

BMM5729 – Análise Sistêmica e Engenharia do Metabolismo

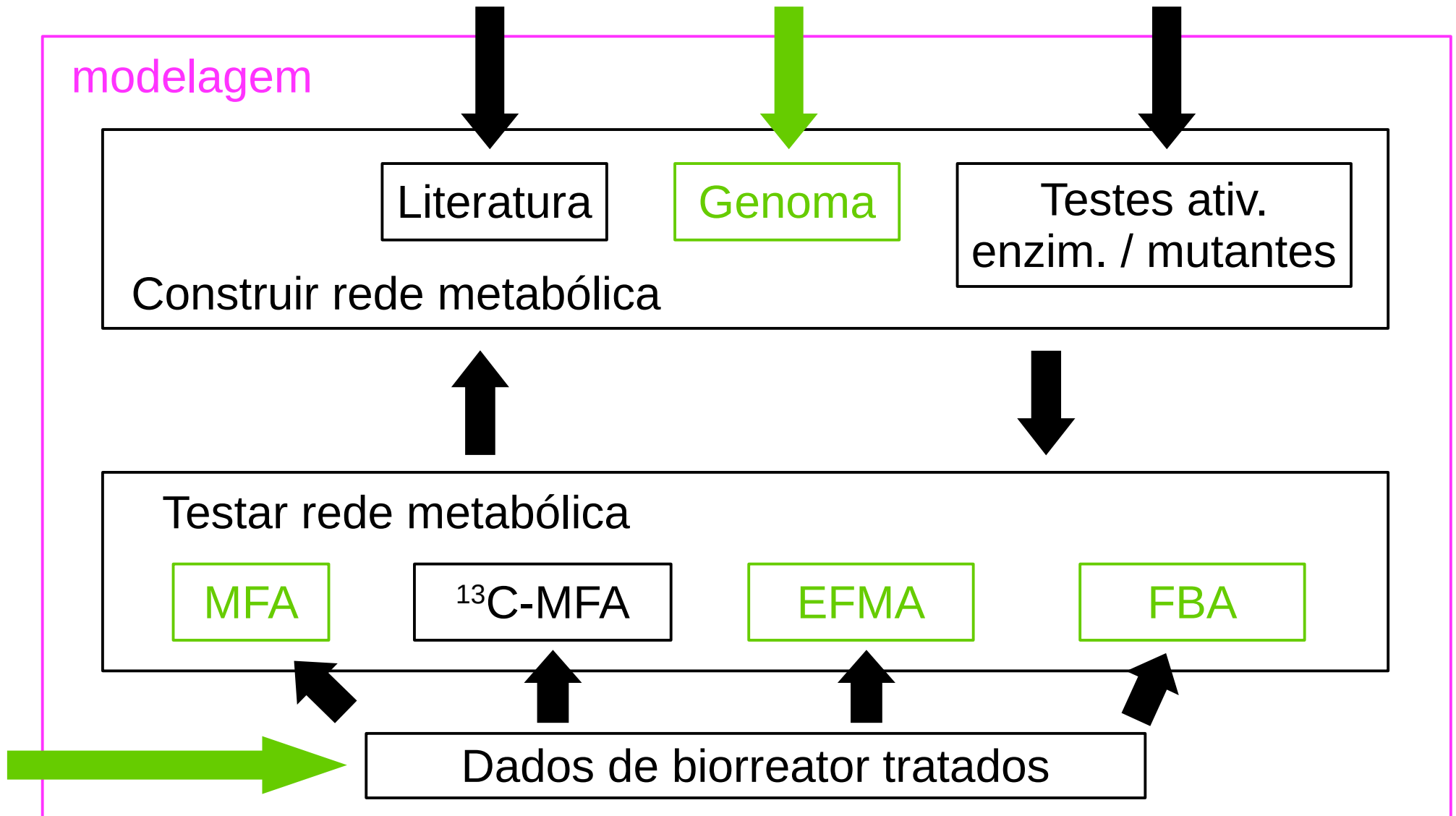
Método do annealing metabólico

Parte 1: Definição e uso

Rafael Nahat
2018

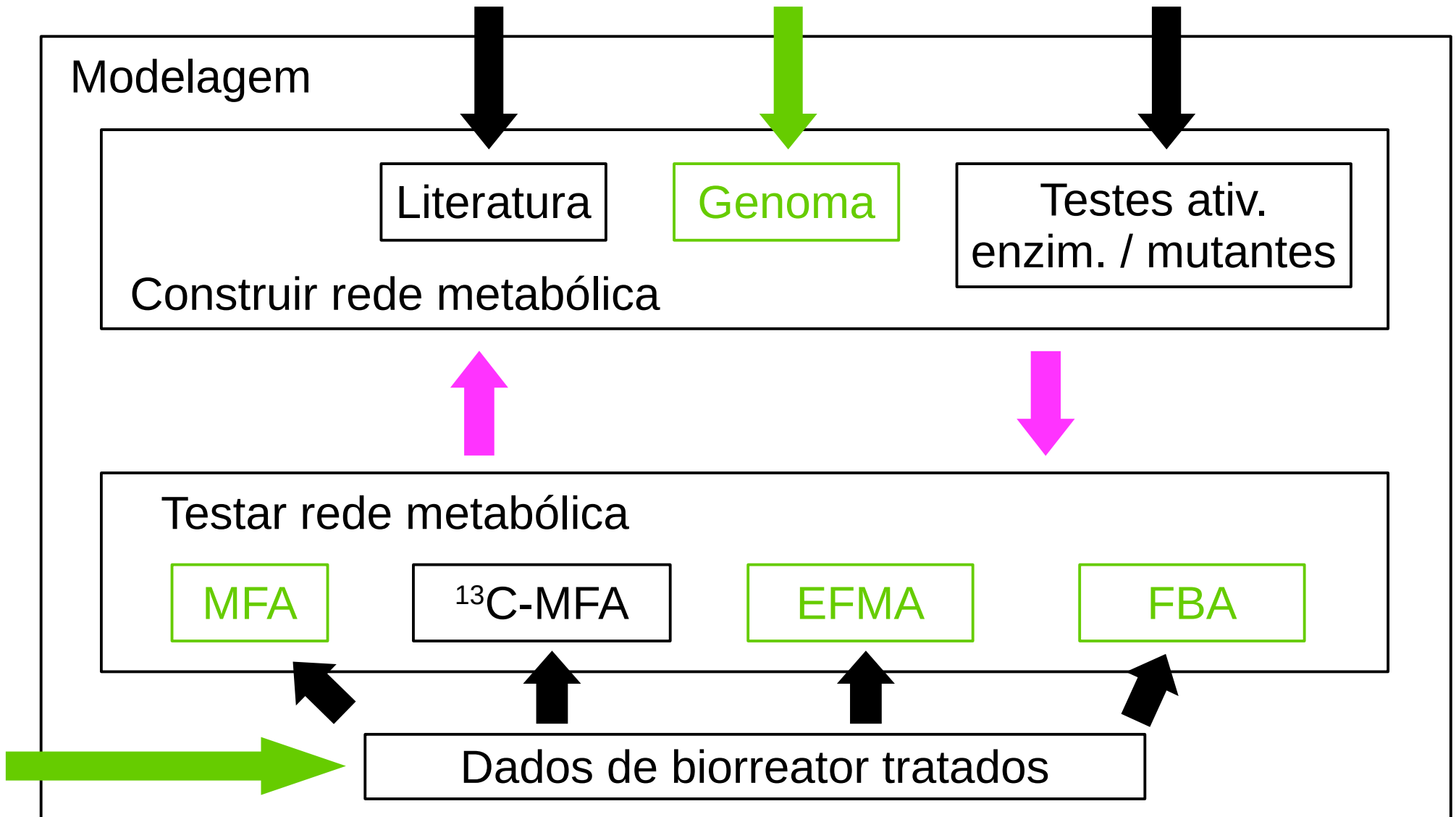
Onde estamos?

