

УДК 577.121:51-76

Анализ метаболических потоков с использованием ^{13}C -изотопов (^{13}C -MFA).

I. Экспериментальные основы метода и состояние исследований

© 2016. Л.И. ГОЛУБЕВА^{1,*}, М.С. ШУПЛЕЦОВ^{1,2}, С.В. МАШКО^{1,3}

¹ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика», Москва 117545

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет вычислительной математики и кибернетики, Москва 119991

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва 119991

*e-mail: luba_golubeva@agri.ru

Резюме — Количественное определение внутриклеточных потоков метаболитов имеет большое фундаментальное и практическое значение для изучения роли разнообразных метаболических путей и отдельных реакций, для описания метаболического статуса клетки, различий между штаммами и выбора стратегии улучшения свойств штаммов — продуцентов биологически активных веществ. Набор методов, решающих задачу характеристики метаболического состояния клетки путем определения внутриклеточных потоков метаболитов, объединен под общим названием анализ метаболических потоков (Metabolic Flux Analysis, MFA), или флюксомика (fluxomics). Вместе с другими так называемыми «Х-омными» технологиями (геномикой, транскриптомикой, протеомикой и метаболомикой) эта совокупность методов входит в арсенал современной системной биологии. Одним из наиболее развитых в настоящее время подходов к определению метаболических потоков *in vivo* в квазистационарных условиях является метод ^{13}C -MFA, основанный на проведении экспериментов с использованием субстратов, меченых тяжёлыми ^{13}C -изотопами углерода. Отличительной чертой этого метода является необходимость согласованного действия специалистов разных областей: биохимии, вычислительной математики и ЯМР/масс-спектрометрии. Учитывая эту особенность, авторы предлагают обзор, состоящий из трех частей, с целью в равной степени дать представление о разных, но одинаково важных аспектах флюксомики. В первой части, представленной ниже, основное внимание уделено базовым принципам ^{13}C -MFA: составлению стехиометрической модели целевого организма, постановке эксперимента с меченым субстратом и методом, позволяющим получать значительную часть информации для расчета внутриклеточных потоков. Вторая часть посвящена математическим аспектам моделирования экспериментов с меткой, количественным расчетам параметров потоков и оценки их статистической достоверности. В заключительной третьей части будут рассмотрены имеющиеся на сегодняшний день результаты фундаментальных и прикладных исследований метаболизма бактерий, получение которых стало возможным благодаря использованию ^{13}C -MFA.

Ключевые слова: изотопмер, стехиометрическая метаболическая модель, эксперимент с ^{13}C -меченым субстратом.

doi: 10.1016/0234-2734-2758-2016-32-5-10-37

Список сокращений: а.е.м. — атомная единица массы; КоА — коэнзим А; ММ — молекулярная масса; ТКТ — транскетолаза; Ф — фосфат; ЦМ — центральный метаболизм; ЯМР — ядерный магнитный резонанс; АТФ — аденозинтрифосфат; CID (Collision-Induced Dissociation) — диссоциация, индуцированная столкновениями; CLE (carbon-labeling experiment) — эксперимент с меченым углеродом; EDP (Entner–Doudoroff Pathway, ED-путь) — метаболический путь Энтнера–Дудороффа; EI (Electron Impact Ionization) — ионизация электронным ударом; EMP (Embden–Meyerhof–Parnas Pathway) — метаболический путь Эмбдена–Мейерхофа–Парнаса; ESI (electrospray ionization) — электроспрей-ионизация; FBA (Constraints-based Flux Balance Analysis) — анализ метаболических потоков; GLC — глюкоза; GS (genome-scale) модель — полногеномная модель; GC — газовая хроматография; **IDV** (Isotopomer Distribution Vector) — вектор изотопомерного распределения; LC — жидкостная хроматография; **MAV** (Metabolite Activity Vector) — вектор активности метаболита; **MDV** (Mass Distribution Vector) — вектор распределения по массам; MFA (Metabolic Flux Analysis) — анализ метаболических потоков; MS — масс-спектрометрия; PEP — фосфоенолпируват; PPP (Pentose-Phosphate Pathway, PP-путь) — пентозофосфатный цикл; TAL — трансальдолаза; TCA (TriCarboxylic Acid Cycle) — цикл трикарбоновых кислот.

Metabolic Flux Analysis using ^{13}C Isotopes.

I. Experimental Basis of the Method and Present State of Investigations

L.I. GOLUBEVA^{1,*}, M.S. SHUPLETSOV^{1,2}, S.V. MASHKO^{1,3}

¹The Closed Joint-Stock Company Ajinomoto-Genetika, Moscow, 117545 Russia

²The Faculty of Computational Mathematics and Cybernetics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

³The Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: luba_golubeva@agri.ru

Abstract — A quantitatively characterized picture of intracellular metabolite fluxes provides useful information for both fundamental and applied investigations of various metabolic pathways and individual reactions, for the description of the cell metabolic status, metabolic differences between strains, and developing of the strategy for improving characteristics of strains producing biologically active compounds. A kit of methods aimed at the cell metabolic state characterization by determining the intracellular metabolite fluxes has got a common name of Metabolic Flux Analysis (MFA), or fluxomics. Together with so-called X-omic technologies (genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics), fluxomics is a part of the recent arsenal of system biology methods. ^{13}C -based Metabolic Flux Analysis (^{13}C -MFA) dealing with ^{13}C (heavy carbon)-labeled substrates is one of the most developed approaches to the analysis of intracellular metabolic fluxes in vivo under steady-state conditions. The application of ^{13}C -MFA requires a combined functioning of experts in biochemistry, applied mathematics and NMR/mass-spectrometry. In view of this feature, authors prepared a three-part review to highlight various, but equally important fluxomic aspects. In the first part represented below, the attention is paid to the basic principles of ^{13}C -MFA like: design of stoichiometric model of target organism; experiments with labeled substrate which permits to obtain the basic portion of information for intracellular fluxes calculation; and experimental data extraction. Principles of mathematical modeling of experiments with labeled substrates together with quantitative carbon flux estimation and assessment of their statistic reliability are discussed in the second part. The final part reviews the recent achievements in fundamental and applied investigations of bacterial metabolism reached with the ^{13}C -MFA assistance.

Key words: ^{13}C -labeling experiment, isotopomer, stoichiometric metabolic model.

Само возникновение нового направления в биологической науке, получившего название системной биологии, т.е. теоретического и экспериментального исследования биологических объектов на уровне целостных систем [1], было обусловлено возникновением, бурным развитием и широким применением инновационных высокопродуктивных и информативных методов, или так называемых X-омных технологий (X-omics). Эти методы позволяют в настоящее время получать информацию: о структуре отдельных областей и целых геномов новых организмов (геномика) [2—5]; о профиле синтезируемых в клетках мРНК (транскриптомика) [6—9] и белков (протеомика) [10—12]; о специфических белковых комплексах (интерактомика) [13, 14]; о синтезе и компартиментализации клеточных метаболитов (метабономика) [15, 16]; о скорости потоков реакций в различных участках разветвленной метаболической сети клетки (флюксомика, или анализ метаболических потоков, Metabolic Flux Analysis, MFA) [17—19].

Методические особенности X-омных технологий, их вклад в комплексное исследование биологических систем как для получения фундаментальных, так и практически значимых результатов, неоднократно освещались в обзорной лите-

ратуре [20—24] и в специализированных публикациях [25—27]. В то же время отмечалось [18, 19], что частота использования этих методов в различных сферах различна, что часто связано со сложностью их освоения исследовательскими лабораториями до уровня, необходимого для получения достоверно значимых экспериментальных результатов. Задачи прикладной геномики, включая определение нуклеотидной последовательности и аннотацию как отдельных генетических кластеров, так и целых геномов, доступны в настоящее время многим лабораториям. В частности, в странах с развитой структурой «научного сервиса» рутинные задачи по секвенированию практически полностью переданы из исследовательских групп в коммерческие структуры. При этом, естественно, не останавливаются и фундаментальные исследования в области геномики, направленные на дальнейшее совершенствование методов секвенирования и алгоритмов анализа данных, а также практические разработки новой приборной и методической базы.

Многочисленные лаборатории используют в своих исследованиях транскриптомику и протеомику — методы количественного анализа синтезированных в клетках соответственно мРНК и бел-

ков (см., например [28]). Несколько менее активно, чем методы геномики, но все же достаточно часто практикуется проведение транскриптомного и протеомного анализа приготовленных исследователями проб на коммерческой основе. При этом техника коммерческого приготовления специализированных фильтров или микрочипов для проведения гибридизационных работ в рамках транскриптомики постепенно заменяется прямым секвенированием индивидуальных молекул мРНК [29], что опять-таки обусловлено колоссальным прогрессом методов и приборной оснащённости геномики.

В развитых странах рутинные анализы в области метабомики также постепенно переходят из исследовательских лабораторий в крупные специализированные коммерческие научно-аналитические центры, ориентированные на серийное определение многочисленных интермедиатов клеточного метаболизма. За исследователями-заказчиками остаются, таким образом, пионерские разработки новых аналитических методов, а также довольно сложный и решаемый в зависимости от поставленной задачи вопрос об адекватной подготовке проб чрезвычайно лабильных биологически активных препаратов [30—33].

В отличие от сказанного выше флюксмики, являясь комплексной экспериментально-аналитической техникой, до настоящего времени все еще остается достоянием ограниченного числа ведущих лабораторий мира [19]. По своей методологической сути общая задача MFA состоит в том, чтобы путем сочетания результатов измерения эффлюксов (т.е. внеклеточных потоков расходования субстратов, формирования продуктов клеточного метаболизма, а также физиологических потоков расходования общих метаболических предшественников на синтез биомассы) и стехиометрического моделирования клеточного метаболизма определить параметры потоков внутриклеточных соединений в разветвленной метаболической цепи [34].

MFA используется в современной науке в виде нескольких подходов, различающихся методически и идеологически. Например, принципиально различаются подход анализа потоков, основанный на решении задачи линейного программирования с ограничениями (Constraints-based Flux Balance Analysis, FBA), и анализа метаболических потоков с использованием ^{13}C (^{13}C -based Metabolic Flux Analysis, ^{13}C -MFA). Каждый из этих подходов может рассматриваться в динамическом, стационарном и квазистационарном варианте в зависимости от экспериментальных условий определения параметров потоков.

В общем случае MFA базируется на решении уравнений массового баланса для внутриклеточных метаболитов. В простейшем случае, чаще всего встречающемся на практике, уравнения баланса записываются в предположении стационарности, т.е. ситуации, когда скорость изменения концентраций всех внутриклеточных метаболитов за время проведения эксперимента может считаться равной нулю (стационарный MFA). Разрабатываемые в настоящее время подходы к решению нестационарных задач MFA (см., например [35, 36]) не рассматриваются в данной работе; для интересующихся читателей можно рекомендовать несколько последних специализированных обзоров [37, 38].

В стационарных или квазистационарных условиях совокупный входящий поток для каждого из метаболитов уравнивается суммой выходящих потоков; в результате для пула каждого внутриклеточного метаболита генерируется одно линейное алгебраическое уравнение. Естественно, условие квазистационарности накладывает определенные ограничения на характер подвергаемых анализу биологических систем, а потому с помощью MFA исследуются в основном культуры, растущие с постоянной скоростью в проточных ферментерах. С существенно большими ограничениями принимаются к рассмотрению культуры в экспоненциальной фазе роста или в условиях медленно меняющихся параметров внешней среды.

Исходно стационарный MFA представлял собой сугубо теоретический компьютерный анализ внутриклеточных метаболических потоков, основанный на измеренных эффлюксах и стехиометрическом моделировании. Современное научное направление, сохранившее основные черты и методы традиционной флюксмики, носит название FBA (Flux Balance Analysis) [39]. FBA — это теоретический анализ параметров внутриклеточных метаболических потоков, входящих в стехиометрическую модель исследуемого организма, который основан на решении задачи линейного программирования при поиске экстремума линейной в отношении потоков некой заданной исследователем целевой функции.

Как правило, количество неизвестных параметров потоков превышает количество уравнений баланса, генерированных для внутриклеточных метаболитов. В результате в FBA система стехиометрических уравнений массового баланса является недоопределенной. Математически эта ситуация характеризуется тем, что единственного решения системы уравнений FBA не существует.

Чтобы уменьшить допустимое пространство возможных решений, как правило, используют введение некоторых формальных ограничений в виде различных целевых функций. Так, ограничение со стороны редокс-баланса подразумевает, что сумма потоков через все окислительные и восстановительные реакции должна равняться нулю. Другим ограничением может являться количество произведенного или потребленного АТР. При этом термодинамические соображения [40] и доступные данные метабомики о концентрации субстратов и продуктов некоторых реакций взятые вместе могут позволить существенно упростить используемую модель путем замены части бинаправленных реакций однонаправленными. Часто FBA проводится в предположении о наибольшей скорости синтеза биомассы в условиях неограниченного количества субстратов, которые, как полагают, расходуются максимально эффективно на биосинтез внутриклеточных компонентов и т.п. Начатый в 90-х годах стехиометрический анализ потоков в квазистационарном приближении базировался на известных потребностях микроорганизмов в биосинтетических предшественниках для производства биомассы; при этом делалась попытка определить возможные параметры потоков в клетке в зависимости от скорости ее роста [39, 41, 42]. Такая процедура привела к появлению первых карт потоков центрального метаболизма (ЦМ) [43].

Однако, как правило, любые ограничения модели основаны на предположениях, которые совершенно необязательно реализуются в клетках исследуемых организмов [34]. В настоящее время FBA широко используется в основном для теоретического изучения потенциала больших метаболических сетей, в частности которые генерируются в ходе метаболических реконструкций вновь секвенированных и аннотированных полных геномов организмов при учете всех биохимических реакций, для которых обнаруживаются возможные белковые катализаторы — гомологи известных ферментов других организмов [44, 45]. Результаты определения оптимальных потоков методами FBA имеют большое теоретическое значение, устанавливая величину потенциальных максимумов для образования клетками интересующих исследователей продуктов клеточного метаболизма, которая, однако, может быть недостижима при конструировании реальных продуцентов.

Специальной разновидностью FBA является ^{13}C -constrained FBA. При этом подходе к флюксомике данные получают в результате проведения эксперимента, начинающегося с выращива-

ния организма на среде с субстратом (трэйсером), специфически меченным по определенным позициям тяжелым ^{13}C -изотопом углерода. Так же, как и в случае ^{13}C -MFA (см. далее), в рассматриваемом подходе одним из главных теоретических предположений является пренебрежение потенциальными масс-изотопными эффектами [46]: предполагается, что скорость энзиматического превращения метаболита одинакова для всех его «изотопомеров», т.е. всех молекул данного вещества, отличающихся по составу «тяжелых» и «легких» изотопов [47], а также что пулы внутриклеточных метаболитов хорошо перемешиваются, а потому отсутствует эффект субстратного туннелирования [48]. После выращивания микроорганизма в соответствующей среде в течение времени, достаточного для установления равновесия и определения параметров эффлюксов, а также распределения тяжелых изотопов в молекулах некоторых метаболитов (см. ниже), можно рассчитать вероятность распределения углерода в некоторых ключевых точках ветвления ЦМ углерода (split ratio) и использовать далее эти значения как ограничивающие возможное пространство решений задачи нахождения параметров потоков. Положительным является то обстоятельство, что такой подход унифицирован и имеется соответствующее программное обеспечение [49], отрицательным — то, что лишь простейшие типовые модели могут быть количественно охарактеризованы таким способом. Как бы то ни было, развитие этого подхода явилось на короткое время полезным инструментарием, который затем был полностью заменен более универсальным, мощным, но и значительно более сложным в понимании и освоении методом — ^{13}C -MFA.

