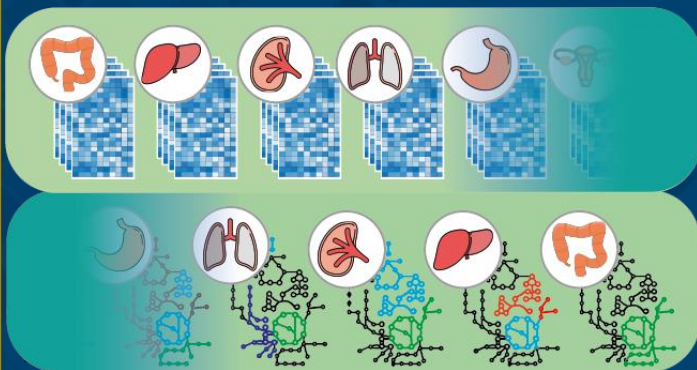




رساله دکتری

بررسی سامانه‌های 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 - بخش مهندسی شیمی

شهریور ۱۴۰۲



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 مقاله‌های 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:

سال ۱۴۰۲/۰۵/۱۵

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: عالی

- دکتر پیام ستوده، دانشیار بخش مهندسی شیمی (استاد راهنما)
- دکتر مهرزاد فیلی‌زاده، دانشیار بخش مهندسی شیمی (استاد مشاور)
- دکتر هایبیل 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، استاد بخش مهندسی 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 هم چنان 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 به منظور 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 به منظور مقابله با چالش‌های بیان شده باشد. مجموعه‌های کشنده مصنوعی اهدافی هستند که حمله به آن‌ها به صورت جداگانه تاثیر 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 برای پاسخ به پرسش‌های زیست‌پزشکی از طریق بررسی برهم‌کنش‌های پیچیده‌ی شبکه‌های زیستی است، در این پژوهش از این رویکرد به منظور 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 برای حمله هدفمند به مجموعه‌ای خاص از باکتری‌ها ارائه شد. در آخرین گام، از روش‌های توسعه داده شده برای یافتن اهداف دارویی به منظور 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 به منظور 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: اهداف دارویی انتخابی، زیست‌شناسی سامانه‌ای، سرطان، مدل‌های متابولیکی ژنوم-مقیاس، مجموعه‌های کشنده مصنوعی، مدلسازی مبتنی بر محدودیت

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه	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 به منظور مبارزه با عوامل بیماری‌زا	۶
۲-۴-۱- داروهای گزینشی به منظور 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: مروری بر تحقیقات پیشین	۱۱
۱-۲- مقدمه	۱۱
۲-۲- زیست‌شناسی سامانه‌های محاسباتی	۱۲
۳-۲- جعبه ابزارهای توسعه داده شده به منظور 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 به منظور شناسایی مجموعه کشنده‌های مصنوعی	۱۵
۶-۲- به کارگیری روش‌های محاسباتی با هدف یافتن اهداف دارویی برای مقابله با میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا	۱۷

۱۸	۷-۲- ایجاد مدل‌های متابولیکی بافت-خاص
۲۱	۸-۲- کاربرد مدل‌های متابولیکی بافت-خاص
۲۳	فصل سوم: مبانی مدل‌سازی
۲۳	۱-۳- انتخاب روش مدل‌سازی
۲۴	۲-۳- مدل‌سازی مبتنی بر محدودیت
۲۵	۳-۳- اجزای مدل‌های متابولیکی ژنوم-مقیاس
۲۵	۱-۳-۳- ماتریس استوکیومتری
۲۶	۲-۳-۳- ظرفیت‌ها
۲۶	۳-۳-۳- قوانین ارتباط ژن-پروتئین-واکنش (GPR)
۲۷	۴-۳- تحلیل موازنه جریان (FBA)
۲۸	۵-۳- تحلیل تغییرات جریان (FVA)
۲۹	۶-۳- شبیه‌سازی حذف واکنش و ژن
۲۹	۱-۶-۳- شبیه‌سازی حذف واکنش
۳۰	۲-۶-۳- شبیه‌سازی حذف ژن
۳۰	۷-۳- جستجوی اول-عمق (DFS)
۳۱	۸-۳- روش rFASTCORMICS

فصل چهارم: توسعه روش Rapid-SL به منظور شناسایی مجموعه

۳۳	کشنده‌های مصنوعی مرتبه بالا
۳۳	۱-۴- مقدمه
۳۳	۲-۴- نحوه پیاده‌سازی روش Rapid-SL
۳۴	۱-۲-۴- گام اول: شناسایی فضای بذر
۳۵	۲-۲-۴- گام دوم: جستجو در فضای بذر
۳۶	۳-۲-۴- شرایط عقبگرد و توقف در الگوریتم DFS
۳۸	۴-۲-۴- شمارش مجموعه‌های ژن‌های کشنده مصنوعی

- ۳-۴-۳- ارزیابی و مقایسه روش توسعه داده شده با روش‌های پیشین.....۳۹
- ۳-۴-۳-۱- کشنده‌های مصنوعی مربوط به سه میکروارگانسیم مورد مطالعه.....۳۹
- ۳-۴-۳-۲- مقایسه عملکرد روش Rapid-SL و روش‌های MCSEnumerator.....۳۹
- ۴-۴-۳- گسترش دامنه عملکرد Rapid-SL.....۴۰
- ۴-۴-۳-۱- جستجوی در لیستی از اهداف خاص.....۴۰
- ۴-۴-۳-۲- اعمال محدودیت در شاخه‌زنی الگوریتم DFS.....۴۱
- ۴-۴-۳-۳- بررسی انتخابی در بین شاخه‌های DFS.....۴۱
- ۴-۴-۳-۵- جمع بندی.....۴۳

فصل پنجم: تجزیه و تحلیل سیستماتیک متابولیسم میکروارگانسیم‌ها به

- منظور یافتن اهداف دارویی گزینشی.....۴۵
- ۱-۵-۱- مقدمه.....۴۵
- ۲-۵-۲- معرفی گام‌های پیاده سازی روش.....۴۶
- ۵-۲-۱- مرحله اول: انتخاب مدل‌های متابولیک ژنوم مقیاس.....۴۷
- ۵-۲-۲- مرحله دوم: تعریف شرایط محیطی مختلف.....۴۷
- ۵-۲-۳- مرحله سوم: شناسایی مجموعه‌های کشنده مصنوعی.....۴۷
- ۵-۲-۴- مرحله چهارم: اهداف دارویی بالقوه گزینشی و چند هدفه.....۴۸
- ۵-۲-۵- مرحله پنجم: اعمال محدودیت‌های سختگیرانه دیگر.....۴۸
- ۵-۳-۳- بررسی موردی برخی از حالت‌های خاص از پاسخ‌های بدست آمده.....۴۹
- ۵-۳-۱- هدف قرار دادن همه میکروارگانسیم‌ها به جز یکی.....۵۰
- ۵-۳-۲- حفظ همه میکروارگانسیم‌ها به جز یکی.....۵۰
- ۵-۳-۳- موارد بدون راه حل بالقوه.....۵۱
- ۵-۴-۴- مشارکت مسیرها متابولیکی در کیس‌های مختلف.....۵۱
- ۵-۴-۱- مسیرهایی که بیشترین دفعات مورد حمله قرار گرفته‌اند.....۵۲
- ۵-۴-۲- مسیرهایی که فقط توسط مجموعه‌های کشنده مصنوعی هدف قرار می‌گیرند.....۵۲
- ۵-۵-۵- واکنش‌های کلیدی.....۵۳

۵-۶- جمع بندی ۵۶

فصل ششم: یافتن اهداف دارویی انتخابی برای حمله به سلول‌های سرطانی ۵۸

۶-۱- مقدمه ۵۸

۶-۲- نحوه پیاده‌سازی روش ۵۸

۶-۲-۱- بازسازی مدل‌های بافت-خاص ۵۸

۶-۲-۲- استخراج مجموعه‌های کشنده مصنوعی ۵۹

۶-۲-۳- معیارهای انتخاب اهداف دارویی اکیداً انتخابی ۵۹

۶-۳- نتایج ۵۹

۶-۴- بحث در نتایج ۶۱

فصل هفتم: نتیجه‌گیری و جمع‌بندی ۶۴

۷-۱- توسعه نرم‌افزاری ۶۴

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

کشنده‌های مصنوعی ۶۵

۷-۳- یافتن اهداف دارویی انتخابی به منظور مبارزه با سرطان ۶۷

منابع ۶۹

پیوست (ها) ۸۳

پیوست ۱- کد مربوط به روش Rapid-SL و شبیه‌کد مربوطه ۸۴

پیوست ۲- اهداف دارویی انتخابی شناسایی شده در فصل پنجم ۸۶

پیوست ۳- تعداد پاسخ‌های شناسایی شده در گام چهارم و پنجم ۸۷

پیوست ۴- نرخ مشارکت مسیرها (Pathways) در کیس‌های مختلف ۱۰۲

پیوست ۵- لیست بافت‌های سرطانی مورد مطالعه و راه‌حل‌های اکیداً انتخابی

بدست آمده برای آن‌ها ۱۰۶

فهرست جدول‌ها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۲- جعبه ابزارهای توسعه داده شده به منظور مدل‌سازی و تحلیل مبتنی بر محدودیت.....	۱۳
جدول ۲-۲- خلاصه‌ای از روش‌های تولید مدل‌های بافت-خاص.....	۱۹
جدول ۳-۲- خلاصه‌ای از پژوهش‌های پیشین در زمینه بکارگیری مدل‌های بافت-خاص.....	۲۲
جدول ۱-۴- مقایسه تعداد مسائل بهینه‌سازی خطی حل‌شده در Rapid-SL و Fast-SL برای سه مدل مورد ارزیابی.....	۴۰
جدول ۲-۴- مقایسه روش‌های Rapid-SL و CNAMCSEnumerator2.....	۴۰
جدول ۳-۴- تعداد SLها و LPهای مربوطه در هر گروه از شاخه‌های Rapid-SL به منظور شناسایی کشنده‌های تکی تا چهارتایی توسط مدل iAF1260.....	۴۲
جدول ۴-۴- SLهای شناسایی شده با ارزیابی شاخه‌های دارای یک واکنش در گروه اولیه (گروه ۱ در جدول ۳-۴).....	۴۲
جدول ۵-۴- نتایج سه کاربرد معرفی شده.....	۴۳
جدول ۱-۵- لیست میکروارگانسیم‌های مورد مطالعه در این فصل و اسامی مدل‌های مربوط به هر یک از آن‌ها. اسامی میکروارگانسیم‌هایی که قبلاً به آن‌ها اشاره شده است به صورت خلاصه آورده شده است.....	۴۶
جدول ۲-۵- تعداد پاسخ‌های به دست آمده برای مواردی که در آن‌ها همه میکروارگانسیم‌ها به جز یکی هدف قرار می‌گیرند.....	۵۰
جدول ۳-۵- تعداد پاسخ‌های بالقوه شناسایی شده در مواردی که تنها یک میکروارگانسیم هدف قرار گرفته و قابلیت رشد دیگر میکروارگانسیم‌ها حفاظت شده است.....	۵۱
جدول ۴-۵- لیست مسیرهایی که در تمام ۶۳ مورد بدون میکروارگانسیم حفاظت شده، مورد حمله قرار می‌گیرند.....	۵۳
جدول ۵-۵- مجموعه‌ای از چهار واکنش که ۱۹۸ کیس از ۶۵۷ کیس را پوشش می‌دهد.....	۵۴

- جدول ۵-۶- مجموعه‌ای از هفت واکنش که زیرمجموعه آن‌ها ۲۳۶ مورد را پوشش می‌دهند..... ۵۴
- 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..... ۶۰