Dentro da modelagem, também já vimos algumas coisas



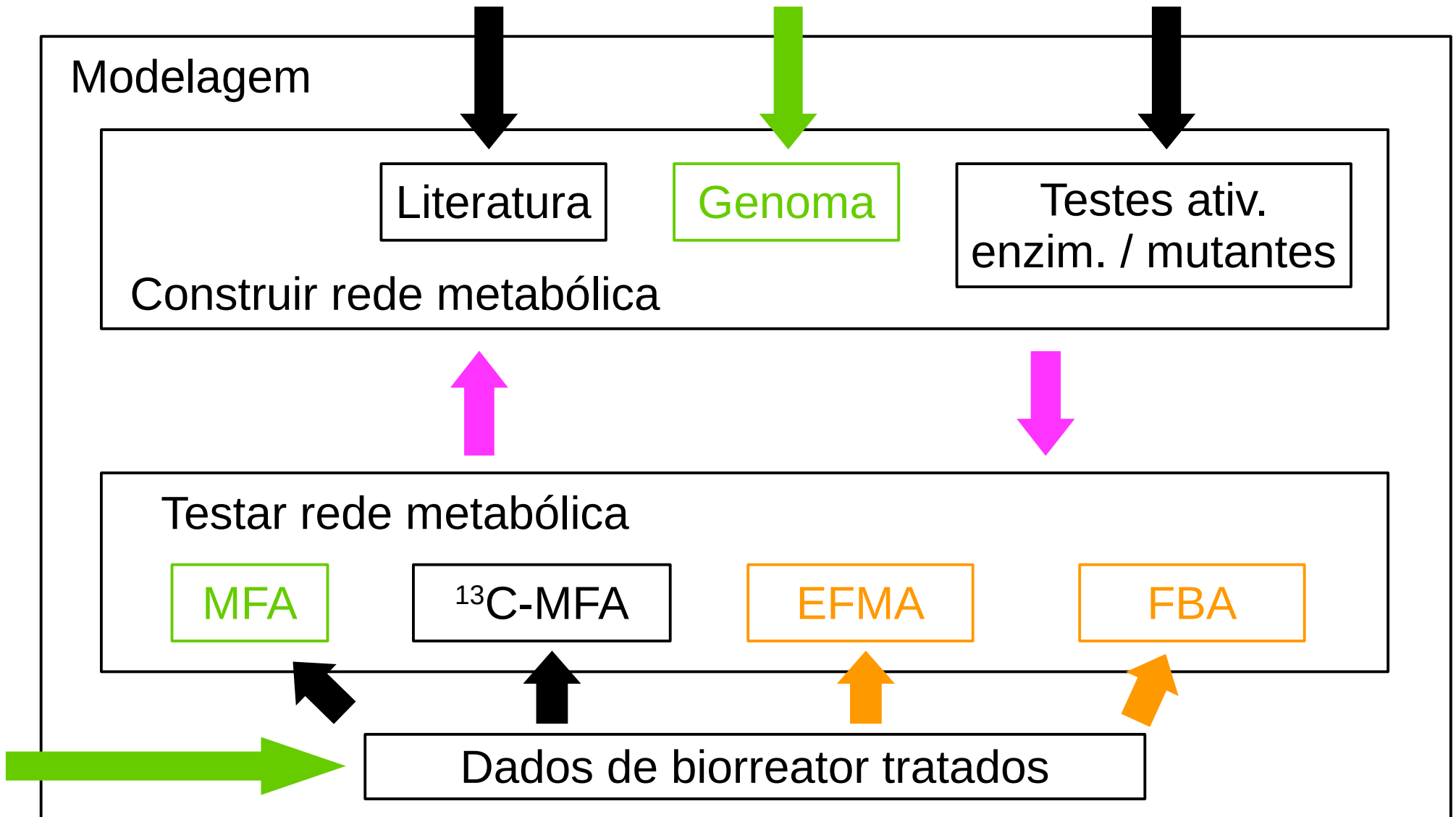
Onde estamos?

Hoje veremos um método para fazer o **ciclo iterativo abaixo**



Onde estamos?

