

E.coli Core Model for Beginners (PART 1)

Autor: H. Scott Hinton, Utah State University

Editado y traducido: German Preciat, Universidad de Guadalajara

Universidad de Guadalajara

Carrera: Ing. Biomédica

Materia: Ingeniería Metabólica

Contacto: german.preciat@academicos.udg.mx

4.B. Vía de la glucólisis

Ahora que hemos completado la exploración del subsistema de administración de energía del modelo central, es hora de comenzar a analizar los otros subsistemas incluidos. La glucólisis es la vía metabólica en el modelo central de *E.coli* que convierte la glucosa y la fructosa en piruvato. La energía libre liberada en este proceso se utiliza para formar los compuestos de alta energía atp[c] y nadh[c]. La ubicación de la ruta de la glucólisis en el mapa central de *E.coli* se destaca en la Figura 13.

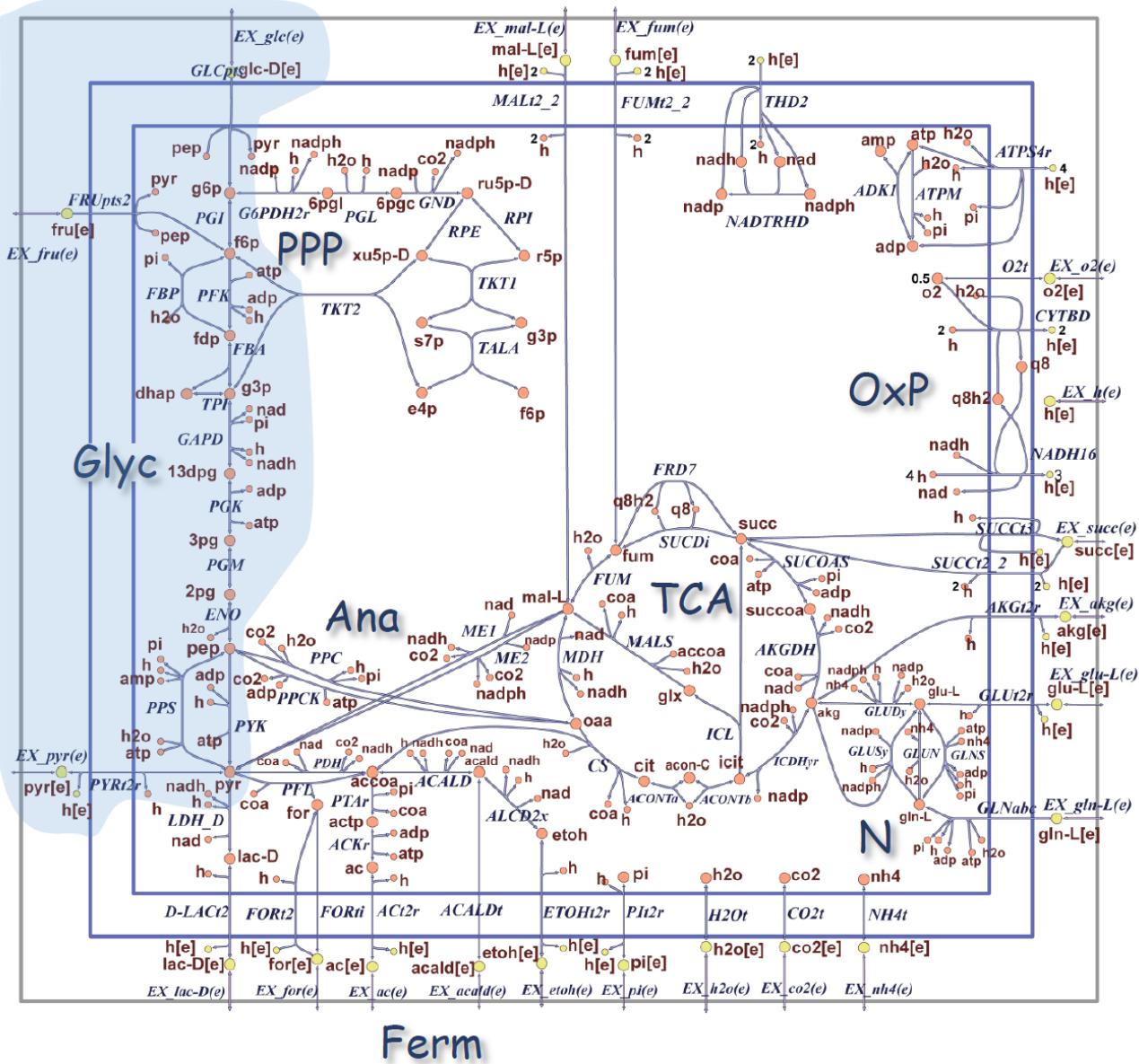


Figura 13. La ubicación de las reacciones del subsistema de la ruta de la glucólisis se resalta en azul en el mapa central de E.coli [3].

Se puede extraer una tabla que muestra las reacciones asociadas con la ruta de la glucólisis del modelo central de la siguiente manera: [Tiempo: segundos].

```
model = e_coli_core; % Comenzando con el modelo original
```

Unrecognized function or variable 'e_coli_core'.

```
model = changeRxnBounds(model,'EX_glc(e)',-10,'l');
model = changeRxnBounds(model,'EX_o2(e)',-30,'l');
model = changeObjective(model,'Biomass_Ecoli_core_w_GAM');
glycolysisSubsystem = {'Glycolysis/Gluconeogenesis'};
glycolysisReactions = model.rxn(ismember(model.subSystems,glycolysisSubsystem));
[~,glycolysis_rxnID] = ismember(glycolysisReactions,model.rxn);
Reaction_Names = model.rxnNames(glycolysis_rxnID);
```

```

Reaction_Formulas = printRxnFormula(model,glycolysisReactions,0);
T = table(Reaction_Names,Reaction_Formulas,'RowNames',glycolysisReactions)

```

Cabe señalar que, aunque la reacción pirvato deshidrogenasa (PDH) está incluida en el subsistema de glucólisis, funcionalmente encaja mejor en el subsistema "Ciclo de glucoxilato, gluconeogénesis y reacciones anapleuróticas", como se describe en la sección 4.E.

Además de proporcionar algo de atp[c] a través de la fosforilación del sustrato (PGK y PYK), la vía de la glucólisis también demuestra ser una fuente importante de nadh[c] (GAPD) que se utiliza para impulsar la cadena de transporte de electrones. También suministra varios precursores clave necesarios para las vías de biosíntesis. Estos precursores incluyen: D-Glucosa 6-fosfato (g6p[c]) un precursor de nucleótidos de azúcar, D-Fructosa 6-fosfato (f6p[c]) un precursor de aminoazúcares, gliceraldehído 3-fosfato (g3p[c]) un precursor de fosfolípidos, 3-fosfo-D-glicerato (3pg[c]) un precursor de cisteína, glicina y serina, fosfoenolpiruvato (pep[c]) un precursor de tirosina, triptófano y fenilalanina, y finalmente piruvato (pir[c]) el precursor de alanina, leucina y valina [5]. Estos precursores y su ubicación en la ruta de la glucólisis se ilustran en la Figura 14.

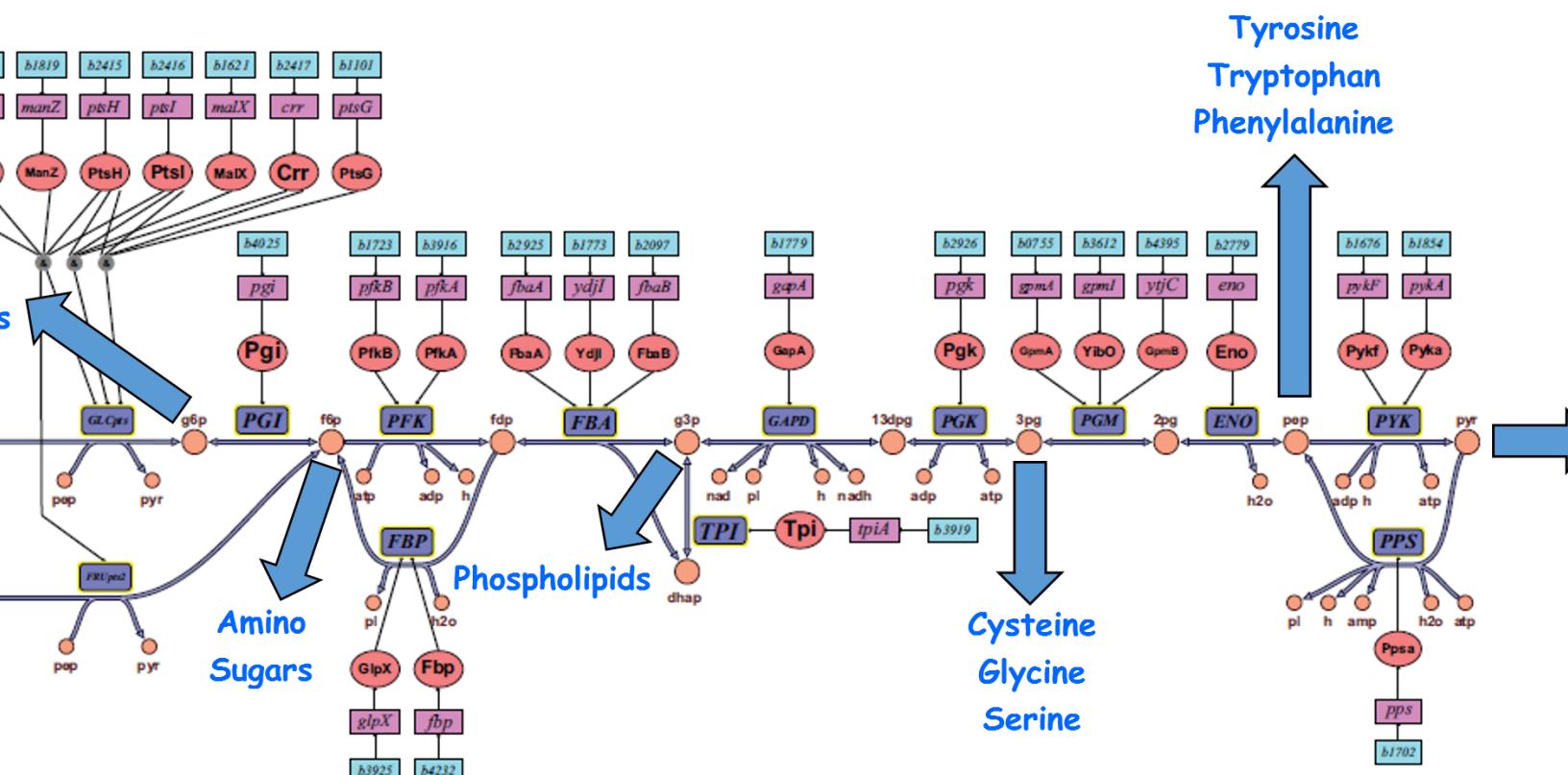


Figura 14. Precursores producidos en la vía de la glucólisis [3].

