

www.biophys.msu.ru

Модели нелинейного мира

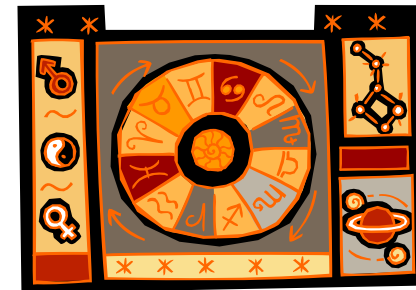
Лекция 11

Галина Юрьевна Ризниченко

Каф. биофизики Биологического ф-та Московского
государственного университета им.
М.В.Ломоносова, к.119

тел: +7(495)9390289; факс: (495)9391115;

E-mail: riznich@biophys.msu.ru



<http://mathbio.professorjournal.ru/mnw>

Моделирование метаболических путей

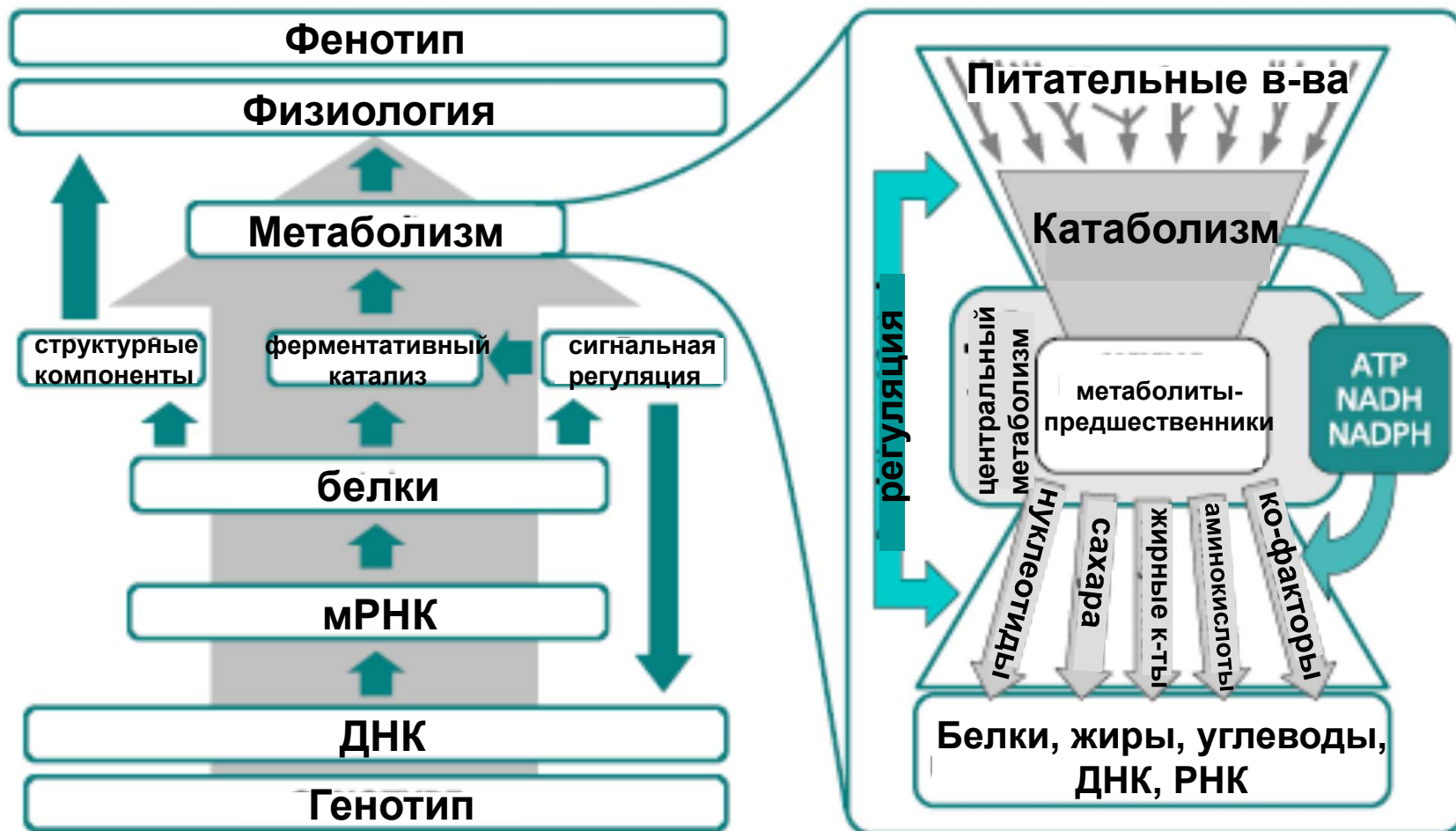
Плюснина Татьяна Юрьевна
Доц-т каф. биофизики
Биологического ф-та МГУ

Метаболизм (от греч. μεταβολή — «превращение, изменение»), — набор химических реакций, которые протекают в живом организме и способствуют поддержанию жизни.

Метаболический путь — совокупность метаболических реакций

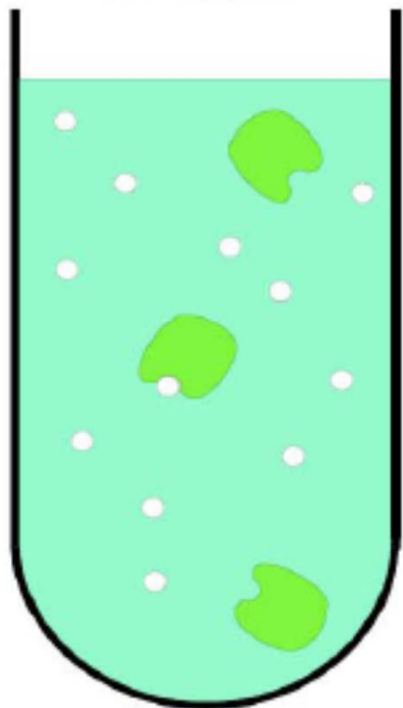
Метаболиты — субстраты и продукты, участвующие в реакциях

Организация клеточного метаболизма



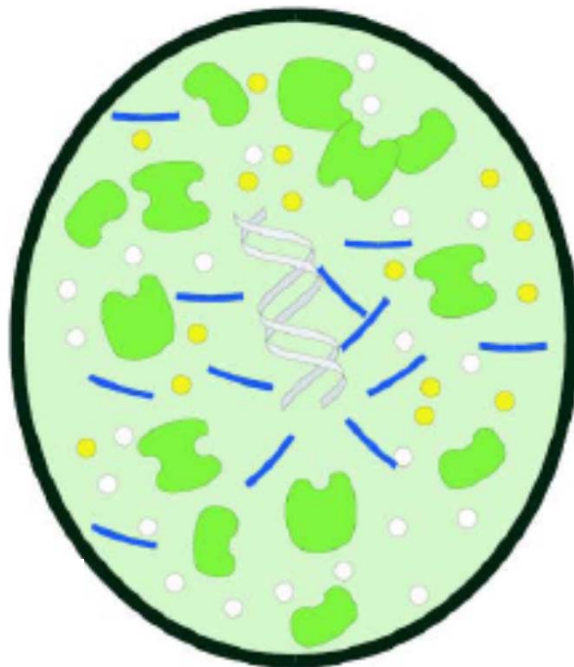
Уровни исследования метаболических реакций

In vitro



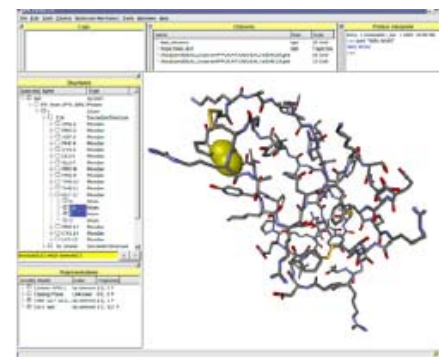
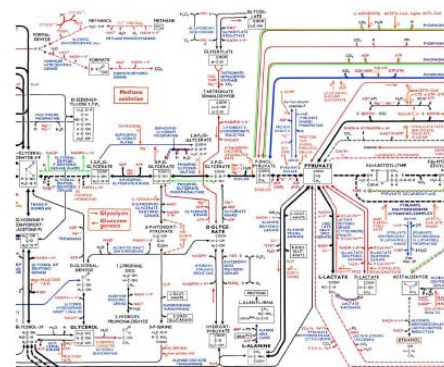
свойства отдельных метаболитов и их динамика

In vivo



описание характеристик метаболизма клетки в целом

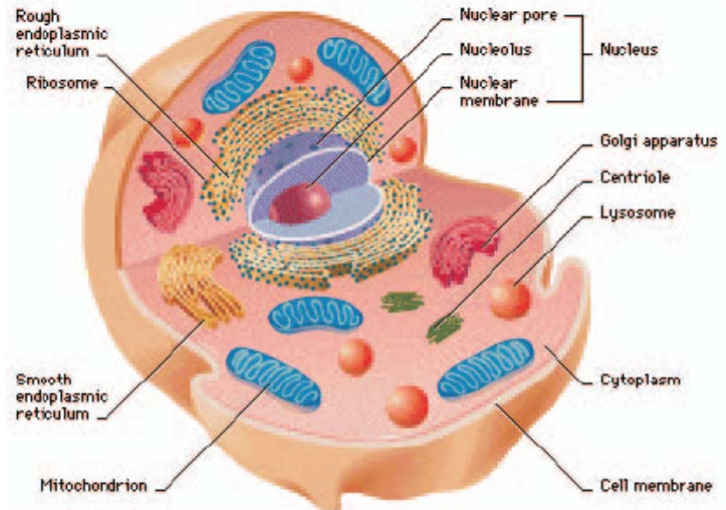
In silico



построение «электронной клетки»

