

АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЦЕНТРАЛЬНЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПОТОКОВ В КЛЕТКАХ *Chlamydomonas reinhardtii* В УСЛОВИЯХ СЕРНОГО ГОЛОДАНИЯ

© 2017 г. Т.Ю. Плюснина, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин

Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12

E-mail: riznich@biophys.msu.ru

Поступила в редакцию 11.01.17 г.

Рассмотрена стехиометрическая модель, объединяющая реакции центрального метаболизма и электрон-транспортные процессы дыхания и первичных реакций фотосинтеза в растительной клетке. Реакции центрального метаболизма включают гликолиз, цикл Кальвина и цикл Кребса; они связаны с электрон-транспортными процессами через окислительно-восстановительные эквиваленты NAD(P)H. Модель задается алгебраическими уравнениями и включает правила, позволяющие описывать изменение направления метаболизма в зависимости от доступности разных источников углерода. Для верификации модели использованы экспериментальные данные об изменении отдельных клеточных метаболитов в процессе серного голодания водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Модель позволила обобщить имеющиеся представления о перенаправлении метаболических потоков в процессе серного голодания.

Ключевые слова: центральный метаболизм, метаболический поток, стехиометрическая модель, серное голодание.

В настоящее время большое внимание привлекает проблема получения биотоплива, в частности водорода, как продукта жизнедеятельности клеток водорослей. Экспериментальные и модельные исследования направлены на поиск условий, при которых происходит увеличение выделения водорода.

Известно, что клетки водоросли *C. reinhardtii*, растущие в условиях серного голодания, активно выделяют водород [1–4]. Характерными процессами, предшествующими выделению водорода, являются инактивация фотосистемы II и переход клеток водоросли *C. reinhardtii* на хлоропластное дыхание [5–7]. Ранее, используя кинетическую модель электронного транспорта в первичных процессах фотосинтеза [8], мы проанализировали механизм этих явлений. Анализ модели показал, что накопление восстановленных форм хинонов в процессе голодания может приводить к скачкообразной инактивации фотосистемы II с одновременным увеличением потока электронов в цепи хлоропластного дыхания. Это явление было описано в работах [5–7]. Выделение водорода в этих условиях происходит вследствие изменения направления электронных потоков при накоплении избыточных восстановленных форм переносчиков в цепи фотосинтеза [7,9,10]. Оно осуществляется в целях защиты фотосинтетическо-

го аппарата от окислительного стресса при образовании активных форм кислорода.

Актуальной задачей является исследование распределения метаболических потоков в условиях стресса, вызванного минеральным голоданием. Очевидно, что полученная в результате анализа модели информация о величинах и направлениях скоростей метаболических реакций в процессе голодания важна для оценки эффективности выделения водорода и накопления биомассы в целом.

Для изучения направления и соотношения активности метаболических путей в различных условиях роста широко используются так называемые потоковые или стехиометрические модели. Они построены на основе предположения о квазистационарном состоянии концентраций метаболитов в рассматриваемом диапазоне времени [11–13] и используют информацию о геноме организма и соответствующей структуре метаболических путей, организованных в виде баз данных [14,15]. Переменными в таких моделях являются *метаболические потоки*.

Одной из первых работ, где вводится понятие метаболического потока, является работа [16], где живая система представлена как некий объем, имеющий границу. Все изменения в системе происходят: 1) за счет транспортных потоков веществ (метаболитов) через границу;

2) за счет химических реакций в объеме. Метаболический поток, таким образом, является результатом метаболической реакции или группы метаболических реакций. В современных обзорах, посвященных анализу распределения метаболических потоков [17,18], величины потоков связаны с величинами отдельных скоростей реакций, в которых рассматриваемый метаболит образуется или расходуется.

Для большей ясности определим метаболический поток как химическую реакцию, в которой может происходить перераспределение атомов, например, углерода, между образующимися в ходе реакции молекулами, так что число атомов в молекуле субстрата может отличаться от числа атомов в молекулах продукта. При этом общее число атомов в закрытой системе остается постоянным. Такое перераспределение атомов в реакционном событии отражается в стехиометрических коэффициентах, определяющих относительное число молекул метаболитов, вступивших в реакционное событие на данном участке метаболического пути, и число молекул метаболитов, образованных в ходе этого реакционного события при условии сохранения общего числа атомов, участвующих в реакции. Для каждого метаболита можно записать уравнение баланса потоков метаболитов, направленных на его образование и распад со стехиометрическими коэффициентами, отражающими сохранение числа переносимых метаболитами элементов. В стационарном состоянии сумма всех потоков образования и распада рассматриваемого метаболита равна нулю, поэтому для построения потоковой модели достаточно знать лишь стехиометрические соотношения между этими метаболическими потоками в реакционном событии.

Хорошо развитый аппарат линейной алгебры, применяемый для решения таких задач, позволяет строить модели со сколь угодно большим числом метаболических потоков. В зависимости от поставленной задачи потоковая модель может включать либо максимально известное число метаболических реакций, вплоть до нескольких сотен [19–21], либо ограничиваться небольшим числом реакций, непосредственно принадлежащих изучаемому метаболическому пути [22–24]. Для оценки реальных величин метаболических потоков часто используются экспериментальные данные о распределении в метаболитах переносимого ими меченого углерода ^{13}C [25–27]. Все реакции обычно нормируются на один из входящих потоков, например приток глюкозы, переносимой углерод. Таким образом, изменяя именно этот входящий поток метаболита, можно получить серию последовательных стационарных распре-

делений всех остальных потоков метаболитов, переносимых данным элементом, решая соответствующие уравнения баланса.

В задачу данной работы входило построение упрощенной потоковой модели, включающей центральный метаболизм клеток водоросли *S. reinhardtii* и сопряженные с ним реакции фотосинтеза и выделения водорода и анализ перераспределения этих метаболических потоков в процессе серного голодания. К реакциям центральных метаболических путей относят катаболические пути – гликолиз, пентозофосфатный путь, противоположно направленные к ним анаболические пути – глюконеогенез, цикл Кальвина, а также цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса).

Как правило, конкретные условия роста культуры определяют преимущественное направление метаболизма, которое может изменяться при изменении внешних условий. Такие изменения обуславливаются сложной регуляцией экспрессии соответствующих генов. Это приводит к изменению активности регуляторных ферментов и, как следствие, к переключению метаболических потоков, т.е. к изменению направлений переноса элементов метаболитами.

Как известно, в кинетических моделях метаболических процессов такую регуляцию можно задать, если ввести, например, положительные или отрицательные обратные связи между продуктами и/или субстратами, влияющими на скорости соответствующих реакций. Однако в потоковых моделях рассматриваются лишь стационарные состояния, а сами модели представляют собой линейные алгебраические уравнения, где скорости реакций являются постоянными величинами. Поэтому такого рода регуляцию на основе обратных связей здесь задать невозможно.

Возникает вопрос, каким образом в стационарной модели можно отразить изменение направления переноса углерода при переключении с одного типа метаболизма на другой, например с гликолиза на глюконеогенез или с цикла Кальвина на пентозофосфатный путь, в ответ на изменение условий роста клеток. В работах [28,29] для описания такого рода регуляции метаболизма в потоковых моделях авторы используют логические правила по типу *if-then*, в соответствии с которыми считается, что в заданные периоды роста клетки часть реакций полностью «выключается» или «включается». Ясно, что такие правила справедливы лишь в предельных случаях, т.е. когда на самом деле либо реакция есть, либо ее нет. Для реализации таких моделей требуются специальные программные средства.

