

Análise do estado estacionário de uma rede metabólica

Caroline Satye Martins Nakama

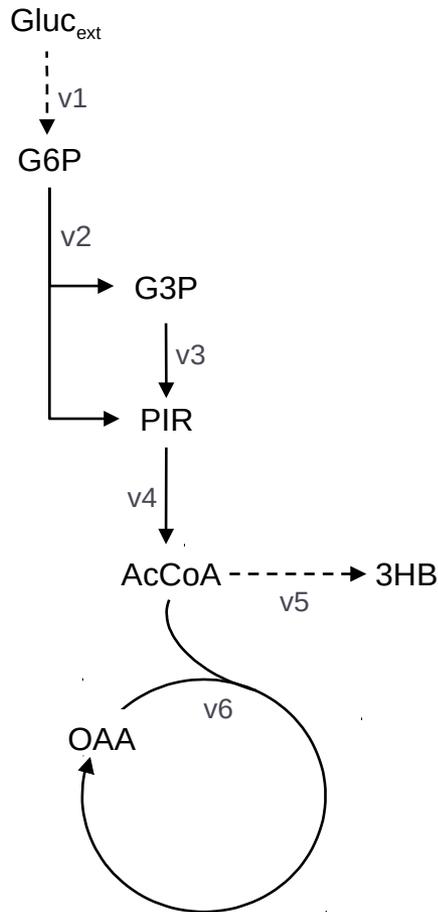
Estado estacionário

“Um sistema em um **estado estacionário**, (ou **regime permanente** para a engenharia), tem numerosas propriedades que são inalteráveis no tempo.”

Wikipedia



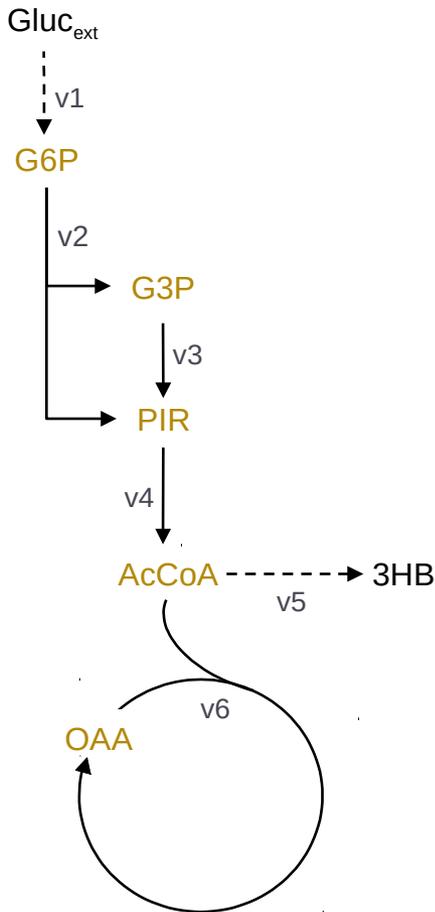
Rede metabólica



- ▶ *Burkholderia sacchari*
- ▶ Metabolismo central MUITO simplificado
 - ▶ Via Entner Doudoroff
 - ▶ Ciclo de Krebs
 - ▶ Sem crescimento
 - ▶ Produção de PHB



Balanço dos metabólitos internos



- ▶ Cada metabólito interno compõe um *pool*
- ▶ As reações são fluxos de entrada e saída desses *pools*

$$\frac{d[G6P]}{dt} = v_1 - v_2 - \mu[G6P]$$

$$\frac{d[G3P]}{dt} = v_2 - v_3 - \mu[G3P]$$

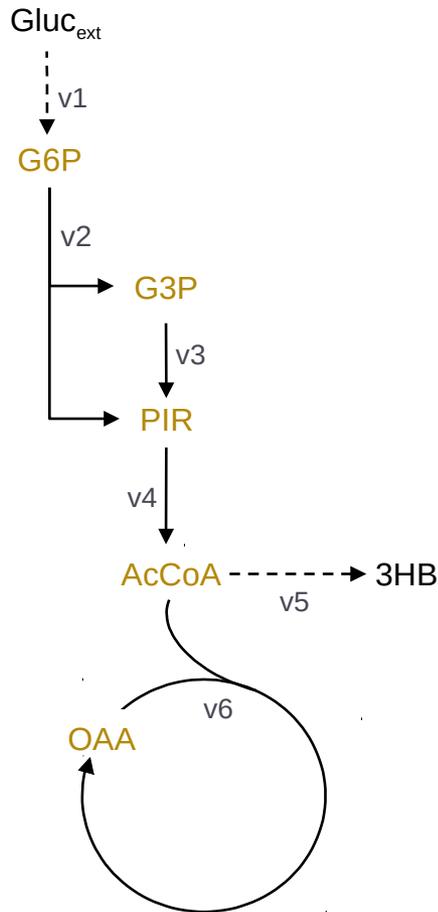
$$\frac{d[PIR]}{dt} = v_2 + v_3 - v_4 - \mu[PIR]$$

