

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJU KATEDRA

Cryptocodinium cohnii metabolisma matemātiskā modelēšana
DHA ražošanas optimizācijai

Bakalaura darbs

Autors: Santa Prikule
Stud. Apl. Nr. sp17042
Darba vadītājs: Dr.sc.ing. Egils Stalidzāns

RĪGA 2020

KOPSAVILKUMS

Datormodelēšana un bioķīmisko ceļu simulēšana ir sistēmbioloģijas pamatnostādnes, un pastāv vairākas metodes, kas var palīdzēt šo sistēmu izpētīšanā. Darbā izmantota divu sistēmbioloģijas modelēšanas metožu pieeja šūnu taukskābju sintēzes metabolisma pētīšanai.

Darba ietvaros izveidots kinētiskais modelis, kas ietver glikolīzes ceļa reakcijas un reakcijas, kas ved līdz taukskābju sintezējošajam enzīmam- FAS, kā arī pilnveidots genoma izmēra metaboliskais modelis dinoflagellātam *Cryptocodinium cohnii*. Kinētiskais modelis tika parametrizēts saskaņā ar pieejamajiem eksperimentālajiem datiem. Aplūkoti stehiometriskajā modelī ietvertie metabolisma regulācijas mehānismi taukskābju sintēzei un galvenā prekursorā metabolīta iesaiste organisma reakcijās.

Turpmāk abus modeļus paredzēts izmantot stratēģiju veidošanā pētāmā organisma metabolisma optimizācijai. Mērķis ir palielināt dokozaheksaēnskābes ražošanu, un veikt pareizo substrātu izvēli organisma audzēšanai bioreaktorā.

Atslēgas vārdi: Dokozaheksaēnskābe, *Cryptocodinium cohnii*, kinētiskā modelēšana, stehiometriskā modelēšana.

SUMMARY

Computational modelling and biochemical pathway simulations are at the center of systems biology and there are many methods which aid in the understanding of these systems. Two of those methods are used to study the metabolism of fatty acid synthesis.

A kinetic model was constructed as a part of the work, which includes reactions of the glycolytic pathway and reactions that lead to the FAS enzyme which catalyzes fatty acid synthesis. A genome- scale metabolism model was obtained for the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* and further improvements were made. Kinetic model was parameterized accordingly to the experimental data. The metabolic mechanisms responsible for the fatty acid accumulations were considered as well as the reactions of the main precursor for the fatty acid synthesis.

It is planned to use both models in the development of new strategies for the optimization of the metabolism of the organism of interest. The aim is to improve the production of docosahexaenoic acid and to aid in the selection of the best substrates for the growth in the bioreactor.

Keywords: Docosahexaenoic acid, *Cryptocodinium cohnii*, kinetic modelling, stoichiometric modelling.

IZMANTOTIE APZĪMĒJUMI

ACP- no angļu val. "*acyl carrier protein*" acil grupu nesošais proteīns

C- ogleklis

DHA- dokozaheksaēnskābe

ET- endoplazmatiskais tīkls

FAS- no angļu val. "*fatty acid synthase*" taukskābju sintēzes sistēma

FBA- no angļu val. "*flux balance analysis*" plūsmas balansa analīze

G6FD- glikozes-6 fosfāta dehidrogenāze

GEM- no angļu val. "*genome-scale metabolic model*" genoma mēroga metaboliskie modeļi

HDL- no angļu val. - "*high density lipoproteins*" augsta blīvuma lipoproteīni

LC- PUFAs- no angļu val. "*long chain polyunsaturated fatty acids*" garo ķēžu polinepiesātinātās taukskābes

N- slāpekļis

PFK- fosfofrukto kināze

PKS- no angļu val. "*polyketide synthase*" poliketīdu sintēzes sistēma

PUFAs- no angļu val. "*polyunsaturated fatty acids*" polinepiesātinātās taukskābes

SATURS

IEVADS	7
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	8
1.1. Modelēšana	8
1.1.1. Matemātiskā modelēšana	8
1.1.2. Modelēšanas izmantošanas motivācija.....	8
1.1.3. Kinētiskie modeļi	9
1.1.4. Stehiometriskie modeļi.....	9
1.1.5. Genoma mēroga stehiometriskie modeļi.....	10
1.2. DHA.....	12
1.3. DHA nepieciešamība uzturā	12
1.4. <i>Cryptocodinium cohnii</i>	13
1.4.1. <i>C. cohnii</i> taksonomija.....	13
1.4.2. <i>C. cohnii</i> izmantošana	14
1.4.3. Lipīdu asimilācijas regulējošie mehānismi	15
1.4.4. Saistība ar substrāta slāpekļa avotu	15
1.4.5. Saistība ar substrāta oglekļa avotu	16
1.4.6. Bioķīmiskās atšķirības lipīdu asimilācijā.....	17
1.4.7. NADPH iegūšana:	18
1.4.8. Polinepiesātināto taukskābju sintēze.....	19
1.4.9. Konvencionālais polinepiesātināto taukskābju sintēzes mehānisms.....	20
1.4.10. PKS sintēzes ceļš.....	20
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	22
2.1. Kinētiskā modelēšana	22
2.1.1. Kinētiskā modeļa reakciju shēmas izveide.....	22
2.1.2. Copasi.....	22
2.1.3. Izmantotie vienādojumi kinētiskajā modelī	22
2.2. Stehiometriskā modelēšana.....	23
2.2.1. Izmantotās datorprogrammas	23
2.2.2. Organisma genoma sekvence	24
2.3. Datubāzes.....	25
3. REZULTĀTI.....	26
3.1. Kinētiskais modelis.....	26
3.1.1. Kinētiskā modeļa struktūra.....	26

3.1.2. Parametru novērtēšana	27
3.1.3. Kinētiskā modeļa stacionārais stāvoklis.....	30
3.2. Stehiometriskais modelis	31
3.2.1. Gapfill rezultāti	32
3.2.2. Modeļa vizualizācija	35
3.2.3. Taukskābju sintēze stehiometriskajā modelī.....	36
3.2.4. Lipīdu asimilācijas regulējošie mehānismi:	38
4. DISKUSIJA	40
4.1. Kinētiskā modelēšana	40
4.2. Stehiometriskā modelēšana.....	41
4.3. Abu modelēšanas veidu kopēja izmantošana.....	43

IEVADS

Šūnu metabolisms veido lielus un sarežģītus tīklus, kuru apzināšana un paredzēšana var nest lielu zinātnisko gandarījumu, bet tas ir darbietilpīgs process. Datortehnoloģijas tiek lietotas šo tīklu attainošanai un analīzei veidojot bioloģijas *in silico* komponenti. *In silico* (datormodeļi) modeļi var būt noderīgi šo tīklu simulācijās un jaunu stratēģiju izstrādāšanā, virzot zinātnisko darbību.

Omega 3 taukskābes ir plaši lietots uztura bagātinātājs, kuras zināmas saistībā ar to labvēlīgo ietekmi uz cilvēka organismu. Dokozaheksaēnskābe (DHA) ir viena no šīm omega 3 taukskābēm, kura lielos daudzumos tiek iegūta no zivīm. Samazinoties Pasaules Okeana zivju resursiem, un pieaugot pasaules populācijai, ka arī tās pieprasījumam pēc uztura bagātinātājiem, ir vērts pievērsties šīs taukskābes oriģinālajiem pamatražotājiem- aļģēm un dinoflagellātiem. Izmantojot postgenomiskās ēras plašo informācijas daudzumu un datortehnoloģiju piedāvātās iespējas, projekta *CryZym* ietvaros paredzēts optimizēt DHA ražošanu dinoflagellātā, padarot šādu biotehnoloģisku produkta iegūšanu ekonomiski izdevīgu.

Darba mērķis: izmantojot sistēmbioloģijā visbiežāk pielietotos modelēšanas veidus, izveidot kinētisko modeli un pilnveidot stehiometrisko modeli taukskābju sintēzes metabolisma pētīšanai.

Darba uzdevumi:

1. Noskaidrot nozīmīgākās reakcijas, kuras nepieciešams iekļaut kinētiskajā modelī. Reakciju tīklā jāiekļauj oglekļa substrāta uzņemšana, tā pārvēršana par taukskābju prekursoro metabolītu un taukskābju sintēze.
2. Veikt nepieciešamo reakciju parametru apkopošanu un nezināmo parametru apzināšanu.
3. Izveidot kinētisko modeli un veikt nezināmo parametru noskaidrošanu. Izveidotajam modelim iegūt stacionāro stāvokli.
4. Veikt stehiometriskā modeļa pilnveidošanu, automatizēti aizpildot nesabalansētas reakcijas, sašaurinot, vienkāršojot un aizpildot strupceļreakcijas modelī. Veikt modeļa vizualizāciju.
5. Noskaidrot taukskābju sintēzes prekursorā metabolīta iesaisti modeļa reakcijās. Noskaidrot lipīdu asimilācijas regulējošos mehānismus modelī.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Modelēšana

1.1.1. Matemātiskā modelēšana

Matemātiskā modelēšana bioloģiskā kontekstā tiek pielietota jau kopš pagājušā gadsimta vidus. Modeļi tiek izmantoti populāciju ekoloģijā, epidemioloģijā, kā arī šūnu metabolisma pētīšanā. Iespējams, visaktualākās modeļsistēmas šobrīd tiek veidotas, lai analizētu CO₂ ietekmi uz Zemes klimatu nākotnē (SWIPA 2017) vai slimību gaitu, izplatību un spējas tas ierobežot (Chang et al. 2020). Bioķīmijā divas lielākās modeļu klases ir stehiometriskie modeļi un kinētiskie modeļi (Bergmann et al. 2017).

Modeļsistēmu mērķis biotehnoloģijās ir maksimizēt plūsmu uz vajadzīgajiem reakciju produktiem un minimizēt to uz nevajadzīgiem blakusproduktiem. Tas iespējams ar dažādām kinētiskās un stehiometriskās modelēšanas metodēm. Izmaiņas, kuru lietderība konstatēta modelī, var tikt ieviestas eksperimentāli laboratorijās.

1.1.2. Modelēšanas izmantošanas motivācija

Bailija (*Bailey*) 5 principi pamato modelēšanas teorētisko noderību:

1. ‘‘Organizēt dažādu informāciju sakarīgā veselumā (*‘‘To organize disparate information into a coherent whole’’*): Informācija, uz kuras pamata, tiek būvēti modeļi, parasti ir atrodamā dažādos datu avotos. Modelētajiem tā ir jāizvērtē un jāapraksta kontekstā.

2. Loģiski spriest par dažādu komponentu un mijiedarbību nozīmi kompleksā sistēmā (*‘‘To think (and calculate) logically about what components and interactions are important in a complex system’’*). Kad informācija ir ievākta, to var reprezentēt matemātiskā veidā, formulējot matemātiskās formulas. Dažādu komponentu mijiedarbība tiek izvērtēta, un modeļa dati tiek salīdzināti ar eksperimentāli iegūtajiem datiem.

3. Atklāt jaunas stratēģijas (*‘‘To discover new strategies’’*). Izveidotie modeļi bieži spēj atklāt jaunas likumsakarības starp tā komponentēm, kuras iepriekš nav izdevies pamanīt. To visu padara sarežģītu lielais datu apjoms, kas parasti iekļauts modeļos. Modeļu simulācijas parasti noved pie jauniem eksperimentiem un hipotēzēm.

4. Veikt svarīgus labojumus tradicionālajā domāšanā (*‘‘To make important corrections to the conventional wisdom’’*). Modeļu uzrādītie rezultāti var atšķirties no valdošajiem pieņēmumiem, kas ir secināti pamatojoties uz kvalitatīvu domāšanu. Labi modeļi var novest līdz jaunai konceptuālai attīstībai.

5. Saprast svarīgas kvalitatīvās īpašības (*‘‘To understand the essential qualitative features’’*). Modeļi iekļauj aprakstītas metaboliskās mijiedarbības starp to komponentēm, tādēļ tie var palīdzēt izprast mehānismu kā vienu veselumu (Bailey 1998).

1.1.3. Kinētiskie modeļi

Kinētiskie modeļi sastāv no reakcijām, kuru ātrumu apraksta atbilstoši diferenciālie vienādojumi (*Rate laws*). Šie modeļi parasti aptver mazāku sistēmas daļu, piemēram, konkrētu metabolisko ceļu. Lai izveidotu kinētisko modeli, nepieciešama detaļzētāka informācija par reakciju norisi un enzīmu darbību. Toties lielāks informācijas daudzums, kas ietverts modelī, ļauj veikt precīzāku sistēmas analīzi (Bergmann et al. 2017).

Stacionārais stāvoklis ir sistēmas stāvoklis, kuru raksturo nemainīga metabolītu koncentrācija laikā, kas iespējama, kad metabolīta ražošanas ātrums ir vienāds ar tā patērēšanas ātrumu modelī, ja reakciju ātrums nav vienāds ar nulli.

Molekulārā līmenī galvenais uzdevums ir noskaidrot bioķīmiski relavento enzīmu darbības mehānismus un to regulāciju. Šī informācija tiek izmantota, lai palielinātu interesējošā produkta ražību (*yield*). Viens no veidiem kā to izdarīt, ir aprēķināt sistēmas stacionāro stāvokli un apvienot to ar strukturālo analīzi un/vai molekulāro modelēšanu. Šādā veidā tika simulēta DNS endonukleāžu darbība, kuru katalītiskajai darbībai nepieciešama dažādu divvērtīgu metāla jonu saistīšana (Pingoud et al. 2009). Otra stratēģija ietver kinētiskā modeļa izveidošanu un parametru novērtēšanas metodi. Šādā veidā tika optimizēta frukto-oligosaharīdu produkcija (Kashyap et al. 2015) un tika pētīta nitrogēna asimilācija *Eschericia coli* (Ma et al. 2009).

Ir vairākas pieejas kinētisko modeļu analīzei un optimizācijai. Viena no tām- metaboliskā kontroles analīze (MCA). MCA spēj kvantitatīvi noteikt, cik daudz izmaiņas vienā reakcijā, ietekmē visa modeļa stacionāro stāvokli vai citu reakciju plūsmu. Tiek aprēķināti “kontroles koeficienti”, kas nosaka katras reakcijas devumu kopējai reakciju un metabolītu izmaiņai (Mendes et al. 2009). Jūtīguma (*Sensitivities*) analīze spēj noteikt cik daudz izvēlēts parametrs (the effect) spēj mainīt izvēlētu modeļa mainīgo (the cause). COPASI (Hoops et al. 2006) ietver dažādus iebūvētus parametrus un mainīgos, kurus lietotājs var izvēlēties. Piemēram, kā parametru var izvēlēties sākuma koncentrācijas, bet kā mainīgo- reakciju plūsmas (Bergmann et al. 2017). MCA var uzskatīt kā apakšgrupu jutīguma analīzei, kuru veic stacionārajam stāvoklim, tomēr aprēķina metodes atšķiras. Optimizāciju var realizēt arī izmantojot dažādas mākslīgā intelekta metodes, kas arī ir pieejamas COPASI.

1.1.4. Stehiometriskie modeļi

Stehiometriskie modeļi balstās uz stehiometrijas pamatprincipu, kas nosaka, ka reakcijas gaitā, izmantoto substrātu daudzums būs kvantitatīvi tāds pats kā gala produktu daudzums. (Stehiometrija apzīmē relatīvu susbtrāta un produkta masas saglabāšanu pirms un pēc

reakcijas.) Stehiometriskajos vienādojumos to palīdz uzturēt reakciju koeficienti, kas uzskaita molekulas, kas ir saražotas un patērētas reakcijā. Modeļus veido šo reakciju statistiskas shēmas un tos izmanto, lai atspoguļotu plūsmas sadalījumu metaboliskajā tīklā. Modeļi veido metabolīti, kas savā starpā savienoti ar reakcijām. Reakcijas modelī aizvietotas ar tās izpildošajiem enzīmiem. Stehiometriskie modeļi vienmēr attēlo metabolisko tīklu stacionārajā stāvoklī, tas ir, visu reakciju plūsma un metabolītu koncentrācija ir relatīvi vienāda.

Modeļi satur informāciju par gēnu, reakciju un metabolītu savstarpējo saistību, kā arī informāciju par reakciju atgriezeniskumu un stehiometriju. Reakciju stehiometriju raksturo matricas, kas palīdz bioloģisko informāciju kvantificēt un atspoguļo to matemātiskā veidā (1.attēls). Rindas atbilst metabolītiem un kolonnas reakcijām. Katra rinda atspoguļo vienu modeļa metabolītu, kas ir vai nu reakcijas substrāts vai produkts, bet katra kolonna konkrētu reakciju (Wang et al. 2018).

$$\begin{array}{c}
 \text{Reakcijas} \\
 R_1 \quad R_2 \quad R_3 \\
 \text{Metabolīti} \begin{array}{c} \triangle \\ \square \\ \circ \end{array} \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & 0 \end{bmatrix} = S
 \end{array}$$

1. attēls. Metabolītisko tīklu stehiometriskā reprezentācija. R_1 , R_2 , un R_3 apzīmē reakcijas šūnā, bet figūras attēlo metabolītus. Piemēram, reakcijā R_1 tiek patērēts trijstūra metabolīts, bet tiek saražots apla metabolīts.

Figure 1. Stoichiometric representation of metabolic pathways. R_1 , R_2 , and R_3 indicate the reactions of the cell but geometric shapes represent the metabolites. For example, in reaction R_1 the triangular metabolite is consumed and the circle one is produced.

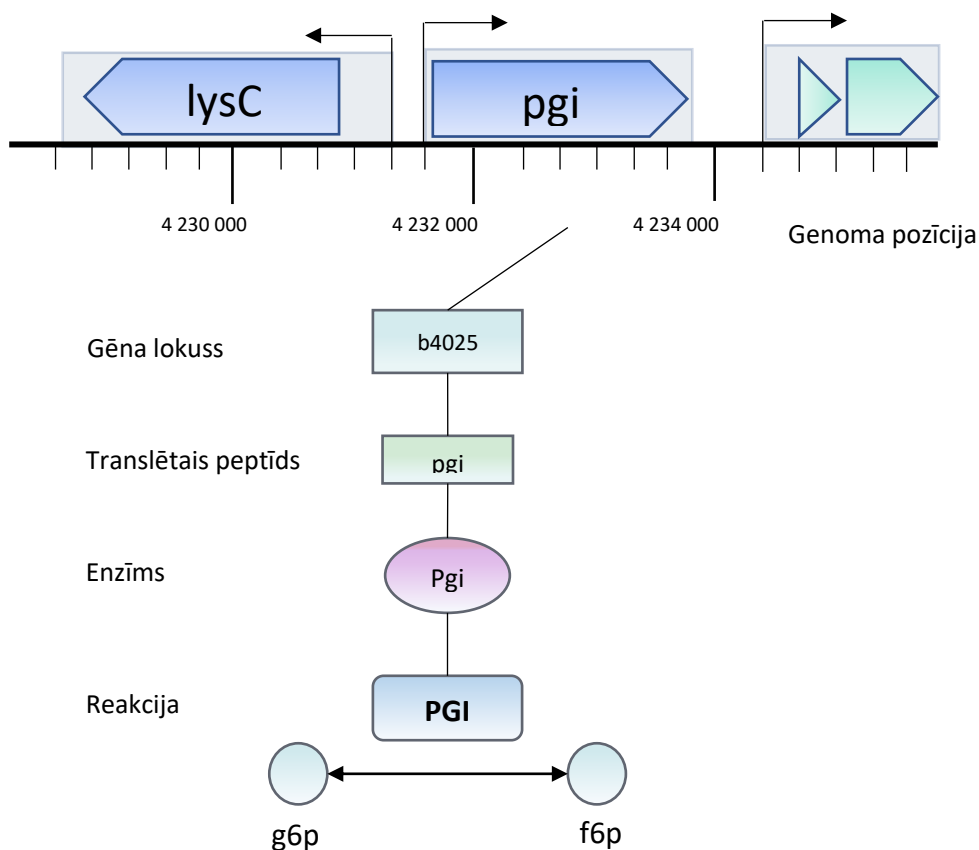
Stehiometriskie modeļi piedāvā platformu metaboliskā tīkla strukturālai analīzei. Modeļu vadīta un racionāla metabolsikā inženērija ļauj ietaupīt laiku un materiālos resursus (Kuepfer 2014).

