

Dynamic Behavioral Prediction of *Escherichia coli* Using a Visual Programming Environment

비주얼 프로그래밍 환경을 이용한 *Escherichia coli*의 동적 거동 예측

Sung Gun Lee¹, Kyu Suk Hwang¹, Cheol Min Kim^{2*}

¹Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Pusan National University, Busan, Korea

²Department of Biochemistry, College of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: kimcm@pusan.ac.kr

Abstract

When there is a lack of detailed kinetic information, dFBA(dynamic flux balance analysis) has correctly predicted cellular behavior under given environmental conditions with FBA and differential equations. However, until now, dFBA has centered on substrate concentration, cell growth, and gene on/off, but a detailed hierarchical structure of a regulatory network has not been taken into account. For this reason, the dFBA has limited the representation of interactions between specific regulatory proteins and genes and the whole transcriptional regulation mechanism with environmental change. Moreover, to calculate optimal metabolic flux distribution which maximizes the growth flux and predict the behavior of cell system, linear programming package(LINDO) and spreadsheet package(EXCEL) have been used simultaneously. These two software packages have limited in the visual representation of simulation results and it can be difficult for a user to look at the effects of changing inputs to the models. Here, we describe the construction of hierarchical regulatory network with defined symbols and the development of an integrated system that can predict the total control mechanism of regulatory elements (operations, genes, effectors, etc.), substrate concentration, growth rate, and optimal flux distribution with time. All programming procedures were accomplished in a visual programming environment (LabVIEW).

Introduction

최근 완전히 서열화된 미생물 지놈들을 신속하고, 정확하게 전산적 분석을 실시하여, 세포 전체의 종합적인 생화학적 대사경로를 구축할 수 있게 되었다. 이로 인해서 세포

이 연구는 2003년 BK21 프로젝트에 의해서 수행되었음.

의 기능을 PC상에서 모사할 수 있는 *In silico* models에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

구축된 생화학적 대사경로를 기반으로 한 세포의 조절과 대사 모델링 분석은 여러 분야에 좋은 결과를 가져다 준다. 특히 microarrays를 다루는 분야에서는 유전자의 발현패턴을 분석하기 위해서 개발되었기 때

문에, 여러 환경조건에서 세포 내부 전사 (intracellular transcription)와 전사 조절 (transcriptional regulation)을 예측하는 것은 필수적이다 [1]. 또한, 대사공학자들이 이 모델링 방법을 사용하여 원하고자 하는 생화학성분들을 만들 수 있기 때문에 대사공학에도 매우 유용하다 [16]. 이러한 유용성 때문에 여러 연구자들은 모사에 의해서, 조절과 대사 모델(regulation and metabolism models)을 분석하는 여러 가지 방법을 제안하였다. 그 중에서 정성적 모델들(qualitative models)은 그 하나의 예이며, 분자 생물학에서 정량적인 데이터의 부족과 세포 대사에 관련된 정보 부족의 문제를 대처하기 위해서 제안된 방법이다. 그러나 이 방법들은 조합의 발산 때문에 부정확한 거동이나 결과를 생성시킬 수 있는 단점이 있다 [8, 9, 13]. 또 다른 모델은 속도론(kinetic theory)을 채택한 것이며, 주로 *E. Coli*의 이단계 적응 성장(diauxic growth)과 이화 대사 억제(catabolic repression)을 연구하기 위해서 구축된 모델이다 [6, 18]. 이 모델도 또한 상세한 속도데이터와 농도데이터가 필요로 하는 단점을 가진다.

상세한 속도식 정보가 부족한 상황에서, FBA(flux balance analysis)는 대사 능력 (metabolic capabilities), 세포 성장율, 대사 부산물, 기질의 농도와 원하는 성분을 생성시킬 수 있는 중요한 반응들을 정확하게 분석할 수 있다 [14, 15, 16]. 분석에 필요한 정보는 대사경로의 양론계수, 대 수요량, 그리고 기본적인 물리화학적 제약조건이며, 이러한 정보는 잘 알려져 있기 때문에 쉽게 이용할 수 있다.

최근에 몇몇 연구자들은 조절 제약 조건 (regulatory constraints)을 Varma가 제안한

dFBA(dynamic flux balance analysis)에 통합 시키려고 시도하고 있다. 그 이유는 제약조건들이 미생물의 거동에 큰 영향을 미치기 때문이다. dFBA에서 조절 제약 조건은 논리적 방법 [1]으로 표현되어질 수 있다. 이 방법을 가진 dFBA는 *E. Coli*의 이단계 적응성장을 정량적으로 예측하기 위해서 사용되었다.