$$\frac{d[AcCoA]}{dt} = v_4 - 2v_5 - v_6 - \mu[AcCoA]$$

$$\frac{d[OAA]}{dt} = v_6 - v_6 - \mu[OAA]$$

Balanço dos metabólitos internos

- ▶ Hipótese do estado estacionário



$$\frac{d[G6P]}{dt} = v_1 - v_2 - \mu[G6P] = 0$$

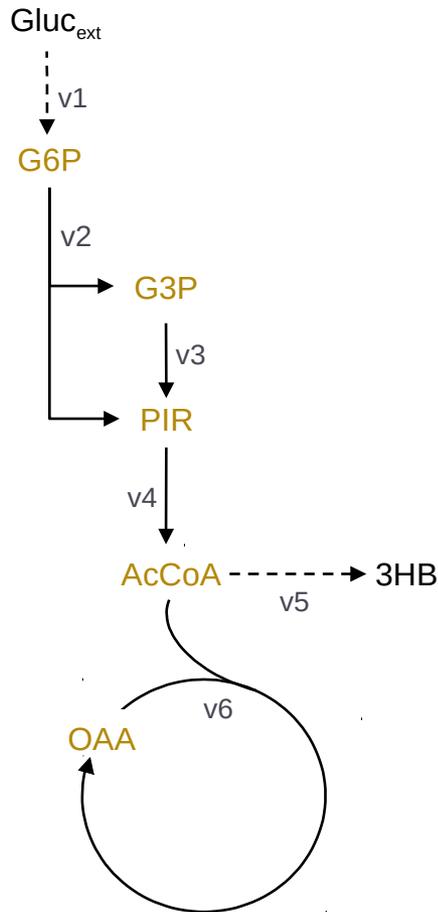
$$\frac{d[G3P]}{dt} = v_2 - v_3 - \mu[G3P] = 0$$

$$\frac{d[PIR]}{dt} = v_2 + v_3 - v_4 - \mu[PIR] = 0$$

$$\frac{d[AcCoA]}{dt} = v_4 - 2v_5 - v_6 - \mu[AcCoA] = 0$$

$$\frac{d[OAA]}{dt} = v_6 - v_6 - \mu[OAA] = 0$$

Balanço dos metabólitos internos



$$v_1 - v_2 = 0$$

$$v_2 - v_3 = 0$$

$$v_2 + v_3 - v_4 = 0$$

$$v_4 - 2v_5 - v_6 = 0$$

~~$$v_6 - v_6 = 0$$~~

Forma matricial

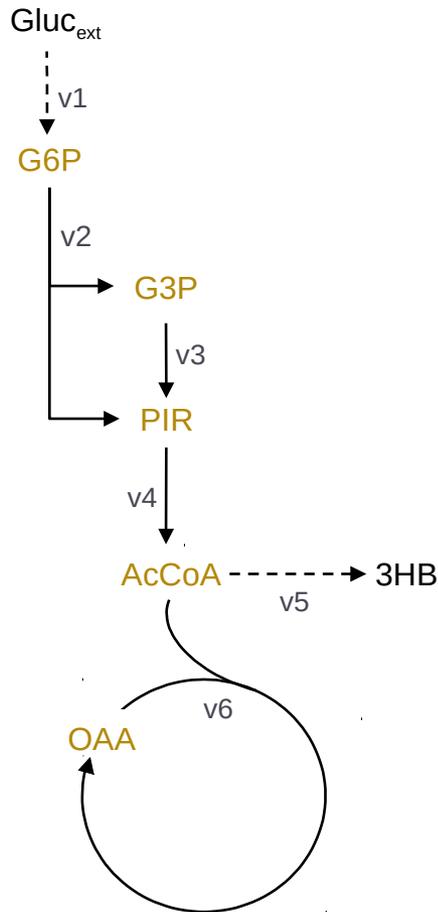
$$\begin{bmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -2 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \end{bmatrix} = 0$$

Notação matricial: $Nv = 0$

Letra maiúscula: matriz
Letra minúscula: vetor
Letra grega: número

Análise de fluxos metabólicos (MFA)

- Utiliza fluxos externos medidos para determinar a distribuição de fluxos



$$\begin{bmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -2 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \end{bmatrix} = 0 \quad Nv = 0$$

$$\begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_6 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & -2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ v_5 \end{bmatrix} = 0 \quad N_d v_d + N_m v_m = 0$$

$$\begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_6 \end{bmatrix} = - \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & -2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ v_5 \end{bmatrix} \quad N_d v_d = -N_m v_m$$

Análise de fluxos metabólicos (MFA)

► Dados experimentais

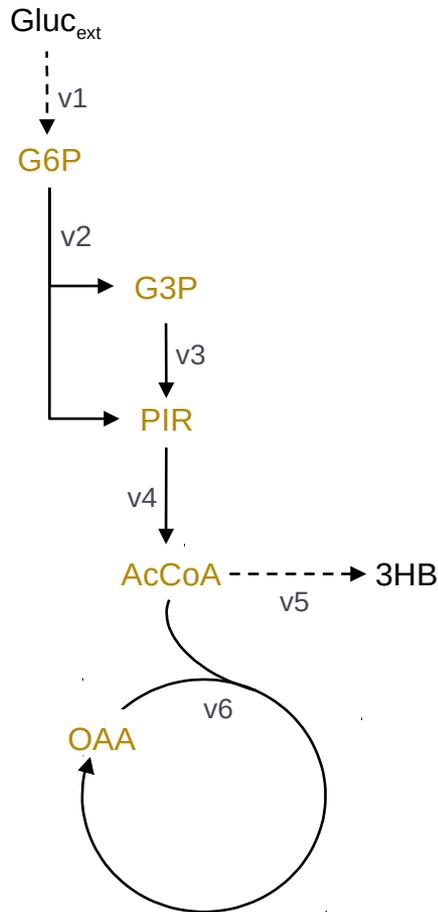
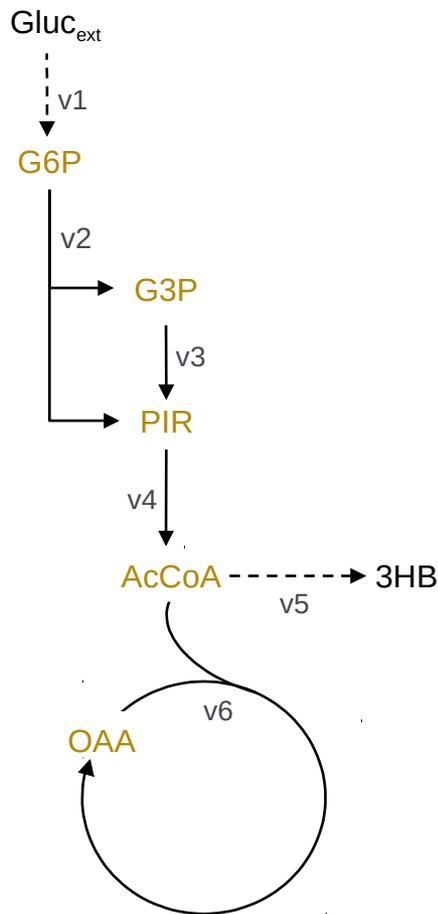


