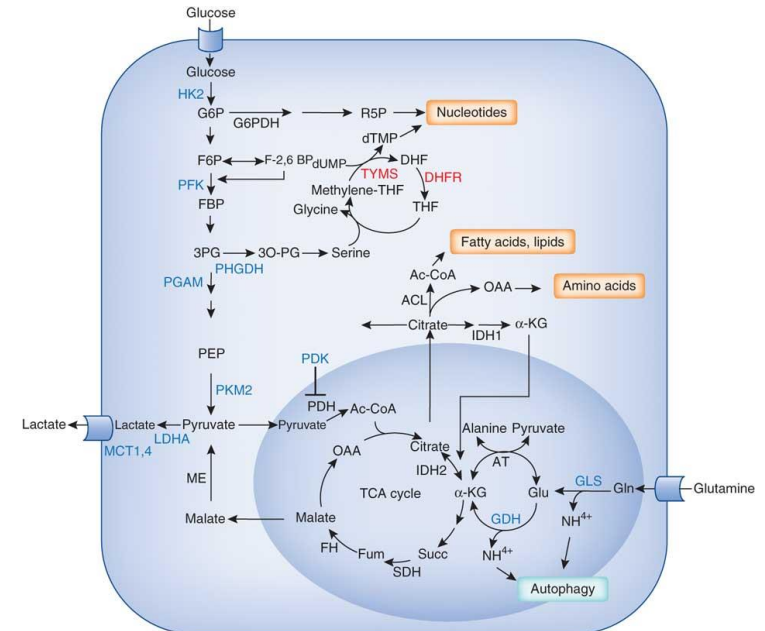




Ανάλυση μεταβολικού ελέγχου

**Καθηγητής
Δημοσθένης Σαρηγιάννης
Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μηχανικής**





Έμμεσοι μέθοδοι για τον προσδιορισμό των συντελεστών ελέγχου

- Οι μέθοδοι που περιγράφονται σε αυτήν την ενότητα χαρακτηρίζονται ως έμμεσοι επειδή οι ελαστικότητές τους πρέπει αρχικά να προσδιοριστούν πειραματικά, με τη ροή των συντελεστών ελέγχου να προσδιορίζεται στη συνέχεια κάνοντας χρήση των θεωρημάτων της (ανάλυσης του μεταβολικού ελέγχου) ΑΜΕ. Οι δύο σημαντικές παραδοχές στις οποίες βασίζεται αυτή η προσέγγιση είναι:
 - (1) ότι το μεταβολικό σύστημα έχει επαρκώς περιγραφεί, δηλαδή, όλες οι αντιδράσεις και οι ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις έχουν συμπεριληφθεί στην περιγραφή του συστήματος, και
 - (2) ότι το σύστημα είναι σε σταθερή κατάσταση με το αρχικό υπόστρωμα και τις συγκεντρώσεις του τελικού προϊόντος να είναι σταθεροποιημένα

Για να εξασφαλιστεί ότι οι υποθέσεις αυτές έχουν ικανοποιηθεί καλό είναι να ελέγχονται τα αποτελέσματα μέσω του προσδιορισμού τουλάχιστον ενός από τους συντελεστές ελέγχου του συστήματος.

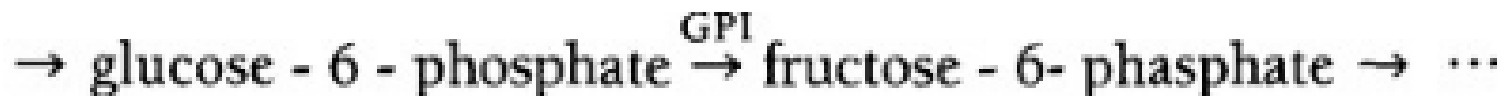
Στην ανάλυση της γλυκογένεσης σε ηπατικά κύτταρα αρουραίου οι Groen, et al., (1986) προσδιόρισαν όλους τους συντελεστές ελαστικότητας και χρησιμοποιήθηκαν τα θεωρήματα της ΑΜΕ για τον υπολογισμό των ροών σε αυτήν την οδό. Για να ελέγξουν τα αποτελέσματα, προσδιόρισαν τον συντελεστή απόκρισης της οδού σε σχέση με το πυροσταφυλικό. Επειδή η ελαστικότητα της πρώτης αντίδρασης (πυροσταφυλική καρβοξυλάση) σε σχέση με πυροσταφυλικό προσδιορίστηκε, ο συντελεστής ελέγχου ροής του πρώτου σταδίου μπορούσε να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας τον συντελεστή απόκρισης.

Ένας αριθμός διαφορετικών προσεγγίσεων μπορούν να εφαρμοστούν για τον προσδιορισμό των συντελεστών ελαστικότητας.



Διπλή διαφοροποίηση

- Ας εξετάσουμε την αντίδραση της εξόξης ισομεράσης της οδού EMP (Embden–Meyerhof–Parnas - γλυκόλυση) :



- Ο ρυθμός της αντίδρασης της ισομεράσης εξαρτάται μόνο από τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων, δηλαδή, $v_{\text{GPI}} = f(c_{\text{G6P}}, c_{\text{F6P}})$. Στη σταθερή κατάσταση, ο ρυθμός αυτής της αντίδρασης είναι ίσος με τη ροή J μέσω της οδού EMP και κατά συνέπεια

$$dJ = \frac{\partial v_{\text{GPI}}}{\partial c_{\text{G6P}}} dc_{\text{G6P}} + \frac{\partial v_{\text{F6P}}}{\partial c_{\text{F6P}}} dc_{\text{F6P}}$$

- Ανάπτυξη και αναδιάταξη της εξίσωσης δίνει :

$$d \ln J = \varepsilon_{\text{G6P}}^{\text{GPI}} d \ln c_{\text{G6P}} + \varepsilon_{\text{F6P}}^{\text{GPI}} d \ln c_{\text{F6P}}$$



- Σε ένα πείραμα ελέγχου, είναι δυνατό να μετρηθούν οι συγκεντρώσεις των δύο μεταβολιτών σε κατάσταση σταθερής ροής.
 - Μπορεί στη συνέχεια να εισαχθεί μια διαταραχή, π.χ., αλλάζοντας την εξωκυτταρική συγκέντρωση της γλυκόζης, που θα προσφέρει ένα νέο σύνολο μετρήσεων στις συνθήκες της νέας σταθερής κατάστασης. Αυτό το πείραμα αποδίδει μια εξίσωση σε σχέση με τις μετρήσεις ροής και τις συγκεντρώσεις των δύο συντελεστών ελαστικότητας.
 - Εάν εισαχθεί μια δεύτερη διαταραχή, ένα πρόσθετο σύνολο δεδομένων για τις συγκεντρώσεις τις ροής και του μεταβολίτη σε σταθεροποιημένη κατάσταση θα παραχθεί μαζί με μια νέα εξίσωση από την οποία μπορούν να υπολογιστούν οι δύο συντελεστές ελαστικότητας.
- Είναι προφανές ότι οι δύο διαταραχές πρέπει να είναι σχεδιασμένες έτσι ώστε να παράγουν δύο γραμμικά ανεξάρτητες εξισώσεις, δηλαδή πρέπει να πληρείται η ακόλουθη ανισότητα:

$$\frac{d \ln c_{G6P}^1}{d \ln c_{F6P}^1} \neq \frac{d \ln c_{G6P}^2}{d \ln c_{F6P}^2}$$



- Οι εκθέτες στην παραπάνω εξίσωση αναφέρονται σε μετρήσεις που ελήφθησαν μετά την περίοδο διαταραχής. Αν η διαφορά μεταξύ των δύο όρων της εξίσωσης είναι μικρή το διάλυμα καθίσταται πολύ ευαίσθητο σε πειραματικό σφάλμα. Στην πραγματικότητα, σε πολλές οδούς μπορεί να είναι πειραματικά δύσκολο να ληφθεί ένα γραμμικά ανεξάρτητο σύνολο μετρήσεων που να ικανοποιεί την Εξίσωση.
- Για να αυξηθεί η πιθανότητα παραγωγής τέτοιων τιμών αλλά και ότι τέτοιες μετρήσεις είναι πράγματι ανεξάρτητες, προτείνεται οι μελέτες διαφοροποίησης να εκτελούνται τόσο πριν όσο και μετά την υπό έλεγχο οδό.
- Σημειώνεται ότι για τις περισσότερες ενζυματικές αντιδράσεις υπάρχουν και άλλοι συντελεστές εκτός από το υπόστρωμα και το προϊόν, π.χ. συμπαραγοντες και αναστολείς. Αυτό σημαίνει ότι η ταχύτητα αντίδρασης είναι συνάρτηση περισσότερων από τις δύο μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν στο προηγούμενο παράδειγμα.
- Καθότι χρειάζεται διαφορετική ελαστικότητα για να περιγράψει την επίδραση καθενός από αυτές τις μεταβλητές, καθίσταται αναγκαίο να εκτελούνται περισσότερες από δύο πειραματικές διαταραχές που να αποφέρουν γραμμικά ανεξάρτητες εξισώσεις.



Μονή διαφοροποίηση

- Αν ένας από τους συντελεστές ελαστικότητας είναι γνωστός για μία αλληλουχία αντιδράσεων ο δεύτερος συντελεστής ελαστικότητας μπορεί να προσδιοριστεί από ένα μόνο πείραμα διαφοροποίησης. Το πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι αρκετές διαμορφώσεις του ίδιου τύπου αλλά διαφορετικού μεγέθους μπορούν να εφαρμοστούν και μια γραφική μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των διαφορικών όρων
- Οι Groen, et al., (1986), χρησιμοποίησαν τη μέθοδο αυτή για τον προσδιορισμό του συντελεστή ελαστικότητας της πυροσταφυλικής κινάσης σε σχέση με το φωσφοενολπυροσταφυλικό και τον συντελεστή ελαστικότητας της πυροσταφυλικής καρβοξυλάσης σε σχέση με το κυτταροπλασματικό οξαλοξικό οξύ. Η προσέγγιση είναι προφανώς πιο ισχυρή από εκείνη της διπλής διαμόρφωσης, αλλά εξακολουθεί να στηρίζεται στην εκτίμηση των διαφορικών όρων της εξίσωσης και φυσικά στη γνώση του ενός συντελεστή ελαστικότητας.