^{13}C -MFA основан на экспериментальном материале, способном характеризовать метаболический статус организма, параметризованную упрощенную модель которого предлагает исследователь. Наряду с уже упомянутыми экспериментально определяемыми значениями эффлюксов, этим материалом, получаемым, в частности методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и/или газовой (жидкостной) хроматомасс-спектрометрии, является распределение атомов тяжелого изотопа углерода в интермедиатах метаболизма (например, в протеиногенных аминокислотах), происходящее при катаболизме исходно меченого субстрата (например, $[1-^{13}\text{C}]$ -глюкозы). Моделируя распределение тяжелых изотопов с помощью известных механизмов перераспределения отдельных атомов в биохимических реакциях можно попытаться определить численные значе-

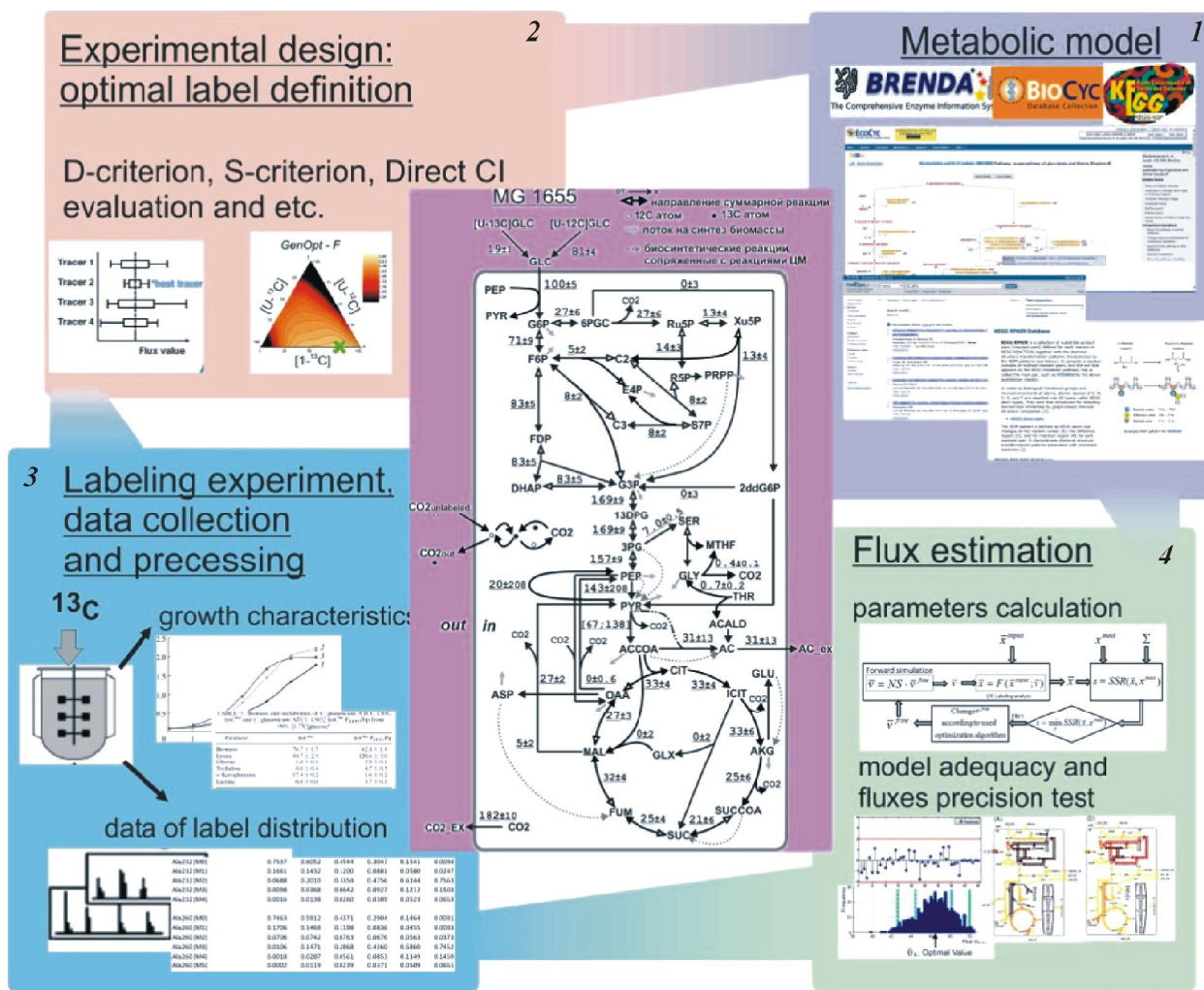


Рис. 1. Общая схема анализа метаболических потоков с использованием ¹³C-изотопов. Отображены четыре основных этапа метода: 1 — составление метаболической модели, описывающей интересующую часть метаболизма целевого объекта; 2 — планирование эксперимента, состоящее, как правило, в выборе типа метки для обеспечения высокой точности определения метаболических потоков; 3 — непосредственное проведение эксперимента с ¹³C-меченым субстратом с последующим сбором и обработкой экспериментальных данных; 4 — расчет оптимальных величин параметров метаболических потоков, оценка статистической адекватности использованной модели и вычисление погрешностей рассчитанных параметров потоков

Fig. 1. General scheme of the ¹³C-based Metabolic Flux Analysis: 1 — metabolic model construction which describes interested part of the target object metabolism; 2 — design of the experiment to choose label optimal for precise flux estimation; 3 — performing labeling experiment followed by data collection and processing; 4 — flux estimation and statistics

ния параметров внутриклеточных метаболических потоков, которые в рамках предложенной стехиометрической модели организма обеспечивают наилучшее совпадение результатов расчетов с экспериментальными данными.

¹³C-MFA — исключительно трудоемкая современная группа методов, требующая творческого подхода специалистов различного экспериментального и компьютерно-теоретического профиля, которых бывает чрезвычайно сложно собрать в единую работоспособную команду. Общая схема проведения типичного ¹³C-MFA, на-

глядно отражающая необходимость комплексного использования методов компьютерного моделирования, аналитической химии и математической статистики в биологическом эксперименте, показана на рис. 1.

Как видно из рис. 1, общая схема эксперимента по ¹³C-MFA включает: 1) составление метаболической модели; 2) разработку экспериментального дизайна с выбором оптимального набора потенциальных меченых субстратов для достижения наилучшего разрешения потоков в интересной для исследователя области метаболической

модели; 3) проведение биологической части эксперимента с выращиванием культуры на меченом субстрате до установления метаболического и изотопомерного (см. ниже) равновесия с параллельным измерением параметров внеклеточных эффлюксов и компонентов образующейся биомассы, и с последующим масс-спектрометрическим определением ^{13}C -меченности интермедиатов метаболизма и/или, например, протеиногенных аминокислот из гидролизатов клеточного белка; 4) компьютерный расчет метаболических потоков и их доверительных интервалов на основе регрессионного математического анализа с оценкой адекватности и статистической значимости выбранной метаболической модели.

С учетом высокой сложности комплексного анализа, связанного с ^{13}C -MFA в отличие от других X-омных технологий, только очень немногие ведущие лаборатории мира к настоящему времени внесли существенный вклад в развитие и применение данного метода [19] в системной биологии, метаболической инженерии [50—54], а также в биотехнологии и медицине [55—57].

Надо признать, что особое положение ^{13}C -MFA среди остальных X-омных технологий, как для фундаментальных, так и для прикладных исследований, постоянно отмечаемое в литературе (см., например, [17, 58—61]), обусловлено его ролью в построении количественной карты параметров метаболических потоков. Эта карта отражает конечный результат — своего рода функциональный итог многообразной и сложной генетической и метаболической регуляции [59], а также внутриклеточных метаболонных взаимодействий [62], обусловленных структурной или функциональной компартиментализацией процессов [63], субстратным туннелированием [48] и природной внутриклеточной «толкотней» (crowding) различных субстратов и ферментов [64].

Значение MFA в современной метаболической инженерии сложно переоценить. Ограничимся лишь мнением одного из ведущих специалистов в этой области, профессора Массачусетского технологического института (Massachusetts Institute of Technology) и главного редактора журнала “Metabolic Engineering” Г. Стефанопулоса (G. Stephanopoulos): «...Сочетание аналитических методов расчета потоков и молекулярно-биологических методов их контроля, основанных на проведении соответствующих генетических модификаций, представляют собой саму сущность метаболической инженерии...» [65]. Именно фундаментальным основам стационарного ^{13}C -MFA, анализу состояния работ и перспекти-

вам наиболее развитого и практически ориентированного раздела современной флюксомики и посвящен материал настоящего обзора, разбитого для удобства на три части. В первой дается описание свойств метаболических моделей для ^{13}C -MFA, введен термин изотопомер как основное концептуальное понятие в этом виде анализа, а также рассмотрены основные экспериментальные методы определения содержания ^{13}C -изотопов углерода в промежуточных продуктах метаболизма при катаболизме меченых субстратов (при проведении CLE (carbon-labeling experiment)). Вторая часть обзора посвящена изложению математических основ моделирования распределения изотопов углерода при CLE, расчета потоков и их достоверности в адекватной метаболической модели. Вторая часть может быть опущена без значительного ущерба для понимания материала третьей части, представляющей анализ работ в основном в области фундаментальных исследований микроорганизмов и метаболической инженерии бактерий, в которых использованы результаты ^{13}C -MFA.

СТЕХИОМЕТРИЧЕСКАЯ МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Из-за исключительной сложности реальной схемы метаболических реакций, протекающих в живой клетке, любой анализ во флюксомике, как правило, начинается с формирования упрощенной стехиометрической модели, которая отражает свойства своего природного прототипа по крайней мере тем, что включает те же исходные субстраты, потенциальные продукты и экспериментально детектируемые (см. далее) метаболические интермедиаты. В первоначальных, да и в большинстве современных исследований по флюксомике использовались так называемые базовые («коровые») модели, в которые включалось схематическое представление ЦМ с более или менее детальным описанием гликолиза (т.е. всех биохимических реакций конверсии глюкозы в пируват; у *E. coli*, например, эта конверсия может осуществляться в результате реализации трех метаболических путей: пути Эмбдена–Мейерхофа–Парнаса (Embden–Meyerhof–Parnas, EMP — pathway); пентозофосфатного пути (Pentose Phosphate pathway, PPP); и пути Энтнера–Дудороффа (Entner–Doudoroff, ED — pathway) [65]), цикла трикарбоновых кислот с возможностью реализации глиоксалатного шунта, а также суммарное уравнение формирования биомассы из основных метаболических предшественников, синтезируемых в ЦМ [65], с учетом экспериментально изме-

ряемых долей макромолекулярных компонентов клеток исследуемого организма [66]. Примеры таких “коровых” моделей различной степени подробности можно встретить в большинстве работ по флюксомике (см., например, [67—70]). Однако в последнее время “коровые” модели стали значительно расширяться и усложняться за счет введения более полного набора реакций как ЦМ, так и отдельных «периферийных» областей метаболизма, а также учета транспортных функций, реакций биосинтеза и конверсии кофакторов [70, 71]. Более того, все большую популярность приобретают модели, построенные на основе полногеномных (genome-scale, GS) реконструкций метаболизма [3, 72] как для хорошо изученных микроорганизмов [40, 45, 73], так и для организмов с недавно секвенированным геномом [74, 75]. Такие GS-метаболические модели, как правило, исследуются методами FBA, которые дают представления в большей степени о теоретически возможных потоках метаболитов, чем о реально наблюдаемых в эксперименте; последние характеризуют потом с введением большого числа допущений и предположений [76].

Перед использованием в ^{13}C -MFA GS-метаболические модели, как правило, подвергают значительному сокращению и упрощению. Прежде всего, их сокращают путем удаления реакций, описывающих потоки, которые не могут быть определены из имеющихся в распоряжении экспериментальных данных, но добавляют информацию о перестройках атомов углерода во всех анализируемых реакциях [77, 78]. Дальнейшее упрощение проводят следующим образом [79]: 1) линейная цепочка последовательных неразветвленных реакций рассматривается как одна реакция; 2) все реакции, катализируемые изоферментами (если они используют одни и те же кофакторы или же баланс кофакторов не используется в предлагаемой модели — см. ниже) объединяются в одну; 3) реакции, известная регуляция которых не предполагает их протекания в анализируемых условиях (например, при анализе аэробно растущих бактериальных клеток модель, как правило, не учитывает реакции, ингибируемые кислородом), не включаются в упрощенную модель; 4) обобщаются внутриклеточные пулы интермедиатов, которые *in vivo* находятся в быстро устанавливаемом равновесном состоянии (пентозофосфаты в ЦМ углерода в клетках *E. coli*, растущих на глюкозе); 5) все потоки, направленные на биосинтез биомассы, преобразуются в единственную реакцию, суммирующую вклад метаболических предшественников в единицу биомассы. Очень часто в таких упрощенных мо-

делях все кофакторы, обеспечивающие окислительно-восстановительный баланс (в частности, NADH и NADPH) или перенос энергии (в частности, АТФ или КоА), не включаются в состав стехиометрических уравнений, поскольку строгий учет их баланса практически невозможен (см. раздел «CLE ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СУБСТРАТОВ...» настоящего обзора).

Отдельно остановимся на обратимости используемых в упрощенной модели реакций. Хотя все реакции, катализируемые ферментами *in vivo* теоретически обратимы, тем не менее, многие из них в упрощенных моделях рассматриваются как однонаправленные на основе термодинамических и/или кинетических соображений [80]. Примерами условно необратимых реакций часто являются такие, в которых происходит выделение энергии за счет гидролиза макроэргических соединений (АТФ, PEP) или образование летучих соединений (CO_2). Вопрос об обратимости той или иной реакции в конкретной модели может быть далеко не простым и по-разному решаться различными и даже одними и теми же авторами на разных этапах развития исследований, связанных с использованием упрощенной модели.

Известно, что метаболизм различных организмов включает несколько реакций, направленных на фиксацию CO_2 в форме карбоната. Но образование карбоната может происходить как за счет растворения в воде свободного CO_2 из воздуха, так и в процессе различных реакций катаболизма углеродных субстратов при аэробном росте. Следовательно, создаваемая упрощенная модель обязана учитывать обмен как CO_2 , непосредственно вовлеченного в метаболизм, так и присутствующего в воздухе. Только дополнительное введение соответствующей реакции в уже достаточно разработанную модель аэробного роста клеток *E. coli* на глюкозе позволило получить согласованные результаты ^{13}C -MFA при различных условиях постановки эксперимента [81].

Создание стехиометрических моделей может быть усложнено в случае компартментализации определенных метаболических процессов. Это явление, наиболее характерное для клеток эукариот, приводит к необходимости при построении моделей отдельно учитывать реакции, протекающие в цитоплазме и в митохондриях, а также оценивать транспорт внутриклеточных интермедиатов между этими клеточными компартментами [53]. В настоящее время нам неизвестны бактериальные модели, построенные с учетом компартментализации определенных ветвей метаболизма. Однако имеющиеся в литературе доказа-

тельства туннелирования определенных групп реакций и образования *in vivo* специфических комплексов ферментов, так называемых метаболонов ЕМР гликолиза [48, 82, 83] и цикла трикарбоновых кислот [62], различие в метаболической регуляции изоферментов РР-пути гликолиза [84], а также начало создания искусственных метаболонов из индивидуальных ферментов с помощью специфических «скаффолдов» в бактериальной клетке [85—87] позволяют ожидать, что в недалеком будущем компартиментализация метаболизма будет учитываться и в бактериальных моделях.

Подводя некоторые итоги, отметим, что анализ метаболических потоков методами флюксомики имеет смысл для изучения не реальных, а условных реакций, введенных и параметризованных в упрощенной исследователем стехиометрической модели метаболизма. До недавнего времени вся ответственность за адекватность этой упрощенной модели реальному биологическому объекту, исследуемому в определенных экспериментальных условиях, возлагалась на автора модели [79, 88], который должен был руководствоваться в своем выборе как имеющейся (если она есть для данного объекта исследований) информацией обо всех возможных метаболических реакциях организма с известным геномом [3, 45, 73], так и известными из литературы и из собственного экспериментального опыта сведениями о метаболической регуляции тех или иных реакций.

В дальнейшем математическими методами должен быть найден набор численных параметров потоков метаболической модели, который при моделировании роста организма на реально использованной среде со специфическим ^{13}C -трейсером обеспечивал бы рассчитанное распределение метки среди атомов углерода в интермедиах клеточного метаболизма, наилучшим образом согласующееся с экспериментально полученными данными. Иными словами, если в исходной модели было предположено существование того или иного потока, а расчет показывал, что его оптимальное значение близко к нулю в пределах статистически определенных доверительных интервалов, то можно было бы считать, что истинный поток в этой части метаболической сети в исследуемых условиях пренебрежимо мал. Но в том случае, если соответствующий потенциально возможный поток не был включен исследователем в упрощенную метаболическую модель на основе каких-либо ошибочно сделанных предположений, математический анализ потоков сам по себе не в состоянии исправить эту ошибку. Примерами таких ранее ошибочно сделанных допущений, ис-

правленных по мере совершенствования используемой в ^{13}C -MFA модели клеток *E. coli*, растущих на минимальной среде с глюкозой [81, 89], являются следующие: 1) пренебрежение обратимостью реакций неокислительной ветви РР-пути, 2) пренебрежение потоками через ED и глиоксалатный шунт (см., например, [90, 91]), 3) неучтенное образование пирувата из малата, а фосфоенолпирувата из оксалацетата, 4) неучтенная возможность синтеза глицина из треонина и др.

Различные исследовательские группы методом проб и ошибок постепенно отработывали создание приемлемых упрощенных стехиометрических моделей для организмов, наиболее часто используемых в метаболической инженерии (бактерий — *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, дрожжей — *Saccharomyces cerevisiae*). Несмотря на исключительную дороговизну экспериментов по ^{13}C -MFA (из-за необходимости расходования больших количеств дорогостоящей ^{13}C -глюкозы при низкой чувствительности ЯМР по сравнению с современными масс-спектрометрами для анализа изотопомеров, см. ниже), исследование метаболических потоков более 10 лет проводилось очень часто с использованием искусственно созданных мутантов по генам ЦМ углерода, для которых результат анализа был во многом предопределен. Шла последовательная отработка формализованных математических методов получения этих заранее очевидных результатов перед тем, как начать использование всей мощи разработанной методологии применительно к вариантам, для которых результат не был заранее предсказуем.

Ситуация стала кардинально меняться в последнее время, когда в практику стали все более широко внедряться так называемые эксперименты с параллельным мечением (PLE, parallel labeling experiments), т.е. набор экспериментов, проводимых одновременно с одним и тем же объектом и отличающихся лишь расположением ^{13}C -атомов в молекулах используемого субстрата. Поскольку вся совокупность получаемых экспериментальных данных в конечном итоге должна отражать свойства одной и той же метаболической модели, возникла возможность верификации исходно предложенной модели как для известных [81], так и для малоизученных организмов [92]. В результате исходная модель могла быть скорректирована введением дополнительных реакций [93] для достижения лучшей статистической согласованности наблюдаемых и ожидаемых (предсказанных на основе специально проведенных вычислений) результатов ^{13}C -экспериментов.