논리적 표현방법은 생성규칙(production rule—If than rule)과 불린논리(boolean logic)로 표현된 논리식(logic equation)을 사용한다. 이러한 생성시스템(production system)은 어떤 조건에 따른 결과, 즉 상황을 나타내는 지식을 쉽게 규칙으로 표현할 수 있는 장점이 있다. 반면에 이러한 불린 규칙은 (I) binary system이기 때문에 복잡한 조절 단백질의 상호관계를 표현할 수 가 없는 문제가 발생할 수 있다 [3]. (II)어떤 규칙들이 순서대로 적용되었는지 알 수 없기 때문에 [17], 외부 환경 변화에 따른 유전자들의 조절 메커니즘을 알 수 가 없었다. 또한 (III)최적의 대사 흐름 분석, 최대 성장률, 그리고 세포의 거동을 예측하기 위해서, linear programming package(LINGO)와 spreadsheet package (EXCEL)을 사용하여왔다. 이러한 프로그램은 예측 결과를 비주얼하게 표현하는 데에 한계가 있고, 사용자가 모델의 입력 변화의 영향을 쉽게 알 수가 없었다.

본 논문에서는 위에서 언급한 것들을 해결하기 위해서, (I)조절 요소들(regulatory protein, genes, effectors etc.) 사이의 관계를 더욱더 유연하게 표현하기 위해서 결합의 정도를 나타내는 가중치 개념을 도입하였다. (II)외부 환경 변화에 따른 유전자들의 조절 메커니즘을 표현하기 위해서, 정의된 기호로 계층적 조절 네트워크(hierarchical regulatory

network)를 모델링하였다. (III)사용자가 쉽게 정량적으로 예측할 수 있고, 비주얼한 결과를 보여줄 수 있는 통합 시스템을 개발하였다. 프로그램 개발은 비주얼 프로그램 환경인 LabVIEW에서 실행되었다.

Materials and Methods

Visual Programming

모든 프로그래밍 과정은 LabVIEW version 7.1(National Instruments Ltd.)에서 만들어졌고, 1GByte RAM을 가진 IBM Computer에서 실행되어 졌다. 최적의 플러스 분배와 최대 성장률을 구하기 위해서, LabVIEW에서 지원하는 Sub.VI인 Linear Programming Simplex Method.VI를 사용하였다.

Fundamental Modeling Symbols

계층적 조절 네트워크를 구성하고 있는 오페론은 기호(Symbol), 간선(Arc), 가중치(Weight)로 구성되어 있다.

표 1. Fundamental modeling symbols

Function	Symbol
Operator	
Structural Gene	
Promoter (RNA polymerase)	
Regulatory Protein (or transcription factor)	
Effector(inducer, repressor)	
Gene Transcription negative control positive control	
Weight Distributor	
And gate	
Not gate	
Switch for operon	
Node state active/inactive	

모델링 기호는 조절(regulation)을 위한 생물

학적 기호들과 가중치를 위한 비생물학적 기호들로 구분된다. 프로모터, not gate, 오퍼레이터 기호들은 하나의 클러스터를 형성하여 유전자 전사(gene transcription)의 기능을 담당한다. 간선은 각 기호들 간에 인과관계의 유무와 가중치를 전파시키는 기능을 한다. 가중치가 심볼들의 활성유무를 결정하기 위해서 사용되지는 것 이외에, 노드 사이에 결합의 정도를 나타낼 수 있다.

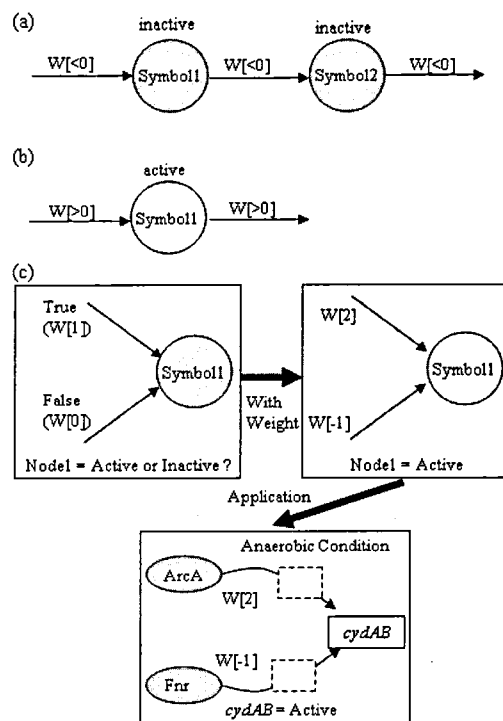


그림 1. Symbols change to weight

(a) Inactive condition of symbol (b) Active condition of symbol (c) Weight application to the binary system

이는 binary system으로 나타낼 수 없는 경우에 효과적으로 사용할 수 있다. 그림 1(c)와 같이 binary system인 경우에 True와 False가 동시에 발생하는 경우 이를 처리할 수 없다. 그러나 가중치에 결합의 정도를 부가함으로써, 이를 처리할 수 있다. 실제로 이

러한 상황이 혐기 조건(anaerobic condition) 하에서 FNR → *cydAB* and ArcA → *cydAB* 관계에서 발생한다. FNR은 *cydAB*에 repressor, ArcA는 *cydAB*에 activator로 작용한다 [4, 5, 12]. 이러한 상황이 동시에 발생할 수 있기 때문에 binary system으로 처리할 수 없는 상황이 발생한다.

