



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 важно определять скорости метаболических потоков внутри клетки. Мощный метод 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. Для этого решают обратную задачу: подбирают такие параметры биологической системы, чтобы результат компьютерной симуляции совпал с экспериментальными данными. 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, его математических моделей, его программных реализаций, написана эффективная открытая программа для решения задачи на языке C++ и проведено сравнение с существующими аналогами.

# Оглавление

<b>1</b>	<b>Введение</b>	<b>2</b>
1.1	Мотивация . . . . .	2
1.2	$^{13}\text{C}$ -Metabolic Flux Analysis . . . . .	3
1.2.1	Эксперимент . . . . .	3
1.2.2	Математическая модель . . . . .	4
1.2.3	Компьютерные программы . . . . .	5
<b>2</b>	<b>Основные понятия</b>	<b>6</b>
2.1	Глоссарий . . . . .	6
2.2	Допущения . . . . .	7
2.3	Прямая симуляция . . . . .	8
2.3.1	EMU . . . . .	8
2.3.2	Стехиометрическая матрица . . . . .	9
2.3.3	Каскад уравнений . . . . .	10
2.3.4	Улучшения . . . . .	10
2.4	Обратная задача . . . . .	11
2.5	Статистический анализ . . . . .	12
<b>3</b>	<b>Постановка задачи</b>	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>Основная часть</b>	<b>14</b>
4.1	Khnum . . . . .	14
4.2	Тестирование . . . . .	14
4.3	Бенчмаркинг . . . . .	14
<b>5</b>	<b>Полученные результаты</b>	<b>15</b>
5.1	Дальнейшая работа . . . . .	15

# 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 первом случае, 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.

Напрямую можно измерить только внешние потоки — например, с какой скоростью поглощается глюкоза или с какой скоростью выделяется  $\text{CO}_2$ . Внутриклеточные потоки восстанавливают из «сцепленной» информации, полученной в эксперименте.

В методе  $^{13}\text{C}$ -MFA «сцепленной» информацией становится распределение особых атомов. Для этого используется входной субстрат, у которого некоторые атомы углерода заменены на стабильный тяжелый изотоп  $^{13}\text{C}$ , называемый *трейсером*<sup>1</sup>. Этот субстрат скормливается колонии клеток, и тяжелый углерод распространяется по метаболитам в ходе химических реакций. То, как он распределится, зависит от скоростей потоков, поэтому узнав распределение, можно математическими методами восстановить значения метаболических потоков.

проверить  
до-  
ступ-  
ность  
суб-  
стра-  
тов  
уг-  
ле-  
рода

### 1.2.1 Эксперимент

Хотя, текущая работа концентрируется на численном моделировании, опишем эксперимент [20, 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. Эти метаболиты содержат разное количество меченных атомов и, поэтому отличаются по массе. Найдем долю молекул разной тяжести. «Взвешивать» молекулы можно с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии, при этом для каждого метаболита на выходе получим так называемый *Mass Isotopomer Distribution* (далее *MID*) — вектор  $MID = [M_0, M_1, \dots, M_n]$ , где  $M_i$  — массовая доля метаболита с  $i$  атомами трейсера, и  $\sum_{i=0}^n M_i = 1$ . Набор таких векторов — это распределение трейсера, поэтому они служат входными данными математической задачи. Подробные протоколы эксперимента можно найти в [21] для животных клеток и в [22] для растений.

<sup>1</sup>На самом деле, использовать углерод не обязательно. В последнее время появились работы, использующие  $^{15}\text{N}$  азот [18] или  $^{34}\text{S}$  серу [19]. Эти стабильные изотопы позволяют исследовать метаболические пути, в которых нет углерода, однако, для большинства приложений хватает более доступных субстратов с меченым углеродом.