La visualización del flujo a través de las vías de glucólisis se puede ver utilizando el paquete de dibujo disponible con COBRA Toolbox. Esto se ilustra en el código de la caja de herramientas de Matlab y COBRA que se enumera a continuación para el caso de operación anaeróbica con fructosa como fuente de carbono. [Tiempo: segundos]

```

model = e_coli_core; % Comenzando con el modelo original
model = changeRxnBounds(model, 'EX_glc(e)',0,'l');
model = changeRxnBounds(model, 'EX_fru(e)',-10,'l');

```

```

model = changeRxnBounds(model,'EX_o2(e)',-0,'l');
model = changeObjective(model,'Biomass_Ecoli_core_w_GAM');
FBAsolution = optimizeCbModel(model,'max',0,0);

% Importa el mapa central de E.coli y ajusta los parámetros
map=readCbMap('coli_Textbook_ExportMap');
options.zeroFluxWidth = 0.1;
options.rxnDirMultiplier = 10;
drawFlux(map, model, FBAsolution.x, options);

```

En la Figura 15 se muestra una captura de pantalla del archivo "target.svg" guardado.

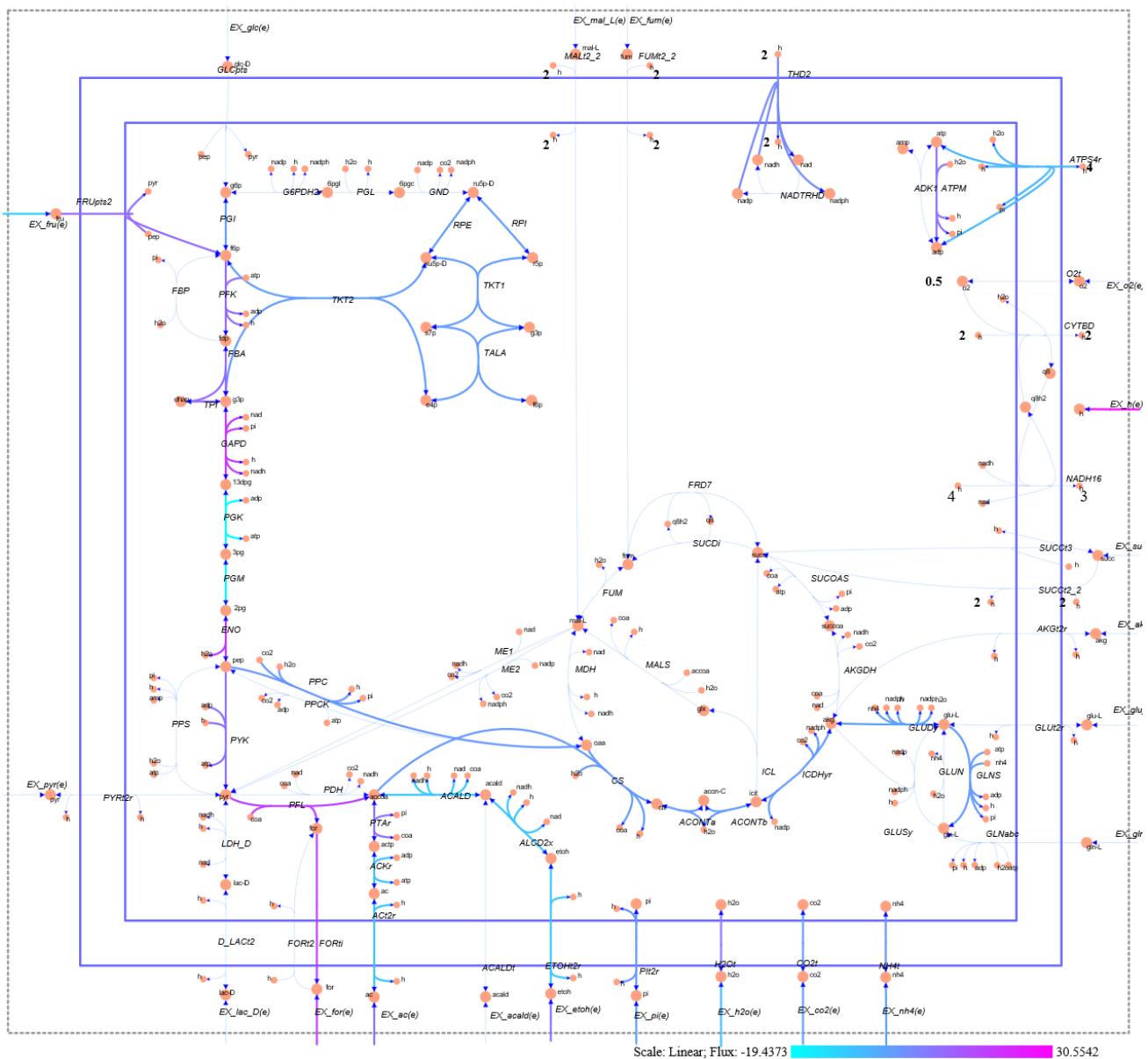


Figura 15. Mapa de red del modelo central de *E. coli* usando fructosa como fuente de carbono (EX_fru(e) -10) en un ambiente anaeróbico (EX_o2(e) 0).

Tenga en cuenta que la fructosa ingresa a la red en la parte superior izquierda del mapa. Los valores de flujo detallados para todas las reacciones activas se muestran a continuación. [Tiempo: segundos]

```
% Imprime los valores de flujo distintos de cero
printFluxVector(model, FBAsolution.x, true)
```

Los consumidores de precursores formados en las vías de la glucólisis se pueden encontrar utilizando la función COBRA Toolbox "surfNet". A continuación, se muestra un ejemplo que busca tanto a los productores como a los consumidores de "f6p[c]", un precursor de los aminoazúcares. [Tiempo: segundos]

```
surfNet(model, 'f6p[c]', 0, FBAsolution.x, 1, 1)
```

Ten en cuenta que la mayoría del flujo de f6p[c] se dirige a la vía de la glucólisis (PFK), una cantidad modesta se dirige a la vía de las pentosas fosfato (PGI, TALA, TKT2), y una pequeña cantidad se dirige a la función de biomasa ($0,211663 \times 0,0709 = 0,015$) que representa la carga de biosíntesis de los precursores. Se puede utilizar un enfoque similar para comprender las relaciones productor/consumidor con los otros precursores glicolíticos.

Usando COBRA Toolbox, es posible crear una tabla de reacciones y sus valores de flujo para ambas fuentes de carbono soportadas por glucólisis, glucosa y fructosa. Esto se ilustra a continuación. [Tiempo: segundos]

```
% Comenzando con el modelo original
model = e_coli_core;

% Obten los rxnID para las reacciones de la ruta de la glucólisis
[tmp,glycolysis_rxnID] = ismember(glycolysisReactions,model.rxns);

% Flujo aeróbico de glucosa
FBAsolution = optimizeCbModel(model,'max',0,0);
Glucose_Aerobic_Flux = FBAsolution.x(glycolysis_rxnID);

% flujo aeróbico de fructosa
model = changeRxnBounds(model,'EX_glc(e)',-0,'l');
model = changeRxnBounds(model,'EX_fru(e)',-10,'l');
FBAsolution = optimizeCbModel(model,'max',0,0);
Fructose_Aerobic_Flux = FBAsolution.x(glycolysis_rxnID);

% Establecer condiciones anaeróbicas
model = changeRxnBounds(model,'EX_o2(e)',-0,'l');

% flujo anaeróbico de glucosa
model = changeRxnBounds(model,'EX_glc(e)',-10,'l');
FBAsolution = optimizeCbModel(model,'max',0,0);
Glucose_Anaerobic_Flux = FBAsolution.x(glycolysis_rxnID);

% flujo anaeróbico de fructosa
model = changeRxnBounds(model,'EX_glc(e)',-0,'l');
model = changeRxnBounds(model,'EX_fru(e)',-10,'l');
FBAsolution = optimizeCbModel(model,'max',0,0);
Fructose_Anaerobic_Flux = FBAsolution.x(glycolysis_rxnID);

T = table(Glucose_Aerobic_Flux,Fructose_Aerobic_Flux,Glucose_Anaerobic_Flux,...
```

En esta tabla, se puede ver que en las cuatro situaciones, el flujo fluye desde la fuente de carbono en la parte superior izquierda de los mapas metabólicos por la vía de la glucólisis para formar piruvato en la parte inferior derecha. En condiciones aeróbicas, parte del flujo se desvía hacia la entrada de G6PDH2r a las vías de las pentosas fosfato. Para el caso anaeróbico, el flujo solo se desvía hacia la mitad inferior de la vía de las pentosas fosfato (TKT2) para producir los precursores de la vía de las pentosas fosfato. También tenga en cuenta que el flujo a través de GAPD casi se ha duplicado ya que la cantidad de metabolitos g3p[c] que salen de la reacción FBA y TPI es el doble de la cantidad de metabolitos fdp[c] que ingresan a FBA. Esto es posible ya que la salida de FBA proporciona tanto una molécula de g3p[c] como una molécula de dhap[c]. El dhap[c] se convierte rápidamente en g3p[c] creando así el efecto de duplicar el g3p[c] entrando en GAPD. Una comprensión más detallada de los flujos a través de la glucólisis utilizando la caja de herramientas COBRA se deja como una oportunidad de exploración para el lector.

Preguntas

¿Cuál es la diferencia entre la glucólisis y la gluconeogénesis?

¿Qué reacciones componen la ruta de la glucólisis?

¿Qué metabolitos se crean en la vía de la glucólisis?

¿Cuál es el metabolito final creado por la vía de la glucólisis?

¿Cuáles son los precursores biosintéticos creados por la vía de la glucólisis?

4.C. Vía pentosa fosfato

El propósito principal de la vía de las pentosas fosfato (PPP) es proporcionar los precursores de 4, 5 y 7 carbonos para la célula y producir nadph[c]. Los precursores de 4, 5 y 7 carbonos incluyen D-eritrosa-4-fosfato (e4p[c]), alfa-D-ribosa-5-fosfato (r5p[c]) y sedoheptulosa-7-fosfato (s7p[c]), respectivamente. El nadph[c] se produce en la vía oxidativa por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH2r) y la fosfogluconato deshidrogenasa (GND).

La ubicación de las reacciones asociadas con el PPP se muestra a continuación en el mapa central de E.coli en la Figura 16.