Разные уровни сложности организации клеток

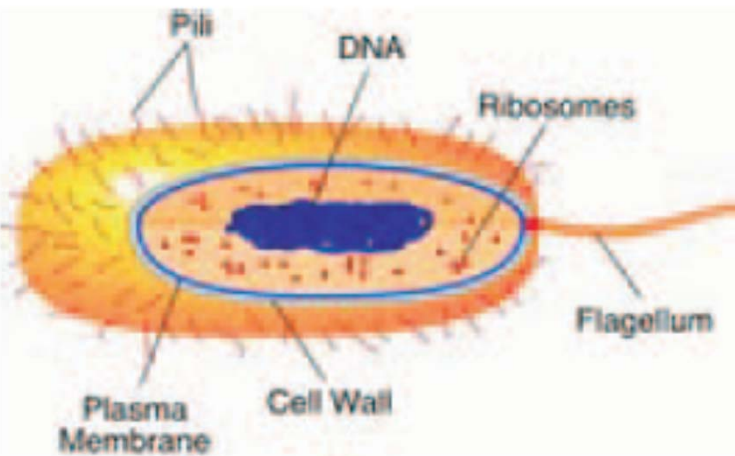
Клетка эукариот



Клеточные процессы локализованы в разных компартментах

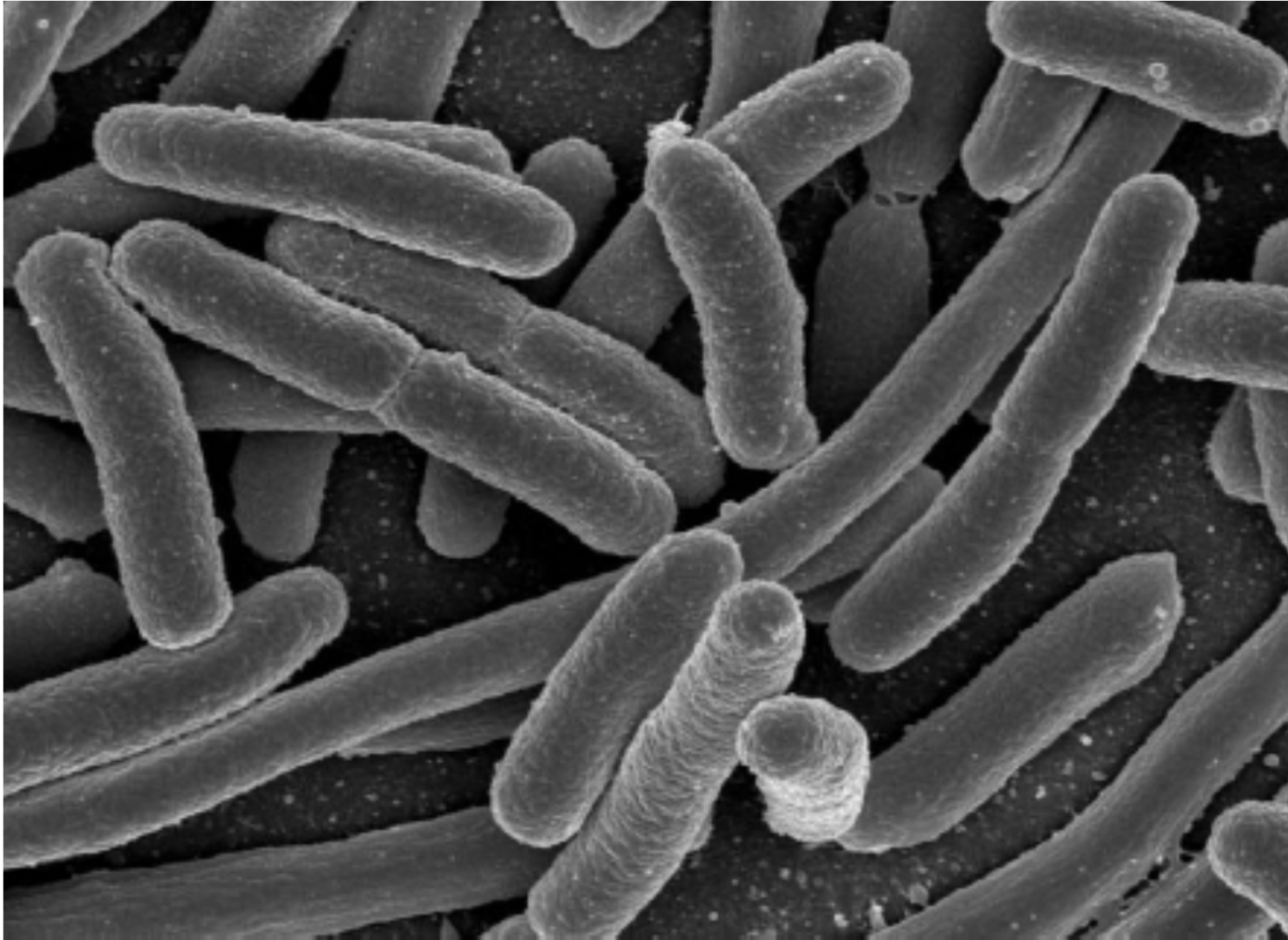
Первые модели – модели клеток прокариот

Клетка прокариот



Все процессы протекают в одном компартменте

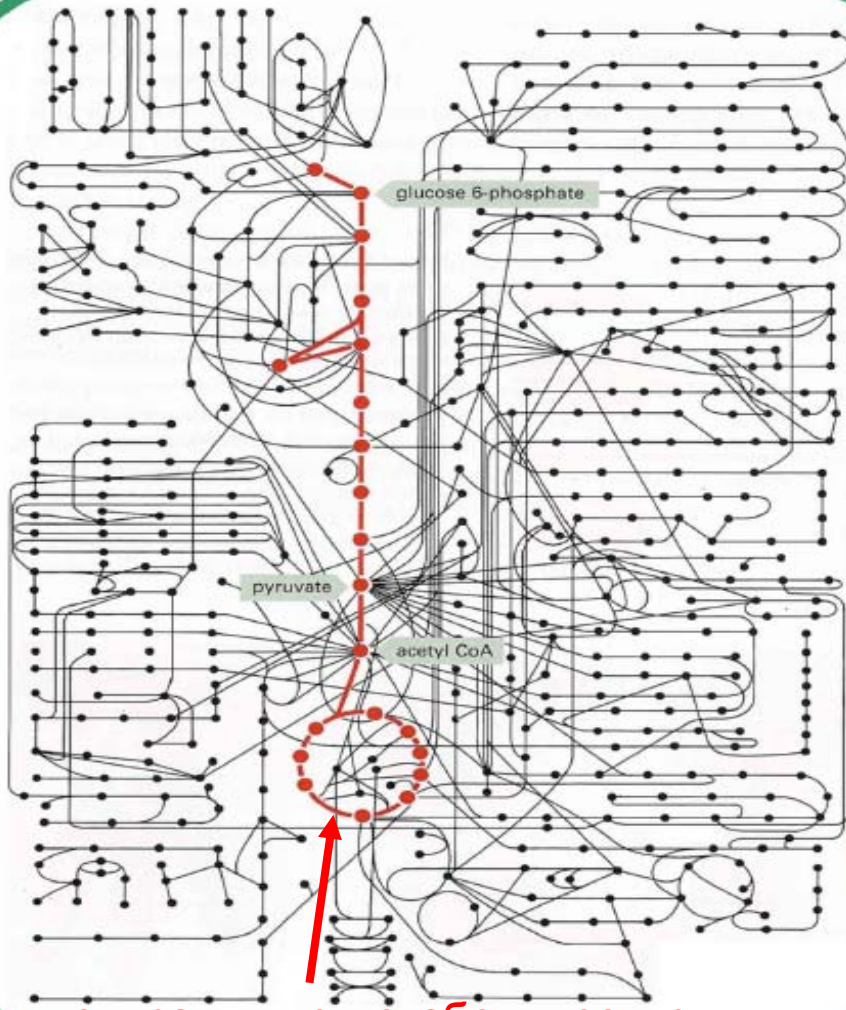
Escherichia coli



http://www3.niaid.nih.gov/NR/rdonlyres/49477C30-0513-47BE-88FC-17974CB1F952/0/e_coli.jpg

Escherichia coli – удобный объект для моделирования
клеточного метаболизма

Метаболические пути *Escherichia coli*



центральные метаболические пути

720 метаболических процессов
436 метаболитов
540 ферментов

**Описание метаболизма
включает:**

- мембранные транспортные процессы
- центральные катаболические пути
- биосинтетические пути (продукция всех компонент биомассы)

Представление метаболических путей

Центральные метаболические пути

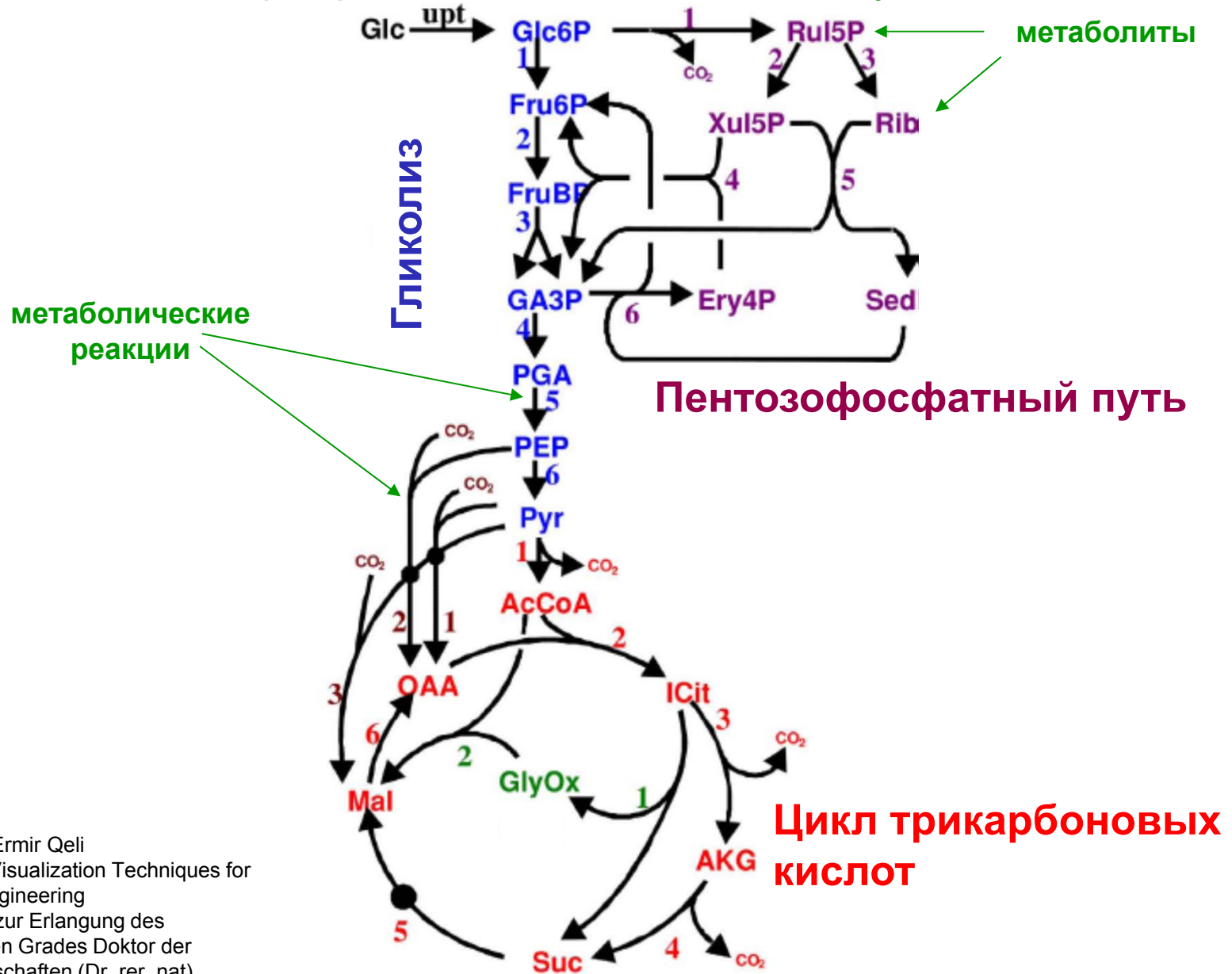


Figure from Ermir Qeli
Information Visualization Techniques for
Metabolic Engineering
Dissertation zur Erlangung des
akademischen Grades Doktor der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

Цели и задачи метаболического моделирования

Научные задачи:

- исследование механизмов клеточной регуляции в сложных биохимических системах
- объяснение экспериментально установленных фактов и предсказание новых ещё не выявленных внутриклеточных явлений
- систематизация накопленных экспериментальных данных

Биоинженерные задачи:

- оптимизация получения необходимых веществ из бактериальных клеток и других организмов
- разработка новых штаммов с наперед заданными свойствами
- разработка новых лекарств

Построение метаболической модели:

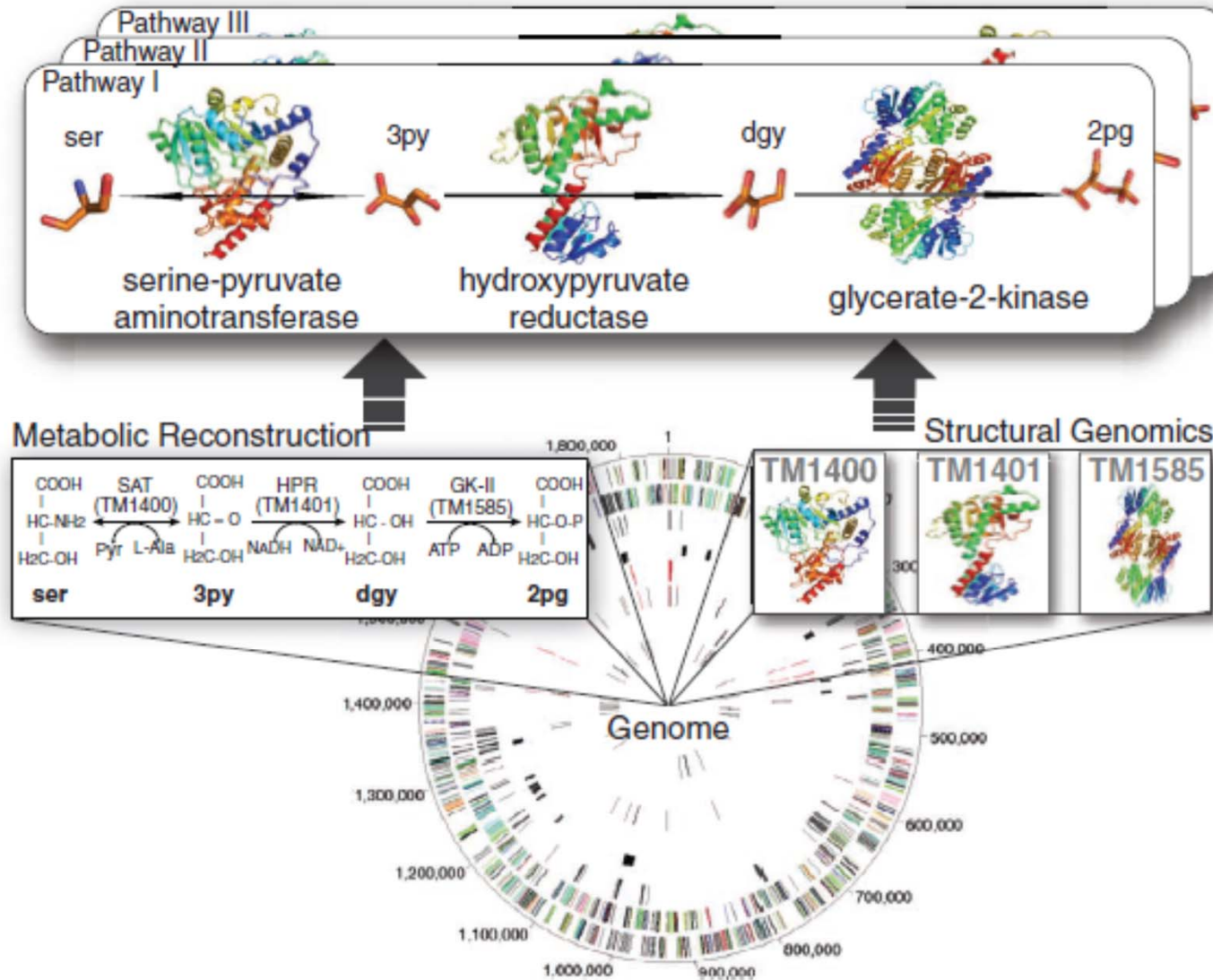
реконструкция метаболических путей:

построение общей схемы метаболических путей

математическое описание:

вывод уравнений скорости и построение системы уравнений в соответствии с метаболической картой