Προσέγγιση από την κορυφή προς τη βάση

Top-down approach

- Σε πολλές περιπτώσεις οι λεπτομερείς πληροφορίες που παρέχονται από όλους τους συντελεστές ελέγχου δεν είναι πραγματικά αναγκαίες, εντούτοις είναι θεμιτό να προσδιοριστεί η ομάδα αντιδράσεων στην οποία βρίσκεται η πλειοψηφία των ροών ελέγχου. Αυτό μπορεί να βοηθήσει κάποιον να εστιάσει σε τμήματα του μεταβολισμού. Επίσης, με την επανάληψη της διαδικασίας αυτής είναι δυνατός ο εντοπισμός μικρότερων ομάδων αντιδράσεων.
- Η ομαδοποίηση των αντιδράσεων είναι ένα ισχυρό εργαλείο στην ανάλυση του ελέγχου ροής των μεταβολικών οδών. Η βασική ιδέα προέρχεται από την προσέγγιση <από την κορυφή προς τη βάση> που εισήγαγαν οι Brand, Brown et al., σύμφωνα με την οποία η υπό μελέτη οδός χωρίζεται σε τμήματα (ή ομάδες) με μόνο ένα κοινό μεταβολίτη





- Σε ένα διακλαδισμένο μονοπάτι το κοινό ενδιαμέσο X είναι προφανώς ο κοινός μεταβολίτης, ενώ για μία γραμμική οδό X θα είναι ένας από τους μεταβολίτες K της γραμμικής οδού. Οι συντελεστές ελέγχου ροής μπορεί να εισαχθούν για να παρέχουν ένα μέτρο ελέγχου της ροής που ασκείται από τις αντιδράσεις της ομάδας. Είναι φανερό ότι οι συντελεστές ροής ελέγχου για καθεμία από τις ομάδες ισούται με το άθροισμα των ροών ελέγχου για τα επιμέρους βήματα και ότι οι συντελεστές ελέγχου ροής ακολουθούν το αθροιστικό θεώρημα

$$C_{\text{Group 1}}^J + C_{\text{Group 2}}^J = 1$$

- Εκτός από την ομάδα ελέγχου της ροής, μπορεί να εισαχθεί ένα σύνολο συντελεστών ελαστικότητας, σε σχέση με το ενδιαμέσο μεταβολίτη, για να περιγράψει την επίδραση του εν λόγω μεταβολίτη στο ρυθμό των αντιδράσεων της ομάδας

$$\varepsilon_X^{\text{Group } i} = \frac{c_X}{v_{\text{Group } i}} \frac{\partial v_{\text{Group } i}}{\partial c_X} \quad i \in \{1, 2\}$$



- Κατ' αναλογία με το θεώρημα συνεκτικότητας, οι συντελεστές ελαστικότητας και οι συντελεστές ελέγχου ροής σχετίζονται σύμφωνα με:

$$C_{\text{Group 1}}^J \varepsilon_X^{\text{Group 1}} + C_{\text{Group 2}}^J \varepsilon_X^{\text{Group 2}} = 0$$

- Παρόμοια θεωρήματα ισχύουν και για τους συντελεστές ομαδοποιημένου ελέγχου (Brown et al., 1990a).
- Όταν η οδός έχει τμηματοποιηθεί, οι καθολικοί συντελεστές ελαστικότητας μπορούν να προσδιοριστούν, π.χ., με πειράματα διπλής διαφοροποίησης, ή αν ένας από τους συντελεστές ελαστικότητας είναι γνωστός, ο δεύτερος μπορεί να προσδιοριστεί με πειράματα μονής διαφοροποίησης. Με χρήση των παραπάνω εξισώσεων οι ομαδοποιημένοι συντελεστές ροής μπορεί στη συνέχεια να υπολογιστούν παρέχοντας έτσι ένα μέτρο ελέγχου που απορρέει από κάθε ένα από τα δύο τμήματα της οδού.
- Καθότι το μονοπάτι μπορεί να υποδιαιρεθεί σε οποιαδήποτε αυθαίρετη θέση, είναι δυνατό να μειωθούν προοδευτικά οι ομάδες μεμονωμένων αντιδράσεων κάτι που αποτελεί προϋπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου διπλής (ή μονής διαμόρφωσης) ωστόσο, η μέθοδος δεν επιτρέπει αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών αντιδρώντων εκτός από εκείνες που συμβαίνουν μέσω του ενδιάμεσου μεταβολίτη X . Αυτό μπορεί να είναι ένα σημαντικό μειονέκτημα καθώς υπάρχουν πολλές περιπτώσεις όπου οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο ομάδων μπορεί να συμβούν απουσία του κοινού μεταβολίτη X .



Υπολογισμός των συντελεστών ελαστικότητας μέσω κινητικών μοντέλων

- Εάν είναι διαθέσιμο ένα μαθηματικό μοντέλο που προσδιορίζει το ρυθμό μιας ενζυματικής αντίδρασης, η ελαστικότητα σε σχέση με τα αντιδρώντα και τα υποστρώματα μπορεί εύκολα να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας τον ορισμό του συντελεστή ελαστικότητας.
- Για τους σκοπούς της ανάλυσης μεταβολικού ελέγχου, δεν απαιτείται η κινητική έκφραση να είναι μηχανιστικά βασισμένη, καθ' όσο περιγράφει σωστά την κινητική επίδραση των διαφόρων αντιδρώντων. Αυτή η προσέγγιση είναι απλή και πολύ ισχυρή, αλλά θέτει ένα θεμελιώδες ερώτημα: κατά πόσον η *in vitro* ενζυμική κινητική περιγράφει σωστά την *in vivo* λειτουργία του ενζύμου.
- Ευτυχώς, οι τιμές V_{\max} εξουδετερώνονται κατά τον υπολογισμό των συντελεστών ελαστικότητας, και το πρόβλημα ανάγεται σε προσδιορισμό του K_m



- Είναι επίσης σημαντικό να εξετάσουμε όλα τα πιθανά αντιδρώντα. Επιπλέον, επειδή μικροί συντελεστές ελαστικότητας γενικά συνδέονται με μεγάλους συντελεστές ελέγχου, τα αντιδρώντα με χαμηλούς συντελεστές ελαστικότητας είναι τα πιο σημαντικά για τον έλεγχο της ροής, ενώ οι περισσότερες *in vitro* μελέτες ενζυματικής κινητικής υπάρχει μια τάση να επικεντρώνονται σε αντιδρώντα με μεγάλες ελαστικότητες.
- Ένας άλλος περιοριστικός παράγοντας στη χρήση *in vitro* κινητικών δεδομένων είναι ότι οι περισσότερες μελέτες ενζυματικής κινητικής βασίζονται σε δεδομένα όπου εμφανίζονται προϊόντα αντίδρασης. Προφανώς, αυτή η πειραματική κατάσταση δεν είναι αντιπροσωπευτική των *in-vivo* συνθηκών.
- Υπάρχουν πολλά παραδείγματα προσδιορισμού ελαστικότητας μέσω κινητικών μοντέλων. Όπως της γλυκονεογένεσης σε κύτταρα ήπατος αρουραίου, Groen, et al., (1986) και ανάλυση της γλυκόλυσης σε *S. Cerevisiae* Galazzo Bailey (1990)



Χρήση των παροδικών μετρήσεων των μεταβολιτών

- Παρότι οι συντελεστές ελέγχου ροής ορίζονται για συστήματα σε σταθερή κατάσταση οι Delgado και Liao (1992) πρότειναν μια προσέγγιση για τον προσδιορισμό των συντελεστών ροής απευθείας από παροδικές μετρήσεις των συγκεντρώσεων του μεταβολίτη. Η μέθοδος επιτρέπει τέσσερις υποθέσεις:
 - 1. Οι εξωτερικοί μεταβολίτες δεν επηρεάζουν την κινητική οδό, ή η συγκέντρωσή τους ελέγχεται σε ένα σταθερό επίπεδο. Αυτή είναι μια γενική παραδοχή.
 - 2. Μια γραμμική προσέγγιση της ενζυμικής κινητικής γύρω από την σταθερή κατάσταση είναι έγκυρη σε μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων του μεταβολίτη.
 - 3. Θα πρέπει να είναι θεωρητικά δυνατό να προσδιοριστούν οι παροδικές ροές μέσα από κάθε αντίδραση στην οδό από μετρήσεις της συγκέντρωσης του μεταβολίτη.
 - 4. Οι μεταβολίτες κατανέμονται ομοιογενώς στο σύστημα (άλλη γενική παραδοχή).



- Με βάση τις προηγούμενες υποθέσεις, είναι δυνατόν να εξαχθεί η ακόλουθη σχέση μεταξύ των συντελεστών ελέγχου ροής και την παροδική ροή μέσα από κάθε ένζυμο

$$\sum_{i=1}^L C_i^J \left(\frac{v_i(t)}{J_i} \right) = 1$$

- όπου $v_i(\mathbf{t})$ είναι η παροδική ροή μέσω της αντίδρασης i -και J_i είναι η σταθερή κατάσταση. Η ακριβής εκτίμηση της παροδικής ροής μέσω της μέτρησης μεταβολικών περιλαμβάνει τον προσδιορισμό των παραγώγων, μια διαδικασία που είναι δύσκολο να εφαρμοστεί και επιρρεπής σε λάθη. Για το λόγο αυτό, οι Delgado και Liao (1992) εισήγαγαν μια εναλλακτική προσέγγιση που βασίζεται στην εξελιγμένη έκδοση της βασικής εξίσωσης. Σύμφωνα με αυτήν την προσέγγιση, ένα σετ συντελεστών α_j προσδιορίζεται πρώτα από τις παροδικές μετρήσεις μεταβολικών κάνοντας χρήση της ακόλουθης εξίσωσης

$$\sum_{j=1}^K \alpha_j (c_j(t) - c_j(0)) = t$$

- Οι συντελεστές ελέγχου ροής σχετίζονται με τους συντελεστές α_j . Για μια γραμμική πορεία η σχέση παρουσιάζεται από τον τύπο

$$\left(C_1^J \quad C_2^J \quad \dots \quad C_L^J \right) = \left(\alpha_1 \quad \alpha_2 \quad \dots \quad \alpha_K \right) G^* J$$



- όπου το \mathbf{J} είναι η κατά σταθερή κατάσταση ροή μέσω της οδού και \mathbf{G}^* είναι η στοιχειομετρική κατάσταση του μονοπατιού. Η στοιχειομετρία του μονοπατιού αυξάνεται για να συμπεριλάβει τούς στοιχειομετρικούς συντελεστές του υποστρώματος και του μεταβολικού προϊόντος της οδού (με τους στοιχειομετρικούς συντελεστές για το υπόστρωμα να τοποθετείται στην πρώτη στήλη και τούς στοιχειομετρικούς συντελεστές του μεταβολικού προϊόντος να τοποθετούνται στην τελευταία στήλη). Για ένα διακλαδισμένο μονοπάτι ο καθορισμός των συντελεστών ροής γίνεται από τον τύπο:

$$\mathbf{C}^{\mathbf{J}} = (\alpha_1 \quad \alpha_2 \quad \dots \quad \alpha_K) \mathbf{G}^* \mathbf{J}$$

- όπου $\mathbf{C}^{\mathbf{J}}$ είναι οι στοιχειομετρικοί συντελεστές και \mathbf{J} είναι ο πίνακας που περιέχει τις ροές των επιμέρους κλάδων του μονοπατιού
- Οι συντελεστές α_i μπορούν να προσδιοριστούν με αλληπάλληλες μετρήσεις των συγκεντρώσεων του μεταβολίτη κατά τη διάρκεια παροδικής, π.χ., μετά από μια παλμική προσθήκη κάποιας ένωσης σε κάποιο χημειοστάτη. Οι συντελεστές αυτοί χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για τον υπολογισμό των συντελεστών ροής.



