



Egy nagyobb méretű metabolikus modell kifejlesztése Modell leírás és előzetes eredmények

Varga M.

Kaposvári Egyetem, Informatika Tanszék, 7400 Kaposvár, Guba S. u. 40.

ÖSSZEFOGLALÁS

Távlati célunk az emberi, állati sejten lejátszódó metabolikus folyamatok minél teljesebb körű azonosítása, és az így felépített modell konkrét feladatok megoldására való alkalmazása (például bizonyos gyógyszerek vagy toxinok hatásának megismerése, stb.). Munkánk során a generikus kétrétegű háló modellnek megfelelő új szoftver architektúra alapján készített dinamikus szimulátorból és a többszemponú genetikai algoritmusból álló programrendszerrel kezdtük meg egy metabolikus hálózat modell azonosítását. A rendelkezésre álló kis számú mérést, valamint a hiányos és bizonytalan ismereteket az együttműködő szakértőkkel (Vanderbilt Egyetem, Integrált Biorendszer Kutató és Oktató Intézet, TN, USA) folyamatosan egyeztetve iterációs módon próbálunk hasznosítható modellt fejleszteni. Jelen munkában egy konkrét mérések alapján készülő szimulációs modell kialakításának első lépéseiről és jelenlegi eredményeiről számolunk be.

(Kulcsszavak: metabolikus folyamatok, azonosítás, generikus szimulátor, genetikai algoritmus)

ABSTRACT

Development of a Large-scale Metabolic Model Model Description and Preliminary Results

M. Varga

University of Kaposvar, Department of Information Technology, Guba S. 40., Kaposvar, H7400

Final goal of this work is the more detailed identification of the metabolic processes in the human or animal cells. The computer models are to be applied to solve practical tasks, e.g. in studying the effect of the drugs and toxins. Recently we have started the identification of a large-scale metabolic model by means of the generic bi-layered net model based simulating software, combined with the multiobjective genetic algorithm. Considering the limited set of available measurements, as well as the ill-defined and uncertain knowledge, the development of the model is based on a continuous consultation with the field experts (Vanderbilt Institute of Integrated Biosystem Research and Education, Vanderbilt University, TN, USA). Present work reports about the first steps and the present state of the development of a simulation model on the basis of a published data set.

(Keywords: metabolic processes, identification, generic simulator, genetic algorithm)

BEVEZETÉS

A sejten lejátszódó folyamatok, a különféle szervezetre hasznos vagy káros anyagok (gyógyszerek, toxinok) hatásának megismerése iránti igény vetette fel a sejtfolyamatok minél teljesebb körű modellezésének szükségességét (Wikswó *et al.*, 2006). A metabolikus modell

identifikálásához egyrészt a generikus szimulátorral együttműködő genetikus algoritmus teremtette meg a szükséges alapot, másrészt nélkülözhetetlenek voltak az adott szakterület (jelen esetben a biológia, biokémia) szakirodalomból, illetve közvetlen kommunikációból származó ismeretei is. Ezek sokszor bizonytalanok és csak igen korlátozott mennyiségben állnak rendelkezésre. A korlátozott mennyiségű ismeretet a rendelkezésünkre álló „számítógépi tudással” kombinálva próbálunk eljutni az egyre pontosabban identifikált sejtmodellhez.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Modell kifejlesztés

A metabolikus modell felépítése során az alábbiakban felsorolt információk álltak rendelkezésre, melyek segítségével lépésről lépésre tudtunk előre haladni:

1. Mérési adatok
2. Modell bázisú logikus következtetések, melyek a munka során kerülnek felszínre
3. Szakirodalmi adatok
4. Szakértői becslések, vélemények, kvalitatív megfigyelések