Мы предлагаем альтернативный способ отображения регуляции метаболических потоков, позволяющий описывать постепенное изменение направления потоков. В этом подходе объединяются метаболические пути, включающие одни и те же метаболиты, между которыми реакции могут протекать в разных направлениях, например гликолиз и глюконеогенез, и задаются дополнительные соотношения на входящие потоки, которые определяют условия «взаимодействия» потоков. Мы используем этот подход для анализа распределения метаболических потоков в клетке водоросли *C. reinhardtii* в процессе роста в условиях серного голодания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Упрощенные модели центральных метаболических путей. Для демонстрации предлагаемого подхода рассмотрим в качестве примера минимальную схему, отражающую изменения углеродного скелета метаболитов в центральных метаболических путях – гликолизе и глюконеогенезе (рис. 1).

В процессе гликолиза (рис. 1а) одна молекула глюкозы, содержащая шесть атомов углерода, превращается в одну молекулу шестиуглеродного сахара (реакция $V_{in\ 1}$), из которой затем образуются две молекулы трехуглеродного сахара (реакция V_+), которые далее утилизируются в последующем метаболизме (реакция $V_{out\ 1}$).

Обратный путь, глюконеогенез (рис. 1б), представляет реакции превращения пирувата в трехуглеродные сахара (реакция $V_{in\ 2}$) и последующие реакции образования шестиуглеродных сахаров (реакция V_-), которые затем также утилизируются в метаболизме (реакция $V_{out\ 2}$).

Назовем метаболиты, находящиеся в начале и конце метаболических путей – глюкозу и пируват – внешними, а метаболиты, претерпевающие изменения внутри пути – трех- (C_3) и шестиуглеродные (C_6) сахара – внутренними. Реакции, связывающие внешние и внутренние метаболиты, $V_{in\ 1,2}$ и $V_{out\ 1,2}$ соответственно, назовем внешними входящими и выходящими потоками, а реакции превращения внутренних метаболитов друг в друга V_+ и V_- – внутренними потоками. Объединим обе схемы в одну следующим образом (рис. 1в). Будем рассматривать внешние потоки $V_{in\ 1,2}$ и $V_{out\ 1,2}$ как отдельные реакции, имеющие только одно направление в соответствии с направлением метаболического пути. Внутренний поток V будем теперь рассматривать как результирующую суммарную реакцию, способную протекать как в прямом, так и в обратном направлениях.

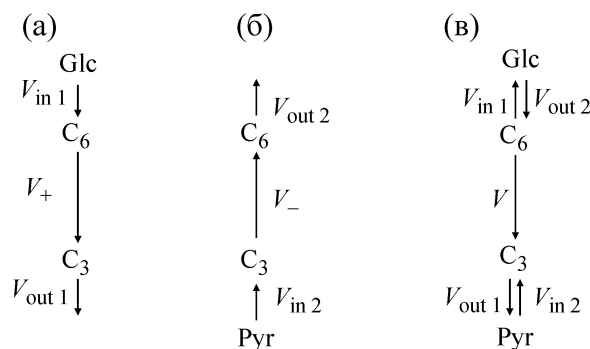


Рис. 1. Минимальные упрощенные схемы гликолиза и глюконеогенеза: (а) – направление реакций соответствует гликолизу; (б) – направление реакций соответствует глюконеогенезу; (в) – объединение гликолиза и глюконеогенеза в одну схему. Стрелки соответствуют результирующим суммарным реакциям превращения метаболитов, V_i – соответствующий метаболический поток. Обозначения: Glc – глюкоза, C_6 – шестиуглеродный сахар, C_3 – трехуглеродный сахар, Pyr – пируват.

Уравнения баланса для внутренних метаболитов C_6 и C_3 , в стационарном состоянии в соответствии со схемой (рис. 1в) и с учетом стехиометрических коэффициентов (из одной молекулы C_6 образуются две молекулы C_3) можно записать как:

$$\begin{aligned} C_6: V_{in\ 1} - V_{out\ 2} - V &= 0; \\ C_3: V_{in\ 2} - V_{out\ 1} + 2V &= 0. \end{aligned} \quad (1)$$

Здесь V – относительное количество молекул углерода, переносимых метаболитами на данном участке цепи в стационарных условиях при сохранении общего числа атомов в системе.

Полученная система алгебраических уравнений (1) представляет собой простейшую потоковую (стехиометрическую) модель, где переменными являются метаболические потоки V_i . Система уравнений (1) является недоопределенной, поскольку число переменных в ней больше, чем число уравнений, поэтому имеет бесконечное число решений. Однако распределение метаболических потоков (их величины и направление) в такой недоопределенной системе может быть найдено, если дополнительно поставить задачу оптимизации. Для этого нужно задать целевую функцию (как правило, это прирост биомассы либо увеличение продукции целевого метаболита), а также ввести дополнительные ограничения на величины потоков, исходя из существующих экспериментальных данных [11,12]. Другой способ получить единственное решение – доопределить систему, используя дополнительную информацию либо о величинах потоков, либо об их соотношениях. Именно этот подход будет использован в данной работе.

Таблица 1. Расчет величин потоков, показанных на рис. 1, при заданном изменении значений входящего потока $V_{in 1}$

$V_{in 1}$	V	$V_{in 2}$	$V_{out 1}$	$V_{out 2}$
1,0	1,0	0	2,0	0
0,75	0,5	0,5	1,5	0,25
0,5	0	1,0	1,0	0,5
0,25	-0,5	1,5	0,5	0,75
0	-1,0	2,0	0	1,0

Введем дополнительные соотношения между величинами входящих потоков в виде определенных правил. Они позволят, с одной стороны, описать переключения одного направления метаболизма на другое, а с другой – дадут возможность доопределить систему уравнений (1), решить ее и найти распределение потоков в системе в зависимости от величины входящего потока.

Составим линейную комбинацию уравнений системы (1) так, чтобы исключить внутренние потоки и оставить только входящие и выходящие потоки. Для этого умножим первое уравнение в системе (1) на 2 и сложим со вторым. Переносим по разные стороны равенства входящие и выходящие потоки, получим:

$$2V_{in 1} + V_{in 2} = V_{out 1} + 2V_{out 2}. \quad (2)$$

Уравнение (2) означает, что в стационарном состоянии сумма всех входящих потоков равна сумме всех выходящих потоков с учетом их стехиометрических коэффициентов.

Будем предполагать, что в течение периода роста сумма всех входящих потоков остается постоянной величиной. Сделанное предположение запишем в виде следующего соотношения:

$$2V_{in 1} + V_{in 2} = \text{const}. \quad (3)$$

Соотношение (3) определяет правило, согласно которому уменьшение в сумме одного из входящих потоков автоматически должно привести к увеличению другого.

Выберем для удобства расчетов $\text{const} = 2$ (величина константы может быть произвольной, поскольку в соответствии с уравнениями баланса все внутренние потоки будут рассчитываться как доли от входящих потоков).

$$2V_{in 1} + V_{in 2} = 2. \quad (4)$$

Полученное равенство постулирует, что построение углеродного скелета метаболитов может осуществляться за счет любого из доступных источников углерода, в данном примере – и за счет глюкозы, и за счет пирувата. В случае

истощения одного из источников будет происходить «переключение» на другой источник, обеспечивая таким образом постоянство суммарного выхода метаболитов. По отношению к направлению метаболических путей это означает, что будет происходить «переключение», например, с гликолиза на глюконеогенез.