Construction of Hierarchical Regulatory Network

타낸다. Modulon level은 세포 외부 환경의 변화에 반응하고, 하나 이상의 효과를 나타내는 regulatory protein에 의해서 regulon/operon을 통합적으로 조절하는 기능을 한다. Regulon/operon level은 common regulatory protein에 의해서 직접적으로 오페론들의 세트 또는 유전자들의 세트를 조절한다 [11]. Gene level은 오페론에 의해서 조절되는 유전자들의 active /inactive를 나타낸다.

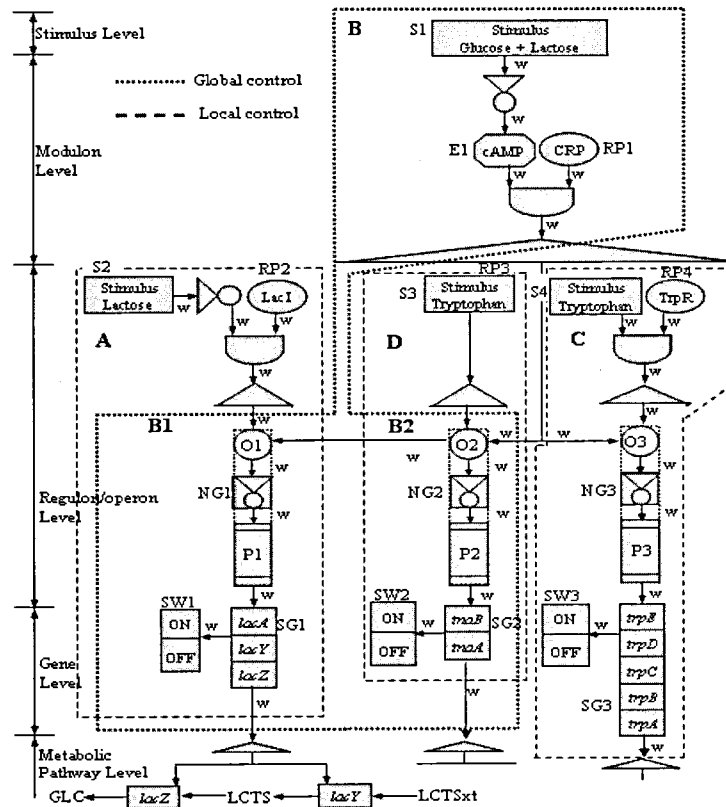


그림 2. Hierarchical regulatory network

정의된 기호들로 구성된 계층적 조절 네트워크는 조절 단백질들이 어떻게 유전자들의 세트를 조절하는지 직관적으로 알 수 있다 (그림. 2). 이 네트워크는 stimulus, modulon, regulon/operon, gene level, metabolic pathway level로 나눌 수 있다. Stimulus level은 단순한 환경 변화(a simple environmental change)를 나

이러한 유전자들은 metabolic pathway level에서 세포성장에 필요한 대사물질을 합성하거나 분해하는 기능을 하게 된다

Central Metabolic Network of *E. Coli*

본 논문에서는 이전에 연구되었던 central metabolic pathway of *E. Coli* [10]을 채택했다.

central metabolic pathway에 관련된 21개의 조절단백질 중에서, 혐기성, 호기성, glucose, lactose, succinate, acetate, ethanol, tryptophan metabolism에 관련된 13개의 조절단백질들을 *In silico* system에 포함하였다.

Dynamic Flux Balance Analysis

dFBA(dynamic flux balance analysis)는 FBA와 iterative algorithm을 사용하여, 시간에 따른 세포량(cell density)과 부산물의 배출(metabolic by-product)을 정량적으로 예측할 수 있는 방법이다 [15, 16]. 정량적으로 예측을 하기 위해서, 먼저 회분 시간(batch time)을 작은 시간구간으로 나눈다. 초기값들이 주어지면, FBA는 실제 기질농도, 성장률, 그리고 부산물을 평가하기 위해서 사용된다 [7, 15, 16]. 이러한 데이터를 가지고 다음 시간구간의 농도를 예측하기 위해서, 반복 알고리즘이 상미분식을 반복적으로 계산하게 된다. 최종적으로 작은 시간구간을 적분함으로써, 전 구간에 대해서 시간에 따른 농도 변화를 예측하게 된다. 이때, 시간구간 내에서는 흐름들(fluxes)이 동일하다고 가정하고 적분하게 된다 [15, 16].

Results

Composition of In silico System

Extracellular Environment Setting Mode and Constraints

세포가 어떠한 조건하에서 성장하는지를 설정하는 것으로서, 8개의 checkboxes-aerobic/anaerobic condition, glucose, lactose, succinate, acetate, tryptophan로 구성되어 있다.