Az előbbiekből felsoroltak közül a kevés, de konkrét számszerű adat azokból a mérési eredményekből állt rendelkezésre, melyeket az együttműködő szakértői csoport végzett (Eklund *et al.*, 2004). Az ún. mikrofiziométer gyors, dinamikus mérést tesz lehetővé, melynek lényege a következőkben foglalható össze. 3 uL térfogatban 1.74 uL mennyiségű sejt kultúra (kb. 300 ezer sejt) van, és 1.26 uL extracelluláris folyadék. Az extracelluláris téren meghatározott összetételű RPMI oldatot vezetnek át. 90 másodpercenként végzett dinamikus mérésekkel határozzák meg az extracelluláris folyadék glükóz és oxigén, illetve laktát koncentrációját, valamint az úgy nevezett savanyodási sebességet. A mérési eredményekből számítottuk a sejtek glükóz és oxigén fogyasztását, valamint a sejtekből az extracelluláris térbe áramló laktát és proton mennyiségét.

A modell identifikálásának első lépése az, hogy meghatározzuk azokat az „építőelemeket” (komponenseket) és elemi folyamatokat (reakciókat és transzportokat), amelyeket figyelembe veszünk az identifikálás során. Ez alapvetően a vonatkozó szakirodalom alapján történt (Michal, 1999; Nicholson, 2003). A munka egyik érdekes tapasztalataként említhetjük meg, hogy egy kezdeti részletesebb struktúra kidolgozása nagy segítséget nyújtott ahhoz, hogy megértsük a különféle sejt folyamatok összefüggéseit, kapcsolódási pontjait, illetve a folyamatok működési mechanizmusait. A részletesebb struktúrából kiindulva viszont már könnyebb volt a folyamatok lényeges jellemzőit tartalmazó leegyszerűsített váz meghatározása, amely az 1. ábrán látható.

Az ábrán lévő kör alakú gráf pontok a komponenseket, a vonalka alakú gráf pontok a reakciókat, illetve transzportokat jelölik, a gráfélek pedig az elemek közti lehetséges utakat, az egyes elemi folyamatok által okozott csökkentéseknek illetve növekedéseknek felelnek meg. A nem irányított gráfélek arra utalnak, hogy a kapcsolódó elemi folyamat mindkét irányban lejátszódhat ugyanannak az enzimnek a segítségével.

Az identifikálás során az 1. ábrán is látható módon a sejtet funkcionálisan különböző részekre (kompartmentekre) bontottuk, és ezen részek százalékos arányait a vonatkozó szakirodalmi adatok alapján (Voet *et al.*, 2006) a következőképpen vettük figyelembe:

Sejtmembrán	10%
Citoszol	55%
Mitokondriális membrán	5%
Mitokondrium	15%
Egyéb	15%

1. ábra

A sejten belül lezajló folyamatok egyszerűsített rajza és a főbb folyamatok kapcsolódási pontjai