Рассмотрим один из предельных случаев отсутствия какого-либо из источников углерода, например пирувата, когда $V_{in 2} = 0$ и одновременно $V_{out 2} = 0$. В этом случае направление всех потоков будет совпадать с направлением гликолиза. Тогда из уравнения (2) получим еще одно дополнительное соотношение:

$$2V_{in 1} = V_{out 1}. \quad (5)$$

Таким образом, уравнения баланса (1) и дополнительные соотношения (4) и (5) позволяют получить однозначное распределение потоков в зависимости от величины одного из входящих потоков, например, $V_{in 1}$:

$$\begin{aligned} V &= 2V_{in 1} - 1, & V_{in 2} &= -2V_{in 1} + 2, \\ V_{out 1} &= 2V_{in 1}, & V_{out 2} &= 1 - V_{in 1}. \end{aligned}$$

Задавая значения притока углерода от глюкозы $V_{in 1}$ от максимального до минимального, можно рассчитать, как при этом меняются и все остальные потоки (табл. 1).

Сопоставляя значения таблицы со схемой, получим наглядное представление возможных распределений потоков в зависимости от величины $V_{in 1}$ (рис. 2).

Из расчетов видно, что уменьшение притока глюкозы $V_{in 1}$ от 1 до 0 сопровождается увеличением притока пирувата $V_{in 2}$ от 0 до 2, что и приводит к постепенному изменению направления внутреннего потока V , его величина меняется от 1 до -1, Иными словами, при этом и происходит переключение гликолиза на глюконеогенез.

Рассмотрим еще один пример упрощенной схемы, позволяющий качественно описать некоторые экспериментальные данные. На рис. 3 представлена минимальная схема, объединяющая гликолиз и цикл Кальвина.

Гликолиз представлен теми же реакциями, что и в предыдущем примере. Соответствующие входящий, внутренний и выходящий потоки на схеме: $V_{in 1}$, V_1 , $V_{out 1}$. Упрощенный цикл Кальвина включает реакцию фиксации CO_2 (реакция $V_{in 2}$), в которой происходит карбоксилирование пятиуглеродного сахара C_5 . В результате образуются две молекулы трехуглеродного сахара C_3 . Известно, что для образования одной молекулы глюкозы требуется шесть молекул CO_2 , тогда суммарно для реакции $V_{in 2}$ можно записать: $6\text{C}_5 + 6\text{CO}_2 = 12\text{C}_3$. Далее половина

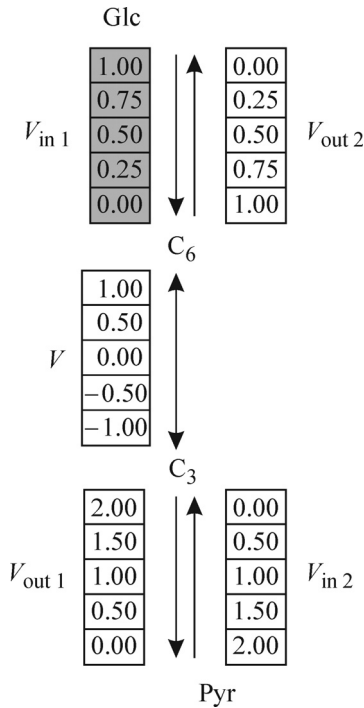


Рис. 2. Распределение потоков в зависимости от величины $V_{in 1}$. Серый столбик – заданные значения $V_{in 1}$, светлые столбики – рассчитанные величины соответствующих потоков. Номер ячейки соответствует каждому конкретному расчету.

молекул C_3 в реакции V_1 идет на образование шестиуглеродного сахара C_6 : $6C_3 = 3C_6$, другая половина молекул C_3 участвует в реакции V_2 и вновь возвращается в цикл. Кроме того, две из образовавшихся в реакции V_1 молекул шестиуглеродного сахара C_6 также уходят в цикл в реакции V_2 : $6C_3 + 2C_6 = 6C_5$. Из оставшейся одной молекулы шестиуглеродного сахара C_6 в реакции $V_{out 2}$ образуется одна молекула глюкозы Glc: $C_6 = Glc$. Таким образом, представленный упрощенный цикл Кальвина сохраняет стехиометрические соотношения между реакциями полного цикла: для образования одной молекулы глюкозы требуется шесть оборотов цикла Кальвина с общей фиксацией шести молекул CO_2 .

Выберем в качестве положительного направления для внутренних потоков направление против часовой стрелки. Уравнения баланса для внутренних метаболитов с учетом стехиометрических коэффициентов будут иметь вид:

$$\begin{aligned} C_6: V_{in 1} - V_2 + V_1 - V_{out 2} &= 0, \\ C_3: 2V_{in 2} - 2V_1 - 3V_2 - V_{out 1} &= 0, \quad C_5: 3V_2 - V_{in 2} = 0. \end{aligned} \quad (6)$$

Как и в предыдущем примере, составим линейную комбинацию так, чтобы исключить внутренние потоки – умножим первое уравне-

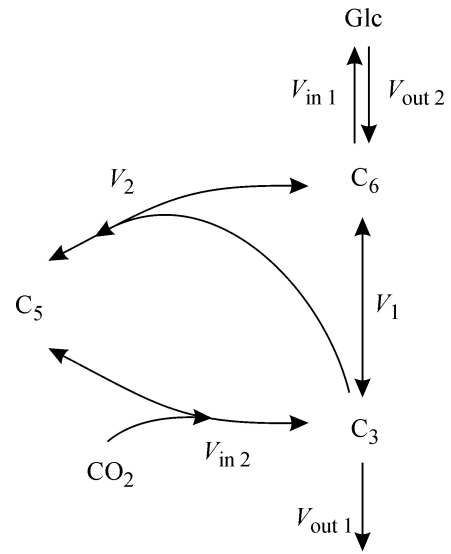


Рис. 3. Минимальная упрощенная схема, объединяющая гликолиз и цикл Кальвина. Обозначения: Glc – глюкоза, C_6 – шестиуглеродный сахар, C_5 – пятиуглеродный сахар, C_3 – трехуглеродный сахар.

ние на 6, второе на 3, третье – на 5 и, складывая их, получим равенство сумм входящих и выходящих потоков:

$$6V_{in 1} + V_{in 2} = 6V_{out 2} + 3V_{out 1}. \quad (7)$$

Вновь будем предполагать, что сумма всех входящих потоков является постоянной величиной, взятой в этом примере для удобства равной шести.

$$6V_{in 1} + V_{in 2} = 6. \quad (8)$$

Рассматривая один из предельных случаев, когда один из путей, например гликолиз, не работает, $V_{in 1} = 0$, $V_{out 1} = 0$, получим еще одно дополнительное соотношение:

$$V_{in 2} = 6V_{out 2}. \quad (9)$$

Таким образом, уравнения баланса (6) и дополнительные соотношения (8) и (9) вновь позволяют выразить все потоки через один входящий поток, например, $V_{in 2}$:

$$\begin{aligned} V_1 &= 2/3V_{in 2} - 1, \quad V_2 = 1/3V_{in 2}, \quad V_{in 1} = -1/6V_{in 2} + 1, \\ V_{out 1} &= -1/3V_{in 2} + 2, \quad V_{out 2} = 1/6V_{in 2}. \end{aligned}$$