최적의 흐름 분산을 구하기 위해서는 *E. Coli*의 maximal uptake rate와 cell density를 지정하여야 한다. 사용자는 단지 각각의 해당

box에 수치값을 지정하면 된다. 이러한 작업을 통해서 simulation을 위한 초기 조건 지정이 완료된다.

Optimal Flux Distributions and Time Profile for Substrates

원하는 생리학적 특성(objective function: growth rate)을 최적화 함으로써, 최적 흐름 분산을 테이블로 보여준다. 특히, global control mode에 의한 최적 흐름의 변화를 직접적으로 비교할 수 있고, 시간에 따른 기질의 농도 변화를 차트로 보여준다. 이것은 다른 환경조건에서 세포의 대사와 생리학적 변화를 이해하는 것을 가능하게 한다.

Dynamic Flux Distribution

Metabolic reaction pathway를 보여주는 dynamic graphical viewer를 제공한다. 이 viewer는 여러 환경 조건하에서 변화하는 최적 흐름의 결과값에 의해서 자동적으로 그리고 다이내믹하게 보여준다.

Dynamic Hierarchical Regulatory Network

조절 단백질이 환경변화에 따라서 어떻게 유전자들의 세트를 조절되는지를 보여주는 dynamic graphical viewer를 제공한다. 이 network는 stimulus level, modulon level, regulon/operon level, gene level metabolic pathway level에 의해서 계층적 구조를 이루고 있다.

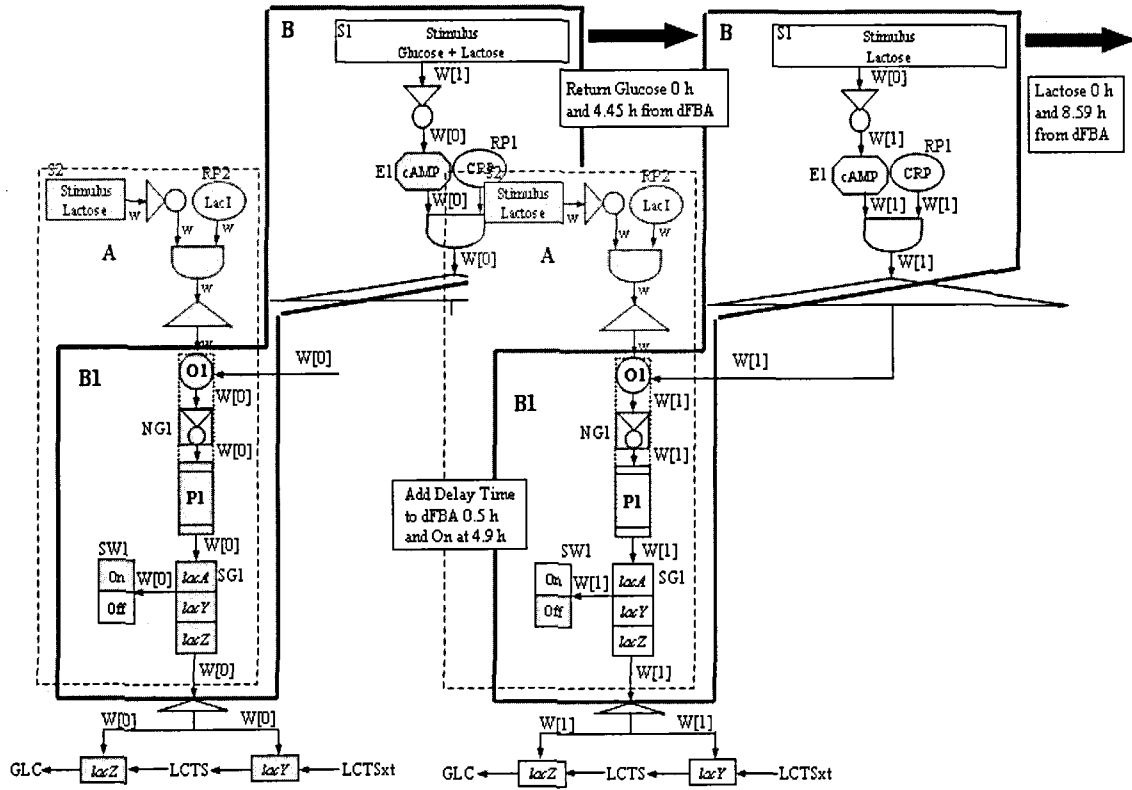
Parameters for simulation

조절 네트워크의 계층적 구조 (그림 2), central metabolic pathway [10]와 parameters의 값들을 이용하여, 시간에 따른 유전자 조절을 모사함으로써, 본 연구에서 제시한 모델

링이 설명되어 진다. 초기조건 (biomass : 15.0mM)이 문헌[2]으로부터 획득되어 졌다. 0.011 g/l, glucose : 1.6 mM, lactose : 5.8 mM, tryptophan : 1 mM delay time : 0.5h)과

