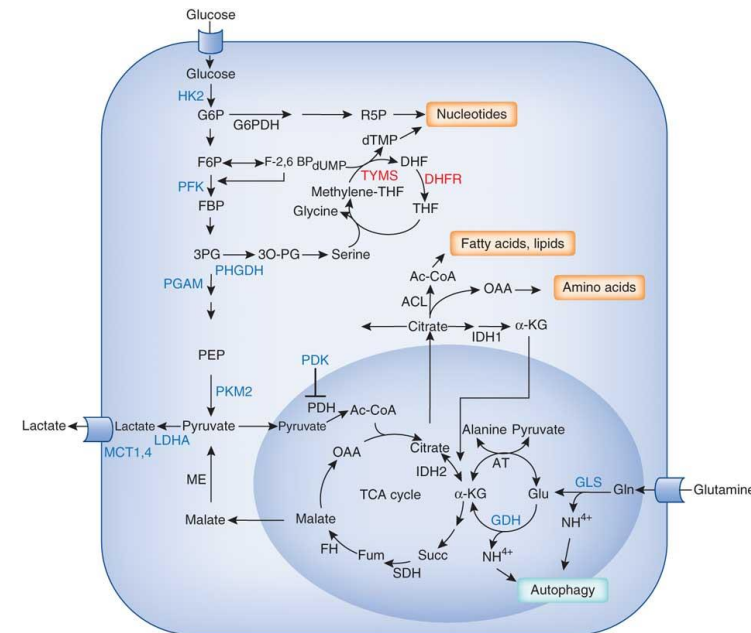




Ανάλυση μεταβολικών ροών και εφαρμογές

Καθηγητής
Δημοσθένης Σαρηγιάννης

Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μηχανικής



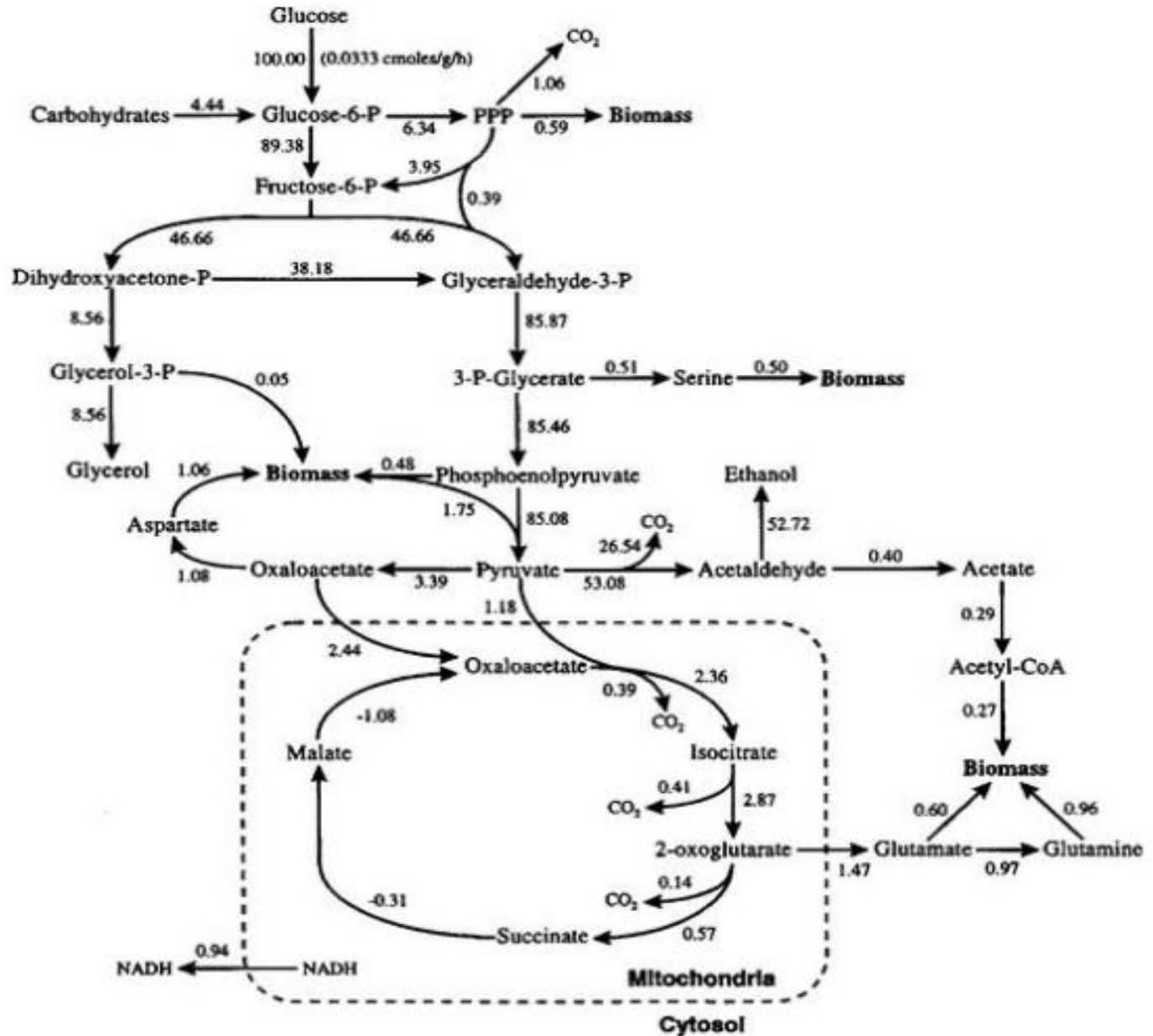


Εισαγωγή

- Οι μεταβολικές ροές καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τη φυσιολογία του κυττάρου καθώς αποτελούν μέτρο της εμπλοκής των διαφόρων μεταβολικών οδών στη συνολική κυτταρική λειτουργία και στις μεταβολικές διεργασίες. Η καλύτερη κατανόηση του ελέγχου της ροής αποτελεί το θεμέλιο λίθο για τον ορθολογικό σχεδιασμό μιας μεταβολικής οδού.
- Ο ακριβής προσδιορισμός του μεγέθους των μεταβολικών ροών *in vivo* αποτελεί θεμελιώδη στόχο της κυτταρικής φυσιολογίας και της μεταβολικής μηχανικής, ιδιαίτερα όσο αφορά την παραγωγή μεταβολιτών κατά την οποία ο στόχος επικεντρώνεται στο να μετατραπεί όσο το δυνατόν περισσότερο υπόστρωμα σε προϊόν.
- Η μεθοδολογία για τον προσδιορισμό των μεταβολικών ροών *in vivo* είναι γνωστή ως *Ανάλυση των Μεταβολικών Ροών* και αποτελεί κεντρικής σημασίας στόχο της μεταβολικής μηχανικής. Σύμφωνα με τη μεθοδολογία αυτή, ο προσδιορισμός των ενδοκυττάριων ροών βασίζεται στην εφαρμογή *στοιχειομετρικών μοντέλων* για τις κυριότερες ενδοκυτταρικές αντιδράσεις και στην εφαρμογή *ισοζυγίων μάζας* στους ενδοκυττάριους μεταβολίτες.