ОГРАНИЧЕНИЯ СТЕХИОМЕТРИЧЕСКОГО MFA

К сожалению, MFA, базирующийся только на стехиометрической модели и измерении эффлюксов (стехиометрический MFA), серьезно ограничен и не может разрешить следующие ситуации, часто возникающие даже в упрощенных метаболических моделях (рис. 2):

1) в случае параллельных метаболических ветвей (см. рис. 2, b), когда ни в одной из них нет экспериментально измеряемой переменной, и нет

возможности определить по отдельности параметры потоков в этих ветвях: например, два пути биосинтеза лизина в *Corynebacterium glutamicum* [94];

2) в случае, когда метаболические циклы (см. рис. 2, c), которые не связаны с измеряемыми экспериментально потоками, не могут быть разрешены (т.е. индивидуально оценены). Измерения входящего потока недостаточно для определения циклических потоков: для фиксированных внеклеточных эффлюксов параметры циклических потоков могут иметь любые значения;

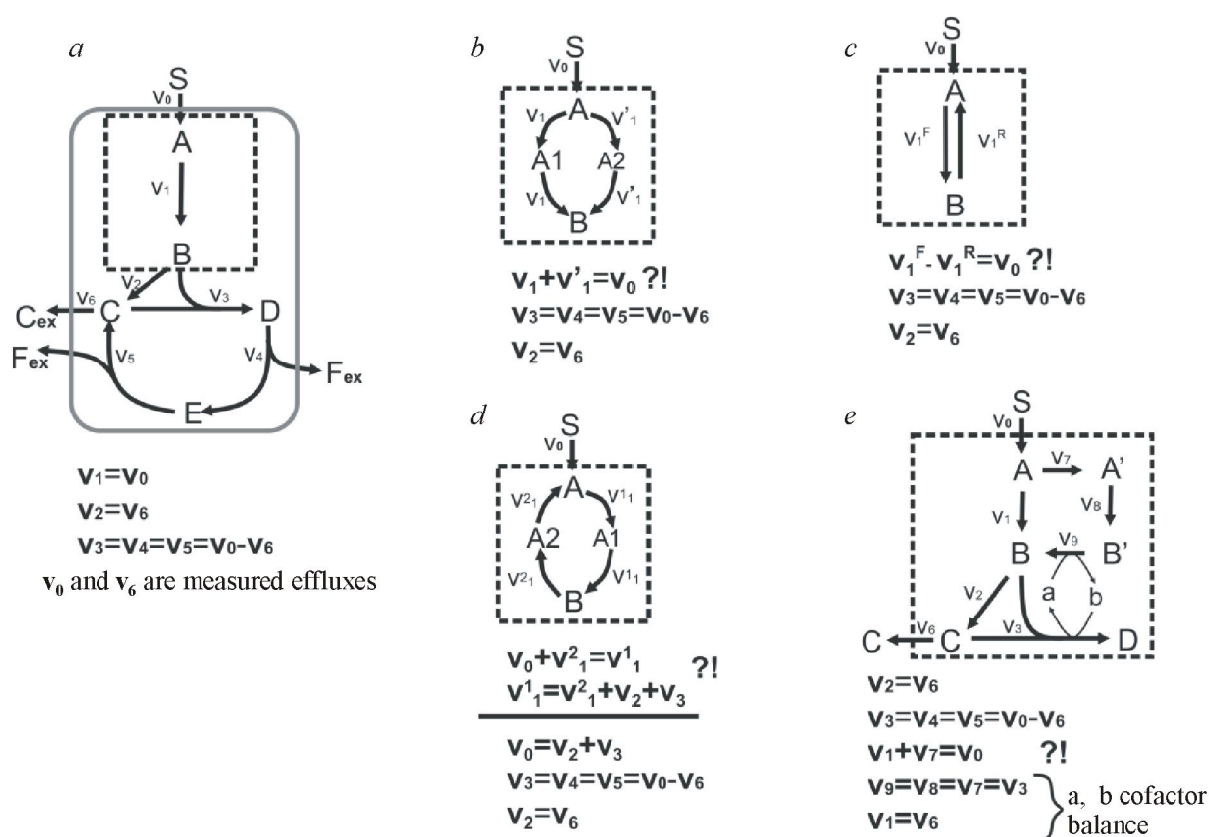


Рис. 2. Простейшая метаболическая схема, потоки которой могут быть количественно охарактеризованы методом FBA (a) и факторы, усложняющие использование этого метода (b–e) (по [88] с модификациями).

Модель описывает рост объекта исследования на субстрате (S), утилизируемом со скоростью v_0 . Продуктами метаболизма субстрата являются вещества C_{ex} и F_{ex} , синтезируемые со скоростью v_6 и $(v_4 + v_5)$, соответственно. Сеть внутриклеточных биохимических реакций характеризует взаимопревращение между пулами внутриклеточных метаболитов A, B, C, D и E; они протекают со скоростью v_1, v_2, v_3, v_4 и v_5 , соответственно. b — параллельные метаболические пути, не сопряженные с измерением эффлюксов (характеризуются скоростью потоков v_1 и v'_1); c — двунаправленные реакции (характеризуются скоростью потоков v_1^F и v_1^R); d — метаболические циклы (характеризуются скоростью потоков v^1_1 и v^2_1); e — разветвленные пути без балансирования кофакторов (характеризуются скоростью потоков v_1 и v_7)

Fig. 2. A simple metabolic map characterized quantitatively by Flux Balance Analysis (a) and typical metabolic map features which restrict application of the FBA method (b–e) [88]. Metaboli model describes growth on substrate S utilized with the rate v_0 . Two products — C_{ex} and F_{ex} — are synthesized from substrate with rates v_6 and $(v_4 + v_5)$, correspondently. A net of internal conversions between pools of A, B, C, D and E metabolites are characterized by reaction rates v_1, v_2, v_3, v_4 and v_5 . b — parallel pathways which do not coupled with any flux measurements (characterized by v_1 and v'_1 flux rates); c — bi-directional reactions (characterized by v_1^F and v_1^R flux rates); d — metabolic cycles (characterized by v^1_1 and v^2_1 flux rates); e — split pathways without any cofactor balancing (characterized by v_1 and v_7 flux rates)

3) в специальном случае, когда метаболическим циклом является бинаправленная реакция (см. рис. 2, *d*). Такие реакции в метаболических превращениях являются именно правилом, а не исключением, поскольку только реакции, которые строго необратимы по термодинамическим соображениям, могут приниматься за однонаправленные при построении достаточно совершенной модели. Хорошо известными примерами строго обратимых реакций являются реакции, катализируемые трансальдозой и транскетолозой в PP-пути [95];

4) при типичных метаболических реакциях, входящих, например, в EMP и PP-пути гликолиза, в цикл трикарбоновых кислот, глиоксалатный шунт и анаплерозис, определить все потоки с помощью стехиометрического MFA возможно только при использовании уравнений массового баланса для энергетических метаболитов и кофакторов (ATP, NADH, NSDPH и др.) (см. рис. 2, *e*) [96]. Но для этого необходимо, чтобы все энергогенерирующие и энергопотребляющие реакции, а также реакции конверсии между энергетическими метаболитами были полностью установлены и детально охарактеризованы.

Однако новые результаты исследования метаболизма, полученные в том числе и методом ^{13}C -MFA, показывают, что баланс NADPH и NADH может не сходиться при учете только известных на момент исследования метаболических реакций данного организма [97]; эффективность конверсии NADH в ATP при окислительном фосфорилировании зависит от большого числа факторов и потому может быть установлена далеко не однозначно и, как правило, с трудом поддается точной экспериментальной оценке [98]; значительное расходование ATP в «циклах холостого хода» экспериментально зарегистрировано в анаплеротических реакциях микроорганизмов [99]; к тому же, в последние годы сильно изменились представления о роли различных энергозависимых транспортеров и энергонезависимых помощников (facilitators) в транспорте предшественников и метаболитов [76, 100, 101]. Все эти данные сильно дискредитируют ожидания, связанные со строгим балансированием кофакторов в рамках выбранной упрощенной модели даже для организмов с наиболее изученным метаболизмом.

CLE — ЭКСПЕРИМЕНТЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СУБСТРАТОВ, МЕЧЕННЫХ ^{13}C -ИЗОТОПОМ УГЛЕРОДА

Указанные ограничения стехиометрического MFA требуют помимо измерения внеклеточных

эффлюксов учета дополнительных экспериментальных данных для получения полноценной информации о параметрах внутриклеточных потоков. Такие данные удалось получить в экспериментах с использованием для роста исследуемого микроорганизма субстратов, меченных изотопом ^{13}C (Carbon-Labeling Experiments, CLE) [97]. В качестве меченого углеродного субстрата добавляется, например, $[1-^{13}\text{C}]$ -глюкоза. В дальнейшем меченые атомы углерода перераспределяются в процессах катаболизма глюкозы в соответствии с известными для каждой биохимической реакции механизмами [77]. Двенадцать ключевых интермедиатов ЦМ (табл. 1) [65, 102] служат в дальнейшем основными строительными блоками всех внутриклеточных низкомолекулярных метаболитов и макромолекулярных компонентов клеточной биомассы. Так, в частности, из рис. 3 [103, 104] видно, что во всех позициях углеродных скелетов 20 протеиногенных аминокислот строго специфично располагаются атомы из 8 интермедиатов ЦМ (за исключением одного углерода остатка HIS и одного углерода в структуре MET, имеющих свое происхождение из пула C_1 -соединений, а также одного углерода из CO_2 в составе ARG). Поэтому, получив информацию о расположении/нахождении изотопов тяжелого углерода в структуре той или иной аминокислоты или ее фрагмента с помощью ЯМР или GC-MS, можно попытаться установить эффективность прохождения атомов исходно меченого субстрата через разветвленную метаболическую цепь до анализируемого соединения (т.е. фактически определить параметры потоков в исходно выбранной метаболической модели).

На рис. 4 показан упрощенный, но весьма наглядный пример того, как анализ перераспределения атомов тяжелых изотопов из исходных субстратов в метаболические интермедиаты позволяет определять параметры внутриклеточных потоков, которые не могли быть разрешены методами стехиометрического MFA. В этом примере при катаболизме исходного субстрата с участием ферментов из двух параллельных реакций некой метаболической цепи (в реакции v_1) происходит инверсия двух атомов углеродного скелета входящего субстрата, а потому, оценивая долю меченого атома в первом положении общего продукта параллельных реакций v_1 и v_1' , можно определить отношение величин скорости потоков, т.е. $v_1 : v_1'$.

В качестве существенно более сложного, но реалистичного примера покажем, как можно оценить относительные значения скорости потоков углерода через альтернативные ветви гликолиза (EMP, PPP и EDP). Для этого рассмотрим резуль-

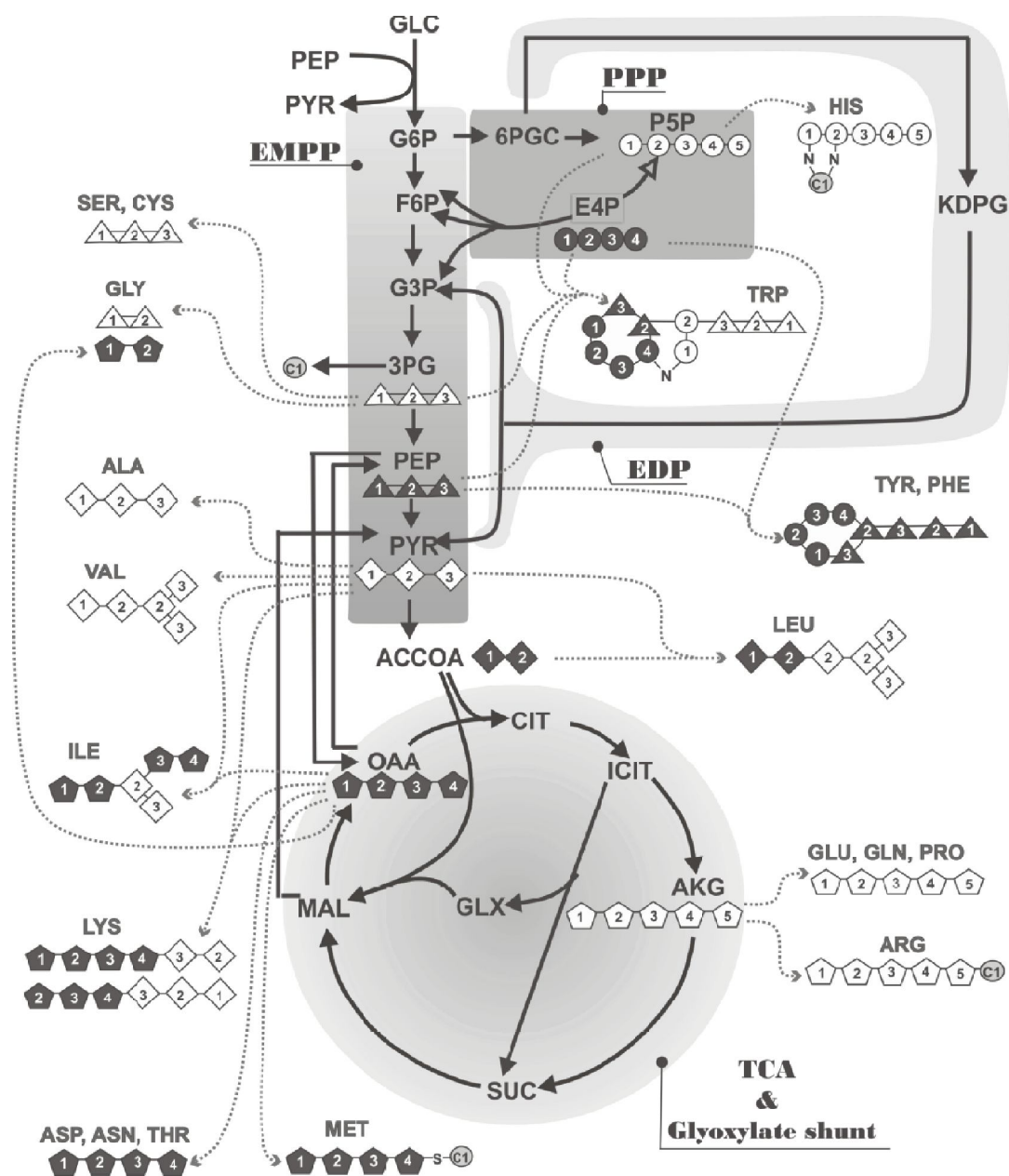


Рис. 3. Восемь метаболитов центрального метаболизма *E. coli* являются донорами углерода для синтеза углеродных скелетов 20 протеиногенных аминокислот (по [103] с модификациями). Структура углеродных скелетов этих восьми метаболитов-предшественников схематично изображена с помощью геометрических фигур с условной нумерацией атомов углерода, которые в результате биохимических превращений перераспределяются в молекулы аминокислот.

Обозначения: C₁ в сером круге — C₁-фрагменты; GLC — глюкоза, G6P — глюкозо-6-фосфат, F6P — фруктозо-6-фосфат, G3P — глицеральдегид-3-фосфат, 3PG — 3-фосфоглицерат, PEP — фосфоенолпируват, PYR — пируват, 6PGC — глюконат 6-фосфат, KDPG — 2-кетогидрокси-3-дезоксиглюконат, P5P — рибозо-5-фосфат, E4P — эритрозо-4-фосфат, ACCOA — ацетил-коэнзим А, CIT — цитрат, ICIT — изоцитрат, AKG — 2-оксоглутарат, SUC — сукцинат, MAL — малат, OAA — оксалоацетат, GLX- глиоксилат

Fig. 3. Eight metabolites donated their carbon atoms to 20 proteinogenic AAs synthesis (according to *E. coli* biosynthetic pathways). Carbon backbone of these metabolites is drawn schematically by numbered geometrical figures of different types.

Designations: C₁-unit is marked by "C1" symbol in a grey circle. GLC — glucose, G6P — glucose-6-phosphate, F6P — fructose-6-phosphate, G3P — glyceraldehyde-3-phosphate, 3PG — 3-phospho-D-glycerate, PEP — phosphoenolpyruvate, PYR — pyruvate, 6PGC — gluconate 6-phosphate, KDPG — 2-keto-3-deoxy-6-phospho-D-gluconate, P5P — pentose-5-phosphate, E4P — erythrose-4-phosphate, ACCOA — acetyl coenzyme-A, CIT — citrate, ICIT — isocitrate, AKG — 2-oxoglutarate, SUC — succinate, MAL — malate, OAA — oxaloacetate, GLX- glyoxylate

таты анализа распределения ¹³C-изотопа в углеродном скелете аланина (ALA) и его фрагментов, полученных с помощью анализа методом GC-MS дериватизированных гидролизатов белков бактериальных клеток, выращенных в квазистационарных условиях на среде с [1-¹³C]-глюкозой в качестве единственного источника углерода.