Case Study 1. Glucose and Lactose in Medium

(a)



(b)

Protein or Gene	Time (h)		
	0	4.45	4.95
cAMP-CRP	off	on	on
<i>lacA</i>	off	off	on
<i>lacY</i>	off	off	on
<i>lacZ</i>	off	off	on

(c)

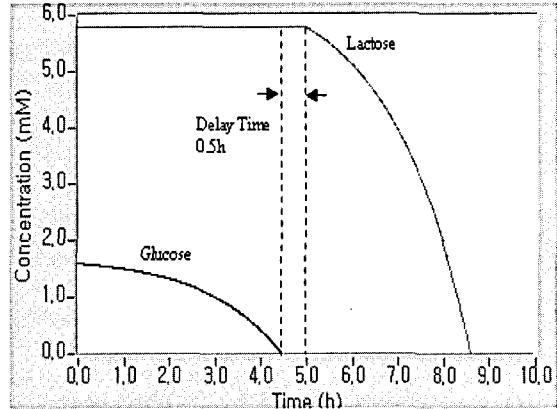


그림 3. Dynamic gene regulation for two carbon sources.

(a) Weight propagation in digraph. (b) Active/inactive regulatory elements with time. on: activation, off: inactivation, N: none. (c) Metabolite concentration change with time

흡수율제한조건(glucose : 6.5 mM, lactose : 3.0 mM, tryptophan : 2.0 mM, estimated, Oxygen :

세포 외부환경에 glucose와 lactose가 있는

경우 계층적 조절 네트워크의 최고 상부에 있는 stimulus level에서 S1이 활성화된다. Glucose가 medium에 존재하기 때문에 W[1]이 되며, 이 값은 Arc를 따라서 전파하게 된다. Modulon level에서는 가중치가 not gate에 의해서 W[0]이 되고 cAMP가 비활성화된다. 이는 glucose가 cAMP 농도 level를 낮게 하여 cAMP/CRP complex을 생성 못하게 되어, W[0]이 regulon/operon level로 전파된다. Regulon/operon level에서는 W[0]에 의해서 O1이 비활성화 된다. NG1은 S1에 의해서 positive control mode가 선택되기 때문에 비활성화되고, NG1에서 나온 W[0]이 P1을 비활성화되게 한다. 최종적으로, gene transcription이 비활성화된다. Gene level에서 lacAYZ은 gene transcription의 W[0]에 의해서 비활성화된다. 결국, lac operon이 “off” 상태가 되고, 이로 인해서 metabolic pathway level에서 lactose를 대사하지 못하게 된다. lacAYZ의 비활성화 상태는 dFBA에서 glucose의 농도가 [0]의 값이 리턴될 때까지 지속된다. dFBA에서 glucose가 [0]의 값이 리턴하면, S1에는 lactose만 존재하게 되어 W[0]이 Arc를 따라서 modulon level로 전파된다. Glucose가 없기 때문에 not gate에 의해서 W[1]로 전환되고, E1과 RP1이 활성화된다. Modulon level에서의 가중치 값은 앞서 설명한 것 처럼, 차례로 하위 level로 전파되어 lacAYZ가 metabolic pathway level에서 lactose를 대사하게 한다. Lactose대사는 dFBA에서 lactose의 농도가 [0]값을 리턴할 때 까지 계속된다. Lactose의 농도값이 [0]을 리턴하면 lac operon은 다시 “off”되고, 그때의 시간은 dFBA으로부터 획득된다.

시간에 따른 각 regulatory elements의 active/inactive 그림 3(b), (c)는 *E. Coli*가

preferred carbon source인 glucose를 먼저 소비시키는 것을 잘 나타내고 있다. Glucose 대사 구간, lactose 대사를 위한 transport protein이 합성되는 구간, lactose 대사 구간으로 크게 나눌 수 있다. $t=0(h)$ 에서 $t=4.45(h)$ 의 glucose 대사 구간에서는 S1과 이해 대사 억제를 위한 RP1만이 활성화되고, 나머지 E1, O1, NG1, P1, SG1, SW1이 모두 비활성화된다. Global control이기 때문에 local control인 S2와 RP2는 N(none)이 된다.