### 1.2.2 Математическая модель

Существуют разные подходы к вычислению метаболических потоков. Чаще всего задачу решают как обратную. Для этого создают математическую модель, предсказывающую MID измеренных метаболитов при заданных скоростях потока; пишут программу для симуляции, а затем решают задачу регрессии: подбирают такие значения потоков, при которых предсказанный в симуляции MID совпадает с полученным в эксперименте.

На вход прямой симуляции подается

- Меченность входного субстрата (например, в каких позициях глюкозы стояли тяжелые изотопы  $^{13}\text{C}$ ).
- Полный набор химических реакций клетки и их реагенты.
- Скорости всех метаболических потоков.

На выходе получается MID вектор экспериментально измеренных метаболитов.

На вход задачи регрессии подается:

- Измеренные MID некоторых метаболитов.
- Если есть — измеренные внешние потоки (например, скорость поглощения глюкозы).
- Если есть — ограничения на скорости потоков, известные из биологических соображений.

Конечно, обратная задача может иметь несколько решений, поэтому результат должен проанализироваться биологом. Формальное описание и решение модели в главе 2.

### Историческая справка

Первую модель прямой симуляции составил Wolfgang Wiechert[23, 24] в 1997 году. Она использовала понятие изотопомера — это молекулы одного вещества, имеющие одинаковое количество атомов изотопов, вообще говоря в разных позициях. За два года автор разработал математически эквивалентную модель кумомеров[25, 26], которая быстрее рассчитывалась на компьютере. В 2007 году Maciek R. Antoniewicz создал EMU-модель[37], которая остается самой популярной среди программных реализаций. Так же существуют прямые модели[27], вероятностные модели на основе Марковских цепей[28] и другие[29]. В этой работе подробно разбирается EMU-модель.

### 1.2.3 Компьютерные программы

Существует несколько программ для МФА-расчетов.

**13CFLUX2** — Самая известная программа для  $^{13}\text{C}$ -МФА. Имеет закрытый исходный код и платна для коммерческого использования. Для научных целей можно получить академическую лицензию, написав письмо в Германию[30].

**Metran** — Написана автором EMU-модели. Чтобы получить программу под академической лицензией надо написать письмо в MIT.

**OpenFlux(2)** — Пакет для Matlab[31, 32].

**FluxPyt** — Пакет для Python[33].

вписать  
еще

# Глава 2

## Основные понятия

### 2.1 Глоссарий

Некоторые термины встретятся дальше.

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

*Метаболический поток* — Внутриклеточная химическая реакция.

*Метаболит* — Реагент метаболического потока.

*Трейсер* — Атом, тяжелый стабильный изотоп которого отслеживается в MFA. Обычно, это  $^{13}\text{C}$ .

*MID* — Mass Isotope Distribution, вектор  $MID = [M_0, M_1, \dots, M_n]$ , соответствующим метаболиту  $M$ , где  $M_i$  — массовая доля метаболита с  $i$  атомами трейсера, а  $\sum_{i=0}^n = 1$ .

*EMU* — Elementary Metabolic Unit молекулы  $A$  — это любое непустое подмножество атомов трейсера этой молекулы.

*Размер EMU* — Количество атомов в EMU.

*Размер EMU-реакции* — Размер реагентов EMU-реакции.

*EMU-граф* — граф EMU-реакций одного размера.

*Стехиометрическая матрица* — Матрица, каждый столбец которой соответствует химическому уравнению и заполнен коэффициентами метаболитов. В условиях стационарности, при умножении на столбец скоростей метаболитов даст ноль.



## 2.2 Допущения

Математическая модель для MFA основывается на нескольких допущениях о биологической системе[23]:

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 незначительны. То есть химические реакции протекают одинаково как с  $^{12}\text{C}$ , так и с  $^{13}\text{C}$ . Это обычно верно, но массовые эффекты можно наблюдать в случае малых молекул типа  $\text{CO}_2$ .

Пулы?

Дописать после неформального введения

Заметим, что разным математическим моделям могут соответствовать разные допущения. Этот вопрос подробно разбирался в работе [36], там же формально был доказан изоморфизм нескольких популярных моделей.

