

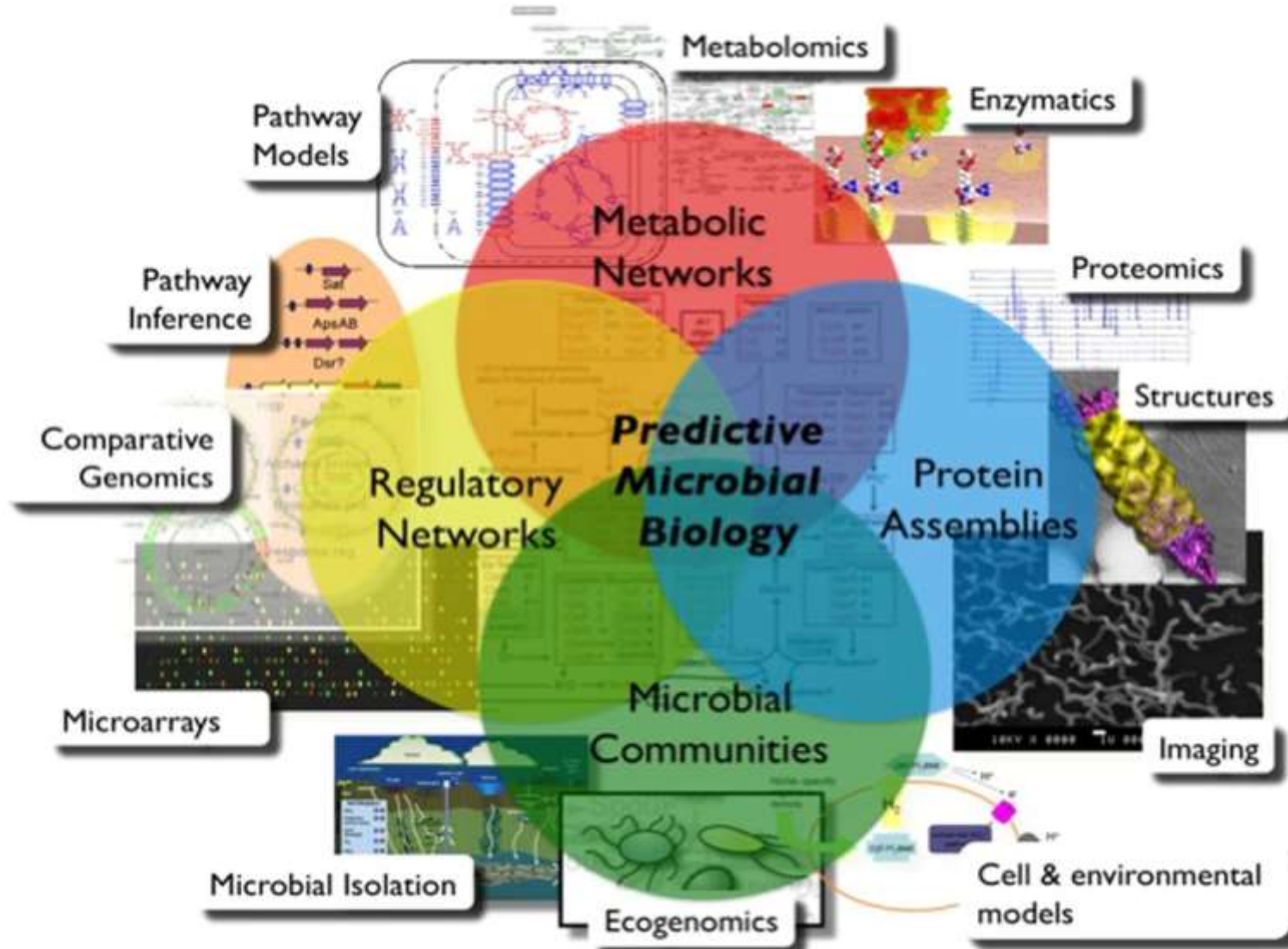
Изучение метаболизма *Geobacillus icigianus* на основе метода потокового моделирования

Студент 4 курса ФЕН, НГУ, кафедра информационной биологии
Куляшов Михаил Андреевич

Лаборатория молекулярных биотехнологий
ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