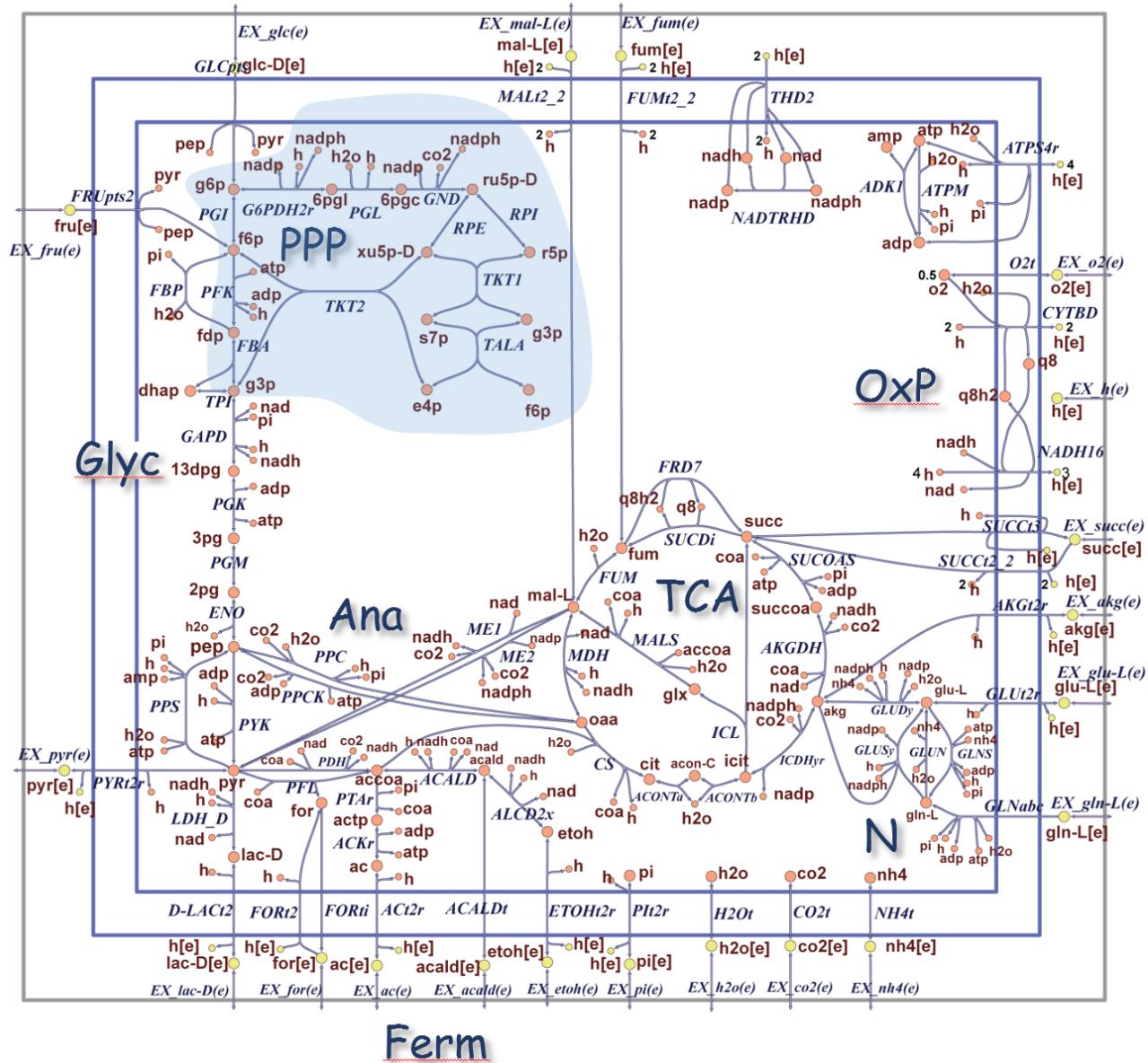


Figura 16. Reacciones del subsistema de la vía de las pentosas fosfato resaltadas en azul en el mapa central de *E.coli* [3].

El subsistema de la ruta de las pentosas fosfato incluye las siguientes reacciones derivadas del modelo central. [Tiempo: segundos]

```

model = e_coli_core; % Comenzar con el modelo original
model = changeRxnBounds(model,'EX_glc(e)',-10,'l');
model = changeRxnBounds(model,'EX_o2(e)',-30,'l');
model = changeObjective(model,'Biomass_Ecoli_core_w_GAM');
pppSubsystem = {'Pentose Phosphate Pathway'};
pppReactions = model.rxns(ismember(model.subSystems,pppSubsystem));
[~,ppp_rxnID] = ismember(pppReactions,model.rxns);
Reaction_Names = model.rxnNames(ppp_rxnID);
Reaction_Formulas = printRxnFormula(model,pppReactions,0);
T = table(Reaction_Names,Reaction_Formulas,'RowNames',pppReactions)

```

Hay dos fases distintas de la ruta de las pentosas fosfato. La primera es la "fase oxidativa", en la que se genera nadph[c]. Tenga en cuenta que la vía de las pentosas fosfato no es la única fuente de nadph[c] en condiciones aeróbicas. Esto se exploró utilizando "surftNet" en la sección de administración de energía (Sección 4.A). La segunda fase de la ruta de las pentosas fosfato se conoce como la fase "no oxidativa" que proporciona una ruta para la síntesis de precursores de 4, 5 y 7 carbonos en condiciones anaeróbicas. Las reacciones de la ruta de las pentosas fosfato y los precursores admitidos se muestran en la Figura 17 a continuación.

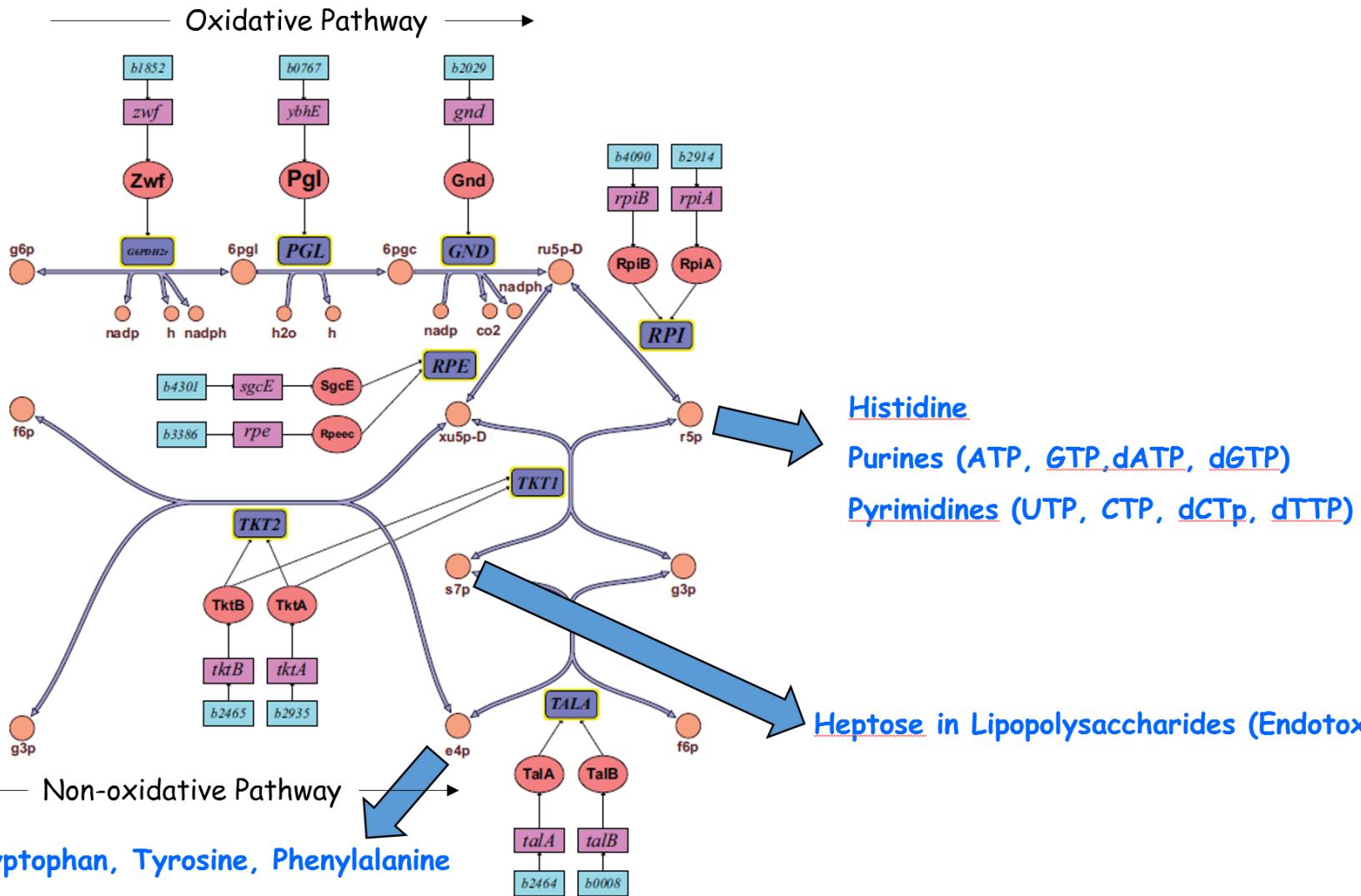


Figura 17. Reacciones y precursores de la vía de las pentosas fosfato [3].

La dirección del flujo que fluye a través de la parte no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato cambia en función de las condiciones aeróbicas frente a las anaeróbicas. Esta variación en la dirección del flujo se muestra a continuación en la Figura 18.

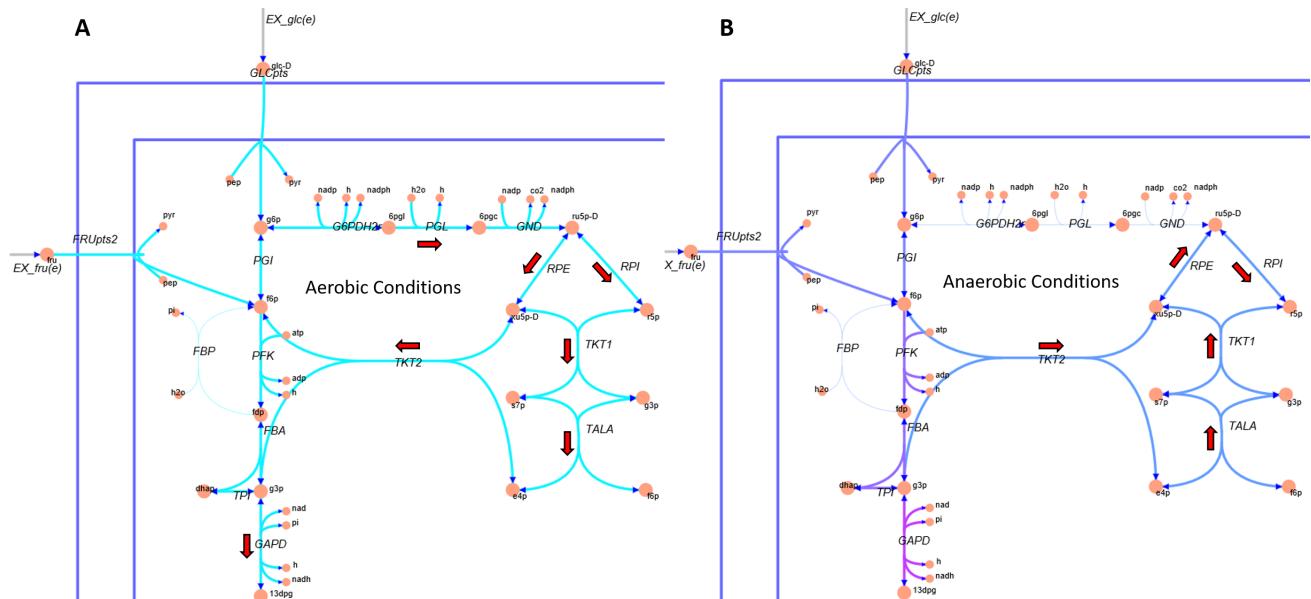


Figura 18. El flujo de flujo a través de la vía de las pentosas fosfato basado en A) condiciones aeróbicas o B) anaeróbicas.