1.1.5. Genoma mēroga stehiometriskie modeļi

Izmantojot veselas genomu sekvences, var tikt veidoti genoma izmēra stehiometriskie modeļi. Darbā tiek izmantotas datubāzes, kas satur nepieciešamo informāciju par saistību starp gēnu-proteīnu-reakciju mijiedarbībām, vai var tikt izmantota proteīnu homolģija ar citiem iepriekš izveidotiem genoma- izmēra modeļiem.

Genoma izmēra modeļi (*genome-scale models*) tiek veidoti pamatojoties uz sekvencē iegūstamo informāciju. Nukleotīdu tripleti kodē aminoskābes, kuras veido konkrētus enzīmus.

Noskaidrojot organismā esošos enzīmus, var tikt izveidotas metabolisko ceļu shēmas. (2. attēls), Centrālā metabolisma ceļi, lielākoties, ir līdzīgi starp atsevišķiem organismiem, tomēr, tie var atšķirties, tādēļ modeļi ir organismu specifiski. Sekundārā metabolisma ceļi izraisa lielāku interesi, jo tie atbild par dažādu saimnieciski nozīmīgu produktu sintēzi- antibiotiku, bioloģisko pesticīdu un citu makromoleku- sintēzi, un šie ceļi bieži ir organismu grupām specifiski.



2. attēls. Gēnu- proteīnu- reakciju attiecības modelī. Iekrāsotie taisnstūra laukumi, kas ir apkārt gēniem, ir gēnu operoni. Modelī gēni atrodami tikai pēc gēna lokusa numura (zilais taisnstūris). Gēna produkts- peptīds (gaiši zaļais taisnstūris), šajā gadījumā ir arī vesels funkcionējošs enzīms- fosfoglikozes izomerāze (violetais ovāls), kurš katalizē glikozes 6- fosfāta izomerizāciju par fruktozes 6-fosfātu (metabolīti attēloti kā gaiši zili aplīši). Pārveidots no opencobra.github.io

Figure 2. Gene- protein- reaction relationships in the model. The coloured rectangles around the genes indicate gene operons. Genes in the model are represented only by their locus numbers (light blue boxes). Gene product- the peptide (light green boxes), in this case is also a functioning enzyme- phosphoglucose isomerase (purple oval) which catalyzes the isomerisation reaction between glucose 6-phosphate and fructose 6- phosphate (metabolites represented as light blue circles). Modified from opencobra.github.io

Stehiometriskie modeļi piedāvā vairākas sistēmas optimizācijas metodes. FBA (*Flux balance analysis*) ir viena no visbiežāk izmantotajām metodēm. Izmantojot šo metodi, tiek aprēķināta metabolītu plūsma visā sistēmā, tādā veidā ļaujot paredzēt izvēlēta produkta sintēzes vai šūnas augšanas ātrumu. Izvēlēta metabolīta ražošanas vai izvades reakcija tiek norādīta, kā mērķa funkcija, kuru parasti mēģina maksimizēt. Tādā veidā iespējams redzēt lielāko iespējamo plūsmu mērķa metabolīta virzienā (Orth et al. 2010).

pFBA (*parsimoneouse enzyme usage Flux Balance Analysis*) jeb ekonomiskas enzīmu izmantošanas FBA analīze ir cieši saistīta ar sekvencē ietvertās informācijas izmantošanu, lai optimizētu organisma darbību. Vispirms tiek identificēti būtiskie gēni. Par tādiem tiek atzīti gēni, bez kuriem pēc *gene-knocked out* analīzes nav iespējama organisma augšana. Tālāk tiek noskaidrotas reakcijas, kas nespēj caur sevi vadīt plūsmu, un ar tām saistītie gēni. Turpmāk tiek noteiktas 2 reakciju grupas: enzimatiski mazāk efektīvas reakcijas, un metaboliski mazāk efektīvas reakcijas. Abām šīm reakciju grupām ir alternatīvi ceļi, kas ir vairāk izdevīgi organismam; enzimatiski mazāk efektīvās reakcijas izmanto vairāk enzīmu nekā nepieciešams, lai sintizētu tos pašus metabolītus, ko alternatīvi reakciju ceļi. Ja organismā ir vairāki ceļi viena un tā paša gala produkta sintēzei, tad metaboliski mazāk efektīvās reakcijās, izmantos vairāk substrātā metabolītus nekā cits reakciju ceļš. Baktēriju kolonijai attīstoties bioreaktorā eksponenciālajā fāzē, notiek adaptīvas evolucionāras paaudžu maiņas. Katrai paaudzei mutējot, to augšanas ātrums palielinās, kas ir saistīts ar būtisko gēnu augšupregulēšanu un mazāk efektīvo reakciju lejupregulēšanu (Lewis et al. 2010).

1.2. DHA

Dokozaheksaēnskābe (DHA) ir polinepiesātināta omega 3 taukskābe 22:6 (n-3), kas satur 22 oglekļa (C) atomus un 6 dubultsaites. Dubultsaites atrodas pie 4, 7, 10, 13, 16, un 19 oglekļa atomiem ($\Delta 4,7,10,13,16,19$) un visas ir cis konformācijā (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

1.3. DHA nepieciešamība uzturā

Cilvēka organisms ir spējīgs sintizēt DHA tikai minimālos daudzumos: vīriešiem spēja sintizēt DHA ir pietiekami maza, ka atsevišķos gadījumos to nav iespējams detektēt. Vīriešu organismos, DHA sintēze nepieciešama tikai, lai nodrošinātu šūnu membrānas uzturēšanu (*membrane turn over*) un DHA sastāda mazu daļu, no membrānā esošajām taukskābēm (Burdge et al. 2002). Sievietēm DHA sintēze notiek lielākos apmēros. Pastāv hipotēze, ka tas saistīts ar nepieciešamību zīdīt mazuļus, un to nodrošināšanu ar nepieciešamajām taukskābēm grūtniecības periodā (Burdge and Wootton 2002). DHA ir nozīmīga loma dzīves agrīnajā attīstības posmā. DHA koncentrācija neirālajos audos sastāda aptuveni 14% (14g/100g no

kopējā taukskābju sastāva) (Carver et al. 2001; Arterburn et al. 2006) un tā ir vienīgā polinepiesātinātā taukskābe, kuras daudzums turpina palielināties līdz 18 gadu vecumam (Carver et al. 2001), kas liek secināt, ka tās uzņemšana ir vitāli svarīga smadzeņu audiem. Cilvēku smadzeņu masa strauji pieaug kopš dzimšanas brīža līdz pirmajiem 4 dzīves gadiem (Hardt 2007), tādēļ ir svarīgi saņemt uzturvielas, kas satur DHA. DHA un citas omega-3 taukskābes ir nozīmīga sastāvdaļa piena pulveros, kas paredzēti zīdaiņu barošanai, lai pēc iespējas vairāk imitētu dabisko mātes piena sastāvu (Koletzko et al. 2015). Eiropas Pārtikas nekaitīguma iestāde (*European Food Safety Authority*) noteikusi nepieciešamo DHA daudzumu, ar ko nepieciešams nodrošināt zīdaiņus, kas ir 100 mg/dienā (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) 2013).

Pētījumi norāda uz DHA spēju samazināt sirdsdarbības ātrumu un asins spiedienu, uzlabojot endotēlija un gludo muskuļu funkcijas asinsvados. DHA samazina kologēna inducētu trombocītu agregāciju asinsvados, samazinot tromboksāna B2 izdalīšanos, kā arī palielina augsta blīvuma lipoproteīnu (HDL) holesterīna daļiņu daudzumu, kas palīdz novērst aterosklerozi jeb lipīdu nogulsnešanos uz asinsvadu iekšējām sienām (Mori and Woodman 2006).

Veikti vairāki pētījumi, kas norāda uz fertilitātes uzlabošanu vīriešiem, uzturā lietojot bagātinātājus, kas satur polinepiesātinātās taukskābes (PUFAs). Ir pierādīts, ka DHA samazina spermatozoīdu DNS fragmentācijas indeksu, palielinot DHA sastāvu šūnas membrānā, tādā veidā samazinot oksidatīvo brīvo radikāļu (ROS) izraisītos bojājumus (Martínez-Soto et al. 2016). Pierādīts, ka arī baktērijās, garo ķēžu PUFAs ir iesaistītas rezistences veidošanā pret ROS (Yoshida et al. 2016). Dānijā veikts pētījums, kas norāda uz dažādu spermas parametru uzlabošanu arī armijas vecuma vīriešiem. Salīdzinājumā ar kontroles grupu, kas uzturā nav papildus lietojuši zivju eļļas produktus, viņiem ir lielāks aktīvo šūnu skaits, spermas tilpums un lielāka brīvā testosterona un luteinizācijas hormona (LH) attiecība (Jensen et al. 2020).

Tā pat kā zīdaiņiem, arī pieaugušiem cilvēkiem noteikts nepieciešamais DHA un EPA (eikazapentaēnskābe C20:5) kopējais daudzums: 250 mg/dienā (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) 2010).

1.4. *Cryptocodinium cohnii*

1.4.1. *C. cohnii* taksonomija

C. cohnii ir eikariotisks, sālsūdenī dzīvojošs dinoflagellāts. Dinoflagellāti ir organismu grupa, kas saglabājusi vairākas prokariotiskās īpašības (hromosomas kondensētas visu dzīves ciklu, liels daudzums DNS metilēts) un to visraksturīgākā īpašība ir 2 flagellas no kurām viena

ir apvīta apkārt šūnai, bet otra atgādina monotrihu baktēriju flagellu. Suga ir svarīga fitoplanktona sastāvdaļa (Mendes et al. 2009; Bi et al. 2019).

1.4.2. *C. cohnii* izmantošana

Uztura bagātinātāji (Pārtikas piedevas), kas satur augstu taukskābju daudzumu, parasti tiek iegūti no dzīvnieku vai augu valsts produktiem. Zivju eļļa joprojām ir lielākais omega-3 taukskābju avots, ko izmanto uztura bagātinātājos. Augi parasti nesatur garo ķēžu vai piesātinātās taukskābes. To sastāvā ir īsakās un vai piesātinātās taukskābes, tādēļ tie nav piemēroti omega-3 taukskābju iegūšanai. Piemēram, palmitīnskābe (16:0) ir galvenā sastāvdaļa palmu eļļā (Fitzherbert et al. 2008) un tai organismā nav īpašu funkciju, kā vien, tā kalpo kā enerģijas avots.

Mikroorganismi kā lipīdu ieguves avots, tika apsvērti jau iepriekšējā gadsimta sākumā (Ratledge and Wynn 2002). Jāpiemin, ka augstais PUFU sastāvs zivīs ir no to barības avota dažādām aļģēm un dinoflagellātiem, kas mīt fitoplanktonā. Ir vairāki iemesli, kas mudina apšaubīt omega-3 iegūšanu no zivīm. Zivju aknās, kas ir galvenais taukskābju iegūšanas avots, uzkrājas smagie metāli, dioksīni un PCBs (polychlorinated biphenyl). Smago metālu vidū ir metilmerkūrijs, kas negatīvi ietekmē zīdaiņu neuroattīstību. PCBs ir organiski savienojumi un tie ir saistīti ar virkni veselībai negatīvu efektu, tai skaitā aknu bojājumiem un dažādām vēža formu attīstībām (Schechter et al. 1995; EFSA Scientific Committee 2015). Zivju eļļas attīrīšana no šiem savienojumiem ir dārgs un sarežģīts process, kas joprojām nodarbina vairākas zinātnieku grupas un prasa ievērojamus resursus (Guil-Guerrero and Belarbi 2001). Amerikas Savienotajās valstīs šādā veidā iegūtu DHA aizliegts pievienot bērnu piena pulveriem, ko var uzskatīt par nepieciešamības precī jaunajām ģimenēm, un kuru pieprasījums pieaug (Ratledge 2004). No dinoflagellātiem iegūts DHA ir droša alternatīva. Mikroorganismu kultivācijā tiek izmantotas biotehnoloģijas, un netiek negatīvi ietekmēti Pasaules Okeāna zivju resursi. Šādi iegūtas omega-3 taukskābes ir pieejamas veģetārā dzīvesveida piekritējiem, kas mūsdienās kļūst aizvien aktuālāks.

Ir 2 mikroorganismu grupas no kurām komerciāli mēģināts iegūt taukskābes- *C. Cohnii* celmi un triaustohitrīdi (*Thraustochytrium sp.*, *Schizochytrium sp.*), kas ir sālsūdenī dzīvojoša eikariotu grupa (Ratledge and Wynn 2002). *C. Cohnii* izmantošanai ir vairākas priekšrocības.

Cryptocodinium cohnii ir viens no nedaudzajiem mikroorganismiem, kas lipīdus uzkrāj kā barības rezerves vielas un tiek rūpnieciski izmantots DHA ražošanai (Mendes et al. 2009). Dinoflagelāts ir nefotosintēzējošs, kas atvieglo tā kultivēšanu un DHA frakcija no kopējā taukskābju daudzuma (total fatty acids TFA) sastāda līdz pat 40% (Liu et al. 2015; de Swaaf et

al. 2003). Šis ir viens no lielākajiem DHA apjomiem zināmo organismu vidū. Citu piesātināto un nepiesātināto taukskābju piemaisījums ir ļoti mazs, kas ievērojami atvieglo DHA attīrīšanu un padara procesu pievilcīgu farmācijas nozarei. Attīrīšanas process ir īpaši svarīgs, jo taukskābju izmantošanai medikamentos un bērnu piena pulveros nepieciešama tīrības pakāpe vismaz 95% (Ratledge 2004; de Swaaf et al. 1999; de Swaaf et al. 2003; Mendes et al. 2009).

1.4.3. Lipīdu asimilācijas regulējošie mehānismi

Viens no interesējošajiem jautājumiem ir, noskaidrot bioķīmiskās atšķirības, kas ļauj šiem organismiem asimilēt lielāku daudzumu lipīdu nekā citām organismu grupām. Taukskābju sintēzes ceļi neatšķiras organismos ar zemu vai augstu lipīdu saturu. Tiek izmantoti tie paši enzīmu kompleksi- konvencionālā taukskābju sintēzes sistēma (FAS) vai poliketīdu sintēzes sistēma (PKS) un nav pierādījumu, ka substrāta asimilēšana vienā organismā notiktu ātrāk nekā otrā. Atšķirībām jābūt redzamām starpmetabolisma posmos. Jābūt palielinātai oglekļa (C) plūsmai uz acetil-CoA metabolīta sintēzi un jāsarāžo pietiekami nepieciešamā reducēšanas potenciāla- NADPH (Ratledge and Wynn 2002).

1.4.4. Saistība ar substrāta slāpekļa avotu

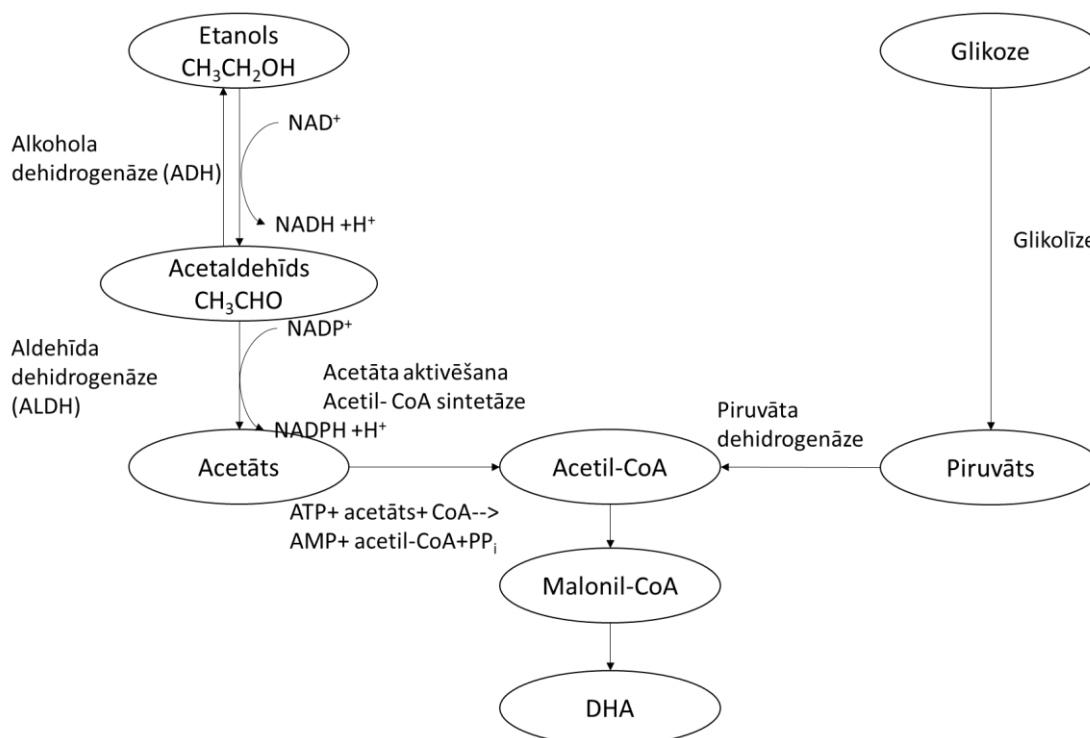
Lipīdu akumulēšanos mikroorganismos izraisa stresa apstākļu inducēšana, parasti, samazinot slāpekļa daudzumu barotnē un nodrošinot lielu C avota pārpalikumu. Par slāpekļa (N) avotu visbiežāk izmanto rauga ekstraktu, bet iespējams pievienot amonija sāļus, NaNO₃ vai glutamīnskābi (de Swaaf et al. 1999; Safdar et al. 2017). C atomu asimilēšanas ātrums ir lielāks nekā organisma spēja tos iesaistīt biomasā. Samazinātā N daudzuma dēļ, šūnas nespēj sevi pietiekami nodrošināt ar nukleotīdiem un aminoskābēm. Liekais C tiek novadīts lipīdu sintēzei, kas ir ātrāks process un nav nepieciešama jaunu proteīnu sintēze tā nodrošināšanai (Ratledge 2004; Mendes et al. 2009).