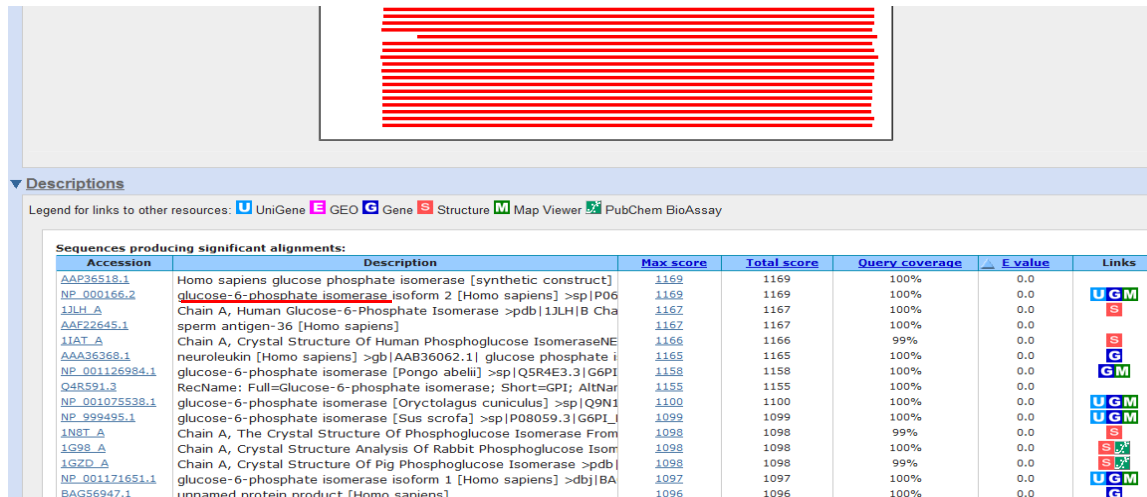
Реконструкция метаболических путей



Пример аминокислотной последовательности

MAALTRDPQFQKLQQWYREHRSELNLRRLFDANKDRFNHFSLTNTNHHGHILVDYSKNLVTEDVMRMLVDLAKSRGVEAA
RERMFNGEKINYTEGRAVLHVALRNRSNTPILVDGKDVMPVNVKVLDDKMKSFQQRVRSQDWKGYTGKTITDVINIGIGGSD
LGPLMVTEALKPYSSGGPRVWYVSNIDGTHIAKTLAQLNPESLFIASKTFTTQETITNAETAKEWFLQAAKDPSAVA
KHFVALSTNTTKVKEFGIDPQNMFEFWDWVGGRYSLWSAIGLSIALHVGFDNFEQLLSGAHWMDQHFRTTPLEKNAPVLL
ALLGIWYINCFGCETHAMLPYDQYLHRFAAYFQQGDMESNGKYITKSGTRVDHQTGPVWGEPTNGQHAFYQLIHQGT
KMIPCDLIPVQTHPIRKGLHHKILLANFLAQTEALMRGKSTEEARKELQAAGKSPEDLERLLPHKVFEGNRPTNSIVFT
KLTPFMLGALVAMYEHKIFVQGIWDINSFDQWGVELGKQLAKKIEPELDGSAQVTSHDASTNGLINFIKQQREARVQ

BLAST База данных по сравнению последовательностей



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Links
AAP36518.1	Homo sapiens glucose phosphate isomerase [synthetic construct]	1169	1169	100%	0.0	
NP_000166.2	glucose-6-phosphate isomerase isoform 2 [Homo sapiens] >sp P06	1169	1169	100%	0.0	UGM
1JLH_A	Chain A, Human Glucose-6-Phosphate Isomerase >pdb 1JLH B Cha	1167	1167	100%	0.0	S
AAF22645.1	sperm antigen-36 [Homo sapiens]	1167	1167	100%	0.0	
1IAT_A	Chain A, Crystal Structure Of Human Phosphoglucose IsomeraseNE	1166	1166	99%	0.0	S
AAA36368.1	neuroleukin [Homo sapiens] >gb AAB36062.1 glucose phosphate i	1165	1165	100%	0.0	G
NP_001126984.1	glucose-6-phosphate isomerase [Pongo abelii] >sp Q5R4E3.3 G6PI	1158	1158	100%	0.0	GM
Q4R591.3	RecName: Full=Glucose-6-phosphate isomerase; Short=GPI; AltNar	1155	1155	100%	0.0	
NP_001075538.1	glucose-6-phosphate isomerase [Oryctolagus cuniculus] >sp Q9N1	1100	1100	100%	0.0	UGM
NP_999495.1	glucose-6-phosphate isomerase [Sus scrofa] >sp P08059.3 G6PI_	1099	1099	100%	0.0	UGM
1N8T_A	Chain A, The Crystal Structure Of Phosphoglucose Isomerase From	1098	1098	99%	0.0	S
1G98_A	Chain A, Crystal Structure Analysis Of Rabbit Phosphoglucose Isom	1098	1098	100%	0.0	S
1GZD_A	Chain A, Crystal Structure Of Pig Phosphoglucose Isomerase >pdb	1098	1098	100%	0.0	S
NP_001171651.1	glucose-6-phosphate isomerase isoform 1 [Homo sapiens] >dbj BA	1097	1097	100%	0.0	UGM
BAG56947.1	unnamed protein product [Homo sapiens]	1096	1096	100%	0.0	G

фермент, соответствующий выбранной последовательности

glucose-6-phosphate isomerase

реакция, катализируемая ферментом

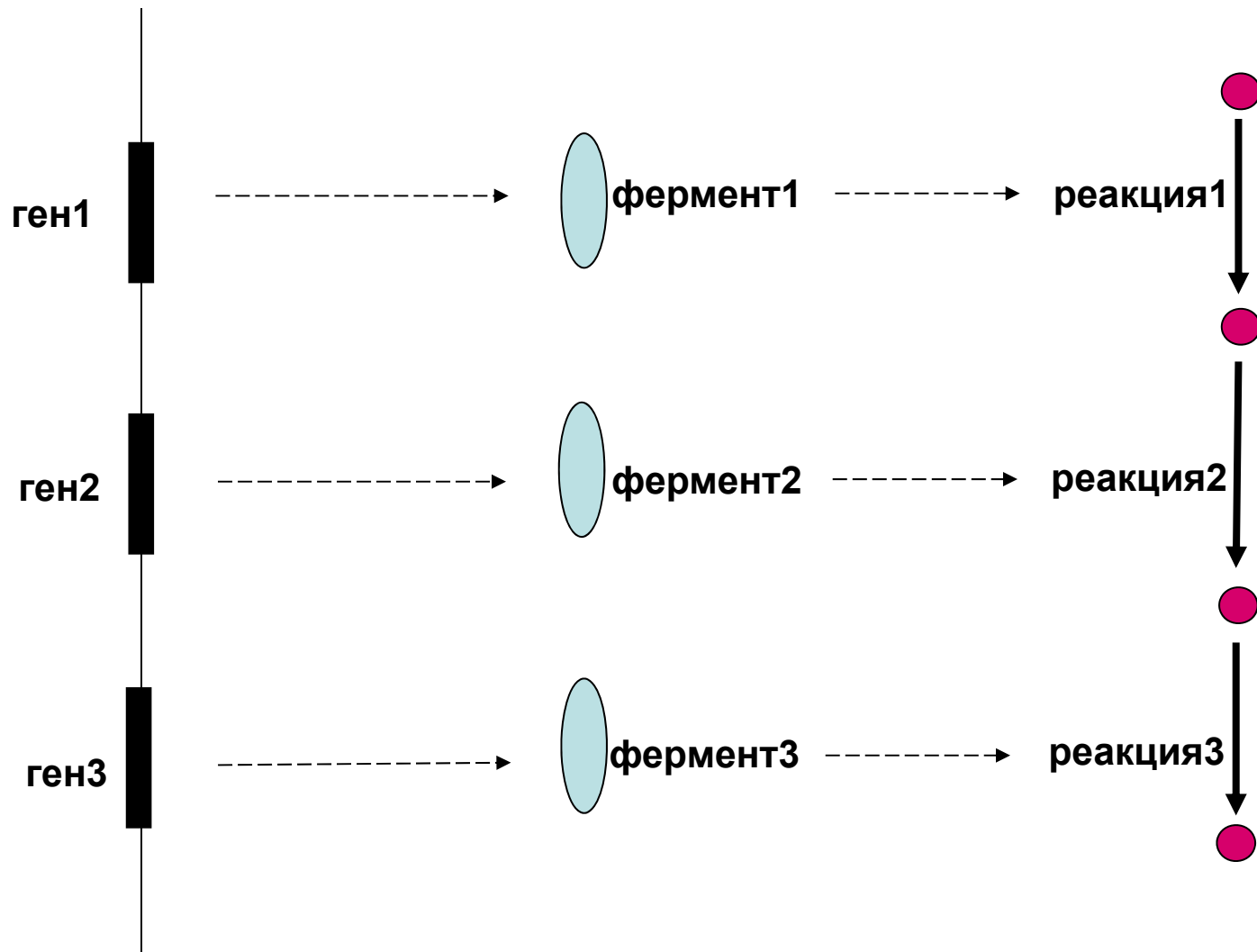


определение всех реакций
метаболического пути

Геном
(совокупность генов)

Протеом
(совокупность белков)

Метаболом
(совокупность
метаболических реакций)



Молекулярно-биологические базы данных

русскоязычный ресурс

ОБЪЕДИНЕННЫЙ ЦЕНТР ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И БИОИНФОРМАТИКИ



» Карта сайта

| [Заглавная](#) | [Научный Совет](#) | [Кластер](#) | [Проекты](#) | [Базы данных](#) | [Ссылки](#) | [Объявления](#) | [Контакты](#) |

Молекулярно-биологические базы данных

[По алфавиту](#) | [ДНК](#) | [РНК](#) | [Белки](#) | [Метаболические пути](#) | [Библиография](#) | [Прочие](#)

[BioCyc](#) - BioCyc Database collection

[BRUTE](#) - Biomolecular Reaction Pathways fo Information Transfer and Expression database

[EcoCyc](#) - Encyclopedia of E.coli Genes and Metabolism

[EMP](#) - the Enzymes and Metabolic Pathways database

[KEGG](#) - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

[MetaCyc](#) - Database of metabolic pathways and enzymes

[MPW](#) - Metabolic PathWays database

[SoiBase](#) - Soybean metabolism dataBase

[SPAD](#) - Signaling PAthway Database

[UM-BBD](#) - University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database

NCBI Центр биотехнологической информации

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

англоязычный ресурс

The screenshot displays the NCBI website interface. At the top, there is a navigation bar with 'NCBI Resources' and 'How To' dropdown menus. Below this is the NCBI logo and the text 'National Center for Biotechnology Information'. A search bar is present with a dropdown menu currently showing 'PubMed' selected, and other options like 'All Databases', 'Protein', 'Nucleotide', 'GSS', 'EST', 'Structure', 'Genome', 'BioSample', 'BioSystems', 'Books', 'CancerChromosomes', 'Conserved Domains', 'dbGaP', 'dbVar', 'Epigenomics', 'Gene', 'Genome Project', 'GENSAT', and 'GEO Datasets'. To the right of the search bar are 'Search' and 'Clear' buttons. On the left side, there is a vertical navigation menu with various categories such as 'NCBI Home', 'Site Map (A-Z)', 'All Resources', 'Chemicals & Bioassays', 'Data & Software', 'DNA & RNA', 'Domains & Structures', 'Genes & Expression', 'Genetics & Medicine', 'Genomes & Maps', 'Homology', 'Literature', 'Proteins', 'Sequence Analysis', 'Taxonomy', 'Training & Tutorials', and 'Variation'. In the center, there is a large heading 'NCBI' followed by a paragraph: 'Biotechnology Information advances science and... biomedical and genomic information.' Below this is a link for 'Organization | Research | RSS Feeds'. On the right side, there are two sections: 'Popular Resources' with a list of links including 'BLAST', 'Bookshelf', 'Gene', 'Genome', 'Nucleotide', 'OMIM', 'Protein', 'PubChem', 'PubMed', 'PubMed Central', and 'SNP'; and 'NCBI News' with a link for 'New NCBI News Issue' dated '28 Mar 2011' and another link for 'Retirement of Peptidome, SRA & Trace Archive' dated '16 Feb 2011'. At the bottom, there is an 'Education Resources' section with the text 'Central point of access for help documents, teaching materials, news outlets, and other educational resources.' and a small image of a person at a computer. A navigation bar at the very bottom shows a series of numbered buttons from 1 to 5, with '2' being the active page.

KEGG База данных по метаблическим путям



KEGG PATHWAY Database

Wiring diagrams of molecular interactions, reactions, and relations

KEGG2 PATHWAY BRITZ MODULE DISEASE DRUG GENES GENOME LIGAND DBGET

Select prefix

map

Organism

Enter keywords

Go

Help

Pathway Maps

KEGG PATHWAY is a collection of manually drawn pathway maps (see [new maps](#), [change history](#), and [last updates](#)) representing our knowledge on the molecular interaction and reaction networks for:

0. Global Map

1. Metabolism

[Carbohydrate](#) [Energy](#) [Lipid](#) [Nucleotide](#) [Amino acid](#) [Other amino acid](#) [Glycan](#)
[Cofactor/vitamin](#) [Terpenoid/PK](#) [Other secondary metabolite](#) [Xenobiotics](#) [Overview](#)

2. Genetic Information Processing

3. Environmental Information Processing

4. Cellular Processes

5. Organismal Systems

6. Human Diseases

and also on the structure relationships (KEGG drug structure maps) in:

7. Drug Development

KEGG База данных по метаболическим путям



Search

ENZYME



for

glucose-6-phosphate isomerase

Go

Clear

Database: ENZYME - Search term: glucose-6-phosphate isomerase (Total 1 hit)

5.3.1.9

glucose-6-phosphate isomerase; phosphohexose isomerase; phosphohexomutase; oxoisomerase;
hexosephosphate isomerase; phosphosaccharomutase; phosphoglucoisomerase;
phosphohexoisomerase; phosphoglucose isomerase; glucose phosphate isomerase; hexose pho •••

DBGET integrated database retrieval system

KEGG База данных по метаболическим путям



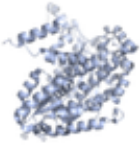
ENZYME: 5.3.1.9

Help

Entry	EC 5.3.1.9 Enzyme
Name	glucose-6-phosphate isomerase; phosphohexose isomerase; phosphohexomutase; oxoisomerase; hexosephosphate isomerase; phosphosaccharomutase; phosphoglucoisomerase; phosphohexoisomerase; phosphoglucose isomerase; glucose phosphate isomerase; hexose phosphate isomerase; D-glucose-6-phosphate ketol-isomerase
Class	Isomerases; Intramolecular oxidoreductases; Interconverting aldoses and ketoses, and related compounds BRITE hierarchy
Sysname	D-glucose-6-phosphate aldose-ketose-isomerase
Reaction (IUBMB)	D-glucose 6-phosphate = D-fructose 6-phosphate [RN:R00771]
Reaction (KEGG)	R00771 > R02740 R03321; (other) R02739 Show all
Substrate	D-glucose 6-phosphate [CPD:C00092]
Product	D-fructose 6-phosphate [CPD:C00085]
Comment	Also catalyses the anomerization of D-glucose 6-phosphate.
Pathway	ec00010 Glycolysis / Gluconeogenesis ec00030 Pentose phosphate pathway ec00500 Starch and sucrose metabolism ec00520 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism ec01100 Metabolic pathways ec01110 Biosynthesis of secondary metabolites ec01120 Microbial metabolism in diverse environments
Orthology	K01810 glucose-6-phosphate isomerase K06859 glucose-6-phosphate isomerase, archaeal K13810 transaldolase / glucose-6-phosphate isomerase
Genes	HS: 2821 (GPI) PTR: 455941 (GPI) PON: 100174006 (GPI) MCC: 717980

