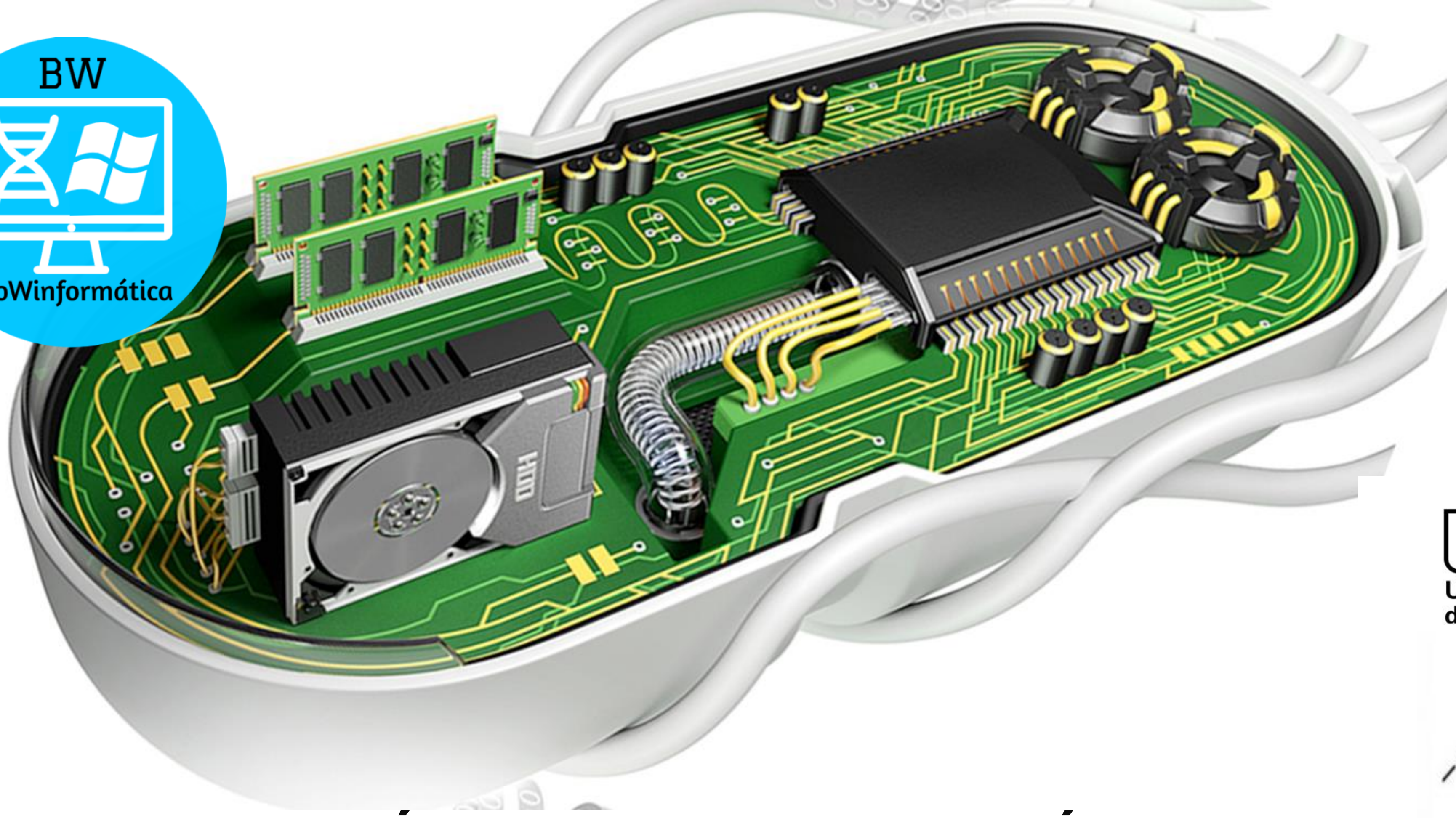
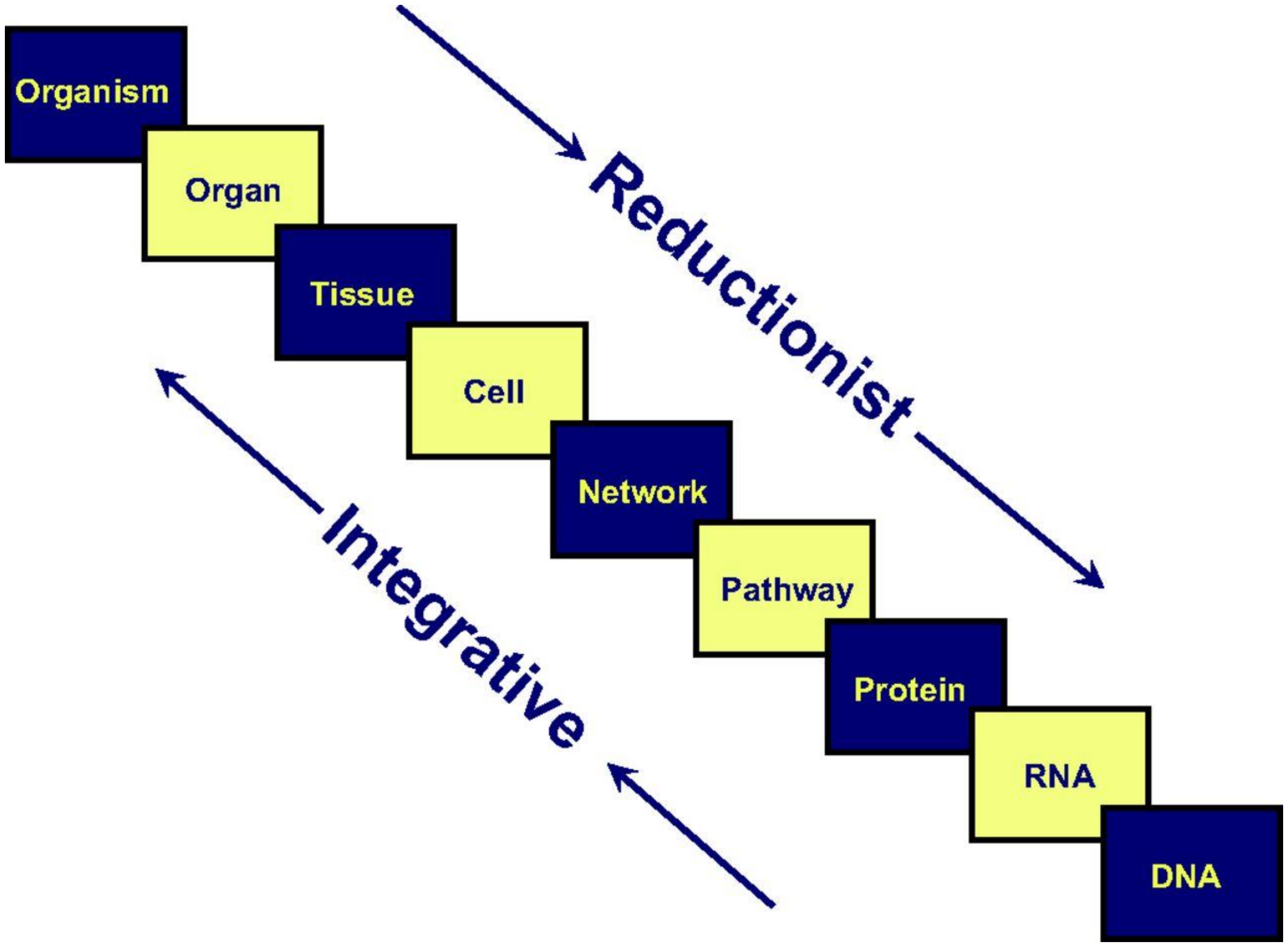