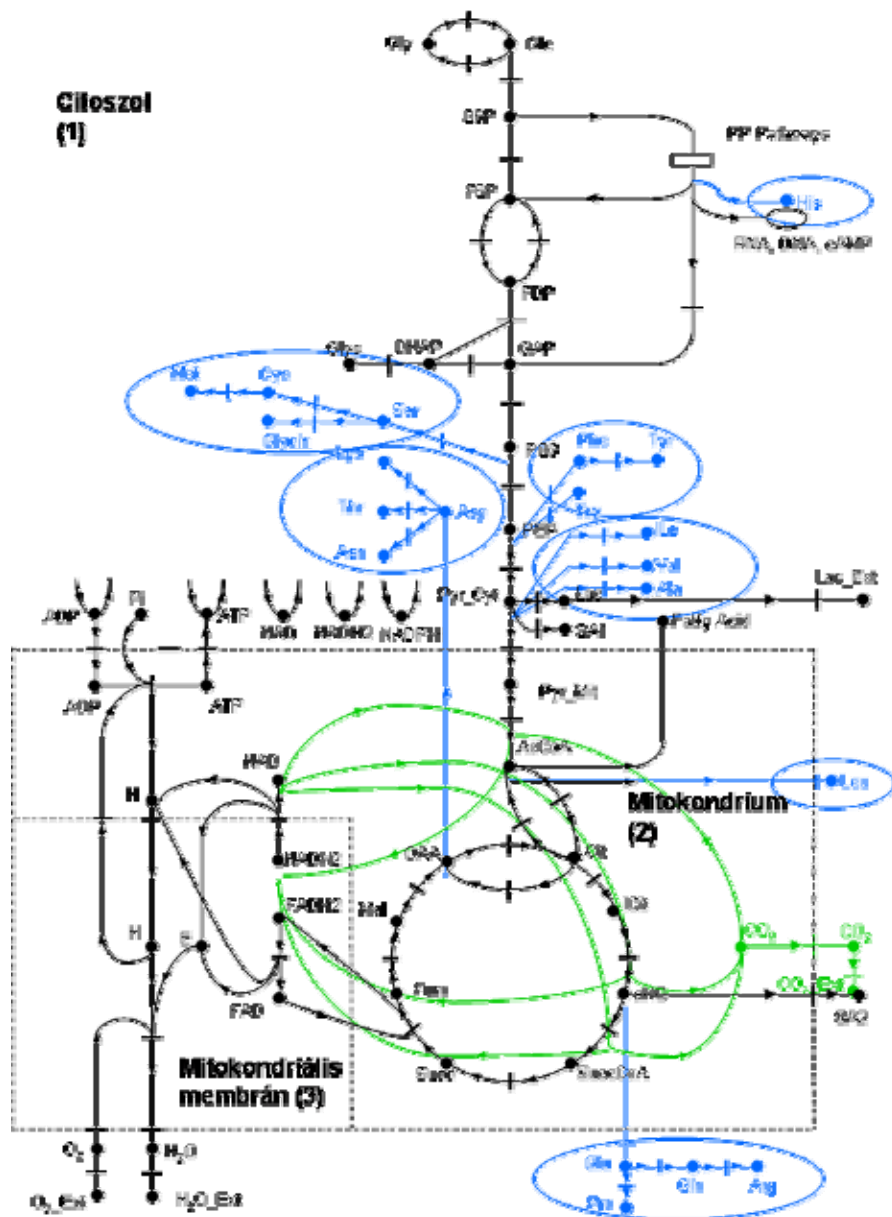


Figure 1: Simplified graph of the metabolic processes and connections of the main parts Cytosol(1), Mitochondrion(2), Mitochondrial membran(3)

Az 1. ábra csak a főbb folyamatokat és azok kapcsolódásait tartalmazza, melyek a következők:

- Glikolízis
- Pentóz-foszfát ciklus
- Citrátkör
- Terminális oxidáció folyamata

Az 1. és 2. ábrákon látható folyamatokat (az ábrázoltnál jóval részletesebben) egy megfelelően strukturált Excel adatbázisban gyűjtöttük össze, és ebből az adatbázisból egy interpretáló program készíti el a dinamikus szimulátor részletes input állományát. Az így kialakított durva felbontási modell a folyamatokat (az úgy nevezett „mass action” megközelítés szellemében) első illetve másodrendű (opcionálisan egyensúlyi) modellre képezi le.

A folyamatok Excel adatbázisban történő megadásánál maximum 4-4 input, illetve output komponens bevitelére van lehetőség, a hozzá tartozó kompartment feltüntetésével és a folyamatot katalizáló enzim megadásával. A kinetikai állandók és egyensúlyi paraméterek is megadhatók, azonban ezek számszerű értékére nincsenek, vagy csak bizonytalanul becsült adatok vannak. Ezért az adatbázisban egy olyan intervallumot is fel kell tüntetni, melyet a szimulátorral együttműködő genetikai algoritmus felhasznál majd az evolúciós módszerrel történő identifikálás során.

A komponensek esetében az ugyancsak bizonytalan, becsült koncentrációk és kompartment térfogatokból adódó bázisértékek miatt szintén egy „változtathatósági” intervallumot kell megadni a genetikai algoritmus számára.