فهرست شکل‌ها

صفحه	عنوان
۱۵	شکل ۱-۲- شمایی از مفهوم کشندگی مصنوعی.....
۲۵	شکل ۱-۳- واکنش‌های R1، R3، R4، R6، و R9 واکنش‌های تبادلی هستند.....
۲۶	شکل ۲-۳- نمایش ساختار اساسی مدل متابولیکی برای شبکه.....
	شکل ۳-۳- مراحل محاسبه جریان در شبکه متابولیکی بازسازی شده به وسیله تحلیل موازنه جریان (FBA).....
۲۸	شکل ۴-۳- نمودار شماتیک محدوده تولید.....
۲۹	شکل ۵-۳- نحوه پیمایش یک گراف شماتیک با استفاده از روش جست‌وجوی اول-عمق.....
۳۱	شکل ۶-۳- شماتیکی از نحوه عملکرد روش rFASTCORMICS.....
۳۲	شکل ۱-۴- فلوجارت مربوط به روش توسعه داده شده.....
۳۴	شکل ۲-۴- اثر حذف واکنش غیر کشنده J_{nz}
۳۶	شکل ۳-۴- شماتیکی از جستجوی عمقی در پیاده سازی روش Rapid-SL.....
۳۸	شکل ۱-۵- درخت فیلوژنتیک شش میکروارگانیسم بدست آمده توسط iTOL.....
۴۶	شکل ۲-۵- شماتیک موارد مختلف مورد مطالعه.....
۴۹	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.....
۶۱	شکل ۲-۶- هدف‌های دارویی بالاقوه اکیداً انتخابی شناسایی شده در این مطالعه.....
۶۲	

فهرست نشانه‌های اختصاری

مفهوم	نشانه	مفهوم	نشانه
بردار جریان عبوری از واکنش‌ها	v	مقدار میانگین داده‌های بیان	μ
ماتریس استوکیومتری	S	مقدار انحراف معیار داده‌های بیان	σ

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 و

¹ Systems biology

² Integrated systems

³ Genomics, proteomics or metabolomics data

⁴ Predictive models

⁵ Computational systems biology

⁶ Descriptive science

آن را به سمت علوم قابل پیش‌بینی^۱ سوق می‌دهد [۷, ۱]. 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 گنجانند. 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 به منظور 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 به منظور 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 و ساختار آن‌ها می‌شود. از جمله پرکاربردترین این شبکه‌ها می‌توان به مواردی همچون شبکه‌های

¹ Predictive science

² In-silico experiments

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

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 به منظور 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 به منظور اعتبار سنجی نتایج، استفاده از این روش‌ها تنها به مدل‌سازی یک یا تعداد محدودی از مسیرهای متابولیکی^۹ محدود می‌شود [۱۲].

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

⁹ Metabolic pathways

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^۱). با توجه به چالش‌های مطرح شده برای سایر روش‌ها به منظور 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 به منظور 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^۲ 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^۳ 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)^۴ [۱۳] و یا تحلیل موازنه جریان (FBA)^۵ [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^۶ را تشکیل می‌دهند. به منظور محدودسازی بیشتر فضای حل و بدست آمدن محدوده‌ی جواب دقیق‌تر، از داده‌های آزمایشگاهی در سطح متابولیت و همچنین داده‌های با دقت بالا^۷ استفاده می‌شود. چند مورد از کاربرد این مدل‌ها به شرح زیر است [۱۵-۱۷]:

- مفهومی‌سازی داده‌های با حجم بالا^۸
- هدایت مهندسی متابولیک^۹
- اکتشاف مسیرهای متابولیکی پنهان^{۱۰}

¹ Constraint-based modeling

² Gene-protein-reaction relationship

³ Genome-scale metabolic models

⁴ Metabolic flux analysis (MFA)

⁵ Flux balance analysis (FBA)

⁶ Underdetermined system of linear equations

⁷ High throughput data

⁸ Contextualization of High-Throughput Data

⁹ Guidance of Metabolic Engineering

¹⁰ Discovery of Missing Pathways

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

- مطالعه ارتباطات بین چند گونه مختلف^۱
- اکتشاف ویژگی‌های شبکه^۲
- مطالعه بیماری‌ها^۳
- کشف اهداف دارویی در عوامل بیماری‌زا^۴

در سال‌های اخیر ابزارهای متعددی به منظور 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 COBRA^۵ [۲۱] بیش از دیگر ابزارها مورد استفاده قرار گرفته است.

۱-۴- 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^۶، تولید داروهای گزینشی^۷ و مبارزه با پدیده مقاومت دارویی^۸ کارآمد باشد.

اصطلاح «زیست‌نشانه‌گر» به زیر مجموعه وسیعی از علائم پزشکی اشاره دارد که می‌تواند به طور دقیق و قابل تکرار اندازه‌گیری شود [۲۲]. زیست‌نشانه‌گرها با علائم پزشکی^۹، که محدود به علائم

¹ Interrogation of multi-species relationships

² Network property discovery

³ Study of Diseases

⁴ Drug-targeting in pathogens

⁵ COntstraint-Based Reconstruction and Analysis

⁶ Biomarker identification

⁷ Selective drugs

⁸ Drug resistance

⁹ Medical symptoms

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 اندازه‌گیری شود و بروز هرگونه پیامد و یا بیماری را پیش‌بینی کند، اطلاق می‌شود. روش‌های بسیار متعددی به منظور شناسایی این زیست‌نشانگرها تا به حال ارائه شده است. استفاده از زیست‌شناسی سامانه‌ای محاسباتی برای شناسایی تفاوت‌های معنادار ایجاد شده در شبکه‌ی متابولیسی بین دو حالت مبنا و بیمار، می‌تواند یک روش مناسب به منظور یافتن این نشانگرها باشد. یکی از شناخته شده‌ترین مثال‌ها در زمینه تغییرات عملکردی در شبکه‌های متابولیسی و استفاده از آن در تشخیص بروز ناهنجاری، با عنوان اثر واربرگ^۱ [۲۳] شناخته می‌شود. این پدیده در سلول‌های سرطانی ایجاد شده و طی آن فرآیند تامین انرژی سلول بجای مسیر فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی^۲، از طریق مسیر گلیکولیز هوازی^۳ 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]. به منظور 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 هر یک از این دو گروه دارویی پرداخته خواهد شد.

۱-۴-۱- شناسایی اهداف دارویی گزینشی به منظور مبارزه با عوامل بیماری‌زا

از بین بردن عوامل بیماری‌زا (میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا) هدف اصلی هر درمان موثر عفونت است؛ با این حال، آنتی‌بیوتیک‌های طیف گسترده^۴ روش درمان بیماری‌های عفونی را تغییر داده‌اند. 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 یا غیرمستقیم بر میکروبیوم^۵ انسان، که به عنوان یک اندام مجازی در بدن انسان شناخته می‌شود، تأثیر بگذارند. میکروبیوم انسانی در دهه‌های اخیر در راستای علت شناسی بیماری‌های کبد [۲۷،

¹ Warburg effect

² Mitochondrial oxidative phosphorylation

³ Aerobic glycolysis

⁴ Broad-spectrum antibiotics

⁵ Microbiome

بررسی سامانه‌های تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

[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^۱، کاهش تنوع میکروبی، و پتانسیل ظهور میکروارگانیسم‌های مقاوم به دارو می‌باشد [۳۶]. علاوه بر این، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های طیف گسترده، به‌ویژه تتراسایکلین‌ها و ماکرولیدها، ممکن است با ایجاد سندرم روده تحریک‌پذیر (IBS)^۲ [۳۷] مرتبط باشند. اثرات آنتی‌بیوتیک‌ها بر بیماری التهابی روده (IBD)^۳ [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^۴ را با به حداقل رساندن تغییرات در میکروبیوم بیمار [۲۵، ۴۴-۴۷] پیشنهاد می‌کنند.

۱-۴-۲- داروهای گزینشی به منظور مبارزه با سلول‌های سرطانی

تغییرات متابولیکی^۵ باعث ایجاد اثرات مختلفی در نرخ جریان مسیرهای متابولیکی مختلف در سلول‌های سرطانی می‌شود. آتو واربرگ برای نخستین بار به این تغییرات متابولیکی توجه کرد که در آن گلیکولیز هوازی^۶ به جای فسفریلاسیون اکسیداتیو^۷ در سلول‌های سرطانی ترجیح داده می‌شود [۴۸]. اثر واربرگ^۸ 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 سرطان‌های مختلف گزارش شده است. به عنوان مثال، فعالیت مسیر گلوتامینولیز^۹ نیز در سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد تا با افزایش گلیکولیز^{۱۰}، تامین انرژی و ماده مورد نیاز برای نرخ تکثیر بالاتر را تسهیل نماید [۶۱، ۶۲]. ناهنجاری در مسیرهای دیگر مانند مسیر سنتز لیپید^۱

^۱ ریزویواگان یا میکروبیوتا (Microbiota) جوامع بوم‌شناختی از میکروارگانیسم‌های همسفره، هم‌زیست و بیماری‌زا است.

^۲ Irritable bowel syndrome

^۳ Inflammatory bowel disease

^۴ Narrow-spectrum antibiotics

^۵ Metabolic alterations

^۶ Aerobic glycolysis

^۷ Oxidative phosphorylation

^۸ Warburg effect

^۹ Glutaminolysis pathway

^{۱۰} Glycolysis

لیپید^۱ [۶۳]، متابولیسم اسیدهای آمینه‌های شاخه‌دار^۲، مسیر سنتز سرین^۳ [۶۴] و مسیر پنتوز فسفات^۴ [۶۵] نیز در مقالات و منابع گزارش شده است. تغییر شکل متابولیسمی در سلول‌های سرطانی همچنین فرصت‌های ویژه‌ای برای اجتناب از سیستم ایمنی [۶۶]، اختلال در آپوپتوز [۶۷] و مصرف محصولات زائد معمول سلول‌ها مانند آمونیا، کتون بادی‌ها^۵، استات، لاکتات و سایر پروتئین‌های خارجی [۶۴] فراهم می‌کند. شناسایی و تعیین ویژگی‌های متابولیسمی ویژه سرطان، راهی را برای توسعه استراتژی‌های درمانی انتخابی که تنها بر سلول‌های سرطانی تأثیر می‌گذارد و به سلول‌های سالم آسیب نمی‌رساند، ممکن می‌سازد [۶۸].

۱-۴-۳- معرفی داروهایی چند هدفه

میکروارگاناسم‌های بیماری‌زای متعددی با نشان دادن مقاومت چند دارویی^۶ 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^۷ 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^۸ اشاره کرد. مجموعه واکنش‌ها یا ژن‌های کشنده ترکیبی به گونه‌ای عمل می‌کنند که حذف به یک باره 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 مقاومت دارویی ایجاد کرده است. برای یافتن دارویی با چنین ویژگی‌هایی، می‌توان تغییرات ایجاد شده توسط اهداف دارویی بالقوه^۹ متعددی را در رفتار شبکه متابولیسمی بررسی کرد و با تعریف معیارهای مناسب، اهداف دارویی با قدرت بازدارندگی بیشتری را معرفی نمود.

