

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

MEP METABOLISKĀ CEĻA MATEMĀTISKĀ MODEĻA IZVEIDE
IZOPRĒNA UN CIS-ABIENOLA RAŽOŠANAI TĀLA SĪKPLIKSTIŅĀ

Bakalaura darbs

Autors: Katrīna Daila Neiburga

Stud. apl. Nr. kn14005

Darba vadītājs: Dr.sc.ing. Egils Stalidzāns

Recenzents: Dr.biol. Nils Rostoks

RĪGA 2018

KOPSAVILKUMS

Darbā apskatīta sistēmbioloģijas pieeja augu biotehnoloģijai, tās nozīme un priekšrocības eksperimentālo un modelēšanas metožu apvienošanai. Šī darba ietvaros izveidots matemātiskais modelis MEP metaboliskā ceļa un izoprenoīdu prekursoru sintēzes kinētikai tāla sīkplikstiņa savvaļas formā ar tālāko mērķi to izmantot izoprēna un cis-abienola biosintēzes ceļu optimizācijai. Darba ietvaros tika veikta parametru novērtēšana, stacionārā stāvokļa noteikšana un parametru jutības analīze, pielāgojot modeļa darbību eksperimentālajiem datiem. Darba ietvaros izmēģinātas iespējas samazināt parametru novērtēšanas risinājumu telpu, aprēķinot bioloģiski atbilstošas robežvērtības un genoma mēroga stehiometriskās modelēšanas datu iekļaušana kinētiskajā modelī stacionārā stāvoklī.

Atslēgas vārdi: MEP metaboliskais ceļš, kinētiskā modelēšana, tāla sīkplikstiņš, izoprēna biosintēze, cis-abienola biosintēze

SUMMARY

Mathematical modelling of MEP pathway in *Arabidopsis thaliana* for production of isoprene and cis- abienol.

Systembiology approach to plant biotechnology is reviewed, along with its importance and advantages of combining experimental and modelling methods. In this work a mathematical model with kinetics of MEP pathway and the following synthesis of isoprenoid precursors in wild type thale cress for further use in optimisation of isoprene and cis-abienol biosynthetic pathways was created. Parameter estimation, establishing steady state and sensitivity analysis was done to adjust the model behaviour to experimental data. Options to decrease solution space by calculating biologically relevant minimal and maximal limits were tested as well as incorporating data from genome scale stoichiometric modelling into the kinetic model steady state.

Keywords: MEP pathway, kinetic modelling, thale cress, *Arabidopsis thaliana*, isoprene biosynthesis, cis-abienol biosynthesis

IZMANTOTIE APZĪMĒJUMI

WT – no angļu val. – “*wild type*”, savvaļas forma

PE – no angļu val. – “*parameter estimation*”, parametru novērtēšana

MVA - mevalonāts

DXS/DOXP - 1-deoksi-D- ksilulozes -5-fosfāta sintāze

Acetil-CoA – acetilkoenzīms A

ATP - adenozintrifosfāts

Uni-Uni – reakcija ar vienu substrātu un vienu produktu

Bi-Uni – reakcija ar diviem substrātiem un vienu produktu

EC numurs – Enzīmu identifikācijas kods (*Enzyme commission number*)

5C – no pieciem oglekļa atomiem sastāvoša vienība

¹⁴C – oglekļa-14 radioaktīvais izotops

OKV – optimizācijas kritērija vērtība

TOP – no angļu val. – “*total optimisation potential*”

GG-hlorofils – geranil-geranil hlorofils

AtIPD – no angļu val. “*The Arabidopsis thaliana Isoprenoid Pathway Database*”

TAIR – no angļu val. “*The Arabidopsis Information Resource*”

CRISPR/cas9 – no angļu val. “*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*”/ “*CRISPR associated*”

Izmantotie enzīmu un metabolītu saīsinājumi atrodami 2. un 3. pielikumā.

SATURS

IZMANTOTIE APZĪMĒJUMI.....	4
SATURS.....	5
IEVADS	7
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	8
1.1. Biotehnoloģijas un metaboliskās inženierijas nozīme augos.....	8
1.2. Sistēmbioloģijas pieeja biotehnoloģijai.....	8
1.3. Matemātiskā modelēšana un tās pieejas	10
1.4. <i>A. thaliana</i>	11
1.5. Izoprenoīdi.....	12
1.5.1. MEP metaboliskais ceļš	14
1.5.2. Prenildifosfātu biosintēze	15
1.5.3. Izoprēns	16
1.5.4. Cis-abienols	16
1.6. Līdzšinējie MEP metaboliskā ceļa modeļi augos	17
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	18
2.3. Izmantotās datorprogrammas	18
2.3.1. COPASI.....	18
2.4. Izmantotās datubāzes	18
2.5. Modeļa struktūra	18
2.6. Nezināmo parametru novērtēšana	20
2.7. Stacionārā stāvokļa iegūšana	20
2.8. Parametru jutības analīze	21
2.9. Modeļa uzvedības un parametru vērtību uzlabošana	21
3. REZULTĀTI.....	22
3.1. Modeļa uzbūve un parametru izvēle	22
3.2. Modelī izmantoto vienādojumu izvēle	24
3.3. Nezināmo parametru novērtēšana.	25
3.4. Stacionārā stāvokļa iegūšana	28
4. DISKUSIJA	30
4.1. Modeļa uzbūve, parametru un reakciju izvēle.....	30
4.2. Nezināmo paramteru novērtēšana	31
4.3. Stacionārā stāvokļa iegūšana	31
4.4. Turpmākie uzdevumi un modeļa uzlabošana	32

SECINĀJUMI	34
PATEICĪBAS	35
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	36
PIELIKUMI	44

IEVADS

Pieaugot vajadzībām pēc pārtikas, atjaunojamās enerģijas un citiem rūpnieciskajiem resursiem, ko iegūst no augiem, rodas nepieciešamība pēc efektīvākām biotehnoloģijas un metaboliskās inženierijas pieejām augu produktivitātes uzlabošanai. Šādiem uzlabojumiem var palīdzēt sistēmbioloģijas un sintētiskās bioloģijas metožu iekļaušana pētījumos, ļaujot samazināt ieguldāmos resursus eksperimentu veikšanai (Zurbriggen et al. 2012).

Interesants mērķis metaboliskajai inženierijai ir dažādu augu īpašību uzlabošana, palielinot noteiktu vielu ražošanu. Rūpnieciski pievilcīgi ir izoprenoīdu prekursoru sintēzes metaboliskie ceļi un to atzarojumu sākumreakcijas, jo izoprenoīdi veido lielāko daļu augu produktu un to prekursori augos tiek sintezēti divos metaboliskajos ceļos (Lipko & Swiezewska 2016). Lielās izoprenoīdu ražošanas jaudas augos ir labs pamats būtisku plūsmu daļu novirzīt rūpnieciskām vajadzībām.

Projekts SMARTPLANTS paredz izveidot kontroles sistēmu metaboliskās inženierijas ceļiem, izmantojot dabisku signālu aktivētus regulatoros tīklus. Viens no šī projekta uzdevumiem ir veikt *in silico* optimizāciju izoprenoīdu ražošanai tāla sīkplikstiņa (*A. thaliana*) lapās. Šajā darbā paveiktais ir pirmais solis šī uzdevuma izpildei projekta ietvaros.

Darba mērķis: Izveidot matemātisku modeli metileritritol fosfāta (MEP) metaboliskajam ceļam un tam sekojošajām izoprenoīdu prekursoru ražošanas reakcijām *A. thaliana*, kas turpmāk būtu pielietojams izoprēna un cis-abienola ražošanas metaboliskās inženierijas priekšlikumu izstrādei.

Darba uzdevumi:

1. Atlasīt nozīmīgākās modelī iekļaujamās reakcijas no MEP metaboliskā ceļa un tā produktu tālākizmantošanas.
2. Apkopot informāciju par iekļauto reakciju kinētiku un apzināt iespējamus inhibitorus un citus ierobežojumus.
3. Izveidot modeli un novērtēt nezināmos enzīmu parametrus izmantojot pieejamos eksperimentālos rezultātus un citus informācijas avotus.
4. Iegūt stabilu modeļa darbību stacionārā stāvoklī ar bioloģiski iespējamām parametru vērtībām.
5. Pārbaudīt modeļa darbību, salīdzinot ar eksperimentāliem datiem par iekļauto metabolītu koncentrācijām un enzīmu plūsmu lielumiem.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Biotehnoloģijas un metaboliskās inženierijas nozīme augos.

Ir sagaidāms, ka globālā populācija pieaugs no 7.6 miljardiem šodien līdz 9.8 miljardiem 2050. gadā, kas ir pieaugums par 29% (worldometers.info 2018). Līdz ar to paredzams pieaugošs pieprasījums pēc pārtikas un citiem resursiem – sagaidāms, ka 2050. gadā būs nepieciešams līdz 85% vairāk primārās produkcijas pārtikas ražošanai, salīdzinot ar 2013. gadu (Long et al. 2015). Tai pat laikā augu biotehnoloģiju jomā kā perspektīvas tiek apskatītas iespējas tos izmantot kā “zaļās rūpnīcas” ilgtspējīgai zālvielū, pigmentu, ķīmikāliju un biodegvielu ražošanai (Dersch et al. 2016).

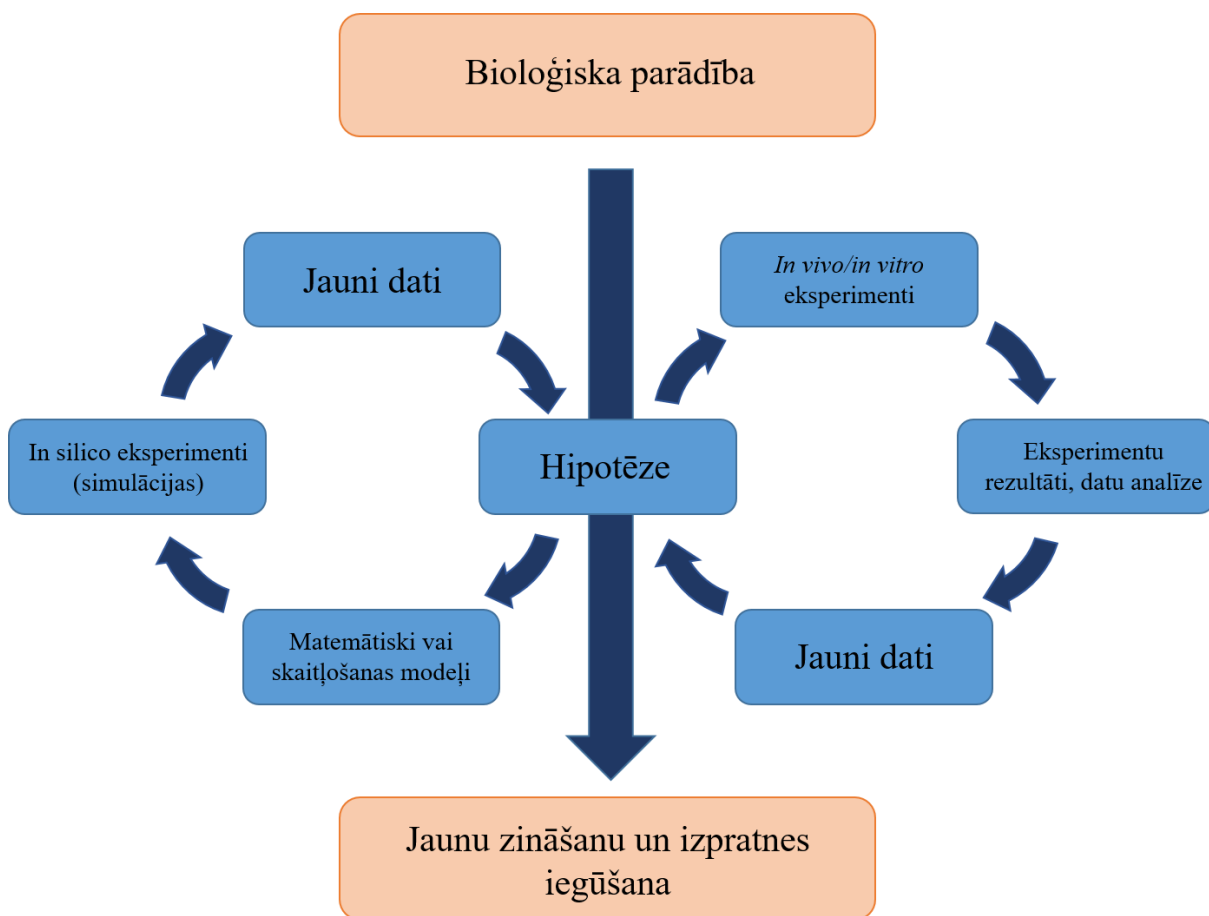
Lai šī dubultā loma pārtikas un biodegvielas/bioķīmisko vielu ražošanā neradītu papildus slodzi jau šobrīd izsīkstošajiem lauksaimniecības zemju resursiem, nākotnē būs nepieciešams ievērojami paaugstināt augu produktivitāti, kā arī, pielāgojoties globālā klimata izmaiņām, uzlabot to izturību pret mainīgiem laikapstākļiem, slimībām un kaitēkļiem (Dersch et al. 2016; Weckwerth 2011). Metaboliskā inženierija dod iespēju sistemātiski un racionāli pielāgot dzīvus organismus dažādu produktu ražošanai, pārekspresējot metabolisko ceļu gēnus, aizvadot blakusproduktus, līdzsvarojošot kofaktorus un palielinot prekursoru daudzumu u.tml. Pēdējos gados CRISPR/Cas9 sistēmas izveidošana vēl vairāk atvieglojusi iespējas pielāgot dažādus organismus kļūšanai par “dzīvajām ražotnēm” (Hansen et al. 2017).

1.2. Sistēmbioloģijas pieeja biotehnoloģijai.

Metaboliskā inženierija, kas saistīta ar produktivitātes palielināšanu un vērtīgu īpašību apvienošanu augos, ir īpašs izaicinājums, jo tajos sastopama, iespējams, augstākā metabolisko tīklu sarežģītība no visiem dzīvajiem organismiem (Lipko and Swiezewska 2016). Tāpēc rīki, kas spēj dot sistēmas līmeņa izpratni par augos notiekošajiem procesiem un to izmainīšanas biotehnoloģiskajām iespējām ir ļoti vērtīgi, lai tuvinātu augu izmantošanu tai, kas sasniegta mikroorganismu izmantošanā industriālai dažādu vielu bioproducēšanai, pateicoties izpratnei par to metabolisma darbību un regulāciju. Svarīgi ir ieviest un optimizēt augos esošos biosintēzes ceļus, tai pat laikā neatņemot oglekļa plūsmu uz augšanai nozīmīgu metabolītu ražošanu, tā kavējot auga normālu augšanu un attīstību. Pieaugot vajadzībai pēc efektīvākiem biosintēzes veidiem, biotehnoloģijas tradicionālās pieejas saskaras ar vairākām problemām: 1) acīmredzamu mērķa gēnu optimizācijai ir maz un ģenētiskas maipulācijas bieži noved pie

nevēlamam un neparedzētiem blakusefektiem sarežģītu genotipa-fenotipa attiecību dēļ (Hansen et al. 2017). 2) izvirzot vairāk potenciāli pārbaudāmos gēnus optimizācijai, parādās kombinatoriskie un resursu ierobežojumi – eksperimentālā ceļā pārbaudīt visas potenciāli derīgās kombinācijas nozīmē lielu resursu un laika patēriņu.

Sistēmbioloģija apvieno kvantitatīvus eksperimentālos datus no kompleksiem molekulāriem tīkliem, piemēram, biokīmija un šūnu bioloģija, ar matemātisku vai skaitļošanas modelēšanu (Hübner et al., 2011). Sistēmbioloģijas skaitļošanas pieejas ietver metabolisko un regulatoro ceļu un tīklu modelēšanu, analīzi un optimizāciju. Pēdējos gados metabolisko tīklu analīze ir daudz attīstījusies, galvenokārt pateicoties genomu sekvenēšanai, kas ļauj rekonstruēt liela mēroga un visa genoma mēroga metaboliskos tīklus. Šobrīd metaboliskos tīklus iespējams ar dažādām metodēm pētīt gan eksperimentāli *in vivo*, gan skaitļojot *in silico*, ļaujot dažādos līmeņos kombinēt abas pieejas, lai palielinātu precizitāti, tīkla izmērus un ticamību utml (Dersch et al. 2016).



1. attēls. Zināšanu uzkrāšana sistēmbioloģijā. Zināšanas par noteiktu bioloģisku parādību tiek veidotas soli pa solim, kombinējot modelēšanas un eksperimentālās tehnikas. Modelis tiek veidots, ļaujot pētniekiem veikt *in silico* eksperimentus, lai paredzētu bioloģiskas sistēmas

uzvedību noteiktos apstākļos. Šīs prognozes savukārt jāapstiprina *in vitro* vai *in vivo* sistēmās, pilnveidojot modeli un tā pamatā esošās hipotēzes (Woelke et al. 2010).

Figure 1. Knowledge generation in system biology. Knowledge on a given biological phenomenon is generated step by step combining modeling and experimental techniques. A model is created to enable the researcher to perform *in silico* experiments in order to predict the behavior of the biological system under given conditions. These predictions have, in turn, to be validated via *in vivo* or *in vitro* systems, further refining the model and the underlying hypothesis (Woelke et al. 2010).

Atkarībā no pētījuma mērķa apskatāmo reakciju skaits variē no dažām reakcijām noteikta metaboliskā ceļa ietvaros līdz vairākiem tūkstošiem reakciju, kas cenšas aprakstīt metabolisma tīklu genoma mērogā vai vismaz pietuvināti tam (Dersch et al. 2016). Sistēmbioloģijas pieeja ļauj izmantot šobrīd plaši iegūtos genomikas, metabolomikas un proteomikas datus, kas paši par sevi ir statistiskas informācijas kopas un nesniedz ieskatu dzīvas šūnas funkcionēšanā, lai atvieglotu hipotēžu izvirzīšanu eksperimentālajā bioloģijā (Rohwer 2012). Veidojot bioloģisku sistēmu modeļus, ar optimizācijas algoritmu palīdzību iespējams izslēgt lielāko daļu neefektīvo vai visticamāk nevēlamas blakusparādības izraisošo variantu, samazinot iespējamo risinājumu skaitu, piemēram, 2500 reizes (Trinh et al. 2008), padarot *in vivo/in vitro* eksperimentus iespējamākus laika un materiālo resursu ziņā.