Задавая изменение $V_{in 2}$, получим возможные распределения остальных потоков (рис. 4а.). Будем считать, что каждое значение $V_{in 2}$ соответствует некоему моменту времени, в частности, значение в верхней ячейке – нулевому, а все, находящиеся ниже, получены через равные интервалы времени. Тогда ряд величин, полученный для каждого потока, будет отра-

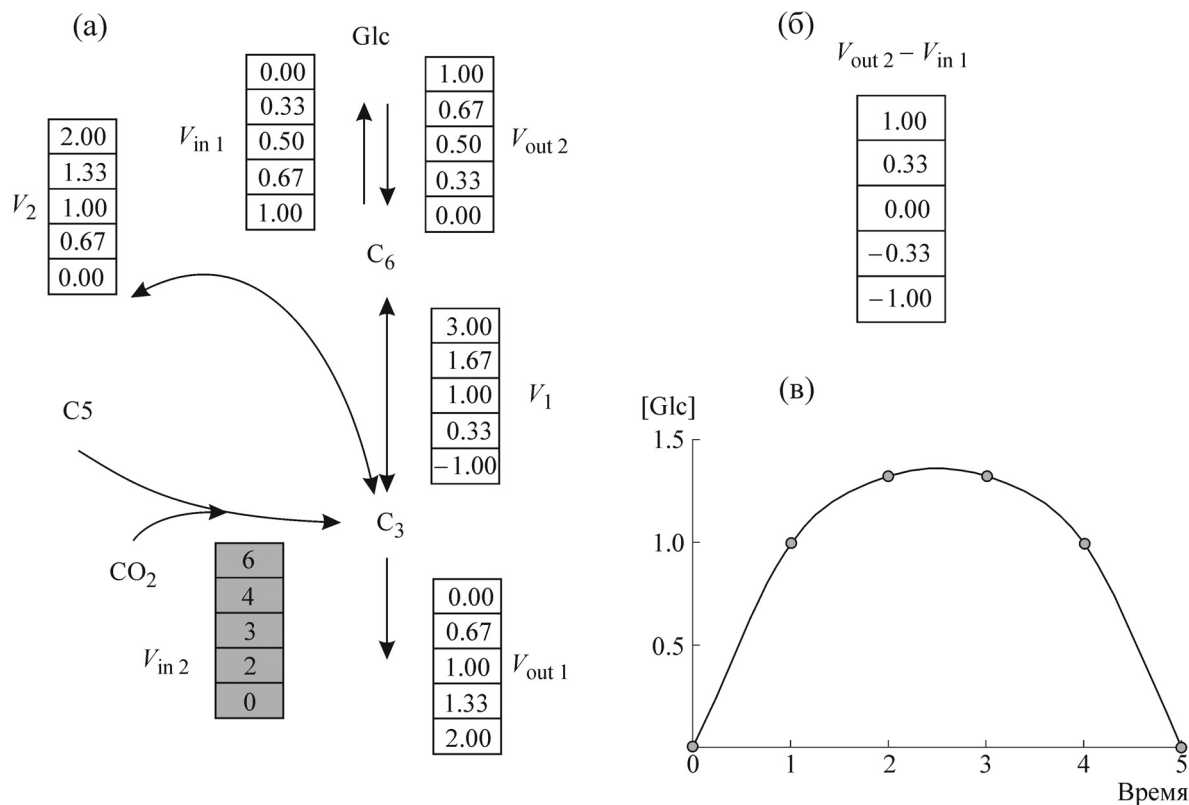


Рис. 4. (а) – Распределение потоков для минимальной упрощенной объединенной схемы цикла Кальвина и гликолиза в зависимости от изменения величины $V_{in 2}$. Серый столбик – заданные значения, светлые столбики – результаты расчета. (б) – Расчет изменения скорости накопления глюкозы (крахмала) ($V_{out 2} - V_{in 1}$) в зависимости от инактивации Рубиско (изменения $V_{in 2}$). (в) – Накопление и расход глюкозы (крахмала) с течением времени при инактивации Рубиско. Обозначения: Glc – глюкоза, C₆ – шестиуглеродный сахар, C₅ – пятиуглеродный сахар, C₃ – трехуглеродный сахар.

жать динамику изменения этого потока. Интегрирование такого ряда по времени позволяет оценить изменение концентрации метаболита во времени за счет соответствующего потока.

Расчет потоков позволяет оценить скорость накопления глюкозы и, соответственно, крахмала как разность двух потоков: $V_{out 2} - V_{in 1}$ (рис. 4б). Интегрируя скорость накопления глюкозы (крахмала), получим изменение концентрации глюкозы (крахмала) (рис. 4в). Из расчетов видно, что в процессе уменьшения фиксации CO₂ поток, направленный на образование крахмала, сначала положителен, однако его величина уменьшается, затем становится отрицательной. Другими словами, по мере инактивации цикла Кальвина крахмал сначала накапливается, затем начинает расходоваться, при этом происходит постепенное переключение цикла Кальвина на гликолиз. Качественно подобные процессы – накопление и расход крахмала при инактивации Рубиско, катализирующего фиксацию CO₂, – соответствуют экспериментальным данным, полученным при серном голодании на клетках водоросли *C. reihardtii* [4].

Это позволяет считать, что сделанные в модели предположения о соотношении входных потоков действительно отражают феноменологию переходных процессов и могут использоваться в качестве дополнительных уравнений в потоковых (стехиометрических) моделях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Модель центральных метаболических путей с учетом электрон-транспортных путей фотосинтеза и дыхания. Далее рассмотренный подход был применен для построения более детальной потоковой модели, включающей не только центральные метаболические пути в клетках *C. reihardtii*, но и электрон-транспортные пути фотосинтеза и дыхания (рис. 5). Как и в рассмотренных примерах, мы объединили противоположно направленные пути в одну схему. Центральные метаболические пути схемы включают гликолиз, пентозофосфатный глюкогенез, цикл Кальвина, цикл Кребса.

Путь гликолиза представлен на схеме реакциями превращения глюкозы в трехуглеродные