¹ Lipid synthesis pathway

² Branched-chain amino acid metabolism

³ Serine synthesis pathway

⁴ Pentose phosphate pathway

⁵ Ketone bodies

⁶ Multi-drug resistance

⁷ Essential gene or reaction

⁸ Synthetic lethal drugs

⁹ Potential drug targets

بررسی سامانه‌های تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

از سوی دیگر در سلول‌های سرطانی نیز هدفگیری تنها به یک ژن ممکن است مشکلات مختلفی ایجاد کند [۷۳]. 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 [۷۴]. 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 کسندگی مصنوعی را پیشنهاد می‌دهند [۷۴-۷۶]. علاوه بر این، فرضیه‌هایی مطرح شده است که می‌توان با هدفگیری یک مجموعه ژن کسندنده مصنوعی متعلق به جهشی مرتبط با سرطان، استراتژی‌های درمانی انتخابی را شناسایی نمود [۷۷]. اخیراً، دسترسی گسترده به ابزارهای مبتنی بر CRISPR، امکان شناسایی مجموعه‌های کسندنده مصنوعی را به صورت تجربی تسهیل کرده است [۷۵، ۷۸]. همچنین، رویکردهای محاسباتی مختلف به طور قابل توجهی برای شناسایی اهداف دارویی سرطان توسعه یافته‌اند [۷۹]. شبکه‌های متابولیکی بافت-خاص که از مدل‌های ژنوم-مقیاس استخراج شده‌اند ابزارهای قابل اعتمادی برای دستیابی به استراتژی‌های درمانی با بررسی تغییرات عملکردی در شبکه متابولیکی و یا شناسایی و معرفی اهداف دارویی انتخابی [۸۰-۸۵] با کمک مفهوم کسندگی مصنوعی [۸۶] 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 (به منظور دستیابی به داروهای چند هدفه) بسیار ارزشمند خواهد بود. به منظور دستیابی به هر یک از موارد ذکر شده در بستر زیست‌شناسی سامانه‌ای محاسباتی، نیاز به 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. درگام دوم نیز، پس از ارائه یک ابزار مناسب در راستای بررسی سازمان یافته شبکه متابولیکی سلول‌های مورد مطالعه، شناسایی و معرفی اهداف دارویی انتخاب پذیر با تکیه بر مفهوم کسندگی 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. به منظور کارآمدی بیشتر، این روش‌ها می‌بایست تعاملات چند وجهی بین بسیاری از عناصر شبکه‌های زیستی را در نظر بگیرند [۸۷]. 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 به منظور بررسی مدل‌های مبتنی بر محدودیت

روش‌های مدل‌سازی مبتنی بر محدودیت بر اساس روش‌های ریاضی پیچیده‌ای توسعه داده شده اند 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 برنامه‌نویسی Java حل کرده‌اند.

¹ Constraint-based models

² Genome-scale reconstruction

³ Genome-scale metabolic models

⁴ Systematic

بررسی سامانه‌های تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

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

مرجع	توضیحات	سال	بستر توسعه	نام روش
[۸۸]	اسکرپت‌های پیاده‌سازی الگوریتم‌های تحلیل مسیر متابولیکی	۱۹۹۹	GNU Octave/ MATLAB	METATOOL
[۸۹]	تحلیل‌گر شبکه‌های متابولیکی با یک رابط کاربری گرافیکی	۲۰۰۳	MATLAB	FluxAnalyzer
[۹۰]	ابزاری چند پلتفرم برای تحلیل مدل‌سازی بر مبنای گراف و محدودیت با یک رابط کاربری کاربرپسند	۲۰۰۵	Java	YANA
[۹۱]	ابزاری ماژولار مدل‌سازی بر اساس محدودیت با چندین روش پیش‌بینی فنوتیپ و تحلیل جریان	۲۰۰۷	MATLAB	COBRA Toolbox
[۹۲]	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
[۹۳]	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
[۹۴]	جعبه ابزاری برای بازسازی و تحلیل مدل‌های مبتنی بر محدودیت با پشتیبانی از داده‌های multi-omics	۲۰۱۳	MATLAB	RAVEN
[۹۵]	جعبه ابزار مدل‌سازی شبکه متابولیکی با پشتیبانی از روش‌های بهینه‌سازی extra arithmetic	۲۰۱۴	MATLAB	MONGOOSE
[۹۶]	چارچوب ماژولار مدل‌سازی بر اساس محدودیت با روش‌های شبیه‌سازی مبتنی بر FBA	۲۰۱۹	Python	ReFramed
[۹۷]	چارچوب متن باز با معماری ماژولار با قابلیت پشتیبانی 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، ۹۸، ۹۹].

¹ Systematic

۲-۴- بررسی تاثیر حذف اهداف مختلف از شبکه و مفهوم کشندگی مصنوعی^۱

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 [۱۰۰]:

الف) حذف عوامل بیماری‌زا [۷۱]، ب) بررسی حذف متابولیت‌ها از شبکه و یا آنالیز متابولیت محور^۲ [۱۰۳-۱۰۱]، و ج) هدف قرار دادن واکنش‌ها و ژن‌های حیاتی^۳ [۱۰۴-۱۰۸]. 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^۴) 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 [۱۰۹]. با بسط این مفهوم، هنگامی که تعداد اهداف افزایش می‌یابد، مجموعه‌های کشنده مصنوعی مرتبه بالاتر^۵ (بیش از دو هدف) را می‌توان به دست آورد [۱۰۹]. شکل ۲-۱ 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 [۱۱۰]. 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 داپتوماپسین، سفوپرازون و داکسی‌سایکلین برای مبارزه با *Borrelia burgdorferi*^۶ [۱۱۱] 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 [۱۱۰].

¹ The concept of synthetic lethality

² Metabolite-centric targeting

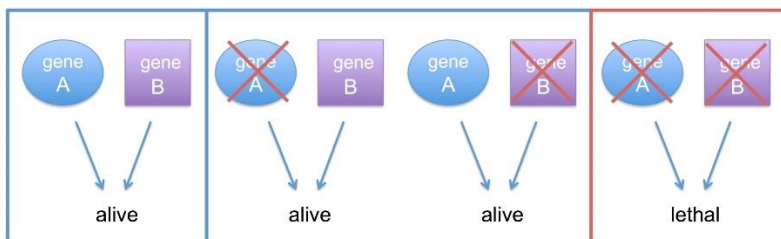
³ Essential reactions and genes

⁴ Synthetic lethality

⁵ Higher-order synthetic lethals

⁶ *Borrelia burgdorferi*

بررسی سامانه‌های تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...



شکل ۲-۱- شمایی از مفهوم کشتندگی 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.

[۱۱۲]

۲-۵- روش‌های محاسباتی مبتنی بر محدودیت به منظور شناسایی مجموعه کشتنده‌های مصنوعی

همانطور که قبلاً ذکر شد، از پدیده مقاومت دارویی به عنوان یک دغدغه مهم در زمینه مبارزه با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا یاد می‌شود. به همین منظور شناسایی اهداف دارویی جدید بر اساس مفهوم کشتندگی مصنوعی می‌تواند راه حل مناسبی برای مقابله با این مقاومت دارویی باشد. با این حال، مقایسه اثر مجموعه‌های کشتنده مصنوعی مختلف بر روی شبکه متابولیکی و عملکرد آن نشان می‌دهد که برخی از مجموعه‌های با کاردینالیته^۱ بالاتر می‌توانند اثرات قوی‌تر و عمیق‌تری بر روی شبکه داشته باشند.

دو رویکرد برای شناسایی محاسباتی SLها استفاده می‌شود: الف) بررسی تمامی حالات امکان 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 [۱۰۸، ۱۱۳]. 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^۲، زمان محاسباتی مورد نیاز برای جستجوی جامع، بیش از ۱۸۰ روز برای به دست آوردن تمام SLهای چهارگانه برای باکتری *اشریشیا کلی* (ای کلی)^۳ با استفاده از مدل iAF1260 [۱۱۴] 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

^۱ Cardinality

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

^۳ *Escherichia coli*

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 [۱۰۹] را پیدا کنند، در حالی که هدف برخی از روش‌های دیگر یافتن همه SLها است [۱۱۵-۱۲۰]. یکی از این روش‌ها که SL Finder نام دارد، جستجوی مبتنی بر بهینه‌سازی را برای شناسایی جامع و هدفمند SLها انجام می‌دهد [۱۰۹]. به منظور کاهش فضای جستجو، این روش از آنالیز جریان‌های همبسته^۱ [۱۲۱] استفاده می‌کند تا تنها یکی از واکنش‌های کاملاً همبسته^۲ 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 ای/کی با مدل iAF1260 [۱۱۴] استفاده شد.

روش دیگری به نام MCSEnumerator استراتژی‌های مداخله را با برش‌مردن حالت‌های ابتدایی شبکه دوگانه^۳ [۱۲۲] شبکه متابولیکی مربوطه [۱۱۵] پیدا می‌کند. روش MCSEnumerator یک رویکرد قدرتمند به ویژه برای کاربرد آن در زمینه‌های مهندسی متابولیک است. برای به دست آوردن چارچوب تعمیم یافته MCSEnumerator و تسریع در محاسبات شبکه دوگانه، بهبودهای بیشتری در این رویکرد صورت گرفت [۱۱۶-۱۱۸]. روش MCSEnumerator برای یافتن همه SLهای دو تا پنجگانه در iAF1260 مورد استفاده قرار گرفت [۱۱۵]. 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.

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 [۱۱۹]. 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 آورندگان این روش از شناسایی ۱۲۷ ژن کشنده مصنوعی جدید در ای/کی خبر دادند که توسط روش SL Finder پیدا نشده بود. همچنین، Fast-SL با یافتن همان SLها، چهار برابر سریع‌تر از MCSEnumerator عمل می‌کند. Fast-SL ایده ارزشمندی برای یافتن SLها در فضای جستجوی کاهش یافته ارائه کرد، اما پیاده سازی این روش دو اشکال عمده

¹ Flux-coupling analysis

² Fully coupled

³ Elementary modes of the dual network

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

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 LTM^۱ 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، به منظور در نظر گرفتن رابطه ژن‌ها و واکنش‌ها تغییر می‌دهد [۱۲۰]. 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، به منظور یافتن SLها مسائل بهینه‌سازی خطی (LP) بیشتری 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 هلیکوباکتر پیلوری (اچ پیلوری)^۲، مایکوباکتریوم توبریکلوزیس (ام توبریکلوزیس)^۳، استافیلوکوکوس اورئوس (اس اورئوس)^۴ [۱۲۳]، اسینتوباکتر بومانی (ای بومانی)^۵ [۱۰۱] و سودوموناس آئروژینوزا (پی آئروژینوزا)^۶ [۱۲۴] شناسایی شده‌اند. از جمله این مطالعات، می‌توان به پژوهش لی و همکاران [۱۲۳] اهداف دارویی گزینشی را برای چهار عامل بیماری‌زا را با استفاده از آنالیز نقطه خفگی^۷ [۱۲۵] ارائه کرده‌اند.

^۱ Logical transformation of genome-scale metabolic models

^۲ *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

^۳ *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*)

^۴ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

^۵ *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*)

^۶ *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)

^۷ Choke-point analysis

۲-۷- ایجاد مدل‌های متابولیکی بافت-خاص^۱

همان طور 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، به منظور بررسی عملکرد متابولیکی یک سلول خاص باید تنها واکنش‌هایی که ژن مربوط به آنزیم 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. به منظور تولید این مدل‌ها باید به نحوی داده‌های مربوط به بیان^۲ ژن‌ها (مانند داده‌های RNA-seq) با شبکه ادغام شود. با توجه به این که داده‌های بیان به دلیل وجود مراحل پیچیده‌ی تغییرات پسا ترجمه^۳، به منظور 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 Context-specific metabolic models

² Expression data

³ Post-transcriptional modifications

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

جدول ۲-۲- خلاصه‌ای از روش‌های تولید مدل‌های بافت-خاص [۱۲۶]

نام روش	توضیحات	داده‌های ورودی	استخراج زیر شبکه	روش بهینه سازی	الزام وجود تابع هدف متابولیکی	مرجع
GIMME	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.	ترنسکریپتومیک	بله	برنامه ریزی خطی	بله	[۱۲۷]
iMAT	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.	ترنسکریپتومیک	بله	برنامه ریزی خطی عدد صحیح آمیخته ^۱	خیر	[۱۲۸]
INIT	به هر واکنش یه وزن می‌دهد و تطابق بین جریان عبوری از واکنش‌ها و ضرایب مشخص شده را بیشینه می‌کند. به صورت اختیاری، می‌توان اجازه تجمع یک ماده خاص را داد.	ترنسکریپتومیک و پروتئومیک	بله	برنامه ریزی خطی عدد صحیح آمیخته	خیر	[۱۲۹]
tINIT	با قابلیت تعریف وظایف متابولیکی برای INIT نسخه ارتقا یافته سلول‌های یک بافت خاص.	ترنسکریپتومیک	بله	برنامه ریزی خطی	خیر	[۸۰]
mCADRE	بر اساس ساختار شبکه و داده‌های بیان مجموعه‌ای از واکنش‌های مرکزی را تشکیل می‌دهد. دیگر واکنش‌ها، در صورتی که حذف آن‌ها فعالیت واکنش‌های مرکزی را مختل نکند، کنار گذاشته می‌شوند.	ترنسکریپتومیک	بله	برنامه ریزی خطی	خیر	[۱۳۰]