Единственным метаболитическим предшественником ALA является пируват (PYR), пул которого при превращении молекулы [1-¹³C]-глюкозы в реакциях EMP-пути увеличивается на одну полностью немеченую молекулу и одну молекулу с меченым изотопом углерода в положении 3 углеродного скелета (рис. 5). В случае прохождения [1-¹³C]-глюкозы через ED-путь, одна новая моле-

кула PYR вновь будет полностью немеченой, в то время как вторая будет содержать один меченый атом углерода, но на этот раз в положении 1 углеродного скелета. Катаболизм [1-¹³C]-глюкозы по PP-пути происходит с утратой единственного изотопа углерода, что приводит к образованию только немеченых молекул пирувата. Таким образом, как видно из рис. 5, анализ масс изотопомеров ALA (понятие «изотопомер» освещается в следующем разделе обзора) позволяет установить, какая именно его доля образуется при катаболизме глюкозы на PP- и (EMP + ED)-путях гликолиза, а анализ изотопомеров фрагментов аминокислоты помогает различать ALA, имеющий происхождение из EMP- или из ED-пути [17].

Таблица 1
Table 1

Ключевые интермедиаты центрального метаболизма, служащие строительными блоками для синтеза компонентов клеточной биомассы

Key intermediates of central metabolism that serve as building blocks in the synthesis of cell biomass components

№	Интермедиаты ЦМ Intermediates of central metabolism	Компоненты клеточной биомассы Components of cellular biomass
1	Глюкозо-6Ф Glucoso-6P	Фосфолипиды (дрожжи), пептидогликан, липополисахариды, гликоген Phospholipids (yeast), peptidoglycans, lipopolysaccharides, glycogen
2	Фруктозо-6Ф Fructose-6P	Пептидогликан, липополисахариды Peptidoglycan, lipopolysaccharides
3	Рибозо-5Ф Ribose-5P	Белок, РНК, ДНК, липополисахариды Protein, RNA, DNA, lipopolysaccharides
4	Эритрозо-4Ф Erythroso-4P	Белок Protein
5	Триозофосфат Triosphosphate	Фосфолипиды Phospholipids
6	3-Фосфоглицерат 3-Phosphoglycerate	Белок, пептидогликан, липополисахариды Protein, peptidoglycan, lipopolysaccharides
7	Фосфоенолпируват Phosphoenol pyruvate	Белок, пептидогликан, липополисахариды Protein, peptidoglycan, lipopolysaccharides
8	Пируват Pyruvate	Белок, пептидогликан Protein, peptidoglycan
9	Ацетил-КоА Acetyl-CoA	Белок, фосфолипиды, пептидогликан, липополисахариды Protein, phospholipids, peptidoglycan, lipopolysaccharides
10	2-Оксоглутарат 2-Oxoglutarate	Белок, пептидогликан Protein, peptidoglycan
11	Оксалоацетат Oxaloacetate	Белок, РНК, ДНК, пептидогликан Protein, RNA, DNA, peptidoglycan
12	Сукцинил-КоА Succinyl-CoA	Гем Heme

v_0 and v_6 are measured effluxes

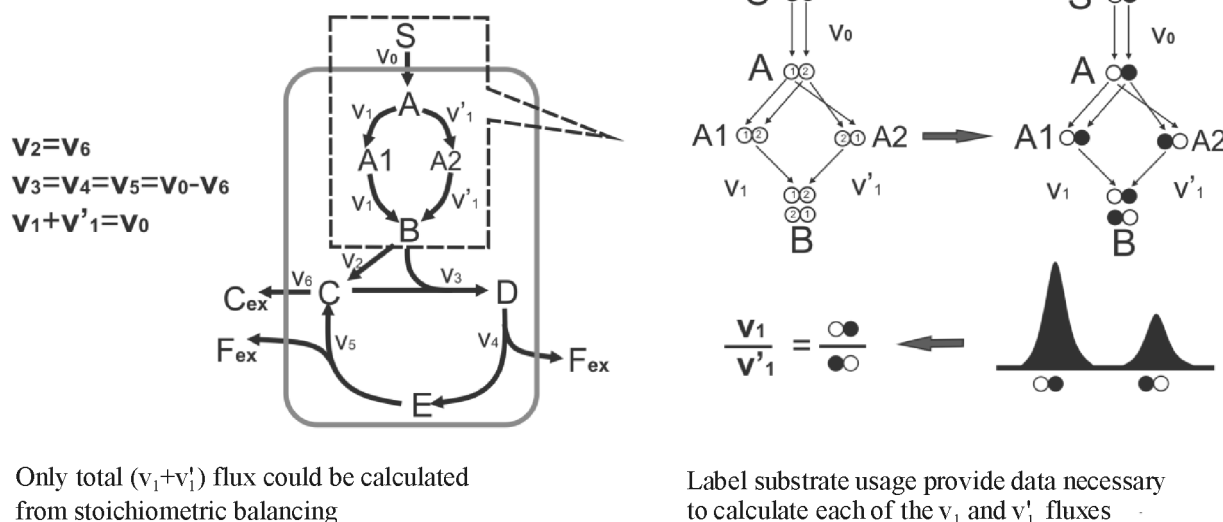


Рис. 4. Простейший пример использования информации о перераспределении тяжелых изотопов для количественной оценки внутриклеточных потоков (в данном случае параллельных), которую невозможно осуществить с помощью стехиометрического MFA [105]. Приведенная модель подробно описана в подписи к рис. 2; v — скорость той или иной реакции.

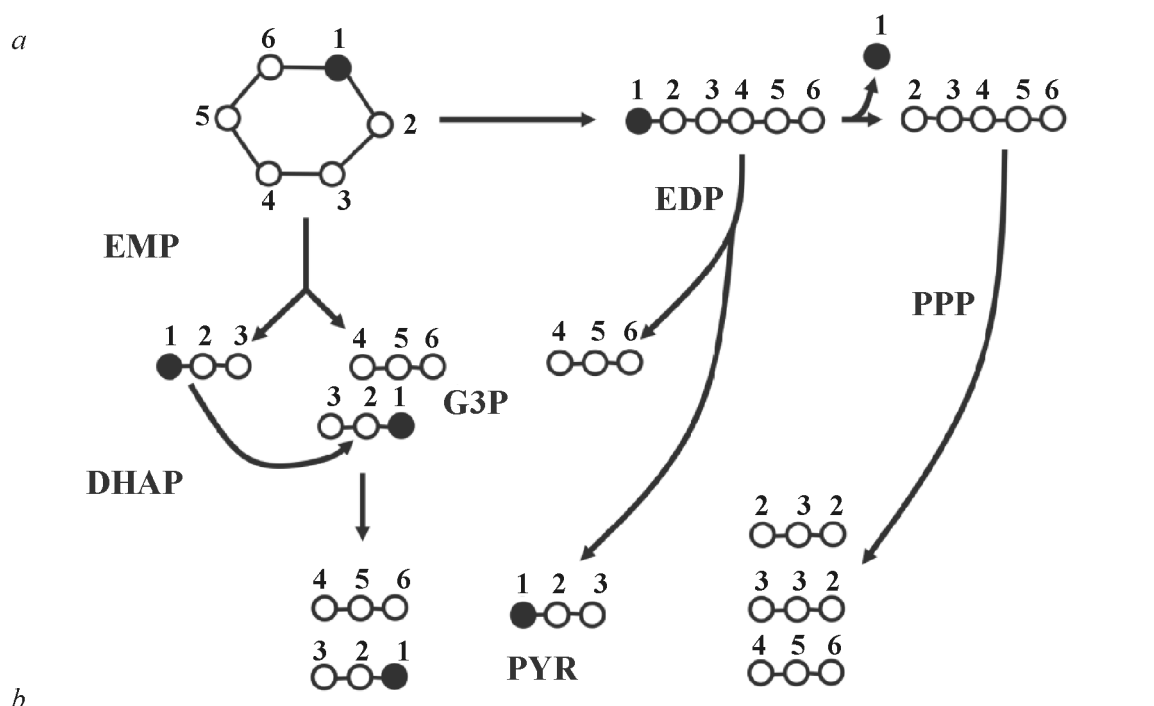
Fig. 4. A simple example how an analysis of the heavy atoms redistribution helps to estimate intracellular fluxes which could not be characterized by MFA [105]. Metabolic model is described in detail in Fig. 2; v is rate of one or another reaction

Схема, приведенная на рис. 6, была впервые представлена в работе [105], а затем повторена в наиболее часто цитируемом обзоре проф. W. Wiechert [88]. Она в высшей степени наглядно иллюстрирует основной принцип ^{13}C -MFA: внутриклеточные метаболические потоки могут быть определены на основе экспериментально измеренных внеклеточных эффлюксов и полученной информации о распределении метки во внутриклеточных метаболических интермедиатах. Однако реальная компьютерная процедура расчета метаболических потоков, стоящая за этой простой формулой, достаточно сложна и требует привлечения серьезного математического аппарата. Неудивительно, что несколько лет было потрачено на разработку математических основ расчета потоков [47, 95, 106, 107], которые впоследствии обусловили мощное развитие компьютерных методов анализа метаболических потоков, находящихся в настоящее время в различной степени доступности для независимого пользователя (см. часть 2 данного обзора). По оценке проф. W. Wiechert, руководителя одной из наиболее успешных математических групп, принимавших участие в создании фундамента расчетов метаболических потоков и разработке одного из наиболее совершенных компьютерных алгоритмов их анализа и ста-

тистики [108, 109], «математический анализ метаболического эксперимента с мечеными трэйсерами является одним из наиболее сложных математических методов, когда-либо применявшихся для биологических систем» [88].

ИЗОТОПОМЕРЫ

Основным понятием в литературе, посвященной ^{13}C -MFA, является понятие изотопомера [110]. Термин *изотопмер* является комбинацией терминов *изотоп* и *изомер* и означает одно из возможных «меченых» состояний метаболита. Хотя, естественно, в интермедиатах метаболизма могут встречаться природные изотопы различных атомов. Рассматривая особенности ^{13}C -MFA, мы будем обсуждать ситуацию, в которой изотопомеры какого-либо метаболита образуются только за счет изотопов углерода. Так, если в молекуле метаболита массой m имеется всего n атомов углерода, которые могут быть тяжелыми (^{13}C , мечеными), либо легкими (^{12}C , немечеными), то общее число различных изотопомеров углерода данного метаболита будет составлять 2^n . Например, могут существовать 8 различных изотопомеров 3-углеродных ПЕР или ПУР и 64 изотопомера 6-углеродной глюкозы.



Mass-isotopomers distribution analysis of the alanine and its fragment characterised ratio between EMP, PP or ED pathways of the glucose utilization

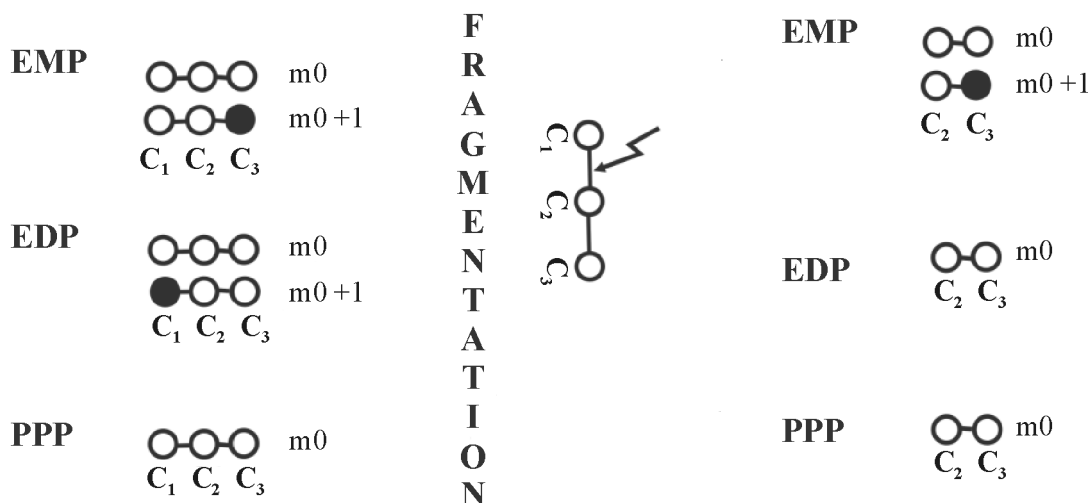


Рис. 5. Схема количественной характеристики потоков в точке ветвления EMP/PP/ED-путей с помощью анализа распределения масс-изотопомеров аланина и его фрагментов [17]. *a* — упрощенная схема окисления глюкозы до пирувата по трем альтернативным путям; *b* — распределение масс-изотопомеров аланина характеризует соотношение углеродных потоков по PP и суммарному (EMP+ED)-путям. В то же время, тяжелый масс-изотопомер фрагмента аланина с утраченным первым атомом характеризует величину EMP-потока. Для наглядности схема метаболизма не учитывает обратимости реакций.

Обозначения: DHAP — дигидроксиацетонфосфат, GAP — глициральдегид-3-фосфат; m0 — массовый изотопомер ALA/фрагмента ALA, имеющий только ^{12}C -атомы во всех положениях; m0+1 — массовый изотопомер ALA/фрагмента ALA, имеющий ^{13}C -атом в одном из положений

Fig. 5. Principal scheme of a EMP/PPP/ED pathways branch point investigation by analysis of the alanine mass-isotopomer distribution. *a* — simplified scheme of the glucose oxidation to pyruvate by three alternative pathways. *b* — mass-isotopomer analysis of alanine discriminates PPP from (EMP+ED) pathways followed by further ED pathway discrimination by mass-isotopomer analysis of alanine fragment lost C_1 -carbon.

Designations: DHAP — dihydroxyacetone phosphate, GAP — glyceraldehyde-3-phosphate. m0 — mass-isotopomer with only ^{12}C -atoms in a carbon backbone. m0+1 — mass-isotopomer with one ^{13}C -atoms in a carbon backbone at any position

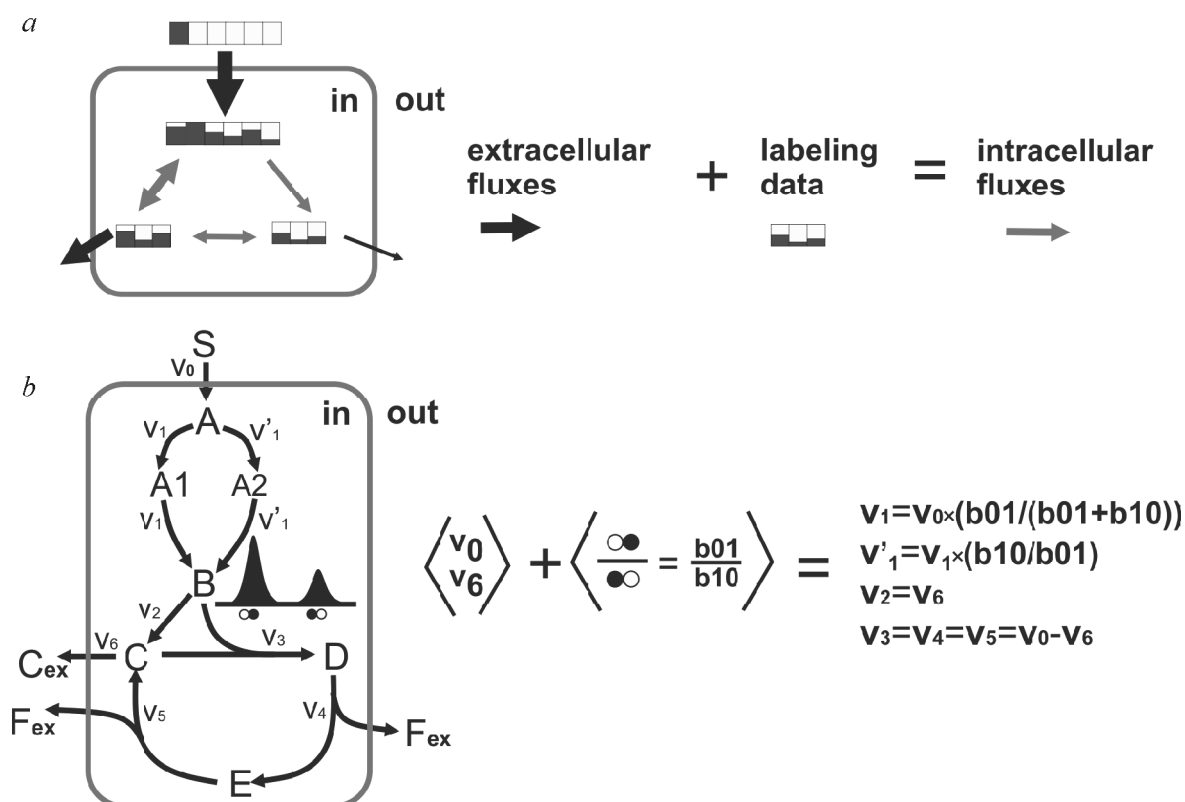


Рис. 6. Схема основного принципа ^{13}C -MFA [88, 105] — внутриклеточные метаболические потоки могут быть рассчитаны из экспериментально определенных величин эффлюксов и распределения метки во внутриклеточных интермедиатах (а) и реализации основного принципа ^{13}C -MFA на примере модельной метаболической схемы с параллельными путями (б). Обозначения см. на рис. 2 и 4

Fig. 6. A general principle of ^{13}C -MFA. *a* — The intracellular fluxes could be determined from the measured extracellular fluxes and the measured intracellular labeling information. *b* — General ^{13}C -MFA principle applied for the flux distribution estimation for example metabolic model. Designation is shown at Fig. 2 and 4

Наиболее полно структуру «меченности» гомогенного вещества, содержащего как ^{13}C -, так и ^{12}C -изотопы углерода, можно описать в виде вектора изотопомерного распределения (Isotopomer Distribution Vector, **IDV**), формируемого следующим образом. Обозначив за единицу те позиции, в которых присутствует ^{13}C , а за ноль — ^{12}C , получим формальное и интуитивно понятное обозначение изотопомера как последовательности нулей и единиц, которая в свою очередь может быть интерпретирована как двоичное представление десятичного числа. Изотопомеры в **IDV** расположены по возрастанию числа, закодированного в двоичном представлении (представление числа в двоичной системе исчисления обозначено сокращением bin). Элементы **IDV** — это доли соответствующих изотопомеров вещества; при этом очевидно, что сумма элементов этого вектора равна единице. На рис. 7 показан явный вид **IDV** глюкозы, имеющей 6 атомов углерода и 64 изотопо-

мера ($2^6 = 64$). В частности, коммерчески доступный изотопомер глюкозы, который часто используется в качестве трейсера в CLE с последующим ^{13}C -MFA, расположен на позиции № 32 в **IDV** глюкозы и записывается в принятых обозначениях как $I_{\text{glc}}(32) = I_{\text{glc}}(100000_{\text{bin}})$.