Liu et al. (2015) pierādīja, ka *Schizochytrium sp.* barotnei, kas ir viens no triaustohitrītiem, pievienojot mono-nātrija glutamātu pēc slāpekļa samazināšanās fāzes, palielinās šūnu skaits barotnē un DHA frakcijas lielums. Rumiani et al. (2018) kā oglekļa avotu izmantoja dateļu sīrupu un novēroja lielāku DHA daļu kā ierasts, un izvirzīja hipotēzi, ka ņemot vērā, ka dateļu sīrupā lielāko aminoskābju daļu sastāda glutamīnskābe, iespējams pēc sākotnējās N deplēcijas, *C. cohnii* sāk izmantot sīrupā pieejamo glutamīnskābi. Arī Rumiani et al. (2018) novēroja slāpekļa trūkuma stresa izraisītu pozitīvu efektu uz DHA frakcijas lielumu.

1.4.5. Saistība ar substrāta oglekļa avotu

Kā galvenais enzīms, kas nodrošina glikozes plūsmas regulāciju un nepārtrauktu C atomu uzņemšanu no substrāta un iesaistīšanu tālākajos bioķīmiskajos ceļos, tiek uzskatīts fosfofrukto kināze (PFK). Citrāts darbojas kā šī enzīma inhibitors, bet NH_4^+ , kura līmenis palielinās pie N samazināšanās barotnē, var savienoties ar PFK un veido kompleksu. NH_4^+ novērš citrāta inhibīciju, ļaujot enzīmam turpināt iesaistīt C atomus šūnas metabolismā. Šāds mehānisms strādā, ja par substrātu kalpo glikoze, kas tiek iesaistīta glikolīzes reakcijās. Izmantojot glikozi panākta $19 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ liela DHA produktivitāte ar vidējo DHA sastāvu 35.2% no kopējā taukskābju daudzuma (de Swaaf et al. 1999). Citu substrātu, piemēram, etanola gadījumā, metabolismā tiek iesaistīti citi enzīmi.

Etanola plūsmas regulācija: etanols tiek importēts šūnā un alkohola dehidrogenāze to pārvērš acetaldehīdā. Reakcijā tiek iegūts $\text{NADH}^+ \text{H}^+$. Tālāk aldehīda dehidrogenāze, izmantojot NADP^+ un iegūstot NADPH H^+ , oksidē acetaldehīdu par acetātu. Visbeidzot acetātu aktivē acetil-CoA sintēze un tiek iegūts acetil-CoA, kas kalpo par prekursoru taukskābju sintēzei (de Swaaf et al. 2003) (3. attēls). Izmantojot etanolu ir panākta vislielākā DHA produktivitāte- $53 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ar DHA sastāvu 33% no kopējā taukskābju daudzuma (de Swaaf et al. 2003).



3. attēls. Glikozes un etanola substrātu iesaiste DHA metabolismā.

Figure 3. Glucose and ethanol as substrates for the synthesis of DHA.

1.4.6. Bioķīmiskās atšķirības lipīdu asimilācijā

Tiek uzskatīts, ka ir 2 galvenie mehānismi, kas ļauj dinoflagellātiem uzkrāt lipīdus lielākā daudzumā nekā to spēj citi organismi: pirmām kārtām, spēja citoplazmā uzkrāt lielu daudzumu acetil-CoA, kas kalpo kā prekursors malonil-CoA metabolītam, kurš ir pamats taukskābju sintāzei. Otrām kārtām, spēja saražot pietiekami lielu daudzumu NADPH, kas kalpo kā galvenais reducēšanas kofaktors.

Acetil-CoA iegūšana:

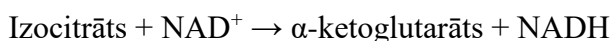
Turpmāk aprakstīta mehānismu ķēde, kas noved pie palielinātas oglekļa plūsmas uz acetil-CoA sintēzi. Shematiskais attēls atrodams rezultātu sadaļā (11. attēls.)

AMP loma: Substrātā samazinoties N daudzumam, mikroorganismos strauji palielinās enzīma AMP deamināzes aktivitāte, kas samazina intracelulārā AMP daudzumu, veicot reakciju (1):



Šo enzīmu var uzskatīt par slāpekļa rezervju nodrošinātāju, kas N deplēcijas gadījumā nodrošina šūnu ar nepieciešamo NH_4 nepārtrauktai proteīnu vai nukleotīdu sintēzei.

Izocitrāta dehidrogenāze (ICDH) ir atbildīga par trikarbonskābju ciklā veikto reakciju (2):

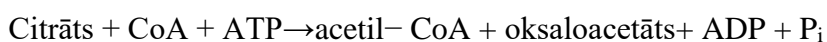


Tā ir atkarīga no celulārā AMP daudzuma, AMP trūkums noved pie enzīma aktivitātes samazināšanās.

Par cik enzīma aktivitāte ir samazinājusies, palielinās reakcijas sākuma produkta-izocitrāta- daudzums, kurš tālāk atgriezeniskās reakcijas līdzsvara dēļ pārvēršas par akonitātu un beigās par citrātu (3) (Safdar et al. 2017):



Vizbeidzot enzīms ATP citrāta liāze (ACL), kas veic reakciju (4):



nodrošina acetil-CoA sintēzi no citrāta. Citiem vārdiem sakot, acetil-CoA tiek sintezēts no citrāta, apturot tā iesaisti trikarbonskābju ciklā.

ATP citrāta liāze (ACL) nodrošina acetil grupas pievienošanu no citrāta koenzīmam A (CoA), veidojot acetil-CoA krājumus taukskābju sintēzei. Šī enzīma veiktā reakcija tiek uzskatīta par kritisko soli taukskābes akumulējošo organismu spējai ražot lipīdus lielā daudzumā, jo pastāv stipra korelācija starp organismiem, kuriem šī enzīma aktivitāte ir liela, un to spēju uzkrāt lipīdus (Guay et al. 2007; Safdar et al. 2017).

Citrāts uzkrājas mitohondrijos samazināta trikarbonskābju cikla aktivitātes dēļ, bet ATP citrāta liāze atrodas citoplazmā. Citrātu nepieciešams transportēt un transporta reakciju veic

mitochondriju membrānā esošā citrāta translokāze. Tā darbojas pēc apmaiņas reakcijas principa-transportējot citrātu ārā, iekšā tiek transportēts malāts. Šo mehānismu sauc par citrāta/ malāta ciklu (Ratledge 2004). Citosolā malāts rodas pēc iepriekš apskatītās ATP citrāta liāzes veiktās reakcijas, kuras rezultātā no sākuma rodas oksaloacetāts (4), pēc tam, papildus izmantojot malāta dehidrogenāzi, rodas malāts (5):

Citrāts → Oksaloacetāts → Malāts.

Šāds cikliskums ļauj turpināt darboties transportierim.

Malātu šūnā reoksidizē atpakaļ par oksaloacetātu (6), kur tam tiek pievienots jauns acetil-CoA metabolīts, lai kopā tie veidotu nākošo citrāta molekulu (7) un cikls varētu sākties no gala. Acetil-CoA mitochondrijā pieejams no glikolīzes ražotā piruvāta (Ratledge and Wynn 2002).

1.4.7. NADPH iegūšana:

Taukskābes ir stipri reducēti savienojumi, tādēļ to sintēzei nepieciešams liels reducēšanas potenciāls ko nodrošina NADPH. 1 molam 18 C atomus garas taukskābes sintēzei nepieciešami 16 moli NADPH (Liu et al. 2015).

Malik (*Malic*) enzīms ir viens no NADPH ģenerējošajiem enzīmiem taukskābju ražošanai. Otrs NADPH iegūšanas veids ir izmantojot pentozo fosfātu ceļa enzīmus. Enzīmi, kas piedalās pentozo fosfātu ceļā ir: glikozes-6 fosfāta dehidrogenāze (G6PD) un 6-fosfoglukonāta dehidrogenāze, Vispārpieņemts viedoklis atbalsta vairāku enzīmu iesaisti NADPH rezervju veidošanā šūnā (Safdar et al. 2017, Ratledge 2004).

Malik enzīms veic reakciju:



Šī reakcija notiek alternatīvi citrāta/malāta ciklam.

Malik enzīms atrodas, gan citoplazmā, gan ir saistīts ar šūnas membrānu. Malik enzīma aktivitāte nepieciešama taukskābju desaturāzēm. Desaturāzes ir ar membrānu saistīti proteīni, kas piedalās taukskābju desaturācijas procesos, ieviešot tajās dubultsaites. Kaut gan desaturāzēm kā reducējošais potenciāls nepieciešams NADPH, tas nespēj difundēt cauri endoplazmatiskā tīkla membrānai. Malāts ir lipofils savienojums, kas spēj iekļūt membrānā, ko tālāk iesaista malik enzīma veiktajā reakcijā un tās rezultātā tiek ģenerēts NADPH. Turpat esošās mebrānu saistītās desaturāzes to var izmantot. Inhibējot malic enzīmu ar sezama eļļu, tika izsaukta kopējā taukskābju daudzuma samazināšanās par 25.24% (Liu et al. 2015), turpretī pārekspresējot malik enzīmu, taukskābju daudzumu palielināja par 20% (Wang et al. 2019).

1.4.8. Polinepiesātināto taukskābju sintēze

Dokozaheksaēnskābe (DHA) ir polinepiesātināta omega 3 taukskābe (22:6) un lielākā daļa mikroorganismu taukskābju *de novo* ražošanai izmanto konvenciālo taukskābju sintēzes sistēmu (FAS), vai retāk- poliketīdu sintēzes sistēmu (PKS). PKS ir galvenais enzīms, ja polinepiesātinātās taukskābes tiek sintezētas anaboliskajos procesos, jo šim enzīmam nav nepieciešams molekulārais skābeklis dubultsaišu ieviešanai. Gan FAS, gan PKS tiek iedalīti vairākās grupās, atkarīgi no enzīmu organizācijas. Pirmā tipa (I) sintēzes ir lieli multifunkcionāli kompleksi, kas savienoti kopā vienā polipeptīdā un sastāv no atsevišķiem domēniem ar dažādām enzimatiskajām funkcijām. Šāda tipa sintēzes sastopamas mugurkaulniekiem un dažiem raugiem. Otrā tipa (II) sintēzes ir nošķirti un monofunkcionāli enzīmi, kas funkcionē kā kopīgs komplekss, un ir atrodami prokariotos un augos (Yoshida et al. 2016).

Ir vairāki mehānismi garo ķēžu polinepiesātināto taukskābju (LC-PUFAs) sintēzei. Mugurkaulniekos tas notiek ar dažādu elongāžu un desaturāžu starpniecību par prekursoriem izmantojot jau uzsintezētas piesātinātas taukskābes, parasti, palmitīnskābi (C:16) vai stearīnskābi (C:18). Tomēr dažādos mikroorganismos LC-PUFAs tiek sintezētas *de novo* izmantojot PKS.

PKS kodējošie gēni *pfa* ir atrasti vairākos LC-PUFA sintezējošos, jūrā dzīvojošos mikroorganismos (Okuyama et al. 2007).

Līdz šim nav skaidri konkrētie bioķīmiskie procesi, kas noved pie DHA sintēzes *C. cohnii*.

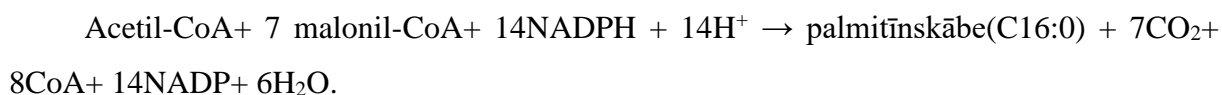
Vairāk autori norāda uz iespējamu sistēmu, kur piesātināto, mononepiesātināto un polinepiesātināto taukskābju sintēze notiek paralēli, iesaistot dažādus mehānismus. Piedāvātajā hipotēzē, DHA tiek sintezēta no 2C prekursoru blokiem *de novo*, visticamāk, izmantojot PKS enzīmu kompleksu. Piesātinātās taukskābes tiek sintezētas izmantojot konvencionālo FAS sistēmu. Mononepiesātinātās taukskābes tiek sintezētas izmantojot gatavas taukskābes no FAS un desaturizējot tās ar delta9 desaturāzi (de Swaaf et al. 2004, Liu et al. 2015; Pei et al. 2017). Līdzīga sistēma ir atklāta DHA sintezējošā organismā *Schizochytrium sp.*, kur piesātināto un DHA taukskābju sintēze notiek reizē. Sīkāk tiek apskatītas abas sistēmas.

Gan FAS, gan PKS sastāv no vairākiem enzimatiski aktīvajiem centriem- KS, MT, KR, HD, ER, AT un ACP (*acyl carrier protein*) acil grupu nesošais proteīns.

1.4.9. Konvencionālais polinepiesātināto taukskābju sintēzes mehānisms

Taukskābju sintēze atšķiras no to oksidācijas. Sintēzes procesos kā pamatvienība nepieciešama malonil-CoA molekula, ko, izmantojot ATP, no acetil-CoA un HCO_3^- (bikarbonāta) katalizē acetil-CoA karboksilāze.

Veicot *de novo* transkriptoma and metaboloma datu analīzi *C. cohnii* detektēti visi veidojošie enzīmi (Pei et al. 2017), kas norāda uz to, ka vismaz piesātinātās taukskābes varētu tikt sintezētas šādā veidā. Pēc tā uzlādēšanas ar pirmajām acetil un malonil grupām, kompleksa enzīmi veic secīgu kondensācijas, pirmās reduktācijas, dehidratācijas un otrās reduktācijas reakciju ciklu, kura rezultātā ķēdei katru reizi tiek pievienoti 2 jauni oglekļa atomi. Ciklu atkārti līdz sasniegts nepieciešamais taukskābes garums. Gala produkts parasti ir palmitīnskābe (C16:0). Abās reduktācijas reakcijās elektronu donors ir NADPH un sintēze notiek citosolā, kur ir iespējams nodrošināt optimālu tā koncentrāciju (Nelson and Cox 2008). Reakcijas kopējais vienādojums palmitīnskābes sintēzei ir:



Garāku taukskābju sintēze mugurkaulniekos notiek mitohondrijos vai gludajā endoplazmatiskajā tīklā (ET) par prekursoru izmantojot jau uzsintizētas taukskābes un tām pievienojot jaunas acil grupas (2 C atomi). Reakcijas veic individuāli enzīmi, nevis to kopmoleksi, un tos sauc par elongāzēm. Reakciju cikls ir tāds pats, kā sintizējot īsākas taukskābes.

Dubultsaites tiek veidotas oksidatīvā reakcijā, ko katalizē tauku acil-CoA desaturāze. Šis ir aerobs process, kam nepieciešams molekulārais skābeklis. Reizē tiek veikta 2 substrātu-NADPH un taukskābes oksidācija. Bez tauku acil-CoA desaturāzes, reakcijā arī piedalās citohroms b5 un flavoproteīni, kuri nodrošina elektronu pārnesi.

Desaturāzes un elongāzes, katras nepiesātinātās taukskābes produkcijā strādā noteiktā secībā, un tās parasti apzīmē pēc C atoma taukskābē, kur tās to pagarina vai ievieš jaunu dubultsaiti.

1.4.10. PKS sintēzes ceļš

Poliketīdu sintēzes (PKSs) parasti atrodamas baktērijās, kur tās nodrošina dažādu sekundāro metabolītu sintēzi. PKS veic reakciju ciklu, kas ir ļoti līdzīgs FAS, un izmanto to pašu acil- nesošo (*acyl-carrier*) proteīnu (ACP), kā kovalentu saistīšanās vietu augošajai taukskābju ķēdei. Tomēr PKS veiktās reakcijas (reduktācija, dehidratācija un otrā reduktācija) parasti ir pārkārtotas, radot ļoti atvasinātus produktus ar vairākām keto, hidroksi un C=C dubultsaitēm trans- konfigurācijā (taukskābēm parasti ir cis- dubultsaišu konfigurācija). Gala

produkti parasti ir cikliski savienojumi, ar dažādām funkcijām- antibiotikas, aflatoksīni (mikotoksīnu paveids, visbiežāk ražo *Aspergillus sp.*) un dažādi pigmenti (Metz et al. 2001; Qiu 2003). PKS ceļš ir spējīgs sintizēt LC- PUFAs anaerobi, jo tam nav nepieciešamas desaturāzes, kas izmanto molekulāro skābekli.

Baktēriju cikliskos savienojumus sintezējošās PKS proteīnu primārās struktūras atšķiras no PUFAs sintezējošajiem PKS proteīniem. Domājams, ka PKS sintezē polinepiesātinātās taukskābes *de novo* no malonil-CoA un izmanto acetil-CoA kā praimeru līdzīgi kā to dara FAS. Proteīnu komplekss atkārtoti veic reduktācijas, dehidratācijas un reduktācijas ciklus, bet selektīvi izpilda trans-cis izomerizāciju nevis otru reduktācijas reakciju konkrētos ciklos, lai augošajā taukskābju ķēdē saglabātu dubultsaites (Yoshida et al. 2016; Metz et al. 2001).

Šis alternatīvais ceļš atklāts vairākiem eikariotiskajiem triaustohitrīdiem, tai skaitā *Schizochytrium spp.* (Qiu 2003) .

2. MATERIĀLI UN METODES

2.1. Kinētiskā modelēšana

2.1.1. Kinētiskā modeļa reakciju shēmas izveide

Kinētiskais modelis sastāv no glikolīzes un taukskābju sintēzes reakcijām. Glikolīzes daļa tika balstīta uz Smallbone et al. (2013) izveidoto modeli un apvienojot informāciju, kura pieejama datu bāzēs. Taukskābju sintēzes reakcijas tika pamatotas uz KEGG datubāzē esošajām reakciju shēmām. Glikolīzes modelis pieejams SBML (Systems Biology Markup Language) formātā.

2.1.2. Copasi

Kinētiskā modeļa izveidošanai tikai izmantota datorprogramma COPASI (COmplex PATHway SIMulator) (Hoops et al. 2006). COPASI ļauj veidot un simulēt sarežģītu metabolisko tīklu darbību laikā, izmantojot parasto diferenciālvienādojumu sistēmas. Modeļi tiek definēti divos veidos- bioķīmiski un matemātiski. No bioķīmiskās perspektīvas modelis sastāv no reakcijām, nodalījumiem un metabolītiem. Matemātiski tā pati sistēma tiek raksturota izmantojot diferenciālos vienādojumus.

Copasi izmantotās funkcijas:

- *Steady state* stacionārā stāvokļa parametru iegūšanai;
- *Parameter estimation* nezināmo parametru noteikšanai. Šī optimizācijas metode mēģina piemērot nezināmos parametrus eksperimentālajiem datiem, lai tuvinātu modeļa uzvedību modelējamā organisma vai procesa uzvedībai.

Mērvienību definējumi kinētiskajā modelī: laiks- stundas (h), daudzuma mērvienība- milimoli (mmol), tilpums- mililitri (mL).

