

***Escherichia coli*의 흐름 평균 모델에서 가중치를 가진 조절 네트워크**

황희태, 이성근, 황규석*
 부산대학교 화학공학과
 (kshwang@pusan.ac.kr*)

Flux balance models of *Escherichia coli* with the weight-added regulatory networks

Hee Tae Hwang, Sung Gun Lee, Kyu Suk Hwang*
 Department of Chemical Engineering, Pusan National University
 (kshwang@pusan.ac.kr*)

서론

FBA는 대사 경로 데이터 베이스로부터 재구축된 대사 경로, 양론비, 및 선형계획법 (linear programming)을 이용하여 세포 내부의 flux를 성공적으로 예측하였다[1, 2, 4]. 그러나, 환경 변화에 따른 잠재적인 유전적 효과 (potential genetic effect)를 자동적으로 기준 대사 경로(reference metabolic pathway)에 반영하지 못하였다. 최근에 Boolean rules과 같은 이진 시스템으로 조절 제한 조건(regulatory constraints)을 FBA에 추가하려고 시도하고 있다. 이러한 이진 시스템으로 복잡한 transcriptional factors와 target genes사이의 관계를 단순히 on/off로 표현하는데에 한계가 있으며, 또한 stimuli, sensors/regulatory proteins, target genes사이의 관계 변화를 직관적으로 알기가 힘들었다[1-2]. 따라서 본 연구에서는 기존의 방법을 향상시키기 위해서, 가중치를 가진 조절 네트워크 (weight-added regulatory network)을 정해진 기호로 모델링하였고, 이를 FBA에 통합함으로써 다이나믹한 분석이 가능하도록 하였다. 최종적으로 우리가 제안한 통합 프레임워크의 타당성을 검증하기 위해서, *E. coli*의 중심 대사 경로(central metabolic pathway)를 기반으로 한 모델시스템을 특정 환경 조건하에서 모사하였다.

본론**1. Weight-added regulatory network**

정의된 기호들로 구성된 가중치를 가진 조절 네트워크(Fig. 1)는 조절 단백질들이 어떻게 유전자들의 세트를 조절하는지 직관적으로 알 수 있다. 이 네트워크는 stimulus, sensors/regulators, 와 target genes들로 구성되어 있다.

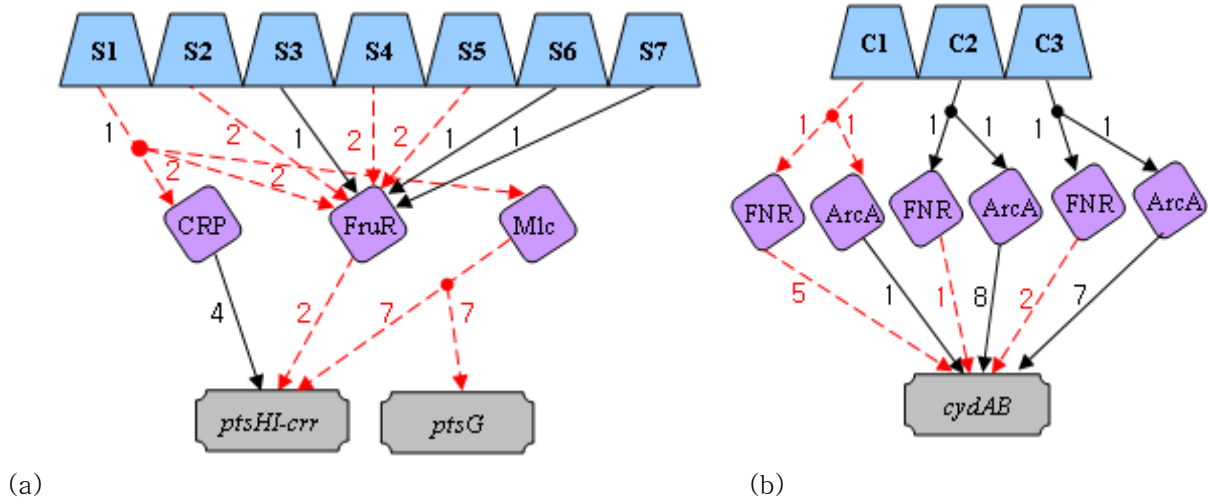


Fig. 1. The sub-networks. It has three layers and weights on the edges. (a) ptsGHI-crr. (b) cydAB.
 ▲; stimulus, ◆; sensor/regulator, ▭; gene, (→); activation, (---→) inhibition.