Меченое состояние клетки полностью количественно описывается изотопомерным распределением всех метаболитов. Представление меченого статуса клетки в CLE требует количественных измерений, которые были бы связаны с изотопомерными распределениями. К сожалению, определение всех элементов **IDV** в настоящее время может быть экспериментально проведено только для узкого круга веществ, пригодных для ^{13}C -MFA [112]. Однако информация по группам изотопомеров, объединенных по определенному признаку, может быть получена методами ЯМР и MS; более того, эта информация оказывается достаточной, чтобы подробно характеризо-

$$\mathbf{I}_{\text{glc}} = \begin{pmatrix} I_{\text{glc}}(1) \\ I_{\text{glc}}(2) \\ I_{\text{glc}}(3) \\ I_{\text{glc}}(4) \\ \dots \\ I_{\text{glc}}(64) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I_{\text{glc}}(000000_{\text{bin}}) \\ I_{\text{glc}}(000001_{\text{bin}}) \\ I_{\text{glc}}(000010_{\text{bin}}) \\ I_{\text{glc}}(000011_{\text{bin}}) \\ \dots \\ I_{\text{glc}}(111111_{\text{bin}}) \end{pmatrix}$$

$$\sum_{i=1}^{64} I_{\text{glc}}(i) = 1$$

вать метаболизм широкого круга микроорганизмов и клеток эукариот. Например, комбинируя изотопомеры в группы по признаку присутствия меченого атома в определенном положении, получим специфическую активность атомов углерода в каждом из метаболитов в векторной форме (Metabolite Activity Vector, **MAV**) [113, 114]: $\mathbf{MAV} = (\text{MAV}_1, \text{MAV}_2, \dots, \text{MAV}_n)^T \equiv (\text{FE}_1, \text{FE}_2, \dots, \text{FE}_n)^T$, измеряемую методом ¹H-ЯМР (рис. 8) [115]. Элементы **MAV** численно равны доле меченых атомов в данном положении молекулы метаболита. Доля немеченых атомов в *i*-м положении будет равна $(1 - \text{MAV}_i)$, где $i = 1, 2, \dots, n$, соответственно. Сумма элементов не обязательно должна быть равна единице. Сгруппировав изотопомеры по количеству меченых атомов, получим массовые изотопомеры (рис. 8), детектируемые с помощью MS. Количественно такой тип данных характеризуется вектором распределения по массам (Mass Distribution Vector, **MDV**) $= (\text{MDV}_{M+0}, \text{MDV}_{M+1}, \dots, \text{MDV}_{M+n})^T$. Максимальное количество элементов в **MDV** составляет $n+1$. Элементы вектора **MDV**, так же, как и **IDV**, численно равны доле соответствующей группы изотопомеров в общем пуле вещества и, следовательно, их сумма равна единице. Нетрудно заметить, что все элементы векторов **MAV** и **MDV** могут быть представлены в виде линейных комбинаций элементов **IDV** (см. рис. 8).

Судьба изотопомеров продукта в каждой энзиматической реакции определяется судьбой атомов углерода каждого из реагентов. При этом, как уже отмечалось, упрощающим предположением является пренебрежение возможными изотопомерными масс-эффектами [46], т.е. считается, что скорость и эффективность энзиматической

Рис. 7. Представление всей совокупности возможных изотопомеров глюкозы в виде вектора изотопомерного распределения (\mathbf{I}_{glc}) [111]. Каждый элемент вектора численно равен доле одного из возможных изотопомеров глюкозы. Порядковый номер элемента вектора **IDV**, переведенный в двоичную систему исчисления, отражает расположение меченых (¹³C)- и немеченых (¹²C)-атомов. Так элемент № 2 $I_{\text{glc}}(2) = I_{\text{glc}}(000001_{\text{bin}})$ соответствует изотопомеру с ¹³C-атомом в 6-м положении

Fig. 7. A complete set of the glucose isotopomers represented in a form of isotopomer distribution vector (**IDV**, \mathbf{I}_{glc}) [111]. Each element of the vector represents a portion of the defined isotopomer in total pool of all possible isotopomers of the glucose. The vector element number, represented in binary system, reflects location of the ¹²C and ¹³C atom in molecule. For example, element № 2, $I_{\text{glc}}(2) = I_{\text{glc}}(000001_{\text{bin}})$, corresponds to glucose isotopomer with ¹³C atom at sixth position

конверсии одинаковы для всех изотопомеров соответствующего метаболита [47].

Изотопомерная модель должна не только включать все рассматриваемые метаболические реакции, но и указывать порядок распределения всех атомов в ходе каждого превращения субстратов в продукты во всех реакциях. Принято считать [88], что в первых работах источником информации о таких внутримолекулярных перестройках атомов служили общеизвестные учебники по биохимии, однако в этом случае была необходима довольно высокая квалификация читателя, поскольку описание многих реакций желаемой информации в явном виде не содержало. Более того, развитие методологии ¹³C-MFA в ряде случаев индуцировало углубленное исследование механизма некоторых метаболических реакций, обеспечивающих истинное разнообразие пулов интермедиатов и внутримолекулярные перестройки атомов (в том числе меченых). Хорошим примером в этом случае являются реакции неокислительной ветви РР-пути (PPP), катализируемые транскеталазой (ТКТ) и трансальдолазой (ТАЛ). Было показано, что моделирование этих реакций в соответствии с пинг-понговым механизмом, предполагающим (в отличие от ранее использованного упорядоченного последовательного механизма) существование комплексов ферментов с полупродуктами реакций (C₂-ТКТ и C₃-ТАЛ) позволяет корректно учесть возможные перегруппировки атомов при моделировании, поскольку пулы образующихся C₂- и C₃- соединений едины, независимо от того, из какого метаболита они изначально происходят [116]. Естественно, что соответствующие модификации были введены в современные метаболические модели

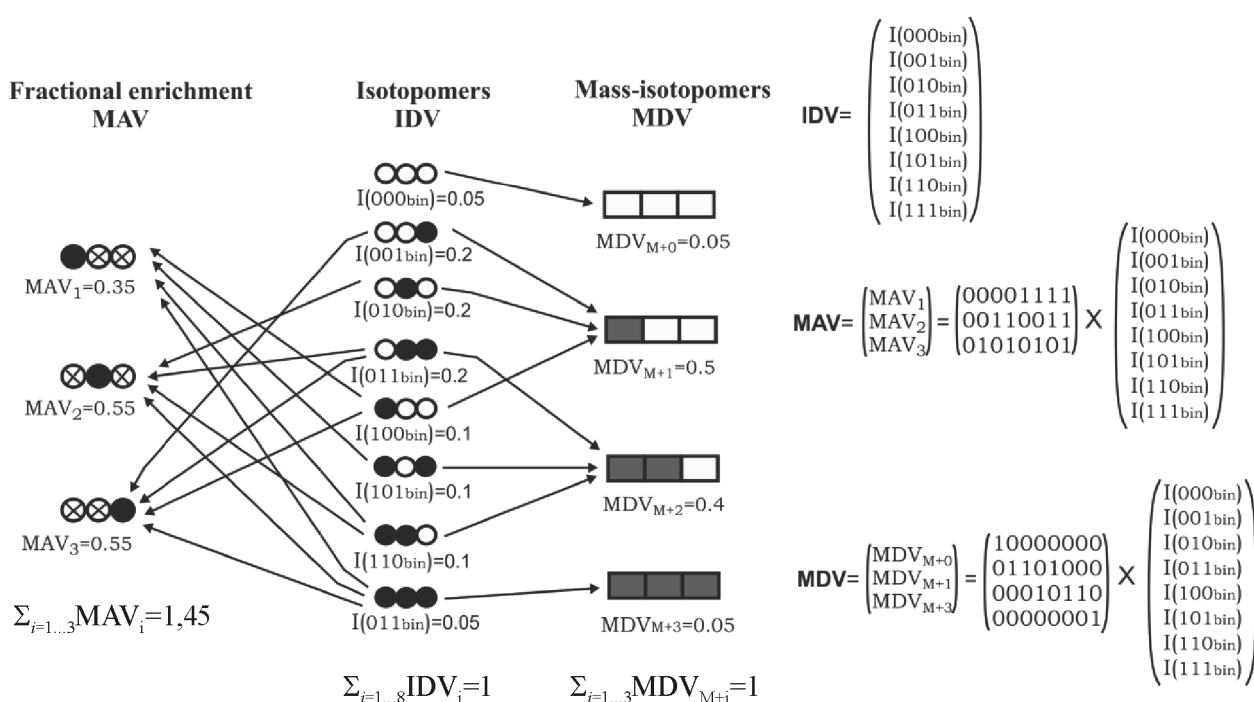


Рис. 8. Взаимосвязь между вектором изотопомерного распределения **IDV**, численно характеризующим пул всех возможных изотопомеров вещества, и векторами, введенными для представления экспериментально измеряемых величин, таких как вектор активности метаболита (**MAV**) и распределение масс-изотопомеров (**MDV**) [115]

Fig. 8. Conversion of **IDV**, quantitatively representing a complete set of target compound isotopomers, to the experimentally measured values like fractional enrichment (**MAV**) and mass-isotopomer distribution (**MDV**) [115]

тех организмов, для ферментов которых пинг-понговый механизм был продемонстрирован (*E. coli* [71, 81] и *Sacharomyces cereviciae* [117]). В то же время, для других организмов, как достаточно хорошо изученных (*Corynebacterium glutamicum*), так и новых объектов для ^{13}C -MFA (*Basfia succiniciproducens*), моделирование PPP все еще проводится на основе упорядоченного последовательного механизма действия ферментов неоксидативной ветви [118, 119].

В настоящее время на основе математической теории графов разработана специальная процедура, позволяющая для реакций с установленным механизмом автоматически проследить все переходы атомов из субстратов в продукты на уровне полномасштабной метаболической карты организма [77]. В частности, эта процедура использована для работы с метаболической картой генома *E. coli*, представленной 1260 реакциями. Использование этого метода позволяет, в частности, правильно учесть возможные перестройки в реакциях с зеркально симметричными молекулами (например, сукцинатом). В настоящее время информацию о перестановках атомов в биохимических реакциях метаболических путей

можно найти в недавних публикациях [77, 120] и базах данных (см., например, "BioCyc <http://ecocyc.org>").

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ «МЕЧЕННОСТИ» ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ДЛЯ ^{13}C -MFA

Исторически первым методом анализа ^{13}C -изотопомерного состава продуктов метаболизма и клеточных компонентов для исследования потоков был метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР). В связи с этим методом хотелось бы упомянуть две работы, выполненные, по-видимому, независимо и практически одновременно [97, 103]. В этих работах исследовались протеиногенные аминокислоты гидролизата клеточного белка. Использование указанного исходного материала обусловлено, во-первых, необходимостью большого количества препарата для анализа методом ЯМР, во-вторых, наличием в аминокислотах углеродных остовов большого числа интермедиатов ЦМ (восьми, см. рис. 3) и, в-третьих, высокой стабильностью белков по сравнению с бо-

льшинством других клеточных метаболитов. Анализируя структуру протеиногенных аминокислот белковых гидролизатов, исследователь имеет дело со стабильно хранящейся информацией о протекании быстро меняющихся процессов взаимопревращения метаболитов ЦМ углерода на стадии быстрого синтеза и накопления белка. Обе работы демонстрируют возможность использования информации о распределении метки в протеиногенных аминокислотах для ретроспективного анализа катаболизма исходного меченого трэйсера и синтеза метаболитических предшественников в реакциях основных путей ЦМ.

Существует несколько разновидностей ЯМР-анализа, используемых при исследовании метаболитических потоков [88, 121]: ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР и 2D [^{13}C , ^1H]-COSY-ЯМР (рис. 9).

^1H -ЯМР был первым методом, который интенсивно применялся для анализа распределения метки среди интермедиатов метаболизма при выращивании микроорганизмов на среде с ^{13}C -мечеными субстратами [97]. В соответствии с этим методом каждый протонированный атом углерода, расположенный внутри какого-либо метаболита, мог быть исследован отдельно от других атомов углерода внутри молекулы. Информация, которую можно извлечь из такого анализа, это доля изотомера данного метаболита, меченного тяжелым изотопом ^{13}C по данному положению в структуре молекулы (обогащение фракции, т.е. $\text{MAV} = (\text{FE}_1, \text{FE}_2, \dots, \text{FE}_n)^T$). Естественно, это лишь малая часть информации от содержащейся в **IDV**, но ее проще получить, чем полную информацию об изотопомерах. Это и объясняет тот факт, что именно протонный ЯМР наиболее часто применялся в первых работах с использованием ^{13}C -MFA.

В спектрах ^{13}C -ЯМР распределение изотопомеров изучается с существенно большей детализацией, поскольку тяжелый изотоп углерода дает различное расщепление сигнала в зависимости от «меченности» ближайших к нему атомов углерода в молекуле [122]. Полностью немеченый изотопомер не дает сигналов в спектрах ^{13}C -ЯМР, и поэтому относительные количества типов пиков в спектрах не позволяют прямо судить о доле тех или иных изотопомеров, а только определяют отношение между изотопомерами, дающими различные формы наблюдаемых пиков.

Метод 2D [^{13}C , ^1H]-COSY-ЯМР обеспечивает наибольший объем информации о соотношении пространственных изотопомеров протеиногенных аминокислот [122, 123]. К тому же при его использовании не требуется предварительное разделение аминокислот, как в случае ^1H -ЯМР. Причиной яв-

ляется то, что в двумерных спектрах сигналы различных аминокислот не перекрываются и не мешают друг другу. Однако в таких двумерных спектрах сигналы атомов углерода, не содержащих присоединенных атомов водорода (четвертичные атомы углерода, например), имеют низкую интенсивность, и их регистрация затруднена.

Наряду с несомненными преимуществами в получении детальной информации о структуре изотопомеров аминокислот в гидролизатах белков (особенно в случае 2D [^{13}C , ^1H]-COSY-ЯМР), общим недостатком ЯМР является дороговизна как оборудования, так и самого эксперимента, из-за необходимости получения большого количества биомассы на среде с дорогостоящей меченой глюкозой. К тому же для расшифровки спектров ЯМР необходимо иметь высококвалифицированных специалистов узкого профиля.

Важным этапом в распространении метода ^{13}C -MFA была демонстрация того, что информация о распределении масс-изотопомеров аминокислот, получаемая при использовании хромато-масс-спектрометрии, хотя и уступает по объему получаемой в 2D [^{13}C , ^1H]-COSY-ЯМР, но все же оказывается достаточной для расчета метаболитических потоков [124]. Этот метод обладает высокой чувствительностью, требует меньшего количества образца, а потому отличается от ЯМР относительной дешевизной как самого эксперимента, так и оборудования. Более того, чувствительность MS достаточна для анализа не только гидролизатов белка, но и свободных аминокислот и других интермедиатов в пуле внутриклеточных метаболитов, что позволяет применять данный метод и для стационарного, и для кинетического анализа потоков [125, 126]. При этом необходимо учитывать специфические особенности приготовления проб различных метаболитов для стационарного и нестационарного вариантов ^{13}C -MFA [32, 33].

MS имеет лишь один существенный недостаток по сравнению с ЯМР: точно определяя **MDV**, он не позволяет получать информацию обо всех пространственных изотопомерах, описываемых **IDV**.