En esta figura se puede ver que en (A) condiciones aeróbicas, el flujo fluye a través de la fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato y luego se dirige hacia abajo a través de la fase no oxidativa y luego regresa al ciclo de la glucólisis. Por otro lado, en (B) condiciones anaeróbicas, el flujo ingresa por el lado izquierdo de la reacción TKT2 de la ruta de las pentosas fosfato desde la ruta de la glucólisis que opera bajo la condición de gluconeogénesis. Luego, el flujo se divide para satisfacer las necesidades de los tres principales precursores e4p[c], r5p[c] y s7p[c]. Estos valores de flujo específicos se pueden calcular usando la caja de herramientas COBRA de la siguiente manera. [Tiempo: segundos]

```
% Obten los rxnID para las reacciones de la ruta de las pentosas fosfato
[~,glycolysis_rxnID] = ismember(glycolysisReactions,model.rxns);

% Flujo aeróbico de glucosa
FBAsolution = optimizeCbModel(model,'max',0,0);
Glucose_Aerobic_Flux = round(FBAsolution.x(ppp_rxnID),3);

% flujo aeróbico de fructosa
model = changeRxnBounds(model,'EX_glc(e)',-0,'l');
model = changeRxnBounds(model,'EX_fru(e)',-10,'l');
FBAsolution = optimizeCbModel(model,'max',0,0);
Fructose_Aerobic_Flux = round(FBAsolution.x(ppp_rxnID),3);

% Establecer condiciones anaeróbicas
model = changeRxnBounds(model,'EX_o2(e)',-0,'l');

% Flujo anaeróbico de glucosa
model = changeRxnBounds(model,'EX_glc(e)',-10,'l');
FBAsolution = optimizeCbModel(model,'max',0,0);
Glucose_Anaerobic_Flux = round(FBAsolution.x(ppp_rxnID),3);
```

```
% flujo anaeróbico de fructosa
model = changeRxnBounds(model,'EX_glc(e)',-0,'l');
model = changeRxnBounds(model,'EX_fru(e)',-10,'l');
FBAsolution = optimizeCbModel(model,'max',0,0);
Fructose_Anaerobic_Flux = round(FBAsolution.x(ppp_rxnID),3);

T = table(Glucose_Aerobic_Flux,Fructose_Aerobic_Flux,Glucose_Anaerobic_Flux, ...
    Fructose_Anaerobic_Flux,'RowNames',pppReactions)
```

Preguntas

¿Cuáles son los precursores biosintéticos creados por la ruta de las pentosas fosfato?

¿Cuál es la diferencia entre las vías oxidativa y no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato?

¿Qué reacciones forman la vía de las pentosas fosfato?

¿Qué metabolitos se crean en la ruta de las pentosas fosfato?

4.D. Ciclo del ácido tricarboxílico

El ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) o el ciclo del ácido cítrico es compatible con una variedad de funciones celulares dependiendo del entorno. En condiciones aeróbicas, el ciclo TCA opera en sentido contrario a las agujas del reloj utilizando acetil-CoA como sustrato para producir tres precursores celulares, reduciendo el poder nadh[c] y nadph[c], la energía celular atp[c] a través de la fosforilación del sustrato y el carbono. dióxido de carbono (co2[c]). Mientras que en la condición anaeróbica, sólo una parte del ciclo TCA se utilizará para producir dos de los tres precursores y el poder reductor nadph[c]. La ubicación del subsistema del ciclo TCA se muestra en el siguiente mapa central de E.coli (Figura 19).

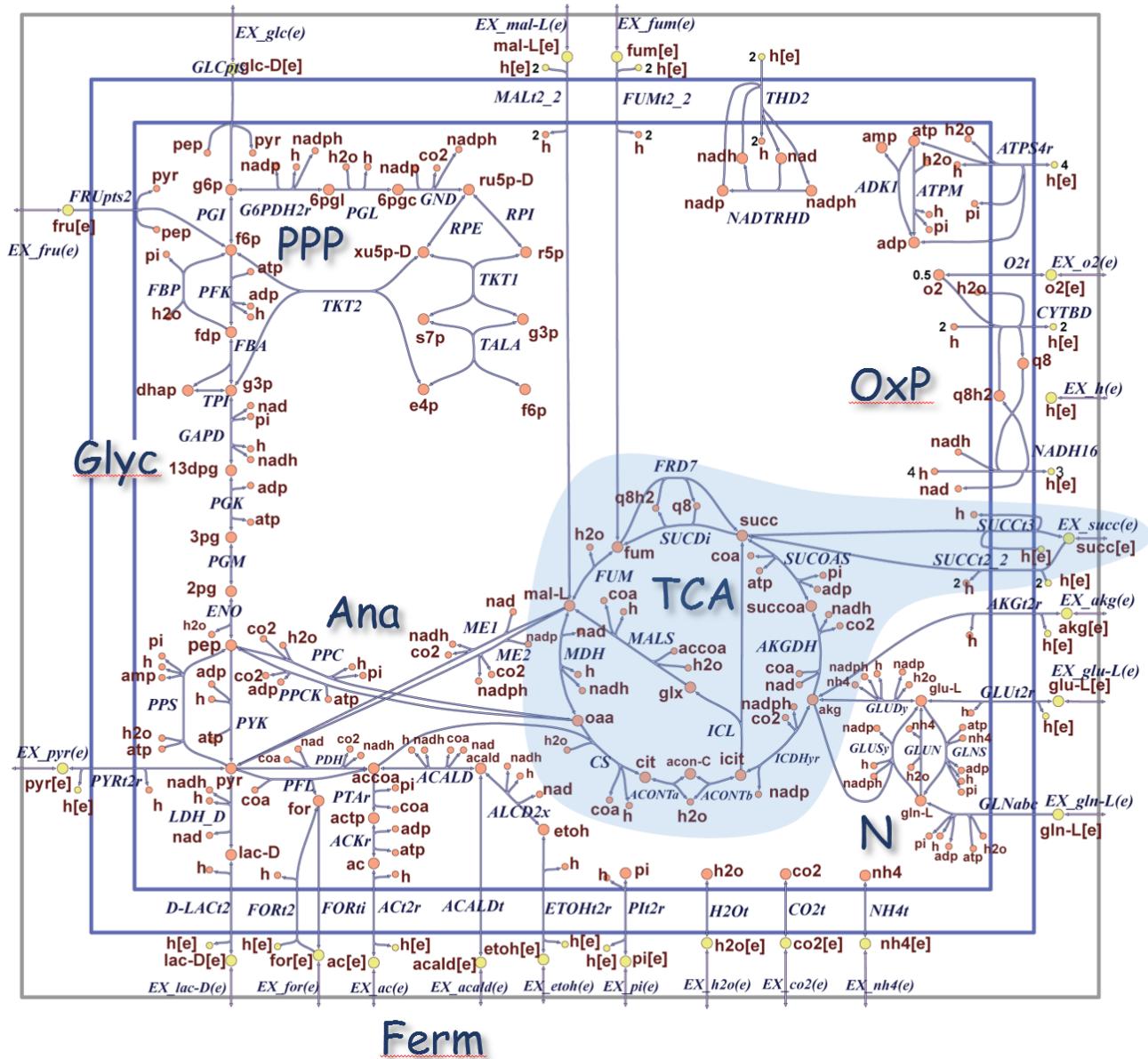


Figura 19. Reacciones del subsistema de la vía TCA resaltadas en azul en el mapa central de E.coli [3].

Las reacciones asociadas con el ciclo TCA se pueden recuperar del modelo central de E.coli como se muestra a continuación. [Tiempo: segundos]

```

model = e_coli_core;
TCA_Reactions = transpose({'CS', 'ACONTa', 'ACONTb', 'ICDHyr', 'AKGDH', 'SUCOAS', ...
    'FRD7', 'SUCDi', 'FUM', 'MDH'});
[~,TCA_rxnID] = ismember(TCA_Reactions,model.rxnNames);
Reaction_Names = model.rxnNames(TCA_rxnID);
Reaction_Formulas = printRxnFormula(model,TCA_Reactions,0);
T = table(Reaction_Names,Reaction_Formulas,'RowNames',TCA_Reactions)

```

El modelo central de E.coli no incluye las reacciones de membrana (FRD7 y SUCDi) en el subsistema del ciclo TCA (Ciclo del ácido cítrico). Se han agregado a esta discusión ya que cierran el ciclo TCA y permiten una operación TCA completa.

Los precursores asociados con el ciclo TCA se muestran a continuación en la Figura 20. Los precursores incluyen; 1) oxaloacetato (oaa[c]) para la biosíntesis de asparagina, ácido aspártico, isoleucina, lisina, metionina y treonina, 2) 2-oxoglutarato o alfa-cetoglutarato (akg[c]) para la biosíntesis de arginina, glutamina, ácido glutámico y prolina y finalmente 3) succinil-CoA (succoa[c]) para la biosíntesis de hemo.

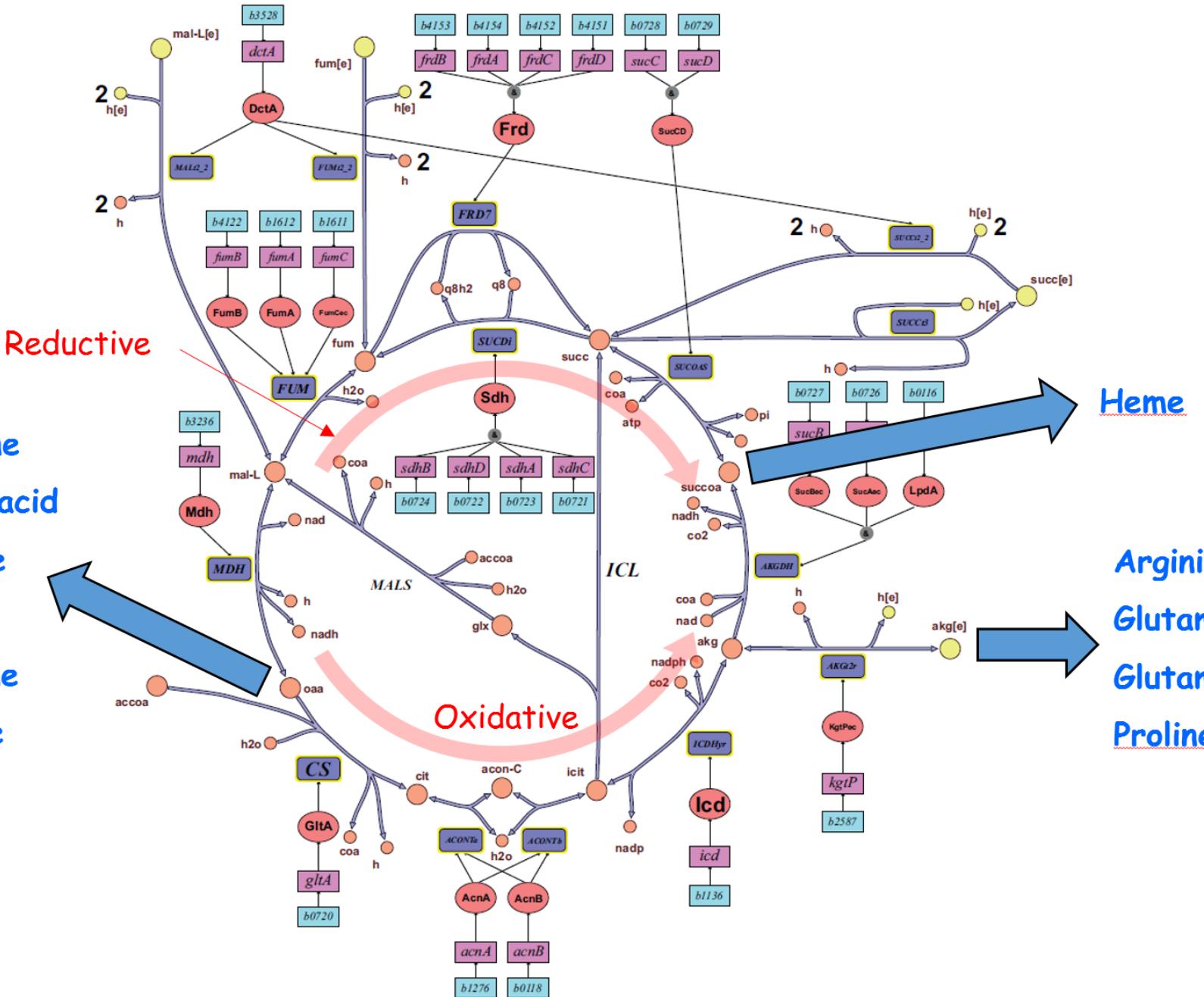


Figura 20. Reacciones y precursores de la vía TCA [3].