Antes faremos uma **revisão comparativa** rápida



Revisão: EFMA x FBA

EFMA

- Estado estacionário (metabólitos internos)
- Todas as distribuições de fluxos possíveis

FBA

- Estado estacionário (metabólitos internos)
- 1 distribuição de fluxos extrema

Revisão: EFMA x FBA

EFMA

- Estado estacionário (metabólitos internos)
 - Todas as distribuições de fluxos possíveis
- 
- Viável apenas para redes pequenas

FBA

- Estado estacionário (metabólitos internos)
 - 1 distribuição de fluxos extrema
- 
- Independe do tamanho da rede

Revisão: EFMA x FBA

EFMA

- Visão do todo, porém difícil de ver detalhes

FBA

- Foco em um detalhe porém sem ver o todo

Revisão: EFMA x FBA

EFMA

- Visão do todo, porém difícil de ver detalhes

FBA

- Foco em um detalhe porém sem ver o todo

Aplicando na modelagem de redes metabólicas:

Construir: adicionar / remover reações e metabólitos

Validar: simular a rede e interpretar os resultados

Revisão: EFMA x FBA

EFMA

- Visão do todo, porém difícil de ver detalhes

FBA

- Foco em um detalhe porém sem ver o todo

Aplicando na modelagem de redes metabólicas:

Adicionar / remover reações e metabólitos



Simular a rede e interpretar os resultados

Revisão: EFMA x FBA

EFMA

FBA

Lembrem do exercício 5 item II:

Arquivo bsacchari_m_e2.xml

→ Tudo zero! Como achar o erro?

Adicionar / remover reações e metabólitos



Simular a rede e interpretar os resultados

Revisão: EFMA x FBA

EFMA

FBA

Lembrem do exercício 5 item II:

Arquivo bsacchari_m_e2.xml

- Tudo zero! Como achar o erro?
- Isso teria acontecido se cada mudança na rede fosse testada antes da próxima?

Adicionar / remover reações e metabólitos



Simular a rede e interpretar os resultados

Revisão: EFMA x FBA

EFMA

FBA

IMPORTANTE:

Validação não é só ver se a distribuição de fluxos explica dados experimentais. Antes disso precisa ver se a distribuição em si faz sentido!

Adicionar / remover reações e metabólitos



Simular a rede e interpretar os resultados

Revisão: EFMA x FBA

EFMA

FBA

IMPORTANTE – AUTO-VALIDAÇÃO:

Exemplo: ao maximizar a função-objetivo, uma reação que AJUDA nisso na lower bound (exercício 5.III - arquivo bsacchari_m_e3.xml)

Adicionar / remover reações e metabólitos



Simular a rede e interpretar os resultados

Revisão: EFMA x FBA

EFMA

FBA

IMPORTANTE – AUTO-VALIDAÇÃO:

Outros exemplos?

Adicionar / remover reações e metabólitos



Simular a rede e interpretar os resultados

Revisão: EFMA x FBA

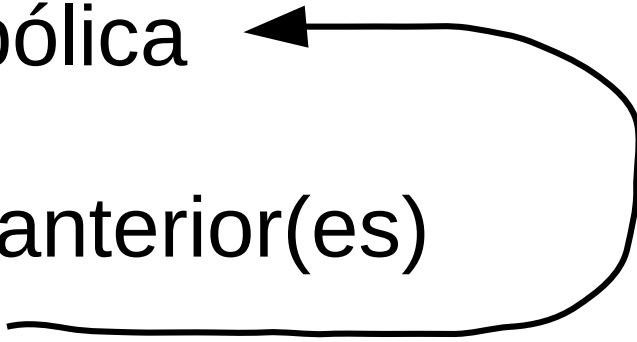
EFMA

- Visão do todo, porém difícil de ver detalhes

FBA

- Foco em um detalhe porém sem ver o todo

Ciclo iterativo:

- 1) Faz alteração na rede metabólica
 - 2) Roda EFMA e/ou FBA
 - 3) Compara solução(ões) com anterior(es)
 - 4) Decide a próxima alteração
- 

Revisão: EFMA x FBA

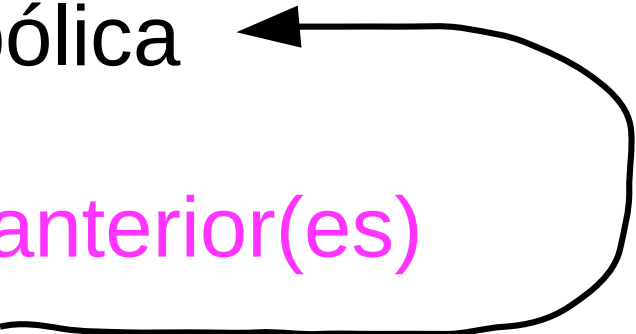
EFMA

- Visão do todo, porém difícil de ver detalhes

FBA

- Foco em um detalhe porém sem ver o todo

Ciclo iterativo:

- 1) Faz alteração na rede metabólica
 - 2) Roda EFMA e/ou FBA
 - 3) Compara solução(ões) com anterior(es)
 - 4) Decide a próxima alteração
- 

Se parar de funcionar, qual é a próxima alteração?

Revisão: EFMA x FBA

EFMA

- Visão do todo, porém difícil de ver detalhes

FBA

- Foco em um detalhe porém sem ver o todo

Quando usar EFMA e/ou FBA no passo 2?

- I) Construindo uma rede do zero, no início
- II) Construindo uma rede do zero, no fim
- III) Adaptando uma rede pronta de outro organismo
- IV) Incluir ou não uma reação do genoma
- V) Incluir ou não uma reação do transcriptoma
- VI) Verificar um experimento em biorreator

Revisão: EFMA x FBA - Exercícios

1) Você está construindo uma rede metabólica. Você rodou FBA maximizando a seguinte função objetivo: $f_{\text{obj}} = v_{01} - v_{19}$. Deu $f_{\text{obj}} = 7 - 12 = -5$.

Agora você quer testar a hipótese da reação 14 estar com a direção errada.

- a) Qual alteração na rede representa esse teste?
- b) Esse teste é auto-validação ou validação com dados experimentais?