Tabela 5.24 – Consumo de substratos e formação de PHA de cultivo em biorreator (B06 a B10) da linhagem recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) suprida de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (0 - 45 g/L).

		Glicose	3HB	Ác. Hex	3HHx	CO ₂	O ₂	Balanco C
B10 P(3HB)	g/h	2,85	1,11	0,00	0,00	-	-	
	g/g.h	v_1 0,35	v_5 0,14	0,00	0,00	-	-	
	mmol/g.h	1,97	1,60	0,00	0,00	4,26	3,57	
	mmolC/g.h	11,82	6,42	0,00	0,00	4,26	-	90,19

Análise de fluxos metabólicos (MFA)



$$\begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_6 \end{bmatrix} = - \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & -2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1,97 \\ 1,60 \end{bmatrix}$$

$$N_d v_d = -N_m v_m$$

$$\begin{bmatrix} v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_6 \end{bmatrix} = - \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & -2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1,97 \\ 1,60 \end{bmatrix}$$

$$v_d = -N_d^{-1} N_m v_m$$

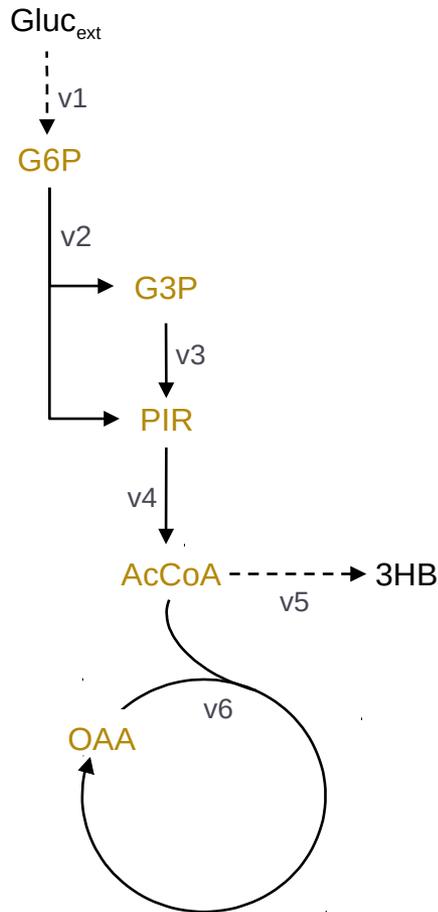
► Octave/Matlab

$$N_d = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 \end{bmatrix}$$

$$N_m = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & -2 \end{bmatrix}$$

$$v_m = \begin{bmatrix} 1,97 \\ 1,60 \end{bmatrix}$$

Análise de fluxos metabólicos (MFA)



► Verificar fluxos externos

$$v_1 - v_2 = 0 \longrightarrow v_1 = v_2$$

$$v_4 - 2v_5 - v_6 = 0 \longrightarrow v_5 = \frac{v_4 - v_6}{2}$$

Análise de fluxos metabólicos (MFA)

► Dados experimentais

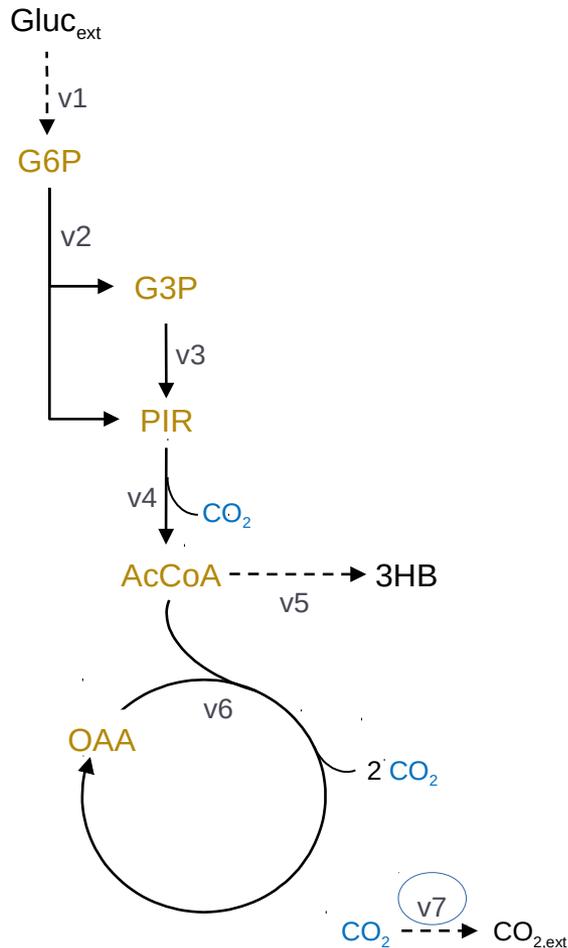
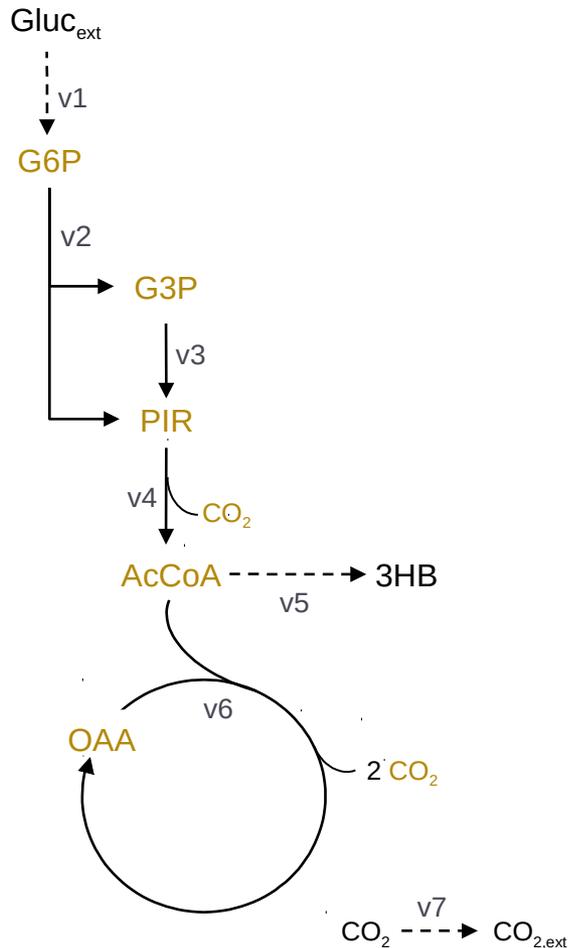