1.3. Matemātiskā modelēšana un tās pieejas

Modelēšanai ir divas galvenās pieejas – matemātiskā modelēšana, kurā sistēmas elementu uzvedība tiek definēta ar diferenciālvienādojumu palīdzību, un likumos balstīta (*rule based*) modelēšana, kurā sistēmas elementiem tiek noteikti vienkārši uzvedības principi, atkarībā no vides stāvokļa. Salīdzinoši diferenciālos vienādojumus ir vieglāk analizēt, iespējams noteikt parametru jutību un risinājuma sarežģītību. Ir vienkāršāk pielāgot modeļa parametrus, lai pielīdzinātu tā uzvedību eksperimentālajiem datiem, nepieciešamie skaitļošanas resursi ir mazāki. Diferenciālo vienādojumu sistēmām ir arī savi trūkumi – tās ir limitētas konkrētām novērojamām parādībām un homogēnam populācijām un parasti nespēj attēlot pilnu bioloģisko sarežģītības pakāpi (Woelke et al. 2010).

Pēc dažādām pieejām metabolisma matemātiskos modeļus var iedalīt stehiometriskajos un kinētiskajos. Stehiometriskajā modelēšanā katrai modelētajai reakcijai jāspecifizē vairāki raksturlielumi: stehiometrija, iesaistītie kofaktori, termodinamiskās īpašības, piemēram, vai reakcija ir vienvirziena vai atgriezeniska un novietojums šūnā. Šī metode ir labi pielietojama

genoma mēroga modeļiem, lai analizētu iespējamās stacionāros stāvokļus. Kinētiskā modelēšana apvieno strukturālo informāciju par metabolisma ceļiem ar kvantitatīviem enzīmu reakciju ātruma vienādojumiem. Papildus stehiometriskā modelī vajadzīgajai informācijai, tajā nepieciešami dati par enzīmu kinētiku. To priekšrocība savukārt ir iespēja simulēt kvantitatīvas izmaiņas metabolītu koncentrācijās un plūsmās laika gaitā. Tā kā kinētiskajiem modeļiem vajag vairāk detalizētas informācijas, tie pastasti tiek izmantoti atsevišķu metabolisma ceļu modelēšanā, sistēmās līdz dažiem desmitiem reakciju (Dersch et al. 2016; Stalidzans et al. 2018).

Galvenais ierobežojums matemātiskās modelēšanas izmantošanā ir nepieciešamība vienkāršot dabā atrodamo bioloģiskās sarežģītības pakāpi. Tā kā jāreķinās ar ierobežotiem skaitļošanas resursiem un iespēju ieviest lielāku matemātisko kļūdu variāciju kā bioloģiskā, veidojot un analizējot modeli pieņemams vienkāršot un apvienot, piemēram, lineāras reakcijas, kurās plūsma nemainās, lai samazinātu modeļa sarežģītību un izmērus. Tāpat iespējams izlaist reakcijas, kas dod nenozīmīgu pienesumu konkrētā fenotipa veidošanā (Dersch et al. 2016). Tomēr jāsaprot, ka šādi rīkojoties iespējams arī izlaist dabā nozīmīgus regulācijas un pielāgošanās mehānismus, novērtējot tos kā kopskatā nenozīmīgus. Apskatot maza mēroga kinētiskos modeļus, kuros netiek ņemts vērā kofaktoru daudzums un citi kopējo metabolismu ietekmējoši faktori, iespējams pārvērtēt uzlabojumus auga produktivitātē, kādus nestu konkrētu enzīmu daudzuma palielināšana vai samazināšana.

1.4. *A. thaliana*

A. thaliana ir krustziežu dzimtas augs, kas ir populārākais augu modeļorganisms. Tam ir īss dzīves cikls un relatīvi mazs genoms sarežģītam daudzšūnu eikariotam. *A. thaliana* bija pirmais augs, kura genoms ticis pilnība sekvenēts (The Arabidopsis Genome Initiative 2000). Šo iemeslu rezultātā pieejams salīdzinoši daudz informācijas par *A. thaliana* genomu, metabolomu un citiem augšanas parametriem, ļaujot to vieglāk izmantot sistēmbioloģijas pieejām, kas balstās uz iepriekšzināmo informāciju. Pieejami arī vairāki tiešsaistes resursi, kuru mērķis ir apkopot un sistematizēt informāciju par *A. thaliana*, piemēram, TAIR (pieejama www.arabidopsis.org) (Huala 2001) un AtIPD (pieejama www.atipd.ethz.ch) (Vranová et al. 2011). *A. thaliana* jau iepriekš apskatīts kā modeļorganisms izoprēna bioloģisko funkciju izpētei augos, ievietojot tajā pelēcīgās apses (*Populus x canescens*) izoprēna sintāzes gēnu (Loivamäki et al. 2007).

1.5. Izoprenoīdi

Izoprenoīdi jeb terpenoīdi ir lielākā, kā arī funkcionāli un strukturāli daudzveidīgākā augu produktu klase, kas ietver vairāk kā 50000 identificētas molekulas augstākajos augos (Ghirardo et al. 2014; Vranová et al. 2013) un sastāv no izoprēna vienībām. Nosaukums izoprenoīdi lietots tāpēc, ka daudzas no šīm vielām sabrūk, veidojot piecus oglekļus saturošu gāzi – izoprēnu. Izoprenoīdi augos veic dažādas nozīmīgas funkcijas: liela daļa no tiem piedalās fotozintēzes procesos (Malkin & Niyogi 2000 cit. pēc Vranová et al. 2013); liela daļa izoprenoīdus ražojošās plūsmas veido membrānu steorlu lipīdus – augstākie augi sintezē kompleksu sterolu lipīdu maisījumu, zināmu, kā fitosterolus (Boutté & Grebe 2009); no astoņiem galvenajiem augu hormoniem pieci tiek pilnībā vai daļēji sintezēti no izoprenoīdiem – abcīzskābe, brasinosteroīdi, citokinīni, gibberelīnskābe un strigolaktoni- (Santner et al. 2009); faranesildifosfāts (FPP) un geranilgeranildifosfāts (GGPP) piedalās proteīnu prenilēšanā, kas ir nozīmīga vairākiem attīstības procesiem augos; kā specializēti metabolīti izoprenoīdi piedalās alelopātijā un augu-patogēnu mijiedarbībā, tāpat daudzi izoprenoīdu produkti ir ekonomiski nozīmīgi gumijas, zāļvielu, garšvielu, smaržvielu, pigmentu, agroķīmijas un dezinfekcijas līdzekļu ražošanā (Ghirardo et al. 2014; Vranová et al. 2013).

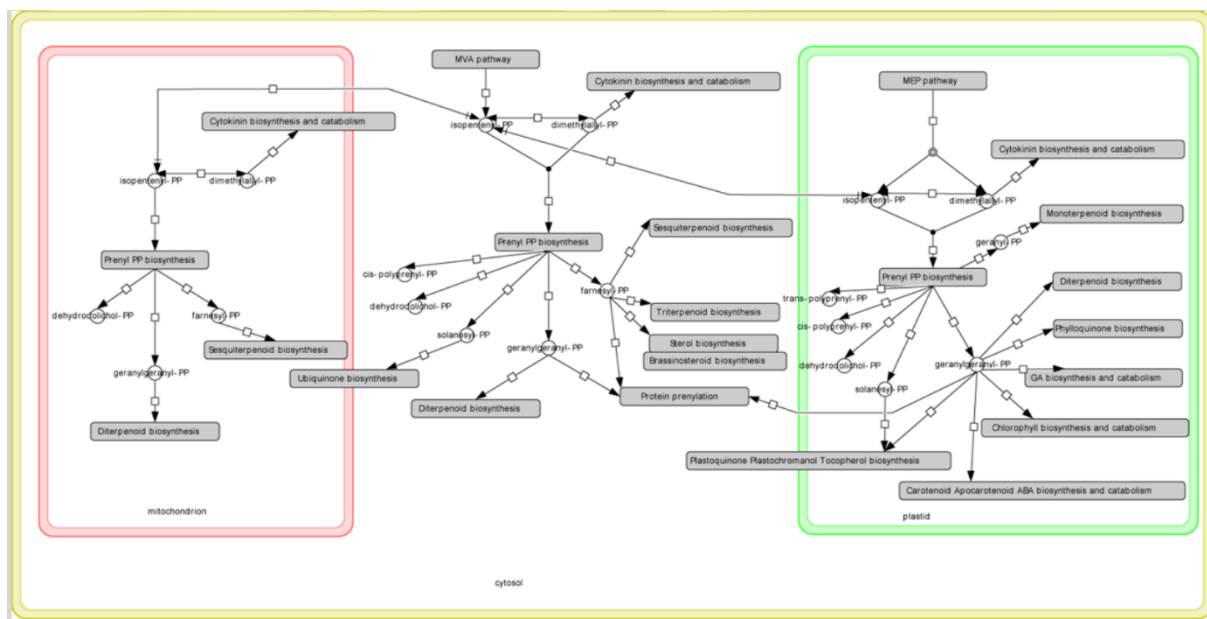
Izoprenoīdu biosintēzi var iedalīt četros solos: 1) Pamata 5C vienību – IPP un DMAPP – sintēze; 2) IPP un DMAPP kondensēšana preniltransferāžu darbības rezultātā, veidojot izoprenoīdu prekursorus, kā GPP un FPP; 3) Terpēnu sintāžu katalizēta prekursoru pārveidošana izoprenoīdu produktu vecākstruktūrās 4) Izoprenoīdu skeletu modifikācija, ieviešot strukturālu daudzveidību.

Augstākajos augos pastāv divi metaboliskie ceļi izoprenoīdu pamatā esošo 5C vienību – IPP un DMAPP - ražošanai. Citosolā esošais MVA (mevalonāta) ceļš, kas sākas ar acetil-CoA, un plastīdās esošais MEP ceļš, kas sākas ar GAP un piruvātu (Lichtenthaler et al. 1997). MVA ceļā saražotie IPP un DMAPP veido sterolu un ubikvīnona sānu ķēžu prekursorus, savukārt MEP ceļā tiek ražoti karotenoīdi, izoprēns, hlorofilu un plastokvīnonu sānu ķēdes. Eksperimentos ar MEP ceļa gēnu represēšanu veidojas augi ar albīnu fenotipu, norādot uz šī ceļa nozīmīgumu hlorofilu un karotenoīdu sintēzē (Bowsher et al. 2008). Divu izoprenoīdu prekursoru producēšanas ceļu esamība atšķir augstākos augus no lielas daļas organism, kas izmanto tikai vienu no šiem ceļiem. Izmantojot abus ceļus un tos telpiski atdalot, augi ir optimizējuši izoprenoīdu biosintēzi un regulāciju attiecībā uz fiksētā oglekļa un ATP pieejamību, kā arī palīdz atdalīt izoprenoīdu sintēzi dažādām funkcijām – piemēram, hlorofila un fitosterolu sintēzi (Vranová et al. 2013).

Lai gan MEP un MVA metabolisma ceļi ir atdalīti telpiski un ražo dažādas izoprenoīdu grupas, starp tiem novērota mijiedarbība iezīmēšanas pētījumos, kā arī apstrādājot augus ar MEP vai MVA metabolisko ceļu inhibitoriem. Iezīmējot viena ceļa substrātus ar ^{14}C iezīmi, tā nelielos daudzumos novērtota otra ceļa produktos (Flügge & Gao 2005a). Tāpat kavējot viena vai otra ceļa darbību ar inhibitoriem kā fosmidomicīns (MEP) un lovastatīns (MVA) novērots, ka attiecīgo galaproduktu daudzums samazinās, bet pilnīgi nepazūd – šķietami norādot, ka dažādu izoprenoīdu galaproduktu grupu ražošanai nepieciešamos prekursorus iespējams transportēt starp plastīdu un citosolu, kompensējot otra sintēzes ceļa trūkumu (Laule et al. 2003). Tomēr tā kā šī kompensācija viena vai otra ceļa deficītos mutantos ir relatīvi niecīga un nespēj uzturēt vajadzīgo produktu sintēzi, veidojot albīnus vai sterilus mutantus, iespējams to varētu izskaidrot ar IPP noplūdi no citosola plazmīdās vai ļoti limitētu transportu, vai tālākiem izoprenoīdu sintēzes soļiem nepieciešamo enzīmu atrašanos abos šūnas nodalījumos, nevis aktīvu līdzsvara uzturēšanas un kompensēšanas mehānismu (Vranová et al. 2013). Zināms, ka DXP var tikt transportēts no citosola plastīdā ar neorganiskā fosfāta apmaiņu, HMBPP transports starp abiem nodalījumiem nav novērojams, kamēr IPP tiek transportēts plastīdās (Flügge & Gao 2005b). Konkrēti transportieri IPP un citu iespējams starp ceļiem migrējošu metabolītu transportam starp citosolu un plastīdu, kā arī to potenciālie darbības mehānismi pagaidām nav atklāti (Pick & Weber 2014; Vranov et al. 2013).

Izoprenoīdu sintēzes ceļu plūsmas regulācija notiek gan transkripcijas, gan pēctranskripcijas līmenī, nozīmīgākajam ārējam faktoram, kas ietekmē attiecīgo enzīmu daudzumu un plūsmu caur IPP un DMAPP sintēzes ceļiem, esot gaismai (Pokhilko et al. 2015; Vranová et al. 2013). Plūsmu caur MEP ceļu ietekmē arī temperatūra un CO_2 pieejamība (Ghirardo et al. 2014).

AtIPD (pieejama www.atipd.ethz.ch) (Vranová et al. 2011) ir manuāli pārraudzīta datubāze, kas sniedz pieeju *A. Thaliana* izoprenoīdu sintēzes ceļiem un gēniem, kā arī ļauj vizualizēt metabolisko ceļu topoloģiju. (2. attēls)

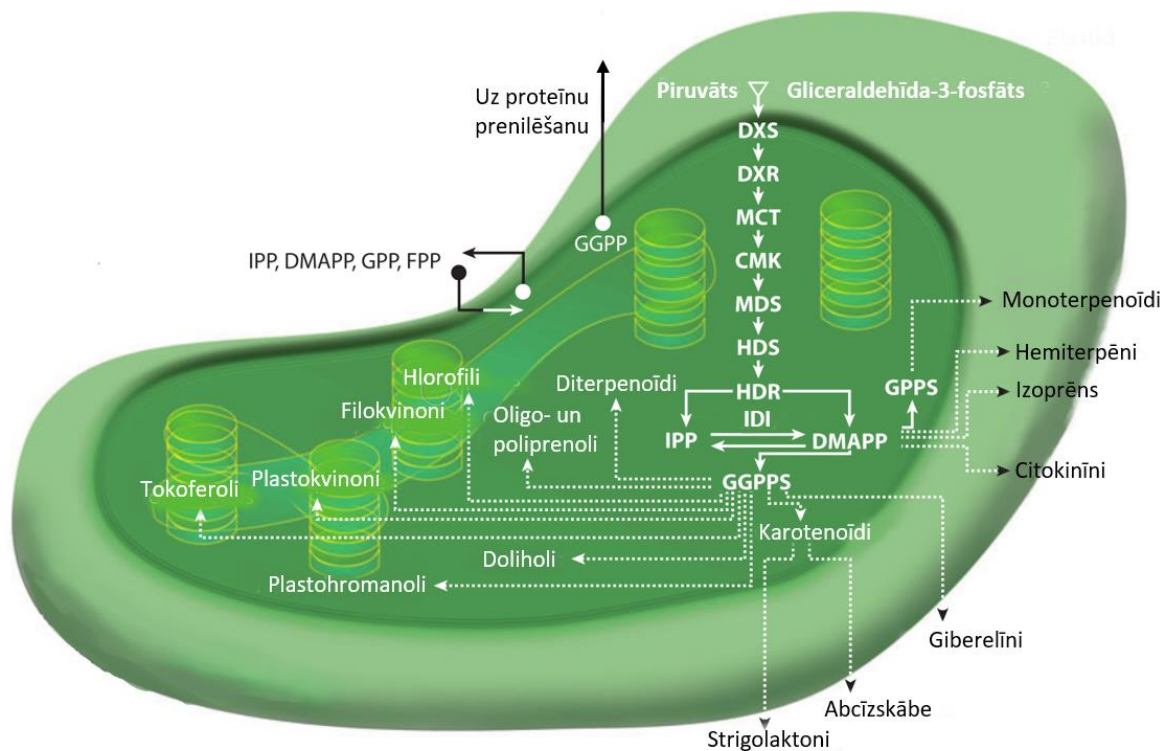


2. attēls. Pārskats par izoprenoīdu biosintēzes ceļu topoloģiju *A. thaliana* šūnā. Iekļauti vairāki nodalījumi – šūnas citosols (ar dzeltenu kontūru), mitochondriji (ar sarkanu kontūru) un hloroplasti (ar zaļu kontūru). Ekrānkopija no atipd.ethz.ch

Figure 2. Overview of isoprenoid biosynthetic pathway topology in *A. thaliana* cell. Multiple compartments are shown – cell cytosol (yellow outline), mitochondria (red outline), chloroplasts (green outline). A screenshot from atipd.ethz.ch

1.5.1. MEP metaboliskais ceļš

Dažādos literatūras avotos šo metabolisma ceļu mēdz saukt arī par ne-mevalonāta, DOXP vai DXP ceļu, tāpat arī daudziem gēniem, enzīmiem un metabolītiem ir alternatīvi nosaukumi. MEP metaboliskā ceļa pirmais enzīms ir 1-deoksi-ksilulozes-5-fosfāta sintāze (DXS; EC 2.2.1.7), kas kondensē no piruvāta atvasināto hidroksietiltiamīnu un D-gliceraldehīda-3-fosfāta (GAP) C1 aldehīda grupu, izdalot CO₂, un ir vienvirziena reakcija, kas novirza oglekli MEP ceļā (Vranová et al. 2013). Ceļa lineārās daļas beidzamā reakcija ir hidroksimetilbutenildifosfāta reduktāzes (HDR) katalizētā HMBPP sadalīšana IPP un DMAPP, kurā IPP tiek producēts pārākumā par DMAPP - ar attiecību 5:1 (Rohdich et al. 2001) vai 6:1 (Bowsher et al. 2008). MEP ceļa shematiskais attēlojums un tā galaprodukti redzami 3. attēlā. DMAPP tiek tiešā veidā izmantots citokīnu un hemiterpēnu sintēzei, kā arī izoprēna sintēzei augos, kas to izdala (Vranová et al. 2013).