El ciclo TCA se puede dividir en una vía oxidativa y una vía reductora, como se ilustra en la Figura 19. La vía oxidativa del ciclo TCA se desarrolla en sentido contrario a las agujas del reloj en la parte inferior del ciclo, desde el oxaloacetato (oaa[c]), hasta el 2-oxoglutarato. (akg[c]). En condiciones aeróbicas, la vía oxidativa puede continuar en sentido antihorario desde el 2-oxoglutarato (akg[c]) hasta el oxaloacetato (oaa[c]). El ciclo

completo del TCA puede oxidar totalmente la acetil-CoA (accoa[c]), pero solo durante el crecimiento aeróbico con acetato o ácidos grasos.

En condiciones anaeróbicas, el ciclo TCA no funciona como un ciclo, sino como dos vías separadas. La vía oxidativa, la parte inferior del ciclo en sentido antihorario, todavía forma el precursor 2-oxoglutarato. La vía reductora, la parte superior del ciclo en el sentido de las agujas del reloj, puede formar el precursor succinil-CoA.

Comencemos esta exploración visualizando los flujos a través del modelo central cuando se usa piruvato como fuente de carbono para condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. [Tiempo: segundos]

```
% Parámetros clave para la sección de la vía TCA
model = e_coli_core;
model = changeRxnBounds(model, 'EX_glc(e)', -0, 'l');
model = changeRxnBounds(model, 'EX_pyr(e)', -20, 'l');
model = changeRxnBounds(model, 'EX_o2(e)', -30, 'l'); % Establecer en -30 para aeróbicos
model = changeObjective(model, 'Biomass_Ecoli_core_w_GAM');
FBAsolution = optimizeCbModel(model, 'max', 0, 0);

% Importe el mapa central de E.coli y ajuste los parámetros
map=readCbMap('ecoli_core_map.txt');
options.zeroFluxWidth = 0.1;
options.rxnDirMultiplier = 10;
drawFlux(map, model, FBAsolution.x, options);
```

En la Figura 21 se muestra un primer plano del ciclo TCA para los casos aeróbico y anaeróbico.

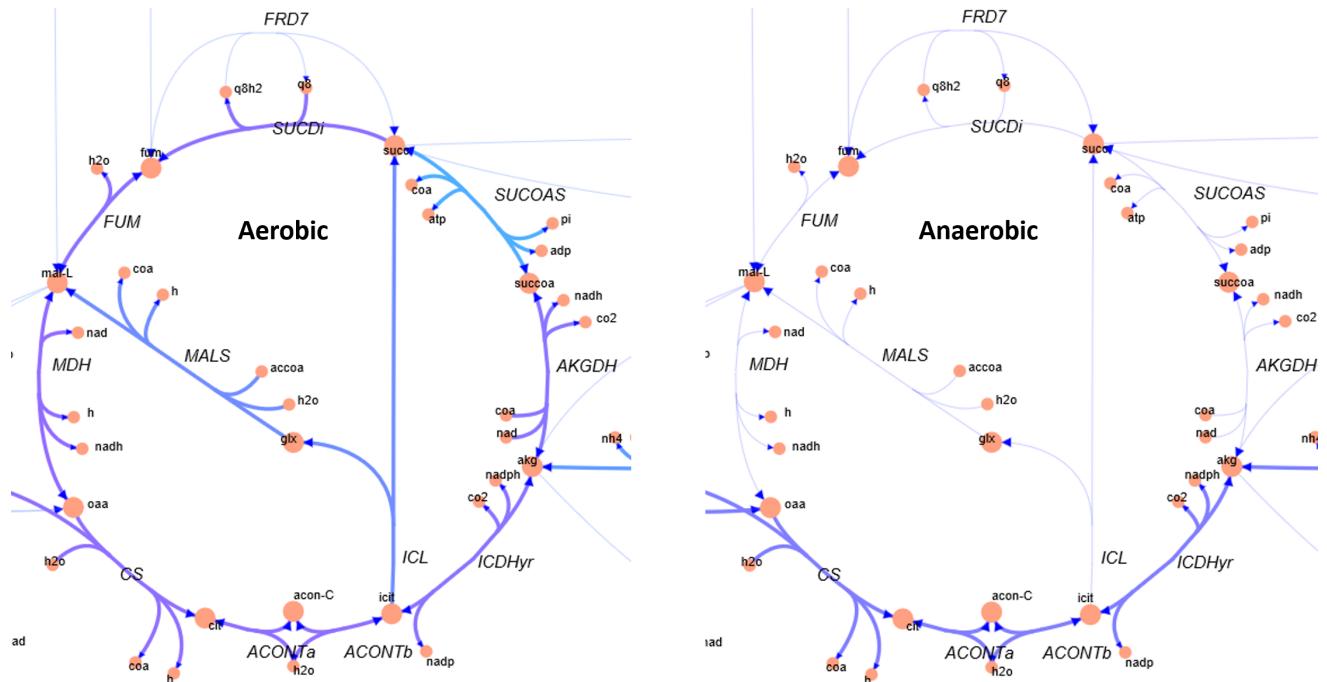


Figura 21. A close-up of the TCA cycle with pyruvate as the carbon source for both aerobic and anaerobic conditions.

Los valores de flujo específicos para cada una de estas condiciones se calculan a continuación. [Tiempo: segundos]

```
model = e_coli_core;
% flujo aeróbico de piruvato
model = changeRxnBounds(model, 'EX_glc(e)', -0, 'l');
model = changeRxnBounds(model, 'EX_pyr(e)', -20, 'l');
model = changeRxnBounds(model, 'EX_o2(e)', -30, 'l');
FBAsolution = optimizeCbModel(model, 'max', 0, 0);
Pyrvate_Aerobic_Flux = round(FBAsolution.x(TCA_rxnID), 3);

% flujo anaeróbico de piruvato
model = changeRxnBounds(model, 'EX_o2(e)', -0, 'l');
FBAsolution = optimizeCbModel(model, 'max', 0, 0);
Pyrvate_Anaerobic_Flux = round(FBAsolution.x(TCA_rxnID), 3);

T = table(Pyrvate_Aerobic_Flux, Pyrvate_Anaerobic_Flux, ...
    'RowNames', TCA_Reactions)
```

Estos flujos muestran que, en condiciones aeróbicas, el ciclo TCA completo está operativo, mientras que en condiciones anaeróbicas solo se utiliza la parte inferior del ciclo TCA (CS, ACONTa, ACONTb e ICDHyr), la vía oxidativa.

Preguntas

¿Cuáles son los diferentes nombres para el ciclo TCA?

¿Cuáles son los precursores biosintéticos creados por el ciclo TCA?

¿Cuál es la vía oxidativa en el ciclo TCA?

¿Qué reacciones componen el ciclo TCA?

¿Qué metabolitos se crean en el ciclo TCA?

4.E. Ciclo del glucoxilato, gluconeogénesis y reacciones anapleuróticas

El ciclo del glucoxilato y las reacciones gluconeogénicas son necesarias para permitir que *E. coli* crezca en compuestos de 3 carbonos (piruvato) y 4 carbonos (malato, fumarato y succinato). Esto ocurre al evitar

la pérdida de carbono a dióxido de carbono en el ciclo TCA (ciclo de glucoxilato), proporcionando una vía para la generación de intermediarios glucolíticos a partir de intermediarios TCA (reacciones anapleuróticas) e invirtiendo el flujo de carbono a través de la glucólisis (gluconeogénesis) para producir precursores esenciales para la biosíntesis.

La ubicación del ciclo del glucoxilato, la gluconeogénesis y las reacciones anapleuróticas en el mapa central de E.coli se muestra en la Figura 22 a continuación.

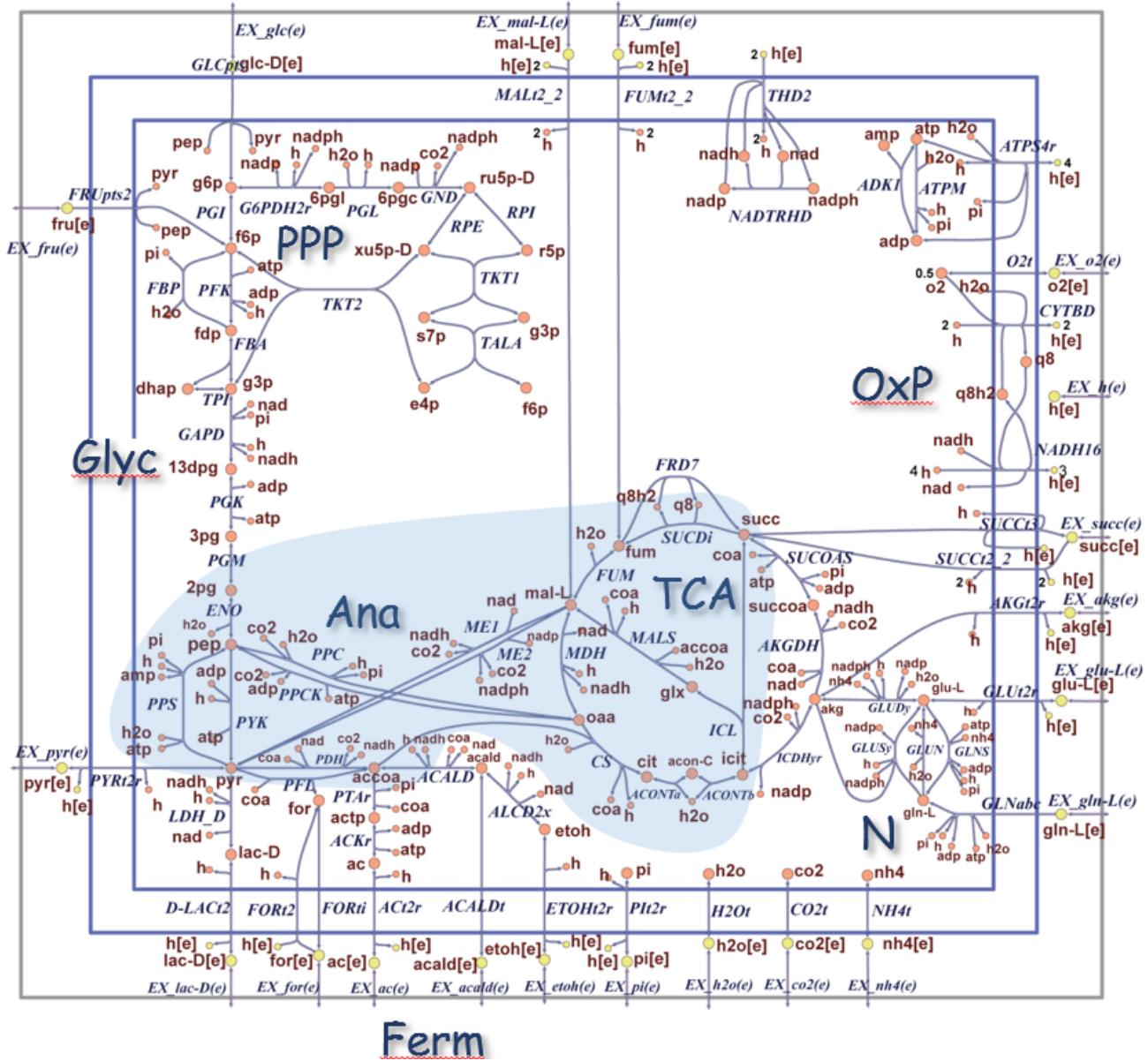


Figura 22. Ciclo de glucoxilato, gluconeogénesis y reacciones anapleuróticas resaltadas en azul en el mapa central de *E.coli* [3].