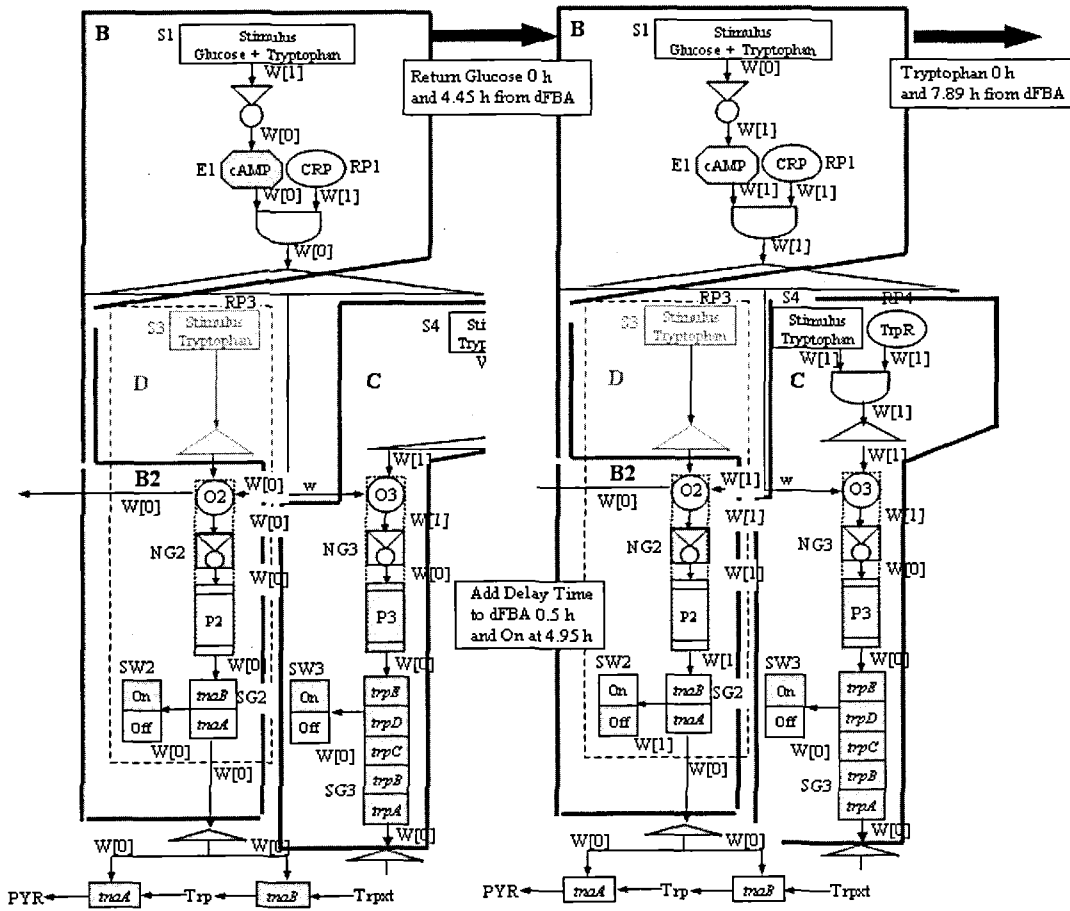
$t=4.45(h)$ 에서 $t=4.95(h)$ 에서는 alternate carbon source인 lactose를 대사하기 위해서, E1, O1, P1, SG1, SW1이 활성화되고, $t=4.95(h)$ 에서 $t=8.59(h)$ 의 구간동안 lactose가 대사된다.

Case study 2. Glucose and Tryptophan in Medium

세포 외부환경에 glucose와 tryptophan이 존재하는 경우에 S1과 S4가 동시에 활성화된다. S1의 활성화에 의한 global control mode은 case study 1.과 동일한 mechanism으로 진행됨으로써, *tnaAB*가 비활성화 된다. 이러한 *tna* operon off는 dFBA에서 glucose의 농도값 [0]이 리턴될 때까지 지속된다. S1에 tryptophan만 존재하는 경우, 가중치가 W[0]되고, not gate에 의해서 W[1]로 변환됨으로써, regulon/operon level에 있는 gene transcription이 활성화된다. 결국 gene level과 metabolic pathway level이 각각 활성화 되어서 tryptophan이 대사된다.

S4의 활성화는 regulon/operon level에서 시작되며, local control에 해당된다. S4의 활성화와 RP4의 활성화는 W[1]을 O3로 전파한다. O3의 활성화는 tryptophan과 Trp이 함께 결합함을 의미한다. Negative control mode이므로 NG3

(a)



(b)

Protein or Gene	Time(h)		
	0	4.45	4.95
cAMP-CRP	off	on	on
tnaA	off	off	on
tanB	off	off	on
trpE	off	off	off
trpD	off	off	off
trpC	off	off	off
trpB	off	off	off
trpA	off	off	off

(c)

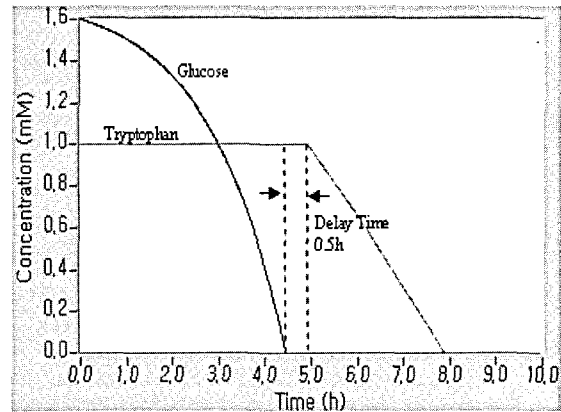


그림 4. Dynamic gene regulation for two carbon sources, glucose-tryptophan.

