

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 618.36, 547.436

СТЕХІОМЕТРИЧНА МОДЕЛЬ ФОЛАТЗАЛЕЖНОГО МЕТАБОЛІЗМУ ОДНОВУГЛЕЦЕВИХ ГРУП У ПЛАЦЕНТІ ЛЮДИНИ

Р. Р. РОДРИГЕС¹, І. С. ЛУЩИК², М. Ю. ОБОЛЕНСЬКА¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: northernwizard@yandex.ua;

²Національний університет «Києво-Могилянська Академія», Україна

Роботу присвячено створенню математичної моделі фолатзалежного метаболізму одноуглецевих груп (ФЗМОГ) і дослідженню її функціонування в плаценті людини в умовах навантаження гомоцистеїном і найпоширеніших мутацій в генах метилентетрагідрофолатредуктази (МТГФР) і цистатіонін-β-синтази (ЦБС). При моделюванні враховані специфічні для плаценти особливості експресії генів, які кодують ензими ФЗМОГ. За допомогою програмних інструментів *MetaTool* і *COBRAToolbox* визначено ключові метаболіти, елементарні моди і метаболічні потоки в різних реакціях системи. Показано, що найвразливішими ланками системи є реакції фолатного циклу і синтезу попередників нуклеїнових кислот, інозин- і тимідинмонофосфатів, які залежно від умов змінюються в межах від істотного пригнічення до активації. Найстабільнішими ланками системи виявляються реакції синтезу глутатіону і таурину. Результати моделювання ФЗМОГ збігаються з результатами, експериментально одержаними в схожих умовах. За деяких накладених умов виявляються раніше неочевидні зв'язки між ланками системи, що стає підставою для цілеспрямованої перевірки передбачень, одержаних за допомогою моделі.

Ключові слова: фолатзалежний метаболізм одноуглецевих груп, стехіометрична модель, гомоцистеїн, поліморфізм, метилентетрагідрофолат редуктаза, цистатіонін-β-синтаза.

Фолатзалежний метаболізм одноуглецевих груп (ФЗМОГ) об'єднує реакції, в яких похідні фолієвої кислоти різного ступеня окислення є безпосередніми або опосередкованими постачальниками одноуглецевих груп. Центральне місце у ФЗМОГ займають два тісно пов'язаних між собою цикли – тетрагідрофолатний і метіоніновий (рис. 1).

Із тетрагідрофолатним циклом пов'язані синтез попередників нуклеїнових кислот, а саме синтез *de novo* пуринових нуклеотидів, утворення дезокситимідинмонофосфату із дезоксиуридинмонофосфату, а також формування метіоніну в складі метіонінової аміноацил-тРНК [1]. З метіоніновим циклом безпосередньо пов'язані усі реакції метилування в клітині і, зокрема, метилування ДНК, транссульфування гомоцистеїну з утворенням цистеїну і подальшим синтезом таурину і глутатіону [2–6]. Таким чином, від роботи двох циклів ФЗМОГ залежать найважливіші

процеси в клітині – синтез ДНК і РНК, підтримання окисно-відновного статусу, епігенетична регуляція експресії генів, процес ініціації трансляції в мітохондріях, детоксикаційні властивості клітини. Розлади у фолатзалежних процесах відповідно обговорюються в контексті численних захворювань серцево-судинної і центральної нервової систем, акушерської патології та деяких видів раку [2, 7–9]. Показником стану ФЗМОГ вважається рівень гомоцистеїну.

Основну увагу в роботі зосереджено на ФЗМОГ у плаценті людини. Це пов'язано з тим, що плацента відіграє істотну, а іноді і провідну, роль у виникненні акушерської патології. Гіпергомоцистеїнемія (в крові матері) як показник порушення ФЗМОГ асоціюється з незарощенням нервової трубки у плода [10].

Попередні дослідження, проведені в нашій лабораторії, вперше показали, що в плаценті вагітних із діагнозом «пreekлампсія» у ФЗМОГ спостерігається підвищення вмісту