2.1.3. Izmantotie vienādojumi kinētiskajā modelī

Katras reakcijas ātruma aprēķinam nepieciešams matemātiskais vienādojums. Jāņem vērā, ka reakciju bioloģiskie katalizatori (enzīmi) atšķiras pēc to darbības principa, kas ietekmē vienādojumu izvēli.

Modelī izmantoti 3 veidu vienādojumi, kuri izveidoti projekta SMARTPLANTS ietvaros (Stalidzāns pers. comm.).

Reakcijām, kurās piedalās viens substrāts un viens produkts, izmantots *Uni Uni* vienādojums (1).

$$V = \frac{k \cdot V_f \cdot \left(S - \frac{P}{K_{eq}}\right)}{S + K_{ms} \cdot \left(1 + \frac{P}{K_{mp}}\right)} \quad (1)$$

Fruktozes bifosfāta aldozes enzīma darbības raksturošanai izmantots *Ordered Uni Bi* vienādojums (2). Reakcijas rezultātā no viena substrāta rodas 2 produkti.

$$V = \frac{k \cdot V_f \cdot \left(S - \frac{P_p \cdot P_q}{K_{eq}} \right)}{K_{ms} + S \cdot \left(1 + \frac{P_p}{K_{ip}} \right) + \frac{V_f}{V_r \cdot K_{eq}} \cdot (K_{mq} \cdot P_p + K_{mp} \cdot P_q + P_q)} \quad (2)$$

Glikozes transporta reakcijā izmantots *Mass action* vienādojums, kuram ir tikai viens parametrs- k_1 .

Apzīmējumi:

v – reakcijas ātrums

k – optimizācijas koeficients (tiek izmantots optimizācijas uzdevumos, lai noteiktu nepieciešamās izmaiņas enzīmu koncentrācijās)

V_f – reakcijas maksimālais ātrums, reakcijai virzoties uz priekšu

V_r – reakcijas maksimālais ātrums, reakcijai virzoties atgriezeniski

S - substrāta koncentrācija

P - produkta koncentrācija

K_{eq} – līdzsvara konstante

K_{ms} , K_{mp} – Mihaels-Menten līdzsvara konstantes, s apzīmē konstanti substrātam un p - produktam

2.2. Stehiometriskā modelēšana

2.2.1. Izmantotās datorprogrammas

Stehiometriskā modelēšana tika veikta MATLAB (<https://se.mathworks.com/products/>) programmēšanas valodā un interaktīvajā aprēķinu vidē. Atšķirībā no citām programmēšanas valodām, kur mainīgie ir definēti kā vienkārši skaitļi, aprēķini tika veikti mainīgos definējot kā multidimensionālas matricas. Tika izmantots dzīvais skripts (*Live script*), kas ļauj apvienot formatētu tekstu, skriptu, kā arī izvades datus. Viss sadalāms nodaļās, kas atvieglo skripta pārskatīšanu un relavento komandu izpildi.

Metabolisko modeļu izveidei un manipulēšanai izmantoti divi MATLAB rīki.

COBRA 3.0 (COntstraint-Based Reconstruction and Analysis Toolbox) (Heirendt et al. 2019) ir rīks, kas ļauj kvantitatīvi simulēt cellulāros bioķīmiskos tīklus, iekļaujot tos bioloģiskos, fiziskos un termokīmiskos ierobežojumos.

RAVEN 2.0 (Wang et al. 2018) ir MATLAB vidē izmantojams rīks, kas izveidots automatizētai genoma mēroga modeļu (GEM) rekonstrukcijai un analīzei.

RAVEN izmantotās funkcijas- nepilnību aizpildīšana (*fillGaps*). Gapfill funkcija, salīdzina izveidoto modeli ar references modeli un pārbauda, kuras reakcijas nespēj vadīt plūsmu caur tam. Šīs reakcijas tiek izdzēstas. Nosacījums *useModelConstraints* kodā ir paties, kas nozīmē, ka modelī cenšas ievietot tik maz reakciju cik iespējams, lai tiktu apmierināti modeļa ierobežojumi.

Dokumentācija:

(<https://github.com/SysBioChalmers/RAVEN/blob/master/core/contractModel.m>).

RAVEN funkcija *contractModel* samazina modeli, sagrupējot kopā visas vienādās reakcijas. Īpaša uzmanība tiek pievērsta gēnu- reakciju asociācijām.

Dokumentācija:

(<https://github.com/SysBioChalmers/RAVEN/blob/master/core/contractModel.m>).

COBRA funkcija *removeDeadEnds* izdzēš visas strupceļa reakcijas un metabolītus.

Dokumentācija:

(<https://github.com/opencobra/cobratoolbox/blob/efb2c06be702aaed38349581ba73ed420251992b/src/reconstruction/modelGeneration/removeDeadEnds.m>).

RAVEN funkcija *simplifyModel* ļauj vienkāršot modeli, izdzēšot reakcijas un metabolītus, kuri nespēj vadīt plūsmu. Tas tiek panākts mēģinot minimizēt un maksimizēt plūsmu caur konkrētu reakciju. Ja tas neizdodas, tā tiek izdzēsta.

Dokumentācija:

(<https://github.com/SysBioChalmers/RAVEN/blob/master/core/simplifyModel.m>).

FBA (*Flux balance analysis*) ir optimizācijas problēmas atrisinājums. Funkcija atļauj modelim uzstādīt mērķa funkciju jeb metabolītu, uz kuru novirzīt plūsmu. Izvades laukā tiek parādīti vairāki datu struktī. Svarīgākie no tiem ir *FBAsolution.f*, kas ir mērķa funkcijas atrisinājums un *FBAsolution.v*, kas parāda plūsmu sadalījumu, kad maksimizēta plūsma uz norādīto metabolītu.

Modelis tika vizualizēts ar *ModelExplorer* vizualizācijas rīku (Martyushenko and Almaas 2019).

2.2.2. Organisma genoma sekvenca

Modeļa veidošanai tika izmantota *Symbiodinium minutum* genoma sekvenca. Sekvenca sastāv no 616 Mbp (Mega- base pairs), gēnus kodējošiem bāzu pāriem, kas sastāda aptuveni pusi no minētā organisma kopējās sekvences (Shoguchi et al. 2013). Dinoflagelāti ir organismi ar lielu nukleārā genoma izmēru. To genoma izmērs parasti ir aptuveni 3-250 pg (piko grami) uz šūnu, kas ir 1- 80 reizes lielāks par cilvēka genoma izmēru (Bi et al. 2019). Lielu daļu dinoflagelātu genoma sastāda duplikāt gēni, kas regulē hromosomu kondensēšanos. Iegūtā

sekvence iekļauj 42 000 proteīnus kodējošos gēnus, kas sakrīt ar citu dinoflagelātu proteīnus kodējošo gēnu skaitu, tādēļ sekvence tika uzskatīta par pilnīgu (Shoguchi et al. 2013).

2.3. Datubāzes

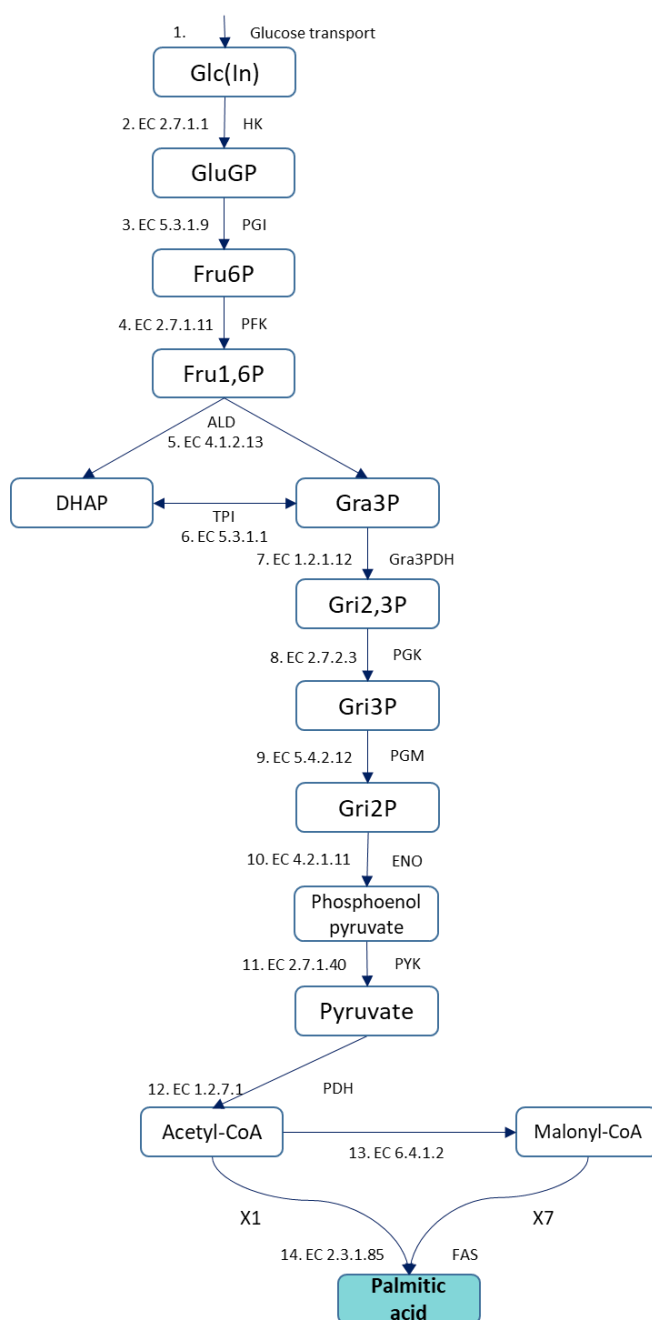
Iepriekš publicētie modeļi SBML formātā pieejami BioModels datu bāzē (pieejama www.ebi.ac.uk/biomodels/) (Glont et al. 2018). Informācija par metabolisma ceļiem un enzīmu parametru informācija pieejama KEGG datubāzē (pieejama www.genome.jp/kegg/) (Kanehisa et al. 2019).

3. REZULTĀTI

3.1. Kinētiskais modelis

3.1.1. Kinētiskā modeļa struktūra

Izveidots kinētiskais modelis, kas satur 14 reakcijas un 15 metabolītus. Metabolītu atšifrējumi un sīkāks reakciju apraksts atrodami 1. un 2. pielikumā. Glikolīzes reakcijas, līdz piruvāta sintēzei, tika balstītas uz Smallbone (2013) publicēto modeli un vispārzināmu informāciju par glikolīzes ceļa norisi. Turpmākās reakcijas, kas iesaistītas taukskābju sintēze balstītas uz KEGG datubāzē pieejamo informāciju. Shematiski modelis attēlots 4. attēlā



4. attēls. Modelī iekļauto reakciju attēlojums. Ar zilu līniju apvilktajos kvadrātos norādīti metabolīti, bultas apzīmē oglekļa plūsmu modelī. Lai tiktu sintezēta C16:0 gara palmitīnskābe

(*palmitic acid*) nepieciešams 1 acetil-CoA metabolīts un 7 malonil-CoA metabolīti. Malonil-CoA molekulas sintēzi no acetil-CoA šķir viena enzimatiskā reakcija. Starp metabolītiem atzīmēti reakciju katalizējošo enzīmu EC numuri un modelī izmantotie saīsinājumi.

Figure 4. A schematic representation of the reactions of the model. The metabolites are shown in the blue circled squares, the arrows represent the carbon flow in the model. For the synthesis of a C16:0 long fatty acid, 1 acetyl-CoA and 7 malonyl-CoA metabolites are needed. Malonyl-CoA is synthesized from acetyl-CoA in one enzymatic reaction. Reaction catalyzing enzyme EC numbers as well as their abbreviations are shown between the metabolites.

Modelī iekļauto reakciju attēlojums COPASI datorprogrammā redzams 5. attēlā.

#	Name	Reaction
1	01. glucose transport	"glucose{ex}" -> "glucose{cell}"
2	02. EC 2.7.1.1 HK	"glucose{cell}" = glucose-6-phosphate
3	03. EC 5.3.1.9 PGI	glucose-6-phosphate = fructose-6-phosphate
4	04. EC 2.7.1.11 PFK	fructose-6-phosphate = fructose-1,6-biphosphate
5	05. EC 4.1.2.13 ALD	fructose-1,6-biphosphate = dihydroxyacetone-phosphate + glyceraldehyde-3-phosphate
6	07. EC 1.2.1.12 Gra3PDH	glyceraldehyde-3-phosphate = 1,3-bisphosphoglycerate
7	09. EC 5.4.2.12 PGM	3-phosphoglycerate = 2-phosphoglycerate
8	08. EC 2.7.2.3 PGK	1,3-bisphosphoglycerate = 3-phosphoglycerate
9	10. EC 4.2.1.11 ENO	2-phosphoglycerate = phosphoenolpyruvate
10	11. EC 2.7.1.40 PYK	phosphoenolpyruvate = pyruvate
11	06. EC 5.3.1.1 TPI	dihydroxyacetone-phosphate = glyceraldehyde-3-phosphate
12	12. EC 1.2.7.1 PDH	pyruvate = acetyl-CoA
13	13. EC 6.4.1.2 Acetyl-CoA carboxylase	acetyl-CoA = malonyl-CoA
14	14. EC 2.3.1.85 Palmitic acid synthase	acetyl-CoA + 7 * malonyl-CoA = palmitoyl-CoA

5. attēls. Ekrānkopija ar izveidotajām reakcijām.

Figure 5. Screenshot with the reactions encompassed in the model.

3.1.2. Parametru novērtēšana

Lai spētu kvantitatīvi novērtēt bioloģiskā sistēmā notiekošo reakciju norisi, tās apraksta ar matemātiskajiem vienādojumiem. Vienādojumiem, kā ierasts, ir vairāki mainīgie, šajā gadījumā- parametri. Diemžēl, ne vienmēr visi parametri ir eksperimentāli noteikti vai atrodami literatūrā, kas saistāms ar bioloģisko organismu specifiku un reakciju daudzveidību. Parametru novērtēšana spēj pielāgot nezināmās vērtības sistēmai ar citiem zināmajiem parametriem vai eksperimentālajiem datiem. Šajā gadījumā parametru novērtēšanai tika izmantoti eksperimentālie dati *C. cohnii* esot logaritmiskajā augšanas fāzē. Dati tika aprēķināti balstoties uz Pei et al. (2017) publicēto informāciju un ir apskatāmi 1. tabulā.

1. tabula. Eksperimentālo datu aprēķini.

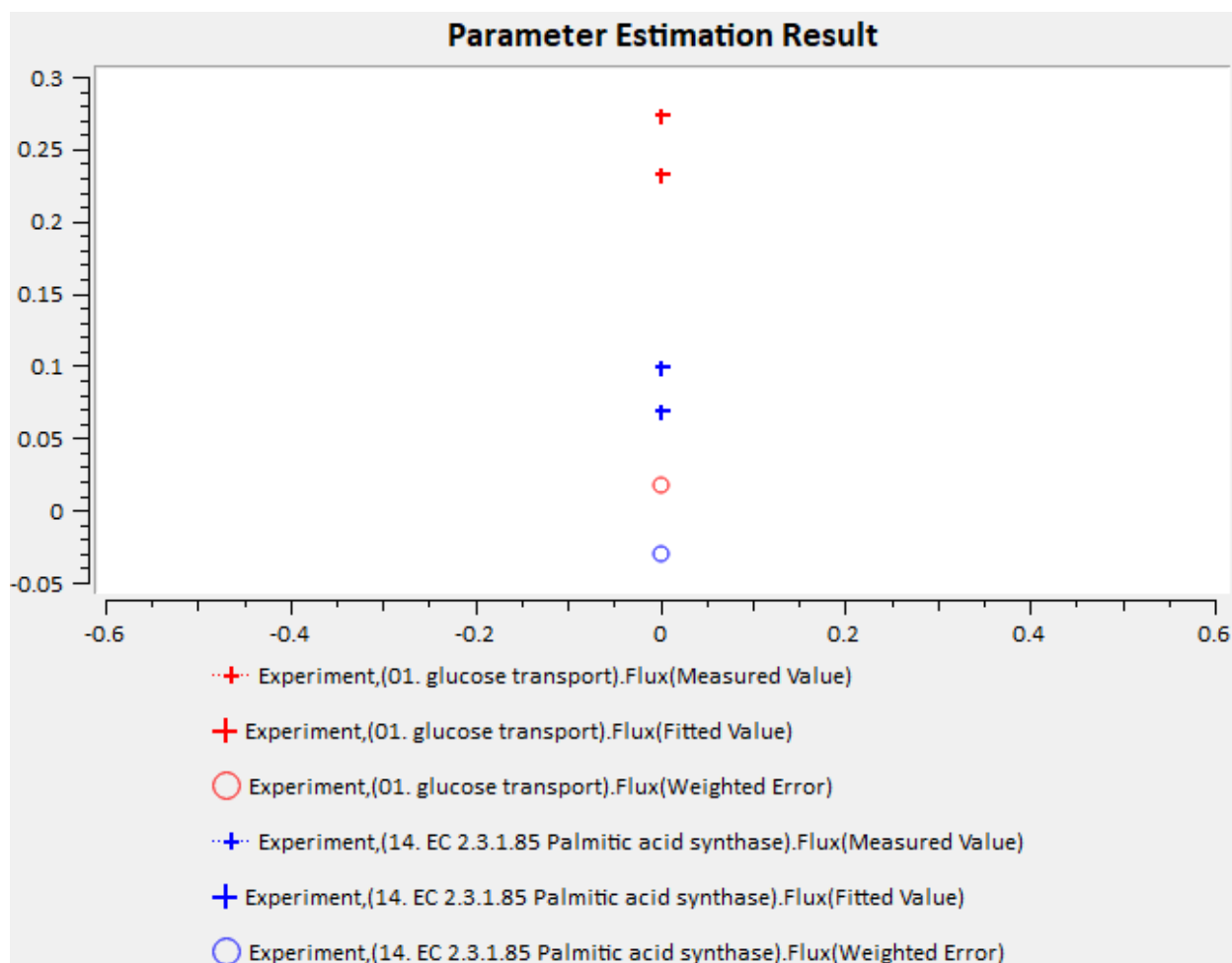
Table 1. Calculations of experimental data.

