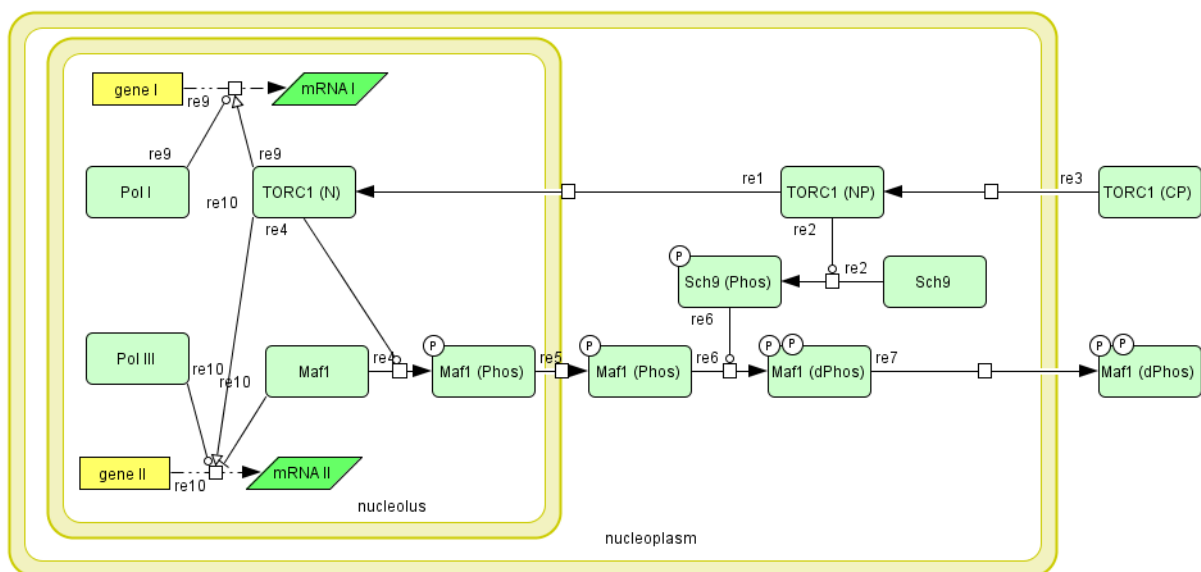


# Skrypt do ćwiczeń z przedmiotu Biologia Systemów

Małgorzata Adamczyk



# Wprowadzenie

Modelowanie i symulacje komputerowe są integralnym elementem badań związanych z analizą złożonych systemów biologicznych. Użyteczność stosowania podejścia biologii systemowej w bioinżynierii, w oparciu o modele ODE oraz na poziomie komórkowym, w skali genomowej, jest udowodniona licznymi publikacjami. Rozwój metod związanych z analizą *in silico* przyczynił się do licznych aplikacji w sektorze biotechnologii (optymalizacji procesów fermentacji z użyciem mikroorganizmów, otrzymywania bio-produktów), farmakologii (toksykologii systemowej, analizie gospodarz-patogen, modelowaniu epidemii chorób zakaźnych z użyciem danych epidemiologicznych) oraz w spersonalizowanej medycynie systemowej (w celu identyfikacji osobniczych przyczyn skutków ubocznych stosowania leków).

Skrypt został przygotowany, jako materiał pomocniczy i uzupełniający do cyklu wykładów w ramach przedmiotu Biologia Systemów, który mam przyjemność prowadzić dla studentów II stopnia na kierunku Biotechnologia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej.

Materiał umożliwia studentom zdobycie wiedzy o programach komputerowych, szeroko stosowanych w analizie systemowej i ich zastosowaniu w modelowaniu systemów biologicznych od procesów komórkowych zachodzących u drożdży *S.cerevisiae*, *Neurospora crassa* i bakterii mlekowych *L.lactis*, do złożonych oddziaływań zachodzących w sieciach metabolicznych i regulacji genów, zachodzących w komórkach eukariotycznych na przykładzie makrofaga i hepatocytu.

Małgorzata Adamczyk

# Ćwiczenie 1.

## CellDesigner4.4

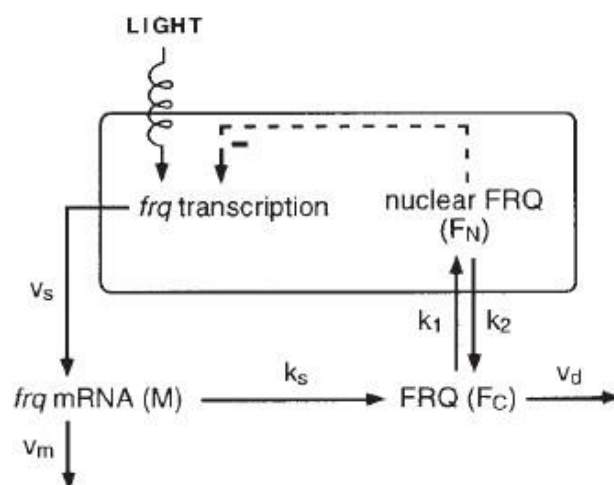
Ćwiczenie ma na celu zapoznanie się z oprogramowaniem CellDesigner, zdobycie doświadczenia w tworzeniu diagramów SBGN. Gdy diagram będzie gotowy, dodamy do niego równania szybkości reakcji. Dzięki temu ze statycznego modelu uzyskamy model dynamiczny oraz przeprowadzimy symulacje.

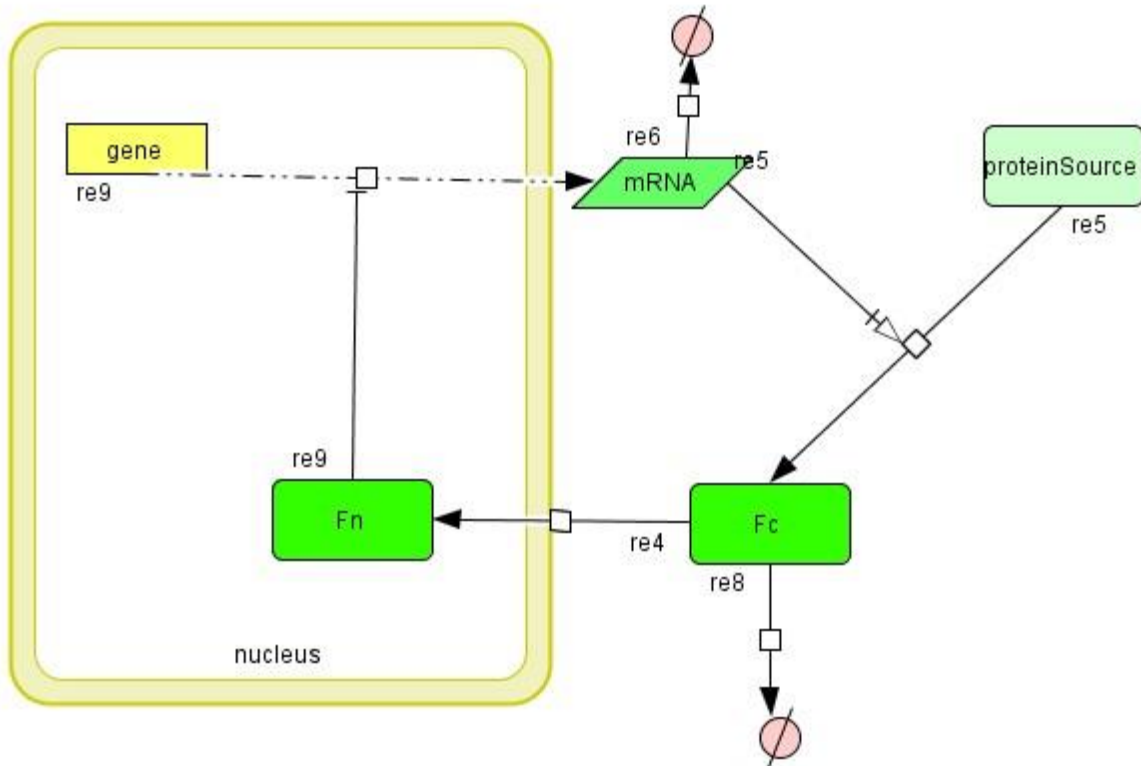
Program CellDesigner pozwala na rysowanie zaawansowanych modeli w postaci graficznej. W programie znajduje się edytor służący do rysowania diagramów z bogatą bazą zawierającą paletę symboli graficznych, które odpowiadają różnego rodzaju cząsteczkom biologicznym, takim jak białka, receptory, metabolity, kanały jonowe i wiele innych. Istnieje możliwość modyfikowania symboli w taki sposób, aby oznaczały formy modyfikacji PTS (postranslacyjnych). Program zawiera również makra oznaczające specyficzne procesy komórkowe, takie jak transport, inhibicja i aktywacja.

1. Instalacja oprogramowania
2. Przykładowy model 1
3. Utworzenie nowego modelu
  - Rysowanie różnych rodzajów cząsteczek (species)
  - Rysowanie reakcji
  - Makra
  - Format SBGN-PD
  - Identyfikacja/rozróżnienie cząsteczek o tym samym kształcie
4. Wprowadzanie równań szybkości reakcji
  - Opis równania
  - Wprowadzenie równań w programie
5. Przeprowadzenie symulacji
  - Symulacja i skan parametrów
6. Importowanie modeli z baz danych

### 1. Przykładowy model 1

Model 1 jest serią reakcji opisujących cykl dobowy *Neurospora* (Leloupe *et al.* 1996).

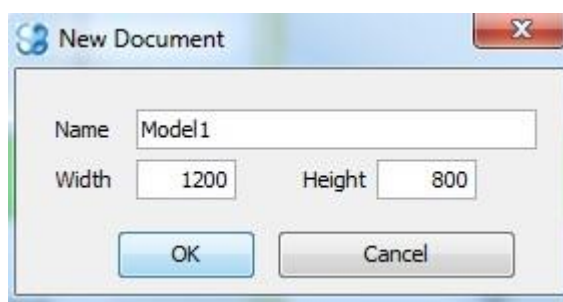




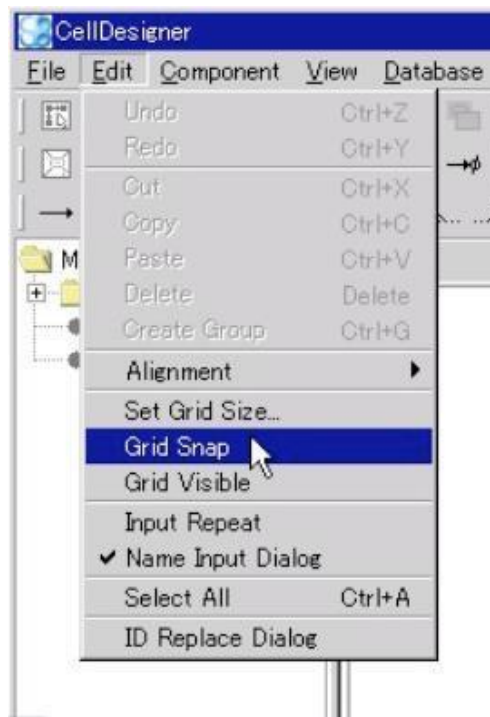
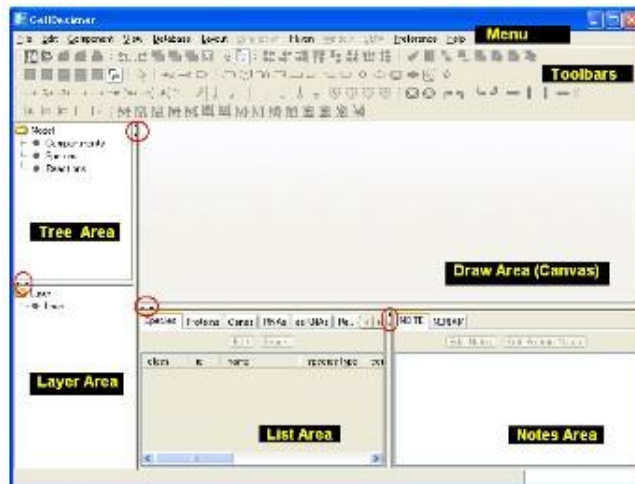
Model opisuje negatywne sprzężenie zwrotne między genem FRQ, a białkiem, kodowanym przez ten gen. Transkrypcja genu FRQ jest wzmożona przez światło dzienne. Białko FREQ jest transportowane do jądra komórkowego gdzie pełni funkcję negatywnego regulatora własnego genu. Proszę zauważyć, że nawet jeśli mamy do czynienia z jedną cząsteczką białka, to występuje ona w różnych kompartmentach komórkowych (jądro komórkowe i cytoplazma) i jest przedstawiona w postaci oddzielnych ikon Fn i Fc.

## 2. Utwórz nowy plik.

1. Idź do **File- New** i wybierz **New Document**. Ustal szerokość 1200 i wysokość 800 pikseli. Nadaj dokumentowi nazwę Model 1. Potwierdź przez naciśnięcie OK.

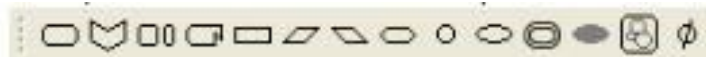


Pojawi się puste okno dialogowe z nazwą pliku. Każdy region okna ma określoną funkcję. **Draw Area** (Canvas) służy do rysowania.



Wybierz opcję przyciągania do siatki **Grid Snap**, co ułatwi rozmieszczenie ikon.

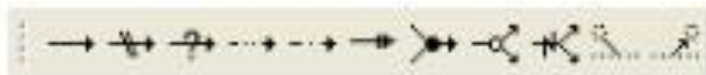
2. Z menu **Species Toolbar** wybierz ikony oznaczające poszczególne cząsteczki i narysuj w oknie dialogowym. Kliknij w pozycji, w której chcesz, żeby pojawił się symbol nazywany **SpeciesAlias**.

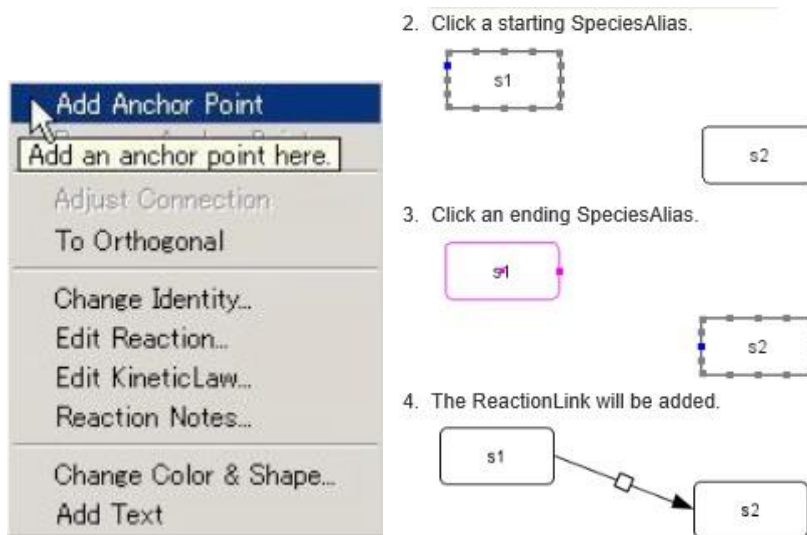


3. Narysuj reakcję. Reakcja może zostać zapisana w postaci strzałki między istniejącymi **SpeciesAlias**. Najpierw kliknij na cząsteczkę "substratu", a następnie "produktu".

Niebieskie kwadraty na obrysie ikon pokazują gdzie zostanie utworzone połączenie.

Wybierz ikonę reakcji z **Reaction Toolbar**.





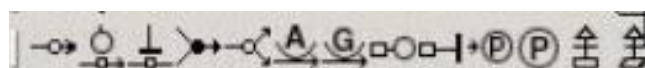
Aby narysować przedział komórkowy wybierz z menu ikonę **[compartment]**.



Przecignij kursor i zaznacz obszar, który chcesz wydzielić. Nadaj mu nazwę.

#### 4. Makra

Oprogramowanie zawiera paletę wzorów różnych zjawisk biologicznych np. fosforylacji, dimeryzacji, tworzenia kompleksu.



5. Każda cząsteczka utworzona na ekranie będzie traktowana jako wyjątkowa, to jest, będzie posiadała numer ID. Kopiowanie i wklejanie obiektów prowadzi do powstania identycznych obiektów (z perspektywy modelowania), tj. w formie SBGN ikona, w ten sposób powstała, będzie posiadała oznaczenie **clone marker**. Jeśli chcesz utworzyć odrębny obiekt poprzez kopiowanie istniejącego naciśnij dwukrotnie na ikonę i w oknie dialogowym "protein" wybierz z listy opcję (np. duplikat istniejącego obiektu), lub nadaj nowy ID (nazwij ikonę).

### 3. Wprowadzanie równań szybkości reakcji

1. Publikacja Leloup i współ. opisuje kinetykę systemu posługując się trzema równaniami, które charakteryzują szybkości zmiany trzech komponentów systemu, to jest: mRNA, cytoplazmatycznego FREQ(Fc) i jądrowego FREQ (Fn).

$$\frac{dM}{dt} = vs + \frac{K^n}{Ki^n + FN^n} - vm \frac{M}{Km + M}$$

Reakcja przedstawiona powyżej opisuje przemiany związane z mRNA (M), które zakładają syntezę (box pojedyncza linia) i degradacji mRNA (box podwójna linia).

1.  $V_s$ , szybkość transkrypcji
2.  $n$ , współczynnik Hilla, który opisuje kooperatywne wiązanie represora  $F_n$
3.  $K_i$ , próg powyżej którego dochodzi do represji
4.  $V_m$ , szybkość degradacji mRNA
5.  $K_m$ , stała Michaelisa dla reakcji degradacji mRNA

$$\frac{dF_c}{dt} = k_s M - v_d \frac{F_c}{K_d + F_c} - k_1 F_c + k_2 F_n$$

1.  $K_s$ , szybkość translacji
2.  $V_d$ , szybkość degradacji białka
3.  $K_d$ , stała Michaelisa dla reakcji degradacji
4.  $k_1$ , szybkość akumulacji  $F_c$  w jądrze
5.  $k_2$ , szybkość akumulacji w cytoplazmie

$$\frac{dF_n}{dt} = k_1 F_c - k_2 F_n$$

Ostatnie równanie przedstawia zachowanie białka  $F_n$  w czasie, które jest zależne od eksportu i importu jądrowego (opisane parametrem  $k_1$  i  $k_2$ ).

2. Aby dodać równania na diagramie wprowadź do system wszystkie parametry kinetyczne i uzupełnij o wartości podane w poniższej tabeli.

Nazwa	wartość
$V_s$	1.6
$K_i$	1.0
$n$	4.0
$V_m$	0.505
$K_m$	0.5
$K_s$	0.5
$V_d$	1.4
$K_d$	0.13
$k_1$	0.5
$k_2$	0.6

Następnie należy rozdzielić równania, tak żeby można było dodać prawo kinetyczne w każdej reakcji dodając identyfikator dla syntezy i reakcji degradacji.