(a) Weight propagation in digraph. (b) Active / inactive regulatory elements with time. on: activation, off: inactivation, N: none. (c) Metabolite concentration change with time

가 활성화되어서 W[1]을 W[0]으로 변환시킨다. Regulon/operon level에서 W[0]은 gene level로 전파되어 SG3, SW3을 비활성화시킨다. 결국, metabolic pathway level에서 *trpEDCBA*가 비활성화된다. 이러한 *trp* operon off는 tryptophan 때문에, 계속 off상태가 지속된다.

Stimulus에 glucose와 amino acid인 tryptophan이 있는 경우에서도 *E. coli*가 glucose를 먼저 대사하고, tryptophan을 alternate carbon energy source로 사용된다는 것을 그림 4(b), (c)를 통하여 알 수 있다. Glucose 대사 구간, tryptophan 대사를 위한 transport protein이 합성되는 구간, tryptophan 대사 구간으로 나눌 수 있다. $t=0(h)$ 에서 $t=4.45(h)$ 의 glucose 대사구간에서는 S1와 RP1 이외에 S4, RP4, O3, NG3가 tryptophan에 의해서 함께 활성화되어, global control과 local control이 함께 진행됨을 알 수 있다. 그러나 또 다른 local control인 S3와 RP3는 N(none)이 된다.

$t=4.45(h)$ 에서 $t=4.95(h)$ 에서는 alternate carbon source인 tryptophan을 대사하기 위해서, E1, O1, P1, SG1, SW1이 활성화되고, $t=4.95(h)$ 에서 $t=8.59(h)$ 의 구간 동안 tryptophan가 대사되며, tryptophan이 소비되는 동안에 tryptophan을 생성 못하게 하기 위해서 S4, RP4, O3, 그리고 NG3는 계속 활성화된다.

Discussion

본 논문에서는 central metabolic pathway에서 유전자 조절 메커니즘을 표현하기 위해서, 정의된 기호로 계층적 조절 네트워크 축하였고, 결합의 정도를 나타내는 가중치의 개념을 도입함으로써, 조절단백질과 유전자사

이의 관계를 유연하게 하였다. 최종적으로 비주얼 환경인 LabVIEW에서 이러한 모델링을 바탕으로 *In silico* system을 개발하였다.

계층적 조절 네트워크에서 각각의 오페론은 유전자 발현을 위한 선행조건들과 전체적인 제어 흐름을 보여준다. 그림 3(a)와 그림 4(a)에서 *lac* operon을 구성하고 있는 *lacZYA*, *tna* operon을 구성하고 있는 *tnaAB* 그리고 *trp* operon을 구성하고 있는 *trpEDCBA*들이 active되는 선행조건들과 전체적인 과정을 보여 주고 있다. 여기서 genes의 active/inactive여부는 세포외부 환경인 stimulus에 종속적인 조절 단백질과 효과기 (effector)들에 의해서 결정되며, 계층적 조절 네트워크에서 상위 level에 있는 stimulus가 선택되어지면, global하게 조절되어지고, 하위 level에 있는 stimulus가 선택되어지면 local하게 조절되어 carbon source를 선택적으로 대사시키는 것을 알 수 있다.

Central metabolic pathway에 관련된 유전자들 중에서 하나 이상의 조절 단백질에 영향을 받는 유전자들이 71.9%(87/121)였으며, 이는 central metabolic pathway가 환경에 매우 민감하다는 것을 알 수 있다.

정의된 기호로 모델링한 계층적 조절 네트워크와 dFBA의 연계는 시간에 따른 동적인 유전자 조절 예측(prediction of dynamic gene regulation)을 가능하게 한다. 이러한 예는 그림 3.과 그림 4.에서 볼 수 있으며, carbon source concentration 변화와 오페론 on/off를 함께 나타내었다. Glucose와 lactose 농도의 time profile은 기존의 논문 [6]과 유사한 값을 가진다. 모사 결과에서 오페론이 “off”상태에서 “on”상태로 변화할 때에 지연시간이 적용되고, 각 오페론이 “on”된 상태에서 carbon source인 lactose와 tryptophan

concentration의 감소가 발생한다. 만약 오페론이 “off”가 될 경우에는 carbon source의 감소가 발생하지 않는다. 이러한 관점에서 보면, 오페론이 제한 요소로 작용하기 때문에 오페론을 통합으로 조절하는 stimulus, modulon, regulon과 control pattern (positive, negative)의 인지는 중요할 수 있다.

아미노산의 생성과 분해에 관련된 오페론은 서로 상보적인 성격을 가진다. case study2에서 tna operon과 trp operon가 그 예이며, 이러한 오페론들이 동시에 “on”되지 않기 위해서 각각 다른 control mechanism을 사용한다. tna operon은 global control, trp operon은 local control에 의해서 on/off 되어졌다.