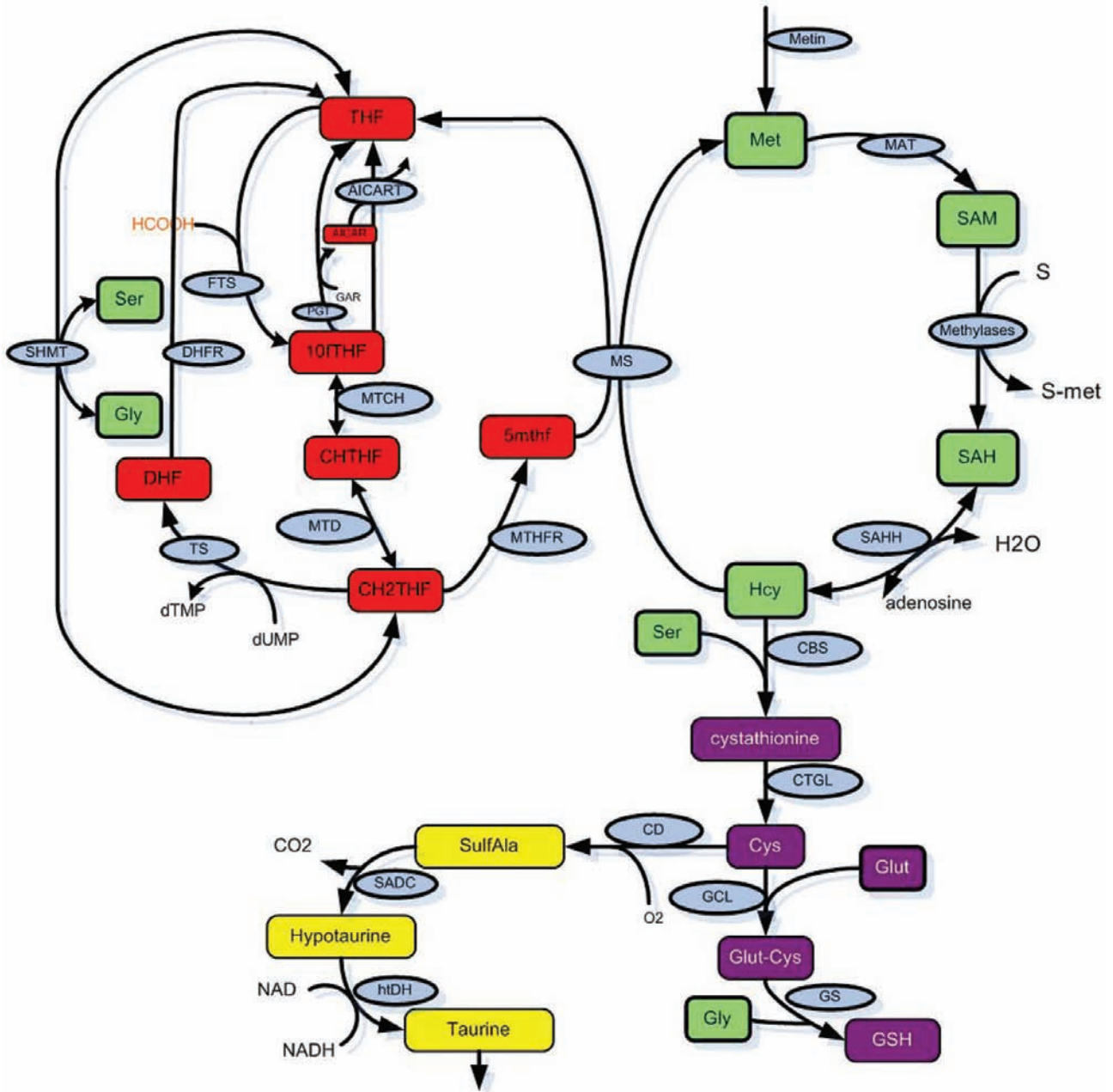


Рис. 1. Схема фолатзалежних процесів у плаценті людини. Червоним кольором позначені метаболіти фолатного циклу, зеленим – амінокислоти, фіолетовим – метаболіти, що беруть участь у синтезі глутатіону, жовтим – метаболіти шляху синтезу таурину, а в блакитних овалах – **назви реакцій за аббревіатурою ензимів:** AICART – фосфорибозиламіноімідазол-карбоксамід формілтрансфераза (ФРАІКФТ, англ. Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase, 2.1.2.3), CBS – цистатіонін-β-синтаза (ЦБС, англ. Cystathionine β-synthase, 4.2.1.22), CD – цистеїндіоксигеназа (ЦД, англ. Cysteine dioxygenase, 1.13.11.20), CTGL – цистатіонін-γ-ліаза (ЦЛ, англ. Cystathionine γ-lyase, 4.4.1.1), DHFR – дигідрофолатредуктаза (ДФР, англ. Dihydrofolate reductase, 1.5.1.3), FTS – форміаттетрагідрофолат-синтетаза (ФТГФЛ, англ. Formate-tetrahydrofolate ligase, 6.3.4.3), GCL – глутамат-цистеїн ліаза (ГЦЛ, англ. Glutamate-cysteine ligase, 6.3.2.2), GS – глутатіонсинтетаза (ГС, англ. Glutathione synthase, 6.3.2.3), htDH – гіпотаурин дегідрогеназа (ГТД, англ. Hypotaurine dehydrogenase, 1.8.1.3), MAT – метіонін-аденозилтрансфераза, (МАТ, англ. Methionine adenosyltransferase, 2.5.1.6), Methylases (MT) – метилтрансферази, Metin – імпорт метіоніну, MS – метіонінсинтаза (МС, англ. Methionine synthase, 2.1.1.13), MTCH – метенілтетрагідрофолат-циклогідролаза (МТГФЦГ, англ. Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, 3.5.4.9), MTD –

метилентетрагідрофолат-дегідрогеназа (МТФД, англ. *Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase*, 1.5.1.5), *MTHFR* – метилентетрагідрофолат-редуктаза (МТГФР, англ. *Methylenetetrahydrofolate reductase*, 1.5.1.20), *PGT* – фосфорибозилгліцинамід-формілтрансфераза (ФГФТ, англ. *Phosphoribosylglycinamide formyltransferase*, 2.1.2.2), *SADC* – сульфонілаланіл-декарбоксілаза (САД, англ. *Sulfonilalanine decarboxylase*, 4.1.1.29), *SAHH* – *S*-аденозилгомоцистеїн гідролаза (АГГ, англ. *Adenosylhomocysteinase*, 3.3.1.1), *SHMT* – серингідроксиметилтрансфераза (ГГМТ, англ. *Glycine hydroxymethyltransferase*, 2.1.2.1), *TS* – тимідилат синтаза (ТС, англ. *Thymidylate synthase*, 2.1.1.45).

Метаболіти: *5mthf* – *N5*-метилтетрагідрофолат, *10fTHF* – *N10*-формілтетрагідрофолат, *AICAR* – аміноімідазолкарбоксамід рибонуклеотид, *CH2THF* – *N5,N10*-метилентетрагідрофолат, *CHTHF* – *N5,N10*-метенілтетрагідрофолат, *Cys* – цистеїн, *Cystathionine* – цистатіонін, *DHF* – дигідрофолат, *dTMP* – деокситимідин монофосфат, *dUMP* – деоксиуридин монофосфат, *GAR* – гліцинамід рибонуклеотид, *Glut* – глутамат, *Glut-Cys* – γ -глутаміл цистеїн, *Gly* – гліцин, *GSH* – глутатіон, *Hcy* – гомоцистеїн, *Hypotaurine* – гіпотаурин, *Met* – метіонін, *S* – неметильований субстрат, *S-met* – метильований субстрат, *SAH* – *S*-аденозилгомоцистеїн, *SAM* – *S*-аденозилметіонін, *Ser* – серин, *SulfAla* – сульфонілаланін, *Taurine* – таурин, *THF* – тетрагідрофолат

гомоцистеїну, зниження вмісту фолатів на фоні інших відхилень у складі амінотіолів. Ці зрушення можуть бути патогенетичними факторами розвитку хвороби [11–13].

Порушення ФЗМОГ виникають із різних причин. До найдослідженіших належать нестача фолієвої кислоти, вітамінів (B_2 , B_6 , B_{12}), які є кофакторами в реакціях ФЗМОГ, поліморфізм ензимів цієї системи. Слід зазначити, що численні ензими ФЗМОГ є високополіморфними. Серед останніх, насамперед, виокремлюють метилентетрагідрофолатредуктазу (*MTHFR*), що відновлює метилентетрагідрофолат до метилтетрагідрофолату, який надає метильну групу для реакції реметилування гомоцистеїну. Гетерозиготне С677Т-носіїство гену *MTHFR* зустрічається майже у 50% людей європейської популяції, в тому числі і в Україні [12, 14]. Воно супроводжується зниженням у середньому на 35% активності ензиму [15] і підвищеним ризиком виникнення різних захворювань [9, 16].

Ген, що кодує ензим цистатіонін- β -синтазу (*CBS*), також є поліморфним, і його варіант із вісімнадцятьма тандемними повторами ділянки у 31пн (31 base pairs variable number of tandem repeats, 31bp VNTR) на межі 13-й екзон – 13-й інтрон зустрічається в 60% людей європейської популяції, а ензим має знижену (на ~38%) активність [17]. Зустрічаються й інші заміни в гені *CBS*, які супроводжуються зниженням ензиматичної активності, наприклад, Т833С поліморфізм в *cis*-положенні з інсерцією 68 пн в районі 844-го нуклеотиду у 8-у екзоні [18]. Обидва гени, *MTHFR* і *CBS*, знаходяться в різних хромосомах і успадковуються незалежно, тому комбінація названих мутантних форм цих генів має зустрічатися приблизно у 30% населення ($50\% \times 60\% / 100\% = 30\%$). Впливу

носіїства одноклеотидних замін в інших ензимах приділено значно менше уваги. З огляду на роль ФЗМОГ у загальному метаболізмі і функціонуванні клітини, ми припускаємо, що зміни у функціонуванні одного з ензимів неодмінно призведуть до змін в інших ланках системи, не кажучи вже про збіг мутацій в генах декількох ензимів, що в цілому позначиться на функціонуванні клітини.