---

<sup>1</sup>В этой работе рассматривается только *Stationary MFA*, но существуют так же *Non-Steady MFA*[34], в котором в клеточной культуре делают несколько замеров, пока трейсер распределяется, и *Dynamic MFA*[35], в котором сами метаболические потоки меняются со временем. Эти модели не так развиты из-за своей вычислительной сложности.

## 2.3 Прямая симуляция

Опишем модель ЕМУ, предложенную Мачеком Антониевичем в 2007 году[37]. Рассмотрим направленный гиперграф, вершины которого соответствуют метаболитам, а ребра — химическим реакциям. Для каждой реакции известно какой атом углерода в какой переходит. Такой граф называют *метаболической сетью*. На вход модели подается:

- Метаболическая сеть.
- Меченность входных субстратов.
- Экспериментально измеренный метаболит сети, MID которого будем предсказывать.

На выходе — MID указанного метаболита. Для этого мы построим графы специального вида (*графы ЕМУ-реакций*), по которым построим каскад СЛАУ, решение которых будет искомым MID.

### 2.3.1 ЕМУ

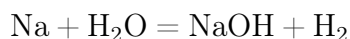
Пусть  $A$  — молекула. Любое непустое подмножество атомов углерода молекулы  $A$  будем называть *Elementary Metabolic Unit* (далее *ЕМУ*). Например, если  $A$  состоит из трех атомов углерода, обозначим через  $A_{13}$  ЕМУ состоящий из первого и третьего атома углерода (на атомах углерода одной молекулы существует естественный порядок).

Будем рассматривать ЕМУ-реакции. Всего можно выделить три типа: реакции конденсации(condensation), расщепления(cleavage) и унимолекулярная реакция(unimolecular). Для каждой реакции мы хотим понять, какое минимальное количество информации требуется, чтобы рассчитать MID продукта. Для всех реакций достаточно знать MID исходных веществ и тогда MID продукта рассчитывается по формулам с ??.

Посмотрим, как получить финальный MID. Через DFS построим все ЕМУ-реакции, чтобы произвести финальный MID. Сгруппируем ЕМУ-реакции по размерам и для каждой группы построим граф.

### 2.3.2 Стехиометрическая матрица

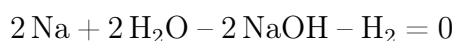
Введем понятие стехиометрической матрицы. Рассмотрим химическое уравнение:



Расставим коэффициенты:



Перенесем все в левую часть:



Здесь записан закон сохранения массы. Из допущения, система находится в стационарном состоянии. Значит скорость реакции не меняется: какого?

$$2 \frac{d\text{Na}}{dt} + 2 \frac{d\text{H}_2\text{O}}{dt} - 2 \frac{d\text{NaOH}}{dt} - \frac{d\text{H}_2}{dt} = 0$$

Запишем в матричном виде:

$$\begin{pmatrix} 2 & 2 & -2 & -1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \frac{d\text{Na}}{dt} \\ \frac{d\text{H}_2\text{O}}{dt} \\ \frac{d\text{NaOH}}{dt} \\ \frac{d\text{H}_2}{dt} \end{pmatrix} = 0$$

Если мы рассмотрим систему химических уравнений, в левой матрице будет разреженная матрица, каждая строчка которой — химическое уравнение. Она называется *стехиометрической матрицей*.

$$\begin{pmatrix} \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & 2 & 2 & -2 & -1 & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \vdots \\ \frac{d\text{Na}}{dt} \\ \frac{d\text{H}_2\text{O}}{dt} \\ \frac{d\text{NaOH}}{dt} \\ \frac{d\text{H}_2}{dt} \\ \vdots \end{pmatrix} = 0$$

$$Sv = 0$$

### **2.3.3 Каскад уравнений**

Для каждого графа запишем условие стационарности  $AX = BY$ . Решаем, получаем ответ. Дополнительно можно посчитать производные.