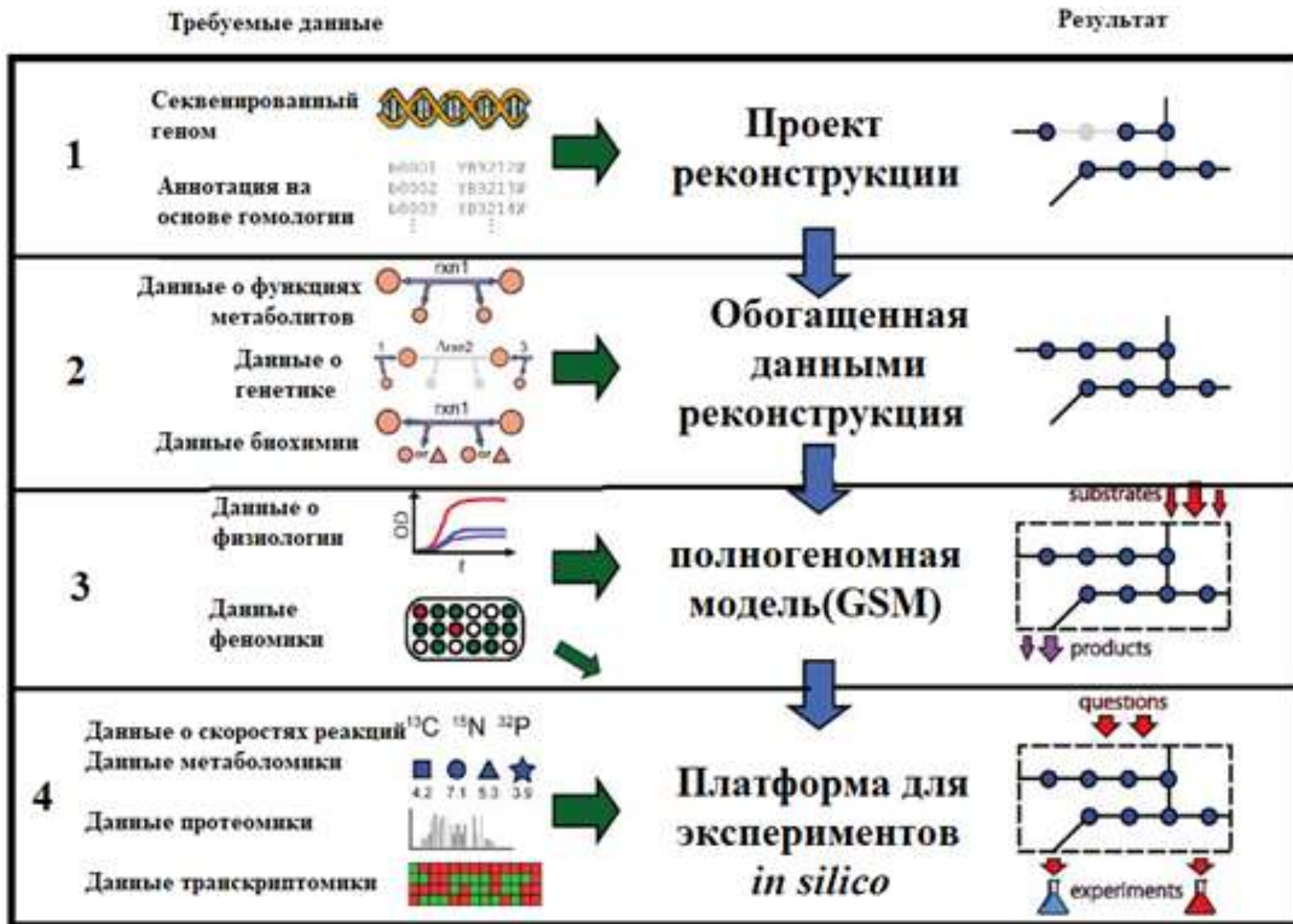
Со-руководители: к.б.н., Акбердин Илья Ринатович, к. б. н., Розанов Алексей Сергеевич

Современные экспериментальные данные в биологии



Lepage *et al.*,
Gut, 2013

Построение полногеномной потоковой модели – путь к синтетической биологии

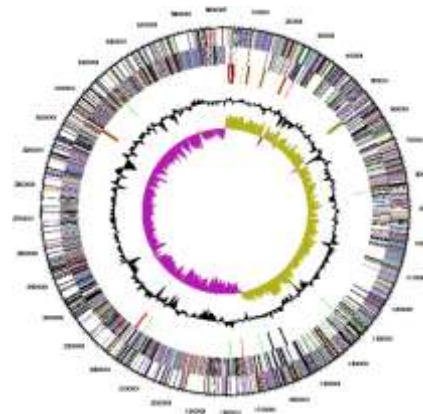


Feist et al., *Nat. Rev. Microbiol.*
2009

Объект исследования *Geobacillus icigianus*

Параметр	Значение
Диапазон температуры	50°C - 75°C
Оптимальная температура	60°C - 65 °C
Диапазон pH	Рост при pH = 5, pH = 9
Оптимальный pH	pH = 6.5 - 7
Рост в 1% р. – ре NaCl	Бактерия галлотоллерантна
Количество генов	3342
GC content	52 %

Bryanskaya *et al.*,
IJSEM., 2015



Bryanskaya *et al.*,
Genome Announcements., 2014

Цели и задачи

Цель:

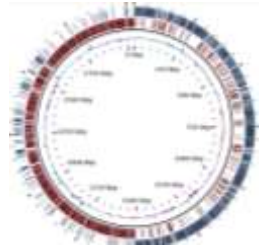
Изучение метаболизма *Geobacillus icigianus* на основе метода потокового моделирования

Задачи:

- Анализ литературных данных и определение комплекса экспериментальных и теоретических подходов для реконструкции и анализа метаболизма клетки;
- Построение потоковой полногеномной модели на основе секвенированного генома *G.icigianus*;
- Проведение экспериментов по изучению параметров роста культуры клеток в зависимости от источника углерода;
- Адаптация полногеномной модели к полученным экспериментальным данным;
- *In silico* предсказания по поиску путей увеличения продукции биомассы с помощью адаптированной модели и интерпретация полученных результатов.

Этапы построения полногеномной модели

Геном



RAST (<http://rast.nmpdr.org/>)

Гены (опероны)



RAST (<http://rast.nmpdr.org/>)

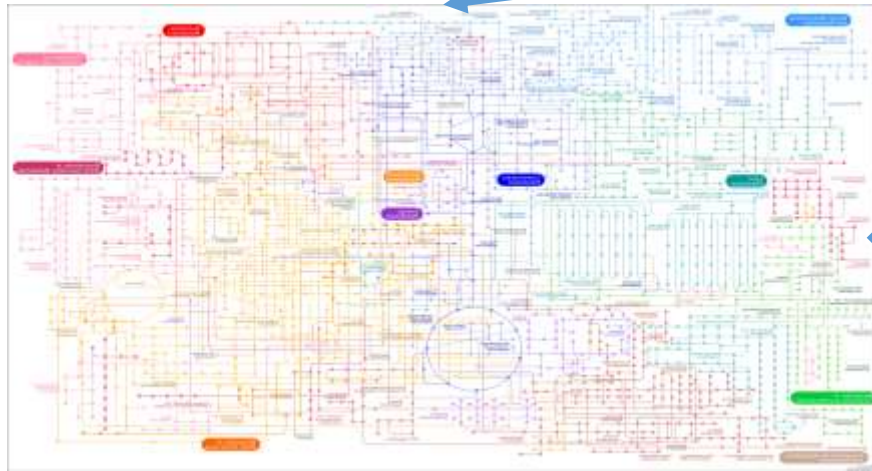
Белки(ферменты)



NCBI RefSeq
NZ_JPYA01000186_1

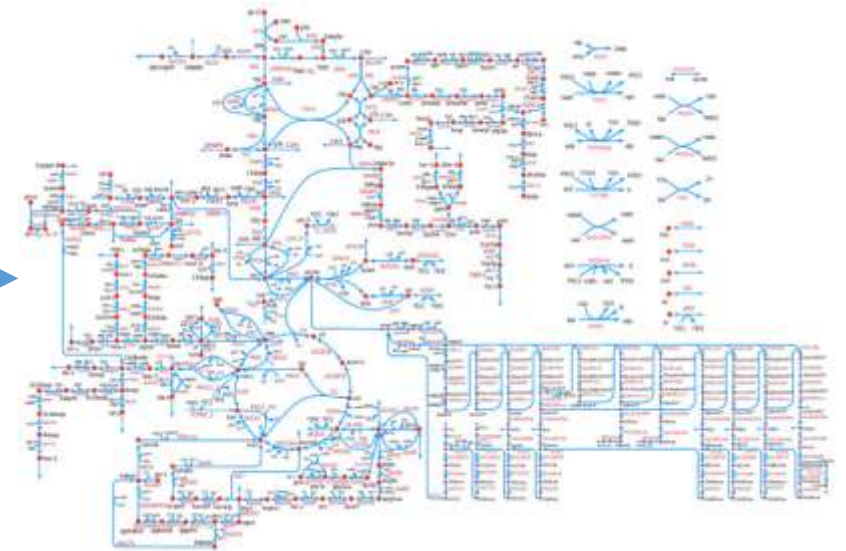
ModelSEED (<http://modelseed.org>)

KBase(<http://kbase.us>)



Метаболическая карта

KBase(<http://kbase.us>)



Полногеномная модель бактерии с распределением потоков углерода на метаболической карте

Уравнение биомассы

**Макромолекулы входящие в состав биомассы в
поточковой полногеномной модели *B. subtilis*
(Oh et al., The journal of biological chemistry, 2007)**

Макромолекулы	Соотношение(% w/w)
Белки	52.84
РНК	6.55
ДНК	2.60
Жиры	7.60
Клеточная стенка	22.42
Кофакторы	4.94
Суммарно	96.95

Образование макромолекул

$x_1 \text{ дАТФ} + x_2 \text{ дЦТФ} + x_3 \text{ дГТФ} + x_4 \text{ дТТФ} \rightarrow \text{ДНК}$