Aby dodać równania, należy wybrać glif (symbol kwadratu łączący ikonę substratu i produktu) i w menu wybrać opcję **“Edit Kinetic law”**. W oknie dialogowym wybierz **“non predefined function”**.

Wzory mają następujący format:

(należy zwrócić uwagę na spacje i wielość liter)

**Gene -> RNA:**  $V_s * \text{pow}(K_i, n) / (\text{pow}(K_i, n) + \text{pow}(s_{15}, n))$

**Degradation of RNA:**  $V_m * s_3 / (K_m + s_3)$

**Protein synthesis:**  $K_s * s_3$

**Protein degradation:**  $V_d * s_2 / (K_d + s_2)$

**Protein import to nucleus:**  $k_1 * s_2 - k_2 * s_{15}$

(W powyższych wzorach, s3 = RNA, s2 = Fc, s15 = Fn. Przyporządkowane w programie nazwy poszczególnych reaktantów mogą mieć inne niż w skrypcie oznaczenia, ze względu na to, że CellDesigner przyporządkowuje reaktantom ID zgodnie z kolejnością wprowadzania wzorów).

math

$$V_s * \text{pow}(K_i, n) / (\text{pow}(K_i, n) + \text{pow}(s_1, n))$$

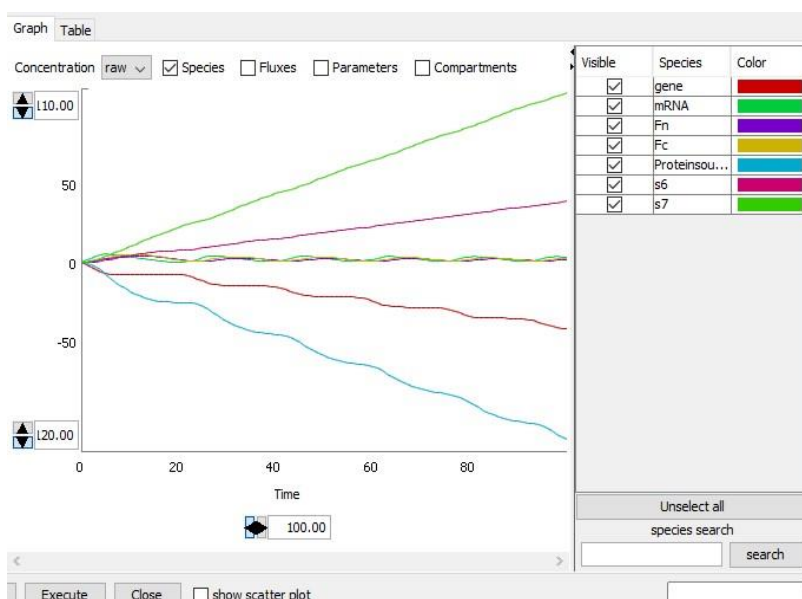
Selected Reaction

Defined Functions

class	id	name	speciesType	compar...	position...	included	quantit..
GENE	s1	gene		c1	inside		Amount
PROTEIN	s2	Fc		default	inside		Amount

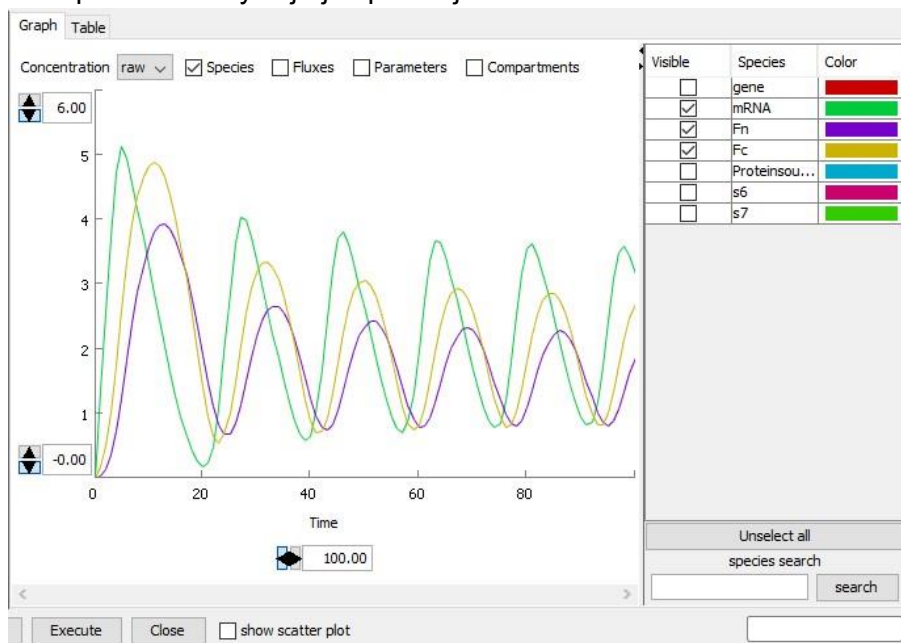
#### 4. Przeprowadzenie symulacji

Wybierz komendę **Simulation -> Control panel**, ustaw czas symulacji 100 i zatwierdź przez kliknięcie ikony **Execute**. Na ekranie powinien pojawić się wykres jak poniżej.





Zmień skalę na wykresie od 0 do 10, a na liście reaktantów pozostaw tylko mRNA, Fc i Fn. Wykres powinien pokazać oscylacje jak poniżej.

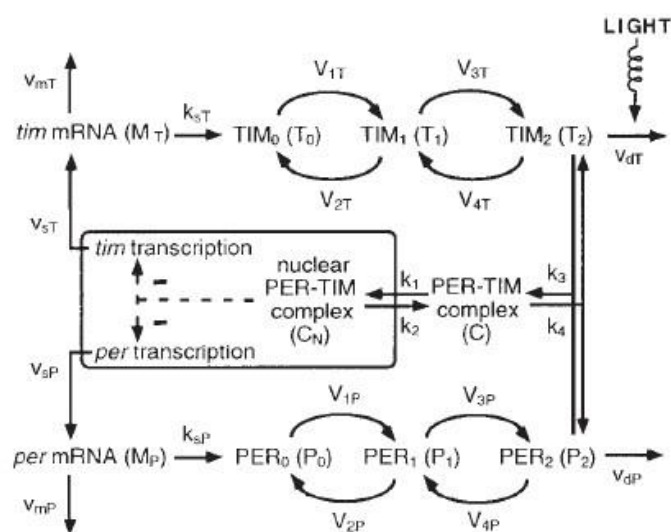


Przeprowadź podobną analizę zmieniając uprzednio wartości dla parametrów w modelu. CellDesigner umożliwia również automatyczny skan parametrów.

Używając tego narzędzia możemy uzyskać odpowiedź na poniższe przykładowe pytania.

- Które parametry mają wpływ na czas oscylacji?
- W jaki sposób można wytłumić oscylację (np. oscylacja maleje w czasie)?
- Czy zmiana niektórych parametrów ma większy wpływ na system niż zmiana innych?

Dodatkowo spróbuj konwertować model cyklu dobowego *Drosophila* (Fig1A w publikacji Leloue *et al.*, 1999) do formatu SBGN.



Ścieżka regulacyjna cyklu dobowego u *Drosophila* (Model2) jest bardziej skomplikowana niż u *Neurospora*. Zamiast monomerycznego białka Freq, mamy tu do czynienia z regulacją transkrypcji poprzez pętlę zwrotną regulowaną przez ufosforylowany dimer dwóch białek *Per* i

**Tim.** W konsekwencji ścieżka zawiera dodatkową reakcję fosforylacji każdego z białek oraz formowania przez białka kompleksu **Per-Tim**. Na diagramie powyżej symbole oznaczają:

P(0) = nieufosforylowane białko *Per*

P(1) = pojedyncza fosforylacja białka *Per*

P(2) = podwójnie fosforyzowane białko *Per*

*Tim* jest oznaczone w podobny sposób.

Dodatkowa informacja:

Aby narysować model 2 i nadać białkom *Per* i *Tim* status niezależnych obiektów należy posłużyć się komendą **state variables** jak poniżej.

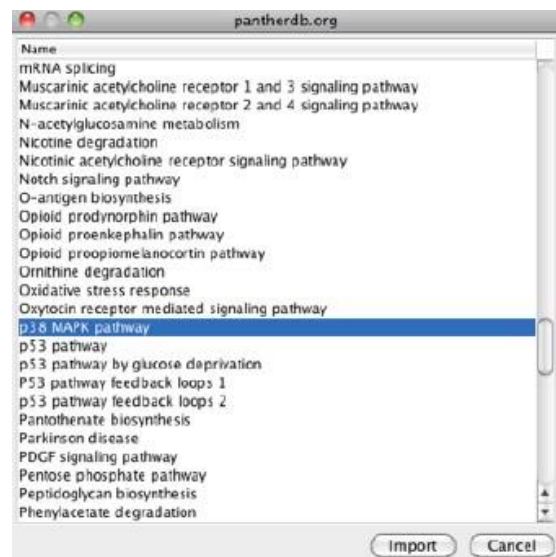
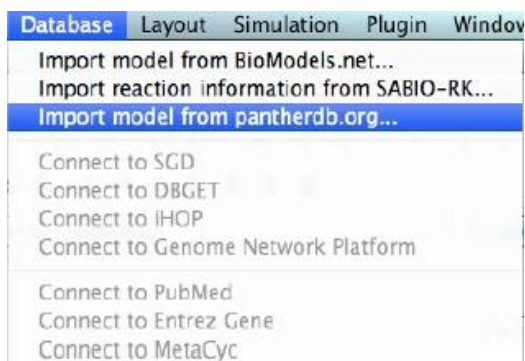
Zwróć uwagę jak **clone makers** poradzi sobie z białkami o tych samych nazwach, ale występujących w różnych stanach.

## 5. Importowanie modeli z baz danych

CellDesigner zawiera łącza do baz danych takich jak BioModels, Panther Pathways i SabioRK. Panther Pathways zawiera ręcznie rysowane diagramy wielu ścieżek, które mogą posłużyć jako punkt początkowy do konstrukcji własnego modelu.

Poświęć chwilę czasu na przyjrzenie się dostępnym w bazie modelom.

Baza Biomodels nie zawiera informacji o schemacie/układzie modeli. Jeśli nie wiesz, który model wybrać importuj przykładowe modele cykli dobowych np. Biomodels55, Biomodels22, czy Biomodels89.

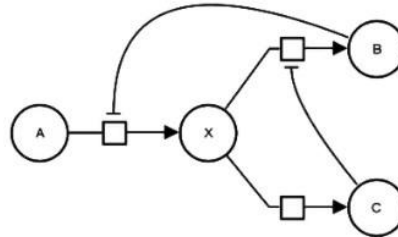


# Ćwiczenie 2 Copasi

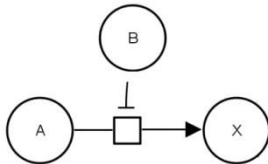
## 4.16.

Zajęcia mają na celu zapoznanie się z oprogramowaniem Copasi używanym m.in. do symulacji w modelach kinetycznych.

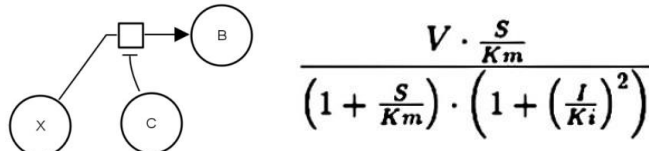
1. Poznamy proces utworzenia modelu składającego się z trzech reakcji.
2. Zapoznamy się z rysowaniem wykresów.
3. Przeprowadzimy analizy metabolizmu w modelu ścieżki glikolizy *S.cerevisiae* wg. Smallbone2013.



**Reakcja R1-** odwracalna reakcja Michaelis-Menten z niekompetycyjnym inhibitorem

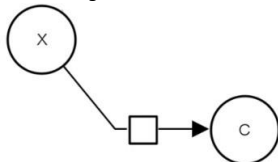


**Reakcja R2-** nieodwracalna reakcja drugiego rzędu Michaelis-Menten z niekompetycyjnym inhibitorem



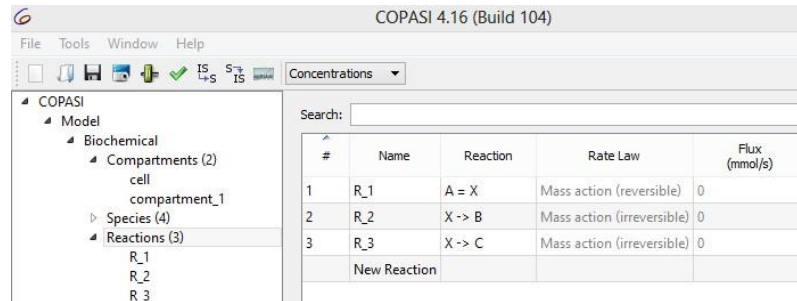
$$\frac{V \cdot \frac{S}{K_m}}{\left(1 + \frac{S}{K_m}\right) \cdot \left(1 + \left(\frac{I}{K_i}\right)^2\right)}$$

**Reakcja R3-** nieodwracalna Michaelis-Menten

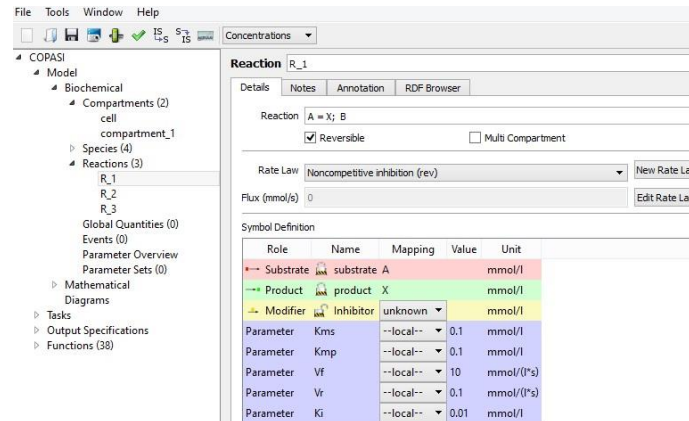


1. Wejdź do zakładki **Model**. Nadaj nazwę modelowi. Zmień **Volume unit** na litry.
2. W zakładce **Compartment** nadaj nazwę przedziałowi komórkowemu "**cell**".
3. Rozwiń okno dialogowe **cell** i zapisz Initial Volume (ml) "1e-12".
4. Wejdź do zakładki **Reactions**. Nadaj nazwę reakcji R\_1. Przejdź do opisu reakcji R\_1.
  - a) W linii **Reaction** wpisz A = X
  - b) Rate Law powinno pojawić się automatycznie **Mass action (reversible)**.
5. Kliknij **New**. Pojawi się nowa zakładka umożliwiająca opisanie następnej reakcji.
  - a) W nazwie reakcji wpisz R\_2
  - b) Rate Law zostanie automatycznie uzupełnione jako **Mass action (irreversible)**

- Kliknij **New**. Pojawi się nowa zakładka umożliwiająca opisanie następnej reakcji.
- Uzupełnij jak powyżej.
- Przejdź do zakładki **Reactions** i upewnij się, że na liście znajdują się 3 reakcje.



- Ponieważ reakcja R\_1 przebiega z udziałem inhibitora, zmień **Rate Law** wybierając Noncompetitive inhibition (rev) z listy dialogowej. W oknie **Symbol Definition** pojawią się komponenty reakcji. Wybierz z listy odpowiedni symbol opisujący modyfikator (**Modifier**). Uzupełnij **Vf** 10mmol/l, **Ki**= 0.01 mmol/l. Zatwierdź **Commit**



- Przejdź do korekty reakcji R\_2. Na liście dialogowej **Rate Law** nie istnieje reakcja, która odpowiada procesowi reakcji R\_2. Należy ją utworzyć w zakładce **New Rate Law**.

- W linii **Function** wpisujemy nazwę funkcji **Noncompetitive inhibition 2<sup>nd</sup> order (irr)**. W oknie **Formula** zapisujemy poniższą reakcję. Aby zapisać potęgę 2 używamy zapisu “**^2**”. Kolor niebieski tła oznacza, że funkcja jest zapisana prawidłowo. Jeśli pojawia się różowy kolor tła, oznacza to, że funkcja zawiera błąd, bądź nie została dokończona.

$$\frac{V \cdot \frac{S}{K_m}}{\left(1 + \frac{S}{K_m}\right) \cdot \left(1 + \left(\frac{I}{K_i}\right)^2\right)}$$

- Zaznacz prawidłowo **Function Type**.
- W tabeli **Parameters** powinny pojawić się wszystkie symbole znajdujące się w opisie funkcji. Nie wszystkie z nich są parametrami. W oknie **Description** opisz prawidłowo poszczególne symbole. W oparciu o wzór w pkt 10. zidentyfikuj substrat i modyfikator. Zatwierdź **Commit**.
- Wróć do zakładki **Reactions** i dla reakcji R\_2 wybierz z listy dialogowej, przed chwilą utworzoną funkcję. Zmiana **Rate Law** spowoduje uaktualnienie listy symboli. Uzupełnij **Mapping** o nazwę modyfikatora. Wartość parametru **V** = 2 mmol/l.

14. Przejdź do R\_3. Zmień Rate Law wybierając z listy **Henri-Michaelis-Menten (Irr)**. Wartość parametru  $V = 2$  mmol/l.
15. Upewnij się, że zakładka **Reactions** przedstawia reakcje jak poniżej na rysunku.

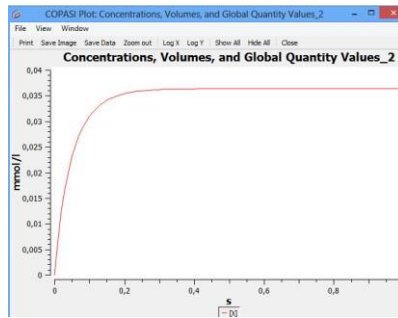
#	Name	Reaction	Rate Law	Flux (mmol/s)
1	R_1	A = X; B	Noncompetitive inhibition (rev)	0
2	R_2	X -> B; C	noncompetitive inhibition 2nd order (irr)	0
3	R_3	X -> C	Henri-Michaelis-Menten (irreversible)	0
		New Reaction		

16. Przejdź do **Species** i zmień status reagentów
  - a) Stężenie A jest stałe, nie zależy od reakcji, więc wpisz **fixed** w linii **Simulation Type**.
  - b) Podobną operację wykonaj dla reagent B. Dodatkowo ustaw initial concentration (mmol/l)= 0.1.
  - c) Reagent C jak wyżej. Dodatkowo ustaw initial concentration (mmol/l)= 0.1.
  - d) Stężenie reagenta X ustaw jako zależne od reakcji, a jego stężenie początkowe w mmol/l wynosi 0.
17. Rozwiń zakładkę **Parameter Overview**. Na liście znajdują się wszystkie parametry i przyporządkowane im wartości. Zapisz plik **File-> Save as**. Przyjrzyj się równaniu różniczkowemu opisującemu zmiany stężenia reagent X w czasie (**Mathematical-> Differential equations**). Zapisz formułę na dysku poprzez zatwierdzenie **Save** w prawym dolnym rogu ekranu.