Дослідити експериментально та із статистично значущою ймовірністю роль поліморфізму різних генів фолатзалежних процесів у функціонуванні всієї системи досить складно через необхідність обстеження надзвичайно великої кількості осіб і трудомісткості визначення численних показників. Цілісне уявлення про роботу системи можна отримати за допомогою комп'ютерного моделювання метаболізму і симуляції різних умов функціонування системи. Існують три підходи до моделювання метаболізму: моделювання структури (топології) системи; стехіометричне моделювання, яке враховує стехіометрію реакцій та використовує обмеження, що вводяться на підставі результатів експериментальних досліджень, і створення кінетичної моделі з використанням кінетичних характеристик ензимів, даних щодо концентрації метаболітів і регуляції реакцій [19]. На сьогодні створено кінетичні моделі фолатного метаболізму для печінки людини [20] і для раку товстого кишечника [21] та досліджено вплив мутацій на різні ланки системи [22]. Створення кінетичних моделей ФЗМОГ для плаценти людини ускладнене наявністю тканиноспецифічних особливостей експресії генів і відсутністю достатньої кількості даних щодо кінетичних характеристик ензимів і концентрації метаболітів в органі. Раніше про-

ведений аналіз публікацій щодо експресії генів ФЗМОГ у плаценті людини показав, що деякі гени (формілтетрагідро-фолатдегідрогенази, бетаїн-гідроксиметилтрансферази, гліцин-N-метилтранс-ферази) не експресуються (або концентрація індивідуальних РНК нижча за чутливість використаних методів) [23]. Цей результат врахований при побудові моделі.

Метою нашої роботи було створити стехіометричну модель ФЗМОГ для плаценти людини і провести аналіз поведінки системи в умовах симуляції підвищеного вмісту гомоцистеїну, зниженої на 35% активності *MTHFR* (носійство гетерозиготності *C677T MTHFR*) і на 38% активності *CBS* (варіант гену *CBS* із 18 тандемними повторами 31 пн), а також означених варіантів у різних комбінаціях. Вибираючи гени-кандидати для моделювання наслідків мутацій в них, ми керувалися частотою, з якою мутації та їх комбінації зустрічаються в європейській популяції людей, а саме більше ніж у 25% населення. Функціонування системи характеризували через елементарні моди (ЕМ), які відображають всі можливі розподіли метаболічних потоків у метаболічній мережі за стаціонарного стану, і через баланс стаціонарних метаболічних потоків системи.

Ми вперше побудували математичну модель ФЗМОГ для плаценти людини, відтворили, використовуючи модель, різні умови функціонування системи в залежності від вмісту гомоцистеїну і обох мутацій і визначили їх вплив на кожен із ланок системи.

Методи

Фолатзалежні процеси відбуваються у трьох компартментах клітини – в цитозолі, мітохондріях і ядрі [24]. У цій роботі для моделювання обрано фолатзалежні процеси, які відбуваються в цитозолі клітин плаценти (табл. 1), і враховано тканиноспецифічні особливості метаболізму. Ключові метаболіти системи, тобто метаболіти, які беруть участь у найбільшій кількості реакцій і слугують зв'язуючими ланками циклів, і набір елементарних мод визначено за допомогою відкритої і доступної (<http://penguin.biologie.uni-jena.de/bioinformatik/networks/>) програми Metatool [25]. Кожна метаболічна система характеризується певними елементарними модами. Набір елементарних мод описує всі можливі потоки метаболітів у системі в умовах її стаціонарного стану. Елементарна мода – це направлений шлях, що включає мінімальний набір реакцій від одного зовнішнього метаболіту до іншого.

Вона характеризується унікальним набором ензимів. Будь-який шлях може бути представлений як лінійна комбінація елементарних мод.

Моделювання і аналіз поведінки системи ФЗМОГ за різних умов її функціонування виконано із застосуванням методу «Балансу стаціонарних потоків» і програмного забезпечення COBRAToolbox [26], що знаходиться у відкритому доступі (<http://opencobra.sourceforge.net/openCOBRA/>). На першому етапі було отримано значення метаболічних потоків через реакції системи, яка знаходиться у стаціонарному стані. При цьому враховували стехіометрію реакцій, їх оборотність/необоротність, а як об'єктивну функцію обирали максимум потоків через усі реакції системи. Значення метаболічних потоків через реакції виражали в умовних одиницях у довільно обраному інтервалі від нуля до ста. На наступному етапі проведено моделювання інших умов функціонування системи шляхом примусового зменшення або збільшення значення потоку через певну реакцію. Таким чином, змодельовано сім варіантів функціонування системи – умовно «нормальний стан» за максимально ефективною роботи системи і шість варіантів, що відрізняються від «нормального стану»:

1. двократне збільшення концентрації гомоцистеїну завдяки збільшенню в два рази потоку через реакцію SAHH, яка безпосередньо веде до утворення гомоцистеїну;

2. гетерозиготне *C677T*-носійство гену *MTHFR*, змодельоване зниженням потоку через реакцію *MTHFR* на 35%;

3. гетерозиготне *C677T*-носійство гену *MTHFR* в комбінації з підвищеною в два рази концентрацією гомоцистеїну;

4. носійство варіанта гену *CBS* з 18 тандемними повторами ділянки в 31 пн, змодельоване зниженням метаболічного потоку через реакцію *CBS* на 38%;

5. носійство варіанта гену *CBS* з 18 тандемними повторами ділянки в 31 пн у комбінації з підвищеною концентрацією гомоцистеїну;

6. комбінація означених мутантних форм генів *MTHFR* і *CBS*.

Результати

Для моделювання фолатзалежних процесів використано реакції, які обрано з урахуванням тканиноспецифічної особливості експресії генів ФЗМОГ у плаценті людини (табл. 1).