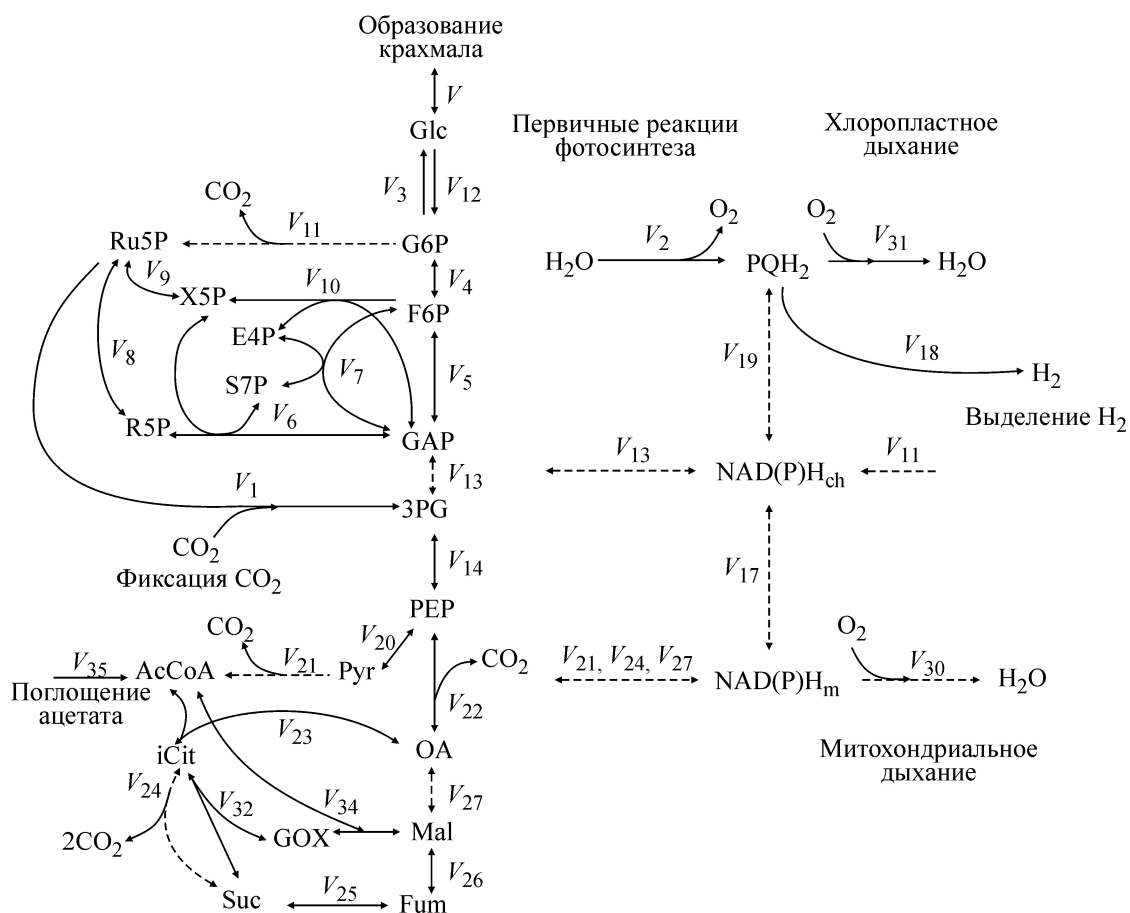


Рис. 5. Схема центральных метаболических путей, пути фотосинтеза, дыхания и образования водорода. Обозначения: Glc – глюкоза, G6P – глюкозо-6-фосфат, F6P – фруктозо-6-фосфат, GAP – глицеральдегид-3-фосфат, 3PG – 3-фосфоглицерат, Ru5P – рибулозо-5-фосфат, X5P – ксилулозо-5-фосфат, R5P – рибозо-5-фосфат, E4P – эритрозо-4-фосфат, S7P – седугептулозо-7-фосфат, PEP – фосфоенолпируват, Pyr – пируват, AcCoA – ацетил-коэнзим А, iCit – изоцитрат, GOX – глиоксилат, Suc – сукцинат, Mal – малат, Fum – фумарат, OA – оксалоацетат, NAD(P)H – никотинамидадениндинуклеотид(фосфат) восстановленный (индексы ch и m указывают на расположение молекул в хлоропластах или в митохондриях соответственно), PQH₂ – пластохинон восстановленный, CO₂ – углекислый газ, H₂ – водород, O₂ – кислород, H₂O – вода. V_i – реакции превращения одних метаболитов в другие (метаболические потоки). Пунктирные стрелки обозначают реакции, в которых происходит восстановление или окисление молекул NAD(P) и NAD(P)H. Односторонние стрелки указывают на протекание реакции только в одном направлении.

сахара глицеральдегид-3-фосфат и 3-фосфоглицерат (реакции V₃₋₅, V_{13,14}), путь гликогенеза – обратными реакциями синтеза шестиуглеродных сахаров фруктозо-6-фосфата и глюкозы из трехуглеродных. Пентозофосфатный путь и цикл Кальвина представлены реакциями трансформации углеродного скелета в пятиуглеродные сахара рибулозо-5-фосфат, ксилулозо-5-фосфат и рибозо-5-фосфат, четырехуглеродный эритрозо-4-фосфат и семиуглеродный седугептулозо-7-фосфат, сахара (реакции V₁, V₆₋₁₁, V₁₃). Разделение путей на гликолиз и пентозофосфатный путь (или на цикл Кальвина и глюконеогенез) достаточно условно, поскольку часть реакций входит в оба пути. Реакция V₁₁ объединяет две реакции окислительного декарбок-

силирования молекул глюкозо-6-фосфат с выделением двух молекул NADPH, присутствует только в пентозофосфатном пути и является необратимой. Реакция V₁ объединяет реакции образования рибулозо-дифосфата и фиксации CO₂, характерна только для цикла Кальвина и также является необратимой.

Электрон-транспортные пути включают восстановление пластохинона и NAD(P)H электронами от молекул воды в первичных реакциях фотосинтеза, обратный перенос электронов от NAD(P)H на пластохинон и молекулы воды в реакциях хлоропластного дыхания, а также реакции митохондриального дыхания.

Первичные процессы фотосинтеза представлены потоками электронов V₂ от молекул воды

к пластохинону через фотосистему II и далее на NAD(P)H через фотосистему I и ферредоксин (реакция V_{19}). Связь центральных метаболических путей и фотосинтетического пути осуществляется посредством NADH-дегидрогеназы (реакция V_{19} , протекающая в направлении, противоположном вышеописанному), катализирующей восстановление пластохинона в реакциях хлородыхания, которые активизируются в условиях серного голодания. Хлородыхание включает реакции восстановления пластохинона электронами от NADH-дегидрогеназы V_{19} и окисление пластидной терминальной оксидазой с поглощением кислорода (реакция V_{31}). Учтена также реакция образования водорода Fe-гидрогеназой (реакция V_{18}), которая активируется в бескислородной среде, когда становится невозможным окисление пластохинона.

Митохондриальное дыхание обобщенно представлено реакциями переноса электронов на кислород от молекул NAD(P)H (реакция V_{30}), образованными в цикле Кребса в суммарном потоке $V_{21} + V_{24} + V_{27}$.

На основе предложенной схемы (рис. 5) были записаны уравнения баланса с учетом стехиометрии реакций (см. Приложение). Поскольку для клеток *C. reinhardtii* питательной средой является ацетат, то построение углеродного скелета возможно тремя путями – в результате поглощения ацетата в цикле Кребса, в результате фиксации CO_2 в цикле Кальвина и в результате расщепления глюкозы в процессе гликолиза. Таким образом, схема имеет три входных потока: V_1 – фиксация CO_2 в цикле Кальвина, V_3 – поступление глюкозы, начальная реакция в гликолизе, V_{35} – поступление ацетата. Как и в рассмотренных выше примерах, будем искать такую линейную комбинацию уравнений баланса, чтобы остались только внешние потоки, и далее будем предполагать, что сумма всех входящих потоков является постоянной величиной. Сделанное предположение выражается в виде следующего соотношения:

$$2V_1 + 3V_{35} + 12V_3 = 12. \quad (10)$$

Соотношение (10) задает взаимодействие трех путей – цикла Кальвина, гликолиза и глюконеогенеза. Два входящих потока, V_1 и V_{35} , направлены на синтез сахаров, поток V_3 направлен на распад сахаров. Таким образом, из соотношения (10) следует, что уменьшение потоков на синтез сахаров приведет к увеличению потоков на их распад.