Revisão: EFMA x FBA - Exercícios

1) Você está construindo uma rede metabólica. Você rodou FBA maximizando a seguinte função objetivo: $f_{\text{obj}} = v_{01} - v_{19}$. Deu $f_{\text{obj}} = 7 - 12 = -5$.

Agora você quer testar a hipótese da reação 14 estar com a direção errada.

c) Além do teste, você faz $v_{01} = 7$ e $v_{19} = -12$. Quais são as 2 consequências possíveis disso para a próxima distribuição de fluxos? Explique cada uma. Dica: lembre-se que FBA só encontra extremos

Revisão: EFMA x FBA - Exercícios

2) Você já construiu a rede metabólica e tem certeza da direção de todas as reações, e a 11 é reversível. Você testou uma direção da reação 11 com FBA, minimizando $f_{\text{obj}} = v_{07}$. Deu $f_{\text{obj}} = 2$.

Agora você quer testar a reação 11 na outra direção usando a mesma função-objetivo. Faz sentido impor $v_{07} = 2$?

Revisão: EFMA x FBA - Exercícios

3) Você fez 6 ciclos iterativos de construção / validação de uma rede metabólica, usando sempre EFMA. Essa foi a evolução do número de modos elementares não-cíclicos (EMs):

152 $\rightarrow$ 307 $\rightarrow$ 14 $\rightarrow$ 16 $\rightarrow$ zero EMs $\rightarrow$ 77 $\rightarrow$ 77
I II III IV V VI

Os 16 EMs da III foram muito parecidos com os 14 da II. Na IV a rede parou de funcionar. Os 77 da VI são muito diferentes dos 77 da V.

Revisão: EFMA x FBA - Exercícios

3) Essa foi a evolução do número de modos elementares não-cíclicos (EMs):

152 $\xrightarrow{\text{I}}$ 307 $\xrightarrow{\text{II}}$ 14 $\xrightarrow{\text{III}}$ 16 $\xrightarrow{\text{IV}}$ zero EMs $\xrightarrow{\text{V}}$ 77 $\xrightarrow{\text{VI}}$ 77

Os 16 EMs da III foram muito parecidos com os 14 da II. Na IV a rede parou de funcionar. Os 77 da VI são muito diferentes dos 77 da V.

a) O que o resultado da iteração IV significa?

Revisão: EFMA x FBA - Exercícios

3) Essa foi a evolução do número de modos elementares não-cíclicos (EMs):

152 $\xrightarrow{\text{I}}$ 307 $\xrightarrow{\text{II}}$ 14 $\xrightarrow{\text{III}}$ 16 $\xrightarrow{\text{IV}}$ zero EMs $\xrightarrow{\text{V}}$ 77 $\xrightarrow{\text{VI}}$ 77

Os 16 EMs da III foram muito parecidos com os 14 da II. Na IV a rede parou de funcionar. Os 77 da VI são muito diferentes dos 77 da V.

b) A iteração V foi reverter a IV?

Revisão: EFMA x FBA - Exercícios

3) Essa foi a evolução do número de modos elementares não-cíclicos (EMs):

152 $\xrightarrow{\text{I}}$ 307 $\xrightarrow{\text{II}}$ 14 $\xrightarrow{\text{III}}$ 16 $\xrightarrow{\text{IV}}$ zero EMs $\xrightarrow{\text{V}}$ 77 $\xrightarrow{\text{VI}}$ 77

Os 16 EMs da III foram muito parecidos com os 14 da II. Na IV a rede parou de funcionar. Os 77 da VI são muito diferentes dos 77 da V.

c) Qual dos pares de iterações abaixo agrupa as que causaram efeitos mais parecidos na rede?
{I, VI}; {II, III} ou {II e IV}

Revisão: EFMA x FBA - Exercícios

3) Essa foi a evolução do número de modos elementares não-cíclicos (EMs):

152 $\xrightarrow{\text{I}}$ 307 $\xrightarrow{\text{II}}$ 14 $\xrightarrow{\text{III}}$ 16 $\xrightarrow{\text{IV}}$ zero EMs $\xrightarrow{\text{V}}$ 77 $\xrightarrow{\text{VI}}$ 77

Os 16 EMs da III foram muito parecidos com os 14 da II. Na IV a rede parou de funcionar. Os 77 da VI são muito diferentes dos 77 da V.

d) Se a mesma sequência de alterações tivesse sido feita em ciclos de FBA, os resultados não seriam conjuntos de EMs. Como seria a sequência de resultados então?

Revisão: dados experimentais

FBA

EFMA

- Restrições extras
(desigualdades)
- Função-objetivo no
máximo tenta atingir
um valor experimental

Revisão: dados experimentais

FBA

- Restrições extras (desigualdades)
- Função-objetivo no máximo tenta atingir um valor experimental

EFMA

- Reações artificiais forçando a rede a se encaixar (igualdades) – ex 10 da última aula
- Zero ou infinitas soluções válidas que explicam igualmente bem os experimentos

Revisão: dados experimentais

FBA

- Resultado de uma alteração na rede só é conclusivo se:
 - parou de funcionar
 - voltou a funcionar

EFMA

- Resultado de uma alteração na rede só não é conclusivo se:
 - número de EMs e direções vetoriais deles forem muito parecidos (se forem iguais é conclusivo!)

Método do annealing metabólico

Annealing = ciclos de aquecimento e resfriamento de um material para otimizar sua estrutura

Método do annealing metabólico

Annealing = ciclos de aquecimento e resfriamento de um material para otimizar sua estrutura

Annealing metabólico = ciclos de “aquecimento” e “resfriamento” de uma rede metabólica para aproximar suas previsões da realidade experimental

Método do annealing metabólico

Annealing = ciclos de aquecimento e resfriamento de um material para otimizar sua estrutura

Annealing metabólico = ciclos de “aquecimento” e “resfriamento” de uma rede metabólica para aproximar suas previsões da realidade experimental

- Aquecer = aumentar a diversidade das distribuições de fluxos possíveis
- Resfriar = diminuir a diversidade das distribuições de fluxos possíveis

Método do annealing metabólico

Annealing = ciclos de aquecimento e resfriamento de um material para otimizar sua estrutura

Annealing metabólico = ciclos de “aquecimento” e “resfriamento” de uma rede metabólica para aproximar suas previsões da realidade experimental

- Aquecer = aumentar a diversidade das distribuições de fluxos possíveis
- Resfriar = diminuir a diversidade das distribuições de fluxos possíveis

FBA ou EFMA?