- Παράλληλα, οι εξωκυτταρικές ροές, οι οποίες μπορούν να μετρηθούν, όπως η ταχύτητα λήψης του υποστρώματος ή η ταχύτητα εξόδου ενός μεταβολίτη από το κύτταρο, ενσωματώνονται στους υπολογισμούς των εσωκυτταρικών ροών. Το τελικό αποτέλεσμα των παραπάνω υπολογισμών είναι ο **χάρτης των μεταβολικών ροών** ο οποίος αναπαριστά τις βιοχημικές αντιδράσεις που συμπεριλαμβάνονται στους υπολογισμούς και **δίνει μια εκτίμηση της ταχύτητας (δηλαδή της ροής) στη σταθερή κατάσταση** με την οποία κάθε αντίδραση απαντάται.
- Στο παρακάτω διάγραμμα εμφανίζεται η κατανομή των ροών στις καταβολικές οδούς του *Saccharomyces cerevisiae* κατά την αναερόβια ανάπτυξη του. Όλες οι ροές υπολογίστηκαν από τα ισοζύγια μάζας γύρω από τους ενδοκυτταρικούς μεταβολίτες και από μετρήσεις των ροών των συστατικών που ανταλλάσσονται μεταξύ κυτάρου και περιβάλλοντος.
- Ο χάρτης των μεταβολικών ροών του σχήματος εμπεριέχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη συνεισφορά των εκάστοτε μεταβολικών οδών στις συνολικές μεταβολικές διεργασίες που σχετίζονται με την κατανάλωση του υποστρώματος και το σχηματισμό του προϊόντος. Η πραγματική όμως αξία των μεταβολικών αυτών χαρτών έγκειται στις διαφορές των μεταβολικών ροών που παρατηρούνται σε διαφορετικά στελέχη ή κάτω από διαφορετικές συνθήκες και οι οποίες αποτυπώνονται σε αντίστοιχους χάρτες μεταβολικών ροών, οπότε αξιολογούνται συγκριτικά





- Πέρα όμως από την ποσοτικοποίηση των ροών στα μεταβολικά μονοπάτια, η ανάλυση μεταβολικών ροών παρέχει μια σειρά σημαντικών πληροφοριών οι σημαντικότερες εκ των οποίων περιγράφονται στη συνέχεια.
- Α) Προσδιορισμός των σημείων διακλάδωσης των μεταβολικών οδών: Η ευκαμψία ή η ακαμψία των σημείων διακλάδωσης (κόμβων) μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της σύγκρισης της κατανομής των ροών στα σημεία διακλάδωσης μετά από μεταβολές των συνθηκών λειτουργίας ή με τη χρήση μεταλλαγμένων στελεχών. Σε γενικές γραμμές, οι άκαμπτοι κόμβοι, σε αντίθεση με τους εύκαμπτους, δεν παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές στην κατανομή των ροών γύρω τους. Η γνώση αυτή είναι σημαντική για τον σχεδιασμό των αλλαγών που θα πρέπει να επιφέρουμε για να αυξήσουμε την απόδοση σε κάποιο προϊόν.
- Β) Προσδιορισμός εναλλακτικών μεταβολικών οδών: ο έλεγχος της μεταβολικής ροής και ιδιαίτερα ο σχηματισμός των στοιχειομετρικών αντιδράσεων προϋποθέτει τη λεπτομερή γνώση των ενεργών βιοχημικών δρόμων μέσω των οποίων το υπόστρωμα μετατρέπεται σε προϊόν. Η γνώση αυτή δεν είναι αυτονόητη καθώς σε πολλούς μικροοργανισμούς έχουν εντοπιστεί εναλλακτικά μεταβολικά μονοπάτια τα οποία λειτουργούν σε διαφορετικές συνθήκες. Η ανάλυση της μεταβολικής ροής αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στον εντοπισμό μεταβολικών μονοπατιών τα οποία μπορούν να αναπαράγουν τις μακροσκοπικές μετρήσεις της ροής των εξωκυτταρικών μεταβολιτών ή αντίθετα μέσω της ανάλυσης της μεταβολικής ροής μπορεί να αποκλεισθούν μεταβολικά μονοπάτια με βάση τα οποία δεν ικανοποιούνται τα ισοζύγια μάζας.



- Γ) Υπολογισμός των μη μετρήσιμων εξωκυτταρικών ροών. Συχνά, ο αριθμός των εξωκυτταρικών ροών οι οποίες μπορούν να μετρηθούν είναι μικρότερος από τον απαιτούμενο αριθμό για τον υπολογισμό των άγνωστων ενδοκυτταρικών ροών. Στην περίπτωση αυτή, γνωρίζοντας από προηγούμενα πειράματα τους λόγους κατανομής των ροών, είναι δυνατόν να υπολογισθούν οι εξωκυτταρικές ροές.
- Δ) Υπολογισμός της θεωρητικά μέγιστης απόδοσης. Ο υπολογισμός της θεωρητικά μέγιστης απόδοσης βασίζεται στη στοιχειομετρία του μεταβολικού δικτύου η οποία σχηματίζεται με τέτοιο τρόπο ώστε να παράγει τη μέγιστη δυνατή ποσότητα προϊόντος από ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα. Ο προσδιορισμός των θεωρητικών αποδόσεων αποτελεί ένα εργαλείο ελέγχου για μια διεργασία σε πραγματικές συνθήκες και βέβαια μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για τον εντοπισμό εναλλακτικών μεταβολικών δρόμων



ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΡΟΩΝ- Η ΨΕΥΔΟ-ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ

- Η αρχή της ανάλυσης των μεταβολικών ροών είναι το δίκτυο των στοιχειομετρικών αντιδράσεων οι οποίες περιγράφουν πως τα υποστρώματα μετατρέπονται σε μεταβολικά προϊόντα και συστατικά της βιομάζας. Εφαρμόζοντας τις αρχές που περιγράψαμε νωρίτερα θεωρούμε 3 ενδοκυτταρικές αντιδράσεις K μεταβολιτών για τις οποίες το ισοζύγιο μάζας δίνεται από την

$$\frac{dX_{met}}{dt} = r_{met} - \mu X_{met}$$

- Με τον όρο X_{met} συμβολίζεται το άνωσμα των συγκεντρώσεων των ενδοκυτταρικών μεταβολιτών και με τον όρο r_{met} συμβολίζεται το άνωσμα των καθαρών ρυθμών σχηματισμού των μεταβολιτών στις J αντιδράσεις, μ είναι ο ρυθμός διάχυσης των δεξαμενών των μεταβολιτών και μX_{met} ο ρυθμός κατανάλωσης των μεταβολιτών για την παραγωγή κυτταρικής μάζας.
- Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι ανακατατάξεις στα επίπεδα συγκέντρωσης των μεταβολιτών γίνονται πολύ γρήγορα, με αποτέλεσμα η αποκατάσταση των νέων τιμών της συγκέντρωσης των διαφόρων μεταβολιτών, να γίνεται γρήγορα ακόμη και μετά από μεγάλες μεταβολές στο κυτταρικό περιβάλλον. Κατά συνέπεια μπορεί να θεωρηθεί ότι οι μεταβολίτες σε ένα μεταβολικό δρόμο βρίσκονται σε μια **ψευδο-δυναμική ισορροπία**. Θεωρώντας λοιπόν ότι δεν παρατηρείται συσσώρευση των μεταβολιτών μπορεί να γραφεί ότι:

$$0 = r_{met} - \mu X_{met}$$



- Καθώς ο ρυθμός κατανάλωσης μεταβολιτών για την παραγωγή βιομάζας είναι σημαντικά μικρότερος από τους ρυθμούς σχηματισμού ή κατανάλωσης ενός μεταβολίτη, μπορούμε να αγνοήσουμε και αυτόν τον όρο χωρίς ιδιαίτερο σφάλμα. Με βάση τα παραπάνω η παραπάνω εξίσωση λαμβάνει τη μορφή

$$0 = \mathbf{r}_{met} = \mathbf{G}^T \mathbf{v}$$

- όπου \mathbf{G}^T ο στοιχειομετρικός πίνακας και \mathbf{v} το άνυσμα στήλης των ταχυτήτων των J αντιδράσεων (J αριθμός των ροών-δηλαδή η διάσταση του ανύσματος \mathbf{v}). Η εξίσωση αποτελεί σύστημα K εξισώσεων ισοζυγίων μάζας (για τους K μεταβολίτες στη σταθερή κατάσταση) με J μεταβλητές (J αντιδράσεις). Ο πίνακας λοιπόν \mathbf{G}^T έχει ως στήλες τους στοιχειομετρικούς συντελεστές του συνόλου των ροών (τόσο αυτών που προσδιορίζονται πειραματικά όσο και αυτών που υπολογίζονται μαθηματικά) που συνθέτουν το υπό εξέταση μεταβολικό δίκτυο και ως γραμμές τις εξισώσεις των ισοζυγίων μάζας.