In silico system은 본 연구에서 제시한 모델링방법이 사용자에게 예측 결과를 직관적으로 인지할 수 있는 방법을 제공할 수 있다. 정의된 기호들로 모델링한 계층적 조절 네트워크는 좋은 예이다. 환경변화에 따라서 유전자들이 어떻게 조직적으로 조절되는지를 직관적으로 잘 보여준다. 또한 사용자가 쉽게 정량적으로 시뮬레이션할 수 있기 때문에 여러 환경 변화에 따른 조절 단백질과 유전자들의 up/down-regulation를 조사할 수 있다.

본 연구에서는 (I)조절 요소들(regulatory protein, genes, effectors etc.) 사이의 관계를 더욱더 유연하게 표현하기 위해서 가중치의 개념을 도입하였고, (II) 정의된 기호로 계층적 조절 네트워크를 구축하였다. 이러한 모델링을 기반으로해서 (III) 사용자가 쉽게 정량적으로 예측할 수 있고, 비주얼한 결과를 보여줄 수 있는 In silico system을 개발하였다. 이 시스템은 생물학자와 공학자에게 여러 환경 조건하에서 세포의 거동을 연구하는데에 좋은 도구로서 사용될 수 있을 것이

다.

Acknowledgements

이 연구는 2003년 BK21 프로젝트에 의해서 수행되었음.

References

- [1] W.C. Covert, C. H. Schilling, and B. O. Palsson, Regulation of gene expression in flux balance models of metabolism, *J. Theor. Biol.* **213**, 2001, 73-88.
- [2] W. C. Covert and B. O. Palsson, Transcriptional regulation in constraints-based metabolic models of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 2002, 28058-28064.
- [3] M.W. Covert, E. M. Knight, J. L. Reed, M. J. Herrgard, and B. O. Palsson, Integrating high-throughput and computational data elucidates bacterial networks, *Nature*, **429**, 2004, 92-96.
- [4] P. A. Cotter and R. P. Gunsalus, Contribution of the fir and arcA gene products in coordinate regulation of cytochrome o and d oxidase (cyoABCDE and cydAB) genes in *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol Lett*, **70**, 1992, 31-36.
- [5] A. M. Huerta, H. Salgado, D. Thieffry, and J. Collado-Vides, RegulonDB: A database on transcriptional regulation in *Escherichia coli*, *Nucleic. Acids Res.*, **26**, 1998, 55-59.
- [6] A. Kremling, K. Bettenbrock, B. Laube, J. W. Lengeler, and E. D. Gilles, The organization of metabolic reaction networks: Application for diauxic growth on glucose and lactose, *Meta. Eng.*, **3**, 2001, 362-379.
- [7] S. Y. Lee and Papoutsakis, *Metabolic flux balance analysis*, 1999, pp13-57, Marcel Dekker, New York, U.S.A

- [8] H. H. MacAdams, and L. Shapiro, Circuit simulation of genetic networks, *Science*, **269**, 1995, 650-656.
- [9] S. Meyers, and P. Friedland, Knowledge-based simulation of genetic regulation in bacteriophage lambda, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 1984, 1-9.
- [10] C. H. Schilling, J. S. Edwards, Letscher D., and B.O. Palsson, Combining pathway analysis with flux balance analysis for the comprehensive study of metabolic systems, *Biotechnol. Bioeng.*, **71(4)**, 2000, 286-306.
- [11] G. N. Stephanopoulos, A. A. Aristidou, and J. Nielsen, *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*, 1998, pp180-193, Academic press, London, UK.
- [12] S. S. Shen-Orr, R. Milo, S. Mangan, and U. Alon, Network motifs in the transcriptional regulation network of *Escherichia coli*. *Nature Genetics*, **31**, 2002, 64-68.
- [13] M. Tomita, K. Hashimoto, K. Takahashi, T. S. Shimizu, Y. Matsuzaki, F. Miyoshi, K. Saito, S. Tanida, K. Yugi, J. C. Venter, and C. A. Hutchison III, E-Cell: software environment for whole-cell simulation, *Bioinformatics*, **15**, 1999, 72-84.
- [14] A. Varma, B.W. Boesch, and B.O. Palsson, Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1993, 2465-2473.
- [15] A. Varma and B.O. Palsson, Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product Secretion in wild type *Escherichia coli* W3110, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1994a., 3724-3731.
- [16] A. Varma and B.O. Palsson, Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use, *Bio/Technology*, **12**, 1994b, 994-998.
- [17] P.H. Winston, *Artificial Intelligence*, 1992, pp119-137, Addison Wesley, U.S.A
- [18] P. Wong, S. Gladney, and J. D. Keasling, Mathematical model of the lac operon: Inducer exclusion, catabolite repression, and diauxic growth on glucose and lactose, *Biotechnol. Progr.*, **13**, 1997, 132-143.