Apraksts	Vērtība	Mērvienība
Glikozes patērēšanas ātrums g uz 1 bioreaktora šķīduma stundā	1,25	$\text{g}/(\text{l}_{\text{bioreaktora}} * \text{h})$
Glikozes patērēšanas ātrums g uz 1 <i>C. cohnii</i> stundā (Izmantots <i>Chlorella vulgaris</i> šūnas blīvums 570g/L (Hu 2014))	41,92	$\text{g}/(\text{l}_{\text{C.cohnii}} * \text{h})$
Glikozes patērēšanas ātrums g uz ml <i>C. cohnii</i> stundā	0,04	$\text{g}/(\text{ml}_{\text{C.cohnii}} * \text{h})$
Glikozes patērēšanas ātrums molos uz ml <i>C. cohnii</i> stundā (Izmantota glikozes molekulas masa 180,2 g/mol)	0,00023	$\text{mol}/\text{ml}_{\text{C.cohnii}} * \text{h}$
Glikozes patērēšanas ātrums milimolos uz ml <i>C. cohnii</i> stundā	0,232	$\text{mmol}/\text{ml}_{\text{C.cohnii}} * \text{h}$
Biomasa ražošanas ātrums	0,47	$\text{g}/(\text{l}_{\text{bioreaktora}} * \text{h})$
Lipīdu (38% no biomasas) ražošanas ātrums g uz 1 bioreaktora stundā	0,18	$\text{g}/(\text{l}_{\text{bioreaktora}} * \text{h})$
Lipīdu ražošanas ātrums g uz 1 <i>C. cohnii</i> stundā	5,95	$\text{g}/(\text{l}_{\text{C.cohnii}} * \text{h})$
Lipīdu ražošanas ātrums g uz ml <i>C. cohnii</i> stundā	0,006	$\text{g}/\text{ml}_{\text{C.cohnii}} * \text{h}$
Lipīdu ražošanas ātrums molos uz ml <i>C. cohnii</i> stundā (Izmantota acetilskābes molekulas masa 60,1 g/mol)	9,89	$\text{mol}/\text{ml}_{\text{C.cohnii}} * \text{h}$
Lipīdu ražošanas ātrums milimolos uz ml <i>C. cohnii</i> stundā	0,099	$\text{mmol}/\text{ml}_{\text{C.cohnii}} * \text{h}$

Iegūti eksperimentālie dati glikolīzes patēriņam ($0,232 \text{ mmol}/\text{ml}_{\text{C.cohnii}} * \text{h}$) un lipīdu sintēzei ($0,099 \text{ mmol}/\text{ml}_{\text{C.cohnii}} * \text{h}$).

Iegūto parametru novērtēšanas dati redzami 3. pielikumā.

Modeļa simulētā glikozes patēriņā un lipīdu sintēzes vērtības redzamas 6. attēlā, kur tās salīdzinātas ar eksperimentāli iegūtajiem datiem.



6. attēls. Iegūtie parametru novērtēšanas dati.

Figure 6. Parameter estimation data.

Mainot nezināmos parametrus robežās no 0,1 līdz 1000000, modeļa simulētie un eksperimentālie glikozes uzņemšanas dati attēloti ar sarkanajiem krustiņiem. Augšējais krustiņš attēlo simulētos (*fitted*) datus, ar vērtību 0,274 mmol/ml_{C.cohnii} * h, bet apakšējais eksperimentālos (*measured*)- 0,232 mmol/ml_{C.cohnii} * h. Simulēto lipīdu sintēzes datu vērtība ir 0,068 mmol/ml_{C.cohnii} * h (zemākais zilais krustiņš), turpretī eksperimentālie dati, ir 0,099 mmol/ml_{C.cohnii} * h (augšējais zilais krustiņš).

3.1.3. Kinētiskā modeļa stacionārais stāvoklis

Modelī izdevies ieviest stacionāro stāvokli, reakciju plūsmu ātrumi un metabolītu sākuma koncentrācijas attēlotas 2. un 3. tabulā.

2. tabula. Metabolītu sākuma koncentrācijas, modelim atrodoties stacionārajā stāvoklī.

Table 2. Start values of metabolites for the model in steady state.

Metabolīts	Sākuma koncentrācija (mmol/ml)
Glikoze (intracelulārā)	8,05e-05
Glikozes 6-fosfāts	0,0952
Fruktozes 6-fosfāts	0,0007
Fruktozes 1,6-bifosfāts	0,0621
Dihidroksiacetona fosfāts	0,0015
Gliceraldehīda 3-fosfāts	0,0136
1,3 bifosfoglicerāts	9,82e-05
2- fosfoglicerāts	0,0682
3- fosfoglicerāts	0,1197
Fosfoenolpiruvāts	0,0188
Piruvāts	0,0010
Acetil-koenzīms A	0,1645
Malonil-koenzīms A	0,7137

3.tabula. Reakciju plūsmu ātrumi, modelim atrodoties stacionārajā stāvoklī.

Table 3. Reaction fluxes for the model in steady state.

Reakcija	Plūsma (mmol/h)
Glikozes tranports	0,27
HK	0,27
PGI	0,27
PFK	0,27
ALD	0,27
TPI	0,27
Gra3PDH	0,55
PGK	0,55
PGM	0,55
ENO	0,55
PYK	0,55
PDH	0,55
Acetil- koenzīma A karboksilāze	0,48
FAS	0.07

3.2. Stehiometriskais modelis

Projekta “Crypthecodinium cohnii un Zymomonas mobilis sintrofija omega 3 taukskābju ražošanai no biodegvielas un cukura rūpniecības blakusproduktiem”, turpmāk *CryZym*, ietvaros tika izveidots *C. cohnii* genoma izmēra stehiometriskais modelis (K. Bērziņš pers. comm.). Darba ietvaros veikta šī modeļa pilnveidošana.

3.2.1. Gapfill rezultāti

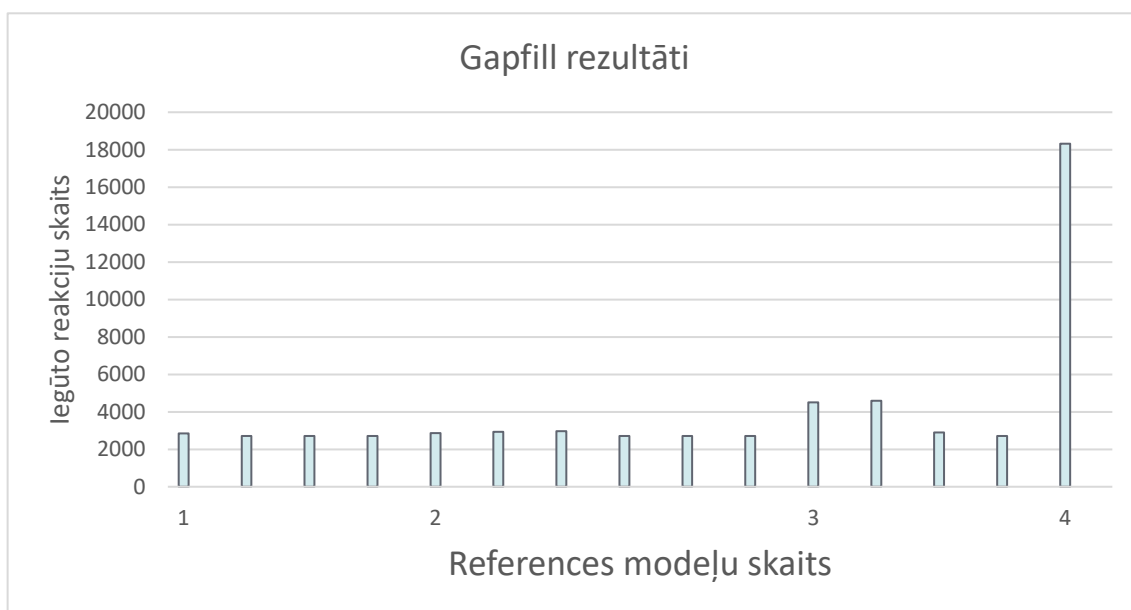
Izmantojot RAVEN funkciju *Gapfill*, tika veikta modelī esošo nesabalansēto reakciju aizpildīšana. Rezultāti, salīdzinot vairāku references modeļu izmantošanu, redzami 4. tabulā.

4. tabula. Gapfill rezultāti.

Table 4. Results of gapfill..

References modeļu skaits	Izmantotie Gapfill modeļi	Gapfill rezultāti		Karkasa modeļu skaits	Izmantotie Gapfill modeļi	Gapfill rezultāti		
1	HumanGEM	RXNS	2850	2	ecModel x iYali	RXNS	2717	
		METS	3391			METS	3248	
	ecModel	RXNS	2706		ecModel x rhto	RXNS	2711	
		METS	3238			METS	3241	
	iYali	RXNS	2704		iYali x rhto	RXNS	2705	
		METS	3235			METS	3235	
	rhto	RXNS	2713		3	HumanGEM x ecModel x iYali	RXNS	4512
		METS	3245				METS	5109
	HumanGEM x ecModel	RXNS	2868			HumanGEM x ecModel x rhto	RXNS	4586
		METS	3411				METS	5177
HumanGEM x iYali	RXNS	2931	HumanGEM x iYali x rhto	RXNS		2901		
	METS	3459		METS		3442		
HumanGEM x rhto	RXNS	2968	HumanGEM x iYali x rhto	RXNS		2708		
	METS	3514		METS		3235		
2	HumanGEM x ecModel	RXNS	2868	4		ecModel x HumanGEM x iYali x rhto	RXNS	18313
		METS	3411				METS	11409

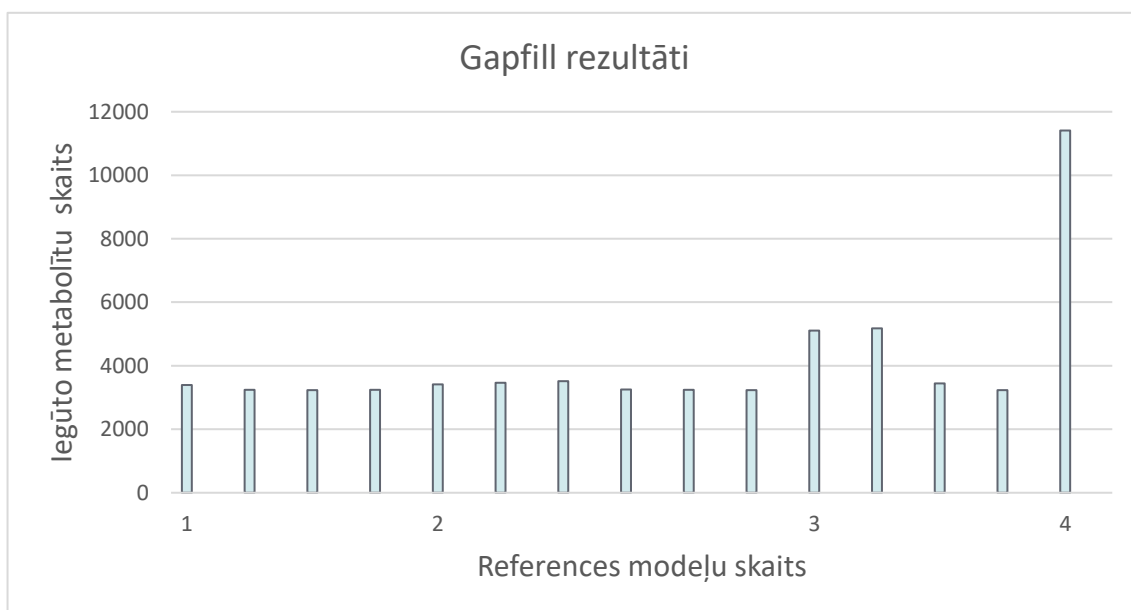
Minimālais reakciju skaits modelī, izmantojot Gapfill, bija 2704 reakcijas, kas tika panākts izmantjot tikai iYali references modeli. Maksimālais reakciju skaits tika iegūts izmantojot visus 4 references modeļus, un tika iegūtas 18313 reakcijas (7. attēls).



7. attēls. Iegūto reakciju skaits atkarībā no izmantoto references modeļu skaita.

Figure 7. The number of reactions obtained depending on the number of reference models used.

Minimālais metabolītu skaits bija 3235, kas arī tika iegūts izmantjot iYali kā references modeli. Vislielākais metabolītu skaits tika iegūts izmantojot visus 4 references modeļus, un tas bija 11409 metabolīti (8. attēls).



8. attēls. Iegūto metabolītu skaits atkarībā no izmantoto references modeļu skaita.

Figure 8. The number of metabolites obtained depending on the number of reference models used.

Tikai izmantojot visus 4 references modeļus, tika panākta plūsmas balansa analīze (FBA *flux balance analysis*) un modelī tika ieviests biomasas vienādojums, tādēļ tālāk tika strādāts ar to.

Tika izmantotas vairākas RAVEN funkcijas- sašaurināt modeli (*contractModel*), strupceļreakciju aizvākšana (*removeDeadEnds*) un modeļa vienkāršošana (*SimplifyModel*), lai uzlabotu un pilnveidotu modeļa darbību. Gala modelis satur 11352 reakcijas un 3869 metabolītus. Rezultāti pēc katras funkcijas izpildes redzami 5. tabulā.

Modelī tika ieviests biomasas vienādojums. FBA analīze, kas bija uzstādīta, lai maksimizētu plūsmu uz biomasas vienādojumu, kas apzīmē šūnu augšanas ātrumu, uzrādīja rezultātu 79.3225 mmol gDW/h (gDW- gramu sausasnes).

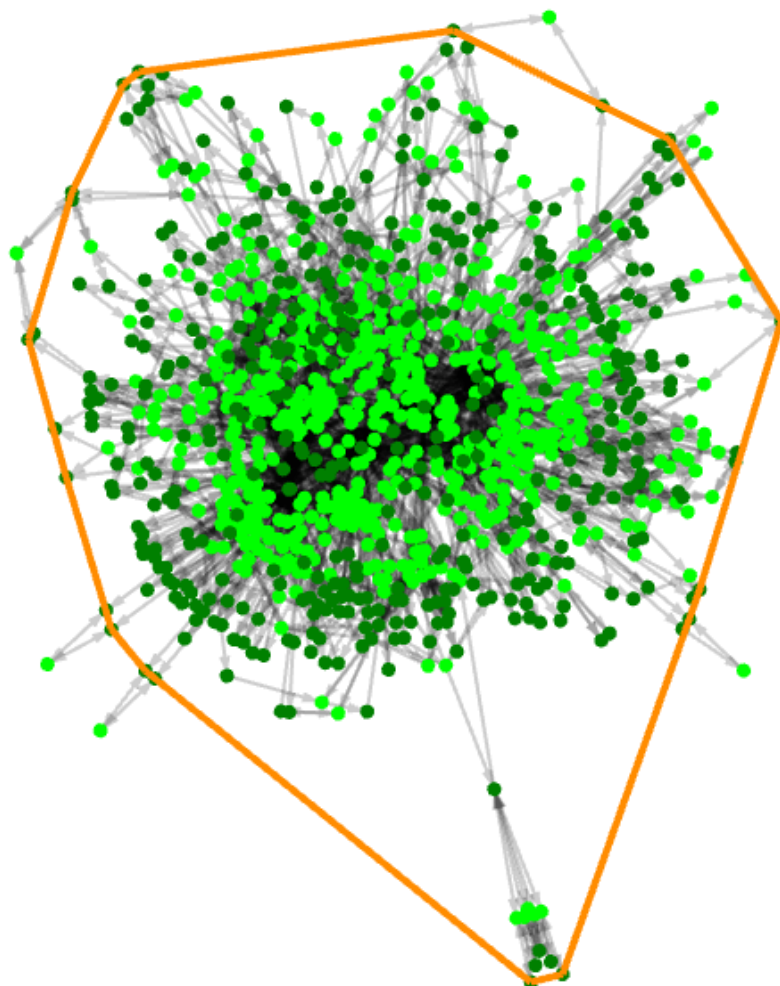
5. tabula. Modeļa apstrādes rezultāti.

Table 5. Results of processing the model

Gapfill modeļi	Remove duplicate RXNS (<i>contractModel</i>)		Remove Dead ends		Simplify model		FBA	Biomasas vienādojums
	RXNS		RXNS		RXNS			
ecModel x HumanGEM x iYali x rhto	RXNS	16954	RXNS	13339	RXNS	11352	79.3225	x
	METS	11383	METS	7784	METS	3869		

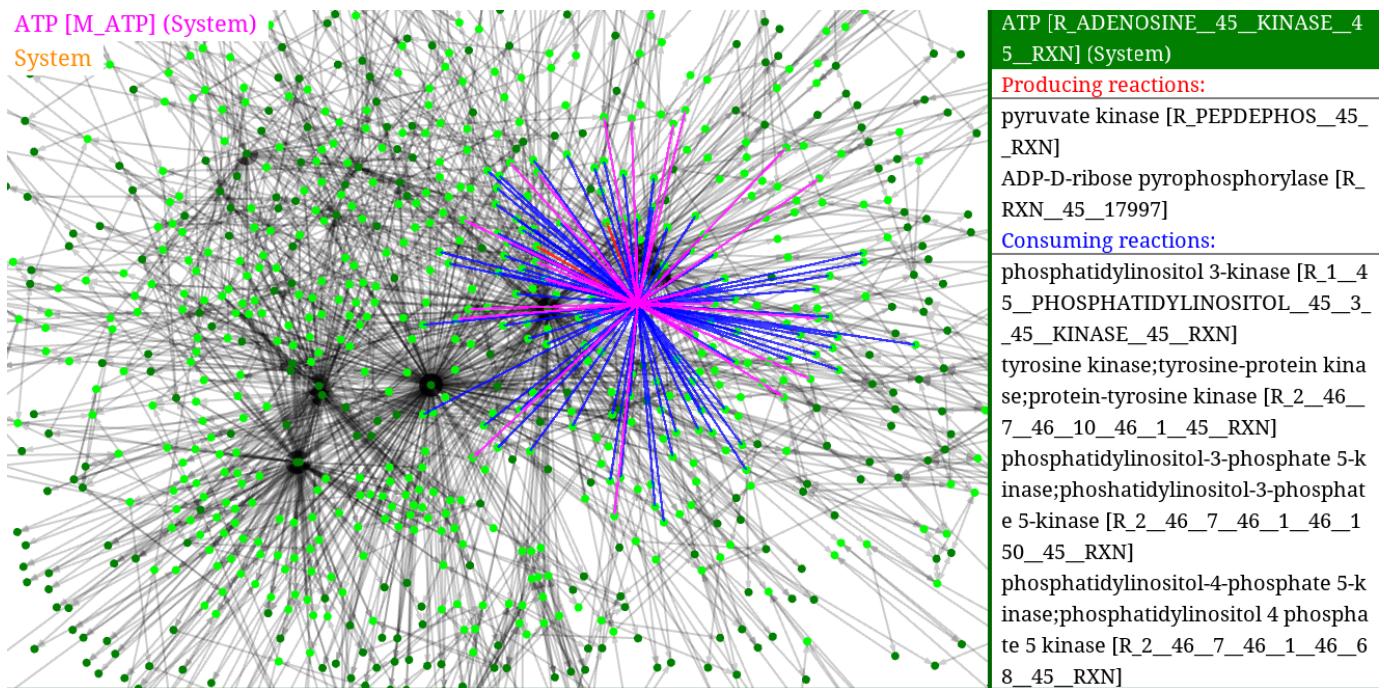
3.2.2. Modeļa vizualizācija

Ar rīku *ModelExplorer* tika veikta stehiometriskā modeļa vizualizācija (9. un 10. attēls). Vizualizācijas rīks spēj lietotājam intuitīvi izpētīt un novērtēt nepilnības genoma-izmēra modeļos. Attēlota daļa no izveidotā genoma- izmēra modeļa.



9.attēls. Stehiometriskā modeļa grafiskais attēlojums. Koši zaļajā krāsā attēlotas aktīvās reakcijas un tumši zaļajā krāsā aktīvie metabolīti. Oranžā kontūra iezīmē nodalījumu.