Рассматривая вновь один из предельных случаев, когда работает только один из трех путей, например цикл Кальвина, получим еще

одно дополнительное соотношение, связывающее внешние потоки цикла Кальвина:

$$12V_3 = 2V_{11} + 3V_{21}. \quad (11)$$

В качестве начального условия (контроль, 0 ч голодания) выберем величины потоков, соответствующие миксотрофному росту клеток *C. reinhardtii* на ацетате. Расщепления глюкозы нет, $V_3 = 0$, при этом скорости поглощения ацетата (V_{35}) и фиксации CO_2 (V_1) примерно равны, что с учетом стехиометрических соотношений (10) выражается как $2V_1 = 3V_{35} = 6$. В соответствии с основным уравнением фотосинтеза поток на восстановление пластохинона (V_2) должен быть в два раза больше, чем скорость фиксации CO_2 (V_1), т.е. $V_2 = 2V_1 = 6$. Скорости хлоропластного дыхания (V_{31}) и выделения водорода (V_{18}) равны нулю: $V_{31} = 0$, $V_{18} = 0$.

Окончательная система уравнений, описывающая распределение метаболических потоков в центральных метаболических путях, включает уравнения баланса для метаболитов, дополнительные соотношения между потоками и начальное условие. Такая система уравнений имеет единственное решение, соответствующее распределению метаболических потоков при выбранных начальных условиях.

Для того чтобы сопоставить результаты моделирования с реальными процессами, происходящими в клетках *Chlamidomonas reinhardtii* в условиях серного голодания, необходимы данные об изменении величин метаболических потоков в центральных метаболических путях в процессе серного голодания. Известные нам работы по исследованию метаболических процессов в клетках водоросли при наступлении серного голодания таких данных не содержат. Однако существующие экспериментальные данные о содержании метаболитов и об изменении активности ферментов позволяют оценить относительные величины внешних потоков в модели, если принять некоторые допущения. Так, в работе [4] приведены данные об изменении активностей фотосистемы II, Рубиско, Fe-гидрогеназы, а также о содержании кислорода в культуре, накоплении крахмала и выделении водорода в течение нескольких дней роста культуры клеток *Chlamidomonas reinhardtii* в условиях серного голодания. Активность фотосистемы II в работе [4] была оценена по отношению F_v/F_m – квантовому выходу первичных реакций фотосинтеза. Мы предположили, что скорость восстановления пула пластохинонов электронами с фотосистемы II (в модели поток V_2 , рис. 5) пропорциональна изменению F_v/F_m . Тогда данные об уменьшении активности фотосистемы II по дням в процессе серного голодания позво-

Таблица 2. Нормированные экспериментальные данные из работы [4] и соответствующие им потоки модели

Время голодания, ч	Фиксация CO ₂ , V ₁	Активность фотосистемы II, V ₂	Выделение водорода, V ₁₈	Накопление крахмала, V	Поглощение кислорода, V ₃₀
0	3,0	6,0	0	1,0	1,0
24	0,7	3,5	0,3	0,3	0,5
48	0,1	1,7	1,0	0	0,1
72	0	1,0	0,9	-0,1	0,1

ляют рассчитать соответствующее уменьшение потока V₂, по отношению к его начальной величине в первый день голодания. Содержание Рубиско в работе [4] определяли с помощью Вестерн-блот-анализа. Поскольку Рубиско является ферментом, катализирующим реакцию фиксации CO₂ (в модели поток V₁, рис. 5), мы, принимая во внимание, что в стандартные уравнения скоростей реакций по типу Михаэлиса-Ментен концентрации ферментов входят линейно, предположили, что изменение скорости фиксации CO₂ (V₁) будет пропорционально изменению содержания Рубиско. Аналогичные рассуждения были применены к оценке данных об изменении активности Fe-гидрогеназы, фермента, катализирующего образование водорода (в модели поток V₁₈, рис. 5). Данные о накоплении крахмала в процессе голодания [4] мы соотнесли со стационарной скоростью образования крахмала (в модели поток V, рис. 5). Чтобы оценить среднюю скорость, мы рассчитывали разность концентрации крахмала из двух последовательных измерений и делили ее на соответствующий интервал времени. Данные по изменению содержания кислорода в культуре клеток в работе [4] мы соотнесли со стационарной скоростью поглощения кислорода в результате дыхания (в модели поток V₃₀, рис. 5).

Таким образом, мы получили ряды численных значений для пяти внешних потоков модели – V, V₁, V₂, V₁₈, V₃₀, отражающие их изменение в течение четырех суток роста клеток *Chlamidomonas reinhardtii* в условиях серного голодания (табл. 2).

Построенная схема центральных метаболических потоков (рис. 5) и соответствующая ей система уравнений (см. Приложение), а также преобразованные экспериментальные данные (табл. 2) далее были использованы для анализа распределения метаболических потоков, изменения их величин и направлений в течение четырех суток роста клеток *C. reinhardtii* в условиях голодания по сере (рис. 6).

Для каждых суток голодания было найдено распределение метаболических потоков, характеризующее соответствующую стадию голодания. Рассчитанные изменения величин и на-

правлений некоторых потоков в процессе четырех суток голодания представлены на рис. 6.

Найденные распределения потоков показывают, что в первые 24 ч голодания (верхняя строчка в столбиках с величинами потоков) активно работает цикл Кальвина (V₁ = 3), метаболический поток превращения сахаров направлен на образование крахмала в результате фиксации CO₂ (V = 1), окислительные реакции пентозофосфатного пути «выключены» (V₁₁ = 0). Ацетат поглощается из среды (V₃₅ = 2). При этом в хлоропласте в первичных реакциях фотосинтеза идет интенсивное выделение кислорода (V₂ = 6). Поток электронов от воды полностью идет на восстановление молекул NADPH (V₁₉ = 6), которые идут в цикл Кальвина для синтеза крахмала. Одновременно в митохондриальной электрон-транспортной цепи идет активное дыхание (V₃₀ = 1).

На вторые сутки голодания (распределение потоков отражено во второй сверху строчке в столбиках с величинами потоков, рис. 6) активность Рубиско падает на 75% по отношению к его активности в первые сутки (V₁ = 0,7). Усиливаются потоки катаболических путей, появляется окислительная реакция пентозофосфатного пути (V₁₁ = 0,2), в которой образуется NADPH. Поток на синтез крахмала уменьшается, увеличивается его распад (V = 0,3). Поглощение ацетата немного увеличивается (V₃₅ = 2,2). Поток фотосинтетической ЭТЦ, направленный на восстановление NADPH, становится отрицательным (V₁₉ = -1,4), т.е. появляется обратный поток электронов, восстанавливающий пул пластохинонов. В совокупности с появлением потока, осуществляемого пластидной терминальной оксидазой, направленного на восстановление кислорода (V₃₁ = 4,6), это указывает на появление хлородыхания. Также, в соответствии с экспериментальными данными, наблюдается небольшое выделение водорода (V₁₈ = 0,3).

На третьи и четвертые сутки голодания активность Рубиско падает до нуля (V₁ = 0,1; 0), значительно снижается активность фотосистемы II, (V₂ = 1,7; 1). Поглощение ацетата из среды также немного снижается (V₃₅ = 1,9; 1,8).