A modellépítés során szükséges megtalálni egy a részletességre vonatkozó olyan kompromisszumot, mely élethűen mutatja be a modellezett valóságot, a valóság szempontjából lényegtelen elemeket viszont figyelmen kívül hagyja. A részletességre példaképpen a terminális oxidáció folyamatát mutatjuk be, mely lényege a következőkben fogalmazható meg.

A metabolikus modell egyik igen fontos eleme a nagyon sok elemi folyamat által fogyasztott és termelt különféle energiaközlelő és elvonó (pl. ATP, ADP), illetve oxidációs és redukciós (pl. NAD, NADH₂, FAD, FADH₂) „valuta jellegű” komponensek regenerálását a metabolikus folyamatokkal szervesen összekötő részletes, 2. ábrán bemutatott terminális oxidációs folyamat.

Ez a modell részlet a sejtben lezajló folyamatok oxidációja során keletkező protonokat és elektronokat a citrátkörrel kapcsolt NAD→NADH₂ illetve FAD→FADH₂ körön keresztül juttatja a terminális oxidáció enzimeihez. Megemlítendő, hogy a protonok egy másik része a mitokondrium külső membránján keresztül forgalmazódik. A terminális oxidáció során az elektronok a belső membrán elektronszállító rendszerén, a hidrogénionok pedig egy bizonyos koncentráció elérése után a „protonpumpán” keresztül jutnak az oxigénmolekuláig. A három alkotórész reakciójából víz keletkezik. Az elektron és protonszállítás energia felszabadulással járó folyamat, a sejtben egységnyi glükóz bomlásakor meghatározott mennyiségű ATP keletkezését biztosítja a mitokondriumban.

Modell leírás

A durva modellt a szimulátor szükség szerint dekomponálja a részletes strukturális modell aktív és passzív elemeire. A metabolikus modell esetében a passzív elemek az egyes elemi komponensek (enzim, metabolitok, kofaktorok és ezek komplexei), az aktív elemek pedig a lehetséges legrészletesebb elemi lépések. A 3. ábrán az egyik bruttó folyamatnak megfelelő részletes elemi folyamat kétrétegű háló modelljét mutatjuk be, ahol izocitrátból α-Ketoglutarát képződik NAD belépése illetve CO₂ és NADH₂ kilépése mellett.

2. ábra

A terminális oxidáció részletes folyamatábrája

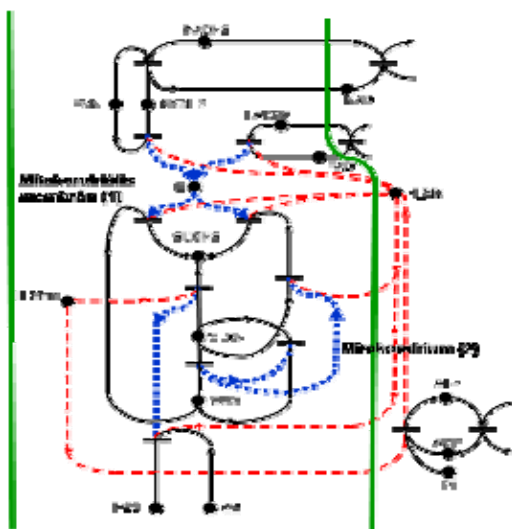
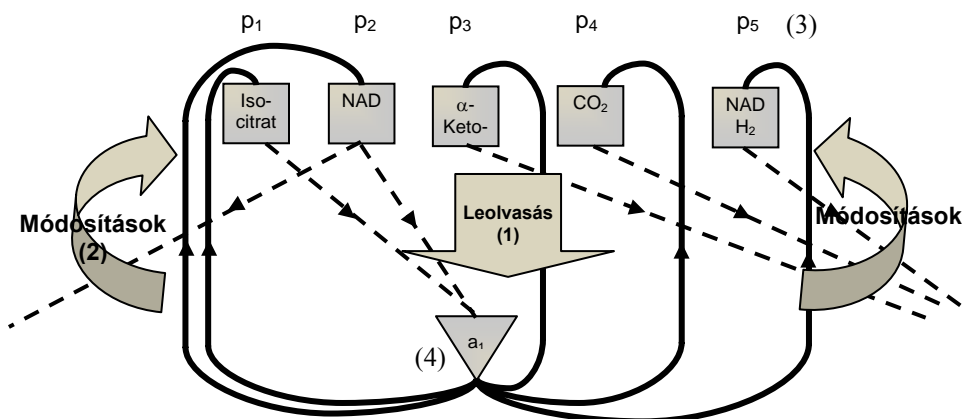