Model Parameters			
Name	Type	Value	Unit
Initial Time			
New Model	time	0	s
Initial Compartment Sizes			
cell	fixed	1e-12	l
compartment_1	fixed	1	l
Initial Species Values			
A	fixed	1	mmol/l
X	reactions	0	mmol/l
B	fixed	0,1	mmol/l
C	fixed	0,1	mmol/l
Initial Global Quantities			
Kinetic Parameters			
R_1			
Kms	fixed	0,1	mmol/l
Kmp	fixed	0,1	mmol/l
Vf	fixed	10	mmol/(l*s)
Vr	fixed	0,1	mmol/(l*s)
Ki	fixed	0,01	mmol/l
R_2			
V	fixed	2	mmol/(l*s)
Km	fixed	0,1	mmol/l
Ki	fixed	0,1	?
R_3			
Km	fixed	0,1	mmol/l
V	fixed	2	mmol/(l*s)

### Rysowanie prostych wykresów. Symulacja w czasie.

1. W zakładce **Tasks** wybierz **Time course**. Przejdź do **Output Assistant** i wybierz 1szy rodzaj wykresu, który umożliwi śledzenie zmiany stężeń substancji w funkcji czasu. Zatwierdź **Create**.



2. Dodatkowo wykonaj analizę Steady-state; **Tasks-> steady-state**. Odczytaj wartości flux (przepływu metabolitów) dla reakcji R1, R2, R3.
3. Czy model jest stabilny? Co o tym świadczy?

### Testowanie funkcji programu Copasi z użyciem modelu glikolizy wg Smallbone2013 - Glycolysis in *S.cerevisiae* - Iteration 17)

1. Narzędzie Steady state
2. Narzędzie Metabolic Control Analysis
3. Narzędzie Skanowania parametrów i próbkowanie

**Steady state.** Analiza stanu stacjonarnego glikolizy u *S.cerevisiae* ma na celu określenie stanu systemu wyrażonego w stężeniach metabolitów i przepływie metabolitów - Flux w poszczególnych krokach tego szlaku metabolicznego.

1. Importuj Model Smallbone2013 (17 iteracja) z bazy BIOMODELS.
2. Przejdź do **Tasks -> Steady state**, a następnie wykonaj zadanie przez uruchomienie **Run**
3. **Podaj** stężenie UDP w stanie stacjonarnym oraz Flux dla reakcji kinazy pirogronianiu CDC19, w stanie stacjonarnym.
4. **Podaj** wartość Eigenvalue i określ na jego podstawie, czy stan stacjonarny w modelu glikolizy jest stabilny.

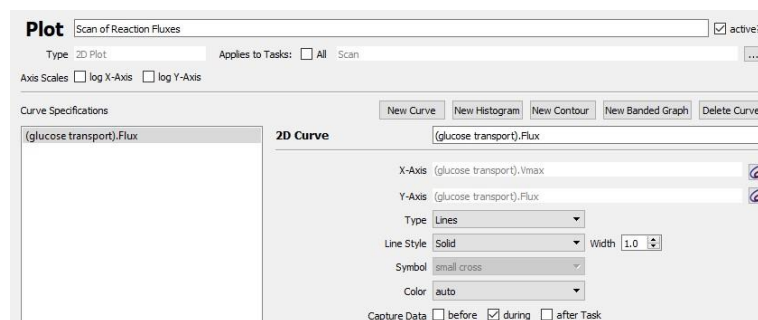
**Metabolic Control Analysis.** Analiza kontroli metabolicznej glikolizy u *S.cerevisiae* ma na celu ilościową analizę kontroli, jaka wywierana jest przez poszczególne komponenty systemu (szlaku glikolizy) na aktywności tego szlaku wyrażoną siłą przepływu metabolitów i kontroli stężenia metabolitów.

1. Przejdź do **Taks-> Metabolic Control Analysis**, uruchom analizę kontroli metabolicznej.
2. Otwórz tabelę z wynikami, które przedstawiają współczynniki kontroli przepływu metabolitów (Flux Control Coefficients).
3. **Odszukaj** w tabeli z wynikami, enzym, który ma największy współczynnik kontroli przepływu metabolitów w ścieżce górnej glikolizy poczynając od heksokinazy 2.
4. Otwórz tabelę z wynikami, które przedstawiają współczynniki kontroli stężenia (Concentration Control Coefficients).
5. **Odszukaj** w tabeli z wynikami odszukaj syntezę T6P. Na podstawie współczynników CCC, skomentuj wpływ syntazy T6P w kontroli stężenia metabolitów w ścieżce glikolizy.

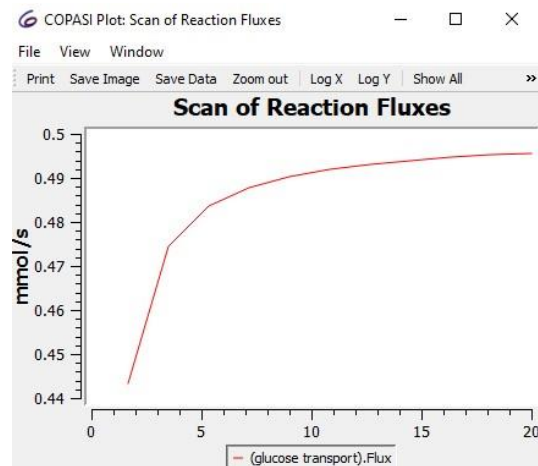
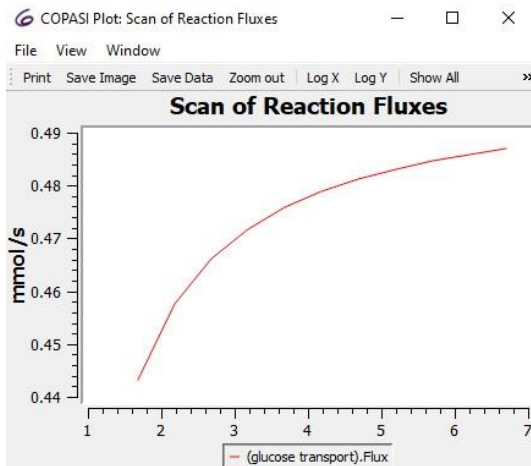
**Skanowanie parametrów.** Skanowanie parametrów ma na celu odpowiedzenie na pytanie:

- w jakim stopniu zachowanie systemu zależy od wartości parametrów?
- czy są parametry, których wartości muszą być ściśle zdefiniowane?
- które właściwości systemu są wrażliwe, a które bardzo odporne na zmiany, co zapewnia homeostazę systemu (robustness).

1. Nadal korzystaj z modelu Smallbone2013 (17 iteracja).
2. Przejdź do **Tasks-> Parameters Scan**. Przeprowadź skanowanie w warunkach stanu stacjonarnego **Steady-state**. W oknie dialogowym **Create**, wybierz (**Select items**) parametry, których wartości chcesz poddać skanowaniu: glucose transport Vmax. Przeprowadź analizę z zadanymi oryginalnie wartościami, a następnie porównaj otrzymany wykres po zmianie **Intervals** na 12 i zmianie min = 1 i max = 20.
3. Aby otrzymać wykresy przedstawione w skrypcie, należy uprzednio określić rodzaj wykresów. W tym celu przejdź do **Output Assistant**, wybierz z listy **Plots-> Scan of reactions Fluxes**.
4. Następnie otwórz okno dialogowe **Output Specifications-> Plots-> Scan of reaction Fluxes**. Z listy **Curve specifications** usuń wszystkie element umieszczone na liście poza **glucose transport Flux**.



5. Powróć do okna dialogowego Parameter scan i uruchom skanowanie **RUN**.
6. **Wygeneruj dwa wykresy** skanowania parametrów aktywności transportera glukozy i **skomentuj wyniki**. Warunki skanowania parametrów 1) glucose transport. Vmax, Intervals 10, min= 1.675, max = 6.7. warunki skanowania parametrów 2) glucose transport.Vmax, Intervals 10, min= 1.675, max = 20



7. Następnie dodaj do listy kolejny parametr do skanowania. **Create-> reaction> heksokinase HXK2.kcat**

**Scan**  Intervals  Values

Object: (hexokinase [HXK2]).kcat

Intervals: min 31.55, max 126.2

logarithmic

---

**Scan**  Intervals  Values

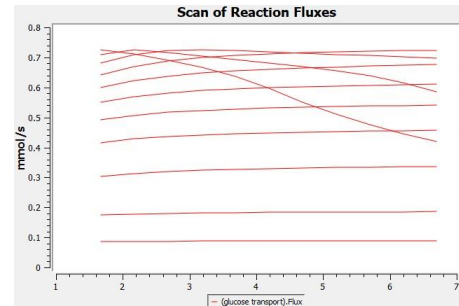
Object: (glucose transport).Vmax

Intervals: min 1.675, max 6.7

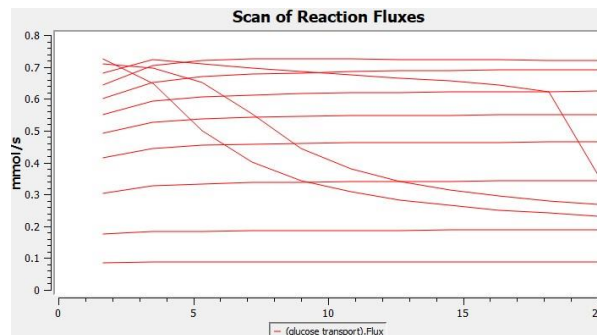
logarithmic

**Task** Steady State

Continue from Current State  output during subtask execution  Continue on Error



8. Zmień zakres aktywności transportera glukozy, to jest do max = 20.

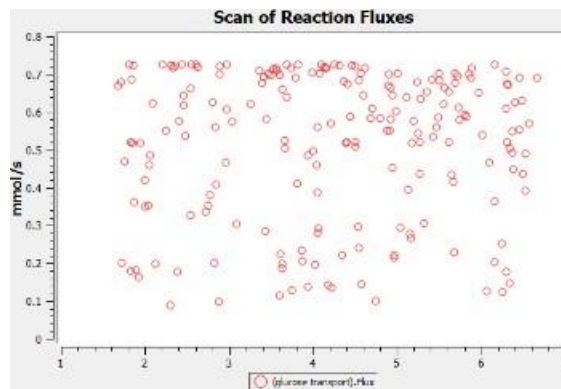


9. Przeprowadź podobną symulację korzystając z opcji próbkowania parametrów (Random distribution). Wejdź do **Parameter scan** i przeprowadź skanowanie w stanie stacjonarnym **steady-state** oraz ustaw **New scan item**: jako **Random distribution**.

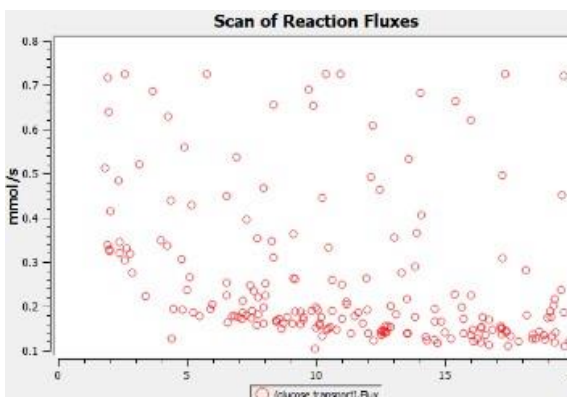
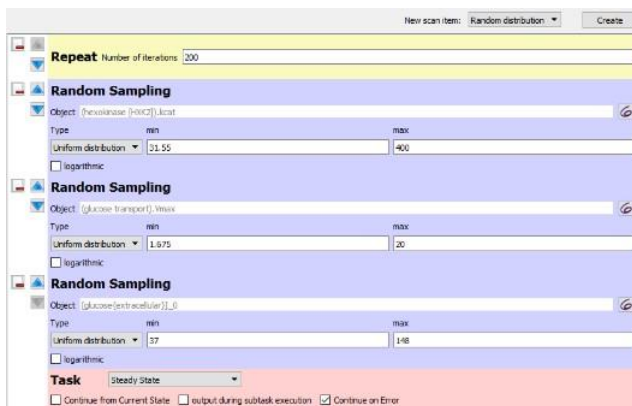
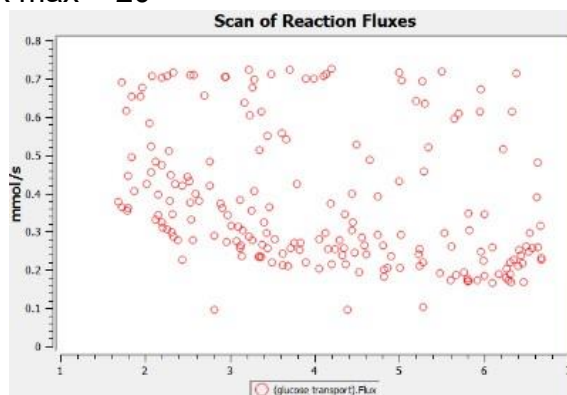
10. W zakładce **Create** wybierz: glucose transport.Vmax, hexokinase [HXK].kcat, glucose{extracellular}\_0, co oznacza stężenie glukozy w pożywce.

11. Dodaj do tabeli zakładkę Repeat **New scan item -> Repeat**. Wprowadź przez naciśnięcie przycisku **Create**. Ustaw ilość powtórzeń na 200. W zakładce Plot wybierz **Type Symbols**. Przeprowadź próbkowanie.





12. Zmień kolejno zakres wartości parametru kcat hexokinase[HXK2].kcat na max = 400, a następnie glucose transporter.Vmax max = 20



13. Następnie usuń z listy linię odpowiadającą próbkowaniu (**Random Sampling**) stężenia zewnątrzkomórkowej glukozy i zamień próbkowanie na skanowanie dla oryginalnych wartości aktywności transportera glukozy oraz powróć do oryginalnego zakresu wartości kcat hexokinazy HXK2.

**Repeat** Number of iterations: 200

**Scan**  Intervals  Values

Object: (glucose transport).Vmax

Intervals	min	max
10	1.675	6.7

logarithmic

**Random Sampling**

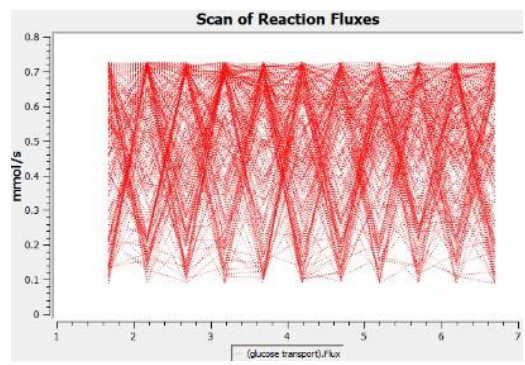
Object: (hexokinase [HK2]).kcat

Type	min	max
Uniform distribution	31.55	126.2

logarithmic

**Task** Steady State

Continue from Current State  output during subtask execution  Continue on Error



# Ćwiczenie 3.

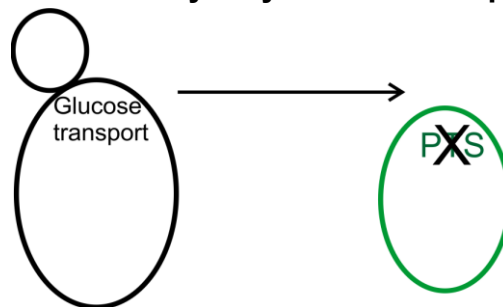
## Copasi 4.16.104

Ćwiczenia mają na celu wykorzystanie programu Copasi do skonstruowania transgenicznego mikroorganizmu z użyciem strategii „chirurgii metabolicznej”. Chirurgia metaboliczna jest koncepcją inżynierii metabolicznej (Adamczyk i Westerhoff, 2012). Jest to nowe podejście do tworzenia zmodyfikowanych organizmów, poprzez wprowadzenie zmian w sposób niezauważalny z punktu widzenia ich metabolizmu. Dzięki zachowaniu oryginalnych (takich samych) stężeń metabolitów w stanie stacjonarnym (również po ingerencji metabolicznej), unikamy negatywnych efektów na metabolizm takich jak zaburzenie homeostazy wewnątrzkomórkowej. Metoda zostanie zilustrowana na dwóch przykładach:

- 1) Inżynierii transportu glukozy do komórki bakterii mlekowych, poprzez zmianę architektury sieci transportu glukozy u *L. lactis* (producenta jogurtu), na system transportu charakterystyczny dla komórki drożdży (*S. cerevisiae*), producenta alkoholu.
- 2) Drugi przykład pokaże, w jaki sposób „chirurgia metaboliczna”, w sposób dyskretny pozwala na rozszerzenia ścieżek metabolicznych o nowe komponenty, co może przełożyć się na produkcję sera przez drożdże, a piwa przez bakterie mlekowe.

Adamczyk M and Westerhoff HV (2012) Engineering of self-sustaining systems: substituting the yeast glucose transporter plus hexokinase for the Lactococcus lactis phosphotransferase system in a *L. lactis* network in silico. *Biotechnol J*, 7(7):877-83

### 1. Konstrukcja *L.lactis* z drożdżowym systemem transportu glukozy.



Systemy pobierania glukozy dzielimy na aktywne i pasywne.

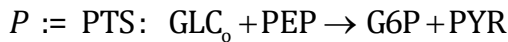
Pasywne systemy wykorzystywane są w komórkach ludzkich i komórkach drożdży.

Aktywne systemy dzielimy na powiązane z:

- transportem jonów do komórki
- zależne od hydrolizy ATP (*S. cerevisiae*)
- zależne od fosforylacji glukozy przez fosfoenolopirogronian PEP (*L. lactis*).

Podczas ćwiczeń zamienimy system PEP:PTS w bakterii mlekowej, na system wspomaganą dyfuzję z hydrolizą ATP, który występuje u drożdży.

Reakcje, które przebiegają w niezmodyfikowanym systemie, a służą wymianie oznaczone są literą „P”. Reakcje nowe, wprowadzane do sieci oznaczone są literą „Q”. Chcemy wymienić proces P na Q.



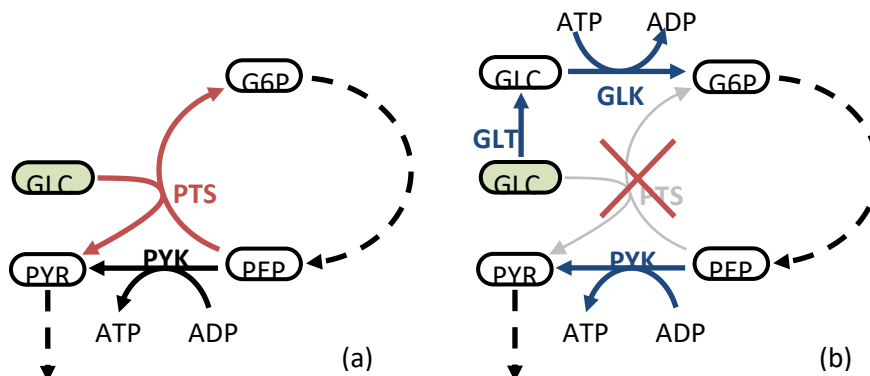
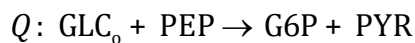
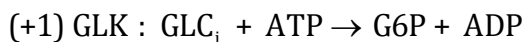
Proces Q jest zapisany w dwóch odrębnych reakcjach, z których pierwsza opisuje transport glukozy do komórki, a druga opisuje reakcję konwersji glukozy do glukozy-6-fosforanu z udziałem enzymu heksokinazy.