- Στα εξεταζόμενα στην πράξη συστήματα ισχύει πάντα $J \geq K$, οπότε η διαφορά των δύο μεγεθών ορίζεται ως βαθμός ελευθερίας του συστήματος F ($F=J-K$).
Ανάλογα με τον αριθμό των μετρούμενων ροών M στο άνυσμα v , διακρίνονται οι ακόλουθες περιπτώσεις για το σύστημα:
 - $F=M$ Το σύστημα είναι ορισμένο και έχει μοναδική λύση
 - $F \geq M$ Το σύστημα είναι αόριστο και για να βρεθεί λύση πρέπει να τεθούν νέοι περιορισμοί ή κάποιο κριτήριο βελτιστοποίησης
 - $F \leq M$ Το σύστημα είναι υπερορισμένο και οι επιπλέον μετρήσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιβεβαίωση της ψευδομόνιμης κατάστασης και τον έλεγχο των μετρήσεων και βέβαια για την εξαγωγή ακριβέστερων τιμών για τις υπολογιζόμενες ροές.
- Συνέπεια της παραδοχής περί ψευδο-δυναμικής ισορροπίας είναι το γεγονός, ότι μόνο οι μεταβολίτες που εντοπίζονται στα σημεία διακλάδωσης του μεταβολικού δικτύου αντιδράσεων λαμβάνονται υπόψη. Έτσι οι ενδιάμεσοι μεταβολίτες που εμφανίζονται σε μια γραμμική αλληλουχία αντιδράσεων δεν θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη.



- Ας υποθέσουμε ότι ο μεταβολίτης A μετατρέπεται σε προϊόν P σε δύο αντιδράσεις των οποίων η στοιχειομετρία δίνεται από τις παρακάτω σχέσεις:
 - $-A+B=0$
 - $-B+P=0$
- οι δύο αυτές αντιδράσεις είναι οι μόνες αντιδράσεις στις οποίες ο μεταβολίτης B εμφανίζεται οπότε σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας (σταθερή κατάσταση) το ισοζύγιο μάζας για τον μεταβολίτη B δίνει ότι:

$$V_1 - V_2 = 0$$

- όπου V_1 και V_2 οι ενδοκυτταρικές ταχύτητες των δύο αντιδράσεων αντίστοιχα. Η ταχύτητα της πρώτης αντίδρασης είναι λοιπόν ίση με την ταχύτητα της δεύτερης αντίδρασης και μπορεί να θεωρηθεί ότι η μετατροπή του A σε P γίνεται σε μια αντίδραση η οποία εξελίσσεται με ταχύτητα V_1 . Η ίδια προσέγγιση μπορεί να γίνει κάθε φορά που υπάρχει μια γραμμική αλληλουχία αντιδράσεων. Έτσι, μόνο οι μεταβολίτες γύρω από τα σημεία διακλάδωσης είναι ανάγκη να λαμβάνονται υπόψη κατά την κατασκευή ενός στοιχειομετρικού μοντέλου (κατά την ανάλυση των μεταβολικών ροών), γεγονός που μειώνει δραστικά την πολυπλοκότητα του μοντέλου αυτού.



$$0 = \mathbf{r}_{met} = \mathbf{G}^T \mathbf{v}$$

- Η παραπάνω εξίσωση αποτελεί τη βάση της ανάλυσης της μεταβολικής ροής δηλαδή τον προσδιορισμό των άγνωστων μεταβολικών ροών στο ενδοκυτταρικό άνυσμα της ταχύτητας \mathbf{V} . Το άνυσμα αυτό αντιπροσωπεύει K γραμμικά αλγεβρικά ισοζύγια για τους K μεταβολίτες με J αγνώστους (τις μεταβολικές ροές). Η επίλυση της εξίσωσης επιτυγχάνεται μέσω της ενσωμάτωσης των ταχυτήτων που μπορούν να μετρηθούν σε ένα νέο υποάνυσμα \mathbf{v}_m καθώς και των ταχυτήτων που μένει να προσδιορισθούν σε ένα άλλο υπο-άνυσμα \mathbf{v}_c . Με ανάλογο τρόπο οι στοιχειομετρικοί συντελεστές στον πίνακα \mathbf{G} μπορούν να αναλυθούν αντίστοιχα σε δύο νέους πίνακες τους \mathbf{G}_m και \mathbf{G}_c . Με βάση τα παραπάνω η εξίσωση μπορεί να γραφτεί ως:

$$0 = \mathbf{G}^T \mathbf{v} = \mathbf{G}_m^T \mathbf{v}_m + \mathbf{G}_c^T \mathbf{v}_c$$

- Στην παραπάνω εξίσωση ο πίνακας \mathbf{G}_m^T είναι πίνακας $K \times F$ όπου F ο αριθμός των ροών που μπορούν να προσδιορισθούν. Είναι δηλαδή ένας πίνακας που έχει ως στήλες τους στοιχειομετρικούς συντελεστές των μετρούμενων πειραματικά ροών για τις K εξισώσεις διατήρησης της μάζας που προκύπτουν από το προς εξέταση μεταβολικό δίκτυο



- Στην περίπτωση του ορισμένου συστήματος, όπου ο πίνακας G_c^T (πίνακας διαστάσεων $K \times K$) είναι αντιστρέψιμος (όταν $F = J-K$ τότε ο G_c^T είναι αντιστρέψιμος), τότε τα στοιχεία του ανύσματος v_c μπορούν να προσδιοριστούν από την παρακάτω εξίσωση:

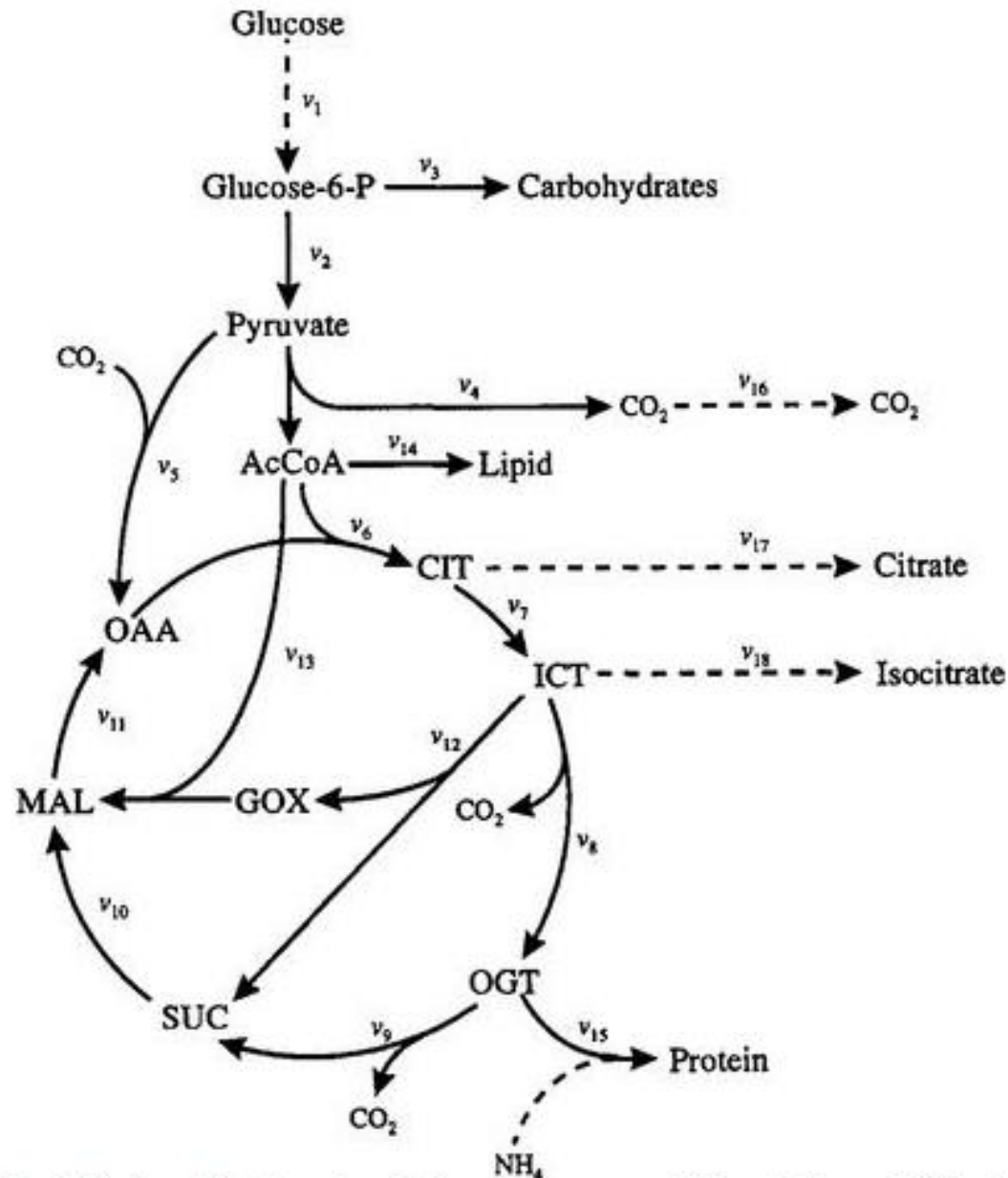
$$v_c = -G_m^T v_m (G_c^T)^{-1}$$

- Η παραπάνω εξίσωση αντιπροσωπεύει το αποτέλεσμα που λαμβάνεται όταν K γραμμικές αλγεβρικές εξισώσεις επιλυθούν με τη βοήθεια πινάκων



Ανάλυση της μεταβολική ροής κατά τη Ζύμωση Κιτρικού Οξέος από τον μικροοργανισμό *Candida lipolytica*

- Για την περαιτέρω επεξήγηση της έννοιας της ανάλυσης της μεταβολικής ροής, θα μελετηθεί παρακάτω η παραγωγής κιτρικού οξέος από το μικροοργανισμό *Candida lipolytica*. Στην ανάλυσή αυτή που έγινε από τους, Aiba και Matsuoka χρησιμοποιήθηκε το απλοποιημένο μεταβολικό δίκτυο που φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, η οποία περιλαμβάνει την οδό EMP, τον κύκλο Crebs, την πυροσταφυλική καρβοξυλίωση, και το σχηματισμό μακρομορίων, πρωτεϊνών, υδατανθράκων και λιπιδίων.
- Οι δύο αυτές διαδρομές προφανώς είναι αναγκαίες για την αναπλήρωση των ενδιάμεσων του κύκλου του Crebs όταν το κιτρικό και το ισοκιτρικό εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο.





- Παρατηρήστε την δομή του μοντέλου, ιδίως ορισμένα μεταβολικά προϊόντα όπως το κιτρικό και το ισοκιτρικό διακρίνονται ως ενδιάμεσα μονοπατιού. Η εισαγωγή των αντιδράσεων έκκρισης (που υποδεικνύεται από τις διακεκομμένες γραμμές), Επιτρέπει την εφαρμογή της ψευδο-σταθερής υποθετικής κατάστασης για όλα τα ενδιάμεσα μονοπάτια.
- Το διοξείδιο του άνθρακα συμμετέχει σε αρκετές αντιδράσεις και ως εκ τούτου περιλαμβάνεται ως μια ενδοκυτταρική ένωση η οποία εκκρίνεται με ρυθμό V16.
- Μια ισορροπία, επομένως, μπορεί να εισαχθεί γύρω από αυτήν την ένωση.
- Με τη δομή αυτή του μοντέλου, μερικές από τις ροές μπορούν να μετρηθούν άμεσα. Η στοιχειομετρία των μεμονωμένων αντιδράσεων είναι αρκετά απλή, επειδή, εκτός από την μετατροπή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό, όλοι οι στοιχειομετρικοί συντελεστές είναι 1 ή -1.
- Με την εφαρμογή της υπόθεσης της ψευδο σταθερής κατάστασης σε όλα τα σημεία διακλάδωσης του δικτύου δύναται εύκολα να τις εξισώσεις (1) - (11) για τις επιμέρους αντιδράσεις. Όλες οι τιμές δίδονται σε γραμμομόρια ανά γραμμάριο ξηρού βάρους ανά ώρα της ένωσης που σχηματίζεται στην αντίδραση.



$$\text{G6P: } v_1 - v_2/2 - v_3 = 0 \quad (1)$$

$$\text{Pyr: } v_2 - v_4 - v_5 = 0 \quad (2)$$

$$\text{AcCoA: } v_4 - v_6 - v_{13} - v_{14} = 0 \quad (3)$$

$$\text{CIT: } v_6 - v_7 - v_{17} = 0 \quad (4)$$

$$\text{ICT: } v_7 - v_8 - v_{12} - v_{18} = 0 \quad (5)$$

$$\text{OGT: } v_8 - v_9 - v_{15} = 0 \quad (6)$$

$$\text{SUC: } v_9 - v_{10} + v_{12} = 0 \quad (7)$$

$$\text{MAL: } v_{10} - v_{11} + v_{13} = 0 \quad (8)$$

$$\text{GOX: } v_{12} - v_{13} = 0 \quad (9)$$

$$\text{OOA: } v_5 + v_{11} - v_6 = 0 \quad (10)$$

$$\text{CO}_2: v_4 + v_8 + v_9 - v_{16} = 0 \quad (11)$$



- Στην ανάλυσή τους οι Aiba και Matsuoka μέτρησαν έξι ρυθμούς αντίδρασης στο δίκτυο: το ποσοστό πρόσληψης γλυκόζης ($r_{glc} = v_1$) ο ρυθμός παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα ($r_c = v_{16}$), ο ρυθμός παραγωγής κιτρικού οξέος ($r_{cit} = v_{17}$), ο ρυθμός παραγωγής ισοκιτρικού ($r_{ict} = v_{18}$), το ποσοστό της πρωτεϊνικής σύνθεσης ($r_{prot} = v_{15}$) και ο ρυθμός σύνθεσης υδατανθράκων ($r_{cat} = v_3$).
- Τα ποσοστά r_{prot} και r_{cat} της βιομάζας βρέθηκαν από μετρήσεις του περιεχομένου πρωτεϊνών και υδατανθράκων αντίστοιχα, (σε σταθερή κατάσταση).
- Εκτός από τις έξι μετρήσεις, οι Aiba και Matsuoka επέβαλε περιορισμούς θέτοντας μία από τις τιμές στο δίκτυο ίση με το μηδέν. Τρεις διαφορετικές περιπτώσεις βιοχημείας του κιτρικού οξέος εξετάστηκαν, αντανακλώνοντας τρία διαφορετικά μοντέλα :
 - Μοντέλο 1. η διακλάδωση της γλυοξυλίνης είναι ανενεργή – $v_{12} = 0$
 - Μοντέλο 2 Η πυροσταφυλική καρβοξυλάση είναι ανενεργή – $v_5 = 0$
 - Μοντέλο 3 Ο κύκλος TCA είναι ατελής – $v_9 = 0$



- Με χρήση των έξι προηγουμένως μετρημένων ρυθμών (r), το σύστημα των εξισώσεων καθορίζεται για καθένα από αυτά τα μοντέλα και μπορεί να λυθεί για τον προσδιορισμό των αγνώστων συντελεστών των αντιδράσεων. Αυτό μπορεί να γίνει με διαδοχική εξάλειψη των αγνώστων συντελεστών, π.χ.,

$$v_2 = 2(r_{glc} - r_{car})$$

- Παρόμοιες εξισώσεις μπορούν να προκύψουν για τους άλλους ρυθμούς. Μια πιο γενική προσέγγιση είναι η χρήση αλγεβρικών υπολογισμών. Το ακόλουθο υλικό επεξηγεί πώς οι άγνωστες ροές υπολογίζονται με χρήση στοιχειομετρικών πινάκων G :



$$\begin{pmatrix}
 1 & -0.5 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 1 & 0 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0
 \end{pmatrix} \mathbf{v} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$