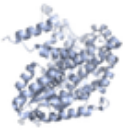
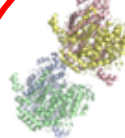

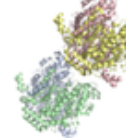
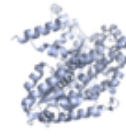
All links
Ontology (5) KEGG BRITE (5)
Pathway (8421) KEGG PATHWAY (5587) KEGG MODULE (2834)
Disease (1) OMIM (1)
Chemical substance (5) KEGG COMPOUND (5)
Chemical reaction (14) KEGG ENZYME (1) KEGG REACTION (5) KEGG RPAIR (4) KEGG RCLASS (4)
Genome (3) KEGG GENOME (3)
Gene (2209) KEGG ORTHOLOGY (3) KEGG GENES (1494) KEGG DGENES (27) KEGG EGENES (450) KEGG MGENES (235)
Protein sequence (6112) UniProt (3930) PRF (180) RefSeq(pep) (1868) PDBSTR (126) PMD (8)
DNA sequence (4921) RefSeq(nuc) (1843) GenBank (1541) EMBL (1537)
3D Structure (64) PDB (64)
Protein domain (11) InterPro (7) Pfam (3) PROSITE(DOC) (1)
Literature (5) PubMed (5)
Enzyme (4) BRENDA (1) EXPASY-ENZYME (1) EXPLORENZ (1) IUBMB (1)
All databases (21775)

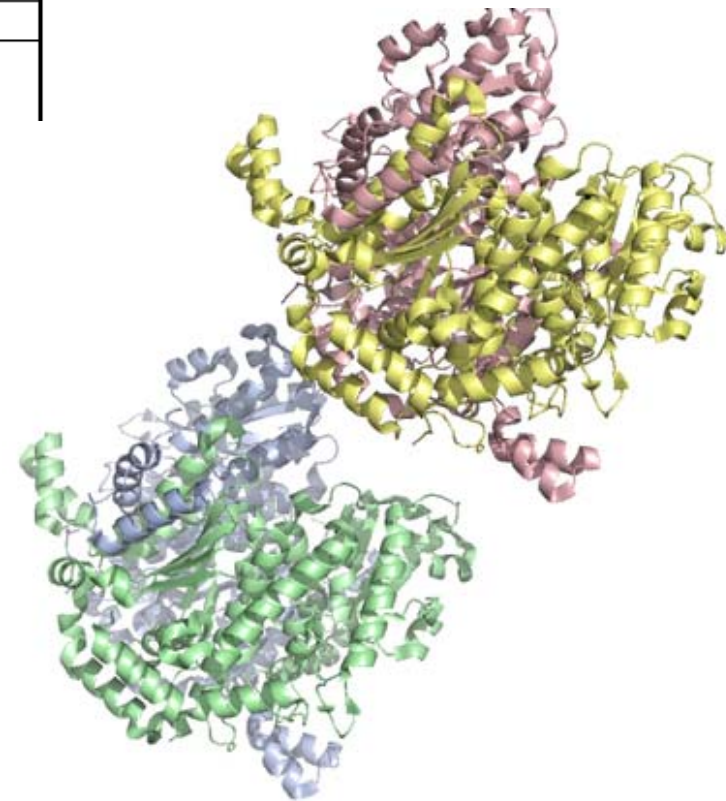
KEGG База данных по метаболическим путям

	HPRD: 01394 Ensembl: ENSG00000105220 UniProt: P06744 B4DG39
Structure	PDB: 1IAT 1JIQ 1JLH 1IRI 1NUH Thumbnails  Jmol
Position	19q13.1
AA seq	558 aa AA seq DB search MAALTRDPQFQKLQQWYREHRSELNLRRLFDANKDRFNHFSLTLNTNHGHILVDYSKNLV



KEGG Homo sapiens (human) : 2821 5 PDB structures

 PDB:1IAT 1.62 Å S04 BME Jmol	 PDB:1JIQ 1.90 Å Jmol	 PDB:1JLH 2.10 Å Jmol	 PDB:1IRI 2.40 Å E4P Jmol	 PDB:1NUH 2.51 Å S04 PA5 Jmol
---	--	--	---	---



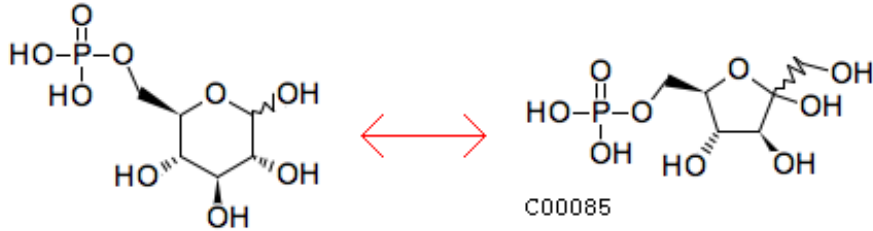
Определили структуру белка

KEGG База данных по метаболическим путям



REACTION: R00771

Help

Entry	R00771	Reaction
Name	D-glucose-6-phosphate aldose-ketose-isomerase	
Definition	D-Glucose 6-phosphate <=> D-Fructose 6-phosphate	
Equation	C00092 <=> C00085	
	 <p>C00092</p> <p>C00085</p>	
RPair	RP01093 C00085_C00092 main	
Enzyme	5.3.1.9	

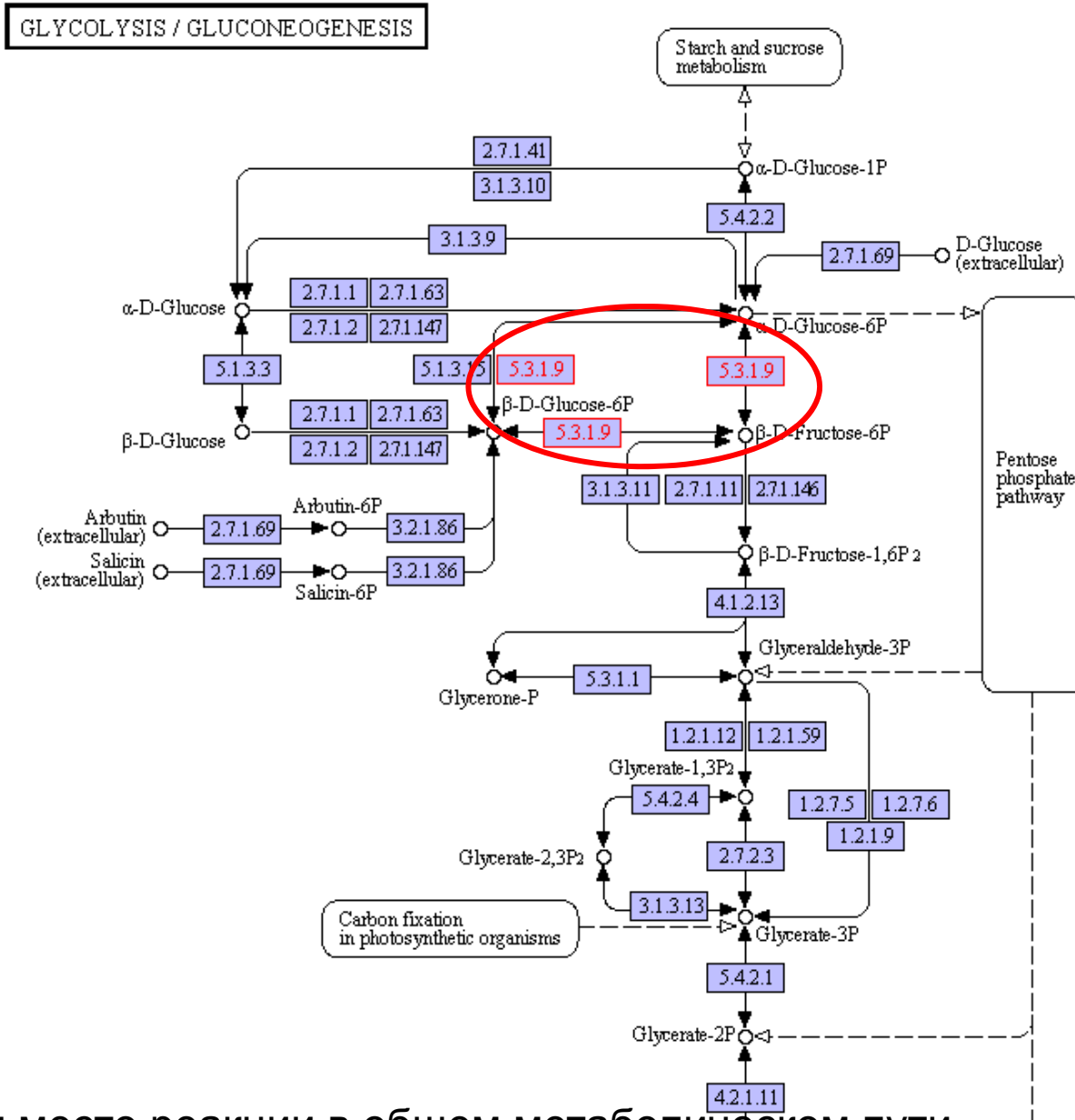
All links

[Ontology \(2\)](#)
[KEGG BRITE \(2\)](#)
[Chemical substance \(2\)](#)
[KEGG COMPOUND \(2\)](#)
[Chemical reaction \(3\)](#)
[KEGG ENZYME \(1\)](#)
[KEGG RPAIR \(1\)](#)
[KEGG RCLASS \(1\)](#)
[All databases \(7\)](#)

DBGET integrated database retrieval system

Определили метаболическую реакцию

KEGG База данных по метаболическим путям



Определили место реакции в общем метаболическом пути

Построение метаболической модели

“The simplest living cell is so complex that supercomputer models may never simulate its behavior perfectly.
But even imperfect models could shake the foundations of biology.”

W.Wayt Gibbs. Scientific American, 2001

«Простейшая клетка настолько сложна, что даже моделирование на суперкомпьютерах никогда не воспроизведет ее поведение в совершенстве. Но даже несовершенные модели могут потрясти основы биологии.»

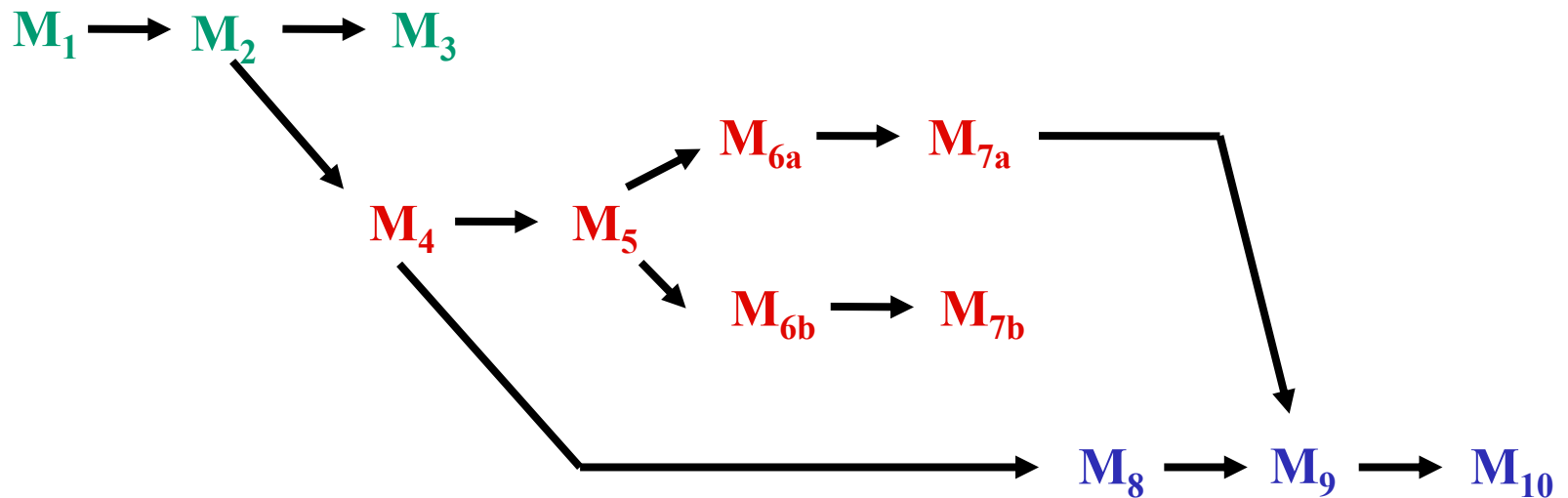
Теоретические подходы и концепции метаболического моделирования

Классический системный подход

1. выделить элементарные единицы системы
2. охарактеризовать все значимые взаимодействия между единицами
3. организовать единицы как иерархию взаимодействующих модулей
4. описать состояние каждой единицы и каждого взаимодействия количественно

Как строятся метаболические модели

1. Метаболическая реакция добавляется, убирается или заменяется на другую.
2. Механизм реакции усложняется, упрощается, заменяется другим.
3. Неизвестные кинетические параметры оцениваются с помощью фитирования.



Данные для верификации метаболической модели

1. Многие (но не все) внутриклеточные концентрации метаболитов могут быть измерены.
2. В стационарном состоянии большинство метаболических потоков может быть определено с помощью изотопа ^{13}C .
3. Активности ферментов могут быть определены из клеточных экстрактов.
4. Кинетические константы большинства ферментов собраны в базы данных.