Método do annealing metabólico

- **Aquecer** = **aumentar** a diversidade das distribuições de fluxos possíveis
- **Resfriar** = **diminuir** a diversidade das distribuições de fluxos possíveis

Dêem exemplos de alterações na rede metabólica que são **aquecimento** e que são **resfriamento**. Dica: lembre dos exercícios que já fizemos.

Método do annealing metabólico

- **Aquecer** = **aumentar** a diversidade das distribuições de fluxos possíveis
- **Resfriar** = **diminuir** a diversidade das distribuições de fluxos possíveis

Se usarmos o método com FBA, teremos reduced costs. Sabendo que o calor sempre flui do quente para o frio, qual a relação do vetor de reduced costs e a **temperatura** da rede metabólica?

Método do annealing metabólico

- **Aquecer** = **aumentar** a diversidade das distribuições de fluxos possíveis
- **Resfriar** = **diminuir** a diversidade das distribuições de fluxos possíveis

Quando a rede fica inconsistente, resultando em infeasible na FBA e sem modos elementares não-cíclicos na EFMA, qual é a sua temperatura média?

Método do annealing metabólico

- **Aquecer** = **aumentar** a diversidade das distribuições de fluxos possíveis
- **Resfriar** = **diminuir** a diversidade das distribuições de fluxos possíveis

Considerando quando a EFMA e a FBA são conclusivas, é esperado que construir uma rede metabólica leve o mesmo número de iterações para ambas? Qual é mais eficiente?

Método do annealing metabólico

- **Aquecer** = **aumentar** a diversidade das distribuições de fluxos possíveis
- **Resfriar** = **diminuir** a diversidade das distribuições de fluxos possíveis

Os reduced costs da FBA ajudam a decidir qual será a próxima alteração na rede. Como decidir isso com EFMA, que não tem reduced costs?

Método do annealing metabólico

- **Aquecer** = **aumentar** a diversidade das distribuições de fluxos possíveis
- **Resfriar** = **diminuir** a diversidade das distribuições de fluxos possíveis

Considerando que FBA encontra somente soluções extremas de acordo com uma função-objetivo, o que vai acontecer se usarmos maximização da biomassa em todas as iterações do annealing?

Método do annealing metabólico

- **Aquecer** = **aumentar** a diversidade das distribuições de fluxos possíveis
- **Resfriar** = **diminuir** a diversidade das distribuições de fluxos possíveis

Fazendo o método somente com FBA, existe alguma função-objetivo que mitiga o viés?

Método do annealing metabólico

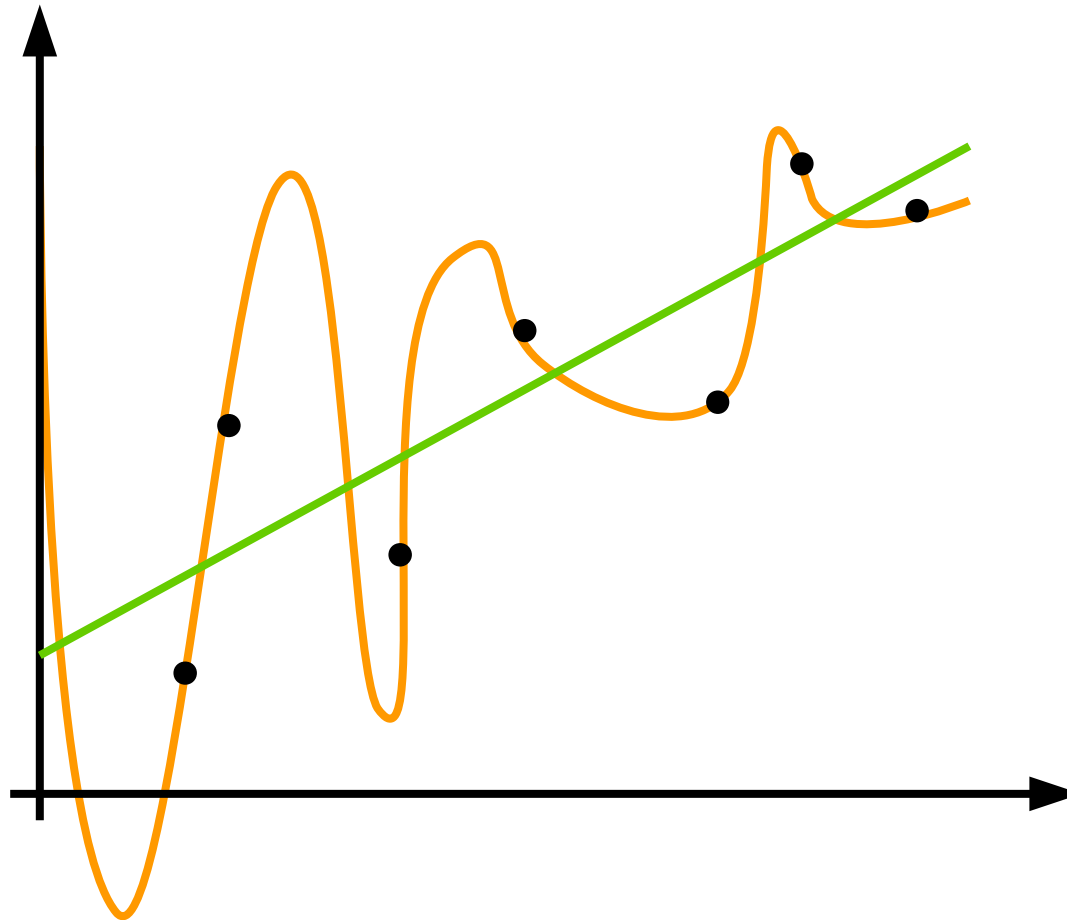
- **Aquecer** = **aumentar** a diversidade das distribuições de fluxos possíveis
- **Resfriar** = **diminuir** a diversidade das distribuições de fluxos possíveis