- Όταν μετρώνται οι ταχύτητες $v_1, v_3, v_{15}, v_{16}, v_{17}$ (υποδεικνύεται με τις μεταβλητές r) και δεν υπάρχει παραγωγή Ισοκιτρικού οξέος ($v_{18} = 0$), για την περίπτωση του μοντέλου 1 το v_{12} θεωρείται 0 και οι στήλες 1, 3, 12, 15, 16, 17, και 18 συλλέγονται στον πίνακα G_m , ενώ οι υπόλοιπες στήλες συλλέγονται στον πίνακα G_c . Με χρήση της εξίσωσης $v_c = -(G_c^T)^{-1} G_m^T v_m$ κατασκευάζεται έναν από τους παρακάτω πίνακες

$$\begin{pmatrix} v_2 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ v_8 \\ v_9 \\ v_{10} \\ v_{11} \\ v_{13} \\ v_{14} \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} -0.5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}^{-1}$$

$$\times \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_{glc} \\ r_{car} \\ 0 \\ r_{prot} \\ r_c \\ r_{cit} \\ r_{ict} \end{pmatrix} \quad (14)$$

$$\begin{pmatrix} v_2 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ v_8 \\ v_9 \\ v_{10} \\ v_{11} \\ v_{13} \\ v_{14} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 2 & -2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2 & -2 & 1 & -1 & 0 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & -1 & 1 & 0 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & 0 & 1.5 & 0.5 & 2 & 2 \\ -1 & 1 & 0 & 1.5 & 0.5 & 1 & 2 \\ -1 & 1 & -1 & 1.5 & 0.5 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & -1 & 0.5 & 0.5 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & 0 & 0.5 & 0.5 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & 1 & 0.5 & 0.5 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 3 & -3 & 0 & -2.5 & -0.5 & -3 & -3 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_{glc} \\ r_{car} \\ 0 \\ r_{prot} \\ r_c \\ r_{cit} \\ r_{ict} \end{pmatrix}$$



- Παρατηρείται μεγάλη πολυπλοκότητα στη λύση αυτού του προβλήματος, καθότι οι ενδοκυτταρικές ροές είναι συναρτήσεις του συνόλου σχεδόν των μετρήσιμων ταχυτήτων.
- Σε τέτοιες περιπτώσεις, η λύση των αλγεβρικών εξισώσεων με απαλοιφή μπορεί να είναι αρκετά περίπλοκη, ενώ η εξίσωση λύνεται εύκολα με τη χρήση προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών, όπως Mathematica, Maple, ή Matlab.
- Οι Aiba και Matsuoka τελικά κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το μοντέλο 1 περιγράφει λογικές τιμές για τις διαφορετικές ροές. Επιπλέον, οι *in vitro* μετρήσεις της δραστηριότητας των τεσσάρων διαφορετικών ενζύμων (πυροσταφυλικής καρβοξυλάσης, κιτρικής συνθάσης, ισοκιτρικής αφυδρογονάσης, και ισοκιτρικής λυάσης) συσχετίζονται αρκετά καλά με τις υπολογιζόμενες ροές του μοντέλου 1.
- Όταν μελετήθηκαν τα δύο άλλα μοντέλα, διαπιστώθηκε ότι ορισμένες από τις ροές ήταν αρνητικές, π.χ., το μοντέλο 2 προβλέπει ότι το α-κετογλουταρικό οξύ μετατρέπεται σε ισοκιτρικό, κάτι το οποίο παρότι δεν είναι αδύνατο δεν ευνοείται θερμοδυναμικά



Επίλυση υπερορισμένου συστήματος

- Τα υπερορισμένα συστήματα ($\mathbf{M} \geq \mathbf{F}$) όπως αναφέρθηκε, χαρακτηρίζονται από το ότι ο αριθμός των μετρήσεων (μετρούμενων ροών) είναι μεγαλύτερος από τους βαθμούς ελευθερίας του συστήματος. Οι πλεονάζουσες μετρήσεις είναι χρήσιμες στην εξαγωγή βελτιωμένων εκτιμήσεων των μη μετρημένων ροών αλλά και των ήδη μετρημένων, καθώς και στην επιβεβαίωση της ισχύος της μόνιμης κατάστασης που τέθηκε ως περιορισμός.
- Σ' αυτήν την περίπτωση ο \mathbf{G}_c^T δεν είναι τετραγωνικός και επομένως δεν αντιστρέφεται. Γι' αυτόν τον λόγο χρησιμοποιείται ο ψευδοανάστροφος του $(\mathbf{G}_c^T)^{\#}$ και η λύση του συστήματος είναι η ακόλουθη:
 - $\mathbf{V}_c = -(\mathbf{G}_c^T)^{\#} \mathbf{G}_m^T \mathbf{V}_m$
 - όπου $(\mathbf{G}_c^T)^{\#}$ είναι ο ψευδοανάστροφος του \mathbf{G}_c^T και δίνεται από την σχέση
 - $(\mathbf{G}_c^T)^{\#} = (\mathbf{G}_c \mathbf{G}_c^T)^{-1} \mathbf{G}_c$
- Η εξίσωση αποτελεί την εκτίμηση ελαχίστων τετραγώνων για τις μη μετρημένες ροές. Απαραίτητη προϋπόθεση για την επίλυση του συστήματος, σύμφωνα με τα παραπάνω, είναι η αντιστρεψιμότητα του $\mathbf{G}_c \mathbf{G}_c^T$, το οποίο συμβαίνει όταν ο πίνακας \mathbf{G}_c^T είναι τάξης \mathbf{K} .



Προσδιορισμός Ροής σε υπερορισμένα Συστήματα

- Μελετώντας τον ετεροζυμωτικό μεταβολισμό των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος θα εξετάσουμε την περίπτωση όπου έχουν μετρηθεί τέσσερις ταχύτητες, προσφέροντας έτσι ένα υπερορισμένο σύστημα. Αν οι μετρήσεις του ρυθμού παραγωγής του πυροσταφυλικού ($=2 r_{glc}$) γαλακτικού (r_{lac}), του μυρμηκικό οξέος (r_{for}) και αιθανόλης (r_{et}) είναι διαθέσιμες τότε κατασκευάζεται ο πίνακας

$$\begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 0 & -2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_{pyr} \\ r_{lac} \\ r_{for} \\ r_{et} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} -1 & 0 \\ 1 & -1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_c \\ r_{ac} \end{pmatrix}$$

- όπου η πρώτη γραμμή είναι η ισορροπία για πυροσταφυλικού οξέος, η δεύτερη σειρά είναι η ισορροπία για την ακετυλο-CoA, και η τελευταία σειρά είναι η ισορροπία για το NADH. Οι μεταβλητές r έχουν εισαχθεί για να προσδιορίσουν του εξωκυτταρικούς ρυθμούς συσσώρευσης των αντίστοιχων μεταβολιτών. Υπολογίζουμε στη συνέχεια, τους μη μετρημένους ρυθμούς από τους τύπους

$$\mathbf{v}_c = -(\mathbf{G}_c^T)^\# \mathbf{G}_m^T \mathbf{v}_m \quad \begin{pmatrix} \mathbf{v}_m \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{I} & 0 \\ \mathbf{G}^T \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{v}_m \\ \mathbf{v}_c \end{pmatrix} = \mathbf{T} \mathbf{v}$$



$$\begin{aligned}
 (\mathbf{G}_c^T)^\# &= \left(\begin{pmatrix} -1 & -1 & 1 \\ 0 & -1 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -1 & 0 \\ 1 & -1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix} \right)^{-1} \begin{pmatrix} -1 & -1 & 1 \\ 0 & -1 & 0 \end{pmatrix} \\
 &= \begin{pmatrix} -0.5 & 0 & 0.5 \\ -0.5 & -1 & 0.5 \end{pmatrix}
 \end{aligned}$$