Ключові метаболіти системи. За участю в деяких реакціях (без урахування транспортних) ключові метаболіти розташовуються у по-

Таблиця 1. Стехіометрія реакцій, використаних для моделювання

№ п/п	Реакції за назвою ензиму	Стехіометрія реакцій
<i>Реакції метіонінового циклу</i>		
1	MAT	$ATP + H_2O + Met = dph + ph + SAM$
2	Methylases	$S + SAM = SAH + Smet$
3	SAHH	$H_2O + SAH = Adn + Hcy$
4	MS	$Hcy + x5mthf = Met + THF$
<i>Реакції тетрагідрофолатного циклу</i>		
5	MTHFR	$CH_2THF + H + NADPH = NADP + x5mthf$
6	MTD	$CH_2THF + NADP = CHTHF + H + NADPH$
7	MTCH	$CHTHF + H_2O = 10fthf$
8	FTS	$ATP + Frmt + THF = ADP + ph + x10fthf$
9	DHFR	$DHF + H + NADPH = NADP + THF$
10	SHMT	$Ser + THF = CH_2THF + Gly + H_2O$
<i>Реакції синтезу пуринів і піримідинів</i>		
11	PGT	$GAR + x10fthf = AICAR + THF$
12	AICART	$AICAR + x10fthf = FICAR + THF$
13	TS	$CH_2THF + dUMP = DHF + dTMP$
<i>Реакції транссульфування</i>		
14	CBS	$Hcy + Ser = Cst + H_2O$
15	CTGL	$Cst + H_2O = Cys + NH_3 + 2oxbt$
<i>Реакції синтезу таурину</i>		
16	CD	$Cys + O_2 = SulfAla$
17	SADC	$SulfAla = CO_2 + hyp\tauaur$
18	htDH	$H_2O + hyp\tauaur + NAD = H + NADH + \tauaur$
<i>Реакції синтезу глутатіону</i>		
19	GCL	$ATP + Cys + Glut = ADP + GlutCys + ph$
20	GS	$ATP + GlutCys + Gly = ADP + GSH + ph$
<i>Реакції введення/виведення метаболітів</i>		
21	Taur_out	$\tauaur = \tauarex$
22	Met_in	$Met_out1 = Met$
23	Cys_in	$Cys_out1 = Cys$
24	Glut_in	$Glut_out1 = Glut$
25	Ser_in	$Ser_out1 = Ser$
26	Gly_in	$Gly_out1 = Gly$
27	GSH_out	$GSH = GSH_out$

рядку спадання – THF (6 реакцій), CH₂THF (4), 10fthf (4), Cys (3), Hcy (3), Ser (2) і Met (2).

Елементарні моди потоків. Вдосліджуваній системі було визначено 23 елементарні моди, які наведено в табл. 2 в порядку збільшення чисельності реакцій в моді (довжини моди).

Найкоротша мода містить 3 реакції, а найдовша – 16. За частотою участі тієї чи іншої реакції в різних елементарних модах можна зробити висновок щодо важливості цієї реакції для системи. Найчастіше в модах зустрічається реакція, яку каталізує

Таблиця 2. Елементарні моди потоків у системі фолатзалежних процесів

№ п/п	Довжина моди	Реакції в елементарних модах потоків
1	3	(1 AICART) (2 FTS) (1 PGT)
2	5	(1 CD) (1 Cys_in) (1 htDH) (1 SADC) (1 Taur_out)
3	5	(1 DHFR) (-1 Gly_in) (1 Ser_in) (1 SHMT) (1 TS)
4	5	(1 DHFR) (1 FTS) (-1 MTCH) (-1 MTD) (1 TS)
5	6	(1 Cys_in) (1 GCL) (1 Glut_in) (1 Gly_in) (1 GS) (-1 GSH_out)
6	6	(1 FTS) (1 Gly_in) (-1 MTCH) (-1 MTD) (-1 Ser_in) (-1 SHMT)
7	7	(1 AICART) (-2 Gly_in) (2 MTCH) (2 MTD) (1 PGT) (2 Ser_in) (2 SHMT)
8	8	(1 CBS) (1 CTGL) (-1 Cys_in) (1 MAT) (1 Met_in) (1 Methylases) (1 SAHH) (1 Ser_in)
9	8	(-1 Gly_in) (1 MAT) (1 Methylases) (1 MS) (1 MTHFR) (1 SAHH) (1 Ser_in) (1 SHMT)
10	8	(1 FTS) (1 MAT) (1 Methylases) (1 MS) (-1 MTCH) (-1 MTD) (1 MTHFR) (1 SAHH)
11	9	(1 Cys_in) (1 DHFR) (1 GCL) (1 Glut_in) (1 GS) (-1 GSH_out) (1 Ser_in) (1 SHMT) (1 TS)
12	10	(1 Cys_in) (-1 FTS) (1 GCL) (1 Glut_in) (1 GS) (-1 GSH_out) (1 MTCH) (1 MTD) (1 Ser_in) (1 SHMT)
13	11	(1 CBS) (1 CD) (1 CTGL) (1 htDH) (1 MAT) (1 Met_in) (1 Methylases) (1 SADC) (1 SAHH) (1 Ser_in) (1 Taur_out)
14	11	(1 AICART) (2 Cys_in) (2 GCL) (2 Glut_in) (2 GS) (-2 GSH_out) (2 MTCH) (2 MTD) (1 PGT) (2 Ser_in) (2 SHMT)
15	12	(1 CBS) (1 CTGL) (1 GCL) (1 Glut_in) (1 Gly_in) (1 GS) (-1 GSH_out) (1 MAT) (1 Met_in) (1 Methylases) (1 SAHH) (1 Ser_in)
16	12	(1 Cys_in) (1 GCL) (1 Glut_in) (1 GS) (-1 GSH_out) (1 MAT) (1 Methylases) (1 MS) (1 MTHFR) (1 SAHH) (1 Ser_in) (1 SHMT)
17	12	(1 CBS) (1 CTGL) (-1 Cys_in) (1 FTS) (1 Gly_in) (1 MAT) (1 Met_in) (1 Methylases) (-1 MTCH) (-1 MTD) (1 SAHH) (-1 SHMT)
18	14	(1 CBS) (1 CTGL) (1 DHFR) (1 GCL) (1 Glut_in) (1 GS) (-1 GSH_out) (1 MAT) (1 Met_in) (1 Methylases) (1 SAHH) (2 Ser_in) (1 SHMT) (1 TS)
19	14	(1 CBS) (1 CTGL) (1 GCL) (1 Glut_in) (1 GS) (-1 GSH_out) (2 MAT) (1 Met_in) (2 Methylases) (1 MS) (1 MTHFR) (2 SAHH) (2 Ser_in) (1 SHMT)
20	15	(1 CBS) (1 CD) (1 CTGL) (1 FTS) (1 Gly_in) (1 htDH) (1 MAT) (1 Met_in) (1 Methylases) (-1 MTCH) (-1 MTD) (1 SADC) (1 SAHH) (-1 SHMT) (1 Taur_out)
21	15	(1 CBS) (1 CTGL) (1 FTS) (1 GCL) (1 Glut_in) (2 Gly_in) (1 GS) (-1 GSH_out) (1 MAT) (1 Met_in) (1 Methylases) (-1 MTCH) (-1 MTD) (1 SAHH) (-1 SHMT)
22	15	(1 CBS) (1 CTGL) (-1 FTS) (1 GCL) (1 Glut_in) (1 GS) (-1 GSH_out) (1 MAT) (1 Met_in) (1 Methylases) (1 MTCH) (1 MTD) (1 SAHH) (2 Ser_in) (1 SHMT)
23	16	(1 AICART) (2 CBS) (2 CTGL) (2 GCL) (2 Glut_in) (2 GS) (-2 GSH_out) (2 MAT) (2 Met_in) (2 Methylases) (2 MTCH) (2 MTD) (1 PGT) (2 SAHH) (4 Ser_in) (2 SHMT)

В модах, наведених в табл. 2, реакції позначені аббревіатурою ензиму, який каталізує цю реакцію.

