



Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова  
Факультет вычислительной математики и кибернетики  
Кафедра математической кибернетики

---

Стешин Семен Сергеевич

**Khnum: быстрая open-source программа  
для расчета метаболических потоков  
с использованием  $^{13}\text{C}$ -углерода**

Выпускная квалификационная работа

Научный руководитель:  
к.ф.м.н., доцент  
Шуплецов М. С.

Москва — 2020

### **Аннотация**

В биологии и медицине встречается задача определения скорости метаболических потоков внутри клетки. Один из методов решения этой задачи —  $^{13}\text{C}$ -Metabolic Flux Analysis — анализ метаболических потоков с использованием  $^{13}\text{C}$ -углерода. В этом методе, исследователи проводят эксперимент и обрабатывают его результаты на компьютере. Проблема в том, что современные программы для анализа метаболических потоков либо имеют закрытый код и платны для коммерческого использования, либо написаны неэффективно, из-за чего вычисления могут занимать недели для одного эксперимента. В этой работе проведен краткий обзор метода, написана эффективная программа для решения задачи и проведено сравнение с существующими аналогами.

# Оглавление

<b>1</b>	<b>Введение</b>	<b>2</b>
1.1	Мотивация . . . . .	2
1.2	<sup>13</sup> C-Metabolic Flux Analysis . . . . .	3
1.2.1	Эксперимент . . . . .	3
1.2.2	Компьютерное моделирование . . . . .	3
<b>2</b>	<b>Основные понятия</b>	<b>4</b>
2.1	Глоссарий . . . . .	4
2.2	Допущения . . . . .	5
2.3	Прямая симуляция . . . . .	6
2.4	Обратная задача . . . . .	6
<b>3</b>	<b>Постановка задачи</b>	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>Основная часть</b>	<b>8</b>
4.1	Khnum . . . . .	8
4.2	Тестирование . . . . .	8
4.3	Бенчмаркинг . . . . .	8
<b>5</b>	<b>Полученные результаты</b>	<b>9</b>
5.1	Дальнейшая работа . . . . .	9

# Глава 1

## Введение

### 1.1 Мотивация

Рак — вторая по частоте причина смерти в мире[1]. Сто лет назад Отто Варбург заметил[2] особенность раковых клеток: они склонны производить энергию с помощью активного гликолиза, вместо более эффективного окислительного фосфорилирования. Знание этого позволило находить опухоли с помощью позитронно-эмиссионной томографии, а Варбурга наградили Нобелевской премией.

Диабетом болеет 8.8% людей в мире[3]. Почти 4 миллиона в год умирает из-за этой болезни. Лечения пока нет, но есть симптоматическая терапия инъекциями инсулина. Раньше его получали из поджелудочных желез свиней и коров, но препарат было сложно очистить, поэтому иногда случались аллергические реакции. Все изменилось в 1978 году, когда компания Genentech смогла создать генетически-модифицированную кишечную палочку, которая в ходе жизнедеятельности производила чистый человеческий инсулин[4]. Сейчас таким образом производят почти весь препарат.

В случае с эффектом Варбурга, открытие заключалось в изменении скорости химической реакции, протекающей внутри клетки. В случае с инсулином, решается задача метаболической инженерии — увеличить скорость синтеза инсулина, не убив кишечную палочку. В обоих случаях надо уметь измерять скорости внутриклеточных химических реакций — их называют потоками. Один из современных методов измерения потоков —  $^{13}\text{C}$ -Metabolic Flux Analysis (далее *MFA*), что переводится как анализ метаболических потоков. Его применяют в исследованиях рака[5–11], в метаболической инженерии[12–14] и в других областях[15–17]. Этому методу посвящена наша работа.