3. attēls. MEP metaboliskais ceļš hloroplastos un tā galvenās produktu grupas (Vranova et al 2013).

Figure 3. MEP pathway in chloroplasts and its main product groups (Vranova et al 2013).

Ļoti maz datu ir pieejami par lielāko daļu MEP ceļa produktu un starpproduktu saistībā ar to kinētiku dažādos diennakts laikos, īpaši augos, kas neizdala gaistošas vielas lielos daudzumos, tai skaitā *A. thaliana*. Mazā metabolisko un kinētisko datu pieejamība pamatā skaidrojama ar tehniskajām grūtībām MEP ceļa produktu mērīšanā, kam nepieciešama masas spektrometrija un citas augstas izšķirtspējas tehnikas (Pokhilko et al. 2015).

1.5.2. Prenildifosfātu biosintēze

No IPP un DMAPP tālāksintezētie prenildifosfāti – geranildifosfāts (GPP), faranesildifosfāts (FPP) un geranilgeranildifosfāts (GGPP) - ir sazarojuma punkti tālākai visu izoprenoīdu galaproduktu sintēzei. *A. thaliana* plastīdās tiek sintezēts GPP un GGPP, kamēr FPP pamatā tiek sintezēts citosolā un mitohondrijos (Vranová et al. 2013).

Faranesila difosfāta sintēzes (FPS) sintēzē FPP divos diskrētos soļos – vispirms no DAMPP un IPP veidojot starpproduktu GPP; tas paliek piesaistīts enzīmam, reaģē ar vēl vienu IPP un veido FPP. Analogi geranilgeranildifosfāta sintēze (GGPPS) katalizē visus trīs

GGPP sintēzes soļus (Heldt & Heldt 2005). Lai gan abi enzīmi var piesaistīt un izmantot arī iepriekšējā enzīma produktus. Šis process iespējams ir nozīmīgs attiecīgo enzīmu kinētikas modelēšanai, lai gan literatūrā nav atrodami konsekventi dati par to, cik liela afinitāte FPS un GGPPS ir pret dažādiem produktiem, līdz ar to arī grūti izsvērt, cik daudz procentuāli tiek izmantots viens vai otrs produkts.

1.5.3. Izoprēns

Izoprēns ir gaistošs augu lapās ražots produkts, kas veidojas ar vienu enzimatisku soli no DMAPP (Pokhilko et al. 2015). Eksperimentos parādīts, ka izoprēna biosintēze ir atkarīga no IPP izomerāzes (EC 5.3.3.2) un izoprēna sintāzes (EC 5.3.3.2) aktivitātes, kā arī izoprēna sintāzes (ISPS) substrāta – DMAPP – daudzuma. Izoprēnu producējošos augos tas ir viens no galvenajiem MEP metaboliskajā ceļā novadītās oglekļa plūsmas patēriņa avots (Ghirardo et al. 2014). Eksperimentos ar izoprēnu dabiski producējošām apsēm un to neproducējošiem variantiem parādīts, ka plūsma MEP ceļā, pazūdot izoprēna produkcijai, samazinās līdz septiņām reizēm. Izslēdzot izoprēna sintēzi, palielinās DMAPP un IPP koncentrācija, kas savukārt mazina DXS aktivitāti un līdz ar to plūsmu visā ceļā. Otra plūsmas izmaiņa izoprēnu neproducējošos augos - lielāka tās daļa tiek novirzīta karotenoīdu un hlorofilu sintēzei (Banerjee & Sharkey 2014; Ghirardo et al. 2014).

Novērots, ka augstas temperatūras inducē izoprēna sintāzes ekspresiju un tālāka izoprēna atbrīvošana atmosfērā palīdz augus dzesēt iztvaikojot – process ir līdzīgs transpirācijas dzesēšanai, bet bez dehidratācijas riska. Šādam augu karstuma noturības risinājumam ir arī negatīvā puse – izoprēns atmosfērā tiek oksidēts par hidroperoksīdiem, kas reaģējot ar slāpekļa oksīdiem rezultējas papildus ozona ražošanā (Bowsher et al. 2008; Sharkey et al. 2008), kā arī palielina metāna dzīvildzi atmosfērā un piedalās sekundāro organisko aerosolu veidošanā (Ghirardo et al. 2014). Apses un citi augi, kas dabā izdala izoprēnu, to dara dienas laikā paralēli no gaismas atkarīgajai DMAPP akumulācijai (Pokhilko et al. 2015).

1.5.4. Cis-abienols

Cis-abienols ir izoprenoīdu molekula, kas tiek prodēta divos enzimatiskos soļos no GPP vai FPP. Kā ķīmiska viela tas pētīts kopš 19. gadsimta un tā galvenā komerciālā nozīme ir izmantošana parfimērijā ambroksīda (Ambrox®) ražošanai, kas ir nozīmīgākais ambras aizvietotājs (Barrero et al. 1993). Ambra ir izsenis parfimērijā lietota pamatsmaržviela un zināma kā viens no labākajiem smaržu fiksatoriem, savukārt tās alternatīvu sintēze ir

nozīmīga, jo ambru iegūst no kašalotu zarnās esošām vielām, tās nogatavinot (Clarke 2002). Lai gan tās iegūšana noteiktos daudzumos iespējama arī nekaitējot šiem aizsargājamajiem dzīvniekiem, ievērojamā cena padara to pievilcīgu malumedniekiem. Dabīgi industrijai nozīmīgos apmēros cis-abienolu ražo tikai balzāma baltegle (*Abies balsamea*) (Gray & Mills 1964), kā arī dažī ziedaugi – tabakas (*Nicotiana tabacum*) trihomi un *Polymnia sonchifolia* sakņu bubmuļi, tāpēc aktuālas biotehnoloģijas un metaboliskās inženierijas pieejas cis-abienola ražošanai mikroorganismos un citos augos. Veikti pētījumi, lai atklātu cis-abienola ražošanas enzimatisko mašīnēriju un ievietotu to citos organismos (Zerbe et al. 2012).

1.6. Līdzšinējie MEP metaboliskā ceļa modeļi augos

Iepriekš veidoti MEP ceļa matemātiskie modeļi ēterisko eļļu produkcijas optimizēšanai piparmētras (*Mentha × piperita*) trihomos (Rios-Esteva et al. 2010) un MEP ceļa regulācijas dažādos diennakts laikos izprašanai (Pokhilko et al. 2015). Pokhilko veidotais modelis balstās uz agrāko modeli piparmētrās, pielāgojot to *A. thaliana* un pievienojot vairākus regulācijas līmeņus – no dienasgaismas atkarīgo fotozintēzē ražotā substrāta pieejamību, gēnu ekspresijas regulāciju un MEP ceļa starpproduktu inhibitoro efektu uz MEP ceļa sākumpozma enzīmiem. Tajā apskatīts arī MEP ceļa apakšmodelis bez pievienotiem regulācijas līmeņiem, ļaujot salīdzināt to uzvedību atkarībā no abstrakcijas pakāpes.

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.3. Izmantotās datorprogrammas

2.3.1. COPASI

COPASI (Hoops et al. 2006) ir modelēšanas un simulāciju veidošanas vide. Tā ir platformneatkarīga atvērta koda programmatūra un pieejama zem *Artistic License 2.0*, kas atļauj to izmantot jebkuram mērķim. COPASI modeļi tiek ievadīti (bio)ķīmiskos terminos - (bio)ķīmiskas vienības, parasti molekulas, (*species*), kas novietojas vienā vai vairākos nodalījumos (*compartments*), var tikt pārveidotas reakciju (*reactions*) rezultātā. Katras reakcijas norises ātrums tiek aprakstīts ar kinētisku reakcijas ātruma vienādojumu, kas var tikt vai nu izvēlēts no iekļautās datu bāzes vai brīvi definēts. No šī formulējuma COPASI automātiski iegūst modeļa matemātisko attēlojumu, atbrīvojot lietotājus no vajadzības diferenciālvienādojumus specificēt pašiem. Programma ļauj simulēt modeļa darbību laika gaitā (*time course simulations*), kā arī piedāvā dažādus analītiskos uzdevumus parametru precizēšanai un modeļa optimizācijai. Iekļauto analītisko uzdevumu rezultātu attēlošanai pieejami vairāki grafiku veidi (Bergmann et al. 2017).

2.4. Izmantotās datubāzes

Enzīmu kinētisko parametru un reakciju norises meklēšanai izmantotas sekojošas datubāzes: BRENDA (pieejama www.brenda-enzymes.org) (Placzek et al. 2017), UniProt (pieejama www.uniprot.org) (Bateman et al. 2017) un MetaCyc (pieejama www.metacyc.org) (Caspi et al. 2016).

2.5. Modeļa struktūra

Visas modelī iekļautās reakcijas norisinās vienā nodalījumā. Nodalījuma tilpums definēts kā 1 ml aprēķinu vienkāršošanai, kas attiecīgi apsakta reakciju summu vairākos desmitos hloroplastu.

Modelī izmantotās mērvienības: laiks – s; tilpums – mL; daudzums – nmol.

Visi literatūrā atrastie dati tika pārveidoti uz attiecīgajām mērvienībām, nepieciešamības gadījumā izmantojot arī datus par *A. thaliana* sausnes daudzumu un plastīdu proporciju lapā – izmantotie lielumi apkopoti 1. tabulā.

1. tabula

Mērvienību salāgošanā izmantotie *A. thaliana* parametri.

Table 1

A. thaliana parameters used in unit conversions.

Parametrs	Vērtība	Atsauce
Sausnes daudzums	8.44% ±0.18%	Vidējā vērtība no (Cross et al. 2006; Yang et al. 2016)
Plastīdu proporcija lapā	25.4%	(Winter et al. 1994)

Sākotnējais MEP ceļa modelis no pirmās līdz devītajai reakcijai (GPPS 2.5.1.1) balstās uz MEP ceļa modeļiem piparmētrām (Rios-Esteva et al. 2010) un *A. thaliana* (Pokhilko et al. 2015). Pārējo reakciju izvēle un iekļaušana modelī aprakstīta rezultātu sekcijā.

Modelī iekļautas Pokhilko et al. modelī aprēķinātās enzīmu koncentrācijas (2. tabula) tiešā veidā vai arī izmantotas reakciju maksimālā ātruma aprēķināšanai atkarībā no vajadzīgā lieluma reakciju vienādojumos. Tāpat kā metabolītu koncentrāciju sākotnējās vērtības iekļautas šai pašā modelī iegūtās koncentrācijas (3. tabula).

2. tabula.

Enzīmu un metabolītu koncentrācijas pilnā MEP ceļa modelī ar pārveidotām vienībām no Pokhilko et al. 2015.

Table 2

Enzyme and metabolite levels in the full MEP pathway model in converted units from Pokhilko et al 2015.

Enzīms	DXS	DXR	MCT	CMK	MDS	HDS	HDR	IDI
nmol/mL	0.63	0.08	0.5	2	1	1.2	0.25	0.8
Metabolīts	DXP	MEP	CDPME	CDPMEP	MecPP	HMBPP	DMAPP	IPP
nmol/mL	0.99	8.13×10^{-2}	0.11	0.15	2.19	5.08×10^{-2}	0.99	0.50

Galējā modelī iekļautas 19 reakcijas un 20 metabolīti, kas apkopoti tabulās 2. un 3. pielikumā.

2.6. Nezināmo parametru novērtēšana

Literatūrā neaprašīto kinētisko parametru novērtēšanai tika izmantota COPASI analītiskā funkcija *Parameter Estimation* (PE) ar daļiņu spieta optimizācijas (particle swarm optimisation) metodi (Kennedy and Eberhart 1995). Metodei izmantoti standarta iestatījumi, izņemot atkārtojumu robežu – maksimālo atkārtojumu skaitu, ko tā veiks – tā no 2000 mainīta uz 20000.

PE mainot izvēlētos parametrus norādītās robežās cenšas pielāgot modeļa laika simulācijas vai stacionārā stāvokļa uzvedību ievadītajiem eksperimenta datiem. Labākā saderība tiek meklēta optimizācijas algoritmam cenšoties minimizēt optimizācijas kritērija – svērtās kvadrātisko kļūdu summas – vērtību (OKV).

Daļiņu spieta optimizācija ir stohastiskās globālās optimizācijas algoritms, kura pamatā ir spietošanas uzvedība, piemēram, kukaiņu, putnu vai zivju barā, meklējot barību. Spiets sastāv no daļiņām, kam ir novietojums un ātrums daudzdimensiju telpā. Tās virzās cauri telpai izmantojot divus galvenos pamatojumus lēmumu pieņemšanai – atmiņu par savu labāko novietojumu un informāciju par kaimiņdaļiņas labāko novietojumu. Spietam komunicējot savā starpā labākos novietojumus, katra daļiņa pielāgo savu novietojumu un ātrumu, lai nonāktu vislabākajās vietās.

Parametru novērtēšanā tika pielāgoti 42 kinētiskie parametri, kas apkopoti 4. pielikumā. Norādītas arī robežas, kurās šiem parametriem tika ļauts mainīties, lai pielāgotu modeļa uzvedību eksperimentālajiem datiem. Tika noteikts papildu ierobežojums, ka plūsmu vērtības caur enzīmiem nevar būt negatīvas, izņemot IDI (8. reakcija) gadījumā.

Eksperimentālo datu izvēle aprakstīta rezultātu sekcijā.

Parametru novērtēšana tika veikta divās modeļa kopijās paralēli, lai varētu slīdzināt abu parametru novērtēšanas procesu dinamiku, saglabājot parametru uzlabojumus versijā, kas sasniedz mazāko OKV (Elsts et al. 2017).

2.7. Stacionārā stāvokļa iegūšana

Modeļa stacionārā stāvokļa atrašanai tika izmantota COPASI analītiskā funkcija *Steady state*. Par stacionāro stāvokli tiek uzskatīta modeļa uzvedība, kad stāvokļa mainīgie, piemēram, vielu koncentrācijas kļūst laikā nemainīgas. Matemātiski šis stāvoklis izpaužas pielīdzinot nullei diferenciālvienādojumus, kas apraksta metaboliskās sistēmas attīstību laikā. Šādi izveidoto nelineāru vienādojumu sistēmu COPASI risina izmantojot vairākas metodes –

Ņūtona metodi, integrēšanu un atpakaļgaitas integrēšanu. Šī modeļa stacionārā stāvokļa iegūšanai izmanota visu metožu kombinācija.

2.8. Parametru jutības analīze

Izmantojot COPASI analītisko funkciju *Sensitivities* tika noteikta reakcijās mainīgo metabolītu koncentrāciju vērtību jutība pret nelielām izmaiņām reakciju kinētisko parametru vērtībās stacionārā stāvoklī.

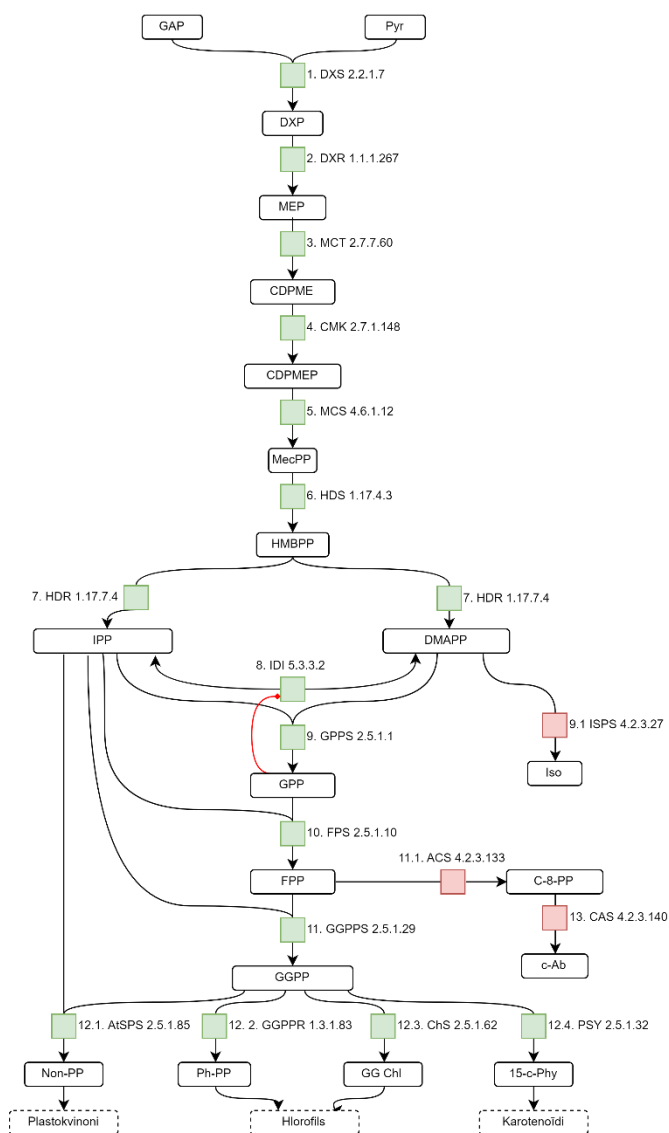
2.9. Modeļa uzvedības un parametru vērtību uzlabošana

Balstoties uz parametru jutības analīzē atrastajām ietekmīgajām parametru vērtībām tika pielāgotas attiecīgās PE robežvērtības, sašaurinot intervālu, kurā tās var mainīties. Tika atkārtota parametru novērtēšana jaunajos intervālos, atrasts un atjaunināts stacionārais stāvoklis un atkārtoti pārbaudīta parametru jutība. Attiecīgās darbības tika secīgi atkārtotas, lai uzlabotu analītisko funkciju rezultātus un tuvinātu modeļa parametru vērtības bioloģiski iespējamām.

3. REZULTĀTI

3.1. Modeļa uzbūve un parametru izvēle

Darba ietvaros izveidots MEP metaboliskā ceļa modelis WT *A. thaliana*, kas ietver 19 reakcijas un 20 metabolītus (4. attēls).