Las reacciones incluidas en esta sección sobre el ciclo del glucoxilato, la gluconeogénesis y las reacciones anapleuróticas se muestran a continuación. Este subsistema se denomina en el modelo central como el subsistema de "reacciones anapleuróticas". [Tiempo: segundos]

```
% Establecer restricciones iniciales para la sección de ciclo de glucoxilato, gluconeogénesis y reacciones anapleuróticas
model = e_coli_core;
```

```

ANA_Reactions = transpose({'ICL', 'MALS', 'ME1', 'ME2', 'PPS', 'PPCK', ...
    'PPC'});
[~,ANA_rxnID] = ismember(ANA_Reactions,model.rxns);
Reaction_Names = model.rxnNames(ANA_rxnID);
Reaction_Formulas = printRxnFormula(model,ANA_Reactions,0);
T = table(Reaction_Names,Reaction_Formulas,'RowNames',ANA_Reactions)

```

Estas reacciones individuales asociadas con el ciclo del glucoxilato, la gluconeogénesis y las reacciones anapleuróticas se muestran gráficamente en la Figura 23.

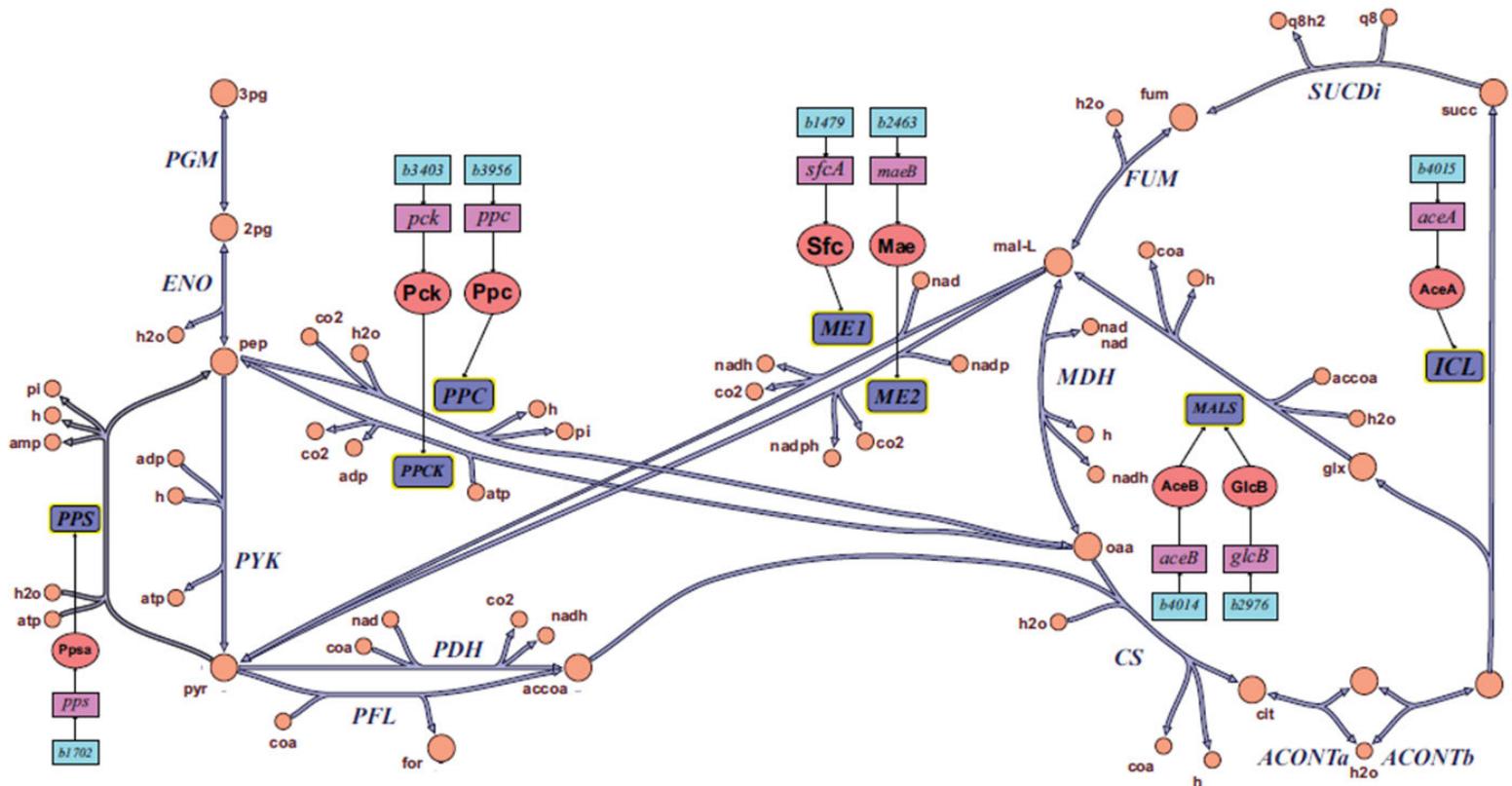


Figura 23. Reacciones asociadas con el ciclo del glucoxilato, gluconeogénesis y reacciones anapleuróticas [3].

Las reacciones anapleuróticas (PPC, PPS, PPCK, PPC, ME1 y ME2) son reacciones de interconexión, inversión y derivación que reponen los intermedios del ciclo TCA. El ciclo del glicoxilato (CS, ACONTa, ACONTb, ICL, MALS, MDH, SUCDi y FUM), que incluye algunas reacciones del ciclo TCA, es esencial para el crecimiento en compuestos de 3 carbonos (piruvato) y 4 carbonos, ya que puede convertir el precursor acetil-CoA en intermediarios glicolíticos sin pérdida de carbono (ICDHyr y AKGDH). Finalmente, el crecimiento en intermediarios de 4 carbonos del ciclo TCA, como el malato, requiere que la célula sea capaz de producir fosfoenolpiruvato (pep[c]) para la gluconeogénesis. La gluconeogénesis se refiere a la inversión del flujo a través de la vía glucolítica. Hay dos caminos capaces de cumplir con estas demandas pep[c]. La primera vía involucra la conversión de malato (mal[c]) a piruvato (pyr[c]) por una enzima málica (ME1 o ME2). A esto le sigue la síntesis de pep[c] a partir de pyr[c] por la fosfoenolpiruvato sintasa (PPS). La enzima málica (ME1) reduce una molécula de nad[c] a nadh[c] mientras convierte mal[c] en pyr[c]. Una segunda reacción paralela, ME2 reduce una molécula de nadp[c] a nadph[c].

Ahora es el momento de explorar el impacto en la célula de estas vías para diferentes fuentes de carbono. Comencemos observando la operación aeróbica de la célula que crece en acetato. [Tiempo: segundos]

```
% Parámetros clave para la sección de la vía TCA
model = e_coli_core;
model = changeRxnBounds(model, 'EX_glc(e)', -0, 'l');
model = changeRxnBounds(model, 'EX_ac(e)', -10, 'l');
model = changeRxnBounds(model, 'EX_o2(e)', -30, 'l'); % Establecer en -30 para aeróbicos
model = changeObjective(model, 'Biomass_Ecoli_core_w_GAM');

% Realice FBA con Biomass_Ecoli_core_N(w/GAM)_Nmet2 como objetivo,
FBAsolution = optimizeCbModel(model, 'max', 0, 0);

% Importa el mapa central de E.coli y ajuste los parámetros
map=readCbMap('ecoli_Textbook_ExportMap');
options.zeroFluxWidth = 0.1;
options.rxnDirMultiplier = 10;
% Dibuja los valores de flujo en el mapa "target.svg" que se puede abrir en FireFox
drawFlux(map, model, FBAsolution.x, options);
```

En la Figura 24 se muestra una copia de la figura almacenada en "target.svg".

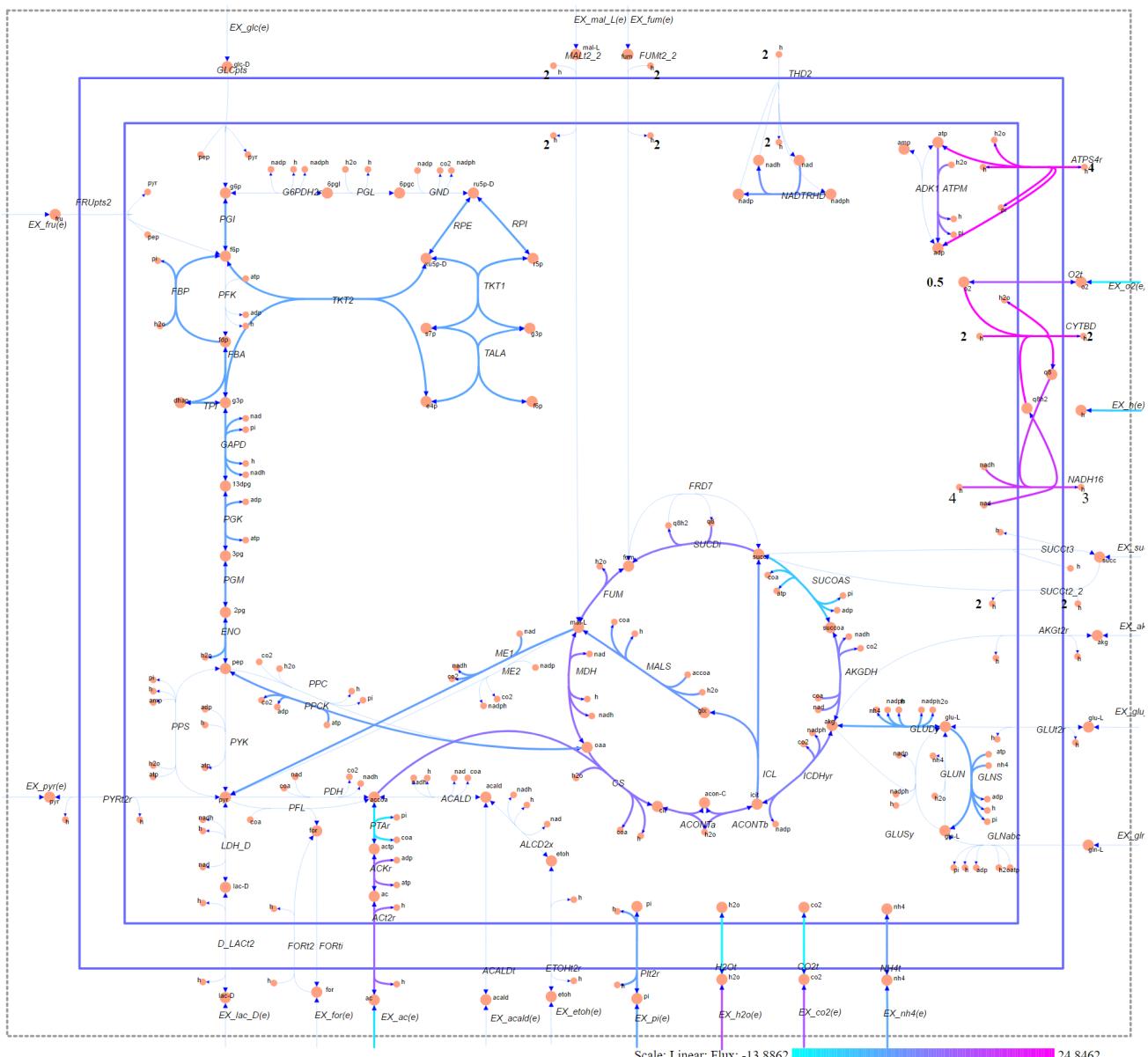


Figure 24. Captura de pantalla del modelo central con acetato como fuente de carbono en condiciones aeróbicas.