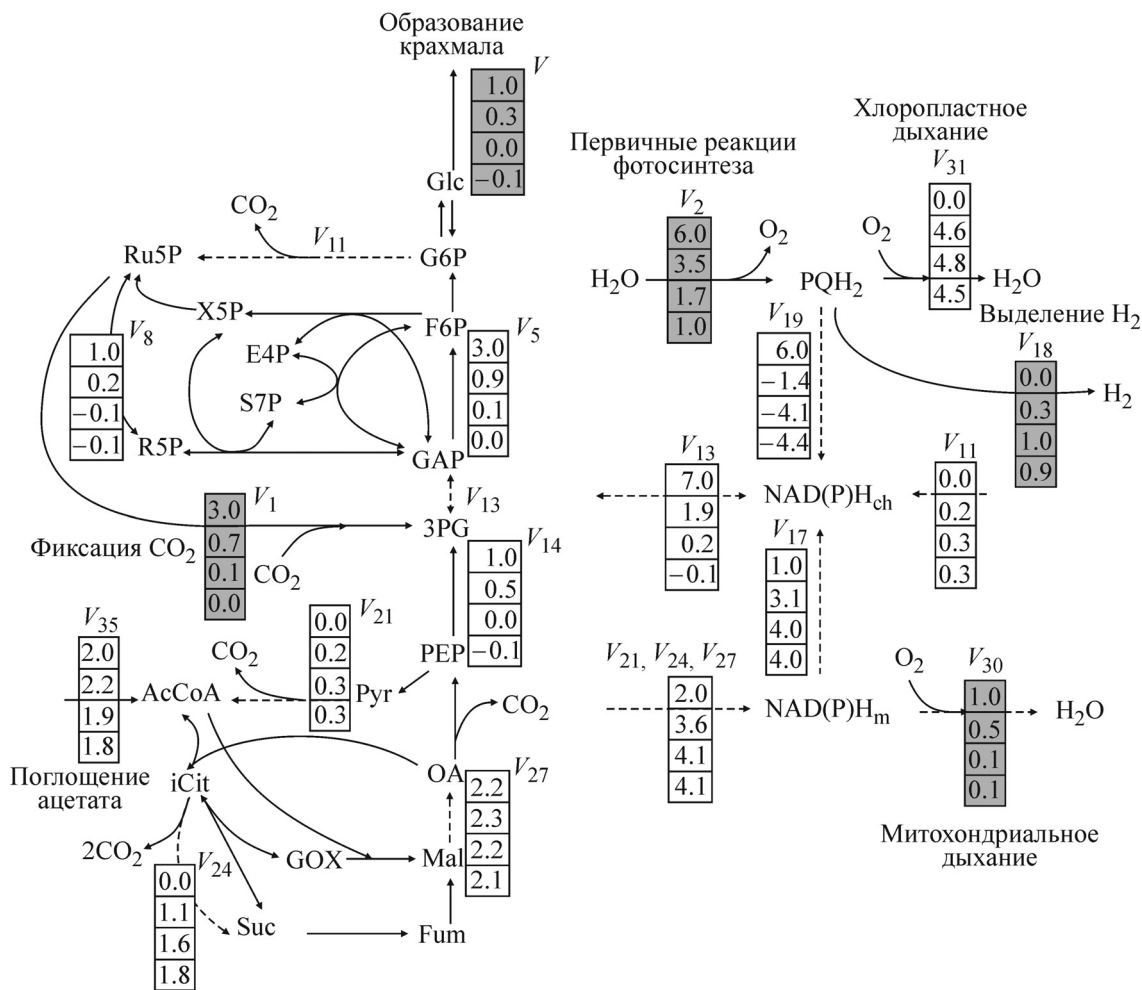


Рис. 6. Распределение метаболических потоков в течение четырех суток серного голодания. В столбиках указаны величины соответствующих метаболических потоков. Верхняя цифра в столбике соответствует началу голодания, нижеследующие цифры внутри столбика – значениям потоков через каждые 24 ч в течение 96 ч. Серые столбики – экспериментальные значения из табл. 1, светлые столбики – результаты модельного расчета. Положительные величины указывают на совпадение направление потока с направлением стрелки, отрицательные величины обозначают направление потока, противоположное направлению стрелки.

Образование крахмала тормозится, поток, направленный на синтез крахмала, сменяется на его распад ($V_0 = 0; -0,1$). Цикл Кальвина перенаправляется на гликолиз. Активизация гликолиза и пентозофосфатного пути приводит к еще большему увеличению образования NAD(P)H ($V_{11} = 0,3; 0,3$). Увеличение NAD(P)H происходит также в результате обращения реакций гликолиза ($V_{13} = 0,2; -0,1$). Это отражается в увеличении потока, направленного на восстановление пластохинона ($V_{19} = -4,1; -4,4$). Активность Fe-гидрогеназы достигает своего максимального уровня на третьи сутки и затем начинает немного снижаться, скорость выделения водорода и поток на хлородыхание также становятся максимальными на третьи сутки ($V_{18} = 1; 0,9, V_{31} = 4,8; 4,5$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ модели, отражающей распределения центральных метаболических потоков, сопряженных с потоками электронного транспорта на мембранах тилакоида и митохондрии в клетках водоросли *C.reinhardtii* в условиях серного голодания, позволяет предложить следующую последовательность изменений метаболических процессов в клетке в соответствии с используемыми экспериментальными данными [4].

В начале голодания, когда еще не активировались процессы деструкции, вызванные голоданием, и компенсирующие их процессы, активно работает фотосистема II и цикл Кальвина, что сопровождается накоплением крахмала. Далее недостаток серы начинает влиять на синтез белков, в первую очередь наиболее

чувствительных к недостатку серу. К таким белкам относится Рубиско, осуществляющий реакцию фиксации CO₂. Снижение активности Рубиско приводит к уменьшению метаболического потока с участием этого фермента и, как следствие, к постепенной инактивации цикла Кальвина. Далее начинают увеличиваться потоки обратных реакций, и происходит постепенное изменение направлений метаболических путей. Модель показывает, что направление метаболизма меняется с синтеза шестиуглеродных сахаров на их распад, т.е. с глюконеогенеза и цикла Кальвина на гликолиз и окислительный пентозофосфатный путь. Накопление крахмала достигает своего максимума и начинается его распад. В литературе существуют различные предположения о причинах усиления хлородыхания в процессе серного голодания. Предполагается, что такое усиление может происходить либо за счет образования NAD(P)H в гликолизе при расщеплении крахмала, либо за счет увеличения митохондриального NAD(P)H в результате инактивации дыхания [7]. Модель показывает, что в первые дни голодания увеличение хлородыхания происходит в основном за счет митохондриального NAD(P)H, и только на четвертые сутки голодания добавляется NAD(P)H, образующийся в гликолизе. Накопление NAD(P)H активирует пути хлородыхания на мембранах тилакоидов и выделение водорода, что позволяет клетке избежать окислительного стресса. Одновременная инактивация фотосистемы II приводит к уменьшению выделения кислорода кислородвыделяющим комплексом. Содержание кислорода в культуре клеток в результате дыхания уменьшается почти до нуля. Известно, что кислород является ингибитором гидрогеназы, катализирующей реакцию выделения водорода [30,31], поэтому следствием уменьшения концентрации кислорода является еще большая активация пути выделения водорода.

Несмотря на то что существуют данные о геноме и, соответственно, о полном наборе метаболических реакций, представленная модель не включает весь набор метаболических реакций. Нашей задачей было получить на относительно простой модели, включающей только потоки центрального метаболизма, представление об изменении направления протекания реакций в процессе голодания. Для этого мы ввели дополнительные стехиометрические соотношения на входящие потоки, позволяющие учесть переключения с одного источника углерода на другой при истощении какого-либо из них. Введенные соотношения в совокупности с оценкой изменения входящих потоков в процессе голодания, по экспериментальным дан-

ным, позволили получить распределение потоков и их перенаправление в процессе голодания и для всей схемы.