¹ Mixed-integer linear programming

مروری بر تحقیقات پیشین

[۱۳۱]	خیر	برنامه ریزی خطی	بله	واکنش‌های مرکزی	یک زیرشبکه سازگار شامل تمامی واکنش‌های مرکزی به علاوه‌ی حداقل واکنش‌های غیرمرکزی ممکن تشکیل می‌دهد.	FASTCORE
[۱۳۲]	خیر	برنامه ریزی خطی	بله	ترنسکریپتومیک	که امکان اضافه کردن واکنش‌های FASTCORE یک نسخه اصلاح شده از غیر مرکزی و همچنین واکنش تولید زیست توده را به کاربر می‌دهد.	FASTCORMICS
[۱۳۳]	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
[۱۳۴]	بله	برنامه ریزی خطی	خیر	ترنسکریپتومیک و فنوتیپیک	داده‌های فنوتیپی را به منظور تعیین واکنش‌های مرتبط با فنوتیپ بکار می‌گیرد و بازه آن واکنش‌ها را مشخص می‌کند.	PRIME
[۱۳۵]	بله	برنامه ریزی خطی	خیر	رنسکریپتومیک و فنوتیپیک	از داده‌های فنوتیپی برای تعیین یک ثابت به منظور 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 [۱۳۶]. از این رو روش‌هایی به منظور یافتن بهتر این مقدار و بهبود عملکرد مدل‌ها ارائه شده است. از میان این روش‌ها، StanDep یک روش موفق به منظور 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^۱ بدست می‌آید [۱۳۷]. 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 [۱۳۸] 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 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 به منظور 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، مربوط به استفاده از تکنیک‌های توالی‌گیری^۲ 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

^۱ Clustering

^۲ Sequencing techniques

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 به منظور درمان سرطان کلیوی استفاده می‌شود.
[۱۳۹]	بازسازی یک مدل متابولیکی اختصاصی برای سرطان کلیه و شناسایی ۵ فرضیه جایگزین برای درمان
[۱۴۰]	استفاده از مجموعه‌های کشنده مصنوعی دوگانه به منظور یافت هدف دارویی برای سرطان. بررسی تاثیر کشندگی ژن <i>RRMI</i> بر روی سلول‌های میلوما
[۱۲۹]	بازسازی خودکار مدل‌ها برای ۶۹ بافت طبیعی و ۱۶ رده سلول سرطانی
[۱۳۴]	بازسازی ۶۰ رده سلول سرطانی با پیش‌بینی هدف‌های دارویی و اعتبارسنجی تجربی به صورت محدود
[۸۰]	بازسازی ۲۷ مدل بیمار-خاص از کارسینومای هیپاتوسلولار (سرطان کبد) که علاوه بر گزینه‌های درمانی مشترک، گزینه‌های درمانی فردی هم نشان پیشنهاد شده است.
[۱۴۱]	تعیین معادله رشد سلولی انسان برای بررسی متابولیسم سرطانی و اثر واربارگ
[۱۴۲]	شناسایی ویژگی‌های عملکرد متابولیکی در دو نوع سرطان ریه
[۱۴۳]	بازسازی هیپاتوسیت انسان (HepatoNet1) برای بررسی پاسخ‌های کبد به وضعیت‌های متابولیکی تغییر یافته
[۱۴۴]	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.
[۱۲۹]	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.
[۱۴۵]	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 [۹۹]:

- 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 به منظور مدل‌سازی سامانه‌های بزرگ زیستی یاد کرد. از مدل‌های به دست آمده از این روش با عنوان مدل‌های مبتنی بر محدودیت¹ 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).

با توجه به چهار فرضیه فوق، تغییر غلظت‌های متابولیت‌ها (که با نماد c نشان داده شده است)

¹ Constraint-based models

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

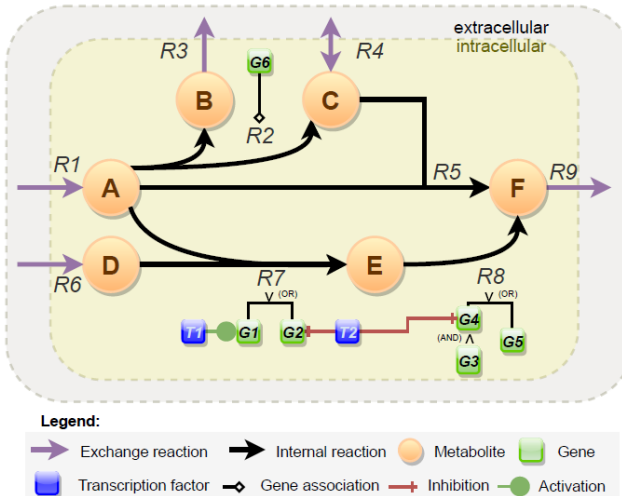
به مرور زمان (نشان داده شده با نماد t) از طریق (۳-۱) قابل بیان است [۱۴۶].

$$\frac{dC(t)}{dt} = Sv = 0 \quad (۱-۳)$$

(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 شده‌اند.



شکل ۳-۱- واکنش‌های $R1, R3, R4, R6, R9$ و واکنش‌های تبدیلی هستند (نشان داده شده با رنگ بنفش). قوانین ژن-پروتئین-واکنش^۱ از طریق ژن‌ها (مربع‌های سبز) که با اپراتورهای بولین^۲ ارتباط دارند نشان داده شده‌اند. اطلاعات بیشتر مربوط به داده‌های بیانی ژن‌ها می‌باشد که با مربع‌های آبی نشان داده شده‌اند [۱۴۷].

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

¹ Gene-Protein-Reaction

² Boolean

است و هر مقدار S ضریب استوکیومتری برای متابولیت i در واکنش j را نشان می دهد. 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

$$S \times v = 0$$

v_1
 v_2
 v_3
 v_4
 v_5
 v_6
 v_7
 v_8
 v_9
 0

شکل ۳-۲- نمایش ساختار اساسی مدل متابولیکی برای شبکه نشان داده شده در شکل ۳-۱ که محدودیت های وضعیت پایا^۱ را تعیین می کند [۱۴۷]

۳-۳-۲- ظرفیت ها

به منظور نشان دادن قابلیت برگشت پذیری و یا پذیرفتن ظرفیت های خاص که از داده های fluxomics بدست می آیند، نرخ واکنش ها می توانند به مقادیری خاص محدود شوند. برای این منظور، برای هر جریان v_i ، نامساوی های خطی به مدل اضافه می شود. برای هر جریان v_i ، مقادیر حداکثر (u_i) و حداقل (l_i) تنظیم می شوند (نامساوی **(Error! Reference source not found.)**). اگر $l_i \geq 0$ باشد، واکنش i برگشت ناپذیر محسوب می شود. اگر $l_i < 0$ و $u_i > 0$ باشد، واکنش می تواند به صورت دوطرفه (برگشت پذیر) اتفاق بیفتد. ظرفیت های جریان به ویژه برای واکنش های تبدیلی^۲ بسیار مهم هستند. باید در نظر داشت که این واکنش ها برای تعیین نرخ میزان جذب یا اجازه و امکان تولید هر متابولیت داده شده لازم هستند.

$$l_i \leq v_i \leq u_i \quad (2-3)$$

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

به منظور درج روابط بین ژن ها و واکنش ها در مدل های متابولیکی ژنوم مقیاس، از قوانین ژن-پروتئین-واکنش (قوانین GPR)، که به صورت روابط منطقی بین ژن ها مطرح می شوند، استفاده

¹ Steady state

² Exchange reactions

³ Gene-protein-reaction rules

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

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 به منظور 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 زیست‌توده^۱» 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 خطی تشکیل می‌شود که با توجه به تعداد زیاد متغیرها، روش‌های ویژه متعددی به منظور حل آن‌ها توسعه داده شده است. در مسئله (۳-۳) خلاصه مباحث مطرح شده در قالب فرمول‌های ریاضی آورده شده است:

$$\max. v_{bio}$$

subject to:

$$S \cdot v = 0$$

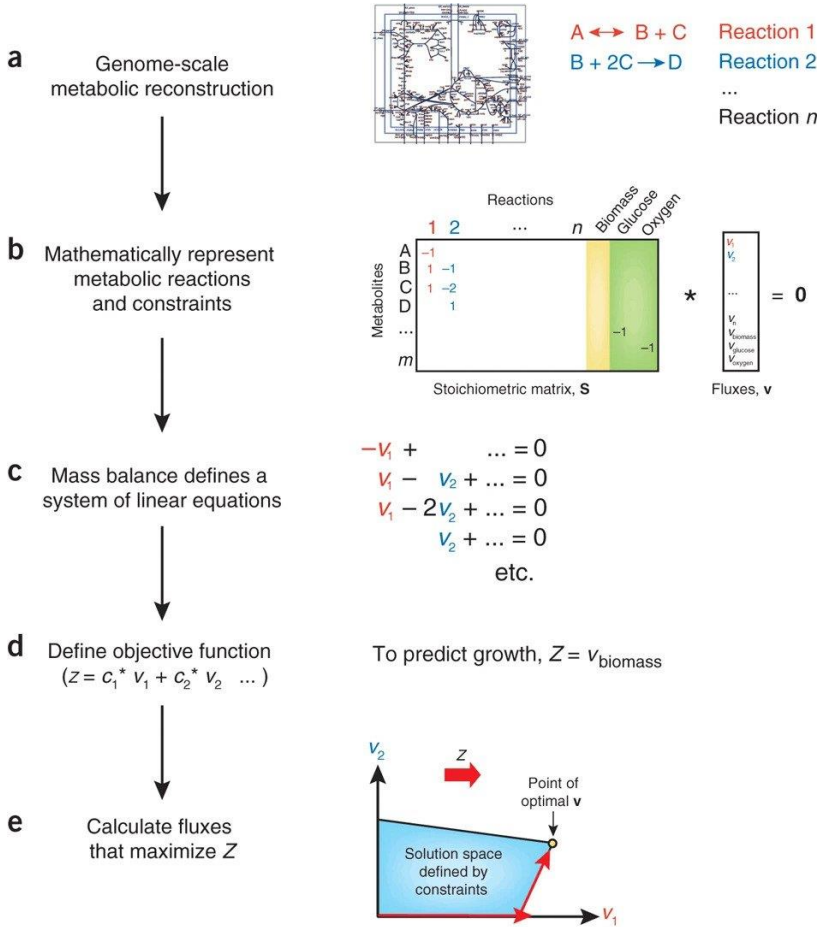
(۳-۳)

$$v_{lb} \leq v \leq v_{ub}$$

در مسئله (۳-۳)، v_{bio} نشان دهنده فلاکس عبوری از واکنش زیست‌توده، ماتریس S نماینده ماتریس استوکیومتری و وکتور v نشان دهنده جریان عبوری از واکنش‌ها می‌باشد. شکل ۳-۳ به

¹ Biomass reaction

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 (FBA) [۱۴]