Los flujos activos para esta simulación se dan a continuación. [Tiempo: segundos]

```
printFluxVector(model,FBAsolution.x,true) % solo imprime flujos distintos de cero
```

Se puede ver, utilizando el mapa y los flujos enumerados anteriormente, que el acetato ingresa a la red por la parte inferior y fluye hacia el ciclo TCA. A partir de ahí se puede observar que no sólo está operativo el ciclo completo del TCA sino también el ciclo del glicoxolato. Luego, parte del flujo del metabolito oaa[c] se dirige a través de la vía de la glucólisis (gluconeogénesis) a la vía de las pentosas fosfato para crear los precursores precursores de 4, 5 y 7 carbonos.

El uso de malato como fuente de carbono en condiciones aeróbicas es otro buen ejemplo del papel del ciclo del glucoxilato, la gluconeogénesis y las reacciones anapleuróticas. El código de Matlab/COBRA Toolbox para este ejemplo se muestra a continuación. [Tiempo: segundos]

```
model = e_coli_core;
model = changeRxnBounds(model,'EX_glc(e)',-0,'l');
model = changeRxnBounds(model,'EX_mal_L(e)',-10,'l');
model = changeRxnBounds(model,'EX_o2(e)',-30,'l'); % Establecer en -30 para aeróbicos
model = changeObjective(model,'Biomass_Ecoli_core_w_GAM');

% Realice FBA con Biomass_Ecoli_core_N(w/GAM)_Nmet2 como objetivo,
FBAsolution = optimizeCbModel(model,'max',0,0);

% Importe el mapa central de E.coli y ajuste los parámetros
map=readCbMap('ecoli_Textbook_ExportMap');
options.zeroFluxWidth = 0.1;
options.rxnDirMultiplier = 10;
drawFlux(map, model, FBAsolution.x, options);
```

En la Figura 25 se muestra una captura de pantalla de la figura almacenada en "target.svg".

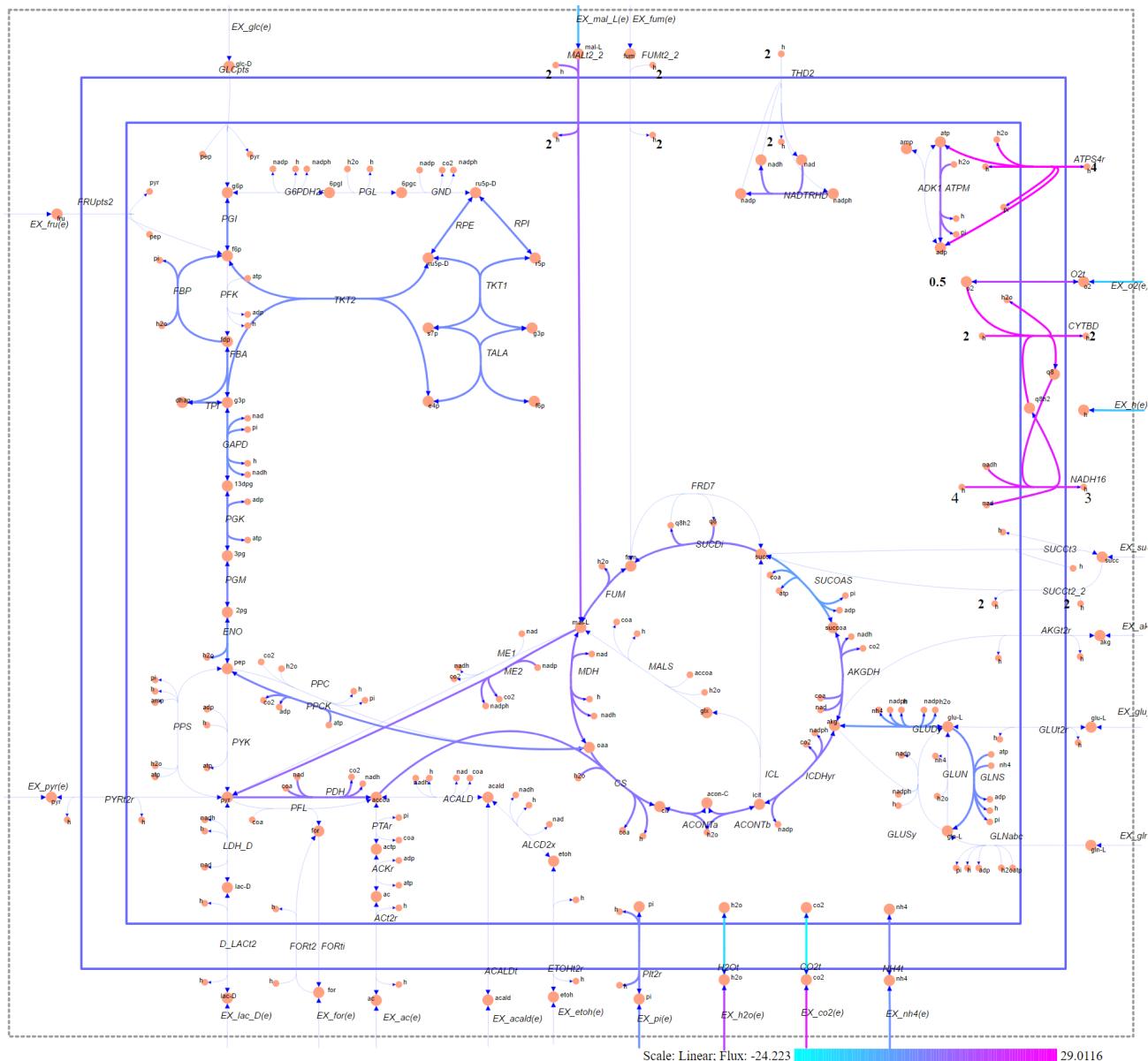


Figura 25. COBRA Toolbox produjo un mapa que muestra la operación aeróbica con malato como fuente de carbono.

Los flujos activos para esta simulación se dan a continuación. [Tiempo: segundos]

```
printFluxVector(model,FBAsolution.x,true) % solo imprime flujos distintos de cero
```

En esta situación, el malato ingresa a la red desde la parte superior y fluye hacia el ciclo TCA. Parte del flujo de metabolitos de malato se convierte para usarse como precursor de piruvato, mientras que el resto ingresa al ciclo TCA completamente operativo. Tenga en cuenta que el ciclo de glicoxolato está inactivo. Luego, parte del flujo del metabolito oaa[c] se dirige a través de la vía de la glucólisis (gluconeogénesis), a la vía de las pentosas fosfato, para crear los precursores de 4, 5 y 7 carbonos.

Preguntas

¿Qué es la vía apleurótica?

¿Qué es el ciclo del glucoxilato?

¿Qué reacciones componen la vía anapleurótica y el ciclo del glucoxilato?

¿Qué metabolitos se crean en la vía anapleurótica y el ciclo del glucoxilato?

¿Qué reacciones componen los modelos centrales de fosforilación oxidativa y cadena de transferencia de electrones?

¿Qué metabolitos se crean en los modelos centrales de fosforilación oxidativa y cadena de transferencia de electrones?

4.F. Fermentación

La fermentación es el proceso de extraer energía de la oxidación de compuestos orgánicos sin oxígeno. La ubicación de las reacciones de fermentación en el mapa central de E.coli se muestra en la Figura 26.

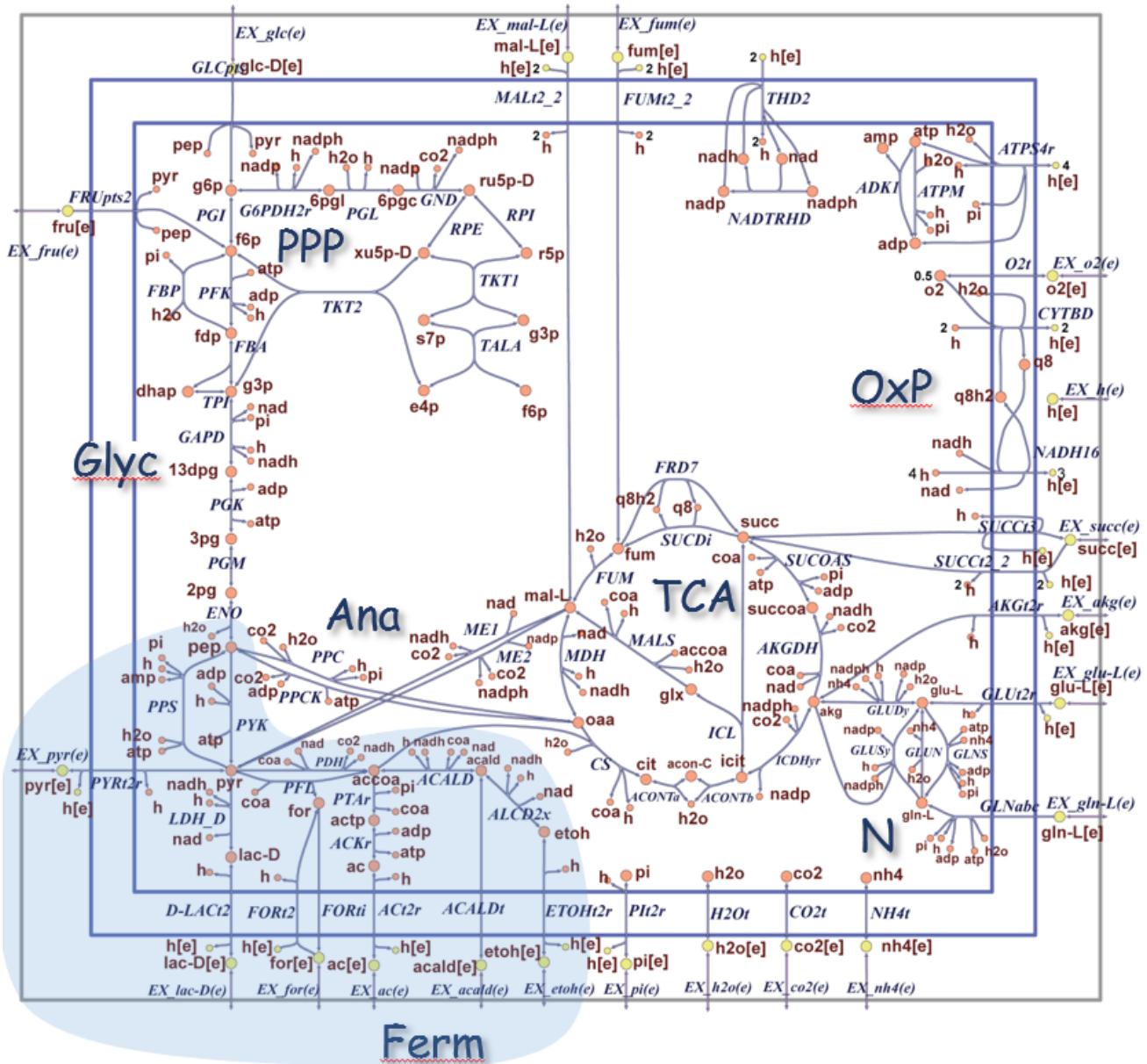


Figura 26. Reacciones de fermentación resaltadas en azul en el mapa central de E.coli [3].