Και στη συνέχεια η λύση για τις μη μετρημένες ροές

$$\begin{aligned}
 \begin{pmatrix} r_c \\ r_{ac} \end{pmatrix} &= - \begin{pmatrix} -0.5 & 0 & 0.5 \\ -0.5 & -1 & 0.5 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 0 & -2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_{pyr} \\ r_{lac} \\ r_{for} \\ r_{et} \end{pmatrix} \\
 &= \begin{pmatrix} 0 & 0 & -0.5 & 1 \\ 0 & 0 & 0.5 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_{pyr} \\ r_{lac} \\ r_{for} \\ r_{et} \end{pmatrix}
 \end{aligned}$$



Επίλυση αόριστου συστήματος

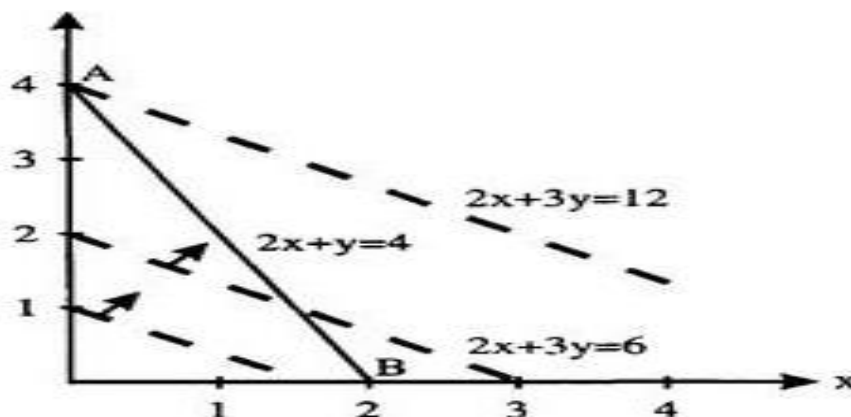
- Στην περίπτωση όπου ο αριθμός των μετρήσεων είναι μικρότερος από τους βαθμούς ελευθερίας του συστήματος, τότε οι λύσεις για τις ροές του δικτύου είναι άπειρες. Η επίλυση του προβλήματος αυτού προσεγγίζεται με γραμμικό προγραμματισμό, η δε λύση δύναται να βρεθεί από μια ομάδα δυνατών λύσεων, κάνοντας χρήση ειδικών αλγορίθμων.
- Θεωρούμε ένα σύστημα δύο μεταβλητών x και y που σχετίζονται με τον περιορισμό:

$$2x + y = 4$$

- το οποίο ορίζει ότι η λύση βρίσκεται στην ευθεία AB.
- ένας άλλος περιορισμό κοινός σε όλα τα προβλήματα γραμμικού προγραμματισμού είναι ότι όλες οι μεταβλητές (στην περίπτωση αυτή x και y), απαιτείται να είναι μη αρνητικοί αριθμοί.
- Αυτό παραβιάζει τον ορισμό των μεταβολικών ροών, οι οποίες μπορούν να είναι είτε θετικοί είτε αρνητικοί αριθμοί. Ως εκ τούτου, η εφαρμογή του γραμμικού προγραμματισμού για την επίλυση ισοζυγίων μεταβολικών ροών απαιτεί την επέκταση του μεταβολικού μοντέλου προς τα εμπρός και αντίστροφα για κάθε μία από τις αντιδράσεις J στο μοντέλο ή, τουλάχιστον, για εκείνες τις αντιδράσεις που μπορεί να είναι αντιστρεπτές.
- Με τους περιορισμούς $x > 0$ και $y > 0$, η λύση του προηγούμενου προβλήματος περιορίζεται σε εκείνα που βρίσκονται στο θετικό τεταρτημόριο του χώρου (x, y) . Αυτό εξακολουθεί να αντιπροσωπεύει άπειρες λύσεις, οι οποίες μειώνονται περαιτέρω σε μια εφαρμόζοντας την προϋπόθεση ότι η λύση μεγιστοποιεί ή ελαχιστοποιεί κάποιο κόστος ή λειτουργία.



- Για παράδειγμα, αν είναι επιθυμητή η μεγιστοποίηση της συνάρτησης $2x + 3y$ στο προηγούμενο παράδειγμα, τότε το πρόβλημα είναι να βρεθεί μια λύση η οποία βρίσκεται επί της γραμμής AB και ταυτόχρονα μεγιστοποιεί αυτή τη λειτουργία.
- Μια ομάδα γραμμών κόστους φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Η γραμμή που παράγει την μεγαλύτερη τιμή για την αντικειμενική συνάρτηση και συγχρόνως ικανοποιεί τον περιορισμό είναι $2x + 3y = 12$.



- Διασταυρώνεται με τη γραμμή AB στο $x = 0$ και $y = 4$. Σε αυτό το παράδειγμα υπάρχει εφικτή λύση. Εντούτοις δύναται να υπάρξει κατάσταση όπου δεν υπάρχει εφικτή λύση ή υπάρχουν άπειρες λύσεις.



- Στο μεταβολικό μοντέλο, οι περιορισμοί προκύπτουν από την εξίσωση.

$$\mathbf{0} = \mathbf{G}^T \mathbf{v} = \mathbf{G}_m^T \mathbf{v}_m + \mathbf{G}_c^T \mathbf{v}_c$$

- Επειδή όλες οι μεταβλητές (δηλαδή οι ροές) πρέπει να είναι θετικές σε ένα μοντέλο γραμμικού προγραμματισμού, πρέπει να ξαναγραφτεί το μοντέλο έτσι ώστε η στοιχειομετρία να περιλαμβάνει αμφίδρομες αντιδράσεις (σε εκείνες τις περιπτώσεις που υπάρχουν όμως αντιστρεπτές αντιδράσεις). Έτσι, οι περιορισμοί συνοψίζονται από τον τύπο:

$$\mathbf{G}_{ex}^T \mathbf{v}_{ex} = \mathbf{0} \quad \text{and} \quad \mathbf{v}_{ex} \geq \mathbf{0}$$

- όπου το \mathbf{G}_{ex}^T είναι ο στοιχειομετρικός πίνακας ο οποίος πλέον συμπεριλαμβάνει την στοιχειομετρία των αντιστρεπτών αντιδράσεων και το \mathbf{V}_{ex} είναι τα αναθεωρημένα διανύσματα ροής
- Στο προηγούμενο απλό παράδειγμα ο περιορισμός καθορίζεται από μια γραμμή στο 2-διάστατο χώρο. Με τις J_{EX} μεταβλητές (ή ροές), κάθε περιορισμός ορίζει μια περιοχή στο J_{EX} τρισδιάστατο χώρο.



- Επειδή πρέπει να πληρούνται όλοι οι περιορισμοί, η λύση πρέπει να βρίσκεται στη διασταύρωση των υπερεπιπέδων K στον J_{EX} τρισδιάστατο χώρο. Αν ένα από τα υπερεπίπεδα δεν τέμνεται με τα άλλα, δεν υπάρχει εφικτή λύση για τις ροές.
- Η κατάσταση αυτή, ωστόσο, σπάνια συναντάται στην πράξη. Το επόμενο βήμα είναι να προσδιοριστεί μια αντικειμενική συνάρτηση που είναι μία γραμμική συνάρτηση των ροών, δηλαδή, μία λειτουργία των στοιχείων του διανύσματος V_{EX} . Η βέλτιστη λύση τότε βρίσκεται στην επίλυση του αντίστοιχου προβλήματος μεγιστοποίησης ή ελαχιστοποίησης

Minimize / maximize αV_{ex}

- Όπου α είναι ένας φορέας που περιέχει σειρά μεταβλητών προσδιορίζοντας την επίδραση των επιμέρους ροών στην αντικειμενική συνάρτηση.