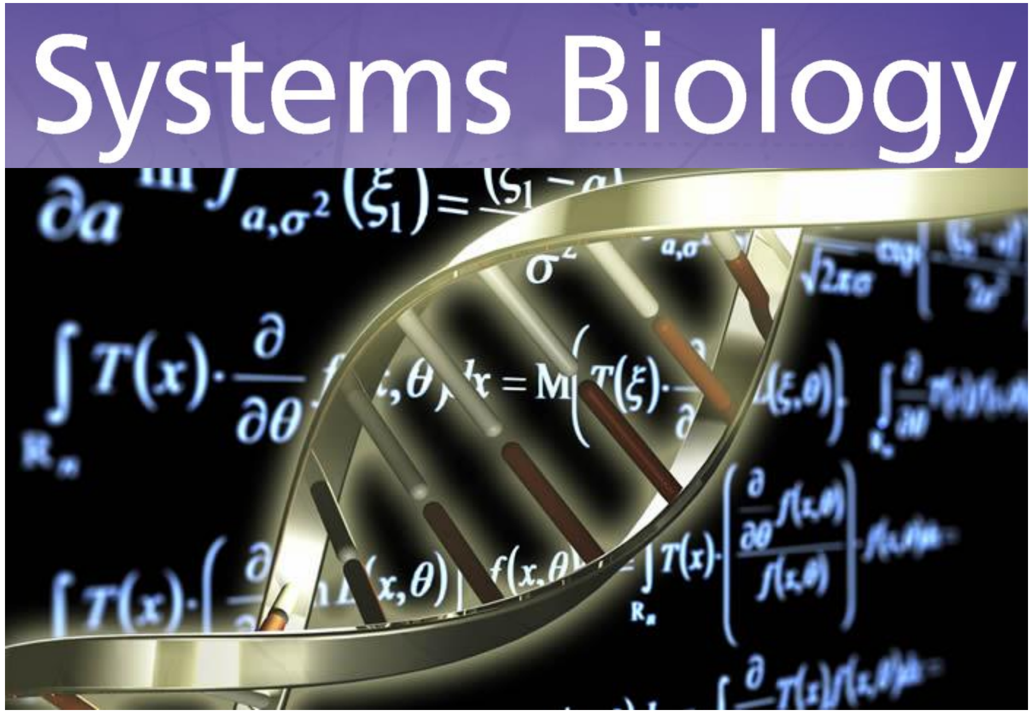
MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS. RECONSTRUÇÃO DE VIAS METABÓLICAS: INTRODUÇÃO A BIOLOGIA DE SISTEMAS PARA ANÁLISE *IN SILICO* DE METABOLISMO

Alex Ranieri J. Lima
biowinformatica1@gmail.com
alexranieri@hotmail.com

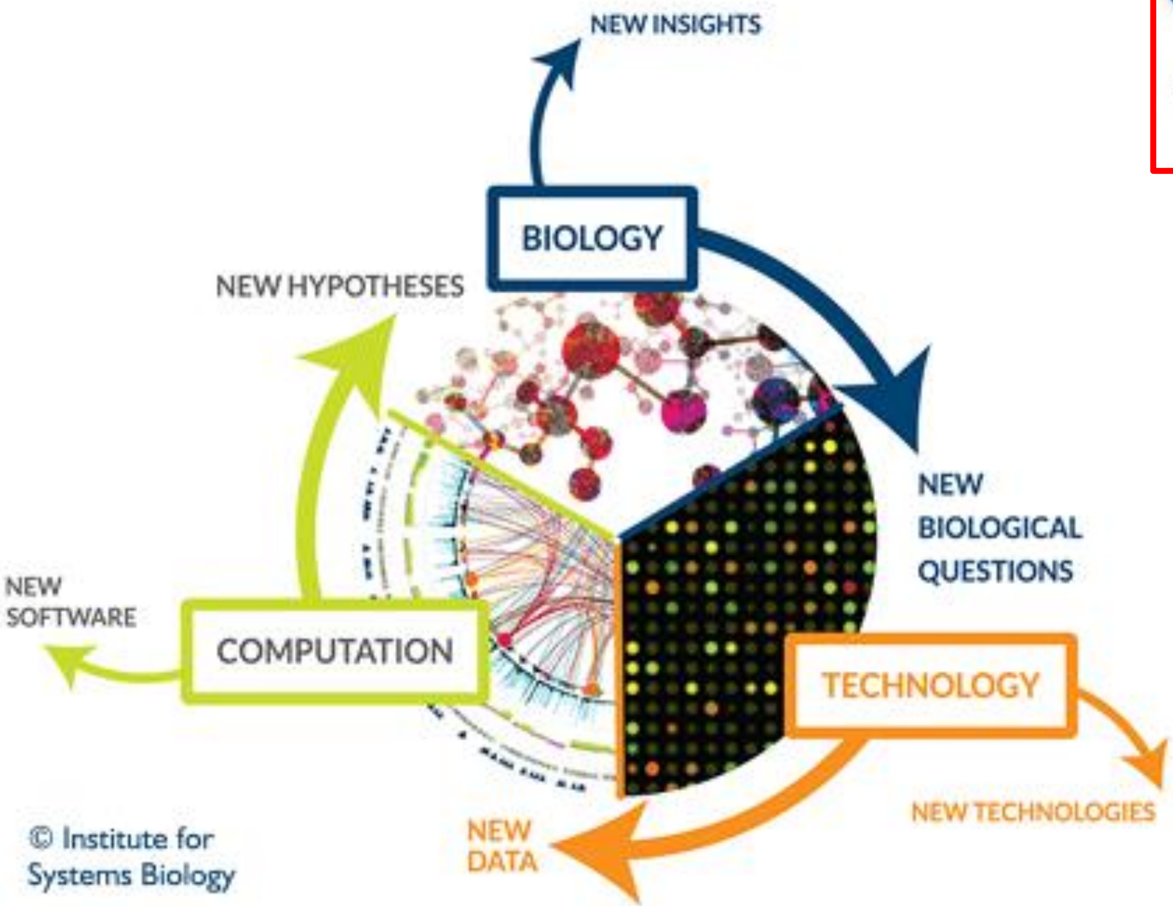
BW BioWinformática
INSTITUTO BUTANTAN A serviço da vida
LCC
USP Universidade de São Paulo
LaBTryps Laboratory of Biochemistry of Tryps