## 1.2 $^{13}\text{C}$ -Metabolic Flux Analysis

Введем основные понятия. Химические реакции, протекающие внутри клетки называют *метаболическими потоками*, а их реагенты — *метаболитами*. Задача состоит в определении скоростей внутриклеточных потоков. Для этого в методе  $^{13}\text{C}$ -MFA используется глюкоза, у которой некоторые атомы углерода заменены на тяжелый изотоп  $^{13}\text{C}$ . Эта глюкоза скармливается колонии клеток, и тяжелый углерод распространяется по метаболитам в ходе разных химических реакций. То как распределится углерод, зависит от скоростей потоков. Мы будем отслеживать углерод (поэтому его называют *трейсером*) и по его распределению восстановим скорости потоков.

### 1.2.1 Эксперимент

Хотя, текущая работа концентрируется на численном моделировании, опишем эксперимента[18, стр. 312]. Исследователь выращивает клетки на субстрате, содержащем  $^{13}\text{C}$ -углерод (обычно это глюкоза). Когда трейсер распределится по биологической системе, изолируем некоторые метаболиты: например, аминокислоты, полученные гидролизацией белков.

### 1.2.2 Компьютерное моделирование

Вычисляем то-то и вот так-то. Есть вот такие модели. Есть вот такие программы.

## Глава 2

# Основные понятия

### 2.1 Глоссарий

Приведем определения терминов

*$^{13}\text{C}$ -Metabolic Flux Analysis* — Анализ метаболических потоков с использованием  $^{13}\text{C}$ -углерода.

*Метаболический поток* — Внутриклеточная химическая реакция.

*Метаболит* — Реагент метаболического потока.

## 2.2 Допущения

Математическая модель для MFA основывается на нескольких допущениях о биологической системе[19]:

1. Состояние системы можно представить в виде конечного множества однородных пулов. Каждому атому углерода внутриклеточного метаболита соответствует свой пул.
2. Наблюдаемая система должна находиться в стационарном состоянии. Для этого экспериментаторы выжидают некоторое время, пока трейсер распространяется по системе.<sup>1</sup>
3. Метаболическая карта должна быть полной. То есть для интересующих метаболических потоков должны быть известны все предшествующие химические реакции, и в них должна быть известна судьба каждого атома углерода.
4. Изотопические массовые эффекты несущественны. То есть химические реакции протекают одинаково как с  $^{12}\text{C}$ , так и с  $^{13}\text{C}$ . Это обычно так, но массовые эффекты можно наблюдать в случае малых молекул типа  $\text{CO}_2$ .

Пулы?

Дописать  
по-  
сле  
нефор-  
маль-  
ного  
вве-  
де-  
ния

---

<sup>1</sup>В этой работе рассматривается только *Stationary MFA*, но существуют так же *Non-Steady MFA*[20], в котором в клеточной культуре делают несколько замеров, пока трейсер распределяется, и *Dynamic MFA*[21], в котором сами метаболические потоки меняются со временем. Эти модели не так развиты из-за своей вычислительной сложности.

## 2.3 Прямая симуляция

Опишем модель распространения трейсера ЕМУ, предложенную Мачеком Антониевичем в 2007 году[22].

## 2.4 Обратная задача

Метод оптимизации.



## Глава 3

### Постановка задачи

Написать программу, провести замеры.

## Глава 4

### Основная часть

#### 4.1 Khnum

Программа написана так-то. В ней то-то.

#### 4.2 Тестирование

Так убедился в корректности.

#### 4.3 Бенчмаркинг

Во как быстро.

## Глава 5

# Полученные результаты

Кратко: написано, протестировано, замерено.