Figure 2: Detailed graph of the terminal oxidation

Mitochondrial membran(1), Mitochondrion(2)

3. ábra

Egy egyszerű elemi folyamat kétrétegű háló modell részlete



p₁, p₂, p₃, p₄, p₅ – passzív elemek a₁ – aktív elem

Figure 3: Detailed part of generic bi-layered net model for a simple chemical process

Reading channels(1), Modifying channels(2), p₁, p₂, p₃, p₄, p₅ – passive elements(3), a₁ – active element(4)

A modell identifikálására szolgáló számítógépi módszer alapját a kétrétegű háló modell alapú generikus szimulátor és az ezzel visszacsatolt kapcsolatban együttműködő genetikus algoritmus képezte (Csukás és Balogh, 1998).

A felhasználó által megadott strukturált Excel adatbázisból egy interpreter program GNU-Prolog kódot készít (Felhasználói vagy user interfész), soronként beolvasva a táblázat aktív és passzív elemeit, illetve ezeknek a struktúrából adódó leolvasásait és módosításait, lefordítva azokat a szimulátor által érthető nyelvre.

Ebből az ún. „Felhasználói (User) interfészből” és a szakértő által megadható ismereteket, összefüggéseket tartalmazó „Szakértői (Expert) interfészből” származó fájlok felhasználásával a GNU-Prolog nyelven írt kernel program végzi a dinamikus szimulációt. A modell tényleges identifikálását a genetikus algoritmussal való kommunikáció teszi lehetővé. A dinamikus szimulátor értékelési szempontokat és a lehetséges változtatások lehetőségterét biztosítja a genetikus algoritmusnak, mely a biológia mintájára szelekció, kereszteződés és mutáció révén tendenciájelleggel javuló pontosságú variánsokat képez és ad át a dinamikus szimulátornak számolásra. A szimulátor a számolások elvégzése után a kiértékelt variánsokat visszaadja a genetikus algoritmusnak, ahonnan az evolúciós folyamat végén „kinyerhetők” a legjobbnak ítélt változatok.

Mivel a sejtmodell felépítése ismerethiányos környezetben, többnyire bizonytalan adatokkal történik, ezt kiküszöbölendő szükség van a különféle ismeretek együttes alkalmazására, beépítésére.

Az általunk identifikálni kívánt metabolikus sejtmodell esetében a változtatható paraméterek (kinetikai és egyensúlyi állandók, koncentrációk) megadása egy ún. bottom-up tudás bevitelét jelenti a modellbe, mely egyfajta alulról való meghatározást jelent.

A top-down tudáselem felhasználását a modellben esetünkben a fluxusokra vonatkozó ismeretek alkalmazásán keresztül valósítjuk meg. Erre vonatkozóan az egyes útvonalak egzisztenciájára, illetve az egyes útvonalakhoz tartozó áramokra különféle, a szakértőktől és a szakirodalmi adatokból származó hipotézisek vannak. Egy példaként elmondható, hogy a beáramló glükóz fluxusban belépő szénatomok a távozó CO₂ fluxusában, a laktát és egyéb a sejt által előállított komponensek fluxusaiban, valamint a sejtbe épített komponensekben (pl. aminosavakban) jelennek meg.

A bottom-up és top-down tudáselemek együttes alkalmazása segíti a minél pontosabb identifikálást.