Tabela 5.24 – Consumo de substratos e formação de PHA de cultivo em biorreator (B06 a B10) da linhagem recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) suprida de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (0 - 45 g/L).

		Glicose	3HB	Ác. Hex	3HHx	CO_2	O_2	Balanco C
B10 P(3HB)	g/h	2,85	1,11	0,00	0,00	-	-	
	g/g.h	v1 10,35	v5 0,14	0,00	0,00	v7 -	-	
	mmol/g.h	1,97	1,60	0,00	0,00	4,26	3,57	
	mmolC/g.h	11,82	6,42	0,00	0,00	4,26	-	90,19

Análise de fluxos metabólicos

► Balanço dos metabólitos internos



$$v_1 - v_2 = 0$$

$$v_2 - v_3 = 0$$

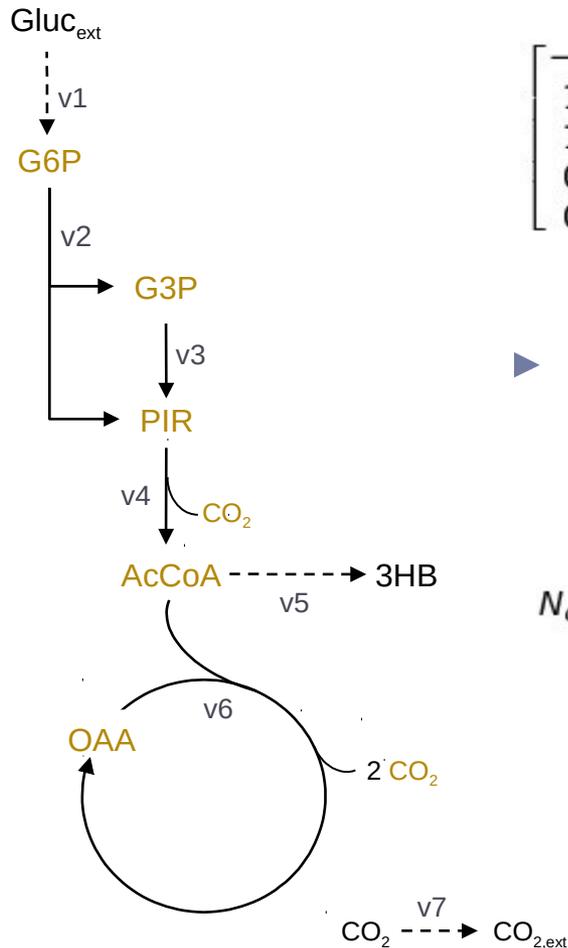
$$v_2 + v_3 - v_4 = 0$$

$$v_4 - 2v_5 - v_6 = 0$$

$$v_4 + 2v_6 - v_7 = 0$$

$$\begin{bmatrix}
 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 1 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 1 & -2 & -1 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 2 & -1
 \end{bmatrix}
 \begin{bmatrix}
 v_1 \\
 v_2 \\
 v_3 \\
 v_4 \\
 v_5 \\
 v_6 \\
 v_7
 \end{bmatrix}
 = 0 \quad Nv = 0$$

Análise de fluxos metabólicos



$$\begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 \\ 0 & 0 & 1 & 2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_6 \end{bmatrix} = - \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & -2 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1.97 \\ 1.60 \\ 4.26 \end{bmatrix}$$

$$N_d v_d = -N_m v_m$$

► Octave/Matlab

$$N_d = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 \\ \boxed{0 & 0 & 1 & 2} \end{bmatrix} \quad N_m = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & -2 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{bmatrix}$$