Figure 9. Graphic representation of the stoichiometric model. Circles in the bright green colour represent the active reactions and the circles in the dark green- active metabolites. The orange line contours the compartment.



10.attēls. Modeļa grafiskā attēlojuma pietuvināts skatījums. Izcelts viens no metabolītiem-ATP. Ar zilu iekrāsotas reakcijas, kas to paterē, ar sarkanu reakcijas, kas to ražo. Rozā līnijas apzīmē divvirzienu reakcijas. Detalizētāks reakciju apraksts redzams loga labajā pusē.

Figure 10. Zoomed view of the graphical representation of the model. The metabolite ATP is highlighted. The blue lines represent reactions which consume it, the red lines- reactions which synthesize it. The pink lines are bidirectional reactions. A more detailed description of the reactions is seen in the window to the right.

3.2.3. Taukskābju sintēze stehiometriskajā modelī

Noskaidrots, ka malonil-CoA metabolīts, kas ir pamatsastāvdaļa taukskābju sintēzē, modelī apzīmēts kā “m02444c” un tiek patērēts 50 reakcijās (4. pielikums), bet to sintēzē 3 (4. pielikums) reakcijas. Divām no reakcijām, kas patērē malonil-CoA, nav norādīts EC numurs, pārējo reakciju apkopojums atrodams 6. tabulā. Kā arī sintezējošas reakcijas apkopotas 7. tabulā. Izmantojot malonil-CoA kā references metabolītu taukskābju sintēzei ir pārskatāmāk redzama organisma resursu novadišana DHA ražošanai.

6. tabula. EC numuri reakcijām, kas patērē malonil-CoA metabolītu

Table 6. EC numbers of reactions that consume malonyl-CoA metabolite.

Reakciju skaits	EC numurs	Nosaukums	Katalizētā reakcija (KEGG vai brenda-enzymes.org)
Reakcijas, kurās tiek patērēts malonil-CoA metabolīts			
1	EC:4.1.1.9	malonyl-CoA decarboxylase	Malonyl-CoA \rightleftharpoons Acetyl-CoA + CO ₂
29	EC:2.3.1.199	very-long-chain 3-oxoacyl-CoA synthase	a very-long-chain acyl-CoA + malonyl-CoA = a very-long-chain 3-oxoacyl-CoA + CO ₂ + CoA
2	EC:2.3.1.85	fatty-acid synthase system (FASN)	acetyl-CoA + n malonyl-CoA + 2n NADPH + 2n H ⁺ = a long-chain fatty acid + (n+1) CoA + n CO ₂ + 2n NADP ⁺
1	EC:2.3.1.39	[acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase	malonyl-CoA + an [acyl-carrier protein] = CoA + a malonyl-[acyl-carrier protein]
1	EC:2.3.1.21	carnitine O-palmitoyltransferase	palmitoyl-CoA + L-carnitine = CoA + L-palmitoylcarnitine
12	EC:2.3.1.86	fatty-acyl-CoA synthase system (FAS 1/2)	acetyl-CoA + n malonyl-CoA + 2n NADPH + 4n H ⁺ = long-chain-acyl-CoA + n CoA + n CO ₂ + 2n NADP ⁺
1	EC:2.3.1.16	acetyl-CoA C-acyltransferase	acyl-CoA + [acetyl-CoA C-acyltransferase]-L-cysteine = [acetyl-CoA C-acyltransferase]-S-acyl-L-cysteine + CoA
1	EC:2.7.1.91	sphingosine kinase	ATP + a sphingoid base = ADP + a sphingoid base 1-phosphate

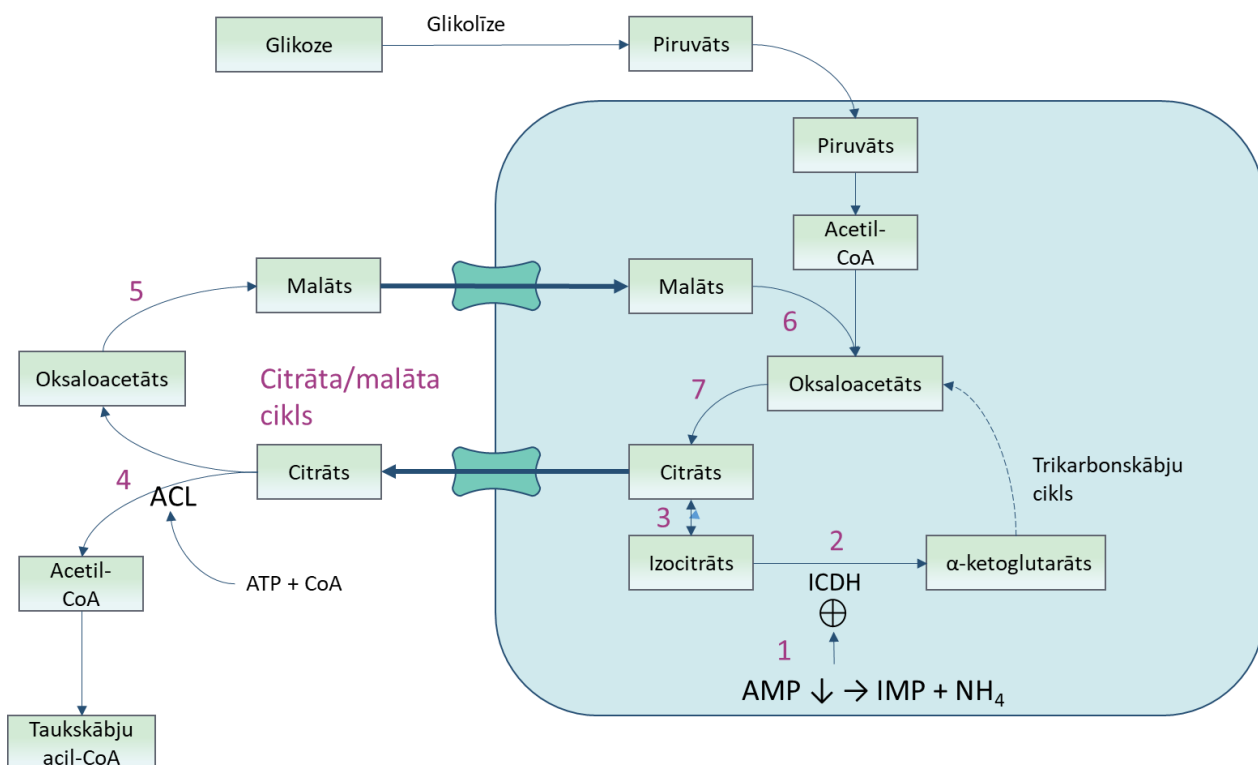
7. tabula. EC numuri reakcijām, kurās tiek sintezēts malonil-CoA metabolīts.

Table 7. EC numbers of reactions that synthesize malonyl-CoA metabolite.

Reakciju skaits	EC numurs	Nosaukums	Katalizētā reakcija (KEGG vai brenda-enzymes.org)
Reakcijas, kurās tiek sintezēts malonil-CoA metabolīts			
1	EC:6.4.1.2	acetyl-CoA carboxylase	ATP + acetyl-CoA + hydrogencarbonate = ADP + phosphate + malonyl-CoA
2	EC:6.3.4.14	biotīna karboksilāze	ATP + [biotin carboxyl-carrier protein]-biotin-N6-L-lysine + hydrogencarbonate- = ADP + phosphate + [biotin carboxyl-carrier protein]-carboxybiotin-N6-L-lysine

3.2.4. Lipīdu asimilācijas regulējošie mehānismi:

Modelī iekļautas literatūrā visbiežāk aprakstītās lipīdu asimilācijas regulējošās reakcijas. Shematiskais attēlojums redzams 11. attēlā. Reakcijas apkopotas 8. tabulā.



11. attēls Lipīdu asimilācijas regulācijas shematiskais attēls. Reakcijas sīkāk paskaidrotas literatūras sadaļā.

Figure 11. Schematic picture of the regulatory mechanisms for lipid synthesis. A more detailed explanation of the reactions is found at the literature section.

8. tabula. Lipīdu asimilācijas kontroles reakcijas.

Table 8. Control reactions of lipid assimilation.

N.p.k.	Reakcijas numurs modelī	Reakcijas vienādojums	Reakcija modelī
1	#754 #115	AMP => IMP + NH4	AMP[c] + H2O[c] => IMP[c] + NH3[c]; AMP[s] + H+[s] + H2O[s] => ammonium[s] + IMP[s];
2	#7871 #7872 #1379 #1380	Izocitrāts => α-ketoglutarāts	isocitrate[m] + NAD[m] => NADH[m] + 2-oxoglutarate[m] + carbon dioxide[m]; isocitrate[m] + NADP(+)[m] => NADPH[m] + 2-oxoglutarate[m] + carbon dioxide[m]; isocitrate[m] + NAD+[m] => AKG[m] + CO2[m] + NADH[m]; isocitrate[m] + NADP+[m] => AKG[m] + CO2[m] + NADPH[m];
3	#9562 #1339 #9565 #1395 #1394 #9561	Citrāts <=> Izocitrāts	citrate[m] => cis-aconitate[m] + H2O[m]; cis-aconitate[m] + H2O[m] => isocitrate[m]; isocitrate[m] => cis-aconitate[m] + H2O[m]; cis-aconitate[m] + H2O[m] => citrate[m]; citrate[m] => isocitrate[m]; isocitrate[m] => citrate[m];
4	#8480	Citrāts => acetil-CoA + oksaloacetāts	ATP[c] + citrate[c] + coenzyme A[c] => acetyl-CoA[c] + ADP[c] + oxaloacetate[c] + phosphate[c];
5	#11016	Oksaloacetāts => malāts	H+[c] + NADH[c] + oxaloacetate[c] => (S)-malate[c] + NAD[c];
6	#7890	Malāts => oksaloacetāts	(S)-malate[m] + NAD[m] => H+[m] + NADH[m] + oxaloacetate[m];
7	#94	Acetil-CoA + oksaloacetāts => citrāts	acetyl-CoA[m] + oxaloacetate[m] + H2O[m] => citrate[m] + coenzyme A[m] + H+[m];
Citrāta/malata cikls	#4647	Citrāta un malāta apmaiņas transports	citrate[c] + malate[m] => citrate[m] + malate[c];

4. DISKUSIJA

4.1. Kinētiskā modelēšana

Kinētiskā modeļa parametru novērtēšanas ietvaros, veikta nezināmo kinētiskā modeļa vienādojumu parametru piemeklēšana. Iegūtās vērtības redzamas 3. pielikumā. Modeļa simulētie glikolīzes patēriņa dati ir lielāki par eksperimentālajiem datiem (0,232 un 0,274 mmol/ml_{C.cohnii} * h). Stacionārā stāvokļa plūsma turpmākajās reakcijās, glikolīzes lineārajā daļā līdz gliceraldahīda fosfāta dehidrogenēzei (Gra3PDH), ir vienmērīga (3. tabula). Sākot ar gliceraldahīda fosfāta dehidrogenāzi (Gra3PDH) plūsma dubultojas (no 0,27 līdz 0,55 mmol/h). Reakcijās līdz tam iesaistītie savienojumi bija ar 6 C atomiem, līdz aldolāze tos sašķel 2 molekulās, kur katrai molekulai, kas plūst caur Gra3PDH, ir 3 C atomi. Stehiometriski caur turpmākajām reakcijām plūst tāds pat oglekļa daudzums, tikai molekulu skaits ir lielāks, tādēļ arī plūsma palielinās. Plūsma caur acetil- koenzīma A karboksilāzi, kas sintezē malonil-CoA metabolītu, ir nedaudz samazināta (0,48 mmol/h), ko izskaidro viena acetil-CoA novirzīšana taukskābju sintēzei (4. attēls). Plūsma caur FAS enzīmu samazinās līdz 0,07 mmol/h, bet jāņem vērā, ka šai reakcijai nepieciešami 7 malonil-CoA metabolīti un stehiometriski reakcija sakrīt ar plūsmu caur iepriekšējo enzīmu (0,07 mmol/h*7 malonil-CoA metabolīti = 0,48 mmol/h). Modeļa simulācija spēj izskaidrot 68,69% no eksperimentāli iegūtās plūsmas uz taukskābju sintēzi. Ņemot vērā, ka simulētie glikozes patēriņa dati ir lielāki ka eksperimentālie, lai sasniegtu 0,068 mmol/ml_{C.cohnii} * h lielu plūsmu taukskābju sintēzes virzienā, modelim nepieciešams uzņemt vairāk glikozes.

Kinētiskais modelis izveidots tikai līdz plamitīnskābes (C16:0) sintezējošajam solim-FAS enzīmam. Tas darīts, jo par šo enzīmu ir pieejams lielāks literatūras apjoms un ir veikti parametru mērījumi (Sonnenborn and Kunau 1982). Kā arī literatūrā, biežāk pieejama informācija par visu taukskābju daudzumu, kas atvieglo eksperimentālo datu aprēķināšanu un pielāgošanu modelim.

Bieži parametri tiek pielāgoti, lai spētu izskaidrot konkrētā ceļa darbību, vēlāk strādājot ar modeli, lai spētu to optimizēt. Teusink et al. (2000) mēģināja noskaidrot vai atsevišķi nomērīti sistēmas kinētiskie parametri *in vitro* glikolīzes enzīmiem, spēj izskaidrot visa ceļa holistisko darbību *in vivo*. Izmantojot tikai nomērītos parametrus un tos nepielāgojot, sistēma nerasniedza stacionāro stāvokli. Teusink et al. (2000) ieviesa 3 glikolīzes ceļa sazarojumus novadot plūsmu uz trehalozi, glikogēnu un glicerolu pēc kā modelis spēja sasniegt stacionāro stāvokli. Tomēr, ieviešot ceļa sazarojumus, modelis nespēja izskaidrot eksperimentālos datus tik labi, kā PDC (piruvātu sintizējošs enzīms) V_{max} palielināšana (parametru pielāgošana). Veidojot *C. cohnii* modeli, prioritāte tika piešķirta tā spējai paredzēt eksperimentālos datus un

tika pielietota parametru novērtēšana. Tomēr glikolīzes ceļa sazarojumu ieviešana tā pat kā Teusink et al. (2000) modelī, varētu uzlabot modeļa kvalitāti.

Kinētisko modeli iespējams uzlabot, izveidojot ciešāk regulētu reakciju tīklu. Vairāki no enzīmiem tiek alostēriski regulēti vai to reakcijas mehānismi ir sarežģītāki nekā pašreizējie modelī aprakstītie. Piemēram, FAS sintēzes mehānisms atbilst 7 saitū ping-pong mehānismam. Enzīms satur 4'- fosfopanteteīna prostētisko grupu, kas transportē reakciju starpproduktus no viena katalītiskā centra uz citu, kur katrs no substrātiem atsevišķi veido kompleksu ar enzīmu (Katiyar et al. 1975). Šādus reakcijas mehānismus var precīzāk aprakstīt ar ping-pong vienādojumiem.

Vēl nav vienota viedokļa par DHA sintizējošo ceļu *C. cohnii* (Qiu 2003). Izmantojot jau izveidoto modeli un tam pievienojot attiecīgi –konvencionālā ceļa enzīmus (elongāzes un desaturāzes) vai PKS enzīmu, ir iespējams simulēt abu sintēzes ceļu darbību. Tomēr jāpiebilst, ka informācija par šo ceļu parametriem ir vēl mazāk pieejama. Tadā pašā veidā, iespējams pievienot arī citus substrātus izmantojošās reakcijas. Paredzēts pārbaudīt modeļa darbību, salīdzinot glikozes un etanola izmantošanu *C. cohnii* barotnē, kā arī citus substrātus, kuri piemēroti *C. cohnii* augšanai (Kalnenieks pers. comm.).

4.2. Stehiometriskā modelēšana

Izmantojot vienu, divus vai pat trīs references modeļus gan metabolītu, gan reakciju skaits modeļos ievērojami nepalielinājās, kā tas notika izmantojot visus 4 modeļus. Iespējams, tikai apvienojot lielāku metabolītu un reakciju dažādību, var pilnībā rekonstruēt metaboliskos tīklus šūnā, ko arī apstiprina FBA analīze. Jāpiemin, ka izmantojot RAVEN rīku rekonstrukcijā, modelī tiek ieviesti vairāki nodalījumi, šajā gadījumā veseli 19 (piem., goldži komplekss, peroksisomas, mitohondriji), kas var nopietni palielināt gan reakciju, gan metabolītu daudzumu. Ja atzīmēts, ka reakcija notiek gan citoplazmā, gan mitohondrijā, modelī tā tiek atkārtota, papildus metabolītiem klāt kvadrātiem pierakstot nodalījuma apzīmējumu (malonyl-CoA[c] vai malonyl-CoA[m]). Modeļorganisma *E.coli* GEMs satur no 2286 līdz 2583 metabolītu un no 1366 līdz 1445 reakciju, bet *Saccharomyces cerevisiae* satur no 555 līdz 817 metabolītu un 1379 līdz 1562 reakciju (Yilmaz and Walhout 2017). Diatoma *Phaeodactylum tricornutum* (B.) genoma izmēra modelis satur 4,456 reakcijas un 2,172 metabolītus (Levering et al. 2016). Līdz šim modeļa rekonstrukcija tika koncentrēta uz automatizētu metožu pielietošanu, lai simulētā sistēma spētu pastāvēt un uzrādīt plūsmu uz biomasas komponentēm. Pašreiz pastāv uzskats, ka modelis satur nepieciešami lielu reakciju skaitu, salīdzinot ar citu organismu GEMs, kas palielina aprēķinu un analīzes laiku. Tika

mēģināts to vienkāršot, izmantojot iepriekš minētās metodes, bet tajā pašā laikā cenšoties saglabāt tā plūsmu uz biomasas vienādojumu.

Pirmā reakcija, kurā tiek patērēts malonil-CoA, ir atgriezeniska reakcija tā sintēzei, to katalizē malonil-CoA dekarboksilāze (EC:4.1.1.9). Nākošais enzīms (EC:2.3.1.199) katalizē malonil grupas pievienošanu jau uzsintezētai karbonskābei. Modelī šī enzīma katalizētās reakcijas ir visvairāk pārstāvētas- 29, tās sintezētie produkti ir garās piesātinātās, mononepiesātinātās un polinepiesātinātās taukskābes (4. pielikums). Taukskābju sintēzes sistēmas (FAS) (EC:2.3.1.85) enzīms sintezē palmitīnskābi vienā reakcijā, uzreiz izmantojot 7 malonil-CoA metabolītus. Abas reakcijas uzskatāmas par galvenajām, taukskābju sintēzei modelī.

Reakcija, kuru katalizē enzīms (EC:2.3.1.39) ACP s-maloniltransferāze, pievieno malonil grupu ACP nesošajam proteīnam. Reakcija tiek uzskatīta, par FAS uzlādēšanas posmu (Yoshida et al. 2016).