ABORDAGENS: REDUCIONISTA VS INTEGRATIVA

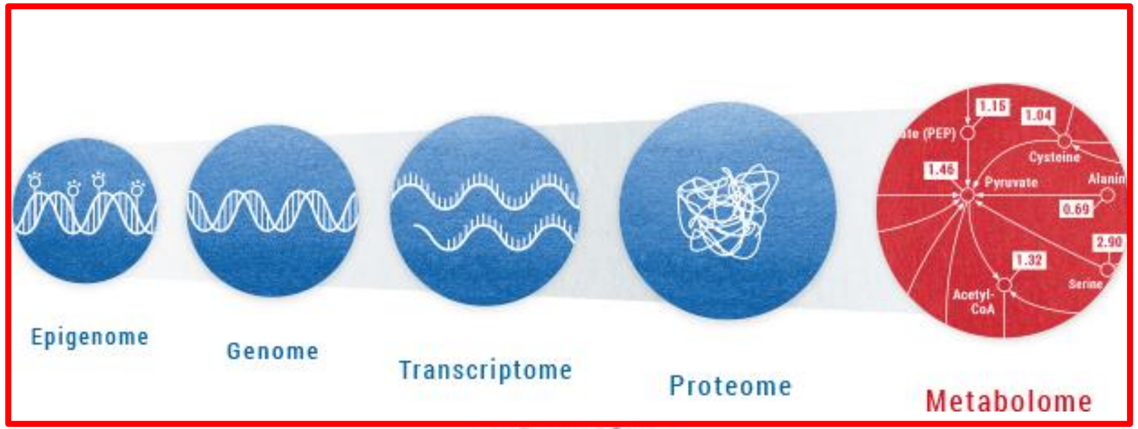


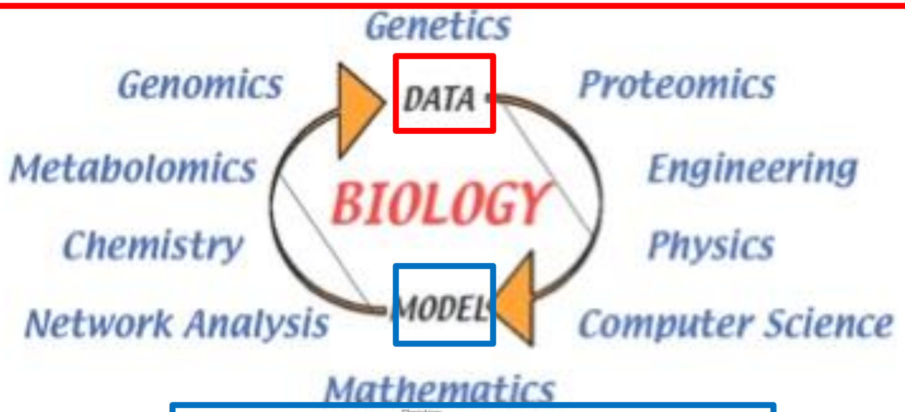


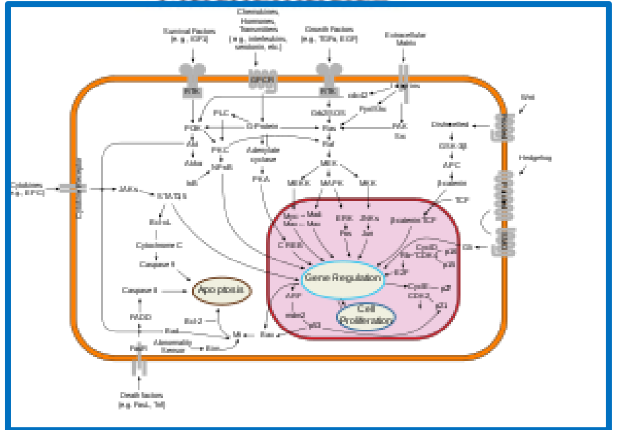
BIOLOGIA DE SISTEMAS



- Organização dos dados ômicos







REPRESENTANDO UM MODELO METABÓLICO

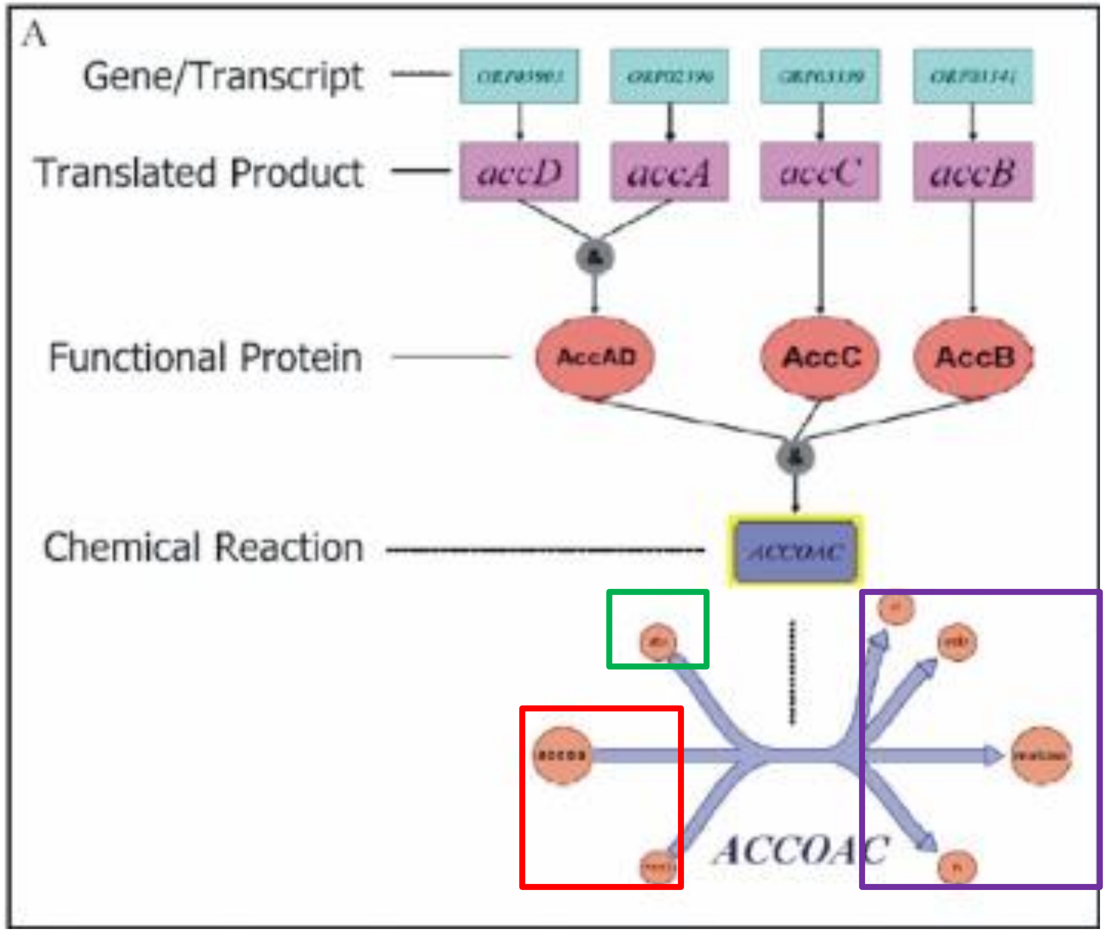
- Associações GPR – Gene, Proteína, Reação;