Reakcje te nie są natywne dla *L. lactis*. Aby reakcje P i Q były ekwiwalentne, musi zostać uwzględniona jeszcze jedna reakcja. Jest to reakcja konwersji fosfoenolopirogronianu (PEP) do kwasu pirogronianowego (PYR)



Nowy proces Q, w którego skład wchodzi 3 reakcje, zakłada, że Q jest ekwiwalentem reakcji chemicznej P



Wykres 1. A) system PTS u *L. lactis*. Na czerwono zaznaczony jest proces transportu glukozy do komórki z udziałem PEP. W procesie bierze udział enzym PYK (kinaza pirogronianu) B) System transportu glukozy drożdży. Na niebiesko zaznaczony jest nowy proces wprowadzony do *L. lactis* (reakcje GLT i GLK). Metabolit oznaczony na zielono GLC. Stężenie glukozy jest stałe.

1. Modelem podstawowym, który zmodyfikujemy na ćwiczeniach jest model szlaku glikolizy Hoefnagell i współ. 2002. **File -> Open**
2. Odszukaj na liście reakcji reakcję o nazwie V26 (heksokinaza) i V29 (fosfataza glukozy-6 fosforanu). Zmień  $V_{max}$  reakcji na zero, co oznacza, że reakcje są nieaktywne.
3. Ustaw stężenie glukozy zewnętrznej na 2 mM.
4. Oblicz stężenia metabolitów w stanie homeostazy. Oblicz wartości przepływów (flux) w stanie stacjonarnym (**Steady-state**). Przenieś wyniki do tabeli Excel porównaj z Tabelą 1 (plik **Wyniki\_ćw\_3**).
5. Dodaj dwie nowe reakcje do modelu *L. lactis* kierując się wskazówkami z ćwiczenia nr 2 (czyli instrukcją tworzenia reakcji w modelu i ich opisu) uzupełnij funkcję

- matematyczną, nazwij poszczególne elementy reakcji: modyfikator, substrat, produkt, parametr. Reakcje GLT i GLK zostały opisane (ich kinetyka) w modelu Teusink (2000).
6. Importuj model Teusink, 2000. **File-> Import SBML.**
  7. Zwróć uwagę na symbole oznaczające glukozę w modelu Hoefnagel (2002) i Teusink (2000). Symbole się różnią (!). Przepisując funkcje dla reakcji weź to po uwagę. Zamień symbol, tak aby był rozumiany przez model Hoefnagel (2002).
  8. W modelu Hoefnagel (2002) utwórz reakcję o nazwie GLT(transport glukozy) zapisz jako „**Gluc -> Glucin** oraz GLK(heksokinaza) zapisz „**Glucin + ATP = G6P + ADP**”.
  9. Zachowaj wartości parametrów kinetycznych dla tych dwóch reakcji wg Teusink (2000). Dostosuj jedynie Vmax. Tymczasowo ustaw wartość Vmax **zero**. Reakcje będą nieaktywne. Pozostałe wartości np. ATP, czy G6P itd. zostaną uzupełnione automatycznie (są elementami oryginalnego modelu Hoefnagel (2002)).
  10. Szybkość transportu glukozy w stanie stacjonarnym w niezmodyfikowanym systemie *L. lactis* wynosi  $v=101.363$  mM/min.

Flux  $v$  nowego procesu Q wynosi jak niżej

$$\mathbf{v}'_0 = \begin{pmatrix} 101.363 \\ 101.363 \\ 101.363 \end{pmatrix} \begin{matrix} GLK \\ GLK \\ PYK \end{matrix}$$

W nowym zmodyfikowanym systemie flux PYK (kinazy pirogronianowej) powinien wynosić 192.405 mM/min (sprawdź wynik **flux steady-state** w reakcji PYK w oryginalnym modelu Hoefnagel), więc musi zostać zwiększony aby skompensować usuniętą reakcję konwersji PEP w PYR przez system PTS oraz konsumpcję ADP w nowej reakcji GLK. Z czego to wynika? (patrz plik **wzór\_jak\_obliczyć\_nowy\_VmaxPYK\_Cw3**).

11. Oblicz nowe wartości Vmax transportera glukozy ( $v_{GLT}$ ) i heksokinazy ( $v_{GLK}$ ), tak aby uzyskane wartości przepływu metabolitów dla poszczególnych reakcji w modelu zmodyfikowanym o nowe reakcje, nie uległy zmianie (były identyczne z przepływami w oryginalnym modelu Hoefnagel (2002),  $v=101.363$  mM/min, patrz pkt 11).

Transporter glukozy (GLT)

$$v_{GLT} = \frac{V_{\max}^{GLT} \cdot \left( GLC_o - \frac{GLC_i}{K_{eq}^{GLT}} \right)}{\left( 1 + \frac{GLC_i}{K_M^{GLC_i}} + \frac{GLC_o}{K_M^{GLC_o}} + \frac{0.91 \cdot GLC_i \cdot GLC_o}{K_M^{GLC_i} \cdot K_M^{GLC_o}} \right)} \cdot K_M^{GLC_o}$$

$$K_M^{GLC_i} = 1.1918 \text{ mM}; K_M^{GLC_o} = 1.1918 \text{ mM}; K_{eq}^{GLT} = 1.$$

Heksokinaza (GLK)

$$v_{GLK} = \frac{V_{\max}^{GLK} \cdot \frac{GLC_i \cdot ATP}{K_M^{GLC_i} \cdot K_M^{ATP}} \cdot \left( 1 + \frac{G6P \cdot ADP}{GLC_i \cdot ATP} \right)}{\left( 1 + \frac{GLC_i}{K_M^{GLC_i}} + \frac{G6P}{K_M^{G6P}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{ATP}{K_M^{ATP}} + \frac{ADP}{K_M^{ADP}} \right)}$$

$$K_M^{GLC_i} = 0.08 \text{ mM}; K_M^{G6P} = 30 \text{ mM}; K_M^{ATP} = 0.15 \text{ mM}; K_M^{ADP} = 0.23 \text{ mM}; K_{eq}^{GLK} = 3800.$$

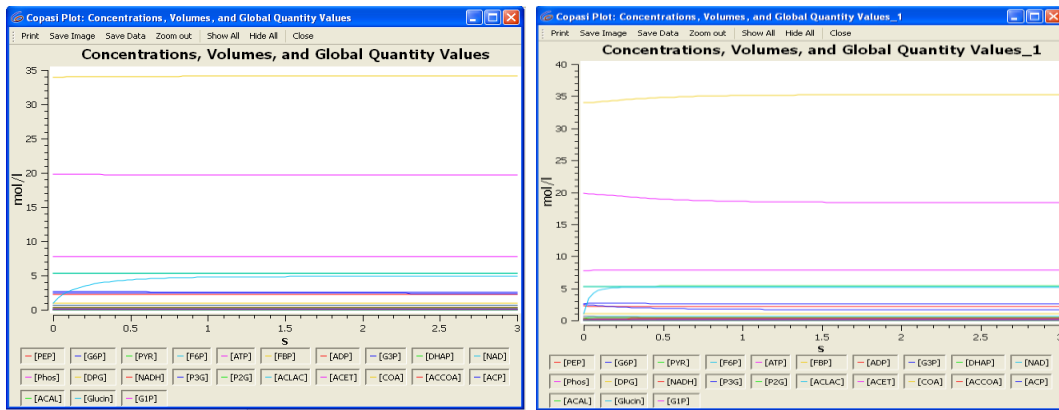
1. Następnym krokiem jest inaktywacja oryginalnej reakcji opisanej przez proces *P.* Zidentyfikuj reakcję opisującą transport glukozy PEP:PTS na liście reakcji *L. lactis*. Ustal  $V_{max}$  tej reakcji na **zero**.
2. W **parameter overview** zastąp  $V_{max}$  (GLK=132.864),  $V_{max}$  (GLT=579.685) i  $V_{max}$  (PYK=4290,13) wartościami obliczonymi ze wzorów w pkt 5.
3. Przeprowadź analizę **Steady-state** oraz **Time course**. Porównaj wyniki uzyskane w modelu zmodyfikowanym i oryginalnym. Czy są identyczne?
4. Zmień stężenie zewnętrznej glukozy od 2 mM do 5 mM. Przeprowadź analizę **Steady-state** i **Time course**.

Species			Species			Compartments			Model Quantities			Reactions			Jacc		
Name	Flux (mol/s)		Name	Flux (mol/s)	Chemical Equation												
v1	101.362		v1	0	GLUC + PEP = G6P + PYR												
v2	96.2012		v2	96.2012	G6P = F6P												
v3	96.2084		v3	96.2084	F6P + ATP = FBP + ADP; PEP												
v4	96.2012		v4	96.2012	FBP = G3P + DHAP												
v5	96.2012		v5	96.2012	DHAP = G3P												
v6	192.402		v6	192.402	G3P + NAD + Phos = DPG + NADH												
v7	192.402		v7	192.402	DPG + ADP = P3G + ATP												
v8	192.402		v8	192.402	P3G = P2G												
v9	192.402		v9	192.402	P2G = PEP												
v10	91.0405		v10	192.402	PEP + ADP = PYR + ATP; FBP G6P Phos												
v11	188.092		v11	188.092	PYR + NADH = Lac + NAD; FBP												
v12	0.0040217		v12	0.0040217	2 * PYR = ACLAC												
v13	0.00402159		v13	0.00402159	ACLAC = ACET												
v14	0.00029706		v14	0.00029706	ACET = ACETOUT												
v15	1.13823e-07		v15	1.13823e-07	ACLAC = ACET												
v16	0.00372464		v16	0.00372464	ACET + NADH = BUT + NAD												
v17	1.01826		v17	1.01826	PYR + COA = FOR + ACCOA; G3P DHAP												
v18	4.23734		v18	4.23734	ACCOA + Phos = ACP + COA												
v19	4.23734		v19	4.23734	ACP + ADP = AC + ATP												
v20	3.2838		v20	3.2838	PYR + NAD + COA = NADH + ACCOA												
v21	0.0647125		v21	0.0647125	NADH + ACCOA = NAD + COA + ACAL												
v22	0.0647125		v22	0.0647125	ACAL + NADH = ETOH + NAD												
v23	186.311		v23	186.311	ATP = ADP + Phos												
v24	5.39647		v24	5.39647	NADH + O2 = NAD												
v25	0.00722157		v25	0.00722157	FBP = F6P + Phos												
v26	0		v26	0	G6P = Glucn + Phos												
v27	5.1607		v27	5.1607	G6P = G1P												
v28	1.03214		v28	1.03214	5 * G1P + 5 * ATP + 2 * NADH + 3 * UDP +												
v29	5.1607		v29	0	GLUCn + ATP = G6P + ADP												
v28	1.03214		vGLT	101.362	Glucn = Glucn												
v29	0		vGLK	101.362	Glucn + ATP = G6P + ADP												

Hoefnagel

Hoefnagel\_ATP

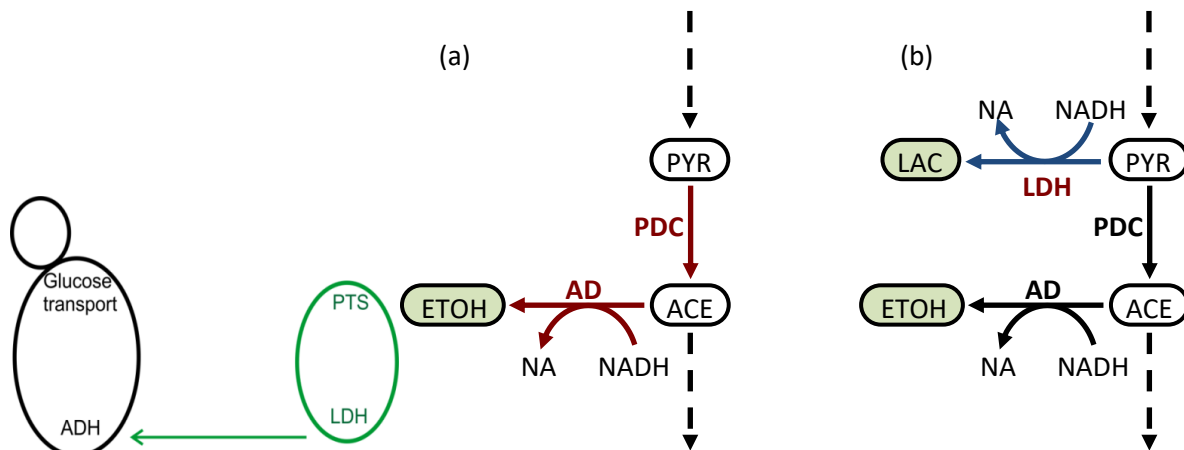
5. Wykorzystaj tabelę poniżej do przeprowadzenia stopniowej wymiany systemu PEP:PTS na system transportu glukozy z udziałem ATP. Przykłady poniżej pokazują różnice w czasie (transient time), wymagane aby system osiągnął stan stacjonarny.



Od lewej: 85% PEP:PTS oraz 5% PEP:PTS

Vmax	GLK	GLT	PTS	PYK
GLK 90%/PTS 10%	119.5776	521.7165	16.00003	4068.431
GLK 85%/PTS 15%	112.9344	492.7323	24.00004	3955.302
GLK 80%/PTS 20%	106.2912	463.748	32.00006	3842.174
GLK 75%/PTS 25%	99.648	434.7638	40.00007	3729.046
GLK 70%/PTS 30%	93.0048	405.7795	48.00009	3615.917
GLK 65%/PTS 35%	86.3616	376.7953	56.0001	3502.789
GLK 60%/PTS 40%	79.7184	347.811	64.00012	3389.661
GLK 55%/PTS 45%	73.0752	318.8268	72.00013	3276.532
GLK 50%/PTS 50%	66.432	289.8425	80.00014	3163.404
GLK 45%/PTS 55%	59.7888	260.8583	88.00016	3050.276
GLK 40%/PTS 60%	53.1456	231.874	96.00017	2937.147
GLK 35%/PTS 65%	46.5024	202.8898	104.0002	2824.019
GLK 30%/PTS 70%	39.8592	173.9055	112.0002	2710.891
GLK 25%/PTS 75%	33.216	144.9213	120.0002	2597.762
GLK 20%/PTS 80%	26.5728	115.937	128.0002	2484.634
GLK 15%/PTS 85%	19.9296	86.95276	136.0002	2371.506
GLK 10%/PTS 90%	13.2864	57.9685	144.0003	2258.377
GLK 5%/PTS 95%	6.6432	28.98425	152.0003	2145.249
GLK 0%/PTS 100%	0	0	160.0003	4290.13

### 1. Konstrukcja drożdży produkujących kwas mlekowy zamiast etanolu.



Proces u drożdży: *P*

Proces u bakterii: *Q*

(+1) PDC :  $\text{PYR} \rightarrow \text{ACE}$

(+1) ADH :  $\text{ACE} + \text{NADH} \rightarrow \text{ETOH} + \text{NAD}$

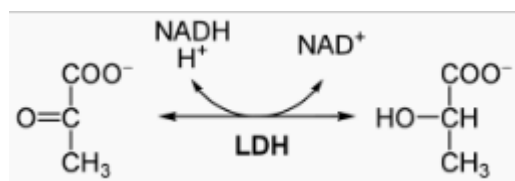
*Q* := LDH :  $\text{PYR} + \text{NADH} \rightarrow \text{LAC} + \text{NAD}$

-----  
*P* :  $\text{PYR} + \text{NADH} \rightarrow \text{ETOH} + \text{NAD}$

Poprzez nowy proces *Q*, został wprowadzony do system nowy metabolit, którym jest kwas mlekowy, a którego stężenie wewnątrzkomórkowe chcemy utrzymać na możliwie jak najniższym poziomie. W tym celu „wprowadzamy do systemu transporter”, o bardzo wysokiej aktywności, który zapewni usuwanie kwasu mlekowego z komórki do pożywki. W naszym przypadku kwas mlekowy w modelu Teusink (2000) zostanie wprowadzony jako metabolit końcowy (podobnie jak w modelu Hoefnagel (2002)). Ustawimy stężenie kwasu mlekowego na zero, co naśladuje sytuację sekrecji metabolitu przejściowego na zewnątrz komórki. Wzór reakcji i wartości parametrów reakcji dehydrogenazy mleczanowej zostaną zaczerpnięte z oryginalnego modelu Hoefnagel (2002).

Original system	<i>P</i>	<i>Q</i>	$V_{\max}$ (mM/min)			$\epsilon$
			LDH	PDC	ADH	
<i>S. cerevisiae</i>	PDC + ADH	LDH	1.28E+03	9.29E+00	0.00E+00	3.73E-06

1. Modelem podstawowym, który zmodyfikujemy w tym zadaniu jest model szlaku glikolizy Teusink i współ. 2000. **File-> Import SBML.**
2. Oblicz wartości przepływów (flux) w stanie stacjonarnym (**Steady-state**) dla modelu Teusink, 2000. Przenieś wyniki do tabeli Excel. Porównaj z wynikami w pliku **Wyniki\_Ćw\_3.**
3. Enzym niezbędny do produkcji kwasu mlekowego w *L. lactis* to dehydrogenaza mleczanowa (vLDH). Odszukaj reakcję katalizowaną przez LDH w modelu ścieżki glikolizy Hoefnagel, 2002. **File-> Import SBML.** Reakcja ta przebiega z udziałem modyfikatora, czynnika allosterycznego fruktozo1,6-bisfosforanu (symbol F1,6P = FBP).



4. Dopisz tę reakcję w modelu Teusink (2000), kierując się wskazówkami z ćwiczenia nr 2 (instrukcja do tworzenia modelu składającego się z trzech reakcji), uzupełnij funkcję matematyczną, nazwij poszczególne elementy reakcji: modyfikator, substrat, produkt, parametr.
5. Oblicz nowy  $V_{\max}$  dla reakcji LDH, tak by otrzymać przepływ metabolitów (flux) identyczny jak w modelu Teusink (2000) dla reakcji vADH (enzym: dehydrogenaza alkoholowa vADH=AD) (**plik wyniki\_Ćw\_3**).
6. Ustaw  $V_{\max}$  dla reakcji vADH **zero**. Enzym ADH jest wówczas nieaktywny.
7. Przeprowadź analizę **Time course**. Co zaobserwowałeś?