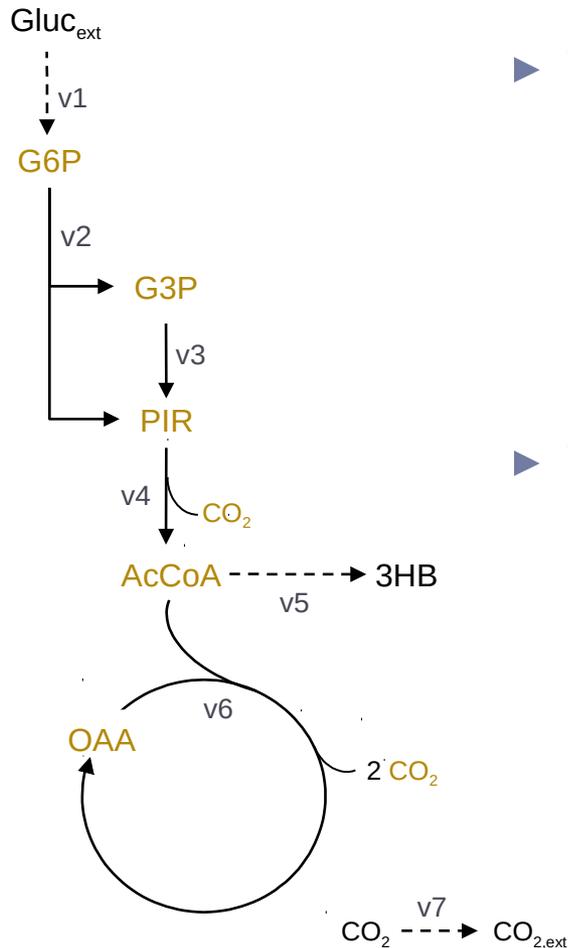
$$v_m = \begin{bmatrix} 1.97 \\ 1.60 \\ 4.26 \end{bmatrix}$$

Informação redundante

$$v_d = -N_d \setminus (N_m v_m)$$

Estimação

Análise de fluxos metabólicos



► Verificar os fluxos

$$v_1 - v_2 = 0 \longrightarrow v_1 = v_2$$

$$v_4 - 2v_5 - v_6 = 0 \longrightarrow v_5 = \frac{v_4 - v_6}{2}$$

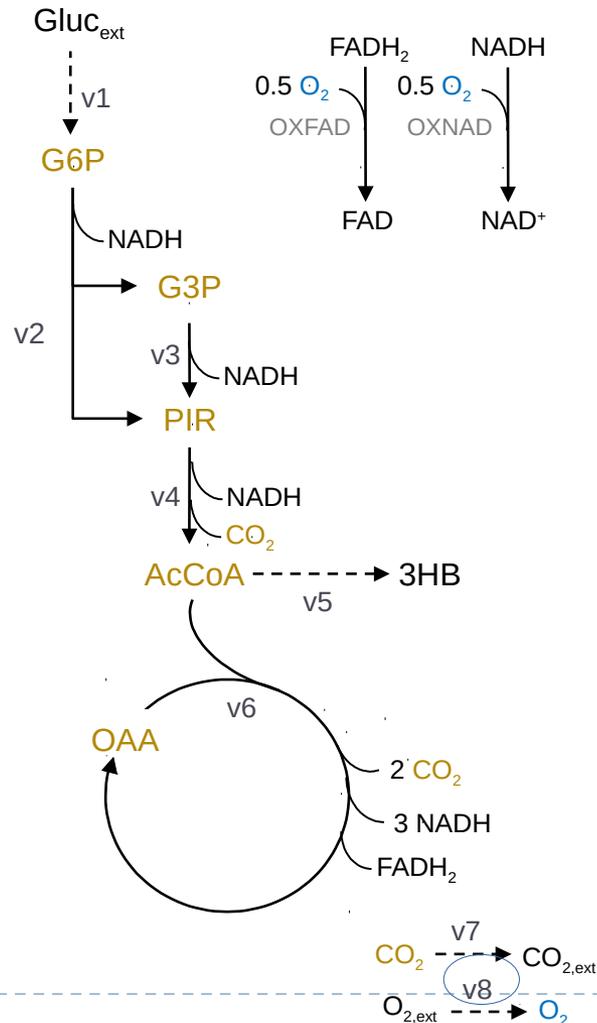
$$v_4 + 2v_6 - v_7 = 0 \longrightarrow v_7 = v_4 + 2v_6$$

► Verificar balanço de carbono dos fluxos externos

Dados experimentais:

Fluxos estimados:

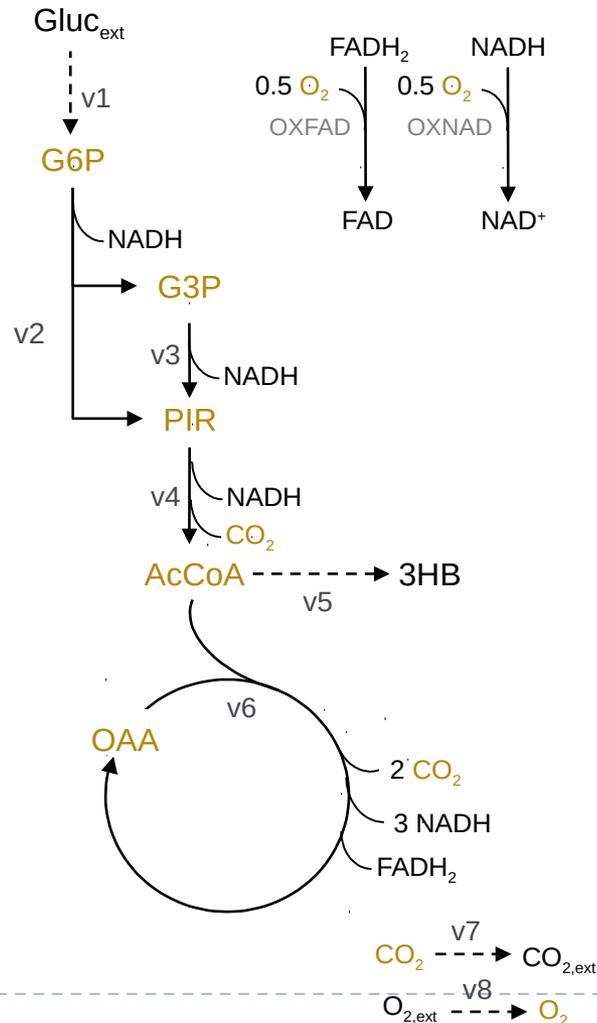
Análise de fluxos metabólicos



▶ Exercício

- ▶ Utilizar o dado de fluxo de $\text{O}_2 = 3.57$
- ▶ Dica
 - ▶ Os balanços dos cofatores não são necessários