2. Levels of strength

Strength는 크게 네 부분으로 분류하였고, edges상에 나타내었다; Weak(0~3), Intermediate(4), Strong(5~6), Very strong(7~). Intermediate level은 외부 또는 내부 metabolites를 충분히 대사시킬 정도로 gene을 expression시킬 수 있는 힘으로 정의 한다. Weak level은 interaction은 있으나, metabolite를 대사 시키지 못하는 정도이고, strong과 very strong은 metabolite를 대사시킬 수 있는 정도의 세기 보다 더 강하게 gene를 expression하는 경우로 정의한다. 여기서 Edges 위의 “0”은 regulatory proteins 과 target genes 사이에 아무런 interaction이 없음을 의미하고 “0” 값이 해당 genes에 전달된다.

3. Integrated framework

우리의 통합된 프레임워크는 크게 세 부분으로 이루어져 있다. ; FBA module, weight-added regulatory network module, differential analyzer module.

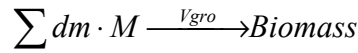
FBA module 에서는 구축된 대사경로 내의 flux 와 목적 함수인 최대성장율이 계산 된다. 이러한 예측을 위해서, 대사경로의 각각의 대사물질을 중심으로 해서 동적 물질수지(dynamic mass balance)형태로 나타내고, 정상상태 가정하에서 이 물질수지 식을 행렬(matrix) 형태로 나타낸다 [1, 2, 4].

$$S \cdot V = 0$$

여기서 S 는 양론계수행렬이고, V 는 흐름들의 행렬이다. 위의 식을 풀기위해서, 최대 흡수율 또는 분비율, 반응의 가역성, 비가역성과 같은 제한 조건들을 부가한다. 여기에 우리가 구축한 가중치를 가진 조절네트워크에서 생성된 유전적 변화 (genetic changes)와 같은 추가적인 제한조건들이 적용된다. 이 제한 조건에 의해서 더욱더 좁은

해공간(solution space)의 경계가 정의 된 후, 그 해공간에서 최적의 대사흐름을 구하기 위해서 최적화(optimization) 기법이 사용된다.

$$\text{Minimize } Z = -V_{gro}$$



여기서 Z 는 목적함수, V_{gro} 는 Growth Flux, M 은 생합성 전구체(biosynthetic precursors), dm 은 세포(biomass)를 생성하기 위한 M 의 요구량을 각각 나타낸다.

Regulatory network module에서는 환경 변화에 따른 genes의 변화를 다이나믹하게 예측한다. 기질(substrate)에 의한 환경 변화의 시점들은 differential analyzer module에 의해서 계산되며, 환경이 변화되는 시점마다 regulatory network module은 유전적 변화들(genetic changes)을 갱신한다. 이렇게 예측된 유전적 제약 조건은 다시 기준 대사경로의 대사흐름을 open 혹은 close하게 한다.

Differential analyzer module은 비정상 상태를 나타내는 대사 부산물, 미생물량, 기질의 농도를 시간에 따라 정량적으로 예측하는 기능을 한다. 이 모듈에 의해서 모든 분석이 다이나믹하게 된다. 이 세 개의 모듈이 서로 연동됨으로써, 분자 레벨을 포함하는 세포의 거동이 예측 된다.