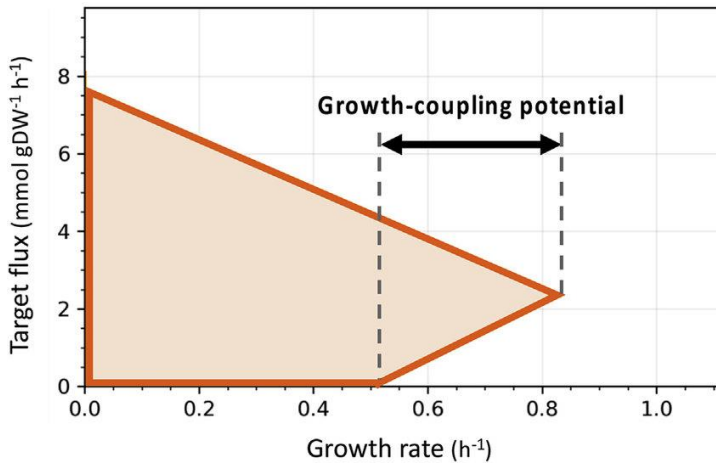
۳-۵- تحلیل تغییرات جریان (FVA)^۱

در حل دستگاه‌های جبری خطی فراموش با استفاده از روش مدل سازی مبتنی بر محدودیت، به طور معمول به جای یک جواب مشخص، برای هر مجهول یک بازه از جواب تعیین می گردد که به ازای هر مقدار از آن بازه، شرایط مسئله برقرار می گردد. در بحث محاسبه جریان در شبکه‌های متابولیکی نیز همین موضوع مطرح می شود و محاسبه این بازه جریان برای واکنش‌های مختلف اهمیت خاصی دارد. محاسبه این بازه با روش تحلیل تغییرات جریان (FVA) [۱۴۸] انجام می پذیرد. با استفاده از روش FVA تحلیل‌های کاربردی را می توان انجام داد که از جمله آن‌ها

^۱ Flux variability analysis

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

رسم نمودار محدوده‌ی تولید^۱ 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 همبند رشد^۲ نامیده می‌شود [۱۴۹]

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، تحلیل این نمودار و مقایسه آن در حالت‌های مختلف می‌تواند ابزار بسیار مناسبی به منظور 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. به منظور 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،

¹ Production envelope

² growth-coupled

عدم عبور قطعی جریان از این واکنش معادل عدم وجود واکنش در شبکه خواهد بود. بنابراین مسئله به صورت زیر بیان می‌شود:

$$\begin{aligned} & \max v_{bio} \\ & \text{subject to:} \\ & \quad S \cdot \mathbf{v} = 0 \\ & \quad \mathbf{v}_{lb} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{v}_{ub} \\ & \quad v_{lb(i), v_{ub(i)}} = 0 \end{aligned} \tag{۴-۳}$$

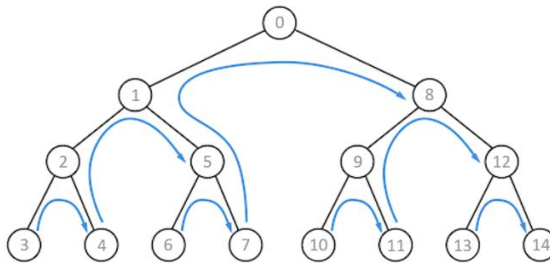
که در مسئله (۴-۳)، i نشان‌دهنده اندیس واکنشی است که از سیستم حذف خواهد شد.

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)

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 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 [۱۵۰]. شماتیکی از این روش در شکل ۳-۵ نشان داده شده است.



^۱ Depth-first search

^۲ Backtracking

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

شکل ۳-۵- نحوه پیمایش یک گراف شماتیک با استفاده از روش جست‌وجوی 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 [۱۵۱]

۳-۸- روش rFASTCORMICS

پاچکو و همکاران در مقاله خود نشان دادند که rFASTCORMICS ابزاری موثر برای بازسازی مدل‌های محیط خاص است [۱۳۸]. 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 [۱۳۶، ۱۵۲]. روش rFASTCORMICS از روشی که توسط هارت و همکاران [۱۵۳] پیشنهاد شده برای مشخص کردن آستانه فعالیت به منظور به‌دست‌آوردن 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 به‌دست‌آمده 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) آورده شده است.

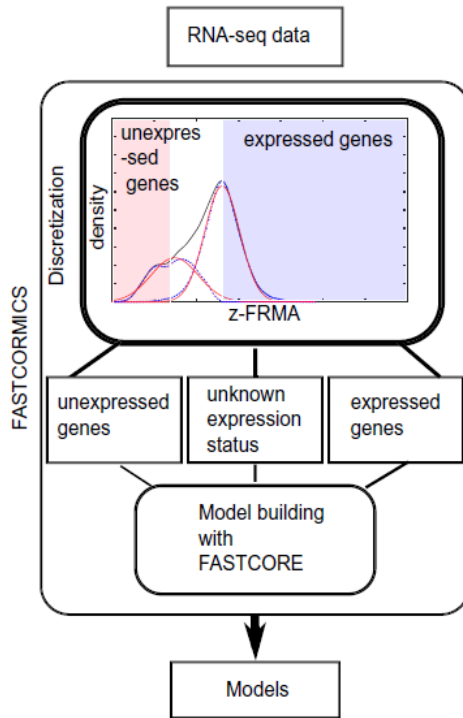
$$z\text{FPKM} = \frac{\log_2(\text{FPKM}) - \mu}{\sigma} \quad (۳-۵)$$

اگر میانگین منحنی عدم بیان بیشتر از ۳- (با واحد zFPKM) باشد، آنگاه مقدار ۳- به عنوان حد عدم بیان انتخاب می‌شود و ژن‌هایی با مقادیر zFPKM کمتر به عنوان غیرفعال با امتیاز ۱- در نظر گرفته می‌شوند. از سوی دیگر، «آستانه بیان» به عنوان مقدار zFPKM برابر با ۰ انتخاب می‌شود و ژن‌هایی با مقادیر zFPKM بیشتر به عنوان فعال با امتیاز ۱+ در نظر گرفته می‌شوند. ژن‌هایی که مقادیر zFPKM آن‌ها بین این دو آستانه قرار دارد، به عنوان وضعیت بیان ناشناخته با امتیاز صفر در نظر گرفته می‌شوند. در نهایت، با استفاده از قوانین GPR^۳، امتیازهای بیان ژن‌ها به واکنش‌های متناظر نگاشت می‌شوند و باندهای مربوط به این واکنش‌های غیرفعال در مدل، برابر با صفر قرار داده می‌شود. نحوه عملکرد این روش به صورت خلاصه در شکل ۳-۶ نشان داده

¹ Threshold

² Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

³ Gene-protein-reaction rules



شکل ۳-۶- شماتیکی از نحوه عملکرد روش FASTCORMICS [۱۳۸]

فصل چهارم

توسعه روش Rapid-SL به منظور شناسایی مجموعه کشنده‌های مصنوعی مرتبه بالا

۴-۱- مقدمه

همانطور که در فصل دوم اشاره شده، روش‌های متعددی به منظور شناسایی مجموعه‌های کشنده مصنوعی توسعه داده شده‌اند. با این وجود با توجه به وسعت فضای جستجو برای 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 منظور نیاز به توسعه روش دیگر یا انجام اصلاحات اساسی بر روی روش‌های موجود می‌باشد.

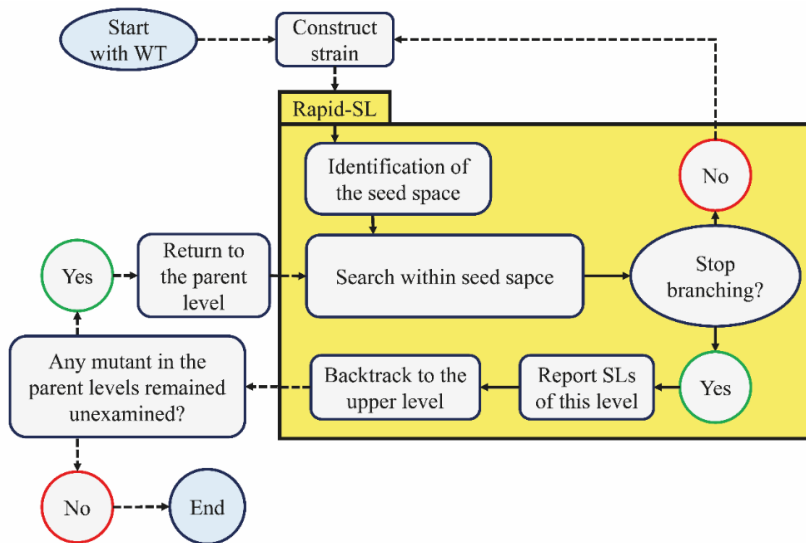
در این فصل نحوه پیاده‌سازی روش Rapid-SL که به عنوان یک روش جدید به منظور دستیابی سریع‌تر به SLهای مرتبه بالا می‌باشد، شرح داده شده است. در ابتدا خلاصه‌ای از نحوه پیاده‌سازی روش بیان شده است؛ سپس هر مرحله به تفصیل شرح داده خواهد شد. در ادامه نتایج مربوط به ارزیابی روش و همچنین SLهای مرتبه‌بالای استخراج 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 [۱۱۹]. بنابراین، برای کاهش فضای

توسعه روش Rapid-SL به منظور شناسایی مجموعه کشنده‌های مصنوعی ...

جستجو، ابتدا مجموعه‌ای از واکنش‌های حامل شار را شناسایی کرده و بر روی آن تمرکز می‌کنیم که در این کار با عنوان مجموعه J_{nz} یا فضای بذر^۱ اشاره می‌شود. در مرحله دوم، به منظور یافتن SLها، در فضای بذر 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^۲ مربوط به روش توسعه داده شده در پیوست ۱ آورده شده است. فلوچارت نشان داده شده در شکل ۴-۱ یک شماتیک از نحوه کارکرد روش Rapid-SL را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۱- فلوچارت 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 فضای بذر

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 Seed Space

² Pseudocode

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

شاره‌های عبوری از تمامی واکنش‌ها به حداقل می‌رسد:

$$\begin{aligned} & \min \sum_j |v_j| \\ & \text{subject to:} \\ & v_{bio} = v_{bio, WT} \\ & S.v = 0 \\ & v_{lb} \leq v \leq v_{ub}, \end{aligned} \quad (1-4)$$

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

$$\begin{aligned} & \max v_{bio} \\ & \text{subject to:} \\ & S.v = 0 \\ & v_{lb} \leq v \leq v_{ub}. \end{aligned} \quad (4-3)$$

هدف از محاسبه این توزیع شار، مشخص کردن واکنش‌های حامل شار یا فضای بذر است. استفاده از تحلیل تغییر پذیری شار [۱۴۸] 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.

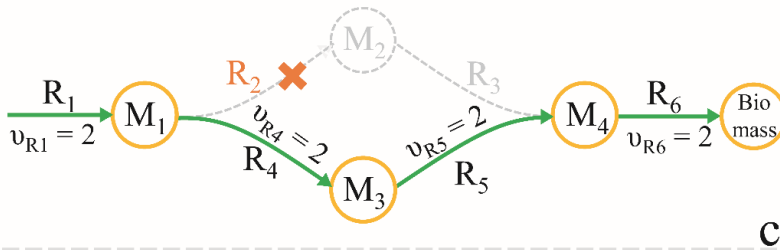
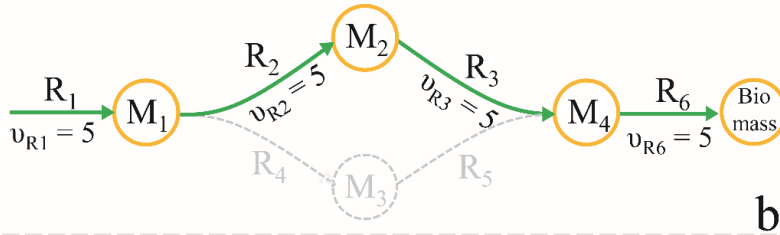
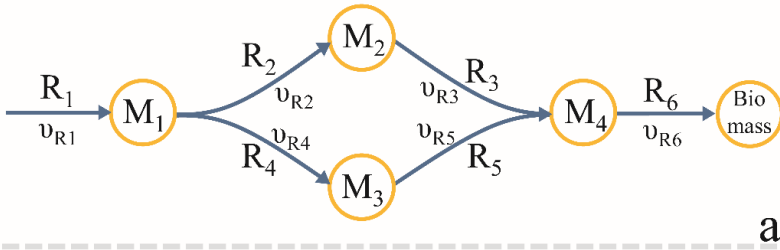
۴-۲-۲- گام دوم: جستجو در فضای بذر

تمام ترکیبات واکنش‌ها در فضای بذر پتانسیل تشکیل SL را دارند. بنابراین جستجوی جامع بر روی مجموعه واکنش‌های موجود در فضای بذر 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 $J_{nz} = (R_1, R_2, R_3, R_6)$ (c) توزیع شار سویه جهش یافته که در آن R_2 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 [۱۱۹]، 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 فضای بذر 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 حذف در مراحل بعدی الگوریتم DFS تعیین می‌شود، باید از فضای بذر سویه مجازی مادر سرچشمه بگیرد.