Análise de fluxos metabólicos



► Verificar os fluxos

$$v_1 - v_2 = 0 \longrightarrow v_1 = v_2$$

$$v_4 - 2v_5 - v_6 = 0 \longrightarrow v_5 = \frac{v_4 - v_6}{2}$$

$$v_4 + 2v_6 - v_7 = 0 \longrightarrow v_7 = v_4 + 2v_6$$

$$-0.5v_2 - 0.5v_3 - 0.5v_4 - 2v_6 + v_8 = 0$$

$$\longrightarrow v_8 = 0.5v_2 + 0.5v_3 + 0.5v_4 + 2v_6$$

► Verificar balanço de carbono dos fluxos externos

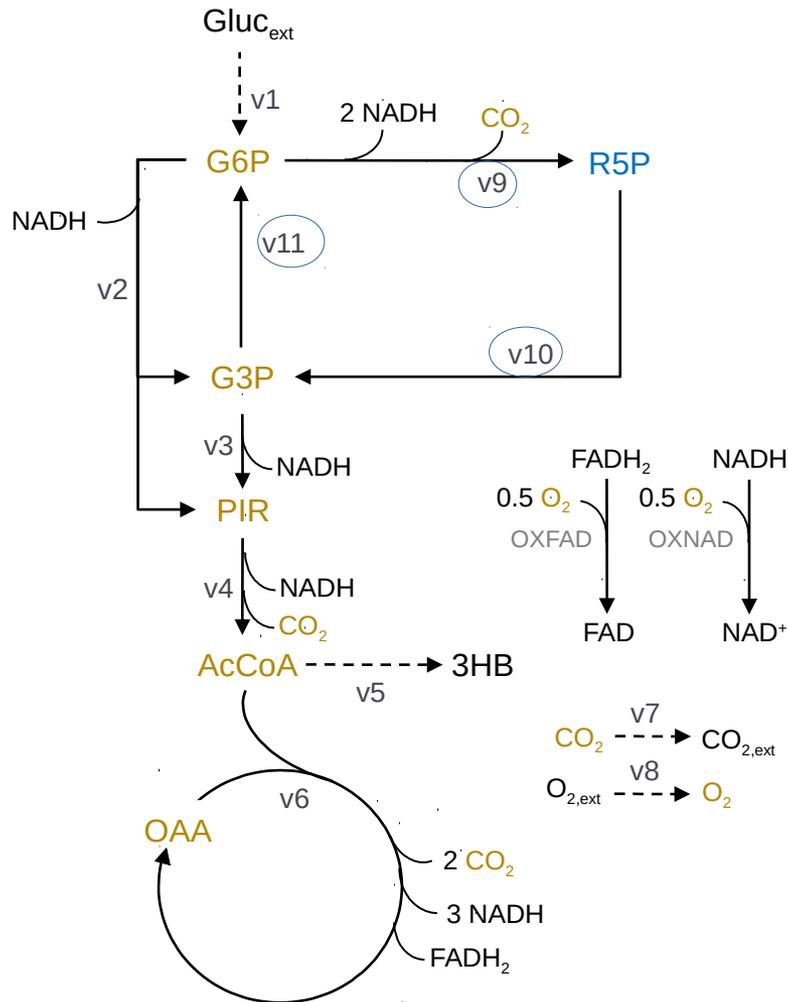
Dados experimentais:

Fluxos estimados com CO_2 :

Fluxos estimados com CO_2 e O_2 :