Типы метаболических моделей

кинетические модели – системы ОДУ

- (~10-50 уравнений, ~100-500 параметров)
- переменная модели - метаболит
- описание отдельных метаболических путей
- решение модели – динамическое поведение метаболитов во времени

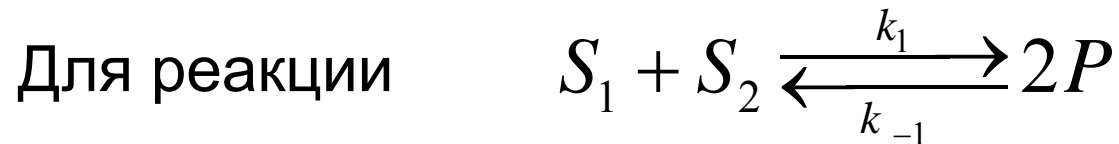
стехиометрические (потоковые) модели – системы линейных алгебраических уравнений

- (~100-1000 уравнений)
- переменная модели – метаболический поток
- описание метаболизма целой клетки
- решение модели – стационарное распределение метаболических потоков

Представление скорости реакции

В соответствии с законом действующих масс

(скорость реакции пропорциональна вероятности столкновения реагентов, а вероятность в свою очередь пропорциональна концентрации реагентов с учетом молекулярности реакции)



$$v = k_1 S_1 S_2 - k_{-1} P^2 = v_+ - v_-$$

v - общая скорость реакции

v_+ - скорость прямой реакции

v_- - скорость обратной реакции

В общем виде:

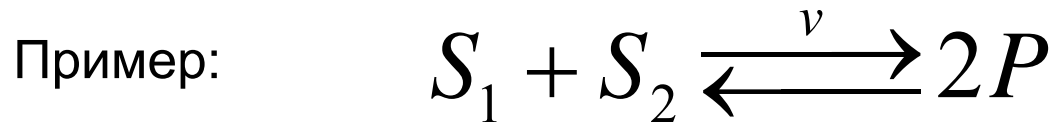
$$v = v_+ - v_- = k_+ \prod_i S_i^{m_i} - k_- \prod_j P_j^{m_j}$$

m_i и m_j соответствуют молекулярности S_i и P_j

Скорость реакции может быть выражена как через **концентрации** реагирующих веществ, так и в виде баланса **скоростей** прямых и обратных реакций.

Стехиометрические коэффициенты

Стехиометрические коэффициенты обозначают пропорции субстратов и продуктов, участвующих в реакции.



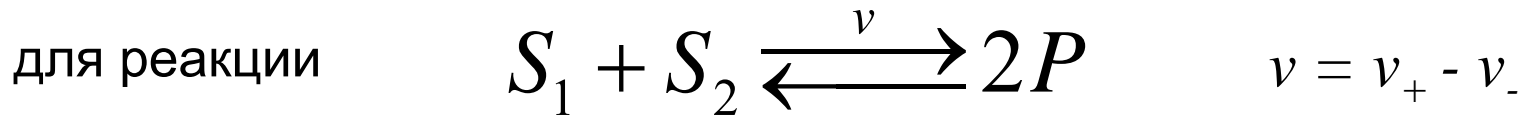
Стехиометрические коэффициенты для S_1 , S_2 и P : -1, -1 и 2.

Набор стехиометрических коэффициентов не единственен:

если считать, что для получения одного моля используется по половине моля каждого субстрата S_1 и S_2 , можно записать: -1/2, -1/2 и 1;

или если изменить направление реакции, тогда можно записать: 1, 1 и -2.

ОДУ для одной и нескольких реакций



имеем ОДУ:

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{dS_2}{dt} = -v$$

$$\frac{dP}{dt} = 2v$$

убыль субстрата S_1 со скоростью v сопровождается убылью субстрата S_2 с той же скоростью и удвоенной скоростью увеличения концентрации продукта P

Для метаболической сети, состоящей из m метаболитов и r реакций, динамика системы описывается системой m уравнений.

Уравнения наз. уравнениями баланса, поскольку рассматривается баланс между синтезом и распадом метаболита:

$$\frac{dS_i}{dt} = \sum_{j=1}^r n_{ij} v_j$$

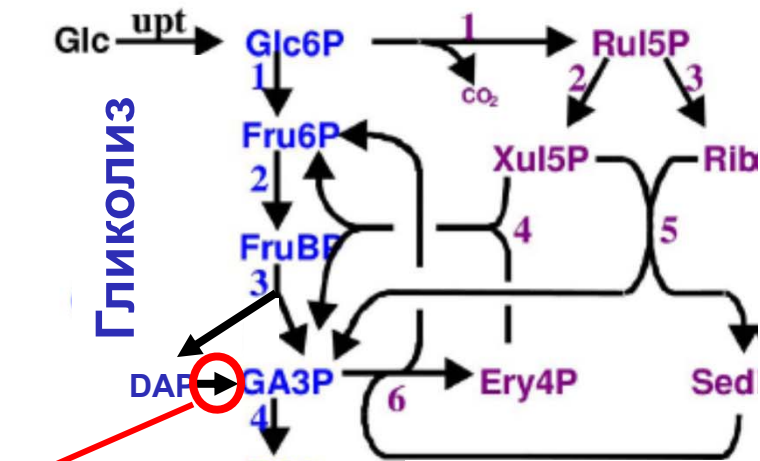
$i = 1, \dots, m$

n_{ij} – стехиометрические коэффициенты метаболита i в реакции j

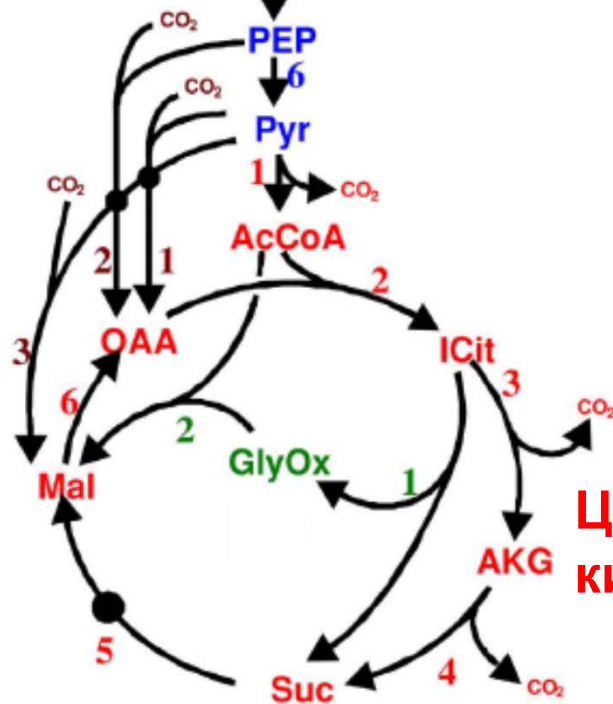
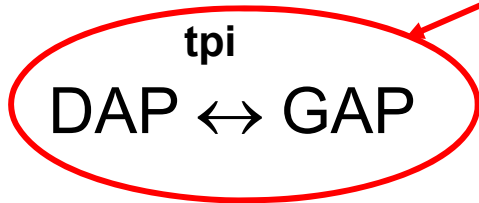
Кинетические модели

- построение схемы метаболического пути
- вывод уравнения скорости для каждой реакции
- объединение в систему дифференциальных уравнений
- подбор параметров
- верификация модели по экспериментальным данным

Центральные метаболические пути

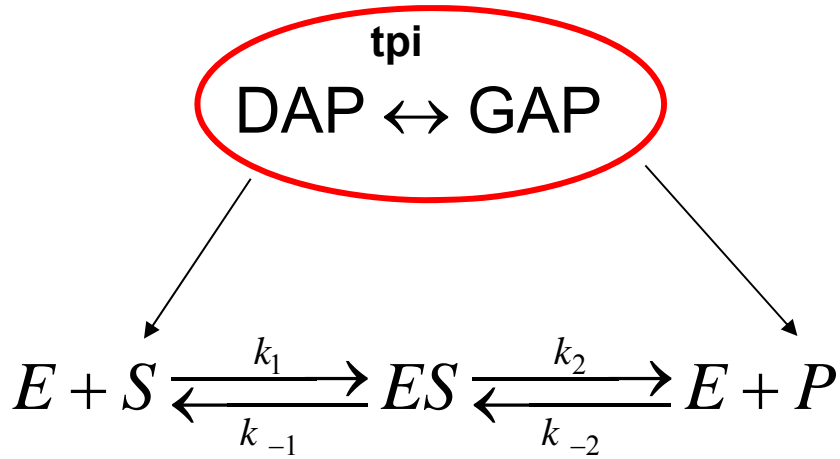


Пентозофосфатный путь



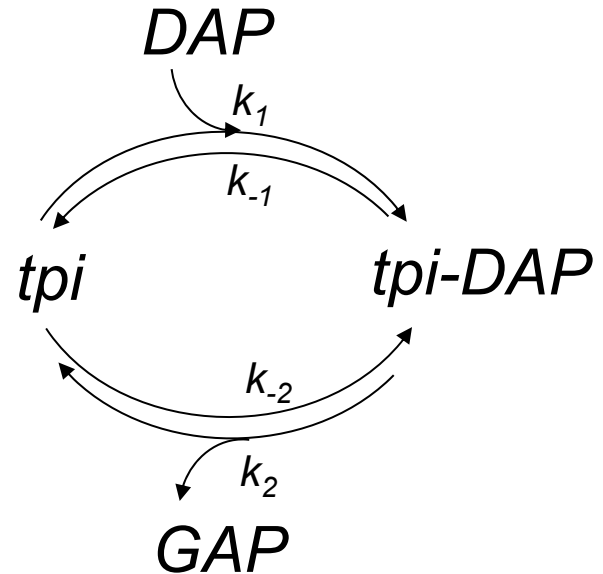
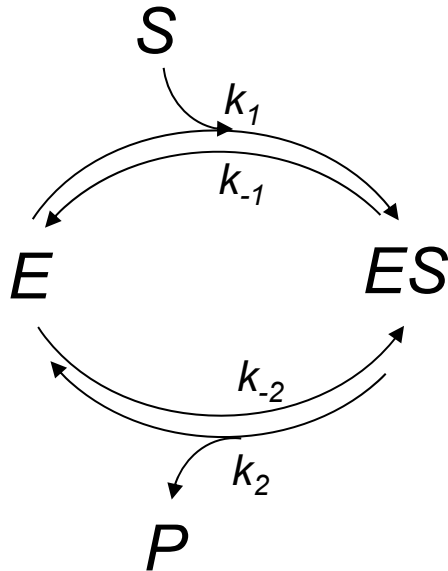
Цикл трикарбоновых кислот

Вывод уравнения скорости



Кинетическая схема взаимодействия субстрата и продукта с ферментом

Каталитический цикл фермента



Вывод уравнения скорости

Метод квази-стационарных концентраций

Кинетическая схема взаимодействия субстрата и продукта с ферментом:



Соответствующая система дифференциальных уравнений:

$$\left. \begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= -k_1 \cdot S \cdot E + k_{-1} \cdot ES \\ \frac{dP}{dt} &= k_2 \cdot ES - k_{-2} \cdot E \cdot P \end{aligned} \right\} \text{медленные переменные}$$

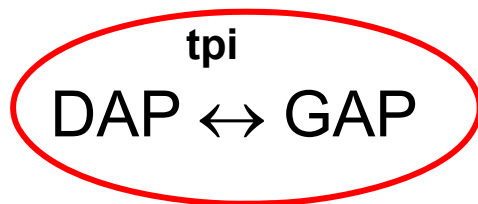
$$\left. \begin{aligned} \frac{dE}{dt} &= -k_1 \cdot S \cdot E + k_{-1} \cdot ES + k_2 \cdot ES - k_{-2} \cdot E \cdot P \\ \frac{dES}{dt} &= k_1 \cdot S \cdot E - k_{-1} \cdot ES - k_2 \cdot ES + k_{-2} \cdot E \cdot P \end{aligned} \right\} \text{быстрые переменные}$$

Уравнение скорости:

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{dS}{dt} = V = E_0 \frac{k_2 \frac{S}{K_m^S} - k_{-2} \frac{P}{K_m^P}}{1 + \frac{S}{K_m^S} + \frac{P}{K_m^P}}$$

Определение констант скорости

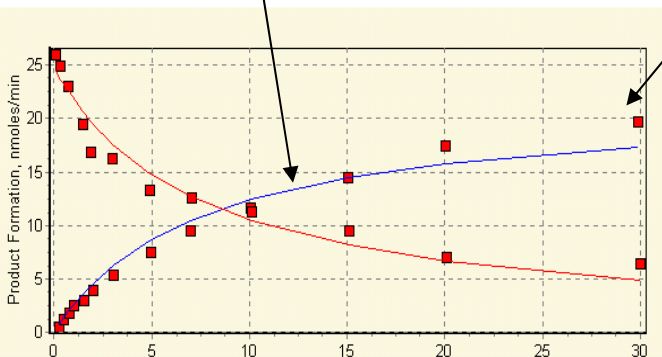
для триозофосфат изомеразы (tpi)



$$V = E_0 \frac{k_2 \frac{C_{DAP}}{K_m^{DAP}} - k_{-2} \frac{C_{GAP}}{K_m^{GAP}}}{1 + \frac{C_{DAP}}{K_m^{DAP}} + \frac{C_{GAP}}{K_m^{GAP}}}$$

фитирование методом
наименьших квадратов

экспериментальные
точки



$$K_m^{DAP} = 2.3 \text{ mM}$$

$$K_m^{GAP} = 1.5 \text{ mM}$$

$$k_2 = 45000 \text{ 1/min,}$$
$$k_{-2} = 520000 \text{ 1/min}$$

константы Михаэлиса для
субстрата и продукта

каталитические константы для
прямой и обратной реакций
(число оборотов фермента)

базы данных

MetaСус База данных по метаболическим путям

Enzymatic reaction of: phosphoglucose isomerase

Synonyms: glucose-6-phosphate isomerase, D-glucose-6-phosphate-ketol-isomerase

[β-D-glucose-6-phosphate <=> D-fructose-6-phosphate](#)

The reaction direction shown, that is, $A + B \rightleftharpoons C + D$ versus $C + D \rightleftharpoons A + B$, is in accordance with the direction of enzyme catalysis.

This reaction is reversible. [[Ishii07](#)]

In Pathways: [gluconeogenesis I](#), [glycolysis I](#), [GDP-mannose biosynthesis](#)

Summary:

The equilibrium constant for the reaction is 0.30 [[Ishii07](#)].

