### Metabolik Modelleme *E. coli* iML1515

Bu çalışmada *Escherichia coli* için kapsamlı genom ölçekli model olan iML1515 kullanılmıştır. Farklı çevresel koşullarda hücrenin büyüme hızını ve metabolik akışlarını karşılaştırmaktır.

Flux Balance Analysis (FBA) hücrenin metabolik reaksiyonlarını matematiksel bir çerçevede ifade ederek her reaksiyon üzerinden geçen metabolik akışları (flux) tahmin etmeye yarar. Bu yöntem, stokiyometrik matris kullanımı ve lineer optimizasyon yaklaşımıyla çalışır. Belirlenen bir amaç fonksiyonunu (genellikle biyokütle üretimi veya büyüme hızı) maksimize etmeye çalışır. Böylece, farklı çevresel koşullar (örneğin aerobik veya anaerobik) ya da genetik müdahaleler altında hücrenin nasıl davranacağı öngörülebilir.

Model, BiGG Models veri tabanından SBML (.xml) formatında indirilmiştir. Python ortamında modelin analizi için COBRApy kütüphanesi kullanılmıştır. SBML formatındaki modelin temel özellikleri ilk aşamada incelenmiştir.

A screen shot of a computer screen

AI-generated content may be incorrect. A black screen with white text

AI-generated content may be incorrect.

Modelin temel özellikleri incelendiğinde iML1515 modelinde toplam 2712 reaksiyon, 1877 metabolit ve 1516 gen bulunduğu görülmüştür. Bu değerler *E. coli* metabolizmasını genom ölçeğinde kapsamlı bir şekilde temsil etmektedir.

Hücre metabolizmasının gerçekçi koşullarda incelenebilmesi için büyüme ortamı yeniden düzelmiştir.

A computer screen shot of a program

AI-generated content may be incorrect.

Modelin besi ortamı parametreleri değiştirilmiş, özellikle glukoz (10 mmol/gDW/h) ve oksijen (20 mmol/gDW/h) alım hızları sınırlandırılarak simülasyon yapılmıştır. İlk olarak aerobik koşullarda akı dengelemesi analizi (FBA) gerçekleştirilmiş ve maksimum büyüme hızı hesaplanmıştır. Daha sonra oksijen alım hızı sıfıra (0 mmol/gDW/h) ayarlanarak anaerobik koşul simüle edilmiş, bu durumda elde edilen büyüme hızı ile aerobik koşul karşılaştırılmıştır. Model optimizasyonu model.optimize() fonksiyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu fonksiyon, model üzerinde FBA uygulayarak tanımlı hedef fonksiyon için optimal çözümü hesaplamaktadır. Fonksiyon çalıştırıldığında sonuçlar cobra.Solution nesnesi olarak döndürülmekte ve bu nesne aracılığıyla çeşitli bilgilere erişilebilmektedir. solution.objective\_value büyüme hızı gibi optimize edilen hedef fonksiyonun değerini verirken, solution.fluxes her reaksiyonun hesaplanan flux değerlerini sunmaktadır.

A computer screen shot of a black screen

AI-generated content may be incorrect.

Yapılan flux balance analizi sonucunda aerobik ve anaerobik koşullarda hesaplanan maksimum büyüme hızlarının benzer olduğu (0.877 1/h) gözlemlenmiştir. Literatürde aerobik koşullarda büyümenin daha yüksek, anaerobik koşullarda ise sınırlı olması beklenmektedir. Anaerobik koşulda en yüksek flux değerleri ATP sentezi (ATPS4rpp), su değişimi (EX\_h2o\_e), NADH dehidrogenaz (NADH16pp) ve karbondioksit salınımı (EX\_co2\_e) gibi temel enerji metabolizması ve solunumla ilişkili reaksiyonlarda yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte, oksijen taşıma ve tüketimiyle ilişkili bazı reaksiyonlarda (örneğin CYTBO3\_4pp, O2tpp, O2tex) kayda değer flux değerlerinin gözlenmesi, anaerobik ortam tanımında oksijen kullanımının tam olarak engellenmediğini düşündürmektedir. Bu durumun başlıca üç nedeni olabilir. İlk olarak, ortam tanımlarında yalnızca tek bir oksijen değişim reaksiyonunun kapatılması yeterli olmayabilir; oksijenle ilişkili tüm exchange ve transport reaksiyonlarının sınırlarının kısıtlanması gerekmektedir. İkinci olarak, kullanılan biyomas reaksiyonunun oksijen tüketimine doğrudan bağımlı olmaması, fermantatif metabolizma yoluyla oksijensiz koşullarda da benzer büyüme hızlarının hesaplanmasına yol açabilir. Üçüncü olarak, glukoz alım hızının yüksek tutulması, anaerobik ortamda da yüksek büyüme hızlarını mümkün kılarak aerobik ve anaerobik koşullar arasındaki farkın maskelenmesine neden olmuş olabilir.

A screen shot of a computer code

AI-generated content may be incorrect.

Knock-out model üzerinde uygulanarak hücrenin maksimum büyüme hızı belirlenmiştir. Daha sonra orijinal model korunarak bir kopyası oluşturulmuş ve seçilen gen (b1779) devre dışı bırakılmıştır. Bu işlem, knock-out edilen genin bağlı olduğu reaksiyonları etkiler ve bu reaksiyonlar knocked\_out\_rxns listesinde tutulur. Knock-out sonrası model tekrar optimize edilerek yeni maksimum büyüme hızı hesaplanmış ve knock-out öncesi ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, knock-out nedeniyle devre dışı kalan reaksiyonlar ve bu reaksiyonlardaki flux değişimleri incelenmiştir. Bu sayede gen knock-out’unun metabolik akış üzerindeki etkisi ve hücre büyümesi üzerindeki olası etkileri detaylı bir şekilde gözlemlenebilmiştir.

A screenshot of a computer

AI-generated content may be incorrect.

Knock-out analizi sonuçlarına göre, b1779 geninin knock-out edilmesi öncesi modelin büyüme hızı 0.877 1/h iken, knock-out sonrası hız 0.7594 1/h olarak gözlemlenmiştir. Bu durum, knock-out’un hücre büyümesini bir miktar azalttığını göstermektedir. Knock-out sonrası devre dışı kalan reaksiyon sayısı 1 olup, bu reaksiyon GAPD olarak belirlenmiştir. Ayrıca, knock-out sonrası en fazla değişen flux değerleri incelenmiş ve PGK, PGM, ATPS4rpp gibi reaksiyonlarda belirgin artışlar gözlemlenmiştir.

A screen shot of a computer code

AI-generated content may be incorrect.

Analiz kapsamında hedef reaksiyon olarak sukkinatın hücre dışına taşınmasını temsil eden "EX\_succ\_e" reaksiyonu belirlenmiştir. Öncelikle bu reaksiyonun modelde tanımlı olup olmadığı kontrol edilmiş, sonrasında ise modelin amaç fonksiyonu söz konusu reaksiyona atanmıştır. Böylece FBA çözümü, sukkinat üretimini maksimize edecek şekilde gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon sonucunda elde edilen çözüm, sukkinatın hücre tarafından maksimum hangi hızda salgılanabileceğini göstermekte olup, sonuçlar mmol/gDW/h birimi üzerinden raporlanmıştır. Bu yöntem sayesinde model, ilgili metabolitin üretim potansiyeli hakkında nicel bir öngörü sağlamaktadır.

A black background with white text

AI-generated content may be incorrect.

Modelden elde edilen sonuçlara göre, hedef reaksiyon olan EX\_succ\_e için maksimum süksinat üretim hızı 17.1375 mmol/gDW/h olarak hesaplanmıştır. Bu değer, modelin mevcut ortam koşulları ve tanımlanan kısıtlar altında süksinatı en yüksek bu hızda dış ortama verebileceğini göstermektedir, bu sonucun süksinatın net üretimine karşılık geldiği söylenebilir.