- Στοιχειομετρικοί περιορισμοί μπορεί επίσης να υπάρξουν για συμπαράγοντες όπως το NAD^+ και το NADH . Ακόμα κι αν οι περιορισμοί αυτοί μπορούν να φιλτραρισθούν από την εξίσωση

$$\sum_{j=1}^K \alpha_j (c_j(t) - c_j(0)) = t$$

- Είναι σκόπιμο να εξαλειφθούν με τη διαγραφή της μέτρησης και της αντίστοιχης στήλης από τον στοιχειομετρικό πίνακα. Προφανώς η μέτρηση που θα πρέπει να διαγραφεί θα πρέπει να είναι αυτή που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αβεβαιότητα.
- Ακόμα και αν δεν υπάρχουν στοιχειομετρικοί περιορισμοί, ορισμένοι από τους μεταβολίτες μπορούν να συσχετισθούν γραμμικά μέσω κινητικής. Αν, για παράδειγμα μία από τις αντιδράσεις είναι πολύ ταχύτερη από ό, τι οι άλλες αντιδράσεις που εμφανίζονται, αυτή η αντίδραση μπορεί να φθάσει σε κατάσταση ισορροπίας σύντομα, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος και του προϊόντος αυτής της αντίδρασης να είναι συναφείς με τη σταθερά ισορροπίας.



- Αν υπάρχουν αντιδράσεις ισορροπίας εκ των προτέρων γνωστές, οι Delgado και Liao (1992) προτείνουν οι μεταβολίτες να ενώνονται σε ένα κοινό σύνολο. Η προσέγγιση που βασίζεται στην παροδική μέτρηση των μεταβολιτών μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των συντελεστών ελέγχου με χρήση της εξίσωσης

$$\sum_{i=1}^L C_i X_j \left(\frac{v_i(t)}{J_i} \right) = 1 - \frac{c_j(t)}{c_{j,ss}}$$

- όπου $C_{j,ss}$ είναι η υπό σταθερή κατάσταση συγκέντρωση του μεταβολίτη. Η παραπάνω εξίσωση δείχνουν ότι οι συγκεντρώσεις του μεταβολίτη και οι ροές που παράγονται από μεμονωμένες αντιδράσεις δεν μεταβάλλονται ανεξάρτητα μετά από μια διαταραχή καθότι περιορίζονται από τους συντελεστές ελέγχου του συστήματος. Μία παραλλαγή της παραπάνω εξίσωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των συντελεστών ελέγχου μέσω γραμμικών συναρτήσεων με αποτέλεσμα τον υπολογισμό των συντελεστών ελέγχου.



- Η μέθοδος της παροδικής μέτρησης του μεταβολίτη είναι αρκετά εύκολη, καθώς στοχεύει σε έναν ταχύ προσδιορισμό των συντελεστών ελέγχου. Πρόσφατα παρουσιάστηκε (Nielsen, 1997) ότι η διαδικασία μπορεί να εφαρμοσθεί και όταν η κινητική της αντίδρασης περιγράφεται από γραμμικές συναρτήσεις σε σχέση με το λογάριθμο των συγκεντρώσεων του μεταβολίτη. Αυτό το είδος της γραμμικοποίησης δίνει γενικά μια πιο ακριβή περιγραφή της κινητικής κατάστασης της αντίδρασης.
- Παρόλα τα θετικά που παρουσιάζει η μέθοδος έως σήμερα δεν έχει αναφερθεί ολοκληρωμένη μελέτη μονοπατιού με τη μέθοδο αυτή. Οι Delgado et al., (1993) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο για να μελετήσουν τους συντελεστές ελέγχου ροής της εξοκινάσης και της φωσφοφρουκτοκινάσης σε ένα τεχνητά κατασκευασμένο γλυκολυτικό μονοπάτι. Το ίδιο πείραμα έλαβε χώρα με χρήση ενζύμων και βρέθηκε ότι υπήρχε συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων των δυο πειραμάτων



Ανάλυση μεταβολικού ελέγχου σε γραμμικά μονοπάτια

- Για ένα γραμμικό μονοπάτι ο αριθμός των μεταβολιτών είναι $L - 1$, όπου L είναι ο αριθμός των ενζυμικών αντιδράσεων, δηλαδή, υπάρχει ένας μεταβολίτης λιγότερος σε σχέση με τις ενζυματικές αντιδράσεις.
- Υπάρχει άρα μόνο μία ροή σε αυτή την περίπτωση που είναι ίση με τις τιμές όλων των αντιδράσεων σε σταθερή κατάσταση.
- Επίσης, υπάρχουν L άγνωστοι συντελεστές ελέγχου ροής, ένας για την επίδραση της κάθε αντίδρασης στην οδό. Οι συντελεστές ελέγχου ροής μπορούν να προσδιοριστούν από τα θεωρήματα συνεκτικότητας όπου μαζί με το αθροιστικό θεώρημα, παρέχουν αρκετές εξισώσεις για τον υπολογισμό των συντελεστών ελέγχου ροής L από τους συντελεστές ελαστικότητας. Ομοίως, οι συντελεστές ελέγχου μπορούν να υπολογιστούν μέσω των θεωρημάτων συνεκτικότητας και άθροισης. Οι εξισώσεις για τους συντελεστές ελέγχου (ροή και συγκέντρωση) (συνολικά $L+2$ εξισώσεις) μπορεί εύκολα να συνοψιστεί σε πίνακες



$$\begin{pmatrix} 1 & 1 & \dots & 1 \\ \varepsilon_{X_1}^1 & \varepsilon_{X_1}^2 & \dots & \varepsilon_{X_1}^L \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ \varepsilon_{X_K}^1 & \varepsilon_{X_K}^2 & \dots & \varepsilon_{X_K}^L \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_1^J & -C_1^{X_1} & \dots & -C_1^{X_{L-1}} \\ C_2^J & -C_2^{X_1} & \dots & -C_2^{X_{L-1}} \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ C_L^J & C_L^{X_1} & \dots & -C_L^{X_{L-1}} \end{pmatrix} \\
 = \begin{pmatrix} 1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 1 & \dots & 0 \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ 0 & 0 & \dots & 1 \end{pmatrix}$$



- Η εξίσωση αυτή φαίνεται ότι είναι ταυτόσημη με τη γενική διατύπωση της γραμμικής πορείας, όπου η παράμετρος ελαστικότητας \mathbf{P} είναι ίση με τον πίνακα ταυτοποίησης. Εάν ο πίνακας του συντελεστή ελαστικότητας είναι ομαλός, οι συντελεστές ελέγχου μπορεί να υπολογιστούν χρησιμοποιώντας αναστροφή του πίνακα. Με τον τρόπο αυτό, οι συστημικές ιδιότητες που εκφράζονται από τους συντελεστές ελέγχου που σχετίζονται με τις τοπικές ενζυματικές κινητικές αντικατοπτρίζεται στους συντελεστές ελαστικότητας. Μια απλή απεικόνιση της διαδικασίας παρουσιάζεται παρακάτω

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \varepsilon_X^1 & \varepsilon_X^2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_1^J & -C_1^X \\ C_2^J & -C_2^X \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$$

- Και η λύση της

$$\begin{pmatrix} C_1^J & C_1^X \\ C_2^J & C_2^X \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{\varepsilon_X^2}{\varepsilon_X^2 - \varepsilon_X^1} & \frac{1}{\varepsilon_X^2 - \varepsilon_X^1} \\ -\frac{\varepsilon_X^1}{\varepsilon_X^2 - \varepsilon_X^1} & -\frac{1}{\varepsilon_X^2 - \varepsilon_X^1} \end{pmatrix}$$



- Κανονικά, η ελαστικότητα μιας αντίδρασης έχει αρνητικό πρόσημο σε σχέση με το προϊόν της και θετικό σε σχέση με το υπόστρωμα. Έτσι, ε_x^{-1} είναι αρνητικό και ε_x^1 είναι θετικό, όπως και ο παρονομαστής του συντελεστή ελέγχου.
- Η κατανομή της ροής ελέγχου εξαρτάται από την τιμή των αντίστοιχων συντελεστών ελαστικότητα: μια μεγάλη ελαστικότητα συνδέεται με ένα μικρό συντελεστή ελέγχου ροής και το αντίστροφο.
- Εάν η ελαστικότητα της πρώτης αντίδρασης σε σχέση με το μεταβολίτη είναι ιδιαίτερα χαμηλή, όπως στην περίπτωση μιας μη αντιστρεπτής αντίδρασης, ο συντελεστής ελέγχου ροής της πρώτης αντίδρασης θα προσεγγίσει το 1, βάζοντας έτσι έναν περιορισμό στο ρυθμό αυτού του σταδίου.



- Όταν η ελαστικότητα της πρώτης αντίδρασης σε σχέση με το μεταβολίτη είναι μηδέν, δηλαδή, δεν υπάρχει καμία απολύτως επίδραση του προϊόντος της αντίδρασης, τότε οι συντελεστές ροής των δύο αντιδράσεων επιτυγχάνουν τις τιμές 1 και 0 αντίστοιχα οι οποίες είναι και ανεξάρτητες της συγκέντρωσης του μεταβολίτη.
- Ωστόσο, ακόμη και για τις αντιδράσεις που είναι πρακτικώς μη αντιστρεπτές υπάρχει πάντα κάποια ελαστικότητα σε σχέση με το προϊόν της αντίδρασης, και η θεωρητική κατάσταση συμφόρησης ποτέ δεν επιτυγχάνεται στην πράξη.
- Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι αν όλες οι αντιδράσεις σε μια γραμμική πορεία που περιγράφεται από μη αντιστρεπτή κινητική τύπου Michaelis-Menten, οι ελαστικότητες σε σχέση με τα προϊόντα της αντίδρασης μηδενίζονται, και όλοι οι συντελεστές ελέγχου ροής ισούνται με μηδέν, εκτός από το πρώτο, το οποίο είναι ακριβώς ίσο με τη μονάδα.