4. attēls. MEP metaboliskā ceļa modeļa shematisks attēlojums. Bultas norāda galveno ogekļa plūsmas virzienu reakcijās; baltajos taisnstūros norādīti metabolīti; ar raustītu līniju atzīmētajos taisnstūros norādīti modeļa atzarojumu galaprodukti; ar kvadrātiem apzīmēti reakcijas katalizējošie enzīmi, tiem blakus - reakcijas numurs modelī, enzīma nosaukuma saīsinājums modelī un EC numurs. Ar zaļu krāsu atzīmēti aktīvie enzīmi WT modelī, ar sarkanu – enzīmi, kas nav aktīvi WT augā. Attēla palielināta versija atrodama 1. pielikumā. Attēlā izmantoto saīsinājumu pilni atšifrējumi atrodami 2. (metabolītiem) un 3. (enzīmiem) pielikumā.

Figure 4. A schematic overview of the MEP pathway model. The arrows show the main direction of the carbon flux in reactions; white rectangles contain metabolites; the rectangles with dashed edges show the end products of main branches; squares show enzymes participating in reactions, next to them – reaction ID in model, enzyme abbreviation and EC number. Reactions active in WT model are coloured green, inactive ones – in red. Full version of the figure is added in 1st attachment. The full versions of abbreviations used in the figure are found in 2nd attachment for metabolites and 3rd attachment for enzymes.

Papildus MEP ceļa reakcijām no iepriekšējiem modeļiem (1.-9. reakcija), tika iekļautas vēl divas prenildifosfātu biosintēzes reakcijas FPS (EC 2.5.1.10) un GGPPS (EC 2.5.1.29). Tika pievienots enzimatiskais solis izoprēna sintēzei - 9.1 reakcija izoprēna sintāzei (EC 4.2.3.27) pārvēršot DMAPP par izoprēnu. Tāpat divi enzimatiski soļi cis-abienola sintēzei – alfa kopaēna sintāzei (EC 4.2.3.133) pārvēršot FPP kopalola difosfātā un cis-abienola sintāzei (EC 4.2.3.140), kas pārvērš kopalola difosfātu cis abienolā. Personīgā komunikācijā ar Prof. Alain Tissier un Dr. Tom Schreiber (Leibniz Augu Biotehnoloģijas Institūts, Halle, Vācija) projekta SMARTPLANTS realizācijas ietvaros tika izvēlētas vairākas plūsmas auga pamatmetabolisma saglabāšanai, lai vēlākos optimizācijas soļos izoprēna un cis-abienola sintēze modelī netiktu palielināta uz auga pamatfunkcijām nozīmīgu metabolītu sintēzes trūkuma rēķina. Šim mērķim modelī iekļauti atzarojumi uz plastokvinonu, hlorofila un karotenoīdu sintēzi, ievieojot katra atbilstošā ceļa pirmo enzīmu: plastokvinonu sintēzei al-trans-nonaprenildifosfāta sintāzi (EC 2.5.1.85), kas pārvērš IPP un GGPP nonaprenildifosfātā, hlorofila sintēzei geranilgeranildifosfāta reduktāzi (EC 1.3.1.83), kas pārvērš GGPP fitildifosfātā, un hlorofila sintāze (EC 2.5.1.62), kas pārvērš GGPP geranilgeranilhlorofilā (GG hlorofils), karotenoīdu sintēzei 15-cis-fitoēna sintāzi (EC 2.5.1.32), kas pārvērš GGPP 15-cis-fitoēnā.

Modelī izmantotās reakcijas detalizēti aprakstītas 3. pielikumā. Papildus pievienoto reakciju parametru noskaidrošanai un iepriekšējos modeļos izmantoto parametru vērtību apstiprināšanai tika izmantota datubāzēs pieejamā informācija. No augstākās uz zemāko prioritāti tika izmantoti dati no: 1) *A. thaliana*, 2) citiem krustziežu dzimtas augiem, 3) citiem lakstaugiem, 4) citiem augiem, 5) citiem organismiem, kam enzīma optimālā temperatūra un pH aprakstīts līdzīgs *A. thaliana* (pH = 8 (Kunz et al. 2014)). Sākotnēji zināmie enzīmu kinētikas dati un to avoti apkopoti 5. pielikumā.

3.2. Modelī izmantoto vienādojumu izvēle

Tā kā tika atrasts maz literatūras datu par modelī izmantoto enzīmu darbības mehānismiem, tika pieņemts, ka to katalizētās reakcijas varētu būt atgriezeniskas. Šādi iespējams izvairīties no iespējamās modeļa ierobežošanas, neņemot vērā produktu koncentrācijas ietekmi uz enzīma darbību starpproduktu uzkrāšanās gadījumā, kā arī kompensēt citus iespējams nezināmos regulēšanas mehānismus. Tā kā modeļi, uz kuriem tika balstīta darbā veidotā modeļa struktūra, izmanto vienvirziena reakcijas ar Mihaelisa-Mentenē kinētiku, tika nolemts mainīt reakciju vienādojumus, iekļaujot līdzsvara konstantes.

Gala modelim tika izveidoti trīs vienādojumu veidi – Uni-Uni, Bi-Uni un izomerāzes vienādojums (J. Rohwer pers. comm.). Pirmajā reakcijā, ko katalizē DXS enzīms, tika sagalabāts iepriekšējos modeļos izmantotais vienādojums (1) – tā kā tas determinēti novada oglekļa plūsmu uz MEP ceļu, tam nav nepieciešams atgriezeniskums.

$$A + B \rightarrow C$$

$$v = k * \frac{k_{cat} * E * S_a * S_b}{K_I * K_{mb} + K_{ma} * S_a + K_{mb} * S_b + S_a * S_b} \quad (1)$$

Uni-Uni vienādojumi (2) izmantoti reakcijās, kam ir viens substrāts un viens produkts.

$$A \rightleftharpoons B$$

$$v = k * \frac{V_f * \left(S - \frac{P}{K_{eq}}\right)}{S + K_{ma} * \left(1 + \frac{P}{K_{mb}}\right)} \quad (2)$$

Bi-Uni vienādojumi (3) izmantoti reakcijās, kur ir viens substrāts un vairāki produkti.

$$A + B \rightleftharpoons C$$

$$v = k * \frac{\frac{V_f}{K_{ma} * K_{mb}} \left(S_a * S_b - \frac{P}{K_{eq}}\right)}{\left(1 + \frac{S_a}{K_{ma}}\right) \left(1 + \frac{S_b}{K_{mb}}\right) + \frac{P}{K_{mc}}} \quad (3)$$

Izomerāzes vienādojums (4) apraksta IDI darbību, iekļaujot arī GPP inhibējošo ietekmi.

$$A \rightleftharpoons B$$

$$v = k * \frac{V_f * \left(S + \frac{P}{K_{eq}}\right)}{S + K_{ma} + P + K_{mb} + \frac{I}{K_I}} \quad (4)$$

Vienādojumos lietotie apzīmējumi:

k – optimizācijas koeficients

V_f – Maksimālais tiešās reakcijas ātrums

S – substrāta koncentrācija, indeksi a un b norāda attiecīgo substrātu

P - produkta koncentrācija;

K_{eq} – līdzsvara konstante;

K_m – Mihaelisa-Mentenē konstante, indeksi a , b un c norāda attiecīgo substrātu vai produktu;

I – inhibitora koncentrācija;

K_I – inhibīcijas konstante.

Visiem vienādojumiem tika pievienots mainīgais k , kas tiks izmantots vēlākā darbā ar modeli tā optimizācijai projekta SMARTPLANTS ietvaros, lai parādītu vajadzīgās enzīmu koncentrācijas izmaiņas. WT modelī visos vienādojumos k fiksēts kā 1.

Lai pārlicinātos par mainīto vienādojumu piemērotību tika pārbaudīta modeļa lineārā daļa (1.-7. reakcija), kuras darbību iespējams salīdzināt ar iepriekš veidotajiem modeļiem. Tika iegūts stacionārs stāvoklis, kas atbilst eksperimentālajiem datiem par DXS plūsmu, DXP un MecPP koncentrācijām kas apstiprināja, ka vienādojumu izmaiņas saglabā modeļa darbību.

Lai panāktu maksimālu produktu prekursoru aizvadīšanu 12.1, 12.2 un 12.4 reakcijās, ņemot vērā, ka arī to kinētiskie parametri nav zināmi no literatūras datiem, šīm reakcijām tika maksimizēts reakcijas ātrums (J. Rohwer pers. comm.). Tas izdarīts, palielinot K_m atgriezeniskajai reakcijai ($K_{mp}=100$ nmol/mL) un reakcijas ātrumu tiešajai reakcijai ($V_f=10000$ nmol \times mL $^{-1}\times$ s $^{-1}$), kā arī samazinot K_m tiešajai reakcijai ($K_{ms}=0.01$ nmol/mL). Izņēmums bija 12.3 reakcija, jo tai bija zināma eksperimentālā plūsma, tāpēc tās parametriem tika ļauts mainīties, lai parametru noteikšanā pielāgotos eksperimentālajiem datiem.

3.3. Nezināmo parametru novērtēšana.

Parametru novērtēšanas mērķis bija atrast kinētiskos parametrus un metabolītu koncentrācijas, kas izskaidro auga metabolismu stacionārā stāvoklī brīdī, kad augā tiek ražoti MEP ceļa produkti. Šim nolūkam tika kombinēta informācija par eksperimentāli iegūtām MEP ceļa metabolītu – DXP, MecPP, DMAPP un IPP - koncentrācijām (J. Rohwer pers. comm.) un dati par MEP ceļa plūsmu (Wright et al. 2014), kas nāk no vienas laboratorijas.

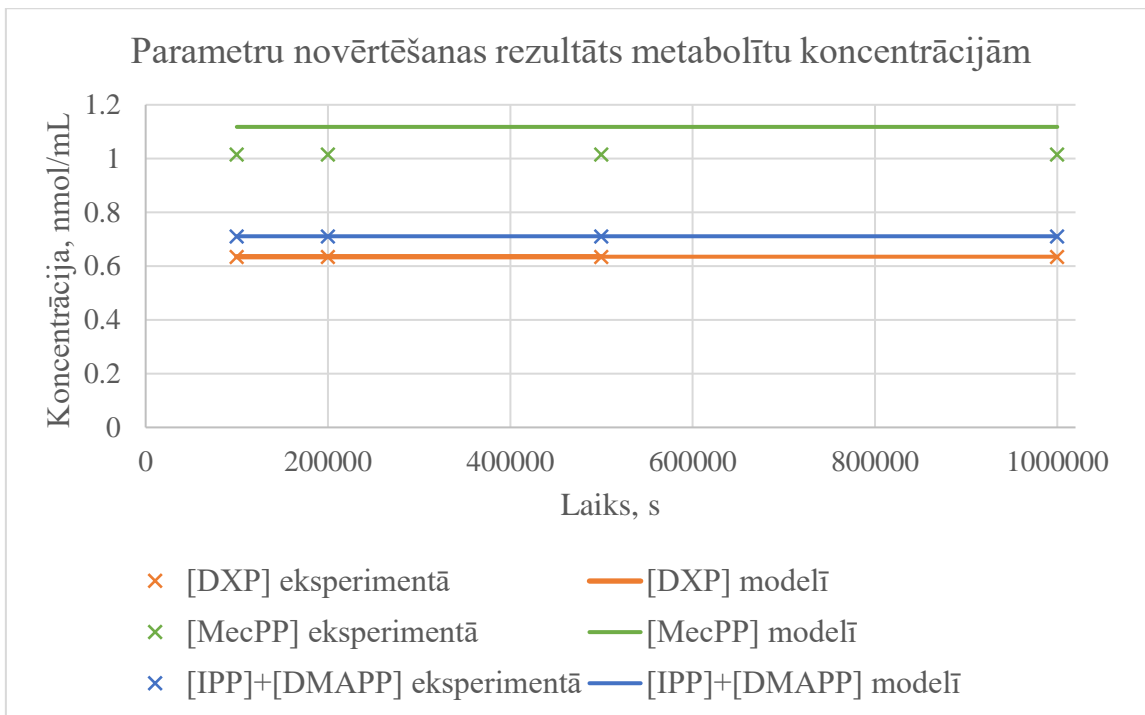
Šīm vērtībām tika pievienota informācija par plūsmu caur 12.3. reakciju uz GG-hlorofila sintēzi, kas iegūti no genoma mēroga stehiometriskās modelēšanas *A. thaliana* (A. Pentjušs pers. ziņ.). Tā kā *A. thaliana* savvaļas forma neražo ne izoprēnu, ne cis-abienolu, šo vielu koncentrācijai WT modelī būtu jābūt nullei, arī šī informācija tika iekļauta eksperimentālo datu failā. Lai simulētu stacionāro stāvokli ilgā laika periodā, tika pieprasīts šīs vērtības uzturēt laika intervālā no 10^5 s līdz 10^6 s, kas atbilst 10 dienu ilgam laika periodam. Laika periodā no 0 līdz 10^5 s (27 h) modelim tika dota iespēja pielāgoties. Eksperimentālie dati apkopoti 5. tabulā.

5. tabula. Simulēti eksperimentālie dati, kombinējot informāciju no eksperimentiem un genoma mēroga stehiometriskās modelēšanas.

Table 5. Simulated experimental data, combining information from experiments and genome scale stoichiometric modelling.

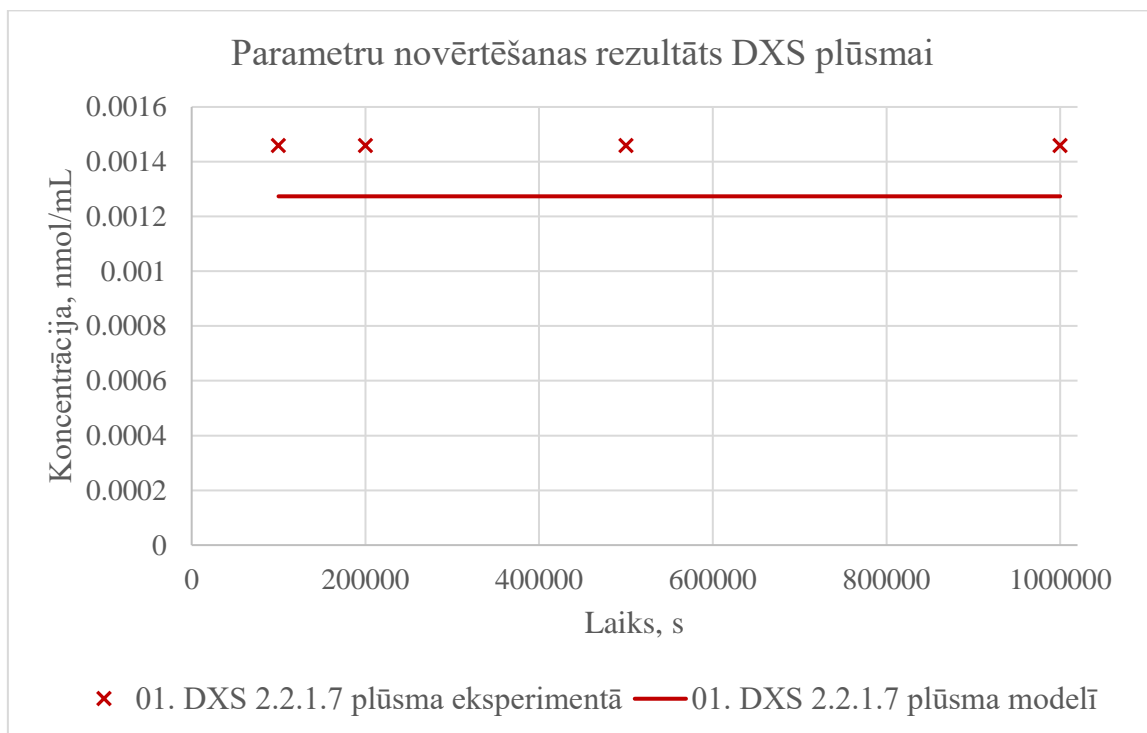
Laiks	[DXP], nmol/L	[MecPP], nmol/L	[DMAPP+ IPP], nmol/L	DXS plūsma, nmol/s	[Iso], nmol/mL	[c-Ab], nmol/mL	GGChl plūsma, nmol/s
100000	0.635	1.016	0.711	1.46×10^3	0.00	0.00	5.5×10^6
200000	0.635	1.016	0.711	1.46×10^3	0.00	0.00	5.5×10^6
500000	0.635	1.016	0.711	1.46×10^3	0.00	0.00	5.5×10^6
1000000	0.635	1.016	0.711	1.46×10^3	0.00	0.00	5.5×10^6

Tika atrasti parametri, kas izskaidroja eksperimentālos datus ar OKV vērtību 1.56×10^{-9} . Salīdzinājumam – nezināmo parametru novērtēšanas OKV modeļa izveides sākumā bija 1.00×10^6 . Modeļa simulācijas atbilstība parametru novērtēšanas eksperimentālajiem datiem redzama 5., 6. un 7. attēlā.



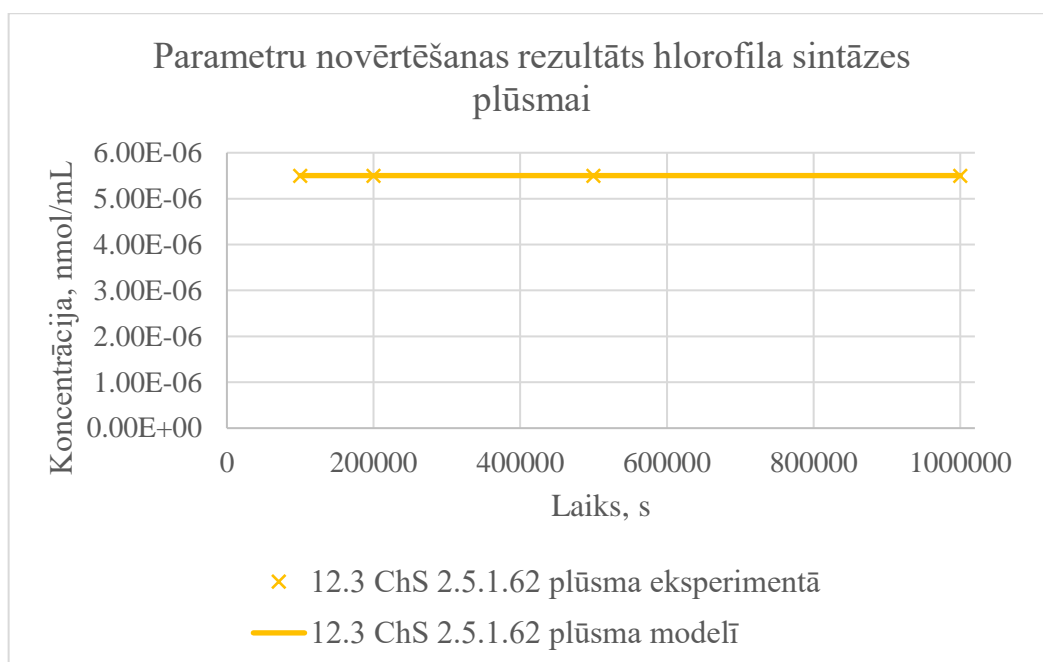
5. attēls. Modeļa metabolītu koncentrāciju atbilstība eksperimentālajiem datiem.

