

1. What is the wild-type production of your group's compound?

O modelo utilizado para resolver os exercícios foi o de *Escherichia coli*, iML1515 (1).

Para avaliar a produção de lactato foi primeiro necessário definir as condições ambientais e obter a função objetivo. As condições ambientais foram definidas como o consumo de oxigénio de 0 mmol/gDW/h e consumo de glicose de 15 mmol/gDW/h. Foi depois obtida a função objetivo (declaração matemática do que deve ser realizado), neste caso para a produção ótima do composto desejado. Verificou-se que nas condições especificados não existe produção de lactato, ou seja, são produzidos 0 mmol/gDW/h de lactato.

2. What are the maximum compound production capabilities?

Para calcular as capacidades máximas de produção do composto (lactato) usamos o método Flux Variability Analysis (FVA). Os valores obtidos permitem caracterizar as variações (mínima / máxima) de fluxo de um composto, considerando as restrições e função objetivo definidas.

As restrições ao modelo foram implementadas na pergunta anterior. Por defeito, a função objetivo considerada é a maximização da biomassa. Através dos cálculos de FVA, verificamos que, sob estas condições, a capacidade máxima de produção de lactato é 0 mmol/gDW/h, ou seja, não há produção de lactato.

No caso de alterarmos a função objetivo no sentido de otimização da produção de lactato (em detrimento da biomassa), mantendo as mesmas restrições, verificamos que é possível produzir lactato, obtendo-se um valor máximo de produção de 1.11 mmol/gDW/h e 12.26 mmol/gDW/h para o lactato-L e lactato-D, respetivamente.

3. Use different optimization objective functions to improve the production of the compound, considering that cells have evolved for maximum growth.

a. Evaluate if single gene deletions enhance the production of the compound. Rank the mutants obtained according to the compound production capacity and growth performance.

De acordo com a introdução da questão 3, em primeiro lugar temos que garantir que na simulação do comportamento celular usamos a maximização da produção de biomassa como função objetivo, uma vez que temos que assumir que as células seguem a hipótese de crescimento ótimo. De seguida, o enunciado diz também que temos que maximizar a produção do nosso composto, que no nosso caso é o lactato. Assim, o nosso procedimento foi usar duas funções objetivo do package MEWpy, sendo que cada uma maximiza ao mesmo tempo a produção de biomassa e a produção do composto, **Biomass-Product Coupled Yield (BPCY)** e **Weighted Yield (WYIELD)**. A BPCY é obtida através da multiplicação da quantidade do produto formado pela taxa de crescimento. A WYIELD, o cálculo do rendimento ponderado, leva a soluções mais robustas uma vez que tem em conta a variabilidade do fluxo do composto, apesar de estas poderem ser mais baixas.

De seguida, efetuámos um problema de otimização de deleção genética (GKOPProblem) para deleções de genes únicos e, finalmente, corremos a otimização para cada função objetivo com o método IMOMA e FBA respetivamente.

Todas as soluções apresentadas deram zero para o problema de otimização, indicando a inexistência de uma solução ideal para as nossas funções objetivo, tendo em conta as condições ambientais impostas.

Para a solução de cobrapy 1º otimizamos para a biomassa, e utilizamos o resultado da função objetivo como um novo *lower bound* no modelo para esta reação de forma a garantir a produção máxima no processo de deleção de genes únicos em que o objetivo eram ambas as formas quirais do lactato. Obtivemos destes um grande número de KO que resultaram na mesma função objetivo, e outro grande número que originou mutantes inválidos, porém existiu um reduzido número de genes cujo resultado esteve entre o resultado máximo e 0.

Também tentámos fazer de uma forma alternativa para melhor perceber os resultados da maneira anterior. Esta forma consistiu na utilização do package COBRA com o qual alterámos a função objetivo do modelo para maximizar a reação da biomassa e da produção do composto. Depois, fizemos todas as deleções de genes individuais, o que resultou. Outra tentativa foi correr a mesma metodologia anteriormente descrita no MEWpy, porém foi utilizado outro modelo da *E. coli* (modelo iMM904SL_v6, organismo *Saccharomyces cerevisiae* S288C (2)), o qual obteve mais uma vez um conjunto de soluções de valor 0 para ambas as funções objetivo.

b. Determine the best strategy, up to five modifications, to improve the compound production.

Foram testadas várias modificações, como o *knockout*, sub e supra expressão de genes, tendo sempre sido obtidos valores iguais a zero para as funções de otimização.

A proposta que apresentamos, uma vez que a produção de biomassa é competitiva com a produção de lactato, é que não se consegue otimizar as duas simultaneamente.

Isto acontece, não só, para as condições pretendidas, como também para condições anaeróbicas, que também foram testadas, confirmando o que foi verificado anteriormente.

4. Analyse the strategies proposed by your optimization, from the metabolic viewpoint. Would it be feasible to implement this strategy in the lab? Why?

A otimização do metabolismo pode ocorrer de várias formas, seja alterando as condições ambientais (temperatura, pH, concentração de oxigénio, de glucose, etc), seja modificando geneticamente o organismo para sub ou supra expressar um determinado gene ou conjunto de genes, seja fazendo *knockout* a um ou vários genes (3–6).

Cada abordagem tem diferentes necessidades e custos. Uma alteração ambiental pode ser o suficiente para otimizar a produção de um metabolito que um microrganismo já produz, sem ter de se modificar geneticamente o organismo.

Em termos genéticos, pode-se alterar a região promotora para sub ou supra expressar um gene de interesse (7), ou fazer *knockout* a um gene, garantindo que apenas as vias metabólicas de interesse (as que garantem a sobrevivência da *E. coli* e as que produzem lactato) estão ativas (1,8,9).

O *knockout* de alguns genes, embora uma estratégia que deva ser seguida com precaução, é possível de ser implementada, uma vez que esta estirpe está bem documentada em relação ao genoma e ao conjunto de reações que ocorrem (10).

BIBLIOGRAFIA

1. M. Monk J, J. Lloyd C, Brunk E, Mih N, Sastry A, King Z, et al. iML1515 , a knowledgebase that computes E . coli traits. Nat Biotechnol. 2017;35(10):8–12.
2. L. Mo M, Palsson B, J. Herrgård M. Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast. BMC Syst Biol. 2009;3:1–17.
3. Engström PM. Medium optimization of an E . coli fed-batch culture for the production of a recombinant protein. KTH Royal Institute of Technology; 2013.
4. Neves Candeias JA. A Engenharia Genética. Rev Saúde Pública [Internet]. 1991;25(1):3–10. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rsp/v25n1/02.pdf>
5. Choi DJ. The Ethics of Genetic Engineering. 2014.
6. Griffiths JF, R. Wessler S, B. Carroll S, Doebley J. Introdução à Genética. 11th editi. GUANABARA KOOGAN; 2015.
7. Morgan K. Plasmids 101: The Promoter Region – Let’s Go! [Internet]. 2014. Available from: <https://blog.addgene.org/plasmids-101-the-promoter-region>
8. Chang YJ, Sahinidis N V. Optimization of metabolic pathways under stability considerations. Comput Chem Eng. 2005;29(3):467–79.
9. Du J, Yuan Y, Si T, Lian J, Zhao H. Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering. Nucleic Acids Res. 2012;40(18):1–10.
10. Domingues A, Lemos JM, Vinga S. Optimization strategies for metabolic networks. 2009 Eur Control Conf ECC 2009. 2014;3190–5.