Enzīms (EC:2.3.1.21)- karnitīna palmitīntransferāze- nodrošina palmitin-CoA transportu uz mitohondriju matriksu, lai to varētu oksidizēt enerģijas iegūšanai. Taukskābes, kuras garākas par 14 C atomiem nespēj brīvi difundēt mitohondriju matriksā, tādēļ tām nepieciešams karnitīna mediēts transports (Nelson and Cox 2008).

Enzīms (EC:2.3.1.86) FAS ½, kas parasti atrodams raugos, arī ir taukskābju sintēzes sistēma, tikai šis enzīms sastāv no 2 subvienībām. Modelī ir 12 šī enzīma veiktās reakcijas. Reakciju produkti noved līdz palmitil-CoA, stearil-CoA un vairākām 18 un 20 C atomus saturošām taukskābēm ar atšķirīgu dubultsaišu skaitu (4. pielikums).

Enzīmi acetil-CoA acetiltransferāze (EC:2.3.1.16) un sfingozīna kināze (EC:2.7.1.9) nav tieši iesaistīti taukskābju sintēzē, bet ir prekursori citiem produktiem (sfingolipīdiem) vai piedalās taukskābju β-oksidācijā.

Reakcijai #4981 un reakcijai #8335 nav norādīti EC numuri. #4981 reakcija ir pirmais solis taukskābes pagarināšanā, bet #8335 ir transporta reakcija, kas nogādā malonil-CoA endoplazmatiskā tīkla membrānā (4. pielikums).

Lielā enzīmu daudzveidība, ar šķietami līdzīgām funkcijām (EC:2.3.1.199, EC:2.3.1.85, EC:2.3.1.86), var tikt izskaidrota ar organismu lielo genoma izmēru. Tiek hipotizēts, ka ģintī vairāku pastāvošo endosimbiotu dēļ ir liela laterālā gēnu pārnese. Stehiometriskie modeļi ir balstīti uz gēnu- proteīnu- reakciju attiecībām, tādēļ sekvencē iekļautā informācija, tiek atspoguļota modeļa reakcijās. Tas varētu izskaidro gan prokariotisko, gan eikariotisko enzīmu līdzpastāvēšanu dinoflagellātos (Wisecaver and Hackett 2011, Bi et al. 2019).

Malonil-CoA savienojuma sintezēšana var tik uzskatīta par pirmo reakciju taukskābju biosintēzes reakcijās. Acetil-CoA karboksilāze (EC:6.4.1.2) ir enzīms, kas ir galvenais šīs

reakcijas katalizators. Dažos organismos enzīms sastāv no viena polipeptīda, tadā gadījumā biotīna karboksilāzes (EC:6.3.4.14) veiktā reakcija, ir iekļauta visa enzīma kopējā darbībā. Bet, ja tas ir daudzomēnu polipeptīds, biotīna karboksilāzi, izdala kā atsevišķu enzīmu (Norman et al. 1994). Modelī atrodami abi enzīmi, un tie veic vienu un to pašu reakciju- malonil-CoA veidošanu no acetil-CoA un bikarbonāta. Arī šo abu enzīmu līdzpastāvēšanu, var izskaidrot ar lielu laterālās gēnu apmaiņas apjomu.

4.3. Abu modelēšanas veidu kopēja izmantošana

Stehiometriskā modeļa reakciju matricā ir attēlota visu reakciju masas bilance. Šūnas reakciju dinamiskā uzvedība netiek ņemta vērā pamatojoties uz pieņēmumu, ka metabolīti un plūsmas atrodas stacionārajā stāvoklī. Šī pieņēmuma dēļ genoma izmēra modeļi spēj aptvert daudz lielāku metabolisma apmēru, šajā gadījumā, visa genoma. Tie spēj balansēt šaurāk izveidotos kinētiskos modeļus, ierobežojot to darbību bioloģiski iespējamā diapazonā.

Izmantjot abus modeļus, to sniegtā informācija var papildināt viena otru. Stehiometriskajā modelī aplūkoti tikai oglekļa plūsmas kontroles galvenie ceļi. Šie regulācijas mehānismi ir specifiski taukskābes uzkrājošiem organismiem, un ir svarīga to iesaiste kopējā metabolisma pētīšana. Taukskābju sintēzē svarīgs arī celulārais reducēšanas potenciāls- NADPH. Kaut gan darba ietvaros nav detalizēti aplūktas stehiometriskajā modelī ietvertās NADPH nodrošinātās reakcijas, visu nepieciešamo acetil-CoA mehānismu esamība liek pieņemt, ka arī reducēšanas potenciāla veidošanās ir pareizi balansēta.

Kinētiskajā modelī nav iekļautas ATP, NAD(P)H, H₂O, CO₂ kā arī citas molekulas. ATP un NADH ieviešanai kinētiskajā modelī, nepieciešmas “dummy” reakcijas, jo izveidotā sistēma ir izolēta no pārējā organisma centrālā metabolisma, kas parasti nodrošina šos savienojumus. Plūsmas noteikšana konkrētā ceļa virzienā kinētiskajam modelim, dotu balansētus datus, kas labāk atbilstu konkrētā organisma sintēzes iespējām.

SECINĀJUMI

- Kinētiskajā modelī sasniegts stacionārais stāvoklis, bet modeli nepieciešams pilnveidot un izveidot vairāku substrātu izmantošanas stratēģijas DHA ražošanas optimizācijai.
- Modelis uzrāda mazāku plūsmu taukskābju sintēzes virzienā, tajā pašā laikā uzrādot lielāku glikozes patēriņu, nekā norādīts eksperimentālajos datos.
- RAVEN rīks ir piemērots automatizētai genoma mēroga modeļu veidošanai, tomēr modeļiem joprojām nepieciešama manuāla koriģēšana.
- Kinētiskās un stehiometriskās modelēšanas apvienošana sniedz bioloģiski realistiskāku organisma metabolisma atainojumu, kas var palīdzēt izvirzīt precīzākas hipotēzes.

PATEICĪBAS

Izsaku pateicību darba vadītājām Egilam Stalidzānam par plašo zināšanu klāstu, pozitīvismu, sniegto iespēju apgūt sistēmbioloģijas metodes un visaptverošu ieskatu zinātnes pasaulē. Paldies visiem sistēmbioloģijas grupas locekļiem par tiešu un netiešu atbalstu darba tapšanā. Īpašs paldies Kristapam Bērziņam par padomiem stehiometriskās modelēšanas apgūšanā.

Darbs izstrādāts “Crypthecodinium cohnii un Zymomonas mobilis sintrofija omega 3 taukskābju ražošanai no biodegvielas un cukura rūpniecības blakusproduktiem” projekta ietvaros ar finansiālo atbalstu no Eiropas Reģionālā attīstības fonda.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- Anomyous 2019. RAVEN/core/ fillGaps.m
<https://github.com/SysBioChalmers/RAVEN/blob/master/core/fillGaps.m>
- Anomyous 2018. RAVEN/core/ contractModel.m
<https://github.com/SysBioChalmers/RAVEN/blob/master/core/contractModel.m>
- Anomyous 2018. cobratoolbox/src/ reconstruction/ modelGeneration/
removeDeadEnds.m
<https://github.com/opencobra/cobratoolbox/blob/efb2c06be702aaed38349581ba73ed420251992b/src/reconstruction/modelGeneration/removeDeadEnds.m>
- Anomyous 2018. RAVEN/core/ simplifyModel.m
<https://github.com/SysBioChalmers/RAVEN/blob/master/core/simplifyModel.m>
- Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP). 2017. Snow, Water, Ice and Permafrost in the Arctic (SWIPA); Summary for Policy-makers. <https://oaarchive.arctic-council.org/bitstream/handle/11374/1931/swipa-spm.pdf.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (accessed on April 3, 2020)
- Arterburn L.M., Hall E.B., Oken H. 2006. Distribution, interconversion, and dose response of n- 3 fatty acids in humans.- *The American journal of clinical nutrition*, 83(6): 1467S-1476S.
- Bailey J.E. 1998. Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities.- *Biotechnology progress*, 14(1): 8-20.
- Bergmann F.T., Hoops S., Klahn B., Kummer U., Mendes P., Pahle J., Sahle S. 2017. COPASI and its applications in biotechnology.- *Journal of biotechnology*, 261: 215-220.
- Bi Y., Wang F., Zhang W. 2019. Omics Analysis for Dinoflagellates Biology Research.- *Microorganisms*, 7(9): 288.
- Burdge G.C., Jones A.E., Wootton S.A. 2002. Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of α -linolenic acid metabolism in young men.- *British Journal of Nutrition*, 88(4): 355-363.
- Burdge G.C., Wootton S.A. 2002. Conversion of α -linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women.- *British Journal of Nutrition*, 88(4): 411-420.
- Carver J.D., Benford V.J., Han B., Cantor A.B. 2001. The relationship between age and the fatty acid composition of cerebral cortex and erythrocytes in human subjects.- *Brain research bulletin*, 56(2): 79-85.

Chang S.L., Harding N., Zachreson C., Cliff O.M., Prokopenko M. 2020. Modelling transmission and control of the COVID-19 pandemic in Australia.- arXiv preprint arXiv:2003.10218.

de Swaaf M.E., de Rijk T.C., Eggink G., Sijtsma L. 1999. Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*.- *Journal of Biotechnology*, 70(1-3): 185-192.

de Swaaf M.E., Sijtsma L., Pronk J.T. 2003. High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii*.- *Biotechnology and bioengineering*, 81(6): 666-672.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). 2013. Scientific Opinion on nutrient requirements and dietary intakes of infants and young children in the European Union.- *EFSA Journal*, 11(10): 3408.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). 2010. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol.- *EFSA Journal*, 8(3): 1461.

EFSA Scientific Committee. 2015. Statement on the benefits of fish/seafood consumption compared to the risks of methylmercury in fish/seafood.- *EFSA journal*, 13(1): 3982.

Fitzherbert E.B., Struebig M.J., Morel A., Danielsen F., Brühl C.A., Donald P.F., Phalan B. 2008. How will oil palm expansion affect biodiversity?.- *Trends in ecology & evolution*, 23(10): 538-545.

Glont M., Nguyen T.V.N., Graesslin M., Hälke R., Ali R., Schramm J., Wimalaratne S.M., Kothamachu V.B., Rodriguez N., Swat M.J., Eils J. 2018. BioModels: expanding horizons to include more modelling approaches and formats.- *Nucleic acids research*, 46(D1): D1248-D1253.

Guay C., Madiraju S.M., Aumais A., Joly É., Prentki M. 2007. A role for ATP-citrate lyase, malic enzyme, and pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion.- *Journal of Biological Chemistry*, 282(49): 35657-35665.

Guil-Guerrero J.L., Belarbi E.H. 2001. Purification process for cod liver oil polyunsaturated fatty acids.- *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(5): 477-484.

Hardt T. 2007. *Handbook of Paleoanthropology: Vol I: Principles, Methods and Approaches Vol II: Primate Evolution and Human Origins Vol III: Phylogeny of Hominids*. New York: Springer Science & Business Media.

- Hauvermale A., Kuner J., Rosenzweig B., Guerra D., Diltz S., Metz J.G. 2006. Fatty acid production in *Schizochytrium* sp.: Involvement of a polyunsaturated fatty acid synthase and a type I fatty acid synthase.- *Lipids*, 41(8): 739-747.
- Heirendt L., Arreckx S., Pfau T., Mendoza S.N., Richelle A., Heinken A., Haraldsdóttir H.S., Wachowiak J., Keating S.M., Vlasov V., Magnusdóttir S. 2019. Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v. 3.0.- *Nature protocols*, 14(3): 639-702.
- Hoops S., Sahle S., Gauges R., Lee C., Pahle J., Simus N., Singhal M., Xu L., Mendes P., Kummer U. 2006. COPASI—a complex pathway simulator.- *Bioinformatics*, 22(24): 3067-3074.
- Hu W. 2014. Dry weight and cell density of individual algal and cyanobacterial cells for algae research and development. Columbia: University of Missouri, 81 pp.
- Yilmaz L.S., Walhout A.J. 2017. Metabolic network modeling with model organisms. *Current opinion in chemical biology*, 36: 32-39.
- Yoshida K., Hashimoto M., Hori R., Adachi T., Okuyama H., Orikasa Y., Nagamine T., Shimizu S., Ueno A., Morita N. 2016. Bacterial long-chain polyunsaturated fatty acids: their biosynthetic genes, functions, and practical use.- *Marine drugs*, 14(5): 94.
- Yuhas R., Pramuk K., Lien E. L. 2006. Human milk fatty acid composition from nine countries varies most in DHA.- *Lipids*, 41(9): 851–858.
- Jensen T.K., Priskorn L., Holmboe S.A., Nassan F.L., Andersson A.M., Dalgård C., Petersen J.H., Chavarro J.E., Jørgensen N. 2020. Associations of fish oil supplement use with testicular function in young men.- *JAMA Network Open*, 3(1): e1919462.
- Kanehisa M., Sato Y., Furumichi M., Morishima K., Tanabe M. 2019. New approach for understanding genome variations in KEGG.- *Nucleic acids research*, 47(D1): D590-D595.
- Kashyap R., Palai T., Bhattacharya P.K. 2015. Kinetics and model development for enzymatic synthesis of fructo-oligosaccharides using fructosyltransferase.- *Bioprocess and biosystems engineering*, 38(12): 2417-2426.
- Katiyar S.S., Cleland W.W., Porter J.W. 1975. Fatty acid synthetase. A steady state kinetic analysis of the reaction catalyzed by the enzyme from pigeon liver.- *Journal of Biological Chemistry*, 250(7): 2709-2717.
- Koletzko B., Carlson S.E., Van Goudoever J.B. 2015. Should infant formula provide both omega-3 DHA and omega-6 arachidonic acid?.- *Annals of Nutrition and Metabolism*, 66(2-3): 137-138.
- Kuepfer L. 2014. Stoichiometric modelling of microbial metabolism.- In: *Metabolic Flux Analysis*, New York, NY., Humana Press: 3-18.

Kumar L.R., Kaur R., Yellapu S.K., Zhang X., Tyagi R.D. 2019. Biodiesel Production From Oleaginous Microorganisms With Wastes as Raw Materials.- In: Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels, Academic press: 661-690.

Levering J., Broddrick J., Dupont C.L., Peers G., Beerli K., Mayers J., Gallina A.A., Allen A.E., Palsson B.O., Zengler K. 2016. Genome-scale model reveals metabolic basis of biomass partitioning in a model diatom.- PLoS One, 11(5): e0155038.

Lewis N.E., Hixson K.K., Conrad T.M., Lerman J.A., Charusanti P., Polpitiya A.D., Adkins J.N., Schramm G., Purvine S.O., Lopez-Ferrer D., Weitz K.K. 2010. Omic data from evolved E. coli are consistent with computed optimal growth from genome-scale models.- Molecular systems biology, 6(390) doi: 10.1038/msb.2010.47.

Liu B., Liu J., Sun P., Ma X., Jiang Y., Chen F. 2015. Sesamol enhances cell growth and the biosynthesis and accumulation of docosahexaenoic acid in the microalga *Cryptocodinium cohnii*.- Journal of agricultural and food chemistry, 63(23): 640-664.

Ma H., Boogerd F.C., Goryanin I. 2009. Modelling nitrogen assimilation of *Escherichia coli* at low ammonium concentration.- Journal of biotechnology, 144(3): 175-183.

Martínez-Soto J.C., Domingo J.C., Cordobilla B., Nicolás M., Fernández L., Albero P., Gadea J., Landeras J. 2016. Dietary supplementation with docosahexaenoic acid (DHA) improves seminal antioxidant status and decreases sperm DNA fragmentation.- Systems biology in reproductive medicine, 62(6): 387-395.

Martyushenko N., Almaas E. 2019. ModelExplorer-software for visual inspection and inconsistency correction of genome-scale metabolic reconstructions.- BMC bioinformatics, 20(1): 56.

Mendes A., Reis A., Vasconcelos R., Guerra P., da Silva T.L. 2009. *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review.- Journal of applied phycology, 21(2): 199-214.

Mendes P., Hoops S., Sahle S., Gauges R., Dada J., Kummer U. 2009. Computational modeling of biochemical networks using COPASI.- In Systems biology, 500: 17-59.

Metz J.G., Roessler P., Facciotti D., Levering C., Dittrich F., Lassner M., Valentine R., Lardizabal K., Domergue F., Yamada A., Yazawa K. 2001. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes.- Science, 293(5528): 290-293.

Mori T.A., Woodman R.J. 2006. The independent effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiovascular risk factors in humans.- Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 9(2): 95-104.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Docosahexaenoic acid, CID=445580, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Docosahexaenoic-acid> (accessed on May 5, 2020)

Nelson D.L., Cox M.M.. 2008. Principles of biochemistry fifth edition. New York: W. H. Freeman and Company, 1158 pp.

Norman E., De Smet K.A., Stoker N.G., Ratledge C., Wheeler P.R., Dale J.W. 1994. Lipid synthesis in mycobacteria: characterization of the biotin carboxyl carrier protein genes from *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis*.- *Journal of bacteriology*, 176(9): 2525-2531.

Okuyama H., Orikasa Y., Nishida T., Watanabe K., Morita N. 2007. Bacterial genes responsible for the biosynthesis of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their heterologous expression.- *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(3): 665-670.

Orth J.D., Thiele I., Palsson B.Ø. 2010. What is flux balance analysis?.- *Nature biotechnology*, 28(3): 245-248.

Pei G., Li X., Liu L., Liu J., Wang F., Chen L., Zhang W. 2017. De novo transcriptomic and metabolomic analysis of docosahexaenoic acid (DHA)-producing *Cryptocodinium cohnii* during fed-batch fermentation.- *Algal research*, 26: 380-391.

Pingoud V., Wende W., Friedhoff P., Reuter M., Alves J., Jeltsch A., Mones L., Fuxreiter M., Pingoud A. 2009. On the divalent metal ion dependence of DNA cleavage by restriction endonucleases of the EcoRI family.- *Journal of molecular biology*, 393(1): 140-160.

Pleissner D., Eriksen N.T. 2012. Effects of phosphorous, nitrogen, and carbon limitation on biomass composition in batch and continuous flow cultures of the heterotrophic dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*.- *Biotechnology and bioengineering*, 109(8): 2005-2016.

Qiu X. 2003. Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22: 6-4, 7, 10, 13, 16, 19): two distinct pathways.- *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 68(2): 181-186.

Ratledge C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. – *Biochimie*, 86 (11): 807–815.

Ratledge C., Wynn J.P. 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms.- *Advances in applied microbiology*, 51: 1–52.

Rumiani L.A., Jalili H., Amrane A. 2018. Enhanced docosahexaenoic acid production by *Cryptocodinium cohnii* under combined stress in two-stage cultivation with date syrup based medium. - *Algal Research*, 34: 75-81.