Figure 5. Modelled metabolite concentration fit to experimental data.



6. attēls. Modeļa plūsmas atbilstība stehiometriskajā modelēšanā noteiktajai plūsmai caur DXS.

Table 6. Fit of modelled flux through DXS to its value from stoichiometric modelling.



7. attēls. Modeļa plūsmas atbilstība eksperimentāli noteiktajai plūsmai caur ChS.

Table 7. Fit of modelled flux through ChS to its experimental value.

3.4. Stacionārā stāvokļa iegūšana

Tika atrasts stacionārais stāvoklis, kurā aprēķinātās metabolītu sākumkoncentrācijas un plūsmas caur aktīvajiem enzīmiem apkopotas 6. tabulā.

6. tabula. Iegūtās metabolītu sākuma koncentrācijas un plūsmas caur aktīvajiem enzīmiem atrastajā stacionārajā stāvoklī.

Table 6. Metabolite initial concentrations and fluxes through active enzymes in the calculated steady state.

Metabolīts	Sākotnējā koncentrācija, nmol/mL	Reakcija	Plūsmas vērtība, nmol/s
Pyr	2.11	1. DXS 2.2.1.7	1.27×10^{-3}
GAP	0.42	2. DXR 1.1.1.267	1.27×10^{-3}
DXP	0.63	3. MCT 2.7.7.60	1.27×10^{-3}
MEP	5.97×10^{-2}	4. CMK 2.7.1.148	1.27×10^{-3}
CDPME	6.76×10^{-2}	5. MCS 4.6.1.12	1.27×10^{-3}
CDPMEP	0.15	6. HDS 1.17.4.3	1.27×10^{-3}
MecPP	1.12	7.1. HDR 1.17.1.2	1.07×10^{-3}
HMBPP	4.42×10^{-2}	7.2. HDR 1.17.1.2	2.03×10^{-4}

Metabolīts	Sākotnējā koncentrācija, nmol/mL	Reakcija	Plūsmas vērtība, nmol/s
IPP	0.24	8. IDI 5.3.3.2	1.15×10^{-4}
DMAPP	0.47	9. GPPS 2.5.1.1	3.18×10^{-4}
GPP	1.13×10^{-3}	10. FPS 2.5.1.10	3.18×10^{-4}
FPP	2.70×10^{-2}	11. GGPPS 2.5.1.29	3.18×10^{-4}
GGPP	0.95	12.1. AtSPS 2.5.1.85	2.69×10^{-6}
Non-PP	1.73×10^{-5}	12.2. GGPPR 1.3.1.83	3.06×10^{-4}
Ph-PP	5.50	12.3. ChS 2.5.1.62	5.50×10^{-6}
GG Chl	0.63	12.4. PSY 2.5.1.32	2.04×10^{-6}
15-c-Phy	0.45		

4. DISKUSIJA

4.1. Modeļa uzbūve, parametru un reakciju izvēle

Neskatoties uz salīdzinoši mazo datu pieejamību – vairāk kā pusei no modelī izmantotajiem parametriem vērtības tika meklētas ar parametru novērtēšanu - izdevies izveidot stacionāro stāvokli sasniedzosu metabolisko modeli. Tomēr šis ir tikai pirmais solis modeļa izvēlē un turpmākā darbā būs nepieciešams modeli pilnveidot un validēt ar lielāku daudzumu eksperimentālo datu.

Modeļa uzbūvē veiktas vairākas vienkāršošanas gan metaboliskā tīkla uzbūvē, gan enzīmu darbības matemātiskajā aprakstā. No visiem izoprenoīdu ražošanas atzariem (Vranová et al. 2013) izvēlēti tikai trīs, pieņemot, ka plūsmas caur citiem atzariem ir salīdzinoši nenozīmīgas. Tomēr, tā kā izoprenoīdu produktu starpā ir arī fitohormoni un citas nozīmīgas vielas, kas augam var būt kritiskas mazākos daudzumos, šos pieņēmumus būtu vēlams pārbaudīt. Šim nolūkam var izmantot iespēju kombinēt kinētisko modeli ar datiem no genoma mēroga stehiometriskās modelēšanas *A. thaliana* un apskatot pārējiem MEP ceļa produktiem novirzīto oglekļa plūsmu lielumus un to samazināšanas efektus stehiometriskajā modelī, lai apstiprinātu, ka modelī nav izlaisti *A. thaliana* metabolismā nozīmīgi atzarojumi.

Bez reakciju tīkla tika vienkāršota arī noteiktu enzīmu darbība, lai izvairītos no maemātiskās sarežģītības, kas varētu radīt lielāku kļūdu variāciju kā bioloģiskā (Dr F. Bruggeman pers. comm.). Apzināti vienkāršota tika prenildifosfātu sintāžu darbība. Zināms, ka šie enzīmi galaprodukta sintēzi veic pakāpeniski, bet var izmantot arī iepriekšējā enzīma produktus (Heldt and Heldt 2005). Tātad, piemēram, FPS var izmantot divas dažādas substrātu kombinācijas un atbrīvot divus dažādus produktus. Šī darba ietvaros modeļa matemātiskajai vienkāršošanai tika nolemts katrai prenildifosfāta sintāzei atstāt tikai vienu reakciju – pēdējo, pieņemot, ka parametru novērtēšana pielīdzinās to nezināmos kinētiskos parametrus, lai kompensētu pārējo apakšreakciju trūkumu. Attiecīgi GPPS modelī funkcionē kā visu trīs prenildifosfātu sintāžu GPP sintāzes soļu apkopojums utml. Prenildifosfātu biosintēzes reakcijas netika apvienotas vienā vienkāršošanas nolūkos, jo tika secināts, ka katrs prenildifosfāts novirza plūsmu uz noteiktu vēlamu galaproduktu (FPP un GGPP) vai regulē iepriekšējās reakcijas (GPP).

4.2. Nezināmo paramteru novērtēšana

Vairāk kā puse no modelī izmantotajiem kinētiskajiem parametriem tika noteikta parametru novērtēšanā. Lai ierobežotu mainīgo lielumu amplitūdas parametru noteikšanā, to iespējamās minimalās un maksimālās vērtības tika pietuvinātas bioloģiski iespējamām vērtībām. K_{mp} minimālās robežas tika noteiktas, izmantojot pieņēmumus par enzīmu kinētiku un reakciju atgriezeniskumu, tām izmantotas K_{ms} vērtības. Enzīmu koncentrācijas gadījumā, izmantojot to zināmo molekulu masu, plastīdas aptuveno tilpumu un pieņemot, ka lapas blīvums ir vienāds ar ūdens blīvumu, tika aprēķināta maksimālā iespējamā enzīma koncentrācija plastīdā, gadījumā, ja konkrētais enzīms aizņemtu visu plastīdā esošo proteīnu frakciju. Izmantojot dažas zināmās k_{cat} vērtības iesaistītajiem enzīmiem, tika aprēķinātas atbilstošas V_f vērtības. Lielākā iegūtā vērtība bija 6.7×10^4 kas tika noapaļota uz 1×10^5 . Šī vērtība tika sākotnēji izvēlēta kā V_f maksimālā robeža parametru novērtēšanā. Tā kā lapu blīvums ir mazāks kā ūdens blīvums - $0.1-0.6 \text{ g/cm}^3$ (Poorter et al. 2009), un neviens no enzīmiem neaizņem visu plastīdas tilpumu, aprēķinātās enzīmu koncentrācijas maksimālās robežas ir daudz lielākas, kā tās būtu dabā, tadējādi neierobežojot bioloģisko variāciju, joprojām nozīmīgi samazinot risinājuma telpu (*solution space*). Papildus tam, šādu ierobežojumu izmantošana samazina iespēju algoritmam ar nereālistiskām vērtībām kompensēt mūsu modelī iespējami ieviestās kļūdas. Tālākā darba gaitā šīs robežas tika samazinātas, atkārtoti veicot 2.9. sadaļā aprakstīto algoritmu, tā nonākot pie bioloģiski iespējamākām vērtībām. Lai gan, šādi rīkojoties, nav pārbaudītas vērtības reakcijās, pret kuru parametru izmaiņām metabolītu koncentrācijas nav jutīgas. Tāpat iespējams, ka modelis kompensē nepiefiksētas nepilnības, izmantojot ļoti lielas vērtības parametriem, kuru maksimālās robežas nav pielāgotas.

Kopumā parametru novērtēšanā tika atrastas mainīgo vērtības, kas mehānistiski labi izskaidro pieejamos eksperimentālos rezultātus ar salīdzinoši mazu kvadrātisko kļūdu un mazu OKV. Izvēlētais PE algoritms – daļiņu kopas optimizācija prasa ilgāku laiku, salīdzinot ar citiem PE algoritmiem, bet kopumā dod konsekventi zemāku OKV (Baker et al. 2010).

4.3. Stacionārā stāvokļa iegūšana

Modelī atrastās stacionārā stāvokļa metabolītu sākotnējās koncentrācijas līdzinās Pokhilko et al. MEP ceļa diennakts regulācijas modelī iegūtajām (Pokhilko et al. 2015). Lielākās atšķirības novērojamas gadījumos, kad Pokhilko et al. modelī iegūtās vērtības nesakrīt ar šajā darbā parametru novērtēšanā izmantotajiem eksperimentālajiem datiem.

Šādos gadījumos metabolītu sākotnējās koncentrācijas modelī sakrīt vai ir skaitliski tuvākas eksperimentālajiem datiem.

Šai darbā apskatīts stacionārais stāvoklis ilgstošā laika periodā (1-10 dienas). Lai gan diennakts ietvaros MEP metaboliskā ceļa darbībā un metabolītu koncentrācijās novērojamas svārstības (Pokhilko et al. 2015), tās ir regulāras. Tā kā šai darbā interese ir tieši par MEP ceļa darbību dienas laikā, kad tiek ražots izoprēns un citi izoprenoīdu produkti, tika apskatītas tikai attiecīgās vērtības dienas laikā. Tā kā modelis nav paredzēts kvantitatīvas auga produktivitātes noteikšanai, bet tās optimizācijai, šādai pieejai nevajadzētu negatīvi ietekmēt modeļa izmantošanas iespējas.

4.4. Turpmākie uzdevumi un modeļa uzlabošana

Lai arī modelī ir iegūts stacionārais stāvoklis, un tas spēj izskaidrot eksperimentālos datus, būtu vēlams veikt papildu pārbaudes, lai pārlicinātos, ka izmantotas korektas PE mainīgo robežvērtības, un nav pieļauta nereālistisku vērtību izmantošana, lai gan matemātiski tās dod piemērotu risinājumu. Tāpat veikt padziļinātu jutības analīzi, lai pārlicinātos par modeļa stabilitāti.

Nākamais solis darbā būtu iekļaut enzīmu parametrus šobrīd neatktīvajiem atzariem – izoprēna un cis-abienola sintēzei. Zināms izoprēna ražošanas ātrums *A. thaliana*, kurā veiksmīgi ievietots un ekspresēts ISPS, turklāt noteikts, ka ISPS darbība statistiski nozīmīgi nemaina oglekļa plūsmu uz fotosintēzes pigmentu ražošanu (Loivamäki et al. 2007). Informācija par cis-abienola sintēzi *A. thaliana* nav pieejama, tāpēc jāatrod efektīvākā pieeja – ar parametru novērtēšanu, citām skaitļošanas metodēm vai eksperimentāli transformējot *A. thaliana* par cis-abienola sintēzi atbildīgos gēnus, lai iegūtu kinētiskos datus. Ņemot vērā ilgo laiku transgēnu augu izveidošanai, kas *A. thaliana* gadījumā ir ap trīs mēnešiem (Prof. Alain Tissier pers. comm.), arī šim solim tiks izmantotas skaitļošanas metodes.

Kad iegūta informācija par pievienoto atzarojumu kinētiku, tālākie soļi būtu 1) veikt TOP optimizāciju (Stalidzans et al. 2017), lai atrastu mazāko efektīvo izmaiņu daudzumu cis-abienola vai izoprēna produkcijas maksimizēšanai 2) pārbaudīt optimizācijas piedāvāto risinājumu vērtības genoma mēroga stehiometriskajā modelī, lai pārlicinātos, ka tos neierobežo kofaktoru pieejamība un citu metabolisma ceļu vajadzības 3) pārbaudīt ieteiktos optimizācijas risinājumus *in vivo*.

Lai uzlabotu modeli turpmāk, iespējams pievienot arī Pokhilko et al. aprakstītos regulācijas līmeņus, kā arī ieviest pilnīgu preniltransferāžu kinētiku, ņemot vērā, ka

optimizācijā var tikt piedāvāts celt konkrētu enzīma koncentrāciju, kas ietver cita enzīma veikto darbu, rezultātā neatspoguļojoties plūsmas uzlabojumos *in vivo*. Otrs variants – apskatīt apakšmodeļi ar pilnu preniltransferāžu kinētiku, un salīdzināt optimizācijas piedāvātās preniltransferāžu enzīmu koncentrāciju izmaiņas šādā apakšmodelī un mūsu modelī. Tomēr jāizsver, vai tas ir nepieciešams, un iegūtā informācija par enzīmu darbību dos nozīmīgus pienesumu ierobežojumus, vai arī ar šādu vienkāršotu pieeju iespējams iegūt pietiekami ticamas hipotēzes enzīmu darbības modificēšanai *in vivo*.

SECINĀJUMI

1. Izdevies atrast nezināmos enzīmu kinētiskos parametrus, kas ar atzīstamu precizitāti mehānistiski spēj izskaidrot eksperimentālos datus. Kinētisko parametru precīzākai noteikšanai ir nepieciešami papildus eksperimentālie dati.
2. Izdevies iegūt stacionāro stāvokli modelim.
3. Enzīmu V_{\max} parametru novērtēšanas diapazona sašaurināšanai ir lietderīgi izmantot proteīnu koncentrāciju robežvērtības.
4. Genoma mēroga stehiometriskā modeļa dati ir pielietojami kā kinētiskā modeļa eksperimentālie dati stacionāram stāvoklim.

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību darba vadītājam Egilam Stalidzānam par iespēju izstrādāt darbu sistēmbioloģija jomā un vispusīgu atbalstu darba izstrādes gaitā. Paldies Prof. Alain Tissier un Dr. Tom Schreiber no Leibniz Augu Biotehnoloģijas Institūta par konsultācijām sakarā modeļa teorētisko pamatojumu, kā arī Agrim Pentjušam no LLU par plūsmu datiem par plūsmām no genoma mēroga stehiometriskā modeļa. Īpašs paldies Johann Rohwer no Steltenbošas Universitātes par konsultācijām kinētisko vienādojumu jautājumos, kā arī par eksperimentālajiem datiem saistībā ar MEP ceļu *A. thaliana*. Tāpat paldies Dārtai Maijai Zaķei par modelēšanas apgūšanas un pieeju pārspriešanu no biologa skatupunkta.

Darbs izstrādāts SMARTPLANTS projekta ietvaros LLU ar VIAA finansējumu.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

- Attia, Mohamed, Soo-Un Kim, and Dae-Kyun Ro. 2012. "Molecular Cloning and Characterization of (+)-Epi- α -Bisabolol Synthase, Catalyzing the First Step in the Biosynthesis of the Natural Sweetener, Hernandulcin, in *Lippia Dulcis*." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 527(1): 37–44.
- Baker, Syed Murtuza, Kai Schallau, B Orn, and H Junker. 2010. "Comparison of Different Algorithms for Simultaneous Estimation of Multiple Parameters in Kinetic Metabolic Models." *Journal of Integrative Bioinformatics* 7(3): 254–62.
- Banerjee, A., and T. D. Sharkey. 2014. "Methylerythritol 4-Phosphate (MEP) Pathway Metabolic Regulation." *Nat. Prod. Rep.* 31(8): 1043–55.
- Barrero, Alejandro F. et al. 1993. "Synthesis of Ambrox® from (–)-Sclareol and (+)-Cis-Abienol." *Tetrahedron* 49(45): 10405–12.
- Bateman, Alex et al. 2017. "UniProt: The Universal Protein Knowledgebase." *Nucleic Acids Research* 45(D1): D158–69.
- Bergmann, Frank T et al. 2017. "COPASI and Its Applications in Biotechnology." *Journal of Biotechnology* 261: 215–20.
- Boutté, Yohann, and Markus Grebe. 2009. "Cellular Processes Relying on Sterol Function in Plants." *Current opinion in plant biology* 12(6): 705–13.
- Bowsher, C., M. Steer, and A. Tobin. 2008. Plant biochemistry. *Plant Biochemistry*. Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC.
- Burke, Charles, and Rodney Croteau. 2002. "Interaction with the Small Subunit of Geranyl Diphosphate Synthase Modifies the Chain Length Specificity of Geranylgeranyl Diphosphate Synthase to Produce Geranyl Diphosphate." *Journal of Biological Chemistry* 277(5): 3141–49.