серингідроксиметилтрансфераза, і супутня їй реакція постачання в систему серину (участь у 15 модах із 23). Серин постачає одновуглецеві групи для тетрагідрофолатного циклу, а завдяки реакції МТГФР і далі через реметилування гомоцистеїну одновуглецевий фрагмент використовується для синтезу метіоніну з гомоцистеїну. Серин є також субстратом у реакції транссульфування гомоцистеїну з утворенням цистатіоніну. У 13 із 23 мод присутні реакції метіонінового циклу, які забезпечують утворення S-аденозилметіоніну і метилування. Для порівняння лише в трьох модах присутні реакції синтезу таурину, при цьому одна з цих мод (мода №2) містить виключно набір реакцій тауринового синтезу. Це свідчить про відносну незалежність тауринового синтезу від тетрагідрофолатного і метіонінового циклів, а саме про можливість функціонування шляху синтезу таурину, навіть у разі зупинки реакцій інших ланок ФЗМОГ.

Баланс стаціонарних потоків системи ФЗМОГ. Значення метаболічних потоків системи було розраховано за допомогою програмного забезпечення COBRAToolbox і наведено в умовних одиницях довільно обраного інтервалу від 0 до 100. Як видно з рис. 2, найбільші величини потоків спостерігаються в реакціях транспортування серину, реакціях метіонінового циклу, окрім синтезу метіоніну, утворення глутатіону, транссульфування і транспортування глутамату.

Поведінка системи ФЗМОГ за різних умов її симуляції. Величини метаболічних потоків в реакціях системи за різних умов симуляції наведено в умовних одиницях у табл. 3.

Навантаження системи гомоцистеїном призводить до зниження на 72% метаболічного потоку через реакції МТСН і МТД, які ведуть до утворення 10-формілтетрагідрофолату – метаболіту, необхідного для синтезу *de novo* азотистого кільця пуринових нуклеотидів.

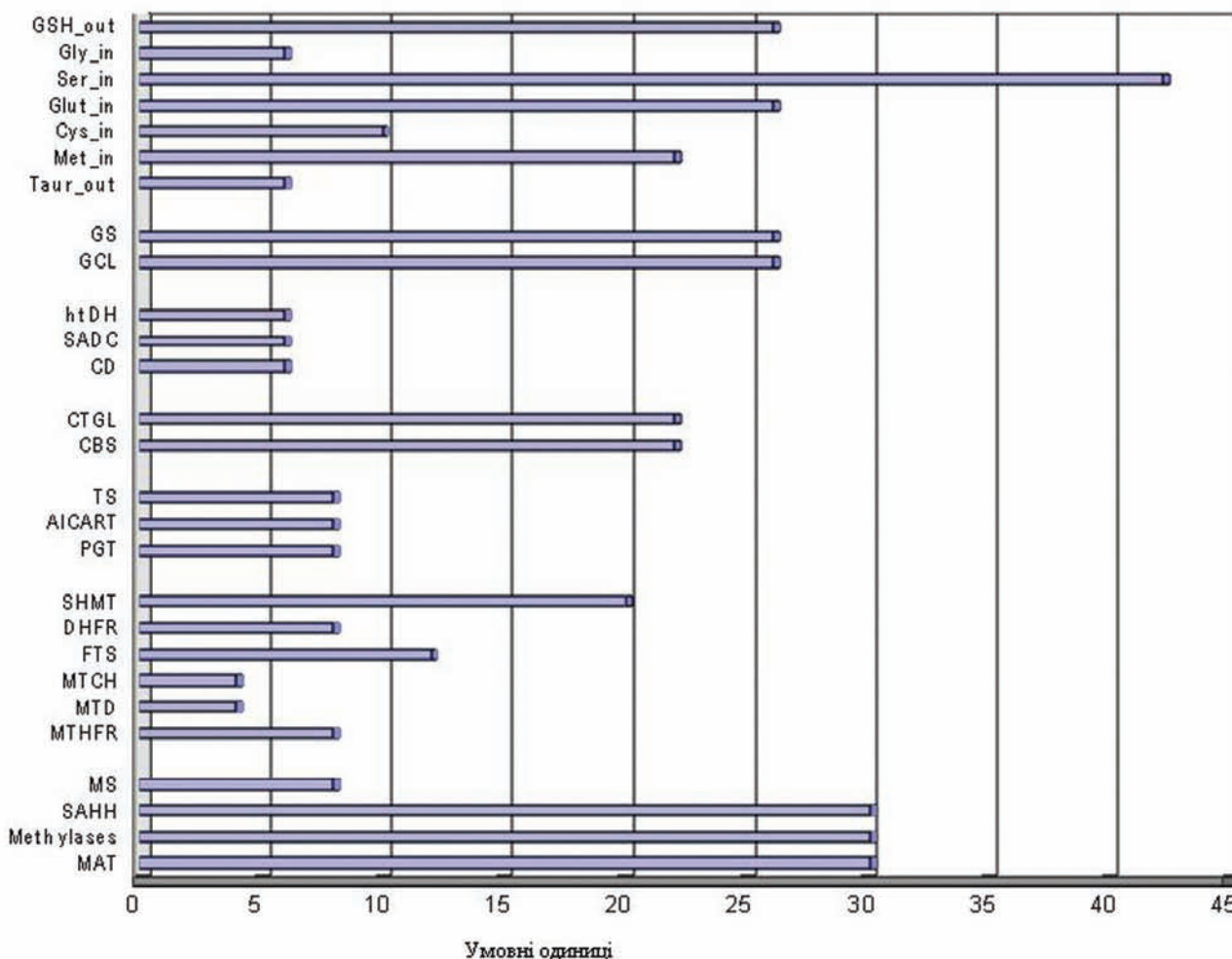


Рис. 2. Розподіл метаболічних потоків за вихідних умов функціонування системи

Таблиця 3. Зміни потоків через реакції ФЗМОГ (у % по відношенню до вихідних умов)