### **2.3.4 Улучшения**

Разбиение на компоненты связности.

## 2.4 Обратная задача

Минимизация разности квадратов. Какие существуют методы оптимизации.

## 2.5 Статистический анализ

Это значимо, а это нет. Есть байесовский подход.

## Глава 3

### Постановка задачи

- Написать программу для расчета  $^{13}\text{C}$ -MFA на языке C++.
- Провести тестирование, сравнить скорость работы с существующими аналогами.

## 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] Nakahigashi 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] Nilsson R., Jain M. Simultaneous tracing of carbon and nitrogen isotopes in human cells //Molecular BioSystems. — 2016. — T. 12. — №. 6. — C. 1929–1937.

- [19] Krömer J. O. et al. Accumulation of homolanthionine and activation of a novel pathway for isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* McbR deletion strains // *Journal of bacteriology*. — 2006. — T. 188. — №. 2. — С. 609–618.
- [20] *Systems Metabolic Engineering. Methods and Protocols.* // Под ред. Alper, Hal S. — 1 изд. Humana Press, 2013. — 474 с.
- [21] (ed.). *Metabolic flux analysis: methods and protocols.* // Под ред. Krömer J. O., Nielsen L. K., Blank L. M. — 1 изд. Humana Press, 2014. — 329 с.
- [22] *Plant metabolic flux analysis: methods and protocols.* // Под ред. Dieuaide-Noubhani M., Alonso A.P. — 1 изд. Humana Press, 2014. — 366 с.
- [23] 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. — С. 101–117.
- [24] Wiechert W. et al. Bidirectional reaction steps in metabolic networks: II. Flux estimation and statistical analysis // *Biotechnology and bioengineering*. — 1997. — T. 55. — №. 1. — С. 118–135.
- [25] Wiechert W. et al. Bidirectional reaction steps in metabolic networks: III. Explicit solution and analysis of isotopomer labeling systems // *Biotechnology and bioengineering*. — 1999. — T. 66. — №. 2. — С. 69–85.
- [26] Möllney M. et al. Bidirectional reaction steps in metabolic networks: IV. Optimal design of isotopomer labeling experiments // *Biotechnology and bioengineering*. — 1999. — T. 66. — №. 2. — С. 86–103.
- [27] Rantanen A. et al. Algorithms for  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis. — 2006.
- [28] Huo Y., Ji P. Continuous-Time Markov Chain-Based Flux Analysis in Metabolism // *Journal of Computational Biology*. — 2014. — T. 21. — №. 9. — С. 691–698.

- [29] Srour O., Young J. D., Eldar Y. C. Fluxomers: a new approach for  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis //BMC systems biology. — 2011. — T. 5. — №. 1. — C. 129.
- [30] Weitzel M. et al. 13CFLUX2—high-performance software suite for  $^{13}\text{C}$ -metabolic flux analysis //Bioinformatics. — 2013. — T. 29. — №. 1. — C. 143–145.
- [31] Quek L. E. et al. OpenFLUX: efficient modelling software for  $^{13}\text{C}$ -based metabolic flux analysis //Microbial cell factories. — 2009. — T. 8. — №. 1. — C. 25.
- [32] Shupletsov M. S. et al. OpenFLUX2:  $^{13}\text{C}$ -MFA modeling software package adjusted for the comprehensive analysis of single and parallel labeling experiments //Microbial cell factories. — 2014. — T. 13. — №. 1. — C. 152.
- [33] Desai T. S., Srivastava S. FluxPyt: a Python-based free and open-source software for  $^{13}\text{C}$ -metabolic flux analyses //PeerJ. — 2018. — T. 6. — C. e4716.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] Borkum M. I. et al. Modeling framework for isotopic labeling of heteronuclear moieties //Journal of cheminformatics. — 2017. — T. 9. — №. 1. — C. 1–11.
- [37] 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.