- Caspi, Ron et al. 2016. “The MetaCyc Database of Metabolic Pathways and Enzymes and the BioCyc Collection of Pathway/genome Databases.” *Nucleic Acids Research* 44(D1): D471–80.
- Clarke, R. 2002. “The Origin of Ambergris.” *Latin American Journal of Aquatic Mammals* 5(1): 7–21.
- Cross, J. M. et al. 2006. “Variation of Enzyme Activities and Metabolite Levels in 24 Arabidopsis Accessions Growing in Carbon-Limited Conditions.” *PLANT PHYSIOLOGY* 142(4): 1574–88..
- Dersch, Lisa Maria, Veronique Beckers, and Christoph Wittmann. 2016. “Green Pathways: Metabolic Network Analysis of Plant Systems.”
- Elsts, Atis, Agris Pentjuss, and Egils Stalidzans. 2017. “SpaceScanner: COPASI Wrapper for Automated Management of Global Stochastic Optimization Experiments.” *Bioinformatics* 33(18): 2966–67.
- Ferriols, Victor Marco Emmanuel N. et al. 2015. “Cloning and Characterization of Farnesyl Pyrophosphate Synthase from the Highly Branched Isoprenoid Producing Diatom Rhizosolenia Setigera.” *Scientific Reports* 5(1): 10246.
- Flügge, U.-I., and W. Gao. 2005. “Transport of Isoprenoid Intermediates Across Chloroplast Envelope Membranes.” *Plant Biology* 7(1): 91–97.
- Frick, Sindy et al. 2013. “Metal Ions Control Product Specificity of Isoprenyl Diphosphate Synthases in the Insect Terpenoid Pathway.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(11): 4194–99.
- Ghirardo, Andrea et al. 2014. “Metabolic Flux Analysis of Plastidic Isoprenoid Biosynthesis in Poplar Leaves Emitting and Nonemitting Isoprene.” *Plant physiology* 165(1): 37–51.
- Gray, P. S., and J. S. Mills. 1964. “1109. The Isolation of Abienol from Canada

- Balsam, the Oleoresin of *Abies balsamea*(L.) Mill.” *Journal of the Chemical Society (Resumed)*: 5822.
- Green, Terrence R., and Charles A. West. 1974. “Purification and Characterization of Two Forms of Geranyl Transferase from *Ricinus Communis*.” *Biochemistry* 13(23): 4720–29.
- Hansen, Anne Sofie Lærke, Rebecca M. Lennen, Nikolaus Sonnenschein, and Markus J Herrgård. 2017. “Systems Biology Solutions for Biochemical Production Challenges.” *Current Opinion in Biotechnology* 45: 85–91.
- Heider, Sabine A. E., Petra Peters-Wendisch, Jules Beekwilder, and Volker F. Wendisch. 2014. “IdsA Is the Major Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase Involved in Carotenogenesis in *Corynebacterium Glutamicum*.” *FEBS Journal* 281(21): 4906–20.).
- Heldt, Hans-Walter., and Fiona. Heldt. 2005. *Plant Biochemistry*. Elsevier Academic Press.
- Hoops, S. et al. 2006. “COPASI--a COMplex PATHway SIMulator.” *Bioinformatics* 22(24): 3067–74.).
- Huala, E. 2001. “The Arabidopsis Information Resource (TAIR): A Comprehensive Database and Web-Based Information Retrieval, Analysis, and Visualization System for a Model Plant.” *Nucleic Acids Research* 29(1): 102–5..
- Hübner, Katrin, Sven Sahle, and Ursula Kummer. 2011. “Applications and Trends in Systems Biology in Biochemistry.” *FEBS Journal* 278(16): 2767–2857.
- Kawasaki, Takashi et al. 2003. “Interconversion of the Product Specificity of Type I Eubacterial Farnesyl Diphosphate Synthase and Geranylgeranyl

- Diphosphate Synthase through One Amino Acid Substitution.” *Journal of biochemistry* 133(1): 83–91.
- Kennedy, James, and Russell Eberhart. 1995. “Particle Swarm Optimization.” In *Proceedings of the Fourth IEEE International Conference on Neural Networks*, , 1942–48.
- Kunz, H.-H. et al. 2014. “Plastidial Transporters KEA1, -2, and -3 Are Essential for Chloroplast Osmoregulation, Integrity, and pH Regulation in Arabidopsis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(20): 7480–85.
- Laskaris, van der Heijden R, and Verpoorte. 2000. “Purification and Partial Characterisation of Geranylgeranyl Diphosphate Synthase, from *Taxus Baccata* Cell Cultures. An Enzyme That Regulates Taxane Biosynthesis.” *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 153(2): 97–105.
- Laule, Oliver et al. 2003. “Crosstalk between Cytosolic and Plastidial Pathways of Isoprenoid Biosynthesis in *Arabidopsis Thaliana*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(11): 6866–71.
- Lichtenthaler, Hartmut K, Jörg Schwender, Andrea Disch, and Michel Rohmer. 1997. “Biosynthesis of Isoprenoids in Higher Plant Chloroplasts Proceeds via a Mevalonate-Independent Pathway.” *FEBS Letters* 400(3): 271–74.
- Lipko, Agata, and Ewa Swiezewska. 2016. “Isoprenoid Generating Systems in Plants — A Handy Toolbox How to Assess Contribution of the Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways to the Biosynthetic Process.” *Progress in Lipid Research* 63: 70–92.
- Loivamäki, Maaria et al. 2007. “Arabidopsis, a Model to Study Biological

- Functions of Isoprene Emission?" *Plant physiology* 144(2): 1066–78.
- Long, Stephen P., Amy Marshall-Colon, and Xin-Guang Zhu. 2015. "Meeting the Global Food Demand of the Future by Engineering Crop Photosynthesis and Yield Potential." *Cell* 161(1): 56–66.
- Orlova, I. et al. 2009. "The Small Subunit of Snapdragon Geranyl Diphosphate Synthase Modifies the Chain Length Specificity of Tobacco Geranylgeranyl Diphosphate Synthase in Planta." *The Plant Cell* 21(12): 4002–17.
- Pick, Thea R., and Andreas P. M. Weber. 2014. "Unknown Components of the Plastidial Permeome." *Frontiers in Plant Science* 5: 410.
- Placzek, Sandra et al. 2017. "BRENDA in 2017: New Perspectives and New Tools in BRENDA." *Nucleic Acids Research* 45(D1): D380–88.
- Pokhilko, Alexandra, Jordi Bou-Torrent, Pablo Pulido, Manuel Rodríguez-Concepción, et al. 2015. "Mathematical Modelling of the Diurnal Regulation of the MEP Pathway in *Arabidopsis*." *New Phytologist* 206(3): 1075–85.
- Pokhilko, Alexandra, Jordi Bou-Torrent, Pablo Pulido, Manuel Rodríguez-Concepción, et al. 2015. "Mathematical Modelling of the Diurnal Regulation of the MEP Pathway in *Arabidopsis*." *New Phytologist* 206(3): 1075–85.
- Poorter, Hendrik et al. 2009. "Causes and Consequences of Variation in Leaf Mass per Area (LMA): a Meta-Analysis." *New phytologist* 182(3): 565–88.
- Rasulov, B., L. Copolovici, A. Laisk, and U. Niinemets. 2009. "Postillumination Isoprene Emission: In Vivo Measurements of Dimethylallyldiphosphate Pool Size and Isoprene Synthase Kinetics in Aspen Leaves." *PLANT PHYSIOLOGY* 149(3): 1609–18.

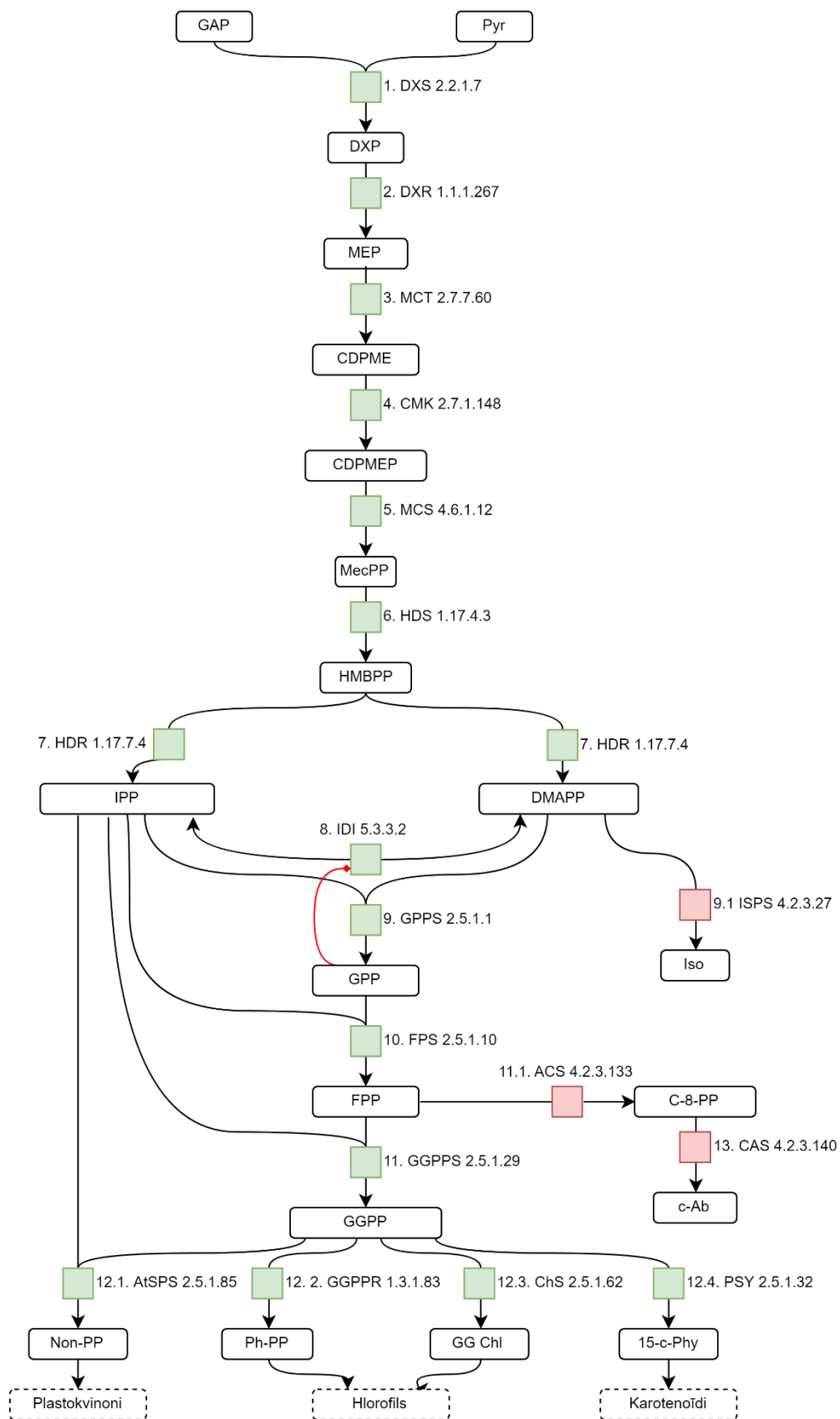
- Rios-Estepa, R., I. Lange, J. M. Lee, and B. M. Lange. 2010. “Mathematical Modeling-Guided Evaluation of Biochemical, Developmental, Environmental, and Genotypic Determinants of Essential Oil Composition and Yield in Peppermint Leaves.” *Plant Physiology* 152(4): 2105–19.
- Rohdich, Felix et al. 2001. “Studies on the Nonmevalonate Terpene Biosynthetic Pathway: Metabolic Role of IspH (LytB) Protein.”
- Rohwer, Johann M. 2012. “Kinetic Modelling of Plant Metabolic Pathways.” *Journal of Experimental Botany* 63(6): 2275–92.
- Santner, Aaron, Luz Irina A Calderon-Villalobos, and Mark Estelle. 2009. “Plant Hormones Are Versatile Chemical Regulators of Plant Growth.” *Nature Chemical Biology* 5(5): 301–7.
- Sharkey, Thomas D, Amy E Wiberley, and Autumn R Donohue. 2008. “Isoprene Emission from Plants: Why and How.” *Annals of botany* 101(1): 5–18.
- Stalidzans, Egils et al. 2018. “Model-Based Metabolism Design: Constraints for Kinetic and Stoichiometric Models.” *Biochemical Society Transactions*.
- Stalidzans, Egils, Ivars Mozga, Jurijs Sulins, and Peteris Zikmanis. 2017. “Search for a Minimal Set of Parameters by Assessing the Total Optimization Potential for a Dynamic Model of a Biochemical Network.” *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics* 14(4): 978–85.
- Takaya, Akiyuki et al. 2003. “Cloning, Expression and Characterization of a Functional cDNA Clone Encoding Geranylgeranyl Diphosphate Synthase of *Hevea Brasiliensis*.” *Biochimica et biophysica acta* 1625(2): 214–20.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. “Analysis of the Genome Sequence

- of the Flowering Plant *Arabidopsis Thaliana*.” *Nature* 408(6814): 796–815.
- Tholl, Dorothea, and Sungbeom Lee. 2011. “Terpene Specialized Metabolism in *Arabidopsis Thaliana*.” *The Arabidopsis Book* 9: e0143.
- Trinh, Cong T., Pornkamol Unrean, and Friedrich Srienc. 2008. “Minimal *Escherichia Coli* Cell for the Most Efficient Production of Ethanol from Hexoses and Pentoses.” *Applied and environmental microbiology* 74(12): 3634–43.
- Vranová, Eva, Diana Coman, and Wilhelm Gruissem. 2013. “Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis.” *Annual Review of Plant Biology* 64(1): 665–700.
- Vranová, Eva, Matthias Hirsch-Hoffmann, and Wilhelm Gruissem. 2011. “AtIPD: A Curated Database of *Arabidopsis* Isoprenoid Pathway Models and Genes for Isoprenoid Network Analysis.” *Plant physiology* 156(4): 1655–60..
- Weckwerth, Wolfram. 2011. “Green Systems Biology — From Single Genomes, Proteomes and Metabolomes to Ecosystems Research and Biotechnology.” *Journal of Proteomics* 75(1): 284–305.
- WIBERLEY, AMY E. et al. 2007. “Regulation of Isoprene Emission in *Populus Trichocarpa* Leaves Subjected to Changing Growth Temperature.” *Plant, Cell & Environment* 31(2): 258–67.
- Winter, Heike, David G. Robinson, and Hans Walter Heldt. 1994. “Subcellular Volumes and Metabolite Concentrations in Spinach Leaves.” *Planta* 193(4): 530–35.
- Woelke, Anna Lena, Manuela S Murgueitio, and Robert Preissner. 2010. “Theoretical Modeling Techniques and Their Impact on Tumor

- Immunology.” *Clinical & developmental immunology* 2010: 271794.
- worldometers.info. 2018. “Current World Population.”
<http://www.worldometers.info/world-population/> (May 7, 2018).
- Wright, Louwrance P et al. 2014. “Deoxyxylulose 5-Phosphate Synthase Controls Flux through the Methylerythritol 4-Phosphate Pathway in Arabidopsis.” *Plant physiology* 165(4): 1488–1504.
- Yang, Deyue, Daniel D Seaton, Johanna Krahmer, and Karen J Halliday. 2016. “Photoreceptor Effects on Plant Biomass, Resource Allocation, and Metabolic State.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(27): 7667–72.
- Zerbe, Philipp et al. 2012. “Bifunctional Cis-Abienol Synthase from *Abies Balsamea* Discovered by Transcriptome Sequencing and Its Implications for Diterpenoid Fragrance Production * □ S.”
- Zurbriggen, Matias D., Alina Moor, and Wilfried Weber. 2012. “Plant and Bacterial Systems Biology as Platform for Plant Synthetic Bio(techno)logy.” *Journal of Biotechnology* 160(1–2): 80–90.

PIELIKUMI

Modeļa shematiskais attēlojums.



Modelī iekļautie metabolīti.

N.p.k.	Nosaukums	Apzīmējums modeli
1.	Piruvāts	Pyr
2.	Glicer aldehīda-3-fosfāts	GAP
3.	1-deoksi-D-ksilulozes-5-fosfāts	DXP
4.	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfāts	MEP
5.	4-(cistidīna 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritols	CDPME
6.	2-fosfo-4-(cistidīna 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritols	CDPMEP
7.	2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciklodifosfāts	MecPP
8.	4-hidroksi-3-metilbut-1-ēn-1-il difosfāts	HMBPP
9.	Izopentenildifosfāts	IPP
10.	Dimetilalildifosfāts	DMAPP
11.	Geranildifosfāts	GPP
12.	Faranesildifosfāts	FPP
13.	Geranilgeranildifosfāts	GGPP
14.	Izoprēns	Iso
15.	Kopal-8-ol difosfāts	C-8-PP
16.	Cis-abienols	c-Ab
17.	Nonaprenildifosfāts	Non-PP
18.	Fitildifosfāts	Ph-PP
19.	Geranilgeranilhlorofils	GG Chl
20.	12-cis-fitoēns	15-c-Phy

Modelī iekļauto reakciju apkopojums.

Modelī iekļautas 19 reakcijas. Rekcijas nosaukums modelī ietver izpildošā enzīma nosaukuma saīsinājumu un tā EC numuru.

N.p.k. modelī	Nosaukums modelī	Enzīma nosaukums	Vienādojums modelī	Ātruma vienādojums
1.	DXS 2.2.1.7	1-deoksi-D-ksilulozes-5-fosfāta sintāze	$GAP + Pyr \rightarrow DXP$	(1)
2.	DXR 1.1.1.267	1-deoksi-D-ksilulozes-5-fosfāta reduktoizomerāze	$DXP = MEP$	(2)
3.	MCT 2.7.7.60	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfāta citidililtransferāze	$MEP = CDPME$	(2)
4.	CMK 2.7.1.148	4-(citidīna 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol kināze	$CDPME = CDPMEP$	(2)
5.	MCS 4.6.1.12	2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciklodifosfāta sintāze	$CDPMEP = MecPP$	(2)
6.	HDS 1.17.4.3	4-hidroksi-3-metilbut-2-en-1-il difosfāta sintāze	$MecPP = HMBPP$	(2)
7.1.	HDR 1.17.1.2	4-hidroksi-3-metilbut-2-enil difosfāta reduktāze	$HMBPP = IPP$	(2)
7.2.	HDR 1.17.1.2	4-hidroksi-3-metilbut-2-enil difosfāta reduktāze	$HMBPP = DMAPP$	(2)
8.	IDI 5.3.3.2	Izopentenildifosfāta izomerāze	$IPP = DMAPP; GPP$	(4)
9.	GPPS 2.5.1.1	Geranildifosfāta sintāze	$DMAPP + IPP = GPP$	(3)
9.1.	ISPS 4.2.3.27	Izoprēna sintāze	$DMAPP = Iso$	(2)
10.	FPS 2.5.1.10	Faranesildifosfāta sintāze	$GPP + IPP = FPP$	(3)
11.	GGPPS 2.5.1.29	Geranilgeranil difosfāta sintāze	$FPP + IPP = GGPP$	(3)

3.1. pielikums

Modelī iekļauto reakciju apkopojums.