- Reação Bioquímica – Reagentes, Cofatores, Produtos;

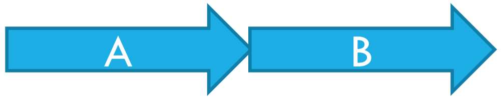
- Equação Química:

$$R1 + R2 \longrightarrow P1 + P2$$

- Coeficientes estequiométricos – reação balanceada



REPRESENTANDO UM MODELO METABÓLICO

- Exemplo:
- Genoma - 

- R_x é uma reação;
- M_x é um metabólito;

$R_1 = 1M_1 + 1M_2 \longrightarrow 1M_3 + 1M_4$: Gene A

$R_2 = 2M_4 \longrightarrow 1M_5$: Gene B

	R1	R2
M1	-1	0
M2	-1	0
M3	1	0
M4	1	-2
M5	0	1

- Exemplo:
- Genoma - A → B → C
- R_x é uma reação;
- M_x é um metabólito;

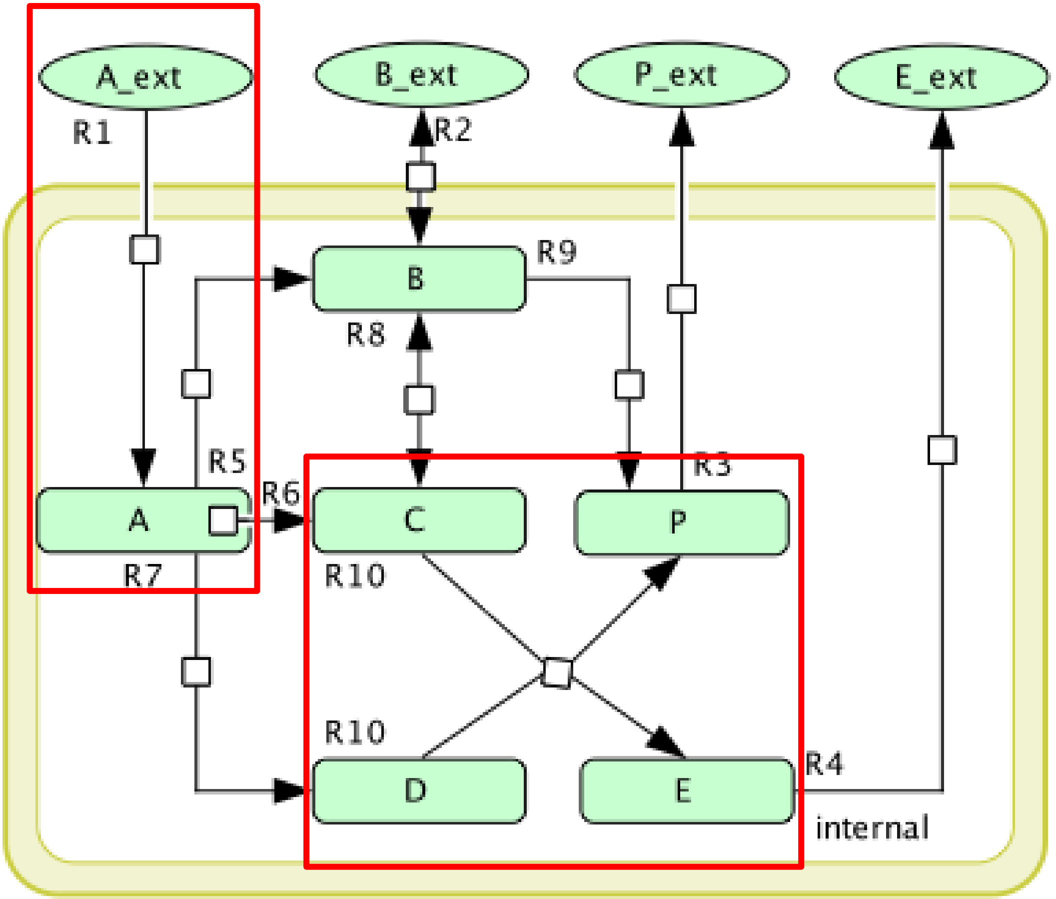
$$R_1 = 1M_1 + 1M_2 \longrightarrow 1M_3 \text{ : Gene A}$$

$$R_2 = 2M_3 + 1M_4 \longrightarrow 1M_5 \text{ : Gene B}$$

$$R_3 = 1M_{5(\text{citoplasma})} \longrightarrow 1M_{6(\text{meio extracelular})} \text{ : Gene C}$$

	R1	R2	R3
M1	-1	0	0
M2	-1	0	0
M3	1	-2	0
M4	0	-1	0
M5	0	1	-1
M6	0	0	1

REPRESENTANDO UM MODELO METABÓLICO



N=

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
A	1	0	0	0	-1	-1	-1	0	0	0
B	0	1	0	0	1	0	0	-1	-1	0
C	0	0	0	0	0	1	0	1	0	-1
D	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-1
E	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	1
P	0	0	-1	0	0	0	0	0	1	1

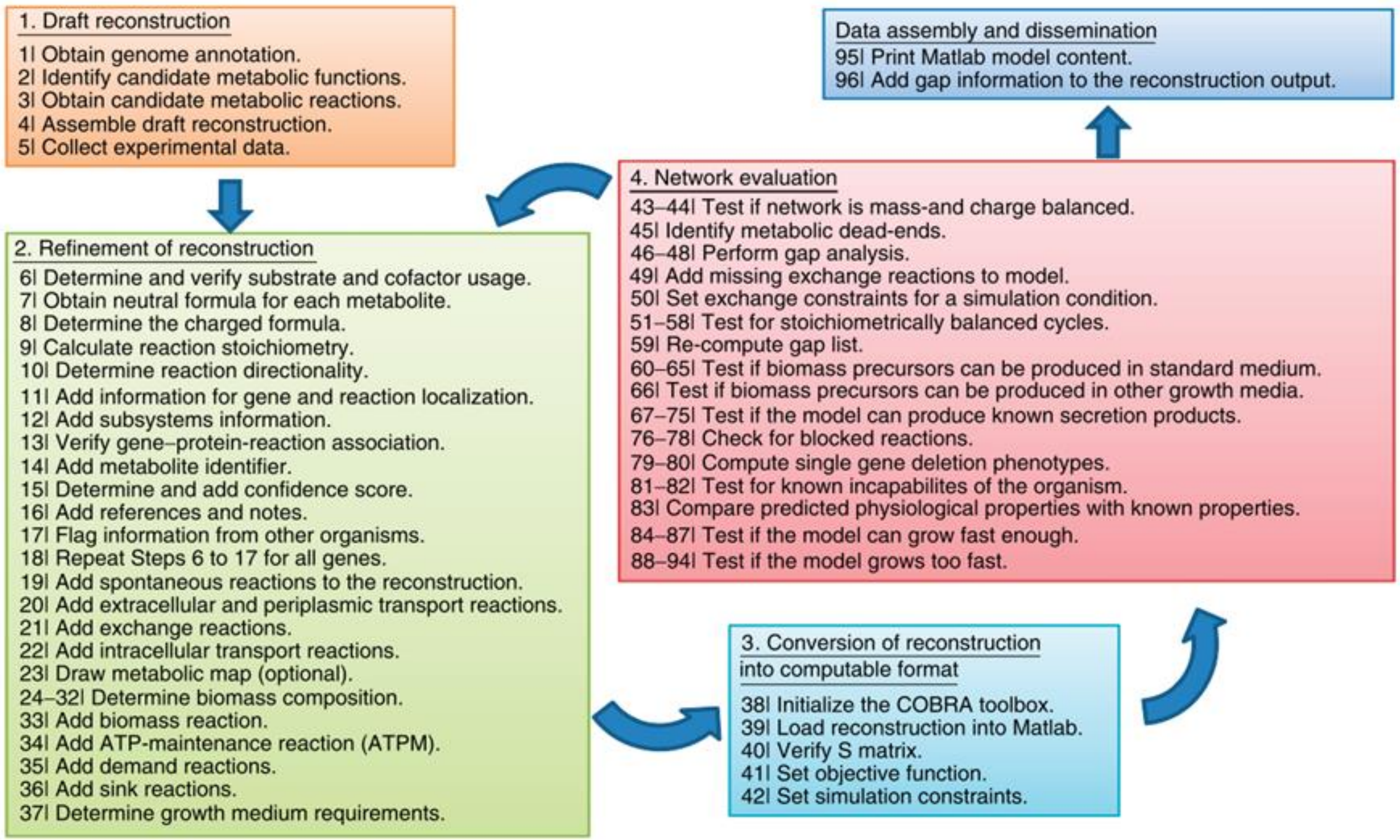
A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction

Ines Thiele[1,2] & Bernhard Ø Palsson[1]

[1]Department of Bioengineering, University of California, San Diego, La Jolla, California, USA. [2]Current address: Center for Systems Biology, Faculty of Industrial Engineering, Mechanical Engineering and Computer Science, University of Iceland, Reykjavik, Iceland. Correspondence should be addressed to B.Ø.P. (palsson@ucsd.edu).

Published online 7 January 2010; doi:10.1038/nprot.2009.203

CONSTRUINDO UM MODELO METABÓLICO



COM QUAIS FERRAMENTAS?

Mendoza *et al. Genome Biology* (2019) 20:158
https://doi.org/10.1186/s13059-019-1769-1

Genome Biology

RESEARCH Open Access

A systematic assessment of current genome-scale metabolic reconstruction tools

Sebastián N. Mendoza[1], Brett G. Olivier[1,2], Douwe Molenaar[1] and Bas Teusink[1*]

Table 1 List of selected genome-scale metabolic reconstruction tools and their main features

Reconstruction tool	Mapping method	Reactions are inherited from	Associated databases	Version	Type of software
AuReMe	Pantograph (Inparanoid and OrthoMCL)	Template model(s)	BIGG-MetaCyc	1.2.4	Command line
CarveMe	Diamond, eggNOG-mapper[a]	Template model	BIGG	1.2.1	Command line
Merlin	Mapping from annotation with BLAST or HMMER	Database	KEGG	3.8	Standalone interface
MetaDraft	Autograph (Inparanoid)	Template model(s)	BIGG	0.9.2	Standalone interface
ModelSEED	Annotation ontology map from RAST data	Template model	ModelSEED	2.2–2.4	Online service
Pathway Tools	Pathologic	Database	MetaCyc	22.0	Standalone interface
RAVEN	Autograph-type method from BLASTP and Bidirectional BLASTP[b]	Database- Template model(s)	KEGG-MetaCyc	2.0.1	Command line

[a]eggNOG-mapper should be run externally by the user
[b]Bidireactional BLASTP is used with template models and BLASTP with databases (KEGG and Metacyc)

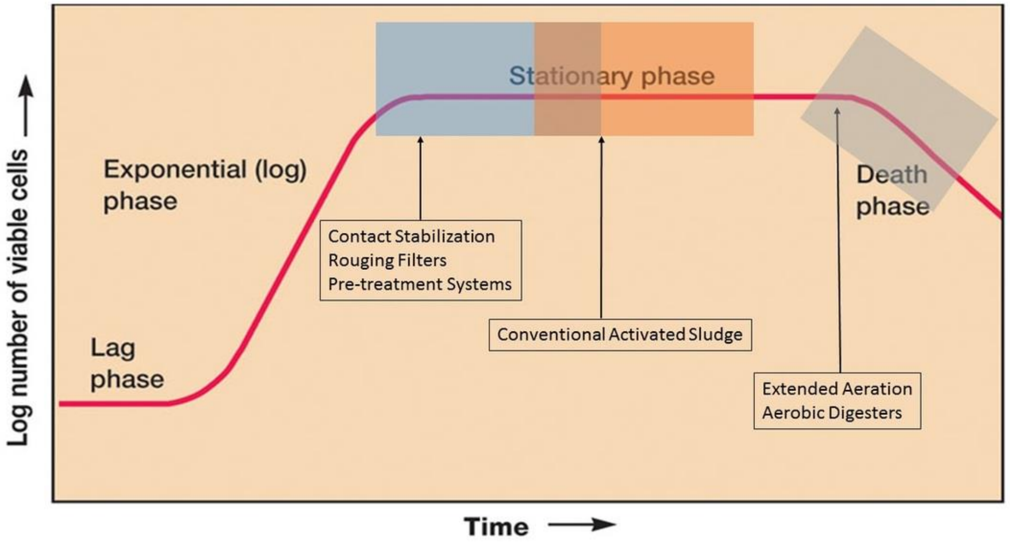
What is flux balance analysis?

Jeffrey D Orth, Ines Thiele & Bernhard Ø Palsson

Flux balance analysis is a mathematical approach for analyzing the flow of metabolites through a metabolic network. This primer covers the theoretical basis of the approach, several practical examples and a software toolbox for performing the calculations.

O QUE É FBA?

- FBA = *Flux Balance Analysis* ➡ Análise de Balanço de Fluxo;
- Abordagem matemática;
- Calcula o fluxo dos metabólitos em uma rede metabólica (mmol/gDW/h);
- Torna possível a predição da **taxa de crescimento** de um organismo ou a **taxa de produção** de um metabólito biotecnologicamente importante.