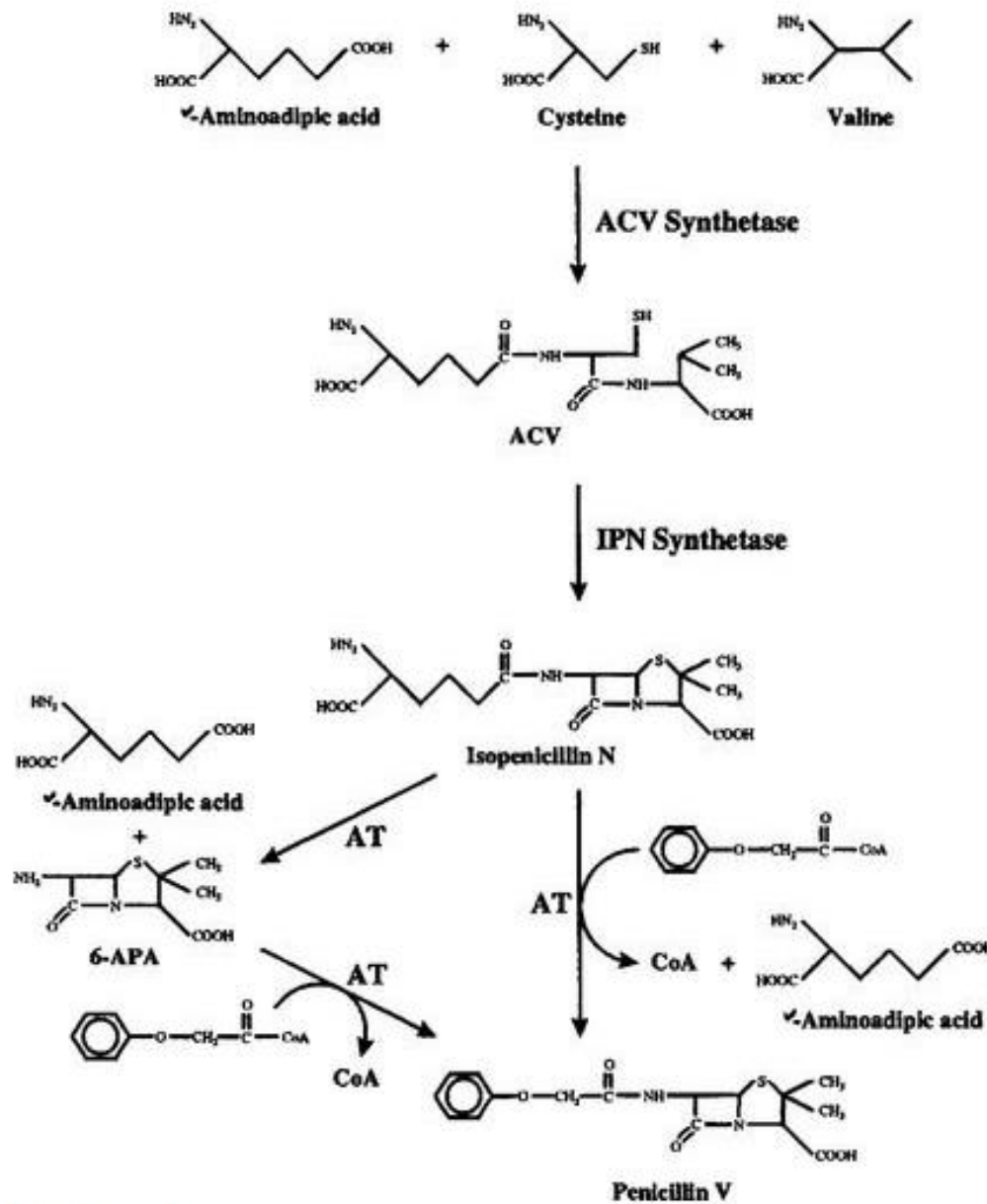


Ανάλυση μεταβολικού ελέγχου στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της πενικιλίνης

- Η βιοσυνθετική οδός της πενικιλίνης έχει περιγράφεται αρκετά καλά στο παρελθόν. Η οδός αποτελείται από τρεις ενζυματικές αντιδράσεις, εκ των οποίων τα δύο πρώτα βήματα είναι ίδια σε όλες τις βιοσυνθετικές οδούς για τα αντιβιοτικά της β-λακτάμης (με ένα πολύ υψηλό βαθμό ομοιότητας μεταξύ ενζύμων από διαφορετικούς οργανισμούς).
- Το πρώτο βήμα στην οδό είναι η συμπύκνωση των τριών αμινοξέων L-α-αμινοαδιπικό οξύ, L-κυστεΐνη, και D-βαλίνη για να σχηματίσει το τριπεπτίδιο L-α-αμινοαδιπυλ-L-κυστεΐνυλο-D-βαλίνη (LLD- ACV). Η L-κυστεΐνη και L-βαλίνη είναι γνωστά ενδιάμεσα στο μεταβολισμό όλων των κυττάρων, ενώ το α-αμινοαδιπικό οξύ είναι ένα ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση της λυσίνης στους μύκητες.
- Ο σχηματισμός του τριπεπτίδιου LLD-ACV καταλύεται από ένα ενιαίο πολυλειτουργικό ένζυμο, τη συνθετάση ACV (ACVS). Το δεύτερο βήμα στην οδό είναι το κλείσιμο του δακτυλίου οξειδωσης του LLD-ACV προς το σχηματισμό ισοπενικιλίνης N.



- Αυτό γίνεται από το ένζυμο συνθετάση της ισοπενικιλίνης N, με το ελεύθερο οξυγόνο να αποτελεί το δέκτη ηλεκτρονίων. Η τελική μετατροπή της ισοπενικιλίνης N σε πενικιλίνη V καταλύεται από το ακυλο-CoA της ακυλοτρανσφεράσης (AT) της ισοπενικιλίνης και μπορεί να προκύψει είτε από ένα μηχανισμό ενός ή δύο σταδίων.
- Στο μηχανισμό αντίδραση δύο σταδίων, η χαρακτηριστική ομάδα του α-αμινοαδιπικού οξέος διασπάται και 6-APA ((+)-6-aminopenicillanic acid) απελευθερώνονται. Εάν μια ενεργοποιημένη πρόδρομη ένωση, δηλαδή το φαινοξυακετυλ-CoA, είναι διαθέσιμο, 6-APA μπορούν να δεσμεύονται και στη συνέχεια να μετατρέπονται σε πενικιλίνη V.
- Στο μηχανισμό αντίδραση ενός σταδίου η πλευρική αλυσίδα του α-αμινοαδιπικού οξέος της ισοπενικιλίνης N ανταλλάσσεται με την πρόδρομη ένωση χωρίς να είναι απαραίτητη η απελευθέρωση του 6-APA από το ένζυμο.





- Η ανάλυση του μεταβολικού ελέγχου της συγκεκριμένης οδού πραγματοποιήθηκε από τους Nielsen & Jørgensen (1995). Στην ανάλυση τους, προτάθηκαν κάποιες κινητικές αποδόσεις για τα πρώτα δύο ένζυμα. Από τις κινητικές αυτές για τα ACVS και IPNS, προσδιορίστηκαν οι συντελεστές ελαστικότητας και τα θεωρήματα της ανάλυσης του μεταβολικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των συντελεστών ελέγχου ροής για τα δύο πρώτα βήματα
- Από τις μετρήσεις δραστηριότητας του τελευταίου ενζύμου (AT), βρέθηκε ότι ο έλεγχος που ασκείται από το AT είναι ελάχιστος. Αυτό επιβεβαιώθηκε περαιτέρω από μια πιο λεπτομερή ανάλυση όλων των αντιδράσεων στην οδό που πραγματοποιήθηκε από τους Pissara, et al., (1996)
- Το ACVS εμφανίζει κινητική Michaelis-Menten σε σχέση με τα επιμέρους αμινοξέα που συμμετέχουν στην αντίδραση της συνθετάσης
- Στην ανάλυση τους, οι Nielsen & Jørgensen (1995) πρότειναν αναστολή ανάδρασης από το προϊόν της αντίδρασης LLD-ACV, και ως εκ τούτου οι ακόλουθες κινητικές προτάθηκαν για τις καταλυόμενες αντιδράσεις από το ACVS :



$$r_{ACV} = \frac{v_{max}}{(1 + K_{aaa} c_{aaa}^{-1} + K_{cys} c_{cys}^{-1} + K_{val} c_{val}^{-1})(1 + c_{ACV} K_{ACV}^{-1})}$$

- Πρόσφατα η ACVS που παράγεται από τον οργανισμό *P. chrysogenum* καθαρίστηκε και η προτεινόμενη ανάδραση μέσω LLD-ACV επιβεβαιώθηκε (Theilgaard, et al., 1997).
- Στην παραπάνω εξίσωση ο μέγιστος ρυθμός είναι συνάρτηση των διαφόρων παραγόντων και περιλαμβάνει το ATP, AMP, πυροφωσφορικό, φωσφορικό, CoA και Mg 2+, το ATP προσφέρει επιτάχυνση της αντίδρασης και το AMP και το πυροφωσφορικό αποτελούν αναστολείς. Οι παράμετροι Michaelis-Menten K_{aaa} , K_{cys} και K_{val} ελήφθησαν ότι είναι ίσοι με εκείνους που αναφέρθηκαν για τον *S. clavuligerus*, δηλαδή, 0,63, 0,12, και 0,30 mM, αντίστοιχα
- Η τιμή του K_{ACV} υπολογίστηκε με προσθήκη της τιμής R_{ACV} στη βιοσυνθετική οδό της πενικιλίνης.

K_{ACV} = inhibition constant of ACVS for ACV (mM)

K_{AAA} = saturation constant of ACVS for L- α -aminoadipate (mM)

K_{VAL} = saturation constant of ACVS for L-valine (mM)

r_{ACV} = secretion constant of ACVS



- Η ισοπενικιλινική συνθετάση N (IPNS) είναι το καλύτερα χαρακτηρισμένο ένζυμο της βιοσυνθετικής οδού της β-λακτάμης. Αυτό το ένζυμο, με εξάρτηση στις συγκεντρώσεις του σιδήρου, δρα με την αφαίρεση τεσσάρων ισοδύναμων υδρογόνων από το LLD-ACV με την κατανάλωση κάθε ενός mole οξυγόνου.
- Η IPNS του μικροοργανισμού *P. Chrysogenus* απομονώθηκε με επιτυχία με το ένζυμο να εμφανίζει κινητική Michaelis-Menten σε σχέση με τη συγκέντρωση LLD-ACV με K_m από 0,13 mM. Επιπλέον, φαίνεται να υπάρχει ανταγωνιστική αναστολή από τη γλουταθειόνη K_i 8,9 mM.
- Δεν υπάρχουν εργασίες σχετικά με την επίδραση της συγκέντρωσης του οξυγόνου στην κινητική του απομονωμένου IPNS, αλλά για ένα εν μέρει απομονωμένο IPNS βρέθηκε η κινητική να είναι πρώτης τάξεως σε συγκέντρωση οξυγόνου μεταξύ 0,070 έως 0,18 mM. Αυτό σημαίνει ότι η μετατροπή του LLD-ACV σε ισοπενικιλίνη N είναι πολύ ευαίσθητη σε μεταβολές στην συγκέντρωση του διαλυτού οξυγόνου. Αυτό έχει επίσης παρατηρηθεί πειραματικά για αρκετούς παραγωγούς β-λακτάμης.



- Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, η ακόλουθη εξίσωση προτάθηκε για την κινητική της μετατροπής του LLD-ACV σε ισοπενικιλίνη N (IPN):

$$r_{IPN} = \frac{v_{max} c_{ACV}}{c_{ACV} + K_m (1 + c_{glut} K_i^{-1})}$$

- Βιβλιογραφικές τιμές χρησιμοποιήθηκαν για τις δύο παραμέτρους K_m και K_i τα οποία θεωρήθηκαν ίσα με 0,13 και 8,9 mM, αντίστοιχα.
- Από μετρήσεις των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων πρόδρομων αμινοξέων του LLD-ACV και τη δραστηριότητα του ACVS, ο ρυθμός σχηματισμού LLD-ACV (R_{ACV}) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την εξίσωση

$$r_{ACV} = \frac{v_{max}}{(1 + K_{aaa} c_{aaa}^{-1} + K_{cys} c_{cys}^{-1} + K_{val} c_{val}^{-1})(1 + c_{ACV} K_{ACV}^{-1})}$$

- Με αξιοποίηση του υπολογισμένου συντελεστή σε μετρήσεις της συνολικής σύνθεσης της πενικιλίνης, το K_{ACV} υπολογίστηκε ότι είναι 12,5 mM, τιμή η οποία είναι ελαφρώς υψηλότερη από αυτή που βρέθηκε με το πλήρως απομονωμένο ένζυμο.
- Προφανώς, η παράμετρος της αναστολής που προσδιορίζεται in vitro είναι πιθανό να είναι η σωστή τιμή μηχανιστικά, ενώ η τιμή που προσδιορίζεται από την προσαρμογή της παραγωγικότητας μπορεί να επικαλύπτεται από άλλες δράσεις που εμφανίζονται στους ζώντες οργανισμούς.



- Οι συντελεστές ελαστικότητας για τις αντιδράσεις ACVS και IPNS προήλθαν από τη λήψη των μερικών παραγώγων των ρυθμιστικών εξισώσεων:

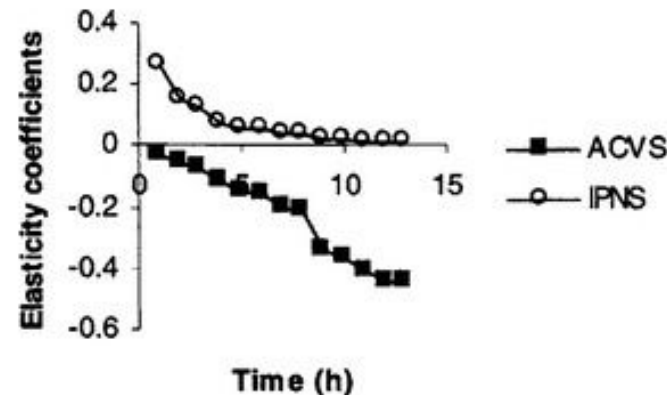
$$\varepsilon_{ACTs}^{ACVS} = -\frac{c_{ACV} K_{ACV}^{-1}}{1 + c_{ACV} K_{ACV}^{-1}}$$

$$\varepsilon_{ACV}^{IPNS} = \frac{K_m(1 + c_{glut} K_i^{-1})}{c_{ACV} + K_m(1 + c_{glut} K_i^{-1})}$$

- Οι παραπάνω εξισώσεις παρουσιάζουν ότι οι συντελεστές ελαστικότητας είναι συναρτήσεις των συγκεντρώσεων γλουταθειόνης και LLD-ACV. Ο συντελεστής ελαστικότητας της πρώτης αντίδρασης σε σχέση με LLD-ACV είναι αρνητικός κάτι που οφείλεται στην αναστολή που προκαλείται, ενώ ο δεύτερος συντελεστής ελαστικότητας έχει θετικό πρόσημο.
- Κατά τη χρονική διάρκεια μιας καλλιέργειας επέρχονται αλλαγές στις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις των μεταβολιτών της οδού, έτσι ώστε η υπόθεση της σταθερής κατάστασης (steady state) δεν ικανοποιείται πάντα. Παρόλα ταύτα, από τη χρονική ανάλυση του συστήματος φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών της οδού βρίσκονται σε ψευδο-σταθερή κατάσταση σε όλη την διάρκεια της καλλιέργειας, παρά τη σημαντική συσσώρευση του LLD-ACV (Pissara, et al., 1996).
- Έτσι, τα θεωρήματα της ανάλυσης του μεταβολικού ελέγχου μπορεί ακόμη να εφαρμοστούν και σε παροδικές μετρήσεις της γλουταθειόνης και των συγκεντρώσεων του LLD-ACV,



- οι συντελεστές ελαστικότητας υπολογίστηκαν σε διαφορετικούς χρόνους κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα



Συντελεστές ελαστικότητας για τα δύο ένζυμα (ACVS και IPNS) σε σχέση με το LLD-ACV κατά την διάρκεια της καλλιέργειας. Φαίνεται ότι ο συντελεστής ελαστικότητας για το ACVS είναι αρνητικός.

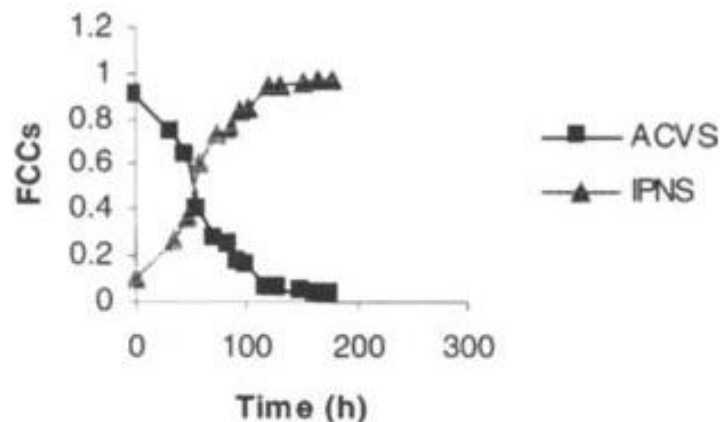
- Σημειώστε ότι ο συντελεστής ελαστικότητας για το ACVS είναι αρνητικός, δηλαδή, αύξηση της συγκέντρωσης των LLD-ACV μειώνει το ποσοστό του LLD-ACV που πλέον συντίθεται από το ACVS. Αντίστοιχα ο συντελεστής ελαστικότητας για το IPNS είναι θετικός, δηλαδή η επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης των LLD-ACV είναι θετική, αλλά το μέγεθος της μειώνεται κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας καθώς επέρχεται κορεσμός του IPNS με LLD-ACV.



- Οι συντελεστές ελέγχου ροής υπολογίστηκαν από τους συντελεστές ελαστικότητας χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο

$$\begin{pmatrix} C_1^J & C_1^X \\ C_2^J & C_2^X \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{\varepsilon_X^2}{\varepsilon_X^2 - \varepsilon_X^1} & \frac{1}{\varepsilon_X^2 - \varepsilon_X^1} \\ -\frac{\varepsilon_X^1}{\varepsilon_X^2 - \varepsilon_X^1} & -\frac{1}{\varepsilon_X^2 - \varepsilon_X^1} \end{pmatrix}$$

- Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.



- Αρχικά ο συντελεστής ελέγχου ροής για το ACVS είναι υψηλός (κοντά στο 1), καθώς υπάρχει πολύ μικρή αναστολή από το ενδιάμεσο LLD-ACV. Ωστόσο, όταν η συγκέντρωση του LLD-ACV αυξάνεται, ο έλεγχος της ροής σταδιακά μετατοπίζεται από το ACVS στο IPNS, και μετά από περίπου 70 h η ροή ελέγχεται κυρίως από IPNS. Με τη μετατόπιση της ροής ελέγχου από το ACVS στο IPNS, καθένα από τα δύο ένζυμα μπορεί να αναγνωρισθεί ως ρυθμοκαθοριστικό βήμα. Αυτό αποδεικνύει ότι οι συντελεστές ελέγχου ροής δεν είναι σταθεροί για μία δεδομένη οδό.

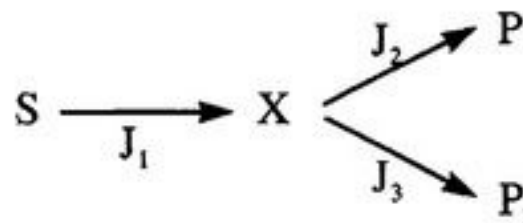


Εφαρμογή της ανάλυσης του μεταβολικού ελέγχου σε διακλαδωμένες οδούς

- Η εφαρμογή της ανάλυσης του μεταβολικού ελέγχου σε διακλαδωμένες οδούς συνεπάγεται έναν πρόσθετο βαθμό πολυπλοκότητας.
 - Πρώτον, ασχολούμαστε με περισσότερες από μία ροές, όπου κάθε μια από τις ροές μιας διακλαδωμένης οδού μπορεί να επηρεαστεί από οποιαδήποτε από τις ενζυμικές αντιδράσεις στο δίκτυο, απαιτώντας έτσι έναν πίνακα συντελεστών ελέγχου για την πλήρη περιγραφή της.
 - Δεύτερον, σε διακλαδωμένα μονοπάτια ο αριθμός των μεταβολιτών είναι μικρότερος από $L-1$ (L είναι ο αριθμός των αντιδράσεων). και τα θεωρήματα συνεκτικότητας και άθροισης σε γενικές γραμμές δεν παρέχουν επαρκή αριθμό εξισώσεων για τον υπολογισμό των συντελεστών ελέγχου από τους συντελεστές ελαστικότητας.
 - Σε τέτοιες οδούς, ωστόσο, οι ροές δεν είναι ανεξάρτητες, και εξισώσεις διατήρησης της μάζας, μεταξύ των ροών, προσφέρουν τους επιπλέον περιορισμούς που επιτρέπουν τον προσδιορισμό των συντελεστών ελέγχου από τις ελαστικότητες των ενζύμων.
 - Αυτοί οι περιορισμοί αναφέρονται ως **δομικές σχέσεις** (Reder, 1988), και καθορίζονται από την στοιχειομετρία των αντιδράσεων στο δίκτυο.