- Η εύρεση της βέλτιστης λύσης για το πρόβλημα μπορεί να είναι περίπλοκη λόγω του δυνητικά μεγάλου αριθμού των εφικτών λύσεων που ικανοποιούν όλους τους περιορισμούς.
- Ωστόσο, όπως και με το προηγούμενο απλό παράδειγμα, η βέλτιστη λύση βρίσκεται στο άκρο (ή γωνία) του συνόλου των εφικτών λύσεων, (αποτέλεσμα της γραμμικότητας τόσο των περιορισμών όσο και των αντικειμενικών λειτουργιών).
- Έτσι, δύναται να βρεθεί η λύση, αρχικά απαριθμώντας όλες τις λύση και, δεύτερον, την αξιολόγηση της αντικειμενικής συνάρτησης σε κάθε σημείο του χώρου των εφικτών λύσεων.
- Αυτή η προσέγγιση είναι πρακτικά ανέφικτη λόγω του πολύ μεγάλου αριθμού πιθανών λύσεων. Αντ' αυτού, έχει αναπτυχθεί η μέθοδος Simplex, η οποία είναι η μέθοδος επιλογής για την επίλυση προβλημάτων γραμμικού προγραμματισμού.
- Τα βήματα εφαρμογής της μεθόδου είναι:
 - αρχικά, εντοπίζεται μια γωνία στην περιοχή όπου η λύση είναι δυνατή
 - στη συνέχεια μελετάται κατά μήκος η περιοχή των εφικτών λύσεων. Σε μια δεδομένη γωνία εμφανίζονται πολλές άκρες για να επιλέξετε, μερικές οδηγούν μακριά από τη βέλτιστη λύση και άλλες οδηγούν σταδιακά προς την κατεύθυνση αυτή.
 - Σταδιακά βρίσκεται η γωνία από την οποία οι άκρες οδηγούν σε υψηλότερες τιμές. Αυτή η γωνία αντιπροσωπεύει τη βέλτιστη λύση.
 - Παρά την απλή περιγραφή της, η μέθοδος simplex απαιτεί, ισχυρή υπολογιστική ισχύ

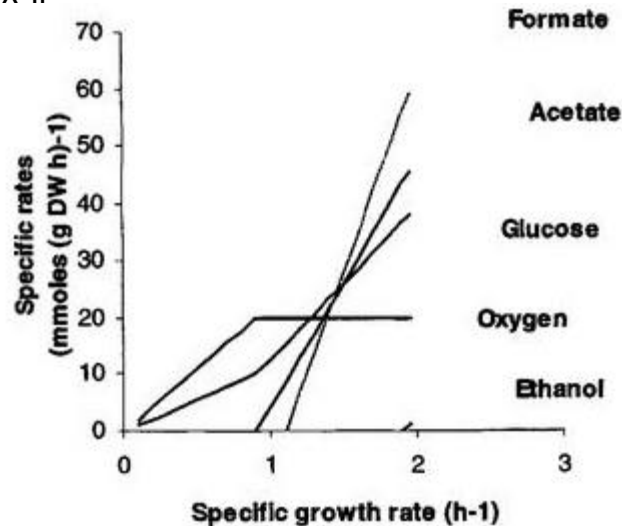


Στοιχειομετρική μελέτη του μεταβολισμού του *Escherichia coli*

- Σε αυτό το παράδειγμα, θα εξεταστεί ο μεταβολισμός του *E. coli* όπως περιγράφεται από τους Varma et al. (1993). Με βάση λεπτομερή στοιχειομετρικά μοντέλα για το μεταβολισμό *E. coli*, οι μελετητές αυτοί ανέλυσαν τον καταβολισμό της γλυκόζης και των βιοχημικών δυνατοτήτων του εν λόγω οργανισμού.
- Το μοντέλο τους αποτελείται από 107 μεταβολίτες (συμπεριλαμβανομένων των υποστρωμάτων και των προϊόντων του μεταβολισμού) και 95 αναστρέψιμες αντιδράσεις προσφέροντας έτσι έναν πίνακα με διαστάσεις 107 x 190, δηλαδή, υπάρχουν 83 βαθμοί ελευθερίας.
- Τα μόνα πειραματικά δεδομένα που χρησιμοποιούνται για τους υπολογισμούς ροής ήταν τα ακόλουθα:
 - Μεταβολικές απαιτήσεις ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της κατανάλωσης μεταβολιτών για σύνθεση νέας βιομάζας. Στην πράξη, η κατανάλωση μεταβολιτών περιλαμβάνεται ως στοιχειομετρικός συντελεστής σε μια αντίδραση που οδηγεί στην σύνθεση της βιομάζας.
 - Απαιτήση ATP για συντήρηση της βιομάζας. Με τη χρήση του ειδικού ρυθμού πρόσληψης γλυκόζης σε διαφορετικούς ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης που προήλθαν από πειραματικά δεδομένα, υπολογίστηκε απαίτηση 23 mmol ATP (g DW)⁻¹ για την ανάπτυξη και 5,87 mmol ATP (g DW h)⁻¹ για τη συντήρηση βιομάζας
 - Μέγιστος ειδικός ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου 20 mmol (gDW h)⁻¹



- Η αντικειμενική συνάρτηση είναι η μεγιστοποίηση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης. Έτσι, αν μια συγκεκριμένη ταχύτητα πρόσληψης γλυκόζης είναι δεδομένη, το μοντέλο προσδιορίζει το αντίστοιχο μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, μαζί με όλες τις ροές στο δίκτυο.
- Επιλεγμένες ροές δικτύου μπορεί να χαράσσονται κατά τον αντίστοιχο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, όπως απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα.



- Παρατηρείται ότι σε χαμηλά ειδικά ποσοστά πρόσληψης της γλυκόζης (που αντιστοιχεί σε χαμηλά ειδικά ποσοστά ανάπτυξης), δεν σχηματίζονται παραπροϊόντα, δηλαδή υπάρχει πλήρης αναπνοή.
- Ως εκ τούτου, σε αυτή την περίπτωση η πρόσληψη οξυγόνου παρουσιάζει γραμμικότητα με τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης. Όταν η συγκεκριμένη ταχύτητα πρόσληψης γλυκόζης προσεγγίζει περίπου $8 \text{ mmol (g dw h)}^{-1}$ (που αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο ρυθμό ανάπτυξης της τάξης του $0,9 \text{ h}^{-1}$) οι απαιτήσεις σε οξυγόνο για την πλήρη οξείδωση της γλυκόζης σε διοξείδιο του άνθρακα υπερβαίνει το καθορισμένο ανώτατο όριο του $20 \text{ mmol (g dw h)}^{-1}$. Ως εκ τούτου, τα κύτταρα στρέφονται προς ένα μικτό μεταβολισμό όπου υπάρχει τόσο αναπνοή όσο και ζύμωση.
- ο πρώτος μεταβολίτης που απεκκρίνεται είναι οξικό οξύ, και σε υψηλότερες γλυκολυτικά ροές (ή υψηλότερους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης) αποβάλλεται μυρμηκικό οξύ. Τέλος, σε πολύ υψηλές γλυκολυτικά ροές αποβάλλεται αιθανόλη. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι το μοντέλο προβλέπει τη σωστή ακολουθία της αποβολής των μεταβολιτών.



- Οι κρίσιμες γλυκολυτικές ροές (ή οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης) υπολογίστηκαν επίσης για τις τιμές της μέγιστης ταχύτητα πρόσληψης οξυγόνου μικρότερες όμως από τα $20 \text{ mmol (g DW h)}^{-1}$ (η οποία θα μπορούσε να είναι συνέπεια των περιορισμών της προσφοράς οξυγόνου στο βιοαντιδραστήρα).
- Διαπιστώθηκε ότι υπάρχει μια γραμμική σχέση μεταξύ αυτών των ροών και της παροχής οξυγόνου στο κύτταρο. Ένα πλεονέκτημα του γραμμικού προγραμματισμού είναι ότι οι πρόσθετες πληροφορίες μπορούν να ληφθούν υπόψη για τον υπολογισμό της ευαισθησίας ως λειτουργίας σε σχέση με τις μεταβλητές του συστήματος. Αυτές οι ευαισθησίες ονομάζονται **σκιώδεις τιμές**, οι οποίες δίδονται για το μεταβολικό μοντέλο του *E. coli* από τον τύπο

$$\lambda_i = \frac{\partial \mu}{\partial r_i}$$

- όπου r_i είναι ο ειδικός ρυθμός κατανάλωσης της νιοστής ένωσης, π.χ., οξυγόνο ή οξικό οξύ. Έτσι, η σκιώδης τιμή αντανακλά τις επιδράσεις των μεταβολικών ρυθμών στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης. Ο παρακάτω πίνακας δίνει μερικές από τις σκιώδεις τιμές που υπολογίζονται από το μεταβολικό μοντέλο για διάφορα ειδικά ποσοστά πρόσληψης οξυγόνου (r_o).