O QUE É FBA?

$$\frac{dx_i}{dt} = S_{ij}\,.\,v_j, \qquad \forall i \in m, \forall j \in n$$

x_i - concentração dos metabólitos;

t - tempo;

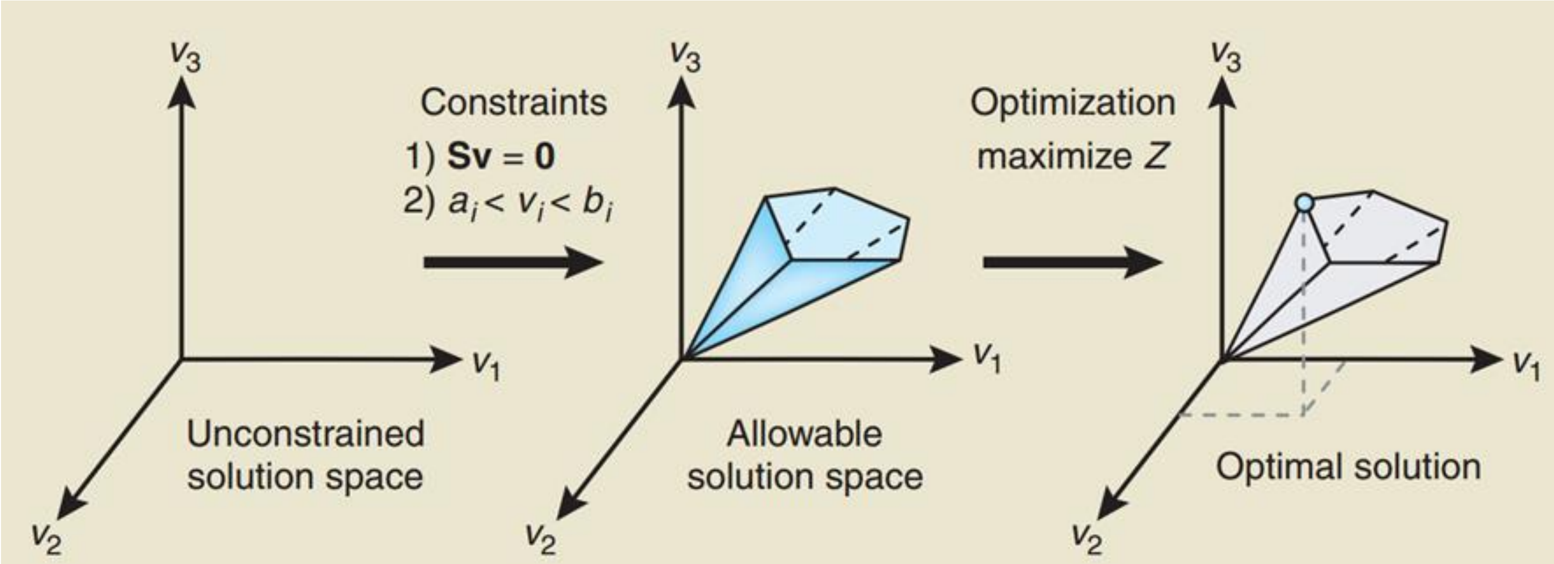
v_j - vetor de fluxo

- Aplicação de restrições ao sistema;

- Estado estacionário – não há variação da concentração dentro do sistema

- Logo $\frac{dx_i}{dt}$ é igual a zero

- Reversibilidade das reações

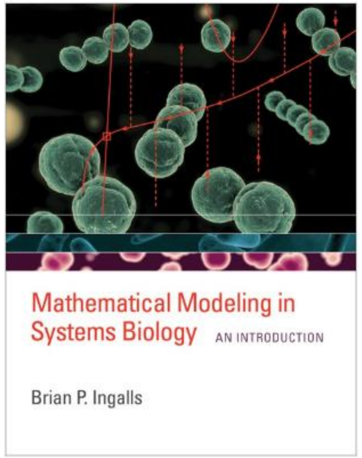


RESOLVENDO FBA

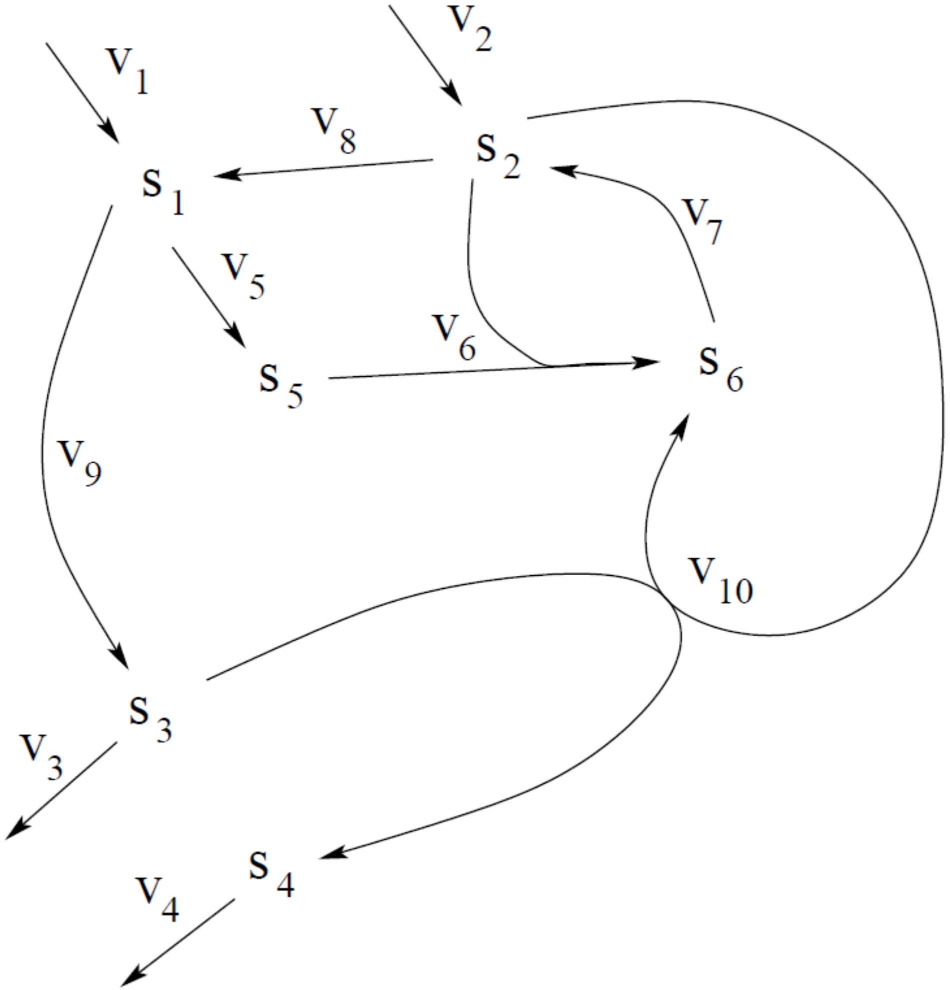
$$\begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1m} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2m} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nm} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_{11}y_1 + x_{12}y_2 + \cdots + x_{1m}y_m \\ x_{21}y_1 + x_{22}y_2 + \cdots + x_{2m}y_m \\ \vdots \\ x_{n1}y_1 + x_{n2}y_2 + \cdots + x_{nm}y_m \end{bmatrix}$$

$$S_{ij} \cdot v_j$$

$$0$$



ILUSTRANDO



$$0 = S_{ij} \cdot v_j$$

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

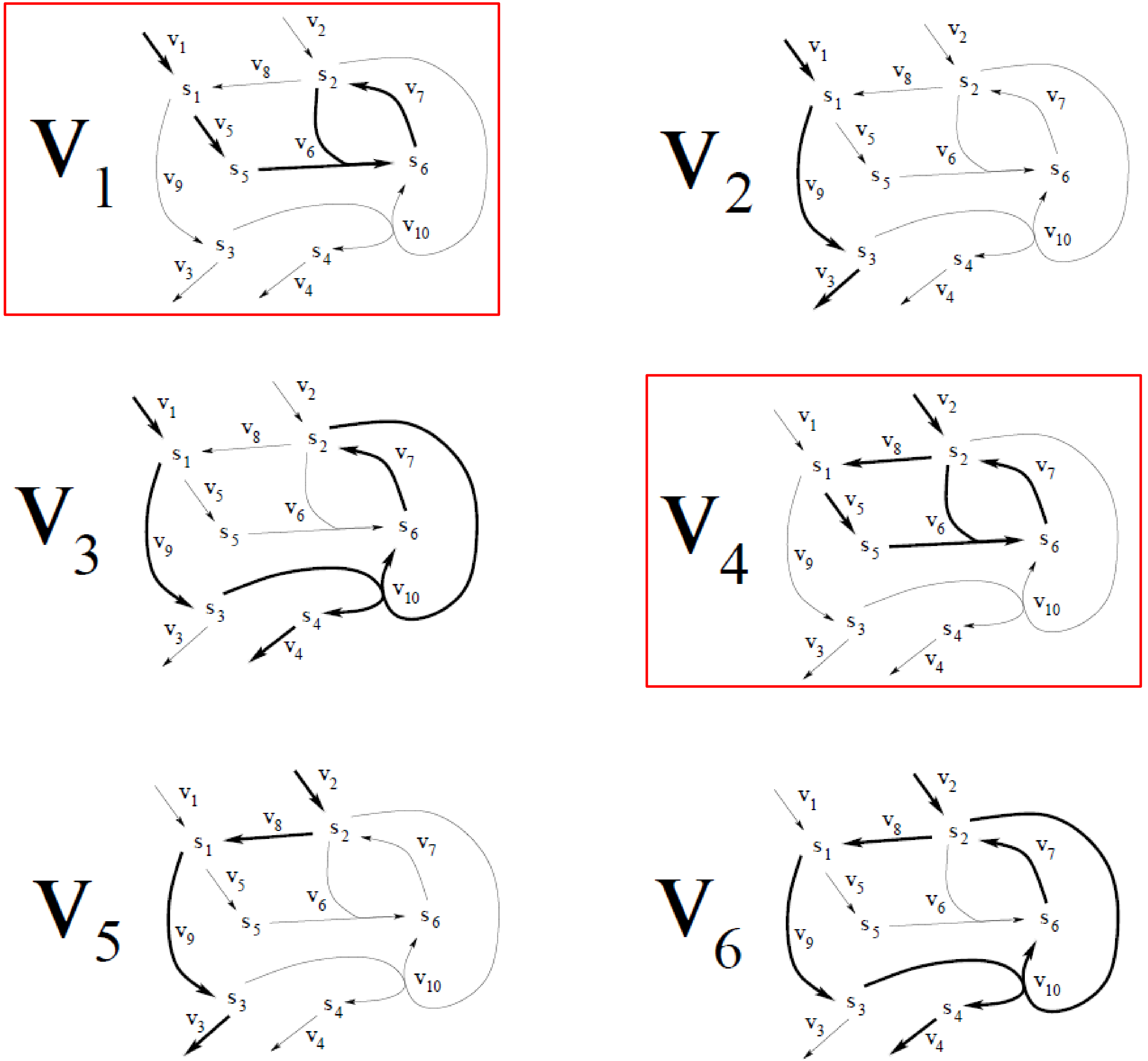
ILUSTRANDO

Modos de fluxos elementares: potenciais comportamentos da rede

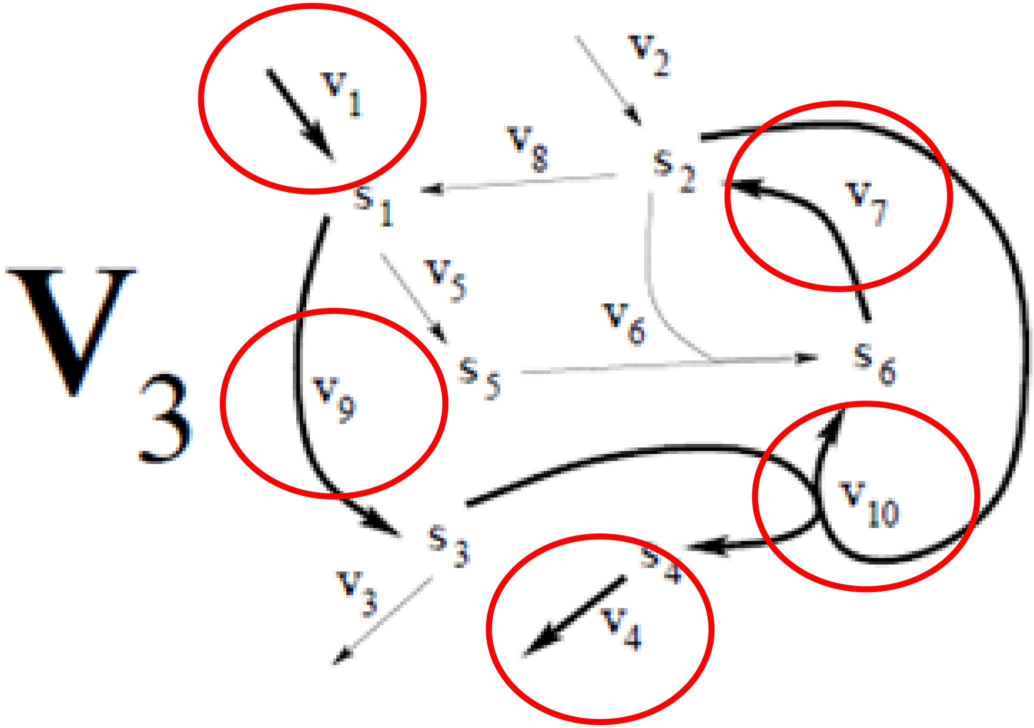
$$\mathbf{v}_1 = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}, \quad \mathbf{v}_2 = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix}, \quad \mathbf{v}_3 = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \\ 1 \\ 1 \end{bmatrix}, \quad \mathbf{v}_4 = \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}, \quad \mathbf{v}_5 = \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix}, \quad \mathbf{v}_6 = \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \end{bmatrix}$$

ILUSTRANDO

Conseguem identificar comportamentos biologicamente não realísticos?



ILUSTRANDO

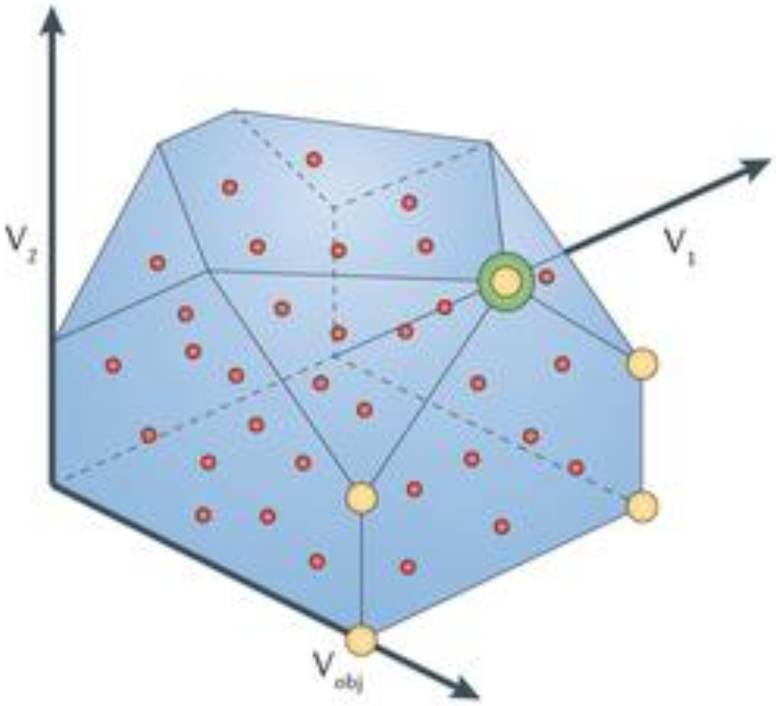


$$\mathbf{v}_3 = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \\ 1 \\ 1 \end{bmatrix}$$

RESOLVENDO FBA

- Função Objetivo (Z);
- $Z = c^T . v$

$$(Z = c_1 * v_1 + c_2 * v_2 \quad \ldots)$$



- Z é uma combinação linear dos vetores de fluxo (v);

- c é um vetor de pesos que indica o quanto cada reação (v) contribui para o objetivo;

- Na reação Z = Vbiomassa, c possuirá o valor 1 na posição da reação de biomassa.

$$f_{bio}(\boldsymbol{v}) = \boldsymbol{c}^T \boldsymbol{v} = [1, 0, 0, \ldots, 0] \begin{bmatrix} v_{bio} \\ v_1 \\ v_2 \\ \vdots \end{bmatrix}$$

BIOMASSA

- O fluxo obtido na reação de biomassa corresponde a taxa de crescimento exponencial μ ;

- Para saber o tempo de duplicação (em horas), use a fórmula:

$$d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

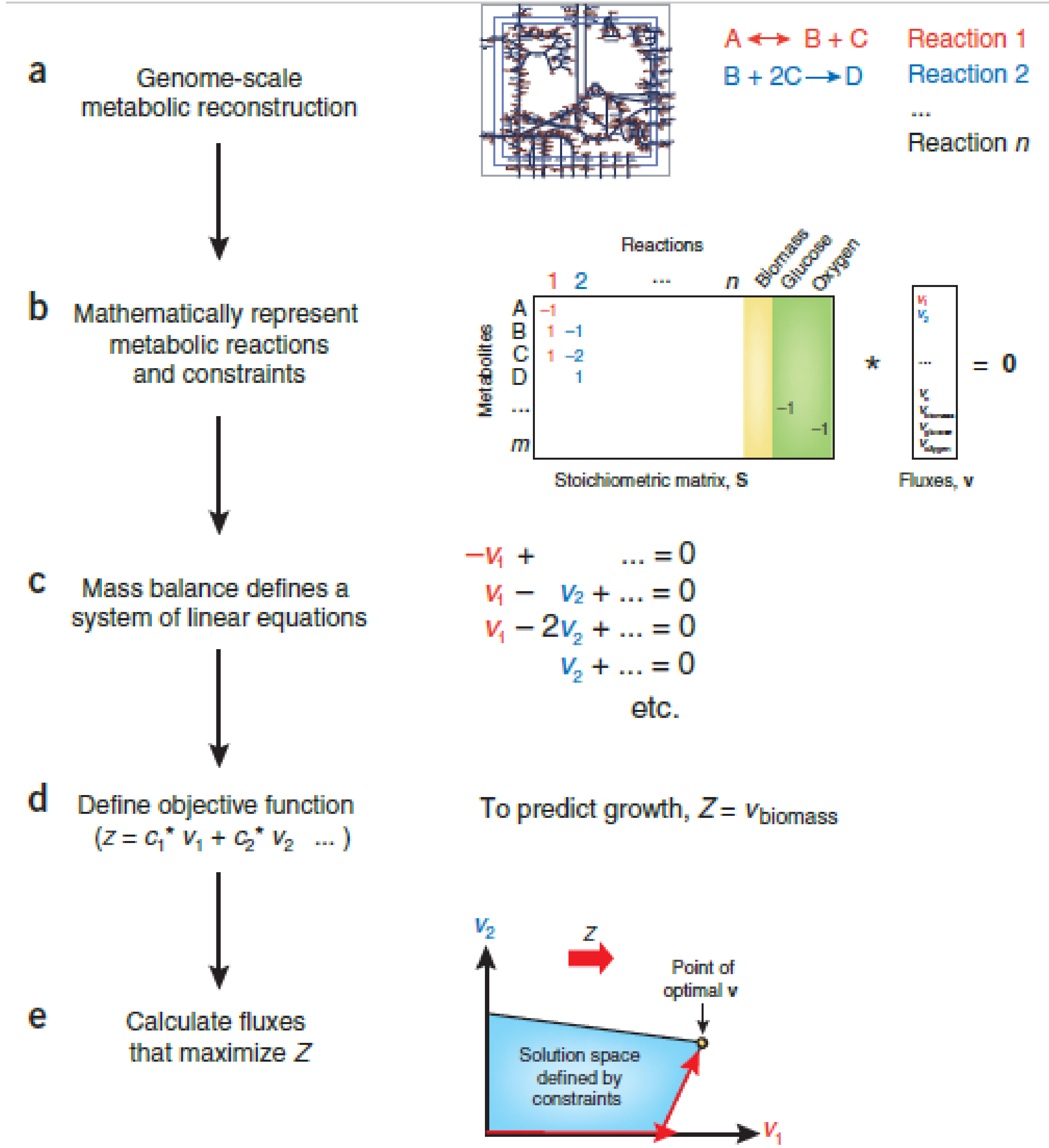
- 20 mmol/gDW/h de cada substrato em *E. coli*:

	Growth Rate (hr^{-1})	
Substrate	**Aerobic**	**Anaerobic**
acetate	0.3893	0
acetaldehyde	0.6073	0
2-oxoglutarate	1.0982	0
ethanol	0.6996	0
D-fructose	1.7906	0.5163
fumarate	0.7865	0

- Acetato: 1,78 h (~1h e 46 min)

- Frutose: 0,39 h (~ 23 min e 30 s)

SE LIGA NA REVISÃO!


a
Genome-scale metabolic reconstruction
A ↔ B + C
Reaction 1
B + 2C → D
Reaction 2
...
Reaction n
b
Mathematically represent metabolic reactions and constraints
Reactions
1 2 ... n
Biomass
Glucose
Oxygen
Metabolites
A
B
C
D
...
m
Stoichiometric matrix, S
Fluxes, v
= 0
c
Mass balance defines a system of linear equations
$-v_1 + \dots = 0$
$v_1 - v_2 + \dots = 0$
$v_1 - 2v_2 + \dots = 0$
$v_2 + \dots = 0$
etc.
d
Define objective function
$(Z = c_1 * v_1 + c_2 * v_2 \dots)$
To predict growth, $Z = v_{biomass}$
e
Calculate fluxes that maximize Z
v_2
Z
Point of optimal v
Solution space defined by constraints
v_1

CHEGA DE TEORIA!

VAMOS À PRATICA!