Análise de fluxos metabólicos

- Adição das vias das pentoses e da ED cíclica



$$\text{G6P: } v_1 - v_2 - v_9 + v_{11} = 0$$

$$\text{G3P: } v_2 - v_3 + v_{10} - v_{11} = 0$$

$$\text{PIR: } v_2 + v_3 - v_4 = 0$$

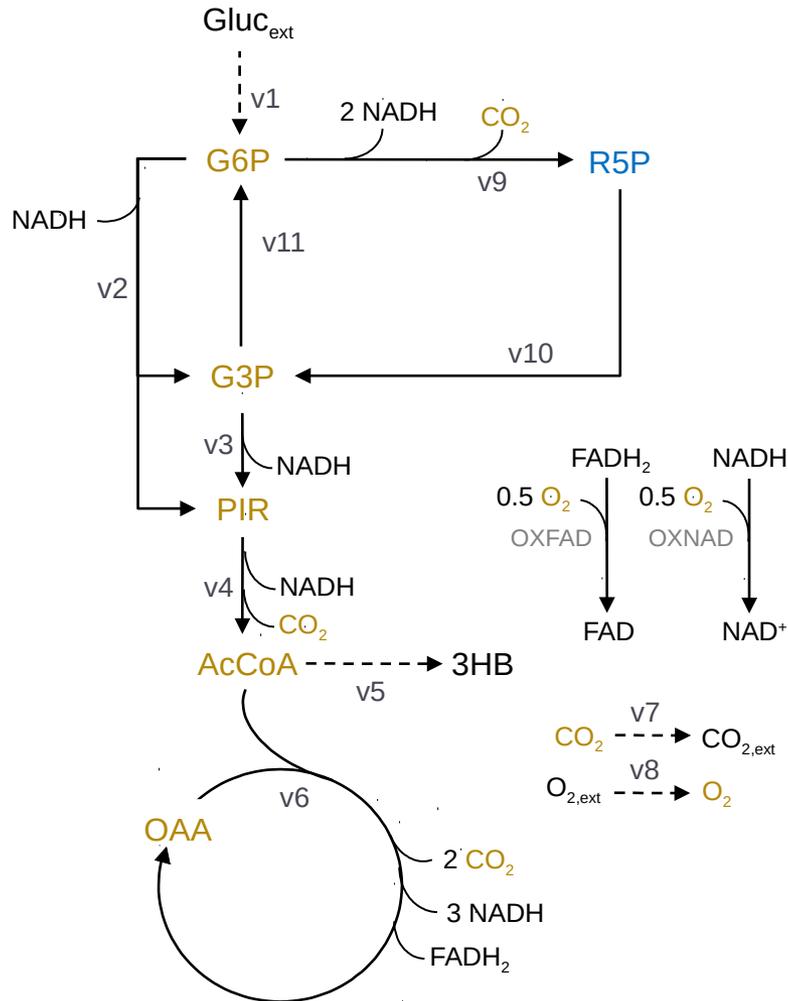
$$\text{AcCoA: } v_4 - 2v_5 - v_6 = 0$$

$$\text{CO}_2: v_4 + 2v_6 - v_7 + v_9 = 0$$

$$\text{O}_2: -0.5v_2 - 0.5v_3 - 0.5v_4 - 2v_6 + v_8 - v_9 = 0$$

$$\text{R5P: } v_9 - v_{10} = 0$$

Análise de fluxos metabólicos



- ▶ Não é possível aplicar MFA nesse caso
- ▶ A redundância do caminho faz com que alguns balanços sejam equivalentes
- ▶ Essencialmente, há mais fluxos a serem definidos do que balanços (mais variáveis do que equações)
- ▶ O vetor v_d tem **infinitas respostas**

Espaço nulo

- ▶ Quando o número de colunas é maior que o número de linhas, há infinitas soluções diferentes do vetor nulo para $Nv = 0$
- ▶ Essas soluções encontram-se no espaço nulo de N

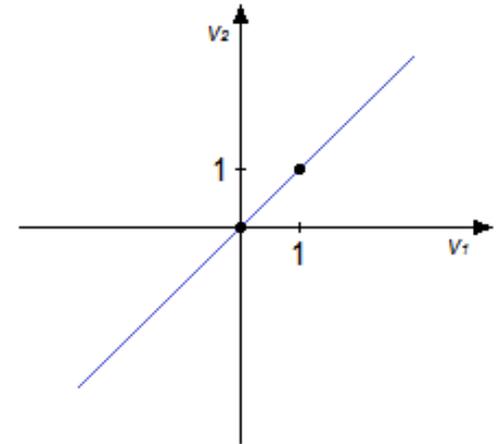
$$NK = 0$$

- ▶ Todos os fluxos que mantêm o sistema em estado estacionário podem ser escritos como combinações lineares das colunas K
- ▶ Exemplo

ext \rightarrow A

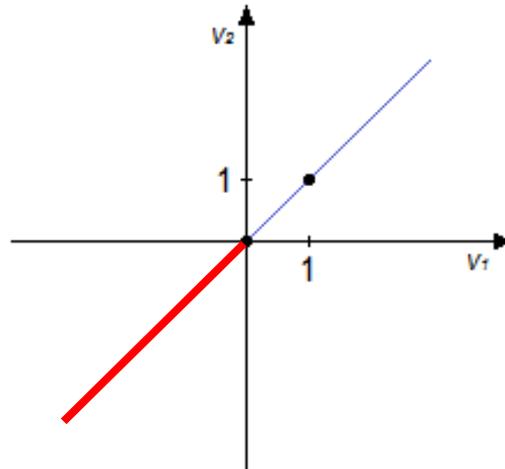
A \rightarrow ext

$$\begin{bmatrix} 1 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \end{bmatrix} = 0$$



Espaço nulo

- ▶ Nem todos os fluxos que podem ser formados pelas colunas de K são válidos
- ▶ Se um reação for irreversível, seu fluxo não pode ser negativo