Построенная модель является довольно грубой, поскольку включает лишь относительно небольшое число метаболических потоков по сравнению с общим числом реакций в клетке. Однако использование экспериментальных данных, соответствующим внешним «входам» и «выходам» в модели, тем не менее, позволяет, на наш взгляд, получить качественную картину распределения внутренних метаболических потоков. Заданные величины «внешних» потоков модели (серые столбики на рис. 6) однозначно, в соответствии со стехиометрией, определяют распределение внутренних потоков (светлые столбики на рис. 6). Таким образом, зная «внешние» потоки, определенные из экспериментальных данных, можно рассчитать те изменения, которые претерпевают все остальные потоки. Предложенный в работе подход, учитывающий взаимодействие противоположно направленных метаболических путей, позволил прояснить постепенное взаимосвязанное перераспределение метаболических потоков в процессе роста клеток *C. reinhardtii* в условиях серного голодания.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Уравнения баланса для каждого метаболита модели центрального метаболизма, сопряженной с первичными реакциями фотосинтеза

Glc	$V - V_3 + V_{12} = 0$
G6P	$-V_{12} + V_3 - V_{11} + V_4 = 0$
F6P	$-V_4 - V_{10} - V_7 + V_5 = 0$
GAP	$-2V_5 - V_{10} - V_6 + V_7 + V_{13} = 0$
Ru5P	$V_{11} + V_8 + V_9 - V_1 = 0$
3PG	$-V_{13} + 2V_1 + V_{14} = 0$
R5P	$-V_8 + V_6 = 0$
X5P	$-V_9 + V_{10} + V_6 = 0$
E4P	$-V_7 + V_{10} = 0$
S7P	$-V_6 + V_7 = 0$
PEP	$V_{22} - V_{14} - V_{20} = 0$
Pyr	$V_{20} - V_{21} = 0$
AcCoA	$V_{21} - V_{23} - V_{34} + V_{35} = 0$
OA	$V_{27} - V_{23} - V_{22} = 0$
iCit	$V_{23} - V_{24} - V_{32} = 0$
Suc	$V_{32} - V_{25} = 0$
Fum	$V_{25} - V_{26} = 0$
Mal	$V_{26} - V_{27} + V_{34} = 0$
GOX	$V_{32} - V_{34} = 0$

PQH2	$V_2 - V_{19} - V_{18} - V_{31} = 0$
NAD(P)H _m	$V_{21} + V_{24} + V_{27} - V_{17} - V_{30} = 0$
NAD(P)H _{ch}	$V_{17} + V_{11} + V_{19} - V_{13} = 0$

Дополнительные уравнения для описания взаимодействия путей:

$$2V_1 + 3V_{35} + 12V_3 = 12, \quad 12V_3 = 2V_{11} + 3V_{21}.$$

Дополнительные уравнения для точек разветвления метаболических путей:

$$V_{11} = 0,5V_3, \quad V_{23} = 0,5V_{27}.$$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. D. Wykoff, J. P. Davies, A. Melis, et al., *Plant Physiol.* **117**, 129 (1998).
2. A. Melis, L. Zhang, M. Forestier, et al., *Plant Physiol.* **122**, 127 (2000).
3. M. L. Ghirardi, L. Zhang, J. W. Lee, et al., *Trends Biotechnol.* **18**, 506 (2000).
4. L. Zhang, T. Happe and A. Melis, *Planta* **214**, 552 (2002).
5. T. K. Antal, T. E. Krendeleva, T. V. Laurinavichene, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1607**, 153 (2003).
6. A. A. Volgusheva, V. E. Zagidullin, T. K. Antal, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 559 (2007).
7. T. K. Antal, T. E. Krendeleva, and A. B. Rubin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 3 (2011).
8. Т. Ю. Плюснина, Г. Ю. Ризниченко и А. Б. Рубин, *Физиология растений* **60**, (4) 549 (2013).
9. G. Peltier, D. Tolleter, E. Billon, et al., *Photosynth Res.*, **106**, 19 (2010).
10. T. K. Antal, D. N. Matorin, G. P. Kukarskikh, et al., *Int. J. Hydrogen Energy* **39**, 18194 (2014).
11. E. Murabito, E. Simeonidis, K. Smallbone, et al., *J. Theor. Biol.* **260**, 445 (2009).
12. A. Varma and B. O. Palsson, *Nature Biotechnol.* **12**, 994 (1994).
13. J. S. Edwards, M. Covert, and B. Palsson, *Environ. Microbiol.* **4**, 133 (2002).
14. <http://biocyc.org>.
15. <http://www.brenda.uni-koeln.de>.
16. J. A. Roels, *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 2457 (1980).
17. E. Simeonidis and N. D. Price, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 327 (2015).
18. N. R. Boyle, A. A. Shastri, and J. A. Morgan, in *Plant Metabolic Networks*, Ed. by J. Schwender (Springer, New York, 2009), pp. 211–243.
19. R. B. Nanette and J. A. Morgan, *BMC Systems Biol.* **3**, 4 (2009).
20. C. Wu, W. Xiong, J. Dai, and Q. Wu, *Plant Physiol.* **167**, 586 (2015).
21. J. Nogales, S. Gudmundsson, E. M. Knight, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 2678 (2012).
22. J. J. Vallino and G. Stephanopoulos, *Biotechnol. Prog.* **10**, 327 (1994).
23. C. Yang, Q. Hua, and K. Shimizu, *Metabolic Eng.* **4**, 202 (2002).
24. G. B. Nyberg, R. R. Balcarcel, B. D. Follstad, et al., *Biotechnol. Bioeng.* **62**, 324 (1999).
25. A. Marx, A. A. de Graaf, W. Wiechert, et al., *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 111 (1996).
26. C. Zupke and G. Stephanopoulos, *Biotechnol. Bioeng.* **45**, 292 (1995).
27. K. Schmidt, A. Marx, A. A. de Graaf, et al., *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 254 (1998).
28. M. W. Covert, C. H. Schilling, and B. Palsson, *J. Theor. Biol.* **213**, 73 (2001).
29. M. W. Covert, N. Xiao, T. J. Chen, et al., *Bioinformatics* **24** (18), 2044 (2008).
30. M. Forestier, P. King, L. Zhang, et al., *Eur. J. Biochem.* **270**, 2750 (2003).
31. M. C. Posewitz, P. W. King, S. L. Smolinski, et al., *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 102 (2005).

Flux Analysis of Central Metabolic Pathways in *Chlamydomonas reinhardtii* Cells under Sulfur Deprivation

T.Yu. Plyusnina, G.Yu. Riznichenko, and A. B. Rubin

Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

The stoichiometric model that combines central metabolic pathways, electron transport chain of the respiration and primary reactions of photosynthesis in the plant cell is considered. The central metabolic pathways are: glycolysis, the Calvin cycle, the Krebs's cycle; these pathways are related to the electron transport processes through reducing equivalents such as NAD(P)H. The model is defined by algebraic equations and includes rules to describe the change of direction in the metabolic flow, depending on the availability of different carbon sources. For verification of the model experimental data on evolution of the metabolic flux distribution in *Chlamydomonas reinhardtii* cells under sulfur starvation were used. This model summarizes existing ideas about redirecting metabolic fluxes in the process of sulfur starvation.

Key words: central metabolism, metabolic flux, stoichiometric model, sulfur starvation