EREDMÉNYEK

Jelenlegi eredményeink a sejtben lejátszódó elemei folyamatokra vonatkozó kinetikák és egyensúlyi állandók, illetve az egyes elemekre vonatkozó koncentrációk becsült értékei, melyek alapján egy ténylegesen funkcionáló modell épült fel. Jelen állapotában – a felhasználók általi egyszerű kezelhetőség érdekében felhasználói felület készítése folyamatban van – a modell Excel munkafüzet alkalmazásával, tetszés szerinti folyamatokkal bővítve használható a különféle anyagok hatásának modellezésére (pl. gyógyszerek, toxinok hatása). Ezen kívül a programrendszer lehetővé teszi a különféle beadagolások függvényyszerű megadását is (pl. adott sejt kultúra táplálása érdekében a tápanyag tetszőleges függvény szerinti beadagolását).

Az eredmények azonban nem tekinthetők véglegesnek, hiszen a pontosabb sejtmodell identifikálása érdekében még rengeteg nyitott és folyamatosan felmerülő kérdés megvitatása áll előttünk a nemzetközi együttműködés keretében velünk dolgozó sejtbiológus szakemberekkel.

4. ábra

Az extracelluláris térben lévő anyagok mennyisége

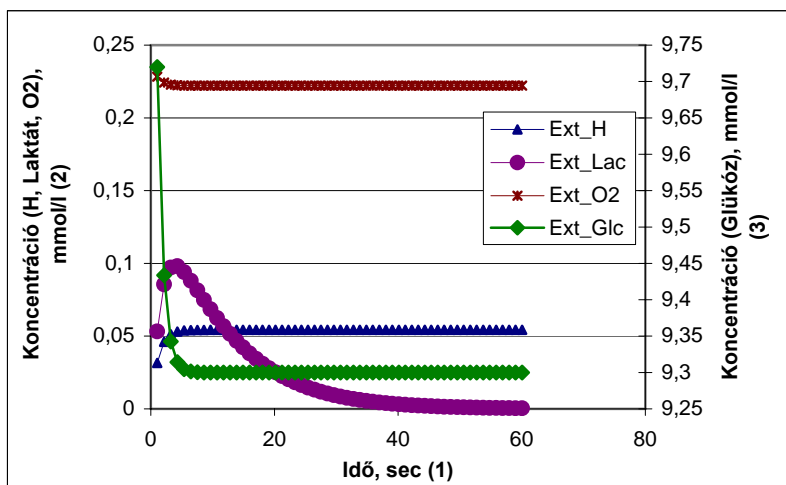


Figure 4: Chart of the external elements

Time, sec(1), Concentration of H, Lactat and O2(2), Concentration of Glucose(3)

5. ábra

A sejt által szintetizált aminosavak

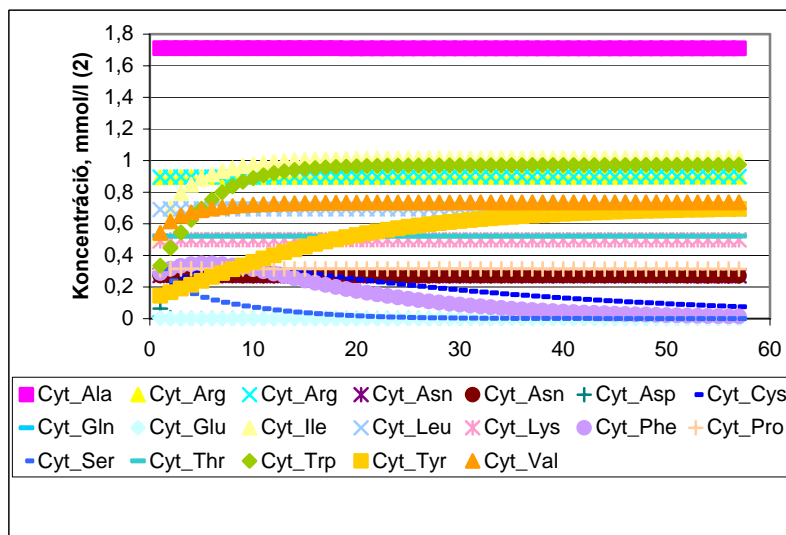


Figure 5: Synthesis of amino acids by the cell

Time, s(1), Concentration, mmol/l(2)

A pillanatnyilag rendelkezésünkre álló, aktuális ismereteink alapján identifikált modell működését reprezentálja a 4. ábra, mely a sejten kívüli oldatban lévő proton, laktát, oxigén és glükóz komponensek koncentrációjának időbeli változását mutatja. Az 5. ábra, mely a sejt által szintetizált aminosavak alakulását szemlélteti.

KÖVETKEZTETÉSEK

Eddigi munkánk tapasztalata alapján az elkészített sejtmodell jól alkalmazható a sejten belüli folyamatok pontosabb megismerésére, segítséget nyújthat különböző gyógyszerek, toxinok sejt szintű hatásmechanizmusainak megismerésére.

A feladat multidiszciplináris jellegéből adódóan elmondhatjuk, hogy a teljeskörű metabolikus modell felépítése egy szakmailag felkészült, különféle szakterületek képviselőiből álló team-et igényel, folyamatos konzultációval, a különböző elszigetelt tudáselemek ötvözésével.

Egyre több olyan kérdés adódik ugyanis a munka során, mely előre nem látható, de a feladat megoldása igényli a pontos megválaszolást, felderítést.

Példaképpen néhányat megemlítünk a jelenleg diszkutált kérdések közül:

- A metabolitok lehetséges vagy nem lehetséges akkumulációja, és a lehetséges koncentrációtartományok.
- A komponensek szükséges vagy nem szükséges állandó jelenléte.
- A parciális teljes fluxusutakra és körökre vonatkozó hipotézisek, becsült fluxus tartományok.
- Az egyes elemi folyamatok egyensúlyának becsült tartománya.
- A sejt által felvehető illetve leadható komponensek specifikálása.
- A kompartmentek közötti lehetséges transzportok megadása (pl. lehet-e NADH₂ transzport a mitokondrium és a citoszol között?)

Jövőbeni feladatok az ezekhez hasonló kérdésekre a válasz megtalálása, és a folyamatosan bővülő információk alapján a modell egyre pontosabb identifikálása.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A cikk a Gazdasági és Közlekedési Minisztérium GVOP/TST-3.3.1.-2004-04-0091/3.0 számú pályázatának felhasználásával készült.

IRODALOM

- Csukás, B., Balogh, S. (1998). Combining Genetic Programming with Generic Simulation Models in Evolutionary Synthesis. *Computers in Industry*, 36. 181-197.
- Eklunk, S.E., Taylor, D., Kozlov, E., Prokop, A., Cliffel, D.E. (2004). A Microphysiometer for Simultaneous Measurement of Changes in Extracellular Glucose, Lactate, Oxigen and Acidification Rate. In: *Analytical Chemistry* 76. 3. 519-527. p.
- Michal, G. (1999). *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg
- Nicholson, D.E. (2003). *Metabolic Pathways Chart*, Sigma-Aldrich
- Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W. (2006). *Fundamentals of Biochemistry*, 2nd Edition. John Wiley and Sons, Inc., 547.

Wikswó, J.P., Prokop, A., Baudenbacher, F., Cliffl, D.E., Csukas, B., Velkovsky, M. (2006). The Engineering Challenges of BioNEMS: The Integration of Microfluidics, and Micro- and Nanodevices, Models, and External Control for System Biology, IEE Proc. Nanobiotechnology (in press).

Levelezési cím (*corresponding author*):

Varga Mónika
Kaposvári Egyetem
7400, Kaposvár, Guba S. u. 40.
University of Kaposvár
H-7400, Kaposvár, Guba S. u. 40.
Tel.: 36-70-581-5673
e-mail: varga@matinf.gtk.u-kaposvar.hu