$y_1 \text{ ala} + y_2 \text{ asp} + \dots + y_k \text{ val} \rightarrow \text{Белки}$

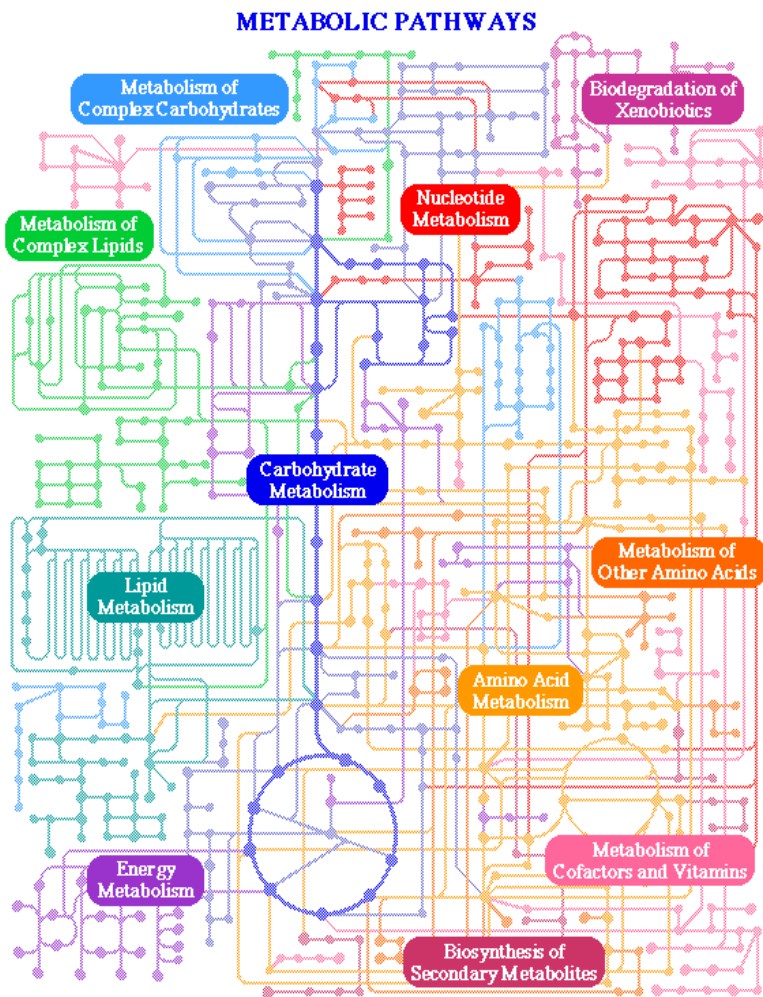
$z_1 \text{ АТФ} + z_2 \text{ ЦТФ} + z_3 \text{ ГТФ} + z_4 \text{ ТТФ} \rightarrow \text{РНК}$

·
·
·

$X, Y, Z, D, F, K, x_i, y_i, z_i$ – соответствующие
стехиометрические коэффициенты

$X \text{ ДНК} + Y \text{ Белки} + Z \text{ РНК} + D \text{ Жиры} + F \text{ Кофакторы} + K \text{ Элементы клеточной стенки} \rightarrow \text{Биомасса}$

Потоковая полногеномная модель



KBase(<http://kbase.us>)

$$\begin{aligned} \frac{dX_A}{dt} &= v_1 - v_2 \\ \frac{dX_B}{dt} &= v_2 - v_3 \\ \frac{dX_{B_m}}{dt} &= v_3 - v_4 + v_7 \\ \frac{dX_C}{dt} &= v_2 - v_{10} \\ \frac{dX_{C_e}}{dt} &= v_{11} - v_{12} \\ &\vdots \\ \frac{dX_F}{dt} &= v_{13} - v_{14} \\ \frac{dX_{F_e}}{dt} &= v_{12} - v_{13} \end{aligned}$$

In matrix form

$$\begin{bmatrix} \frac{dX_A}{dt} \\ \frac{dX_B}{dt} \\ \frac{dX_{B_m}}{dt} \\ \frac{dX_C}{dt} \\ \frac{dX_{C_e}}{dt} \\ \vdots \\ \frac{dX_F}{dt} \\ \frac{dX_{F_e}}{dt} \end{bmatrix}_{m \times 1}$$

Каждый элемент строки – «вклад» определенного метаболита в соответствующую реакцию (стехиометрический коэффициент)

$$= \begin{bmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 \end{bmatrix}_{m \times n} \cdot \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ \vdots \\ v_{13} \\ v_{14} \end{bmatrix}_{n \times 1}$$

Стехиометрическая матрица

Матрица скоростей реакций

Скорость изменения концентрации определенного метаболита

Метод анализа баланса потоков

$$\mathbf{N} = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & -1 \end{pmatrix}, \mathbf{v} = \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & -1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \end{pmatrix} = 0$$