Как и в случае с ^1H -ЯМР, использование MS требует предварительного разделения аминокислот перед входом в масс-анализатор. Так например, Lys (MM=147,2) и Met (MM=149,2) имеют частично перекрывающиеся масс-спектры, но предварительное разделение их на хроматографической колонке позволит извлечь информацию об элементах **MDV** для изотопомеров обоих метаболитов. Методы разделения по массе различаются принципом действия, точностью и чувствитель-

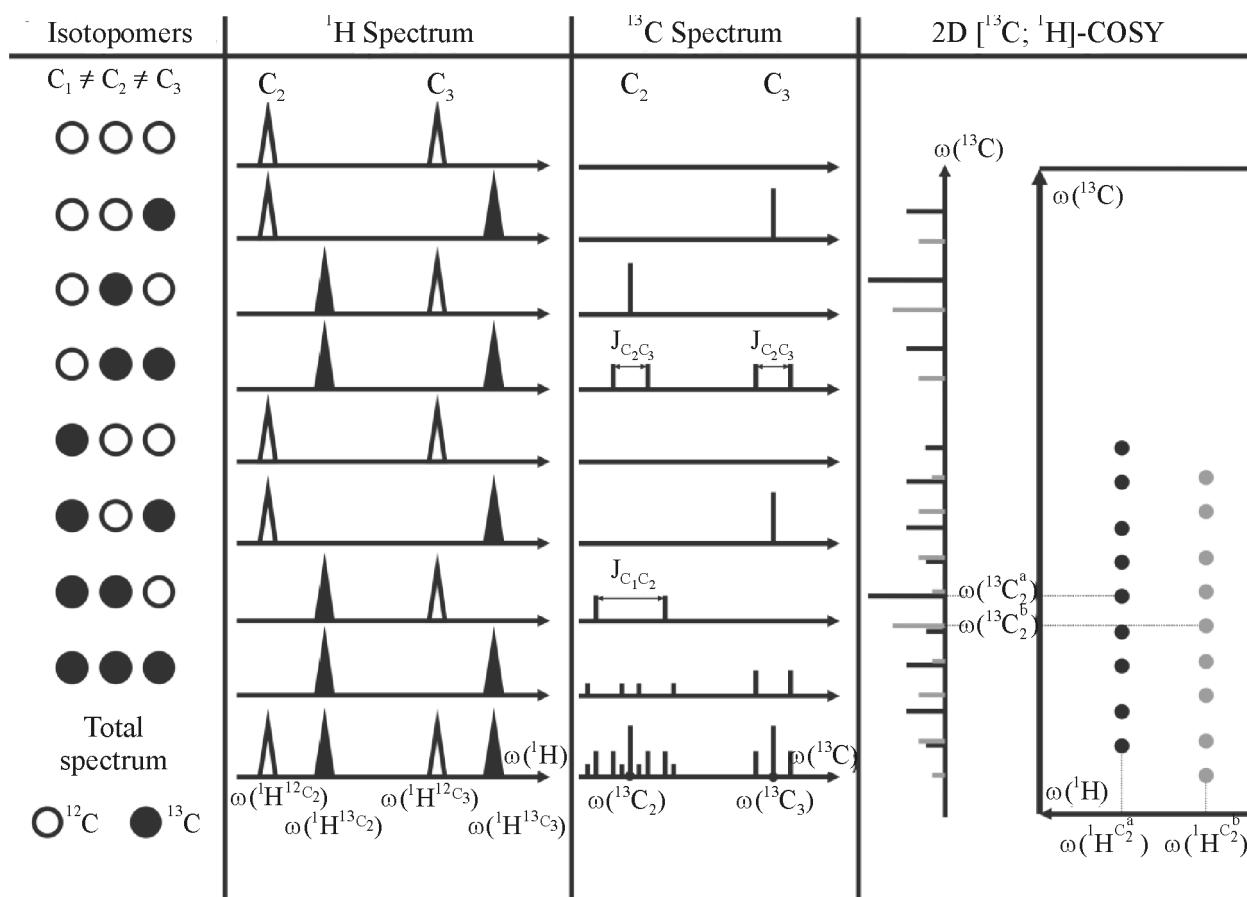


Рис. 9. Схематические изображения спектров ^1H -, ^{13}C - и $2\text{D } [^{13}\text{C}, ^1\text{H}]\text{-COSY-NMR}$, полученных при анализе эквимолярной смеси изотопомеров вещества, углеродный остов которого состоит из трех химически неэквивалентных атомов углерода (для простоты отображены сигналы, соответствующие C_2 - и C_3 -атомам): ^1H -спектр имеет низкое разрешение, не учитывает спин-спиновое взаимодействие и позволяет оценить только количество изотопомеров с тяжелым атомом углерода в заданном положении за счет разницы резонансных частот протона, связанного с изотопом ^{12}C или ^{13}C ; ^{13}C -спектр характеризуется высоким разрешением, учитывает ^{13}C - ^{13}C спин-спиновое взаимодействие и позволяет определять относительное количество изотопомеров конкретного вещества; использование двумерной спектроскопии $2\text{D } [^{13}\text{C}, ^1\text{H}]\text{-COSY-NMR}$ позволяет разрешить перекрывающиеся спектры атомов углерода двух разных веществ, находящихся в близком химическом окружении, как например атомы углерода тирозина и фенилаланина. $\omega(^1\text{H})$, $\omega(^{13}\text{C})$ — резонансные частоты атомов водорода и тяжелого углерода, соответственно. $J_{\text{C}_2\text{C}_3}$ — константа спин-спинового взаимодействия между ядрами атомов C_1 и C_2

Fig. 9. Schematic representation of the ^1H -, ^{13}C - and $2\text{D } [^{13}\text{C}, ^1\text{H}]\text{ NMR}$ spectra of equimolar mixture of 8 possible isotopomers of three-carbon compound. ^1H -spectrum is low resolution spectrum, which is sense difference in resonance frequency of ^1H bounded with ^{12}C or ^{13}C . This spectrum can be used to characterize quantitatively portion of isotopomers containing ^{13}C atom at defined position, only. In ^{13}C -spectrum ^{13}C - ^{13}C spin interaction is taking into account. This spectrum possesses higher resolution and could, already, characterize quantitatively relative abundance of the different isotopomers of the target compound. $2\text{D } [^{13}\text{C}, ^1\text{H}]\text{-COSY-NMR}$ could distinguish overlapping spectra of carbon atoms with similar chemical environment but related to different compounds (ex. carbon atoms in tyrosine and phenylalanine). $\omega(^1\text{H})$, $\omega(^{13}\text{C})$ are resonance frequencies of the ^1H and ^{13}C atoms correspondently. $J_{\text{C}_2\text{C}_3}$ — one-bond scalar coupling between nuclei C_1 and C_2

ностью [127]. При использовании наиболее популярного одноквадрупольного масс-спектрометра, вещества, разделенные по физико-химическим свойствам на хроматографической колонке, попадают в камеру, где происходит их ионизация. К ионизированным молекулам далее прикладывают магнитное поле таким образом, чтобы пропустить только молекулы заданной массы, подсчет которых происходит на детекторе.

Традиционно для измерения метаболических потоков методами ^{13}C -MFA используют сочетание разделения метаболитов с помощью газовой хроматографии и последующего определения MDV на масс-спектрометре с одним квадруполем (GC-MS). Последний является мощным методом аналитической химии, позволяющим измерять фракции метаболитов с молекулярной массой, различающейся на доли а.е.м. Для GC-MS-анали-

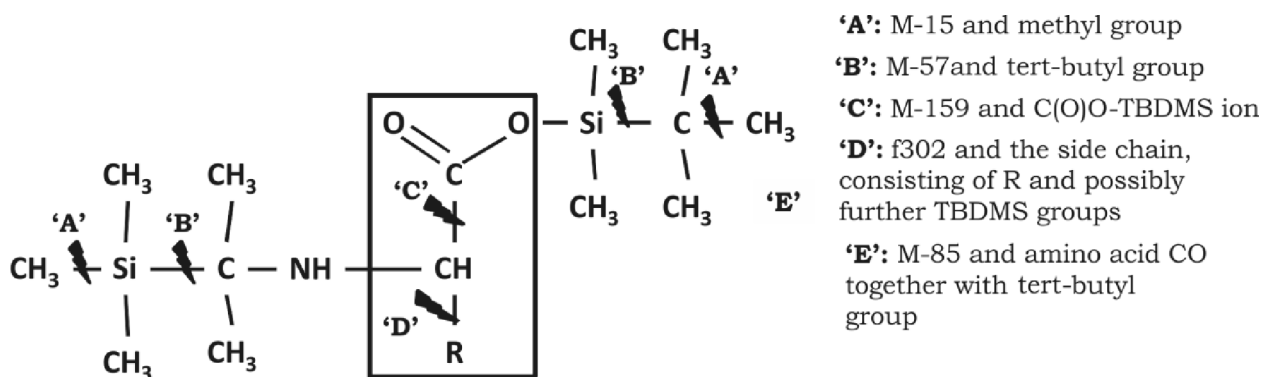


Рис. 10. Схема фрагментации TBDMS-derivatизированных аминокислот в результате их ионизации электронным ударом при проведении GC-MS-анализа. Остов аминокислоты ограничен прямоугольником. M-15 (57, 159, 85) — масса иона, получившегося в результате отрыва фрагмента с массой 15 (57, 159, 85) а.е.м. (а именно, метильной группы) от derivatизированной молекулы аминокислоты, с массой M а.е.м; f302 — фрагмент с массой 302 а.е.м.

Fig. 10. Scheme of the TBDMS-derivatized amino acid fragmentation during electron impact ionization (EI) applied in GC-MS method, usually. The amino acid is in rectangle. “M-15 (57, 159, 85)” is a fragment which resulted from cut off of the methyl group (mass of 15 or (57, 159, 85) a.e.m.) from derivatized AA molecule with mass M a.e.m; f302 is a fragment with mass of 302 a.e.m. obtained after specific fragmentation of the derivatized AA

за аминокислот требуется их химическая дериватизация с получением летучих соединений. Дериватизация также снижает полярность функциональных групп и как следствие улучшает хроматографические свойства исследуемых метаболитов. В качестве дериватизирующего агента часто используется *трет*-бутилдифенилсилан (TBDMS) [79, 128]. При мощной электронной ионизации (Electron Impact Ionization, EI), применяемой к разделенным с помощью GC дериватизированным молекулам аминокислот, они фрагментируются по известным химическим связям, давая хорошо охарактеризованные ионы (рис. 10) [128, 129]. Так как дезинтеграция может происходить и по связям в молекуле аминокислоты, то анализ масс-спектров отдельных фрагментов дает дополнительную информацию к той, которую предоставляет масс-спектрометрия целостных молекул аминокислот. Данные о массе наиболее легких изотопомеров, обычно регистрируемых при MS-анализе дериватизированных протеиногенных аминокислот, приведены в табл. 2 [128].

Существенным фактором, который необходимо учитывать при определении MDV метаболитов методом MS является частота встречаемости природно-меченых тяжелых изотопов углеродных и неуглеродных атомов самих метаболитов, а также дериватизирующего агента, которые вносят свой вклад в появление изотопомеров большей массы, что приводит к искажению спектров, обусловленных только перераспределением тяжелых углеродов ^{13}C -трэйсера. Отметим, что в

случае ЯМР наличием природно-меченого углерода в препаратах пренебрегают. Было разработано несколько подходов к учету поправки измеряемых масс-спектров на природную «меченность» метаболитов [129—131]. В настоящее время существуют подробные протоколы по использованию GC-MS для ^{13}C -MFA с описанием возможных сложностей и обязательных шагов при анализе данных [79, 128].

Альтернативным методом деления меченых метаболитов по физико-химическим свойствам перед их MS-анализом является жидкостная хроматография (LC). LC позволяет фракционировать значительно большее, по сравнению с GC, число метаболитов даже без предварительной дериватизации, хотя их предварительная модификация часто улучшает разделяющую способность хроматографии, как например при использовании широко известного метода AccQ-TagTM [125, 132]. Однако в сочетании с MS (LC-MS) метод имеет ограниченное применение в экспериментах по ^{13}C -MFA. Дело в том, что электроспрэй-ионизация (Electrospray Ionization, ESI), которая осуществляется после фракционирования метаболитов в LC для последующего детектирования ионов в MS, проводится в значительно более мягких условиях по сравнению с EI, так что нативные метаболиты не образуют специфических фрагментов как, например, в случае анализа дериватизированных аминокислот с помощью GC-MS. В конечном итоге это приводит к меньшей точности типичного определения MDV с помощью LC-MS

Масса легких фрагментов TBDMS-derivatизированных протеиногенных аминокислот, детектируемая при EI-GC-MS-анализе**Masses of light fragments of TBDMS-derivatized proteinogenic amino acids detected by EI-GC-MS**

Аминокислота ¹ Aminoacid ¹	Масса молекулы (M, а.е.м.) Mass molecule (u)	Масса фрагментов (а.е.м.) Masses of fragments (u)				
		(M-15) ⁺	(M-57) ⁺	(M-85) ⁺	(M-159) ⁺	(f302) ⁺
1	2	3	4	5	6	7
Аланин Alanine	317 [3] ²	–	260 [3]	232 [2]	–	–
Аспарат Aspartate	475 [4]	460 [4]	418 [4]	390 [3]	316 [3]	302 [2]
Валин Valine	345 [5]	–	288 [5]	260 [4]	–	302 [2]
Гистидин Histidine	497 [6]	482 [6]	440 [6]	412 [5]	338 [5]	302 [2]
Глицин Glycine	303 [2]	288 [2]	246 [2]	218 [1]	144 [1]	–
Глутамат Glutamate	489 [5]	474 [5]	432 [5]	404 [4]	330 [4]	302 [2]
Изолейцин Isoleucine	359 [6]	344 [6]	–	274 [5]	200 [5]	–
Лейцин Leucine	359 [6]	344 [6]	–	274 [5]	200 [5]	–
Лизин Lysine	488 [6]	–	431 [6]	?	329 [5]	–
Метионин Methionine	377 [5]	–	320 [5]	292 [4]	218 [4]	–
Пролин Proline	343 [5]	328 [5]	286 [5]	258 [4]	184 [4]	–
Серин Serine	447 [3]	432 [3]	390 [3]	362 [2]	288 [2]	302 [2]
Тирозин Tyrosine	523 [9]	508 [9]	466 [9]	438 [8]	364 [8]	302 [2]
Треонин Threonine	461 [4]	446 [4]	404 [4]	376 [3]	–	–

1	2	3	4	5	6	7
Фенилаланин Phenylalanine	393 [9]	–	336 [9]	308 [8]	234 [8]	302 [2]

¹В процессе кислотного гидролиза аспарагин и глутамин дезаминируются до аспартата и глутамата, соответственно; триптофан и цистеин разрушаются; сигналы, соответствующие аргинину, имеют интенсивность, недостаточную для точного количественного обсчета.

²В квадратных скобках — число атомов углеродного остова аминокислоты.

Примечание: «←» — данный ион не детектируется; знак «+» указывает, что ионизация проводится в условиях образования положительно заряженных ионов исследуемой дериватизированной молекулы аминокислоты; M-15, M-57, M-85, M-159, f302 — см. в подписи к рис. 10.

¹Asparagine and glutamine get deaminated during the acid hydrolysis up to aspartate and glutamate, respectively, and tryptophan and cysteine degrade; signals from arginine are not intense enough to provide precise quantitative processing.

²Numbers in square brackets show numbers of carbon atoms in aminoacid skeletons.

«←» sign means that ion is not detected; «+» sign means that the ionization was performed under the conditions promotion the formation of positively charged ions of the analyzed derivatized aminoacid molecule. For M-15, M-57, M-85, M-159, f302 see legend to Fig. 10.

(0,5—2,0 моль% [133]), чем методом GC-MS (0,2—0,4 моль% [134—136]).

В настоящее время жидкостную хроматографию применяют для ¹³C-MFA в сочетании с более дорогим, но существенно более информативным и точным методом — tandemной MS, или MS/MS. Tandemная MS — это аналитическая техника, включающая множественные стадии MS с фрагментацией исследуемых соединений между стадиями [137]. Биологический образец вводится в масс-спектрометр после применения соответствующей разделительной процедуры, например, GC или LC, что позволяет анализировать сложные биологические смеси, включая клеточные экстракты. Для образования ионов, необходимых для MS, элюированные с колонки метаболиты ионизируются: EI используют при разделении на GC, так же, как и для MS-анализа с одним квадруполом, либо применяют ESI — в случае LC. Затем первый анализатор масс выделяет один масс-изотомер из полного спектра (родительский ион, или ион-предшественник), который может быть дополнительно фрагментирован за счет столкновения (Collision-Induced Dissociation, CID) во втором квадруполе (ячейка столкновений). В конечном итоге образующиеся дочерние ионы (или ионы-продукты) разделяют в третьем квадруполе анализатора масс и анализируют в детекторе.

Использование разнообразных методов анализа метаболитов с помощью LC-MS/MS описано для целей ¹³C-MFA [135]. Для аминокислот,

а также для других клеточных метаболитов метод LC-MS/MS по разрешающей способности в отношении изотопомеров практически достиг уровня GC-MS. Действительно, не имея возможности дезинтегрировать дериватизированные аминокислоты за счет использования ESI, LC-MS/MS может получать их фрагменты путем CID-зависимой фрагментации в ячейке столкновений. Что же касается точности, то в определенных вариантах эксперимента с помощью LC-MS/MS достигаемая точность определения параметров MDV оказывается выше, чем при аналогичных измерениях, проводимых путем LC-MS или даже GS-MS [137]. С методической точки зрения использование LC-MS/MS для анализа изотопомеров интермедиатов ЦМ (EMP, пентозофосфатного пути, цикла Кребса и др.), а также их осколков с идентифицированной структурой, получаемых в результате CID-фрагментации, впервые реализованное в работе [138], представляет чрезвычайный интерес. С одной стороны, положено начало созданию библиотеки информации об условиях формирования дочерних ионов интермедиатов ЦМ и их пространственной структуре для последующего экспериментального исследования IDV соответствующих метаболитов. С другой стороны, интерес к анализу интермедиатов метаболизма обусловлен тем, что изотопомерный стационар для этих метаболитов достигается уже через минуты (возможно, десятки минут) после импульсного добавления метки в культуру быстрорастущих микроор-

ганизмов, а не спустя десятки часов, как в случае протеиногенных аминокислот. Последнее обстоятельство позволяет оценивать метаболические потоки после внесения метки в различные периоды времени в параллельно растущие культуры, т.е. использовать хорошо разработанную технику стационарного ^{13}C -MFA для анализа кинетики потоков в процессе культивирования [126].