- ▶ Por esse motivo, a análise desses fluxos cai no escopo de análise convexa



Modos de fluxos elementares

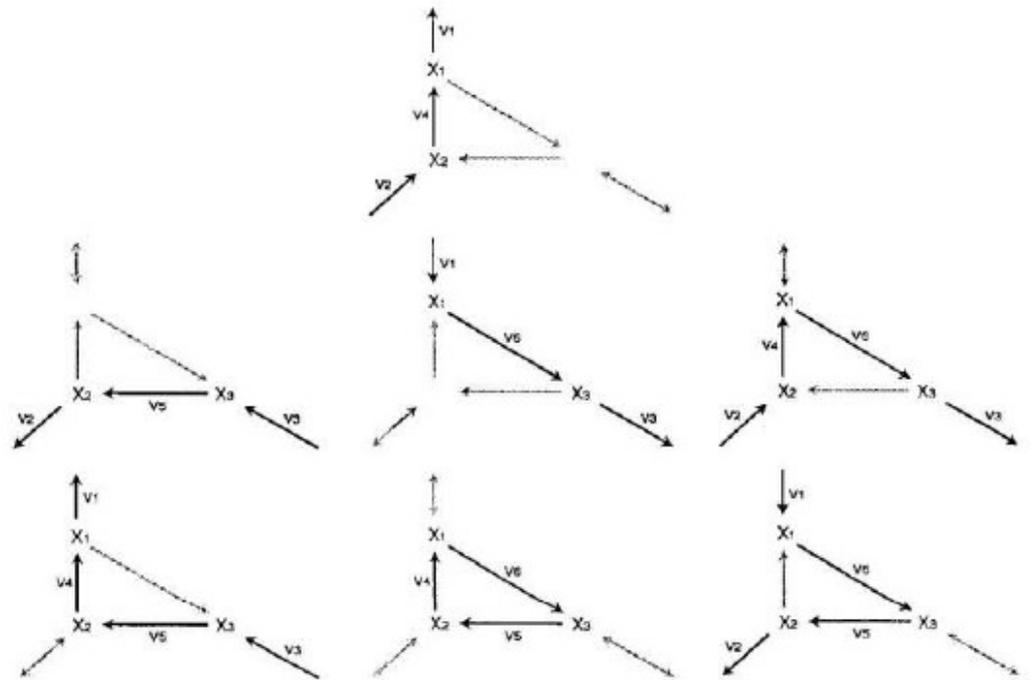
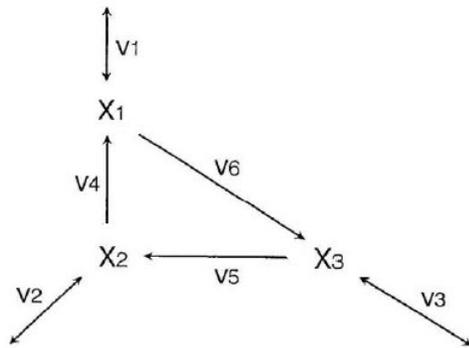
- ▶ Modos de fluxos elementares (EFM) são vetores de fluxos que mantêm a rede metabólica em estado estacionário e satisfazem três propriedades
 - ▶ São únicos
 - ▶ Contêm o número mínimo de reações necessárias para funcionar
 - ▶ O conjunto de modos elementares contém todos os vetores de fluxos que satisfazem a segunda propriedade

- ▶ Há dois tipos de modos elementares
 - ▶ Com reações de fronteira
 - ▶ Cíclico ~~termodinamicamente~~ impossíveis



Modos de fluxo elementares

▶ Exemplo



Modos de fluxos elementares

▶ Aplicações

- ▶ Identificar todos os caminhos mínimos possíveis
- ▶ Avaliar a redundância da rede metabólica
- ▶ Identificar todos os caminhos mínimos com rendimento máximo
- ▶ Verificar a importância das reações
- ▶ Identificar *targets* para modificações genéticas
- ▶ Calcular *minimal cut sets*

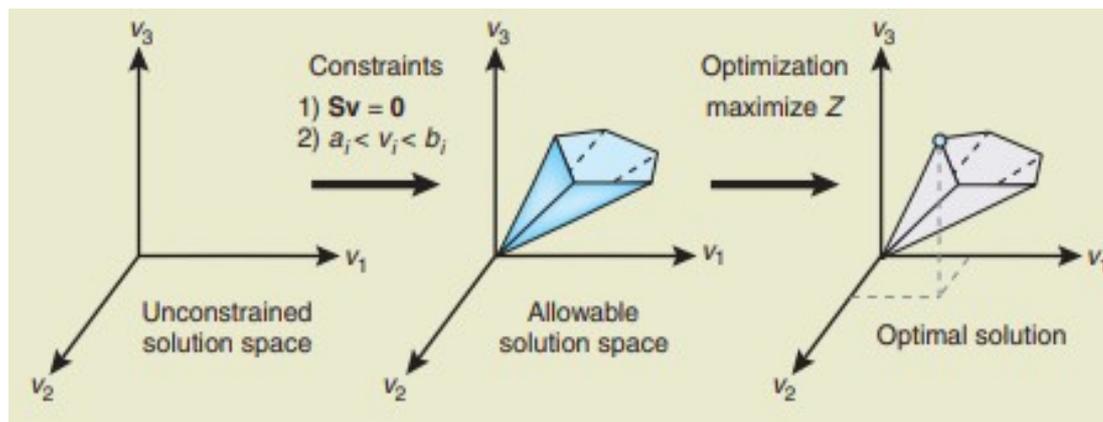
▶ Software disponíveis

- ▶ **Metatool** - <http://penguin.biologie.uni-jena.de/bioinformatik/networks/metatool/metatool5.1/metatool5.1.html>
- ▶ Optflux
- ▶ COPASI



Análise de balanço de fluxos

- ▶ Análise de balanço de fluxos (FBA) é um modelo que nos permite estudar possíveis fluxos em uma rede metabólica quando não temos dados suficientes para determinar todos os fluxos
 - ▶ Matematicamente falando, é um problema de otimização no qual buscamos maximizar ou minimizar um fluxo, respeitando os balanços dos metabólitos (matrix M) e fluxos máximos e mínimos (restrições)
 - ▶ O fluxo a ser maximizado ou minimizado é chamado de função objetivo, sendo a maximização do crescimento o objetivo mais comum



Análise de balanço de fluxos

- ▶ Aplicações
 - ▶ Analisar rendimento máximo
 - ▶ Verificar a importância das reações
 - ▶ Identificar e simular *targets* para modificações genéticas
 - ▶ Flux Variability Analysis

- ▶ Software disponíveis
 - ▶ **COBRA** - <http://opencobra.github.io/>
 - ▶ Escher - <https://sbrg.github.io/escher-fba/>
 - ▶ Optflux



EFM x FBA

- ▶ É possível ver todos os caminhos mínimos que levam ao mesmo resultado
 - ▶ Ainda é aplicável apenas a redes pequenas e medias (em torno de 100 fluxos)
 - ▶ Usa apenas informação de estequiometria e reversibilidade das reações
- ▶ Fornece apenas um resultado
 - ▶ Pode ser usado em redes em escala genômica
 - ▶ É possível incorporar valores de fluxos