### 5.1 Дальнейшая работа

Что можно сделать

# Литература

- [1] Всемирная Ассоциация Здравоохранения. Cancer [Электронный ресурс] URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (дата обращения: 12.03.2020)
- [2] Warburg O., Wind F., Negelein E. The metabolism of tumors in the body //The Journal of general physiology.— 1927. — Т. 8. — №. 6. — С. 519.
- [3] Zimmet P. et al. Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies //Nature Reviews Endocrinology. — 2016. — Т. 12. — №. 10. — С. 616.
- [4] Cohen S. N. et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro //Proceedings of the National Academy of Sciences. — 1973. — Т. 70. — №. 11. — С. 3240–3244.
- [5] Metallo C. M., Walther J. L., Stephanopoulos G. Evaluation of  $^{13}\text{C}$  isotopic tracers for metabolic flux analysis in mammalian cells //Journal of biotechnology. — 2009. — Т. 144. — №. 3. — С. 167–174.
- [6] Walther J. L. et al. Optimization of  $^{13}\text{C}$  isotopic tracers for metabolic flux analysis in mammalian cells //Metabolic engineering. — 2012. — Т. 14. — №. 2. — С. 162–171.
- [7] Hiller K., Metallo C. M. Profiling metabolic networks to study cancer metabolism //Current opinion in biotechnology. — 2013. — Т. 24. — №. 1. — С. 60–68.
- [8] Boroughs L. K., DeBerardinis R. J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth //Nature cell biology. — 2015. — Т. 17. — №. 4. — С. 351–359.

- [9] Dong W., Keibler M. A., Stephanopoulos G. Review of metabolic pathways activated in cancer cells as determined through isotopic labeling and network analysis //Metabolic engineering. — 2017. — T. 43. — C. 113–124.
- [10] Antoniewicz M. R. A guide to  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis for the cancer biologist //Experimental & molecular medicine. — 2018. — T. 50. — №. 4. — C. 1–13.
- [11] Badur M. G., Metallo C. M. Reverse engineering the cancer metabolic network using flux analysis to understand drivers of human disease //Metabolic engineering. — 2018. — T. 45. — C. 95–108.
- [12] Nakhigashi K. et al. Systematic phenome analysis of Escherichia coli multiple-knockout mutants reveals hidden reactions in central carbon metabolism //Molecular systems biology. — 2009. — T. 5. — №. 1.
- [13] Crown S. B., Long C. P., Antoniewicz M. R. Integrated  $^{13}\text{C}$ -metabolic flux analysis of 14 parallel labeling experiments in Escherichia coli //Metabolic engineering. — 2015. — T. 28. — C. 151–158.
- [14] Long C. P. et al. Enzyme I facilitates reverse flux from pyruvate to phosphoenolpyruvate in Escherichia coli //Nature communications. — 2017. — T. 8. — №. 1. — C. 1–8.
- [15] Wahrheit J., Nicolae A., Heinzle E. Eukaryotic metabolism: measuring compartment fluxes //Biotechnology journal. — 2011. — T. 6. — №. 9. — C. 1071–1085.
- [16] Metallo C. M., Vander Heiden M. G. Understanding metabolic regulation and its influence on cell physiology //Molecular cell. — 2013. — T. 49. — №. 3. — C. 388–398.
- [17] Dieuaide-Noubhani M., Alonso A. P. (ed.). Plant metabolic flux analysis: methods and protocols. — Humana Press, 2014.
- [18] Systems Metabolic Engineering. Methods and Protocols. // Под ред. Alper, Hal S. — 1 изд. Humana Press, 2013. — 474 с.
- [19] Wiechert W., de Graaf A. A. Bidirectional reaction steps in metabolic networks: I. Modeling and simulation of carbon isotope

- labeling experiments //Biotechnology and bioengineering. — 1997. — T. 55. — №. 1. — C. 101–117.
- [20] Wiechert W., Nöh K. Isotopically non-stationary metabolic flux analysis: complex yet highly informative //Current opinion in biotechnology. — 2013. — T. 24. — №. 6. — C. 979–986.
- [21] Leighty R. W., Antoniewicz M. R. Dynamic metabolic flux analysis (DMFA): a framework for determining fluxes at metabolic non-steady state //Metabolic engineering. — 2011. — T. 13. — №. 6. — C. 745–755.
- [22] Antoniewicz M. R., Kelleher J. K., Stephanopoulos G. Elementary metabolite units (EMU): a novel framework for modeling isotopic distributions //Metabolic engineering. — 2007 — T. 9. — №. 1. — C. 68–86.