N.p.k. modelī	Nosaukums modelī	Enzīma nosaukums	Vienādojums modelī	Ātruma vienādojums
11.1.	ACS 4.2.3.133	Alfa kopaēna sintāze	FPP = C-8-PP	(2)
12.1.	AtSPS 2.5.1.85	Al-trans- nonaprenildifosfāta sintāze	GGPP + IPP = N-PP	(3)
12.2.	GGPPR 1.3.1.83	Geranilgeranil difosfāta reduktāze	GGPP = Ph-PP	(2)
12.3.	ChS 2.5.1.62	Hlorofila sintāze	GGPP = GG Chl	(2)
12.4.	PSY 2.5.1.32	15-cis-fitoēna sintāze	GGPP = 15-c-Phy	(2)
13.	CAS 4.2.3.140	Cis-abienola sintāze	C-8-PP = c-Ab	(2)

Parametru novērtēšanā mainīgie parametri.

N.p.k.	Parametrs	Minimālā robeža	Maksimālā robeža
1.	(02. DXR 1.1.1.267).K _{eq}	0.1	100
2.	(02. DXR 1.1.1.267).K _{mp}	130	1000
3.	(03. MCT 2.7.7.60).K _{eq}	0.01	100
4.	(04. CMK 2.7.1.148).K _{eq}	0.1	100
5.	(04. CMK 2.7.1.148).K _{mp}	80	1000
6.	(05. MDS 4.6.1.12).K _{eq}	0.01	100
7.	(05. MDS 4.6.1.12).K _{mp}	200	1000
8.	(06. HDS 1.17.7.1).K _{eq}	0.01	100
9.	(06. HDS 1.17.7.1).K _{mp}	400	10000
10.	(07. DMAPP HDR 1.17.7.4).K _{mp}	30	1000
11.	(07. IPP HDR 1.17.7.4).K _{eq}	0.01	100
12.	(07. IPP HDR 1.17.7.4).K _{mp}	30	1000
13.	(07. DMAPP HDR 1.17.7.4).K _{eq}	0.01	100
14.	(09. GPPS 2.5.1.1).K _{eq}	0.01	100
15.	(09. GPPS 2.5.1.1).K _{mp}	8	1000

Parametru novērtēšanā mainīgie parametri.

N.p.k.	Parametrs	Minimālā robeža	Maksimālā robeža
16.	(09. GPPS 2.5.1.1).V _f	1	1×10 ⁶
17.	(10. FPS 2.5.1.10).K _{eq}	1	1000
18.	(10. FPS 2.5.1.10).V _f	30	1000
19.	(11.GGPPS 2.5.1.29).K _{eq}	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁶
20.	(11.GGPPS 2.5.1.29).K _{mp}	20	1000
21.	(11.GGPPS 2.5.1.29).V _f	0.001	1×10 ⁶
22.	(12.3 ChS 2.5.1.62).K _{eq}	0.01	1000
23.	(12.3 ChS 2.5.1.62).K _{mp}	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁶
24.	(12.3 ChS 2.5.1.62).K _{ms}	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁶
25.	(12.3 ChS 2.5.1.62).V _f	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁶
26.	(10. FPS 2.5.1.10).K _{mp}	0.1	1×10 ⁶
27.	(01. DXS 2.2.1.7).E	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁵
28.	(12.1 AtSPS 2.5.1.85).K _{eq}	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁶
29.	(12.1 AtSPS 2.5.1.85).K _{ma}	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁶
30.	(12.1 AtSPS 2.5.1.85).K _{mb}	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁶
31.	(12.1 AtSPS 2.5.1.85).K _{mp}	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁶
32.	(12.1 AtSPS 2.5.1.85).V _f	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁶

Parametru novērtēšanā mainīgie parametri.

N.p.k.	Parametrs	Minimālā robeža	Maksimālā robeža
33.	(12.2 GGPPR 1.3.1.83).K _{eq}	1×10^{-6}	1×10^6
34.	(12.2 GGPPR 1.3.1.83).K _{mp}	1×10^{-6}	1×10^6
35.	(12.2 GGPPR 1.3.1.83).K _{ms}	1×10^{-6}	1×10^6
36.	(12.2 GGPPR 1.3.1.83).V _f	1×10^{-6}	1×10^6
37.	(12.4 PSY 2.5.1.32).K _{eq}	1×10^{-2}	1×10^2
38.	(12.4 PSY 2.5.1.32).K _{ma}	1×10^{-6}	1×10^6
39.	(12.4 PSY 2.5.1.32).K _{mb}	1×10^{-6}	1×10^6
40.	(12.4 PSY 2.5.1.32).K _{mp}	1×10^{-6}	1×10^6
41.	(12.4 PSY 2.5.1.32).V _f	1×10^{-6}	1×10^5
42.	(08. IDI 5.3.3.2).K _i	1×10^{-2}	1000
43.	[15-cis-Phy]_0	1×10^{-6}	100
44.	[GG Chl]_0	1×10^{-6}	1000
45.	[NonPP]_0	1×10^{-6}	1000
46.	[PhPP]_0	1×10^{-6}	100

Modelī izmantotie kinētiskie parametri un to avoti.

Parametriem, par kuriem netika atrasti literatūras dati, norādīts, ka tie aprēķināti parametru noteikšanā (PE). Parametru vērtības, kuras netika noteiktas PE, modelī neaktīvo reakciju dēļ, atzīmētas ar NA.

Parametrs	Vērtība	Atsauce	Parametrs	Vērtība	Atsauce
(01. DXS 2.2.1.7).E	2.21	PE	(09. GPPS 2.5.1.1).K _{eq}	0.01	PE
(01. DXS 2.2.1.7).k _{cat}	1.9	(Pokhilko et al. 2015)	(09. GPPS 2.5.1.1).K _{mp}	55.59	PE
(01. DXS 2.2.1.7).K _I	16	(Pokhilko et al. 2015)	(10. FPS 2.5.1.10).K _{ma}	12.2	Vidējais no (Frick et al. 2013; Tholl & Lee 2011)
(01. DXS 2.2.1.7).K _{mb}	160	(Pokhilko et al. 2015)	(10. FPS 2.5.1.10).K _{mb}	32	Vidējais no (Ferriols et al. 2015; Green & West 1974)
(01. DXS 2.2.1.7).K _{ma}	110	(Pokhilko et al. 2015)	(10. FPS 2.5.1.10).K _{mp}	16416	PE
(02. DXR 1.1.1.267).V _f	4.4	(Pokhilko et al. 2015)	(10. FPS 2.5.1.10).V _f	304	PE
(02. DXR 1.1.1.267).K _{eq}	0.10	PE	(10. FPS 2.5.1.10).K _{eq}	157	PE
(02. DXR 1.1.1.267).K _{ms}	130	(Pokhilko et al. 2015)	(11. GGPPS 2.5.1.29).K _{ma}	3.4	Vidējais no (Burke & Croteau 2002; Laskaris et al. 2000; Orlova et al. 2009; Takaya et al. 2003)
(02. DXR 1.1.1.267).K _{mp}	135	PE	(11. GGPPS 2.5.1.29).K _{mb}	38	Vidējais no (Burke & Croteau 2002; Kawasaki et al. 2003)

Modelī izmantotie kinētiskie parametri un to avoti.

Parametrs	Vērtība	Atsauce	Parametrs	Vērtība	Atsauce
(03. MCT 2.7.7.60). V_f	13	(Pokhilko et al. 2015)	(11. GGPPS 2.5.1.29). V_f	5705	PE
(03. MCT 2.7.7.60). K_{eq}	1.60	PE	(11. GGPPS 2.5.1.29). K_{eq}	146	PE
(03. MCT 2.7.7.60). K_{ms}	178	(Pokhilko et al. 2015)	(11. GGPPS 2.5.1.29). K_{mp}	325	PE
(03. MCT 2.7.7.60). K_{mp}	500	(Pokhilko et al. 2015)	(12.1. AtSPS 2.5.1.85). K_{ma}	98150	PE
(04. CMK 2.7.1.148). V_f	2	(Pokhilko et al. 2015)	(12.1. AtSPS 2.5.1.85). K_{mb}	21362	PE
(04. CMK 2.7.1.148). K_{eq}	39.24	PE	(12.1. AtSPS 2.5.1.85). K_{mp}	291801	PE
(04. CMK 2.7.1.148). K_{ms}	100	(Pokhilko et al. 2015)	(12.1. AtSPS 2.5.1.85). K_{eq}	104144	PE
(04. CMK 2.7.1.148). K_{mp}	654.47	PE	(12.1. AtSPS 2.5.1.85). V_f	24699	PE
(05. MDS 4.6.1.12). V_f	3.4	(Pokhilko et al. 2015)	(12.2. GGPPR 1.3.1.83). K_{ms}	73728	PE
(05. MDS 4.6.1.12). K_{eq}	19.93	PE	(12.2. GGPPR 1.3.1.83). K_{mp}	3.19	PE
(05. MDS 4.6.1.12). K_{ms}	250	(Pokhilko et al. 2015)	(12.2. GGPPR 1.3.1.83). K_{eq}	5.91	PE
(05. MDS 4.6.1.12). K_{mp}	805	PE	(12.2. GGPPR 1.3.1.83). V_f	3826	PE
(06. HDS 1.17.7.1). V_f	0.48	(Pokhilko et al. 2015)	(12.3. ChS 1.5.1.62). K_{ms}	47680	PE

Modelī izmantotie kinētiskie parametri un to avoti.

Parametrs	Vērtība	Atsauce	Parametrs	Vērtība	Atsauce
(06. HDS 1.17.7.1).K _{eq}	100	PE	(12.3. ChS 1.5.1.62).K _{mp}	9026	PE
(06. HDS 1.17.7.1).K _{ms}	420	(Pokhilko et al. 2015)	(12.3. ChS 1.5.1.62).K _{eq}	613	PE
(06. HDS 1.17.7.1).K _{mp}	10000	PE	(12.3. ChS 1.5.1.62).V _f	0.28	PE
(07.1. HDR 1.17.7.4).V _f	0.77	(Pokhilko et al. 2015)	(12.4. PSY 2.5.1.32).K _{ms}	2847	PE
(07.1. HDR 1.17.7.4).K _{eq}	100	PE	(12.4. PSY 2.5.1.32).K _{mp}	655767	PE
(07.1. HDR 1.17.7.4).K _{ms}	30	(Pokhilko et al. 2015)	(12.4. PSY 2.5.1.32).K _{eq}	4.03	PE
(07.1. HDR 1.17.7.4).K _{mp}	975	PE	(12.4. PSY 2.5.1.32).V _f	104	PE
(07.2. HDR 1.17.7.4).V _f	0.15	(Pokhilko et al. 2015)	(9.1. ISPS 4.2.3.27).K _{ms}	290	Vidējais no (Rasulov et al. 2009; Wiberley et al. 2007)
(07.2. HDR 1.17.7.4).K _{eq}	99	PE	(9.1. ISPS 4.2.3.27).K _{mp}	NA	PE
(07.2. HDR 1.17.7.4).K _{ms}	30	(Pokhilko et al. 2015)	(9.1. ISPS 4.2.3.27).K _{eq}	NA	PE
(07.2. HDR 1.17.7.4).K _{mp}	992	PE	(9.1. ISPS 4.2.3.27).V _f	NA	PE
(08. IDI 5.3.3.2).V _f	0.456	(Pokhilko et al. 2015)	(11.1. ACS 4.2.3.133).K _{ms}	4.8	(Attia et al. 2012)
(08. IDI 5.3.3.2).K _{eq}	2	(Pokhilko et al. 2015)	(11.1. ACS 4.2.3.133).K _{mp}	NA	PE
(08. IDI 5.3.3.2).K _{ms}	5.1	(Pokhilko et al. 2015)	(11.1. ACS 4.2.3.133).K _{eq}	NA	PE

Modelī izmantotie kinētiskie parametri un to avoti

Parametrs	Vērtība	Atsauce	Parametrs	Vērtība	Atsauce
(08. IDI 5.3.3.2).K _{mp}	17	(Pokhilko et al. 2015)	(11.1. ACS 4.2.3.133).V _f	NA	PE
(08. IDI 5.3.3.2).K _I	187.74	PE	(13. CAS 4.2.3.140).K _{ms}	NA	PE
(09. GPPS 2.5.1.1).K _{ma}	9.8	Vidējais no (Frick et al. 2013; Heider et al. 2014)	(13. CAS 4.2.3.140).K _{mp}	NA	PE
(09. GPPS 2.5.1.1).K _{mb}	9.9	Vidējais no (Frick et al. 2013; Heider et al. 2014)	(13. CAS 4.2.3.140).K _{eq}	NA	PE
(09. GPPS 2.5.1.1).V _f	15502	PE	(13. CAS 4.2.3.140).V _f	NA	PE

Enzīmu plūsmas nosakošie diferenciālvienādojumi.

$$\frac{d([CDPME] \cdot V_{Plastid})}{dt} = -V_{Plastid} \cdot \frac{k_{("04. CMK 2.7.1.148")} \cdot V_f_{("04. CMK 2.7.1.148")} \cdot \left(\frac{[CDPME]}{K_{eq_{("04. CMK 2.7.1.148")}}} - \frac{[CDPME]}{K_{mp_{("04. CMK 2.7.1.148")}}} \right)}{[CDPME] + K_{ms_{("04. CMK 2.7.1.148")}} \cdot \left(1 + \frac{[CDPME]}{K_{mp_{("04. CMK 2.7.1.148")}}} \right)}$$

$$+ V_{Plastid} \cdot \frac{k_{("03. MCT 2.7.7.60")} \cdot V_f_{("03. MCT 2.7.7.60")} \cdot \left(\frac{[MEP]}{K_{eq_{("03. MCT 2.7.7.60")}}} - \frac{[CDPME]}{K_{mp_{("03. MCT 2.7.7.60")}}} \right)}{[MEP] + K_{ms_{("03. MCT 2.7.7.60")}} \cdot \left(1 + \frac{[CDPME]}{K_{mp_{("03. MCT 2.7.7.60")}}} \right)}$$

$$\frac{d([CDPME] \cdot V_{Plastid})}{dt} = +V_{Plastid} \cdot \frac{k_{("04. CMK 2.7.1.148")} \cdot V_f_{("04. CMK 2.7.1.148")} \cdot \left(\frac{[CDPME]}{K_{eq_{("04. CMK 2.7.1.148")}}} - \frac{[CDPME]}{K_{mp_{("04. CMK 2.7.1.148")}}} \right)}{[CDPME] + K_{ms_{("04. CMK 2.7.1.148")}} \cdot \left(1 + \frac{[CDPME]}{K_{mp_{("04. CMK 2.7.1.148")}}} \right)}$$

$$- V_{Plastid} \cdot \frac{k_{("05. MDS 4.6.1.12")} \cdot V_f_{("05. MDS 4.6.1.12")} \cdot \left(\frac{[CDPME]}{K_{eq_{("05. MDS 4.6.1.12")}}} - \frac{[MecPP]}{K_{mp_{("05. MDS 4.6.1.12")}}} \right)}{[CDPME] + K_{ms_{("05. MDS 4.6.1.12")}} \cdot \left(1 + \frac{[MecPP]}{K_{mp_{("05. MDS 4.6.1.12")}}} \right)}$$

$$\frac{d([DXP] \cdot V_{Plastid})}{dt} = +V_{Plastid} \cdot \frac{k_{cb_{("01. DXS 2.2.1.7")}} \cdot k_{("01. DXS 2.2.1.7")} \cdot E_{("01. DXS 2.2.1.7")} \cdot [Pyr] \cdot [GAP]}{K_{ia_{("01. DXS 2.2.1.7")}} \cdot K_{mb_{("01. DXS 2.2.1.7")}} + K_{ma_{("01. DXS 2.2.1.7")}} \cdot [GAP] + K_{mb_{("01. DXS 2.2.1.7")}} \cdot [Pyr] + [Pyr] \cdot [GAP]}$$

$$- V_{Plastid} \cdot \frac{k_{("02. DXR 1.1.1.267")} \cdot V_f_{("02. DXR 1.1.1.267")} \cdot \left(\frac{[DXP]}{K_{eq_{("02. DXR 1.1.1.267")}}} - \frac{[MEP]}{K_{mp_{("02. DXR 1.1.1.267")}}} \right)}{[DXP] + K_{ms_{("02. DXR 1.1.1.267")}} \cdot \left(1 + \frac{[MEP]}{K_{mp_{("02. DXR 1.1.1.267")}}} \right)}$$

$$\frac{d([MEP] \cdot V_{Plastid})}{dt} = -V_{Plastid} \cdot \frac{k_{("03. MCT 2.7.7.60")} \cdot V_f_{("03. MCT 2.7.7.60")} \cdot \left(\frac{[MEP]}{K_{eq_{("03. MCT 2.7.7.60")}}} - \frac{[CDPME]}{K_{mp_{("03. MCT 2.7.7.60")}}} \right)}{[MEP] + K_{ms_{("03. MCT 2.7.7.60")}} \cdot \left(1 + \frac{[CDPME]}{K_{mp_{("03. MCT 2.7.7.60")}}} \right)}$$

$$+ V_{Plastid} \cdot \frac{k_{("02. DXR 1.1.1.267")} \cdot V_f_{("02. DXR 1.1.1.267")} \cdot \left(\frac{[DXP]}{K_{eq_{("02. DXR 1.1.1.267")}}} - \frac{[MEP]}{K_{mp_{("02. DXR 1.1.1.267")}}} \right)}{[DXP] + K_{ms_{("02. DXR 1.1.1.267")}} \cdot \left(1 + \frac{[MEP]}{K_{mp_{("02. DXR 1.1.1.267")}}} \right)}$$

$$\frac{d([MecPP] \cdot V_{Plastid})}{dt} = +V_{Plastid} \cdot \frac{k_{("05. MDS 4.6.1.12")} \cdot V_f_{("05. MDS 4.6.1.12")} \cdot \left(\frac{[CDPME]}{K_{eq_{("05. MDS 4.6.1.12")}}} - \frac{[MecPP]}{K_{mp_{("05. MDS 4.6.1.12")}}} \right)}{[CDPME] + K_{ms_{("05. MDS 4.6.1.12")}} \cdot \left(1 + \frac{[MecPP]}{K_{mp_{("05. MDS 4.6.1.12")}}} \right)}$$

$$- V_{Plastid} \cdot \frac{k_{("06. HDS 1.17.7.1")} \cdot V_f_{("06. HDS 1.17.7.1")} \cdot \left(\frac{[MecPP]}{K_{eq_{("06. HDS 1.17.7.1")}}} - \frac{[HMBPP]}{K_{mp_{("06. HDS 1.17.7.1")}}} \right)}{[MecPP] + K_{ms_{("06. HDS 1.17.7.1")}} \cdot \left(1 + \frac{[HMBPP]}{K_{mp_{("06. HDS 1.17.7.1")}}} \right)}$$