Metabolite	Shadow price [g DW (mmol metabolite) ⁻¹]		
	0	12	20
Oxygen	0.0399	0.0282	0
ATP	0.0109	0.0106	0.0049
NADH	-0.0054	0	0.0065
Acetate	0	0	0.0242
Ethanol	0	0.0106	0.0422
Lactate	0.0054	0.0106	0.0422
Succinate	0.0109	0.0177	0.0504

- Σε χαμηλά r_o η σκιώδης τιμή για το οξυγόνο είναι θετική, δηλαδή, με την αύξηση του r_o ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μπορεί να αυξηθεί.
- Όταν το r_o είναι στο μέγιστο του, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης δεν μπορεί να αυξηθεί περαιτέρω μέσω του r_o και η σκιώδης τιμή είναι επομένως μηδέν.



- Σε αναερόβιες συνθήκες ($r_o = 0$), η σκιάδης τιμή για το NADH είναι αρνητική, λόγω της αδυναμίας οξειδωσης αυτού του συμπαραγόνα, δηλαδή, αν NADH παραγωγής αυξάνει ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης θα μειωθεί.
- Αυτό δείχνει ότι η αναγέννηση του συμπαραγόνα μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη σε αναερόβιες συνθήκες.
- Για το ATP αντιθετα η σκιάδης τιμή είναι υψηλή σε αναερόβιες συνθήκες και μειώνεται με την αύξηση του r_o . Έτσι, το ATP είναι λιγότερο περιοριστικό για κύτταρα που αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες σε σύγκριση με αναερόβια ανάπτυξη.
- Οι σκιάδεις τιμές για όλους τους μεταβολίτες αυξάνουν μαζί με το r_o , διότι σε αερόβιες συνθήκες αυτές οι ενώσεις μπορούν να οξειδωθούν από το κύτταρο και να δώσει επιπλέον ATP που απαιτείται για την ανάπτυξη.
- Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι σε αναερόβιες συνθήκες, η σκιάδης τιμή για το ηλεκτρικό οξύ είναι υψηλότερη από ότι για τους άλλους μεταβολίτες καθότι η οξειδωση του ηλεκτρικού οξέος θα προκαλέσει αύξηση του NADH



- Το μοντέλο επιτρέπει επίσης τον υπολογισμό των ροών μέσω των διαφόρων οδών. Εδώ διαπιστώθηκε ότι υπό αναερόβιες συνθήκες, δεν υπάρχει ροή διαμέσου της οξειδωτικής υποοδού της οδού PP, δηλαδή, η γλυκόζη-6-P αφυδρογονάση δεν είναι ενεργός, και το NADPH που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση παρέχεται με αντίδραση τρανσυδρογενάσης.
- Για υψηλούς ειδικούς ρυθμούς πρόσληψης οξυγόνου, περίπου το 60% της γλυκόζης-6-P μεταβολίζεται μέσω της PP οδούς και η τρανσυδρογενάση δεν είναι ενεργή. Το μοντέλο εφαρμόστηκε επίσης για τη διερεύνηση της δυνατότητας των E. coli στην παραγωγή επιπρόσθετων μεταβολιτών, π.χ., αμινοξέων (Varma et al., 1993b).
- Το δυναμικό αυτό μπορεί να προσδιοριστεί από το μέγεθος των σκιωδών τιμών, καθώς αυτά παρέχουν ένα μέτρο μεταξύ της κατανάλωσης για συντήρηση – ανάπτυξη και παραγωγή ενός συγκεκριμένου μεταβολίτη, π.χ., αμινοξέα.
- Διαπιστώθηκε ότι οι σκιώδεις τιμές είναι χαμηλές για τα αμινοξέα, όπως τη γλυκίνη και την αλανίνη, τα οποία παράγονται από σχετικά απλά βιοσυνθετικά μονοπάτια,
- Ενώ οι σκιώδεις τιμές είναι υψηλές για τα αρωματικά αμινοξέα όπως η φαινυλαλανίνη, η τρυπτοφάνη και η τυροσίνη, των οποίων η βιοσύνθεση είναι αρκετά πιο περίπλοκη
- Έτσι, αν το κύτταρο πρόκειται να παράξει ένα προϊόν με μία μακρά και πολύπλοκη διαδρομή βιοσυνθετικών δράσεων, η απαίτηση του μεταβολισμού των κυττάρου είναι μεγάλη και η επίδραση στην ανάπτυξη της βιομάζας είναι μεγάλη.
- Αντιθέτως, μία ένωση που προέρχεται από ένα απλό βιοσυνθετικό μονοπάτι μπορεί να παράγεται από τα κύτταρα σε χαμηλό κόστος, και η επίδραση επί της ανάπτυξης της βιομάζας είναι μικρή.



ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

- Στις προηγούμενες ενότητες, προσφέρθηκαν λύσεις για τα ισοζύγια μάζας των ορισμένων υπερορισμένων, και υποορισμένων συστημάτων. Αν και σε κάθε περίπτωση ελήφθη μια μοναδική λύση, είναι σημαντικό να μετρηθεί η ευαισθησία της ή το πόσο τρωτή είναι η λύση αυτή, σε σχέση με πιθανές μικρές αστοχίες ή διαταραχές κατά τις μετρήσεις και παρατηρήσεις.
- Το πρώτο βήμα για αυτήν την ανάλυση είναι να εξεταστεί η στοιχειομετρική κατάσταση. Σε περίπτωση κακής στοιχειομετρικής κατάστασης, ακόμη και μικρές μεταβολές στις μετρήσεις μπορεί να έχουν πολύ μεγάλο αντίκτυπο στις ροές.
- Για να φανεί αυτό, κατασκευάζεται ένα σύστημα δυο εξισώσεων

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 \\ 1 & 1.0001 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 2 \\ 2 \end{pmatrix} \quad \text{and} \quad \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ 1 & 1.0001 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 2 \\ 2.0001 \end{pmatrix}$$

- Παρότι η διαφορά μεταξύ των εξισώσεων είναι της τάξης του 0.0001, η λύση μεταβάλλεται από $V_1=2$ και $V_2=0$, σε $V_1=V_2=1$.



- Επειδή οι λύσεις προέρχονται γενικά από τη χρήση αριθμητικών μεθόδων, λάθη στις εκτιμήσεις των ροών που προκαλούνται από μικρά υπολογιστικά λάθη μπορούν να έχουν τεράστιες συνέπειες. Ένα μέτρο της ευαισθησίας είναι ο λεγόμενος αριθμός κατάστασης (*condition number*) ο οποίος υπολογίζεται από τον τύπο:

$$C(G^T) = \|G^T\| \| (G^T)^{\#} \|$$

- όπου $\| \cdot \|$ υποδεικνύει κάθε κανόνα του πίνακα και $(G^T)^{\#}$ είναι το ψευδο-αντίστροφο του στοιχειομετρικού πίνακα. Ο υπολογισμός του αριθμού κατάστασης είναι αρκετά περίπλοκος, αλλά στην πράξη εξάγεται χρησιμοποιώντας εμπορικά πακέτα λογισμικού όπως το Matlab, Mathematica, ή Maple.
- Εάν ο αριθμός κατάστασης είναι μεγαλύτερος από 100 η στοιχειομετρία είναι προβληματική, και μπορεί να είναι αναγκαίο να τροποποιηθεί η βιοχημεία που έχει χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη του μοντέλου.

***Thank you for your kind
attention***



www.enve-lab.eu

A connectivity perspective to environmental health