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

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 تکرارشونده روبرو هستیم که با استفاده از الگوریتم DFS مدیریت می‌شود. سایر الگوریتم‌های جستجوی سازمان‌یافته مانند روش جست‌وجوی اول-سطح^۱ [۱۵۵] و ابتدا-بهترین^۲ [۱۵۶] به جای DFS می‌توانند به راحتی در Rapid-SL مورد استفاده قرار بگیرند.

شروع جستجو از گره ریشه^۳، 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 $J_{nz}^{\Delta m}$ فضای بذر سویه جهش‌یافته‌ای 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 جهش‌یافته 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^۴ در سه مورد اتفاق می‌افتد که در آن صورت پیمایش^۵ نمی‌تواند عمیق تر 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 کاردینالیتته مورد نظر برسد. پراتاپا و همکاران [۱۱۹] بیان می‌کنند که Fast-SL یک الگوریتم کاملاً 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 عقب‌نشینی را در روش Rapid-SL نشان می‌دهد. در مثال نشان داده شده، حداکثر کاردینالیتته پنج در نظر گرفته شده است ($n = 5$).

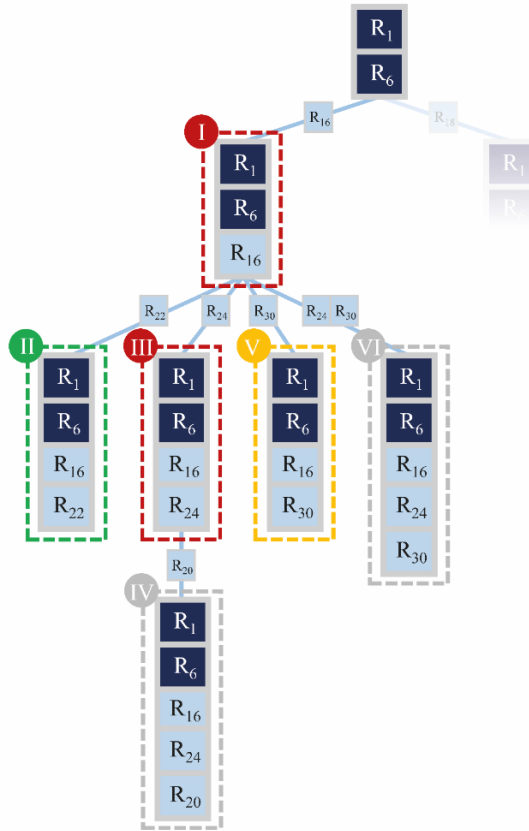
¹ Breadth-first search

² Best-first search

³ Root node

⁴ Backtracking

⁵ 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 کشنده‌گی 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 IV و VI متوقف می‌شود زیرا به حداکثر کاردینالیتته 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 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

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

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.

۴-۳- 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 به منظور 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.

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

جدول 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 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.

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

پراتاپا و همکارانش [۱۱۹] 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 [۱۱۶] برای شناسایی SL‌های سه گانه iML1515 مقایسه شده است (جدول 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 (حدود ۶ روز) با استفاده از Rapid-SL برای مدل iML1515 به دست آمد.

توسعه روش Rapid-SL به منظور شناسایی مجموعه کشنده‌های مصنوعی ...

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

ارزیابی

مشخصات	ای کلی	اس تیفی موریوم	ام توپر کلوزیس
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، یافتن تمام SLها با کاردینالیته بالا (به عنوان مثال، SLهای هشتگانه) با استفاده از الگوریتم‌هایی که در حال حاضر در دسترس هستند، امکان پذیر نیست [۱۱۵، ۱۱۹]. 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 هدفمند 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

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

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 کاردینالیته‌های 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 سویه مربوطه 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 کاردینالیته 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 کشندگی در تعداد محدودی از شاخه‌ها، شناسایی کرد.

¹ Subsystem

² Core model

³ Branching

توسعه روش Rapid-SL به منظور شناسایی مجموعه کشنده‌های مصنوعی ...

جدول ۴-۳- تعداد SLها و LPهای مربوطه در هر گروه از شاخه‌های Rapid-SL. به منظور شناسایی کشنده‌های تکی تا چهارتایی توسط مدل iAF1260. 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

شماره	کاردینالیت‌ه 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 تعمیم پذیری این مشاهدات، آنالیزهای مشابهی برای میکروارگانیسم یکسان (i. کلی) با مدلی در مقیاس ژنومی متفاوت (یعنی iJO1366) و همچنین برای نوع متفاوتی از میکروارگانیسم‌ها (یعنی کلبسیلا پنومونیه (کی پنومونیه))^۱، [iYL1228] انجام شد (جدول ۴-۴).

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

مدل	کاردینالیت‌ه	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

¹ *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

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، سه گانه 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 کاردینالیته 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 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			
iO1366	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 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 کاردینالیته SLها محدود نیست، اما جستجو برای همه SLهای با کاردینالیته 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 هشتمانه 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 کاردینالیته 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 آرگانیسم منفرد ممکن است بیش از چندین هزار SL با کاردینالیته 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 به منظور بدست آوردن مجموعه کشنده‌های مصنوعی در راستای یافتن اهداف دارویی انتخاب‌پذیر برای میکروارگانیسم‌های مختلف و همچنین سلول‌های سرطانی استفاده خواهد شد.

¹ Computer clusters

فصل پنجم

تجزیه و تحلیل سیستماتیک متابولیسم میکروارگانیسم‌ها به منظور 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 به منظور 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 [۱۶۲-۱۶۵] و شبیه‌سازی رایانه-محور^۳ [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 می‌کند. در این فصل، اهداف کشنده مصنوعی با قابلیت هدف قرار دادن همزمان چند بخش از میکروارگانیسم، به منظور معرفی داروی بالقوه با قابلیت تاثیرگذاری بر روی میکروارگانیسم‌های خاص، معرفی شده‌اند. به منظور بررسی گزینش پذیری اهداف دارویی معرفی شده از یک مجموعه شامل شش میکروارگانیسم استفاده شده است (جدول ۵-۱).

¹ Selective drug target

² Genome scale reconstructions

³ In-silico

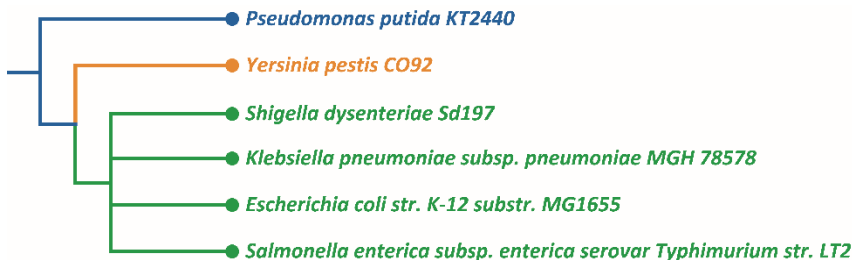
⁴ Synthetic lethality

تجزیه و تحلیل سیستماتیک متابولیسم میکروارگانیسم‌ها ...

جدول ۵-۱- لیست میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در این فصل و اسامی مدل‌های مربوط به هر یک از آن‌ها، اسامی میکروارگانیسم‌هایی که قبلاً به آن‌ها اشاره شده است به صورت خلاصه آورده شده است

مرجع	تعداد واکنش‌ها	تعداد ژن‌ها	نام مدل	نام میکروارگانیسم (لاتین)	نام میکروارگانیسم (فارسی)
[۱۶۰]	۲۲۶۲	۱۲۲۹	iYL1228	<i>K. pneumoniae</i>	کی پنومونیه
[۱۷۲]	۲۹۲۷	۱۴۶۲	iJN1463	<i>Pseudomonas putida</i> (P. putida)	سودوموناس پوتیدا (پی پوتیدا)
[۱۷۳]	۲۷۱۲	۱۵۱۶	iML1515	<i>E. coli</i>	ای کلی
[۱۰۵]	۲۵۴۵	۱۲۷۱	STM_v1_0	<i>Salmonella enterica</i> (S. enterica)	سالمونلا انتریکا (اس انتریکا)
[۱۷۴]	۲۵۳۹	۱۰۵۹	iSDY_1059	<i>Shigella dysenteriae</i> (S. dysenteriae)	شیگلا دیسانتریا (اس دیسانتریا)
[۱۷۵]	۱۹۶۱	۸۱۵	iPC815	<i>Yersinia pestis</i> (Y. pestis)	یرسینیا پستیس (وای 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، پی پوتیدا/ متفاوت ترین سویه در بین این شش میکروارگانیسم است. علاوه بر این، اس دیسانتریا، کی پنومونیه، ای کلی و اس انتریکا در یک سطح فیلوژنی قرار دارند.

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.

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

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 شده‌اند. 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 [۱۰۸]:

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.

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

¹ Minimal medium

² Exchange reactions

³ Demand reactions

⁴ Spontaneous reactions

⁵ Diffusion reactions

تجزیه و تحلیل سیستماتیک متابولیسم میکروارگانیسم‌ها ...

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.

به منظور بررسی‌گزینش 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 کشنده مصنوعی مشترک بین تمامی

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

(۲) پاسخ‌هایی که برای میکروارگانیسم‌های حفاظت شده کشنده محسوب می‌شوند از

مجموعه پاسخ‌ها کنار گذاشته می‌شوند.

با این حال، برای اطمینان از غیر کشنده 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

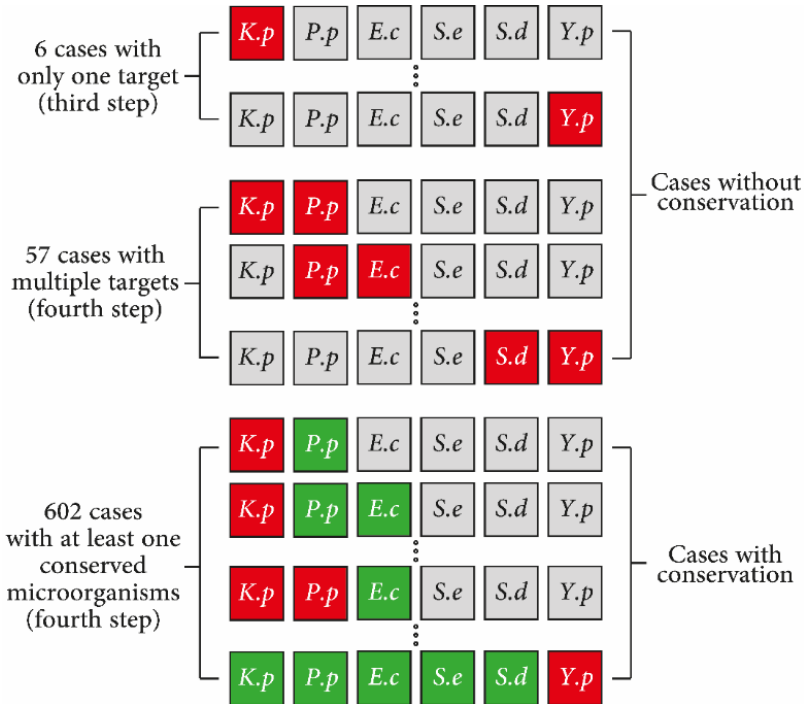
هنگامی که یک جواب گزینشی یافت می‌شود دو احتمال وجود دارد: (الف) همه واکنش‌های هدف در همه مدل‌های حفاظت شده وجود داشته باشد و یا (ب) حداقل یک واکنش هدف در یکی از مدل‌های حفاظت شده وجود نداشته باشد.