Целевая функция



$$Z = \sum v_i \rightarrow \max$$



Биомасса

При следующих условиях:

$$Nv = 0$$

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

Где α_i , β_i предельные нижняя и верхняя границы потока v_i соответственно

Сравнительный анализ полногеномных моделей для рода *Geobacillus*

Объект	Количество генов	Количество ферментативных реакций	Количество уникальных метаболитов
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> (C56-YS93)	736	1159	1163
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> (NCIMB 11955)	859	1011	1050
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> (M10EXG)	-	1075	760
<i>Geobacillus icigianus</i> (G1W1)	1310	1547	1585

Визуализация распределения потоков для разработанной

МОДЕЛИ

MOST (<http://most.ccib.rutgers.edu/index.html>)



Ферментативная реакция.

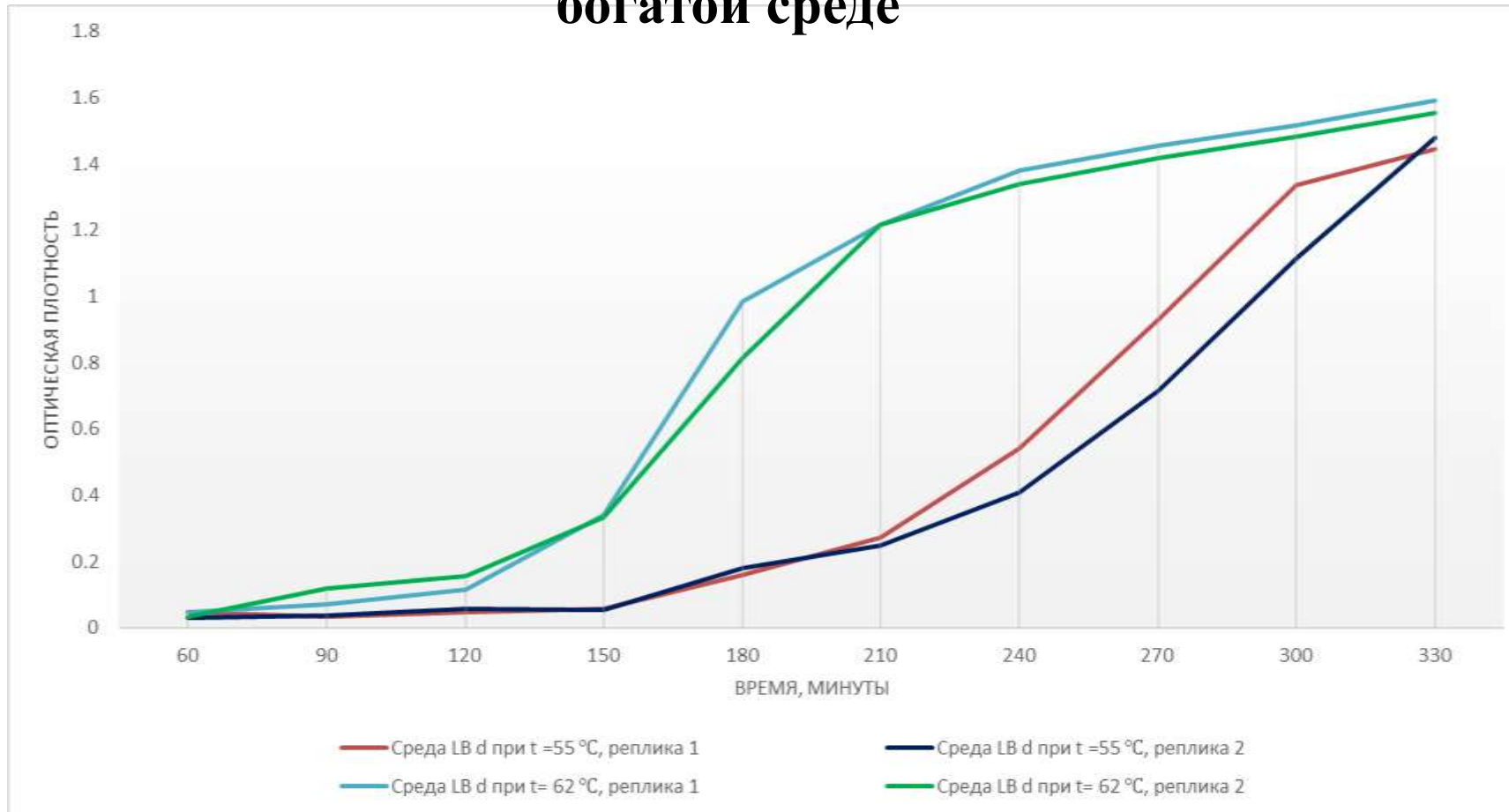
Толщина стрелки определяет мощность потока через эту ферментативную реакцию