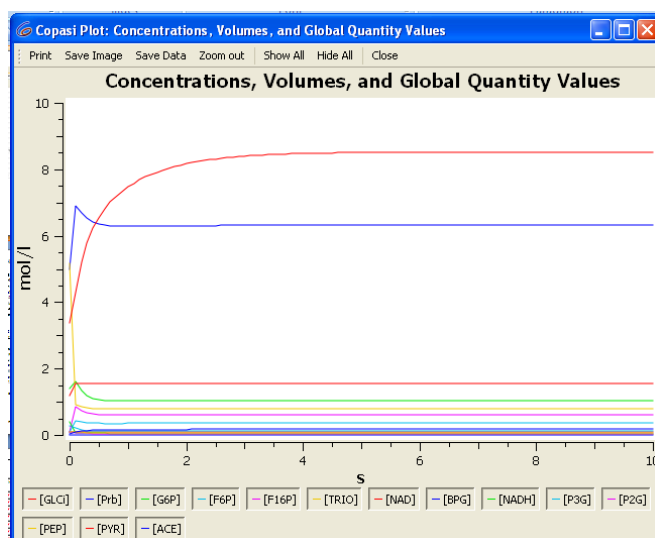


8. Przywróć reakcji vADH oryginalny Vmax = 810.
9. Oblicz Vmax PDC, aby skierować strumień metabolitów do reakcji LDH. Jednak pamiętaj o pozostawieniu minimalnego przepływu przez tę reakcję, co jest niezbędne dla reakcji znajdującej się w szlaku poniżej PDC. Reakcja ta przebiega z wytworzeniem NADH. Dzięki zachowaniu minimalnej aktywności PDC utrzymany zostanie prawidłowy stan redox między reakcjami vSUC i vG3PDH.
10. Zapisz zmiany w modelu pod nazwą Teusink\_LDH1.
11. Przeprowadź analizę **Steady-state** i **Time course**. Porównaj wyniki oryginalnego modelu Teusink(2000) i modelu komórki drożdżowej produkującej kwas mlekowy.

A steady state with given re			A steady state with given resolution was found.		
Species	Compartment	Flux (mol/s)	Species	Compartment	Model Quantities
1	vGLK	88.1505	1	vGLK	88.1505 GLC <sub>i</sub> + Prb = G6P
2	vPGI	77.3505	2	vPGI	77.3505 G6P = F6P
3	vGLYCO	6	3	vGLYCO	6 G6P + Prb = Glyc
4	vTreha	2.4	4	vTreha	2.4 2 * G6P + Prb = Trh
5	vPFK	77.3505	5	vPFK	77.3505 F6P + Prb = F16P
6	vALD	77.3505	6	vALD	77.3505 F16P = 2 * TRIO
7	vGAPDH	136.499	7	vGAPDH	136.499 TRIO + NAD = BPG + NADH
8	vPGK	136.499	8	vPGK	136.499 BPG = P3G + Prb
9	vPGM	136.499	9	vPGM	136.499 P3G = P2G
10	vENO	136.499	10	vENO	136.499 P2G = PEP
11	vPYK	136.499	11	vPYK	136.499 PEP = PYR + Prb
12	vPDC	136.499	12	vPDC	7.28096 PYR = CO <sub>2</sub> + ACE
13	vSUC	3.64049	13	vSUC	3.64048 2 * ACE + 3 * NAD = SUCC + 3 * NADH
14	vGLT	88.1505	14	vGLT	88.1505 GLC <sub>o</sub> = GLC <sub>i</sub>
15	vADH	129.218	15	vADH	0 ACE + NADH = NAD + FTOH
16	vG3PDH	18.2025	16	vG3PDH	18.2024 TRIO + NADH = NAD + GLY
17	vATP	99.0961	17	vATP	99.0962 Prb = X
18	vLDH	129.218	18	vLDH	129.218 PYR + NADH = Lac + NAD; F16P

Teusink model

Teusink\_LDH



# Ćwiczenie 4.

## FLUX BALANCE ANALYSIS - SurreyFBA

Celem ćwiczeń jest zapoznanie się z interfejsem użytkownika JyMet, który to GUI umożliwia wizualizację modeli w skali genomowej. Poznamy koncepcję SurreyFBA i podstawowe narzędzia/funkcje zintegrowane z SurreyFBA [1]. Wykonamy analizę przepływu strumieni (*ang.flux*) w przykładowym modelu drożdży piekarniczych *S.cerevisiae* o nazwie iTO977 [2]. Model powstał na bazie modelu iLN800 i jest modelem rozszerzonym o dodatkowe reakcje wg. danych literaturowych. Model wykazuje skuteczność w symulacjach wzrostu drożdży na różnych podłożach hodowlanych, analizie istotności genów oraz odtwarza wyniki eksperymentalne dla pojedynczych i podwójnych mutantów zgodnie z danymi literaturowymi. iTO977 został użyty do integracji danych transkryptomycznych i eksperymentalnych danych o przepływach metabolitów w 4 warunkach hodowli; warunki limitujące źródło węgla, warunki limitujące źródło azotu, w dwóch wariantach: w warunkach tlenowych i beztlenowych.

Dodatkowe informacje można znaleźć w podanych poniżej źródłach literaturowych.

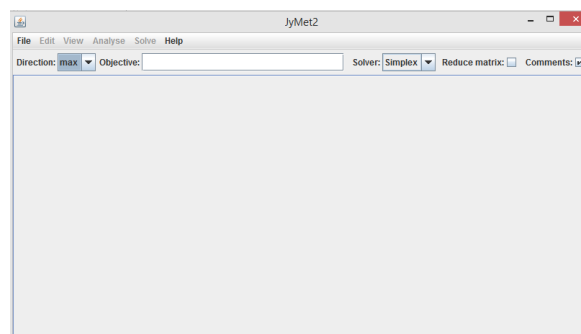
### Bibliografia:

1. Gevorgyan A, Bushell ME, Avignone-Rossa C, Kierzek AM. SurreyFBA: A command line tool and graphics user interface for constraint based modelling of genome scale metabolic reaction networks. *Bioinformatics*. 2011 27(3):433-4.
2. Osterlund T, Nookaew I, Bordel S, Nielsen J Mapping condition-dependent regulation of metabolism in yeast through genome-scale modelling *BMC Systems Biology*. 2013 DOI: 10.1186/1752-0509-7-36

W folderze „SurreyFBA rozwiązania” znajdują się pliki z przykładowymi obliczeniami do przedstawionych ćwiczeń, które będą pomocne przy sprawdzeniu poprawności uzyskanych wyników.

## 4.1 Wstęp do SurreyFBA

1. Otwórz folder SurreyFBA2.34 a następnie uruchom program **JyMet** (program funkcjonuje w środowisku Java dlatego też wymagana jest wcześniejsza instalacja platformy Java)



## 2. Wczytanie modelu.

Kliknij:

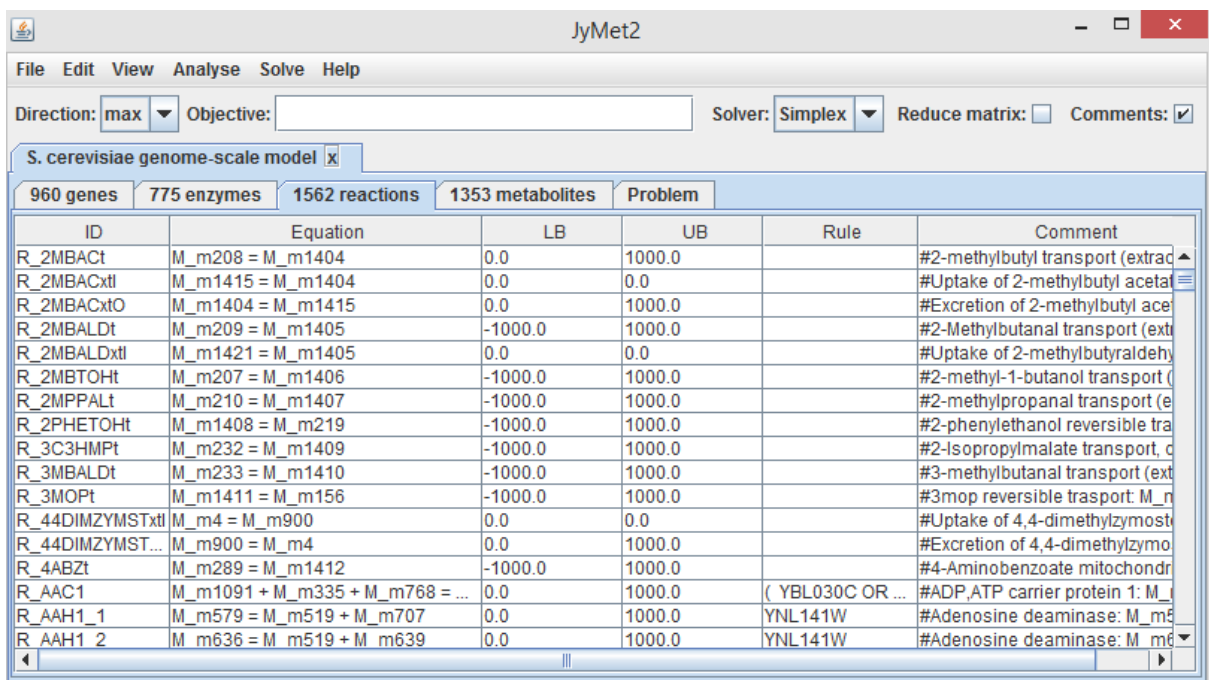
File -> import SMBL, wybierz folder Model, zaznacz plik

**iTO977\_v1.00\_cobra.xml**

(ścieżka dostępu C:\SurreyFBA\examples\models\iTO77\_v1\_cobra.xml)

Model **iTO977\_v1.00\_cobra.xml** został skonwertowany do formatu *SurreyFBA*. Model iTO977 został nazwany według konwencji „*in silico*” szczepów mikrobiologicznych. „i” oznacza „*in silico*”, „TO” oznaczają inicjały autora modelu (Tobias Österlund), a 977 oznacza liczbę genów znajdujących się w modelu.

Po zaimportowaniu modelu w oknie dialogowym pojawiają się zakładki: *geny*, *enzymy*, *reakcje*, *metabolity* i *problem*.



ID	Equation	LB	UB	Rule	Comment
R_2MBACt	M_m208 = M_m1404	0.0	1000.0		#2-methylbutyl transport (extrac
R_2MBACxtl	M_m1415 = M_m1404	0.0	0.0		#Uptake of 2-methylbutyl acetal
R_2MBACxtO	M_m1404 = M_m1415	0.0	1000.0		#Excretion of 2-methylbutyl ace
R_2MBALDt	M_m209 = M_m1405	-1000.0	1000.0		#2-Methylbutanal transport (ext
R_2MBALDxtl	M_m1421 = M_m1405	0.0	0.0		#Uptake of 2-methylbutyraldehy
R_2MBTOHt	M_m207 = M_m1406	-1000.0	1000.0		#2-methyl-1-butanol transport (
R_2MPPALt	M_m210 = M_m1407	-1000.0	1000.0		#2-methylpropanal transport (e
R_2PHETOHt	M_m1408 = M_m219	-1000.0	1000.0		#2-phenylethanol reversible tra
R_3C3HMPT	M_m232 = M_m1409	-1000.0	1000.0		#2-Isopropylmalate transport, c
R_3MBALDt	M_m233 = M_m1410	-1000.0	1000.0		#3-methylbutanal transport (ext
R_3MOPt	M_m1411 = M_m156	-1000.0	1000.0		#3mop reversible trasport: M_n
R_44DIMZYMSTxtl	M_m4 = M_m900	0.0	0.0		#Uptake of 4,4-dimethylzymos
R_44DIMZYMST...	M_m900 = M_m4	0.0	1000.0		#Excretion of 4,4-dimethylzymo
R_4ABZt	M_m289 = M_m1412	-1000.0	1000.0		#4-Aminobenzoate mitochondr
R_AAC1	M_m1091 + M_m335 + M_m768 = ...	0.0	1000.0	( YBL030C OR ...	#ADP,ATP carrier protein 1: M_
R_AAH1_1	M_m579 = M_m519 + M_m707	0.0	1000.0	YNL141W	#Adenosine deaminase: M_m5
R_AAH1_2	M_m636 = M_m519 + M_m639	0.0	1000.0	YNL141W	#Adenosine deaminase: M_m6

W zakładce *reakcje*, znajduje się 1562 reakcji oraz kolejno: nazwa reakcji, równanie reakcji, dolna granica przepływu (**LB**), górna granica przepływu (**UB**), reguły łączące reakcje z zaangażowanymi w ich przebieg genami oraz komentarz do reakcji, zawierający informacje min. na temat lokalizacji (w którym kompartmentcie, części komórki zachodzi reakcja), rodzaju reakcji (np. sekrecja, transport), oraz nazwy metabolitów biorących udział w reakcji.

## 3. Definiowanie zewnętrznych metabolitów

Metabolity zewnętrzne można zaznaczyć w zakładce *metabolity*. Reprezentują one źródło przepływu metabolitów. Bez uprzedniego oznaczenia metabolitów zewnętrznych (w składzie podłoża hodowlanego), nie jest możliwe obliczenie wartości maksymalnego wzrostu. Uzyskujemy wówczas wartość wzrostu = 0 ze względu na brak źródła przepływu metabolitów. W omawianym modelu metabolity zewnętrzne są zaznaczone w kolumnie „external” (zakładka *metabolity*).

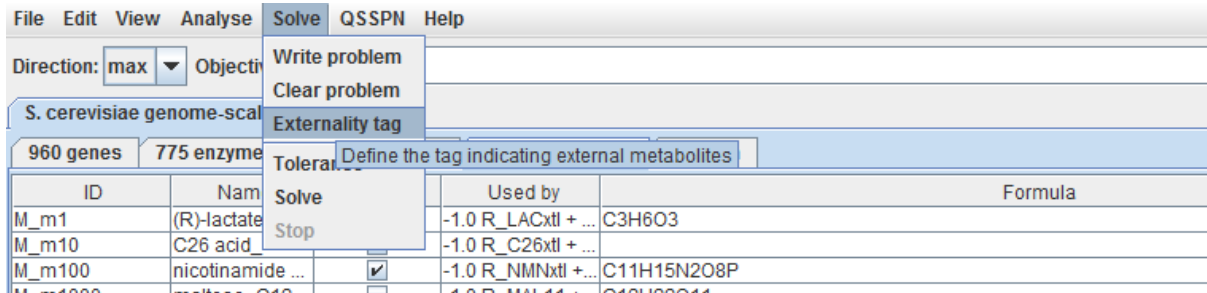
ID	Name	External	Used by	Formula	Canonical SMI	Isomeri
M_m1	(R)-lactate_C3H6O3	<input checked="" type="checkbox"/>	-1.0 R_LACxtl + R_LACxtO	C3H6O3		
M_m10	C26 acid	<input checked="" type="checkbox"/>	-1.0 R_C26xtl + R_C26xtO			
M_m100	nicotinamide monon...	<input checked="" type="checkbox"/>	-1.0 R_NMNxtl + R_NMNxtO	C11H15N2O8P		
M_m1000	maltose_C12H22O11	<input type="checkbox"/>	-1.0 R_MAL11 + R_MLxtl + -1.0 R_ML...	C12H22O11		
M_m1001	melibiose_C12H22...	<input type="checkbox"/>	R_MELixtl + -1.0 R_MELxtO + -1.0 R_U...	C12H22O11		
M_m1002	methane_CH4	<input type="checkbox"/>	R_MTHNxtl + -1.0 R_MTHNxtO + -1.0 R...	CH4		
M_m1003	methylglucoside_C7...	<input type="checkbox"/>	R_AMGxtl + -1.0 R_AMGxtO + -1.0 R_U...	C7H14O6		
M_m1004	myo-inositol_C6H12...	<input type="checkbox"/>	-1.0 R_ITR1 + R_Mlxtl + -1.0 R_MlxtO	C6H12O6		
M_m1005	myristic acid_C14H2...	<input type="checkbox"/>	R_C140xtl + -1.0 R_C140xtO + -1.0 R...	C14H28O2		
M_m1006	nicotinamide monon...	<input type="checkbox"/>	R_NMNxtl + -1.0 R_NMNxtO + -1.0 R_U...	C11H15N2O8P		
M_m1007	octadecanoyl-9-ene ...	<input type="checkbox"/>	R_C181xtl + -1.0 R_C181xtO + -1.0 R...			
M_m1008	oligopeptide	<input type="checkbox"/>	R_OPEPxtl + -1.0 R_OPEPxtO + -1.0 R...			
M_m1009	oxidized glutathione ...	<input type="checkbox"/>	R_OGTxtl + -1.0 R_OGTxtO + -1.0 R_U...	C20H32N6O12...		
M_m101	octadecanoyl-9-ene ...	<input checked="" type="checkbox"/>	-1.0 R_C181xtl + R_C181xtO			
M_m1010	oxygen	<input type="checkbox"/>	R_O2xtl + -1.0 R_O2xtO + -1.0 R_U227			
M_m1011	palmitic acid_C16H3...	<input type="checkbox"/>	R_C160xtl + -1.0 R_C160xtO + -1.0 R...	C16H32O2		
M_m1012	peptide	<input type="checkbox"/>	R_PEPTxtl + -1.0 R_PEPTxtO + -1.0 R...			

W innych modelach metabolity zewnętrzne są oznaczone rozszerzeniem np. „\_xtl” bądź „\_xt” (np.: **M\_example\_xtl**). Aby program poprawnie rozpoznał określony metabolit, metabolity zewnętrzne należy zdefiniować w następujący sposób:

Kliknij:

Solve -> externality tag

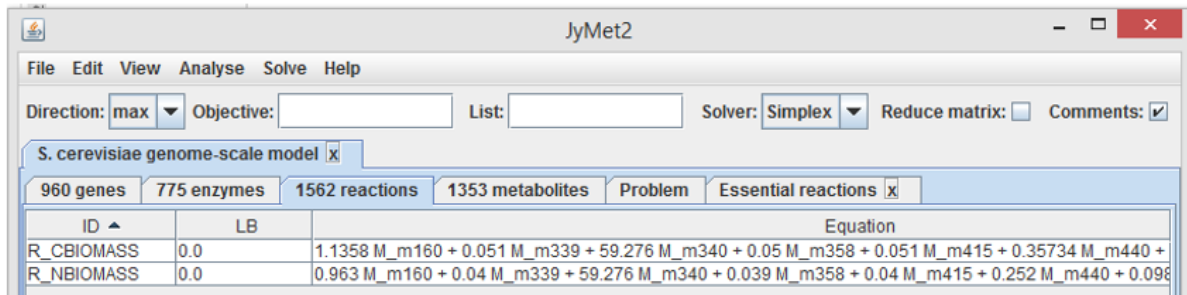
Po wyświetleniu okna dialogowego należy wpisać odpowiednią dla danego modelu etykietę dla zewnętrznych metabolitów.



4. Reakcja BIOMASS i GROWTH RATE

Jedną z reakcji znajdującą się w systemie to reakcja definiująca biomasę BIOMASS. Reakcja ta reprezentuje przepływ metabolitów w kierunku wszystkich istotnych komponentów biomasy. Zapotrzebowanie na dane składniki pokarmowe i energetyczne zdefiniowane w zapisie *Equation* w reakcji BIOMASS w postaci oznaczeń takich jak np. M\_m358. Przepływ metabolitów w BIOMASS reprezentuje

potencjał wzrostu (GROWTH RATE) organizmu. Z zapisu wynika, że inny skład biomasy cechuje drożdże piekarnicze hodowane w warunkach limitujących źródło węgla i limitujących źródło azotu.