- Συνήθως υπάρχουν επαρκείς δομικές σχέσεις που να προμηθεύσουν τις εξισώσεις που λείπουν έτσι ώστε οι συντελεστές ελέγχου να μπορούν να υπολογιστούν από τους συντελεστές ελαστικότητας. Η γενική διατύπωση των δομικών σχέσεων είναι σχετικά πολύπλοκη. Για να διευκολυνθεί η παρουσίαση θα μελετήσουμε πρώτα ένα απλό διακλαδισμένο μονοπάτι όπως αυτό που παρουσιάζεται παρακάτω.



- Οι τρεις ροές J_1 , J_2 , J_3 δεν είναι ανεξάρτητες σε σταθερή κατάσταση, γιατί αλληλοεπιδρούν μέσω ενός ισοζυγίου μάζας γύρω από την οδό του μεταβολίτη X:

$$J_1 = J_2 + J_3$$

$$1 = f_{12} + f_{13}$$



- όπου f_{1k} είναι οι κλασματικές ροές που δίνονται από τον τύπο

$$f_{1k} = \frac{J_K}{J_1} \quad k \in \{2, 3\}$$

- Αν μια διαταραχή εισαχθεί έτσι ώστε η ροή J_2 να αλλάξει ενώ η J_1 παραμένει σταθερή, η δομική σχέση τους άμεσα δείχνει ότι η J_3 πρέπει επίσης να αλλάξει. Αυτό επιβάλλει μια πίεση στους συντελεστές ροής ελέγχου που για πρώτη φορά παρουσιάστηκε από τον Kacser (1983):

$$-f_{12}C_3^{J_1} + f_{13}C_2^{J_1} = 0$$

- Σε συνδυασμό με το αθροιστικό θεώρημα και το θεώρημα συνεκτικότητας αυτή η εξίσωση επιτρέπει τον υπολογισμό των συντελεστών ελέγχου ροής από τους συντελεστές ελαστικότητας και την κλασματική ροή μέσω ενός από τα μονοπάτια

$$\begin{pmatrix} C_1^{J_1} \\ C_2^{J_1} \\ C_3^{J_1} \end{pmatrix} = \frac{1}{\varepsilon_X^1 - f_{12}\varepsilon_X^2 - (1 - f_{12})\varepsilon_X^3} \begin{pmatrix} -f_{12}\varepsilon_X^2 - (1 - f_{12})\varepsilon_X^3 \\ f_{12}\varepsilon_X^1 \\ (1 - f_{12})\varepsilon_X^1 \end{pmatrix}$$



- Στην εξίσωση που παρουσιάστηκε από τον Kacser (1983) η ροή αναφοράς λαμβάνεται ως η J_1 εντούτοις παρόμοιες δομικές σχέσεις ισχύουν και για τους συντελεστές ελέγχου των άλλων δύο ροών της οδού:

$$(1 - f_{12})C_1^{J_2} + C_3^{J_2} = 0$$

$$f_{12}C_1^{J_3} + C_2^{J_3} = 0$$

- Συνδυασμός μιας από αυτές τις εξισώσεις με το αθροιστικό ή το θεώρημα συνεκτικότητας αποδίδει παρόμοιες εξισώσεις για τους συντελεστές ελέγχου των άλλων δύο ροών J_2 και J_3
- Σε πιο πολύπλοκες οδούς όπου αρκετές αντιδράσεις μπορούν να υπάρχουν σε κάθε σημείο διακλάδωσης, μπορούν να προκύψουν παρόμοιες εξισώσεις. οι Fell & Sauro (1985) υπολόγισαν την εξίσωση που φαίνεται παρακάτω και αφορά τους συντελεστές ελέγχου ροής των διαφόρων κλάδων που οδηγούν ή προέρχονται από ένα σημείο διακλάδωσης του μεταβολίτη X_j .
- Η ροή που λαμβάνεται ότι κατευθύνεται στον μεταβολίτη θεωρείται ως J_i και η κλασματική ροή μέσω του k κλάδου θεωρείται ως f_{ik} , δηλαδή, η ροή μέσα από αυτή τη διακλάδωση είναι η J_k .

$$-f_{1k} \sum_{\text{Branch } k} C_k^{J_i} + (1 - f_{ik}) \sum_{\text{Branch } m} C_m^{J_i} = 0$$



- Θεωρήστε ένα δίκτυο αντιδράσεων που περιλαμβάνουν K μεταβολίτες που συνδέονται με L ενζυμικές αντιδράσεις. Κάποιος μπορεί να γράψει τα ισοζύγια για τις K ροές, ένα για κάθε μεταβολίτη του δικτύου. Με την εισαγωγή του στοιχειομετρικού πίνακα $L \times K$ G και $L \times 1$ και του διανύσματος J , αυτά τα ισοζύγια ροής μπορούν να συνοψισθούν στην ακόλουθη εξίσωση

$$G^T J = 0$$

- Προφανώς, με την αναδιάταξη της εξίσωσης μπορούμε να καθορίσουμε τις K ροές (**οι εξαρτώμενες ροές**) ως γραμμικές συναρτήσεις των υπόλοιπων $L - K$ ροών (**οι ανεξάρτητες ροές**). Για να γίνει αυτό συλλέγουμε τις γραμμές του στοιχειομετρικού πίνακα που περιέχει τις εξαρτώμενες ροές σε έναν υποπίνακα G_c και τις υπόλοιπες σειρές στον υποπίνακα G_0 και ξαναγράφουμε την εξίσωση.

$$G_c^T J_{dep} + G_0^T J_{in} = 0$$

- Ο υποπίνακας G_c είναι τετράγωνικός και μη μοναδιαίος, και οι ανεξάρτητες ροές κατά συνέπεια μπορεί να υπολογιστεί από τις εξαρτώμενες ροές με χρήση της εξίσωσης

$$J_{dep} = - (G_c^T)^{-1} G_0^T J_{in}$$



- Με χρήση της παραπάνω εξίσωσης, όλες οι ροές μπορούν να προσδιοριστούν με όρους εξαρτημένων ροών ως εξής:

$$\mathbf{J} = \mathbf{L}^J \mathbf{J}_{in}$$

- Με τον πίνακα \mathbf{L}_J να δίνεται από τον τύπο

$$\mathbf{L}^J = \begin{pmatrix} \mathbf{I}_{L-K} \\ -(\mathbf{G}_c^T)^{-1} \mathbf{G}_0^T \end{pmatrix}$$

- Το σημείο εκκίνησης για την παραγωγή της εξίσωσης $\mathbf{C}^J = \mathbf{L}_F^J \mathbf{C}_{in}^J$ είναι η σχέση μεταξύ όλων των μεταβλητών του μονοπατιού και τις ανεξάρτητες ροές, όπως δίνεται από την εξίσωση $\mathbf{J} = \mathbf{L}^J \mathbf{J}_{in}$. Διαφοροποιημένη σε σχέση με E_i αποδίδει:

$$\frac{d\mathbf{J}}{dE_i} = \mathbf{L}^J \frac{d\mathbf{J}_{in}}{dE_i} \quad \text{'Η} \quad \frac{dJ_k}{dE_i} = \sum_{m=1}^{L-K} l_{km} \frac{dJ_{in,m}}{dE_i}$$

- Πολλαπλασιασμός με το $E_i | J_k$ προσφέρει

$$C_i^{J_k} = \sum_{m=1}^{L-K} l_{km} \frac{E_i}{J_k} \frac{J_m}{J_m} \frac{dJ_{in,m}}{dE_i} \quad \text{'Η} \quad C_i^{J_k} = \sum_{m=1}^{L-K} l_{km} \frac{J_m}{J_k} C_{in,i}^{J_m} = \sum_{m=1}^{L-K} l_{km} f_{km} C_{in,i}^{J_m}$$



- Καθότι $I_{km}f_{km}$ είναι στοιχεία της K γραμμής και M στήλης του πίνακα L_F^J παράγεται η εξίσωση

$$C^J = L_F^J C_{in}^J$$

- Όταν ο πίνακας L_F^J με τον πολλαπλασιασμό κάθε στοιχείου I_{jk} του L^J με την κλασματική ροή f_{jk} και με χρήση της εξίσωσης $C^J = P + E \cdot C^X$ τότε παραγεται η εξίσωση

$$L_F^J C_{in}^J = P + EC^X$$

- Η οποία μπορεί να αναδιαταχθεί σε

$$\begin{pmatrix} L_F^J & -E \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_{in}^J \\ C^X \end{pmatrix} = P$$

- Αυτή είναι η γενική εξίσωση για τον προσδιορισμό των συντελεστών ελέγχου από τους συντελεστές ελαστικότητας και τις κλασματικές ροές των διαφόρων κλάδων του μονοπατιού.



Θεώρημα των μεγάλων αποκλίσεων

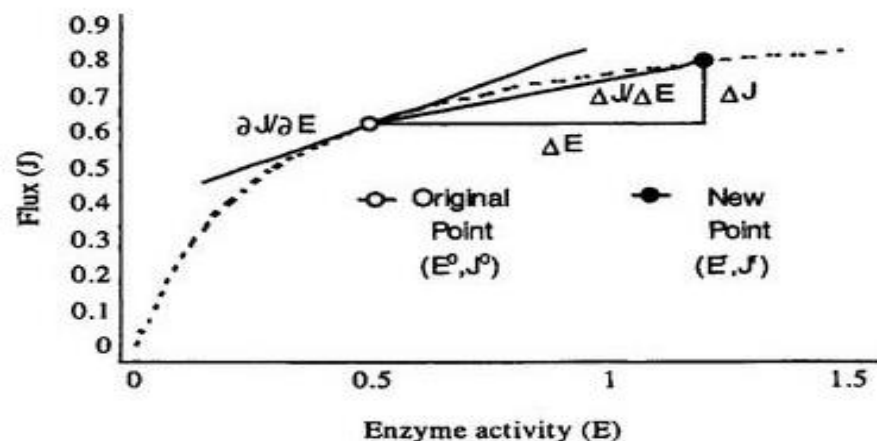
- Κεντρική θέση στην ανάλυση του μεταβολικού ελέγχου έχει ο καθορισμός των ελαστικοτήτων και των συντελεστών ελέγχου. Στην πραγματικότητα, οι βασικές σχέσεις μεταξύ αυτών των ποσοτήτων (δηλαδή, τα αθροίσματα και το θεώρημα συνεκτικότητας) αποτελούν άμεσο αποτέλεσμα της χρήσης αυτών των συντελεστών.
- Είναι σημαντικό να συνειδητοποιήσουμε, ωστόσο, ότι οι συντελεστές της ανάλυσης του μεταβολικού ελέγχου ορίζονται μόνο ως παράγωγα και, ως τέτοια, είναι άμεσα μετρήσιμα μόνο μέσω απειροελάχιστων αλλαγών των συστημικών μεταβλητών (δηλαδή, της συγκέντρωσης, δραστηριότητας και των ροών).
- Εναλλακτικά, λεπτομερής κινητικά μοντέλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον μαθηματικό υπολογισμό των απαιτούμενων παραγώγων, επιτρέποντας έτσι στο θεώρημα της ανάλυσης του μεταβολικού ελέγχου να χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των υπολοίπων ποσοτήτων.
- Συζητήσαμε νωρίτερα για τη δυσκολία να παραχθεί πειραματικά μια μικρή διαταραχή που να μην καταστρέψει το συνολικό πείραμα. Ρεαλιστικά, μια αλλαγή σε μια συστημική μεταβλητή μπορεί να ποσοτικοποιηθεί πειραματικά μόνο εάν είναι πάνω από ένα μετρήσιμο όριο και ως εκ τούτου, περιορισμένης αξιοπιστίας καθότι όσο μεγαλύτερη είναι η διαταραχή, τόσο μικρότερο είναι το πειραματικό σφάλμα.