Обозначение реакции

Теоретически предсказанная скорость роста на глюкозе составила 0.66 ч^{-1}

Проведение экспериментов по изучению параметров роста *Geobacillus icigianus*

Рост культуры в зависимости от температуры на богатой среде

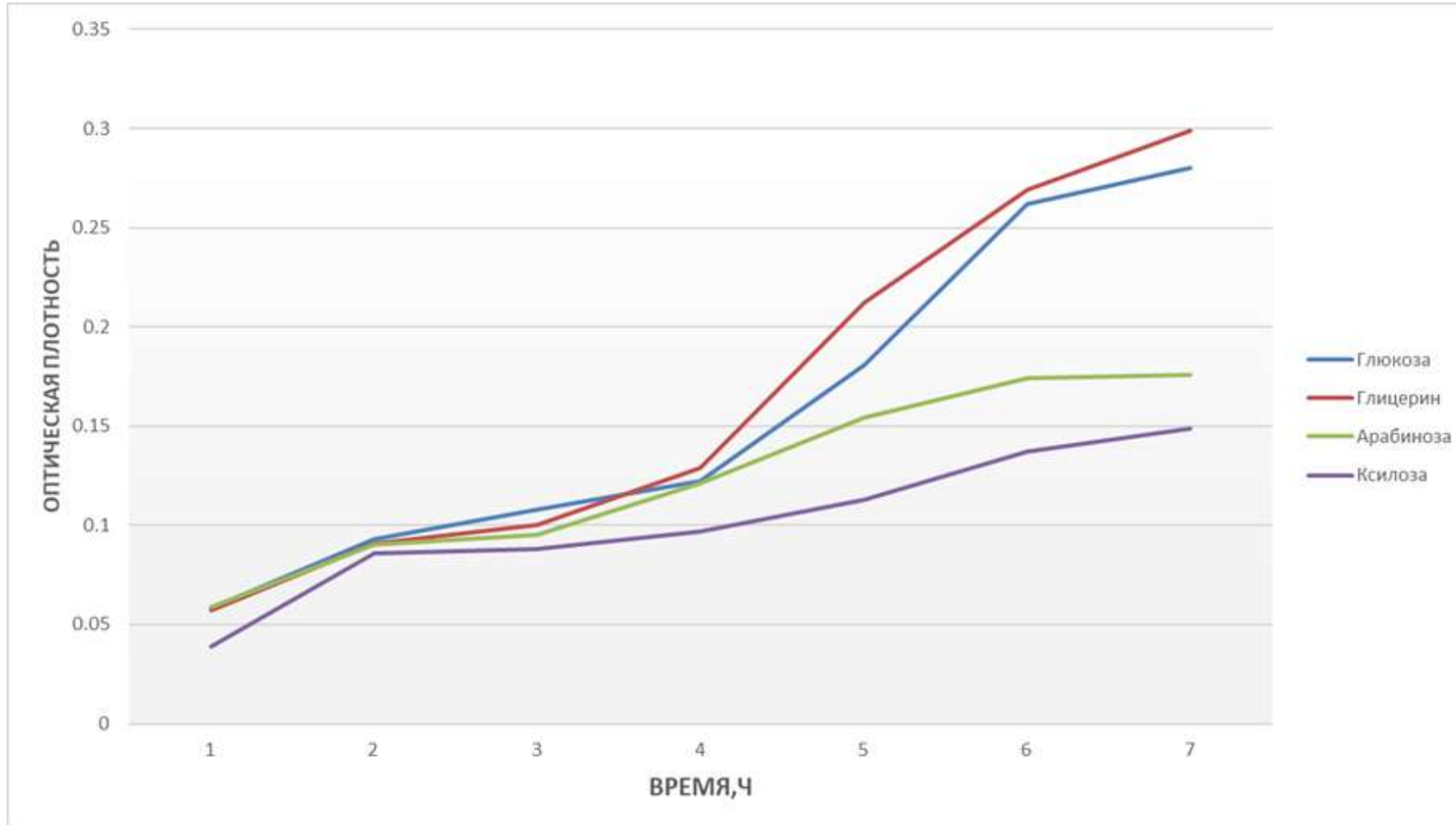


Шейкер - инкубатор

**Наиболее
оптимальная
температура -
62°C**

Проведение экспериментов по изучению параметров роста *Geobacillus icigianus*

Рост культуры в шейкере инкубаторе в зависимости от субстрата

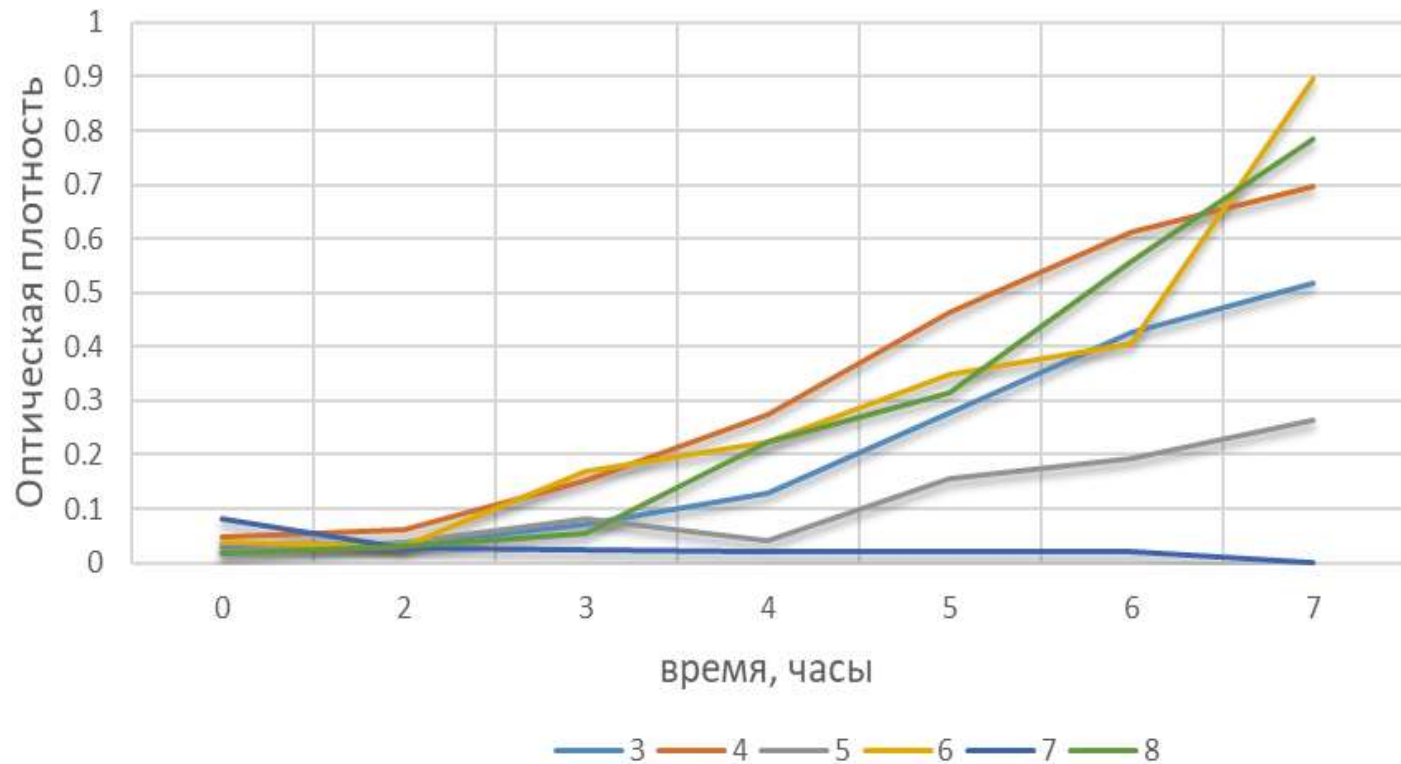


Спектрофотометр

Наиболее эффективный рост был установлен на субстратах: глюкоза, глицерин

Проведение экспериментов по изучению параметров роста *Geobacillus icigianus*

Рост культуры в шейкере инкубаторе в зависимости от состава раствора

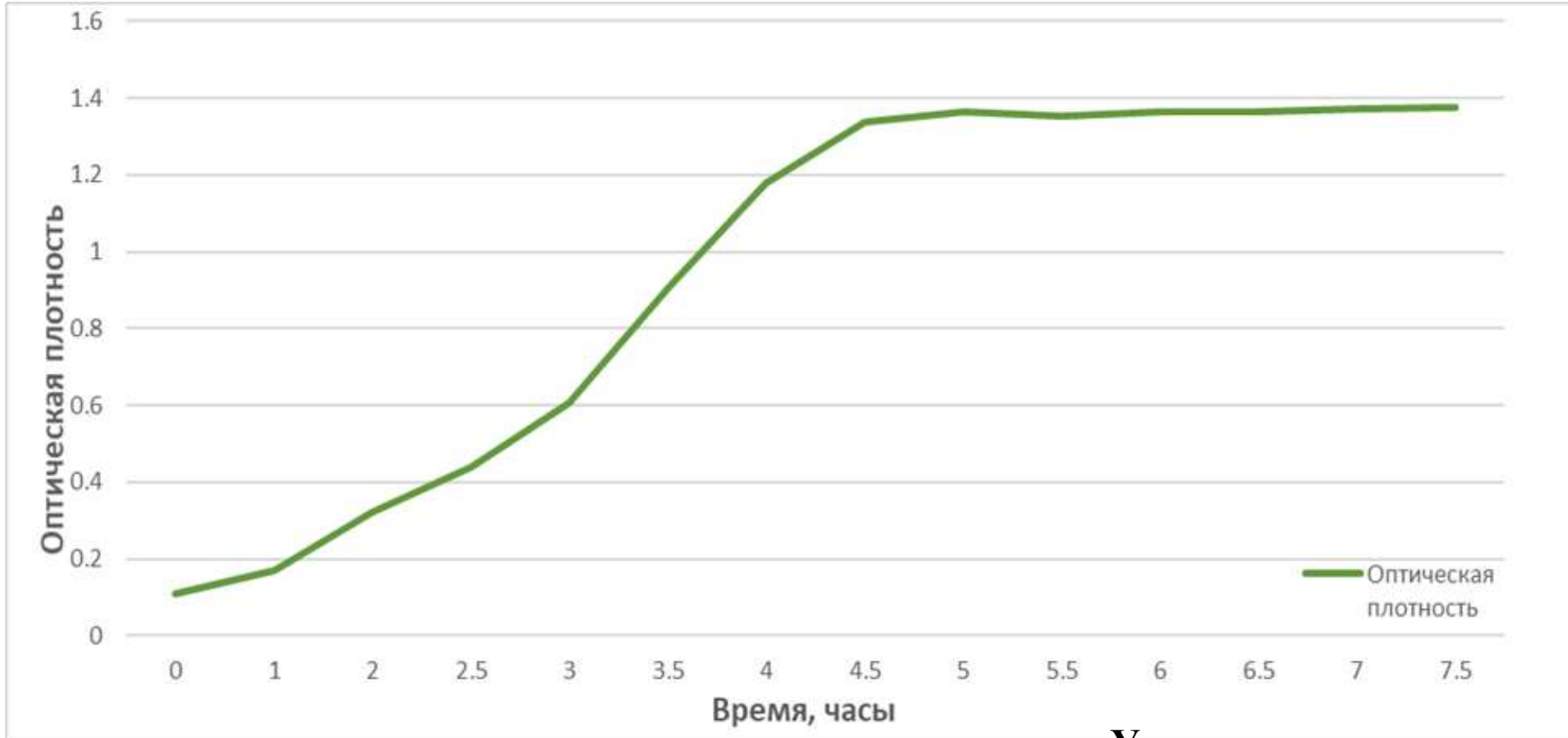


Номер раствора	Состав раствора
1	ПФ + глюкоза
2	ПФ+ глюкоза
3	ПФ + MgSO ₄ · 7H ₂ O, CaCl ₂ , FeSO ₄ · 7H ₂ O+ 5 мл глюкозы + нитрилтриуксуная кислота 100 мкм