Znajdź formułę BIOMASS i sprawdź, co wchodzi w skład tej reakcji. W tym celu kliknij:

Zakładka reaction -> Edit -> search, wprowadź szukaną frazę: BIOMASS

W celu powrócenia do wszystkich reakcji kliknij:

View -> Show -> All

5. Obliczenie biomasy i maksymalnego współczynnika wzrostu (maximal growth rate)

Aby rozpocząć symulację z JyMet ważne jest zdefiniowanie *funkcji celu*, wybranie metody analizy i zdefiniowanie problemu.

W tym celu kliknij:

Analyse -> Objective value.

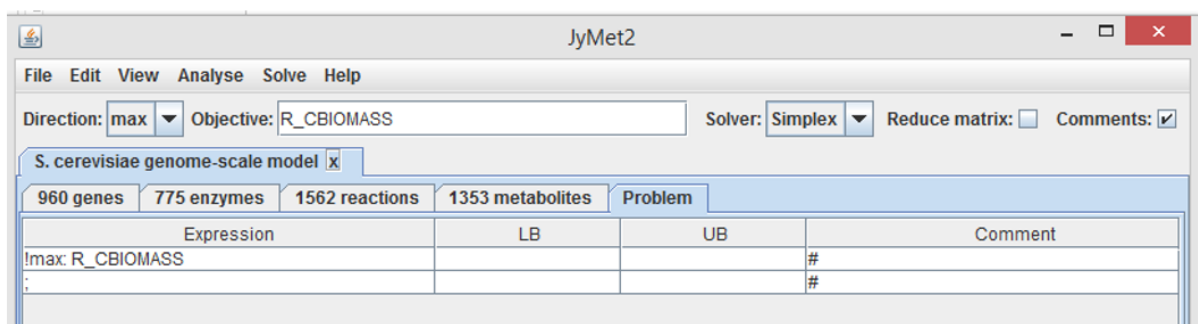
Wpisz w polu OBJECTIVE znaną regułę dla reakcji BIOMASS, ustaw „Direction” na max.

Kliknij:

Solve -> Write problem

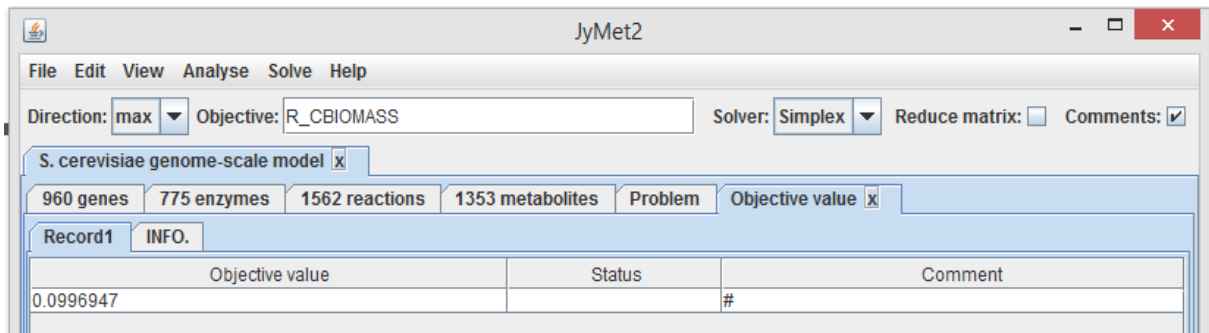
Po pojawieniu się dwóch wierszy w zakładce Problem, kliknij:

Solve -> Solve



Tak zdefiniowany problem pozwala programowi obliczyć teoretyczny maksymalny przepływ metabolitów przez reakcję opisującą tworzenie biomasy (reakcja BIOMASS).

Tempo przyrostu biomasy zależy od składu pożywki, oraz od dostępności preferowanych składników odżywczych. W tym ćwiczeniu, przy założeniu maksymalnego transportu źródła węgla do komórki (glukozy) wartość przepływu jest równa 0.0996947 (mM glukozy /h/g suchej masy komórek).



6. Oblicz maksymalny współczynnik wzrostu (max GROWTH).

Jaki wynik otrzymano? Czy reakcje BIOMASS i GROWTH różnią się?

## 4.2. Sprawdzanie istotności reakcji w modelu, dla przepływu metabolitów w kierunku tworzenia biomasy oraz identyfikacja istotnych genów

W modelu iTO977 dyfuzja glukozy z pożywki do cytoplazmy jest zdefiniowana jako reakcja **R\_GLCxtl**. W tym przypadku reakcja została napisana w kierunku pobierania glukozy z pożywki. Zewnętrzna glukoza, oznaczona symbolicznie **M\_m54**, transportowana jest do cytoplazmy, gdzie definiuje się ją odrębnym symbolem **M\_m960**. Reakcja ta jest więzami LB i UB w stronę „konsumpcji” glukozy (tutaj: LB = 1, UB = 1). Jeśli przepływ w reakcji transportu glukozy do komórki ma wartość „1” dla UB, to oznacza, że szybkość reakcji transportu wynosi 1 mM glukozy (**M\_m54**) w czasie 1 h na gram suchej masy komórek.

ID	LB	Equation	UB	Rule
R_GLCxtl	1.0	M_m54 = M_m960	1.0	#Uptake of alpha-D-glucos

Aby zmienić skład pożywki należy otworzyć bądź zamknąć strumień przepływu metabolitów w danych reakcjach. Można to osiągnąć poprzez zmianę granic przepływu metabolitów (*LB-lower bound*, *UP-upper bound*) w danej reakcji.. Taki zabieg możemy wykonać na dwa sposoby:

- poprzez zmianę granic przepływu bezpośrednio w modelu lub
- ustaleniu nowych granic przepływu w zakładce problemy, co jest lepszym rozwiązaniem, ponieważ nie modyfikujemy źródłowej wersji modelu

Wykonaj poszczególne kroki:

Expression	LB	UB	Comment
!max: R_CBIOMASS			#
R_GLCxtl	0.0	0.0	#

Wpisz w pierwszym wierszu zakładki *problem* max BIOMASS i zamknij przepływ dla reakcji glukozy. Ustaw wartości LB i UB = 0.

Po wpisaniu reakcji w zakładce problemy sprawdź max BIOMASS (*objective value*). Jeśli zamkniemy transport dla źródła węgla, produkcja biomasy powinna wynieść 0.

1. Sprawdzenie produkcji biomasy w komórkach hodowanych w obecności alternatywnego źródła węgla

Do problemu zdefiniowanego powyżej dodaj jeden wiersz:

Edit -> insert rows -> wpisz: 1

W zakładce reakcje poszukaj reakcję dla transportu glicerolu (**R\_GLxtl**), skopiuj ją i wklej w kolejnym wierszu tabeli *problem*. Ustaw granice przepływu w kierunku

Expression	LB	UB	Comment
R_GLxtl	1.0	1.0	#
!max: R_CBIOMASS			#
R_GLCxtl	0.0	0.0	#

konsumpcji glicerolu (dla R\_GLxtl ustaw wartości LB=1, UB=1), a zamknij dla glukozy (dla R\_GLCxtl ustaw wartości LB=0, UB=0).

Oblicz wartość objective value dla max BIOMASS.

Jaką wartość otrzymasz? Czy jest ona taka sama jak dla komórek drożdży rosnących w pożywce, w której źródłem węgla jest glukoza? Wyciągnij wnioski z obserwacji?

2. Analiza istotności reakcji biochemicznych ( **Essential reactions**).

Metoda **Essential reactions** SurreyFBA służy do weryfikacji istotności udziału poszczególnych reakcji w analizowanym systemie. Dla każdej reakcji ujętej w systemie program ogranicza przepływ do 0 i oblicza maksymalną wartość dla funkcji celu (*objective function*). Jeśli deaktywacja poszczególnych reakcji spowoduje, że funkcja celu wynosi 0, reakcja uważana jest wówczas za istotną dla funkcji celu. Program przedstawia reakcje, które muszą być aktywne podczas wyznaczonego celu (np. wzrostu komórek, produkcji biomasy bądź innej funkcji).

Znajdź istotne reakcje dla wzrostu komórek w podłożu z glukozą.

Usuń wiersze w zakładce problemy:

Zaznacz wiersze -> Edit -> Delete rows

W polu objective wpisz R\_GROWTH,; direction ustaw na "max"

Solve -> Write problem

Po pojawieniu się dwóch wierszy w zakładce *Problem*, kliknij:

Solve -> Solve

Oblicz wartość dla **objective value** w celu upewnienia się, że wzrost jest równy 0.0996947 (mM glukozy /godz/g suchej masy komórek).

Do obliczenia essential reactions należy zmienić funkcję z "Objective value" na "Essential reactions"

ID	LB	UB	Rule	Comment
R_2MBACT	0.0	1000.0		#Transport, Extracellular; 2-methylbutyl transport (extracel...
R_2MBACxtl	0.0	0.0		#Exchange reactions; Uptake of 2-methylbutyl acetate; M...
R_2MBACxtO	0.0	1000.0		#Exchange reactions; Excretion of 2-methylbutyl acetate; ...
R_2MBALDt	-1000.0	1000.0		#Transport, Extracellular; 2-Methylbutanal transport (extra...
R_2MBALDxtl	0.0	0.0		#Exchange reactions; Uptake of 2-methylbutylaldehyde; ...
R_2MBTOHt	-1000.0	1000.0		#Transport, Extracellular; 2-methyl-1-butanol transport (e...
R_2MPPAlt	-1000.0	1000.0		#Transport, Extracellular; 2-methylpropanal transport (ext...
R_2PHETOHt	-1000.0	1000.0		#Transport, Extracellular; 2-phenylethanol reversible tran...
R_3C3HMPt	-1000.0	1000.0		#Transport, Extracellular; 2-Isopropylmalate transport, diff...
R_3MBALDt	-1000.0	1000.0		#Transport, Extracellular; 3-methylbutanal transport (extra...
R_3MOPt	-1000.0	1000.0		#Transport, Extracellular; 3mop reversible trasport, M_m...
R_44DIMZYMSTxtl	0.0	0.0		#Exchange reactions; Uptake of 4,4-dimethylzymosterol; ...
R_44DIMZYMST...	0.0	1000.0		#Exchange reactions; Excretion of 4,4-dimethylzymostero...
R_4AR7t	-1000.0	1000.0		#Transport, Extracellular; 4-Aminobenzoate mitochondria

Kliknij:

Analysis -> zaznacz Essential reactions, Solve -> Solve

Obliczenia potrwają kilka minut (!!!).

Dlaczego proces prowadzący do uzyskania wyniku tą metodą jest stosunkowo kosztowny obliczeniowo?

Program wygeneruje następującą tabelę:

ID	Comment
	#195 essential reactions.
R_ACC1	#Acetyl-CoA carboxylase: M_m340 + M_m359 + M_m570 = M_m335 + M_m729 + M_m768
R_ACS1	#Acetyl-coenzyme A synthetase 1: M_m340 + M_m566 + M_m612 = M_m339 + M_m570 + M...
R_ADE1	#Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase: M_m164 + M_m340 + M_m...
R_ADE13_1	#Adenylosuccinate lyase: M_m135 = M_m314 + M_m670
R_ADE16_1	#Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase: M_m176 + M_m314 = M_m...
R_ADE16_2	#IMP cyclohydrolase: M_m320 = M_m422
R_ADE2	#Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase: M_m164 = M_m315 + M_m359
R_ADE4	#Amidophosphoribosyltransferase: M_m324 + M_m458 = M_m323 + M_m457 + M_m651
R_ADE5_7_1	#Phosphoribosylamine--glycine ligase: M_m323 + M_m340 + M_m682 = M_m335 + M_m49...
R_ADE5_7_2	#Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase: M_m203 + M_m340 = M_m315 + M_m335
R_ADE6	#Phosphoribosylformylglycinamide synthase: M_m340 + M_m458 + M_m493 = M_m203 +
R_ADE8	#Phosphoribosylglycinamide formyltransferase: M_m176 + M_m492 = M_m493 + M_m840
R_AKGxtO	#Excretion of 2-oxoglutarate: M_m899 = M_m3
R_ARE2	#Sterol O-acyltransferase 2: M_m572 + M_m662 = M_m612 + M_m661



Wyeksportuj otrzymaną tabelę do pliku EXCEL.

Kliknij:

File -> Save table

Nazwij plik jako: essential reactions glucose.xls

3. Wykonaj obliczenia **essential reactions** dla hodowli na pożywce z glicerolem.

Wygenerowaną przez program tabelę zapisz jako essential reactions glycerol.xls

Wykorzystując wiedzę ze studiów I stopnia, dotyczącą szlaków metabolicznych, odpowiedz, jakie znasz przykładowe enzymy, które są aktywne podczas wzrostu komórek na podłożu zawierającym glicerol, a nie są aktywne na podłożu zawierającym glukozę?

Otrzymane wyniki porównaj w nowym dokumencie Excel, gdzie dwie listy essential reactions znajdują się obok siebie w kolumnach. Wskaż reakcje, które są istotne dla wzrostu tylko w obecności glukozy, oraz te, które są niezbędne do wzrostu tylko w obecności glicerolu. Analizuj wszystkie reakcje w kolumnach, porównaj wyniki wygenerowane dla dwóch źródeł węgla. Zrób przerwę w wierszach jeśli zauważysz, że reakcje nie pokrywają się.

	A	B
1	#199 essential reactions glycerol	#195 essential reactions glucose
2	R_ACC1	R_ACC1
3	R_ACS1	R_ACS1
4	R_ADE1	R_ADE1
5	R_ADE13_1	R_ADE13_1
6	R_ADE16_1	R_ADE16_1
7	R_ADE16_2	R_ADE16_2
8	R_ADE2	R_ADE2
9	R_ADE4	R_ADE4
10	R_ADE5_7_1	R_ADE5_7_1
11	R_ADE5_7_2	R_ADE5_7_2
12	R_ADE6	R_ADE6
13	R_ADE8	R_ADE8
14	R_ADH3	R_AKGxtO
15	R_ARE2	R_ARE2
16	R_ARG1	R_ARG1
17	R_ARG3	R_ARG3
18	R_ARG4	R_ARG4
19	R_ARG5_1	R_ARG5_1
20	R_ARG5_2	R_ARG5_2
21	R_ARG8	R_ARG8
22	R_ARO1_1	R_ARO1_1
23	R_ARO1_2	R_ARO1_2

Wybrane, istotne reakcje zaznacz i przekopiuj do nowego, pustego arkusza w pliku Excel. Wykorzystując wiedzę zdobytą na studiach dotyczącą szlaków metabolicznych, skomentuj uzyskane wyniki.

4. Identyfikacja genów

Przyjrzyj się reakcjom, które reprezentowane są tylko podczas wzrostu w obecności jednego źródła węgla, a nie występują w tabeli wyników w przypadku drugiego źródła węgla. Geny można zidentyfikować na dwa sposoby:

- a. W programie SurreyFBA wyszukaj w zakładce *reakcje* wybrane reakcje posługując się komendą

Edit->Search

Odczytaj nazwy genów w kolumnie „rule”. Przeszukaj internetowe bazy danych (np. <http://www.yeastgenome.org>) aby znaleźć nazwy enzymów kodowanych przez te geny. Wyszukaj w ten sposób informację o genie **YLR377C**. Podaj nazwę enzymu, kodowanego przez gen. Jaką reakcję katalizuje ten enzym i w jakim szlaku metabolicznym uczestniczy?

- b. Za pomocą dokumentu Excel opisującego wszystkie reakcje i metabolity. Otwórz plik *essentials reactions glucose (i glycerol)*. W kolumnie B znajdź poszczególne reakcje. W kolumnie C wypisane są nazwy enzymów biorących udział w danej reakcji.

### 4.3. Analiza istotności genów – funkcja *knock-out*; opis reakcji; przebieg reakcji

1. Sprawdzanie istotności genów za pomocą funkcji *knock-out*.

Dzięki funkcji *knock-out* można dowiedzieć się o istotności genów biorących udział w reakcjach wewnątrzkomórkowych w określonych warunkach zdefiniowanych w zakładce *problem*. Dla każdej reakcji, program wyłącza geny biorące w niej udział (jest to symulacja delekcji genu), a następnie oblicza maksymalną wartość funkcji celu (np.: *objective value* dla *R\_GROWTH*). Jeżeli wartość funkcji celu wyniesie „0” oznacza to iż wyłączony podczas symulacji gen jest istotny. Innymi słowy, usunięcie genu powoduje zaburzenie ważnych szlaków metabolicznych i zahamowanie wzrostu komórek.

Direction: max		Objective:		List: R_GLCxtl
S. cerevisiae genome-scale model				
960 genes		775 enzymes		1562 reactions
1353 metabolites		Problem		Knock-out analysis
Expression	LB	UB		
!max: R_CBIOMASS			#	
R_GLCxtl	0.0	0.0	#	
R_GLxtl	1.0	1.0	#	

Sprawdź jakie geny są niezbędne do wzrostu drożdży na pożywce zawierającej glicerol.

W tym celu kliknij

Analyse -> Knock-out analysis.

Wpisz w polu OBJECTIVE znaną regułę dla reakcji GROWTH, ustaw „Direction” na max.

Kliknij:

Solve -> Write problem

Po pojawieniu się dwóch wierszy w zakładce *Problem* dodaj jeszcze jeden wiersz. W utworzonych polach wpisz nazwy reakcji dla przepływu glukozy i glicerolu. Dla **R\_GLxtl** ustaw wartości LB=1, UB=1, a dla **R\_GLCxtl** ustaw wartości LB i UB = 0

kliknij:

Solve -> Solve

Obliczenia potrważą kilka minut

ID	Transition rate	
YBL030C	0.0556717	OPTIMAL
YBR085W	0.0556717	OPTIMAL
YMR056C	0.0556717	OPTIMAL
YNL141W	0.0556717	OPTIMAL
YKL106W	0.0556717	OPTIMAL
YLR027C	0.0556717	OPTIMAL
YNR033W	0.0556717	OPTIMAL
YNR016C	0.0	OPTIMAL
YBL015W	0.0556717	OPTIMAL
YJL200C	0.0556717	OPTIMAL
YLR304C	0.0556717	OPTIMAL
YKL192C	0.0556717	OPTIMAL
YML120C	0.0556717	OPTIMAL
YAL054C	0.0556717	OPTIMAL
YLR153C	0.0556717	OPTIMAL

Powtórz powyższe czynności tym razem dla glukozy (w zakładce *Problem* zmień wartości LB i UB dla odpowiednich przepływów). Wyniki wyeksportuj do osobnych plików Excel. Nazwij je knockout analysis – wzrost na glukozie oraz knockout analysis – wzrost na glicerolu. Wypisz wszystkie geny, kodujące enzymy, które są niezbędne do spełnienia funkcji celu gdy komórki rosną w pożywce zawierającej glicerol. Tą samą symulację przeprowadź dla pożywki zawierającej glukozę.