№ п/п	Потік	2xГц	MTHFR C677T генотип	2 xГц + MTHFR C677T	CBS 31 bp VNTR генотип	2 x Гц + CBS 31 bp VNTR	MTHFR C677T + CBS 31 bp VNTR
<i>Реакції метилування</i>							
1	MAT	112	95	108	93	109	87
2	Methylases	112	95	108	93	109	87
3	SAHH	112	95	108	93	109	87
4	MS	112	70	79	118	129	83
<i>Реакції фолатного циклу</i>							
5	MTHFR	112	70	79	118	129	83
6	MTD	28	126	52	129	0	164
7	MTCH	28	126	52	129	0	164
8	FTS	84	101	84	114	112	115
9	DHFR	70	108	76	118	84	128
10	SHMT	78	96	72	120	85	117
<i>Реакції синтезу попередників нуклеїнових кислот</i>							
11	PGT	70	108	76	118	84	128
12	AICART	70	108	76	118	84	128
13	TS	70	108	76	118	84	128
<i>Реакції транссульфування</i>							
14	CBS	112	104	118	84	101	88
15	CTGL	112	104	118	84	101	88
<i>Реакції синтезу таурину</i>							
16	CD	93	108	101	99	94	107
17	SADC	93	108	101	99	94	107
18	htDH	93	108	101	99	94	107
<i>Реакції синтезу глутатіону</i>							
19	GCL	90	102	92	105	97	107
20	GS	90	102	92	105	97	107
<i>Реакції транспортування</i>							
21	Taur_out	93	108	101	99	94	107
22	Met_in	112	104	118	84	101	88
23	Cys_in	45	100	40	147	84	150
24	Glut_in	90	102	92	105	97	107
25	Ser_in	96	100	96	101	94	102
26	Gly_in	130	120	156	54	135	75
27	GSH_out	90	102	92	105	97	107

Знижуються на 30% потоки через реакції AICART і PGT, а також через реакцію TS-синтезу тимідинмонофосфату з уридинмонофосфату, і реакцію DHFR-відновлення

дигідрофолату до тетрагідрофолату. Загалом знижуються метаболічні потоки всіх реакцій фолатного циклу, окрім MTHFR. Натомість активуються шляхи реметилування та транс-

сульфування. Проте за активації транссульфування послідовно пов'язані з ним шляхи синтезу глутатіону і таурину не змінюються.

За умов гетерозиготного носійства мутації С677Т в гені *MTHFR* очікувано знижується потік через реакцію реметилування, що майже не впливає на інші потоки метіонінового циклу. Дещо знижується потік через реакцію, яка відбувається з участю серингідроксиметилтрансферази і постачає в систему гліцин, але це компенсується зростанням надходження гліцину ззовні. Внаслідок цього потік, який визначає синтез глутатіону, не змінюється. *MTHFR* конкурує з *MTD* і *TS* за CH_2THF , тому, коли активність *MTHFR* знижена більше, CH_2THF стає доступним для *MTD*, чим пояснюється збільшення потоку через реакцію *MTD* і пов'язану з нею реакцію *MTCH*. Це опосередковано призводить до невеликого зростання потоків через реакції *PGT* і *AICART*. Ймовірно, що завдяки більшій доступності CH_2THF , збільшується потік через реакцію синтезу тимідинмонофосфату (*TS*). У разі низького значення потоку *MTHFR* більше навантаження з утилізації Hcy лягає на шлях транссульфування, опосередкований *CBS* і *CTGL*. Втім, оскільки за вихідних умов потік *MTHFR* значно менший, ніж потоки *CBS* і *CTGL*, то активація шляху транссульфування всього на 4% компенсує втрату активності *MTHFR*. Наступні етапи перетворення цистеїну, а саме синтез таурину і глутатіону зростають на незначну величину – на 8 і 2% відповідно.

Навантаження гомоцистеїном у разі носійства гетерозиготної форми *MTHFR* призводить до майже зворотної ситуації: потік через *CBS* зростає, поглинаючи надлишок гомоцистеїну за меншої «допомоги» з боку *MS*. *CBS* використовує багато серину, забираючи цей субстрат у *SHMT*, що виявляється у зниженні продукції CH_2THF серингідроксиметилтрансферазою. Саме тому ми спостерігаємо зниження потоків *MTD*, *MTCH* і пов'язаних з ними *PGT* і *AICART*. У разі моделювання зниженої активності *CBS* через зменшення відповідного потоку спостерігається зниження продукції цистеїну в системі, і це призводить до збільшення надходження цистеїну ззовні. Через це синтез таурину майже не зменшується, а утворення глутатіону навіть дещо зростає. Внаслідок зменшення потоку *CBS* більше навантаження з утилізації гомоцистеїну припадає на реметилування. Всі потоки фолатного циклу також збільшуються, незважаючи на конкуренцію з *MTHFR* за

CH_2THF . Це пояснюється збільшенням потоку *SHMT*, який постачає CH_2THF . Одночасно продукується більше гліцину, і тому його постачання в систему ззовні знижується на 46%. Збільшуються потоки в реакціях синтезу попередників нуклеїнових кислот.

В умовах навантаження гомоцистеїном на фоні зниженої активності *CBS* настає катастрофа – потоки *MTD* і *MTCH* припиняються, щоб максимально утилізувати накопичений гомоцистеїн за допомогою активації потоків *MTHFR* і *MS* (вважаємо, що цей результат є наближеним через особливості моделі, а повне виключення потоку в живій тканині є майже неймовірним). Адже за високої концентрації гомоцистеїну «без допомоги *CBS*» на них припадає основне навантаження з утилізації гомоцистеїну. Спостерігається зниження потоків в реакціях синтезу нуклеозидмонофосфатів, яке частково компенсується активацією потоку *FTS* (останній постачає формілтетрагідрофолат для синтезу азотистого кільця пуринових нуклеотидів). Втім, це зменшує доступність тетрагідрофолату для *SHMT*, і потік в останній реакції знижується, а внаслідок цього знижується і утворення CH_2THF . Зменшення доступності CH_2THF також грає роль у припиненні потоків *MTD* і *MTCH* на користь *MTHFR*.

Одночасне носійство гетерозиготної форми *MTHFR* і мутантної форми *CBS* призводить до зниження потоків через реакції всього метіонінового циклу, але потоки тетрагідрофолатного циклу зростають. Це особливо позначається на потоках через реакції *MTD* і *MTCH*, які зростають більше ніж у півтора раза. Підвищуються потоки для синтезу *de novo* пуринових мононуклеотидів і *TS*, тому що CH_2THF є в достатній кількості. Завдяки активному надходженню зовнішнього цистеїну і синтезу глутатіону, і синтезу таурину залишаються незмінними, навіть дещо зростають.

Обговорення

Ми вперше побудували стехіометричну модель фолатзалежного метаболізму в плаценті людини і застосували її для аналізу поведінки метаболічної мережі за навантаження гомоцистеїном і найпоширеніших мутацій в ензимах *CBS* і *MTHFR*. Модель не тільки відтворює дані, раніше одержані експериментально, але й надає ширшу інформацію щодо поведінки різних ланок системи в обраних умовах. Так, за навантаження гомоцистеїном модель передбачає накопичення цистеїну,

оскільки потоки транссульфування, що утворюють цистеїн, зростають, а синтез таурину і глутатіону, в якому цистеїн є субстратом, навпаки, знижується. Схожа картина накопичення цистеїну і збільшення вмісту цистатіонін- β -синтази спостерігається в експерименті з експлантами плаценти, які культивували в умовах підвищеної концентрації Гц в середовищі [13].

