

Coeficientes de control metabólico y su aplicación e interpretación en una red metabólica

Biología de Sistemas – Grado en Genética 2020/2021

Emiliano Navarro Garre

UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona

Índice

1. Introducción	1
2. Coeficientes de Control del Metabolismo	1
2.1. Coeficientes de Control	1
2.1.1. Coeficientes de Control del Flujo o FCC	2
2.1.2. Coeficientes de Control de la Concentración o CCC	2
2.2. Teoremas de la Teoría del Control Metabólico	2
3. Aplicaciones	3
4. Ejemplos	4
4.1. Cambio en concentraciones enzimáticas en una vía lineal	4
4.1.1. Aumento de la concentración de E_1 en un 500 %	4
4.1.2. Aumento de la concentración de E_4 en un 500 %	4
4.1.3. Aumento de la concentración de todas las enzimas en un 200 %	5
4.1.4. Aumento de la concentración enzimática en diferentes proporciones	5
4.2. Bases cinéticas en enfermedades mitocondriales	5
4.3. Síntesis de Leucina	6
5. Anexo	7
5.1. Archivos adicionales	7
5.2. Figuras	7
5.3. Tablas	10
6. Referencias	11

1. Introducción

Las redes metabólicas son sistemas muy complejos que están altamente regulados y exhiben multitud de interacciones como la inhibición por *feedback* negativo o sustratos comunes, como el ATP, en diferentes reacciones [1]. Por lo tanto, el análisis del control metabólico (MCA) nos proporciona un marco matemático y teórico sólido para describir las vías y redes metabólicas y de señalización, y para cuantificar los controles sobre estos procesos [2], permitiéndonos describir cómo responden dichas vías frente a diferentes perturbaciones, como pueden ser el cambio de la actividad de una enzima concreta o la sobreexpresión/subexpresión de dicha enzima, lo que puede tener cierto interés biotecnológico, como internaré mostrar en el presente documento.

2. Coeficientes de Control del Metabolismo

Los sistemas de reacciones bioquímicas son redes de metabolitos conectados mediante reacciones químicas, cuyo comportamiento está determinado por las propiedades de sus componentes (las reacciones individuales y su cinética), así como por la estructura de la red. De esta forma, el efecto de una perturbación en una reacción de esta red dependerá de las propiedades locales de dicha reacción y la integración de la misma en la red global.

De esta forma, encontramos los coeficientes **locales** (ε -*elasticity* y π -*elasticity*, que no son objeto de estudio en este trabajo) y **globales** o de **control**, los cuales reflejan las relaciones entre los efectos locales y globales del cambio. Los coeficientes de elasticidad son coeficientes locales que pertenecen a reacciones individuales y pueden calcularse en cualquier estado dado. Los coeficientes de control y los coeficientes de respuesta son cantidades globales, que se refieren a un estado estable dado de todo el sistema. Después de una perturbación de x , se considera la relajación de y a un nuevo estado estable.

Además, cabe comentar brevemente la presencia de un tercer coeficientes, conocidos como coeficientes de **respuesta**, los cuales expresan la dependencia directa de las variables de estado estacionario (flujo y concentraciones) con los parámetros que determinan dicho estado estacionario.

2.1. Coeficientes de Control

Cuando definimos coeficientes de control, lo hacemos para un estado estacionario del sistema metabólico, caracterizado por unas concentraciones y unos flujos determinados. Cualquier pequeña perturbación en una reacción concreta por añadir sustrato, enzima..., llevará al sistema a un nuevo estado estacionario cercano con un cambio en las concentraciones y en los flujos. Dicho cambio es lo que miden los **coeficientes de control globales**.

2.1.1. Coeficientes de Control del Flujo o FCC

El coeficiente de control del flujo (Fig. 1 a) representa la ratio del cambio que se observa en el **flujo** del sistema provocado por el cambio producido en la actividad enzimática, definido matemáticamente mediante:

$$C_k^{J_j} = \frac{v_k}{J_j} \frac{\partial J_j / \partial p_k}{\partial v_k / \partial p_k} = \frac{\partial \ln(J_j)}{\partial \ln(v_k)}. \quad (1)$$

Este coeficiente cuantifica el control que una determinada reacción v_k ejerce sobre el flujo del estado estacionario J_j . Cabe destacar que el cambio en la velocidad de la reacción (Δv_k) viene dado por el cambio de un parámetro p_k (concentración enzimática, concentración de inhibidor...) que tiene un efecto directo únicamente en v_k .

2.1.2. Coeficientes de Control de la Concentración o CCC

Equivalentemente al caso anterior, el coeficiente de control de la concentración (Fig. 1 b) representa la fracción de cambio en la **concentración** producido por una fracción de cambio en la actividad enzimática y, en consecuencia, en la velocidad de la reacción, definido matemáticamente de la siguiente forma:

$$C_k^{S_i} = \frac{v_k}{S_i^{st}} \frac{\partial S_i^{st} / \partial p_k}{\partial v_k / \partial p_k} = \frac{\partial \ln(S_i^{st})}{\partial \ln(v_k)}. \quad (2)$$

2.2. Teoremas de la Teoría del Control Metabólico

Por lo general, los flujos o concentraciones en estado estacionario no se pueden expresar explícitamente en función de las velocidades de reacción, por lo que ambos coeficientes no pueden determinarse simplemente tomando las derivadas respectivas.

Este cálculo se ve facilitado por un conjunto de teoremas ¹. Los **teoremas de la suma** plantean una afirmación sobre el control total sobre un flujo o una concentración en estado estacionario. Los **teoremas de conectividad**, relacionan los coeficientes de control con los coeficientes de elasticidad. Ambos tipos de teoremas, junto con la información de la **matriz estequiométrica** contienen suficiente información para calcular todos los coeficientes de control [1].

¹Solamente mencionaré en qué consisten, no abordaré el punto de vista matemático, ya que en los ejemplos venideros no es necesario calcular los coeficientes manualmente

3. Aplicaciones

La aplicación del análisis de control metabólico ha permitido cambiar el paradigma clásico de *paso limitante* por el de **control compartido**, donde muchas o todas las enzimas implicadas en la red tienen un papel importante en el control del flujo a lo largo de la vía, lo cual nos lleva a la idea de que la regulación del metabolismo celular requiere la acción coordinada de un cierto grupo de enzimas [2].

El MCA se emplea desde hace varios años para diagnosticar y entender enfermedades de carácter genético como pueden ser las **citopatías mitocondriales** [3], donde la presencia de mutaciones en el genoma mitocondrial (con múltiples copias en cada célula) puede provocar una amplia variabilidad en los síntomas, debido a la **relación no lineal** entre la **cantidad de enzimas** y el **flujo de la vía**, donde la cantidad de enzimas puede reducirse significativamente con efectos limitados sobre el flujo, provocando pocos síntomas, pero más allá de un umbral, el flujo disminuye más rápidamente con el contenido enzimático, volviéndose la tasa de respiración de las mitocondrias progresivamente más limitada [4].

Otra área de aplicación en medicina es la **identificación de sitios metabólicos apropiados para ser manipulados con fármacos** [5]. Debido a la escasa probabilidad de la existencia de enzimas limitantes de la velocidad de reacción, se investigó el uso de fármacos que tuvieran efecto en las enzimas con coeficientes de control de flujo más elevados, para inhibir cierto proceso metabólico (célula cancerosa), donde cualquier enzima en el proceso es un objetivo de actuación del fármaco, puesto que cada enzima es esencial para el funcionamiento del resto de la vía. Aun así, es probable que los **efectos** sobre el **metabolismo** se obtengan con **concentraciones más bajas de fármaco** si se **inhibe** una **enzima** con un **coeficiente de control de flujo elevado**, en lugar de una con un coeficiente bajo.

Pero el área donde el MCA podría tener mayor impacto es el área de la **biotecnología**, más concretamente en la **ingeniería metabólica**. Las técnicas modernas de ingeniería genética tienen el potencial de permitir cambios racionales dirigidos que podrían modificar el metabolismo de los organismos en la dirección deseada. Generalmente, aumentar el flujo en una vía específica es el objetivo más habitual y aumentar el flujo es un problema más difícil que disminuirlo. En esta área, las llamadas enzimas limitantes de la velocidad ya se han sobreexpresado en las células con poco efecto. La identificación de **enzimas** con **grandes coeficientes de control de flujo** permitiría un **enfoque dirigido** más racionalmente.

Por ejemplo, el **metabolismo** de las **plantas** podría manipularse para permitir la **producción sostenible** a partir de recursos renovables de materias primas alternativas a las que actualmente se obtienen del petróleo (como los plásticos del almidón). Sin embargo, tales objetivos pueden ser mucho más difíciles de alcanzar de lo que se piensa, por lo que hay mucho margen para seguir trabajando [4].

4. Ejemplos

En este apartado desarrollaré algunos ejemplos de vías metabólicas sencillas para entender la interpretación de los coeficientes de control, así como otros ejemplos de vías metabólicas ligeramente más complejas de aplicación real para ver la utilidad de este tipo de análisis en la investigación habitual, sus potenciales efectos y futuras aplicaciones.

4.1. Cambio en concentraciones enzimáticas en una vía lineal

Para poder comprender el poder predictivo de los coeficientes de control del flujo cuando realizamos un cambio directo en dicho flujo dentro de una vía metabólica, emplearemos la vía sin ramificaciones de la Figura 2 a) , que presenta los coeficientes de control presentes en la Tabla 1, donde podemos observar que el C_{v1}^J presenta una mayor capacidad de control sobre el sistema, debido al elevado valor de dicho coeficiente. De esta forma, variaré las concentraciones de determinadas enzimas en el simulador COPASI [6] para observar el cambio en el flujo total de la vía y el papel que juegan los coeficientes de control del flujo en ello.

4.1.1. Aumento de la concentración de E_1 en un 500 %

En primer lugar, aumentamos en un 500 % (Fig. 3 a) la concentración de la enzima que cataliza la primera reacción (E_1), ya que, como hemos visto, es la enzima que presenta un mayor control sobre el sistema. En este caso, podemos observar como **pierde esa capacidad de control**, al verse reducido su coeficiente de control de flujo a 0.186047 (Fig. 4 a), mientras que es la enzima E_2 la que gana esta **mayor capacidad** para **controlar el flujo** del sistema.

Al realizar este aumento, el flujo del sistema aumenta en un 74,42 %, mientras que las concentraciones de las especies han aumentado considerablemente, pero de manera decreciente, en función de la posición que ocupen en la vía ($[S_1] > [S_2] > [S_3]$).

4.1.2. Aumento de la concentración de E_4 en un 500 %

En este caso, se aumenta en un 500 % la concentración de la enzima 4 (Fig. 3 b) que cataliza la última reacción de la vía. Podemos observar que el flujo del sistema aumenta tan solo en un 5,63 %, ya que, como podemos ver en la Tabla 1, presenta un muy bajo control sobre el flujo del sistema, aumentando ligeramente los coeficientes de control de las **reacciones 1 y 2** (Fig. 4 b), lo que nos confirma el **elevado grado de control** que presentan ambas enzimas.

4.1.3. Aumento de la concentración de todas las enzimas en un 200 %

Para la situación que se presenta en la Figura 3 c), realizamos un aumento del 200 % en todas las enzimas del sistema. De esta forma, el flujo del sistema se duplica ($J = 2$), pero al ser un aumento proporcional para todas las enzimas, la contribución al control del flujo se mantiene constante y presentan los mismos valores que para el caso de referencia (Fig. 2 b).

Así, observamos que **al aumentar las concentraciones enzimáticas en la misma proporción, el flujo total aumenta en la misma proporción, pero la contribución al control del flujo se mantiene invariable** (Fig. 4 c).

4.1.4. Aumento de la concentración enzimática en diferentes proporciones

En este último caso, aumentamos la concentración de todas las enzimas (Fig. 3 d), pero de forma desproporcionada, observando el aumento de flujo más significativo de entre los casos anteriores (128,76 %), aumentando también las concentraciones de las especies del sistema, en diferentes proporciones y de manera creciente en función de la posición que ocupen en la vía ($[S_1] < [S_2] < [S_3]$). Vemos que este **aumento del flujo** que hemos comentado, se debe al hecho de **democratizar los coeficientes de control** (Fig. 4 d), es decir, al repartir la capacidad de control sobre el flujo del sistema entre todas las ecuaciones que forman parte del sistema de una forma bastante equitativa, con las concentraciones enzimáticas pertinentes para ello. Así, la E_1 reduce su elevado efecto sobre el flujo de la vía, en contraposición a las enzimas E_3 y E_4 , que presentaban un control sobre el flujo mucho menor.

4.2. Bases cinéticas en enfermedades mitocondriales

En el artículo de Mazat et al. [3] se hipotiza sobre la posibilidad de que la **expresión de un determinado umbral en una etapa crucial en enfermedades mitocondriales puede deberse a un defecto localizado en un paso de una vía metabólica**, alterando el flujo global. Así, los autores inhibieron progresivamente la actividad de la citocromo c oxidasa de las mitocondrias aisladas de músculo de rata con concentraciones crecientes de KCN, imitando así el efecto de pérdida progresiva de la actividad de esta enzima.

Para poder comprender mejor la inhibición de la citocromo c oxidasa, emplearon el modelo que se presenta en la Figura 5 a), donde la **reacción 2** podría representar el complejo **citocromo c oxidasa**, la **reacción 1** resume las **reacciones precedentes** de la cadena respiratoria; **S**, el **sustrato respiratorio** y **A**, el **citocromo reducido c**. Suponemos además que el paso 2 es prácticamente irreversible y asumimos las ecuaciones que se presentan en dicho artículo para cada reacción.

De esta forma y tras modelar este sistema en *COPASI*, vemos que al **aumentar la concentración de inhibidor** de la citocromo c oxidasa (KCN), hay una transición del **coeficiente de control** C_2^J

de un valor muy bajo a un valor casi igual a uno, mientras que para el C_1^J sucede lo opuesto, decayendo su valor desde uno hasta 0, prácticamente. **A concentraciones muy altas de S**, esta **transición es muy aguda** y ocurre en el valor crítico de inhibidor. Esto muestra que un umbral crítico está acompañado por un cambio drástico en el valor de un coeficiente de control que pasa de bajo a alto en un rango reducido de concentraciones inhibitoras.

Así hemos podido comprobar como la pérdida de acción de la citocromo c oxidasa genera un cambio en los coeficientes de control de flujo, pasando el control de este último a la segunda reacción del modelo.

4.3. Síntesis de Leucina

En el trabajo de Chin C-S et al. [7] se muestra un esquema simplificado de la vía de producción de la leucina (Fig. 6) para poder estudiar las características dinámicas de la respuesta de una red genética a las fluctuaciones ambientales y para predecir correctamente la respuesta de la vía frente a nuevas perturbaciones.

Dicha arquitectura se caracteriza por un **mecanismo de control dual**, con **inhibición por retroalimentación del producto final (EPI)** y **regulación transcripcional mediada por un metabolito intermedio (IMA)**, que no explicaremos en este trabajo al no ser ese su objetivo.

Después de modelizar el sistema en el COPASI y de realizar el MCA, hemos representado los CCC de forma gráfica (Fig. 7) para una mejor visualización de sus efectos sobre las diferentes reacciones sistemas. Así observamos que la **degradación de leucina** presenta una **gran capacidad de control sobre el resto de reacciones del sistema**, ya que al estar regulado por producto final, en este caso, leucina, al ser esta degradada, el flujo teórico del resto de reacciones se debe ver aumentado, mientras que un aporte externo de este mismo metabolito supone una disminución del flujo teórico del resto de reacciones. También cabe destacar el **control positivo sobre todas las reacciones**, exceptuando las dos comentadas previamente, que presenta la **síntesis de α IPM**, ya que este es el metabolito del cual parten los flujos del resto de reacciones del sistema.

En cuanto a los CCC, vemos como un **incremento en la síntesis de α IPM** supone un **incremento en las concentraciones del resto de todos los metabolitos**, al igual que el **aumento en la degradación de leucina** que supone un incremento mayor en las concentraciones de todos los metabolitos, a excepción de la propia leucina. Del mismo modo, un **incremento del flujo externo de leucina** supondría un **aumento de la concentración de leucina** y una **disminución de la concentración del resto de metabolitos** en proporción opuesta a la degradación.

Tras este ejemplo, hemos podido comprobar el uso de los coeficientes de control para entender cómo funcionan vías que presentan regulaciones más complejas que las que hemos comentado en los ejemplos previos.

5. Anexo

5.1. Archivos adicionales

 || : [Script para las gráficas de la Fig. 4](#)

 || : [Programa COPASI del sistema representado en la Fig. 5](#)

 || : [Programa COPASI del sistema representado en la Fig. 6](#)

 || : [Archivo Excel de las gráficas de la Fig. 7](#)

5.2. Figuras

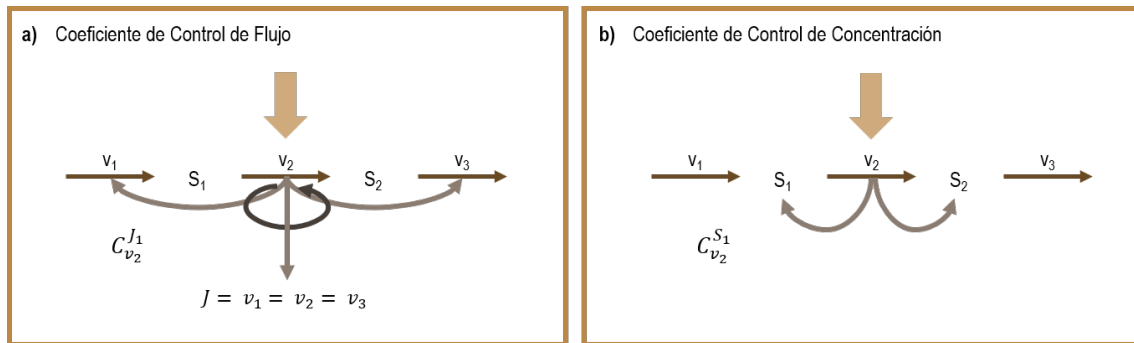


Figura 1 – Representación esquemática de la perturbación y efectos cuantificados de los coeficientes de control del MCA. Modificado de Klipp et al.[1].

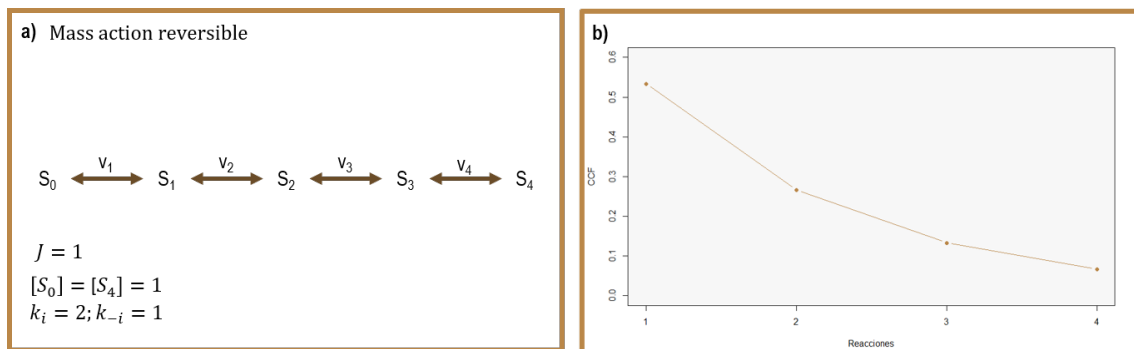


Figura 2 – a) Representación esquemática de una vía lineal con 5 especies (S_0 , S_1 , S_2 , S_3 y S_4) relacionadas con 4 reacciones con cinética *Mass Action Reversible* (v_1 , v_2 , v_3 y v_4). b) Representación gráfica de los coeficientes de control del flujo para cada reacción. Modificado de Klipp et al.[1].

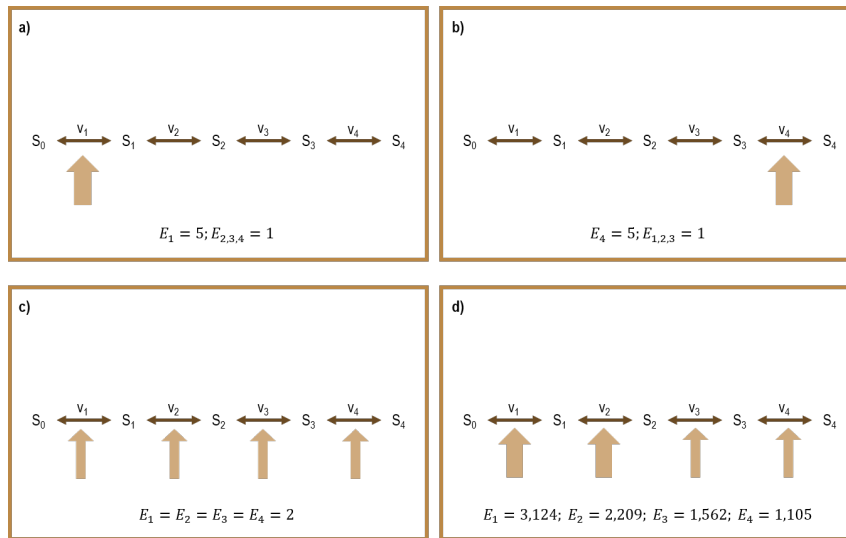


Figura 3 – Diferentes modificaciones en las concentraciones enzimáticas en distintos puntos de la vía metabólica presentada en la Figura 2. a) Aumento de un 500 % de la concentración de E_1 . b) Aumento de un 500 % de la concentración de E_4 . c) Aumento de la concentración de todas las enzimas de la vía en la misma proporción (200 %). d) Ajuste de las concentraciones enzimáticas a unas cantidades concretas. Modificado de Klipp et al.[1].

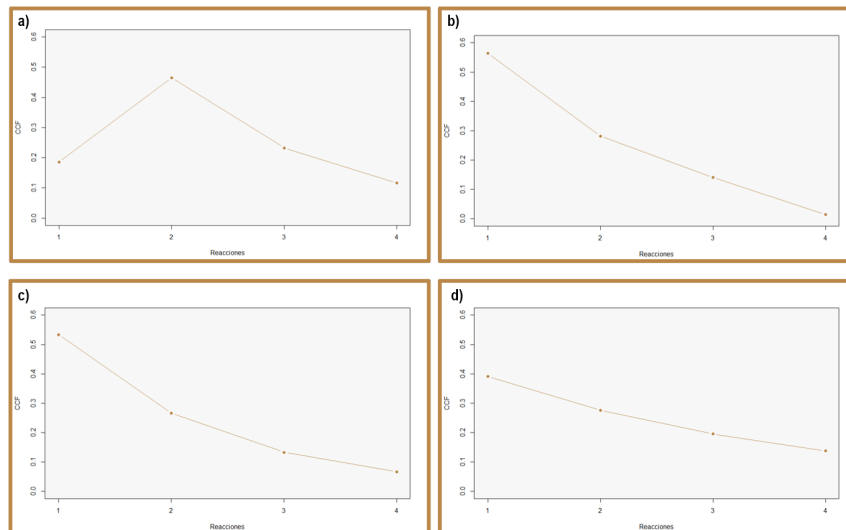


Figura 4 – Coeficientes de Control del Flujo para cada una de las reacciones tras realizar el MCA para cada una de las situaciones descritas en la Figura 3.

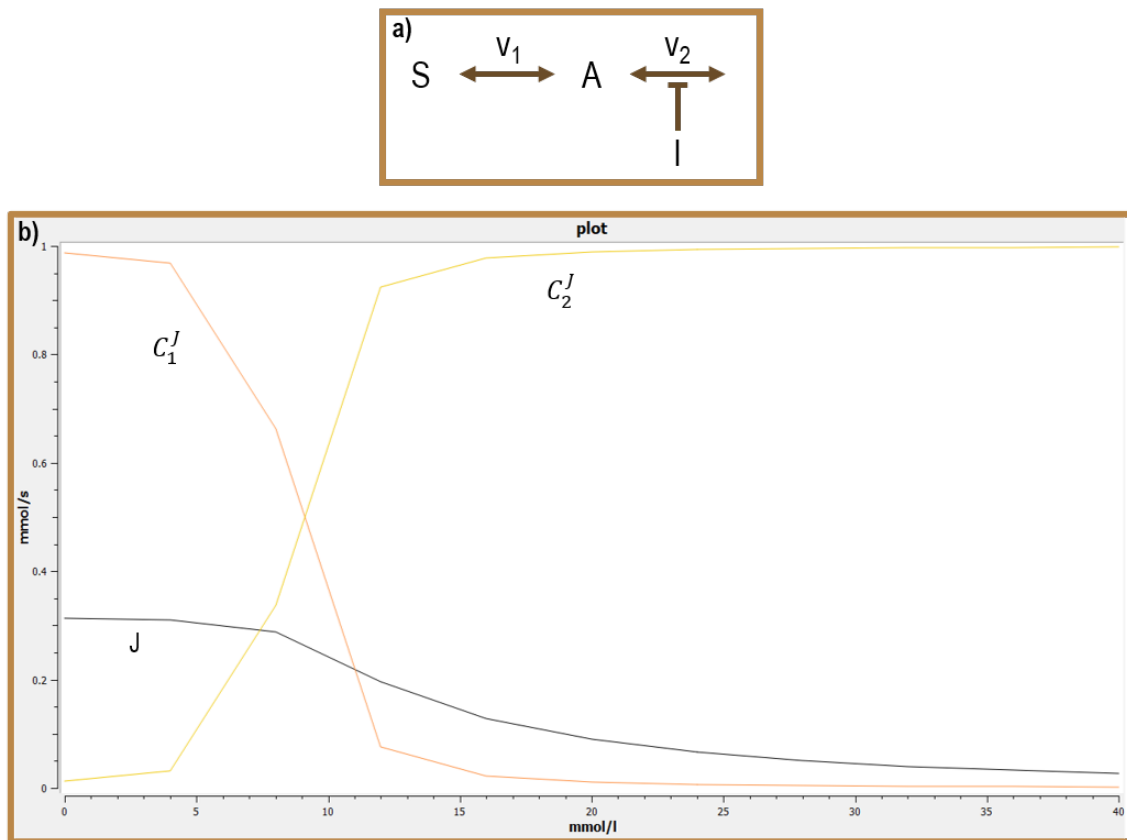


Figura 5 – a) Esquema de las reacciones implicadas en el ejemplo. b) Variación en los coeficientes de control del flujo de ambas reacciones del sistema en función de la concentración de inhibidor $[I]$ con los parámetros mostrados en Mazat et al. [3].

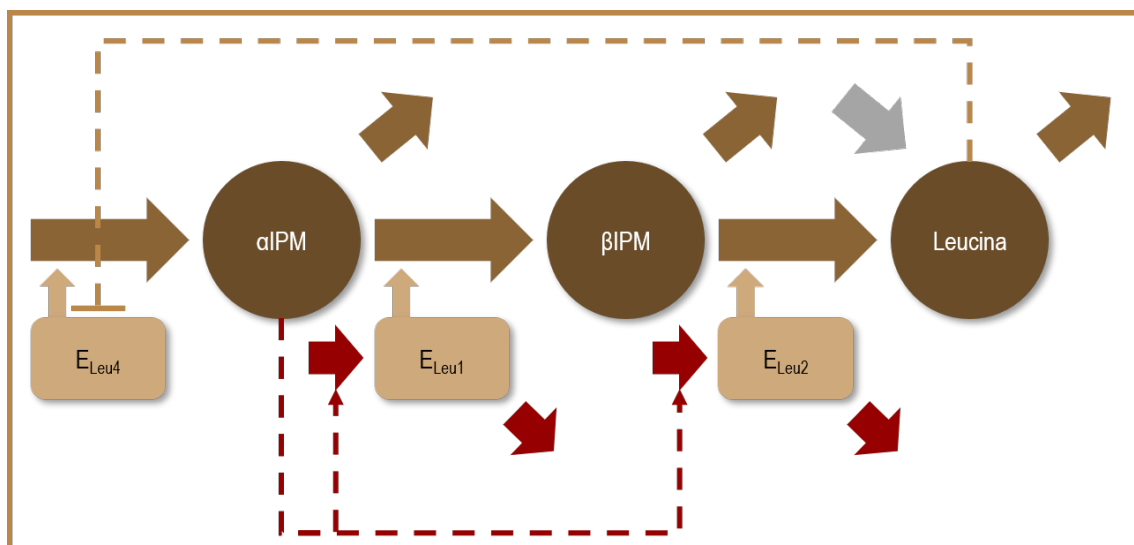


Figura 6 – Descripción de la red simplificada de la síntesis de Leucina. Modificado de Chin C-S et al. [7].

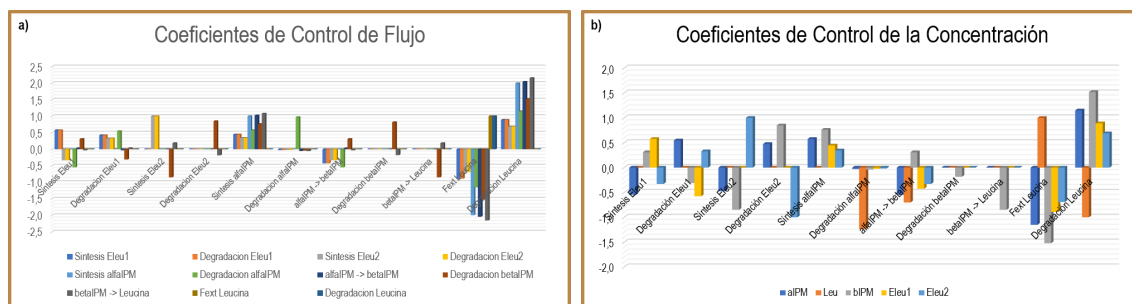


Figura 7 – Representación esquemática de los coeficientes de control de a) flujo y de b) concentración para el sistema representado en la Figura 6.

5.3. Tablas

Tabla 1 – Coeficientes de Control para la situación inicial

		v_1	v_2	v_3	v_4
CCF	v_1	0.5333	0.2667	0.1333	0.0667
	v_2	0.5333	0.2667	0.1333	0.0667
	v_3	0.5333	0.2667	0.1333	0.0667
	v_4	0.5333	0.2667	0.1333	0.0667
CCC	S_1	0.4667	-0.2667	-0.1333	-0.0667
	S_2	0.4	0.2	-0.4	-0.2
	S_3	0.2667	0.1333	0.0667	-0.4667



6. Referencias

- [1] Edda Klipp et al. *Systems Biology. A Textbook*. WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim, 2009. ISBN 9783527318742.
- [2] Mary C Wildermuth. Metabolic control analysis: biological applications and insights. *Genome Biology*, 1(6):1031.1–1031.5, 2000. doi: <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-6-reviews1031>.
- [3] Jean-Pierre Mazat et al. The kinetic basis of threshold effects observed in mitochondrial diseases: a systemic approach. *Biochemistry Journal*, 302:171–174, 1994. doi: <https://doi.org/10.1042/bj3020171>.
- [4] David Fell. *Understanding the Control of Metabolism*. School of Biological and Molecular Sciences, Oxford Brookes University, 2004. ISBN 9781855780477.
- [5] Chris Pogson et al. *Essays in Biochemistry*. Portland Press, London, 1994. ISBN 9781855780163.
- [6] Ursula Kummer et al. Copasi: a complex pathway simulator. *Bioinformatics*, 22:3067–3074, 2006. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl485>.
- [7] Chin C-S et al. Dynamics and design principles of a basic regulatory architecture controlling metabolic pathways. *PLoS Biol*, 6(6):e146, 2008. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060146>.