W Excelu dokonaj porównania tylko istotnych reakcji (transition rate = 0). Zaznacz różnymi kolorami geny istotne dla wzrostu na danym źródle węgla. Zapisz plik pod nazwą: porównanie knock-out glukoza i glicerol.xls

	A	B	C	D
1	R_ACC1	0.0	OPTIMAL	#R_ACC1
2	R_ACC1	0.0	OPTIMAL	#R_ACC1
3	R_ACS1	0.0	OPTIMAL	#R_ACS1
4	R_ACS1	0.0	OPTIMAL	#R_ACS1
5	R_ADE1	0.0	OPTIMAL	#R_ADE1
6	R_ADE1	0.0	OPTIMAL	#R_ADE1
7	R_ADE13_1	0.0	OPTIMAL	#R_ADE13_1
8	R_ADE13_1	0.0	OPTIMAL	#R_ADE13_1

Pamiętaj o sprawdzeniu poprawności problemu za pomocą **objective value** (4.1 pkt5)!

2. Umiejętność opisu reakcji

Do modelu został dołączony dokument w formacie Excel, w którym znajdują się szczegółowo opisane reakcje oraz metabolity. Dokument ułatwia zrozumienie reakcji znajdujących się w modelu. Otwórz dokument pod nazwą „opis 5 reakcji” i przeanalizuj jego zawartość.

Folder: SurreyFBA ćwiczenia - >Ćw.3 -> 2. Opis reakcji -> opis 5 reakcji.xls

Dla każdej uzyskanej reakcji (z zadania 1, pięć pierwszych nie licząc xtl), niezbędnej podczas wzrostu komórki na glicerolu, wypisz:

- a) nazwy genów,
- b) kompartmenty,
- c) subsytemy,
- d) nazwy substratów i produktów.

3. Przyporządkowanie metabolitów do oznaczeń w modelu.

Znajdź metabolit o nazwie **m794**.

Kliknij:

Edit->serach-> wpisz: m794

Odpowiedz na pytania:

- a) jaka jest nazwa tego metabolitu?
- b) wypisz wszystkie reakcje, w których bierze udział i zaznacz te, w których m794 jest tylko produktem reakcji.
- c) Czy metabolit pod tą samą nazwą (nie numerem) znajduje się w innym kompartmentcie? Jeśli tak, to wypisz numer/y.

4.Przebieg reakcji:

W nowym pliku Excel zapisz przebieg wyszukanych reakcji z opisem enzymów oraz metabolitów biorących udział w danej reakcji (numery oraz nazwy) począwszy od metabolitu **m1171**, skończywszy na **m1077** (5 reakcji, nie uwzględniając transportu m1171 z cytoplazmy do mitochondrium).

## Ćwiczenie 5.

### Analiza przepływu metabolitów (FBA) w MUFINS1.0. Wstęp do analizy sieci Petriego QSSPN (ang. *Quasi-Steady State Petri Net*).

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z narzędziem FBA (ang. *flux balance analysis*) służącym do analizy przepływu metabolitów w modelach w skali genomowej (GSMN). Poznamy również nowe narzędzie o nazwie QSSPN, które umożliwia integrację modeli zapisanych w różnych formatach (ang. *multi-formalism simulation*), modeli w skali genomowej omawianych na ćwiczeniu 4 i dynamicznych modeli typu sieć Petriego czy modeli kinetycznych.

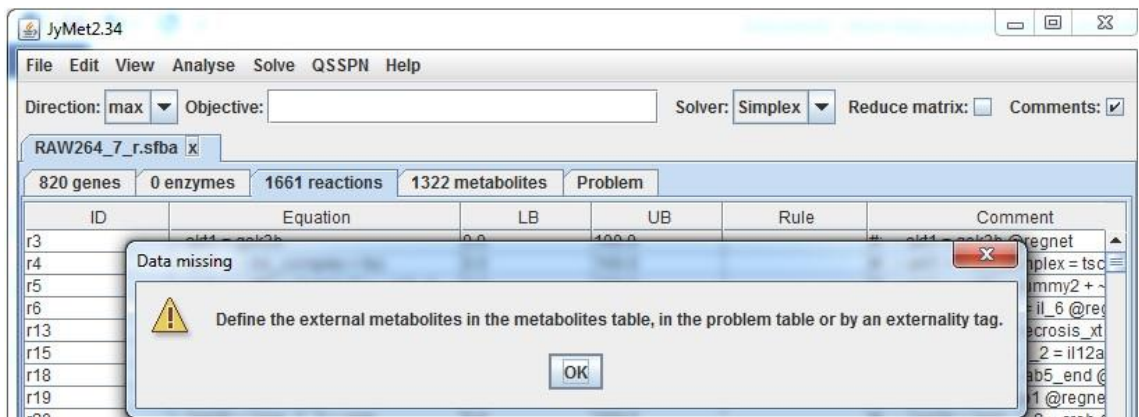
#### Bibliografia:

1. Wu H, von Kamp A, Leoncik V, Mori W, Sahin N, Gevorgyan A, Linley C, Grabowski M, Mannan AA, Stoy N, Stewart GR, Ward LT, Lewis DJM, Sroka J, Matsuno H, Klamt S, Westerhoff HV, McFadden J, Plant NJ, Kierzek AM. MUFINS: multi-formalism interaction network simulator. *Systems Biology and Applications*. 2016, 2, 16032.

### 5.1 Wizualizacja wyników FBA w JyMet na przykładzie modelu makrofaga myszy

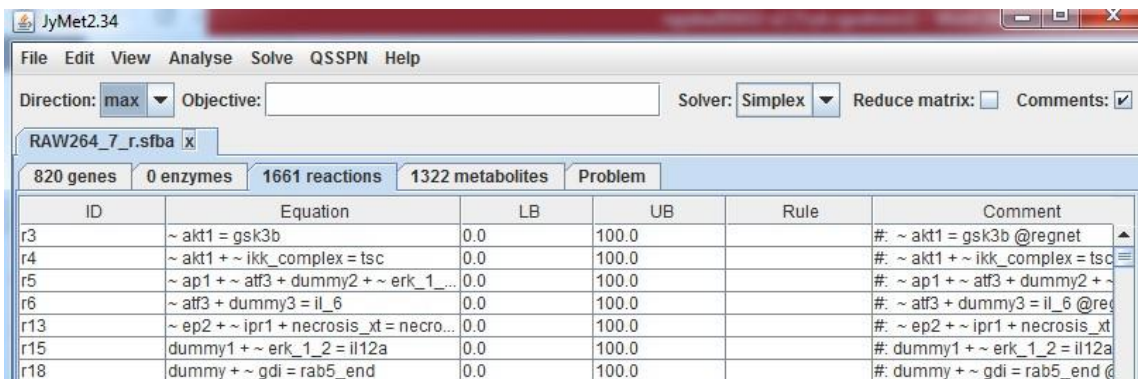
Wykorzystamy do tego celu model, który został stworzony do badania reakcji typu gospodarz-patogen pomiędzy makrofagem myszy, a *Mycobacterium tuberculosis* w czasie infekcji. Przeprowadzimy symulację, w której zostanie zobrazowany przepływ metabolitów w kierunku reakcji syntezy tlenku azotu (NO) w obecności lipopolisacharydu (LPS) oraz inhibitora kinazy Mek1 na ścieżkę sygnałową aktywującą produkcję tlenku azotu (NO) w komórce makrofaga [1].

1. Otwórz zawartość dysku C i znajdź folder **MUFINS1.0**. Ścieżka dostępu: MUFINS1.0/git/MUFINS1.0/JyMet . Następnie uruchom program **JyMet 2.34**
2. Otwórz model makrofaga **RAW264\_7\_r.sfba** poprzez kliknięcie File -> Open model (ścieżka dostępu SurreyFBA\MUFINS1.0\git\MUFINS1.0\_Examples\RAW264\_7\_r\RAW264\_7\_r.sfba)  
Pojawi się okno dialogowe, które poinformuje nas, że metabolity zewnętrzne są niezdefiniowane.



3. Kliknij przycisk OK. by potwierdzić ten komunikat.

Jak możesz zauważyć, zaimportowany model o rozszerzeniu sfba wygląda bardzo podobnie do oryginalnego modelu o rozszerzeniu sbml (patrz ćwiczenia 4). Jednakże zakładka „enzymy” pokazuje obecnie zero wpisów. Jako że format SFBA wykorzystuje tabelę powiązań genu i reakcji, enzymy są nieistotne dla działania modelu - zostały odrzucone. Import modeli w formacie SBML pozwala na zdefiniowanie powiązań gen/enzym, jednak format SFBA jest szybszy i wystarczający do symulacji, którymi będziemy się dzisiaj zajmować.



4. Przejdź do zakładki „reakcje”. W tym modelu równania reakcji poprzedzone znakiem „~” oznaczają inhibicję danej reakcji. Wszystkie reakcje części regulatorowej modelu są opatrzone wyrażeniem „@regnet” występującej w sekcji „komentarze”. Możliwość stymulacji i inhibicji reakcji w modelu metabolicznym na skalę genomową jest istotną innowacją programu SurreyFBA-MUFINS.

5. Definiowanie metabolitów zewnętrznych (patrz ćwiczenie 4).

Metabolity zewnętrzne reprezentują zarówno źródło, jak i ujście przepływów metabolitów. Jeżeli nie zdefiniujemy metabolitów zewnętrznych, to przepływ metabolitu w sieci zawsze będzie wynosił 0, gdyż nie będzie jego źródła. W tym modelu metabolity zewnętrzne mają w swoich oznaczeniach rozszerzenie „\_xt” (np. phd\_xt). Z tego

powodu, aby program mógł poprawnie rozpoznać metabolity zewnętrzne, należy je zdefiniować w następujący sposób:

Kliknij:

Solve -> Externality tag

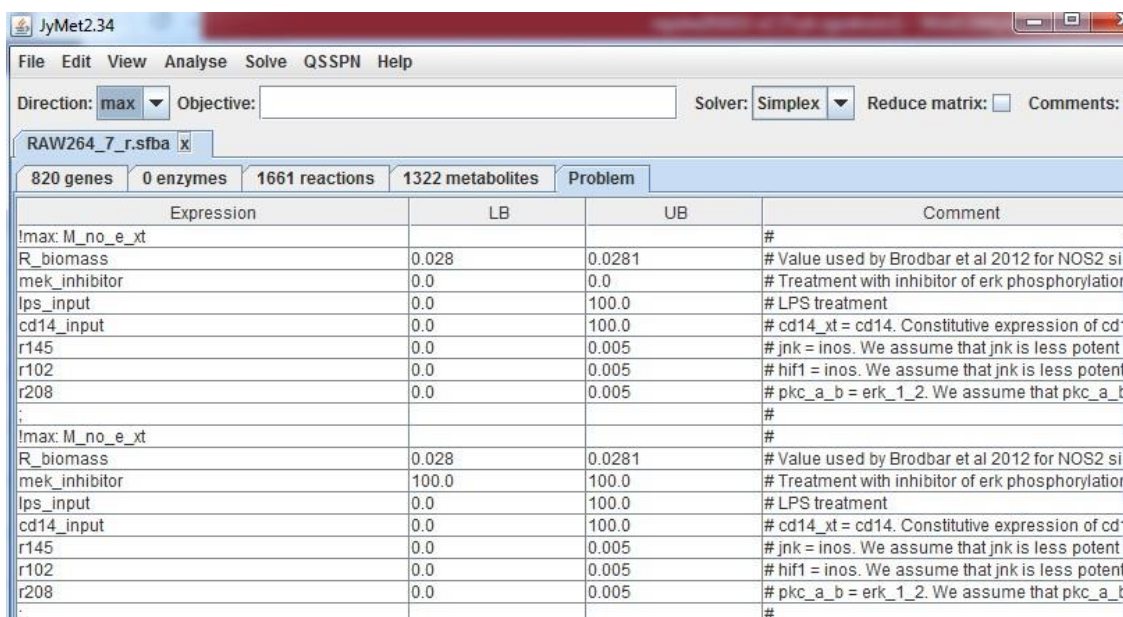
Po wyświetleniu okna dialogowego należy wpisać odpowiednią dla tego modelu etykietę zewnętrznych metabolitów („\_xt”).

6. Otwarcie problemu.

Aby rozpocząć symulację należy otworzyć plik z opisem problemu.

Kliknij:

File -> Open problem, wybierz Model -> Folder RAW 264.7 -> otwórz plik:  
**simulate.pfile**



Expression	LB	UB	Comment
!max: M_no_e_xt			#
R_biomass	0.028	0.0281	# Value used by Brodbar et al 2012 for NOS2 si
mek_inhibitor	0.0	0.0	# Treatment with inhibitor of erk phosphorylation
lps_input	0.0	100.0	# LPS treatment
cd14_input	0.0	100.0	# cd14_xt = cd14. Constitutive expression of cd
r145	0.0	0.005	# jnk = inos. We assume that jnk is less potent
r102	0.0	0.005	# hif1 = inos. We assume that jnk is less potent
r208	0.0	0.005	# pkc_a_b = erk_1_2. We assume that pkc_a_b
:			#
!max: M_no_e_xt			#
R_biomass	0.028	0.0281	# Value used by Brodbar et al 2012 for NOS2 si
mek_inhibitor	100.0	100.0	# Treatment with inhibitor of erk phosphorylation
lps_input	0.0	100.0	# LPS treatment
cd14_input	0.0	100.0	# cd14_xt = cd14. Constitutive expression of cd
r145	0.0	0.005	# jnk = inos. We assume that jnk is less potent
r102	0.0	0.005	# hif1 = inos. We assume that jnk is less potent
r208	0.0	0.005	# pkc_a_b = erk_1_2. We assume that pkc_a_b
:			#

W pliku zdefiniowane są trzy różne symulacje oddzielone znakami „;”. Te eksperymenty *in silico* pozwalają na zbadanie wpływu LPS oraz inhibitora kinazy Mek1 na maksymalny współczynnik produkcji tlenu azotu (II) jako czynnika biorącego udział w odpowiedzi immunologicznej.

Dla każdego problemu, wartość „Objective function” jest nastawiona na maksymalną produkcję tlenu azotu (II) w środowisku zewnętrznym (!max: M\_no\_e\_xt). Kolejne rzędy są parametrami danych reakcji, włączając wymagany wzrost (R\_biomass), poziom inhibitora MEK1 (mek\_inhibitor) oraz LPS (lps\_input), a także maksymalny przepływ dla trzech reakcji w ścieżce regulatorowej (r145, r102, r208).

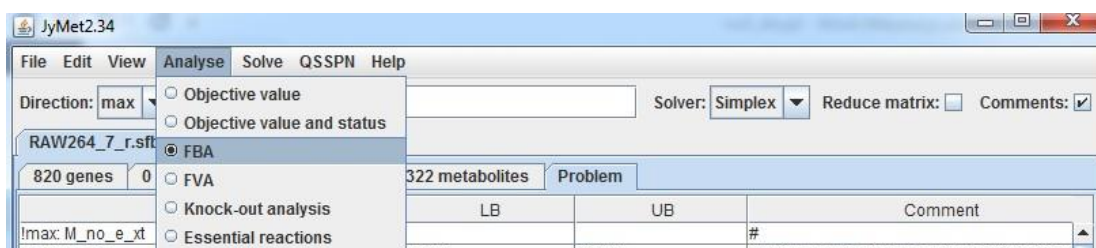
Patrząc na wartości dla inhibitora Mek1, możesz zauważyć, że jedyną różnicą pomiędzy symulacją pierwszą, a drugą jest brak oraz obecność inhibitora MEK1 (patrz LB i UB). Trzeci problem zakłada brak inhibitora Mek1 oraz brak LPS.

## 7. Przeprowadzenie Flux Balance Analysis (FBA).

Analiza FBA jest szeroko stosowana do badania sieci powiązań biochemicznych w szczególności rekonstrukcji sieci metabolicznych w skali genomowej (GSMN) zawierających dane na temat wszystkich poznanych reakcji metabolicznych wraz z genami, które kodują poszczególne enzymy danego organizmu. FBA oblicza przepływ metabolitów przez sieć metaboliczną, a tym samym pozwala na przewidzenie tempa wzrostu organizmu oraz szybkości produkcji interesującego nas metabolitu.

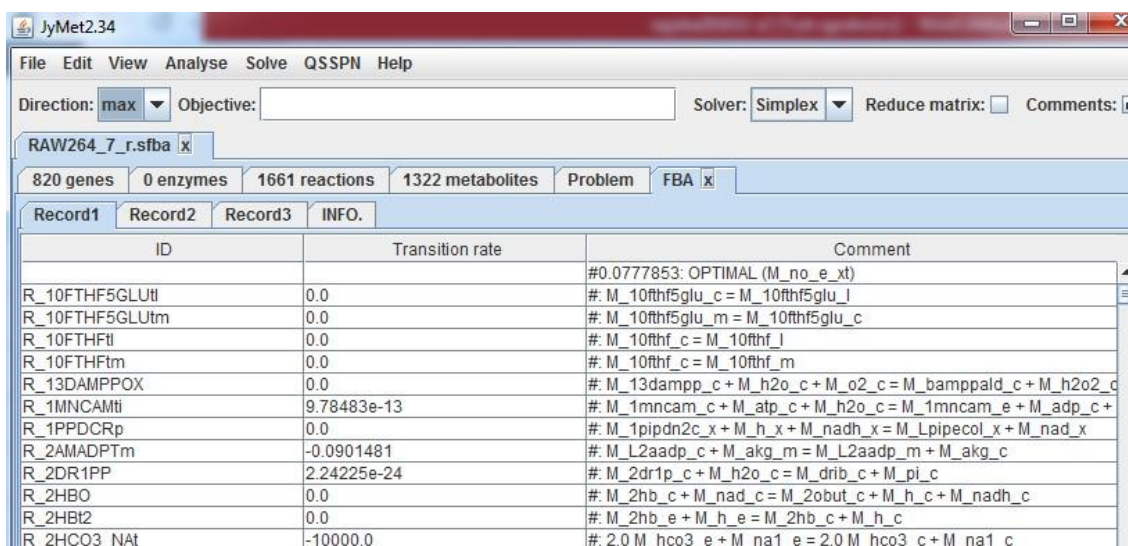
Kliknij:

Analyze -> FBA



Następnie:

Solve -> Solve



Gdy symulacja zostanie przeprowadzona, wyniki są umieszczone w formie tabeli, przy czym każda symulacja z pliku problemu jest przedstawiona w oddzielnej zakładce („Record1-3”). Ponadto zakładka „INFO” zawiera dziennik symulacji, w tym poleceń używanych do uruchomienia narzędzia symulacyjnego.



The screenshot shows the JyMet2.34 software interface. At the top, there is a menu bar with 'File', 'Edit', 'View', 'Analyse', 'Solve', 'QSSPN', and 'Help'. Below the menu bar, there are fields for 'Direction: max', 'Objective:', 'Solver: Simplex', 'Reduce matrix: ', and 'Comments: '. The main window displays a table with the following data:

ID	Transition rate	Comment
R_10FTHF5GLUtl	0.0	#0.0777853: OPTIMAL (M_no_e_xt)
R_10FTHF5GLUtm	0.0	#: M_10fthf5glu_c = M_10fthf5glu_l
R_10FTHFtl	0.0	#: M_10fthf5glu_m = M_10fthf5glu_c
R_10FTHFtm	0.0	#: M_10fthf_c = M_10fthf_l
		#: M_10fthf_c = M_10fthf_m

Przed przystąpieniem do wizualizacji należy ograniczyć ilość reakcji, która będzie brała udział w procesie. Jest to związane z wykorzystaniem mniejszej mocy obliczeniowej komputera. Dlatego następnymi etapami są:

- a. wybór elementów sieci, które nas interesują najbardziej
- b. wybór jedynie reakcji, które mają niezerowe wartości przepływu metabolitów.