Citations: [[Klungsoyr64](#)]

Inhibitors (Competitive): [phosphoenolpyruvate](#) [[Ogawa07](#)]

Inhibitors (Unknown Mechanism): [6-phospho-D-gluconate](#) [[Schreyer80](#)]

K_M for D-fructose-6-phosphate: 78 μM [[Ogawa07](#)]

K_M for β-D-glucose-6-phosphate: 1018 μM [[Ogawa07](#)]

$\text{pH}_{(\text{opt})}$: 8 [[Schreyer80](#)]

Определили кинетические константы для уравнения скорости для *E.coli*

BRENDA База данных по белкам

metals and ions
Inhibitors
Activating Compound
Functional Parameters
KM Value
Turnover Number
kcat/KM Value
Ki Value
IC50 Value
Specific Activity
pH Optimum
pH Range
Temperature Optimum
Temperature Range
pI Value
Organism related Information
Source Tissue
Localization
Organism
General Information
Enzyme Structure
AA Sequence
PDB and Structure Links
Molecular Weight
Subunits
Posttranslational Modification
Crystallization
Molecular Properties
pH Stability
Temperature Stability
General Stability
Organic Solvent Stability
Oxidation Stability
Storage Stability
Purification
Cloned
Expression

KM VALUE [mM]	KM VALUE [mM] Maximum	SUBSTRATE	ORGANISM	COMMENTARY	LITERATURE	IMAGE
0.031	-	D-fructose 6-phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant S278L	702456	
0.034	-	D-fructose 6-phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant I525T	702456	
0.037	-	D-fructose 6-phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant wild-type enzyme	702456	
0.038	-	D-fructose 6-phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant R347H; pH 7.5, 30°C, recombinant mutant R75G	702456	
0.039	-	D-fructose 6-phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant L487F	702456	
0.04	-	D-fructose 6-phosphate	Methanocaldococcus jannaschii	50°C, pH 6.3	649517	
0.045	-	D-fructose 6-phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant A300P; pH 7.5, 30°C, recombinant mutant L339P	702456	
0.046	-	D-fructose 6-phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant R347C; pH 7.5, 30°C, recombinant mutant T375R	702456	
0.05	-	D-fructose 6-phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant E495K	702456	
0.06	-	D-fructose 6-phosphate	Pyrobaculum aerophilum	pH 7.4, 80°C	661679	
0.061	-	D-fructose 6-phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant R83W	702456	
0.063	-	D-fructose 6-phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant T195I; pH 7.5, 30°C, recombinant mutant V101M	702456	
0.068	-	D-fructose 6-phosphate	Homo sapiens	pH 7.5, 30°C, recombinant mutant R472H	702456	
0.147	-	D-fructose 6-phosphate	Escherichia coli	22°C, pH 7.4	661902	
0.2	-	D-fructose 6-phosphate	Thermoplasma acidophilum	80°C, pH 7.4	662220	
0.21	-	D-fructose 6-phosphate	Aeropyrum pernix	50°C, pH 7.4	662220	
0.27	-	D-fructose 6-phosphate	Mycobacterium tuberculosis	pH 7.6, 25°C	682664	

КИНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТАНТЫ ДЛЯ УРАВНЕНИЯ СКОРОСТИ

База данных по публикациям в биологии и медицине

Effects of inherited mutations on catalytic activity and structural stability of human glucose-6-phosphate isomerase expressed in *Escherichia coli*

Lin, H.; Kao, Y.; Chen, S.; Meng, M.; *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 315-323 (2009)



Data extracted from this reference:

Cloned(Commentary)

Commentary Organism
expression of wild-type and mutant enzymes in *Escherichia coli* strain DF2145 Homo sapiens

Engineering

Amino acid exchange	Commentary	Organism
A300P	the mutation may affect the folding efficiency of the enzyme protein, the mutant shows reduced expression level and barely detectable activity	Homo sapiens
E495K	the mutation may affect the folding efficiency of the enzyme protein, the mutant shows reduced expression level and barely detectable activity; the mutation weakens network bonding of the enzyme	Homo sapiens
H389R	the mutation at or near the active site highly affects the catalytic efficiency of the enzyme, the mutant shows barely detectable activity	Homo sapiens
I525T	the mutation decreases the enzyme tolerance to heat or SDS by mechanisms of decreasing packing efficiency; the mutation destabilizes the ternary structure of the enzyme	Homo sapiens

NCBI Resources How To My NCBI Sign In

PubMed.gov
U.S. National Library of Medicine
National Institutes of Health

Search: PubMed Limits Advanced search Help

Search Clear

Display Settings: Abstract

Send to:



Biochim Biophys Acta, 2009 Feb;1794(2):315-23. Epub 2008 Nov 21.

Effects of inherited mutations on catalytic activity and structural stability of human glucose-6-phosphate isomerase expressed in *Escherichia coli*.

Lin HY, Kao YH, Chen ST, Meng M.

Graduate Institute of Biotechnology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan 40227, Republic of China.

Abstract

Glucose-6-phosphate isomerase (GPI), a homodimeric enzyme, catalyzes the interconversion between glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate. In mammals, it can also act as an autocrine motility factor, neuroleukin, and maturation factor. Deficiency of the enzymatic activity in red blood cells causes nonspherocytic hemolytic anemia in human. To gain a more complete understanding of the molecular basis for the hemolytic anemia due to the GPI-deficiency, the wild-type enzyme and sixteen genetic variants were expressed in *Escherichia coli* and functionally characterized. Conclusions are as follows: (1) mutations usually have negative influences on catalytic parameters, particularly k_{cat} , as well as structure stability; (2) mutations at or close to the active site, including R273H, H389R, and S278L, cause great damage to the catalytic function, yet

Related citations

Erythrocyte pyruvate kinase- and glucose phosphate isomerase deficiency [Biophys Chem. 1997]

Expression and enzymatic characterization of human glucose phosphate isomerase deficiency [Blood Cells Mol Dis. 1998]

Molecular basis of neurological dysfunction coupled with haemolytic anemia [Hum Genet. 1998]

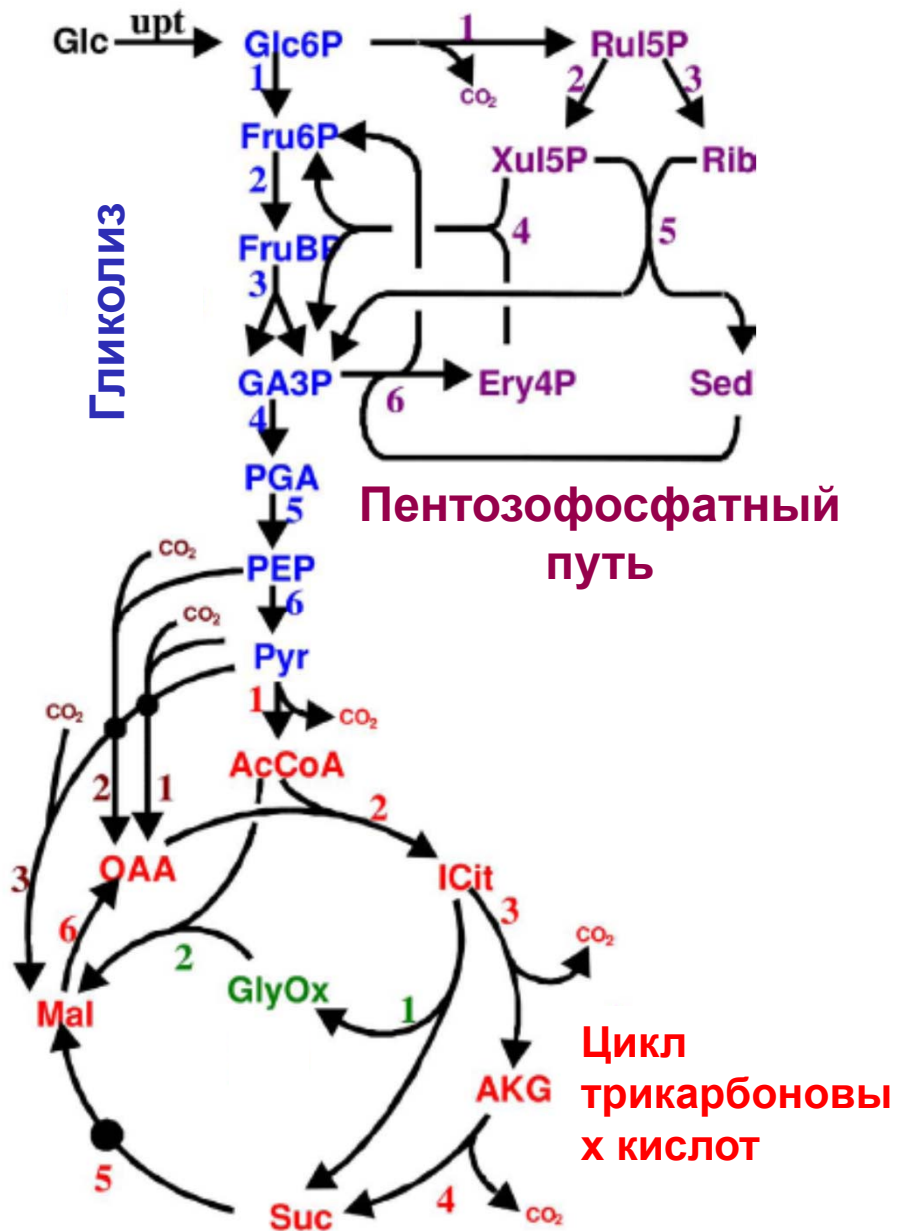
Review Glucose-6-phosphate isomerase deficiency [Baillieres Best Pract Res Clin Haematol. 200...]

Review Red cell glycolytic enzyme disorders Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 200...]

ссылки на сходные публикации

Модель центрального метаболизма *E. coli*

Manfred Rizzi et al,
Institute of Biochemical Engineering,
University of Stuttgart, Germany



1. Вывели уравнения скорости для каждого фермента.

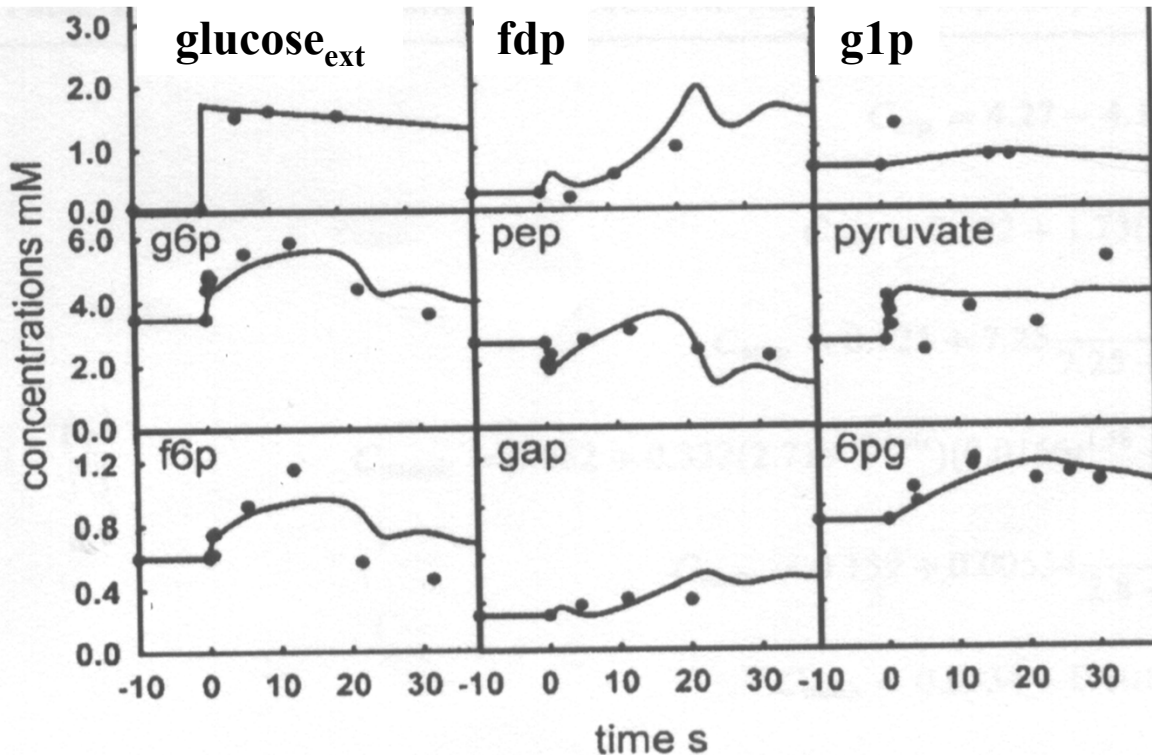
2. Объединили в систему уравнений для всего пути.

3. Оценили параметры модели (константы скоростей)

4. Верифицировали по экспериментальным данным

Результаты моделирования

Manfred Rizzi et al,
Institute of Biochemical Engineering,
University of Stuttgart, Germany



Кинетика метаболитов.

Точки – экспериментальные
данные

Линии – результаты
численного счета

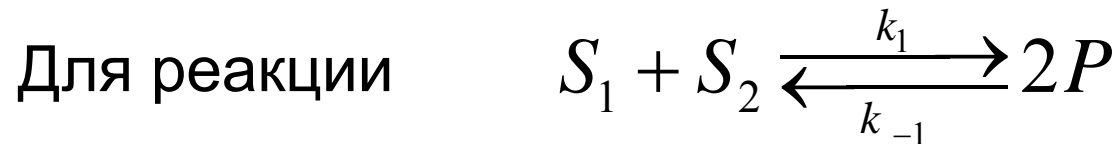
- Описана экспериментально наблюдаемая динамика (в том числе и колебательный процесс).
- Показано, что поглощение глюкозы в основном контролируется двумя системами: транспортной (PTS) и ее ингибиторами.