При моделюванні гетерозиготного носійства *MTHFR* ми спостерігали активацію потоків для синтезу пуринових нуклеотидів і тимідинмонофосфату та зниження реакцій метилування. Зростання активності синтезу попередників нуклеїнових кислот за зниженої активності *MTHFR* обговорюється в літературі, хоча експериментально це поки не перевірено [27]. Глобальне гіпометилування в асоціації з носійством мутації С677Т гену *MTHFR* підтверджено роботами різних авторів [28–30]. Схожі результати було отримано Ульріх з колегами [31] на кінетичній моделі одноуглецевого метаболізму в печінці людини. Кінетичні моделі складніші за стехіометричні, проте моделювання зниженої активності *MTHFR* так само показало зростання синтезу пуринів і піримідинів і зниження швидкості реакцій метилування ДНК. Отже, за меншої вимогливості до початкових даних ефективність стехіометричної моделі підтверджується порівнянням як із складнішими кінетичними моделями, так і з експериментально одержаними даними.

Моделювання фолатзалежного метаболізму в плаценті людини виявило деякі закономірності. Відомо, що метилентетрагідрофолат постачає одноуглецеві групи одразу для трьох метаболічних шляхів — для реметилування (*MTHFR*, *MS*), для синтезу тимідилату (*TS*) і для синтезу формілтетрагідрофолату (*MTD*, *MTCH*), який, у свою чергу, використовується в синтезі пуринових мононуклеотидів (*PGT*, *AICART*). Тому, якщо активність одного з цих трьох конкуруючих за метилентетрагідрофолат шляхів зменшується, активність інших зростає за умови достатньої кількості необхідних субстратів. Основний постачальник метилентетрагідрофолату — серингідроксиметилтрансфераза (*SHMT*). Потік через неї — найбільший серед всіх потоків фолатного циклу, а потік транспортування в систему серину — головного субстрату *SHMT* — найбільший потік всього фолатзалежного метаболізму (рис. 2). Таким чином, синтез пуринових нуклеотидів і тимідилату,

реакції реметилування опосередковано залежать від *SHMT*. Важливість останньої як головного постачальника одноуглецевих груп для фолатного циклу (тобто перетворення тетрагідрофолату на метилентетрагідрофолат) обговорюється в літературі [6]. Знижену активність *SHMT* розглядають як одну із причин незарощення нервової трубки у плода [9]. Шлях транссульфування пов'язаний через цистеїн із синтезом таурину і синтезом глутатіону. Але коливання активності транссульфування компенсуються імпортуванням або експортуванням цистеїну ззовні і назовні, а тому синтез таурину та глутатіону лишається відносно стабільним.

Гомоцистеїн у плаценті утилізується транссульфуванням до цистеїну і реметилуванням до метіоніну. Якщо активність одного з цих шляхів знижується, на інший лягає більше навантаження. Згідно з даними моделювання, критичнішим слід вважати порушення транссульфування, оскільки за вихідних умов потік транссульфування у 2,5 раза більший за потік реметилування (рис. 2).

Порівнюючи діапазони коливань значень потоків через різні реакції, можемо дійти висновку, що найменших змін зазнають потоки в реакціях утворення таурину і глутатіону, а найбільших — потоки в реакціях *MTD* і *MTCH*. Досить стабільними виявляються потоки через реакції утворення S-аденозилметіоніну і реакції метилування. Потоки через реакції утворення пуринових мононуклеотидів і дезокситимідилату коливаються в межах 60%. Одержані результати свідчать про істотну різницю в поведінці різних ланок системи за обраних умов її функціонування. На наш погляд, це є причиною нечітких і не завжди статистично вірогідних результатів, навіть у разі проведення широкомасштабних досліджень, в яких не враховуються одночасно поліморфізм одонуклеотидних замін, забезпеченість амінокислотами, фолатами й іншими вітамінами, задіяними у ФЗМОГ [32].

Запропонована модель допомогла краще зрозуміти логіку і взаємозв'язки у фолатзалежній мережі процесів і виявилась придатною для дослідження впливу різних ланок мережі на систему в цілому. Втім, не треба забувати, що цей метод має свої обмеження — ця модель не повністю враховує компартменталізацію фолатзалежного метаболізму, не враховує регуляцію експресії генів і активності ензимів, не показує напряду, в якому змінюється концентрація метаболітів. Ці недоліки можна усунути в подальшому.

Також ми розуміємо необхідність ґрунтовної експериментальної перевірки результатів проведеного моделювання. Ми плануємо перевірити експресію генів шляхів транссульфування і синтезу попередників нуклеїнових кислот у плацентарних експлантах в стандартних умовах культивування і за навантаження гомоцистеїном. Головна цінність математичної моделі — це дешевий і швидкий інструмент, що забезпечує попереднє тестування гіпотез, планування експериментів та інтерпретацію одержаних експериментальних даних.

СТЕХИОМЕТРИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ФОЛАТЗАВИСИМОГО МЕТАБОЛИЗМА ОДНОУГЛЕРОДНЫХ ФРАГМЕНТОВ В ПЛАЦЕНТЕ ЧЕЛОВЕКА

*Р. Р. Родригес¹, И. С. Луцик²,
М. Ю. Оболенская¹*

¹Институт молекулярной биологии
и генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: northernwizard@yandex.ru;

²Национальный университет «Киево-
Могилянская Академия», Украина

Работа посвящена созданию математической модели фолатзависимого метаболизма одноуглеродных групп (ФЗМОГ) и исследованию ее функционирования в плаценте человека в условиях нагрузки гомоцистеином и распространенных мутаций в генах метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР) и цистатионин-β-синтазы (ЦБС). При моделировании учтены специфические для плаценты особенности экспрессии генов, кодирующих энзимы ФЗМОГ. С помощью программных инструментов Metatool и COBRAToolbox определены ключевые метаболиты, элементарные моды и метаболические потоки в различных реакциях системы. Показано, что наиболее уязвимыми звеньями системы являются реакции фолатного цикла и синтеза предшественников нуклеиновых кислот, инозин- и тимидинмонофосфатов, которые в зависимости от наложенных условий изменяются в пределах от существенного подавления до активации. Наиболее стабильными звеньями системы являются реакции синтеза глутатиона и таурина. Результаты моделирования ФЗМОГ совпадают с результатами, экспериментально полученными при сходных условиях. В некоторых наложенных условиях проявляются ранее неочевидные связи между звеньями системы, что является основанием для целенаправленной проверки предсказаний, полученных с помощью модели.