- Είναι επιθυμητό να προσπαθήσουμε να υπολογίσουμε τους συντελεστές ελέγχου από μεγάλες συστημικές διαταραχές, με την προϋπόθεση, βεβαία, ότι οι υπολογισμοί παρέχουν ακριβείς εκτιμήσεις των συντελεστών ελέγχου.
- Μέχρι πρόσφατα, δεν υπήρχε διαθέσιμη μέθοδος η οποία θα μπορούσε να αφορά περιορισμένης αξιοπιστίας πειραματικά αποτελέσματα για τους συντελεστές της ανάλυσης του μεταβολικού ελέγχου. Εντούτοις ένα νέο σύνολο σχέσεων, που αναπτύχθηκε ως προέκταση της ανάλυσης αυτής (Small και Kacsar, 1993), επιτρέπει μεγάλες αποκλίσεις από μια σταθερή κατάσταση να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των συντελεστών ελαστικότητας και ελέγχου.
- Η ροή μέσω ενός μη διακλαδισμένου μονοπατιού αυξάνεται όταν ενισχύεται ένα συγκεκριμένο ένζυμο. Ο βαθμός της ενίσχυση της ροής που επιτυγχάνεται εξαρτάται από το βαθμό του ελέγχου που ασκείται από την αρχική δραστηριότητα, όπως αυτή ορίζεται από τους συντελεστές ελέγχου ροής στην αρχική δραστηριότητα.
- Σύμφωνα με τον ορισμό των συντελεστών ελέγχου ροής για ένα συγκεκριμένο ένζυμο ο συντελεστής λαμβάνεται από μια απειροελάχιστη αλλαγή στη δραστηριότητα του εν λόγω ενζύμου με τον προσδιορισμό της κλίσης της αντίστοιχης καμπύλης ροής-δραστηριότητα και πάντα κατά τη σταθερή κατάσταση.



- Είναι σαφές ότι, σε χαμηλή ενζυμική δραστηριότητα ενός ενζύμου επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη ροή στην οδό. Αυτό αντανακλάται από μια μεγάλη τιμή στον συντελεστή ελέγχου ροής.
- Σε υψηλότερες δραστηριότητες ωστόσο, ένα ένζυμο έχει μικρή επίδραση επί της ροής, με αποτέλεσμα μια μικρή τιμή ελέγχου ροής.
- Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι διαφορετικές αριθμητικές τιμές για τον συντελεστή ελέγχου ροής λαμβάνονται σε διάφορες δραστηριότητες και στα διάφορα τμήματα της καμπύλης ροής – δραστηριότητας. Μια σημαντική αλλαγή στη δραστηριότητα ενός ενζύμου, από την άλλη πλευρά, θα προκαλούσε μεταβολή μόνο στην κλίση της καμπύλης ροής-δραστηριότητα με αποτέλεσμα ανακριβείς τιμές για τον συντελεστή ροής ελέγχου.
- Εξετάστε το αποτέλεσμα μιας μεγάλης αλλαγής στη δραστηριότητα ενός ενζύμου, όπως υποδεικνύεται στο παρακάτω σχήμα. Σαφώς, η κλίση αυτής της αλλαγής, μετράτε με d^J / dE , και βρίσκεται μακριά από το $\Delta^J / \Delta E$ το οποίο αποτελεί το αρχικό σημείο. Ως εκ τούτου, μία μέθοδος είναι αναγκαία για να διευκολύνει τον προσδιορισμό του πραγματικού συντελεστή ροής από πειράματα διαταραχής. Η λύση σε αυτή την φαινομενική δυσαρμονία θα γίνει εμφανής, μέσω της χρήσης της μεθόδου των Little & Kacser ή **θεωρία των μεγάλων αποκλίσεων**.





Βάση της θεωρία των μεγάλων Αποκλίσεων

- Δεν είναι δυνατόν να περιγραφεί πλήρως μια αυθαίρετη σχέση μεταξύ της ροής και του ενζύμου, καθότι γενικά είναι πολύ πολύπλοκη και μη γραμμική. Έτσι είναι σωστό να καθοριστεί το απλούστερο σύστημα που αποδίδει την αναμενόμενη σχέση ροής-ενζύμου όπως απεικονίζεται στο σχήμα της προηγούμενης διαφάνειας. Ως εκ τούτου, οι Small & Kacser (1993) απλοποίησαν την τυπική διατύπωση για την ταχύτητα v μιας αντιστρεπτής μονομοριακής ενζυμικής μετατροπής του X_i σε X_j :

$$v = \frac{E \cdot k_{\text{cat}} \left(c_i - \frac{c_j}{K} \right)}{1 + \frac{c_i}{K_{m_i}} + \frac{c_j}{K_{m_j}}}$$

- Σε μια κατά προσέγγιση γραμμική μορφή σε σχέση με τη δραστηριότητα του ενζύμου:

Στην οποία
$$v = e \left(c_i - \frac{c_j}{K} \right)$$

$$e = \frac{E \cdot k_{\text{cat}}}{K_{m_i} k_s} = \frac{v_{\text{max}}}{K_{m_i} k_s}$$

Όπου

$$k_s = 1 + \frac{c_i}{K_{m_i}} + \frac{c_j}{K_{m_j}} \cong \text{constant}$$



- Στις προηγούμενες εξισώσεις η παράμετρος K_{cat} είναι η σταθερά ρυθμού αντίδρασης για το προϊόν που παράγεται μέσω ενός μηχανισμού Michaelis-Menten, και οι παράμετροι K_m είναι οι σταθερές ισορροπίας των πολύπλοκων αντιδράσεων σχηματισμού-διάσπασης ενζύμου-υποστρώματος.
- Η σταθερά κορεσμό K_s είναι σταθερή υπό τις ακόλουθες προϋποθέσεις:
 - (α) αν $c_i \ll K_{mi}$ και $C_J \ll K_m$ όταν $K_s \cong 1$
 - (β) εάν δεν υπάρχει σημαντική μεταβολή στον κορεσμό του ενζύμου σε σχέση με το υπόστρωμα που προκύπτει μέσω των αλλαγών στην ενζυμική δραστηριότητα.
 - Μέσω της εφαρμογής του θεωρήματος των μεγάλων αποκλίσεων σε πολλά συστήματα, η απλούστευση αυτή αποδείχθηκε εκ των υστέρων ότι ισχύει για ένα ευρύ φάσμα συνθηκών (Little και Kacser, 1993). Εάν οι σταθερές στην

$$v = e \left(c_i - \frac{c_j}{K} \right)$$

εξίσωση

συνδυαστούν περαιτέρω, είναι σαφές ότι αυτή η μορφή είναι ισοδύναμη με μια αντιστρεπτή αντίδραση πρώτης τάξης:

$$v = kc_i - k_{-1}c_j$$

- Θεωρήστε τώρα ένα μονοπάτι που περιλαμβάνει μια γραμμική σειρά αντιδράσεων μετατροπή X_0 να X_n :





- και υποθέστε ότι η ταχύτητα αντίδρασης του καθενός από τα στάδια της αντίδρασης δίνεται από μια εξίσωση παρόμοια με την

$$v = e \left(c_i - \frac{c_j}{K} \right)$$

στην οποία η δραστηριότητα και η σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο I είναι e_i και K_i , αντίστοιχα. Η ροή J μέσω μιας τέτοιας οδού μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι ίση με

$$J = \frac{c_0 - \frac{c_n}{K_{1:n}}}{\frac{1}{e_1} + \frac{1}{e_2 K_1} + \frac{1}{e_3 K_{1:2}} + \Lambda + \frac{1}{e_n K_{1:n}}}$$

Στην οποία

$$K_{1:n} = \prod_{i=1}^n K_i$$

Σημειώστε ότι αυτή η εξίσωση της ροής είναι μη γραμμική σε σχέση με τη δραστηριότητα οποιουδήποτε συγκεκριμένου ενζύμου. Στην πραγματικότητα, η εξίσωση αυτή μπορεί να ξαναγραφτεί ως συνάρτηση της δραστηριότητας οποιουδήποτε ενζύμου E_i , με αποτέλεσμα την παρακάτω σχέση

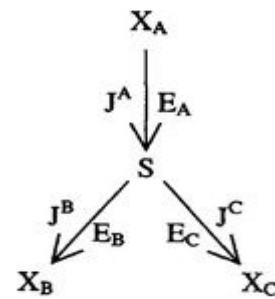
$$J = \frac{E_i \cdot \chi_1}{1 + E_i \cdot \chi_2}$$

- στην οποία χ_1 και χ_2 είναι διαφορετικές για κάθε ένζυμο, αλλά πάντα αποτελούνται από σταθερές στη μορφή κινητικών σταθερών και σταθερών εξωτερικών συγκεντρώσεις.



Διακλαδισμένα δίκτυα

- Τα μεταβολικά δίκτυα περιλαμβάνουν γενικά σημεία διακλάδωσης, στα οποία ένα S μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε δύο διαφορετικές οδούς, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα



- Στην πραγματικότητα, σχεδόν κάθε αρχιτεκτονική του δικτύου μπορεί να κατασκευαστεί με τη σύνδεση διαφορετικών αντιδράσεων σε συγκεκριμένα σημεία διακλάδωσης,
- Ορισμένα δίκτυα ενδέχεται να περιλαμβάνει συγκλίνουσα σημεία στα οποία το S παράγεται από δύο διαφορετικές οδούς για να αξιοποιηθεί στη συνέχεια μόνο από ένα μονοπάτι. Λόγω της απλουστευτικής υπόθεσης της ευθυγραμμιστικής κινητικής που χρησιμοποιείται, η μαθηματική επεξεργασία ενός σημείου διακλάδωσης με χρήση της θεωρίας των μεγάλων αποκλίσεων προσφέρει τις παρακάτω περιπτώσεις



$$v_A = E_A \cdot \left(c_A - \frac{c_S}{K_A} \right)$$

$$v_B = E_B \cdot \left(c_S - \frac{c_B}{K_B} \right)$$

$$v_C = E_C \cdot \left(c_S - \frac{c_C}{K_C} \right)$$

- Στη διαμόρφωση διακλαδισμένων δικτύων, η θεωρία των μεγάλων αποκλίσεων χρησιμοποιεί γραμμικοποιημένη κινητική με τη μορφή της εξίσωσης. $v = e \left(c_i - \frac{c_j}{K} \right)$

όπως ακριβώς και στην περίπτωση των μη διακλαδισμένων. Κατά συνέπεια, κάθε κλάδος μπορεί να εκφράζεται από μια πρώτης τάξεως, αντιστρεπτή κινητική.