Стехиометрические модели

Представление скорости реакции

В соответствии с законом действующих масс

(скорость реакции пропорциональна вероятности столкновения реагентов, а вероятность в свою очередь пропорциональна концентрации реагентов с учетом молекулярности реакции)



$$v = k_1 S_1 S_2 - k_{-1} P^2 = v_+ - v_-$$

v - общая скорость реакции

v_+ - скорость прямой реакции

v_- - скорость обратной реакции

В общем виде:

$$v = v_+ - v_- = k_+ \prod_i S_i^{m_i} - k_- \prod_j P_j^{m_j}$$

m_i и m_j соответствуют молекулярности S_i и P_j

Скорость реакции может быть выражена как через **концентрации** реагирующих веществ, так и в виде баланса **скоростей** прямых и обратных реакций.

Стехиометрическая матрица

Стехиометрические коэффициенты n_{ij} , соответствующие метаболиту S_i и реакции v_j могут быть объединены в стехиометрическую матрицу:

$$N = \begin{pmatrix} & v_1 & v_2 & \dots & v_r \\ S_1 & n_{11} & n_{12} & \dots & n_{1r} \\ & \dots & \dots & \dots & \dots \\ S_m & n_{m1} & n_{m2} & \dots & n_{mr} \end{pmatrix}$$

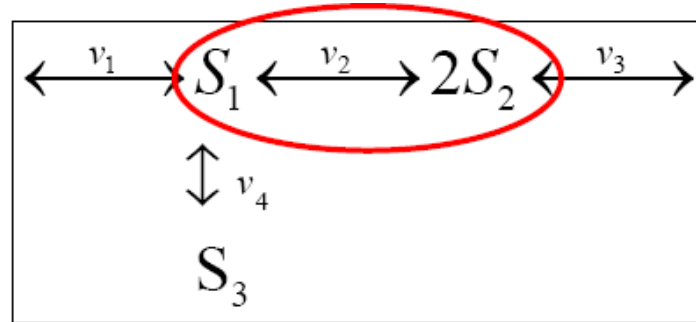
$$\mathbf{N} = \{n_{ij}\}, \\ i = 1, \dots, m ; j = 1, \dots, r$$

каждая колонка соответствует реакции (r реакций)

каждая строка соответствует метаболиту (m метаболитов)

Стехиометрическая матрица

для реакции v_2 :



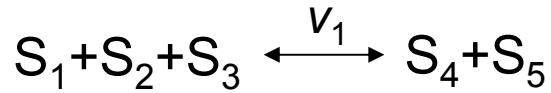
$$N = \begin{matrix} & v_1 & v_2 & v_3 & v_4 & \\ \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & -1 \\ 0 & 2 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} & S_1 & S_2 & S_3 & \end{matrix}$$

Строка 1: 1 молекула S_1 расходуется (-1)
Строка 2: 2 молекулы S_2 образуются (2)
Строка 3: S_3 в этой реакции не участвует (0)

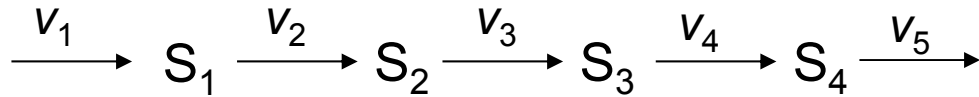
Реакции метаболической сети могут быть обратимы.

Чтобы определить знак коэффициентов, направление стрелок искусственно выбирается как положительное «слева направо» и «сверху вниз».

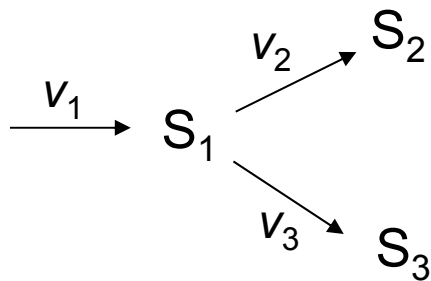
Построить стехиометрическую матрицу



$$N = \begin{pmatrix} -1 \\ -1 \\ -1 \\ 1 \\ 1 \end{pmatrix}$$

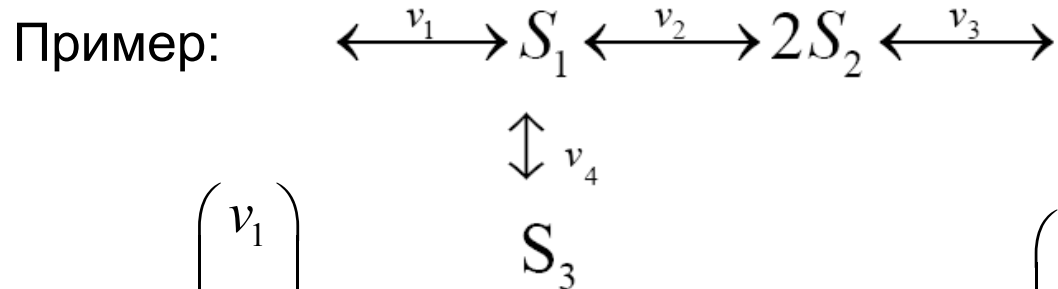


$$N = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 \end{pmatrix}$$



$$N = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Построение уравнений баланса



$$S = \begin{pmatrix} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix}$$

$$v = \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \end{pmatrix}$$

$$N = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & -1 \\ 0 & 2 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

вектор
метаболитов

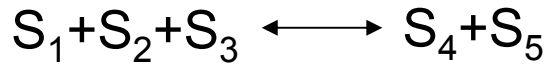
вектор
скоростей

стехиометрическая
матрица

$$\begin{pmatrix} \frac{dS_1}{dt} \\ \frac{dS_2}{dt} \\ \frac{dS_3}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & -1 \\ 0 & 2 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \cdot v_1 - 1 \cdot v_2 + 0 \cdot v_3 - 1 \cdot v_4 \\ 0 \cdot v_1 + 2 \cdot v_2 - 1 \cdot v_3 + 0 \cdot v_4 \\ 0 \cdot v_1 + 0 \cdot v_2 + 0 \cdot v_3 + 1 \cdot v_4 \end{pmatrix}$$

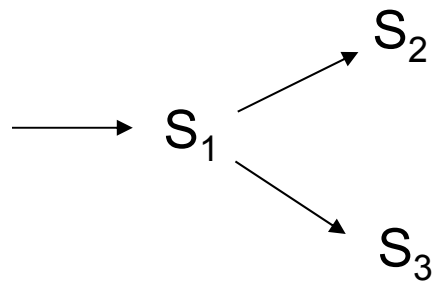
уравнения баланса

Записать уравнения баланса



$$\begin{pmatrix} \frac{dS_1}{dt} \\ \frac{dS_2}{dt} \\ \frac{dS_3}{dt} \\ \frac{dS_4}{dt} \\ \frac{dS_5}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -1 \\ -1 \\ -1 \\ 1 \\ 1 \end{pmatrix} \cdot (v_1) = \begin{pmatrix} -v_1 \\ -v_1 \\ -v_1 \\ v_1 \\ v_1 \end{pmatrix}$$

$$\begin{array}{c} \longrightarrow S_1 \longrightarrow S_2 \longrightarrow S_3 \longrightarrow S_4 \longrightarrow \end{array} \begin{pmatrix} \frac{dS_1}{dt} \\ \frac{dS_2}{dt} \\ \frac{dS_3}{dt} \\ \frac{dS_4}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} v_1 - v_2 \\ v_2 - v_3 \\ v_3 - v_4 \\ v_4 - v_5 \end{pmatrix}$$



$$\begin{pmatrix} \frac{dS_1}{dt} \\ \frac{dS_2}{dt} \\ \frac{dS_3}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} v_1 - v_2 - v_3 \\ v_2 \\ v_3 \end{pmatrix}$$

Уравнение баланса для метаболита

Строго, с учетом роста (и следовательно изменения объема) уравнение для i -го метаболита в общем виде записываются как

$$\frac{dS_i}{dt} = \sum_j n_{ij} v_j - \mu S_i$$

S_i – концентрация i -го метаболита
 v_j – скорость образования (или потребления) метаболита
 n_{ij} – стехиометрический коэффициент i -го метаболита в j -й реакции
 μS_i – фактор разведения

Без учета фактора разведения

$$\frac{dS_i}{dt} = \sum_j n_{ij} v_j$$

В стационарном состоянии

$$\frac{dS_i}{dt} = 0$$



Алгебраическое уравнение

$$\sum_j n_{ij} v_j = 0$$

Построение стехиометрической модели

$$S = (S_1, S_2, \dots, S_n)^T$$

вектор концентраций метаболитов

$$v = (v_1, v_2, \dots, v_n)^T$$

вектор скоростей реакций

$$N$$

стехиометрическая матрица

$$\frac{dS}{dt} = Nv$$

уравнения баланса

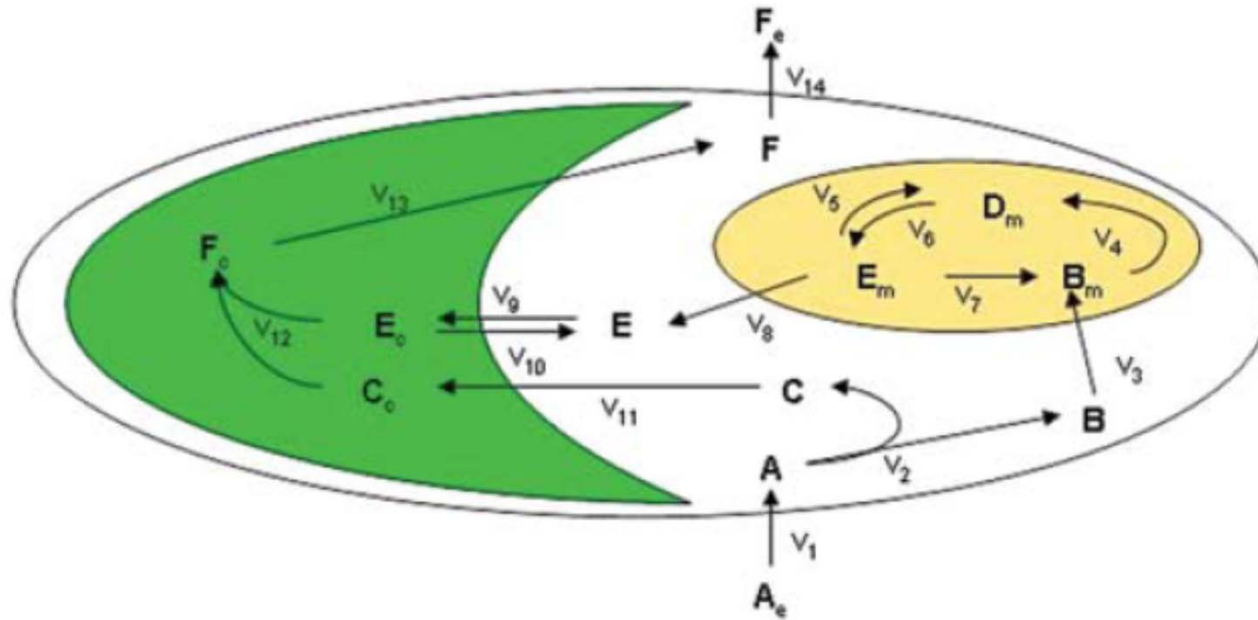
$$\frac{dS}{dt} = 0$$

стационарное состояние

$$Nv = 0$$

система алгебраических уравнений

Гипотетическая схема метаболических потоков



Метаболиты

внешние:

A_e , F_e

внутренние:

A , B , C , E , F , – в цитоплазме

B_m , D_m , E_m – в митохондрии

C_c , E_c , F_c – в хлоропласте

Процессы

транспорт через внешнюю мембрану:

v_1 , v_{14}

транспорт через внутренние мембраны:

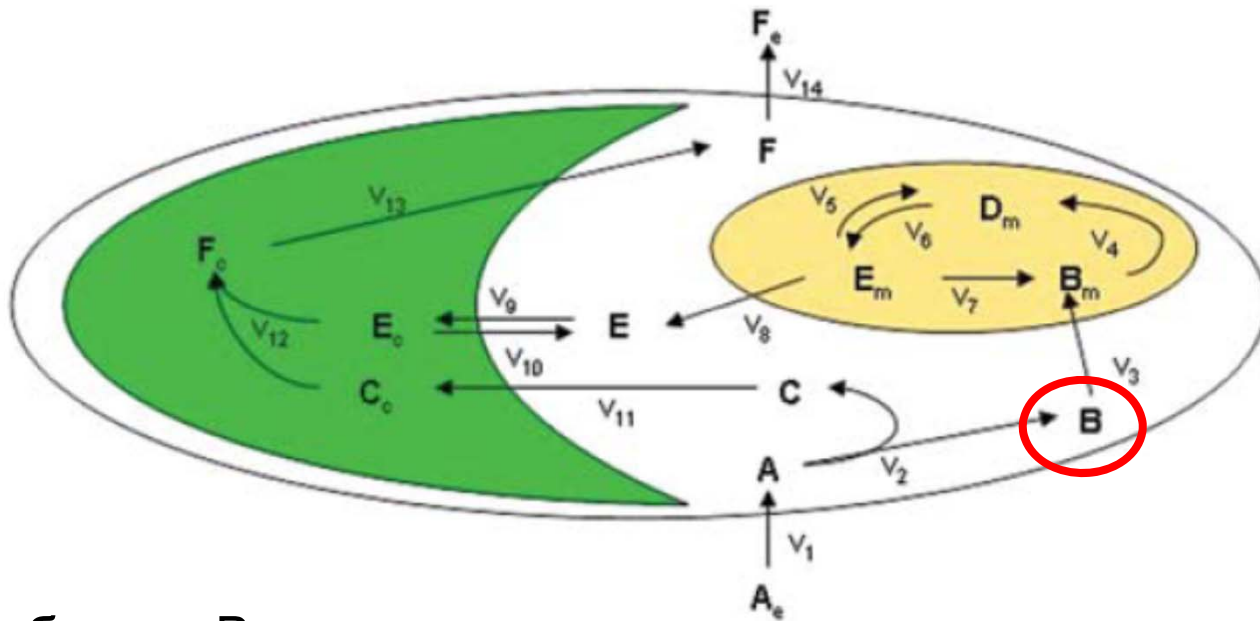
v_3 , v_8 – через мембрану митохондрии

v_9 , v_{10} , v_{11} , v_{13} – через мембрану хлоропласта

реакции превращения субстрата в продукт

v_4 , v_5 , v_6 , v_7 , v_{12}

Гипотетическая схема метаболических потоков



для метаболита В:

$$\frac{dX_B}{dt} = v_2 - v_3$$

(Общая скорость образования метаболита В) =
= (скорость образования В) – (скорость потребления В)

Метаболический поток – нормированная скорость реакции.