Что же касается полной информации о степени «меченности» протеиногенных аминокислот, описываемой вектором **IDV**, то в настоящее время она может стать доступной в результате применения GC-MS/MS [137]. Действительно, при использовании GC TMBDS-derivatизированных аминокислот и EI для их ионизации уже в первом квадрупле достигается разрешение специфических ионов, характерное для GC-MS. При этом последующая CID-фрагментация с установлением структуры образующихся осколков дает большую дополнительную информацию о пространственном распределении меченых атомов и в идеале предоставляет все элементы **IDV**. Так, на сегодняшний день с помощью GC-MS/MS удалось идентифицировать все 16 пространственных изотопомеров (компонентов **IDV**) аспартата [112]. Новый практический интерес представляют и относительно давние структурные исследования фрагментов глутамата [139] и некоторых других аминокислот [140], получаемых в результате CID-фрагментации при MS/MS-анализе.

Безусловно, тандемная MS является очень многообещающей аналитической техникой исследования метаболизма, в том числе и с помощью ^{13}C -MFA, сочетающей в себе высокую эффективность разделения метаболитов, высокую чувствительность и селективность. Для целей кинетических исследований флюксомики и метабономики огромную ценность представляют создаваемые библиотеки пар родительско-дочерних ионов, которые способны играть роль стандартов при высокоточном определении уровня внутриклеточных метаболитов и их изотопомеров [141, 142]. В частности, одна из таких библиотек, описанная в [143], включает 141 метаболит, что составляет около 25% всех охарактеризованных представителей метаболома *E. coli*.

Специалисты рассчитывают, что после относительно небольших доработок уже существующей процедуры анализа тандемная MS в недалеком будущем станет основным «золотым стандартом» для экспериментального исследования изотопомерного распределения метаболитов путем ^{13}C -MFA [137].

Благодарности

Хотелось бы высказать глубокую благодарность академику РАН Михаилу Петровичу Кирпичникову за предложение подготовить для публикации настоящий обзор. Он подготовлен на основе материалов, частично входящих в современный вариант курса лекций по метаболической инженерии, которые уже более 10 лет читает один из авторов настоящего обзора на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Хотелось бы также поблагодарить академика РАН Владимира Георгиевича Дебабова за постоянный интерес к работам по ^{13}C -MFA, проводимым в лаборатории авторов, а также за любезное предложение опубликовать соответствующие обзоры в руководимом им журнале «Биотехнология».

Поступила в редакцию 02.08.2016

Received August 02, 2016

ЛИТЕРАТУРА

1. Gatherer D. So what do we really mean when we say that system biology is holistic? *BMC Systems Biology*. 2010, 4(22), 1—12. doi: 10.1186/1752-0509-4-22
2. Kalinowski J., Bathe B., Bartels D., et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of l-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* 2003, 104, 5—25
3. Thiele I., and Palsson B.O. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature Protocols*. 2010, 5, 93—121. doi: 10.1038/nprot.2009.203
4. Hara Y., Kadotani N., Izui H., et al. The complete genome sequence of *Pantoea ananatis* AJ13355, an organism with great biotechnological potential. *Appl. Microb. Biotechnol.* 2012, 93, 331—341. doi: 10.1007/s00253-011-3713-5
5. Heather J. M., and Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016, 107, 1—8. doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003
6. Schena M., Shalon D., Davis R.W., et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995, 270, 467—470. doi: 10.1126/science.270.5235.467
7. Lockhart D.J., Dong H., Byrne M.C., et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* 1996, 14, 1675—1680. doi: 10.1038/nbt1296-1675
8. Polen T., and Wendisch V.F. Genomewide expression analysis in amino acid-producing bacteria using DNA microarrays. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2004, 118, 215—232. doi: 10.1385/ABAB:118:1-3:215
9. Johansson L., Liden G. Transcriptome analysis of a shikimic acid producing strain of *Escherichia coli* W3110 grown under carbon- and phosphate-limited conditions. *J. Biotechnol.* 2006, 126, 528—545. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.05.007

10. Jensen O.N. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006, 7, 391—403. doi: 10.1038/nrm1939
11. Bantscheff M., Schirle M., Sweetman G., et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 389, 1017—1031. doi: 10.1007/s00216-007-1486-6
12. de Oliveira J.M., and de Graaf L.H. Proteomics of industrial fungi: trends and insights for biotechnology. *Appl. Microb. Biotechnol.* 2011, 89, 225—237. doi: 10.1007/s00253-010-2900-0
13. Plewczynski D., and Ginalski K. The Interactome: predicting the protein-protein interactions in cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2009, 14(1), 1—22. doi: 10.2478/s11658-008-0024-7
14. Williamson M. P., and Sutcliffe M. J. Protein-protein interactions. *Biochem. Soc. Trans.* 2010, 38, 875—878. doi: 10.1042/BST0380875
15. Reaves M.L., and Rabinowitz J.D. Metabolomics in systems microbiology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2010, 22, 17—25. doi: 10.1016/j.copbio.2010.10.001
16. Baidoo E.E.K., Benke P.I., and Keasling J.D. Mass spectrometry-based microbial metabolomics: Microbial systems biology: Methods and protocols. *Methods in molecular biology*. [Ed. A. Navid]. Germany, Springer Science+Business Media, LLC, 2012, 881, 215—278. doi: 10.1007/978-1-61779-827-6_9
17. Sauer U. Metabolic networks in motion: ¹³C-based flux analysis. *Mol. Syst. Biol.* 2006, 2, 1—10. doi: 10.1038/msb4100109
18. Tang Y.J., Martin H.G., Myers S., et al. Advances in analysis of microbial metabolic fluxes via ¹³C isotopic labeling. *Mass Spectrometry Rev.* 2009, 28, 362—375. doi: 10.1002/mas.20191
19. Kohlstedt, M., Becker J., and Wittmann C. Metabolic fluxes and beyond — systems biology understanding and engineering of microbial metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 88, 1065—1075. doi: 10.1007/s00253-010-2854-2
20. Heinemann, M. and Sauer U. Systems biology of microbial metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.* 2010, 13, 337—343. doi: 10.1016/J.MIB.2010.02.005
21. Zhang W., Li F., and Nie L. Integrating multiple ‘omics’ analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiology.* 2010, 156, 287—301. doi: 10.1099/mic.0.034793-0
22. Lee J.W., Na D., Park J.M., et al. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nature Chem. Biol.* 2012, 8, 536—546. doi: 10.1038/nchembio.970
23. Vishwanathan N., Le H., Le T., et al. Advancing biopharmaceutical process science through transcriptome analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014, 30, 113—119. doi: 10.1016/j.copbio.2014.06.011
24. Heffner K. M., Hizal D. B., Kumar A., et al. Exploiting the proteomics revolution in biotechnology: from disease and antibody targets to optimizing bioprocess development. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014, 30, 80—86. doi: 10.1016/j.copbio.2014.06.006
25. Kind S., Kreye S., and Wittmann C. Metabolic engineering of cellular transport for overproduction of the platform chemical 1,5-diaminopentane in *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* 2011, 13, 617—627. doi: 10.1016/j.ymben.2011.07.006
26. Korneli C., Bolten C. J., Godard T., et al. Debottlenecking recombinant protein production in *Bacillus megaterium* under large-scale conditions — targeted precursor feeding designed from metabolomics. *Biotechnol. Bioeng.* 2012, 109, 1538—1550. doi: 10.1002/bit.24434
27. Becker J., and Wittmann C. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production — the heartbeat of industrial strain development. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2012, 23, 718—726. doi: 10.1016/j.copbio.2011.12.025
28. Bath T.S., and Singh P., Ramakrishnan V.R., et al. A targeted proteomics toolkit for high-throughput absolute quantification of *Escherichia coli* proteins. *Metab. Eng.* 2014, 26, 48—56. doi: 10.1016/j.ymben.2014.08.004
29. Oszolac F., Platt A. R., Jones D. R., et al. Direct RNA sequencing. *Nature.* 2009, 461, 814—818. doi: 10.1038/nature08390
30. Van Gulik W. M. Fast sampling for quantitative microbial metabolomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2010, 21, 27—34. doi: 10.1016/j.copbio.2010.01.008
31. Van Gulik W.M., Canelas A.B., Taymaz-Nikerel H., et al. Fast sampling of the cellular metabolome: Microbial systems biology: Methods and protocols. *Methods in molecular biology*. [Ed. A. Navid], Germany, Springer Science+Business Media, LLC, 2012, 881, 279—306. doi: 10.1007/978-1-61779-827-6_10
32. Bolten C.J., Kiefer P., Letisse F., et al. Sampling for metabolome analysis of microorganisms. *Anal. Chem.* 2007, 79, 3843—3849. doi: 10.1021/ac0623888
33. Millard P., Massou S., Wittmann C., et al. Sampling of intracellular metabolites for stationary and non-stationary ¹³C-metabolic flux analysis in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* 2014, 465, 38—49. doi: 10.1016/j.ab.2014.07.026
34. Winter G., and Krömer J.O. Fluxomics — connecting ‘omics’ analysis and phenotypes. *Environ. Microbiol.* 2013, 15, 1901—1916. doi: 10.1111/1462-2920.12064
35. Antoniewicz M.R. Dynamic metabolic flux analysis — tools for probing transient states of metabolic networks. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2013, 24, 973—978. doi: 10.1016/j.copbio.2013.03.018
36. Wiechert W., and Nöh K. Isotopically non-stationary metabolic flux analysis: complex yet highly informative. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2013, 24, 979—986. doi: 10.1016/j.copbio.2013.03.024
37. Antoniewicz M.R. Methods and advances in metabolic flux analysis: a mini-review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 42, 317—325. doi: 10.1007/s10295-015-1585-x
38. Niefenführ S., Wiechert W., and Nöh K. How to measure metabolic fluxes: a taxonomic guide for ¹³C fluxomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015, 34, 82-90. doi: 10.1016/j.copbio.2014.12.003
39. Varma A., and Palsson B.O. Metabolic flux balance. Basic concepts. Scientific and practical use. *Nat. Biotechnol.* 1994, 12, 994—998. doi: 10.1038/nbt1094-994

40. Feist A.M., Henry C.S., Reed J.L., et al. A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and their thermodynamic information. *Mol. Syst. Biol.* 2007, 3, 121—139. doi: 10.1038/msb4100155
41. Varma A., and Palsson B.O. Metabolic capabilities of *Escherichia coli*: I. Synthesis of Biosynthetic precursors and cofactors. *J. Theor. Biol.* 1993, 165, 477—502. doi: 10.1006/jtbi.1993.1202
42. Varma A., Boesch B.W., and Palsson B.O. Biochemical production capabilities of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioengin.* 1993, 42, 59—73. doi: 10.1002/bit.260420109
43. Vallino J.J., and Stephanopoulos G. Metabolic flux distribution in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol. Bioeng.* 1993, 41, 633—646. doi: 10.1002/bit.260410606
44. Oberhardt M.A., Palsson B.O., and Papin J.A. Applications of genome-scale metabolic reconstructions. *Mol. Syst. Biol.* 2009, 5(320), 1—15. doi: 10.1038/MSB.2009.77
45. Orth J.D., Conrad T.M., Na J., et al. A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism. *Mol. Syst. Biol.* 2011, 7(535), P. 1—9. doi: 10.1038/msb.2011.65
46. Wasylenko T.M., and Stephanopoulos G. Kinetic isotope effects significantly influence intracellular metabolite ¹³C labeling patterns and flux determination. *Biotechnol. J.* 2013, 8, 1080—1089. doi: 10.1002/biot.201200276
47. Wiechert W., and de Graaf A.A. Bidirectional reaction steps in metabolic networks: I. Modeling and stimulation of carbon isotope labeling experiments. *Biotechnol. Bioeng.* 1997, 55, 101—117. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970705)55:1<101::AID-BIT12>3.0.CO;2-P
48. Shearer G., Lee J.C., Koo J., et al. Quantitative estimation of channeling from early glycolytic intermediates to CO₂ in intact *Escherichia coli*. *FEBS J.* 2005, 272, 3260—3269. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04712.x
49. Zamboni N., Fischer E., Sauer U., et al. FiatFlux — a software for metabolic flux analysis from ¹³C-glucose experiments. *BMC Bioinformatics.* 2005, 6(209), 1—8. doi: 10.1186/1471-2105-6-209
50. Van Ooyen J., Noack S., Bott M., et al. Improved L-lysine production with *Corynebacterium glutamicum* and systemic insight into citrate synthase flux and activity. *Biotechnol. Bioeng.* 2012, 109, 2070—2081. doi: 10.1002/bit.24486
51. Becker J., Zelder O., Häfner S., et al. From zero to hero — design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. *Metab. Eng.* 2011, 13, 159—168. doi: 10.1016/j.ymben.2011.01.003.
52. Dauner M. From fluxes and isotope labeling patterns towards in silico cells. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2010, 21, 55—62. doi: 10.1016/j.copbio.2010.01.014
53. Zamboni N. ¹³C metabolic flux analysis in complex systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011, 22, 103—108. doi: 10.1016/j.copbio.2010.08.009
54. Guo W., Sheng J., and Feng X. ¹³C-metabolic flux analysis: an accurate approach to demystify microbial metabolism for biochemical production. *Bioengineering.* 2016, 3(3), 1—32. doi: 10.3390/bioengineering3010003
55. Boghigian B.A. Seth G., Kiss R., et al. Metabolic flux analysis and pharmaceutical production. *Metab. Eng.* 2010, 12, 81—95. doi: 10.1016/j.ymben.2009.10.004
56. Iwatani S. Yamada Y., and Usuda Y. Metabolic flux analysis in biotechnology process. *Biotechnol. Lett.* 2008, 30, 791—799. doi: 10.1007/s10529-008-9633-5
57. Niklas J. Schneider K., Heinzle E. Metabolic flux analysis in eukaryotes. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2010, 21, 63—69. doi: 10.1016/j.copbio.2010.01.011
58. Matsuoka Y., and Shimizu K. Current status of ¹³C-metabolic flux analysis and future perspectives. *Proc. Biochem.* 2010, 45, 1873—1881. doi: 10.1016/j.procbio.2010.03.025
59. Gerosa L., and Sauer U. Regulation and control of metabolic fluxes in microbes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011, 22, 566—575. doi: 10.1016/j.copbio.2011.04.016
60. Nöh K., and Wiechert W. The benefits of being transient: isotope-based metabolic flux analysis at the short time scale. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 91, 1247—1265. doi: 10.1007/s00253-011-3390-4
61. Young J. D. ¹³C metabolic flux analysis of recombinant expression hosts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014, 30, 238—245. doi: 10.1016/j.copbio.2014.10.004
62. Meyer F.M., Gerwig J., Hammer E., et al. Physical interactions between tricarboxylic acid cycle enzymes in *Bacillus subtilis*: Evidence for a metabolon. *Metab. Eng.* 2011, 13(1), 18—27. doi: 10.1016/j.ymben.2010.10.001
63. Ovadi J., and Saks V. On the origin of intracellular compartmentation and organized metabolic systems. *Mol. Cell. Biochem.* 2004, (256/257), 5—12. doi: 10.1023/B:MCBI.0000009855.14648.2c
64. Ellis R. J. Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2001, 11(1), 114—119. doi: 10.1016/S0959-440X(00)00172-X
65. Stephanopoulos G. N., Aristidou A. A., and Nielsen J. H. Metabolic engineering: principles and methodologies. San Diego: Academic Press, 1998, 725
66. Antoniewicz M.R., Kraynie D.F., Laffend L.A., et al. Metabolic flux analysis in a nonstationary system: fed-batch fermentation of a high yielding strain of *E. coli* producing 1,3-propanediol. *Metab. Eng.* 2007, 9(3), 277—292. doi: 10.1016/j.ymben.2007.01.003
67. Dauner M., and Sauer U. Stoichiometric growth model for riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 2001, 76(2), 132—143. doi: 10.1002/bit.1153
68. Fischer E., Zamboni N., and Sauer U. High-throughput metabolic flux analysis based on gas chromatography-mass spectrometry derived ¹³C constraints. *Anal. Biochem.* 2004, 325, 308—316. doi: 10.1016/j.ab.2003.10.036
69. Papini M., Nookaew I., Siewers V., et al. Physiological characterization of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Aspergillus nidulans* phosphoketolase pathway: validation of activity through ¹³C-based metabolic flux analysis