Vantagens desse método:

- Constrói e valida a rede ao mesmo tempo
- Mitiga o risco de overfit na rede metabólica final

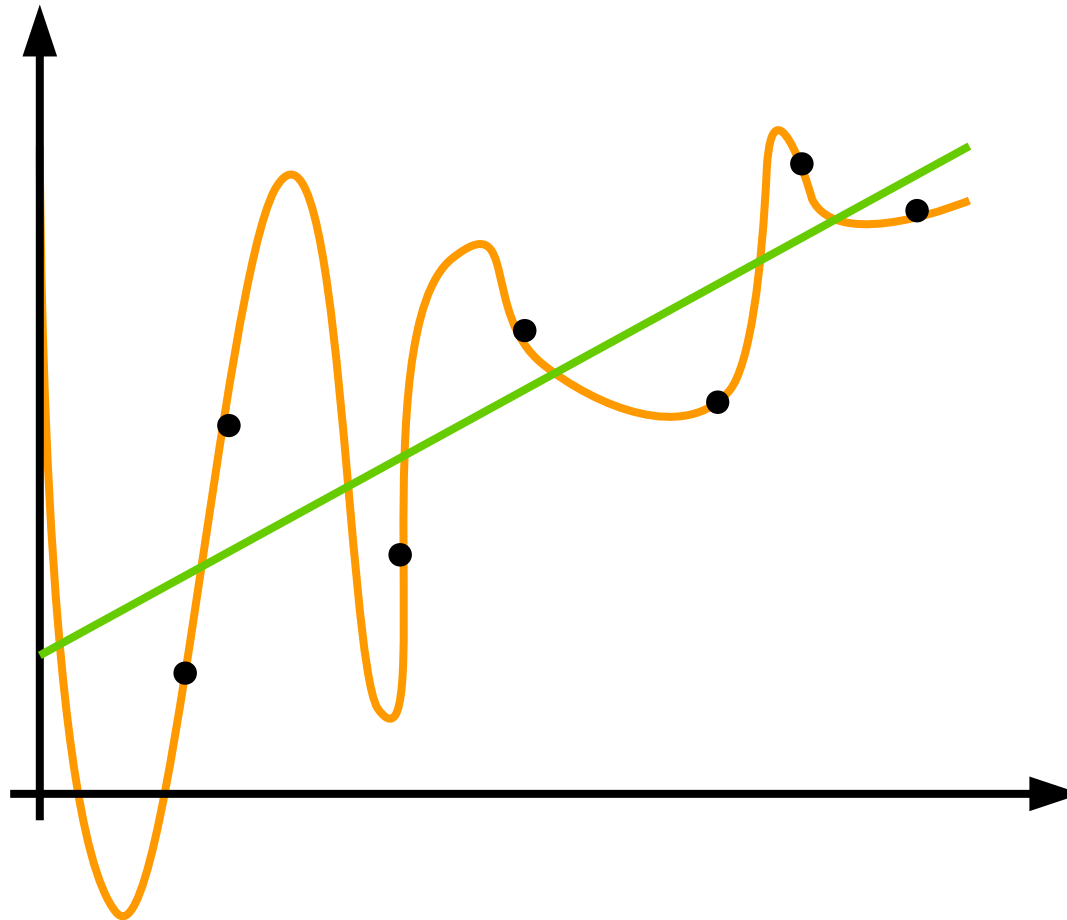
Método do annealing metabólico

Overfit?



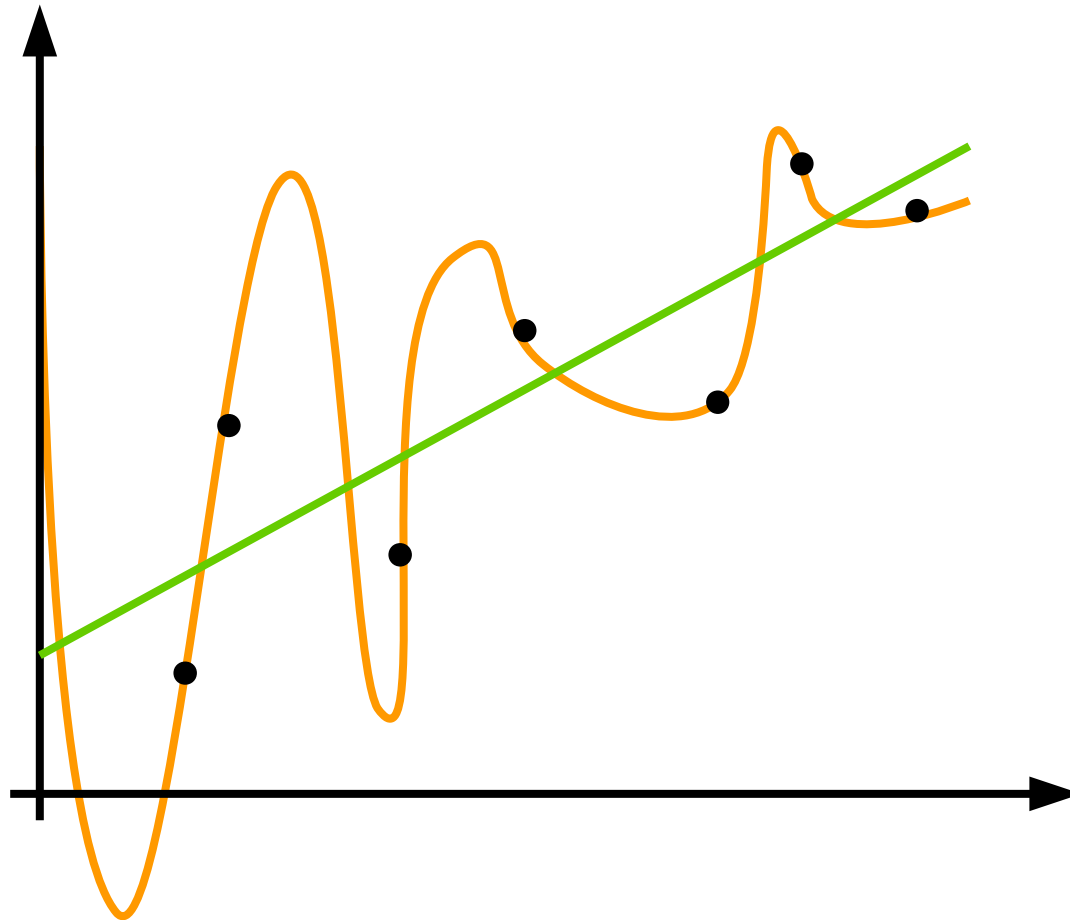
Método do annealing metabólico

Mas como reconhecer overfit numa distribuição de fluxos?