Размерность потока – моль/ед.биомассы/время.

В матричном виде систему дифференциальных уравнений можно записать как :

$$\begin{array}{l}
 \frac{dX_A}{dt} = v_1 - v_2 \\
 \frac{dX_B}{dt} = v_2 - v_3 \\
 \frac{dX_{B_m}}{dt} = v_3 - v_4 + v_7 \\
 \frac{dX_C}{dt} = v_2 - v_{10} \\
 \frac{dX_{C_e}}{dt} = v_{11} - v_{12} \\
 \vdots \\
 \frac{dX_F}{dt} = v_{13} - v_{14} \\
 \frac{dX_{F_e}}{dt} = v_{12} - v_{13}
 \end{array}
 \xrightarrow{\text{In matrix form}}
 \begin{array}{l}
 \left[\begin{array}{c}
 \frac{dX_A}{dt} \\
 \frac{dX_B}{dt} \\
 \frac{dX_{B_m}}{dt} \\
 \frac{dX_C}{dt} \\
 \frac{dX_{C_e}}{dt} \\
 \vdots \\
 \frac{dX_F}{dt} \\
 \frac{dX_{F_e}}{dt}
 \end{array} \right]_{m=1}
 =
 \begin{array}{c}
 \begin{bmatrix}
 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 \\
 \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0
 \end{bmatrix}_{m \times r}
 \cdot
 \begin{array}{c}
 \left[\begin{array}{c}
 v_1 \\
 v_2 \\
 v_3 \\
 v_4 \\
 v_7 \\
 \vdots \\
 v_{13} \\
 v_{14}
 \end{array} \right]_{r=1}
 \end{array}
 \end{array}
 \end{array}$$

n_{ij} число молекул i -го метаболита, вступающего в j -ю реакцию

v_{ij} скорость j -й реакции, в которой участвует i -й метаболит

$$\frac{dX}{dt} = Nv \quad Nv = 0$$

Размерность N в общем виде можно записать $m \times r$, m – это число метаболитов, участвующих в реакциях, r – число реакций.

Соотношение числа метаболитов m и числа потоков r

В условиях стационарного состояния: $Nv = 0$

m – количество уравнений

r – количество переменных

Возможны три варианта:

1. $m = r$ полностью определенная система. Решение единственно.

2. $m < r$ недоопределенная система.

Означает, что недостаточно уравнений баланса для определения всех потоков. Система уравнений может иметь бесконечное число решений.

(Наиболее часто встречаемый случай)

Используется **метод линейного программирования**.

3. $m > r$ переопределенная система.

В случае, когда доступно множество экспериментальных измерений.

Решается методом псевдо-инверсий Мура-Пенроуза (Moore–Penrose)

Постановка задачи линейного программирования для метаболической сети

(Метод анализа стационарных потоков, **Flux Balance Analysis, FBA**)

I. Определить пространство решений:

- Уравнения баланса массы для всех метаболитов.

$$Nv = 0$$

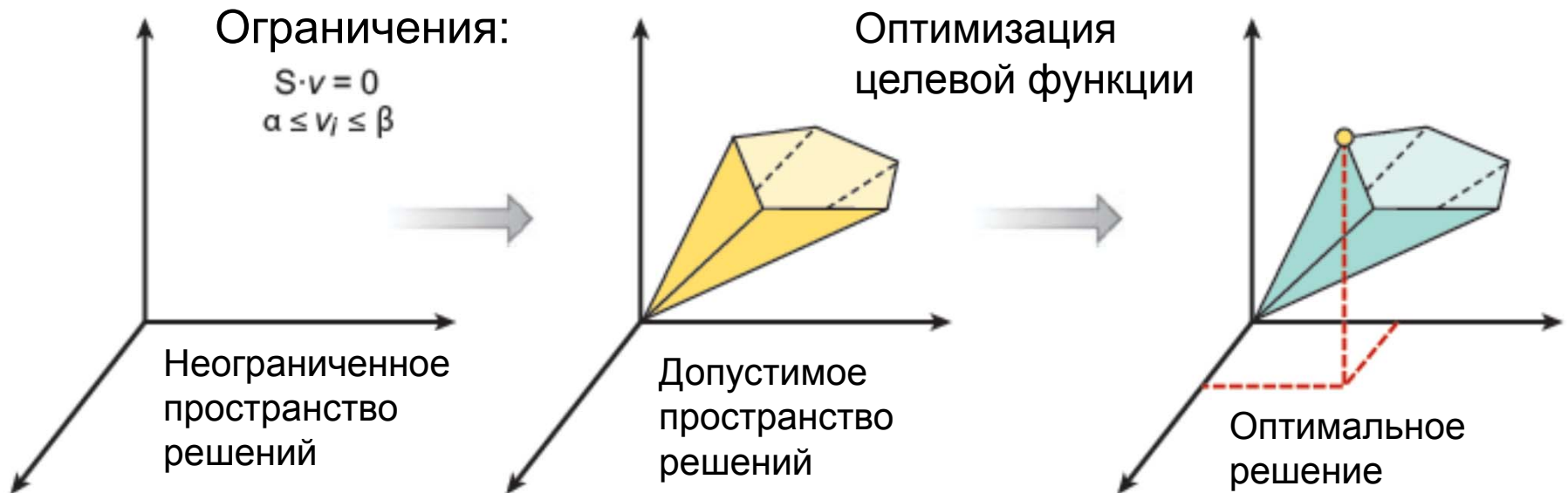
- Ограничения на потоки - максимальные и минимальные значения потоков (если известно).

$$\alpha_i \leq v_i \leq \beta_i$$

II. Определить целевую функцию.

$$z = \sum_j c_{ij} v_j$$

Поиск оптимального решения



Задача линейного программирования

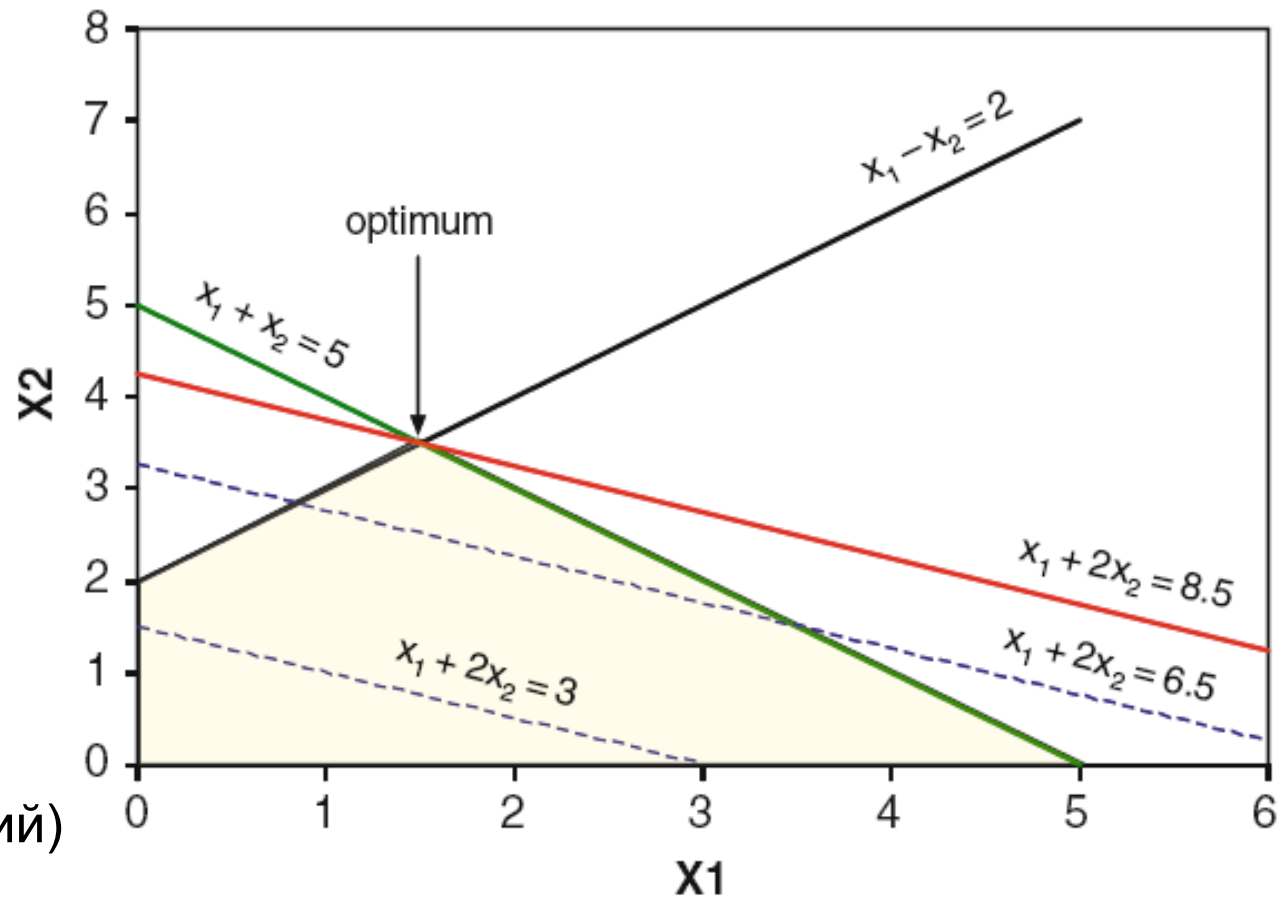
Пример:

максимизировать $z = x_1 + 2x_2$ Целевая функция $z \rightarrow \max$

при условии:

$$\begin{aligned} x_1 - x_2 - 2 &\leq 0 \\ x_1 + x_2 - 5 &\leq 0 \\ x_1 &\geq 0, x_2 &\geq 0 \end{aligned}$$

Ограничения
(пространство решений)



Выбор целевой функции

Целевая функция определяется:

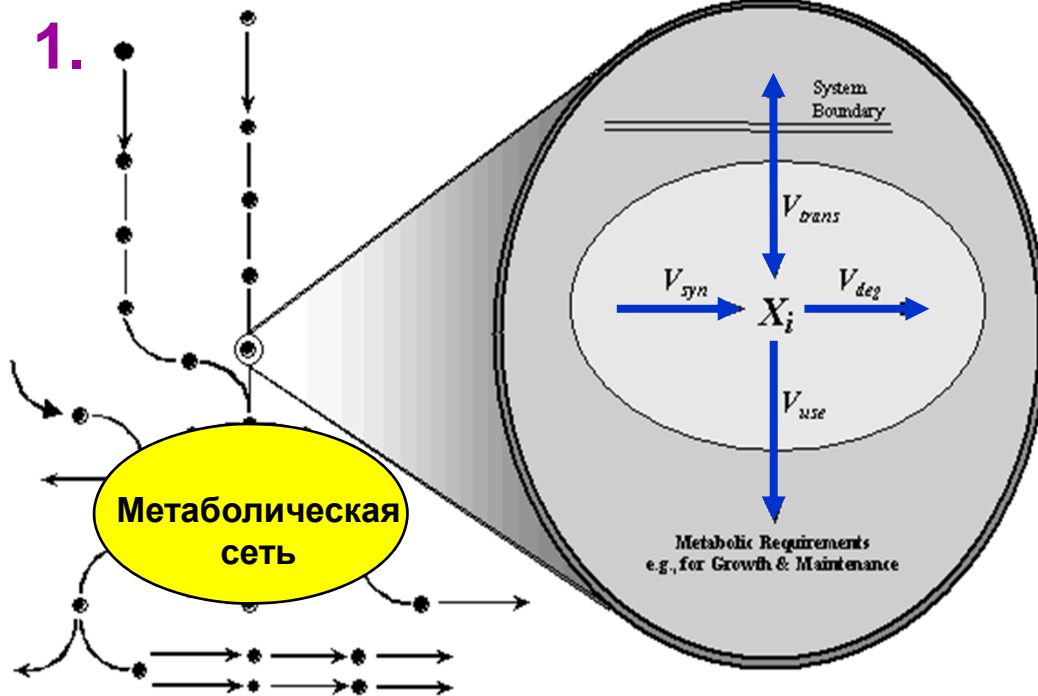
1. биологическими потребностями клетки,
2. биотехнологической задачей.

Примеры целевой функции:

- 1. Максимизировать биомассу.**
2. Минимизировать поток питательных веществ из среды.
3. Максимизировать продукцию определенного метаболита.
4. Максимизировать продукцию АТФ.

Основные положения FBA

Biotechnol. Prog., 1999, 15, 288-295



2. ОДУ

$$\frac{dX}{dt} = N \cdot v, \quad v = f(X, \dots)$$

X – вектор концентрации метаболитов

v – вектор скоростей реакций

N – стехиометрическая матрица

3. рассматривается стационарное состояние: $N \cdot v = 0$

4. ставится задача линейного программирования:

целевая функция: максимум биомассы
(максимум скорости роста):

$$Z = V_{growth} \rightarrow \max$$

ограничения – нижние и верхние границы для всех потоков: $v_{lb} < v < v_{ub}$

Применение анализа метаболических путей

Метаболизм *E.coli*

Распределение метаболических потоков для полного набора генов.

Целевая функция – максимум биомассы при росте на глюкозе.

Способность *E.coli* адаптироваться к утрате функциональности гена может быть проанализирована путем удаления гена из основного набора

Распределение метаболических потоков, когда «выключен» ген *sucA*.
(ген *sucA* кодирует необходимый компонент реакции в ЦТК)

Поток перенаправляется через глиоксилатный шунт.
Реакция Succ—SucCoA обращается.