8. Wybór interesujących nas reakcji.

W tym ćwiczeniu, zawężymy symulację do ścieżki sygnałowej. W tym modelu, wszystkie reakcje regulatorowe mają dodane w komentarzach „@regnet”. Będziemy się dalej zajmować tylko tymi reakcjami. Wyszukaj je dzięki: Edit -> Search -> „@regnet”

9. Wybór reakcji z wartością przepływu inną od zera.

Kliknij na nagłówek kolumny „Transition rate”. Pozwoli Ci to uszeregować metabolity od najwyższej do najniższej wartości przepływu. Zaznacz wszystkie reakcje, których przepływ jest różny od zera.

JyMet2.34

File Edit View Analyse Solve QSSPN Help

Direction: max Objective: Solver: Simplex Reduce matrix: Comments:

RAW264\_7\_r.sfba

820 genes 0 enzymes 1661 reactions 1322 metabolites Problem FBA

Record1	Record2	Record3	INFO.
ID	Transition rate	Comment	
cd14_input	0.0388927	# cd14_xt = cd14 @regnet	
r71	0.0388927	# cd14 + lps = tlr4 @regnet	
lps_input	0.0388927	# lps_xt = lps @regnet	
R_NOS2	0.0388927	# M_nadph_c + 2.0 M_nwharg_c + 2.0 M_o2_c + & inos = 2.0 M_citr_DAS...	
r96	0.0288927	# erk_1_2 + ~ p38 = inos @regnet	
r161	0.0288927	# mek1 + ~ mek1_xt + ~ ptpb_xt = erk_1_2 @regnet	
r221	0.0288927	# raf_1 = mek1 @regnet	
r226	0.0288927	# ras = raf_1 @regnet	
r227	0.0288927	# rasgef1b = ras @regnet	
r269	0.0288927	# tlr4 = rasgef1b @regnet	
r130	0.01	# ~ a20 + irak4 = traf6 @regnet	
r23	0.01	# ~ irakm + myd88 = irak4 @regnet	
r265	0.01	# tirap_mal = myd88 @regnet	
r272	0.01	# tlr4 = tirap_mal @regnet	
r284	0.01	# traf6 = tak_tab @regnet	
r164	0.005	# ~ dusp1 + mkk_3_6 = jnk @regnet	
r102	0.005	# hif1 + ~ p38 = inos @regnet	
r34	0.005	# hif1a + ~ phd = hif1 @regnet	
r113	0.005	# ikk_complex = hif1a @regnet	
r145	0.005	# jnk + ~ p38 = inos @regnet	
r257	0.005	# tak_tab = ikk_complex @regnet	
r258	0.005	# tak_tab = mkk_3_6 @regnet	
r242	0.0	# ~ a20 + rip2 = traf6 @regnet	
r4	0.0	# ~ akt1 + ~ ikk_complex = tsc @regnet	
r178	0.0	# ~ akt1 + nod2 = caspase9 @regnet	

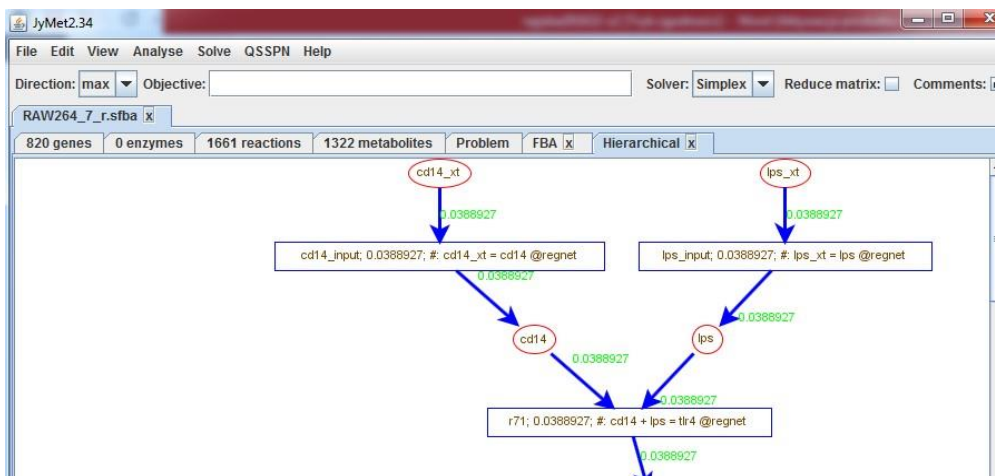
## 10. Generowanie wizualizacji w JyMet

By automatycznie wygenerować wizualizację, należy skorzystać z funkcji:

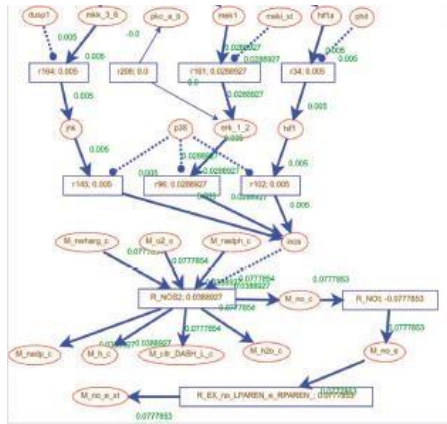
View -> Layout -> hierarchical

Układ przepływów zostanie przedstawiony jako Sieć Petriego (graf dwudzielny), gdzie prostokąty reprezentują tzw. „przejścia”, a okręgi reprezentują „miejsca”. Strzałki oznaczają przepływ metabolitów, przy czym przerywane linie zakończone kółkiem bez wypełnienia oznaczają inhibicję, zaś takie z wypełnieniem, oznaczają aktywację.

Powinieneś otrzymać:



Poprzez kliknięcie na prawy przycisk myszy możesz znaleźć narzędzie do zbliżenia/oddalania obrazu, tak, by uzyskać obraz całej sieci:



Zapisz wizualizację poprzez kliknięcie:

File -> Save graph (na pulpicie)

Możesz otworzyć później ten plik w JyMet używając:

View -> Layout -> Custom

11. Jakie możesz wyciągnąć wnioski? Spójrz na wartość przepływu (Flux) dla reakcji powstawania NO w komórce (reakcja: R\_NOS2). Jak inhibitor Mek1 wpływa na produkcję NO? Jak LPS wpływa na ścieżkę sygnałową?

12. Zamknij program

## 5.2 Dynamiczne FBA (dFBA). Symulacja QSSPN (ang. *Quasi-Steady State Petri Net*) ścieżki sygnałowej kortyzolu w wątrobie ludzkiej.

Kortyzol to ważna cząsteczka sygnałowa, która działa m.in. w czasie odpowiedzi organizmu na stres. Poziom kortyzolu we krwi jest rozpoznawany przez trzy receptory: receptor glukokortykoidowy (GR), receptor pregnanu X (PXR) oraz receptor mineralokortykoidowy (MR). Tak więc sygnał kortyzolu musi być rozpoznany przez trzy niezależne ścieżki sygnałowe, aby mogło dojść do reakcji organizmu. W dalszej części ćwiczeń będziemy pracować z modelem w skali genomowej metabolizmu komórki wątroby ludzkiej, połączonym z modelem dynamicznym regulacji poziomu glukozy i mleczanu we krwi (model ODE, ang. *Ordinary Differential Equation*). Razem modele te tworzą tzw. dynamiczne FBA (dFBA). W modelu tym ustawiono jako funkcję celu regenerację glukozy z mleczanu.

dFBA zostało połączone w sieci Petriego z modelem ścieżki sygnałowej kortyzolu. Zintegrowanie modeli, zapisanych w różnych formatach jest możliwe dzięki zastosowaniu tzw. MUFINS (ang. *MULTI-Formalism Interaction Network Simulator*). W SurreyFBA osiągnięto to przy pomocy narzędzia QSSPN [1].

### 1. Przeprowadzanie symulacji QSSPN w JyMet2.34

Aby przeprowadzić symulację w JyMet należy załadować trzy pliki. Pierwszy jest modelem w formacie GSMN, który został nazwany **recon2\_xt.PIPES.CORE.v1.sfba**. Otwórz go za pomocą:

File -> Open model (ścieżka dostępu:

C:\SurreyFBA\MUFINS1.0\git\MUFINS1.0\_Examples\NR\_Recon2) Powinieneś

otrzymać taki wynik:

ID	Equation	LB	UB	Rule	Comment
R_10FTHF5GLUll	M_10fthf5glu_c = M_10fthf5glu_l	0.0	1000.0		#5-glutamyl-10FTHF transport
R_10FTHF5GLUm	M_10fthf5glu_m = M_10fthf5glu_c	0.0	1000.0		#5-glutamyl-10FTHF transport
R_10FTHF6GLUll	M_10fthf6glu_c = M_10fthf6glu_l	0.0	1000.0		#6-glutamyl-10FTHF transport
R_10FTHF6GLUm	M_10fthf6glu_m = M_10fthf6glu_c	0.0	1000.0		#6-glutamyl-10FTHF transport
R_10FTHF7GLUll	M_10fthf7glu_c = M_10fthf7glu_l	0.0	1000.0		#7-glutamyl-10FTHF transport
R_10FTHF7GLUm	M_10fthf7glu_m = M_10fthf7glu_c	0.0	1000.0		#7-glutamyl-10FTHF transport
R_10FTHFl	M_10fthf_c = M_10fthf_l	-1000.0	1000.0		#10-Formyltetrahydrofolate lysc
R_10FTHFlm	M_10fthf_c = M_10fthf_m	-1000.0	1000.0		#10-Formyltetrahydrofolate mit
R_11DOCRTSLt	M_11docrtsl_c = M_11docrtsl_m	-1000.0	1000.0		#11-deoxycortisol intracellular t
R_11DOCRTSLr	M_11docrtsl_c = M_11docrtsl_r	-1000.0	1000.0		#11-deoxycortisol intracellular t
R_11DOCRTSTm	M_11docrtstrn_c = M_11docrtstrn_m	-1000.0	1000.0		#11-deoxycorticosterone intrac
R_11DOCRTSTr	M_11docrtstrn_c = M_11docrtstrn_r	-1000.0	1000.0		#11-deoxycorticosterone intrac

Nie musisz zaznaczać metabolitów zewnętrznych (Solve -> Externality tag), ponieważ wszystkie dane dla modelu będą wczytane potem, razem z plikiem kontrolnym (patrz niżej).

Następnym plikiem, który musisz załadować jest plik Snoopy (z rozszerzeniem SPEPT). Można to zrobić poprzez kliknięcie:

QSSPN -> Import SPEPT oraz wybranie pliku **NR\_Recon2.v3.1.spept**

Pojawi się okno dialogowe z komendą „Set default maximal number of tokens”. Należy zostawić wartość 2 dla symulacji jakościowych (dla symulacji ilościowych należy wybrać maksymalnie dużą liczbę, więc wpisujemy 1e9).

Powinieneś/naś otrzymać dane w okno jak poniżej:

PN node	Initial tokens	Maximal tokens	Node type	Monitor
PXR_mRNA	0	2	1	<input type="checkbox"/>
PXR	0	2	1	<input type="checkbox"/>
PXR_active	0	2	1	<input type="checkbox"/>
GR_mRNA_deg	0	2	1	<input type="checkbox"/>

Ostatnim plikiem, który trzeba otworzyć jest plik kontrolny. Kliknij:

QSSPN -> Load control i załaduj plik tekstowy **NR\_Recon2.v3.1.ctrl.txt**

Twoja zakładka „Control” powinna wyglądać następująco:

Control parameter	Value
MODEL	./recon2_xt.PIPES.CORE.v1.sfba
NUMBER_OF_SAMPLES	1
SEED	761
TIME_MAX	3000.0
MAXIMAL_TIMESTEP	0.01
MAX_CHANGE	0.01
OUTPUT	./output.xls
LOG	./log.txt
MONITOR	100
QSSPN_ALGORITHM	SIMULATION
GSMN_MODEL	Recon2_PIPES
GSMN_EXT_TAG	_xt

Plik kontrolny zawiera parametry dla symulacji, m.in. takie jak: model, w którym przeprowadzamy symulacje (wiersz „MODEL”), ile razy symulacja ma być przeprowadzona (wiersz „NUMBER\_OF\_SAMPLES”), czas trwania symulacji, czyli czas w którym będziemy obserwować zmiany poziomów metabolitów (wiersz „TIME\_MAX”). Jak możesz zauważyć, w wierszu „GSMN\_EXT\_TAG” jest także zdefiniowane rozszerzenie dla metabolitów zewnętrznych.

Gdy już wszystkie niezbędne pliki zostały załadowane, można przeprowadzić symulacje. Kliknij:

QSSPN -> Run

Po kliknięciu „Run” twój plik kontrolny automatycznie zmieni swój wygląd:

JyMet2.34

File Edit View Analyse Solve QSSPN Help

recon2\_xt.PIPES.CORE.v1.sfba | QSSPN\_model.tm

PN nodes Interactions Metabolites Enzymes Control

Parameters InitialStates Functions FluxMap

Control parameter	Value
MODEL	gsmn.tmp
NUMBER_OF_SAMPLES	1
SEED	761
TIME_MAX	3000.0
MAXIMAL_TIMESTEP	0.01
MAX_CHANGE	0.01
OUTPUT	./output.xls
LOG	./log.txt
MONITOR	100
QSSPN_ALGORITHM	SIMULATION
GSMN_MODEL	Recon2_PIPES
GSMN_EXT_TAG	_xt

Gdy program zakończy niezbędne obliczenia, zobaczysz nową wiersz w tabeli o nazwie „Output”. Zawiera on dane dla wszystkich elementów sieci Petriego. Dane te możemy zwizualizować. Zaznacz kolumnę z wartościami dla poziomu kortyzolu we krwi:

JyMet2.34

File Edit View Analyse Solve QSSPN Help

recon2\_xt.PIPES.CORE.v1.sfba | NR\_Recon2.v3.1 | QSSPN\_model.tm

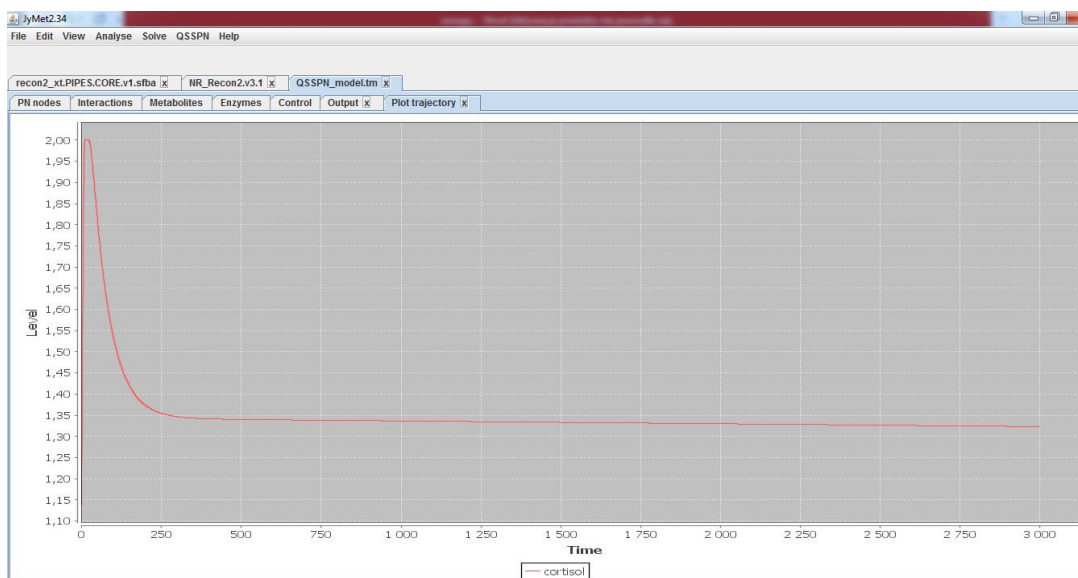
PN nodes Interactions Metabolites Enzymes Control Output | Plot trajectory

Sample1

Time	Event	CYP3A4	GR	GR_cort	Glucose	Glucose_f...	Lactate	Lactate_c...	PXR	PXR_active	cortisol	cortisol_bl...	estradiol	estradiol_...	ligand2
0	none	705.721	16.1833	9.4	0	0	10	0	50.2991	0.055	1.14	0	0.15	0	0.001
4.86952e...	none	2	2	2	0	8.48994	2	-0.0565	2	0.0549476	1.14003	0	0.15	-2.27374e...	0.00102677
1.31711e...	none	2	2	2	0	8.48994	2	-0.0565	2	0.0548566	1.14007	0	0.15	-2.27374e...	0.00107235
3.56253e...	none	2	2	1.99999	0	8.48994	2	-0.0565	2	0.0546113	1.1402	0	0.15	-2.27374e...	0.00119525
9.63591e...	none	2	2	1.99998	0	8.48994	2	-0.0565	2	0.0539533	1.14054	0	0.15	-2.27374e...	0.00152495
0.000260...	none	2	2	1.99995	0	8.48994	2	-0.0565	2	0.0522129	1.14144	0	0.15	-2.27374e...	0.00239702

Następnie kliknij:

QSSPN -> Plot Trajectory



Plik zawierający wyniki jest automatycznie zapisywany w folderze MUFINS1.0 -> MUFINS1.0. Można go otworzyć, np. w programie Excel.

Wykres pokazuje, jak nadmiar kortyzolu jest degradowany w komórce. Następnie jego poziom osiąga nowy stan równowagi.

Wykonaj podobną operację (symulację) z użyciem danych poziomu mleczanu we krwi w czasie. Jakie wnioski wyciągniesz z tej obserwacji? Jak zmienia się stężenie mleczanu we krwi, przy zmianie stężenia kortyzolu?

Możesz przyrzeć się sieci Petriego w programie Snoopy 1.21.

1. Uruchom program.
2. Zainstaluj program (Uwaga: jeżeli pomimo zainstalowania programu, nie możesz otworzyć plików o rozszerzeniu SPEPT, znajdź na dysku nauczycielskim plik instalacyjny dla sterownika o nazwie **vc\_redist.x64** i zainstaluj go).

### 3. Snoopy 1.21

Snoopy umożliwia zapisanie modelu w formacie sieci Petriego oraz wizualizację grafów. Kluczowym elementem w symulacjach dynamicznych jest powodowanie perturbacji w systemie, aby obserwować zachodzące zmiany.

Włącz program Snoopy. Upewnij się, że po lewej stronie widzisz okno z napisem „Hierarchy”. Jeżeli nie widzisz takiego okna, to kliknij:

View -> Toggle Hierarchy browser

Następnie znajdź folder **NR\_Recon2** (ścieżka dostępu C:SurreyFBA\NR\_Recon2) i załaduj plik **NR\_Recon2.v3.1**

W oknie „Hierarchy” znajdź i kliknij dwa razy lewym przyciskiem myszy na cortisol\_burst.

Powinno się pojawić nowe okienko, z tą podsiecią.