¹ Targeted

² Conserved

³ Not included

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...



شکل ۵-۲- شماتیک موارد مختلف مورد مطالعه. *K.p*, *P.p*, *E.c*, *S.e*, *S.d* و *Y.p* به ترتیب مخفف کی پنومونیه، پی پوتییدا، ای کلی، اس انتریکا، اس دیساتریا و وای 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.

تجزیه و تحلیل سیستماتیک متابولیسم میکروارگانیسم‌ها ...

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

ردیف اول جدول ۵-۲ تعداد راه حل‌های بالقوه برای هدف قرار دادن همزمان هر شش میکروارگانیسم را نشان می‌دهد. ردیف‌های دیگر تعداد راه حل‌های بالقوه شناسایی شده را برای هدف‌گیری انتخابی پنج میکروارگانیسم از شش میکروارگانیسم و حفظ دیگری نشان می‌دهند. جدول ۵-۲ نشان می‌دهد که راه حل‌های 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 راه حل‌های شناسایی شده					نام سویه محافظت شده
مجموع تعداد راه حل‌ها	کشنده‌های مصنوعی چهار گانه	کشنده‌های مصنوعی سه گانه	کشنده‌های مصنوعی دوگانه	واکنش‌های حیاتی	
۱۹۹۱	۱۰۳۳	۷۳۱	۱۹۶	۳۱	بدون محافظت
۵۱	۳۱	۱	۰	۱۹	وای پستیس
۱۰	۳	۷	۰	۰	اس دیسانتریا
۰	۰	۰	۰	۰	اس انتریکا
۵۸	۱۶	۲۷	۱۲	۳	ای کلی
۶۱	۱۶	۳۱	۵	۹	پی پوتیدا
۳۹	۱۷	۰	۳	۱۹	کی پنومونیه

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 راه حل‌های شناسایی شده برای این موارد در جدول ۵-۳ نشان داده شده است. از بین شش حالت مورد بررسی، هدف قرار دادن پی پوتیدا با حفظ قابلیت رشد دیگر میکروارگانیسم‌ها، دارای تعداد راه حل‌های بالقوه بیشتری نسبت به سایر کیس‌ها است. این رخداد ممکن است ناشی از تفاوت فیلوژنتیکی بین پی پوتیدا با پنج میکروارگانیسم دیگر باشد که هدف‌گیری انتخابی آن را ساده تر می‌کند.

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

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 چهارگانه	کشنده‌های مصنوعی سه گانه	کشنده‌های مصنوعی دوگانه	واکنش‌های حیاتی	
۱۴	۸	۰	۴	۲	وای پستیس
۱۵	۱۲	۳	۰	۰	اس دیسانتریا
۲	۰	۰	۰	۲	اس انتریکا
۱	۰	۰	۰	۱	ای کلی
۸۵	۱۳	۲۵	۱۹	۲۸	پی پوتیدا
۱۵	۸	۵	۲	۰	کی پنومونیه

۵-۳-۳- موارد بدون راه حل بالقوه

از بین ۶۵۹ کیس مورد مطالعه، ۵۲ کیس دارای هیچ هدف دارویی گزینشی نبوده‌اند. 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، در ۳۱ مورد اس/انتریکا میکروارگانیسم حفاظت شده بوده است. بدون پاسخ ماندن این ۳۱ مورد می‌تواند ناشی از بازسازی مدل STM_v1_0 از مدل‌های ای کلی باشد.

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

در این بخش، یک بررسی آماری به منظور تعیین مسیرهای متابولیکی که برای هدف قرار دادن انتخابی میکروارگانیسم‌ها مناسب‌تر هستند، انجام شده است. مسیرهای متابولیکی مورد نظر بر اساس واکنش‌های هدف در هر پاسخ گزینشی مشخص شده است. راه حل‌های 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 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.

¹ Metabolic Pathways

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

چهار مسیر متابولیکی:

- بیوسنتز پوشش سلولی^۱
- متابولیسم گلیسروفوسفولیپید^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)

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 و گلایکولیز و گلوکنوجنسیس، می‌توانند به صورت جداگانه توسط مجموعه‌های کشنده مصنوعی مورد حمله قرار گیرند.

جدول (۵-۴). این مسیرها با سنتز دیواره سلولی و تکثیر DNA میکروارگانیسم‌ها مرتبط هستند. دستکاری این مسیرها رایج‌ترین مکانیسم آنتی‌بیوتیک‌های موجود است [۱۸۲]. بعلاوه، 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 حیاتی 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 سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

• متابولیسم پیرویت^۱

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.

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

نام مسیر	واکنش‌های حیاتی	کشنده‌های مصنوعی دوگانه	کشنده‌های مصنوعی سه‌گانه	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

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 بهینه‌سازی پیچیده است که از حوصله این پژوهش خارج است. با این حال، شناسایی مجموعه‌هایی که تا حدی این هدف را برآورده می‌کنند، قابل انجام است. به منظور دستیابی به این مجموعه، الگوریتم حریص^۴ [۱۸۳] به کار گرفته شده است.

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

¹ Pyruvate metabolism

² Pentose phosphate pathway

³ Glycolysis and gluconeogenesis

⁴ Greedy algorithm

تجزیه و تحلیل سیستماتیک متابولیسم میکروارگانیسم‌ها ...

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	IMPDP	۴
IMP dehydrogenase	پروتئین		
Purine and Pyrimidine Biosynthesis	مسیر مربوطه		
Inosinic Acid	داروی شناخته شده		

باید توجه داشت که 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 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	

بررسی سامانه‌های تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

مشخصات		نماد واکنش	شماره
Glucose-6-phosphate isomerase	پروتئین		۱
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		
---	داروی شناخته شده		
<i>tktA or 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		

تجزیه و تحلیل سیستماتیک متابولیسم میکروارگانیسم‌ها ...

این ترکیب از سه مجموعه کشنده مصنوعی تشکیل شده است: (۱) یک مجموعه چهارگانه از PGK, TKT2, TPI, و FBA. (۲) مجموعه سه گانه TPI, PGI, 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 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 دقیق

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...
تری 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 برای حمله به سلول‌های سرطانی

۶-۱- مقدمه

در این فصل برای 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 به منظور 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 [۱۳۸] 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.

^۱ Strictly selective

^۲ Context-specific model

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

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.

یافتن اهداف دارویی انتخابی به منظور حمله به سلول‌های سرطانی

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

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

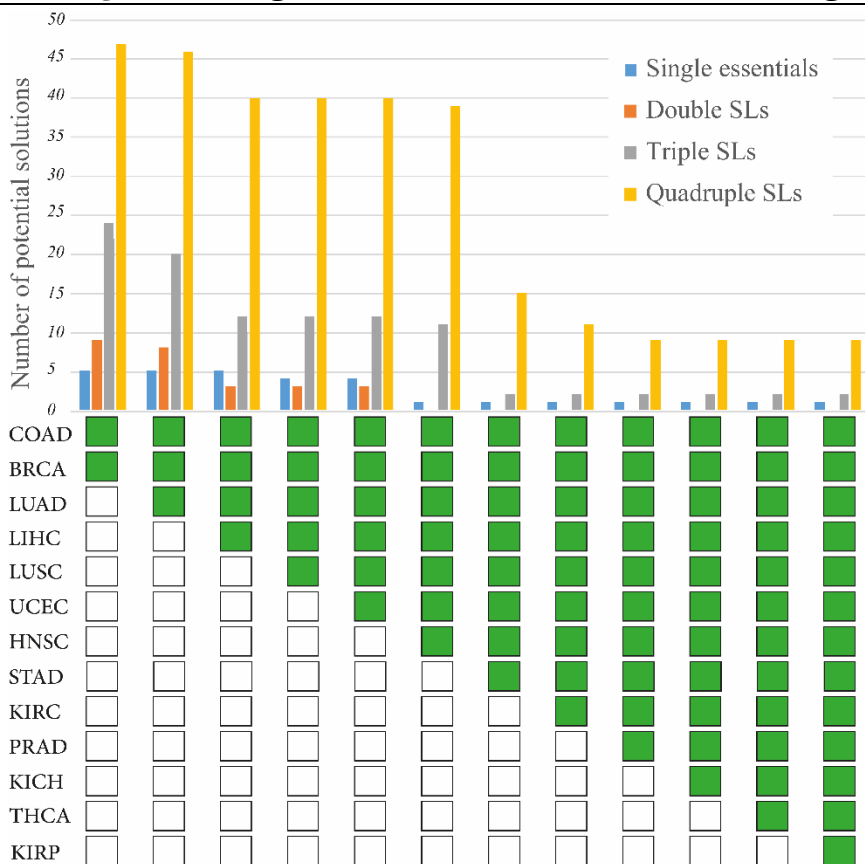
شرایط	تک ژن‌های حیاتی	کشنده‌های مصنوعی دوگانه	کشنده‌های مصنوعی سه‌تایی	کشنده‌های مصنوعی چهارتایی
کشنده برای سلول‌های سرطانی COAD	۷۶	۶۴	۱۴۵	۴۱۶
کشنده برای سلول‌های سرطانی COAD و بی‌اثر برای سلول‌های سالم روده	۱۲	۲۶	۵۷	۱۳۵

اگرچه راه‌حل‌های 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 راه‌حل‌های بالقوه به دست آمده بر سایر بافت‌های سالم بررسی شد. با در نظر گرفتن هر بافت سالم، بعضی از راه‌حل‌های بالقوه ممکن است غیرانتخابی تلقی شوند و از لیست هدف‌های دارویی انتخابی حذف شوند. با در نظر گرفتن تمام ۱۳ بافت سالم، بسیاری از راه‌حل‌ها حذف شدند. شکل ۶-۱ نشان می‌دهد که با در نظر گرفتن هر بافت سالم جدید، تعداد راه‌حل‌ها 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 راه‌حل‌ها به عنوان هدف‌های دارویی بالقوه اکیداً انتخابی در شکل ۶-۲ نشان داده شده است.

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

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

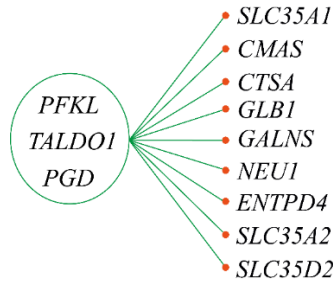


شکل ۶-۱- تعداد هدف‌های دارویی انتخابی بالقوه که با در نظر گرفتن سلول‌های سالم مختلف به عنوان محافظت‌شده و سلول‌های COAD به عنوان هدف، شناسایی شده‌اند. تعداد راه‌حل‌های یافت شده برای هدف‌گیری سلول‌های COAD و حفظ تنها سلول‌های سالم روده در جدول ۶-۱ نشان داده شده است. از چپ به راست، تعداد بافت‌های محافظت‌شده در نظر گرفته شده افزایش می‌یابد و تعداد هدف‌های دارویی انتخابی کاهش می‌یابد. در این شکل، تعداد بیشتر راه‌حل‌های ارائه‌شده 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 راه‌حل‌های انتخابی باقی می‌مانند.

۶-۴- بحث در نتایج

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

یافتن اهداف دارویی انتخابی به منظور حمله به سلول‌های سرطانی



شکل ۶-۲- هدف‌های دارویی بالا قوه 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، راه حل‌های 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 گلوکونوژنز 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 آسیب‌پذیری رده سلولی تقویت شده^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]،

^۱ HER2-amplified cell line

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

تخمندان [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 شناسایی شده 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^۱ CMAS مرتبط با مسیر متابولیسم amono-sugar است. کاهش بیان CMAS باعث کاهش و کنترل فعالیت در سرطان سینه سه‌گانه-منفی^۲ دارد [۲۱۱].