- Safdar W., Shamooun M., Zan X., Haider J., Sharif H.R., Shoaib M., Song Y. 2017. Growth kinetics, fatty acid composition and metabolic activity changes of *Cryptocodinium cohnii* under different nitrogen source and concentration.- *AMB Express*, 7(1): 85.
- Schechter A., Cramer P., Boggess K., Stanley J., Olson J.R. 1997. Levels of dioxins, dibenzofurans, PCB and DDE congeners in pooled food samples collected in 1995 at supermarkets across the United States.- *Chemosphere*, 34(5-7): 1437-1447.
- Shoguchi E., Shinzato C., Kawashima T., Gyoja F., Mungpakdee S., Koyanagi R., Takeuchi T., Hisata K., Tanaka M., Fujiwara M., Hamada M. 2013. Draft assembly of the *Symbiodinium minutum* nuclear genome reveals dinoflagellate gene structure.- *Current biology*, 23(15): 1399-1408.
- Smallbone K., Messiha H.L., Carroll K.M., Winder C.L., Malys N., Dunn W.B., Murabito E., Swainston N., Dada J.O., Khan F., Pir P. 2013. A model of yeast glycolysis based on a consistent kinetic characterisation of all its enzymes.- *FEBS letters*, 587(17): 2832-2841.
- Sonnenborn U., Kunau W.H. 1982. Purification and properties of the fatty acid synthetase complex from the marine dinoflagellate, *Cryptocodinium cohnii*.- *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 712(3): 523-534.
- Wang F., Bi Y., Diao J., Lv M., Cui J., Chen L., Zhang W. 2019. Metabolic engineering to enhance biosynthesis of both docosahexaenoic acid and odd-chain fatty acids in *Schizochytrium* sp. S31.- *Biotechnology for biofuels*, 12(1): 1-14.
- Wang H., Marcišauskas S., Sánchez B.J., Domenzain I., Hermansso D., Agren R., Nielsen J., Kerkhoven E.J. 2018. RAVEN 2.0: A versatile toolbox for metabolic network reconstruction and a case study on *Streptomyces coelicolor*.- *PLoS computational biology*, 14(10): e1006541.
- Wisecaver J.H., Hackett J.D. 2011. Dinoflagellate genome evolution.- *Annual review of microbiology*, 65: 369-387.

PIELIKUMI

Kinētiskā modeļa metabolītu atšifrējums

N.p.k.	Apzīmējums	Nosaukums
1.	Glc(EX)	Glikoze (ekstracelulārā)
2.	Glc(In)	Glikoze (intracelulārā)
3.	GluGP	Glikozes 6-fosfāts
4.	Fru6P	Fruktozes 6-fosfāts
5.	Fru1,6P	Fruktozes 1,6- bifosfāts
6.	DHAP	Dihidroksiacetona fosfāts
7.	Gra3P	Gliceraldehīda 3-fosfāts
8.	Gri2,3P	1,3 bifosfoglicerāts
9.	Gri3P	2- fosfoglicerāts
10.	Gri2P	3- fosfoglicerāts
11.	Phosphoenolpyruvate	Fosfoenolpiruvāts
12.	Pyruvate	Piruvāts
13.	Acetyl-CoA	Acetil-koenzīms A
14.	Malonyl-CoA	Malonil-koenzīms A
15.	C16:0	Palmitīnskābe

N.p.k.	Apzīmējums	Veiktā reakcija modelī	Enzīma nosaukums	EC numurs
1.	Glucose transport	glucose{ex} -> glucose{cell}	-	-
2.	HK	glucose{cell} = glucose-6-phosphate	Heksokināze	EC 2.7.1.1
3.	PGI	glucose-6-phosphate = fructose-6-phosphate	Fosfoglikozes izomerāze	EC 5.3.1.9
4.	PFK	fructose-6-phosphate = fructose-1,6-biphosphate	Fosfofruktokināze	EC 2.7.1.11
5.	ALD	fructose-1,6-biphosphate = dihydroxyacetone-phosphate + glyceraldehyde-3-phosphate	Fruktozobifosfāta aldolāze	EC 4.1.2.13
6.	TPI	dihydroxyacetone-phosphate = glyceraldehyde-3-phosphate	Triozesfosfāta izomerāze	EC 5.3.1.1
7.	Gra3PDH	glyceraldehyde-3-phosphate = 1,3-bisphosphoglycerate	Gliceraldahīda fosfāta dehidrogenēze	EC 1.2.1.12
8.	PGK	1,3-bisphosphoglycerate = 3-phosphoglycerate	3- fosfoglicerāta kināze	EC 2.7.2.3
9.	PGM	3-phosphoglycerate = 2-phosphoglycerate	Fosfoglicerolmutāze	EC 5.4.2.12
10.	ENO	2-phosphoglycerate = phosphoenolpyruvate	Fosfopiruvāta hidratāze	EC 4.2.1.11
11.	PYK	phosphoenolpyruvate = pyruvate	Piruvāta kināze	EC 2.7.1.40
12.	PDH	pyruvate = acetyl-CoA	Piruvāta sintēze	EC 1.2.7.1

13.	-	acetyl-CoA = malonyl-CoA	Acetil- koenzīma A karboksilāze	EC 6.4.1.2
14.	FAS	acetyl-CoA + 7 * malonyl-CoA = palmitic-acid	Taukskābju sintēze	EC 2.3.1.85

3. pielikums

Iegūtās nezināmo parametru vērtības kinētiskajā modelī.

Veiktā reakcija	Enzīms un tā apzīmējums	Parametrs	Iegūtā vērtība
1.	Glikozes transports	k ₁	0,1
2.	HK; Heksokināze	V _f	976.731
4.	PFK; Fosfofruktokināze	V _f	73.509
5.	ALD; Fruktobifosfāta aldoze	K _{ip}	46300,8
5.	ALD; Fruktobifosfāta aldoze	V _f	440599
6.	TPI; Triozesfosfāta izomerāze	V _f	7,059
12.	PDH; Piruvāta sintēze	V _f	446,972
13.	Acetil- koenzīma A karboksilāze	V _f	15.532
14.	Taukskābju sintēze	V _f	990.797

4. pielikums

Reakcijas modeļi, kas patērē malonil-CoA metabolītu

N.p.k.	EC numurs	Reakcija modeļi	ID modeļi	Vienādojums modeļi
1	EC:4.1.1.9	#703	HMR_4105	$H+[c] + \text{malonyl-CoA}[c] \Rightarrow \text{acetyl-CoA}[c] + \text{CO}_2[c]$
2	EC:2.3.1.199	#1558	HMR_2305	$3 H+[c] + \text{malonyl-CoA}[c] + 2 \text{NADPH}[c] + \text{oleoyl-CoA}[c] \Rightarrow (11Z)\text{-eicosenoyl-CoA}[c] + \text{CO}_2[c] + \text{CoA}[c] + \text{H}_2\text{O}[c] + 2 \text{NADP}+[c]$
3	EC:2.3.1.199	#1559	HMR_2315	$(11Z)\text{-eicosenoyl-CoA}[c] + 3 H+[c] + \text{malonyl-CoA}[c] + 2 \text{NADPH}[c] \Rightarrow (13Z)\text{-docosenoyl-CoA}[c] + \text{CO}_2[c] + \text{CoA}[c] + \text{H}_2\text{O}[c] + 2 \text{NADP}+[c]$
4	EC:2.3.1.199	#1560	HMR_2324	$(13Z)\text{-docosenoyl-CoA}[c] + 3 H+[c] + \text{malonyl-CoA}[c] + 2 \text{NADPH}[c] \Rightarrow (15Z)\text{-tetracosenoyl-CoA}[c] + \text{CO}_2[c] + \text{CoA}[c] + \text{H}_2\text{O}[c] + 2 \text{NADP}+[c]$
5	EC:2.3.1.199	#1561	HMR_2332	$(15Z)\text{-tetracosenoyl-CoA}[c] + 3 H+[c] + \text{malonyl-CoA}[c] + 2 \text{NADPH}[c] \Rightarrow \text{CO}_2[c] + \text{CoA}[c] + \text{H}_2\text{O}[c] + \text{hexacosenoyl-CoA}[c] + 2 \text{NADP}+[c]$
6	EC:2.3.1.199	#1562	HMR_2342	$\text{cis-vaccenoyl-CoA}[c] + 3 H+[c] + \text{malonyl-CoA}[c] + 2 \text{NADPH}[c] \Rightarrow (13Z)\text{-eicosenoyl-CoA}[c] + \text{CO}_2[c] + \text{CoA}[c] + \text{H}_2\text{O}[c] + 2 \text{NADP}+[c]$
7	EC:2.3.1.199	#1563	HMR_2347	$(7Z)\text{-octadecenoyl-CoA}[c] + 3 H+[c] + \text{malonyl-CoA}[c] + 2 \text{NADPH}[c] \Rightarrow 9\text{-eicosenoyl-CoA}[c] + \text{CO}_2[c] + \text{CoA}[c] + \text{H}_2\text{O}[c] + 2 \text{NADP}+[c]$
8	EC:2.3.1.199	#1564	HMR_2353	$9\text{-eicosenoyl-CoA}[c] + 3 H+[c] + \text{malonyl-CoA}[c] + 2 \text{NADPH}[c] \Rightarrow (11Z)\text{-docosenoyl-CoA}[c] + \text{CO}_2[c] + \text{CoA}[c] + \text{H}_2\text{O}[c] + 2 \text{NADP}+[c]$

4.1. pielikums

Reakcijas modeļi, kas patērē malonyl-CoA metabolītu

9	EC:2.3.1.199	#1565	HMR_2361	(6Z,9Z)-octadecadienoyl-CoA[c] + 3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => (8Z,11Z)-eicosadienoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c]
10	EC:2.3.1.199	#1566	HMR_2190	2 H+[c] + malonyl-CoA[c] + NADPH[c] + palmitoyl-CoA[c] => (2E)-octadecenoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + NADP+[c]
11	EC:2.3.1.199	#1568	HMR_2201	3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] + stearoyl-CoA[c] => CO2[c] + CoA[c] + eicosanoyl-CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c]
12	EC:2.3.1.199	#1569	HMR_2205	eicosanoyl-CoA[c] + 3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => CO2[c] + CoA[c] + docosanoyl-CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c]
13	EC:2.3.1.199	#1570	HMR_2211	docosanoyl-CoA[c] + 3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c] + tetracosanoyl-CoA[c]
14	EC:2.3.1.199	#1571	HMR_2215	3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] + tetracosanoyl-CoA[c] => CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + hexacosanoyl-CoA[c] + 2 NADP+[c]
15	EC:2.3.1.199	#1572	HMR_2259	3 H+[c] + heptadecanoyl-CoA[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c] + nonadecanoyl-CoA[c]
16	EC:2.3.1.199	#1573	HMR_2263	3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] + nonadecanoyl-CoA[c] => CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + heneicosanoyl-CoA[c] + 2 NADP+[c]

Reakcijas modeļi, kas patērē malonil-CoA metabolītu

17	EC:2.3.1.199	#1574	HMR_2267	3 H+[c] + heneicosanoyl-CoA[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c] + tricosanoyl-CoA[c]
18	EC:2.3.1.85; EC:2.3.1.39	#1590	HMR_2151	[ACP][c] + malonyl-CoA[c] => CoA[c] + malonyl-[ACP][c]
19	EC:2.3.1.199	#1601	HMR_2475	(6Z,9Z,12Z,15Z)-octadecatetraenoyl-CoA[c] + 3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => (8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosatetraenoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c]
20	EC:2.3.1.199	#1603	HMR_2486	(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosapentaenoyl-CoA[c] + 3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => (7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosapentaenoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c]
21	EC:2.3.1.199	#1605	HMR_2497	(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosapentaenoyl-CoA[c] + H+[c] + malonyl-CoA[c] => 3-oxo-tetracos-9,12,15,18,21-all-cis-pentaenoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c]
22	EC:2.3.1.199	#1610	HMR_2515	(8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosatetraenoyl-CoA[c] + 3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => 10,13,16,19-docosatetraenoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c]
23	EC:2.3.1.199	#1611	HMR_2522	10,13,16,19-docosatetraenoyl-CoA[c] + 2 H+[c] + malonyl-CoA[c] + NADPH[c] => 3(S)-hydroxy-tetracos-12,15,18,21-all-cis-tetraenoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + NADP+[c]
24	EC:2.3.1.199	#1613	HMR_2530	3 H+[c] + linolenoyl-CoA[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => (11Z,14Z,17Z)-eicosatrienoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c]

Reakcijas modeļi, kas patērē malonil-CoA metabolītu

25	EC:2.3.1.199	#1614	HMR_2540	(11Z,14Z,17Z)-eicosatrienoyl-CoA[c] + 3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => 13,16,19-docosatrienoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c]
26	EC:2.3.1.199	#1619	HMR_2371	gamma-linolenoyl-CoA[c] + 3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => CO2[c] + CoA[c] + dihomogamma-linolenoyl-CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c]
27	EC:2.3.1.199	#1621	HMR_2383	arachidonyl-CoA[c] + 3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => (7Z,10Z,13Z,16Z)-docosatetraenoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c]
28	EC:2.3.1.199	#1623	HMR_2395	(7Z,10Z,13Z,16Z)-docosatetraenoyl-CoA[c] + 2 H+[c] + malonyl-CoA[c] + NADPH[c] => 3(S)-hydroxy-tetracosal-12,15,18,21-all-cis-tetraenoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + NADP+[c]
29	EC:2.3.1.199	#1629	HMR_2415	dihomogamma-linolenoyl-CoA[c] + 3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => 10,13,16-docosatrienoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c]
30	EC:2.3.1.199	#1630	HMR_2423	3 H+[c] + linoleoyl-CoA[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => (11Z,14Z)-eicosadienoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c]
31	EC:2.3.1.199	#1631	HMR_2433	(11Z,14Z)-eicosadienoyl-CoA[c] + 3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => (13Z,16Z)-docosadienoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c]

Reakcijas modeļi, kas patērē malonil-CoA metabolītu

32	EC:2.3.1.21	#1755	HMR_2599	L-carnitine[c] + malonyl-CoA[c] => CoA[c] + malonyl-carnitin[c]
33	2.3.1.86	#4686	FAEL183	gamma-linolenoyl-CoA[c] + 5 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 4 NADPH[c] + O2[c] => CO2[c] + CoA[c] + dihomogamma-linolenoyl-CoA[c] + 3 H2O[c] + 4 NADP+[c]
34	2.3.1.86	#4687	FAEL184	(6Z,9Z,12Z,15Z)-octadecatetraenoyl-CoA[c] + 5 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 4 NADPH[c] + O2[c] => (8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosatetraenoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + 3 H2O[c] + 4 NADP+[c]
35	2.3.1.86	#4688	FAEL204	arachidonyl-CoA[c] + 5 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 4 NADPH[c] + O2[c] => (7Z,10Z,13Z,16Z)-docosatetraenoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + 3 H2O[c] + 4 NADP+[c]
36	2.3.1.86	#4689	FAEL205	(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosapentaenoyl-CoA[c] + 5 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 4 NADPH[c] + O2[c] => (7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosapentaenoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + 3 H2O[c] + 4 NADP+[c]
37	2.3.1.86	#4729	FAS100COA	3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] + octanoyl-CoA[c] => CO2[c] + CoA[c] + decanoyl-CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c]
38	2.3.1.86	#4730	FAS120COA	decanoyl-CoA[c] + 3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + lauroyl-CoA[c] + 2 NADP+[c]
39	2.3.1.86	#4731	FAS140COA	3 H+[c] + lauroyl-CoA[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + myristoyl-CoA[c] + 2 NADP+[c]

Reakcijas modeļi, kas patērē malonil-CoA metabolītu

40	2.3.1.86	#4732	FAS160COA	3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + myristoyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] => CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c] + palmitoyl-CoA[c]
41	2.3.1.86	#4733	FAS180COA	3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] + palmitoyl-CoA[c] => CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c] + stearoyl-CoA[c]
42	2.3.1.86	#4734	FAS80COA_L	acetyl-CoA[c] + 9 H+[c] + 3 malonyl-CoA[c] + 6 NADPH[c] => 3 CO2[c] + 3 CoA[c] + 3 H2O[c] + 6 NADP+[c] + octanoyl-CoA[c]
43	2.3.1.85	#4760	KAS8	acetyl-CoA[c] + 20 H+[c] + 7 malonyl-CoA[c] + 14 NADPH[c] => 7 CO2[c] + 8 CoA[c] + 6 H2O[c] + 14 NADP+[c] + palmitate[c]
44	-	#4981	RE3148C	(7Z,10Z,13Z,16Z)-docosatetraenoyl-CoA[c] + malonyl-CoA[c] => 3-oxo-tetracos-9,12,15,18,21-all-cis-pentaenoyl-CoA[c] + CO2[c] + CoA[c] + H+[c]
45	2.3.1.16	#4991	RE3241C	3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] + palmitoleoyl-CoA[c] => CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c] + oleoyl-CoA[c]
46	2.7.1.91	#5326	FAS180	3 H+[c] + malonyl-CoA[c] + 2 NADPH[c] + palmitate[c] => CO2[c] + CoA[c] + H2O[c] + 2 NADP+[c] + stearate[c]
47	2.3.1.86	#8253	y002140	acetyl-CoA[c] + 21 H+[c] + 7 malonyl-CoA[c] + 14 NADPH[c] => 7 H2O[c] + palmitoyl-CoA[c] + 7 carbon dioxide[c] + 7 coenzyme A[c] + 14 NADP(+)[c]
48	2.3.1.89	#8554	y002141	acetyl-CoA[c] + 24 H+[c] + 8 malonyl-CoA[c] + 16 NADPH[c] => 8 H2O[c] + stearoyl-CoA[c] + 8 carbon dioxide[c] + 8 coenzyme A[c] + 16 NADP(+)[c]

4.6. pielikums

Reakcijas modelī, kas patērē malonil-CoA metabolītu

49	2.3.1.86	#8255	y002142	acetyl-CoA[c] + 24 H+[c] + 8 malonyl-CoA[c] + 16 NADPH[c] => 8 H2O[c] + stearoyl-CoA[c] + 8 carbon dioxide[c] + 8 coenzyme A[c] + 16 NADP(+)[c]
50	-	#8335	y003514	malonyl-CoA[c] => malonyl-CoA[erm]

Reakcijas modeļi, kas sintizē malonil-CoA metabolītu

N.p.k.	EC numurs	Reakcija modeļi	ID modeļi	Vienādojums modeļi
1	EC:6.4.1.2	#1553	HMR_4156	acetyl-CoA[c] + ATP[c] + HCO ₃ ⁻ [c] => ADP[c] + H ⁺ [c] + malonyl-CoA[c] + Pi[c]
2	EC:6.3.4.14	#2772	HMR_7672	acetyl-CoA[c] + ATP[c] + HCO ₃ ⁻ [c] => ADP[c] + H ⁺ [c] + malonyl-CoA[c] + Pi[c]
3	EC:6.3.4.14	#7675	y000109	acetyl-CoA[c] + ATP[c] + bicarbonate[c] => ADP[c] + H ⁺ [c] + malonyl-CoA[c] + phosphate[c]

Bakalaura darbs „*Cryptocodinium cohnii* metabolisma matemātiskā modelēšana DHA ražošanas optimizācijai” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Santa Prikule *paraksts* 26.05.2020.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr.sc.ing. Egils Stalidzāns *paraksts* 26.05.2020.

Recenzents: *paraksts* Dr.biol. Nils Rostoks

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 26.05.2020.

Lietvede: *paraksts*

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: