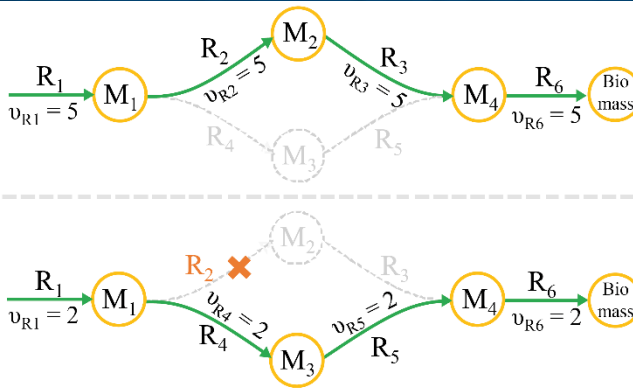


رساله دکتری

بررسی سامانه‌ای تغییرات عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در تشخیص و درمان بیماری‌ها
مهدی دهقان منشادی



استاد راهنما:
دکتر پیام ستوده

دانشکده مهندسی شیمی، نفت و گاز



دانشکده مهندسی شیمی، نفت و گاز

رساله دکتری در رشته

مهندسی شیمی-بدون گرایش

بررسی سامانه‌ای تغییرات عملکردی شبکه‌های متابولیکی و
کاربردهای آن در تشخیص و درمان بیماری‌ها

به کوشش

مهدی دهقان منشادی

استاد راهنما

دکتر پیام ستوده

شهریور ۱۴۰۲

رسالة محمد

به نام خدا

تعهدنامه

اینجانب مهدی دهقان منشادی به شماره دانشجویی ۹۷۳۰۴۵۰ دانشجوی مقطع دکتری تأیید می‌کنم که این رساله حاصل پژوهش خودم است و در مواردی که از منابع دیگران استفاده شده، نشانی دقیق و مشخصات کامل آن را نوشته‌ام. همچنین اظهار می‌نمایم که تحقیق و موضوع رساله‌ام تکراری نیست و موارد زیر را نیز تعهد می‌کنم:

۱- بدون کسب مجوز دانشگاه شیراز و اجازه از استاد، تمام یا قسمتی از دستاوردهای رساله خود را در مجامع و رسانه‌های علمی اعم از همایش‌ها و مجلات داخلی و خارجی به صورت مکتوب یا غیرمکتوب منتشر ننمایم.

۲- اسامی افراد خارج از کمیته رساله را بدون اجازه استاد راهنما به جمع نویسندگان مقاله-های مستخرج از رساله اضافه نکنم.

۳- از درج نشانی یا وابستگی کاری (affiliation) نویسندگان سازمان‌های دیگر (غیر از دانشگاه شیراز) در مقاله‌های مستخرج از رساله بدون تأیید استاد راهنما اجتناب نمایم.

همه حقوق مادی و معنوی این اثر مطابق با آیین‌نامه مالکیت فکری، متعلق به دانشگاه شیراز است. چنانچه مبادرت به عملی خلاف این تعهدنامه محرز گردد، دانشگاه شیراز در هر زمان و به هر نحو مقتضی حق هرگونه اقدام قانونی را در استیفای حقوق خود دارد.

مهدی دهقان منشادی

امضا و تاریخ:

۱۴۰۲/۰۵/۱۵ سال

به نام خدا

بررسی سامانه‌ای تغییرات عملکردی شبکه‌های متابولیکی و
کاربردهای آن در تشخیص و درمان بیماری‌ها

به کوشش

مهدی دهقان منشادی

رساله

ارائه شده به دانشگاه شیراز به عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی لازم

برای اخذ درجه دکتری

در رشته

مهندسی شیمی-بدون گرایش

دانشگاه شیراز

شیراز

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی کمیته رساله، با درجه:

- دکتر پیام ستوده، دانشیار بخش مهندسی شیمی (استاد راهنما)
- دکتر مهرزاد فیلی‌زاده، دانشیار بخش مهندسی شیمی (استاد مشاور)
- دکتر هابیل زارع، استادیار بخش سیستم‌های سلولی و آناتومی دانشگاه
مرکز علوم بهداشت دانشگاه تگزاس (استاد مشاور)
- دکتر محمد حسین مروت، دانشیار بخش بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده
داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شیراز (داور خارجی)
- ... دکتر محمد خرم، دانشیار بخش گاز دانشگاه شیراز (داور متخصص
داخلی)

شهریور ۱۴۰۲

تقدیم به:

همسر مهربان و فداکارم که تمام طول تحصیل همراه و همگام من بوده است.
پدرم که از تو هر چه می‌گویم باز هم کم می‌آورم و مادر عزیزم که مهربان‌ترین
مهربانان است.

خانواده محترم همسرم که مرا همچون فرزند خود دانسته و همچون پدر و مادری
دلسوز در این مسیر کنار من بوده‌اند.

تقدیم به همه دوستانی که صبورانه مرا همراهی کرده و در مراحل مختلف این
پژوهش، راهنمایی‌هایی ارزنده و سازنده به من عطا فرمودند.

سپاس‌گزاری

شکر و سپاس از خالق توانا و بی‌همتا که هر آن و هر لحظه از نعمات و عنایت او بهرماندیم. هر چند بندگی فقط شایسته ذات بی‌همتای خالق هستی آفرین است. لیکن به مصادیق حدیث شریفه «هر کس حرفی به من بیاموزد مرا بنده خود کرده است»، استاد هم‌چنان شأن و مقام والایی دارد که دریای علم و معرفت و پرچم دار توحید هم خود را بنده کسی می‌داند که حتی یک حرف به او بیاموزد.

لذا بر خود لازم می‌دانم که از زحمات بی‌دریغ استاد راهنمای عزیزم جناب آقای دکتر پیام ستوده از صمیم قلب تقدیر و تشکر نمایم.

همچنین از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر هابیل زارع که در مراحل مختلف این پژوهش، راهنمایی‌های ارزنده و سازنده خود را بر من ارزانی داشته و از هیچ کوششی در این زمینه دریغ ننمودند، کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

بر خود لازم میدانم از همکاری‌های صمیمانه استادان دانشمند و پر مایه‌ام جناب آقایان دکتر امین رضانی و دکتر مهرزاد فیلی‌زاده که از محضر پر فیض ایشان بهره‌ها برده‌ام، تشکر و سپاس‌گزاری نمایم.

از جناب آقایان دکتر محمد خرم و دکتر محمد حسین مروت که زحمت داوری این رساله را به عهده داشتند سپاس فراوان دارم.

چکیده

بررسی سامانه‌ای تغییرات عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در
تشخیص و درمان بیماری‌ها

به کوشش

مهدی دهقان منشادی

بررسی سامانه‌ای تغییرات متابولیکی سلول‌های سرطانی یا عملکرد متابولیکی میکروارگانیسم‌های بیماریزا امکان ارائه روش‌های درمانی خاصی جهت هدف‌گیری این سلول‌ها و کمینه کردن اثرات جانبی بر روی سلول‌های سالم را فراهم می‌کند. با این حال، حمله به تک ژن‌های حیاتی اغلب با چالش‌هایی از جمله مقاومت دارویی و یا نبود هدف قابل دسترس رو به رو است. استفاده از مفهوم کشندگی مصنوعی می‌تواند یک رویکرد جایگزین جهت مقابله با چالش‌های بیان شده باشد. مجموعه‌های کشنده مصنوعی (SL) اهدافی هستند که حمله به آن‌ها به صورت جداگانه تأثیر قابل توجهی بر سلول ندارند، اما در صورتی که به طور همزمان از سلول حذف شوند، عملکرد سیستم را مختل می‌کنند. از آنجایی که زیست‌شناسی سامانه‌ای محاسباتی رویکردی کارآمد جهت پاسخ به پرسش‌های زیست‌پزشکی از طریق بررسی برهم‌کنش‌های پیچیده‌ی شبکه‌های زیستی است، در این پژوهش از این رویکرد جهت شناسایی مجموعه‌های کشنده مصنوعی به عنوان اهداف دارویی استفاده شده است. با توجه به پیچیدگی‌های موجود در ایجاد و بکارگیری مدل‌های سلول انسانی، ابتدا روش‌های مورد نظر بر روی سلول‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا پروکاریوتی باکتریایی توسعه داده و ارزیابی شد. به عنوان نتیجه در این گام، اهداف دارویی انتخابی جهت حمله هدفمند به مجموعه‌ای خاص از باکتری‌ها ارائه شد. در آخرین گام، از روش‌های توسعه داده شده جهت یافتن اهداف دارویی جهت مبارزه با سلول‌های سرطانی استفاده شد و برای نخستین بار مفهوم هدف دارویی «اکیداً انتخابی» مطرح گردید.

این پژوهش در سه گام ارائه شده است که در نخستین گام آن روشی به نام Rapid-SL برای شناسایی مجموعه کشنده‌های مصنوعی در یک مدل متابولیکی ژنوم-مقیاس ارائه شد. این روش از جستجوی اول-عمق و توابع بازگشتی برای کاهش زمان جستجو در یافتن مجموعه کشنده‌های مصنوعی مرتبه بالا استفاده می‌کند. اعتبارسنجی نتایج نشان داد که روش Rapid-SL نسبت به روش‌های پیشین، به صورت چشم‌گیری تعداد مسائل بهینه‌سازی حل شده را برای بدست آوردن مجموعه کشنده‌های مصنوعی، کاهش می‌دهد. همچنین پیاده‌سازی روش Rapid-SL به صورت

مجموعه‌ای از توابع بازگشتی و استفاده از جستجوی اول-عمق، امکان انجام محاسبات موازی را فراهم می‌کند و قابلیت جستجوی هدفمند و یا جستجو در بخش‌های دلخواه از سیستم را به کاربر می‌دهد. این قابلیت باعث می‌شود تا تنها با بررسی بخش بسیار کوچکی از فضای جستجو، بخش عمده‌ای از همه راه حل‌های مورد نظر قابل دستیابی باشند.

در گام دوم، با استفاده از روش توسعه داده شده، مجموعه کشنده‌های مصنوعی دوگانه، سه‌گانه و چهارگانه برای یک مجموعه شش عضوی از میکروارگانیسم‌ها شناسایی شد. ترکیب‌های مختلفی از این میکروارگانیسم‌ها در ۶۶۵ حالت مختلف بررسی شد تا هدف‌های دارویی بالقوه انتخابی برای حفظ میکروارگانیسم‌های مورد نظر و حذف میکروارگانیسم‌های هدف شناسایی شود. نتایج نشان داد که بیشتر مسیرهای مرتبط با سنتز دیواره سلولی و تکثیر DNA که هدف بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های موجود هستند، در تمام گروه‌های مورد مطالعه مورد هدف واقع شده‌اند. نهایتاً با استفاده از راه حل‌های مختلف بدست آمده، مجموعه‌ای کوچک از اهداف که شامل ۷ عضو می‌باشد جهت پوشش بخش قابل توجهی از ۶۶۵ حالت مورد بررسی، معرفی شدند. در قسمت سوم از این پژوهش، به شناسایی اهداف دارویی اکیداً انتخابی با استفاده از مدل‌های ژنوم-مقیاس پرداخته شد. اهداف اکیداً انتخابی به معنی این است که اهداف معرفی شده تنها بر روی سلول‌های سرطانی تأثیر گذاشته و در مقابل به هیچ یک از بافت‌های سالم بدن آسیب نرساند. در این راستا، مدل‌های بافت-خاص از ۱۳ بافت مختلف بازسازی شد و مورد مطالعه قرار گرفت. سپس با استفاده از روش Rapid-SL، مجموعه کشنده‌های مصنوعی دوگانه، سه‌گانه و چهارگانه برای هر یک از مدل‌های بافت-خاص سرطانی شناسایی شدند. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش کاردینالیت‌ها مجموعه کشنده‌های مصنوعی، امکان دستیابی به راه حل‌های اکیداً انتخابی افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر، مجموعه کشنده‌های مصنوعی مرتبه بالا، قابلیت ارائه اهدافی را دارند که تنها بر روی سلول‌های سرطانی تأثیر می‌گذارد و در عین حال کمترین اثرات جانبی را بر روی سلول‌های سالم بافت‌های مختلف بدن دارد. نتایج به دست آمده در این پژوهش به عنوان یک مسیر پیشنهادی جدید در تحقیقات آزمایشگاهی در مبارزه با سرطان پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: زیست‌شناسی سامانه‌ای، مدل‌های متابولیکی ژنوم-مقیاس، مدلسازی مبتنی بر محدودیت، اهداف دارویی انتخابی، سرطان، مجموعه‌های کشنده مصنوعی

فهرست مطالب

| عنوان | صفحه |
|--|------|
| فصل اول..... | ۱ |
| ۱-۱- اهمیت زیست شناسی سامانه‌ای | ۱ |
| ۲-۱- بیان اجزا و فرآیندهای سامانه‌های زیستی در قالب یک شبکه | ۲ |
| ۳-۱- شبکه‌های متابولیکی | ۳ |
| ۴-۱- اهمیت بررسی تغییرات عملکردی در شبکه متابولیکی | ۵ |
| ۱-۴-۱- شناسایی اهداف دارویی گزینشی جهت مبارزه با عوامل بیماری‌زا | ۶ |
| ۲-۴-۱- داروهای گزینشی جهت مبارزه با سلول‌های سرطانی | ۷ |
| ۳-۴-۱- معرفی داروهایی چند هدفه | ۸ |
| ۵-۱- هدف پژوهش | ۹ |
| ۶-۱- ترتیب نگارش رساله | ۱۰ |
| فصل دوم..... | ۱۱ |
| ۱-۲- مقدمه | ۱۱ |
| ۲-۲- زیست‌شناسی سامانه‌های محاسباتی | ۱۲ |
| ۳-۲- جعبه ابزارهای توسعه داده شده جهت بررسی مدل‌های مبتنی بر محدودیت | ۱۲ |
| ۴-۲- بررسی تاثیر حذف اهداف مختلف از شبکه و مفهوم کشندگی مصنوعی | ۱۴ |
| ۵-۲- روش‌های محاسباتی مبتنی بر محدودیت جهت شناسایی مجموعه کشنده‌های مصنوعی | ۱۵ |
| ۶-۲- به کارگیری روش‌های محاسباتی با هدف یافتن اهداف دارویی برای مقابله با | |

| | |
|----|---|
| ۱۷ | میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا |
| ۱۸ | ۷-۲- ایجاد مدل‌های متابولیکی بافت-خاص |
| ۲۲ | ۸-۲- کاربرد مدل‌های متابولیکی بافت-خاص |
| ۲۵ | فصل سوم |
| ۲۵ | ۱-۳- انتخاب روش مدل‌سازی |
| ۲۶ | ۲-۳- مدل‌سازی مبتنی بر محدودیت |
| ۲۷ | ۳-۳- اجزای مدل‌های متابولیکی ژنوم-مقیاس |
| ۲۸ | ۱-۳-۳- ماتریس استوکیومتری |
| ۲۸ | ۲-۳-۳- ظرفیت‌ها |
| ۲۹ | ۳-۳-۳- قوانین ارتباط ژن-پروتئین-واکنش (GPR) |
| ۲۹ | ۴-۳- تحلیل موازنه جریان (FBA) |
| ۳۱ | ۵-۳- تحلیل تغییرات جریان (FVA) |
| ۳۲ | ۶-۳- شبیه‌سازی حذف واکنش و ژن |
| ۳۲ | ۱-۶-۳- شبیه‌سازی حذف واکنش |
| ۳۲ | ۲-۶-۳- شبیه‌سازی حذف ژن |
| ۳۲ | ۷-۳- جستجوی اول-عمق (DFS) |
| ۳۳ | ۸-۳- روش rFASTCORMICS |
| ۳۷ | فصل چهارم |
| ۳۷ | ۱-۴- مقدمه |
| ۳۷ | ۲-۴- نحوه پیاده‌سازی روش Rapid-SL |

- ۳۸-۲-۴-۱ گام اول: شناسایی Seed Space.....
- ۳۹-۲-۴-۲ گام دوم: جستجو در Seed Space.....
- ۴۰-۳-۲-۴-۳ شرایط عقبگرد و توقف در الگوریتم DFS.....
- ۴۲-۴-۲-۴-۴ شمارش مجموعه‌های ژن‌های کشنده مصنوعی.....
- ۴۳-۳-۴-۳ ارزیابی و مقایسه روش توسعه داده شده با روش‌های پیشین.....
- ۴۳-۱-۳-۴-۱ کشنده‌های مصنوعی مربوط به سه میکروارگانیزم مورد مطالعه.....
- ۴۳-۲-۳-۴-۲ مقایسه عملکرد روش Rapid-SL و روش‌های MCSEnumerator.....
- ۴۴-۴-۴-۴ گسترش دامنه عملکرد Rapid-SL.....
- ۴۵-۱-۴-۴-۱ جستجوی در لیستی از اهداف خاص.....
- ۴۵-۲-۴-۴-۲ اعمال محدودیت در شاخه‌زنی الگوریتم DFS.....
- ۴۶-۳-۴-۴-۳ بررسی انتخابی در بین شاخه‌های DFS.....
- ۴۸-۵-۴-۵ جمع بندی.....
- ۵۱ فصل پنجم.....
- ۵۱-۱-۵-۱ مقدمه.....
- ۵۳-۲-۵-۲ معرفی گام‌های پیاده سازی روش.....
- ۵۳-۱-۲-۵-۱ مرحله اول: انتخاب مدل‌های متابولیک ژنوم مقیاس.....
- ۵۳-۲-۲-۵-۲ مرحله دوم: تعریف شرایط محیطی مختلف.....
- ۵۳-۳-۲-۵-۳ مرحله سوم: شناسایی مجموعه‌های کشنده مصنوعی.....
- ۵۴-۴-۲-۵-۴ مرحله چهارم: اهداف دارویی بالقوه‌گزینشی و چند هدفه.....
- ۵۴-۵-۲-۵-۵ مرحله پنجم: اعمال محدودیت‌های سختگیرانه دیگر.....
- ۵۵-۳-۵-۳ بررسی موردی برخی از حالت‌های خاص از پاسخ‌های بدست آمده.....

- ۵-۳-۱- هدف قرار دادن همه میکروارگانیزم‌ها به جز یکی ۵۶
- ۵-۳-۲- حفظ همه میکروارگانیزم‌ها به جز یکی ۵۶
- ۵-۳-۳- موارد بدون راه حل بالقوه ۵۷
- ۵-۴-۱- مشارکت مسیرها متابولیکی در کیس‌های مختلف ۵۷
- ۵-۴-۱- مسیرهایی که بیشترین دفعات مورد حمله قرار گرفته‌اند ۵۸
- ۵-۴-۲- مسیرهایی که فقط توسط مجموعه‌های کشنده مصنوعی هدف قرار می‌گیرند ۵۸
- ۵-۵- واکنش‌های کلیدی ۵۹
- ۵-۶- جمع بندی ۶۲
- فصل ششم ۶۵**
- ۶-۱- مقدمه ۶۵
- ۶-۲- نحوه پیاده‌سازی روش ۶۵
- ۶-۲-۱- بازسازی مدل‌های بافت-خاص ۶۵
- ۶-۲-۲- استخراج مجموعه‌های کشنده مصنوعی ۶۶
- ۶-۲-۳- معیارهای انتخاب اهداف دارویی اکیداً انتخابی ۶۶
- ۶-۳- نتایج ۶۶
- ۶-۴- بحث در نتایج ۶۸
- فصل هفتم ۷۱**
- ۷-۱- توسعه نرم‌افزاری ۷۱
- ۷-۲- یافتن اهداف انتخابی در یک مجموعه باکتریایی با شناسایی مجموعه SL ۷۲
- ۷-۳- یافتن اهداف دارویی انتخابی جهت مبارزه با سرطان ۷۴

- پیوست‌ها ۹۰
- پیوست ۱- کد مربوط به روش Rapid-SL و شبیه کد مربوطه ۹۱
- پیوست ۲- اهداف دارویی انتخابی شناسایی شده در فصل پنجم ۹۳
- پیوست ۳- تعداد پاسخ‌های شناسایی شده در گام چهارم و پنجم ۹۵
- پیوست ۴- نرخ مشارکت مسیرها (Pathways) در کیس‌های مختلف ۱۳۱
- پیوست ۵- لیست بافت‌های سرطانی مورد مطالعه و راه‌حل‌های اکیداً انتخابی
بدست آمده برای آن‌ها ۱۳۵

فهرست جدول‌ها

| صفحه | عنوان |
|------|---|
| ۱۳ | جدول ۱-۲- محدودیت..... جعبه ابزارهای توسعه داده شده جهت مدل‌سازی و تحلیل مبتنی بر محدودیت..... |
| ۱۹ | جدول ۲-۲- خلاصه‌ای از روش‌های تولید مدل‌های بافت-خاص |
| ۲۳ | جدول ۳-۲- خلاصه‌ای از پژوهش‌های پیشین در زمینه بکارگیری مدل‌های بافت-خاص..... |
| ۴۴ | جدول ۱-۴- مقایسه تعداد مسائل بهینه‌سازی خطی حل شده در Rapid-SL و Fast-SL برای سه مدل مورد ارزیابی..... |
| ۴۴ | جدول ۲-۴- مقایسه روش‌های Rapid-SL و CNAMCSEnumerator2..... |
| ۴۶ | جدول ۳-۴- تعداد SLها و LPهای مربوطه در هر گروه از شاخه‌های Rapid-SL، جهت شناسایی کشنده‌های تکی تا چهارتایی توسط مدل i.AF1260. شاخه‌ها بر اساس تعداد اعضا در گره شروع خود گروه بندی شده‌اند. ارزیابی گروه اول به تنهایی بیش از ۳۴ درصد از SLها را شناسایی می‌کند، در حالی که تنها حدود ۰/۶۵ درصد از LPها در این گروه مورد بررسی قرار می‌گیرند..... |
| ۴۶ | جدول ۴-۴- SLهای شناسایی شده با ارزیابی شاخه‌های دارای یک واکنش در گره اولیه (گروه ۱ در جدول ۳-۴)..... |
| ۴۷ | جدول ۵-۴- نتایج سه کاربرد معرفی شده..... |
| ۴۸ | جدول ۱-۵- لیست میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در این فصل و اسامی مدل‌های مربوط به هر یک از آنها..... |
| ۵۲ | جدول ۲-۵- تعداد پاسخ‌های به دست آمده برای مواردی که در آنها همه میکروارگانیسم‌ها به جز یکی هدف قرار می‌گیرند. T نماینده میکروارگانیسم‌های هدف و C نماینده میکروارگانیسم‌های حفاظت شده است..... |
| ۵۶ | جدول ۳-۵- تعداد پاسخ‌های بالقوه شناسایی شده در مواردی که تنها یک میکروارگانیسم هدف قرار گرفته و قابلیت رشد دیگر میکروارگانیسم‌ها حفاظت شده است. T نماینده میکروارگانیسم‌های هدف و C نماینده میکروارگانیسم‌های حفاظت شده است..... |
| ۵۷ | جدول ۴-۵- لیست مسیرهایی که در تمام ۶۳ مورد بدون میکروارگانیسم حفاظت شده، مورد حمله قرار می‌گیرند..... |
| ۵۹ | جدول ۵-۵- مجموعه‌ای از چهار واکنش که زیرمجموعه‌های آن ۱۹۸ کیس از ۶۵۷ کیس |

- مورد مطالعه را پوشش می‌دهد. ۶۰
- جدول ۵-۶- مجموعه‌ای از هفت واکنش که زیرمجموعه آن‌ها ۲۳۶ مورد را پوشش می‌دهند
نام دارو و اهداف مرتبط از پایگاه داده DrugBank به دست آمده است. ۶۱
- جدول ۶-۱- تعداد راه حل‌های بدست آمده برای سرطان COAD در دو حالتی که سلول‌های
سالم روده به صورت محافظت شده در نظر گرفته شده و یا نشده باشند. ۶۷

فهرست شکل‌ها

| عنوان | صفحه |
|---|------|
| شکل ۱-۲- شمایی از مفهوم کشف‌کنندگی مصنوعی..... | ۱۵ |
| شکل ۱-۳- واکنش‌های R1، R3، R4، R6، و R9 واکنش‌های تبادلی هستند (نشان داده شده با رنگ بنفش). قوانین ژن-پروتئین-واکنش (Gene-Protein-Reaction) از طریق ژن‌ها (مربع‌های سبز) که با اپراتورهای Boolean ارتباط دارند نشان داده شده‌اند..... | ۲۷ |
| شکل ۲-۳- نمایش ساختار اساسی مدل متابولیکی برای شبکه نشان داده شده در شکل ۱-۳ که محدودیت‌های وضعیت پایا را تعیین می‌کند..... | ۲۸ |
| شکل ۳-۳- مراحل محاسبه جریان در شبکه متابولیکی بازسازی شده به وسیله تحلیل موازنه جریان (FBA)..... | ۳۰ |
| شکل ۴-۳- نمودار شماتیک محدوده تولید..... | ۳۱ |
| شکل ۵-۳- نحوه پیمایش یک گراف شماتیک با استفاده از روش جست‌وجو اول-عمق..... | ۳۳ |
| شکل ۶-۳- شماتیکی از نحوه عملکرد روش rFASTCORMICS..... | ۳۵ |
| شکل ۱-۴- فلوجارت مربوط به روش توسعه داده شده..... | ۳۸ |
| شکل ۲-۴- اثر حذف واکنش غیر کشنده J_{nz} | ۴۰ |
| شکل ۳-۴- شماتیکی از جستجوی عمقی در پیاده سازی روش Rapid-SL..... | ۴۲ |
| شکل ۱-۵- درخت فیلوژنتیک شش میکروارگانیسم بدست آمده توسط iTOL..... | ۵۲ |
| شکل ۲-۵- شماتیک موارد مختلف مورد مطالعه..... | ۵۵ |
| شکل ۱-۶- تعداد هدف‌های دارویی انتخابی بالقوه که با در نظر گرفتن سلول‌های سالم مختلف به عنوان محافظت شده و سلول‌های COAD به عنوان هدف، شناسایی شده‌اند..... | ۶۸ |
| شکل ۲-۶- هدف‌های دارویی بالاقوه اکیداً انتخابی شناسایی شده در این مطالعه..... | ۶۹ |

فهرست نشانه های اختصاری

| نشانه | مفهوم | نشانه | مفهوم |
|----------|----------------------------------|-------|-------------------------------|
| μ | مقدار میانگین داده های بیان | v | وکتور جریان عبوری از واکنش ها |
| σ | مقدار انحراف معیار داده های بیان | S | ماتریس استوکیومتری |

فصل اول

مقدمه

۱-۱- اهمیت زیست‌شناسی سامانه‌ای^۱

زیست‌شناسی سامانه‌ای زمینه‌ای چندرشته‌ای و نوظهور است که به مطالعه ساز و کار فرآیندهای پیچیده زیستی به عنوان سامانه‌هایی یکپارچه^۲ با اجزای متعدد می‌پردازد. به طور ویژه، زیست‌شناسی سامانه‌ای شامل جمع‌آوری مجموعه‌های بزرگ داده‌های آزمایشگاهی (ژنومی، پروتئومی و یا متابولومی)^۳، ایجاد مدل‌های پیش‌بین^۴ رایانه محور مبتنی بر داده‌های جمع‌آوری شده و همچنین ارزیابی و تصحیح این مدل‌ها با مقایسه‌ی داده‌های پیش‌بینی شده و داده‌های آزمایشگاهی، می‌باشد [۱-۳]. جزء جدایی‌ناپذیر در زیست‌شناسی سامانه‌ای، مفهوم مدل‌سازی یا شبیه‌سازی رایانه‌ای است. لازم به ذکر است برای تاکید بر اهمیت این مسئله و گستردگی آن، زمینه جدیدی به اسم «زیست‌شناسی سامانه‌ای محاسباتی»^۵ پدید آمده است [۴]. زیست‌شناسی سامانه‌ای محاسباتی در زمینه‌های بسیار گسترده‌ای همچون مهندسی متابولیکی و یافتن اهداف دارویی جدید بسیار کارآمد خواهد بود. امید به کشف اهداف دارویی و ارزیابی آن‌ها با روش‌هایی بهتر، سریع‌تر و ارزان‌تر توسط ابزارهای جدید در این زمینه، علاقه محققان دارویی و شرکت‌های دارویی را به این زمینه افزایش داده است [۵-۷]. حرکت به سمت مدل‌سازی و شبیه‌سازی، زیست‌شناسی را از علوم توصیفی^۶ صرف دور کرده

¹ Systems biology

² Integrated systems

³ Genomics, proteomics or metabolomics data

⁴ Predictive models

⁵ Computational systems biology

⁶ Descriptive science

و آن را به سمت علوم قابل پیش‌بینی^۱ سوق می‌دهد [۱, ۷]. با توجه به نظریه مکانیسم [۸] رفتارهای بیولوژیک سامانه‌های زیستی بر پایه مکانیسم‌های فیزیکی و شیمیایی استوار و توسط این دو قابل توصیف هستند. از آنجا که در علوم فیزیک، شیمی و پیوند آن‌ها با علوم ریاضی، می‌توان مدل‌های پیش‌بین را ایجاد کرد، با داشتن دانش کافی می‌توان رفتارهای زیستی را نیز در قالب مدل‌های ریاضی گنجانده. این مدل‌سازی و شبیه‌سازی زمانی کارآمد خواهند بود که شامل توانایی‌های زیر باشد:

- ارائه پیش‌بینی و تفاسیر منطبق با نتایج آزمایشگاهی.
 - تولید داده‌هایی که ورای توانایی‌های آزمایشگاهی کنونی باشد.
 - فراهم کردن زمینه انجام آزمایش‌های رایانه-محور^۲ جهت صرفه جویی در وقت و هزینه.
 - ارائه توضیحی از چگونگی عملکرد یک سامانه و یا فرآیند.
 - تشخیص جزء، فرآیند یا عملکرد پنهان در سامانه.
 - کمک به درک بهتر یا شهودی‌سازی سامانه‌های پیچیده.
- با توجه به موارد ذکر شده، اگر مدل یا سامانه‌های مدل‌سازی ایجاد شود که این ویژگی‌ها را در بر گیرد، بدیهی است که زیست‌شناسی سامانه‌ای محاسباتی می‌تواند نقش مهمی در تشخیص و درمان بیماری‌ها (چه در بحث معرفی داروهای جدید و چه در نحوه مصرف بهینه دارو) ایفا کند.

۱-۲- بیان اجزا و فرآیندهای سامانه‌های زیستی در قالب یک شبکه

مدل‌سازی یک سامانه پیچیده با استفاده از یک یا چند شبکه از جمله روش‌هایی است که در دهه‌های اخیر در علوم مختلف، بسیار پرطرفدار و کاربردی بوده است. با توجه به این که هم اجزا و هم برهمکنش بین آن‌ها در سامانه‌های پیچیده دارای اهمیت هستند، به عقیده بسیاری تنها روش مناسب برای مدل‌سازی سامانه‌های پیچیده، استفاده از یک یا چند شبکه است [۹]. به عبارت دیگر، یک سامانه پیچیده در واقع شبکه‌ای با نگاشت یک به یک بین اجزاء در نظر گرفته شده به عنوان گره‌ها و روابط مشخص شده بین آن‌ها به عنوان یال‌هاست. از آنجا که می‌توان سامانه‌های زیستی را به عنوان یک مثال بارز از سامانه‌های پیچیده بیان کرد، شبکه‌های مختلفی جهت مدل‌سازی آن‌ها معرفی می‌شوند. وجود تنوع در شبکه‌ها به دلیل وجود انواع مختلف داده‌هاست که اطلاعات گوناگونی را منتقل می‌کنند و در نتیجه ایجاد شبکه‌هایی بر اساس این داده‌های مختلف، باعث ایجاد تفاوت در ویژگی‌های شبکه همچون همبندی، پیچیدگی

¹ Predictive science

² *In-silico* experiments

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

و ساختار آن‌ها می‌شود. از جمله پرکاربردترین این شبکه‌ها می‌توان به مواردی همچون شبکه‌های متابولیکی^۱، شبکه‌های برهمکنش پروتئین-پروتئین^۲ و یا ژن-پروتئین^۳ اشاره نمود [۱۰]. به طور کلی تحلیل این شبکه‌ها به بررسی دو دسته‌ی کلی از مشخصه‌ها تقسیم می‌شود. دسته اول ویژگی‌های ساختاری^۴ هستند که شامل مواردی همچون قطر شبکه، گره‌های هاب^۵ و قابلیت اتصال شبکه^۶ می‌شود. تحلیل شبکه‌های برهمکنش پروتئین-پروتئین معمولاً در بررسی این دسته از مشخصات خلاصه می‌شود [۱۱]. از سوی دیگر ویژگی‌های عملکردی^۷ شبکه مانند جریان عبوری از یال‌ها و یا سرعت بروز تغییرات در گره‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که در تحلیل شبکه‌های متابولیکی بسیار کارآمد خواهد بود.

۱-۳- شبکه‌های متابولیکی

شبکه‌های متابولیکی مجموعه‌ای از مسیرهای درهم‌تنیده از واکنش‌های بیوشیمیایی در سلول‌های زنده هستند؛ در این واکنش‌ها اجزاء سازنده و همچنین انرژی مورد نیاز برای عملکردهای سلولی سنتز مواد مختلف (آنابولیسم) و شکسته شدن زیست‌مولکول‌ها (کاتابولیسم) فراهم می‌گردد [۱۰]. این مسیرها معمولاً به عنوان مجموعه‌ای از حلقه‌ها و زنجیره‌هایی از واکنش‌های به هم پیوسته شناخته می‌شوند که در آن‌ها محصولات یک واکنش، به عنوان خوراک، در واکنش‌های بعدی مصرف می‌شوند. تمامی فرآیندها در شبکه‌ی متابولیکی از نظر زمانی و مکانی به خوبی سازماندهی شده‌اند. سلول‌ها معمولاً از بخش‌های مختلفی تشکیل شده‌اند که در نتیجه آن شبکه واکنش‌ها به چند زیرشبکه تقسیم می‌گردد. آنزیم‌ها به عنوان کاتالیزور بسیاری از واکنش‌ها، نقش تعیین‌کننده‌ای در شبکه‌های متابولیکی ایفا می‌کنند. از روش‌هایی نظیر مدل‌سازی غیرخطی و دینامیکی جهت تحلیل شبکه‌های متابولیکی استفاده می‌شود (مدل‌سازی بر پایه تئوری^۸)؛ اما باید توجه داشت که در چنین روش‌هایی با توجه به محدودیت‌هایی نظیر در دسترس نبودن اطلاعات کافی در مورد پارامترهای سینتیکی، عدم اطلاع از مکانیسم بسیاری از واکنش‌ها، هزینه زیاد محاسباتی در حل دستگاه معادلات غیر خطی یا دینامیکی و همچنین نبود داده‌های آزمایشگاهی دینامیکی لازم جهت اعتبار سنجی نتایج،

¹ Metabolic networks

² Protein-protein interaction networks

³ Gene-protein interaction networks

⁴ Structural features

⁵ Hub nodes

⁶ Network connectivity

⁷ Functional features

⁸ Theory-based modeling

استفاده از این روش‌ها تنها به مدل‌سازی یک یا تعداد محدودی از مسیرهای متابولیکی^۱ محدود می‌شود [۱۲].

در مقابل استفاده از مدل‌های غیر خطی و یا دینامیکی در شبیه‌سازی شبکه‌های متابولیکی، می‌توان به استفاده از مدل‌های استوکیومتری که در حالت پایا مطرح می‌شوند، اشاره نمود (مدل‌سازی مبنی بر محدودیت^۲). با توجه به چالش‌های مطرح شده برای سایر روش‌ها جهت محاسبه غلظت مواد مختلف، نوع مجهولات در این روش تغییر کرده و بجای غلظت، به شار عبوری از واکنش‌ها تبدیل می‌شود. این نوع بیان ریاضی از شبکه‌های متابولیکی می‌تواند جهت پیش‌بینی جریان عبوری از مسیر هر یک از واکنش‌های در نظر گرفته شده در مدل، با فرض حالت پایا، به کار گرفته شود. معمولاً استوکیومتری واکنش‌های موجود در مدل با کمک اصل بقای جرم و بار الکتریکی تعیین می‌گردد. در واقع این ماتریس به همراه قوانین ارتباطی ژن‌ها، پروتئین‌ها و واکنش‌ها^۳ به اضافه محدودیت‌هایی که در کنار آن‌ها به شکل نامساوی‌هایی در نظر گرفته می‌شود، بیان ریاضی شبکه‌های متابولیکی بازسازی شده هستند که با نام مدل‌های متابولیکی ژنوم-مقیاس^۴ شناخته می‌شوند. می‌توان از بازسازی شبکه‌های متابولیکی و استفاده از آن‌ها در ساخت مدل‌های متابولیکی ژنوم-مقیاس به عنوان یک محور مرکزی در زیست‌شناسی سامانه‌ای یاد کرد [۱۲]. با به کار گیری تحلیل شار متابولیکی (MFB)^۵ [۱۳] و یا تحلیل موازنه جریان (FBA)^۶ [۱۴] و تخصیص یک تابع هدف نظیر بیشینه‌سازی تولید زیست‌توده، کمینه‌سازی مصرف اکسیژن یا انرژی سلولی و یا دیگر اهداف سلولی، تحلیل‌های مختلفی را به وسیله این مدل‌ها انجام داد. نیاز به وجود تابع هدف از آنجایی بوجود می‌آید که با توجه به نوع مسئله و معرفی جریان‌ها به عنوان مجهول، تعداد معادلات به طور معمول از تعداد مجهولات کمتر بوده و یک دستگاه معادلات خطی فرومعین^۷ را تشکیل می‌دهند. جهت محدودسازی بیشتر فضای حل و بدست آمدن محدوده‌ی جواب دقیق‌تر، از داده‌های آزمایشگاهی در سطح متابولیت و همچنین داده‌های با دقت بالا^۸ استفاده می‌شود. چند مورد از کاربرد این مدل‌ها به شرح زیر است [۱۵-۱۷]:

- مفهومی‌سازی داده‌های با حجم بالا (Contextualization of High-Throughput Data)

¹ Metabolic pathways

² Constraint-based modeling

³ Gene-protein-reaction relationship

⁴ Genome-scale metabolic models

⁵ Metabolic flux analysis (MFA)

⁶ Flux balance analysis (FBA)

⁷ Underdetermined system of linear equations

⁸ High throughput data

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

- هدایت مهندسی متابولیک (Guidance of Metabolic Engineering)
 - اکتشاف مسیرهای متابولیکی پنهان (Discovery of Missing Pathways)
 - مطالعه ارتباطات بین چند گونه مختلف (Interrogation of multi-species relationships)
 - اکتشاف ویژگی‌های شبکه (Network property discovery)
 - مطالعه بیماری‌ها (Study of Diseases)
 - کشف اهداف دارویی در عوامل بیماری‌زا (Drug-targeting in pathogens)
- در سال‌های اخیر ابزارهای متعددی جهت بازسازی و شبیه‌سازی شبکه‌های متابولیکی و به طور ویژه مدل‌های متابولیکی ژنوم-مقیاس (به عنوان مدل‌های ریاضیاتی و محاسباتی آن‌ها) توسعه داده شده است [۱۸-۲۰] که در میان آن‌ها جعبه ابزار^۱ COBRA [۲۱] بیش از دیگر ابزارها مورد استفاده قرار گرفته است.

۴-۱- اهمیت بررسی تغییرات عملکردی در شبکه متابولیکی

با توجه به این که ارتباط بین اجزا در شبکه‌های متابولیکی تنها یک ارتباط مبنی بر داده نیست، بلکه یک جریان ماده با تعبیر فیزیکی بین گره‌ها و یال‌هاست، تحلیل شبکه‌های متابولیکی فراتر از بررسی ساختاری رفته و تحلیل عملکردی در این شبکه‌ها بسیار با اهمیت خواهد بود [۱۱]. از سوی دیگر، وظیفه تامین تمامی مواد مورد نیاز در سلول و همچنین انرژی مصرفی در آن بر عهده شبکه متابولیکی است. بنابراین در صورتی که بروز یک ناهنجاری منجر به ایجاد تغییری معنادار در میزان تولید یا مصرف انرژی و مواد در سلول شود، می‌توان انتظار داشت که علت یا معلول این ناهنجاری را در شبکه متابولیکی قابل تعیین خواهد بود. از طرف دیگر وجود امکان بررسی شبکه‌های متابولیکی از دیدگاه عملکردی، نقطه قوت دیگری در مقابل روش‌هایی است که تنها می‌توانند اطلاعات بیان شده در قالب شبکه را به صورت ساختاری بررسی کنند (بررس شبکه‌های برهمکنش پروتئین-پروتئین). در نتیجه بررسی عملکردی شبکه متابولیکی و تحلیل تغییرات ایجاد شده در آن می‌تواند در زمینه‌های یافتن زیست‌نشانه‌ها^۲، تولید داروهای گزینشی^۳ و مبارزه با پدیده مقاومت دارویی^۴ کارآمد باشد.

اصطلاح «زیست‌نشانه‌گر» به زیر مجموعه وسیعی از علائم پزشکی اشاره دارد که می‌تواند به

¹ COncstraint-Based Reconstruction and Analysis

² Biomarker identification

³ Selective drugs

⁴ Drug resistance

طور دقیق و قابل تکرار اندازه گیری شود [۲۲]. زیست‌نشانگرها با علائم پزشکی^۱، که محدود به علائم سلامتی یا بیماری است که توسط خود بیماران درک می‌شود، کاملاً متفاوت است. در واقع زیست‌نشانگر به هرگونه ماده، ساختار یا فرآیندی که می‌تواند در بدن یا محصولات آن اندازه گیری شود و بروز هرگونه پیامد و یا بیماری را پیش‌بینی کند، اطلاق می‌شود. روش‌های بسیار متعددی جهت شناسایی این زیست‌نشانگرها تا به حال ارائه شده است. استفاده از زیست‌شناسی سامانه‌ای محاسباتی جهت شناسایی تفاوت‌های معنادار ایجاد شده در شبکه‌ی متابولیسی بین دو حالت مینا و بیمار، می‌تواند یک روش مناسب جهت یافتن این نشانگرها باشد. یکی از شناخته شده ترین مثال‌ها در زمینه تغییرات عملکردی در شبکه‌های متابولیسی و استفاده از آن در تشخیص بروز ناهنجاری، با عنوان اثر واربرگ^۲ [۲۳] شناخته می‌شود. این پدیده در سلول‌های سرطانی ایجاد شده و طی آن فرآیند تامین انرژی سلول بجای مسیر فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی^۳، از طریق مسیر گلیکولیز هوازی^۴ انجام می‌شود.

یافتن داروهایی که به صورت خاص بر روی گروهی از سلول‌های هدف در بدن انسان تاثیر بگذارد همواره دغدغه محققان علوم دارویی بوده است. لازمی تولید چنین داروهایی، تشخیص تفاوت بین سلول‌های هدف و سایر سلول‌هاست [۲۴]. جهت تشخیص این تفاوت می‌توان به بررسی تغییرات یا تفاوت عملکردی شبکه متابولیسی بین سلول‌های هدف و دیگر سلول‌ها پرداخت. به طور مثال با این روش می‌توان اهداف دارویی را یافت که حمله به آن‌ها تنها بر روی گروه خاصی از باکتری‌های بیماری‌زا و یا سلول‌های سرطانی تاثیر گذار بوده و تاثیرات جانبی کمتری بر سلول‌های سالم یا میکروارگانیسم‌های مفید داشته باشد. در ادامه به بررسی دقیق‌تر هریک از این دو گروه دارویی پرداخته خواهد شد.

۱-۴-۱- شناسایی اهداف دارویی گزینشی جهت مبارزه با عوامل بیماری‌زا

از بین بردن عوامل بیماری‌زا (میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا) هدف اصلی هر درمان موثر عفونت است؛ با این حال، آنتی‌بیوتیک‌های طیف گسترده^۵ روش درمان بیماری‌های عفونی را تغییر داده اند. این نوع داروها ثابت کرده‌اند که ابزار ارزشمندی در مبارزه با عفونت‌ها هستند و زمانی که هویت دقیق عامل ایجاد کننده عفونت ناشناخته باشد، امیدوارکننده‌ترین مسیر درمانی هستند [۲۵, ۲۶]. اما باید در نظر داشت که میکروارگانیسم‌های ایجاد کننده بیماری تنها هدف آنتی‌بیوتیک‌های طیف گسترده نیستند و این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند به طور مستقیم

¹ Medical symptoms

² Warburg effect

³ Mitochondrial oxidative phosphorylation

⁴ Aerobic glycolysis

⁵ Broad-spectrum antibiotics

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

یا غیرمستقیم بر میکروبیوم^۱ انسان، که به عنوان یک اندام مجازی در بدن انسان شناخته می‌شود، تأثیر بگذارند. میکروبیوم انسانی در دهه‌های اخیر جهت علت شناسی بیماری‌های کبد [۲۷، ۲۸]، مغز [۲۹-۳۱]، کلیه [۳۲، ۳۳] و سایر اندام‌های انسان [۳۴، ۳۵] مورد توجه بسیاری از مطالعات بوده است. این مطالعات نقش حیاتی میکروبیوم را در سلامت انسان نشان می‌دهد.

پیامدهای تغییرات ناشی از استفاده از آنتی‌بیوتیک در ترکیب میکروبی بدن شامل تغییرات در ویژگی‌های عملکردی میکروبیوتا^۲، کاهش تنوع میکروبی، و پتانسیل ظهور میکروارگانسیم‌های مقاوم به دارو می‌باشد [۳۶]. علاوه بر این، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های طیف گسترده، به ویژه تتراسایکلین‌ها و ماکرولیدها، ممکن است با ایجاد سندرم روده تحریک‌پذیر (IBS^۳) [۳۷] مرتبط باشند. اثرات آنتی‌بیوتیک‌ها بر بیماری التهابی روده (IBD^۴) [۳۸، ۳۹]، اختلالات مرتبط با چاقی [۴۰]، و بیماری کبدی [۴۱، ۴۲] و سایر بیماری‌ها [۴۳] گزارش شده است. با توجه به عوارض مطرح شده در مورد آنتی‌بیوتیک‌های طیف گسترده، بسیاری از مطالعات استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های طیف محدود^۵ را با به حداقل رساندن تغییرات در میکروبیوم بیمار [۲۵، ۴۴-۴۷] پیشنهاد می‌کنند.

۱-۴-۲- داروهای گزینشی جهت مبارزه با سلول‌های سرطانی

تغییرات متابولیکی^۶ باعث ایجاد اثرات مختلفی در نرخ جریان مسیرهای متابولیکی مختلف در سلول‌های سرطانی می‌شود. اتو واربرگ برای نخستین بار به این تغییرات متابولیکی توجه کرد که در آن گلیکولیز هوازی^۷ به جای فسفریلاسیون اکسیداتیو^۸ در سلول‌های سرطانی ترجیح داده می‌شود [۴۸]. اثر واربرگ^۹ نشان می‌دهد که چگونه تغییرات متابولیکی در سلول‌های سرطانی، نیازهای بیشتر از معمول را به اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب و نوکلئوتیدها، برآورده می‌کند [۴۹]. گلیکولیز هوازی به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته تا درک بهتری از متابولیسم سلول‌های سرطانی به دست آید [۵۰-۶۰]. علاوه بر اثر واربرگ، تغییرات متابولیکی دیگری در

¹ Microbiome

^۲ ریززیواگان یا میکروبیوتا (Microbiota) جوامع بوم‌شناختی از میکروارگانسیم‌های همسفره، هم‌زیست و بیماری‌زاست.

³ Irritable bowel syndrome

⁴ Inflammatory bowel disease

⁵ Narrow-spectrum antibiotics

⁶ Metabolic alterations

⁷ Aerobic glycolysis

⁸ Oxidative phosphorylation

⁹ Warburg effect

سرطان‌های مختلف گزارش شده است. به عنوان مثال، فعالیت مسیر گلوتامینولیز^۱ نیز در سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد تا با افزایش گلیکولیز^۲، تامین انرژی و ماده مورد نیاز برای نرخ تکثیر بالاتر را تسهیل نماید [۶۱، ۶۲]. ناهنجاری در مسیرهای دیگر مانند مسیر سنتز لیپید^۳ [۶۳]، متابولیسم اسیدهای آمینه‌های شاخه‌دار^۴، مسیر سنتز سرین^۵ [۶۴] و مسیر پنتوز فسفات^۶ [۶۵] نیز در مقالات و منابع گزارش شده است. تغییر شکل متابولیکی در سلول‌های سرطانی همچنین فرصت‌های ویژه‌ای برای اجتناب از سیستم ایمنی [۶۶]، اختلال در آپتوز [۶۷] و مصرف محصولات زائد معمول سلول‌ها مانند آمونیا، کتون بادی‌ها^۷، استات، لاکتات و سایر پروتئین‌های خارجی [۶۴] فراهم می‌کند. شناسایی و تعیین ویژگی‌های متابولیکی ویژه سرطان، راهی را برای توسعه استراتژی‌های درمانی انتخابی که تنها بر سلول‌های سرطانی تأثیر می‌گذارند و به سلول‌های سالم آسیب نمی‌رسانند، ممکن می‌سازد [۶۸].

۱-۴-۳- معرفی داروهایی چند هدفه

میکروارگانیزم‌های بیماری‌زای متعددی با نشان دادن مقاومت چند دارویی^۸ چالشی جدی در زمینه بهداشت و درمان جهانی بوجود آورده اند [۶۹]. علاوه بر این بسیاری از این عوامل بیماری‌زا نه تنها از یک، بلکه از چند مکانیسم مقاومت دارویی مختلف بهره می‌برند که همین امر مبارزه با آن‌ها را بسیار دشوار کرده است و در نتیجه داروهایی که تنها بر یک ژن یا واکنش اثرگذار هستند، کارایی چندانی در مقابل آن‌ها ندارند [۷۰]. علاوه بر این، تحقیقات نشان داده است که حمله به یک ژن یا واکنش حیاتی^۹ نه تنها اثر بازدارنده‌ی قابل توجه طولانی مدت بر فعالیت‌های سلول‌های مورد نظر ندارد، بلکه باعث فعال شدن سامانه‌های دفاعی در آن‌ها می‌گردد [۷۱]. در مقابل، داروهای چند هدفه و درمان‌های ترکیبی، فعالیت سیستماتیک سلول‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند؛ بنابراین استفاده از این روش‌ها می‌تواند بسیار کارآمدتر باشد و باعث شود که سلول‌های هدف مقاومت دارویی کمتری را نسبت به داروهایی با اهداف منفرد از خود نشان دهند [۷۲]. از جمله این داروهای چند هدفه می‌توان به داروهای با اهداف کشنده مصنوعی^{۱۰} اشاره کرد. مجموعه واکنش‌ها یا ژن‌های کشنده ترکیبی به گونه‌ای عمل می‌کنند که حذف به یک باره

¹ Glutaminolysis pathway

² Glycolysis

³ Lipid synthesis pathway

⁴ Branched-chain amino acid metabolism

⁵ Serine synthesis pathway

⁶ Pentose phosphate pathway

⁷ Ketone bodies

⁸ Multi-drug resistance

⁹ Essential gene or reaction

¹⁰ Synthetic lethal drugs

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

آن‌ها منجر به توقف رشد سلولی شده، اما حذف هر زیر مجموعه از آن‌ها برای سلول کشنده نخواهد بود. معرفی این دسته از داروها دریچه جدیدی را در علوم دارویی و به ویژه در بحث مبارزه با سرطان و مبارزه با پدیده مقاوت دارویی ایجاد کرده است [۷۳]. برای یافتن دارویی با چنین ویژگی‌هایی، می‌توان تغییرات ایجاد شده توسط اهداف دارویی بالقوه^۱ متعددی را در رفتار شبکه متابولیکی بررسی کرد و با تعریف معیارهای مناسب، اهداف دارویی با قدرت بازدارندگی بیشتری را معرفی نمود.

از سوی دیگر در سلول‌های سرطانی نیز هدفگیری تنها به یک ژن ممکن است مشکلات مختلفی ایجاد کند [۷۴]. وابستگی یک تومور به یک آنکوژن یا مسیر آنکوژنیک، پدیده‌ای است که به آن وابستگی آنکوژنیک گفته می‌شود. این پدیده در حال حاضر مبنای بیشترین درمان‌های هدفمند بر اساس ژنوتیپ سرطان است. با این حال، آنکوژن‌هایی که با افزایش عملکرد شناخته می‌شوند، در همه تومورها قابل هدفگیری نیستند و در نتیجه، مقاومت در برابر درمان اعمال شده، رایج است [۷۵]. علاوه بر این، شناسایی آنکوژن‌های بدون نشانه، یا به عبارتی دیگر ژن‌های وابسته به سرطان که هیچ شواهدی از تغییرات ژنتیکی ندارند، چالش‌برانگیز است. برای غلبه بر این چالش‌ها، دانشمندان استفاده از اصل کشندگی مصنوعی را پیشنهاد می‌دهند [۷۵-۷۷]. علاوه بر این، فرضیه‌هایی مطرح شده است که می‌توان با هدفگیری یک مجموعه ژن کشنده مصنوعی متعلق به جهشی مرتبط با سرطان، استراتژی‌های درمانی انتخابی را شناسایی نمود [۷۸]. اخیراً، دسترسی گسترده به ابزارهای مبتنی بر CRISPR، امکان شناسایی مجموعه‌های کشنده مصنوعی را به صورت تجربی تسهیل کرده است [۷۶، ۷۹]. همچنین، رویکردهای محاسباتی مختلف به طور قابل توجهی برای شناسایی اهداف دارویی سرطان توسعه یافته‌اند [۸۰]. شبکه‌های متابولیکی بافت-خاص که از مدل‌های ژنوم-مقیاس استخراج شده اند ابزارهای قابل اعتمادی برای دستیابی به استراتژی‌های درمانی با بررسی تغییرات عملکردی در شبکه متابولیکی و یا شناسایی و معرفی اهداف دارویی انتخابی [۸۱-۸۶] با کمک مفهوم کشندگی مصنوعی [۸۷] هستند.

۱-۵- هدف پژوهش

با توجه به توضیحات ارائه شده در مورد اهمیت بررسی تغییرات عملکردی در شبکه متابولیکی، دستیابی به اهداف دارویی انتخابی که به صورت همزمان چند بخش از سیستم مورد بررسی را هدف قرار دهند (جهت دستیابی به داروهای چند هدفه) بسیار ارزشمند خواهد بود. جهت دستیابی به هر یک از موارد ذکر شده در بستر زیست‌شناسی سامانه‌ای محاسباتی، نیاز به

¹ Potential drug targets

الگوریتم‌ها و روش‌های محاسباتی ویژه‌ای است که بتوانند اطلاعات قابل درک از شبکه را به نحوی سازمان یافته استخراج کنند. هدف از این پژوهش در گام اول بهبود روش‌های موجود و تدوین و توسعه الگوریتم‌های جدید و در صورت امکان ارزیابی کارایی آن‌ها در این زمینه است. در گام دوم نیز، پس از ارائه یک ابزار مناسب جهت بررسی سازمان یافته شبکه متابولیسی سلول‌های مورد مطالعه، شناسایی و معرفی اهداف دارویی انتخاب پذیر با تکیه بر مفهوم کشندگی مصنوعی، هدف این پژوهش می‌باشد.

۱-۶- ترتیب نگارش رساله

این رساله در هفت فصل تدوین شده است که در فصول مقدمه، مروری بر تحقیقات پیشین و مبانی مدل‌سازی، به طور خلاصه به معرفی مفاهیم اولیه، تحقیقات گذشته در این زمینه و همچنین مبانی اصلی مدل‌سازی این پژوهش اشاره شده است. در فصول چهارم تا ششم، در ابتدای هر فصل، توضیحات اختصاصی مربوط به موضوع مورد بررسی و همچنین نتایج مربوط به آن فصل ارائه شده است. در فصل هفتم نیز به جمع‌بندی نتایج حاصل پرداخته شده است.

فصل دوم

مروری بر تحقیقات پیشین

۲-۱- مقدمه

برخی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای انسانی رفتاری را در زمان مواجهه با درمان دارویی از خود نشان می‌دهند که با عنوان مقاومت چند دارویی^۱ از آن یاد می‌شود. این رفتار میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا یک چالش جدی در عصر مراقبت‌های بهداشتی جهانی است [۶۹، ۷۰]. بیشتر این گونه‌ها از چندین عامل بیماری‌زایی و مکانیسم‌های گسترده مقاومت دارویی بهره می‌برند. از این رو، اختلال در فعالیت تنها یک ژن در این میکروارگانیسم‌ها تضمینی برای جلوگیری از رشد آنها یا بیوسنتز فاکتورهای بیماری‌زا^۲ نیست. علاوه بر این، هدف قرار دادن واکنش‌ها یا ژن‌های ضروری در برخی از پاتوژن‌ها ممکن است باعث افزایش قابل توجهی در واکنش‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم شود. این موضوع نشان می‌دهد که ژن‌ها یا واکنش‌های حیاتی^۳ (که در این پژوهش به آن‌ها ژن‌ها یا واکنش‌های کشنده^۴ نیز اطلاق شده است) ممکن است اهداف مناسبی برای این نوع میکروارگانیسم‌ها نباشند [۷۱]. در مقابل، داروهای چند هدفه و درمان‌های ترکیبی به طور هم‌افزا فعالیت‌های سیستماتیک میکروارگانیسم‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. بنابراین، استفاده از این نوع مکانیسم‌های دارویی چند هدفه می‌تواند در مقابل میکروارگانیسم‌های مقاوم بسیار موثر عمل کند. در نتیجه عوامل بیماری‌زا، مقاومت دارویی کمتری نسبت به روش‌هایی که با مکانیزم حمله به یک هدف عمل می‌کنند، نشان دهند [۷۲].

¹ Multi-drug resistance

² Virulence factors

³ Essential genes or essential reactions

⁴ Lethal genes or lethal reactions

۲-۲- زیست‌شناسی سامانه‌های محاسباتی

زیست‌شناسی سامانه‌های محاسباتی روش‌های قدرتمندی برای رسیدگی به پرسش‌های زیست‌پزشکی (به عنوان مثال، چگونگی متابولیسم بیماری‌های انسانی، و چگونگی شناسایی اهداف دارویی بالقوه) از طریق یک مطالعه چند رشته‌ای را در سطح سیستم پیشنهاد می‌کند. جهت کارآمدی بیشتر، این روش‌ها می‌بایست تعاملات چند وجهی بین بسیاری از عناصر شبکه‌های زیستی را در نظر بگیرند [۸۸]. مدل‌های مبتنی بر محدودیت^۱ (CBMs) در این زمینه بسیار کاربردی هستند. این مدل‌ها با اعمال محدودیت‌های حاکم بر روی شبکه متابولیکی بازسازی شده در مقیاس ژنوم^۲ (GENRE) به‌عنوان نمایشی ریاضی از مدل‌های متابولیکی در مقیاس ژنوم^۳ (GEMM) با موفقیت به کار می‌روند. با استفاده از CBMها فعالیت‌های متابولیکی و خواص فیزیولوژیکی سیستم‌های بیولوژیکی به طور جامع قابل تجزیه و تحلیل و بررسی هستند. با استقرار CBMها، تجزیه و تحلیل‌های سامان‌یافته^۴ را می‌توان با استفاده از تکنیک‌های محاسباتی که در جعبه ابزارهای مختلف که در ادامه به بررسی آن‌ها پرداخته شده است، انجام داد.

۲-۳- جعبه ابزارهای توسعه داده شده جهت بررسی مدل‌های مبتنی بر محدودیت

روش‌های مدل‌سازی مبتنی بر محدودیت بر اساس روش‌های ریاضی پیچیده‌ای توسعه داده شده‌اند که حل آن‌ها بر روی کاغذ در یک زمان قابل قبول امکان‌پذیر نیست. اگرچه روش‌های بهینه‌سازی برنامه‌ریزی خطی از چند دهه پیش در دسترس بوده‌اند، روش‌ها و ابزارهای محاسباتی که به ویژه برای مدل‌سازی مبتنی بر محدودیت توسعه داده شده باشند، تا به تازگی ظاهر شده‌اند. اگرچه برخی از این بسته‌های نرم‌افزاری بیش از ده سال پیش معرفی شده‌اند، اما هنوز به صورت مدام توسعه و به‌روز رسانی‌هایی بر روی آن‌ها در حال انجام می‌باشد. یکی از جامع‌ترین جعبه ابزار در میان مجموعه این ابزارها، جعبه ابزار COBRA می‌باشد که بر بستر نرم‌افزار MATLAB توسعه داده شده است. این بسته نرم‌افزاری در نسخه‌ی سوم خود، دستاوردهای ۱۴ سال به‌روز رسانی را جمع‌آوری کرده و توابعی کارآمد را برای اکثر روش‌های مبتنی بر محدودیت فراهم می‌نماید. با این حال، بسته‌هایی که به نرم‌افزارهای غیر متن باز مانند MATLAB وابسته هستند، دارای محدودیت‌هایی در زمینه ادغام این روش‌ها در منابع دیگر مانند فایل‌های اجرایی و سرویس‌های وب هستند. ابزارهایی مانند YANA و OptFlux این مشکل را با استفاده از زبان

¹ Constraint-based models

² Genome-scale reconstruction

³ Genome-scale metabolic models

⁴ Systematic

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...
برنامه‌نویسی Java حل کرده‌اند.

جدول ۱-۲- جعبه ابزارهای توسعه داده شده جهت مدل‌سازی و تحلیل مبتنی بر محدودیت

| مرجع | توضیحات | سال | بستر توسعه | نام روش |
|------|--|------|--------------------|---------------|
| [۸۹] | اسکرپت‌های جهت پیاده سازی الگوریتم‌های تحلیل مسیر متابولیکی | ۱۹۹۹ | GNU Octave/ MATLAB | METATOOL |
| [۹۰] | تحلیل گر شبکه‌های متابولیکی با یک رابط کاربری گرافیکی | ۲۰۰۳ | MATLAB | FluxAnalyzer |
| [۹۱] | ابزاری چند پلتفرم برای تحلیل مدل سازی بر مبنای گراف و محدودیت با یک رابط کاربری کاربرپسند | ۲۰۰۵ | Java | YANA |
| [۹۲] | ابزاری ماژولار جهت مدل سازی بر اساس محدودیت با چندین روش پیش‌بینی فنوتیپ و تحلیل جریان | ۲۰۰۷ | MATLAB | COBRA Toolbox |
| [۹۳] | چارچوب مهندسی متابولیکی (MEW) با یک رابط کاربری گرافیکی به عنوان یک ابزار مستقل و دارای انواع روش‌های تحلیل و بهینه‌سازی بر اساس محدودیت | ۲۰۱۰ | Java | OptFlux |
| [۹۴] | چارچوبی که بخشی از روش‌های موجود در COBRA Toolbox را پیاده‌سازی می‌کند، امکان پیاده‌سازی روش‌های جدید با استفاده از طراحی کلاس محور | ۲۰۱۳ | Python | COBRAPy |
| [۹۵] | جعبه ابزاری برای بازسازی و تحلیل مدل‌های مبتنی بر محدودیت با پشتیبانی از داده‌های multi-omics | ۲۰۱۳ | MATLAB | RAVEN |
| [۹۶] | جعبه ابزار مدل سازی شبکه | ۲۰۱۴ | MATLAB | MONGOOSE |

| | | | | |
|------|--|------|--------|----------|
| | متابولیکی با پشتیبانی از روش‌های بهینه‌سازی extra arithmetic | | | |
| [۹۷] | چارچوب ماژولار مدل‌سازی بر اساس محدودیت با روش‌های شبیه‌سازی مبتنی بر FBA | ۲۰۱۹ | Python | ReFramed |
| [۹۸] | چارچوب متن باز با معماری ماژولار با قابلیت پشتیبانی از از ویژگی‌های مختلف از جمله پیش‌بینی فنوتیپ و الگوریتم‌های بهینه‌سازی سلول‌ها | ۲۰۲۱ | Python | MEWpy |

در این پژوهش تجزیه و تحلیل‌های سامان‌یافته^۱ مدل‌های مورد مطالعه با استفاده از تکنیک‌های محاسباتی که در جعبه ابزار COBRA موجود است، انجام شده است [۲۱، ۹۹، ۱۰۰].

۲-۴- بررسی تاثیر حذف اهداف مختلف از شبکه و مفهوم کشندگی مصنوعی^۲

از آنجایی که مطالعات رایانه-محور باعث صرفه جویی قابل توجهی در زمان و هزینه می‌شود، از روش‌های یاد شده به طور گسترده برای شناسایی اثرات مختلف حذف واکنش و ژن بر توزیع شار در شبکه‌های متابولیکی استفاده می‌شود. با هدف شناسایی اهداف دارویی جدید، این نوع مطالعات که بر روی حذف یک عامل از سیستم متمرکز هستند را می‌توان به سه دسته تقسیم کرد [۱۰۱]: الف) حذف عوامل بیماری‌زا [۷۱]، ب) بررسی حذف متابولیت‌ها از شبکه و یا آنالیز متابولیت محور^۳ [۱۰۲-۱۰۴]، و ج) هدف قرار دادن واکنش‌ها و ژن‌های حیاتی^۴ [۱۰۵-۱۰۹]. دیدگاه آخر به عنوان رایج‌ترین روش برای شناسایی اهداف دارویی بالقوه شناخته می‌شود و تنها به حذف یک واکنش یا ژن محدود نمی‌گردد. با در نظر گرفتن حذف بیش از یک ژن یا واکنش می‌توان مفهوم کشندگی مصنوعی (SL^۵) را مطرح کرد. کشندگی مصنوعی به حالتی اشاره دارد که ایجاد اختلال همزمان در عملکرد دو واکنش یا ژن غیر حیاتی، باعث ایجاد اختلال شدید در رشد سلول هدف می‌شود [۱۱۰]. با بسط این مفهوم، هنگامی که تعداد اهداف افزایش می‌یابد، مجموعه‌های کشنده مصنوعی مرتبه بالاتر^۶ (بیش از دو هدف) را می‌توان به دست آورد [۱۱۰].

¹ Systematic

² The concept of synthetic lethality

³ Metabolite-centric targeting

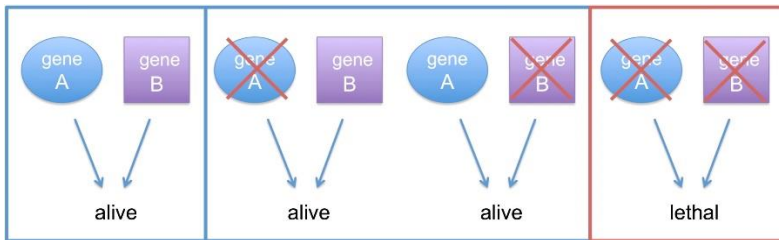
⁴ Essential reactions and genes

⁵ Synthetic lethality

⁶ Higher-order synthetic lethals

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

شکل ۱-۲ شمایی از مفهوم کشندگی مصنوعی را نشان می‌دهد. علیرغم این که شناسایی مجموعه‌های کشنده مصنوعی درجه بالاتر می‌تواند اهداف جدیدی را برای استفاده از داروهای مختلف در طراحی درمان‌های ترکیبی به ارمغان بیاورد، این رویکرد چندان رایج نیست [۱۱۲]. با این حال، ممکن است که این مفهوم، مسیر آشکار نشده‌ای از عملکرد بسیاری از استراتژی‌های داروهای ترکیبی که قبلاً به طرق دیگر کشف شده اند، باشد. یکی از نمونه‌های این استراتژی، ترکیب داپتومیسین، سفوپرازون و داکسی‌سایکلین برای مبارزه با *Borrelia burgdorferi*^۱ [۱۱۳] است. نمونه‌های دیگری از این استراتژی در درمان سرطان، مانند ترکیبی از مهارکننده‌های *BRAF* و *EGFR* برای بیماران مبتلا به سرطان کولون با جهش‌های *BRAF*، پیشنهاد شده است [۱۱۲].



شکل ۱-۲-شمایی از مفهوم کشندگی مصنوعی. در این شماتیک نشان داده شده است که حذف هر یک از ژن‌های A و B به تنهایی قادر به توقف رشد سلول نیستند، اما حذف همزمان این دو ژن باعث توقف رشد آن می‌شود [۱۱۱].

۲-۵- روش‌های محاسباتی مبتنی بر محدودیت جهت شناسایی مجموعه کشنده‌های مصنوعی

همانطور که قبلاً ذکر شد، از پدیده مقاومت دارویی به عنوان یک دغدغه مهم در زمینه مبارزه با میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا یاد می‌شود. به همین جهت شناسایی اهداف دارویی جدید بر اساس مفهوم کشندگی مصنوعی می‌تواند راه حل مناسبی برای مقابله با این مقاومت دارویی باشد. با این حال، مقایسه اثر مجموعه‌های کشنده مصنوعی مختلف بر روی شبکه متابولیکی و عملکرد آن نشان می‌دهد که برخی از مجموعه‌های با کاردینالیته^۲ بالاتر می‌توانند اثرات قوی‌تر و عمیق‌تری بر روی شبکه داشته باشند.

دو رویکرد برای شناسایی محاسباتی SLها استفاده می‌شود: الف) بررسی تمامی حالات امکان

¹ *Borrelia burgdorferi*

² Cardinality

پذیر (جستجوی جامع) و ب) بررسی حالات مستعد (کاهش فضای جستجو). جستجوی جامع به عنوان یک روش ساده شناخته می‌شود و در برخی از مطالعات مورد استفاده قرار گرفته است [۱۰۹، ۱۱۴]. اما استفاده از این رویکرد برای شناسایی SLهای مرتبه بالاتر، به ویژه زمانی که کاردینالیته SLها بیشتر از سه باشد، به دلیل طولانی شدن زمان محاسبات، امکان پذیر نیست. بر اساس سیستم محاسباتی موجود^۱، زمان محاسباتی مورد نیاز برای جستجوی جامع، بیش از ۱۸۰ روز برای به دست آوردن تمام SLهای چهارگانه برای باکتری *Escherichia coli* با استفاده از مدل iAF1260 [۱۱۵] تخمین زده می‌شود. به دلیل وجود بار محاسباتی قابل توجه و در نتیجه زمان محاسبه طولانی در روش جستجوی جامع، روش‌های دیگری برای برطرف سازی این دسته از محدودیت‌ها با کاهش فضای جستجو معرفی شده‌اند. در ادامه به بررسی روش‌های توسعه داده شده در این زمینه پرداخته خواهد شد.

بسته به معیارهای پیشنهادی مورد استفاده برای کاهش فضای جستجو، برخی از این روش‌ها می‌توانند تنها کسری از SLهای مرتبه بالاتر [۱۱۰] را پیدا کنند، در حالی که هدف برخی از روش‌های دیگر یافتن همه SLها است [۱۱۶-۱۲۱]. یکی از این روش‌ها که SL Finder نام دارد، جستجوی مبتنی بر بهینه‌سازی را برای شناسایی جامع و هدفمند SLها انجام می‌دهد [۱۱۰]. به منظور کاهش فضای جستجو، این روش از آنالیز جریان‌های همبسته^۲ [۱۲۲] استفاده می‌کند تا تنها یکی از واکنش‌های کاملاً همبسته^۳ را در لیست مجموعه هدف اضافه کند. این رویکرد برای کشف تمامی SLهای دوگانه، سه گانه و انجام یک شناسایی هدفمند از چند SL چهارگانه و پنج گانه برای *E. coli* با مدل iAF1260 [۱۱۵] استفاده شد.

روش دیگری به نام MCS Enumerator استراتژی‌های مداخله را با برشمردن حالت‌های ابتدایی شبکه دوگانه^۴ [۱۲۳] شبکه متابولیکی مربوطه [۱۱۶] پیدا می‌کند. روش MCS Enumerator یک رویکرد قدرتمند به ویژه برای کاربرد آن در زمینه‌های مهندسی متابولیک است. برای به دست آوردن چارچوب تعمیم یافته MCS Enumerator و تسریع در محاسبات شبکه دوگانه، بهبودهای بیشتری در این رویکرد صورت گرفت [۱۱۷-۱۱۹]. روش MCS Enumerator برای یافتن همه SLهای دو تا پنجگانه در iAF1260 مورد استفاده قرار گرفت [۱۱۶]. با این حال، زمان محاسباتی به طور تصاعدی برای SLهایی که دارای کاردینالیته بالاتر هستند افزایش می‌یابد. بنابراین، روند جستجو باید پس از یافتن تعداد مشخصی از SLها و یا رسیدن به یک محدودیت زمانی مشخص متوقف شود.

^۱ یک سیستم کامپیوتری با پردازنده ۲/۲ گیگاهرتزی Intel Xeon E5-2696 v4، که دارای ۱۲ هسته است.

^۲ Flux-coupling analysis

^۳ Fully coupled

^۴ Elementary modes of the dual network

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

روشی دیگر به نام Fast-SL یک الگوریتم قدرتمند است که فضای جستجو را با حذف واکنش‌هایی که به نحوی از عدم شرکت آن‌ها در تشکیل SLها اطمینان می‌یابد، به شدت کاهش می‌دهد [۱۲۰]. روش Fast-SL می‌تواند از طرق محاسبه توزیع شار خاصی که بیشینه نرخ رشد را با استفاده از یک مقدار حداقل برای مجموع شارها فراهم می‌کند، واکنش‌های حامل شار را شناسایی کند. در مرحله بعدی، الگوریتم فقط از طریق این واکنش‌های حامل شار و همچنین ترکیبات آن‌ها به جستجوی SLها می‌پردازد و از این طریق در یک فضای جستجوی کاهش یافته محاسبات را به انجام می‌رساند. پدید آوردگان این روش از شناسایی ۱۲۷ ژن کشنده مصنوعی جدید در *E. coli* خبر دادند که توسط روش SL Finder پیدا نشده بود. همچنین، Fast-SL با یافتن همان SLها، چهار برابر سریع‌تر از MCS Enumerator عمل می‌کند. Fast-SL ایده ارزشمندی برای یافتن SLها در فضای جستجوی کاهش یافته ارائه کرد، اما پیاده‌سازی این روش دو اشکال عمده دارد. ابتدا، نویسندگان رویه‌های مختلفی را برای به دست آوردن SLها با کاردینالیته‌های مختلف (دوگانه تا چهارتایی)، توسعه داده‌اند. بنابراین، برای به دست آوردن SL با بیش از چهار هدف در هر مجموعه، یک روش کاملاً جدید برای هر کاردینالیته باید ایجاد شود. در نتیجه، اگر از مراحل پیاده‌سازی در Fast-SL اصلی پیروی شود، پیاده‌سازی آن بسیار پیچیده خواهد بود و برای توسعه برنامه مربوطه زمان و حجم کار زیادی باید صرف شود. اشکال دوم این است که Fast-SL فاقد یک روش جستجوی سازمان یافته است. بنابراین، در روش Fast-SL حالت‌های تکراری نیز مورد مطالعه قرار خواهد گرفت که باعث افزایش زمان محاسبات خواهد شد. این مشکل در هنگام محاسبه SLهای مرتبه بالا، به طور واضح‌تر خود را نشان می‌دهد.

روش LTM¹ الگوریتم دیگری است که در این زمینه استفاده می‌شود. این روش ماتریس استوکیومتری را (به عنوان مثال، ماتریس S) با افزودن متابولیت‌ها و واکنش‌های کاذب، جهت در نظر گرفتن رابطه ژن‌ها و واکنش‌ها تغییر می‌دهد [۱۲۱]. با این حال، روش LTM اندازه ماتریس S را افزایش می‌دهد که این کار به نوبه خود موجب افزایش قابل توجه اندازه فضای جستجو می‌گردد. بنابراین، جهت یافتن SLها مسائل بهینه‌سازی خطی بیشتری (LPs) باید حل شوند. از این رو، این روش برای انجام حذف در مورد SLهای مرتبه بالاتر ناکارآمد خواهد بود.

۲-۶- به کارگیری روش‌های محاسباتی با هدف یافتن اهداف دارویی برای مقابله با

میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا

با استفاده از مدل‌های متابولیک ژنوم-مقیاس (GEMME) و به کارگیری روش‌های محاسباتی مبتنی بر محدودیت مانند تجزیه و تحلیل موازنه شار (FBA)، اهداف دارویی متعدد برای اشریشیا

¹ Logical transformation of genome-scale metabolic models

کلی^۱، هلیکوباکتر پیلوری^۲، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس^۳، استافیلوکوکوس اورئوس^۴ [۱۲۴] سینتوباکتر بومانی^۵ [۱۰۲] و سودوموناس آئروژینوزا^۶ [۱۲۵] شناسایی شده اند. از جمله این مطالعات، می‌توان به پژوهش لی و همکاران [۱۲۴] اهداف دارویی گزینشی را برای چهار عامل بیماری‌زا را با استفاده از آنالیز نقطه خفگی^۷ [۱۲۶] ارائه کرده اند.

۲-۷- ایجاد مدل‌های متابولیکی بافت-خاص^۸

همان‌طور که در فصل اول اشاره شد، یکی دیگر از کاربردهای تحلیل و بررسی مدل‌های متابولیکی ژنوم-مقیاس، استخراج اهداف دارویی انتخاب پذیر و یا یافتن زیست نشانگرها از مدل‌های سلول‌های انسانی می‌باشد. مدل‌های متابولیکی ژنوم-مقیاس سلول‌های انسانی، بر اساس داده‌های کل ژنوم انسان ساخته شده اند، در حالی که در یک سلول از یک بافت خاص، تنها بخشی از ژن‌ها بیان می‌شوند. بنابراین، جهت بررسی عملکرد متابولیکی یک سلول خاص باید تنها واکنش‌هایی که ژن مربوط به آن‌ها بیان شده است، در نظر گرفته شود. به مدل‌های ساخته شده در این مبحث، مدل‌های متابولیکی بافت-خاص گفته می‌شود و یکی از مراحل مهم در بررسی تغییرات عملکردی شبکه‌های متابولیکی سلول‌های بدن انسان، ساخت این مدل‌ها می‌باشد. جهت تولید این مدل‌ها باید به نحوی داده‌های مربوط به بیان^۹ ژن‌ها (مانند داده‌های RNA-seq) با شبکه ادغام شود. با توجه به این که داده‌های بیان به دلیل وجود مراحل پیچیده‌ی تغییرات پسا ترجمه^{۱۰}، جهت تبدیل پلی پپتید به آنزیم، نسبت دقیقاً مشخصی با میزان آنزیم‌های مربوط به واکنش‌های متابولیکی ندارند، استنتاج میزان شار عبوری از واکنش‌های متابولیکی با استفاده از این داده‌ها، کار پیچیده‌ای خواهد بود. الگوریتم‌های متعددی برای دستیابی به این مهم طراحی شده اند که در جدول ۲-۲ هر یک به طور خلاصه مورد بررسی قرار گرفته است.

¹ *Escherichia coli*

² *Helicobacter pylori*

³ *Mycobacterium tuberculosis*

⁴ *Staphylococcus aureus*

⁵ *Acinetobacter baumannii*

⁶ *Pseudomonas aeruginosa*

⁷ Choke-point analysis

⁸ Context-specific metabolic models

⁹ Expression data

¹⁰ Post-transcriptional modifications

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

جدول ۲-۲- خلاصه‌ای از روش‌های تولید مدل‌های بافت-خاص [۱۲۷].

| مرجع | الزام وجود تابع هدف متابولیکی | روش بهینه سازی | استخراج زیر شبکه | داده‌های ورودی | توضیحات | نام روش |
|-------|-------------------------------|--|------------------|----------------|---|---------|
| [۱۲۸] | بله | برنامه ریزی خطی | بله | ترنسکریپتومیک | تعداد واکنش‌های فعال را با در نظر گرفتن یک آستانه برای مقادیر بیان، کمینه می‌کند و اطمینان می‌دهد که مقدار تابع هدف سلول (بیشینه کردن رشد) از مقدار معینی کمتر نخواهد شد. | GIMME |
| [۱۲۹] | خیر | برنامه ریزی خطی عدد صحیح آمیخته ^۱ | بله | ترنسکریپتومیک | واکنش‌ها را به دو دسته زیاد بیان شده و کم بیان شده دسته بندی می‌کند و همخوانی بین جریان عبوری از واکنش‌ها و سطح بیان مربوط به آن‌ها را بیشینه می‌کند. | iMAT |

¹ Mixed-integer linear programming

| | | | | | | |
|-------|-----|---------------------------------|-----|---------------------------|--|----------|
| [۱۳۰] | خیر | برنامه ریزی خطی عدد صحیح آمیخته | بله | ترنسکریپتومیک و پروتئومیک | به هر واکنش یه وزن می دهد و تطابق بین جریان عبوری از واکنش ها و ضرایب مشخص شده را بیشینه می کند. به صورت اختیاری، می توان اجازه تجمع یک ماده خاص را داد. | INIT |
| [۸۱] | خیر | برنامه ریزی خطی | بله | ترنسکریپتومیک | با قابلیت تعریف وظایف INIT نسخه ارتقا یافته متابولیکی برای سلول های یک بافت خاص. | tINIT |
| [۱۳۱] | خیر | برنامه ریزی خطی | بله | ترنسکریپتومیک | بر اساس ساختار شبکه و داده های بیان مجموعه ای از واکنش های مرکزی را تشکیل می دهد. دیگر واکنش ها، در صورتی که حذف آن ها فعالیت واکنش های مرکزی را مختل نکند، کنار گذاشته می شوند. | mCADRE |
| [۱۳۲] | خیر | برنامه ریزی خطی | بله | واکنش های مرکزی | یک زیر شبکه سازگار شامل تمامی واکنش های مرکزی به علاوه ی حداقل واکنش های غیر مرکزی ممکن تشکیل می دهد. | FASTCORE |

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

| | | | | | | |
|-------|-----|-----------------|-----|--------------------------|---|-------------|
| [۱۳۳] | خیر | برنامه ریزی خطی | بله | ترنسکریپتومیک | که امکان FASTCORE یک نسخه اصلاح شده از اضافه کردن واکنش‌های غیر مرکزی و همچنین واکنش تولید زیست توده را به کاربر می‌دهد. | FASTCORMICS |
| [۱۳۴] | خیر | برنامه ریزی خطی | بله | واکنش‌های مرکزی | با کمینه کردن جریان عبوری از واکنش‌های هزینه بر یک آنالیز وابستگی را انجام می‌دهد. طبق این آنالیز تنها واکنش‌های ضروری ناخواسته، در شبکه خروجی قرار می‌گیرند. | CORDA |
| [۱۳۵] | بله | برنامه ریزی خطی | خیر | ترنسکریپتومیک و فنوتیپیک | داده‌های فنوتیپی را جهت تعیین واکنش‌های مرتبط با فنوتیپ بکار می‌گیرد و بازه آن واکنش‌ها را مشخص می‌کند. | PRIME |
| [۱۳۶] | بله | برنامه ریزی خطی | خیر | رنسکریپتومیک و فنوتیپیک | از داده‌های فنوتیپی برای تعیین یک ثابت جهت تعیین حد بالا برای واکنش‌ها استفاده میکند. | TRFBA |

یکی از پیچیدگی‌ها و گلوگاه‌های روش‌های مذکور در ساخت مدل‌های بافت-خاص، تعیین مقدار آستانه فعالیت برای تعیین واکنش‌های فعال می‌باشد. در روش‌هایی نظیر iMAT، تنها یک عدد به عنوان آستانه فعالیت در نظر گرفته می‌شود. در روش‌های دیگری نظیر INIT برای واکنش‌ها بر اساس داده‌های بیان، وزن‌هایی در نظر گرفته شده و میزان فعالیت واکنش‌ها بر اساس این وزن‌ها مشخص می‌گردد. با توجه به بررسی‌های انجام شده در میزان تاثیر کمیت‌های ورودی از بین موارد سه گانه‌ی: (۱) داده‌های بیان و فنوتیپک ورودی، (۲) مقدار آستانه فعالیت و (۳) اعمال روش‌های پسا‌فرآیندی افزایش دقت مدل، مورد دوم یا به عبارتی مقدار آستانه فعالیت، بیشترین تاثیر را بر قدرت پیش‌بینی مدل‌های ساخته شده داشته است [۱۳۷]. از این رو روش‌هایی جهت یافتن بهتر این مقدار و بهبود عملکرد مدل‌ها ارائه شده است. از میان این روش‌ها، StanDep یک روش موفق جهت ایجاد مدل پیش‌بین برای ارزیابی تغییرات عملکردی سلول‌های سرطانی و سالم می‌باشد، که برای هر واکنش به صورت مجزا یک مقدار آستانه فعالیت در نظر گرفته که این مقدار با کمک روش خوشه بندی^{۸۶} بدست می‌آید [۱۳۸]. با این حال این روش مانند سایر روش‌های دیگر، در پیش‌بینی رفتار سلولی پس از حذف یک ژن ضعیف عمل می‌کند. در سال ۲۰۱۹ پیرس پاچکو و همکاران [۱۳۹] روشی را توسعه دادند که بر اساس آن، مدل‌های ایجاد شده توانایی قابل توجهی در پیش‌بینی رفتار سلول‌ها پس از حذف یک ژن یا واکنش از آن‌ها را داشتند. این روش که یک روش به روز رسانی شده از روش FASTCORMICS است، با نام این روش rFASTCORMICS شناخته می‌شود. در بین روش‌های یاد شده، این روش تنها الگوریتمی است که با استفاده از مدل‌های بافت-خاص حاصل از آن، داروهای جدیدی جهت درمان سرطان ارائه شده است. با توجه به بکارگیری این روش در تحقیق پیش‌رو، در فصل سوم نحوه عملکرد این روش به صورت مفصل شرح داده شده است.

۲-۸- کاربرد مدل‌های متابولیکی بافت-خاص

کاربردهای رایج مدل‌های بافت-خاص معمولاً بر تحلیل مقایسه‌ای مدل‌های سالم و ناسالم تمرکز دارند و استفاده از روش‌های تحلیل مبتنی بر محدودیت می‌تواند به شناخت مکانیسم‌ها و اثرات یک وضعیت خاص کمک کند. این امر به نتایج منطقی در مورد تشخیص اهداف دارویی منجر می‌شود. ظرفیت بزرگی که هنوز به طور کامل به بلوغ نرسیده است،

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

مربوط به استفاده از تکنیک‌های توالی‌گیری^{۸۷} و بازسازی خودکار مدل‌های بافت-خاص است تا مدل شخصی‌سازی شده از بافت مبتلای بیمار ایجاد شود. با این رویکرد، بهترین درمان با یافتن اهداف دارویی برای بیمار مورد نظر شناسایی می‌شود. تلاش‌هایی که تا به حال در این زمینه انجام شده است در جدول ۲-۳ به صورت خلاصه ذکر شده اند.

جدول ۲-۳- خلاصه‌ای از پژوهش‌های پیشین در زمینه بکارگیری مدل‌های بافت-خاص

| مرجع | خلاصه مقاله ارائه شده |
|-------|---|
| [۶۸] | توسعه اولین مدل متابولیکی انسانی مختص به سرطان (GSMM) که برای شناسایی مسیرهای هدف جهت درمان سرطان کلیوی استفاده می‌شود. |
| [۱۴۰] | بازسازی یک مدل متابولیکی اختصاصی برای سرطان کلیه و شناسایی ۵ فرضیه جایگزین برای درمان |
| [۱۴۱] | استفاده از مجموعه‌های کشنده مصنوعی دوگانه جهت یافت هدف دارویی برای سرطان. بررسی تاثیر کشندگی ژن <i>RRM1</i> بر روی سلول‌های میلوما |
| [۱۳۰] | بازسازی خودکار مدل‌ها برای ۶۹ بافت طبیعی و ۱۶ رده سلول سرطانی |
| [۱۳۵] | بازسازی ۶۰ رده سلول سرطانی با پیش‌بینی هدف‌های دارویی و اعتبارسنجی تجربی به صورت محدود |
| [۸۱] | بازسازی ۲۷ مدل بیمار-خاص از کارسینومای هیپاتوسلولار (سرطان کبد) که علاوه بر گزینه‌های درمانی مشترک، گزینه‌های درمانی فردی هم نشان پیشنهاد شده است. |
| [۱۴۲] | تعیین معادله رشد سلولی انسان برای بررسی متابولیسم سرطانی و اثر واربارگ |
| [۱۴۳] | شناسایی ویژگی‌های عملکرد متابولیکی در دو نوع سرطان ریه |
| [۱۴۴] | بازسازی هیپاتوسیت انسان (HepatoNet1) برای بررسی پاسخ‌های کبد به وضعیت‌های متابولیکی تغییر یافته |
| [۱۴۵] | بازسازی مدل‌های آدیپوسیت، هیپاتوسیت و مایوسیت انسانی. یک مدل چند بافتی ایجاد شد تا چرخه‌های آلانین و کوری، و همچنین جذب مواد مغذی را شبیه‌سازی کند. |

| مرجع | خلاصه مقاله ارائه شده |
|-------|--|
| [۱۳۰] | یکپارچه‌سازی داده‌های multi-omics و ارائه دو روش برای بازسازی خودکار مدل‌های بافت-خاص. هدف‌های دارویی سرطان از طریق تحلیل مقایسه‌ای با بافت سالم تعیین شدند. |
| [۱۴۶] | بازسازی مدل هیپاتوسیت جدید به منظور آشکارسازی جنبه‌های متابولیکی بیماری کبد چرب که با مصرف الکل مرتبط نیست. |

فصل سوم

مبانی مدل سازی

۳-۱- انتخاب روش مدل سازی

مدل سازی ریاضی شبکه‌های متابولیکی را می‌توان به دو شیوه عمده تقسیم بندی نمود: مدل سازی بر پایه تئوری و مدل سازی بر پایه محدودیت. در ادامه به مقایسه این دو روش پرداخته و چرایی انتخاب روش مدل سازی بر پایه محدودیت در این پژوهش بیان خواهد شد. تمامی مدل سازی‌های بر پایه تئوری که به طور معمول بر مبنای قوانین فیزیکی و شیمیایی هستند، به سمت دستیابی به یک جواب خاص از مسئله منجر خواهند شد. اما به کارگیری این روش در مدل سازی سامانه‌های زیستی با سه چالش عمده روبروست [۱۰۰]:

- اولین محدودیت به واسطه پیچیدگی شیمیایی محیط درون سلولی به وجود می‌آید، که تعریف آن را در قالب ترم‌های مورد نیاز برای فرمول‌ها و معادلاتی که این محیط را توصیف می‌کنند، کار بسیار پیچیده و دشواری است.
- با فرض این که تمام معادلات حاکم مشخص شده باشند و محدودیت اول به نحوی برطرف شده باشد، مقادیر عددی تمامی پارامترهایی که در معادلات ظاهر می‌شوند باید مشخص گردد، که امری بسیار دور از ذهن می‌باشد.
- در صورتی که هر دو چالش قبل نیز نادیده گرفته شود، باز هم نمی‌توان این روش مدل سازی را به عنوان راه حلی منطقی معرفی نمود؛ زیرا از طرفی تکامل باعث تغییر پارامترهای سیستم در طول زمان می‌شود و از طرف دیگر در جمعیت زیستی سلول‌ها، پارامترهای هر سلول با بقیه سلول‌ها متفاوت خواهد بود. بنابراین، در این دیدگاه نیاز به آگاهی بر چگونگی تغییر پارامترها در طول زمان و همچنین بین سلول‌های مختلف

می‌باشد که از لحاظ عملی امکان پذیر نیست.

- علاوه بر چالش‌های فوق، در زیست‌شناسی به نظر می‌رسد که یک شبکه نه تنها می‌تواند عملکردهای متفاوتی داشته باشد، بلکه می‌تواند یک عملکرد خاص را در حالت‌های معادل مختلفی از خود بروز دهد.

در مقابل، در روش‌های مبتنی بر محدودیت بجای یک حل خاص، یک محدوده از پاسخ ارائه می‌شود که یک پس‌زمینه مفهومی کلی از عملکرد سامانه مورد مطالعه ارائه می‌دهد. این امر به وسیله محدودیت‌هایی که برای عملکرد سلولی مشخص می‌شود، انجام می‌پذیرد. این محدودیت‌ها در زمینه‌های مختلفی مطرح می‌شوند که برخی از آن‌ها عبارتند از:

- محدودیت‌های اساسی فیزیکی و شیمیایی
- محدودیت‌های فضایی و ساختاری
- محدودیت‌های شرایط محیطی
- محدودیت‌های فرآیندهای تنظیمی سلول

باید توجه داشت که مدل‌سازی مسئله به این روش ماهیت متغیرهای وابسته مسئله یا به عبارتی مجهولات را تغییر می‌دهند. در این روش غلظت مواد مختلف مجهولات مسئله نبوده و شدت جریان مواد مختلف، از طریق تبدیلات بیوشیمیایی به عنوان متغیر وابسته شناخته می‌شود. با استفاده از این روش و مدل‌سازی بر پایه محدودیت، دیگر نیازی به برآورد پارامترهای متعدد برای حل مسئله نیست و تعداد پارامترهای ورودی به شدت کاهش می‌یابد. بنابراین می‌توان از این روش مدل‌سازی به عنوان یک روش مناسب جهت مدل‌سازی سامانه‌های بزرگ زیستی یاد کرد. از مدل‌های به دست آمده از این روش با عنوان مدل‌های مبتنی بر محدودیت^۱ یاد می‌شود. مدل‌های متابولیکی ژنوم-مقیاس، نوعی از مدل‌های مبنی بر محدودیت هستند.

۳-۲- مدل‌سازی مبتنی بر محدودیت

مدل‌های مبتنی بر محدودیت مبتنی بر اساس چند فرضیه بنا شده اند که آن‌ها را از مدل‌های سینتیکی متمایز می‌کند. این فرضیات به شرح زیر هستند:

- (۱) انجام واکنش‌های بیوشیمیایی به صورت آنی در نظر گرفته می‌شود؛
- (۲) زمان در سیستم در نظر گرفته نمی‌شود؛
- (۳) نرخ واکنش‌ها و غلظت‌های متابولیت‌ها متغیر نیستند؛
- (۴) هر واکنش باید معادل همان مقدار ماده‌ای را که مصرف می‌کند، تولید کند (برقراری توازن جرمی).

¹ Constraint-based models

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

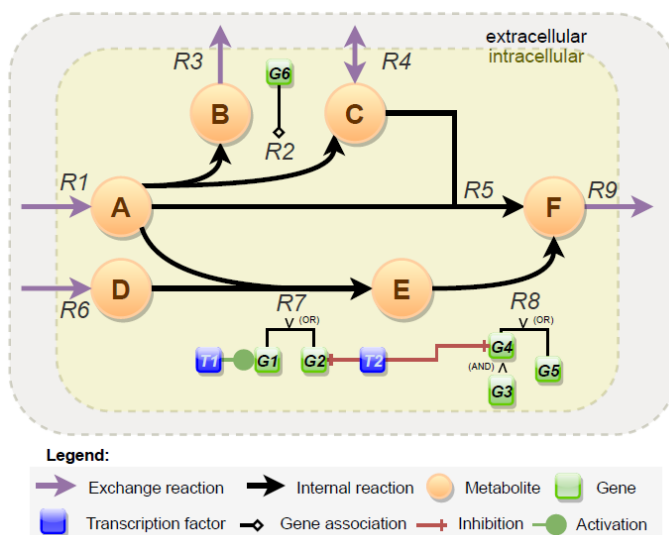
با توجه به چهار فرضیه فوق، تغییر غلظت‌های متابولیت‌ها (که با نماد c نشان داده شده است) به مرور زمان (نشان داده شده با نماد t) از طریق (۳-۱) قابل بیان است [۱۴۷].

$$\frac{dC(t)}{dt} = Sv = 0 \quad (1-3)$$

(۳-۱) نماینده یک دستگاه معادلات را نشان می‌دهد. تعداد معادلات این دستگاه به تعداد متابولیت‌های موجود در سیستم می‌باشد و هر معادله‌ی این دستگاه از ضرب ضرایب استوکیومتری یک متابولیت در واکنش‌های مختلف در نرخ واکنش مربوطه بدست می‌آید. در این معادله S نشان دهنده ماتریس ضرایب استوکیومتری و v نشان دهنده وکتور نرخ شار واکنش‌ها می‌باشد.

۳-۳- اجزای مدل‌های متابولیکی ژنوم-مقیاس

در این قسمت به عنوان نمونه، یک شبکه شماتیک ساختگی نشان داده شده است (شکل ۳-۱). در ادامه اجزای اصلی تشکیل دهنده مدل مربوط به این شبکه شرح داده شده اند.



شکل ۳-۱- واکنش‌های R1, R3, R4, R6, و R9 واکنش‌های تبادلی هستند (نشان داده شده با رنگ بنفش). قوانین ژن-پروتئین-واکنش (Gene-Protein-Reaction) از طریق ژن‌ها (مربع‌های سبز) که با اپراتورهای Boolean ارتباط دارند نشان داده شده‌اند. اطلاعات بیشتر مربوط به داده‌های بیانی ژن‌ها می‌باشد که با مربع‌های آبی نشان داده شده‌اند [۱۴۸].

۳-۳-۱- ماتریس استوکیومتری

ماتریس استوکیومتری (S) با ابعاد m در n، واکنش‌ها و ترکیب‌های شیمیایی آن‌ها در سیستم را نمایش می‌دهد. هر ردیف i و هر ستون j به ترتیب نمایانگر یکی از m متابولیت‌ها و n واکنش‌ها است و هر مقدار S ضریب استوکیومتری برای متابولیت i در واکنش j را نشان می‌دهد. یک نمونه از این ماتریس در شکل ۳-۲ که ماتریس استوکیومتری معادل شبکه نشان داده شده در شکل ۳-۱ است، نشان داده شده است.

Stoichiometric matrix

| | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | R6 | R7 | R8 | R9 |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| A | 1 | -1 | 0 | 0 | -1 | 0 | -1 | 0 | 0 |
| B | 0 | 1 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C | 0 | 0 | 0 | -1 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | -1 | 0 | 0 |
| E | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | -1 | 0 |
| F | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | -1 |

S

$$\begin{matrix}
 v_1 \\
 v_2 \\
 v_3 \\
 v_4 \\
 v_5 \\
 v_6 \\
 v_7 \\
 v_8 \\
 v_9
 \end{matrix}
 \times
 \begin{matrix}
 = \\
 \\
 \\
 \\
 \\
 \\
 \\
 \\
 \\
 \end{matrix}
 \begin{matrix}
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0
 \end{matrix}$$

V 0

شکل ۳-۲- نمایش ساختار اساسی مدل متابولیکی برای شبکه نشان داده شده در شکل ۳-۱ که محدودیت‌های وضعیت پایا^۱ را تعیین می‌کند [۱۴۸].

۳-۳-۲- ظرفیت‌ها

به منظور نشان دادن قابلیت برگشت‌پذیری و یا پذیرفتن ظرفیت‌های خاص که از داده‌های fluxomics بدست می‌آیند، نرخ واکنش‌ها می‌توانند به مقادیری خاص محدود شوند. برای این منظور، برای هر جریان v_i ، نامساوی‌های خطی به مدل اضافه می‌شود. برای هر جریان v_i ، مقادیر حداکثر (u_i) و حداقل (l_i) تنظیم می‌شوند (نامساوی (۳-۲)). اگر $l_i \geq 0$ باشد، واکنش i برگشت ناپذیر محسوب می‌شود. اگر $l_i < 0$ و $u_i > 0$ باشد، واکنش می‌تواند به صورت دوطرفه (برگشت پذیر) اتفاق بیفتد. ظرفیت‌های جریان به‌ویژه برای واکنش‌های تبادلی^۲ بسیار مهم هستند. باید در نظر داشت که این واکنش‌ها برای تعیین نرخ میزان جذب یا اجازه و امکان تولید هر متابولیت

¹ Steady state

² Exchange reactions

$$l_i \leq v_i \leq u_i$$

(۲-۳)

۳-۳-۳- قوانین ارتباط ژن-پروتئین-واکنش (GPR)^۱

جهت درج روابط بین ژن‌ها و واکنش‌ها در مدل‌های متابولیکی ژنوم مقیاس، از قوانین ژن-پروتئین-واکنش (قوانین GPR)، که به صورت روابط منطقی بین ژن‌ها مطرح می‌شوند، استفاده می‌شود. به ازای هر واکنش که رابطه آن با ژن‌های مربوطه مشخص باشد، یک قانون GPR در نظر گرفته می‌شود. در روابط منطقی بین ژن‌ها دو نوع رابطه وجود دارد: الف) رابطه "and" و ب) رابطه "or". برخی از واکنش‌ها نیاز به آنزیم‌هایی دارند که از چند زیربخش تشکیل شده‌اند و هر زیربخش از آن‌ها مربوط به یک ژن خاص می‌باشد. رابطه بین ژن‌ها برای این آنزیم با and بیان می‌شود که نشان دهنده این است که برای تولید آنزیم کاتالیزگر این واکنش و به دنبال آن انجام واکنش، نیاز به بیان تمامی ژن‌های مربوطه به صورت همزمان می‌باشد. از طرف دیگر، برخی از واکنش‌ها به صورت آلترناتیو با بیش از یک آنزیم انجام می‌پذیرند و در نتیجه جهت نمایش رابطه ژن‌های مربوط به این آنزیم‌ها در فرمول GPR، از رابط or استفاده می‌گردد.

۳-۴- تحلیل موازنه جریان (FBA)

تحلیل موازنه جریان یکی از اصلی‌ترین و پایه‌ای‌ترین روش‌های تحلیل مدل‌های مبتنی بر محدودیت هستند که قادر به محاسبه و پیش‌بینی جریان عبوری از مسیر واکنش‌های موجود در یک مدل متابولیکی ژنوم-مقیاس می‌باشند [۱۴]. محاسبه جریان مواد در شبکه، امکان محاسبه نرخ رشد سلول یا تولید یک ماده را، که از دیدگاه زیست‌فناوری با اهمیت است، به ما می‌دهد. اولین قدم در FBA بیان ریاضی شبکه متابولیکی بازسازی شده است که در قسمت پیشین به آن اشاره شد.

قدم دوم در FBA تعریف فنوتیپ سلولی در قالب یک تابع هدف زیستی است که متناسب با مسئله مورد بررسی انتخاب می‌شود. در مسئله‌ی پیش‌بینی میزان رشد، نرخ تبدیل مواد مختلف به اجزاء زیست‌توده همچون نوکلئیک اسیدها، پروتئین‌ها و لیپیدها، به عنوان پیش‌ماده‌های مورد نیاز برای رشد، سنجیده می‌شود. بیان ریاضی این تبدیل در قالب یک واکنش به نام «واکنش زیست توده^۲» گنجانده می‌شود و ضرایب استوکیومتری آن بر مبنای داده‌های آزمایشگاهی تعیین می‌شود. با اضافه شدن این واکنش به شبکه و تعیین آن به عنوان تابع هدف، یک دستگاه جبری

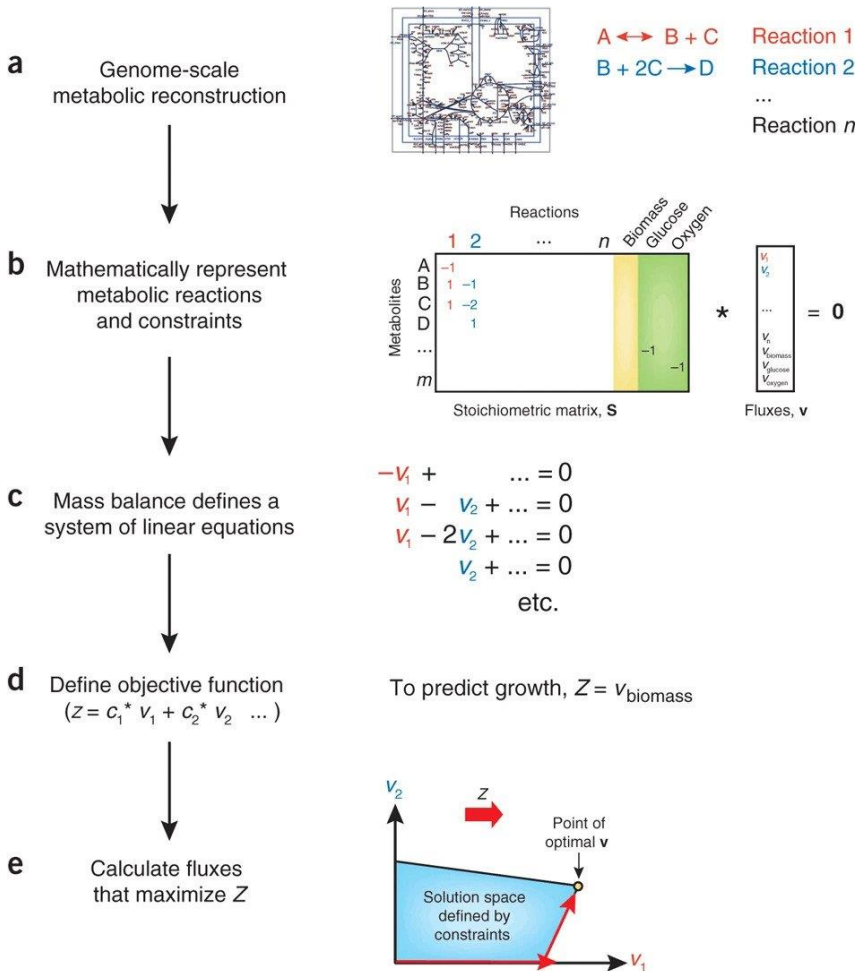
¹ Gene-protein-reaction rules

² Biomass reaction

خطی تشکیل می شود که با توجه به تعداد زیاد متغیرها، روش های ویژه متعددی جهت حل آن ها توسعه داده شده است. در مسئله (۳-۳) خلاصه مباحث مطرح شده در قالب فرمول های ریاضی آورده شده است:

$$\begin{aligned} & \max. v_{bio} \\ & \text{s.t.} \\ & \mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = 0 \\ & \mathbf{v}_{lb} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{v}_{ub} \end{aligned} \quad (3-3)$$

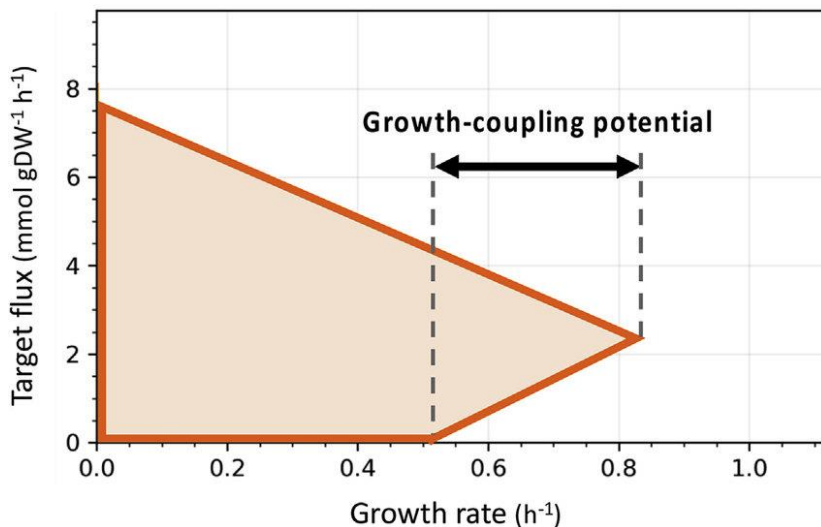
در مسئله (۳-۳)، v_{bio} نشان دهنده فلاکس عبوری از واکنش زیست توده، ماتریس \mathbf{S} نماینده ماتریس استوکیومتری و وکتور \mathbf{v} نشان دهنده جریان عبوری از واکنش ها می باشد. شکل ۳-۳ به طور خلاصه مراحل محاسبه جریان عبوری از شبکه مابولیکی توسط FBA را نشان می دهد.



شکل ۳-۳-مراحل محاسبه جریان در شبکه متابولیکی بازسازی شده به وسیله تحلیل موازنه جریان

۳-۵- تحلیل تغییرات جریان (FVA)^۱

در حل دستگاه‌های جبری خطی فرامعین با استفاده از روش مدل‌سازی مبتنی بر محدودیت، به طور معمول به جای یک جواب مشخص، برای هر مجهول یک بازه از جواب تعیین می‌گردد که به ازای هر مقدار از آن بازه، شرایط مسئله برقرار می‌گردد. در بحث محاسبه جریان در شبکه‌های متابولیکی نیز همین موضوع مطرح می‌شود و محاسبه این بازه جریان برای واکنش‌های مختلف اهمیت خاصی دارد. محاسبه این بازه با روش تحلیل تغییرات جریان (FVA) [۱۴۹] انجام می‌پذیرد. با استفاده از روش FVA تحلیل‌های کاربردی را می‌توان انجام داد که از جمله آن‌ها رسم نمودار محدوده‌ی تولید^۲ است. شکل ۳-۴ نمونه‌ای از این نمودار را نشان می‌دهد:



شکل ۳-۴- نمودار شماتیک محدوده تولید. ناحیه‌ای که رشد سلولی به طور قطع نیاز به تولید ماده مورد نظر دارد، ناحیه growth-coupled یا همبند رشد نامیده می‌شود [۱۵۰].

برای رسم این نمودار می‌بایست به ازای درصد‌های مختلفی از رشد، تحلیل تغییرات جریان برای واکنش مورد نظر انجام گردد؛ به ازای هر درصد خاص، دو مقدار بیشینه و کمینه جریان برای واکنش مورد بررسی تعیین می‌گردد. با تکرار این عملیات، نمودار مورد نظر به دست می‌آید. تحلیل‌های مختلفی از جمله بررسی تولید همبند با رشد، که نشان دهنده تولید قطعی مواد مورد نظر در یک بازه از رشد است، با استفاده از این نمودار و FVA انجام می‌پذیرد. علاوه بر این،

¹ Flux variability analysis

² Production envelope

تحلیل این نمودار و مقایسه آن در حالت‌های مختلف می‌تواند ابزار بسیار مناسبی جهت تشخیص تغییرات ایجاد شده در شبکه متابولیکی به شمار بیاید.

۳-۶- شبیه‌سازی حذف واکنش و ژن

حذف واکنش‌ها و ژن‌ها از مدل‌های متابولیکی ژنوم-مقیاس امکان پذیر می‌باشد. در دو بخش پیش‌رو به این موضوع پرداخته شده است.

۳-۶-۱- شبیه‌سازی حذف واکنش

در مدل‌های متابولیکی ژنوم-مقیاس، دو مشخصه حد پایین جریان و حد بالای جریان برای هر واکنش در نظر گرفته می‌شود. جهت شبیه‌سازی فرآیند حذف یک واکنش، تنها کافی است که هر دو حد بالا و پایین مربوط به واکنش مورد نظر برابر با صفر قرار داده شود. در این حالت، عدم عبور قطعی جریان از این واکنش معادل عدم وجود واکنش در شبکه خواهد بود. بنابراین مسئله به صورت زیر بیان می‌شود:

$$\begin{aligned} & \max. v_{bio} \\ & \text{s.t.} \\ & S \cdot v = 0 \\ & v_{lb} \leq v \leq v_{ub} \\ & v_{lb(i), v_{ub(i)}} = 0 \end{aligned} \quad (۴-۳)$$

که در مسئله (۴-۳)، i نشان‌دهنده اندیس واکنشی است که از سیستم حذف خواهد شد.

۳-۶-۲- شبیه‌سازی حذف ژن

برای تشخیص این که با حذف یک یا چند ژن از مدل، کدام یک از واکنش‌ها غیر فعال می‌شوند، کافی است مقادیر منطقی هر یک از قوانین GPR با توجه به فعال یا غیر فعال بودن ژن‌های شرکت کننده در آن قانون، سنجیده شود. در صورتی که قانون GPR مربوط به یک واکنش مقدار True را نشان دهد، این واکنش در شبکه باقی می‌ماند و در غیر این صورت آن واکنش حذف خواهد شد.

۳-۷- جستجوی اول-عمق (DFS)^۱

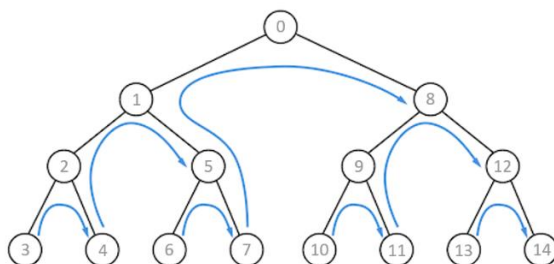
جست‌وجوی اول-عمق یکی از ده‌ها روش پیمایش گراف‌هاست. الگوریتم DFS یک الگوریتم بازگشتی است که از ایده‌ی پیمایش معکوس^۲ استفاده می‌کند. در اینجا، کلمه backtrack به این معنی است که الگوریتم پیمایش زمانی که به جلو حرکت می‌کند و دیگر گره‌ای در طول مسیر

¹ Depth-first search

² Backtracking

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

فعلی وجود ندارد، در همان مسیر به عقب حرکت می‌کند تا گره‌هایی را برای پیمایش پیدا کند. در نتیجه همه گره‌ها در مسیر فعلی بازدید می‌شوند تا زمانی که همه گره‌های بازدید نشده پیموده شوند و پس از آن مسیر بعدی انتخاب شود [۱۵۱]. شماتیکی از این روش در شکل ۳-۵ نشان داده شده است.



شکل ۳-۵- نحوه پیمایش یک گراف شماتیک با استفاده از روش جست‌وجو اول-عمق. فلش‌های آبی رنگ، نحوه پیمایش گراف را نشان می‌دهند. همچنین شماره‌های درج شده بر روی گره‌ها، نوبت پیمایش آن‌ها را مشخص کرده است.

۳-۸- روش rFASTCORMICS

پاچکو و همکاران در مقاله خود نشان دادند که rFASTCORMICS ابزاری موثر برای بازسازی مدل‌های محیط خاص است [۱۳۹]. در نظر گرفتن آستانه‌های^۱ متفاوت و دلخواه برای داده‌های RNA-seq، که ژن‌های فعال و غیرفعال را مشخص می‌کند، به طور قابل توجهی بر دقت مدل تأثیر می‌گذارد [۱۳۷، ۱۵۲]. روش rFASTCORMICS از روشی که توسط هارت و همکاران [۱۵۳] پیشنهاد شده برای مشخص کردن آستانه فعالیت جهت به دست آوردن ژن‌های فعال استفاده می‌کند. در نتیجه، روش rFASTCORMICS برای هر سری داده مربوط به یک بافت، نموداری از میزان بیان ژن‌ها بر اساس مقادیر $\log_2\text{-FPKM}$ ^۲ آن تولید می‌کند. سپس یک منحنی گوسی برای نیمه‌راست قله اصلی (منحنی بیان) تنظیم می‌شود. مقدار میانگین این منحنی به عنوان آستانه بیان در نظر گرفته می‌شود. پس از آن، منحنی به دست آمده از منحنی ژن‌های فعال کم می‌شود و یک منحنی گوسی دیگر برای این بخش از منحنی تولید می‌شود (منحنی عدم بیان).

روش rFASTCORMICS از مقدار میانگین (μ) و انحراف معیار (σ) منحنی گوسی سمت راست برای تبدیل مقادیر $\log_2\text{-FPKM}$ به مقادیر zFPKM استفاده می‌کند که در فرمول (۳-۵)

¹ Threshold

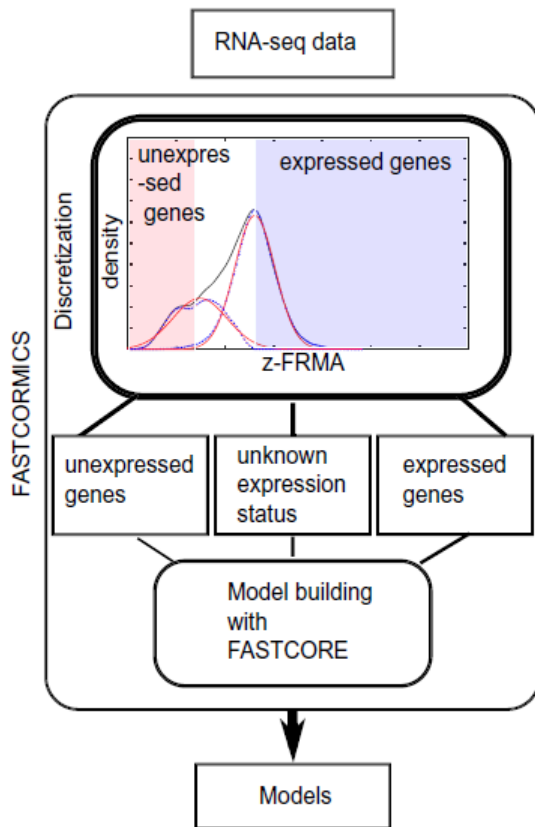
² Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

آورده شده است.

$$z_{\text{FPKM}} = \frac{\log_2(\text{FPKM}) - \mu}{\sigma} \quad (5-3)$$

اگر میانگین منحنی عدم بیان بیشتر از ۳- (با واحد zFPKM) باشد، آنگاه مقدار ۳- به عنوان حد عدم بیان انتخاب می شود و ژن هایی با مقادیر zFPKM کمتر به عنوان غیرفعال با امتیاز ۱- در نظر گرفته می شوند. از سوی دیگر، «آستانه بیان» به عنوان مقدار zFPKM برابر با ۰ انتخاب می شود و ژن هایی با مقادیر zFPKM بیشتر به عنوان فعال با امتیاز ۱+ در نظر گرفته می شوند. ژن هایی که مقادیر zFPKM آن ها بین این دو آستانه قرار دارد، به عنوان وضعیت بیان ناشناخته با امتیاز صفر در نظر گرفته می شوند. در نهایت، با استفاده از قوانین GPR¹، امتیازهای بیان ژن ها به واکنش های متناظر نگاشت می شوند و باندهای مربوط به این واکنش های غیرفعال در مدل، برابر با صفر قرار داده می شود. نحوه عملکرد این روش به صورت خلاصه در شکل ۳-۶ نشان داده شده است.

¹ Gene-protein-reaction rules



شکل ۳-۶- شماتیکی از نحوه عملکرد روش FASTCORMICS [۱۳۹].

فصل چهارم

توسعه روش Rapid-SL جهت دستیابی به کشنده‌های مصنوعی مرتبه بالا

۴-۱- مقدمه

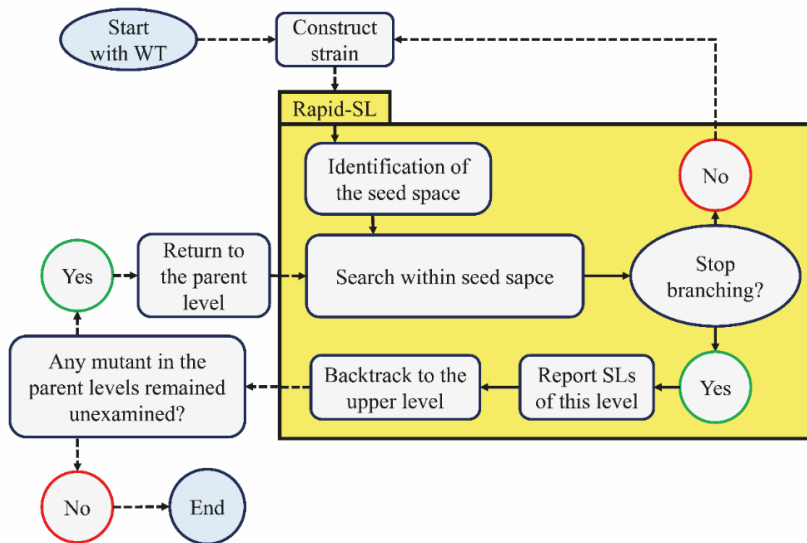
همانطور که در فصل دوم اشاره شده، روش‌های متعددی جهت دستیابی به مجموعه‌های کشنده مصنوعی توسعه داده شده‌اند. با این وجود با توجه به وسعت فضای جستجو جهت دستیابی به مجموعه کشنده‌های مصنوعی مرتبه بالا، سرعت عملکرد روش به کار گرفته شده بسیار هائز اهمیت خواهد شد. با توجه به این موضوع روش Fast-SL سریع‌ترین روش موجود نیز با توجه به نحوه پیاده‌سازی آن، پاسخ‌گوی نیاز زمانی در مسئله پیش رو نمی‌باشد. به همین جهت نیاز به توسعه روش دیگر یا انجام اصلاحات اساسی بر روی روش‌های موجود می‌باشد. در این فصل نحوه پیاده‌سازی روش Rapid-SL که به عنوان یک روش جدید جهت دستیابی سریع‌تر به SLهای مرتبه بالا می‌باشد، شرح داده شده است. در ابتدا خلاصه‌ای از نحوه پیاده‌سازی روش بیان شده است؛ سپس هر مرحله به تفصیل شرح داده خواهد شد. در ادامه نتایج مربوط به ارزیابی روش و همچنین SLهای مرتبه‌بالای استخراج شده برای میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه، ارائه شده است.

۴-۲- نحوه پیاده‌سازی روش Rapid-SL

برای امکان پذیر ساختن شناسایی SLهای مرتبه بالاتر، باید فضای جستجو کاهش داده شود. حذف مجموعه واکنش‌هایی که پس از بهینه‌سازی مقدار رشد، جریانی از آن‌ها عبور نمی‌کند، باعث ایجاد تغییر در شار واکنش زیست توده نمی‌شود [۱۲۰]. بنابراین، برای کاهش فضای

توسعه روش Rapid-SL جهت دستیابی به کشنده‌های مصنوعی ... رساله دکتری

جستجو، ابتدا مجموعه‌ای از واکنش‌های حامل شار را شناسایی کرده و بر روی آن تمرکز می‌کنیم که در این کار با عنوان مجموعه Seed Space (J_{nz}) یا فضای بذر اشاره می‌شود. در مرحله دوم، جهت یافتن SLها، در Seed Space جستجو انجام می‌شود. علاوه بر این، هر زیر مجموعه غیر کشنده فضای بذر یک سویه جهش یافته جدید را تعریف می‌کند. با استفاده از رویکرد DFS، مراحل اول و دوم برای هر یک از سویه‌های جهش یافته جدید تکرار می‌شود (شکل ۴-۱). این روند تا زمانی که شرایط توقف خاصی برآورده شود ادامه می‌یابد. هر مرحله از فرآیند و همچنین شرایط توقف در ادامه توضیح داده شده است. همچنین کد توسعه داده شده و شبه‌کد^۱ مربوط به به روش توسعه داده شده در پیوست ۱ آورده شده است. فلوجارت نشان داده شده در شکل ۴-۱ یک شماتیک از نحوه کارکرد روش Rapid-SL را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۱-فلوجارت مربوط به روش توسعه داده شده. فراخوانی مجدد تابع Rapid-SL از درون خود این تابع نشان دهنده ویژگی بازگشتی این روش است [۱۵۴].

۴-۲-۱- گام اول: شناسایی Seed Space

در مرحله اول، دو مسئله بهینه‌سازی خطی مربوط به تجزیه و تحلیل موازنه شار [۱۴] در نظر گرفته شده و حل می‌شود. حل این دو مسئله منجر به شناسایی یک توزیع شار می‌شود که شار تابع هدف زیست توده (V_{bio}) را به حداکثر می‌رساند، در حالی که نرم شارها به مقدار حداقل آن رسیده باشد. مسئله اول به صورت تعریف شده در مسئله (۴-۱) می‌باشد که در آن مجموعه

¹ Pseudocode

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

شارهای عبوری از تمامی واکنش‌ها به حداقل می‌رسد:

$$\begin{aligned} \min \sum_j |v_j| \\ \text{s.t.} \\ v_{bio} = v_{bio,WT} \\ \mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = 0 \\ \mathbf{v}_{lb} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{v}_{ub}, \end{aligned} \quad (1-4)$$

در این مسئله $v_{bio,WT}$ رشد سویه طبیعی^۱ است که از حل مسئله (۳-۴) (در فصل چهارم به تفصیل توضیح داده شده است) محاسبه می‌شود:

$$\begin{aligned} \max v_{bio} \\ \text{s.t.} \\ \mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = 0 \\ \mathbf{v}_{lb} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{v}_{ub}. \end{aligned} \quad (4-3)$$

هدف از محاسبه این توزیع شار، مشخص کردن واکنش‌های حامل شار یا Seed Space است. استفاده از تحلیل تغییر پذیری شار [۱۴۹] به جای محاسبه نرم اول شارها، اطلاعات بیشتری در مورد تأثیر هر واکنش بر تابع هدف زیست توده در اختیار ما قرار می‌دهد. با این حال، FVA فرآیندی زمان‌بر است و استفاده مکرر از این روش کل فرآیند را از نظر زمان محاسبات با مشکل جدی مواجه می‌کند.

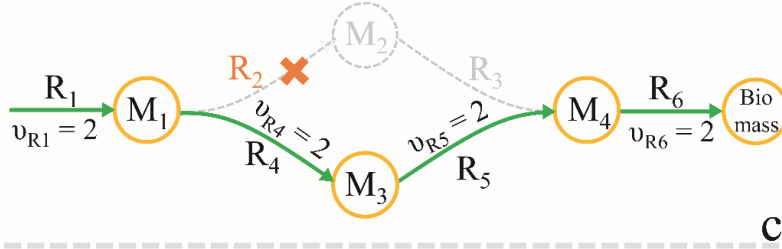
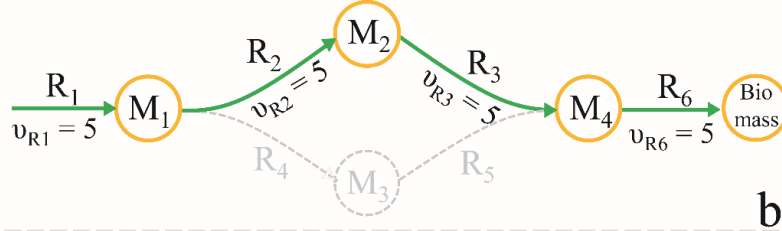
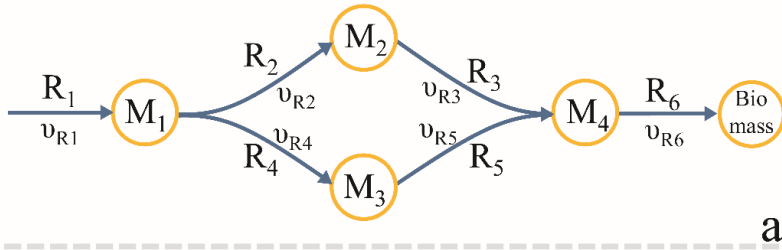
۴-۲-۲- گام دوم: جستجو در Seed Space

تمام ترکیبات واکنش‌ها در Seed Space پتانسیل تشکیل SL را دارند. بنابراین جستجوی جامع بر روی مجموعه واکنش‌های موجود در Seed Space در مرحله دوم انجام می‌شود. با این حال، هنگامی که یک SL در این مرحله یافت می‌شود، تمامی مجموعه‌های شامل این SL از فضای جستجو حذف می‌گردد تا از بررسی موارد تکراری یا تولید پاسخ‌های غیر کمینه^۲ جلوگیری شود. علاوه بر این، هر مجموعه غیر کشنده شناسایی شده در این مرحله به معنی تولید یک سویه جهش یافته با قابلیت رشد است. همچنین، مرحله دوم شامل فهرست کردن همه مجموعه‌های غیر کشنده برای بررسی جهش‌های تکثیر شونده مرتبط با آن‌ها، با حذف واکنش‌های بالقوه بیشتر، در سطح بعدی جستجو است. شکل ۴-۲ این توضیحات را با استفاده از یک مدل اختصاری^۳ نشان می‌دهد.

¹ Wild type

² Non-minimal cut sets

³ Toy model



Constraints on reaction fluxes: $0 < [v_{R1}, v_{R2}, v_{R3}, v_{R6}] < 5$;
 $0 < [v_{R4}, v_{R5}] < 2$

شکل ۴-۲- اثر حذف واکنش غیر کشنده J_{nz} . مدل اختصاری؛ R_i نشان دهنده نام واکنش و v_{Ri} نشان دهنده شار عبوری از طریق R_i است. (b) توزیع شار سویه طبیعی $J_{nz} = (R_1, R_2, R_3, R_6)$ توزیع R_2 شار جهش یافته که در آن حذف شده است. برای به حداکثر رساندن شار R_6 ، واکنش‌های R_4 و R_5 بر خلاف سویه طبیعی، شار غیر صفر به دست می‌آورند. بنابراین، حذف هر یک از واکنش‌های فعال شده R_4 یا R_5 باعث مسدود شدن شار از طریق R_6 و تابع هدف زیست‌توده می‌شود.

۴-۲-۳- شرایط عقبگرد و توقف در الگوریتم DFS

همانطور که توسط پراتاپا و همکاران توضیح داده شده است [۱۲۰]، حذف مجموعه‌ای از واکنش‌ها که فقط شامل واکنش‌های غیر حامل شار می‌شود، تأثیری بر شار واکنش تشکیل زیست توده نخواهد داشت. بنابراین، حداقل یک واکنش در Seed Space سویه نوع طبیعی (J_{nz}) باید در هر SL شرکت کند. در اینجا، این جمله از سویه نوع طبیعی به هر سویه مجازی به دست آمده در طول روند جستجوی خود تعمیم داده خواهد شد. به عبارت دیگر، هر واکنشی که برای

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

حذف در مراحل بعدی الگوریتم DFS تعیین می‌شود، باید از Seed Space سویه مجازی مادر سرچشمه بگیرد. بنابراین، پس از ارزیابی مرحله اول و دوم برای سویه نوع طبیعی، به طور مکرر این دو مرحله برای همه سویه‌های مجازی حاصل که در مرحله دوم سطح قبلی شناسایی شده‌اند، تکرار می‌شود. در ادامه فرآیند، با هر یک از این سویه‌های جهش‌یافته مانند سویه طبیعی رفتار و مراحل تکرار می‌شوند. بنابراین، ما با یک مسئله تکرار شونده روبرو هستیم که با استفاده از الگوریتم DFS مدیریت می‌شود. سایر الگوریتم‌های جستجوی سازمان‌یافته مانند breadth-first search [۱۵۵] و best-first search [۱۵۶] به جای DFS می‌توانند به راحتی در Rapid-SL مورد استفاده قرار بگیرند.

شروع جستجو از گره ریشه^۱، که از یک مجموعه غیر کشنده تشکیل شده است، انجام می‌گردد. به عنوان مثال، یک مجموعه غیر کشنده کلی، Δ_m با m عضو را، که از ارزیابی مرحله دوم به دست آمده است، در نظر بگیرید. فرض کنید $J_{nz}^{\Delta m}$ Seed Space سویه جهش یافته‌ای است که از حذف مجموعه غیر کشنده Δ_m از سویه طبیعی حاصل می‌شود. مجموعه $J_{nz}^{\Delta m}$ از طریق اعمال مراحل گام اول بر روی سویه جهش یافته مربوطه بدست می‌آید. اگر واکنشی در این سطح وجود داشته باشد (یعنی $J_{nz}^{\Delta m} - J_{nz} \neq \emptyset$)، گام دوم برای همه اعضای موجود در $J_{nz}^{\Delta m} - J_{nz}$ تکرار می‌شود. در روش Rapid-SL، عقب‌گرد^۲ در سه مورد اتفاق می‌افتد که در آن صورت پیمایش^۳ نمی‌تواند عمیق‌تر شود:

(۱) هنگامی که یک مجموعه کشنده تشخیص داده شود.

(۲) هنگامی که هیچ واکنش جدیدی پس از حذف یک مجموعه به دست نمی‌آید ($J_{nz}^{\Delta m} - J_{nz} = \emptyset$).

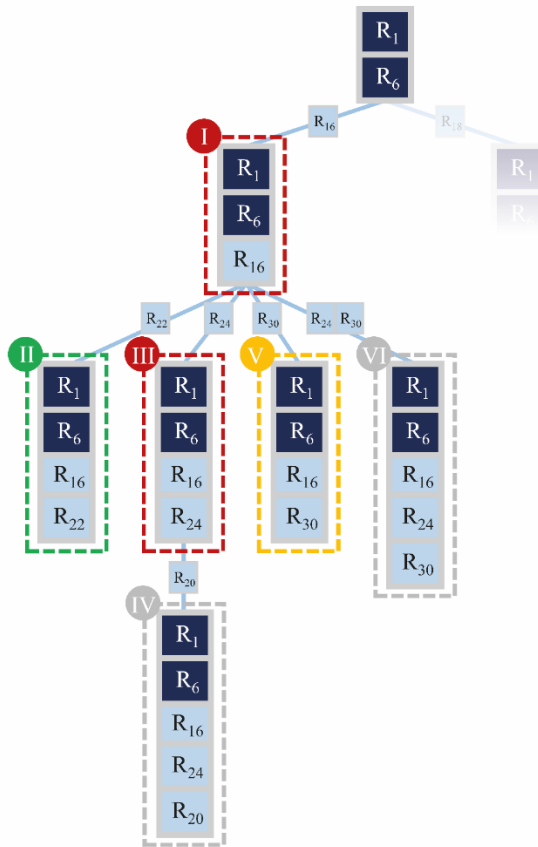
(۳) زمانی که اندازه مجموعه مورد بررسی به حداکثر کاردینالیته مورد نظر برسد.

پراتاپا و همکاران [۱۲۰] بیان می‌کنند که Fast-SL یک الگوریتم کاملا موازی نیست. با این حال، آن‌ها یک نسخه که بخش‌هایی از آن از قابلیت محاسبات موازی پشتیبانی می‌کند و فقط برای ارزیابی SLهای چهارگانه است، ارائه کرده‌اند. بر خلاف Fast-SL، در روش Rapid-SL با توجه به وجود امکان انجام محاسبات هر شاخه از DFS به صورت مجزا، قابلیت موازی‌سازی کامل وجود دارد و در پیاده‌سازی آن از این قابلیت استفاده شده است. شکل ۳-۴ مثالی شماتیک از فرآیند عقب نشینی را در روش Rapid-SL نشان می‌دهد. در مثال نشان داده شده، حداکثر کاردینالیته پنج در نظر گرفته شده است ($n = 5$).

¹ Root node

² Backtracking

³ Extension



شکل ۴-۳- شماتیکی از جستجوی عمقی در پیاده سازی روش Rapid-SL. مربع‌ها نشان دهنده اهداف هستند. در اینجا (R_1, R_6) یک مجموعه غیر کشنده بدست آمده از گام دوم است. اعداد رومی ترتیب پیشرفت در بررسی کشندگی مجموعه‌های مختلف را نشان می‌دهد. مربع‌های آبی روشن اهدافی را نشان می‌دهند که پس از حذف برخی واکنش‌ها، شار غیر صفر به دست می‌آورند. گره I و همچنین گره III مجموعه‌های غیر کشنده هستند و حذف آنها اهداف بالقوه جدیدی را فعال می‌کند (●). گره II یک مجموعه کشنده را نشان می‌دهد و بنابراین انشعاب از این گره متوقف می‌شود (●). انشعاب در گره V متوقف می‌شود زیرا هیچ هدف بالقوه جدیدی نمی‌تواند فعال شود (●). انشعاب در گره‌های VI و IV متوقف می‌شود زیرا به حداکثر کاردینالیته مطلوب رسیده است (●). پس از بررسی مجموعه‌های مربوط به شاخه R_{16} ، این روند برای شاخه R_{18} ادامه می‌یابد.

۴-۲-۴- شمارش مجموعه‌های ژن‌های کشنده مصنوعی

برای شمارش مجموعه ژن‌های کشنده مصنوعی، به روش مشابهی عمل می‌شود، با این تفاوت که واکنش‌های با شار غیر صفر به دست آمده در هر بخش با استفاده از قوانین GPR به ژن‌های

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

فعال تبدیل می‌شوند. تمرکز این پژوهش بر تسهیل مسیر شناسایی واکنش‌های کشنده مصنوعی بوده است، به این دلیل که گام اصلی در فرآیند یافتن ژن‌های کشنده مصنوعی، دستیابی به واکنش‌های کشنده مصنوعی می‌باشد. برای یافتن ژن‌های کشنده مصنوعی، بهبودهای دیگری را می‌توان با درگیر کردن و ترجمه قوانین GPR برای کاهش بیشتر فضای جستجو قبل از فرآیند شناسایی اصلی انجام داد.

۳-۴- ارزیابی و مقایسه روش توسعه داده شده با روش‌های پیشین

زمان محاسبات کلی Fast-SL و Rapid-SL عمدتاً به مدت زمانی بستگی دارد که برای حل مسائل بهینه‌سازی خطی جهت بررسی هر مجموعه مورد ارزیابی صرف می‌شود. بنابراین، برای اطمینان از مقایسه شفاف بین Fast-SL و Rapid-SL، تعداد مسائل بهینه‌سازی خطی که با هر روش انجام شده است، در این قسمت گزارش شده است. نتایج با استفاده از یک سیستم کامپیوتری با پردازنده ۲/۲ گیگاهرتزی Intel Xeon E5-2696 v4، که دارای ۱۲ هسته برای محاسبه است، به دست آمد.

۳-۴-۱- کشنده‌های مصنوعی مربوط به سه میکروارگانیزم مورد مطالعه

جدول ۳-۴-۱ تعداد SL‌های بدست آمده با کاردینالیته‌های مختلف را (تا چهار هدف در هر مجموعه) نشان می‌دهد. نتایج بدست آمده توسط Rapid-SL، عیناً مشابه نتایج بدست آمده توسط روش Fast-SL است. از آنجایی که SL‌های شناسایی شده توسط هر دو روش یکسان هستند، اعداد مربوط به تعداد SL‌های یافت شده به صورت مشترک گزارش شده است. جدول ۳-۴-۱ نشان می‌دهد که الگوریتم Rapid-SL ۳۵ تا ۶۰ درصد فضای جستجوی کوچکتری را نسبت به Fast-SL بررسی می‌کند. این در حالی است که تمام پاسخ‌های مورد نظر توسط Rapid-SL بدست آمده است. این کاهش در فضای جستجو با جلوگیری از بررسی موارد مشابه ایجاد شده در شاخه‌های مختلف به دست می‌آید.

۳-۴-۲- مقایسه عملکرد روش Rapid-SL و روش‌های MCSEnumerator

پراتاپا و همکارانش [۱۲۰] نشان دادند که Fast-SL حدود ۴ برابر سریع‌تر از MCSEnumerator است. از آنجایی که Rapid-SL از Fast-SL بهتر عمل کرده است، در اینجا فقط عملکردهای مربوطه Rapid-SL و CNAMCSEnumerator2 [۱۱۷] برای شناسایی SL‌های سه گانه iML1515 مقایسه شده است (جدول ۳-۴-۲).

باید توجه داشت که اگرچه فرآیند یافتن مجموعه‌های کشنده چهارگانه پس از ۳۰ روز با استفاده از MCSEnumerator2 به پایان نرسید، ۴۰۵۶ کشنده مصنوعی چهارگانه پس از ۱۴۳ ساعت

توسعه روش Rapid-SL جهت دستیابی به کشنده‌های مصنوعی ... رساله دکتری

(حدود ۶ روز) با استفاده از Rapid-SL برای مدل iML1515 به دست آمد.

جدول ۴-۱- مقایسه تعداد مسائل بهینه‌سازی خطی حل شده در Rapid-SL و Fast-SL برای سه مدل مورد ارزیابی.

| مشخصات | اشرشیاکلی ^۱ | سالمونلا تیفی ^۲ موریوم ^۳ | مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ^۳ |
|------------------------------------|------------------------|---|--|
| نام مدل: | iAF1260 | STM_v1.0 | iNJ661[157] |
| محیط کشت: | گلوکز/iM9 | گلوکز/iM9 | میدلبروک/7H9 |
| تعداد واکنش‌ها: | ۲۳۸۲ | ۲۵۴۶ | ۱۰۲۸ |
| تعداد واکنش‌های Jnz: | ۴۰۶ | ۴۸۴ | ۴۱۴ |
| واکنش‌های ضروری: | ۲۷۸ | ۳۲۹ | ۳۰۹ |
| واکنش‌های کشنده‌های مصنوعی دوگانه: | ۹۶ | ۱۵۲ | ۷۵ |
| واکنش‌های کشنده مصنوعی سه‌گانه: | ۲۴۷ | ۲۷۵ | ۱۴۰ |
| واکنش‌های کشنده مصنوعی چهارگانه: | ۴۰۲ | ۱۰۰۸ | ۴۶۳ |
| تعداد مسائل بهینه‌سازی خطی حل شده | | | |
| Fast-SL | ۱۴,۵۰۰,۰۰۰ | ۳۰,۱۰۰,۰۰۰ | ۱۱,۹۰۰,۰۰۰ |
| Rapid-SL | ۷,۳۵۰,۰۰۰ | ۱۹,۸۰۰,۰۰۰ | ۴,۹۰۰,۰۰۰ |

جدول ۴-۲- مقایسه روش‌های Rapid-SL و CNAMCSEnumerator2

| روش مورد استفاده | Rapid-SL | CNAMCSEnumerator2 |
|-----------------------|----------|-------------------|
| تک واکنش‌های حیاتی: | ۲۷۱ | ۲۷۱ |
| کشنده مصنوعی دوگانه: | ۳۰۴ | ۳۰۴ |
| کشنده مصنوعی سه‌گانه: | ۱۲۸۷ | ۱۲۸۷ |
| زمان محاسبه: | ۱۹ دقیقه | بیش از ۲۰ ساعت |

۴-۴- گسترش دامنه عملکرد Rapid-SL

با افزایش حداکثر کاردینالیته مورد نظر در SLها، فضای جستجو و تعداد مواردی که باید برای یافتن همه SLهای ممکن بررسی شوند، به صورت تصاعدی افزایش می‌یابند. در نتیجه،

¹ *Escherichia coli*

² *Salmonella Typhimurium*

³ *Mycobacterium tuberculosis*

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

یافتن تمام SLها با کاردینالیتته بالا (به عنوان مثال، SLهای هشتگانه) با استفاده از الگوریتم‌هایی که در حال حاضر در دسترس هستند، امکان پذیر نیست [۱۱۶، ۱۲۰]. بنابراین، با استفاده بهینه از الگوریتم جدید Rapid-SL برای بررسی موثر این فضای جستجوی بزرگ می‌توان به کشنده‌های مصنوعی مرتبه بالا دست یافت. در اینجا سه کاربرد Rapid-SL برای دستیابی هدمند به SLهای مرتبه بالاتر معرفی شده‌اند.

۴-۴-۱- جستجوی در لیستی از اهداف خاص

ساده ترین روش برای یافتن کسری از راه حل‌ها این است که فقط گروه محدودی از واکنش‌ها، به عنوان فضای جستجو مشخص شود. با این حال، در عین سادگی این روش، مشکل اصلی این است که چه واکنش‌هایی به عنوان جامعه هدف تعیین شوند. این واکنش‌ها ممکن است از زیرسیستم^۱ خاصی انتخاب شوند که برای رشد میکروارگانیسم مهم تشخیص داده شده است. به عنوان مثال، جستجویی برای یافتن SLهای هشتگانه (یعنی با هشت واکنش در یک مجموعه) در میان ۶۵ واکنش اصلی معرفی شده برای تولید یک مدل مرکزی^۲ از مدل iJO1366 انجام شد [۱۵۸، ۱۵۹].

در نگاه اول ممکن است به نظر برسد که استفاده از Rapid-SL برای حل چنین مسئله‌ای ضروری نیست و ممکن است به دلیل تعداد کم واکنش‌های موجود در تجزیه و تحلیل، یافتن این نتایج با استفاده از یک جستجوی جامع، کافی به نظر برسد. با این حال، Rapid-SL از فضای جستجویی استفاده می‌کند که حدود ۵۰ برابر کوچک‌تر از جستجوی جامع است. با توجه به این موضوع، در صورت استفاده از روش جستجوی جامع، حتی برای تعداد کمی از واکنش‌ها این جست و جو به یک فرآیند بسیار زمان‌بر تبدیل می‌شود. همچنین، انجام این فرآیند با استفاده از روش Fast-SL، به دلیل نیاز به الگوریتم‌های مجزا برای کاردینالیتته‌های مختلف امکان پذیر نیست.

۴-۴-۲- اعمال محدودیت در شاخه‌زنی^۳ الگوریتم DFS

از آنجایی که Rapid-SL از الگوریتم DFS برای بررسی فضای جستجو استفاده می‌کند، می‌توان آستانه یا شرایطی را برای محدود کردن شاخه‌زنی تعریف کرد و فقط قسمت‌هایی با پتانسیل بیشتر را در درخت مربوطه جستجو نمود. به عنوان مثال، می‌توان معیاری را تعریف کرد که در آن مجموعه‌ها فقط در صورتی مجاز به ایجاد شاخه هستند که حذف آن‌ها نرخ رشد سوبه مربوطه

¹ Subsystem

² Core model

³ Branching

توسعه روش Rapid-SL جهت دستیابی به کشنده‌های مصنوعی ... رساله دکتری

را حداقل ۱٪ کاهش دهد. باید توجه داشت که در اینجا مقدار بحرانی ۱٪ بر اساس آزمون و خطا انتخاب شده است. مقادیر دیگر را می‌توان بر اساس مدل مورد مطالعه و محیط رشد مربوطه به کار گرفت. همچنین، انواع دیگری از محدودیت‌ها را که به طور مثال می‌تواند مقدار تغییر ایجاد شده در شار واکنش‌های دیگر باشد، تعریف نمود.

۴-۴-۳- بررسی انتخابی در بین شاخه‌های DFS

روند جستجوی SLهای چهارگانه در *E. coli* را با استفاده از مدل iAF1260 در نظر بگیرید. اگر شاخه‌های الگوریتم Rapid-SL را بر اساس تعداد واکنش‌ها در گره شروع هر شاخه گروه‌بندی کنیم، بدیهی است که با افزایش کاردینالیت گره شروع، تعداد LPهای حل شده در هر گروه به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. از سوی دیگر، تعداد SLهای شناسایی شده به ازای LPهای حل شده به طور چشمگیری کاهش می‌یابد (جدول ۴-۳). بنابراین، بخش بزرگی از SLها را می‌توان با انجام آنالیز کشنده‌گی در تعداد محدودی از شاخه‌ها، شناسایی کرد.

جدول ۴-۳- تعداد SLها و LPهای مربوطه در هر گروه از شاخه‌های Rapid-SL، جهت شناسایی کشنده‌های تکی تا چهارتایی توسط مدل iAF1260، شاخه‌ها بر اساس تعداد اعضا در گره شروع خود گروه‌بندی شده‌اند. ارزیابی گروه اول به تنهایی بیش از ۳۴ درصد از SLها را شناسایی می‌کند، در حالی که تنها حدود ۰/۶۵ درصد از LPها در این گروه مورد بررسی قرار می‌گیرند.

| شماره | کاردینالیت گروه | تعداد SLهای شناسایی شده | تعداد مسائل بهینه‌سازی خطی حل شده |
|-------|-----------------|-------------------------|-----------------------------------|
| ۱ | یک واکنش | ۲۵۴ | ۴۷,۸۶۹ |
| ۲ | دو واکنش | ۲۲۰ | ۶۴۶,۵۰۱ |
| ۳ | سه واکنش | ۱۹۲ | ۲,۶۷۹,۴۱۷ |
| ۴ | چهار واکنش | ۷۹ | ۳,۹۷۴,۸۸۹ |

با توجه به جدول ۴-۳، می‌توان تنها با ارزیابی شاخه‌های گروه ۱، تا بیش از ۳۴٪ از تمام SLها (به استثنای واکنش‌های حیاتی) را شناسایی کرد، در حالی که تنها حدود ۰/۶۵ درصد از همه LPها در این گروه مورد بررسی قرار می‌گیرند. لازم به ذکر است که ۲۵۴ کشنده مصنوعی شناسایی شده در گروه ۱، شامل ۷۴ کشنده مصنوعی دوگانه، ۹۸ سه‌گانه و ۸۲ چهارگانه می‌باشد. برای بررسی تعمیم‌پذیری این مشاهدات، آنالیزهای مشابهی برای میکروارگانیسم یکسان (*E. coli*) با مدلی در مقیاس ژنومی متفاوت (یعنی iJO1366) و همچنین برای نوع متفاوتی از

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

میکروارگانسیم‌ها (یعنی کلبسیلا پنومونیه^۱، [۱۶۰] iYL1228) انجام شد (جدول ۴-۴).

جدول ۴-۴ SL‌های شناسایی شده با ارزیابی شاخه‌های دارای یک واکنش در گروه اولیه (گروه ۱ در جدول ۴-۳).

| مدل | کار دینالیت‌ه | تعداد کل SLها | تعداد SLهای بدست آمده از گروه ۱ | درصد |
|---------|-----------------------|---------------|---------------------------------|------|
| iJO1366 | دوگانه | ۲۵۹ | ۲۳۷ | ۹۱/۵ |
| | سه‌گانه | ۱,۱۶۲ | ۸۷۱ | ۷۵/۰ |
| | چهارگانه | ۳,۵۸۵ | ۲,۲۷۵ | ۶۳/۵ |
| | تعداد کل | ۵,۰۰۶ | ۳,۳۸۳ | ۶۷/۶ |
| | تعداد کل LPهای حل شده | ۳۲,۶۱۵,۰۹۲ | ۳۲۲,۶۷۰ | ۱/۰ |
| iYL1228 | دوگانه | ۱۶۴ | ۱۲۷ | ۸۷/۰ |
| | سه‌گانه | ۲۸۹ | ۱۷۸ | ۶۱/۶ |
| | چهارگانه | ۱,۰۹۰ | ۵۱۳ | ۴۷/۱ |
| | تعداد کل | ۱,۵۲۵ | ۸۱۸ | ۵۳/۶ |
| | تعداد کل LPهای حل شده | ۱۲,۲۸۳,۶۱۷ | ۱۲۵,۱۵۹ | ۱/۰ |

می‌توان از جدول ۴-۴ استنباط کرد که ارزیابی شاخه‌های گروه ۱، یک رویکرد قابل اعتماد برای یافتن کسر قابل توجهی از همه SLها است. برای GEMM‌هایی که مورد مطالعه قرار گرفتند، با بررسی تنها حدود ۱ درصد از فضای جستجویی که برای یافتن همه SLهای چهارگانه باید حل شود، تا ۶۷٪ از همه SLها (یعنی شامل SLهای دوگانه، سه‌گانه و چهارگانه) با استفاده از روش نشان داده شده قابل دست‌یابی است. ما این روش را برای یافتن SLهای هشتگانه iAF1260 به کار بردیم تا کارایی این رویکرد را برای شناسایی SLهای با بیش از چهار هدف در هر مجموعه بررسی کنیم.

جدول ۴-۵ نتایج سه کاربرد Rapid-SL را خلاصه کرده است و بر اساس این جدول، بیش از ۹۰۰۰ کشنده مصنوعی با ۸ عضو با استفاده از روش Rapid-SL پیدا شد. بر اساس اندازه مدل و حداکثر کار دینالیت‌ه مورد نظر SLها، می‌توان گروه‌های دیگری از شاخه‌ها را در نظر گرفت. به عنوان مثال، جدول ۴-۳ نشان می‌دهد که ارزیابی هر دو گروه ۱ و ۲ برای iAF1260 فضای

^۱ *Klebsiella pneumoniae*

توسعه روش Rapid-SL جهت دستیابی به کشنده‌های مصنوعی ... رساله دکتری

جستجو را بیش از ۹۰ درصد کاهش می‌دهد در حالی که بیش از ۶۳ درصد از همه SLها را شناسایی می‌کند.

جدول ۴-۵- نتایج سه کاربرد معرفی شده

| جست و جو در لیست خاصی از اهداف | اعمال محدودیت در ایجاد شاخه‌های DFS | بررسی انتخابی در بین شاخه‌های DFS | |
|--|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| نام مدل | | | |
| iJO1366 | iAF1260 | iAF1260 | |
| محیط کشت | | | |
| گلوکز/iM9 | گلوکز/iM9 | گلوکز/iM9 | |
| تعداد کشنده‌های مصنوعی بدست آمده در هر کاربرد Rapid-SL | | | تعداد واکنش‌ها در هر SL |
| ۱۱ | ۱۰ | ۷۴ | ۲ |
| ۱۸ | ۲۷ | ۹۸ | ۳ |
| ۶۸ | ۴۱ | ۸۲ | ۴ |
| ۲۲ | ۱۱ | ۱۵۹ | ۵ |
| ۸۶ | ۵۹ | ۳۰۷ | ۶ |
| ۳۱۹ | ۱۲۵ | ۴۷۶ | ۷ |
| ۶۸۱ | ۴۰۲ | ۹,۱۲۶ | ۸ |
| ۷۸,۲۹۷,۱۱۲ | ۲۷,۸۰۳,۲۵۸ | ۸۹,۹۵۸,۹۶۱ | تعداد کل LPهای حل شده |

۴-۵- جمع بندی

در این فصل، روش Rapid-SL به عنوان یک روش جدید معرفی شد. این الگوریتم قادر است تا SLهای با مرتبه بالا را با کاردینالیته‌های دلخواه را پیدا کند. برخلاف Fast-SL، این پیاده سازی جدید به طور کامل از محاسبات موازی پشتیبانی می‌کند. علاوه بر این، در مقایسه با Fast-SL، می‌توان با استفاده از الگوریتم DFS (به عنوان یک روش جستجوی ساختار یافته) تعداد مسائل بهینه‌سازی خطی حل شده را حدود ۳۵ تا ۶۰ درصد کاهش داد. روش Fast-SL قادر به انجام محاسبات موازی در تمامی مراحل نیست و انجام محاسبات متوالی در برخی از مراحل آن

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

باعث کاهش سرعت آن می‌شود. بر این اساس، برای مدل‌های بزرگتر و SLهای مرتبه بالاتر، تفاوت بین زمان محاسباتی Fast-SL و Rapid-SL افزایش می‌یابد و Rapid-SL کارآمدتر می‌شود. اگرچه Rapid-SL از نظر کاردینالیت SLها محدود نیست، اما جستجو برای همه SLهای با کاردینالیت بالاتر، به خصوص برای $n > 4$ ، بدون استفاده از خوشه‌های محاسباتی^۱ امکان پذیر نیست. هنگام استفاده از یک رایانه معمولی، زمان اجرای آن ممکن است به چند ماه افزایش یابد. با توجه به پیاده سازی مناسب در روش ارائه شده، Rapid-SL می‌تواند به طور موثر، بخش قابل توجهی از SLهای مرتبه بالاتر را با جستجوی بخش نسبتاً کوچکی از موارد بالقوه پیدا کند. بر این اساس، سه کاربرد از Rapid-SL معرفی شدند: الف) جستجو در میان یک لیست انتخاب شده از واکنش‌های بالقوه، ب) اعمال محدودیت‌ها در شاخه‌های DFS، و ج) شمارش انتخابی در میان شاخه‌های DFS. با استفاده از این رویکردها، با جست و جو در حدود ۱ درصد موارد بالقوه، تا ۶۷ درصد از SLهای چهارگانه شناسایی شدند. به طور خاص، بیش از ۹۰۰۰ واکنش مصنوعی هشتگانه برای iAF1260 در رویکرد سوم یافت شد. بر این اساس، Rapid-SL می‌تواند برای بررسی مدل‌های بزرگ مانند مدل‌های متابولیکی در مقیاس ژنوم سلول‌های انسانی برای یافتن اهداف دارویی با کاردینالیت بالا مؤثر باشد.

اگرچه دو کاربرد اول، SLهای کمتری را نسبت به سایر برنامه‌ها پیدا می‌کنند، اما همچنان ممکن است برای جستجوی SLها با ملاحظات زیست‌شناختی خاص مفید باشند. اهمیت این ویژگی با توجه به اینکه یک ارگانسیم منفرد ممکن است بیش از چندین هزار SL با کاردینالیت بالا داشته باشد، آشکارتر می‌شود. به گونه‌ای که اعتبار سنجی تجربی همه این SLها به دلیل تعداد بی‌شمار آزمایش‌های مورد نیاز امکان‌پذیر نیست. بنابراین، هر دو سناریو نیاز به در نظر گرفتن معیارهای زیست‌شناختی هنگام جستجو برای مجموعه‌های مفید SL دارند. در فصل‌های پنجم و ششم از ابزار Rapid-SL جهت بدست آوردن مجموعه کشنده‌های مصنوعی در راستای یافتن اهداف دارویی انتخاب‌پذیر برای میکروارگانسیم‌های مختلف و همچنین سلول‌های سرطانی استفاده خواهد شد.

¹ Computer clusters

فصل پنجم

تجزیه و تحلیل سیستماتیک متابولیسم میکروارگانیسم‌ها جهت یافتن اهداف دارویی گزینشی

۵-۱- مقدمه

شناسایی اهداف دارویی گزینشی^۱، طراحی آنتی‌بیوتیک‌های طیف محدود را تسهیل می‌کند. با این حال، یافتن اهداف دارویی بالقوه اولین گام جهت دستیابی به اهداف انتخابی است. روش‌های مختلفی برای شناسایی اهداف دارویی بالقوه از رویکردهای محاسباتی استفاده می‌کنند [۱۶۱]. برای نمونه، شبکه‌های متابولیک ژنوم-مقیاس (GENRES^۲)، به عنوان ابزارهای محاسباتی مناسب و مفید، به طور قابل توجهی در مهندسی متابولیک سیستم‌ها [۱۶، ۱۶۲-۱۶۵] و شبیه سازی رایانه-محور^۳ [۱۲۴، ۱۶۶-۱۶۸] مورد استفاده قرار می‌گیرند.

با توجه به پژوهش‌های گذشته، استفاده از داروهای چند هدفه راه موثرتری برای رقابت با پاتوژن‌های عفونی، به ویژه میکروارگانیسم‌های مقاوم به دارو است [۱۶۹-۱۷۱]. مفهوم کشندگی مصنوعی^۴ و شناسایی مجموعه‌های کشنده مصنوعی راه را برای طراحی داروهای چند هدفه هموار هموار می‌کند. در این فصل، اهداف کشنده مصنوعی با قابلیت هدف قرار دادن همزمان چند بخش از میکروارگانیسم، جهت معرفی داروی بالقوه با قابلیت تاثیرگذاری بر روی میکروارگانیسم های خاص، معرفی شده اند. جهت بررسی گزینش پذیری اهداف دارویی معرفی شده از یک

¹ Selective drug target

² Genome scale reconstructions

³ In-silico

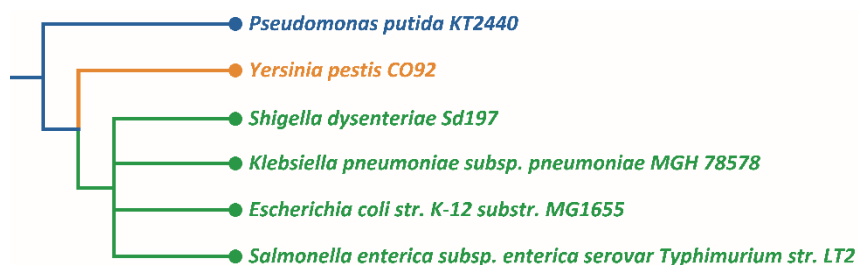
⁴ Synthetic lethality

تجزیه و تحلیل سیستماتیک متابولیسم میکروارگانیسم‌ها ... رساله دکتری
مجموعه شامل شش میکروارگانیسم استفاده شده است (جدول ۵-۱).

جدول ۵-۱- لیست میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در این فصل و اسامی مدل‌های مربوط به هر یک از آن‌ها

| مرجع | تعداد واکنش‌ها | تعداد ژن‌ها | نام مدل | نام میکروارگانیسم (لاتین) | نام میکروارگانیسم (فارسی) |
|-------|----------------|-------------|-----------|---|---------------------------|
| [۱۶۰] | ۲۲۶۲ | ۱۲۲۹ | iYL1228 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (<i>K. pneumoniae</i>) | کلبسیلا پنومونیه |
| [۱۷۲] | ۲۹۲۷ | ۱۴۶۲ | iJN1463 | <i>Pseudomonas putida</i> (<i>P. p putida</i>) | سودوموناس پوتیدا |
| [۱۷۳] | ۲۷۱۲ | ۱۵۱۶ | iML1515 | <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) | اشریشیا کلی |
| [۱۰۶] | ۲۵۴۵ | ۱۲۷۱ | STM_v1_0 | <i>Salmonella enterica</i> (<i>S. enterica</i>) | سالمونلا انتریکا |
| [۱۷۴] | ۲۵۳۹ | ۱۰۵۹ | iSDY_1059 | <i>Shigella dysenteriae</i> (<i>S. dysenteriae</i>) | شیگلا دیسانتریا |
| [۱۷۵] | ۱۹۶۱ | ۸۱۵ | iPC815 | <i>Yersinia pestis</i> (<i>Y. pestis</i>) | یرسینیا پستیس |

در شکل ۵-۱ درخت فیلوژنتیک تولید شده توسط پایگاه داده iTOL [۱۷۶] برای شش میکروارگانیسم مورد مطالعه نشان داده شده است.



شکل ۵-۱- درخت فیلوژنتیک شش میکروارگانیسم بدست آمده توسط iTOL [۱۷۶].
با توجه به این درخت، *P. putida* متفاوت ترین سویه در بین این شش میکروارگانیسم است. علاوه بر این، *S. dysenteriae*، *K. pneumoniae*، *E. coli* و *S. enterica* در یک سطح فیلوژنی قرار دارند.

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

۵-۲- معرفی گام‌های پیاده سازی روش

مطالعات صورت گرفته در این فصل در پنج مرحله سازماندهی شده است و هر مرحله به تفصیل در این بخش توضیح داده خواهد شد.

۵-۲-۱- مرحله اول: انتخاب مدل‌های متابولیک ژنوم مقیاس

شش مدل مورد مطالعه بر اساس تعداد کل واکنش‌ها و همچنین تعداد قابل توجه واکنش‌های مشترک آن‌ها انتخاب شده اند. این مدل‌ها دارای ۱۰۴۸ واکنش مشترک هستند که حدود ۳۵٪ تا ۵۰٪ از تمام واکنش‌های موجود در هر یک از آن‌ها را شامل می‌شود.

۵-۲-۲- مرحله دوم: تعریف شرایط محیطی مختلف

بر اساس در دسترس بودن مواد مغذی و اکسیژن، چهار شرایط مختلف به عنوان محیط کشت میکروارگانیسم‌ها قابل تعریف می‌باشد [۱۰۹]:

الف) محیط غنی با نرخ جذب اکسیژن بالا (R-H)

ب) محیط غنی با نرخ جذب اکسیژن کم (R-L)

ج) محیط حداقلی^۱ با نرخ جذب اکسیژن بالا (M-H)

د) محیط حداقلی با نرخ جذب اکسیژن کم (M-L)

این پژوهش فقط بر روی محیط‌های R-H و M-L به ترتیب به عنوان انعطاف پذیرترین و آسیب پذیرترین حالت سلول‌ها متمرکز شده است. مطالعه این دو حالت منجر به دستیابی به تمامی پاسخ‌های کشنده مصنوعی بالقوه در مدل خواهد شد.

۵-۲-۳- مرحله سوم: شناسایی مجموعه‌های کشنده مصنوعی

در این پژوهش از مفهوم کشنده‌گی مصنوعی [۱۷۷-۱۸۱] برای ارائه داروهای بالقوه چند هدف استفاده شده است. همچنین از الگوریتم Rapid-SL [۱۵۴] برای شناسایی این مجموعه‌های کشنده مصنوعی استفاده شده است. این روش به صورت تفصیلی در فصل چهارم مورد مطالعه قرار گرفته است. برای تعیین فضای جستجو برای Rapid-SL، همه واکنش‌هایی که در مدل، ژنی برای آن‌ها تعریف نشده است، واکنش‌های تبدیلی^۲، واکنش‌های مطالبه‌ای^۳، واکنش‌های خود به خودی^۴ و واکنش‌های انتشاری^۵ حذف شدند.

¹ Minimal medium

² Exchange reactions

³ Demand reactions

⁴ Spontaneous reactions

⁵ Diffusion reactions

تجزیه و تحلیل سیستماتیک متابولیسم میکروارگانیسم‌ها ... رساله دکتری

جهت یافتن پاسخ‌های مورد نظر، نیازی به انجام آنالیز کشف‌کننده برای هر شرایط محیطی به طور جداگانه وجود دارد. از آنجایی که فضای حل محیط R-H زیرمجموعه‌ای از سایر شرایط است، هر مجموعه کشف‌کننده شناسایی شده برای محیط R-H در شرایط دیگر نیز کشف‌کننده است. بنابراین، تجزیه و تحلیل کشف‌کننده هر مدل فقط برای شرایط محیط R-H انجام شده است.

۵-۲-۴- مرحله چهارم: اهداف دارویی بالقوه‌گزینشی و چند هدفه

در این مرحله، میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه به صورت ترکیب‌های مختلف دو تا شش عددی که با طبقه‌بندی میکروارگانیسم‌ها به عنوان هدف^۱، حفاظت شده^۲ یا لحاظ نشده^۳، مورد بررسی قرار گرفته است. بدین ترتیب، ۶۵۹ ترکیب مختلف ساخته شد. در ۵۷ مورد، ۲ تا ۶ میکروارگانیسم بدون در نظر گرفتن هیچ یک از میکروارگانیسم‌ها به عنوان حفاظت شده، مورد هدف قرار گرفته‌اند. در ۶۰۲ مورد دیگر، حداقل یک میکروارگانیسم به عنوان هدف و یک میکروارگانیسم به عنوان حفاظت شده در نظر گرفته شده است. شکل ۵-۲ شماتیکی از موارد مختلف مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

جهت بررسی گزینش پذیری پاسخ‌های بدست آمده در مرحله سوم برای هر یک از مجموعه‌های تشکیل شده مراحل زیر انجام می‌شود:

۱) واکنش‌های حیاتی و یا مجموعه واکنش‌های کشف‌کننده مصنوعی مشترک بین تمامی

میکروارگانیسم‌های هدف به عنوان یک مجموعه جواب اولیه در نظر گرفته می‌شوند.

۲) پاسخ‌هایی که برای میکروارگانیسم‌های حفاظت شده کشف‌کننده محسوب می‌شوند از

مجموعه پاسخ‌ها کنار گذاشته می‌شوند.

با این حال، برای اطمینان از غیر کشف‌کننده بودن پاسخ‌های گزینشی برای همه شرایط محیطی،

تاثیر حذف آن‌ها برای شرایط محیطی M-L در همه مدل‌های حفاظت شده آزموده می‌شود. این

شرط تضمین می‌کند که میکروارگانیسم‌های حفاظت شده در آسیب پذیرترین حالت خود نیز با

حذف مجموعه‌های گزینشی قابلیت رشد داشته باشند.

۵-۲-۵- مرحله پنجم: اعمال محدودیت‌های سختگیرانه دیگر

هنگامی که یک جواب گزینشی یافت می‌شود دو احتمال وجود دارد: (الف) همه واکنش‌های

هدف در همه مدل‌های حفاظت شده وجود داشته باشد و یا (ب) حداقل یک واکنش هدف در

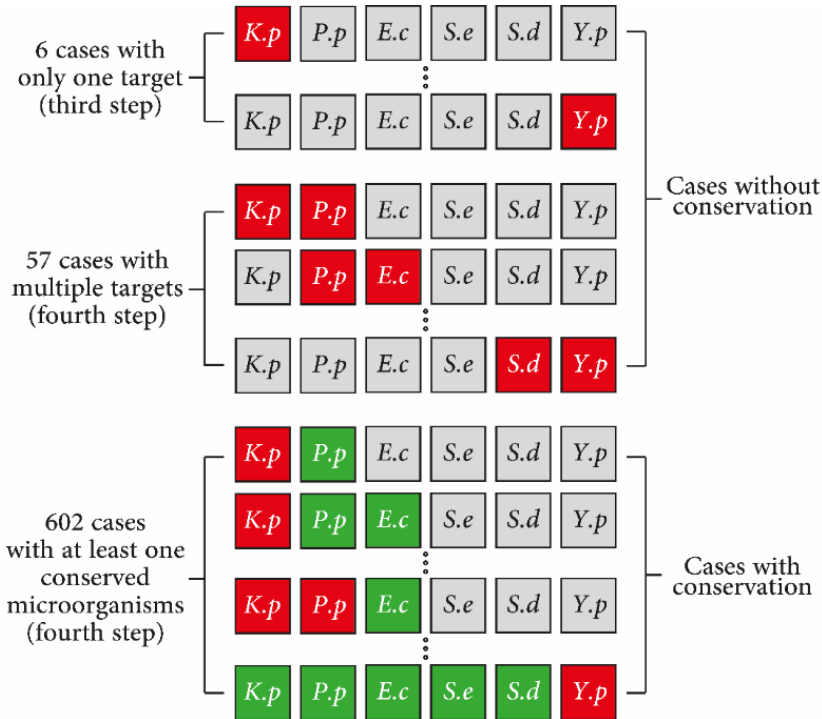
یکی از مدل‌های حفاظت شده وجود نداشته باشد.

¹ Targeted

² Conserved

³ Not included

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...



شکل ۵-۲- شماتیک موارد مختلف مورد مطالعه. K.p, P.p, E.c, S.e, S.d, Y.p به ترتیب مخفف کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس پوتیدا، اشریشیا کلی، سالمونلا انتریکا، شیگلا دیسانتریا و یرسینیا پستیس هستند. مربع‌های قرمز، سبز و خاکستری نشان‌دهنده میکروارگانیسم‌های هدف، حفاظت شده و شامل نشده هستند.

در هر دو سناریو، حذف واکنش‌های هدف برای مدل‌های حفاظت شده کشنده نیست. با توجه به این که مدل تنها بخشی از کل ژنوم میکروارگانیسم را پوشش می‌دهند، در سناریوی دوم این احتمال وجود دارد که واکنش‌های هدف و ژن‌های مربوط به آن‌ها در حالی که در ژنوم میکروارگانیسم وجود دارند، در مدل در نظر گرفته نشده باشند. بر این اساس، به دلیل نداشتن اطلاعات کافی، راه‌حل‌های گزینشی به دست آمده از سناریوی دوم در این گام حذف می‌شوند.

۵-۳- بررسی موردی برخی از حالت‌های خاص از پاسخ‌های بدست آمده

راه‌حل‌های انتخابی بالقوه بدست آمده در این پژوهش در پیوست ۲ ارائه شده‌اند. در این قسمت برخی از موارد خاص مطالعه شده، مورد بررسی قرار گرفته‌اند. همچنین تعداد راه‌حل‌های بدست آمده در هر گام در پیوست ۳ ارائه شده است.

۵-۳-۱- هدف قرار دادن همه میکروارگانیسم‌ها به جز یکی

ردیف اول جدول ۵-۲ تعداد راه‌های بالقوه برای هدف قرار دادن همزمان هر شش میکروارگانیسم را نشان می‌دهد. ردیف‌های دیگر تعداد راه‌های بالقوه شناسایی شده را برای هدف‌گیری انتخابی پنج میکروارگانیسم از شش میکروارگانیسم و حفظ دیگری نشان می‌دهند. جدول ۵-۲ نشان می‌دهد که راه‌های ممکن متعددی برای از بین بردن هر شش میکروارگانیسم به طور همزمان وجود دارد. با این حال، حفظ حتی یکی از میکروارگانیسم‌ها تعداد جواب‌های موجود را به شدت کاهش می‌دهد.

جدول ۵-۲- تعداد پاسخ‌های به دست آمده برای مواردی که در آن‌ها همه میکروارگانیسم‌ها به جز یکی هدف قرار می‌گیرند. T نماینده میکروارگانیسم‌های هدف و C نماینده میکروارگانیسم‌های حفاظت شده است.

| تعداد راه‌های شناسایی شده | | | | | نام سویه محافظت شده |
|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| مجموع تعداد راه حل‌ها | کشنده‌های مصنوعی چهارگانه | کشنده‌های مصنوعی سه‌گانه | کشنده‌های مصنوعی دوگانه | واکنش های حیاتی | |
| ۱۹۹۱ | ۱۰۳۳ | ۷۳۱ | ۱۹۶ | ۳۱ | بدون محافظت |
| ۵۱ | ۳۱ | ۱ | ۰ | ۱۹ | <i>Y. pestis</i> |
| ۱۰ | ۳ | ۷ | ۰ | ۰ | <i>S. dysenteriae</i> |
| ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | <i>S. enterica</i> |
| ۵۸ | ۱۶ | ۲۷ | ۱۲ | ۳ | <i>E. coli</i> |
| ۶۱ | ۱۶ | ۳۱ | ۵ | ۹ | <i>P. putida</i> |
| ۳۹ | ۱۷ | ۰ | ۳ | ۱۹ | <i>K. pneumoniae</i> |

۵-۳-۲- حفظ همه میکروارگانیسم‌ها به جز یکی

هدف قرار دادن گزینشی تنها یک میکروارگانیسم در حالی که دیگر میکروارگانیسم‌ها قابلیت رشد داشته باشند چالش برانگیز است. تعداد راه‌های شناسایی شده برای این موارد در جدول ۵-۳ نشان داده شده است. از بین شش حالت مورد بررسی، هدف قرار دادن *P. putida* با حفظ قابلیت رشد دیگر میکروارگانیسم‌ها، دارای تعداد راه‌های بالقوه بیشتری نسبت به سایر

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

کیس‌ها است. این رخداد ممکن است ناشی از تفاوت فیلوژنتیکی بین *P. putida* با پنج میکروارگانیسم دیگر باشد که هدف گیری انتخابی آن را ساده تر می‌کند.

جدول ۵-۳- تعداد پاسخ‌های بالقوه شناسایی شده در مواردی که تنها یک میکروارگانیسم هدف قرار گرفته و قابلیت رشد دیگر میکروارگانیسم‌ها حفاظت شده است. T نماینده میکروارگانیسم‌های هدف و C نماینده میکروارگانیسم‌های حفاظت شده است.

| تعداد راه حل‌های شناسایی شده | | | | | نام سویه محافظت شده |
|------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------|------------------------|
| مجموع تعداد راه حل‌ها | کشنده‌های مصنوعی چهار گانه | کشنده‌های مصنوعی سه‌گانه | کشنده‌های مصنوعی دوگانه | واکنش‌های حیاتی | |
| ۱۴ | ۸ | ۰ | ۴ | ۲ | <i>Y. pestis</i> |
| ۱۵ | ۱۲ | ۳ | ۰ | ۰ | <i>S. dysenteriae</i> |
| ۲ | ۰ | ۰ | ۰ | ۲ | <i>S. enterica</i> |
| ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱ | <i>E. coli</i> |
| ۸۵ | ۱۳ | ۲۵ | ۱۹ | ۲۸ | <i>P. putida</i> |
| ۱۵ | ۸ | ۵ | ۲ | ۰ | <i>K. pneumoniae</i> |

۵-۳-۳- موارد بدون راه حل بالقوه

از بین ۶۵۹ کیس مورد مطالعه، ۵۲ کیس دارای هیچ هدف دارویی گزینشی نبوده اند. برخی از این ۵۲ کیس، دارای پاسخ‌هایی در گام چهارم بوده‌اند. با این حال، حتی بدون محدودیت‌های اعمال شده در گام پنجم، ۳۲ مورد بدون هیچ راه حل بالقوه‌ای باقی می‌ماند. در تمام این ۳۲ مورد، حداقل یک میکروارگانیسم حفاظت شده است. همچنین از این ۳۲ مورد بدون پاسخ، ۳۱ مورد *S. enterica* میکروارگانیسم حفاظت شده بوده است. بدون پاسخ ماندن این ۳۱ مورد می‌تواند ناشی از بازسازی مدل STM_v1_0 از مدل‌های *E. coli* باشد.

۵-۴- مشارکت مسیرها متابولیکی^۱ در کیس‌های مختلف

در این بخش، یک بررسی آماری جهت تعیین مسیرهای متابولیکی که برای هدف قرار دادن

¹ Metabolic Pathways

تجزیه و تحلیل سیستماتیک متابولیسم میکروارگانیسم‌ها ... رساله دکتری

انتخابی میکروارگانیسم‌ها مناسب‌تر هستند، انجام شده است. مسیرهای متابولیکی مورد نظر بر اساس واکنش‌های هدف در هر پاسخ‌گزینشی مشخص شده است. راه‌های شناسایی شده با کاردینالیته‌های مختلف به طور جداگانه در نظر گرفته شدند. در این مرحله، چهل و نه مسیر مختلف که حداقل در یک راه حل بالقوه مشارکت داشتند شناسایی شدند. نرخ مشارکت هر مسیر در پیوست ۴ گزارش شده است. در ادامه به طور خاص برخی از این مسیرها را تحلیل می‌کنیم.

۵-۴-۱- مسیرهایی که بیشترین دفعات مورد حمله قرار گرفته‌اند

چهار مسیر متابولیکی:

- بیوسنتز پوشش سلولی^۱
- متابولیسم گلیسروفسفولیپید^۲
- متابولیسم لیپیدهای غشایی^۳
- مسیر سالویج نوکلئوتید^۴

مسیرهایی هستند که در تمام ۶۳ موردی که در آن‌ها هیچ یک از میکروارگانیسم‌ها در گروه حفاظت شده قرار نگرفته بودند شرکت داشتند (جدول ۵-۴). این مسیرها با سنتز دیواره سلولی و تکثیر DNA میکروارگانیسم‌ها مرتبط هستند. دستکاری این مسیرها رایج‌ترین مکانیسم آنتی‌بیوتیک‌های موجود است [۱۸۲]. نکته قابل توجه دیگری که می‌توان به آن اشاره کرد این است که نمی‌توان هیچ تک واکنش حیاتی انتخاب‌پذیری در بین واکنش‌های مربوط به مسیر متابولیسم لیپیدهای غشایی یافت. به عبارت دیگر، در صورتی که در هر میکروارگانیسم، واکنش‌های حیاطی مربوط به مسیر متابولیسم لیپیدهای غشایی مورد حمله قرار گیرد، آن میکروارگانیسم قابلیت رشد نخواهد داشت. از سوی دیگر این نکته را می‌توان بیان کرد که این چهار مسیر بیشترین نقش را در ایجاد اهداف دارویی انتخاب‌پذیر دارند.

۵-۴-۲- مسیرهایی که فقط توسط مجموعه‌های کشنده مصنوعی هدف قرار می‌گیرند

مسیرهایی مانند:

- متابولیسم سیستین^۵
- بیوسنتز اسیدهای چرب^۶

¹ Cell envelope biosynthesis

² Glycerophospholipid metabolism

³ Membrane lipid metabolism

⁴ Nucleotide salvage pathway

⁵ Cysteine metabolism

⁶ Fatty acid biosynthesis

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

• متابولیسم پایرویت^۱

جدول ۴-۵- لیست مسیرهایی که در تمام ۶۳ مورد بدون میکروارگانیسم حفاظت شده، مورد حمله قرار می‌گیرند.

| نام مسیر | واکنش‌های حیاتی | کشنده‌های مصنوعی دو گانه | کشنده‌های مصنوعی سه گانه | کشنده‌های مصنوعی چهار گانه |
|---------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| بیوسنتز پوشش سلولی | ۲۱۵ | ۲۰۱ | ۲۳۵ | ۲۸۸ |
| متابولیسم گلیسروفسفولیپید | ۱۸۵ | ۱۸۹ | ۱۵۹ | ۱۳۹ |
| متابولیسم لیپیدهای غشایی | ۰ | ۱۴۱ | ۱۹۳ | ۲۷۶ |
| مسیر سالویج نوکلئوتید | ۱۲۲ | ۱۸۱ | ۲۲۰ | ۱۹۰ |

فقط توسط مجموعه‌های کشنده مصنوعی مورد حمله قرار می‌گیرند (یعنی هیچ یک از این مسیرها توسط یک واکنش کشنده هدف قرار نمی‌گیرند). به عبارت دیگر این مسیرها تنها با هدف قرار گرفته شدن در کنار یک مسیر متابولیکی دیگر قادر به ایجاد یک هدف دارویی می‌باشند. مسیرهای متابولیکی دیگری وجود دارند که رفتاری کاملاً متفاوتی نسبت به مسیرهای فوق دارند. ۱۸ مسیر مانند مسیر پنتوز فسفات^۲ و گلایکولیز و گلوکنئوجنسیس^۳، می‌توانند به صورت جداگانه توسط مجموعه‌های کشنده مصنوعی مورد حمله قرار گیرند.

۵-۵- واکنش‌های کلیدی

یافتن گروه نسبتاً کوچکی از واکنش‌ها که زیرمجموعه‌های آن بتوانند اهداف دارویی گزینشی متعددی را برای کیس‌های متفاوت تشکیل دهند، ارزشمند است. البته دستیابی به بهترین مجموعه واکنش با این ویژگی ساده نیست و نیازمند پرداختن به یک مسئله بهینه سازی پیچیده است که از حوصله این پژوهش خارج است. با این حال، شناسایی مجموعه‌هایی که تا حدی این

¹ Pyruvate metabolism

² Pentose phosphate pathway

³ Glycolysis and gluconeogenesis

تجزیه و تحلیل سیستماتیک متابولیسم میکروارگانیسم‌ها ... رساله دکتری

هدف را برآورده می‌کنند، قابل انجام است. جهت دستیابی به این مجموعه، الگوریتم حریص^۱ [۱۸۳] به کار گرفته شده است.

جدول ۵-۵- مجموعه‌ای از چهار واکنش که ۱۹۸ کیس از ۶۵۷ کیس را پوشش می‌دهد.

| توضیحات | | نماد واکنش | شماره |
|---|------------------|------------|-------|
| <i>murA</i> | ژن | UAGCVT | ۱ |
| UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase | پروتئین | | |
| Cell Envelope Biosynthesis | مسیر مربوطه | | |
| Uridine-Diphosphate-N-Acetylglucosamine | داروی شناخته شده | | |
| <i>fabB</i> | ژن | 3OAS161 | ۲ |
| 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I | پروتئین | | |
| Cell Envelope Biosynthesis | مسیر مربوطه | | |
| Lauric acid | داروی شناخته شده | | |
| <i>ribE</i> | ژن | RBFSa | ۳ |
| 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase | پروتئین | | |
| Cofactor and Prosthetic Group Biosynthesis | مسیر مربوطه | | |
| Dithioerythritol | داروی شناخته شده | | |
| <i>guaB</i> | ژن | IMPD | ۴ |
| IMP dehydrogenase | پروتئین | | |
| Purine and Pyrimidine Biosynthesis | مسیر مربوطه | | |
| Inosinic Acid | داروی شناخته شده | | |

زیرمجموعه‌های مجموعه واکنش بدست آمده، می‌توانند بخش بزرگی از ۶۶۵ مورد را مدیریت کنند. بسیاری از ترکیبات کشف شده چهارتایی می‌توانند بیش از ۳۰ درصد از کیس‌ها را پوشش دهند. جدول ۵-۵ یکی از این ترکیب‌ها را نشان می‌دهد که بر اساس این معیار که هر چهار واکنش باید هدف برخی از داروهای شناخته شده باشد، انتخاب شده است. باید توجه داشت که

¹ Greedy algorithm

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

واکنش‌های ذکر شده در جدول ۵-۵ از تک واکنش‌های حیاتی هستند. با این حال، با توجه به وجود این نظریه که حمله به میکروارگانیسم‌ها با اهداف متعدد، شانس غلبه بر مشکلات مقاومت دارویی را افزایش می‌دهد، ترکیب‌های دیگری که فقط از مجموعه‌های کشنده مصنوعی تشکیل شده باشند، معرفی شده‌اند. ترکیبی از هفت واکنش که زیرمجموعه آن‌ها می‌تواند ۲۳۶ مورد را پوشش دهد در جدول ۵-۶ نشان داده شده است.

جدول ۵-۶- مجموعه‌ای از هفت واکنش که زیرمجموعه آن‌ها ۲۳۶ مورد را پوشش می‌دهند. نام دارو و اهداف مرتبط از پایگاه داده DrugBank [۱۸۴] به دست آمده است.

| مشخصات | | نماد واکنش | شماره |
|---|------------------|------------|-------|
| <i>pgi</i> | ژن | PGI | ۱ |
| Glucose-6-phosphate isomerase | پروتئین | | |
| Glycolysis/Gluconeogenesis | مسیر مربوطه | | |
| 5-Phosphoarabinonic acid | داروی شناخته شده | | |
| <i>pgk</i> | ژن | PGK | ۲ |
| Phosphoglycerate kinase | پروتئین | | |
| Glycolysis/Gluconeogenesis | مسیر مربوطه | | |
| --- | داروی شناخته شده | | |
| <i>tpiA</i> | ژن | TPI | ۳ |
| Triose-phosphate isomerase | پروتئین | | |
| Glycolysis/Gluconeogenesis | مسیر مربوطه | | |
| --- | داروی شناخته شده | | |
| <i>fbaA or fbaB</i> | ژن | FBA | ۴ |
| Fructose-bisphosphate aldolase class I & II | پروتئین | | |
| Glycolysis/Gluconeogenesis | مسیر مربوطه | | |
| Phosphoglycolohydroxamic Acid | داروی شناخته شده | | |
| <i>gnd</i> | ژن | GND | ۵ |
| 6-phosphogluconate dehydrogenase | پروتئین | | |
| Pentose Phosphate Pathway | مسیر مربوطه | | |

| مشخصات | | نماد واکنش | شماره |
|----------------------------|------------------|------------|-------|
| --- | داروی شناخته شده | | |
| <i>tktA</i> or <i>tktB</i> | ژن | TKT2 | ۶ |
| Transketolase | پروتئین | | |
| Pentose Phosphate Pathway | مسیر مربوطه | | |
| Coccarboxylase | داروی شناخته شده | | |
| <i>pgl</i> | ژن | PGL | ۷ |
| 6-phosphogluconolactonase | پروتئین | | |
| Pentose Phosphate Pathway | مسیر مربوطه | | |
| Formic acid | داروی شناخته شده | | |

این ترکیب از سه مجموعه کشنده مصنوعی تشکیل شده است: (۱) یک مجموعه چهارگانه از *PGK*، *TPI*، *TKT2*، *FBA* و (۲) مجموعه سه گانه *TPI*، *PGI*، *TPI* و *GND*. و (۳) یک مجموعه کشنده مصنوعی دوگانه از *TKT2* و *PGL*. این هفت واکنش به شدت با متابولیسم مرکزی میکروارگانیسم‌ها مرتبط هستند.

۵-۶- جمع بندی

در این فصل، نشان داده شد که به دست آوردن اهداف دارویی انتخابی با حفظ یک یا چند میکروارگانیسم در مقایسه با شناسایی اهداف دارویی غیرانتخابی با استفاده از مدل‌های موجود ژنوم-مقیاس، بسیار چالش برانگیز است. مسیرهای متابولیکی:

- بیوسنتز انولوپ سلولی
- متابولیسم گلیسروفسفولیپید
- متابولیسم لیپیدهای غشایی
- مسیر سالویج نوکلئوتید

در همه کیس‌هایی که در آن‌ها میکروارگانیسم حفاظت شده‌ای در نظر گرفته نمی‌شود، هدف قرار گرفته می‌شوند. همچنین، این مسیرها هدف بسیاری از اهداف دارویی بالقوه انتخابی هستند. این مسیرها مربوط به سنتز دیواره سلولی و تکثیر DNA هستند که به عنوان اهداف اصلی آنتی‌بیوتیک‌های طیف گسترده محسوب می‌شوند.

می‌توان انتظار داشت که به دست آوردن مجموعه‌های کشنده مصنوعی اهداف بالقوه بیشتری

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

را برای مواردی که هیچ تک واکنش حیاتی به عنوان راه حل برای آن‌ها معرفی نشده، فراهم کند. این نظریه با نتایج به دست آمده در گام چهارم مطابقت دارد، به طوری که اهداف کشنده مصنوعی بالقوه برای ۱۰۲ کیسی که بدون هیچ تک واکنش حیاتی بودند، به دست آمده است. همچنین، نتایج مرحله چهارم نشان می‌دهد که مجموعه‌های کشنده مصنوعی چهارگانه به طور کلی گزینه‌های بسیار گسترده‌تری را برای انجام کیس‌های مورد مطالعه ارائه می‌دهند. اما در گام پنجم برقرار بودن این نظریه مورد بحث واقع می‌شود. بسیاری از مجموعه‌های کشنده مصنوعی سه‌گانه و چهارگانه با اعمال محدودیت‌های سخت‌گیرانه مرحله پنجم کنار گذاشته می‌شوند. در نتیجه، به طور کلی در گام پنجم، استفاده از اهداف دارویی کشنده مصنوعی با مرتبه بالا، تعداد راه حل‌های بالقوه در دسترس را افزایش نداده است.

در این فصل، میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه به گروه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا، به دلیل عدم وجود مدل‌های کارآمد از میکروارگانیسم‌های غیر بیماری‌زا در روده انسان تقسیم نشده‌اند. با این حال، با ارائه مدل‌های دقیق و کارآمد برای این میکروارگانیسم‌ها، می‌توان مطالعات دقیق‌تری را برای شناسایی اهداف دارویی خاص که قابلیت کشندگی گزینشی برای یک مجموعه خاص از میکروارگانیسم‌ها داشته باشند، انجام داد.

فصل ششم

یافتن اهداف دارویی انتخابی جهت حمله به سلول‌های سرطانی

۶-۱- مقدمه

در این فصل جهت دستیابی به اهداف بالقوه دارویی اکیداً انتخابی^۱ به بررسی و شناسایی مجموعه ژن‌های کشنده مصنوعی که توسط مدل‌های متابولیکی بافت-خاص پیش‌بینی شده است، پرداخته می‌شود. عبارت اکیداً انتخابی به اهدافی اشاره دارد که علی‌رغم تأثیر بر سلول‌های سرطانی، تأثیری حداقلی بر دیگر بافت‌های سالم دارند. برای دستیابی به این هدف، مدل‌های بافت-خاص مختلف برای ۱۳ نوع مختلف از بافت‌های سرطانی و سالم (در مجموع ۲۶ مدل) ایجاد شد. داده‌های بیانی جهت بازسازی این مدل‌ها از پروژه GSE62944 [۱۸۵] استخراج شده است که در پایگاه داده TCGA (<http://cancergenome.nih.gov/>) در دسترس می‌باشد. همچنین لیست بافت‌های مورد بررسی در پیوست ۵ ذکر شده است.

۶-۲- نحوه پیاده‌سازی روش

۶-۲-۱- بازسازی مدل‌های بافت-خاص^۲

در این مطالعه، از روش rFASTCORMICS [۱۳۹] و مدل Recon 2 [۱۸۶] برای بازسازی ۲۶ مدل بافت-خاص استفاده شد. این ۲۶ مدل بازسازی شده از ۱۳ مدل کنترلی عمومی و ۱۳ مدل سرطانی عمومی تشکیل شده‌اند. نحوه عملکرد روش rFASTCORMICS در فصل سوم مورد بررسی قرار گرفته است.

¹ Strictly selective

² Context-specific model

۶-۲-۲- استخراج مجموعه‌های کشنده مصنوعی

استخراج جفت ژن‌های مصنوعی کشنده از مدل‌های بازسازی شده به لحاظ محاسباتی چالشی ندارد. اما، توسعه مفهوم کشندگی مصنوعی به مجموعه‌های ژنی با بیش از دو ژن و تمایل به شناسایی مجموعه‌های کشنده مصنوعی درجه بالاتر^۱ کار دشواری است. با افزایش تعداد ژن‌ها در مجموعه مصنوعی کشنده، فضای جستجو مرتبط به صورت نمایی افزایش می‌یابد و به همین دلیل فرآیند جستجو بسیار زمان‌بر می‌شود. بنابراین، استفاده از یک الگوریتم برای بررسی کارآمد فضای جستجو اجتناب‌ناپذیر خواهد بود. در اینجا از الگوریتم Rapid-SL [۱۵۴] برای جستجوی مجموعه ژن‌های کشنده مصنوعی مرتبه بالا تا مجموعه‌های چهارگانه^۲ (چهار ژن در یک مجموعه) برای ۱۳ مدل سرطانی استفاده شده است. الگوریتم Rapid-SL در فصل چهارم به طور مفصل شرح داده شده است.

۶-۲-۳- معیارهای انتخاب اهداف دارویی اکیداً انتخابی

هدف اصلی این کار، شناسایی هدف‌های دارویی بالقوه اکیداً انتخابی است. ما هدف‌های دارویی اکیداً انتخابی را به عنوان ژن ضروری یا مجموعه ژن‌های مصنوعی کشنده تعریف می‌کنیم که حذف آن‌ها باعث کاهش قابل توجه نرخ رشد سلول‌های سرطانی می‌شود، در حالی که کم‌ترین تاثیر را در نرخ رشد بافت‌های سالم ایجاد کند. با این حال، باید برخی از آستانه‌ها برای توصیف این دو معیار به صورت ریاضی تعریف شوند. در این روش، یک راه حل به عنوان کشنده تلقی می‌شود اگر حذف آن نرخ رشد سلول‌های سرطانی را بیش از ۵۰ درصد کاهش دهد. علاوه بر این، عدم تأثیر بر بافت‌های سالم به این معناست که زمانی که ژن یا مجموعه ژن‌ها از مدل‌های مربوطه حذف می‌گردد، کاهش نرخ رشد بافت‌های سالم به کمتر از ۱۰ درصد محدود شود.

۶-۳- نتایج

در این بخش، اهداف دارویی بالقوه انتخابی حاصل برای سرطان COAD^۳ به عنوان یک مثال، تحلیل و بحث شده است. هدف‌های دارویی حاصل برای مدل‌های سرطانی دیگر در پیوست ۵ گزارش شده‌اند.

ابتدا ژن‌های ضروری و ژن‌های مصنوعی کشنده برای مدل سرطان COAD شناسایی شدند. سپس، برای شناسایی هدف‌های دارویی انتخابی، تأثیر حذف راه‌حل‌های شناسایی‌شده بر روی

^۱ Higher-order synthetic lethal sets

^۲ Quadruple SLs

^۳ سرطان کولورکتال بیماری است که در آن سلول‌های روده بزرگ یا رکتوم بدون کنترل رشد می‌کنند. COAD یا colon adenocarcinoma یکی از شایع‌ترین انواع این نوع سرطان در سیستم گوارشی است.

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

سلول‌های طبیعی روده مورد بررسی قرار گرفت. راه حل‌هایی که منجر به کاهش کمتر از ۱۰ درصد در نرخ رشد سلول‌های سالم شدند، به عنوان هدف‌های دارویی انتخابی گزارش شدند. تعداد راه حل‌های بدست آمده برای هر مرحله در جدول ۱-۶ گزارش شده‌اند.

جدول ۱-۶-تعداد راه حل‌های بدست آمده برای سرطان COAD در دو حالتی که سلول‌های سالم روده به صورت محافظت شده در نظر گرفته شده و یا نشده باشند.

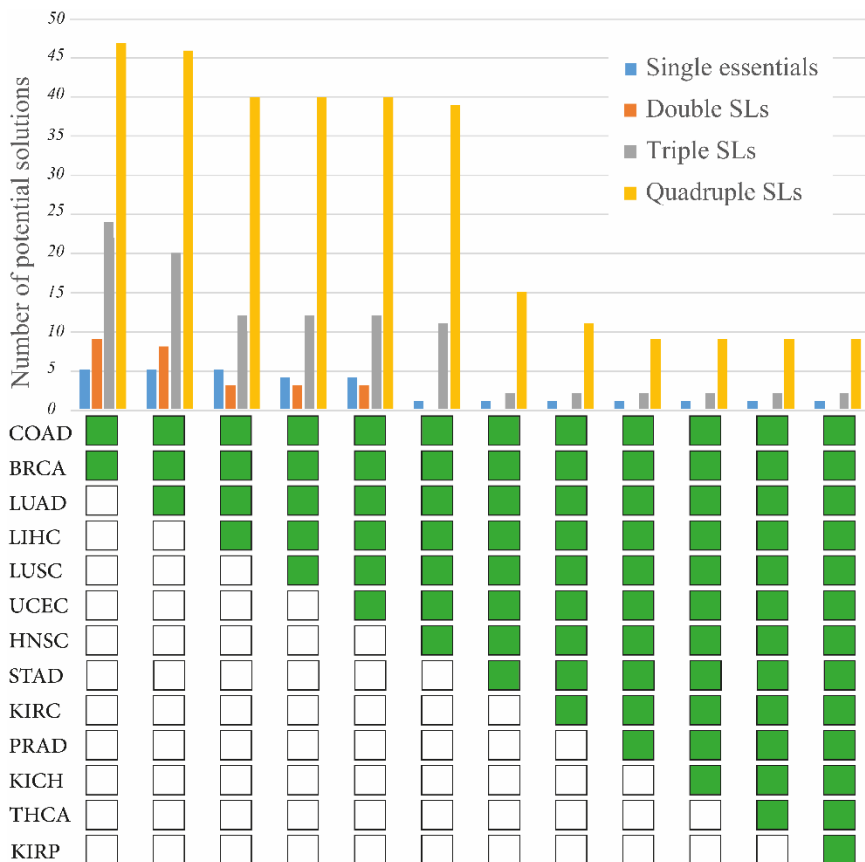
| شرایط | تک ژن‌های حیاتی | کشنده‌های مصنوعی دو گانه | کشنده‌های مصنوعی سه تایی | کشنده‌های مصنوعی چهار تایی |
|--|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| کشنده برای سلول‌های سرطانی COAD | ۷۶ | ۶۴ | ۱۴۵ | ۴۱۶ |
| کشنده برای سلول‌های سرطانی COAD و بی‌اثر برای سلول‌های سالم روده | ۱۲ | ۲۶ | ۵۷ | ۱۳۵ |

اگرچه راه حل‌های حاصل در این مرحله بین سلول‌های سرطانی بافت روده و سلول‌های سالم، به صورت انتخابی عمل می‌کنند، هنوز احتمال وارد آمدن آسیب به سلول‌های سالم بافت‌های دیگر وجود دارد. بنابراین، اثر راه حل‌های بالقوه به دست آمده بر سایر بافت‌های سالم بررسی شد. با در نظر گرفتن هر بافت سالم، بعضی از راه حل‌های بالقوه ممکن است غیرانتخابی تلقی شوند و از لیست هدف‌های دارویی انتخابی حذف شوند. با در نظر گرفتن تمام ۱۳ بافت سالم، بسیاری از راه حل‌ها حذف شدند. شکل ۱-۶ نشان می‌دهد که با در نظر گرفتن هر بافت سالم جدید، تعداد راه حل‌ها کاهش می‌یابد.

با در نظر گرفتن تمام ۱۳ بافت سالم به عنوان محافظت‌شده، تنها یک ژن ضروری و ۹ مجموعه ژنی کشنده مصنوعی چهارتایی باقی می‌مانند که به عنوان هدف‌های دارویی بالقوه اکیداً انتخابی شناخته می‌شوند. این راه حل‌ها به عنوان هدف‌های دارویی بالقوه اکیداً انتخابی در شکل ۲-۶ نشان داده شده است.

همه مجموعه‌های مصنوعی کشنده چهارتایی که در شکل ۲-۶ شکل ۳-۳ نشان داده شده‌اند، دارای سه ژن مشترک *PFKL*، *TALDO1* و *PGD* هستند. برای هر مجموعه، ژن چهارم به عنوان یک عامل کشنده عمل می‌کند و نرخ رشد جهش $\Delta PFKL\Delta TALDO1\Delta PGD$ را به کمتر از ۵۰ درصد از سلول‌های سرطانی مربوطه کاهش می‌دهد.

یافتن اهداف دارویی انتخابی جهت حمله به سلول‌های سرطانی رساله دکتری



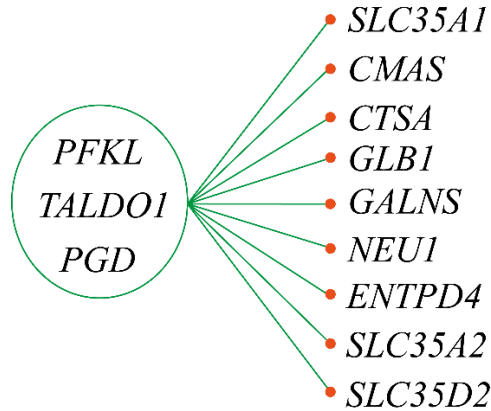
شکل ۶-۱- تعداد اهداف دارویی انتخابی بالقوه که با در نظر گرفتن سلول‌های سالم مختلف به عنوان محافظت شده و سلول‌های COAD به عنوان هدف، شناسایی شده‌اند. تعداد راه حل‌های یافت شده برای هدف‌گیری سلول‌های COAD و حفظ تنها سلول‌های سالم روده در جدول ۶-۱ نشان داده شده است. از چپ به راست، تعداد بافت‌های محافظت شده در نظر گرفته شده افزایش می‌یابد و تعداد هدف‌های دارویی انتخابی کاهش می‌یابد. در این شکل، تعداد بیشتر راه حل‌های ارائه شده توسط مجموعه‌های مصنوعی کشنده چهارتایی قابل مشاهده است. با در نظر گرفتن تنها شش بافت سالم (شامل بافت سالم کولون خود)، همه مجموعه‌های مصنوعی کشنده دوگانه و سه‌تایی از بین می‌روند و تنها یک ژن ضروری انتخابی باقی می‌ماند. از سوی دیگر، تعداد قابل توجهی از مجموعه‌های مصنوعی کشنده چهارتایی به عنوان راه حل‌های انتخابی باقی می‌مانند.

۴-۶- بحث در نتایج

برای مدل سرطانی COAD، تک ژن حیاتی *SLC38A3* به عنوان یک هدف دارویی بالقوه

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

اکیداً انتخابی شناسایی شد. اگرچه شواهدی برای ارتباط این ژن با سایر انواع سرطان‌ها وجود دارد [۱۸۷]، مهار این ژن ممکن است باعث آسیب جدی به سلول‌های سالم شود [۱۸۸]. از سوی



شکل ۶-۲- هدف‌های دارویی بالا‌قوه اکیداً انتخابی شناسایی شده در این مطالعه. این مجموعه اهداف عبارتند از ۹ مجموعه ژنی کشنده مصنوعی چهارتایی که سه ژن *PFKL*، *TALDO1* و *PGD* در آن‌ها مشترک می‌باشد.

دیگر، نه مجموعه ژنی کشنده مصنوعی چهارتایی، راه‌های پایدارتری را ارائه می‌دهند. تمام این نه راه حل از سه ژن مشترک فسفوفروکتوکیناز (*PFKL*)، ترانزالدولاز (*TALDO1*) و فسفوگلوکونات دهیدروژناز (*PGD*) استفاده می‌کنند. فسفوفروکتوکیناز یک آنزیم از مسیر گلیکولیز و گلوکونئوز است و مهار آن برای کنترل سرطان *COAD* گزارش شده است [۱۸۹]. همچنین گزارش شده است که مهار این ژن می‌تواند پیشرفت کارسینومای کبدی را متوقف کند [۱۹۰] و سرطان ریه را مدیریت نماید [۱۹۱].

ترانزالدولاز یک آنزیم مرتبط با مسیر فسفات پنتوز است و با رشد سرطان‌های مختلف ارتباط داشته است [۱۹۲]. این آنزیم نقش حیاتی‌ای در مسیر فسفات پنتوز در سلول‌های سرطانی با رشد سریع ایفا می‌کند. این آنزیم به عنوان یک واسطه مهم عمل می‌کند و اجازه می‌دهد تا سلول‌های سرطانی گلیکولیتیک نیازهای آنابولیک خود را برآورده کنند و به طور مؤثری با کمبود اکسیژن مقابله کنند [۶۵]. همچنین این آنزیم با گسترش سرطان مثانه [۱۹۳]، کبد [۱۹۴]، [۱۹۵] و سینه [۱۹۵]، [۱۹۶] مرتبط است. ارتباط بین بیان بالاتر ترانزالدولاز و کاهش پاسخگویی به مهارکننده‌های *HER2-BC* در بیماران سرطان سینه نشان‌دهنده نقش بالقوه ترانزالدولاز در مقاومت دارویی در این سرطان است. بنابراین، مهار ترانزالدولاز به عنوان یک هدف دارویی افزایش

یافتن اهداف دارویی انتخابی جهت حمله به سلول‌های سرطانی رساله دکتری

آسیب‌پذیری رده سلولی تقویت‌شده^۱ HER2 را نسبت به مهارکننده‌های HER2 افزایش می‌دهد [۱۹۷].

فسفوگلوکونات دهیدروژناز یکی از آنزیم‌های مسیر فسفات پنتوز است که به تازگی به دلیل نقش حیاتی خود در توسعه تومورها و حفظ تعادل اکسیداتیو سلولی توجه بیشتری را به خود جلب کرده است [۱۹۸]. فسفوگلوکونات دهیدروژناز در انواع مختلف سرطان به طور مکرر بیان می‌شود. این بیان زیاد، توانایی رشد و پخش سلول‌های سرطانی مختلف مانند سرطان سینه [۱۹۹، ۲۰۰]، تخمدان [۲۰۱] و ریه [۲۰۲] را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، بیان زیاد فسفوگلوکونات دهیدروژناز با باعث مقاومت به پرتودرمانی شیمی‌درمانی در سرطان‌ها مرتبط می‌شود.

در هر یک از نه هدف دارویی بالقوه اکیداً انتخابی شناسایی‌شده نه ژن متمایز وجود دارد. این نه ژن مرتبط با پنج مسیر متفاوت هستند. ژن‌های CTSA، GLB1 و NEU1 مرتبط با مسیر متابولیسم چربی‌های اسفنجی هستند که در پیشرفت سرطان‌های مختلف، به ویژه سرطان COAD [۲۰۳-۲۰۸]، تاثیر گذار هستند. تمام ژن‌های SLC35A1، SLC35A2 و SLC35D2 مرتبط با solute carrier family 35 هستند که به مسیر ترانسپورت دستگاه گلژی تعلق دارد. افزایش بیان SLC35A2 در بسیاری از انواع سرطان‌ها [۲۰۹، ۲۱۰] از جمله سرطان COAD، گزارش شده است.

ژن CMAS^۲ مرتبط با مسیر متابولیسم amono-sugar است. کاهش بیان CMAS باعث کاهش و کنترل فعالیت در سرطان سینه سه‌گانه-منفی^۳ دارد [۲۱۱].

ژن GALNS^۴ مرتبط با فرآیند ترکیب کراتان سولفات است و بیان بالاتر آن در بسیاری از انواع سرطان‌ها گزارش شده است [۲۱۲].

ژن ENT4^۵ قادر به انجام فعالیت هیدرولاز است و به طور خاص به عنوان یک فسفاتاز UDP عمل می‌کند و به مسیر متابولیسم نوکلئوتید مرتبط است. با این حال، ENT4 به عنوان یک انکوژن شناسایی نشده است.

¹ HER2-amplified cell line

² Cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase

³ Triple-negative breast cancer or TNBC

⁴ N-acetylgalactosamine-6-sulfatase

⁵ ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase

فصل هفتم

نتیجه‌گیری و جمع‌بندی

۷-۱- توسعه نرم‌افزاری

در گام اول این پژوهش، یک روش ارتقاء یافته با نام Rapid-SL جهت شناسایی مجموعه کشنده‌های مصنوعی یک مدل متابولیکی ژنوم-مقیاس ارائه شد. در این روش با کاهش فضای جستجو، به صورت چشم‌گیری زمان جستجو جهت یافتن مجموعه کشنده‌های مصنوعی مرتبه بالا، کاهش یافت. جهت اعتبارسنجی این روش، پاسخ‌های گزارش شده توسط روش Fast-SL با پاسخ‌های بدست آمده توسط Rapid-SL تطبیق داده شد. نتایج نشان‌دهنده کاهش ۳۵ تا ۶۰ درصدی تعداد مسائل بهینه‌سازی حل شده در روش Rapid-SL نسبت به روش Fast-SL در مرحله بدست آوردن مجموعه کشنده‌های مصنوعی چهارگانه، می‌باشد. همچنین در این پژوهش به مقایسه روش Rapid-SL با نسخه ارتقاء یافته روش MCSEnumerator که MCSEnumerator2 نامیده می‌شود، پرداخته شد. باید توجه داشت که اگرچه فرآیند یافتن مجموعه‌های کشنده چهارگانه پس از ۳۰ روز با استفاده از MCSEnumerator2 به پایان نرسید، ۴۰۵۶ کشنده مصنوعی چهارگانه پس از ۱۴۳ ساعت (حدود ۶ روز) با استفاده از Rapid-SL برای مدل iML1515 به دست آمد.

نحوه پیاده‌سازی Rapid-SL به صورت توابع بازگشتی و همچنین استفاده از روش جستجو اول-عمق، قابلیت انجام محاسبات کاملاً موازی را توسط این روش ایجاد کرده است. علاوه بر این، پیاده‌سازی بهینه روش Rapid-SL قابلیت جستجوی هدفمند و یا جستجو در بخش‌های دلخواه از سیستم را در اختیار کاربر قرار می‌دهد به گونه‌ای که با بررسی تنها حدود ۱ درصد از فضای جستجویی که برای یافتن همه SLهای چهارگانه باید حل شود، تا ۶۷٪ از همه SLها (یعنی

شامل SLهای دوگانه، سه گانه و چهارگانه) قابل دستیابی است. این نوع جستجو که بخشی از تمامی پاسخ‌های موجود را در اختیار کاربر قرار می‌دهد، زمانی بسیار کارآمد خواهد بود که کاردینالیت مجموعه کشنده‌های مصنوعی بیش از ۴ عضو در نظر گرفته شود. با استفاده از این قابلیت، Rapid-SL بیش از ۹۰۰۰ مجموعه کشنده مصنوعی با هشت عضو (مجموعه کشنده‌های مصنوعی هشت‌گانه) را در مدل باکتریایی اشریشیا کلی (iJO1366) شناسایی کرده است.

۷-۲- یافتن اهداف انتخابی در یک مجموعه باکتریایی با شناسایی مجموعه کشنده

های مصنوعی

بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های قوی، طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها را مورد هدف قرار می‌دهند که منجر به ایجاد اثرات جانبی متعددی بر سلول‌های بدن انسان و میکروارگانیسم‌های مفید در بدن می‌شود. جایگزین منطقی یک آنتی‌بیوتیک قوی (یعنی یک آنتی‌بیوتیک با طیف گسترده) ممکن است ترکیبی از چندین آنتی‌بیوتیک ضعیف باشد که منجر به حداقل رساندن اثرات جانبی شود. یک درمان ترکیبی ایده‌آل باید تنها میکروارگانیسمی که بیماری را ایجاد می‌کند، از بین ببرد و همزمان میکروارگانیسم‌های مفید را حفظ کند. با این حال، شناسایی داروهای انتخابی نیازمند بررسی تعداد متعددی از اهداف مختلف می‌شود. شناسایی این ترکیب‌ها به صورت تجربی زمان‌بر و هزینه‌بر است. بنابراین به کارگیری یک روش محاسباتی جهت بررسی میلیون‌ها هدف بالقوه به منظور شناسایی اهداف دارویی که به طور خاص یک میکروارگانیسم را مورد حمله قرار می‌دهند و نسبت به دیگر میکروارگانیسم‌ها بی‌اثر هستند، بسیار سودمند خواهد بود.

در راستای هدف ذکر شده، در این پژوهش یک مجموعه شش عضوی از میکروارگانیسم‌ها به عنوان یک جامعه کوچک از باکتری‌ها در نظر گرفته شد. مجموعه کشنده‌های مصنوعی دوگانه، سه‌گانه و چهارگانه برای این شش میکروارگانیسم شناسایی شدند. سپس، با لحاظ کردن حالت‌های مختلفی از این که کدام میکروارگانیسم به عنوان هدف و کدام یک به عنوان حفاظت شده در نظر گرفته شود، ۶۶۵ حالت مختلف مورد مطالعه قرار گرفت و هدف‌های دارویی بالقوه انتخابی برای هر یک از این حالات به صورت جداگانه معرفی شدند. از بین ۶۶۵ حالت، در ۶۳ مورد (گروه اول) هیچ میکروارگانیسمی به عنوان «حفاظت شده» در نظر گرفته نشد. در ۶۰۲ مورد باقیمانده (گروه دوم)، حداقل یک میکروارگانیسم به عنوان «حفاظت شده» در نظر گرفته شد. عبارت «حفاظت شده» به معنی این است که با حذف هدف یا مجموعه اهداف دارویی مورد بررسی از میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه، رشد میکروارگانیسم «حفاظت شده» از مقدار معینی کمتر نشود.

بر اساس نتایج، مسیرهای از جمله:

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

- بیوسنتز پوشش سلولی
- متابولیسم گلیسروفسفولیپید
- متابولیسم لیپیدهای غشایی
- مسیر سالویج نوکلئوتید

در تمام ۶۳ مورد گروه اول مشارکت دارند. همچنین، این مسیرها هدف بسیاری از راه حل‌های بالقوه برای موارد گروه دوم هستند. این مسیرها مربوط به سنتز دیواره سلولی و تکثیر DNA هستند که به عنوان اصلی‌ترین هدف بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش شده‌اند. همچنین، نتایج نشان می‌دهند که حذف واکنش‌های مختلف، که تنها متعلق به مسیرهایی همچون متابولیسم سیستئین، بیوسنتز اسیدهای چرب یا متابولیسم پیرووات باشند، نمی‌تواند رشد میکروارگانیسم‌ها را متوقف کند، اما اختلال این مسیرها به همراه مسیرهای دیگر به مرگ سلولی منجر می‌شود. این نوع راه حل‌ها می‌توانند بسیار با اهمیت باشند، زیرا به معنی این است که با حمله به چند نقطه با اهمیت کمتر در سلول، می‌توان توانایی تقسیم سلولی و تکثیر (رشد) را از آن صلب نمود. شناسایی مجموعه اهدافی که می‌توانند تعداد قابل توجهی از ۶۶۵ کیس مورد مطالعه را پوشش دهند، ارزشمند است. به این معنی که با استفاده از ترکیبات مختلف از چند داروی محدود، به یک مجموعه گسترده از حالات مختلف پاسخ داد. با توجه به این موضوع، دو گروه هدف معرفی شدند که گروه اول با استفاده از چهار واکنش قادر است به ۱۹۸ حالت مورد مطالعه پاسخ دهد. همچنین، داروهای خاصی که به ژن‌های مرتبط با این واکنش‌ها حمله می‌کنند، با کمک گیری از پایگاه‌های داده، معرفی شدند. همانطور که انتظار می‌رفت، چهار واکنش حیاتی معرفی شده در گروه اول و ژن‌های مرتبط با آن‌ها، قابلیت توسعه مقاومت دارویی را دارند. برای مقابله با این چالش، گروه دوم از اهداف معرفی شدند که شامل هفت واکنش اختصاصی از مجموعه‌های کشنده‌های مصنوعی هستند. حذف اهداف مختلف از این گروه می‌تواند به ۲۳۶ مورد پاسخ دهند.

انتظار می‌رود که به دست آوردن مجموعه‌های اهداف کشنده مصنوعی، هدف‌های بالقوه بیشتری را به عنوان راه حل فراهم نماید. این فرضیه ممکن است با نتایج مرحله چهارم منطبق باشد، جایی که چندین مجموعه کشنده مصنوعی برای ۱۰۲ مورد که راه حلی در مجموعه تک واکنش‌های حیاتی نداشتند، به دست آمد. همچنین، نتایج مرحله چهارم نشان می‌دهد که مجموعه‌های کشنده مصنوعی چهارگانه به طور کلی گزینه‌های بسیار متعددی را برای انجام کیس‌های مورد مطالعه فراهم می‌کنند. با این حال، اعمال محدودیت‌های سخت‌گیرانه مرحله پنجم، که شامل در نظر گرفتن تنها واکنش‌های مشترک بین مدل‌ها است، باعث حذف مجموعه‌های کشنده مصنوعی سه‌گانه و چهارگانه بسیاری می‌شود. از آنجایی که تفاوت‌های

فیلوژنتیک ممکن است شناسایی هدف‌های دارویی انتخابی را آسان‌تر سازد، محدود کردن فضای جستجو به واکنش‌های مشترک در مرحله پنجم، گستره مجاز مجموعه‌های کشنده مصنوعی را کاهش می‌دهد. متعاقباً، ۵۴ مورد از کیس‌های مورد بررسی، با راه‌حلهایی که تنها از واکنش‌های حیاتی تشکیل شده‌اند، باقی می‌ماند.

در این پژوهش، به دلیل عدم وجود مدل‌های بازبینی شده با دقت بالا از میکروارگانسیم‌های غیر بیماری‌زای دستگاه گوارش انسان، میکروارگانسیم‌های مورد مطالعه به گروه‌های میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا تقسیم نشده‌اند. با این حال، ارائه مدل‌های بازبینی شده برای این میکروارگانسیم‌ها می‌تواند تحقیقات دقیق‌تری را برای شناسایی هدف‌های دارویی ویژه هر گروه خاص از میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا فراهم کند.

۷-۳- یافتن اهداف دارویی انتخابی جهت مبارزه با سرطان

شناسایی اهداف دارویی که حمله به آن‌ها کمترین میزان اثرات جانبی را بر دیگر سلول‌های سالم در بدن انسان داشته باشند، بسیار ارزشمند خواهد بود. در قسمت سوم از این پژوهش، به شناسایی اهداف بالقوه «اکیدا انتخابی» با استفاده از مدل‌های ژنوم-مقیاس پرداخته شده است. عبارت اکیدا انتخابی به این معنی است که حمله به هدف دارویی مورد شناسایی شده، علاوه بر نداشتن اثرات جانبی بر روی بافت سالم معادل (بافت سالم مربوط به سلول‌های سرطانی)، می‌بایست نسبت به دیگر بافت‌های سالم بدن نیز بی‌اثر باشد.

جهت شناسایی اهداف اکیدا انتخابی، مدل‌های بافت-خاص از ۱۳ بافت مورد مطالعه با استفاده از روش rFastCORMICS ایجاد شد. در این پژوهش، برای نخستین بار توانایی مجموعه کشنده‌های مرتبه بالا جهت ارائه راه‌حل‌های اکیدا انتخاب پذیر ارزیابی شدند. جهت شناسایی اهداف انتخابی، در ابتدا ژن‌های حیاتی و مجموعه ژن‌های کشنده مصنوعی برای مدل‌های بافت‌های سرطانی با استفاده از روش Rapid-SL شناسایی شدند. سپس با در نظر گرفتن یک آستانه برای شناسایی تاثیرپذیری بافت‌های سالم، تاثیر اهداف مختلف بر روی تمامی ۱۳ بافت سالم، بررسی شد.

در این پژوهش برای هر ۱۳ بافت سرطانی مورد مطالعه، اهداف دارویی اکیدا انتخابی معرفی شدند. نتایج بدست آمده برای سرطان‌های مختلف به خوبی نشان دهنده این موضوع است که با افزایش کاردینالیتیه مجموعه کشنده‌های مصنوعی، امکان دستیابی به راه‌حل‌های اکیدا انتخاب پذیر افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر می‌توان بیان کرد که مجموعه کشنده‌های مصنوعی مرتبه بالا، قابلیت ارائه اهدافی را دارند که تنها بر روی بافت سرطانی تاثیر گذاشته و حداقل اثرات جانبی را بر روی سلول‌های بافت(های) سالم دارند. این یافته می‌تواند به عنوان یک مسیر

بررسی سامانه ای تفاوت‌های رفتاری و عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربرد ...

پیشنهادی جدید جهت انجام تست‌های آزمایشگاهی در نظر گرفته شود که در صورت به تایید رسیدن در مسیر آزمایشگاهی، نوید مسیری بسیار قدرتمند و بدون اثرات جانبی جهت مبارزه با سرطان را می‌دهد.

- [1] T. Ideker, T. Galitski, and L. Hood, "A new approach to decoding life: systems biology," *Annual review of genomics and human genetics*, vol. 2, no. 1, pp. 343-372, 2001.
- [2] L. Hood, "Systems biology: integrating technology, biology, and computation," *Mechanisms of ageing and development*, vol. 124, no. 1, pp. 9-16, 2003.
- [3] W. Materi and D. S. Wishart, "Computational systems biology in drug discovery and development: methods and applications," *Drug discovery today*, vol. 12, no. 7-8, pp. 295-303, 2007.
- [4] H. Kitano, "Computational systems biology," *Nature*, vol. 420, no. 6912, pp. 206-210, 2002.
- [5] A. Bugrim, T. Nikolskaya, and Y. Nikolsky, "Early prediction of drug metabolism and toxicity: systems biology approach and modeling," *Drug discovery today*, vol. 9, no. 3, pp. 127-135, 2004.
- [6] C. R. Cho, M. Labow, M. Reinhardt, J. van Oostrum, and M. C. Peitsch, "The application of systems biology to drug discovery," *Current opinion in chemical biology*, vol. 10, no. 4, pp. 294-302, 2006.
- [7] N. Kumar, B. S. Hendriks, K. A. Janes, D. de Graaf, and D. A. Lauffenburger, "Applying computational modeling to drug discovery and development," *Drug discovery today*, vol. 11, no. 17-18, pp. 806-811, 2006.
- [8] J. B. Reece, L. A. Urry, M. L. Cain, S. A. Wasserman, P. V. Minorsky, and R. B. Jackson, *Campbell biology* (no. s 1309). Pearson Boston, 2014.
- [9] K. A. Zweig, "Network Representations of Complex Systems," in *Network Analysis Literacy*: Springer, 2016, pp. 109-148.
- [10] W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, H. Yokota, and K.-H. Cho, *Encyclopedia of systems biology*. Springer Publishing Company, Incorporated, 2013.
- [11] E. O. Voit, *A first course in systems biology*. Garland Science, 2017.
- [12] M. Walhout, M. Vidal, and J. Dekker, *Handbook of systems biology: concepts and insights*. Academic Press, 2012.
- [13] W. Wiechert, "13C metabolic flux analysis," *Metabolic engineering*, vol. 3, no. 3, pp. 195-206, 2001.
- [14] J. D. Orth, I. Thiele, and B. Ø. Palsson, "What is flux balance analysis?," *Nature biotechnology*, vol. 28, no. 3, pp. 245-248, 2010.
- [15] A. M. Feist and B. Ø. Palsson, "The growing scope of applications of genome-scale metabolic reconstructions using *Escherichia coli*," *Nature biotechnology*, vol. 26, no. 6, pp. 659-667, 2008.
- [16] C. Gu, G. B. Kim, W. J. Kim, H. U. Kim, and S. Y. Lee, "Current status and applications of genome-scale metabolic models," *Genome biology*, vol. 20, no. 1, pp. 1-18, 2019.
- [17] M. A. Oberhardt, B. Ø. Palsson, and J. A. Papin, "Applications of genome-scale metabolic reconstructions," *Molecular systems biology*, vol. 5, no. 1, p. 320, 2009.
- [18] S. M. Keating, B. J. Bornstein, A. Finney, and M. Hucka, "SBMLToolbox: an SBML toolbox for MATLAB users," *Bioinformatics*, vol. 22, no. 10, pp. 1275-1277, 2006.

- [19] M. Cvijovic *et al.*, "BioMet Toolbox: genome-wide analysis of metabolism," *Nucleic acids research*, vol. 38, no. suppl_2, pp. W144-W149, 2010.
- [20] P. Mendes, S. Hoops, S. Sahle, R. Gauges, J. Dada, and U. Kummer, "Computational modeling of biochemical networks using COPASI," in *Systems Biology*: Springer, 2009, pp. 17-59.
- [21] L. Heirendt *et al.*, "Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v. 3.0," *Nature protocols*, vol. 14, no. 3, pp. 639-702, 2019.
- [22] K. Strimbu and J. A. Tavel, "What are biomarkers?," *Current Opinion in HIV and AIDS*, vol. 5, no. 6, p. 463, 2010.
- [23] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, and C. B. Thompson, "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation," *science*, vol. 324, no. 5930, pp. 1029-1033, 2009.
- [24] S. K. Mencher and L. G. Wang, "Promiscuous drugs compared to selective drugs (promiscuity can be a virtue)," *BMC clinical pharmacology*, vol. 5, no. 1, pp. 1-7, 2005.
- [25] C. Hill, "Microbiome and infection: a case for "selective depletion"," *Annals of Nutrition and Metabolism*, vol. 77, no. 3, pp. 4-9, 2021.
- [26] Y. Luo and T. Zhou, "Connecting the dots: Targeting the microbiome in drug toxicity," *Medicinal Research Reviews*, vol. 42, no. 1, pp. 83-111, 2022.
- [27] S. K. Sarin, A. Pande, and B. Schnabl, "Microbiome as a therapeutic target in alcohol-related liver disease," *Journal of hepatology*, vol. 70, no. 2, pp. 260-272, 2019.
- [28] C. Woodhouse, V. Patel, A. Singanayagam, and D. Shawcross, "the gut microbiome as a therapeutic target in the pathogenesis and treatment of chronic liver disease," *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 47, no. 2, pp. 192-202, 2018.
- [29] T. G. Dinan and J. F. Cryan, "The microbiome-gut-brain axis in health and disease," *Gastroenterology Clinics*, vol. 46, no. 1, pp. 77-89, 2017.
- [30] S. Ghaisas, J. Maher, and A. Kanthasamy, "Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases," *Pharmacology & therapeutics*, vol. 158, pp. 52-62, 2016.
- [31] C. R. Martin, V. Osadchiy, A. Kalani, and E. A. Mayer, "The brain-gut-microbiome axis," *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, vol. 6, no. 2, pp. 133-148, 2018.
- [32] Y.-Y. Chen *et al.*, "Microbiome-metabolome reveals the contribution of gut-kidney axis on kidney disease," *Journal of translational medicine*, vol. 17, no. 1, pp. 1-11, 2019.
- [33] D. Shankaranarayanan and D. Raj, "Gut Microbiome and Kidney Disease," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2022.
- [34] S. Ahmadmehrabi and W. W. Tang, "Gut microbiome and its role in cardiovascular diseases," *Current opinion in cardiology*, vol. 32, no. 6, p. 761, 2017.
- [35] Y. Okuyama *et al.*, "The influence of gut microbiome on progression of overactive bladder symptoms: A community-based 3-year longitudinal study

- in Aomori, Japan," *International Urology and Nephrology*, vol. 54, no. 1, pp. 9-16, 2022.
- [36] D. V. Patangia, C. Anthony Ryan, E. Dempsey, R. Paul Ross, and C. Stanton, "Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health," *MicrobiologyOpen*, vol. 11, no. 1, p. e1260, 2022.
- [37] A. A. Villarreal, F. J. Aberger, R. Benrud, and J. D. Gundrum, "Use of broad-spectrum antibiotics and the development of irritable bowel syndrome," *Wmj*, vol. 111, no. 1, pp. 17-20, 2012.
- [38] Y. Shimodaira, K. Watanabe, and K. Iijima, "The risk of antibiotics and enterocolitis for the development of inflammatory bowel disease: a Japanese administrative database analysis," *Scientific Reports*, vol. 12, no. 1, pp. 1-8, 2022.
- [39] R. Ungaro *et al.*, "Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis," *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, vol. 109, no. 11, pp. 1728-1738, 2014.
- [40] N. Vallianou, M. Dalamaga, T. Stratigou, I. Karampela, and C. Tsigalou, "Do antibiotics cause obesity through long-term alterations in the gut microbiome? A review of current evidence," *Current Obesity Reports*, vol. 10, no. 3, pp. 244-262, 2021.
- [41] C. Ferrajolo *et al.*, "Antibiotic-induced liver injury in paediatric outpatients: a case-control study in primary care databases," *Drug safety*, vol. 40, no. 4, pp. 305-315, 2017.
- [42] J. G. Stine and J. H. Lewis, "Hepatotoxicity of antibiotics: a review and update for the clinician," *Clinics in Liver Disease*, vol. 17, no. 4, pp. 609-642, 2013.
- [43] G. Ianiro, H. Tilg, and A. Gasbarrini, "Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil," *Gut*, vol. 65, no. 11, pp. 1906-1915, 2016.
- [44] R. A. Alm and S. D. Lahiri, "Narrow-spectrum antibacterial agents—benefits and challenges," *Antibiotics*, vol. 9, no. 7, p. 418, 2020.
- [45] R. J. Melander, D. V. Zurawski, and C. Melander, "Narrow-spectrum antibacterial agents," *Medchemcomm*, vol. 9, no. 1, pp. 12-21, 2018.
- [46] M. Mondhe, A. Chessher, S. Goh, L. Good, and J. E. Stach, "Species-selective killing of bacteria by antimicrobial peptide-PNAs," *PloS one*, vol. 9, no. 2, p. e89082, 2014.
- [47] E. Ostorhazi, R. Hoffmann, N. Herth, J. D. Wade, C. N. Kraus, and L. Otvos Jr, "Advantage of a narrow spectrum host defense (antimicrobial) peptide over a broad spectrum analog in preclinical drug development," *Frontiers in Chemistry*, vol. 6, p. 359, 2018.
- [48] O. Warburg, K. Posener, and E. Negelein, "Über den stoffwechsel der carcinomzelle," *Naturwissenschaften*, vol. 12, no. 50, pp. 1131-1137, 1924.
- [49] R. A. Cairns, I. S. Harris, and T. W. Mak, "Regulation of cancer cell metabolism," *Nature Reviews Cancer*, vol. 11, no. 2, pp. 85-95, 2011.
- [50] M. Akram, "Mini-review on glycolysis and cancer," *Journal of Cancer Education*, vol. 28, no. 3, pp. 454-457, 2013.

- [51] L. C. Costello and R. B. Franklin, "“Why do tumour cells glycolyse?”: from glycolysis through citrate to lipogenesis," *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 280, pp. 1-8, 2005.
- [52] A. Fadaka, B. Ajiboye, O. Ojo, O. Adewale, I. Olayide, and R. Emuowhochere, "Biology of glucose metabolization in cancer cells," *Journal of Oncological Sciences*, vol. 3, no. 2, pp. 45-51, 2017.
- [53] J. Fernandez-de-Cossio-Diaz and A. Vazquez, "Limits of aerobic metabolism in cancer cells," *Scientific reports*, vol. 7, no. 1, p. 13488, 2017.
- [54] S. Ganapathy-Kanniappan, "Molecular intricacies of aerobic glycolysis in cancer: current insights into the classic metabolic phenotype," *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, vol. 53, no. 6, pp. 667-682, 2018.
- [55] S. Ganapathy-Kanniappan and J.-F. H. Geschwind, "Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects," *Molecular cancer*, vol. 12, no. 1, pp. 1-11, 2013.
- [56] R. A. Gatenby and R. J. Gillies, "Glycolysis in cancer: a potential target for therapy," *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 39, no. 7-8, pp. 1358-1366, 2007.
- [57] X. b. Li, J. d. Gu, and Q. h. Zhou, "Review of aerobic glycolysis and its key enzymes—new targets for lung cancer therapy," *Thoracic cancer*, vol. 6, no. 1, pp. 17-24, 2015.
- [58] Z. Li and H. Zhang, "Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression," *Cellular and molecular life sciences*, vol. 73, pp. 377-392, 2016.
- [59] S. Y. Lunt and M. G. Vander Heiden, "Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation," *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 27, pp. 441-464, 2011.
- [60] E. Newsholme, B. Crabtree, and M. Ardawi, "The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells," *Bioscience reports*, vol. 5, no. 5, pp. 393-400, 1985.
- [61] R. J. DeBerardinis *et al.*, "Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 49, pp. 19345-19350, 2007.
- [62] P. P. Hsu and D. M. Sabatini, "Cancer cell metabolism: Warburg and beyond," *Cell*, vol. 134, no. 5, pp. 703-707, 2008.
- [63] C. R. Santos and A. Schulze, "Lipid metabolism in cancer," *The FEBS journal*, vol. 279, no. 15, pp. 2610-2623, 2012.
- [64] L. Sun, C. Suo, S.-t. Li, H. Zhang, and P. Gao, "Metabolic reprogramming for cancer cells and their microenvironment: Beyond the Warburg Effect," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, vol. 1870, no. 1, pp. 51-66, 2018.
- [65] K. C. Patra and N. Hay, "The pentose phosphate pathway and cancer," *Trends in biochemical sciences*, vol. 39, no. 8, pp. 347-354, 2014.
- [66] S. Y. Lunt and S.-M. Fendt, "Metabolism—A cornerstone of cancer initiation, progression, immune evasion and treatment response," *Current opinion in systems biology*, vol. 8, pp. 67-72, 2018.

- [67] A. Sharma, L. H. Boise, and M. Shanmugam, "Cancer metabolism and the evasion of apoptotic cell death," *Cancers*, vol. 11, no. 8, p. 1144, 2019.
- [68] O. Folger, L. Jerby, C. Frezza, E. Gottlieb, E. Ruppin, and T. Shlomi, "Predicting selective drug targets in cancer through metabolic networks," *Molecular systems biology*, vol. 7, no. 1, p. 501, 2011.
- [69] D. Van Duin and D. L. Paterson, "Multidrug-resistant bacteria in the community: trends and lessons learned," *Infectious disease clinics*, vol. 30, no. 2, pp. 377-390, 2016.
- [70] R. A. Jackson and E. S. Chen, "Synthetic lethal approaches for assessing combinatorial efficacy of chemotherapeutic drugs," *Pharmacology & therapeutics*, vol. 162, pp. 69-85, 2016.
- [71] Z. Xu, X. Fang, T. K. Wood, and Z. J. Huang, "A systems-level approach for investigating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation," *PloS one*, vol. 8, no. 2, p. e57050, 2013.
- [72] L. L. Silver, "Multi-targeting by monotherapeutic antibacterials," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 6, no. 1, pp. 41-55, 2007.
- [73] !!! INVALID CITATION !!! [27-37].
- [74] J. Zugazagoitia, C. Guedes, S. Ponce, I. Ferrer, S. Molina-Pinelo, and L. Paz-Ares, "Current challenges in cancer treatment," *Clinical therapeutics*, vol. 38, no. 7, pp. 1551-1566, 2016.
- [75] N. J. O'Neil, M. L. Bailey, and P. Hieter, "Synthetic lethality and cancer," *Nature Reviews Genetics*, vol. 18, no. 10, pp. 613-623, 2017.
- [76] A. Huang, L. A. Garraway, A. Ashworth, and B. Weber, "Synthetic lethality as an engine for cancer drug target discovery," *Nature reviews Drug discovery*, vol. 19, no. 1, pp. 23-38, 2020.
- [77] M. S. Yar, K. Haider, V. Gohel, N. A. Siddiqui, and A. Kamal, "Synthetic lethality on drug discovery: an update on cancer therapy," *Expert opinion on drug discovery*, vol. 15, no. 7, pp. 823-832, 2020.
- [78] W. G. Kaelin Jr, "The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy," *Nature reviews cancer*, vol. 5, no. 9, pp. 689-698, 2005.
- [79] J. K. Dhanjal, N. Radhakrishnan, and D. Sundar, "Identifying synthetic lethal targets using CRISPR/Cas9 system," *Methods*, vol. 131, pp. 66-73, 2017.
- [80] Z. Ji, K. Yan, W. Li, H. Hu, and X. Zhu, "Mathematical and computational modeling in complex biological systems," *BioMed research international*, vol. 2017, 2017.
- [81] R. Agren, A. Mardinoglu, A. Asplund, C. Kampf, M. Uhlen, and J. Nielsen, "Identification of anticancer drugs for hepatocellular carcinoma through personalized genome-scale metabolic modeling," *Molecular systems biology*, vol. 10, no. 3, p. 721, 2014.
- [82] I. Larsson, M. Uhlén, C. Zhang, and A. Mardinoglu, "Genome-scale metabolic modeling of glioblastoma reveals promising targets for drug development," *Frontiers in genetics*, vol. 11, p. 381, 2020.
- [83] J. E. Lewis, T. E. Forshaw, D. A. Boothman, C. M. Furdui, and M. L. Kemp, "Personalized genome-scale metabolic models identify targets of redox metabolism in radiation-resistant tumors," *Cell systems*, vol. 12, no. 1, pp. 68-81. e11, 2021.

- [84] A. Paul, R. Anand, S. P. Karmakar, S. Rawat, N. Bairagi, and S. Chatterjee, "Exploring gene knockout strategies to identify potential drug targets using genome-scale metabolic models," *Scientific reports*, vol. 11, no. 1, p. 213, 2021.
- [85] J. L. Robinson and J. Nielsen, "Anticancer drug discovery through genome-scale metabolic modeling," *Current Opinion in Systems Biology*, vol. 4, pp. 1-8, 2017.
- [86] B. Turanli *et al.*, "Discovery of therapeutic agents for prostate cancer using genome-scale metabolic modeling and drug repositioning," *EBioMedicine*, vol. 42, pp. 386-396, 2019.
- [87] C. Frezza *et al.*, "Haem oxygenase is synthetically lethal with the tumour suppressor fumarate hydratase," *Nature*, vol. 477, no. 7363, pp. 225-228, 2011.
- [88] M. A. Oberhardt, K. Yizhak, and E. Ruppin, "Metabolically re-modeling the drug pipeline," *Current opinion in pharmacology*, vol. 13, no. 5, pp. 778-785, 2013.
- [89] T. Pfeiffer, I. Sánchez-Valdenebro, J. Nuñez, F. Montero, and S. Schuster, "METATOOL: for studying metabolic networks," *Bioinformatics (Oxford, England)*, vol. 15, no. 3, pp. 251-257, 1999.
- [90] S. Klamt, J. Stelling, M. Ginkel, and E. D. Gilles, "FluxAnalyzer: exploring structure, pathways, and flux distributions in metabolic networks on interactive flux maps," *Bioinformatics*, vol. 19, no. 2, pp. 261-269, 2003.
- [91] R. Schwarz *et al.*, "YANA—a software tool for analyzing flux modes, gene-expression and enzyme activities," *BMC bioinformatics*, vol. 6, pp. 1-12, 2005.
- [92] S. A. Becker, A. M. Feist, M. L. Mo, G. Hannum, B. Ø. Palsson, and M. J. Herrgard, "Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox," *Nature protocols*, vol. 2, no. 3, pp. 727-738, 2007.
- [93] I. Rocha *et al.*, "OptFlux: an open-source software platform for in silico metabolic engineering," *BMC systems biology*, vol. 4, no. 1, pp. 1-12, 2010.
- [94] A. Ebrahim, J. A. Lerman, B. O. Palsson, and D. R. Hyduke, "COBRAPy: constraints-based reconstruction and analysis for python," *BMC systems biology*, vol. 7, pp. 1-6, 2013.
- [95] R. Agren, L. Liu, S. Shoaie, W. Vongsangnak, I. Nookaew, and J. Nielsen, "The RAVEN toolbox and its use for generating a genome-scale metabolic model for *Penicillium chrysogenum*," *PLoS computational biology*, vol. 9, no. 3, p. e1002980, 2013.
- [96] L. Chindelevitch, J. Trigg, A. Regev, and B. Berger, "An exact arithmetic toolbox for a consistent and reproducible structural analysis of metabolic network models," *Nature communications*, vol. 5, no. 1, p. 4893, 2014.
- [97] D. Machado, "A benchmark of optimization solvers for genome-scale metabolic modeling," *bioRxiv*, p. 2023.04. 11.536343, 2023.
- [98] V. Pereira, F. Cruz, and M. Rocha, "MEWpy: a computational strain optimization workbench in Python," *Bioinformatics*, vol. 37, no. 16, pp. 2494-2496, 2021.

- [99] N. E. Lewis, H. Nagarajan, and B. O. Palsson, "Constraining the metabolic genotype–phenotype relationship using a phylogeny of in silico methods," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 10, no. 4, pp. 291-305, 2012.
- [100] B. Palsson, *Systems biology*. Cambridge university press, 2015.
- [101] B. V. Dougherty, T. J. Moutinho Jr, and J. Papin, "Accelerating the drug development pipeline with genome-scale metabolic network reconstructions," *Systems Biology*, vol. 6, 2017.
- [102] H. U. Kim, T. Y. Kim, and S. Y. Lee, "Genome-scale metabolic network analysis and drug targeting of multi-drug resistant pathogen *Acinetobacter baumannii* AYE," *Molecular BioSystems*, vol. 6, no. 2, pp. 339-348, 2010.
- [103] H. U. Kim *et al.*, "Integrative genome-scale metabolic analysis of *Vibrio vulnificus* for drug targeting and discovery," *Molecular systems biology*, vol. 7, no. 1, p. 460, 2011.
- [104] S. Singh, B. K. Malik, and D. K. Sharma, "Choke point analysis of metabolic pathways in *E. histolytica*: a computational approach for drug target identification," *Bioinformatics*, vol. 2, no. 2, pp. 68-72, 2007.
- [105] A. K. Chavali, J. D. Whittemore, J. A. Eddy, K. T. Williams, and J. A. Papin, "Systems analysis of metabolism in the pathogenic trypanosomatid *Leishmania major*," *Molecular systems biology*, vol. 4, no. 1, p. 177, 2008.
- [106] I. Thiele *et al.*, "A community effort towards a knowledge-base and mathematical model of the human pathogen *Salmonella Typhimurium* LT2," *BMC systems biology*, vol. 5, no. 1, pp. 1-9, 2011.
- [107] A. K. Chavali, K. M. D’Auria, E. L. Hewlett, R. D. Pearson, and J. A. Papin, "A metabolic network approach for the identification and prioritization of antimicrobial drug targets," *Trends in microbiology*, vol. 20, no. 3, pp. 113-123, 2012.
- [108] H. B. Hartman *et al.*, "Identification of potential drug targets in *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* using metabolic modelling and experimental validation," *Microbiology*, vol. 160, no. 6, pp. 1252-1266, 2014.
- [109] G. Sigurdsson, R. M. Fleming, A. Heinken, and I. Thiele, "A systems biology approach to drug targets in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm," *PLoS One*, vol. 7, no. 4, p. e34337, 2012.
- [110] P. F. Suthers, A. Zomorodi, and C. D. Maranas, "Genome-scale gene/reaction essentiality and synthetic lethality analysis," *Molecular systems biology*, vol. 5, no. 1, p. 301, 2009.
- [111] S. M. Nijman, "Synthetic lethality: general principles, utility and detection using genetic screens in human cells," *FEBS letters*, vol. 585, no. 1, pp. 1-6, 2011.
- [112] A. Ashworth and C. J. Lord, "Synthetic lethal therapies for cancer: what’s next after PARP inhibitors?," *Nature reviews Clinical oncology*, vol. 15, no. 9, pp. 564-576, 2018.
- [113] J. Feng, P. G. Auwaerter, and Y. Zhang, "Drug combinations against *Borrelia burgdorferi* persists in vitro: eradication achieved by using daptomycin, cefoperazone and doxycycline," *PloS one*, vol. 10, no. 3, p. e0117207, 2015.
- [114] S. Tymoshenko, R. D. Oppenheim, R. Agren, J. Nielsen, D. Soldati-Favre, and V. Hatzimanikatis, "Metabolic needs and capabilities of *Toxoplasma*

- gondii through combined computational and experimental analysis," *PLoS computational biology*, vol. 11, no. 5, p. e1004261, 2015.
- [115] A. M. Feist *et al.*, "A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information," *Molecular systems biology*, vol. 3, no. 1, p. 121, 2007.
- [116] A. von Kamp and S. Klamt, "Enumeration of smallest intervention strategies in genome-scale metabolic networks," *PLoS computational biology*, vol. 10, no. 1, p. e1003378, 2014.
- [117] P. Schneider, A. von Kamp, and S. Klamt, "An extended and generalized framework for the calculation of metabolic intervention strategies based on minimal cut sets," *PLoS computational biology*, vol. 16, no. 7, p. e1008110, 2020.
- [118] S. Klamt, R. Mahadevan, and A. von Kamp, "Speeding up the core algorithm for the dual calculation of minimal cut sets in large metabolic networks," *Bmc Bioinformatics*, vol. 21, no. 1, pp. 1-21, 2020.
- [119] R. Miraskarshahi, H. Zabeti, T. Stephen, and L. Chindelevitch, "MCS2: minimal coordinated supports for fast enumeration of minimal cut sets in metabolic networks," *Bioinformatics*, vol. 35, no. 14, pp. i615-i623, 2019.
- [120] A. Pratapa, S. Balachandran, and K. Raman, "Fast-SL: an efficient algorithm to identify synthetic lethal sets in metabolic networks," *Bioinformatics*, vol. 31, no. 20, pp. 3299-3305, 2015.
- [121] C. Zhang, B. Ji, A. Mardinoglu, J. Nielsen, and Q. Hua, "Logical transformation of genome-scale metabolic models for gene level applications and analysis," *Bioinformatics*, vol. 31, no. 14, pp. 2324-2331, 2015.
- [122] A. P. Burgard, E. V. Nikolaev, C. H. Schilling, and C. D. Maranas, "Flux coupling analysis of genome-scale metabolic network reconstructions," *Genome research*, vol. 14, no. 2, pp. 301-312, 2004.
- [123] K. Ballerstein, A. von Kamp, S. Klamt, and U.-U. Haus, "Minimal cut sets in a metabolic network are elementary modes in a dual network," *Bioinformatics*, vol. 28, no. 3, pp. 381-387, 2012.
- [124] T. Y. Kim, H. U. Kim, and S. Y. Lee, "Metabolite-centric approaches for the discovery of antibacterials using genome-scale metabolic networks," *Metabolic Engineering*, vol. 12, no. 2, pp. 105-111, 2010.
- [125] D. Perumal, A. Samal, K. R. Sakharkar, and M. K. Sakharkar, "Targeting multiple targets in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 using flux balance analysis of a reconstructed genome-scale metabolic network," *Journal of drug targeting*, vol. 19, no. 1, pp. 1-13, 2011.
- [126] I. Yeh, T. Hanekamp, S. Tsoka, P. D. Karp, and R. B. Altman, "Computational analysis of *Plasmodium falciparum* metabolism: organizing genomic information to facilitate drug discovery," *Genome research*, vol. 14, no. 5, pp. 917-924, 2004.
- [127] O. Jamialahmadi, S. Hashemi-Najafabadi, E. Motamedian, S. Romeo, and F. Bagheri, "A benchmark-driven approach to reconstruct metabolic networks for studying cancer metabolism," *PLoS computational biology*, vol. 15, no. 4, p. e1006936, 2019.

- [128] S. A. Becker and B. O. Palsson, "Context-specific metabolic networks are consistent with experiments," *PLoS computational biology*, vol. 4, no. 5, p. e1000082, 2008.
- [129] H. Zur, E. Ruppín, and T. Shlomi, "iMAT: an integrative metabolic analysis tool," *Bioinformatics*, vol. 26, no. 24, pp. 3140-3142, 2010.
- [130] R. Agren, S. Bordel, A. Mardinoglu, N. Pornputtpong, I. Nookaew, and J. Nielsen, "Reconstruction of genome-scale active metabolic networks for 69 human cell types and 16 cancer types using INIT," *PLoS computational biology*, vol. 8, no. 5, p. e1002518, 2012.
- [131] Y. Wang, J. A. Eddy, and N. D. Price, "Reconstruction of genome-scale metabolic models for 126 human tissues using mCADRE," *BMC systems biology*, vol. 6, no. 1, pp. 1-16, 2012.
- [132] N. Vlassis, M. P. Pacheco, and T. Sauter, "Fast reconstruction of compact context-specific metabolic network models," *PLoS computational biology*, vol. 10, no. 1, p. e1003424, 2014.
- [133] M. P. Pacheco *et al.*, "Integrated metabolic modelling reveals cell-type specific epigenetic control points of the macrophage metabolic network," *BMC genomics*, vol. 16, no. 1, pp. 1-24, 2015.
- [134] A. Schultz and A. A. Qutub, "Reconstruction of tissue-specific metabolic networks using CORDA," *PLoS computational biology*, vol. 12, no. 3, p. e1004808, 2016.
- [135] K. Yizhak *et al.*, "Phenotype-based cell-specific metabolic modeling reveals metabolic liabilities of cancer," *Elife*, vol. 3, p. e03641, 2014.
- [136] E. Motamedian, M. Mohammadi, S. A. Shojaosadati, and M. Heydari, "TRFBA: an algorithm to integrate genome-scale metabolic and transcriptional regulatory networks with incorporation of expression data," *Bioinformatics*, vol. 33, no. 7, pp. 1057-1063, 2017.
- [137] S. Opdam, A. Richelle, B. Kellman, S. Li, D. C. Zielinski, and N. E. Lewis, "A systematic evaluation of methods for tailoring genome-scale metabolic models," *Cell systems*, vol. 4, no. 3, pp. 318-329. e6, 2017.
- [138] C. J. Joshi, S.-M. Schinn, A. Richelle, I. Shamie, E. J. O'Rourke, and N. E. Lewis, "StanDep: Capturing transcriptomic variability improves context-specific metabolic models," *PLoS computational biology*, vol. 16, no. 5, p. e1007764, 2020.
- [139] M. P. Pacheco *et al.*, "Identifying and targeting cancer-specific metabolism with network-based drug target prediction," *EBioMedicine*, vol. 43, pp. 98-106, 2019.
- [140] F. Gatto, H. Miess, A. Schulze, and J. Nielsen, "Flux balance analysis predicts essential genes in clear cell renal cell carcinoma metabolism," *Scientific reports*, vol. 5, no. 1, p. 10738, 2015.
- [141] I. Apaolaza *et al.*, "An in-silico approach to predict and exploit synthetic lethality in cancer metabolism," *Nature communications*, vol. 8, no. 1, p. 459, 2017.
- [142] T. Shlomi, T. Benyamini, E. Gottlieb, R. Sharan, and E. Ruppín, "Genome-scale metabolic modeling elucidates the role of proliferative adaptation in causing the Warburg effect," *PLoS computational biology*, vol. 7, no. 3, p. e1002018, 2011.

- [143] A. Rezola, J. Pey, Á. Rubio, and F. J. Planes, "In-silico prediction of key metabolic differences between two non-small cell lung cancer subtypes," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, p. e103998, 2014.
- [144] C. Gille *et al.*, "HepatoNet1: a comprehensive metabolic reconstruction of the human hepatocyte for the analysis of liver physiology," *Molecular systems biology*, vol. 6, no. 1, p. 411, 2010.
- [145] A. Bordbar, A. M. Feist, R. Usaite-Black, J. Woodcock, B. O. Palsson, and I. Famili, "A multi-tissue type genome-scale metabolic network for analysis of whole-body systems physiology," *BMC systems biology*, vol. 5, pp. 1-17, 2011.
- [146] A. Mardinoglu, R. Agren, C. Kampf, A. Asplund, M. Uhlen, and J. Nielsen, "Genome-scale metabolic modelling of hepatocytes reveals serine deficiency in patients with non-alcoholic fatty liver disease," *Nature communications*, vol. 5, no. 1, p. 3083, 2014.
- [147] R. Heinrich and S. Schuster, *The regulation of cellular systems*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [148] J. V. C. Vieira, "Integrative pathway analysis approaches for cancer research and drug development," 2022.
- [149] S. Gudmundsson and I. Thiele, "Computationally efficient flux variability analysis," *BMC bioinformatics*, vol. 11, no. 1, pp. 1-3, 2010.
- [150] K. Jensen, V. Broeken, A. S. L. Hansen, N. Sonnenschein, and M. J. Herrgård, "OptCouple: joint simulation of gene knockouts, insertions and medium modifications for prediction of growth-coupled strain designs," *Metabolic engineering communications*, vol. 8, p. e00087, 2019.
- [151] R. Tarjan, "Depth-first search and linear graph algorithms," *SIAM journal on computing*, vol. 1, no. 2, pp. 146-160, 1972.
- [152] D. Machado and M. Herrgård, "Systematic evaluation of methods for integration of transcriptomic data into constraint-based models of metabolism," *PLoS computational biology*, vol. 10, no. 4, p. e1003580, 2014.
- [153] T. Hart, H. K. Komori, S. LaMere, K. Podshivalova, and D. R. Salomon, "Finding the active genes in deep RNA-seq gene expression studies," *BMC genomics*, vol. 14, pp. 1-7, 2013.
- [154] M. Dehghan Manshadi, P. Setoodeh, and H. Zare, "Rapid-SL identifies synthetic lethal sets with an arbitrary cardinality," *Scientific reports*, vol. 12, no. 1, pp. 1-9, 2022.
- [155] A. Bundy and L. Wallen, "Breadth-first search," in *Catalogue of artificial intelligence tools*: Springer, 1984, pp. 13-13.
- [156] N. R. Vempaty, V. Kumar, and R. E. Korf, "Depth-First Versus Best-First Search," in *AAAI*, 1991, pp. 434-440.
- [157] N. Jamshidi and B. Ø. Palsson, "Investigating the metabolic capabilities of Mycobacterium tuberculosis H37Rv using the in silico strain iNJ 661 and proposing alternative drug targets," *BMC systems biology*, vol. 1, no. 1, pp. 1-20, 2007.
- [158] O. Hädicke and S. Klamt, "EColiCore2: a reference network model of the central metabolism of Escherichia coli and relationships to its genome-scale parent model," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1-15, 2017.

- [159] J. D. Orth *et al.*, "A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism—2011," *Molecular systems biology*, vol. 7, no. 1, p. 535, 2011.
- [160] Y.-C. Liao *et al.*, "An experimentally validated genome-scale metabolic reconstruction of *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578, i YL1228," *Journal of bacteriology*, vol. 193, no. 7, pp. 1710-1717, 2011.
- [161] N. Chandra, "Computational approaches for drug target identification in pathogenic diseases," *Expert Opinion on Drug Discovery*, vol. 6, no. 10, pp. 975-979, 2011.
- [162] K. R. Choi, W. D. Jang, D. Yang, J. S. Cho, D. Park, and S. Y. Lee, "Systems metabolic engineering strategies: integrating systems and synthetic biology with metabolic engineering," *Trends in biotechnology*, vol. 37, no. 8, pp. 817-837, 2019.
- [163] M. A. Garcia-Albornoz and J. Nielsen, "Application of genome-scale metabolic models in metabolic engineering," *Industrial Biotechnology*, vol. 9, no. 4, pp. 203-214, 2013.
- [164] W. J. Kim, H. U. Kim, and S. Y. Lee, "Current state and applications of microbial genome-scale metabolic models," *Current Opinion in Systems Biology*, vol. 2, pp. 10-18, 2017.
- [165] H. M. Purdy and J. L. Reed, "Evaluating the capabilities of microbial chemical production using genome-scale metabolic models," *Current Opinion in Systems Biology*, vol. 2, pp. 91-97, 2017.
- [166] M. F. Cesur, B. Siraj, R. Uddin, S. Durmuş, and T. Çakır, "Network-based metabolism-centered screening of potential drug targets in *Klebsiella pneumoniae* at genome scale," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, p. 447, 2020.
- [167] L. Jerby and E. Ruppín, "Predicting drug targets and biomarkers of cancer via genome-scale metabolic modeling," *Clinical Cancer Research*, vol. 18, no. 20, pp. 5572-5584, 2012.
- [168] O. S. Mohite, T. Weber, H. U. Kim, and S. Y. Lee, "Genome-Scale Metabolic Reconstruction of Actinomycetes for Antibiotics Production," *Biotechnology Journal*, vol. 14, no. 1, p. 1800377, 2019.
- [169] T. Korcsmáros, M. S. Szalay, C. Böde, I. A. Kovács, and P. Csermely, "How to design multi-target drugs: target search options in cellular networks," *Expert opinion on drug discovery*, vol. 2, no. 6, pp. 799-808, 2007.
- [170] A. Talevi, "Multi-target pharmacology: possibilities and limitations of the "skeleton key approach" from a medicinal chemist perspective," *Frontiers in pharmacology*, p. 205, 2015.
- [171] G. R. Zimmermann, J. Lehar, and C. T. Keith, "Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts," *Drug discovery today*, vol. 12, no. 1-2, pp. 34-42, 2007.
- [172] L. A. Lewis, M. A. Perisin, and A. V. Tobias, "Metabolic Modeling of *Pseudomonas putida* to Understand and Improve the Breakdown of Plastic Waste," CCDC Army Research Laboratory Adelphi United States, 2020.
- [173] J. M. Monk *et al.*, "iML1515, a knowledgebase that computes *Escherichia coli* traits," *Nature biotechnology*, vol. 35, no. 10, pp. 904-908, 2017.

- [174] J. M. Monk *et al.*, "Genome-scale metabolic reconstructions of multiple *Escherichia coli* strains highlight strain-specific adaptations to nutritional environments," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, no. 50, pp. 20338-20343, 2013.
- [175] P. Charusanti *et al.*, "An experimentally-supported genome-scale metabolic network reconstruction for *Yersinia pestis* CO92," *BMC systems biology*, vol. 5, no. 1, pp. 1-13, 2011.
- [176] I. Letunic and P. Bork, "Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments," *Nucleic acids research*, vol. 47, no. W1, pp. W256-W259, 2019.
- [177] G. Cottarel and J. Wierzbowski, "Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy," *Trends in biotechnology*, vol. 25, no. 12, pp. 547-555, 2007.
- [178] W. G. Kaelin, "The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy," *Nature reviews cancer*, vol. 5, no. 9, pp. 689-698, 2005.
- [179] K. Klobucar and E. D. Brown, "Use of genetic and chemical synthetic lethality as probes of complexity in bacterial cell systems," *FEMS microbiology reviews*, vol. 42, no. 1, p. fux054, 2018.
- [180] M. Tyers and G. D. Wright, "Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 17, no. 3, pp. 141-155, 2019.
- [181] Y. Zhang, "Using Synthetic-Lethal Interactions to Discover Antibacterial Drug Targets," 2022.
- [182] M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, and J. J. Collins, "How antibiotics kill bacteria: from targets to networks," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, no. 6, pp. 423-435, 2010.
- [183] T. H. Cormen, C. E. Leiserson, R. L. Rivest, and C. Stein, "Greedy algorithms," *Introduction to algorithms*, vol. 1, pp. 329-355, 2001.
- [184] D. S. Wishart *et al.*, "DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018," *Nucleic acids research*, vol. 46, no. D1, pp. D1074-D1082, 2018.
- [185] M. Rahman, L. K. Jackson, W. E. Johnson, D. Y. Li, A. H. Bild, and S. R. Piccolo, "Alternative preprocessing of RNA-Sequencing data in The Cancer Genome Atlas leads to improved analysis results," *Bioinformatics*, vol. 31, no. 22, pp. 3666-3672, 2015.
- [186] N. Swainston *et al.*, "Recon 2.2: from reconstruction to model of human metabolism," *Metabolomics*, vol. 12, pp. 1-7, 2016.
- [187] Y. Wang *et al.*, "Amino acid transporter SLC38A3 promotes metastasis of non-small cell lung cancer cells by activating PDK1," *Cancer letters*, vol. 393, pp. 8-15, 2017.
- [188] K. Chan *et al.*, "Loss of function mutation of the Slc38a3 glutamine transporter reveals its critical role for amino acid metabolism in the liver, brain, and kidney," *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, vol. 468, pp. 213-227, 2016.
- [189] R.-F. Tian *et al.*, "SiRNA targeting PFK1 inhibits proliferation and migration and enhances radiosensitivity by suppressing glycolysis in colorectal

- cancer," *American journal of translational research*, vol. 12, no. 9, p. 4923, 2020.
- [190] Y. Feng *et al.*, "A20 targets PFKL and glycolysis to inhibit the progression of hepatocellular carcinoma," *Cell Death & Disease*, vol. 11, no. 2, p. 89, 2020.
- [191] K. Li, X. Zhu, and C. Yuan, "Inhibition of miR-185-3p Confers erlotinib resistance through upregulation of PFKL/MET in lung cancers," *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 9, p. 677860, 2021.
- [192] A. Perl, R. Hanczko, T. Telarico, Z. Oaks, and S. Landas, "Oxidative stress, inflammation and carcinogenesis are controlled through the pentose phosphate pathway by transaldolase," *Trends in molecular medicine*, vol. 17, no. 7, pp. 395-403, 2011.
- [193] C. R. Silvers, H. Miyamoto, E. M. Messing, G. J. Netto, and Y.-F. Lee, "Characterization of urinary extracellular vesicle proteins in muscle-invasive bladder cancer," *Oncotarget*, vol. 8, no. 53, p. 91199, 2017.
- [194] P. C. Heinrich, H. P. Morris, and G. Weber, "Behavior of transaldolase (EC 2.2. 1.2) and transketolase (EC 2.2. 1.1) activities in normal, neoplastic, differentiating, and regenerating liver," *Cancer Research*, vol. 36, no. 9_Part_1, pp. 3189-3197, 1976.
- [195] C. Wang *et al.*, "Identification of transaldolase as a novel serum biomarker for hepatocellular carcinoma metastasis using xenografted mouse model and clinic samples," *Cancer letters*, vol. 313, no. 2, pp. 154-166, 2011.
- [196] Y. Risha, V. Susevski, N. Hüttmann, S. Poolsup, Z. Minic, and M. V. Berezovski, "Breast cancer-derived microvesicles are the source of functional metabolic enzymes as potential targets for cancer therapy," *Biomedicines*, vol. 9, no. 2, p. 107, 2021.
- [197] Y. Ding *et al.*, "Synthetic lethality between HER2 and transaldolase in intrinsically resistant HER2-positive breast cancers," *Nature communications*, vol. 9, no. 1, p. 4274, 2018.
- [198] I. Sarfraz *et al.*, "6-Phosphogluconate dehydrogenase fuels multiple aspects of cancer cells: From cancer initiation to metastasis and chemoresistance," *BioFactors*, vol. 46, no. 4, pp. 550-562, 2020.
- [199] I. H. Polat *et al.*, "Oxidative pentose phosphate pathway enzyme 6-phosphogluconate dehydrogenase plays a key role in breast cancer metabolism," *Biology*, vol. 10, no. 2, p. 85, 2021.
- [200] X. Yang, X. Peng, and J. Huang, "Inhibiting 6-phosphogluconate dehydrogenase selectively targets breast cancer through AMPK activation," *Clinical and translational oncology*, vol. 20, pp. 1145-1152, 2018.
- [201] W. Zheng *et al.*, "Inhibition of 6-phosphogluconate dehydrogenase reverses cisplatin resistance in ovarian and lung cancer," *Frontiers in pharmacology*, vol. 8, p. 421, 2017.
- [202] G. B. Khan, M. Qasim, A. Rasul, U. A. Ashfaq, and A. M. Alnuqaydan, "Identification of Lignan Compounds as New 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Inhibitors for Lung Cancer," *Metabolites*, vol. 13, no. 1, p. 34, 2023.

- [203] A. H. Janneh and B. Ogretmen, "Targeting sphingolipid metabolism as a therapeutic strategy in cancer treatment," *Cancers*, vol. 14, no. 9, p. 2183, 2022.
- [204] M. Machala *et al.*, "Colon cancer and perturbations of the sphingolipid metabolism," *International journal of molecular sciences*, vol. 20, no. 23, p. 6051, 2019.
- [205] D. E. Modrak, D. V. Gold, and D. M. Goldenberg, "Sphingolipid targets in cancer therapy," *Molecular cancer therapeutics*, vol. 5, no. 2, pp. 200-208, 2006.
- [206] B. Ogretmen, "Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy," *Nature Reviews Cancer*, vol. 18, no. 1, pp. 33-50, 2018.
- [207] J. Shaw, P. Costa-Pinheiro, L. Patterson, K. Drews, S. Spiegel, and M. Kester, "Novel sphingolipid-based cancer therapeutics in the personalized medicine era," *Advances in cancer research*, vol. 140, pp. 327-366, 2018.
- [208] J.-P. Truman, M. García-Barros, L. M. Obeid, and Y. A. Hannun, "Evolving concepts in cancer therapy through targeting sphingolipid metabolism," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1841, no. 8, pp. 1174-1188, 2014.
- [209] H. Cheng *et al.*, "Nucleotide sugar transporter SLC35A2 is involved in promoting hepatocellular carcinoma metastasis by regulating cellular glycosylation," *Cellular Oncology*, vol. 46, no. 2, pp. 283-297, 2023.
- [210] S. Xu *et al.*, "Comprehensive analysis of 33 human cancers reveals clinical implications and immunotherapeutic value of the solute carrier family 35 member A2," *Frontiers in Immunology*, vol. 14, p. 1155182, 2023.
- [211] E. M. O'Day, G. E. Idos, C. Hill, J. W. Chen, and G. Wagner, "Cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase enhances invasion of human triple-negative breast cancer cells," *Oncotargets and therapy*, pp. 6827-6838, 2018.
- [212] M.-L. Ho *et al.*, "N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (GALNS), similar to glycodefin, is a potential general biomarker for multiple malignancies," *Anticancer Research*, vol. 39, no. 11, pp. 6317-6324, 2019.

پیوست‌ها

پیوست ۱- کد مربوط به روش Rapid-SL و شبیه کد مربوطه

با توجه به این که Rapid-SL از مجموعه‌ای از دستورات بر پایه نرم‌افزار متلب توسعه داده شده است، جهت کارآمدی بیشتر، توابع مربوطه در پایگاه داده GitHub به نشانی زیر قابل دسترس می‌باشد:

<https://github.com/CSBLaboratory/RapidSL>

شبه کد مربوطه به شرح زیر می‌باشد:

a) *SearchWithinSeedspace*:

1: **function** SearchWithinSeedspace (*model*, *maxCardinality*, *SeedSpace*, *Cutoff*, *grRate*)

2: **Input:** *model*: metabolic model,

maxCardinality: maximum cardinality for this level

SeedSpace: seed space of the *model*

Cutoff: the cut off threshold for lethality

grRate: the growth rate corresponding to the *model*

3: **Output:** lethal sets, non-lethal sets and the growth rate corresponding to non-lethal sets of the *model*

4: Identify *Candidates* **##** The list of single reactions that should be removed from the mutant

5: Initialize *lethals* and *nonLethals* **##** Each is an empty list

5: **for** *i* = 1 : *maxCardinality*

6: **for** *j* = 1 : the number of cases in *Candidates*

7: Compute *mutantStrain* **##** The upper and lower bounds of all reactions in set *Candidates(i)* are set to zero

6: *grRate* = FBA (*mutantStrain*) **##** It returns the maximum growth rate related to the mutant strain

```

7:  if grRate < Cutoff
8:    Add Candidates(i) to lethals
9:  else
10:   Add Candidates(i) to non-lethals
11: Update Candidates  ## Update the list of reaction sets that should be removed
    in the next iteration
12: Identify trivialSolution      ## The list of Candidates that are supersets of the
    identified lethal sets
13: Candidates = Candidates – (Candidates ∩ trivialSolution)
14: end of for
16: end of for
17: Return lethals, nonLethals

```

b) *RapidSL*

```

1: function RapidSL (model, maxCardinality, Cutoff, eliList)
2:   Input: model: metabolic model,
           maxCardinality: maximum cardinality for this level.
           Cutoff: the cut off threshold for lethality.
           eliList: the set of all reactions that should be excluded from the
lethality analysis.
3:   Output: Synthetic lethal sets of the strain
## The next four lines defines the first step and calculates the SeedSpace and grRate
4: grRate = FBA (model)      ## It returns the maximum growth rate related to
    the mutant strain.
5: Flux = FBA (model, grRate)  ## It returns the taxicab solution corresponding

```

to *grRate*.

6: Identify *Jnz* ## The list of reactions with non-zero fluxes in the strain.

7: $SeedSpace = Jnz \cap eliList$

8: Run *SearchWithinSeedSpace* (*model*, *maxCardinality*, *SeedSpace*, *Cutoff*, *grRate*) to get *Lethals* and *non-Lethals*

9: **if** stopping conditions are met

10: define *SLs* as an empty variable

11: **else**

12: Identify *mutantStrains* ## the upper and lower bounds of all reactions in *set* are changed to zero

13: **for** *set* in *nonLethals*:

14: Run *RapidSL* (*model*, *maxCardinality*, *Cutoff*, *eliList*) to obtain *SLs* ## Branching of the Depth first search algorithm

15: **end** of **for**

16: $SLs = SLs \cup Lethals$

17: Return *SLs*

پیوست ۲-اهداف دارویی انتخابی شناسایی شده در فصل پنجم

با توجه به تعدد پاسخ‌های بدست آمده و همچنین تعداد زیاد موارد بررسی شده، جهت سهولت در استفاده، نتایج بدست آمده در پایگاه داده GitHub بارگذاری شده است که از طریق لینک زیر قابل دسترسی می‌باشند.

نتایج مربوط به گام چهارم:

https://github.com/CSBLaboratory/SelectiveDrugTargets/blob/main/Supplementary_data/Supp_Data_S1.xlsx

نتایج مربوط به گام پنجم:

https://github.com/CSBLaboratory/SelectiveDrugTargets/blob/main/Supplementary_data/Supp_Data_S2.xlsx

پیوست ۳- تعداد پاسخ‌های شناسایی شده در گام چهارم و پنجم

در این پیوست، تعداد راه حل‌ها برای ۶۶۵ کیس مورد مطالعه که در مراحل چهارم و پنجم یافت شده‌اند گزارش شده است. در این پیوست از اختصارهای زیر استفاده شده است:

T: میکروارگانسیم هدف

N: میکروارگانسیم لحاظ نشده

C: میکروارگانسیم حفاظت شده

جدول پ- ۱- تعداد راه حل‌های شناسایی شده در گام چهارم و پنجم

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYL1228 | iJNT463 | iML1515 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 1 | T | T | T | T | T | T | 31 | 196 | 731 | 1033 | 31 | 196 | 731 | 1033 |
| Case 2 | T | T | T | T | T | N | 50 | 198 | 756 | 1115 | 50 | 198 | 756 | 1115 |
| Case 3 | T | T | T | T | T | C | 19 | 2 | 25 | 82 | 19 | 0 | 1 | 31 |
| Case 4 | T | T | T | T | N | T | 31 | 210 | 784 | 1590 | 31 | 210 | 784 | 1590 |
| Case 5 | T | T | T | T | N | N | 50 | 212 | 809 | 1674 | 50 | 212 | 809 | 1674 |
| Case 6 | T | T | T | T | N | C | 19 | 2 | 25 | 84 | 19 | 0 | 1 | 31 |
| Case 7 | T | T | T | T | C | T | 0 | 14 | 53 | 581 | 0 | 0 | 7 | 3 |
| Case 8 | T | T | T | T | C | N | 0 | 14 | 53 | 583 | 0 | 0 | 7 | 3 |
| Case 9 | T | T | T | T | C | C | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 10 | T | T | T | N | T | T | 31 | 196 | 731 | 1021 | 31 | 196 | 731 | 1021 |
| Case 11 | T | T | T | N | T | N | 51 | 198 | 756 | 1103 | 51 | 198 | 756 | 1103 |
| Case 12 | T | T | T | N | T | C | 20 | 2 | 25 | 82 | 20 | 0 | 1 | 31 |
| Case 13 | T | T | T | N | N | T | 31 | 210 | 784 | 1578 | 31 | 210 | 784 | 1578 |
| Case 14 | T | T | T | N | N | N | 51 | 212 | 811 | 1676 | 51 | 212 | 811 | 1676 |
| Case 15 | T | T | T | N | N | C | 20 | 2 | 27 | 98 | 20 | 0 | 1 | 34 |
| Case 16 | T | T | T | N | C | T | 0 | 14 | 53 | 581 | 0 | 0 | 7 | 3 |
| Case 17 | T | T | T | N | C | N | 0 | 14 | 53 | 583 | 0 | 0 | 7 | 3 |
| Case 18 | T | T | T | N | C | C | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--|--------|--------|--------|---|--------|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 19 | T | T | T | C | T | T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 20 | T | T | T | C | T | N | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 21 | T | T | T | C | T | C | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 22 | T | T | T | C | N | T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 23 | T | T | T | C | N | N | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 24 | T | T | T | C | N | C | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 25 | T | T | T | C | C | T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 26 | T | T | T | C | C | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 27 | T | T | T | C | C | C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 28 | T | T | N | T | T | T | 34 | 209 | 780 | 1253 | 34 | 209 | 780 | 1253 |
| Case 29 | T | T | N | T | T | N | 53 | 211 | 805 | 1337 | 53 | 211 | 805 | 1337 |
| Case 30 | T | T | N | T | T | C | 19 | 2 | 25 | 84 | 19 | 0 | 1 | 33 |
| Case 31 | T | T | N | T | N | T | 68 | 126 | 221 | 261 | 68 | 126 | 221 | 261 |
| Case 32 | T | T | N | T | N | N | 88 | 128 | 246 | 282 | 88 | 128 | 246 | 282 |
| Case 33 | T | T | N | T | N | C | 20 | 2 | 25 | 21 | 20 | 0 | 1 | 0 |
| Case 34 | T | T | N | T | C | T | 34 | 70 | 141 | 113 | 34 | 25 | 17 | 27 |
| Case 35 | T | T | N | T | C | N | 35 | 70 | 141 | 113 | 35 | 25 | 17 | 27 |
| Case 36 | T | T | N | T | C | C | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 37 | T | T | N | N | T | T | 34 | 209 | 783 | 1246 | 34 | 209 | 783 | 1246 |
| Case 38 | T | T | N | N | T | N | 54 | 212 | 806 | 1338 | 54 | 212 | 806 | 1338 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 39 | T | T | N | N | T | C | 20 | 3 | 24 | 95 | 20 | 1 | 0 | 43 |
| Case 40 | T | T | N | N | N | T | 68 | 128 | 237 | 248 | 68 | 128 | 237 | 248 |
| Case 41 | T | T | N | N | N | N | 89 | 134 | 291 | 299 | 89 | 134 | 291 | 299 |
| Case 42 | T | T | N | N | N | C | 21 | 6 | 46 | 51 | 21 | 1 | 2 | 18 |
| Case 43 | T | T | N | N | C | T | 34 | 72 | 152 | 113 | 34 | 27 | 28 | 16 |
| Case 44 | T | T | N | N | C | N | 35 | 72 | 155 | 118 | 35 | 27 | 31 | 18 |
| Case 45 | T | T | N | N | C | C | 1 | 0 | 3 | 5 | 1 | 0 | 2 | 2 |
| Case 46 | T | T | N | C | T | T | 0 | 0 | 2 | 7 | 0 | 0 | 1 | 7 |
| Case 47 | T | T | N | C | T | N | 1 | 1 | 1 | 13 | 1 | 1 | 1 | 13 |
| Case 48 | T | T | N | C | T | C | 1 | 1 | 0 | 9 | 1 | 1 | 0 | 8 |
| Case 49 | T | T | N | C | N | T | 0 | 2 | 15 | 18 | 0 | 2 | 14 | 18 |
| Case 50 | T | T | N | C | N | N | 1 | 4 | 19 | 29 | 1 | 3 | 17 | 29 |
| Case 51 | T | T | N | C | N | C | 1 | 2 | 5 | 14 | 1 | 1 | 2 | 13 |
| Case 52 | T | T | N | C | C | T | 0 | 2 | 13 | 12 | 0 | 2 | 13 | 1 |
| Case 53 | T | T | N | C | C | N | 0 | 2 | 16 | 17 | 0 | 2 | 16 | 3 |
| Case 54 | T | T | N | C | C | C | 0 | 0 | 3 | 5 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Case 55 | T | T | C | T | T | T | 3 | 16 | 49 | 234 | 3 | 12 | 27 | 16 |
| Case 56 | T | T | C | T | T | N | 3 | 16 | 49 | 236 | 3 | 12 | 27 | 18 |
| Case 57 | T | T | C | T | T | C | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 58 | T | T | C | T | N | T | 37 | 72 | 144 | 133 | 37 | 25 | 61 | 41 |
| Case 59 | T | T | C | T | N | N | 38 | 72 | 144 | 133 | 38 | 25 | 61 | 41 |
| Case 60 | T | T | C | T | N | C | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 61 | T | T | C | T | C | T | 34 | 70 | 138 | 109 | 34 | 24 | 11 | 9 |
| Case 62 | T | T | C | T | C | N | 35 | 70 | 138 | 109 | 35 | 24 | 11 | 9 |
| Case 63 | T | T | C | T | C | C | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 64 | T | T | C | N | T | T | 3 | 16 | 52 | 240 | 3 | 12 | 28 | 22 |
| Case 65 | T | T | C | N | T | N | 3 | 17 | 51 | 248 | 3 | 13 | 28 | 30 |
| Case 66 | T | T | C | N | T | C | 0 | 1 | 0 | 11 | 0 | 1 | 0 | 10 |
| Case 67 | T | T | C | N | N | T | 37 | 74 | 158 | 136 | 37 | 25 | 63 | 56 |
| Case 68 | T | T | C | N | N | N | 38 | 75 | 160 | 147 | 38 | 26 | 66 | 65 |
| Case 69 | T | T | C | N | N | C | 1 | 1 | 3 | 14 | 1 | 1 | 2 | 11 |
| Case 70 | T | T | C | N | C | T | 34 | 72 | 149 | 109 | 34 | 24 | 12 | 10 |
| Case 71 | T | T | C | N | C | N | 35 | 72 | 152 | 114 | 35 | 24 | 15 | 11 |
| Case 72 | T | T | C | N | C | C | 1 | 0 | 3 | 5 | 1 | 0 | 2 | 1 |
| Case 73 | T | T | C | C | T | T | 0 | 0 | 2 | 7 | 0 | 0 | 1 | 7 |
| Case 74 | T | T | C | C | T | N | 0 | 1 | 1 | 13 | 0 | 1 | 1 | 13 |
| Case 75 | T | T | C | C | T | C | 0 | 1 | 0 | 9 | 0 | 1 | 0 | 8 |
| Case 76 | T | T | C | C | N | T | 0 | 2 | 15 | 18 | 0 | 0 | 2 | 18 |
| Case 77 | T | T | C | C | N | N | 0 | 3 | 17 | 29 | 0 | 1 | 5 | 27 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 78 | T | T | C | C | N | C | 0 | 1 | 3 | 14 | 0 | 1 | 2 | 11 |
| Case 79 | T | T | C | C | C | T | 0 | 2 | 13 | 12 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Case 80 | T | T | C | C | C | N | 0 | 2 | 16 | 17 | 0 | 0 | 4 | 2 |
| Case 81 | T | T | C | C | C | C | 0 | 0 | 3 | 5 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| Case 82 | T | N | T | T | T | T | 48 | 183 | 778 | 1374 | 48 | 183 | 778 | 1374 |
| Case 83 | T | N | T | T | T | N | 69 | 183 | 818 | 1586 | 69 | 183 | 818 | 1586 |
| Case 84 | T | N | T | T | T | C | 21 | 0 | 42 | 212 | 21 | 0 | 23 | 110 |
| Case 85 | T | N | T | T | N | T | 49 | 197 | 863 | 1943 | 49 | 197 | 863 | 1943 |
| Case 86 | T | N | T | T | N | N | 70 | 197 | 907 | 2174 | 70 | 197 | 907 | 2174 |
| Case 87 | T | N | T | T | N | C | 21 | 0 | 46 | 231 | 21 | 0 | 24 | 121 |
| Case 88 | T | N | T | T | C | T | 1 | 14 | 85 | 629 | 0 | 0 | 7 | 3 |
| Case 89 | T | N | T | T | C | N | 1 | 14 | 89 | 648 | 0 | 0 | 7 | 3 |
| Case 90 | T | N | T | T | C | C | 0 | 0 | 4 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 91 | T | N | T | N | T | T | 48 | 183 | 783 | 1374 | 48 | 183 | 783 | 1374 |
| Case 92 | T | N | T | N | T | N | 70 | 183 | 823 | 1586 | 70 | 183 | 823 | 1586 |
| Case 93 | T | N | T | N | T | C | 22 | 0 | 42 | 212 | 22 | 0 | 23 | 110 |
| Case 94 | T | N | T | N | N | T | 49 | 197 | 868 | 1943 | 49 | 197 | 868 | 1943 |
| Case 95 | T | N | T | N | N | N | 71 | 197 | 912 | 2174 | 71 | 197 | 912 | 2174 |
| Case 96 | T | N | T | N | N | C | 22 | 0 | 46 | 231 | 22 | 0 | 24 | 121 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 97 | T | N | T | N | C | T | 1 | 14 | 85 | 629 | 0 | 0 | 7 | 3 |
| Case 98 | T | N | T | N | C | N | 1 | 14 | 89 | 648 | 0 | 0 | 7 | 3 |
| Case 99 | T | N | T | N | C | C | 0 | 0 | 4 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 100 | T | N | T | C | T | T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 101 | T | N | T | C | T | N | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 102 | T | N | T | C | T | C | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 103 | T | N | T | C | N | T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 104 | T | N | T | C | N | N | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 105 | T | N | T | C | N | C | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 106 | T | N | T | C | C | T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 107 | T | N | T | C | C | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 108 | T | N | T | C | C | C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 109 | T | N | N | T | T | T | 53 | 191 | 855 | 1625 | 53 | 191 | 855 | 1625 |
| Case 110 | T | N | N | T | T | N | 74 | 191 | 899 | 1855 | 74 | 191 | 899 | 1855 |
| Case 111 | T | N | N | T | T | C | 21 | 1 | 44 | 230 | 21 | 1 | 25 | 118 |
| Case 112 | T | N | N | T | N | T | 98 | 57 | 121 | 230 | 98 | 57 | 121 | 230 |
| Case 113 | T | N | N | T | N | N | 125 | 64 | 133 | 266 | 125 | 64 | 133 | 266 |
| Case 114 | T | N | N | T | N | C | 27 | 8 | 12 | 36 | 25 | 8 | 12 | 36 |
| Case 115 | T | N | N | T | C | T | 45 | 23 | 58 | 90 | 44 | 17 | 15 | 42 |
| Case 116 | T | N | N | T | C | N | 51 | 30 | 65 | 118 | 50 | 24 | 20 | 51 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 117 | T | N | N | T | C | C | 6 | 7 | 7 | 28 | 4 | 7 | 5 | 9 |
| Case 118 | T | N | N | N | T | T | 53 | 192 | 867 | 1641 | 53 | 192 | 867 | 1641 |
| Case 119 | T | N | N | N | T | N | 75 | 193 | 909 | 1879 | 75 | 193 | 909 | 1879 |
| Case 120 | T | N | N | N | T | C | 22 | 2 | 43 | 241 | 22 | 2 | 24 | 128 |
| Case 121 | T | N | N | N | N | T | 99 | 60 | 149 | 267 | 99 | 60 | 149 | 267 |
| Case 122 | T | N | N | N | N | N | 132 | 95 | 236 | 363 | 132 | 95 | 236 | 363 |
| Case 123 | T | N | N | N | N | C | 33 | 27 | 61 | 91 | 30 | 15 | 27 | 90 |
| Case 124 | T | N | N | N | C | T | 46 | 26 | 70 | 97 | 45 | 20 | 27 | 32 |
| Case 125 | T | N | N | N | C | N | 54 | 39 | 95 | 169 | 52 | 33 | 45 | 69 |
| Case 126 | T | N | N | N | C | C | 8 | 13 | 25 | 72 | 5 | 13 | 16 | 37 |
| Case 127 | T | N | N | C | T | T | 0 | 0 | 14 | 24 | 0 | 0 | 7 | 18 |
| Case 128 | T | N | N | C | T | N | 1 | 1 | 13 | 30 | 1 | 1 | 7 | 24 |
| Case 129 | T | N | N | C | T | C | 1 | 1 | 0 | 9 | 1 | 1 | 0 | 8 |
| Case 130 | T | N | N | C | N | T | 1 | 3 | 29 | 40 | 1 | 3 | 22 | 34 |
| Case 131 | T | N | N | C | N | N | 4 | 14 | 46 | 90 | 3 | 10 | 40 | 84 |
| Case 132 | T | N | N | C | N | C | 3 | 11 | 18 | 53 | 2 | 7 | 16 | 52 |
| Case 133 | T | N | N | C | C | T | 1 | 3 | 15 | 19 | 1 | 3 | 15 | 2 |
| Case 134 | T | N | N | C | C | N | 3 | 9 | 33 | 63 | 2 | 9 | 28 | 30 |
| Case 135 | T | N | N | C | C | C | 2 | 6 | 18 | 44 | 1 | 6 | 11 | 28 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 136 | T | N | C | T | T | T | 5 | 16 | 79 | 274 | 5 | 13 | 28 | 29 |
| Case 137 | T | N | C | T | T | N | 5 | 16 | 83 | 292 | 5 | 13 | 31 | 37 |
| Case 138 | T | N | C | T | T | C | 0 | 1 | 4 | 18 | 0 | 1 | 3 | 8 |
| Case 139 | T | N | C | T | N | T | 49 | 25 | 59 | 100 | 49 | 16 | 27 | 53 |
| Case 140 | T | N | C | T | N | N | 55 | 32 | 66 | 127 | 55 | 23 | 30 | 66 |
| Case 141 | T | N | C | T | N | C | 6 | 8 | 7 | 27 | 4 | 8 | 3 | 13 |
| Case 142 | T | N | C | T | C | T | 44 | 23 | 55 | 86 | 44 | 14 | 8 | 19 |
| Case 143 | T | N | C | T | C | N | 50 | 30 | 62 | 113 | 50 | 21 | 11 | 24 |
| Case 144 | T | N | C | T | C | C | 6 | 7 | 7 | 27 | 4 | 7 | 3 | 5 |
| Case 145 | T | N | C | N | T | T | 5 | 17 | 92 | 291 | 5 | 14 | 31 | 38 |
| Case 146 | T | N | C | N | T | N | 5 | 18 | 95 | 315 | 5 | 15 | 34 | 52 |
| Case 147 | T | N | C | N | T | C | 0 | 2 | 4 | 27 | 0 | 2 | 3 | 16 |
| Case 148 | T | N | C | N | N | T | 50 | 28 | 84 | 119 | 50 | 16 | 33 | 76 |
| Case 149 | T | N | C | N | N | N | 58 | 42 | 108 | 196 | 57 | 30 | 49 | 121 |
| Case 150 | T | N | C | N | N | C | 8 | 15 | 25 | 80 | 5 | 15 | 14 | 47 |
| Case 151 | T | N | C | N | C | T | 45 | 26 | 67 | 93 | 45 | 14 | 11 | 21 |
| Case 152 | T | N | C | N | C | N | 53 | 39 | 92 | 164 | 52 | 27 | 24 | 45 |
| Case 153 | T | N | C | N | C | C | 8 | 13 | 25 | 71 | 5 | 13 | 11 | 24 |
| Case 154 | T | N | C | C | T | T | 0 | 0 | 14 | 24 | 0 | 0 | 3 | 14 |
| Case 155 | T | N | C | C | T | N | 0 | 1 | 13 | 30 | 0 | 1 | 3 | 20 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 156 | T | N | C | C | T | C | 0 | 1 | 0 | 9 | 0 | 1 | 0 | 8 |
| Case 157 | T | N | C | C | N | T | 1 | 3 | 29 | 40 | 1 | 0 | 6 | 30 |
| Case 158 | T | N | C | C | N | N | 3 | 10 | 46 | 90 | 2 | 7 | 19 | 62 |
| Case 159 | T | N | C | C | N | C | 2 | 7 | 18 | 53 | 1 | 7 | 11 | 34 |
| Case 160 | T | N | C | C | C | T | 1 | 3 | 15 | 19 | 1 | 0 | 3 | 2 |
| Case 161 | T | N | C | C | C | N | 3 | 9 | 33 | 63 | 2 | 6 | 13 | 21 |
| Case 162 | T | N | C | C | C | C | 2 | 6 | 18 | 44 | 1 | 6 | 8 | 19 |
| Case 163 | T | C | T | T | T | T | 17 | 8 | 76 | 377 | 9 | 5 | 31 | 16 |
| Case 164 | T | C | T | T | T | N | 19 | 8 | 115 | 528 | 11 | 5 | 31 | 35 |
| Case 165 | T | C | T | T | T | C | 2 | 0 | 41 | 151 | 2 | 0 | 1 | 17 |
| Case 166 | T | C | T | T | N | T | 18 | 8 | 108 | 389 | 9 | 5 | 49 | 28 |
| Case 167 | T | C | T | T | N | N | 20 | 8 | 151 | 557 | 11 | 5 | 49 | 50 |
| Case 168 | T | C | T | T | N | C | 2 | 0 | 45 | 168 | 2 | 0 | 1 | 20 |
| Case 169 | T | C | T | T | C | T | 1 | 0 | 32 | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 170 | T | C | T | T | C | N | 1 | 0 | 36 | 65 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 171 | T | C | T | T | C | C | 0 | 0 | 4 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 172 | T | C | T | N | T | T | 17 | 8 | 76 | 383 | 9 | 5 | 31 | 19 |
| Case 173 | T | C | T | N | T | N | 19 | 8 | 115 | 534 | 11 | 5 | 31 | 38 |
| Case 174 | T | C | T | N | T | C | 2 | 0 | 41 | 151 | 2 | 0 | 1 | 17 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 175 | T | C | T | N | N | T | 18 | 8 | 108 | 395 | 9 | 5 | 49 | 31 |
| Case 176 | T | C | T | N | N | N | 20 | 8 | 151 | 563 | 11 | 5 | 49 | 53 |
| Case 177 | T | C | T | N | N | C | 2 | 0 | 45 | 168 | 2 | 0 | 1 | 20 |
| Case 178 | T | C | T | N | C | T | 1 | 0 | 32 | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 179 | T | C | T | N | C | N | 1 | 0 | 36 | 65 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 180 | T | C | T | N | C | C | 0 | 0 | 4 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 181 | T | C | T | C | T | T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 182 | T | C | T | C | T | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 183 | T | C | T | C | T | C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 184 | T | C | T | C | N | T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 185 | T | C | T | C | N | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 186 | T | C | T | C | N | C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 187 | T | C | T | C | C | T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 188 | T | C | T | C | C | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 189 | T | C | T | C | C | C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 190 | T | C | N | T | T | T | 19 | 9 | 108 | 423 | 11 | 7 | 35 | 18 |
| Case 191 | T | C | N | T | T | N | 21 | 9 | 151 | 590 | 13 | 7 | 35 | 39 |
| Case 192 | T | C | N | T | T | C | 2 | 1 | 43 | 167 | 2 | 1 | 0 | 19 |
| Case 193 | T | C | N | T | N | T | 30 | 14 | 20 | 68 | 21 | 10 | 10 | 28 |
| Case 194 | T | C | N | T | N | N | 37 | 21 | 31 | 104 | 28 | 11 | 10 | 28 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 195 | T | C | N | T | N | C | 7 | 8 | 11 | 36 | 5 | 2 | 0 | 0 |
| Case 196 | T | C | N | T | C | T | 11 | 7 | 4 | 25 | 10 | 5 | 1 | 14 |
| Case 197 | T | C | N | T | C | N | 16 | 14 | 11 | 53 | 15 | 6 | 1 | 14 |
| Case 198 | T | C | N | T | C | C | 5 | 7 | 7 | 28 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| Case 199 | T | C | N | N | T | T | 19 | 9 | 120 | 434 | 11 | 7 | 37 | 23 |
| Case 200 | T | C | N | N | T | N | 21 | 9 | 163 | 601 | 13 | 7 | 37 | 44 |
| Case 201 | T | C | N | N | T | C | 2 | 1 | 43 | 167 | 2 | 1 | 0 | 19 |
| Case 202 | T | C | N | N | N | T | 31 | 15 | 33 | 89 | 22 | 10 | 14 | 37 |
| Case 203 | T | C | N | N | N | N | 42 | 36 | 77 | 164 | 31 | 16 | 35 | 55 |
| Case 204 | T | C | N | N | N | C | 11 | 20 | 39 | 75 | 7 | 4 | 12 | 18 |
| Case 205 | T | C | N | N | C | T | 12 | 8 | 5 | 33 | 11 | 5 | 3 | 16 |
| Case 206 | T | C | N | N | C | N | 19 | 21 | 27 | 100 | 16 | 8 | 11 | 29 |
| Case 207 | T | C | N | N | C | C | 7 | 13 | 22 | 67 | 3 | 3 | 8 | 13 |
| Case 208 | T | C | N | C | T | T | 0 | 0 | 12 | 7 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Case 209 | T | C | N | C | T | N | 0 | 0 | 12 | 7 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Case 210 | T | C | N | C | T | C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 211 | T | C | N | C | N | T | 1 | 1 | 14 | 13 | 1 | 0 | 4 | 2 |
| Case 212 | T | C | N | C | N | N | 3 | 7 | 29 | 52 | 1 | 2 | 16 | 20 |
| Case 213 | T | C | N | C | N | C | 2 | 6 | 15 | 39 | 0 | 2 | 12 | 18 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 214 | T | C | N | C | C | T | 1 | 1 | 2 | 8 | 1 | 0 | 2 | 2 |
| Case 215 | T | C | N | C | C | N | 3 | 7 | 17 | 47 | 1 | 2 | 10 | 15 |
| Case 216 | T | C | N | C | C | C | 2 | 6 | 15 | 39 | 0 | 2 | 8 | 13 |
| Case 217 | T | C | C | T | T | T | 2 | 2 | 35 | 55 | 2 | 2 | 5 | 0 |
| Case 218 | T | C | C | T | T | N | 2 | 2 | 39 | 71 | 2 | 2 | 5 | 2 |
| Case 219 | T | C | C | T | T | C | 0 | 1 | 4 | 16 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| Case 220 | T | C | C | T | N | T | 12 | 9 | 7 | 30 | 12 | 5 | 4 | 10 |
| Case 221 | T | C | C | T | N | N | 17 | 16 | 14 | 57 | 17 | 6 | 4 | 10 |
| Case 222 | T | C | C | T | N | C | 5 | 8 | 7 | 27 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| Case 223 | T | C | C | T | C | T | 10 | 7 | 4 | 25 | 10 | 3 | 1 | 9 |
| Case 224 | T | C | C | T | C | N | 15 | 14 | 11 | 52 | 15 | 4 | 1 | 9 |
| Case 225 | T | C | C | T | C | C | 5 | 7 | 7 | 27 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| Case 226 | T | C | C | N | T | T | 2 | 2 | 47 | 60 | 2 | 2 | 7 | 2 |
| Case 227 | T | C | C | N | T | N | 2 | 2 | 51 | 76 | 2 | 2 | 7 | 4 |
| Case 228 | T | C | C | N | T | C | 0 | 1 | 4 | 16 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| Case 229 | T | C | C | N | N | T | 13 | 10 | 20 | 41 | 13 | 5 | 8 | 12 |
| Case 230 | T | C | C | N | N | N | 20 | 23 | 42 | 107 | 18 | 8 | 15 | 20 |
| Case 231 | T | C | C | N | N | C | 7 | 14 | 22 | 66 | 3 | 4 | 7 | 8 |
| Case 232 | T | C | C | N | C | T | 11 | 8 | 5 | 33 | 11 | 3 | 3 | 11 |
| Case 233 | T | C | C | N | C | N | 18 | 21 | 27 | 99 | 16 | 6 | 8 | 19 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 234 | T | C | C | N | C | C | 7 | 13 | 22 | 66 | 3 | 3 | 5 | 8 |
| Case 235 | T | C | C | C | T | T | 0 | 0 | 12 | 7 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Case 236 | T | C | C | C | T | N | 0 | 0 | 12 | 7 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Case 237 | T | C | C | C | T | C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 238 | T | C | C | C | N | T | 1 | 1 | 14 | 13 | 1 | 0 | 4 | 2 |
| Case 239 | T | C | C | C | N | N | 3 | 7 | 29 | 52 | 1 | 2 | 11 | 10 |
| Case 240 | T | C | C | C | N | C | 2 | 6 | 15 | 39 | 0 | 2 | 7 | 8 |
| Case 241 | T | C | C | C | C | T | 1 | 1 | 2 | 8 | 1 | 0 | 2 | 2 |
| Case 242 | T | C | C | C | C | N | 3 | 7 | 17 | 47 | 1 | 2 | 7 | 10 |
| Case 243 | T | C | C | C | C | C | 2 | 6 | 15 | 39 | 0 | 2 | 5 | 8 |
| Case 244 | N | T | T | T | T | T | 55 | 195 | 710 | 982 | 55 | 195 | 710 | 982 |
| Case 245 | N | T | T | T | T | N | 88 | 195 | 747 | 1068 | 88 | 195 | 747 | 1068 |
| Case 246 | N | T | T | T | T | C | 33 | 4 | 25 | 82 | 33 | 0 | 1 | 31 |
| Case 247 | N | T | T | T | N | T | 59 | 211 | 764 | 1541 | 59 | 211 | 764 | 1541 |
| Case 248 | N | T | T | T | N | N | 92 | 211 | 801 | 1629 | 92 | 211 | 801 | 1629 |
| Case 249 | N | T | T | T | N | C | 33 | 4 | 25 | 84 | 33 | 0 | 1 | 31 |
| Case 250 | N | T | T | T | C | T | 4 | 16 | 54 | 583 | 4 | 2 | 8 | 5 |
| Case 251 | N | T | T | T | C | N | 4 | 16 | 54 | 585 | 4 | 2 | 8 | 5 |
| Case 252 | N | T | T | T | C | C | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 253 | N | T | T | N | T | T | 55 | 195 | 710 | 954 | 55 | 195 | 710 | 954 |
| Case 254 | N | T | T | N | T | N | 114 | 231 | 802 | 1057 | 114 | 231 | 802 | 1057 |
| Case 255 | N | T | T | N | T | C | 59 | 40 | 80 | 99 | 48 | 6 | 1 | 31 |
| Case 256 | N | T | T | N | N | T | 59 | 211 | 768 | 1516 | 59 | 211 | 768 | 1516 |
| Case 257 | N | T | T | N | N | N | 119 | 247 | 907 | 1716 | 119 | 247 | 907 | 1716 |
| Case 258 | N | T | T | N | N | C | 60 | 40 | 127 | 184 | 48 | 6 | 7 | 34 |
| Case 259 | N | T | T | N | C | T | 4 | 16 | 58 | 586 | 4 | 2 | 12 | 7 |
| Case 260 | N | T | T | N | C | N | 5 | 17 | 88 | 643 | 5 | 3 | 36 | 9 |
| Case 261 | N | T | T | N | C | C | 1 | 1 | 30 | 57 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 262 | N | T | T | C | T | T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 263 | N | T | T | C | T | N | 26 | 36 | 49 | 15 | 16 | 11 | 0 | 0 |
| Case 264 | N | T | T | C | T | C | 26 | 36 | 49 | 15 | 15 | 6 | 0 | 0 |
| Case 265 | N | T | T | C | N | T | 0 | 0 | 4 | 3 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Case 266 | N | T | T | C | N | N | 27 | 36 | 95 | 61 | 16 | 11 | 11 | 0 |
| Case 267 | N | T | T | C | N | C | 27 | 36 | 91 | 58 | 15 | 6 | 3 | 0 |
| Case 268 | N | T | T | C | C | T | 0 | 0 | 4 | 3 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Case 269 | N | T | T | C | C | N | 1 | 1 | 34 | 58 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Case 270 | N | T | T | C | C | C | 1 | 1 | 30 | 55 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 271 | N | T | N | T | T | T | 58 | 208 | 759 | 1201 | 58 | 208 | 759 | 1201 |
| Case 272 | N | T | N | T | T | N | 91 | 208 | 796 | 1289 | 91 | 208 | 796 | 1289 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 273 | N | T | N | T | T | C | 33 | 4 | 25 | 84 | 33 | 0 | 1 | 33 |
| Case 274 | N | T | N | T | N | T | 102 | 130 | 198 | 196 | 102 | 130 | 198 | 196 |
| Case 275 | N | T | N | T | N | N | 143 | 145 | 237 | 230 | 143 | 145 | 237 | 230 |
| Case 276 | N | T | N | T | N | C | 41 | 19 | 25 | 30 | 41 | 13 | 1 | 8 |
| Case 277 | N | T | N | T | C | T | 44 | 75 | 143 | 102 | 44 | 30 | 17 | 22 |
| Case 278 | N | T | N | T | C | N | 52 | 90 | 143 | 109 | 52 | 42 | 17 | 29 |
| Case 279 | N | T | N | T | C | C | 8 | 15 | 0 | 7 | 8 | 10 | 0 | 6 |
| Case 280 | N | T | N | N | T | T | 58 | 208 | 765 | 1181 | 58 | 208 | 765 | 1181 |
| Case 281 | N | T | N | N | T | N | 133 | 222 | 846 | 1311 | 133 | 222 | 846 | 1311 |
| Case 282 | N | T | N | N | T | C | 75 | 18 | 70 | 129 | 51 | 7 | 2 | 50 |
| Case 283 | N | T | N | N | N | T | 103 | 128 | 221 | 149 | 103 | 128 | 221 | 149 |
| Case 284 | N | T | N | N | N | N | 294 | 209 | 394 | 576 | 294 | 209 | 394 | 576 |
| Case 285 | N | T | N | N | N | C | 191 | 104 | 232 | 322 | 97 | 25 | 34 | 22 |
| Case 286 | N | T | N | N | C | T | 45 | 77 | 162 | 89 | 45 | 32 | 28 | 25 |
| Case 287 | N | T | N | N | C | N | 158 | 155 | 279 | 297 | 99 | 53 | 48 | 53 |
| Case 288 | N | T | N | N | C | C | 113 | 88 | 175 | 247 | 41 | 21 | 25 | 14 |
| Case 289 | N | T | N | C | T | T | 0 | 0 | 5 | 13 | 0 | 0 | 4 | 13 |
| Case 290 | N | T | N | C | T | N | 42 | 14 | 44 | 51 | 19 | 9 | 6 | 33 |
| Case 291 | N | T | N | C | T | C | 42 | 14 | 40 | 41 | 18 | 7 | 2 | 15 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 292 | N | T | N | C | N | T | 1 | 2 | 22 | 31 | 1 | 2 | 21 | 31 |
| Case 293 | N | T | N | C | N | N | 151 | 92 | 204 | 260 | 63 | 29 | 58 | 65 |
| Case 294 | N | T | N | C | N | C | 150 | 92 | 201 | 257 | 56 | 24 | 32 | 18 |
| Case 295 | N | T | N | C | C | T | 1 | 2 | 21 | 27 | 1 | 2 | 13 | 15 |
| Case 296 | N | T | N | C | C | N | 106 | 85 | 178 | 247 | 39 | 23 | 33 | 47 |
| Case 297 | N | T | N | C | C | C | 105 | 85 | 175 | 245 | 33 | 20 | 25 | 13 |
| Case 298 | N | T | C | T | T | T | 3 | 16 | 49 | 235 | 3 | 12 | 27 | 17 |
| Case 299 | N | T | C | T | T | N | 3 | 16 | 49 | 237 | 3 | 12 | 27 | 19 |
| Case 300 | N | T | C | T | T | C | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Case 301 | N | T | C | T | N | T | 43 | 77 | 146 | 124 | 43 | 30 | 61 | 38 |
| Case 302 | N | T | C | T | N | N | 51 | 92 | 146 | 131 | 51 | 45 | 61 | 45 |
| Case 303 | N | T | C | T | N | C | 8 | 15 | 0 | 7 | 8 | 13 | 0 | 6 |
| Case 304 | N | T | C | T | C | T | 40 | 75 | 140 | 99 | 40 | 29 | 11 | 6 |
| Case 305 | N | T | C | T | C | N | 48 | 90 | 140 | 106 | 48 | 41 | 11 | 13 |
| Case 306 | N | T | C | T | C | C | 8 | 15 | 0 | 7 | 8 | 10 | 0 | 6 |
| Case 307 | N | T | C | N | T | T | 3 | 16 | 55 | 244 | 3 | 12 | 31 | 26 |
| Case 308 | N | T | C | N | T | N | 18 | 18 | 57 | 269 | 18 | 13 | 34 | 48 |
| Case 309 | N | T | C | N | T | C | 15 | 2 | 3 | 28 | 3 | 1 | 2 | 17 |
| Case 310 | N | T | C | N | N | T | 44 | 79 | 167 | 112 | 44 | 30 | 70 | 43 |
| Case 311 | N | T | C | N | N | N | 171 | 159 | 286 | 319 | 109 | 55 | 101 | 72 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 312 | N | T | C | N | N | C | 127 | 90 | 175 | 249 | 41 | 22 | 31 | 19 |
| Case 313 | N | T | C | N | C | T | 41 | 77 | 159 | 89 | 41 | 29 | 12 | 21 |
| Case 314 | N | T | C | N | C | N | 153 | 155 | 279 | 297 | 89 | 52 | 46 | 51 |
| Case 315 | N | T | C | N | C | C | 112 | 88 | 175 | 247 | 36 | 20 | 25 | 14 |
| Case 316 | N | T | C | C | T | T | 0 | 0 | 5 | 13 | 0 | 0 | 4 | 13 |
| Case 317 | N | T | C | C | T | N | 15 | 2 | 7 | 36 | 3 | 1 | 6 | 33 |
| Case 318 | N | T | C | C | T | C | 15 | 2 | 3 | 26 | 3 | 1 | 2 | 15 |
| Case 319 | N | T | C | C | N | T | 1 | 2 | 22 | 31 | 1 | 0 | 9 | 31 |
| Case 320 | N | T | C | C | N | N | 120 | 87 | 178 | 250 | 39 | 24 | 47 | 61 |
| Case 321 | N | T | C | C | N | C | 119 | 87 | 175 | 247 | 33 | 21 | 29 | 18 |
| Case 322 | N | T | C | C | C | T | 1 | 2 | 21 | 27 | 1 | 0 | 1 | 15 |
| Case 323 | N | T | C | C | C | N | 105 | 85 | 178 | 247 | 34 | 22 | 33 | 47 |
| Case 324 | N | T | C | C | C | C | 104 | 85 | 175 | 245 | 28 | 19 | 25 | 13 |
| Case 325 | N | N | T | T | T | T | 77 | 182 | 751 | 1323 | 77 | 182 | 751 | 1323 |
| Case 326 | N | N | T | T | T | N | 116 | 177 | 791 | 1535 | 116 | 177 | 791 | 1535 |
| Case 327 | N | N | T | T | T | C | 39 | 0 | 42 | 212 | 39 | 0 | 23 | 110 |
| Case 328 | N | N | T | T | N | T | 86 | 198 | 837 | 1897 | 86 | 198 | 837 | 1897 |
| Case 329 | N | N | T | T | N | N | 126 | 192 | 884 | 2125 | 126 | 192 | 884 | 2125 |
| Case 330 | N | N | T | T | N | C | 40 | 0 | 46 | 231 | 40 | 0 | 24 | 121 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 331 | N | N | T | T | C | T | 9 | 16 | 86 | 631 | 8 | 2 | 8 | 5 |
| Case 332 | N | N | T | T | C | N | 10 | 16 | 90 | 650 | 9 | 2 | 8 | 5 |
| Case 333 | N | N | T | T | C | C | 1 | 0 | 4 | 19 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 334 | N | N | T | N | T | T | 77 | 182 | 756 | 1331 | 77 | 182 | 756 | 1331 |
| Case 335 | N | N | T | N | T | N | 148 | 231 | 887 | 1594 | 148 | 231 | 887 | 1594 |
| Case 336 | N | N | T | N | T | C | 71 | 54 | 133 | 263 | 58 | 6 | 23 | 110 |
| Case 337 | N | N | T | N | N | T | 86 | 198 | 846 | 1908 | 86 | 198 | 846 | 1908 |
| Case 338 | N | N | T | N | N | N | 160 | 253 | 1057 | 2343 | 160 | 253 | 1057 | 2343 |
| Case 339 | N | N | T | N | N | C | 74 | 61 | 211 | 440 | 60 | 12 | 32 | 121 |
| Case 340 | N | N | T | N | C | T | 9 | 16 | 90 | 634 | 8 | 2 | 12 | 7 |
| Case 341 | N | N | T | N | C | N | 12 | 18 | 166 | 825 | 11 | 4 | 74 | 46 |
| Case 342 | N | N | T | N | C | C | 3 | 2 | 76 | 191 | 2 | 1 | 2 | 0 |
| Case 343 | N | N | T | C | T | T | 0 | 0 | 0 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 344 | N | N | T | C | T | N | 32 | 54 | 85 | 73 | 20 | 11 | 0 | 0 |
| Case 345 | N | N | T | C | T | C | 32 | 54 | 85 | 49 | 19 | 6 | 0 | 0 |
| Case 346 | N | N | T | C | N | T | 0 | 0 | 4 | 27 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Case 347 | N | N | T | C | N | N | 34 | 57 | 157 | 236 | 21 | 14 | 6 | 1 |
| Case 348 | N | N | T | C | N | C | 34 | 57 | 153 | 209 | 20 | 8 | 2 | 0 |
| Case 349 | N | N | T | C | C | T | 0 | 0 | 4 | 3 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Case 350 | N | N | T | C | C | N | 2 | 2 | 76 | 175 | 1 | 1 | 6 | 1 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 351 | N | N | T | C | C | C | 2 | 2 | 72 | 172 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| Case 352 | N | N | N | T | T | T | 82 | 190 | 836 | 1562 | 82 | 190 | 836 | 1562 |
| Case 353 | N | N | N | T | T | N | 121 | 185 | 883 | 1792 | 121 | 185 | 883 | 1792 |
| Case 354 | N | N | N | T | T | C | 39 | 1 | 44 | 230 | 39 | 1 | 25 | 118 |
| Case 355 | N | N | N | T | N | T | 149 | 62 | 88 | 151 | 149 | 62 | 88 | 151 |
| Case 356 | N | N | N | T | N | N | 233 | 82 | 115 | 211 | 233 | 82 | 115 | 211 |
| Case 357 | N | N | N | T | N | C | 84 | 24 | 22 | 53 | 58 | 21 | 17 | 42 |
| Case 358 | N | N | N | T | C | T | 67 | 31 | 58 | 73 | 66 | 25 | 14 | 35 |
| Case 359 | N | N | N | T | C | N | 112 | 54 | 70 | 108 | 95 | 44 | 23 | 51 |
| Case 360 | N | N | N | T | C | C | 45 | 23 | 12 | 35 | 17 | 17 | 9 | 15 |
| Case 361 | N | N | N | N | T | T | 82 | 193 | 845 | 1541 | 82 | 193 | 845 | 1541 |
| Case 362 | N | N | N | N | T | N | 172 | 204 | 977 | 1893 | 172 | 204 | 977 | 1893 |
| Case 363 | N | N | N | N | T | C | 90 | 17 | 130 | 342 | 61 | 8 | 29 | 152 |
| Case 364 | N | N | N | N | N | T | 156 | 73 | 122 | 165 | 156 | 73 | 122 | 165 |
| Case 365 | N | N | N | N | C | T | 74 | 39 | 82 | 106 | 70 | 33 | 24 | 66 |
| Case 366 | N | N | N | C | T | T | 0 | 2 | 15 | 20 | 0 | 2 | 12 | 20 |
| Case 367 | N | N | N | C | T | N | 51 | 18 | 95 | 119 | 23 | 11 | 17 | 63 |
| Case 368 | N | N | N | C | T | C | 51 | 16 | 81 | 102 | 22 | 7 | 5 | 32 |
| Case 369 | N | N | N | C | N | T | 7 | 11 | 33 | 82 | 5 | 11 | 32 | 82 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 370 | N | N | N | C | C | T | 7 | 9 | 29 | 73 | 4 | 9 | 15 | 43 |
| Case 371 | N | N | C | T | T | T | 5 | 16 | 85 | 291 | 5 | 13 | 34 | 38 |
| Case 372 | N | N | C | T | T | N | 5 | 16 | 89 | 309 | 5 | 13 | 37 | 46 |
| Case 373 | N | N | C | T | T | C | 0 | 1 | 4 | 18 | 0 | 1 | 3 | 8 |
| Case 374 | N | N | C | T | N | T | 63 | 33 | 58 | 101 | 62 | 24 | 26 | 58 |
| Case 375 | N | N | C | T | N | N | 107 | 56 | 70 | 135 | 95 | 46 | 34 | 78 |
| Case 376 | N | N | C | T | N | C | 44 | 24 | 12 | 34 | 17 | 21 | 8 | 19 |
| Case 377 | N | N | C | T | C | T | 58 | 31 | 55 | 70 | 57 | 22 | 7 | 15 |
| Case 378 | N | N | C | T | C | N | 102 | 54 | 67 | 104 | 85 | 41 | 14 | 27 |
| Case 379 | N | N | C | T | C | C | 44 | 23 | 12 | 34 | 16 | 17 | 7 | 11 |
| Case 380 | N | N | C | N | T | T | 5 | 19 | 97 | 288 | 5 | 16 | 46 | 45 |
| Case 381 | N | N | C | N | T | N | 23 | 21 | 108 | 350 | 23 | 17 | 57 | 94 |
| Case 382 | N | N | C | N | T | C | 18 | 3 | 12 | 71 | 3 | 2 | 8 | 40 |
| Case 383 | N | N | C | N | N | T | 70 | 43 | 83 | 121 | 67 | 31 | 42 | 103 |
| Case 384 | N | N | C | N | C | T | 65 | 39 | 79 | 106 | 61 | 27 | 8 | 56 |
| Case 385 | N | N | C | C | T | T | 0 | 2 | 15 | 20 | 0 | 2 | 12 | 20 |
| Case 386 | N | N | C | C | T | N | 18 | 4 | 22 | 70 | 3 | 3 | 17 | 63 |
| Case 387 | N | N | C | C | T | C | 18 | 2 | 8 | 53 | 3 | 1 | 5 | 32 |
| Case 388 | N | N | C | C | N | T | 7 | 11 | 33 | 82 | 5 | 8 | 20 | 80 |
| Case 389 | N | N | C | C | C | T | 7 | 9 | 29 | 73 | 4 | 6 | 3 | 41 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 390 | N | C | T | T | T | T | 22 | 9 | 70 | 377 | 10 | 5 | 31 | 16 |
| Case 391 | N | C | T | T | T | N | 27 | 8 | 109 | 528 | 12 | 5 | 31 | 35 |
| Case 392 | N | C | T | T | T | C | 5 | 0 | 41 | 151 | 2 | 0 | 1 | 17 |
| Case 393 | N | C | T | T | N | T | 27 | 9 | 102 | 390 | 11 | 5 | 49 | 28 |
| Case 394 | N | C | T | T | N | N | 33 | 7 | 146 | 557 | 14 | 4 | 49 | 50 |
| Case 395 | N | C | T | T | N | C | 6 | 0 | 45 | 168 | 3 | 0 | 1 | 20 |
| Case 396 | N | C | T | T | C | T | 5 | 0 | 32 | 48 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 397 | N | C | T | T | C | N | 6 | 0 | 36 | 65 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Case 398 | N | C | T | T | C | C | 1 | 0 | 4 | 17 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 399 | N | C | T | N | T | T | 22 | 9 | 70 | 407 | 10 | 5 | 31 | 19 |
| Case 400 | N | C | T | N | T | N | 33 | 27 | 145 | 592 | 17 | 5 | 31 | 38 |
| Case 401 | N | C | T | N | T | C | 11 | 19 | 77 | 185 | 5 | 0 | 1 | 17 |
| Case 402 | N | C | T | N | N | T | 27 | 9 | 102 | 420 | 11 | 5 | 49 | 31 |
| Case 403 | N | C | T | N | N | N | 40 | 32 | 226 | 736 | 20 | 7 | 52 | 53 |
| Case 404 | N | C | T | N | N | C | 13 | 25 | 126 | 319 | 7 | 2 | 4 | 20 |
| Case 405 | N | C | T | N | C | T | 5 | 0 | 32 | 48 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 406 | N | C | T | N | C | N | 7 | 1 | 78 | 182 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Case 407 | N | C | T | N | C | C | 2 | 1 | 46 | 134 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Case 408 | N | C | T | C | T | T | 0 | 0 | 0 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 409 | N | C | T | C | T | N | 6 | 19 | 36 | 58 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Case 410 | N | C | T | C | T | C | 6 | 19 | 36 | 34 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Case 411 | N | C | T | C | N | T | 0 | 0 | 0 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 412 | N | C | T | C | N | N | 7 | 21 | 78 | 175 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| Case 413 | N | C | T | C | N | C | 7 | 21 | 78 | 151 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| Case 414 | N | C | T | C | C | T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 415 | N | C | T | C | C | N | 1 | 1 | 42 | 117 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 416 | N | C | T | C | C | C | 1 | 1 | 42 | 117 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 417 | N | C | N | T | T | T | 24 | 10 | 110 | 410 | 12 | 7 | 35 | 22 |
| Case 418 | N | C | N | T | T | N | 29 | 9 | 154 | 577 | 14 | 7 | 35 | 43 |
| Case 419 | N | C | N | T | T | C | 5 | 1 | 43 | 167 | 2 | 1 | 0 | 19 |
| Case 420 | N | C | N | T | N | T | 47 | 20 | 14 | 50 | 27 | 14 | 6 | 26 |
| Case 421 | N | C | N | T | N | N | 89 | 29 | 30 | 83 | 38 | 14 | 6 | 26 |
| Case 422 | N | C | N | T | N | C | 42 | 11 | 16 | 34 | 9 | 2 | 0 | 0 |
| Case 423 | N | C | N | T | C | T | 23 | 12 | 3 | 19 | 15 | 9 | 0 | 12 |
| Case 424 | N | C | N | T | C | N | 60 | 22 | 15 | 47 | 23 | 10 | 0 | 12 |
| Case 425 | N | C | N | T | C | C | 37 | 10 | 12 | 28 | 6 | 1 | 0 | 0 |
| Case 426 | N | C | N | N | T | T | 24 | 12 | 115 | 404 | 12 | 7 | 41 | 23 |
| Case 427 | N | C | N | N | T | N | 38 | 14 | 200 | 643 | 19 | 7 | 44 | 59 |
| Case 428 | N | C | N | N | T | C | 14 | 4 | 84 | 227 | 5 | 1 | 3 | 31 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 429 | N | C | N | N | N | T | 53 | 28 | 25 | 97 | 31 | 18 | 20 | 46 |
| Case 430 | N | C | N | N | C | T | 29 | 18 | 10 | 66 | 18 | 13 | 2 | 21 |
| Case 431 | N | C | N | C | T | T | 0 | 2 | 9 | 2 | 0 | 0 | 6 | 2 |
| Case 432 | N | C | N | C | T | N | 9 | 5 | 50 | 56 | 3 | 0 | 9 | 17 |
| Case 433 | N | C | N | C | T | C | 9 | 3 | 41 | 54 | 3 | 0 | 3 | 12 |
| Case 434 | N | C | N | C | N | T | 6 | 9 | 10 | 47 | 4 | 5 | 8 | 13 |
| Case 435 | N | C | N | C | C | T | 6 | 7 | 8 | 47 | 3 | 5 | 2 | 9 |
| Case 436 | N | C | C | T | T | T | 2 | 2 | 41 | 70 | 2 | 2 | 5 | 4 |
| Case 437 | N | C | C | T | T | N | 2 | 2 | 45 | 86 | 2 | 2 | 5 | 6 |
| Case 438 | N | C | C | T | T | C | 0 | 1 | 4 | 16 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| Case 439 | N | C | C | T | N | T | 20 | 14 | 5 | 39 | 15 | 9 | 0 | 12 |
| Case 440 | N | C | C | T | N | N | 56 | 24 | 17 | 66 | 23 | 10 | 0 | 12 |
| Case 441 | N | C | C | T | N | C | 36 | 11 | 12 | 27 | 6 | 2 | 0 | 0 |
| Case 442 | N | C | C | T | C | T | 18 | 12 | 3 | 19 | 13 | 7 | 0 | 8 |
| Case 443 | N | C | C | T | C | N | 54 | 22 | 15 | 46 | 20 | 8 | 0 | 8 |
| Case 444 | N | C | C | T | C | C | 36 | 10 | 12 | 27 | 5 | 1 | 0 | 0 |
| Case 445 | N | C | C | N | T | T | 2 | 4 | 48 | 58 | 2 | 2 | 11 | 2 |
| Case 446 | N | C | C | N | T | N | 5 | 4 | 57 | 88 | 2 | 2 | 14 | 19 |
| Case 447 | N | C | C | N | T | C | 3 | 1 | 9 | 36 | 0 | 1 | 3 | 14 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 448 | N | C | C | N | N | T | 26 | 22 | 12 | 72 | 19 | 13 | 8 | 20 |
| Case 449 | N | C | C | N | C | T | 24 | 18 | 10 | 66 | 16 | 11 | 2 | 16 |
| Case 450 | N | C | C | C | T | T | 0 | 2 | 9 | 2 | 0 | 0 | 6 | 2 |
| Case 451 | N | C | C | C | T | N | 3 | 2 | 14 | 22 | 0 | 0 | 9 | 17 |
| Case 452 | N | C | C | C | T | C | 3 | 0 | 5 | 20 | 0 | 0 | 3 | 12 |
| Case 453 | N | C | C | C | N | T | 6 | 9 | 10 | 47 | 4 | 5 | 8 | 12 |
| Case 454 | N | C | C | C | C | T | 6 | 7 | 8 | 47 | 3 | 5 | 2 | 8 |
| Case 455 | C | T | T | T | T | T | 19 | 5 | 0 | 17 | 19 | 3 | 0 | 17 |
| Case 456 | C | T | T | T | T | N | 33 | 3 | 4 | 17 | 33 | 2 | 0 | 17 |
| Case 457 | C | T | T | T | T | C | 14 | 2 | 0 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 |
| Case 458 | C | T | T | T | N | T | 23 | 7 | 1 | 19 | 23 | 5 | 1 | 18 |
| Case 459 | C | T | T | T | N | N | 37 | 5 | 5 | 19 | 37 | 4 | 1 | 18 |
| Case 460 | C | T | T | T | N | C | 14 | 2 | 0 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 |
| Case 461 | C | T | T | T | C | T | 4 | 2 | 1 | 2 | 4 | 2 | 1 | 1 |
| Case 462 | C | T | T | T | C | N | 4 | 2 | 1 | 2 | 4 | 2 | 1 | 1 |
| Case 463 | C | T | T | T | C | C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 464 | C | T | T | N | T | T | 19 | 5 | 0 | 1 | 19 | 3 | 0 | 1 |
| Case 465 | C | T | T | N | T | N | 58 | 39 | 53 | 16 | 48 | 10 | 0 | 1 |
| Case 466 | C | T | T | N | T | C | 39 | 38 | 49 | 15 | 28 | 6 | 0 | 0 |
| Case 467 | C | T | T | N | N | T | 23 | 7 | 5 | 6 | 23 | 5 | 5 | 2 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 468 | C | T | T | N | N | N | 63 | 41 | 86 | 96 | 52 | 12 | 7 | 2 |
| Case 469 | C | T | T | N | N | C | 40 | 38 | 77 | 86 | 28 | 6 | 0 | 0 |
| Case 470 | C | T | T | N | C | T | 4 | 2 | 5 | 5 | 4 | 2 | 5 | 1 |
| Case 471 | C | T | T | N | C | N | 5 | 3 | 35 | 60 | 4 | 2 | 5 | 1 |
| Case 472 | C | T | T | N | C | C | 1 | 1 | 30 | 55 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 473 | C | T | T | C | T | T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 474 | C | T | T | C | T | N | 25 | 36 | 49 | 15 | 15 | 8 | 0 | 0 |
| Case 475 | C | T | T | C | T | C | 25 | 36 | 49 | 15 | 14 | 6 | 0 | 0 |
| Case 476 | C | T | T | C | N | T | 0 | 0 | 4 | 3 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Case 477 | C | T | T | C | N | N | 26 | 36 | 79 | 61 | 15 | 8 | 4 | 0 |
| Case 478 | C | T | T | C | N | C | 26 | 36 | 75 | 58 | 14 | 6 | 0 | 0 |
| Case 479 | C | T | T | C | C | T | 0 | 0 | 4 | 3 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Case 480 | C | T | T | C | C | N | 1 | 1 | 34 | 58 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Case 481 | C | T | T | C | C | C | 1 | 1 | 30 | 55 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 482 | C | T | N | T | T | T | 19 | 5 | 0 | 18 | 19 | 3 | 0 | 18 |
| Case 483 | C | T | N | T | T | N | 33 | 3 | 4 | 18 | 33 | 2 | 0 | 18 |
| Case 484 | C | T | N | T | T | C | 14 | 2 | 0 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 |
| Case 485 | C | T | N | T | N | T | 29 | 9 | 3 | 21 | 29 | 5 | 0 | 21 |
| Case 486 | C | T | N | T | N | N | 50 | 22 | 7 | 28 | 50 | 17 | 0 | 28 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 487 | C | T | N | T | N | C | 21 | 17 | 0 | 7 | 21 | 13 | 0 | 6 |
| Case 488 | C | T | N | T | C | T | 10 | 4 | 3 | 3 | 10 | 2 | 0 | 0 |
| Case 489 | C | T | N | T | C | N | 17 | 19 | 3 | 10 | 17 | 12 | 0 | 7 |
| Case 490 | C | T | N | T | C | C | 7 | 15 | 0 | 7 | 7 | 10 | 0 | 6 |
| Case 491 | C | T | N | N | T | T | 19 | 5 | 3 | 9 | 19 | 3 | 3 | 9 |
| Case 492 | C | T | N | N | T | N | 74 | 16 | 47 | 41 | 51 | 10 | 5 | 23 |
| Case 493 | C | T | N | N | T | C | 55 | 15 | 40 | 32 | 31 | 6 | 2 | 7 |
| Case 494 | C | T | N | N | N | T | 30 | 9 | 11 | 27 | 30 | 5 | 8 | 27 |
| Case 495 | C | T | N | N | N | N | 200 | 99 | 186 | 326 | 119 | 30 | 49 | 38 |
| Case 496 | C | T | N | N | N | C | 170 | 96 | 177 | 277 | 76 | 24 | 27 | 18 |
| Case 497 | C | T | N | N | C | T | 11 | 4 | 11 | 26 | 11 | 2 | 0 | 14 |
| Case 498 | C | T | N | N | C | N | 123 | 90 | 180 | 248 | 58 | 23 | 37 | 25 |
| Case 499 | C | T | N | N | C | C | 112 | 88 | 175 | 247 | 40 | 21 | 25 | 14 |
| Case 500 | C | T | N | C | T | T | 0 | 0 | 3 | 8 | 0 | 0 | 3 | 8 |
| Case 501 | C | T | N | C | T | N | 41 | 13 | 43 | 40 | 18 | 8 | 5 | 22 |
| Case 502 | C | T | N | C | T | C | 41 | 13 | 40 | 32 | 17 | 6 | 2 | 7 |
| Case 503 | C | T | N | C | N | T | 1 | 0 | 8 | 26 | 1 | 0 | 8 | 26 |
| Case 504 | C | T | N | C | N | N | 150 | 91 | 177 | 248 | 62 | 27 | 37 | 28 |
| Case 505 | C | T | N | C | N | C | 149 | 91 | 175 | 247 | 55 | 23 | 27 | 17 |
| Case 506 | C | T | N | C | C | T | 1 | 0 | 8 | 26 | 1 | 0 | 0 | 14 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 507 | C | T | N | C | C | N | 106 | 85 | 177 | 246 | 39 | 22 | 32 | 19 |
| Case 508 | C | T | N | C | C | C | 105 | 85 | 175 | 245 | 33 | 20 | 25 | 13 |
| Case 509 | C | T | C | T | T | T | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Case 510 | C | T | C | T | T | N | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Case 511 | C | T | C | T | T | C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 512 | C | T | C | T | N | T | 6 | 4 | 3 | 4 | 6 | 2 | 0 | 4 |
| Case 513 | C | T | C | T | N | N | 13 | 19 | 3 | 11 | 13 | 15 | 0 | 11 |
| Case 514 | C | T | C | T | N | C | 7 | 15 | 0 | 7 | 7 | 13 | 0 | 6 |
| Case 515 | C | T | C | T | C | T | 6 | 4 | 3 | 3 | 6 | 2 | 0 | 0 |
| Case 516 | C | T | C | T | C | N | 13 | 19 | 3 | 10 | 13 | 12 | 0 | 7 |
| Case 517 | C | T | C | T | C | C | 7 | 15 | 0 | 7 | 7 | 10 | 0 | 6 |
| Case 518 | C | T | C | N | T | T | 0 | 0 | 3 | 8 | 0 | 0 | 3 | 8 |
| Case 519 | C | T | C | N | T | N | 15 | 1 | 6 | 25 | 3 | 0 | 5 | 22 |
| Case 520 | C | T | C | N | T | C | 15 | 1 | 3 | 17 | 3 | 0 | 2 | 7 |
| Case 521 | C | T | C | N | N | T | 7 | 4 | 11 | 26 | 7 | 2 | 8 | 26 |
| Case 522 | C | T | C | N | N | N | 133 | 91 | 180 | 250 | 54 | 23 | 41 | 32 |
| Case 523 | C | T | C | N | N | C | 126 | 89 | 175 | 249 | 40 | 21 | 27 | 18 |
| Case 524 | C | T | C | N | C | T | 7 | 4 | 11 | 26 | 7 | 2 | 0 | 14 |
| Case 525 | C | T | C | N | C | N | 118 | 90 | 180 | 248 | 49 | 22 | 35 | 23 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 526 | C | T | C | N | C | C | 111 | 88 | 175 | 247 | 35 | 20 | 25 | 14 |
| Case 527 | C | T | C | C | T | T | 0 | 0 | 3 | 8 | 0 | 0 | 3 | 8 |
| Case 528 | C | T | C | C | T | N | 15 | 1 | 6 | 25 | 3 | 0 | 5 | 22 |
| Case 529 | C | T | C | C | T | C | 15 | 1 | 3 | 17 | 3 | 0 | 2 | 7 |
| Case 530 | C | T | C | C | N | T | 1 | 0 | 8 | 26 | 1 | 0 | 8 | 26 |
| Case 531 | C | T | C | C | N | N | 120 | 86 | 177 | 248 | 39 | 22 | 37 | 28 |
| Case 532 | C | T | C | C | N | C | 119 | 86 | 175 | 247 | 33 | 20 | 27 | 17 |
| Case 533 | C | T | C | C | C | T | 1 | 0 | 8 | 26 | 1 | 0 | 0 | 14 |
| Case 534 | C | T | C | C | C | N | 105 | 85 | 177 | 246 | 34 | 21 | 32 | 19 |
| Case 535 | C | T | C | C | C | C | 104 | 85 | 175 | 245 | 28 | 19 | 25 | 13 |
| Case 536 | C | N | T | T | T | T | 22 | 5 | 0 | 17 | 22 | 4 | 0 | 17 |
| Case 537 | C | N | T | T | T | N | 40 | 0 | 0 | 17 | 40 | 0 | 0 | 17 |
| Case 538 | C | N | T | T | T | C | 18 | 0 | 0 | 0 | 18 | 0 | 0 | 0 |
| Case 539 | C | N | T | T | N | T | 30 | 7 | 1 | 19 | 30 | 6 | 1 | 18 |
| Case 540 | C | N | T | T | N | N | 49 | 2 | 1 | 19 | 49 | 2 | 1 | 18 |
| Case 541 | C | N | T | T | N | C | 19 | 0 | 0 | 0 | 19 | 0 | 0 | 0 |
| Case 542 | C | N | T | T | C | T | 8 | 2 | 1 | 2 | 8 | 2 | 1 | 1 |
| Case 543 | C | N | T | T | C | N | 9 | 2 | 1 | 2 | 9 | 2 | 1 | 1 |
| Case 544 | C | N | T | T | C | C | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 545 | C | N | T | N | T | T | 22 | 5 | 0 | 1 | 22 | 4 | 0 | 1 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 546 | C | N | T | N | T | N | 71 | 54 | 85 | 50 | 59 | 8 | 0 | 1 |
| Case 547 | C | N | T | N | T | C | 49 | 54 | 85 | 49 | 36 | 6 | 0 | 0 |
| Case 548 | C | N | T | N | N | T | 30 | 7 | 5 | 6 | 30 | 6 | 5 | 2 |
| Case 549 | C | N | T | N | N | N | 82 | 60 | 158 | 215 | 69 | 14 | 7 | 3 |
| Case 550 | C | N | T | N | N | C | 52 | 58 | 153 | 209 | 38 | 9 | 2 | 0 |
| Case 551 | C | N | T | N | C | T | 8 | 2 | 5 | 5 | 8 | 2 | 5 | 1 |
| Case 552 | C | N | T | N | C | N | 11 | 4 | 77 | 177 | 10 | 3 | 7 | 2 |
| Case 553 | C | N | T | N | C | C | 3 | 2 | 72 | 172 | 2 | 1 | 2 | 0 |
| Case 554 | C | N | T | C | T | T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 555 | C | N | T | C | T | N | 31 | 54 | 85 | 49 | 19 | 8 | 0 | 0 |
| Case 556 | C | N | T | C | T | C | 31 | 54 | 85 | 49 | 18 | 6 | 0 | 0 |
| Case 557 | C | N | T | C | N | T | 0 | 0 | 4 | 3 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Case 558 | C | N | T | C | N | N | 33 | 56 | 157 | 212 | 20 | 10 | 6 | 1 |
| Case 559 | C | N | T | C | N | C | 33 | 56 | 153 | 209 | 19 | 7 | 2 | 0 |
| Case 560 | C | N | T | C | C | T | 0 | 0 | 4 | 3 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Case 561 | C | N | T | C | C | N | 2 | 2 | 76 | 175 | 1 | 1 | 6 | 1 |
| Case 562 | C | N | T | C | C | C | 2 | 2 | 72 | 172 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| Case 563 | C | N | N | T | T | T | 22 | 5 | 4 | 25 | 22 | 4 | 0 | 25 |
| Case 564 | C | N | N | T | T | N | 40 | 0 | 4 | 25 | 40 | 0 | 0 | 25 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 565 | C | N | N | T | T | C | 18 | 0 | 0 | 0 | 18 | 0 | 0 | 0 |
| Case 566 | C | N | N | T | N | T | 44 | 12 | 4 | 30 | 44 | 11 | 1 | 29 |
| Case 567 | C | N | N | T | N | N | 101 | 23 | 9 | 37 | 80 | 22 | 6 | 36 |
| Case 568 | C | N | N | T | N | C | 57 | 16 | 5 | 7 | 31 | 13 | 5 | 6 |
| Case 569 | C | N | N | T | C | T | 22 | 7 | 4 | 5 | 22 | 7 | 0 | 0 |
| Case 570 | C | N | N | T | C | N | 61 | 23 | 9 | 12 | 40 | 19 | 4 | 7 |
| Case 571 | C | N | N | T | C | C | 39 | 16 | 5 | 7 | 13 | 10 | 4 | 6 |
| Case 572 | C | N | N | N | T | T | 22 | 5 | 12 | 12 | 22 | 4 | 8 | 12 |
| Case 573 | C | N | N | N | T | N | 90 | 15 | 93 | 126 | 62 | 8 | 13 | 46 |
| Case 574 | C | N | N | N | T | C | 68 | 15 | 81 | 99 | 39 | 6 | 5 | 24 |
| Case 575 | C | N | N | N | N | T | 50 | 16 | 16 | 79 | 48 | 15 | 15 | 78 |
| Case 576 | C | N | N | N | C | T | 28 | 11 | 16 | 75 | 25 | 11 | 0 | 43 |
| Case 577 | C | N | N | C | T | T | 0 | 0 | 8 | 8 | 0 | 0 | 8 | 8 |
| Case 578 | C | N | N | C | T | N | 50 | 15 | 89 | 101 | 22 | 8 | 13 | 45 |
| Case 579 | C | N | N | C | T | C | 50 | 15 | 81 | 93 | 21 | 6 | 5 | 24 |
| Case 580 | C | N | N | C | N | T | 6 | 5 | 14 | 73 | 4 | 5 | 14 | 73 |
| Case 581 | C | N | N | C | C | T | 6 | 5 | 14 | 73 | 3 | 5 | 0 | 43 |
| Case 582 | C | N | C | T | T | T | 0 | 0 | 4 | 8 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| Case 583 | C | N | C | T | T | N | 0 | 0 | 4 | 8 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| Case 584 | C | N | C | T | T | C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 585 | C | N | C | T | N | T | 14 | 7 | 4 | 13 | 13 | 7 | 1 | 12 |
| Case 586 | C | N | C | T | N | N | 52 | 23 | 9 | 20 | 30 | 22 | 6 | 19 |
| Case 587 | C | N | C | T | N | C | 38 | 16 | 5 | 7 | 12 | 13 | 5 | 6 |
| Case 588 | C | N | C | T | C | T | 14 | 7 | 4 | 5 | 13 | 7 | 0 | 0 |
| Case 589 | C | N | C | T | C | N | 52 | 23 | 9 | 12 | 30 | 19 | 4 | 7 |
| Case 590 | C | N | C | T | C | C | 38 | 16 | 5 | 7 | 12 | 10 | 4 | 6 |
| Case 591 | C | N | C | N | T | T | 0 | 0 | 12 | 11 | 0 | 0 | 8 | 11 |
| Case 592 | C | N | C | N | T | N | 18 | 1 | 20 | 52 | 3 | 0 | 13 | 45 |
| Case 593 | C | N | C | N | T | C | 18 | 1 | 8 | 44 | 3 | 0 | 5 | 24 |
| Case 594 | C | N | C | N | N | T | 20 | 11 | 16 | 78 | 17 | 11 | 15 | 75 |
| Case 595 | C | N | C | N | C | T | 20 | 11 | 16 | 75 | 16 | 11 | 0 | 41 |
| Case 596 | C | N | C | C | T | T | 0 | 0 | 8 | 8 | 0 | 0 | 8 | 8 |
| Case 597 | C | N | C | C | T | N | 18 | 1 | 16 | 52 | 3 | 0 | 13 | 45 |
| Case 598 | C | N | C | C | T | C | 18 | 1 | 8 | 44 | 3 | 0 | 5 | 24 |
| Case 599 | C | N | C | C | N | T | 6 | 5 | 14 | 73 | 4 | 5 | 14 | 71 |
| Case 600 | C | N | C | C | C | T | 6 | 5 | 14 | 73 | 3 | 5 | 0 | 41 |
| Case 601 | C | C | T | T | T | T | 3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 602 | C | C | T | T | T | N | 6 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 603 | C | C | T | T | T | C | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 604 | C | C | T | T | N | T | 7 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Case 605 | C | C | T | T | N | N | 11 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Case 606 | C | C | T | T | N | C | 4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 607 | C | C | T | T | C | T | 4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 608 | C | C | T | T | C | N | 5 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Case 609 | C | C | T | T | C | C | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 610 | C | C | T | N | T | T | 3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 611 | C | C | T | N | T | N | 12 | 19 | 36 | 34 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| Case 612 | C | C | T | N | T | C | 9 | 19 | 36 | 34 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Case 613 | C | C | T | N | N | T | 7 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Case 614 | C | C | T | N | N | N | 18 | 23 | 78 | 151 | 7 | 2 | 0 | 0 |
| Case 615 | C | C | T | N | N | C | 11 | 23 | 78 | 151 | 5 | 1 | 0 | 0 |
| Case 616 | C | C | T | N | C | T | 4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 617 | C | C | T | N | C | N | 6 | 1 | 42 | 117 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Case 618 | C | C | T | N | C | C | 2 | 1 | 42 | 117 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Case 619 | C | C | T | C | T | T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 620 | C | C | T | C | T | N | 6 | 19 | 36 | 34 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Case 621 | C | C | T | C | T | C | 6 | 19 | 36 | 34 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Case 622 | C | C | T | C | N | T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 623 | C | C | T | C | N | N | 7 | 21 | 78 | 151 | 4 | 1 | 0 | 0 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 624 | C | C | T | C | N | C | 7 | 21 | 78 | 151 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| Case 625 | C | C | T | C | C | T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 626 | C | C | T | C | C | N | 1 | 1 | 42 | 117 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 627 | C | C | T | C | C | C | 1 | 1 | 42 | 117 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Case 628 | C | C | N | T | T | T | 3 | 1 | 4 | 7 | 1 | 0 | 0 | 4 |
| Case 629 | C | C | N | T | T | N | 6 | 0 | 4 | 7 | 1 | 0 | 0 | 4 |
| Case 630 | C | C | N | T | T | C | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 631 | C | C | N | T | N | T | 15 | 6 | 2 | 9 | 6 | 4 | 0 | 4 |
| Case 632 | C | C | N | T | N | N | 50 | 8 | 7 | 9 | 9 | 4 | 0 | 4 |
| Case 633 | C | C | N | T | N | C | 35 | 3 | 5 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Case 634 | C | C | N | T | C | T | 12 | 5 | 2 | 2 | 5 | 4 | 0 | 0 |
| Case 635 | C | C | N | T | C | N | 44 | 8 | 7 | 2 | 8 | 4 | 0 | 0 |
| Case 636 | C | C | N | T | C | C | 32 | 3 | 5 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Case 637 | C | C | N | N | T | T | 3 | 1 | 9 | 3 | 1 | 0 | 4 | 0 |
| Case 638 | C | C | N | N | T | N | 15 | 3 | 50 | 78 | 4 | 0 | 7 | 15 |
| Case 639 | C | C | N | N | T | C | 12 | 3 | 41 | 60 | 3 | 0 | 3 | 12 |
| Case 640 | C | C | N | N | N | T | 20 | 10 | 8 | 52 | 9 | 7 | 4 | 13 |
| Case 641 | C | C | N | N | C | T | 17 | 9 | 8 | 49 | 7 | 7 | 0 | 9 |
| Case 642 | C | C | N | C | T | T | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iINT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 643 | C | C | N | C | T | N | 9 | 3 | 46 | 54 | 3 | 0 | 7 | 15 |
| Case 644 | C | C | N | C | T | C | 9 | 3 | 41 | 54 | 3 | 0 | 3 | 12 |
| Case 645 | C | C | N | C | N | T | 5 | 5 | 6 | 47 | 3 | 4 | 4 | 13 |
| Case 646 | C | C | N | C | C | T | 5 | 5 | 6 | 47 | 2 | 4 | 0 | 9 |
| Case 647 | C | C | C | T | T | T | 0 | 0 | 4 | 7 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| Case 648 | C | C | C | T | T | N | 0 | 0 | 4 | 7 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| Case 649 | C | C | C | T | T | C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Case 650 | C | C | C | T | N | T | 8 | 5 | 2 | 9 | 3 | 4 | 0 | 4 |
| Case 651 | C | C | C | T | N | N | 39 | 8 | 7 | 9 | 5 | 4 | 0 | 4 |
| Case 652 | C | C | C | T | N | C | 31 | 3 | 5 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Case 653 | C | C | C | T | C | T | 8 | 5 | 2 | 2 | 3 | 4 | 0 | 0 |
| Case 654 | C | C | C | T | C | N | 39 | 8 | 7 | 2 | 5 | 4 | 0 | 0 |
| Case 655 | C | C | C | T | C | C | 31 | 3 | 5 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Case 656 | C | C | C | N | T | T | 0 | 0 | 9 | 3 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Case 657 | C | C | C | N | T | N | 3 | 0 | 14 | 20 | 0 | 0 | 7 | 15 |
| Case 658 | C | C | C | N | T | C | 3 | 0 | 5 | 20 | 0 | 0 | 3 | 12 |
| Case 659 | C | C | C | N | N | T | 13 | 9 | 8 | 52 | 6 | 7 | 4 | 12 |
| Case 660 | C | C | C | N | C | T | 13 | 9 | 8 | 49 | 5 | 7 | 0 | 8 |
| Case 661 | C | C | C | C | T | T | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Case 662 | C | C | C | C | T | N | 3 | 0 | 10 | 20 | 0 | 0 | 7 | 15 |

| Microorganisms State In Each Case T: Targeted, N: Not Participated and C: Conserved | | | | | | | Number Of Potential Solutions Found Fourth Step | | | | Number Of Potential Solutions Found Fifth Step | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|-----------|--------|--|--------|--------|-----------|---|--------|--------|-----------|
| Case No. | iYLT228 | iJNT463 | iMLT5T5 | STM_vT_N | iSDY_TN59 | iPC8T5 | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| Case 663 | C | C | C | C | T | C | 3 | 0 | 5 | 20 | 0 | 0 | 3 | 12 |
| Case 664 | C | C | C | C | N | T | 5 | 5 | 6 | 47 | 3 | 4 | 4 | 12 |
| Case 665 | C | C | C | C | C | T | 5 | 5 | 6 | 47 | 2 | 4 | 0 | 8 |

پیوست ۴- نرخ مشارکت مسیرها (Pathways) در کیس‌های مختلف
در این پیوست، نرخ مشارکت مسیرهای مختلف در جدول پ- ۲ آورده شده است.

جدول پ-۲- نرخ مشارکت مسیرهای مختلف در پاسخ‌های بدست آمده.

| Pathways | All 665 cases | | | | 63 cases | | | | 602 cases | | | |
|--|---------------|--------|--------|-----------|----------|--------|--------|-----------|-----------|--------|--------|-----------|
| | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| alanine and aspartate metabolism | 92 | 63 | 18 | 21 | 16 | 63 | 18 | 21 | 76 | 0 | 0 | 0 |
| alginate biosynthesis | 8 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| alternate carbon metabolism | 208 | 106 | 239 | 268 | 63 | 60 | 62 | 63 | 145 | 46 | 177 | 205 |
| anaplerotic reactions | 64 | 56 | 136 | 184 | 4 | 28 | 63 | 61 | 60 | 28 | 73 | 123 |
| arginine and proline metabolism | 80 | 42 | 94 | 72 | 5 | 8 | 48 | 41 | 75 | 34 | 46 | 31 |
| aromatic compounds degradation | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| cell envelope biosynthesis | 278 | 264 | 298 | 351 | 63 | 63 | 63 | 63 | 215 | 201 | 235 | 288 |
| cofactor and prosthetic group biosynthesis | 282 | 92 | 99 | 211 | 63 | 27 | 45 | 54 | 219 | 65 | 54 | 157 |
| cysteine metabolism | 0 | 43 | 47 | 10 | 0 | 33 | 35 | 5 | 0 | 10 | 12 | 5 |
| extracellular exchange | 104 | 9 | 2 | 32 | 10 | 2 | 2 | 16 | 94 | 7 | 0 | 16 |
| fatty acid biosynthesis | 0 | 56 | 82 | 69 | 0 | 56 | 56 | 56 | 0 | 0 | 26 | 13 |
| fatty acid metabolism | 0 | 8 | 32 | 32 | 0 | 8 | 32 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| folate metabolism | 76 | 70 | 133 | 21 | 31 | 17 | 63 | 9 | 45 | 53 | 70 | 12 |
| formaldehyde metabolism | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| gluconeogenesis | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| glutamate metabolism | 31 | 9 | 24 | 39 | 31 | 5 | 24 | 24 | 0 | 4 | 0 | 15 |
| glycerophospholipid metabolism | 248 | 252 | 222 | 202 | 63 | 63 | 63 | 63 | 185 | 189 | 159 | 139 |
| glycine, serine and threonine metabolism | 0 | 24 | 38 | 81 | 0 | 11 | 35 | 60 | 0 | 13 | 3 | 21 |
| glycolysis / gluconeogenesis | 48 | 80 | 248 | 317 | 3 | 4 | 63 | 63 | 45 | 76 | 185 | 254 |
| glyoxylate and dicarboxylate metabolism | 0 | 38 | 34 | 124 | 0 | 16 | 16 | 44 | 0 | 22 | 18 | 80 |

| Pathways | All 665 cases | | | | 63 cases | | | | 602 cases | | | |
|--|---------------|--------|--------|-----------|----------|--------|--------|-----------|-----------|--------|--------|-----------|
| | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| histidine metabolism | 48 | 60 | 104 | 44 | 3 | 60 | 60 | 36 | 45 | 0 | 44 | 8 |
| inorganic ion transport and metabolism | 74 | 0 | 4 | 4 | 15 | 0 | 1 | 1 | 59 | 0 | 3 | 3 |
| inorganic polyphosphates metabolism | 0 | 0 | 16 | 32 | 0 | 0 | 16 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| iron uptake and metabolism | 4 | 5 | 5 | 5 | 1 | 3 | 5 | 5 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| lipopolysaccharide biosynthesis | 142 | 72 | 56 | 32 | 63 | 41 | 16 | 32 | 79 | 31 | 40 | 0 |
| lysine metabolism | 0 | 16 | 16 | 16 | 0 | 16 | 16 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| membrane lipid metabolism | 63 | 204 | 256 | 339 | 63 | 63 | 63 | 63 | 0 | 141 | 193 | 276 |
| methionine metabolism | 76 | 49 | 43 | 8 | 31 | 40 | 40 | 8 | 45 | 9 | 3 | 0 |
| murein biosynthesis | 120 | 32 | 32 | 32 | 31 | 1 | 1 | 1 | 89 | 31 | 31 | 31 |
| murein recycling | 0 | 32 | 32 | 32 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 31 | 31 | 31 |
| nitrogen metabolism | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| nucleotide salvage pathway | 185 | 244 | 283 | 253 | 63 | 63 | 63 | 63 | 122 | 181 | 220 | 190 |
| oxidative phosphorylation | 32 | 57 | 191 | 216 | 1 | 29 | 63 | 59 | 31 | 28 | 128 | 157 |
| pentose phosphate pathway | 48 | 160 | 275 | 337 | 3 | 63 | 63 | 63 | 45 | 97 | 212 | 274 |
| phas metabolism | 0 | 32 | 32 | 32 | 0 | 32 | 32 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| phenylalanine tyrosine tryptophan biosynthesis | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| purine and pyrimidine biosynthesis | 140 | 120 | 110 | 56 | 63 | 63 | 25 | 20 | 77 | 57 | 85 | 36 |
| purine metabolism | 1 | 49 | 44 | 32 | 1 | 49 | 28 | 16 | 0 | 0 | 16 | 16 |
| pyrimidine metabolism | 0 | 35 | 1 | 1 | 0 | 32 | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| pyruvate metabolism | 0 | 28 | 69 | 58 | 0 | 5 | 21 | 27 | 0 | 23 | 48 | 31 |
| riboflavin metabolism | 32 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 31 | 0 | 0 | 0 |
| sulfur metabolism | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| Pathways | All 665 cases | | | | 63 cases | | | | 602 cases | | | |
|--|---------------|--------|--------|-----------|----------|--------|--------|-----------|-----------|--------|--------|-----------|
| | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple | Single | Double | Triple | Quadruple |
| tca cycle | 0 | 92 | 108 | 90 | 0 | 16 | 21 | 33 | 0 | 76 | 87 | 57 |
| threonine and lysine metabolism | 94 | 0 | 16 | 8 | 31 | 0 | 1 | 4 | 63 | 0 | 15 | 4 |
| transport | 2 | 45 | 24 | 28 | 2 | 17 | 7 | 16 | 0 | 28 | 17 | 12 |
| trna charging | 16 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| tyrosine, tryptophan, and phenylalanine metabolism | 31 | 0 | 35 | 67 | 31 | 0 | 34 | 49 | 0 | 0 | 1 | 18 |
| valine, leucine, and isoleucine metabolism | 0 | 3 | 47 | 99 | 0 | 2 | 28 | 33 | 0 | 1 | 19 | 66 |
| vitamin b12 metabolism | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

پیوست ۵- لیست بافت‌های سرطانی مورد مطالعه و راه حل‌های اکیداً انتخابی بدست آمده برای آن‌ها

جدول پ-۳- عناوین بافت‌های مورد مطالعه در فصل ششم

| عنوان اختصاری بافت | نام لاتین | نام فارسی |
|--------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| COAD | Colon adenocarcinoma | آدنوکارسینوم روده بزرگ |
| BRCA | Bladder Urothelial carcinoma | سرطان بافت درونی مثانی |
| LUAD | Lung adenocarcinoma | آدنوکارسینوم ریه |
| LIHC | Liver hepatocellular carcinoma | سرطان هیپاتوسلولی کبد |
| LUSC | Lung squamous cell carcinoma | سرطان سلول اسکاموس ریه |
| UCEC | Uterine Corpus endometrial carcinoma | سرطان دیواره داخلی رحم |
| HNSC | Head and neck squamous cell carcinoma | سرطان سلول‌های اسکاموس سر و گردن |
| STAD | Stomach adenocarcinoma | آدنوکارسینوم معده |
| KIRC | Kidney renal clear cell carcinoma | سرطان سلول شفاف کلیه |
| PRAD | Prostate adenocarcinoma | آدنوکارسینوم پروستات |
| KICH | Kidney chromophobe | کروموفوب کلیه |
| THCA | Thyroid carcinoma | سرطان تیروئید |
| KIRP | Kidney renal papillary cell carcinoma | کارسینوم سلول پاپیلاری کلیه |

جدول پ-۴- راه حل‌های اکیداً انتخابی بدست آمده برای سرطان‌های مورد مطالعه. اعداد گزارش شده مشخصه NCBI یا همان Entrez ID زن‌های هدف می‌باشد.

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه‌گانه | | | کشنده مصنوعی دوگانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|------|------|------|----------------------|-------|------|---------------------|--|----------|-------|
| 10559 | 5226 | 6888 | 5211 | 3291 | 2539 | 6120 | | | 10991 | COAD |
| 55907 | 5226 | 6888 | 5211 | 3291 | 25796 | 6120 | | | | |
| 5476 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | |
| 2720 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | |
| 2588 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | |
| 4758 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | |
| 9583 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | |
| 7355 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | |
| 11046 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | |
| 10559 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | 1841 | BRCA |
| 55907 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | 10840 | |
| 5476 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | 387775 | |
| 2720 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | |
| 2588 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | |
| 4758 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | |
| 9583 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | |
| 7355 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | |
| 11046 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه گانه | | | کشنده مصنوعی دو گانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|-------|-------|-------|----------------------|-------|------|----------------------|------|----------|-------|
| 2356 | 55577 | 5338 | 10087 | | | | | | 5172 | LUAD |
| 8836 | 55577 | 5338 | 10087 | | | | | | 1841 | |
| 2356 | 5238 | 5338 | 10087 | | | | | | | |
| 8836 | 5238 | 5338 | 10087 | | | | | | | |
| 2356 | 26503 | 5338 | 10087 | | | | | | | |
| 8836 | 26503 | 5338 | 10087 | | | | | | | |
| 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | 1356 | 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | 1593 | LIHC |
| 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | 9963 | 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | 131669 | |
| 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | 4967 | 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | 5825 | |
| 47 | 4967 | 47 | 4967 | 4967 | 47 | 4967 | 47 | 4967 | 10841 | |
| 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | 4967 | 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | | |
| 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | 1743 | 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | | |
| 47 | 1743 | 47 | 1743 | 1743 | 47 | 1743 | 47 | 1743 | | |
| 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | 4967 | 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | | |
| 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | 4967 | 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | | |
| 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | 4967 | 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | | |
| 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | 4967 | 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | | |
| 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | 1743 | 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | | |
| 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | 2745 | 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | | |
| 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | 1356 | 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | | |
| 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | 9963 | 9962 | 9963 | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه‌گانه | | | کشنده مصنوعی دوگانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|------|-------|------|----------------------|-------|------|---------------------|--|----------|-------|
| 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | 4967 | 6120 | 4967 | | | | |
| 47 | 4967 | 47 | 4967 | 4967 | 47 | 4967 | | | | |
| 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | 4967 | 3158 | 4967 | | | | |
| 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | 1743 | 3158 | 1743 | | | | |
| 47 | 1743 | 47 | 1743 | 1743 | 47 | 1743 | | | | |
| 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | 4967 | 5226 | 4967 | | | | |
| 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | 4967 | 5211 | 4967 | | | | |
| 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | 4967 | 2821 | 4967 | | | | |
| 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | 4967 | 6888 | 4967 | | | | |
| 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | 1743 | 6120 | 1743 | | | | |
| 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | 2745 | 51022 | 2745 | | | | |
| 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | 1356 | 94033 | 1356 | | | | |
| 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | 9963 | 9962 | 9963 | | | | |
| 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | 4967 | 6120 | 4967 | | | | |
| 47 | 4967 | 47 | 4967 | 4967 | 47 | 4967 | | | | |
| 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | 4967 | 3158 | 4967 | | | | |
| 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | 1743 | 3158 | 1743 | | | | |
| 47 | 1743 | 47 | 1743 | 1743 | 47 | 1743 | | | | |
| 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | 4967 | 5226 | 4967 | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه‌گانه | | | کشنده مصنوعی دوگانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|------|-------|------|----------------------|-------|------|---------------------|--|----------|-------|
| 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | 4967 | 5211 | 4967 | | | | |
| 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | 4967 | 2821 | 4967 | | | | |
| 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | 4967 | 6888 | 4967 | | | | |
| 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | 1743 | 6120 | 1743 | | | | |
| 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | 2745 | 51022 | 2745 | | | | |
| 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | 1356 | 94033 | 1356 | | | | |
| 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | 9963 | 9962 | 9963 | | | | |
| 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | 4967 | 6120 | 4967 | | | | |
| 47 | 4967 | 47 | 4967 | 4967 | 47 | 4967 | | | | |
| 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | 4967 | 3158 | 4967 | | | | |
| 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | 1743 | 3158 | 1743 | | | | |
| 47 | 1743 | 47 | 1743 | 1743 | 47 | 1743 | | | | |
| 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | 4967 | 5226 | 4967 | | | | |
| 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | 4967 | 5211 | 4967 | | | | |
| 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | 4967 | 2821 | 4967 | | | | |
| 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | 4967 | 6888 | 4967 | | | | |
| 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | 1743 | 6120 | 1743 | | | | |
| 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | 2745 | 51022 | 2745 | | | | |
| 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | 1356 | 94033 | 1356 | | | | |
| 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | 9963 | 9962 | 9963 | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه‌گانه | | | کشنده مصنوعی دوگانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|------|-------|------|----------------------|------|------|---------------------|--|----------|-------|
| 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | 4967 | 6120 | 4967 | | | | |
| 47 | 4967 | 47 | 4967 | 4967 | 47 | 4967 | | | | |
| 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | 4967 | 3158 | 4967 | | | | |
| 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | 1743 | 3158 | 1743 | | | | |
| 47 | 1743 | 47 | 1743 | 1743 | 47 | 1743 | | | | |
| 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | 4967 | 5226 | 4967 | | | | |
| 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | | | | | | | |
| 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | | | | | | | |
| 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | | | | | | | |
| 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | | | | | | | |
| 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | | | | | | | |
| 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | | | | | | | |
| 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | | | | | | | |
| 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | | | | | | | |
| 47 | 4967 | 47 | 4967 | | | | | | | |
| 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | | | | | | | |
| 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | | | | | | | |
| 47 | 1743 | 47 | 1743 | | | | | | | |
| 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | | | | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه گانه | | | | کشنده مصنوعی دو گانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|------|-------|------|----------------------|--|--|--|----------------------|--|----------|-------|
| 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | | | | | | | | |
| 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | | | | | | | | |
| 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | | | | | | | | |
| 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | | | | | | | | |
| 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | | | | | | | | |
| 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | | | | | | | | |
| 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | | | | | | | | |
| 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | | | | | | | | |
| 47 | 4967 | 47 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | | | | | | | | |
| 47 | 1743 | 47 | 1743 | | | | | | | | |
| 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | | | | | | | | |
| 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | | | | | | | | |
| 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | | | | | | | | |
| 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | | | | | | | | |
| 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | | | | | | | | |
| 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | | | | | | | | |
| 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | | | | | | | | |
| 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | | | | | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه‌گانه | | | | کشنده مصنوعی دوگانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|------|-------|------|----------------------|--|--|--|---------------------|--|----------|-------|
| 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | | | | | | | | |
| 47 | 4967 | 47 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | | | | | | | | |
| 47 | 1743 | 47 | 1743 | | | | | | | | |
| 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | | | | | | | | |
| 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | | | | | | | | |
| 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | | | | | | | | |
| 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | | | | | | | | |
| 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | | | | | | | | |
| 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | | | | | | | | |
| 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | | | | | | | | |
| 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | | | | | | | | |
| 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | | | | | | | | |
| 47 | 4967 | 47 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | | | | | | | | |
| 47 | 1743 | 47 | 1743 | | | | | | | | |
| 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | | | | | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه گانه | | | | کشنده مصنوعی دو گانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|------|-------|------|----------------------|--|--|--|----------------------|--|----------|-------|
| 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | | | | | | | | |
| 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | | | | | | | | |
| 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | | | | | | | | |
| 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | | | | | | | | |
| 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | | | | | | | | |
| 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | | | | | | | | |
| 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | | | | | | | | |
| 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | | | | | | | | |
| 47 | 4967 | 47 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | | | | | | | | |
| 47 | 1743 | 47 | 1743 | | | | | | | | |
| 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | | | | | | | | |
| 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | | | | | | | | |
| 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | | | | | | | | |
| 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | | | | | | | | |
| 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | | | | | | | | |
| 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | | | | | | | | |
| 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | | | | | | | | |
| 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | | | | | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه‌گانه | | | | کشنده مصنوعی دوگانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|------|-------|------|----------------------|--|--|--|---------------------|--|----------|-------|
| 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | | | | | | | | |
| 47 | 4967 | 47 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | | | | | | | | |
| 47 | 1743 | 47 | 1743 | | | | | | | | |
| 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | | | | | | | | |
| 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | | | | | | | | |
| 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | | | | | | | | |
| 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | | | | | | | | |
| 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | | | | | | | | |
| 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | | | | | | | | |
| 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | | | | | | | | |
| 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | | | | | | | | |
| 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | | | | | | | | |
| 47 | 4967 | 47 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | | | | | | | | |
| 47 | 1743 | 47 | 1743 | | | | | | | | |
| 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | | | | | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه گانه | | | | کشنده مصنوعی دو گانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|------|-------|------|----------------------|--|--|--|----------------------|--|----------|-------|
| 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | | | | | | | | |
| 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | | | | | | | | |
| 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | | | | | | | | |
| 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | | | | | | | | |
| 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | | | | | | | | |
| 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | | | | | | | | |
| 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | | | | | | | | |
| 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | | | | | | | | |
| 47 | 4967 | 47 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | | | | | | | | |
| 47 | 1743 | 47 | 1743 | | | | | | | | |
| 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | | | | | | | | |
| 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | | | | | | | | |
| 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | | | | | | | | |
| 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | | | | | | | | |
| 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | | | | | | | | |
| 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | | | | | | | | |
| 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | | | | | | | | |
| 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | | | | | | | | |

| کشنده مصنوعي چهارگانه | | | | کشنده مصنوعي سه گانه | | | | کشنده مصنوعي دوگانه | | ژن حياتي | سرطان |
|-----------------------|------|-------|------|----------------------|--|--|--|---------------------|--|----------|-------|
| 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | | | | | | | | |
| 47 | 4967 | 47 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | | | | | | | | |
| 47 | 1743 | 47 | 1743 | | | | | | | | |
| 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | | | | | | | | |
| 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | | | | | | | | |
| 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | | | | | | | | |
| 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | | | | | | | | |
| 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | | | | | | | | |
| 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | | | | | | | | |
| 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | | | | | | | | |
| 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | | | | | | | | |
| 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | | | | | | | | |
| 47 | 4967 | 47 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | | | | | | | | |
| 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | | | | | | | | |
| 47 | 1743 | 47 | 1743 | | | | | | | | |
| 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | | | | | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه گانه | | | کشنده مصنوعی دو گانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|-------|-------|------|----------------------|--|--|----------------------|-------|----------|-------|
| 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | | | | | | | |
| 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | | | | | | | |
| 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | | | | | | | |
| 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | | | | | | | |
| 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | | | | | | | |
| 94033 | 1356 | 94033 | 1356 | | | | | | | |
| 9962 | 9963 | 9962 | 9963 | | | | | | | |
| 6120 | 4967 | 6120 | 4967 | | | | | | | |
| 47 | 4967 | 47 | 4967 | | | | | | | |
| 3158 | 4967 | 3158 | 4967 | | | | | | | |
| 3158 | 1743 | 3158 | 1743 | | | | | | | |
| 47 | 1743 | 47 | 1743 | | | | | | | |
| 5226 | 4967 | 5226 | 4967 | | | | | | | |
| 5211 | 4967 | 5211 | 4967 | | | | | | | |
| 2821 | 4967 | 2821 | 4967 | | | | | | | |
| 6888 | 4967 | 6888 | 4967 | | | | | | | |
| 6120 | 1743 | 6120 | 1743 | | | | | | | |
| 51022 | 2745 | 51022 | 2745 | | | | | | | |
| 4833 | 10201 | 3158 | 39 | | | | | 10991 | LUSC | |
| 10559 | 6888 | 5211 | 5226 | | | | | 1841 | UCEC | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه‌گانه | | | کشنده مصنوعی دوگانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|------|------|------|----------------------|-------|-------|---------------------|------|----------|-------|
| 55907 | 6888 | 5211 | 5226 | | | | | | | |
| 5476 | 6888 | 5211 | 5226 | | | | | | | |
| 2720 | 6888 | 5211 | 5226 | | | | | | | |
| 2588 | 6888 | 5211 | 5226 | | | | | | | |
| 4758 | 6888 | 5211 | 5226 | | | | | | | |
| 9583 | 6888 | 5211 | 5226 | | | | | | | |
| 7355 | 6888 | 5211 | 5226 | | | | | | | |
| 11046 | 6888 | 5211 | 5226 | | | | | | | |
| 51166 | 3030 | 39 | 38 | 47 | 55276 | 3158 | 3158 | 39 | HNSC | |
| 83884 | 3030 | 39 | 38 | 47 | 55276 | 39 | 3157 | 3158 | | |
| 2639 | 3030 | 39 | 38 | 47 | 55276 | 65985 | | | | |
| 10157 | 3030 | 39 | 38 | | | | | | | |
| 51166 | 39 | 3032 | 38 | | | | | | | |
| 83884 | 39 | 3032 | 38 | | | | | | | |
| 2639 | 39 | 3032 | 38 | | | | | | | |
| 10157 | 39 | 3032 | 38 | | | | | | | |
| 10559 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | |
| 55907 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | |
| 5476 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه‌گانه | | | کشنده مصنوعی دوگانه | | ژن حیاتی | سرطان | |
|-----------------------|-------|------|------|----------------------|------|-----|---------------------|-------|----------|-------|--|
| 2720 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | | |
| 2588 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | | |
| 4758 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | | |
| 9583 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | | |
| 7355 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | | |
| 11046 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | | |
| 10559 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | 1841 | STAD | |
| 55907 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | | |
| 5476 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | | |
| 2720 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | | |
| 2588 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | | |
| 4758 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | | |
| 9583 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | | |
| 7355 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | | |
| 11046 | 5226 | 6888 | 5211 | | | | | | | | |
| 788 | 587 | 1737 | 39 | | | | | | | | |
| 6319 | 5160 | 5161 | 788 | 6319 | 1737 | 788 | 30 | 10449 | 4967 | KIRC | |
| 6319 | 5162 | 5161 | 788 | 6319 | 4507 | 788 | 8803 | 8801 | 1743 | | |
| 6319 | 26266 | 5338 | 788 | 6319 | 587 | 788 | | | 3242 | | |
| 6319 | 54511 | 3155 | 788 | 6319 | 5226 | 788 | | | 65985 | | |
| 6319 | 51557 | 2752 | 788 | 6319 | 4329 | 788 | | | 3032 | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه‌گانه | | | کشنده مصنوعی دوگانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|--------|------|-----|----------------------|------|-------|---------------------|--|----------|-------|
| 6319 | 26266 | 9453 | 788 | 6319 | 8034 | 788 | | | 39 | |
| 6319 | 5338 | 1491 | 788 | 6319 | 788 | 26275 | | | 5860 | |
| 6319 | 9453 | 1491 | 788 | 3158 | 8034 | 788 | | | 2184 | |
| 6319 | 5338 | 1036 | 788 | 3155 | 8034 | 788 | | | 275 | |
| 6319 | 9453 | 1036 | 788 | 587 | 8034 | 788 | | | 2731 | |
| 1384 | 26266 | 8034 | 788 | 1737 | 8034 | 788 | | | 2653 | |
| 1384 | 130013 | 8034 | 788 | 3157 | 6319 | 788 | | | 3081 | |
| 1384 | 4507 | 8034 | 788 | | | | | | 8802 | |
| 1384 | 8564 | 8034 | 788 | | | | | | 5053 | |
| 1384 | 8942 | 8034 | 788 | | | | | | 6342 | |
| 1384 | 5226 | 8034 | 788 | | | | | | 1431 | |
| 8879 | 5226 | 8034 | 788 | | | | | | 2954 | |
| 2168 | 5226 | 8034 | 788 | | | | | | 4967 | |
| 1384 | 2639 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 1384 | 4329 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 56922 | 4329 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 64087 | 4329 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 1384 | 125061 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 1384 | 1491 | 8034 | 788 | | | | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه گانه | | | | کشنده مصنوعی دو گانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|-------|------|-------|----------------------|--|--|--|----------------------|--|----------|-------|
| 1384 | 1036 | 8034 | 788 | | | | | | | | |
| 3157 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | | |
| 56922 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | | |
| 64087 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | | |
| 1384 | 8034 | 549 | 788 | | | | | | | | |
| 6319 | 26266 | 353 | 788 | | | | | | | | |
| 6319 | 1491 | 353 | 788 | | | | | | | | |
| 6319 | 1036 | 353 | 788 | | | | | | | | |
| 6319 | 788 | 34 | 36 | | | | | | | | |
| 6319 | 26266 | 788 | 8659 | | | | | | | | |
| 6319 | 1036 | 788 | 8659 | | | | | | | | |
| 6319 | 788 | 8604 | 10165 | | | | | | | | |
| 1384 | 8034 | 788 | 26275 | | | | | | | | |
| 56922 | 8034 | 788 | 26275 | | | | | | | | |
| 64087 | 8034 | 788 | 26275 | | | | | | | | |
| 1384 | 8034 | 788 | 23498 | | | | | | | | |
| 1384 | 8034 | 788 | 89874 | | | | | | | | |
| 10380 | 9583 | 5226 | 10327 | | | | | | | | |
| 9514 | 9583 | 5226 | 10327 | | | | | | | | |
| 347734 | 9583 | 5226 | 10327 | | | | | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه‌گانه | | | کشنده مصنوعی دوگانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|-------|-------|-------|----------------------|--|--|---------------------|--|----------|-------|
| 10380 | 7355 | 5226 | 10327 | | | | | | | |
| 9514 | 7355 | 5226 | 10327 | | | | | | | |
| 347734 | 7355 | 5226 | 10327 | | | | | | | |
| 56922 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 64087 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 3157 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 6319 | 100 | 353 | 788 | | | | | | | |
| 4860 | 6319 | 353 | 788 | | | | | | | |
| 3251 | 6319 | 353 | 788 | | | | | | | |
| 10380 | 10331 | 55577 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 10331 | 55577 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 10331 | 55577 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 10087 | 55577 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 10087 | 55577 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 10087 | 55577 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 9583 | 55577 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 9583 | 55577 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 9583 | 55577 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 7355 | 55577 | 5226 | | | | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه گانه | | | کشنده مصنوعی دو گانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|-------|-------|------|----------------------|--|--|----------------------|--|----------|-------|
| 9514 | 7355 | 55577 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 7355 | 55577 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 7357 | 55577 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 7357 | 55577 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 7357 | 55577 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 10331 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 10331 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 10331 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 10087 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 10087 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 10087 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 5476 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 5476 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 5476 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 2720 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 2720 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 2720 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 9583 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 9583 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 9583 | 5238 | 5226 | | | | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه‌گانه | | | کشنده مصنوعی دوگانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|-------|-------|------|----------------------|--|--|---------------------|--|----------|-------|
| 10380 | 7355 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 7355 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 7355 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 7357 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 7357 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 7357 | 5238 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 10331 | 26503 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 10331 | 26503 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 10331 | 26503 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 10087 | 26503 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 10087 | 26503 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 10087 | 26503 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 9583 | 26503 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 9583 | 26503 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 9583 | 26503 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 7355 | 26503 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 7355 | 26503 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 7355 | 26503 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 7357 | 26503 | 5226 | | | | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه گانه | | | کشنده مصنوعی دو گانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|------|-------|------|----------------------|--|--|----------------------|--|----------|-------|
| 9514 | 7357 | 26503 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 7357 | 26503 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 9583 | 2990 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 9583 | 2990 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 9583 | 2990 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 7355 | 2990 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 7355 | 2990 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 7355 | 2990 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 9583 | 7358 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 9583 | 7358 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 9583 | 7358 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 7355 | 7358 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 7355 | 7358 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 7355 | 7358 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 9583 | 51181 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 9583 | 51181 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 9583 | 51181 | 5226 | | | | | | | |
| 10380 | 7355 | 51181 | 5226 | | | | | | | |
| 9514 | 7355 | 51181 | 5226 | | | | | | | |
| 347734 | 7355 | 51181 | 5226 | | | | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه‌گانه | | | کشنده مصنوعی دوگانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|------|------|-------|----------------------|--|--|---------------------|--|----------|-------|
| 1384 | 8034 | 788 | 89874 | | | | | | | |
| 1384 | 8034 | 788 | 23498 | | | | | | | |
| 788 | 35 | 34 | 26275 | | | | | | | |
| 8034 | 549 | 788 | 26275 | | | | | | | |
| 1384 | 8034 | 788 | 26275 | | | | | | | |
| 5226 | 8034 | 788 | 26275 | | | | | | | |
| 788 | 35 | 34 | 36 | | | | | | | |
| 8034 | 788 | 35 | 34 | | | | | | | |
| 4329 | 788 | 35 | 34 | | | | | | | |
| 5226 | 788 | 35 | 34 | | | | | | | |
| 587 | 788 | 35 | 34 | | | | | | | |
| 4507 | 788 | 35 | 34 | | | | | | | |
| 1737 | 788 | 35 | 34 | | | | | | | |
| 1384 | 8034 | 549 | 788 | | | | | | | |
| 4329 | 8034 | 549 | 788 | | | | | | | |
| 1036 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 1491 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 125061 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 4329 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه گانه | | | کشنده مصنوعی دو گانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|-------|------|-----|----------------------|--|--|----------------------|--|----------|-------|
| 2639 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 5226 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 8942 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 8564 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 4507 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 130013 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 26266 | 1384 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 5226 | 4329 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 5162 | 5161 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 5160 | 5161 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 6319 | 5160 | 5161 | 788 | | | | | | | |
| 6319 | 5162 | 5161 | 788 | | | | | | | |
| 6319 | 26266 | 5338 | 788 | | | | | | | |
| 6319 | 54511 | 3155 | 788 | | | | | | | |
| 6319 | 51557 | 2752 | 788 | | | | | | | |
| 6319 | 26266 | 9453 | 788 | | | | | | | |
| 6319 | 5338 | 1491 | 788 | | | | | | | |
| 6319 | 9453 | 1491 | 788 | | | | | | | |
| 6319 | 5338 | 1036 | 788 | | | | | | | |
| 6319 | 9453 | 1036 | 788 | | | | | | | |

| کشنده مصنوعی چهارگانه | | | | کشنده مصنوعی سه‌گانه | | | کشنده مصنوعی دوگانه | | ژن حیاتی | سرطان |
|-----------------------|--------|------|-----|----------------------|-------|------|---------------------|------|----------|-------|
| 1384 | 26266 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 1384 | 130013 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 1384 | 4507 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 1384 | 8564 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 1384 | 8942 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 1384 | 5226 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 8879 | 5226 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 2168 | 5226 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| 1384 | 2639 | 8034 | 788 | | | | | | | |
| | | | | | | | 2356 | 4507 | | |
| | | | | | | | 8836 | 4507 | | |
| | | | | | | | 10797 | 4507 | | |
| | | | | | | | 2356 | 353 | THCA | |
| | | | | | | | 8836 | 353 | | |
| | | | | | | | 10797 | 353 | | |
| | | | | 4860 | 51292 | 2766 | | | | |
| | | | | 3251 | 51292 | 2766 | | | KIRP | |

scenarios. Lastly, utilizing the obtained solutions, a seven-member set of targets capable of encompassing a significant portion of all cases is introduced.

In the final step, the exploration of strictly selective drug targets is pursued using tissue-specific genome-scale models. Strictly selective targets refer to those exclusively affecting cancer cells while sparing various normal tissues. To address this, tissue-specific models of 13 different cancerous cells, along with their corresponding normal cells, were reconstructed and analyzed. For each cancerous model, double, triple, and quadruple synthetic lethal sets were identified using the Rapid-SL method. The results indicate that with an increase in the cardinality of synthetic lethal sets, the potential for achieving highly selective solutions also rises. In other words, higher-order synthetic lethal sets can propose targets that solely impact cancer cells while minimizing adverse effects on normal cells from different tissues. The findings of this study present a novel approach for laboratory-based research in the fight against cancer.

Keywords: Systems biology, genome-scale metabolic models, constraint-based modeling, selective drug targets, cancer, synthetic lethal sets.

Abstract

A systematic study of behavior changes in metabolic networks with applications in the treatment and diagnosis of diseases

By
Mehdi Dehghan Manshadi

Systematic examination of the metabolic alterations in cancer cells and metabolic functions of pathogens provides the opportunity to develop specific therapeutic methods for targeting these cells while minimizing adverse effects on healthy cells. However, attacking essential single genes as drug targets faces various challenges, such as drug resistance and a lack of accessible targets. The concept of synthetic lethality could provide an alternative approach to address these issues. Synthetic lethal sets (SLs) consist of targets that do not significantly impact a cell when attacked individually but disrupt the cell's function when eliminated simultaneously. Computational systems biology offers an effective approach to address biomedical questions by analyzing complex interactions within biological networks. This study utilizes this approach to identify synthetic lethal sets as potential drug targets. Due to the complexities involved in reconstructing and utilizing human cell models, the methods were initially developed and validated using models of pathogenic and non-pathogenic bacterial prokaryotic cells. Therefore, specific drug targets were identified for the selective targeting of distinct bacterial groups. In the final step, the developed methods were applied to identify drug targets for combating cancer cells, leading to the introduction of the concept of "strictly selective" drug targets for the first time. This research is structured in three steps. In the first step, a method named Rapid-SL is developed to identify higher-order synthetic lethal sets within genome-scale metabolic models. The results demonstrate that Rapid-SL significantly reduces the number of optimization problems required to obtain synthetic lethal sets compared to previous methods. Furthermore, thanks to the utilization of recursive functions and a depth-first search algorithm, Rapid-S is capable of executing parallel computations and targeted enumeration within specific sections of the search space. This capability enables the identification of substantial portions of desired solutions by exploring only a small fraction of the search space. Moving to the second step, employing the developed approach, double, triple, and quadruple synthetic lethals were identified for a set of six microorganisms. Various combinations of these microorganisms were examined across 665 different scenarios to identify potential drug targets with selectivity, aiming to preserve desired microorganisms while eliminating target microorganisms. The results unveil those pathways associated with cell wall synthesis and DNA replication—common targets of existing antibiotics—are under attack by the identified solutions across all studied

In the Name of God

**A systematic study of behavior changes in metabolic networks
with applications in the diagnosis and treatment of diseases**

By
Mehdi Dehghan Manshadi

Dissertation
Submitted to Shiraz University in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Doctor of Philosophy (Ph.D.)

In
Chemical Engineering

Shiraz University
Shiraz
Islamic Republic of Iran

Evaluated and Approved by the Thesis Committee as: ...

.... Payam Setoodeh (Ph.D.), Associate Prof. of the Dept. of
Chemical Engineering (Supervisor)

... Mehrzad Feilizadeh (Ph.D.), Associate Prof. of the Dept. of
Chemical Engineering (Advisor)

..... Habil Zare (Ph.D.), Assistant Prof. of the Dept. of Cell
Systems & Anatomy of University of Texas Health Science
Center in San Antonio (Advisor)

Mohammad Hossein Morovat (Ph. D.), Associate Prof. of the
Dept. of Pharmaceutical Biotechnology of Shiraz University
of Medical Sciences (Internal Examiner)

Mohammad khorram (Ph.D.), Associate Prof. of Dept. of
Gas Engineering (Internal Examiner)

September 2023



**School of Chemical, Oil and Gas Engineering
Ph.D. Dissertation in
Chemical Engineering**

**A systematic study of behavior changes in metabolic
networks with applications in the diagnosis and
treatment of diseases**

**By
Mehdi Dehghan Manshadi**

**Supervised by
Dr. Payam Setoodeh**

September 2023



Ph.D. Dissertation

A systematic study of behavior changes
in metabolic networks with applications
in the treatment and diagnosis of diseases

By **Mehdi Dehghan Manshadi**

Supervised By:

Dr. Payam Setoodeh (Ph.D.)

School of Chemical, Oil and Gas Engineering-
Department of Chemical Engineering

September 2023