- sis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 95(4), 1001—1010. doi: 10.1007/s00253-012-3936-0
70. Suthers P.F., Burgard A.P., Dasika M.S., et al. Metabolic flux elucidation for large-scale models using ¹³C labeled isotopes. *Metab. Eng.* 2007, 9(5-6), 387—405. doi: 10.1016/j.ymben.2007.05.005
71. Leighty R.W., Antoniewicz M.R. COMPLETE-MFA: Complementary parallel labeling experiments technique for metabolic flux analysis. *Metab. Eng.* 2013, 20, 49—55. doi: 10.1016/j.ymben.2013.08.006
72. Feist A.M., Herrgard M. J., Thiele I., et al. Reconstruction of biochemical networks in microbial organisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009, 7, 129—143. doi: 10.1038/nrmicro1949
73. Oh Y.K., Palsson B.O., Park S.M., et al. Genome scale reconstruction of metabolic network in *Bacillus subtilis* based on high-throughput phenotyping and gene essentiality data. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 28791—28799. doi: 10.1074/jbc.M703759200
74. Cordova L.T. and Antoniewicz M.R. ¹³C metabolic flux analysis of the extremely thermophilic, fast growing, xylose-utilizing *Geobacillus* strain LC300. *Metab. Eng.* 2016, 33, 148—157. doi: 10.1016/j.ymben.2015.06.004
75. Cordova L.T., Long C.P., Venkataramanan K.P., et al. Complete genome sequence, metabolic model construction and phenotypic characterization of *Geobacillus* LC300, an extremely thermophilic, fast growing, xylose-utilizing bacterium. *Metab. Eng.* 2015, 32, P. 74—81. doi: 10.1016/j.ymben.2015.09.009
76. Pramanik J., and Keasling J.D. Stoichiometric model of *Escherichia coli* metabolism: incorporation of growth-rate dependent biomass composition and mechanistic energy requirements. *Biotechnol. Bioeng.* 1997, 56(4), 398—421. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19971120)56:4<398::AID-BIT6>3.0.CO;2-J
77. Ravikirthi P., Suthers P.F., and Maranas C.D. Construction of an *E. coli* genome-scale atom mapping model for MFA calculations. *Biotechnol. Bioeng.* 2011, 108, 1372—1382. doi: 10.1002/bit.23070
78. Gopalakrishnan S. and Maranas C.D. ¹³C metabolic flux analysis at a genome-scale. *Metab. Eng.* 2015, 32, 12—22. doi: 10.1016/j.ymben.2015.08.006
79. Zamboni N., Fendt S.-M., and Rühl M. ¹³C-based metabolic flux analysis. *Nature Protocols.* 2009, 4(6), 878—892. doi: 10.1038/nprot.2009.58
80. Wiechert W. The thermodynamic meaning of metabolic exchange fluxes. *Biophys. J.* 2007, 93, 2255—2264. doi: 10.1529/biophysj.106.099895
81. Leighty R.W., and Antoniewicz M.R. Parallel labeling experiments with [U-¹³C]glucose validate *E. coli* metabolic network model for ¹³C metabolic flux analysis. *Metab. Eng.* 2012, 14(5), 533—541. doi: 10.1016/j.ymben.2012.06.003
82. Dutow P., Schmidl S.R., Ridderbusch M., et al. Interactions between glycolytic enzymes of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 19(3), 134—139. doi: 10.1159/000321499
83. Commichau F.M., Rothe F.M., Herzberg C., et al. Novel activities of glycolytic enzymes in *Bacillus subtilis*: interactions with essential proteins involved in mRNA processing. *Mol. Cell. Proteomics.* 2009, 8(6), 1350—1360. doi: 10.1074/mcp.M800546-MCP200
84. Jung I.L., Phyto K.H., and Kim I.G. RpoS-mediated growth-dependent expression of the *Escherichia coli* *tkt* genes encoding transketolases isoenzymes. *Curr. Microbiol.* 2005, 50(6), 314—318. DOI: 10.1007/s00284-005-4501-1
85. Dueber J.E., Wu G.C., Malmirchegini G.R., et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nature Biotechnol.* 2009, 27, 753—759. doi: 10.1038/nbt.1557
86. Lee H., DeLoache W.C., and Dueber J.E. Spatial organization of enzymes for metabolic engineering. *Metab. Eng.* 2012, 14, 242—251. doi: 10.1016/j.ymben.2011.09.003
87. Lee J.H., Jung S.-C., Bui L.M., et al. Improved production of l-threonine in *Escherichia coli* by use of a DNA scaffold system. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013, 79, 774—782. doi: 10.1128/AEM.02578-12
88. Wiechert W. ¹³C metabolic flux analysis. *Metab. Eng.*, 2001, 3(3), 195—206. doi: 10.1006/mben.2001.0187
89. Fischer E., and Sauer U. A novel metabolic cycle catalyzes glucose oxidation and anaplerosis in hungry *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2003, 278(47), 46446—46451. doi: 10.1074/jbc.M307968200
90. Fong S.S., Nanchen A., Palsson B.O., et al. Latent pathway activation and increased pathway capacity enable *Escherichia coli* adaptation to loss of key metabolic enzymes. *J. Biol. Chem.* 2006, 281(12), 8024—8033. doi: 10.1074/jbc.M510016200
91. Emmerling M., Dauner M., Ponti A., et al. Metabolic flux responses to pyruvate kinase knockout in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2002, 184(1), 152—164. doi: 10.1128/JB.184.1.152-164.2002
92. Swarup A., Lu J., and DeWoody K.C. Metabolic network reconstruction, growth characterization and ¹³C-metabolic flux analysis of the extremophile *Thermus thermophilus* HB8. *Metab. Eng.* 2014, 24, 173—180. doi: 10.1016/j.ymben.2014.05.013
93. Au J., Choi J., Jones S.W., et al. Parallel labeling experiments validate *Clostridium acetobutylicum* metabolic network model for ¹³C metabolic flux analysis. *Metab. Eng.* 2014, 26, 23—33. doi: 10.1016/j.ymben.2014.08.002
94. Sonntag K., Eggeling L., de Graaf A.A., et al. Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* — Quantification by ¹³C- and ¹H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 1993, 213(3), 1325—1331. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17884.x
95. Wiechert W., Siefke C., de Graaf A.A., et al. Bidirectional reaction steps in metabolic networks: II. Flux estimation and statistical analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 1997, 55(1), 118—135. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970705)55:1<118::AID-BIT13>3.0.CO;2-I
96. Bonarius H. P. J., Schmidt G., and Tramper J. Flux analysis of undetermined metabolic systems: The quest for missing cons-

- traits. *Trends Biotechnol.* 1997, 15(8), 308—314. doi: 10.1016/S0167-7799(97)01067-6
97. Marx A., de Graaf A.A., Wiechert W., et al. Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol. Bioeng.* 1996, 49(2), 111—129. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960120)49:2<111::AID-BIT1>3.0.CO;2-T
 98. Sauer U., and Bailey J.E. Estimation of P-to-O ratio in *Bacillus subtilis* and its influence on maximum riboflavin yield. *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 64(6), 750—754. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990920)64:6:3.0.CO;2-S
 99. Petersen S., de Graaf A.A., Eggeling L., et al. *In vivo* quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacteria glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 2000, 275(46), 35932—35941. doi: 10.1074/jbc.M908728199
 100. Zheng L., Kostrewa D., Berneche S., et al. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004, 101(49), 17090—17095. doi: 10.1073/pnas.0406475101
 101. Hsieh Y.-J., and Wanner B.L. Global regulation by the seven-component P_i signaling system. *Curr. Opin. Microbiol.* 2010, 13(2), 198—203. doi: 10.1016/j.mib.2010.01.014
 102. Lengeler J.W., Drews G., Schlegel H.G. Biosynthesis of Building blocks. *Biology of the Prokaryotes*. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag, 1999, 110—162.
 103. Szyperski T. Biosynthetically directed fractional ¹³C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *Eur. J. Biochem.* 1995, 232(2), 433—448. doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.433zz.x
 104. Becker J. and Wittmann C. GC-MS-based ¹³C metabolic flux analysis. In: *Metabolic flux analysis: Methods and protocols*. [Eds. J. O. Krömer, L. K. Nielsen, L. M. Blank], N. Y.: Springer Science+Business Media, 2014, 1191, 165—174. doi: 10.1007/978-1-4939-1170-7_10
 105. Wiechert W., and de Graaf A.A. *In vivo* stationary flux analysis by ¹³C labeling experiments. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 1996, 54, 109—154. doi: 10.1007/BFb0102334
 106. Wiechert W., Möllney M., Isermann N., et al. Bidirectional reaction steps in metabolic networks: III. Explicit solution and analysis of isotopomer labeling systems. *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 66(2), 69—85. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(1999)66:2<69::AID-BIT1>3.0.CO;2-6
 107. Möllney M., Wiechert W., Kownatzki D., et al. Bidirectional reaction steps in metabolic networks: IV. Optimal design of isotopomer labeling experiments. *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 66(2), 86—103. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(1999)66:2<86::AID-BIT2>3.0.CO;2-A
 108. Wiechert W., Möllney M., Petersen S., et al. A universal framework for ¹³C metabolic flux analysis. *Metab. Eng.* 2001, 3(3), 265—283. doi: 10.1006/mben.2001.0188
 109. Weitzel M., Nöh K., Dalman T., et al. 13CFLUX2 — high-performance software suite for ¹³C-metabolic flux analysis. *Bioinformatics.* 2013, 29(1), 143—145.
 110. Malloy C.R., Sherry A.D., and Jeffrey F.M.H. Evaluation of carbon flux and substrate selection through alternate pathways involving the citric acid cycle of the heart by ¹³C NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 1988, 263(15), 6964—6971.
 111. Schmidt K., Carlsen M., Nielsen J., et al. Modeling isotopomer distributions in biochemical networks using isotopomer mapping matrices. *Biotechnol. Bioeng.* 1997, 55(6), 831—840. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970920)55:6<831::AID-BIT2>3.0.CO;2-H
 112. Choi J., Grossbach M.T., and Antoniewicz M.R. Measuring complete isotopomer distribution of aspartate using gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2012, 84(10), 4628—4632. doi: 10.1021/ac300611n
 113. Wittmann C., Heinze E. Mass spectrometry for metabolic flux analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 62(6), 739—750. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990320)62:6<739::AID-BIT3>3.0.CO;2-E
 114. Zupke C., Stephanopoulos G. Modeling of isotope distributions and intracellular fluxes in metabolic networks using atom mapping matrices. *Biotechnol. Prog.* 1994, 10(5), 489—498. doi: 10.1021/bp00029a006
 115. Antoniewicz M.R. Comprehensive analysis of metabolic pathways through the combined use of multiple isotopic tracers. PhD thesis [G. Stephanopoulos — supervised], Massachusetts Institute of Technology. 2006. <http://hdl.handle.net/1721.1/37457>
 116. Kleijn R.J., van Winden W.A., van Gulik W.M., et al. Revisiting the ¹³C-label distribution of the non-oxidative branch of the pentose phosphate pathway based upon kinetic and genetic evidence. *FEBS J.* 2005, 272(12), 4970—4982. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04907.x
 117. van Winden W.A., van Dam J.C., and Ras C. Metabolic-flux analysis of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D based on mass isotopomer measurements of (13)C-labeled primary metabolites. *FEMS Yeast Res.* 2005, 5(6-7), 559—568. doi: 10.1016/j.femsyr.2004.10.007
 118. Quek L.E., Wittmann C., Nielsen L.K., et al. OpenFLUX: efficient modelling software for ¹³C-based metabolic flux analysis. *Microb. Cell Fact.* 2009, 8(25), 1—15. doi: 10.1186/1475-2859-8-25
 119. Becker J., Reinefeld J., Stellmacher R., et al. Systems-wide analysis and engineering of metabolic pathway fluxes in bio-succinate producing *Basfia succiniciproducens*. *Biotechnol. Bioeng.* 2013, 110(11), 3013—3023. doi: 10.1002/bit.24963
 120. Mu F., Williams R.F., Unkefer C.J., et al. Carbon-fate maps for metabolic reactions. *Bioinformatics.* 2007, 23(23), 3193—3199. doi: 10.1093/bioinformatics/btm498
 121. Szyperski T. ¹³C-NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research. *Q. Rev. Biophys.* 1998, 31(1), 41—106. doi: 10.1017/S0033583598003412
 122. Schmidt K., Nielsen J., and Villadsen J. Quantitative analysis of metabolic fluxes in *Escherichia coli*, using two-dimensional NMR spectroscopy and complete isotopomer models. *J. Biotechnol.* 1999, 71(1-3), 175—189. doi: 10.1016/S0168-1656(99)00021-8

123. Sauer U., Hatzimanikatis V., Bailey J.E., et al. Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nat. Biotechnol.* 1997, 15(5), 448—452. doi: 10.1038/nbt0597-448.
124. Fischer E., and Sauer U. Metabolic flux profiling of *Escherichia coli* mutants in central carbon metabolism using GC-MS. *Eur. J. Biochem.* 2003, 270(5), 880—891. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03448.x
125. Iwatani S., Van Dien S., Shimbo K., et al. Determination of metabolic flux changes during fed-batch cultivation from measurements of intracellular amino acids by LC-MS/MS. *J. Biotechnol.* 2007, 128(1), 93—111. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.09.004
126. Toya Y., Ishii N., Nakahigashi K., et al. ¹³C-metabolic flux analysis for batch culture of *Escherichia coli* and its *pyk* and *pgi* gene knockout mutants based on mass isotopomer distribution of intracellular metabolites. *Biotechnol. Prog.* 2010, 26(4), 975—992. doi: 10.1002/btpr.420
127. Wittmann C. Metabolic flux analysis using mass spectrometry. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2002, 74, 39—64. doi: 10.1007/3-540-45736-4_3
128. Nanchen A., Fuhrer T., and Sauer U. Determination of metabolic flux ratio from ¹³C-experiments and gas chromatography-mass spectrometry data: protocol and principles. *Methods Mol. Biol.* 2007, 358, 177—197. doi: 10.1007/978-1-59745-244-1_11
129. Dauner M., and Sauer U. GC-MS analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. *Biotechnol. Prog.* 2000, 16(4), 642—649. doi: 10.1021/bp000058h
130. van Winden W.A., Wittmann C., Heinze E., et al. Correcting mass isotopomer distributions for naturally occurring isotopes. *Biotechnol. Bioeng.* 2002, 80(4), 477—479. doi: 10.1002/bit.10393
131. Fernandez C.A., Des Rosiers C., Previs S.F., et al. Correction of ¹³C mass isotopomer distributions for natural stable isotope abundance. *J. Mass. Spectrom.* 1996, 31(3), 255—262. doi: 10.1002/(SICI)1096-9888(199603)31:3<255::AID-JMS290>3.0.CO;2-3
132. Shimbo K., Oonuki T., Yahashi A., et al. Precolumn derivatization reagents for high-speed analysis of amines and amino acids in biological fluid using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009, 23(10), 1483—1492. doi: 10.1002/rcm.4026
133. Kiefer P., Nicolas C., Letisse F. et al. Determination of carbon labeling distribution of intracellular metabolites from single fragment ions by ion chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 2007, 360(2), 182—188. doi: 10.1016/j.ab.2006.06.032
134. Klapa M.I., Aont C., and Stephanopoulos G. Systematic quantification of complex metabolic flux networks using stable isotopes and mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.* 2003, 270(17), 3525—3542. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03732.x
135. Antoniewicz M.R., Kelleher J.K., Stephanopoulos G. Accurate assessment of amino acid mass isotopomer distributions for metabolic flux analysis. *Anal. Chem.* 2007, 79(19), 7554—7559. doi: 10.1021/ac0708893
136. Ahn, W.C., and Antoniewicz M.R. Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metab. Eng.* 2011, 13(5), 598—609. doi: 10.1016/j.ymben.2011.07.002
137. Antoniewicz M.R. Tandem mass spectrometry for measuring stable-isotope labeling. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2013, 24(1), 48—53. doi: 10.1016/j.copbio.2012.10.011
138. Rühl M., Rupp B., Nöh K., et al. Collisional fragmentation of central metabolites in LC-MS/MS increases precision of ¹³C metabolic flux analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 2012, 109(3), 763—771. doi: 10.1002/bit.24344
139. Jeffrey F.M.H., Roach J.S., Storey C.J., et al. ¹³C isotopomer analysis of glutamate by tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 2002, 300(2), 192—205. doi: 10.1006/abio.2001.5457
140. Dookeran N.N., Yalcin T., and Harrison A.G. Fragmentation reactions of protonated δ -amino acids. *J. Mass Spectr.* 1996, 31(5), 500—508. doi: 10.1002/(SICI)1096-9888(199605)31:5<500::CO;2-Q
141. Harada K., Ohyama Y., Tabushi T., et al. Quantitative analysis of anionic metabolites for *Catharanthus roseus* by capillary electrophoresis using sulfonated capillary coupled with electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Biosci. Bioeng.* 2008, 105(3), 249—260. doi: 10.1263/jbb.105.249
142. Buescher J.M., Moco S., Sauer U., et al. Ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast and robust quantification of anionic and aromatic metabolites. *Anal. Chem.* 2010, 82(11), 4403—4412. doi: 10.1021/ac100101d
143. Bajad S.U., Lu W., Kimball E.H., et al. Separation and quantification of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1125(1), 76—88. doi: 10.1016/j.chroma.2006.05.019

Л.И. Голубева,

Канд. биол. наук, научный сотрудник,
L.I. Golubeva,
Ph. D., Researcher,
e-mail: luba_golubeva@agri.ru

М.С. Шуплецов,

Канд. физ.-мат. наук,
ассистент кафедры математической
кибернетики факультета ВМК МГУ,
научный консультант ЗАО «АГРИ»,
M.S. Shupletsov,
Ph. D., Assistant Professor of Dept.
Mathematical Cybernetics,
the Computational Mathematics and Cybernetics Faculty,
Lomonosov Moscow State University,
and Scientific Consultant of ZAO AGRI
e-mail: shupletsov@cs.msu.ru

С.В. Машко,

Докт. биол. наук, профессор,
научный директор ЗАО «АГРИ»,
S.V. Mashko,
Doct. Sci., Prof., Research Head of ZAO AGRI,
e-mail: sergey_mashko@agri.ru