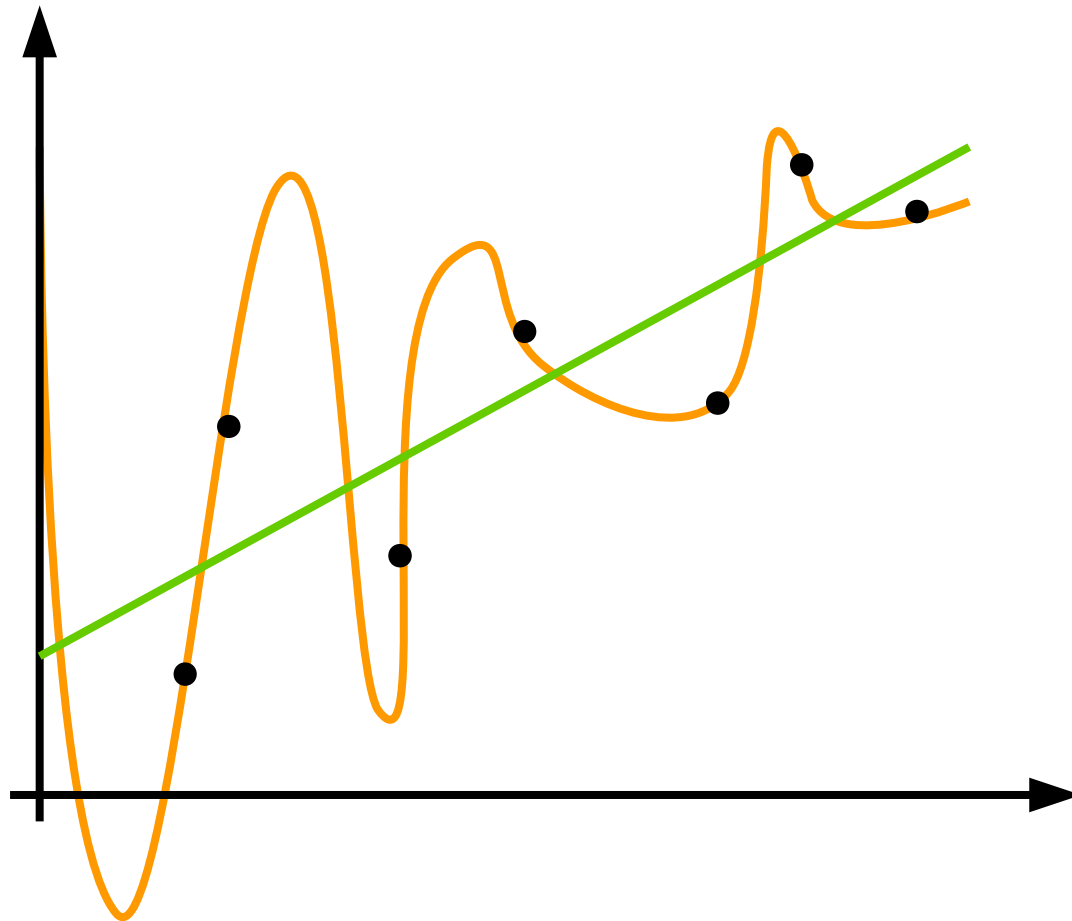
Método do annealing metabólico

O princípio por trás é o mesmo do gráfico abaixo:
segunda lei da termodinâmica!



Método do annealing metabólico

Entropia sempre aumenta no universo, então a configuração mais simples possível do universo é cada vez mais provável!



Método do annealing metabólico

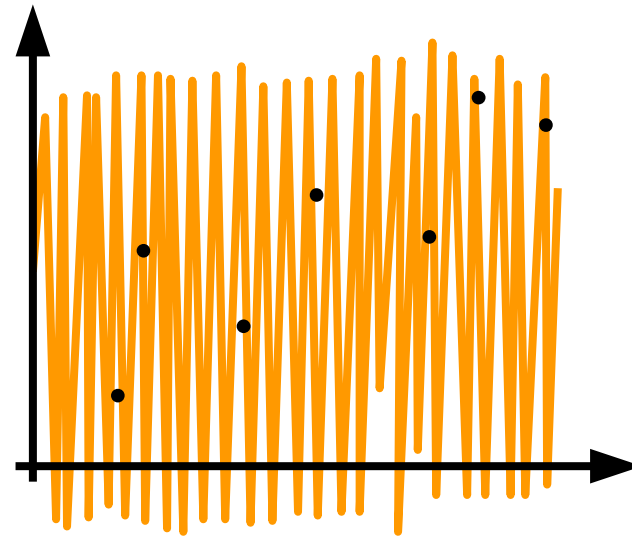
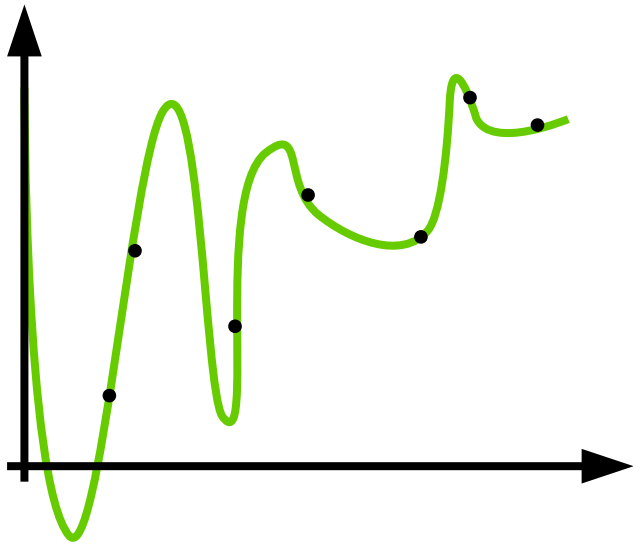
Proteção contra overfit e underfit:

- Annealing pára de ser conclusivo assim que todos os dados experimentais e informações teóricas já foram consolidados no modelo
- Cada alteração foi testada isoladamente, então:
 - Se qualquer alteração fizer a rede parar de funcionar → overfit, está fria demais
 - Se nenhuma alteração fizer a rede parar de funcionar → underfit, está quente demais

Método do annealing metabólico

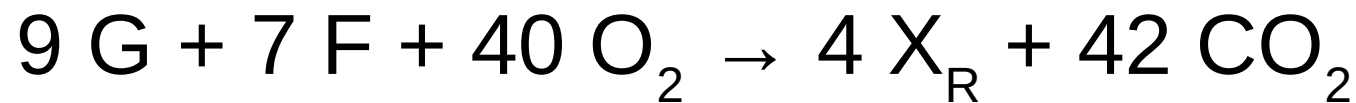
Proteção contra overfit e underfit:

- Cada alteração foi testada isoladamente, então:
 - Se qualquer alteração fizer a rede parar de funcionar → overfit, **está fria demais**
 - Se nenhuma alteração fizer a rede parar de funcionar → underfit, **está quente demais**



Annealing metabólico - exercícios

4) Você tem os seguintes dados experimentais (G = glicose, F = frutose. Tudo em base molar):

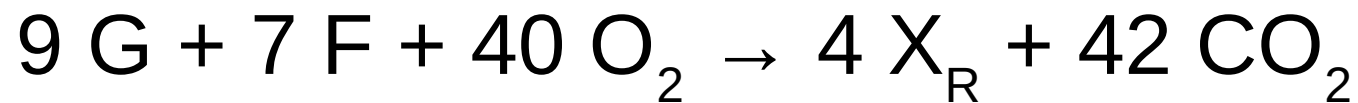


a) Se você já tem a rede metabólica pronta, como verificaria se ela explica os 2 experimentos?

b) Se você está construindo a rede, como poderia forçar a rede a explicar os 2 experimentos?

Annealing metabólico - exercícios

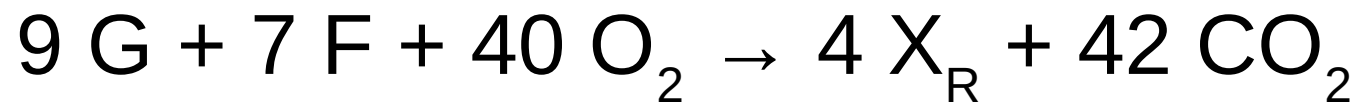
4) Você tem os seguintes dados experimentais (G = glicose, F = frutose. Tudo em base molar):



c) Se você incluir todas as restrições do primeiro experimento e a rede parar de funcionar, como faria para descobrir o problema? Dica: pense em porquê o método de annealing altera gradualmente a rede

Annealing metabólico - exercícios

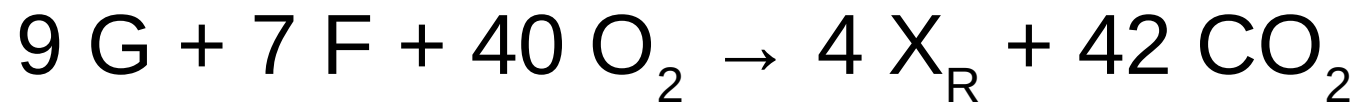
4) Você tem os seguintes dados experimentais (G = glicose, F = frutose. Tudo em base molar):



d) Se a rede metabólica só tem reações balanceadas e esses dados tiverem erro no balanço de massa ou no redox, o que vai acontecer ao forçar a rede a satisfazer um deles?

Annealing metabólico - exercícios

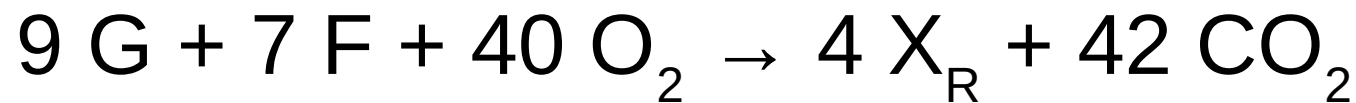
4) Você tem os seguintes dados experimentais (G = glicose, F = frutose. Tudo em base molar):



e) No primeiro experimento, se o $Y_{X/G}$ estiver com -19% de erro (como no exemplo das aulas de tratamento de dados), o que pode acontecer ao simular a rede satisfazendo esse experimento?

Annealing metabólico - exercícios

4) Você tem os seguintes dados experimentais (G = glicose, F = frutose. Tudo em base molar):



f) As reações acima não contém água, mas ela é um metabólito externo. Se a rede não funcionar com um desses experimentos pode ser por causa da omissão da água?

Annealing metabólico - exercícios

5) Considerando quimiostatos de uma Burkholderia produzindo PHA, avalie a necessidade das medições abaixo para a auto-validação, validação com dados experimentais e redundância:

- a) Determinação qualitativa de uma amostra da cultura inteira, sem separar nada antes
- b) Mesmo que o item a, mas sem a biomassa
- c) Determinação da concentração de NH_4^+
- d) Determinação da pressão parcial de O_2
- e) Análise elemental da biomassa
- f) Quantificação de todos os aminoácidos da biomassa

Annealing metabólico - exercícios

6) Considere o exercício anterior, o método do annealing metabólico e o fato de que as redes em escala genômica de *Pseudomonas* publicadas na literatura resultam “infeasible” no FBA para os nossos experimentos de maior acúmulo de PHA.

a) Deu “infeasible” até tirar o RQ das restrições. Qual pode ser o problema?

b) Qual é o viés do método usado na construção dessas redes que mascarou o problema?

c) Qual(is) medição(ões) poderia(m) ter desmascarado o problema antes da publicação dessas redes?