ژن^۳ GALNS مرتبط با فرآیند ترکیب کراتان سولفات است و بیان بالاتر آن در بسیاری از انواع سرطان‌ها گزارش شده است [۲۱۲].

ژن^۴ ENTPD4 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، ENTPD4 به عنوان یک انکوژن شناسایی نشده است.

¹ Cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase

² Triple-negative breast cancer or TNBC

³ N-acetylgalactosamine-6-sulfatase

⁴ 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 به منظور شناسایی مجموعه کشنده‌های مصنوعی یک مدل متابولیکی ژنوم-مقیاس ارائه شد. در این روش با کاهش فضای جستجو، به صورت چشم‌گیری زمان جستجو به منظور یافتن مجموعه کشنده‌های مصنوعی مرتبه بالا، کاهش یافت. به منظور 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 MCS Enumerator که MCS Enumerator 2 نامیده می‌شود، پرداخته شد. باید توجه داشت که اگرچه فرآیند یافتن مجموعه‌های کشنده چهارگانه پس از ۳۰ روز با استفاده از MCS Enumerator 2 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 جستجوی 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

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

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 *ای 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 به منظور 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 بی اثر 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:

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

در تمام ۶۳ مورد گروه اول مشارکت دارند. همچنین، این مسیرها هدف بسیاری از راه‌حل‌های 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 راه‌حل‌ها 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 مجموعه‌اهدافی 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 کمک‌گیری 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 به‌دست‌آوردن مجموعه‌های اهداف کشنده مصنوعی، هدف‌های بالقوه بیشتری را به عنوان راه‌حل فراهم نماید. این فرضیه ممکن است با نتایج مرحله چهارم منطبق باشد، جایی که چندین مجموعه کشنده مصنوعی برای ۱۰۲ مورد که راه‌حلی 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

بررسی سامانه‌ای تفاوت‌های عملکردی شبکه‌های متابولیکی و کاربردهای آن در ...

در مرحله پنجم، گستره مجاز مجموعه‌های کشنده مصنوعی را کاهش می‌دهد. متعاقباً، ۵۴ مورد از کیس‌های مورد بررسی، با راه‌حلی که تنها از واکنش‌های حیاتی تشکیل شده‌اند، باقی می‌ماند.

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

۷-۳- یافتن اهداف دارویی انتخابی به منظور 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.

به منظور 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 به منظور ارائه راه‌حل‌های اکیدا انتخاب پذیر ارزیابی شدند. به منظور 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 پیشنهادی جدید به منظور انجام تست‌های آزمایشگاهی در نظر گرفته شود که در صورت به تایید

نتیجه‌گیری و جمع‌بندی

رسیدن در مسیر آزمایشگاهی، نوید مسیری بسیار قدرتمند و بدون اثرات جانبی به منظور 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] 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.
- [74] 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.
- [75] 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.
- [76] 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.
- [77] 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.
- [78] J. K. Dhanjal, N. Radhakrishnan, and D. Sundar, "Identifying synthetic lethal targets using CRISPR/Cas9 system," *Methods*, vol. 131, pp. 66-73, 2017.
- [79] 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.
- [80] 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.
- [81] 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.
- [82] 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.
- [83] 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.

- [84] 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.
- [85] 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.
- [86] C. Frezza *et al.*, "Haem oxygenase is synthetically lethal with the tumour suppressor fumarate hydratase," *Nature*, vol. 477, no. 7363, pp. 225-228, 2011.
- [87] 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.
- [88] T. Pfeiffer, I. Sánchez-Valdenebro, J. Nuño, F. Montero, and S. Schuster, "METATOOL: for studying metabolic networks," *Bioinformatics (Oxford, England)*, vol. 15, no. 3, pp. 251-257, 1999.
- [89] 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.
- [90] 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.
- [91] 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.
- [92] 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.
- [93] 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.
- [94] 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.
- [95] 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.
- [96] D. Machado, "A benchmark of optimization solvers for genome-scale metabolic modeling," *bioRxiv*, p. 2023.04. 11.536343, 2023.
- [97] V. Pereira, F. Cruz, and M. Rocha, "MEWpy: a computational strain optimization workbench in Python," *Bioinformatics*, vol. 37, no. 16, pp. 2494-2496, 2021.
- [98] 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.
- [99] B. Palsson, *Systems biology*. Cambridge university press, 2015.

- [100] 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.
- [101] 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.
- [102] 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.
- [103] 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.
- [104] 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.
- [105] 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.
- [106] 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.
- [107] 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.
- [108] 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.
- [109] 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.
- [110] 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.
- [111] 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.
- [112] 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.
- [113] 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.
- [114] 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.

- [115] 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.
- [116] 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.
- [117] 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.
- [118] 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.
- [119] 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.
- [120] 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.
- [121] 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.
- [122] 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.
- [123] 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.
- [124] 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.
- [125] 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.
- [126] 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.
- [127] 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.
- [128] H. Zur, E. Ruppin, and T. Shlomi, "iMAT: an integrative metabolic analysis tool," *Bioinformatics*, vol. 26, no. 24, pp. 3140-3142, 2010.
- [129] 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.
- [130] 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.
- [131] 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.
- [132] 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.
- [133] A. Schultz and A. A. Qutub, "Reconstruction of tissue-specific metabolic networks using CORDA," *PLoS computational biology*, vol. 12, no. 3, p. e1004808, 2016.
- [134] K. Yizhak *et al.*, "Phenotype-based cell-specific metabolic modeling reveals metabolic liabilities of cancer," *Elife*, vol. 3, p. e03641, 2014.
- [135] 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.
- [136] 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.
- [137] 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.
- [138] M. P. Pacheco *et al.*, "Identifying and targeting cancer-specific metabolism with network-based drug target prediction," *EBioMedicine*, vol. 43, pp. 98-106, 2019.
- [139] 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.
- [140] 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.
- [141] T. Shlomi, T. Benyamini, E. Gottlieb, R. Sharan, and E. Ruppin, "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.
- [142] 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.
- [143] 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.
- [144] 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.
- [145] 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.
- [146] R. Heinrich and S. Schuster, *The regulation of cellular systems*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [147] J. V. C. Vieira, "Integrative pathway analysis approaches for cancer research and drug development," 2022.
- [148] S. Gudmundsson and I. Thiele, "Computationally efficient flux variability analysis," *BMC bioinformatics*, vol. 11, no. 1, pp. 1-3, 2010.
- [149] 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.
- [150] R. Tarjan, "Depth-first search and linear graph algorithms," *SIAM journal on computing*, vol. 1, no. 2, pp. 146-160, 1972.
- [151] <https://mishadoff.com/blog/dfs-on-binary-tree-array/>
- [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. Ruppin, "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. Csérmely, "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.

پیوست (ها)

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، به منظور 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 *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:  $Candidates = Candidates - (Candidates \cap trivialSolution)$ 
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 ∩ 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 ∪ 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، به منظور 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: میکروارگانیزم هدف

N: میکروارگانیزم لحاظ نشده

C: میکروارگانیزم 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.	:YLT228	:JNT463	:MLT575	:STM_vT_N	:SDY_TN59	:PC8T5	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
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
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

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.	!YL1228	!JNT463	!MLT575	STM_vT_N	!SDY_TN59	!PC875	Single	Double	Triple	Quadruple	Single	Double	Triple	Quadruple
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
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
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
Case 97	T	N	T	N	C	T	1	14	85	629	0	0	7	3

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.	!YI_T228	!INT463	!MLT5T5	STM_vT_N	!SDY_TN59	!PC8T5	Single	Double	Triple	Quadruple	Single	Double	Triple	Quadruple
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	T	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
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
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

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.	YL1228	JNT463	JMLT575	STM_vT_N	ISDY_TNS9	JPC875	Single	Double	Triple	Quadruple	Single	Double	Triple	Quadruple
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
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
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
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

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.	!YI_T228	!INT463	!MLT5T5	STM_vT_N	!SDY_TN59	!PC8T5	Single	Double	Triple	Quadruple	Single	Double	Triple	Quadruple
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
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
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

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.	!YL1228	!JNT463	!MLT5T5	!STM_vT_N	!SDY_TN59	!PC8T5	Single	Double	Triple	Quadruple	Single	Double	Triple	Quadruple
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
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
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
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

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.	!YI_T228	!INT463	!MLT5T5	STM_vT_N	!SDY_TN59	!PC8T5	Single	Double	Triple	Quadruple	Single	Double	Triple	Quadruple
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
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
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

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.	!YL1228	!JNT463	!MLT5T5	STM_vT_N	!SDY_TN59	!PC8T5	Single	Double	Triple	Quadruple	Single	Double	Triple	Quadruple
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
Case 351	N	N	T	C	C	C	2	2	72	172	1	1	2	0
Case 352	N	N	T	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	C	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
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
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

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.	!YI_T228	!INT463	!MLT5T5	!STM_vT_N	!SDY_TN59	!PC8T5	Single	Double	Triple	Quadruple	Single	Double	Triple	Quadruple
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
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
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

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.	YL1228	JNT463	JMLT575	STM_vT_N	ISDY_TNS9	JPC875	Single	Double	Triple	Quadruple	Single	Double	Triple	Quadruple
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
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
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
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

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.	!YLT228	!JNT463	!MLT5T5	STM_vT_N	!SDY_JN59	!PC8T5	Single	Double	Triple	Quadruple	Single	Double	Triple	Quadruple
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
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	C	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
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

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.	YL1228	JN1463	JML1515	STM_vT_N	ISDY_TN59	JPC875	Single	Double	Triple	Quadruple	Single	Double	Triple	Quadruple
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
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
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
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

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.	!YI_T228	!INT463	!MLT5T5	STM_vT_N	!SDY_TN59	!PC8T5	Single	Double	Triple	Quadruple	Single	Double	Triple	Quadruple
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
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
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

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.	YL1228	JNT463	MLT5T5	STM_vT_N	SDY_TN59	PC8T5	Single	Double	Triple	Quadruple	Single	Double	Triple	Quadruple
Case 642	C	C	N	C	T	T	0	0	5	0	0	0	4	0
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
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

Pathways	All 665 cases				63 cases				602 cases			
	Single	Double	Triple	Quadruple	Single	Double	Triple	Quadruple	Single	Double	Triple	Quadruple
sulfur metabolism	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
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 هپاتوسلولی 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 ژن‌های 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							
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				
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				
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				
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						
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						
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						
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					
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						
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						
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						
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	
55907	6888	5211	5226							
5476	6888	5211	5226							
2720	6888	5211	5226							
2588	6888	5211	5226							UCEC
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		
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							
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	
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	
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	
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							
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						
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						
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						

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						
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						
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						
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	1036	788						
6319	9453	1036	788						
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	
							8836	353	
							10797	353	
				4860	51292	2766			
				3251	51292	2766			
									THCA
									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: Constraint-Based Modeling, Cancer, Genome-Scale Metabolic Models, Selective Drug Targets, Synthetic Lethal Sets, Systems Biology.

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 Treatment and Diagnosis 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: Excellent

- 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 Morowvat (Ph. D.), Associate Prof. of
the Dept. of Pharmaceutical Biotechnology of Shiraz
University of Medical Sciences (External Examiner)
- Mohammad khorram (Ph.D.), Professor of Dept. of Gas
Engineering (Internal Examiner)

September 2023



**School of Chemical and Petroleum Engineering
Ph.D. Dissertation in
Chemical Engineering**

**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.)**

September 2023



Ph.D. Dissertation

**A Systematic Study of Behavior Changes
in Metabolic Networks with Applications
in the Treatment and Diagnosis of Diseases**

Mehdi Dehghan Manshadi

Supervised By:

Dr. Payam Setoodeh, PhD

**School of Chemical and Petroleum Engineering -
Department of Chemical Engineering**

September 2023