결론

1. Model prediction using integrated framework in aerobic batch culture with glucose and acetate reutilization

먼저 SR matrix (Stimuli and Sensors/Regulators Interaction **Matrix**)에 의해서, glucose(S1)와 aerobic condition (C1)에 반응하는 sensors/regulators의 상태가 weight에 의해서 결정된다. SR matrix의 0 column은 stimuli를 나타내며, S1은 1 column에 해당된다. 이 S1에 영향을 받는 sensor/regulators이 1 row에 있는 weight에 의해서 식별된다. 따라서 S1에 의해서 CRP, FruR, and Mlc가 inactive되고, FadR과 PdhR이 active 되어졌다. C1에 의해서는 ArcA와 FNR이 각각 inactive 되었다. Stimulus에서 S1과 C1이 외부에 각각 존재하므로 상태값이 “0”에서 “1”로 변환 되고, Sensor/Regulators의 상태값은 가중치에 의해서, 결정되며, 그 상태값이 “1” 또는 “-1”의 값만을 가진다., 이러한 이유에서 FadR의 weight 값이 “2”라할 지라도, 상태값이 1를 가진다.

SR matrix에 의해서 sensor/regulators의 상태가 결정되면, 그 상태값이 RG matrix로 전달되어 target genes의 상태 및 gene expression level이 결정된다 (Table 1). 여기서 각 genes의 active/inactive 상태와 strength는 해당 genes의 weight 합에 의해서 결정된다. 이러한 절차에 의해서 예측된 최종 genes의 active or inactive state는 모사를 위한 초기 조건으로 작용하게 된다. 이러한 genes의 패턴은 glucose가 다 소비되는 시간까지 계속 유지된다. Glucose의 time profiles은 parameters(from FBA, from literature[4])을 사용하여 differential analyzer module에 의해서 생성되었다.

Glucose가 다 소비 되면, $S1(1) \rightarrow S(0)$ 이 되며, 세포 외부에 acetate가 존재하기 때문에 $S3(0)$

→ S3(1)의 상태가 된다. 이는 세포 외부 환경의 변화를 의미하며, 조절 네트워크는 자동적으로 유전적 변화를 모사한다. Acetate에 의해서 FadR(-1)이 inactive 되고, FruR(1), PdhR(1)이 active되어졌다. Glucose에 영향을 받는 CRP와 Mlc interaction이 없음으로 되어 졌고, FadR과 FruR은 반대로 각각 inactive, active되어 졌다. ArcA와 FNR은 동일한 상태를 유지되었다.

Table 1. Comparison the simulated expression levels of genes and experimental data obtained from

Phase	Time(h)	<i>aceA</i>	<i>aceBK</i>	<i>aceEF-<i>lpdA</i></i>	<i>acs</i>	<i>adhE</i>	<i>fumB</i>	<i>fumA</i>	<i>mdh</i>	<i>ppsA</i>	<i>ptsG</i>	<i>ptsHI-<i>err</i></i>	<i>pykF</i>	<i>sdhCDAB-sucABCD</i>
Glucose Metabolism	0~7.1	VS	VS	ST	VS	WK	ST	VS	IT	ST	VS	ST	ST	IT
Lag	7.1~7.5													
Acetate Metabolism	7.5~10.2	VS	ST	ST	VS	VS	ST	VS	IT	ST	WK	WK	ST	ST
Experimental Data [3]		15 ~ 39	17	0.29 ~ 0.44	9.5	0.2	1.8	3.5	3.9	13	0.47 ~ 0.54	0.47 ~ 0.54	0.22	1 ~ 2.4

aerobic batch culture with glucose and acetate reutilization.

WK: weak(0~3), IT: Intermediate(4), ST: Strong(5~6), VS; Very Strong(7~)

□ : active state of gene, ■ : inactive state of gene.

참고문헌

- [1] Covert, M. W. and B. O. Palsson, 2002. "Transcriptional regulation in constraints-based metabolic models of *Escherichia coli*", *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 28058-28064.
- [2] Lee, Sung Gun, Kyu Suk Hwang, Cheol Min Kim, 2005. "Dynamic behavior of regulatory elements in the hierarchical regulatory network of various carbon sources-grown *Escherichia coli*", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **15**: 551-559.
- [3] Oh, M. K., Rohlin, L., Kao, K. C., Liao, J. C., 2002. "Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*" *Journal of Biological Chemistry*. **277**: 13175-13183.
- [4] Varma, Amit, Brian W. Boesch, and Bernhard O. Palsson, 1993. "Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates", *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 2465-2473.