Εντούτοις, προκειμένου να προσδιοριστεί η σταθερή κατάσταση είναι απαραίτητο να αξιοποιηθεί η ισορροπία γύρω από το σημείο διακλάδωσης του μεταβολίτη S:

$$J_A = J_B + J_C$$



- Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα από την ανάλυση των μη διακλαδισμένο οδών, αυτή η ανάλυση αποκάλυψε ότι οι δείκτες απόκλισης σε ένα διακλαδισμένο σύστημα δεν είναι απαραίτητα ίσες με τους αντίστοιχους συντελεστές ελέγχου ροής
- Εάν μια δραστηριότητα E_i ενισχύεται κατά ένα συντελεστή r_i , η γενική έκφραση για το δείκτη απόκλισης της επίδρασης επί της ροής J_k σε όρους ελέγχου ροής δίνεται από τον τύπο

$$D_i^{J_k} \equiv C_i^{J_k} \cdot F_i^k \quad i, k \in \{A, B, C\}$$

– Όπου

$$F_i^k = \frac{1}{1 - (C_i^{J_i} - C_i^{J_k}) \frac{r_i - 1}{r_i}} \quad i, k \in \{A, B, C\}$$

Έτσι, ο συντελεστής απόκλισης διαφέρει από τον αντίστοιχο συντελεστή ελέγχου ροής με τον συντελεστή F_i^k να εξαρτάται όχι μόνο από τη ροή του παράγοντα ενίσχυσης αλλά επίσης από τους δύο συντελεστές ελέγχου ροής. Σημειώστε, ωστόσο, ότι αν $i = k$ (δηλαδή, όταν η επίδραση της μεταβολής της δραστηριότητας του ίδιου κλάδου στην ροή του), $i^k = 1$, και όταν ο δείκτης απόκλιση είναι ίσος με τη ροή του συντελεστή ελέγχου τότε

$$D_i^{J_i} \equiv C_i^{J_i} \quad i \in \{A, B, C\}$$



Πρόβλεψη των αλλαγών στη ροή

- Μόλις γίνουν γνωστοί οι συντελεστές ελέγχου ροής για έναν ή περισσότερους κλάδους περιμετρικά από το σημείο διακλάδωσης του μεταβολίτη, είναι δυνατή η πρόβλεψη των επιδράσεων ορισμένων διαταραχών στο σύστημα.
- Για μια αλλαγή σε ένα μόνο κλάδο i , που χαρακτηρίζεται από ένα συντελεστή ενίσχυσης δραστηριότητα r_i , η αναμενόμενη μεταβολή της ροής για όλους τους τρεις κλάδους μπορεί να καθοριστεί όπως:

$$f_i^k = \frac{1}{1 - C_i^{Jk} \left(\frac{r_i - 1}{r_i} \right)} \quad k \in \{A, B, C\}$$

- Το οποίο μπορεί να αναδιαμορφωθεί σε:

$$\frac{f_i^k - 1}{f_i^k} = C_i^{Jk} \left(\frac{r_i - 1}{r_i} \right) \quad k \in \{A, B, C\}$$

- Αλλά και

$$\frac{f_{ABC}^k - 1}{f_{ABC}^k} = \sum_i C_i^{Jk} \left(\frac{r_i - 1}{r_i} \right) \quad i, k \in \{A, B, C\}$$



Απόκριση στις συγκεντρώσεις θρεπτικών

- Εκτός από την περιγραφή των επιπτώσεων λόγω μεταβολών στη δραστηριότητα των ενζύμων, το θεώρημα των μεγάλων αποκλίσεων μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει μεταβολές στη ροή που προκύπτει από τις αλλαγές στις συγκεντρώσεις των εξωτερικών θρεπτικών συστατικών αλλά και άλλων αναγκαίων υλικών (Little & Kacser, 1993).
- Οποιαδήποτε τέτοιο υλικό θεωρείται ότι ενεργεί ασκώντας πίεση σε ένα ή περισσότερα ένζυμα, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν αλλαγές στη σταθερή κατάσταση του μονοπατιού.
- Εάν είναι γνωστές οι μεταβολές που προκαλούνται στις διαφορετικές ενζυμικές αντιδράσεις, τότε ακολουθώντας τις μεθόδους που παρουσιάστηκαν προηγουμένως μπορούν να προσδιοριστούν οι αλλαγές στο ρυθμό.
- Εάν οι μεταβολές στο ρυθμό δεν είναι γνωστές, οι αλλαγές στη ροή μπορούν να εκφραστούν με όρους συντελεστή απόκρισης. Εάν η κινητική επίδραση επί του ενζύμου E_k χαρακτηρίζεται από μεγάλη ελαστικότητα, ο συντελεστής απόκρισης μπορεί να εκφραστεί μέσω της εξίσωση

$$R_{X_j}^I = C_k^I \epsilon_{X_j}^k, \quad i, k \in \{1, 2, \dots, L\}, j \in \{1, 2, \dots, K\}$$



- Αν υποθέσουμε ότι ο τελεστής, X_0 είναι το εξωτερικό υπόστρωμα μίας μη διακλαδισμένης οδού, έτσι η αρχική ροή αντιπροσωπεύεται από τον τύπο

$$J^0 = \frac{E_1^0 \cdot \left(c_0 - \frac{c_n}{K_{1:n}} \right)}{1 + E_1^0 \cdot \chi_2}$$

- και η διαταραγμένη ροή από τον τύπο

$$J^x = \frac{E_1^0 \cdot \left(x_0 \cdot c_0 - \frac{c_n}{K_{1:n}} \right)}{1 + E_1^0 \cdot \chi_2}$$

- Όπου x_0 είναι ο συντελεστής βάση του οποίου το C_0 , η συγκέντρωση του X_0 , άλλαξε (ο παράγοντας ενίσχυσης τελεστή). Χρησιμοποιώντας την πρώτη Εξίσωση στη διαφάνεια για τον ορισμό του συντελεστή απόκρισης αποδίδεται η ακόλουθη έκφραση:



$$R_{X_0}^J = \frac{c_0}{c_0 - \frac{c_n}{K_{1:n}}}$$

- Προκειμένου η διαταραχή αυτή να επεκταθεί και να αφορά ποιο εκτεταμένες καταστάσεις η ακόλουθη σχέση μπορεί να παραχθεί αξιοποιώντας της τρεις προηγούμενες εξισώσεις:

$$\frac{\Delta J}{\Delta c_0} = \frac{J^x - J^0}{x_0 \cdot c_0 - c_0} = \frac{E_1^0}{1 + E_1^0 \cdot X_2}$$

- Με σύγκριση των δύο προηγούμενων εξισώσεων, είναι προφανές ότι ο συντελεστής απόκρισης μπορεί να καθοριστεί με την εξομάλυνση της πρώτης εξισώσεως σε C_0 / J_0 και ως εκ τούτου,

$$R_{X_0}^J = \frac{\Delta J}{\Delta c_0} \cdot \frac{c_0}{J^0}$$



Συζήτηση

- Το θεώρημα των μεγάλων αποκλίσεων είναι ένα ισχυρό εργαλείο που διευρύνει τα όρια της μεταβολικής ανάλυσης στο μετρήσιμο χώρο του πειράματος. Παρ'όλα αυτά, μερικές αναφορές πρέπει να γίνουν όσον αφορά τα αποτελέσματα αυτής της θεωρίας. - μεθόδου
- Κατ αρχάς, θα πρέπει να τονιστεί ότι οι προηγούμενες εξισώσεις προήλθαν χρησιμοποιώντας μια απλουστευμένη, πρώτης τάξης προσέγγιση της κινητικής του ενζύμου. Κατά συνέπεια, ένα σύστημα που εμφανίζει γραμμική κινητική μπορεί να δώσει διαφορετικά αποτελέσματα όταν χρησιμοποιούνται αυτές οι εξισώσεις .
- Στην αιτιολόγηση της εργασίας τους, οι Little & Kacser (1993b) χρησιμοποίησαν πολλά μη γραμμικά μοντέλα για να δοκιμαστεί η συνοχή της ανάλυσής τους, με καλά αποτελέσματα. Εντούτοις η μελέτη και η διασταύρωση των αποτελεσμάτων είναι απαραίτητη
- Αυτό συχνά μπορεί να γίνει απλά με την επανάληψη του υπολογισμού χρησιμοποιώντας δύο ή περισσότερες διαφορετικές συγκεντρώσεις . Επιπλέον, η εκτίμηση του σφάλματος στον υπολογισμό του συντελεστή ελέγχου ροής που προκύπτουν από τις αβεβαιότητες μετρήσεων μπορεί εύκολα να προσδιοριστεί (Little και Kacser, 1993b).



- Τέλος, είναι κρίσιμο να κατανοήσουμε τα όρια της εφαρμογής αυτής της θεωρίας. Η μείωση της δραστηριότητας οποιουδήποτε ενζύμου σε μηδέν για παράδειγμα, προβλέπεται να εξαλείψει οποιαδήποτε ροή για την οποία ο αντίστοιχος συντελεστής ελέγχου ροής είναι θετικός παρ'όλα αυτά, εάν το εξασθενημένο ένζυμο είναι στον κλάδο B μιας διακλαδισμένης οδού, η ροή μέσω του κλάδου A δεν θα μειωθεί στο μηδέν, όσο κάποια δραστηριότητα παραμένει στον κλάδο C.
- Αυτές οι εξισώσεις μπορούν επίσης να προβλέψουν αρνητικές συγκεντρώσεις ή αρνητικές ροές μέσω μη αντιστρεπτών αντιδράσεων. Ως εκ τούτου η κοινή λογική θα πρέπει να σας βοηθά να αναγνωρίζετε πότε οι ροές των συντελεστών ελέγχου είναι αναξιόπιστες απόρροια του πειραματικού σφάλματος ή της έλλειψης γραμμικότητα.



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



www.enve-lab.eu

A connectivity perspective to environmental health