Enzīmu plūsmas nosakošie diferenciālvienādojumi

$$\begin{aligned}
\frac{d([\text{HMBPP}] \cdot V_{\text{Plastid}})}{dt} &= +V_{\text{Plastid}} \left(\frac{k_{(06. \text{HDS } 1.17.7.1)} \cdot V_f_{(06. \text{HDS } 1.17.7.1)} \cdot \left([\text{MecPP}] - \frac{[\text{HMBPP}]}{\text{Keq}_{(06. \text{HDS } 1.17.7.1)}} \right)}{[\text{MecPP}] + K_{ms_{(06. \text{HDS } 1.17.7.1)}} \cdot \left(1 + \frac{[\text{HMBPP}]}{K_{mp_{(06. \text{HDS } 1.17.7.1)}}} \right)} \right) \\
&\quad -V_{\text{Plastid}} \left(\frac{k_{(07.2 \text{ HDR } 1.17.7.4)} \cdot V_{f7b} \cdot \left([\text{HMBPP}] - \frac{[\text{DMAPP}]}{\text{Keq}_{(07.2 \text{ HDR } 1.17.7.4)}} \right)}{[\text{HMBPP}] + K_{ms_{(07.2 \text{ HDR } 1.17.7.4)}} \cdot \left(1 + \frac{[\text{DMAPP}]}{K_{mp_{(07.2 \text{ HDR } 1.17.7.4)}}} \right)} \right) \\
&\quad -V_{\text{Plastid}} \left(\frac{k_{(07.1 \text{ HDR } 1.17.7.4)} \cdot V_{f7a} \cdot \left([\text{HMBPP}] - \frac{[\text{IPP}]}{\text{Keq}_{(07.1 \text{ HDR } 1.17.7.4)}} \right)}{[\text{HMBPP}] + K_{ms_{(07.1 \text{ HDR } 1.17.7.4)}} \cdot \left(1 + \frac{[\text{IPP}]}{K_{mp_{(07.1 \text{ HDR } 1.17.7.4)}}} \right)} \right) \\
\frac{d([\text{DMAPP}] \cdot V_{\text{Plastid}})}{dt} &= -V_{\text{Plastid}} \left(\frac{k_{(09.1 \text{ ISPS } 4.2.3.27)} \cdot V_f_{(09.1 \text{ ISPS } 4.2.3.27)} \cdot \left([\text{DMAPP}] - \frac{[\text{Iso}]}{\text{Keq}_{(09.1 \text{ ISPS } 4.2.3.27)}} \right)}{[\text{DMAPP}] + K_{ms_{(09.1 \text{ ISPS } 4.2.3.27)}} \cdot \left(1 + \frac{[\text{Iso}]}{K_{mp_{(09.1 \text{ ISPS } 4.2.3.27)}}} \right)} \right) \\
&\quad +V_{\text{Plastid}} \left(\frac{k_{(07.2 \text{ HDR } 1.17.7.4)} \cdot V_{f7b} \cdot \left([\text{HMBPP}] - \frac{[\text{DMAPP}]}{\text{Keq}_{(07.2 \text{ HDR } 1.17.7.4)}} \right)}{[\text{HMBPP}] + K_{ms_{(07.2 \text{ HDR } 1.17.7.4)}} \cdot \left(1 + \frac{[\text{DMAPP}]}{K_{mp_{(07.2 \text{ HDR } 1.17.7.4)}}} \right)} \right) \\
&\quad +V_{\text{Plastid}} \left(\frac{k_{(08. \text{ IDI } 5.3.3.2)} \cdot V_f_{(08. \text{ IDI } 5.3.3.2)} \cdot \left([\text{IPP}] - \frac{[\text{DMAPP}]}{\text{Keq}_{(08. \text{ IDI } 5.3.3.2)}} \right)}{[\text{IPP}] + K_{ms_{(08. \text{ IDI } 5.3.3.2)}} + [\text{DMAPP}] + K_{mp_{(08. \text{ IDI } 5.3.3.2)}} + \frac{[\text{GPP}]}{K_{i_{(08. \text{ IDI } 5.3.3.2)}}}} \right) \\
&\quad -V_{\text{Plastid}} \left(\frac{k_{(09. \text{ GPPS } 2.5.1.1)} \cdot K_{ma_{(09. \text{ GPPS } 2.5.1.1)}} \cdot K_{mb_{(09. \text{ GPPS } 2.5.1.1)}} \cdot \left([\text{DMAPP}] \cdot [\text{IPP}] - \frac{[\text{GPP}]}{\text{Keq}_{(09. \text{ GPPS } 2.5.1.1)}} \right)}{\left(1 + \frac{[\text{DMAPP}]}{K_{ma_{(09. \text{ GPPS } 2.5.1.1)}}} \right) \cdot \left(1 + \frac{[\text{IPP}]}{K_{mb_{(09. \text{ GPPS } 2.5.1.1)}}} \right) + \frac{[\text{GPP}]}{K_{mp_{(09. \text{ GPPS } 2.5.1.1)}}}} \right) \\
\frac{d([\text{GPP}] \cdot V_{\text{Plastid}})}{dt} &= -V_{\text{Plastid}} \left(\frac{k_{(10. \text{ FPS } 2.5.1.10)} \cdot V_f_{(10. \text{ FPS } 2.5.1.10)} \cdot K_{ma_{(10. \text{ FPS } 2.5.1.10)}} \cdot K_{mb_{(10. \text{ FPS } 2.5.1.10)}} \cdot \left([\text{GPP}] \cdot [\text{IPP}] - \frac{[\text{FPP}]}{\text{Keq}_{(10. \text{ FPS } 2.5.1.10)}} \right)}{\left(1 + \frac{[\text{GPP}]}{K_{ma_{(10. \text{ FPS } 2.5.1.10)}}} \right) \cdot \left(1 + \frac{[\text{IPP}]}{K_{mb_{(10. \text{ FPS } 2.5.1.10)}}} \right) + \frac{[\text{FPP}]}{K_{mp_{(10. \text{ FPS } 2.5.1.10)}}}} \right) \\
&\quad +V_{\text{Plastid}} \left(\frac{k_{(09. \text{ GPPS } 2.5.1.1)} \cdot V_f_{(09. \text{ GPPS } 2.5.1.1)} \cdot K_{ma_{(09. \text{ GPPS } 2.5.1.1)}} \cdot K_{mb_{(09. \text{ GPPS } 2.5.1.1)}} \cdot \left([\text{DMAPP}] \cdot [\text{IPP}] - \frac{[\text{GPP}]}{\text{Keq}_{(09. \text{ GPPS } 2.5.1.1)}} \right)}{\left(1 + \frac{[\text{DMAPP}]}{K_{ma_{(09. \text{ GPPS } 2.5.1.1)}}} \right) \cdot \left(1 + \frac{[\text{IPP}]}{K_{mb_{(09. \text{ GPPS } 2.5.1.1)}}} \right) + \frac{[\text{GPP}]}{K_{mp_{(09. \text{ GPPS } 2.5.1.1)}}}} \right)
\end{aligned}$$

Enzīmu plūsmas nosakošie diferenciālvienādojumi.

$$\begin{aligned}
\frac{d([IPP] \cdot V_{\text{Plastid}})}{dt} = & -V_{\text{Plastid}} \cdot \left(\frac{k_{("10. FPS 2.5.1.10")} \cdot \frac{V_f_{("10. FPS 2.5.1.10")}}{K_{ma_{("10. FPS 2.5.1.10")}} \cdot K_{mb_{("10. FPS 2.5.1.10")}} \cdot \left(\frac{[GPP] \cdot [IPP] - [FPP]}{K_{eq_{("10. FPS 2.5.1.10")}}} \right)}{\left(1 + \frac{[GPP]}{K_{ma_{("10. FPS 2.5.1.10")}}} \right) \cdot \left(1 + \frac{[IPP]}{K_{mb_{("10. FPS 2.5.1.10")}}} \right) + \frac{[FPP]}{K_{mp_{("10. FPS 2.5.1.10")}}}} \right) \\
& -V_{\text{Plastid}} \cdot \left(\frac{k_{("12.1 AtSPS 2.5.1.85")} \cdot \frac{V_f_{("12.1 AtSPS 2.5.1.85")}}{K_{ma_{("12.1 AtSPS 2.5.1.85")}} \cdot K_{mb_{("12.1 AtSPS 2.5.1.85")}} \cdot \left(\frac{[GGPP] \cdot [IPP] - ["Non-PP"]}{K_{eq_{("12.1 AtSPS 2.5.1.85")}}} \right)}{\left(1 + \frac{[GGPP]}{K_{ma_{("12.1 AtSPS 2.5.1.85")}}} \right) \cdot \left(1 + \frac{[IPP]}{K_{mb_{("12.1 AtSPS 2.5.1.85")}}} \right) + \frac{["Non-PP"]}{K_{mp_{("12.1 AtSPS 2.5.1.85")}}}} \right) \\
& -V_{\text{Plastid}} \cdot \left(\frac{k_{("11.GGPPS 2.5.1.29")} \cdot \frac{V_f_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}}{K_{ma_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}} \cdot K_{mb_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}} \cdot \left(\frac{[FPP] \cdot [IPP] - [GGPP]}{K_{eq_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}}} \right)}{\left(1 + \frac{[FPP]}{K_{ma_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}}} \right) \cdot \left(1 + \frac{[IPP]}{K_{mb_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}}} \right) + \frac{[GGPP]}{K_{mp_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}}}} \right) \\
& +V_{\text{Plastid}} \cdot \left(\frac{k_{("07.1 HDR 1.17.7.4")} \cdot \frac{V_f7a \cdot [HMBPP] - [IPP]}{K_{eq_{("07.1 HDR 1.17.7.4")}}} \right) \\
& \left(\frac{[HMBPP] + K_{ms_{("07.1 HDR 1.17.7.4")}} \cdot \left(1 + \frac{[IPP]}{K_{mp_{("07.1 HDR 1.17.7.4")}}} \right)}{\left(1 + \frac{[IPP]}{K_{mp_{("07.1 HDR 1.17.7.4")}}} \right)} \right) \\
& -V_{\text{Plastid}} \cdot \left(\frac{k_{("08. IDI 5.3.3.2")} \cdot \frac{V_f_{("08. IDI 5.3.3.2")} \cdot \left([IPP] - \frac{[DMAPP]}{K_{eq_{("08. IDI 5.3.3.2")}}} \right)}{[IPP] + K_{ms_{("08. IDI 5.3.3.2")}} + [DMAPP] + K_{mp_{("08. IDI 5.3.3.2")}} + \frac{[GPP]}{K_i_{("08. IDI 5.3.3.2")}}} \right) \\
& -V_{\text{Plastid}} \cdot \left(\frac{k_{("09. GPPS 2.5.1.1")} \cdot \frac{V_f_{("09. GPPS 2.5.1.1")}}{K_{ma_{("09. GPPS 2.5.1.1")}} \cdot K_{mb_{("09. GPPS 2.5.1.1")}} \cdot \left(\frac{[DMAPP] \cdot [IPP] - [GPP]}{K_{eq_{("09. GPPS 2.5.1.1")}}} \right)}{\left(1 + \frac{[DMAPP]}{K_{ma_{("09. GPPS 2.5.1.1")}}} \right) \cdot \left(1 + \frac{[IPP]}{K_{mb_{("09. GPPS 2.5.1.1")}}} \right) + \frac{[GPP]}{K_{mp_{("09. GPPS 2.5.1.1")}}}} \right)
\end{aligned}$$

Enzīmu plūsmas nosakošie diferenciālvienādojumi.

$$\begin{aligned}
\frac{d([GGPP] \cdot V_{Plastid})}{dt} = & -2 \cdot V_{Plastid} \cdot \left(\frac{k_{("12.4 PSY 2.5.1.32")} \cdot \frac{Vf_{("12.4 PSY 2.5.1.32")}}{Kma_{("12.4 PSY 2.5.1.32")} \cdot Kmb_{("12.4 PSY 2.5.1.32")}} \cdot \left([GGPP] \cdot [GGPP] - \frac{["15-c-Phy"]}{Keq_{("12.4 PSY 2.5.1.32")}} \right)}{\left(1 + \frac{[GGPP]}{Kma_{("12.4 PSY 2.5.1.32")}} \right) \cdot \left(1 + \frac{[GGPP]}{Kmb_{("12.4 PSY 2.5.1.32")}} \right) + \frac{["15-c-Phy"]}{Kmp_{("12.4 PSY 2.5.1.32")}}} \right) \\
& - V_{Plastid} \cdot \left(\frac{k_{("12.2 GGPPR 1.3.1.83")} \cdot Vf_{("12.2 GGPPR 1.3.1.83")} \cdot \left([GGPP] - \frac{["Ph-PP"]} {Keq_{("12.2 GGPPR 1.3.1.83")}} \right)}{[GGPP] + Kms_{("12.2 GGPPR 1.3.1.83")} \cdot \left(1 + \frac{["Ph-PP"]} {Kmp_{("12.2 GGPPR 1.3.1.83")}} \right)} \right) \\
& - V_{Plastid} \cdot \left(\frac{k_{("12.1 AtSPS 2.5.1.85")} \cdot \frac{Vf_{("12.1 AtSPS 2.5.1.85")}}{Kma_{("12.1 AtSPS 2.5.1.85")} \cdot Kmb_{("12.1 AtSPS 2.5.1.85")}} \cdot \left([GGPP] \cdot [IPP] - \frac{["Non-PP"]} {Keq_{("12.1 AtSPS 2.5.1.85")}} \right)}{\left(1 + \frac{[GGPP]}{Kma_{("12.1 AtSPS 2.5.1.85")}} \right) \cdot \left(1 + \frac{[IPP]}{Kmb_{("12.1 AtSPS 2.5.1.85")}} \right) + \frac{["Non-PP"]} {Kmp_{("12.1 AtSPS 2.5.1.85")}}} \right) \\
& - V_{Plastid} \cdot \left(\frac{k_{("12.3 ChS 2.5.1.62")} \cdot Vf_{("12.3 ChS 2.5.1.62")} \cdot \left([GGPP] - \frac{["GG-Chl"]} {Keq_{("12.3 ChS 2.5.1.62")}} \right)}{[GGPP] + Kms_{("12.3 ChS 2.5.1.62")} \cdot \left(1 + \frac{["GG-Chl"]} {Kmp_{("12.3 ChS 2.5.1.62")}} \right)} \right) \\
& + V_{Plastid} \cdot \left(\frac{k_{("11.GGPPS 2.5.1.29")} \cdot \frac{Vf_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}}{Kma_{("11.GGPPS 2.5.1.29")} \cdot Kmb_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}} \cdot \left([FPP] \cdot [IPP] - \frac{[GGPP]} {Keq_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}} \right)}{\left(1 + \frac{[FPP]}{Kma_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}} \right) \cdot \left(1 + \frac{[IPP]}{Kmb_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}} \right) + \frac{[GGPP]} {Kmp_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}}} \right) \\
\frac{d([FPP] \cdot V_{Plastid})}{dt} = & + V_{Plastid} \cdot \left(\frac{k_{("10. FPS 2.5.1.10")} \cdot \frac{Vf_{("10. FPS 2.5.1.10")}}{Kma_{("10. FPS 2.5.1.10")} \cdot Kmb_{("10. FPS 2.5.1.10")}} \cdot \left([GPP] \cdot [IPP] - \frac{[FPP]} {Keq_{("10. FPS 2.5.1.10")}} \right)}{\left(1 + \frac{[GPP]}{Kma_{("10. FPS 2.5.1.10")}} \right) \cdot \left(1 + \frac{[IPP]}{Kmb_{("10. FPS 2.5.1.10")}} \right) + \frac{[FPP]} {Kmp_{("10. FPS 2.5.1.10")}}} \right) \\
& - V_{Plastid} \cdot \left(\frac{k_{("11.1 ACS 4.2.1.133")} \cdot Vf_{("11.1 ACS 4.2.1.133")} \cdot \left([FPP] - \frac{["C-8-PP"]} {Keq_{("11.1 ACS 4.2.1.133")}} \right)}{[FPP] + Kms_{("11.1 ACS 4.2.1.133")} \cdot \left(1 + \frac{["C-8-PP"]} {Kmp_{("11.1 ACS 4.2.1.133")}} \right)} \right) \\
& - V_{Plastid} \cdot \left(\frac{k_{("11.GGPPS 2.5.1.29")} \cdot \frac{Vf_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}}{Kma_{("11.GGPPS 2.5.1.29")} \cdot Kmb_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}} \cdot \left([FPP] \cdot [IPP] - \frac{[GGPP]} {Keq_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}} \right)}{\left(1 + \frac{[FPP]}{Kma_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}} \right) \cdot \left(1 + \frac{[IPP]}{Kmb_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}} \right) + \frac{[GGPP]} {Kmp_{("11.GGPPS 2.5.1.29")}}} \right)
\end{aligned}$$

$$Vf7a = 3.7 \cdot 0.833 \cdot Values[E7].InitialValue$$

$$Vf7b = 3.7 \cdot 0.167 \cdot Values[E7].InitialValue$$

$$SumIPP/DMAPP = [DMAPP] + [IPP]$$