]
R163	ANTHRALINATE_pl + PYR_pl + GLU_pl = CHORISMATE_pl + GLN_pl	abcdefg + hij + klmno = abcdefghij + klmno		R	X	
R164	ANTHRALINATE_pl + PRPP_pl = 1_O_CARBOXYPHENYLAMINO_1_DEOXYRIBULOSE_5_PHOSPHATE_pl	abcdefg + hijkl = abcdefghijkl		FR		[Anthranilate phosphoribosyltransferase, Phosphoribosylanthranilate isomerase]
R165	1_O_CARBOXYPHENYLAMINO_1_DEOXYRIBULOSE_5_PHOSPHATE_pl = ANTHRALINATE_pl + PRPP_pl	abcdefghijkl = abcdefg + hijkl		R	X	
R166	1_O_CARBOXYPHENYLAMINO_1_DEOXYRIBULOSE_5_PHOSPHATE_pl = INDOLE_3_GLYCEROL_PHOSPHATE_pl + CO2_pl	abcdefghijkl = abcdfghijkl + e		FR		[Indole-3-glycerol-phosphate synthase]
R167	INDOLE_3_GLYCEROL_PHOSPHATE_pl + CO2_pl = 1_O_CARBOXYPHENYLAMINO_1_DEOXYRIBULOSE_5_PHOSPHATE_pl	abcdfghijkl + e = abcdefghijkl		R	X	
R168	INDOLE_3_GLYCEROL_PHOSPHATE_pl = INDOLE_pl + G3P_pl	abcdefghijk = abcdefgh + ijk		FR		[Tryptophan synthase alpha subunit]
R169	INDOLE_pl + G3P_pl = INDOLE_3_GLYCEROL_PHOSPHATE_pl	abcdefgh + ijk = abcdefghijk		R	X	
R170	INDOLE_pl + SER_pl = TRP_pl	abcdefgh + ijk = abcdefghkji		FR		[Tryptophan synthase beta subunit]
R171	TRP_pl = INDOLE_pl + SER_pl	abcdefghkji = abcdefgh + ijk		R	X	
R172	THR_pl = 2_OXOBUTANOATE_pl	abcd = abcd		FR		[Threonine deaminase]
R173	2_OXOBUTANOATE_pl = THR_pl	abcd = abcd		R	X	
R174	PYR_pl + 2_OXOBUTANOATE = 2_ACETO_2_HYDROXY_BUTYRATE_pl + CO2_pl	abc + defg = debfgc + a		FR		[Acetolactate synthase]
R175	2_ACETO_2_HYDROXY_BUTYRATE_pl + CO2_pl = PYR_pl + 2_OXOBUTANOATE	debfgc + a = abc + defg		R	X	
R176	2_ACETO_2_HYDROXY_BUTYRATE_pl + NADPH_pl = 2_KETO_3_METHYL_VALERATE_pl	abcdef + X = abcdef		FR		[1.1.1.86, 4.2.1.9]
R177	2_KETO_3_METHYL_VALERATE_pl = 2_ACETO_2_HYDROXY_BUTYRATE_pl + NADPH_pl	abcdef = abcdef + X		R	X	
R178	2_KETO_3_METHYL_VALERATE_pl + GLU_pl = ILE_pl + AKG_pl	abcdef + ghijk = abcdef + ghijk		FR		[Branched-chain-amino-acid transaminase]
R179	ILE_pl + AKG_pl = 2_KETO_3_METHYL_VALERATE_pl + GLU_pl	abcdef + ghijk = abcdef + ghijk		R	X	

## Μελέτη μοντελοποίησης του μεταβολικού δικτύου της ελαιοκράμβης

R180	O_PHOSPHO_L_HOMOSERINE_pl + CYS_pl = CYSTATHIONINE_pl	abcd + efg = abcdefg		FR		[2.5.1.-]
R181	CYSTATHIONINE_pl = O_PHOSPHO_L_HOMOSERINE_pl + CYS_pl	abcdefg = abcd + efg		R	X	
R182	CYSTATHIONINE_pl = L_HOMOCYSTEINE_pl + PYR_pl	abcdefg = abcd + efg		FR		[Cystathionine beta-lyase]
R183	L_HOMOCYSTEINE_pl + PYR_pl = CYSTATHIONINE_pl	abcd + efg = abcdefg		R	X	
R184	L_HOMOCYSTEINE_pl + MTHF_pl = MET_pl	abcd + e = abcde		FR		
R185	MET_pl = L_HOMOCYSTEINE_pl + MTHF_pl	abcde = abcd + e		R	X	
R186	L_ASPARTATE_SEMIALDEHYDE_pl + PYR_pl = L_2_3_DIHYDRODIPICOLINATE_pl	abcd + efg = abcdefg		FR		[Dihydrodipicolinate synthase]
R187	L_2_3_DIHYDRODIPICOLINATE_pl = L_ASPARTATE_SEMIALDEHYDE_pl + PYR_pl	abcdefg = abcd + efg		R	X	
R188	L_2_3_DIHYDRODIPICOLINATE_pl + NADPH_pl = TETRAHYDRODIPICOLINATE_pl	abcdefg + X = abcdefg		FR		[Dihydrodipicolinate reductase]
R189	TETRAHYDRODIPICOLINATE_pl = L_2_3_DIHYDRODIPICOLINATE_pl + NADPH_pl	abcdefg = abcdefg + X		R	X	
R190	TETRAHYDRODIPICOLINATE_pl + GLU_pl = L_L_DIAMINOPIMELATE_pl + AKG_pl	abcdefg + hijkl = abcdefg + hijkl		FR		[L,L-diaminopimelate aminotransferase]
R191	L_L_DIAMINOPIMELATE_pl + AKG_pl = TETRAHYDRODIPICOLINATE_pl + GLU_pl	abcdefg + hijkl = abcdefg + hijkl		R	X	
R192	L_L_DIAMINOPIMELATE_pl = MESO_DIAMINOPIMELATE_pl	abcdefg = abcdefg		FR		[Diaminopimelate epimerase]
R193	MESO_DIAMINOPIMELATE_pl = L_L_DIAMINOPIMELATE_pl	abcdefg = abcdefg		R	X	
R194	MESO_DIAMINOPIMELATE_pl = LYS_pl + CO2_pl	abcdefg = abcdef + g		FR		[Diaminopimelate decarboxylase]
R195	LYS_pl + CO2_pl = MESO_DIAMINOPIMELATE_pl	abcdef + g = abcdefg		R	X	
R196	PRPP_pl + ATP_pl = PHOSPHORIBULOSYLFORMIMINO_AICAR_P_pl	abcde + X = abcde		FR		[ATP-phosphoribosyl transferase, Phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase, Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase, Phosphoribosyl-formimino-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide isomerase]
R197	PHOSPHORIBULOSYLFORMIMINO_AICAR_P_pl = PRPP_pl + ATP_pl	abcde = abcde + X		R	X	
R198	PHOSPHORIBULOSYLFORMIMINO_AICAR_P_pl + MTHF_pl + GLN_pl = IMIDAZOLE_ACETOL_PHOSPHATE_pl + GLU_pl	abcde + f + ghijk = abcdef + ghijk		FR		[2.4.2.-, 4.2.1.19]
R199	IMIDAZOLE_ACETOL_PHOSPHATE_pl + GLU_pl = PHOSPHORIBULOSYLFORMIMINO_AICAR_P_pl + MTHF_pl + GLN_pl	abcdef + ghijk = abcde + f + ghijk		R	X	
R200	IMIDAZOLE_ACETOL_PHOSPHATE_pl + GLU_pl = HISTIDINOL_pl + AKG_pl	abcdef + ghijk = edcbaf + ghijk		FR		[Histidinol-phosphate transaminase, 3.1.3.15]
R201	HISTIDINOL_pl + AKG_pl = IMIDAZOLE_ACETOL_PHOSPHATE_pl + GLU_pl	edcbaf + ghijk = abcdef + ghijk		R	X	
R202	HISTIDINOL_pl = HISTIDINAL_pl + NADH_pl	abcdef = abcdef + X		FR		[Histidinol dehydrogenase]
R203	HISTIDINAL_pl + NADH_pl = HISTIDINOL_pl	abcdef + X = abcdef		R	X	
R204	HISTIDINAL_pl = HIS_pl + NADH_pl	abcdef = abcdef + X		FR		[Histidinol dehydrogenase]
R205	HIS_pl + NADH_pl = HISTIDINAL_pl	abcdef + X = abcdef		R	X	
						<b>// Fatty acid biosynthesis (plastid)</b>
R206	ACCOA_cyt = ACCOA_pl	ab = ab		F		(transport)
R207	PYR_pl + COA_pl = ACCOA_pl + CO2_pl + NADH_pl	abc + X = bc + a + X		FR		plastidic [Pyruvate dehydrogenase]
R208	ACCOA_pl + CO2_pl + NADH_pl = PYR_pl + COA_pl	bc + a + X = abc + X		R	X	
R209	ACCOA_pl + CO2_pl + ATP_pl = MALCOA_pl	ab + c + X = abc		FR		[Acetyl-CoA carboxylase]
R210	MALCOA_pl = ACCOA_pl + CO2_pl + ATP_pl	abc = ab + c + X		R	X	
R211	MALCOA_pl + aHOLO_ACP_pl = MALONYL_ACP_pl + COA_pl	abc + X = abc + X		FR		[[acyl-carrier protein] S-malonyltransferase]: Bn(Br.Napus)-Fab D
R212	MALONYL_ACP_pl + COA_pl = MALCOA_pl + aHOLO_ACP_pl	abc + X = abc + X		R	X	
R213	MALONYL_ACP_pl + ACCOA_pl = ACETOACETYL_pl + CO2_pl + COA_pl	abc + de = abcd + e + X		FR		[ACP synthase III]: KAS III (Br. Napus)
R214	ACETOACETYL_pl + CO2_pl + COA_pl = MALONYL_ACP_pl + ACCOA_pl	abcd + e + X = abc + de		R	X	
R215	ACETOACETYL_pl + NADPH_pl = TRANS_DELTA2_DECENOYL_ACP_pl	abcd + X = abcd		FR		
R216	TRANS_DELTA2_DECENOYL_ACP_pl = ACETOACETYL_pl + NADPH_pl	abcd = abcd + X		R	X	
R217	TRANS_DELTA2_DECENOYL_ACP_pl + NADH_pl = DECANOYL_ACP_pl	abcd + X = abcd		FR		[Enoyl-ACP reductase]
R218	DECANOYL_ACP_pl = TRANS_DELTA2_DECENOYL_ACP_pl + NADH_pl	abcd = abcd + X		R	X	
R219	DECANOYL_ACP_pl + MALONYL_ACP_pl = 3_OXO_DODECANOYL_ACP_pl + aHOLOACP + CO2	abcd + efg = efabcd + X + g		FR		[3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase]
R220	3_OXO_DODECANOYL_ACP_pl + aHOLOACP + CO2 = DECANOYL_ACP_pl + MALONYL_ACP_pl	efabcd + X + g = abcd + efg		R	X	



Μελέτη μοντελοποίησης του μεταβολικού δικτύου της ελαιοκράμβης

R221	3_OXO_DODECANOYL_ACP_pl + NADPH_pl = TRANS_DODEC_2_ENOYL_ACP_pl	abcdef + X = abcdef		FR			[3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase, 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase]]
R222	TRANS_DODEC_2_ENOYL_ACP_pl = 3_OXO_DODECANOYL_ACP_pl + NADPH_pl	abcdef = abcdef + X		R	X		
R223	TRANS_DODEC_2_ENOYL_ACP_pl + NADH_pl = DODECANOYL_ACP_pl	abcdef + X = abcdef		FR			[Enoyl-ACP reductase]
R224	DODECANOYL_ACP_pl = TRANS_DODEC_2_ENOYL_ACP_pl + NADH_pl	abcdef = abcdef + X		R	X		
R225	DODECANOYL_ACP_pl = LAURATE_pl + aHOLO_ACP_pl	abcdef = abcdef + X		FR			[Acyl-ACP thioesterase]
R226	LAURATE_pl + aHOLO_ACP_pl = DODECANOYL_ACP_pl	abcdef + X = abcdef		R	X		
R227	DODECANOYL_ACP_pl + MALONYL_ACP_pl = 3_OXO_MERISTOYL_ACP_pl + aHOLO_ACP_pl + CO2_pl	abcdef + ghi = ghabcdef + X + i		FR			[3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase]
R228	3_OXO_MERISTOYL_ACP_pl + aHOLO_ACP_pl + CO2_pl = DODECANOYL_ACP_pl + MALONYL_ACP_pl	ghabcdef + X + i = abcdef + ghi		R	X		
R229	3_OXO_MERISTOYL_ACP_pl + NADPH_pl = TRANS_TETRADEC_2_ENOYL_ACP_pl	abcdefgh + X = abcdefgh		FR			[3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase, 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase]]
R230	TRANS_TETRADEC_2_ENOYL_ACP_pl = 3_OXO_MERISTOYL_ACP_pl + NADPH_pl	abcdefgh = abcdefgh + X		R	X		
R231	TRANS_TETRADEC_2_ENOYL_ACP_pl + NADH_pl = MYRISTOYL_ACP_pl	abcdefgh + X = abcdefgh		FR			[Enoyl-ACP reductase]
R232	MYRISTOYL_ACP_pl = TRANS_TETRADEC_2_ENOYL_ACP_pl + NADH_pl	abcdefgh = abcdefgh + X		R	X		
R233	MYRISTOYL_ACP_pl + MALONYL_ACP_pl = 3_OXO_PALMITOYL_ACP_pl + aHOLO_ACP_pl + CO2_pl	abcdefgh + ijk = ijabcdefgh + X + k		FR			[3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase]
R234	3_OXO_PALMITOYL_ACP_pl + aHOLO_ACP_pl + CO2_pl = MYRISTOYL_ACP_pl + MALONYL_ACP_pl	ijabcdefgh + X + k = abcdefgh + ijk		R	X		
R235	3_OXO_PALMITOYL_ACP_pl + NADPH_pl = TRANS_HEXADECENOYL_ACP_pl	abcdefghij + X = abcdefghij		FR			[3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase, 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase]]
R236	TRANS_HEXADECENOYL_ACP_pl = 3_OXO_PALMITOYL_ACP_pl + NADPH_pl	abcdefghij = abcdefghij + X		R	X		
R237	TRANS_HEXADECENOYL_ACP_pl + NADH_pl = PALMITOYL_ACP_pl	abcdefghij + X = abcdefghij		FR			[Enoyl-ACP reductase]
R238	PALMITOYL_ACP_pl = TRANS_HEXADECENOYL_ACP_pl + NADH_pl	abcdefghij = abcdefghij + X		R	X		
R239	PALMITOYL_ACP_pl = PALMITATE_pl + aHOLO_ACP_pl	abcdefghij = abcdefghij + X		FR			[acyl-ACP thioesterase]
R240	PALMITATE_pl + aHOLO_ACP_pl = PALMITOYL_ACP_pl	abcdefghij + X = abcdefghij		R	X		
R241	PALMITOYL_ACP_pl + MALCOA_pl = 3_OXO_STEAROYL_ACP_pl + CO2_pl + COA_pl	abcdefghij + klm = klabcdefghij + m + X		FR			[3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase]
R242	3_OXO_STEAROYL_ACP_pl + CO2_pl + COA_pl = PALMITOYL_ACP_pl + MALCOA_pl	klabcdefghij + m + X = abcdefghij + klm		R	X		
R243	3_OXO_STEAROYL_ACP_pl + NADPH_pl = TRANS_OCTADEC_2_ENOYL_ACP_pl	abcdefghijkl + X = abcdefghijkl		FR			[3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase, 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase]]
R244	TRANS_OCTADEC_2_ENOYL_ACP_pl = 3_OXO_STEAROYL_ACP_pl + NADPH_pl	abcdefghijkl = abcdefghijkl + X		R	X		
R245	TRANS_OCTADEC_2_ENOYL_ACP_pl + NADH_pl = STEAROYL_ACP_pl	abcdefghijkl + X = abcdefghijkl		FR			[Enoyl-ACP reductase]
R246	STEAROYL_ACP_pl = TRANS_OCTADEC_2_ENOYL_ACP_pl + NADH_pl	abcdefghijkl = abcdefghijkl + X		R	X		
R247	STEAROYL_ACP_pl = STEARATE_pl + aHOLO_ACP_pl	abcdefghijkl = abcdefghijkl + X		FR			[acyl-ACP thioesterase]
R248	STEARATE_pl + aHOLO_ACP_pl = STEAROYL_ACP_pl	abcdefghijkl + X = abcdefghijkl		R	X		
R249	STEAROYL_ACP_pl + O2_pl = OLEOYL_ACP_pl	abcdefghijkl + X = abcdefghijkl		FR			[acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase]
R250	OLEOYL_ACP_pl = STEAROYL_ACP_pl + O2_pl	abcdefghijkl = abcdefghijkl + X		R	X		
R251	OLEOYL_ACP_pl = OLEATE_pl + aHOLO_ACP_pl	abcdefghijkl = abcdefghijkl + X		FR			[acyl-ACP thioesterase]
R252	OLEATE_pl + aHOLO_ACP_pl = OLEOYL_ACP_pl	abcdefghijkl + X = abcdefghijkl		R	X		
R253	OLEOYL_ACP_pl + ATP_pl + COA_pl = OLEOYL_COA_pl	abcdefghijkl + X + X = abcdefghijkl		FR			[oleate:CoA ligase (AMP-forming)]
R254	OLEOYL_COA_pl = OLEOYL_ACP_pl + ATP_pl + COA_pl	abcdefghijkl = abcdefghijkl + X + X		R	X		
R255	OLEOYL_COA_pl + O2_pl = LINOLEATE_pl + COA_pl	abcdefghijkl + X = abcdefghijkl + X		FR			[ -- ,lipid oleoyl,hydrogen donor:oxygen Δ12-oxidoreductase]
R256	LINOLEATE_pl + COA_pl = OLEOYL_COA_pl + O2_pl	abcdefghijkl + X = abcdefghijkl + X		R	X		
R257	LINOLEATE_pl + O2_pl = LINOLENATE_pl	abcdefghijkl + X = abcdefghijkl		FR			[linolenate Δ15 desaturase]
R258	LINOLENATE_pl = LINOLEATE_pl + O2_pl	abcdefghijkl = abcdefghijkl + X		R	X		
R259	LINOLENATE_pl + O2_pl = gamma_LINOLENATE_pl	abcdefghijkl + X = abcdefghijkl		FR			[Δ6-acyl-lipid desaturase]
R260	gamma_LINOLENATE_pl = LINOLENATE_pl + O2_pl	abcdefghijkl = abcdefghijkl + X		R	X		
R261	CYS_pl = CYS_cyt	abc = abc		F			// Transport (transport)
R262	HIS_pl = HIS_cyt	abcdef = abcdef		F			(transport)
R263	ILE_pl = ILE_cyt	abcdef = abcdef		F			(transport)

Μελέτη μοντελοποίησης του μεταβολικού δικτύου της ελαιοκράμβης

R264	LYS_pl = LYS_cyt	abcdef = abcdef	F		(transport)
R265	LEU_pl = LEU_cyt	abcdef = abcdef	F		(transport)
R266	MET_pl = MET_cyt	abcde = abcde	F		(transport)
R267	PHE_pl = PHE_cyt	abcdefghi = abcdefghi	F		(transport)
R268	THR_pl = THR_cyt	abcd = abcd	F		(transport)
R269	TRP_pl = TRP_cyt	abcdefghijk = abcdefghijk	F		(transport)
R270	TYR_pl = TYR_cyt	abcdefghi = abcdefghi	F		(transport)
R271	VAL_pl = VAL_cyt	abcde = abcde	F		(transport)
R272	PRO_pl = PRO_cyt	abcde = abcde	F		(transport)
R273	GLU_cyt = GLU_mit	abcde = abcde	F		(transport)
R274	GLU_cyt = GLU_pl	abcde = abcde	F		(transport)
R275	ASP_cyt = ASP_pl	abcd = abcd	F		(transport)
R276	3PG_cyt = 3PG_pl	abc = abc	F		(transport)
R277	SER_pl = SER_cyt	abc = abc	F		(transport)
R278	COA_mit = COA_cyt	X = X	F		(transport)
R279	COA_cyt = COA_pl	X = X	F		(transport)
R280	FUM_cyt = FUM_mit	abcd = abcd	F		(transport)
R281	ALA_cyt = ALA_pl	abc = abc	F		(transport)
R282	PEP_cyt = PEP_pl	abc = abc	F		(transport)
R283	E4P_cyt = E4P_pl	abcd = abcd	F		(transport)
R284	PRPP_cyt = PRPP_pl	abcde = abcde	F		(transport)
R285	GLN_cyt = GLN_pl	abcde = abcde	F		(transport)
R286	MTHF_cyt = MTHF_pl	a = a	F		(transport)
R287	0.15585 ARG_cyt + 0.12486 ASN_cyt + 0.042912 CYS_cyt + 0.32184 GLN_cyt + 0.09983 GLU_cyt + 0.25986 GLY_cyt + 0.048872 HIS_cyt + 0.12576 ILE_cyt + 0.1037 LYS_cyt + 0.2238 LEU_cyt + 0.18089 ALA_cyt + 0.12784 ASP_cyt + 0.048872 MET_cyt + 0.11086 PHE_cyt + 0.19191 SER_cyt + 0.13082 THR_cyt + 0.025926 TRP_cyt + 0.071818 TYR_cyt + 0.17373 VAL_cyt + 0.14393 PRO_cyt + 49.9049 ATP_cyt = BIOMASS		B		Biomass
R288	CO2_cyt = CO2_ex	a = a	F		(transport)
R289	CO2_mit = CO2_ex	a = a	F		(transport)
R290	CO2_pl = CO2_ex	a = a	F		(transport)
R291	O2_ex = O2_cyt		B		(transport)
R292	O2_cyt = O2_pl		B		(transport)
R293	G3P_cyt = GLYCEROL		B		(transport)
R294	GLC6P_cyt = ST		B		(transport)
R295	2 NADH_cyt + O2_cyt = 4 ATP_cyt		B		(transport)
R296	GLU_CYT = GLU	abcde = abcde	SF		(transport)
R297	GLU_MIT = GLU	abcde = abcde	SF		(transport)
R298	GLU_PL = GLU	abcde = abcde	SF		(transport)
R299	AKG_CYT = AKG	abcde = abcde	SF		(transport)
R300	AKG_MIT = AKG	abcde = abcde	SF		(transport)
R301	AKG_PL = AKG	abcde = abcde	SF		(transport)
R302	MET_pl = MET	abcde = abcde	SF		(transport)
R303	MET_cyt = MET	abcde = abcde	SF		(transport)
R304	ILE_pl = ILE	abcdef = abcdef	SF		(transport)
R305	ILE_cyt = ILE	abcdef = abcdef	SF		(transport)
R306	LEU_pl = LEU	abcdef = abcdef	SF		(transport)
R307	LEU_cyt = LEU	abcdef = abcdef	SF		(transport)
R308	ARG_cyt = ARG	abcdef = abcdef	S		(transport)
R309	PRO_pl = PRO	abcde = abcde	SF		(transport)
R310	PRO_cyt = PRO	abcde = abcde	SF		(transport)

Πίνακας 6: Δεύτερο τμήμα αρχείου εισόδου για το OpenFLUX. **ExcludedMetabolites**: μεταβολίτες που εξαιρούνται από το μοντέλο ισοζυγίων μεταβολιτών, **simulatedMDVs**: μεταβολίτες που θα προσομοιωθούν από το μοντέλο και για τους οποίους παρέχονται τα πειραματικά MIDs στην στήλη “measurements”, **inputSubstrates**: υποστρώματα εισόδου, **measurements**: πειραματικά MIDs των μεταβολιτών της λίστας “simulated MDVs”. Η στήλη αυτή περιέχει εντάσεις κορυφών του φάσματος μάζας που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο κλάσμα μάζας (m/z) ενός μεταβολίτη. Οι τιμές είναι κανονικοποιημένες (το άθροισμα των κορυφών για ένα μεταβολίτη προκύπτει ίσο με τη μονάδα), **error**: σφάλματα των πειραματικών τιμών της λίστας “measurements”.

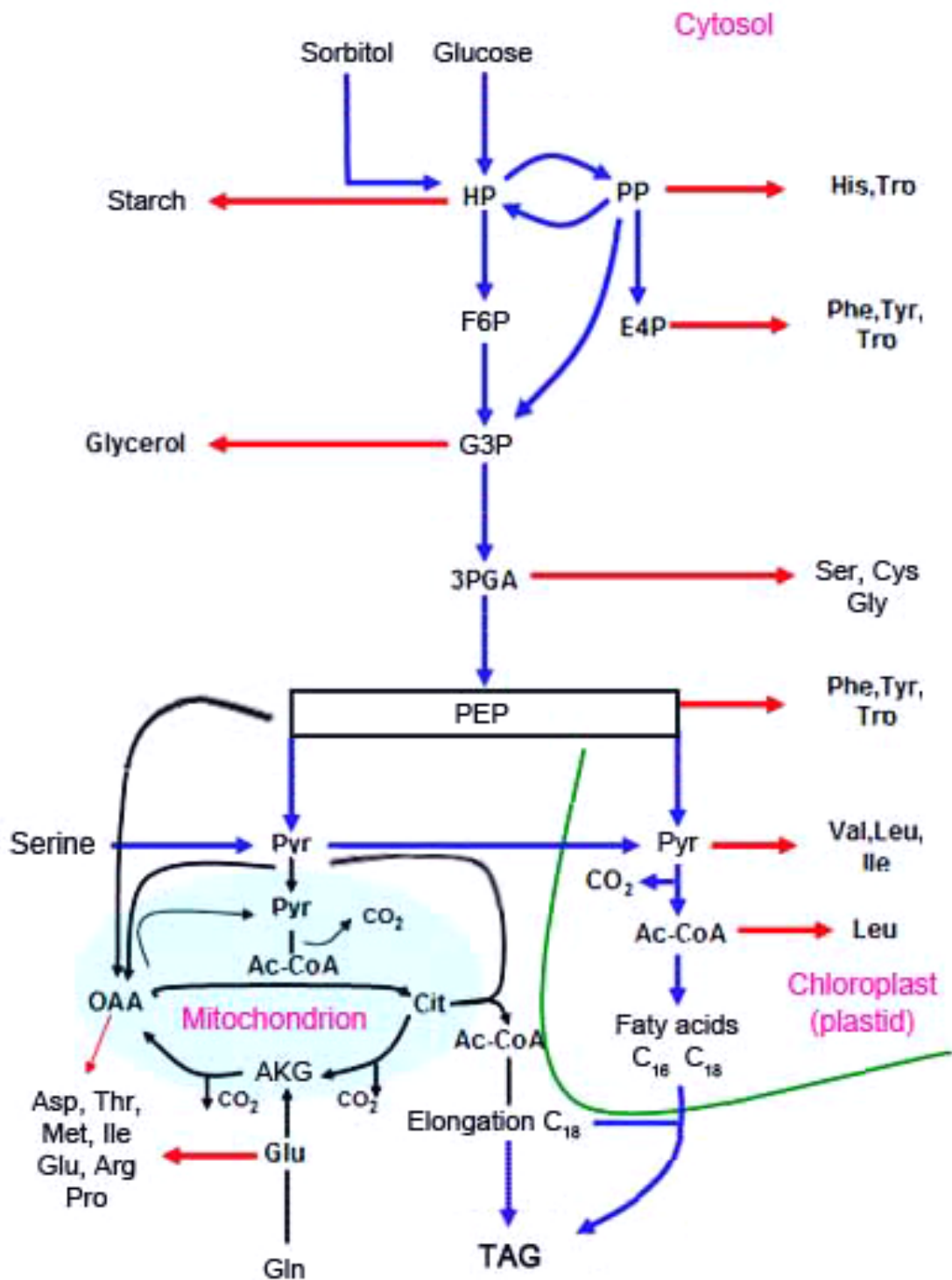
##	excludedMetabolites
#	GLC_ex
#	SER_ex
#	SOR_ex
#	CO2_ex
#	O2_ex
#	GLN_ex
#	GLYCEROL
#	ST
#	HIS
#	ARO
#	ILE
#	LEU
#	LYS
#	MET
#	PHE
#	TRP
#	VAL
#	ALA
#	ARG
#	ASN
#	GLY
#	PRO
#	TYR
#	ACET
#	NADPH
#	NADH
#	BIOMASS

##	simulatedMDVs
#	MET#11111
#	ILE#11111
#	LEU#11111
#	GLU#11111
#	ARG#11111
#	PRO#11111

##	inputSubstrates
#	GLC_ex
#	GLN_ex
#	SER_ex
#	SOR_ex

##	measurements (normalized peak intensity)		m / z
#	0.7616	Methionine	m
#	0.1438		m+1
#	0.0448		m+2
#	0.0356		m+3
#	0.0123		m+4
#	0.0020		m+5
#	0.7556	Isoleucine	m
#	0.0582		m+1
#	0.1327		m+2
#	0.0273		m+3
#	0.0226		m+4
#	0.0023		m+5
#	0.0013		m+6
#	0.8021	Leucine	m
#	0.0436		m+1
#	0.1156		m+2
#	0.0193		m+3
#	0.0180		m+4
#	0.0008		m+5
#	0.0007		m+6
#	0.7789	Glutamate	m
#	0.1085		m+1
#	0.0967		m+2
#	0.0160		m+3
#	0.0000		m+4
#	0.0000		m+5
#	0.8352	Arginine	m
#	0.0942		m+1
#	0.0434		m+2
#	0.0182		m+3
#	0.0049		m+4
#	0.0030		m+5
#	0.0010		m+6
#	0.8273	Proline	m
#	0.0706		m+1
#	0.0717		m+2
#	0.0224		m+3
#	0.0064		m+4
#	0.0016		m+5

##	error		m / z
#	0.0076	Methionine	m
#	0.0014		m+1
#	0.0004		m+2
#	0.0004		m+3
#	0.0001		m+4
#	0.0000		m+5
#	0.0076	Isoleucine	m
#	0.0006		m+1
#	0.0013		m+2
#	0.0003		m+3
#	0.0002		m+4
#	0.0000		m+5
#	0.0000		m+6
#	0.0080	Leucine	m
#	0.0004		m+1
#	0.0012		m+2
#	0.0002		m+3
#	0.0002		m+4
#	0.0000		m+5
#	0.0000		m+6
#	0.0078	Glutamate	m
#	0.0011		m+1
#	0.0010		m+2
#	0.0002		m+3
#	0.0000		m+4
#	0.0000		m+5
#	0.0084	Arginine	m
#	0.0009		m+1
#	0.0004		m+2
#	0.0002		m+3
#	0.0000		m+4
#	0.0000		m+5
#	0.0000		m+6
#	0.0083	Proline	m
#	0.0007		m+1
#	0.0007		m+2
#	0.0002		m+3
#	0.0001		m+4
#	0.0000		m+5



Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση του μεταβολικού δικτύου της ελαιοκράμβης.

### 6.3 Συμπεράσματα

Η μεταβολική μηχανική ασχολείται με την μελέτη της κυτταρικής λειτουργίας και της ρύθμισης οργανισμών σε μεταβολικό επίπεδο. Η μελέτη αυτή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις διαθέσιμες γονιδιωματικές πληροφορίες οι οποίες επηρεάζουν άμεσα τη μεταβολική έκφραση των εξεταζόμενων οργανισμών. Οι οργανισμοί, όμως, για τους οποίους υπάρχει πλήρης αλληλούχιση του γονιδιώματος είναι λίγοι σε αριθμό, ένας από τους οποίους είναι το φυτό *Arabidopsis thaliana*, το οποίο χρησιμοποιείται διεθνώς για τη μελέτη όλου του φυτικού βασιλείου. Ως εκ τούτου, η έλλειψη πληροφοριών μπορεί να περιορίσει σημαντικά την εξέταση οργανισμών για τους οποίους δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία γίνεται προσπάθεια μελέτης της μεταβολικής λειτουργίας του φυτού *Brassica napus* (ελαιοκράμβη), το οποίο ανήκει στην ίδια οικογένεια με το *Arabidopsis thaliana*. Η ελαιοκράμβη παρουσιάζει μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον τόσο σε διατροφικό όσο και σε ενεργειακό επίπεδο, επομένως κρίνεται σημαντική η διαλεύκανση των μηχανισμών λειτουργίας και ρύθμισης, μέσω της ανάπτυξης ενός μεταβολικού μοντέλου. Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης το μοντέλο περιέγραφε τον κεντρικό μεταβολισμό αναπτυσσομένων εμβρύων. Στη συνέχεια συμπεριλήφθηκε η βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και, τέλος, προστέθηκαν οι αντιδράσεις παραγωγής αμινοξέων.

Τέλος, θα πρέπει να ελεγχθεί η λειτουργικότητα του μοντέλου, καθώς παρατηρήθηκαν μεγάλοι υπολογιστικοί χρόνοι (κατά την εκτίμηση παραμέτρων μέσω του OpenFLUX), ενώ κάποιες από τις υπολογιζόμενες ροές εμφανίστηκαν να έχουν ασυνήθιστα χαμηλές ή ακόμα και μηδενικές τιμές, οι οποίες δεν ερμήνευαν ικανοποιητικά τα πειραματικά δεδομένα. Επιπλέον, πρέπει να εξεταστούν με προσοχή κάποιες αντιδράσεις ανταλλαγής ατόμων άνθρακα, ιδίως σε ευαίσθητα τμήματα του μοντέλου, καθώς η ελλιπής απόδοση των βιοχημικών μετασχηματισμών μπορεί να οδηγήσει σε επισφαλείς εκτιμήσεις παραμέτρων.

## Βιβλιογραφία

1. Gregory N. Stephanopoulos; Aristos A. Aristidou; Jens Nielsen, *Metabolic Engineering (Principles and methodologies)*, Academic Press, 1998, ch, 1, 2
2. Bernhard Ø. Palsson, *Systems Biology (Properties of Reconstructed Networks)*, Cambridge University Press, April 2006, ch. 1, 2, 3,
3. Nestor V. Torres; Eberhard O. Voit, *Pathway analysis and optimization in metabolic engineering*, Cambridge University Press, 2002.
4. The royal academy of engineering; The Academy of Medical Sciences, *Systems Biology: a vision for engineering and medicine*, February 2007.  
[http://www.raeng.org.uk/news/publications/list/reports/Systems\\_Biology\\_Report.pdf](http://www.raeng.org.uk/news/publications/list/reports/Systems_Biology_Report.pdf)
5. The royal academy of engineering, *Synthetic Biology: scope, applications and implications*, May 2009.  
[http://www.raeng.org.uk/news/publications/list/reports/Synthetic\\_biology.pdf](http://www.raeng.org.uk/news/publications/list/reports/Synthetic_biology.pdf)
6. Michael L. Shuler; Fikret Kargi, *Μηχανική Βιοδιεργασιών – Βασικές έννοιες*, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Ε.Μ.Π., Αθήνα 2005, κεφ. 5.
7. Jeremy M. Berg; John L. Tymoczko; Lumbert Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman and company, 5<sup>th</sup> Edition, ch. 16, 17.
8. Alberts; Bray; Hopkin; Johnson; Lewis; Raff; Roberts; Walter (Επιμέλεια: Ανάγνου· Παλαζαφείρη· Παλαμαθθαϊάκης· Σταματόπουλος), *Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας*, Ιατρικές εκδόσεις π.χ. Πασχαλίδης, έκδοση 2<sup>η</sup>, τόμος II, κεφ. 14.
9. [metacyc.org](http://www.metacyc.org).
10. Lake-Ee Quek; Christoph Wittmann; Lars K Nielsen and Jens O Krömer, *OpenFLUX: efficient modelling software for <sup>13</sup>C-based metabolic flux analysis*, *Microbial Cell Factories* 2009, 8:25, (<http://www.microbialcellfactories.com/content/8/1/25>).
11. Paula Jouhten, *Metabolic modelling and 13C flux analysis. Application to biotechnologically important yeasts and a fungus*, VTT Publications, November 2009.
12. Wolfgang Wiechert, *Minireview - <sup>13</sup>C Metabolic Flux Analysis*, *Metabolic engineering* 3, 2001, p. 195-206.
13. Jamey D. Young; Jason L. Walter; Maciek R. Antoniewicz; Hyuntae Yoo; Gregory Stephanopoulos, *An Elementary Metabolite Unit (EMU) Based Method of Isotopically Nonstationary Flux Analysis*, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 99, No. 3, February 15, 2008.
14. Reginald H. Garrett; Charles M. Grisham, *Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> Edition, 1999, ch. 18.
15. Wolfgang Wiechert; Michael Möllney; Sören Petersen; Albert A. de Graaf, *A Universal Framework for 13C Metabolic Flux Analysis*, *Metabolic Engineering* 3, 2001, p. 265-283.
16. Maciek R. Antoniewicz; Joanne K. Kelleher; Gregory Stephanopoulos, *Elementary metabolite units (EMU): A novel framework for modeling isotopic distributions*, *Metabolic Engineering* 9, 2007, p. 68-86.

17. *Lake-Ee-Quek, Manual for OpenFLUX Version 2.1.*
18. J. Schwender; Y. Shachar-Hill; J. B. Ohlrogge, *Mitochondrial Metabolism in Developing Embryos of Brassica Napus, The Journal of Biological Chemistry, vol. 281, no. 45, November 10, 2006.*
19. J. Schwender; J. B. Ohlrogge; Y. Shachar-Hill, *A Flux Model of Glycolysis and the Oxidative Pentosephosphate Pathway in Developing Brassica napus Embryos, The Journal of Biological Chemistry, vol. 278, no. 32, August 8, 2003.*
20. Ι. Γ. Γεωργιάτσου, *Βιοχημεία, τόμος Β' - Ενδιάμεση ανταλλαγή της ύλης - Μοριακή πληροφορική, εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη Ο.Ε., 6<sup>η</sup> έκδοση, σελ. 264-269.*
21. *Frank Gustone, Fatty acid and lipid chemistry, Blackie academic and professional, 1996, p. 1-28.*