Ключевые слова: фолатзависимый метаболизм одноуглеродных фрагментов, стехиометрическая модель, гомоцистеин, полиморфизм, метилентетрагидрофолатредуктаза, цистатионин-β-синтаза.

STOICHIOMETRIC MODEL OF FOLATE-DEPENDENT METABOLISM OF ONE-CARBON UNITS IN HUMAN PLACENTA

*R. R. Rodriguez¹, I. S. Lushchik²,
M. Yu. Obolenska¹*

¹Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: northernwizard@yandex.ua;

²National University *Kyiv-Mohyla Academy*, Ukraine

Summary

The work is dedicated to creation of the mathematical model of folate-dependent one-carbon unit metabolism (FOCM) and study of its function in human placenta under homocysteine load and the most common mutations in the genes of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and cystathionine β-synthase (CBS). In the model we have taken into account specific features of placental expression of genes that encode enzymes of FOCM. Using software tools Metatool and COBRAToolbox we have identified key metabolites, elementary modes and metabolic fluxes through different reactions of the system. It is shown that the most vulnerable links in the system are the folate cycle and synthesis of precursors of nucleic acids, inosine monophosphate and thymidine monophosphates, which are changing in the broad range from significant inhibition to activation depending on the imposed conditions. The most stable links in the system are the reactions of glutathione and taurine synthesis. Simulation results coincide with the results obtained in similar experimental conditions. Under certain imposed conditions non-obvious relationships between the system links are revealed, and this becomes the basis for a purposeful test of predictions generated by the model.

Key words: folate-dependent one-carbon metabolism, stoichiometric model, homocysteine, polymorphisms, metylenetetrahydrofolate reductase, cystathionine-β-synthase.

1. *Shane B.* Folate chemistry and metabolism. (In Bailey, L.B. (ed.) *Folate in Health and Disease*). — New York.: Marcel Dekker, 1995. — P. 1–22.

2. *Tchantchou F., Shea T. B.* Chapter 3: Folate Deprivation, the Methionine Cycle, and Alzheimer's Disease, (In Gerald Litwack, Editor, *Vitamins & amp; Hormones*). – Academic Press, 2008. – **79**. – P. 83–97.
3. *Martinov M. V., Vitvitsky V. M., Banerjee R., Ataullakhanov F. I.* // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2010. – **1804**, N 1. – P. 89–96.
4. *Tamura T., Picciano M. F.* // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2006. – **83**. – P. 993–1016.
5. *Appling D. R.* // *FASEB J.* – 1991. – **5**. – P. 2645–2651.
6. *Appling D. R., Tibbetts A. S.* // *Annu. Rev. Nutr.* – 2010. – **30**. – P. 57–81.
7. *Kennedy D. A., Stern S. J., Moretti M. et al.* // *Cancer Epidemiol.* – 2011. – **35**, N 1. – P. 2–10.
8. *Furness D., Fenech M., Dekker G. et al.* // *Matern. Child Nutr.* – 2011. – Epub ahead of print. Doi: 10.1111/j.1740-8709.2011.00364.x <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1740-8709.2011.00364.x/abstract>
9. *Fox J. T., Stover P. J.* // *Vitam. Horm.* – 2008. – **79**. – P. 1–44.
10. *Van der Put N., van Straaten H. W. M., Trijbels F. J. M., Blom H. J.* // *Exp. Biol. Med.* – 2001. – **226**. – P. 243–270.
11. *Mislanova C., Martsenyuk O., Huppertz B., Obolenskaya M. Yu.* // *Reproduction*. – 2011. – **142**, N3. – P. 467–476.
12. *Марценюк О. П., Мішланова Ш., Романець К. Л. та ін.* // *Укр. біохім. журн* – 2009. – **81**, № 4. – С. 94–104.
13. *Марценюк О. П., Романець К. Л., Оболенська М. Ю., Хупертц Б.* // *Там само.* – № 5. – С. 40–49.
14. *Романець К. Л., Марценюк О. П., Оболенська М. Ю.* // *Там само.* – 2010. – **82**, № 4 (додаток 1). – С. 232.
15. *Frosst P., Blom H. J., Milos R. et al.* // *Nat. Genet.* – 1995. – **10**. – P. 111–113.
16. *Brustolin S., Giugliani R., Félix T. M.* // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2010. – **43**, N 1. – P. 1–7.
17. *Lievers K. J., Kluijtmans L. A., Heil S. G. et al.* // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2001. – **9**. – P. 583–589.
18. *Kozich V., Kraus J. P.* // *Hum. Mutat.* – 1992. – **1**. – P. 113–23.
19. *Steuer R., Junker B. H.* / *Computational Models of Metabolism: Stability And Regulation In Metabolic Networks.* (In Rice, S.A. (ed.), *Advances in Chemical Physics*). – New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2009. – **142**. – P. 105–252.
20. *Reed M. C., Thomas R. L., Pavisic J.* // *Theoretical Biology and Medical Modelling.* – 2008. – **5**, N 8. – doi:10.1186/1742-4682-5-8 (Epub). Doi:10.1186/1742-4682-5-8 <http://www.tbiomed.com/content/5/1/8>.
21. *Neuhausser M. L., Nijhout H. F., Gregory J. F. 3rd* // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2011. – **20**, N 9. – P. 1912–7.
22. *Curtin K., Ulrich C. M., Samowitz W. S.* // *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* – 2011. – **2**, N 1. – P. 1–8.
23. *Оболенська М. Ю., Родригес Р. Р., Марценюк О. П.* // *Укр. біохім. журн.* – 2011. – **83**, № 1. – С. 5–17.
24. *Field M. S., Stover P. J.* // *Adv. Nutr.* – 2011. – **2**. – P. 325–331.
25. *Terzer M., Stelling J.* // *Bioinformatics.* – 2008. – **24**, N 19. – P. 2229–2235.
26. *Schellenberger J., Que R., Fleming R. et al.* // *Nature Protocols.* – 2011. – **6**. – P. 1290–1307.
27. *Sang-Woon Choi, Joel B. Mason* // *J. Nutr.* – 2002. – **132**, N 8. – P. 2413–2418.
28. *Paz M. F., Avila S., Fraga M. F. et al.* // *Cancer Res.* – 2002. – **62**. – P. 4519–4524.
29. *Friso S., Choi S.-W., Girelli D. et al.* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2002. – **99**. – P. 5606–5611.
30. *Castro R., Rivera I., Ravasco P. et al.* // *J. Med. Genet.* – 2004. – **41**. – P. 454–458.
31. *Reed M. C., Nijhout H. F., Neuhausser M. L. et al.* // *J. Nutr.* – 2006. – **136**, N 10. – P. 2653–2661.
32. *Murphy M. M., Fernandez-Ballart J. D.* // *Adv. Clin. Chem.* – 2011. – **53**. – P. 105–137.

Отримано 13.12.2011