4	3 раствор + 100 мкл витаминов + 100 мкл микроэлементов
5	ПФ + 5 мл 10% LB + 5 мл глюкозы
6	3 раствор + 5 мл 10% LB
7	mLB(LB + MgSO ₄ *7H ₂ O + CaCl ₂ + FeSO ₄ *7H ₂ O + 5 мл глюкозы)
8	3 раствор + 5мл 20 % LB

Наиболее эффективными для роста на бедной среде оказался раствор №4

Проведение экспериментов по изучению параметров роста *Geobacillus icigianus*

Рост культуры в условиях биореактора



Биореактор

Измеренная экспериментально скорость роста 0.5 ч^{-1}

Теоретически предсказанная скорость роста 0.66 ч^{-1}

Уравнение расчета скорости роста (Barry G. Hall *et al.*,
Molecular Biology and Evolution, 2014)

$$k = \frac{\log_{10} X_t - \log_{10} X_0}{0.301 * (t_1 - t_0)}$$

Результаты работы

1. В ходе анализа литературы метод культивирования бактерий в биореакторе и потоковое моделирование были определены, как наиболее эффективные экспериментально-теоретические подходы для реконструкции и анализа метаболизма клетки недавно открытого штамма *Geobacillus icigianus*.
2. Была построена потоковая модель на основе данных полногеномного секвенирования *G.icigianus*, которая включала 1310 генов, а также 1585 метаболита и 1547 метаболических реакции.
3. Проведена серия экспериментов, которая позволила определить оптимальные параметры для роста культуры (температура, равная 62 °С, необходимость добавления $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$, нитрилотриауксусной кислоты в среду для культивирования), а также — глюкозу и глицерин в качестве наиболее эффективных субстратов для культивирования.
4. Проведенные *in silico* эксперименты показали, что для максимизации биомассы при росте на глюкозе в качестве субстрата наибольший вклад вносят следующие метаболические пути: гликолиз, ЦТК, пентозо - фосфатный путь, анаэробные реакции, пути образования пуринов и пиримидинов.