Las reacciones asociadas con las vías de fermentación incluyen: [Tiempo: segundos]

```
% Establecer restricciones iniciales para la sección de metabolismo de fermentación
model = e_coli_core;
FERM_Reactions = transpose({'LDH_D', 'D_LACT2', 'PDH', 'PFL', 'FORti', 'FORt2',...
    'PTAr', 'ACKr', 'ACALD', 'ALCD2x', 'Act2r', 'ACALDt', 'ETOht2r'});
[~, FERM_rxnID] = ismember(FERM_Reactions, model.rxn);
Reaction_Names = model.rxnNames(FERM_rxnID);
Reaction_Formulas = printRxnFormula(model, FERM_Reactions, 0);
T = table(Reaction_Names, Reaction_Formulas, 'RowNames', FERM_Reactions)
```

Las reacciones, relaciones GRPA y precursores para esta sección sobre fermentación se muestran en la Figura 27 a continuación.

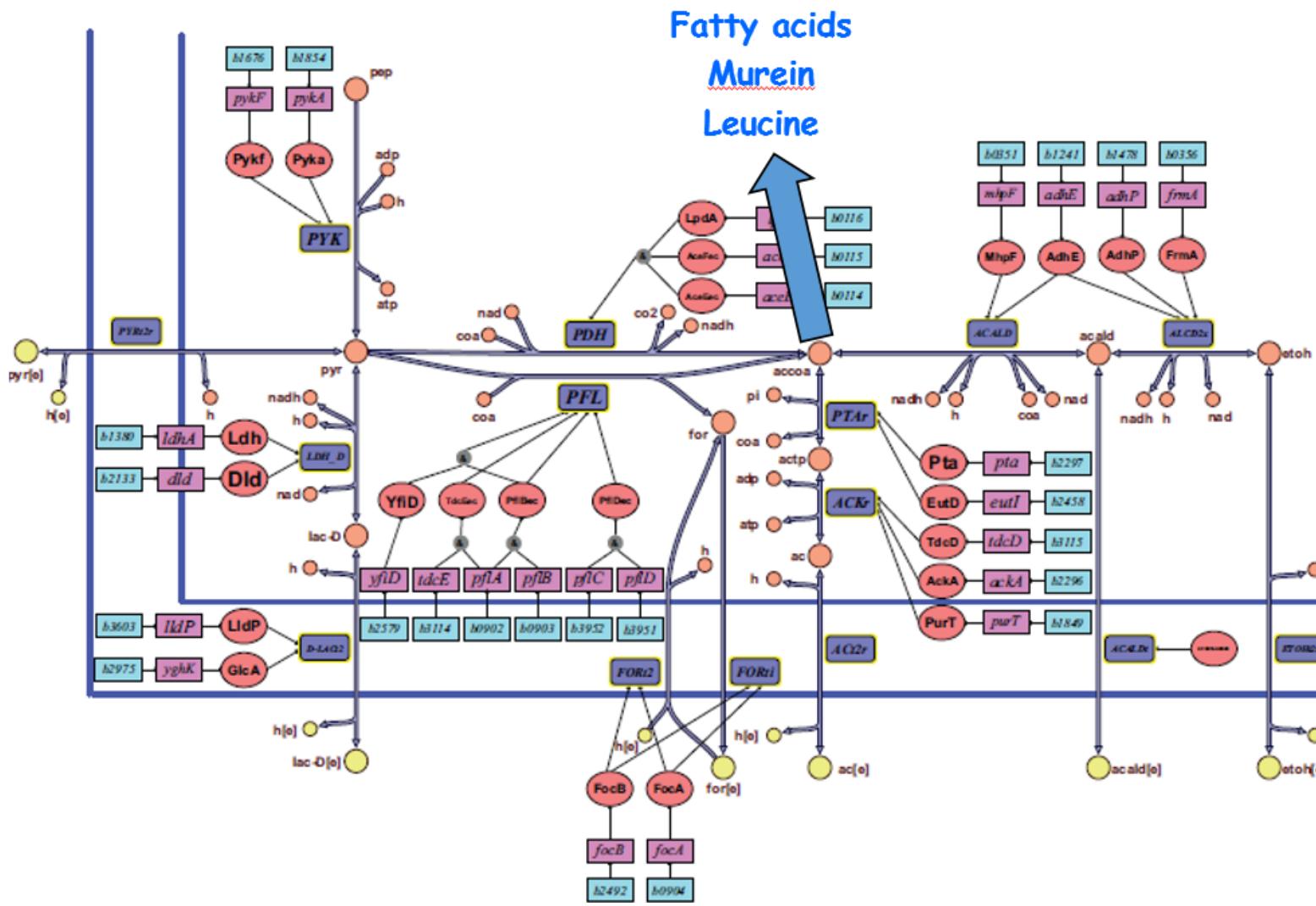


Figura 27. Reacciones, relaciones GRPA y precursores del metabolismo de la fermentación [3].

Durante la respiración aeróbica, el oxígeno se utiliza como acceptor terminal de electrones para el proceso de fosforilación oxidativa, produciendo la mayor parte de la atp[c] necesaria para la biosíntesis de las células. La respiración anaeróbica, por otro lado, se refiere a la respiración sin oxígeno molecular. En este caso, *E. coli* solo puede generar atp[c] a través de la fosforilación a nivel de sustrato, lo que reduce significativamente la cantidad de atp[c] que se puede producir por molécula de glucosa. En condiciones anaeróbicas, la glucólisis da como resultado la producción neta de 2 atp[c] por glucosa por fosforilación a nivel de sustrato. Esto se compara con el total de 17,5 atp[c] por molécula de glucosa que se puede producir para la respiración aeróbica [1]. Para mantener la energía necesaria para el funcionamiento celular durante el crecimiento anaeróbico, esto obliga a cada célula a mantener una gran magnitud de flujo a través de la ruta de la glucólisis para generar la atp[c] necesaria para cumplir con los requisitos de crecimiento de las células. Esto da como resultado una salida de gran magnitud de productos finales fermentativos (lactato (lac-D [c]), formiato (for [c]), acetato (ac [c]), acetaldehído (acald [c]) y etanol (etoh [c])) ya que no hay suficiente atp[c] para asimilar todo el carbono en biomasa. Debe señalarse que solo ~10% del sustrato de carbono se asimila efectivamente en la célula debido al bajo rendimiento energético de la fermentación.

Hay dos procesos fermentativos principales incluidos en el modelo central; fermentación homoláctica y fermentación ácida mixta. La fermentación homoláctica se refiere a la conversión de piruvato a lactato como se muestra en la parte inferior izquierda de la Figura 26 e incluye las reacciones LDH_D y D_LACt2. La fermentación ácida mixta es el proceso que convierte el pirvato en una mezcla de productos finales que incluyen lactato, acetato, succinato, formato, etanol e incluye las siguientes reacciones; PDH, PFL, FORti, FORt2, PTAr, ACKr, ACALD, ALCD2x, ACt2r, ACALDt y ETOHt2r. También debe señalarse que los productos finales de cada vía de fermentación, a excepción del acetaldehído, salen de la célula a lo largo de un gradiente de concentración y transportan un protón desde el citoplasma hacia el espacio extracelular.

Comencemos nuestra exploración del metabolismo de la fermentación determinando los bioproductos secretados producidos en condiciones anaeróbicas con una fuente de carbono de glucosa. [Tiempo: segundos]

```
model = e_coli_core;
model = changeRxnBounds(model, 'EX_glc(e)', -10, 'l');
model = changeRxnBounds(model, 'EX_o2(e)', 0, 'l'); % Anaeróbica
model = changeObjective(model, 'Biomass_Ecoli_core_w_GAM');
FBAsolution = optimizeCbModel(model, 'max', 0, 0);
printFluxVector(model, FBAsolution.x, true, true) % solo imprime flujos distintos de cero
```

Con estos resultados podemos ver que el acetato, el etanol y el formiato son los productos de fermentación mixta. La figura 12 muestra la celda en esta condición anaeróbica. Tenga en cuenta el flujo de flujo en los caminos de los productos de fermentación ácida mixta secretada. Ahora exploremos a los productores y consumidores de atp[c] en condiciones anaeróbicas con una fuente de carbono de glucosa usando "surfNet". [Tiempo: segundos]

```
surfNet(model, 'atp[c]', 0, FBAsolution.x, 1, 1)
```

Tenga en cuenta que todo el atp[c] se produce a través de la fosforilación del sustrato a través de PGK y PYK en la ruta de la glucólisis y ACKr en la ruta de fermentación que produce acetato. Ahora veamos si la mayoría del nadh[c] producido se reduce a nad[c] por las vías de fermentación. [Tiempo: segundos]

```
surfNet(model, 'nad[c]', 0, FBAsolution.x, 1, 1)
```

En este caso, podemos ver que el nadh[c] producido en la vía de la glucólisis se oxida a nad[c] en la vía del etanol (ACALD, ALCD2x) o se convierte en nadph[c] para la biosíntesis celular a través de las reacciones de gestión de la energía (THD2).

Ahora vamos a explorar el impacto del piruvato como fuente de carbono en un ambiente anaeróbico. [Tiempo: segundos]

```
% Parámetros clave para la sección de fermentación
model = e_coli_core;
model = changeRxnBounds(model, 'EX_glc(e)', -0, 'l');
model = changeRxnBounds(model, 'EX_pyr(e)', -20, 'l');
model = changeRxnBounds(model, 'EX_o2(e)', -0, 'l'); % Establecer en -30 para aeróbicos
model = changeObjective(model, 'Biomass_Ecoli_core_w_GAM');

% Realiza FBA con Biomass_Ecoli_core_N(w/GAM)_Nmet2 como objetivo,
```

```
FBAsolution = optimizeCbModel(model, 'max', 0, 0);
```

```
% Importe el mapa central de E.coli y ajuste los parámetros  
map=readCbMap('ecoli_core_map');  
options.zeroFluxWidth = 0.1;  
options.rxnDirMultiplier = 10;  
drawFlux(map, model, FBAsolution.x, options);
```

A continuación se muestra una captura de pantalla de ese mapa (Figura 28).

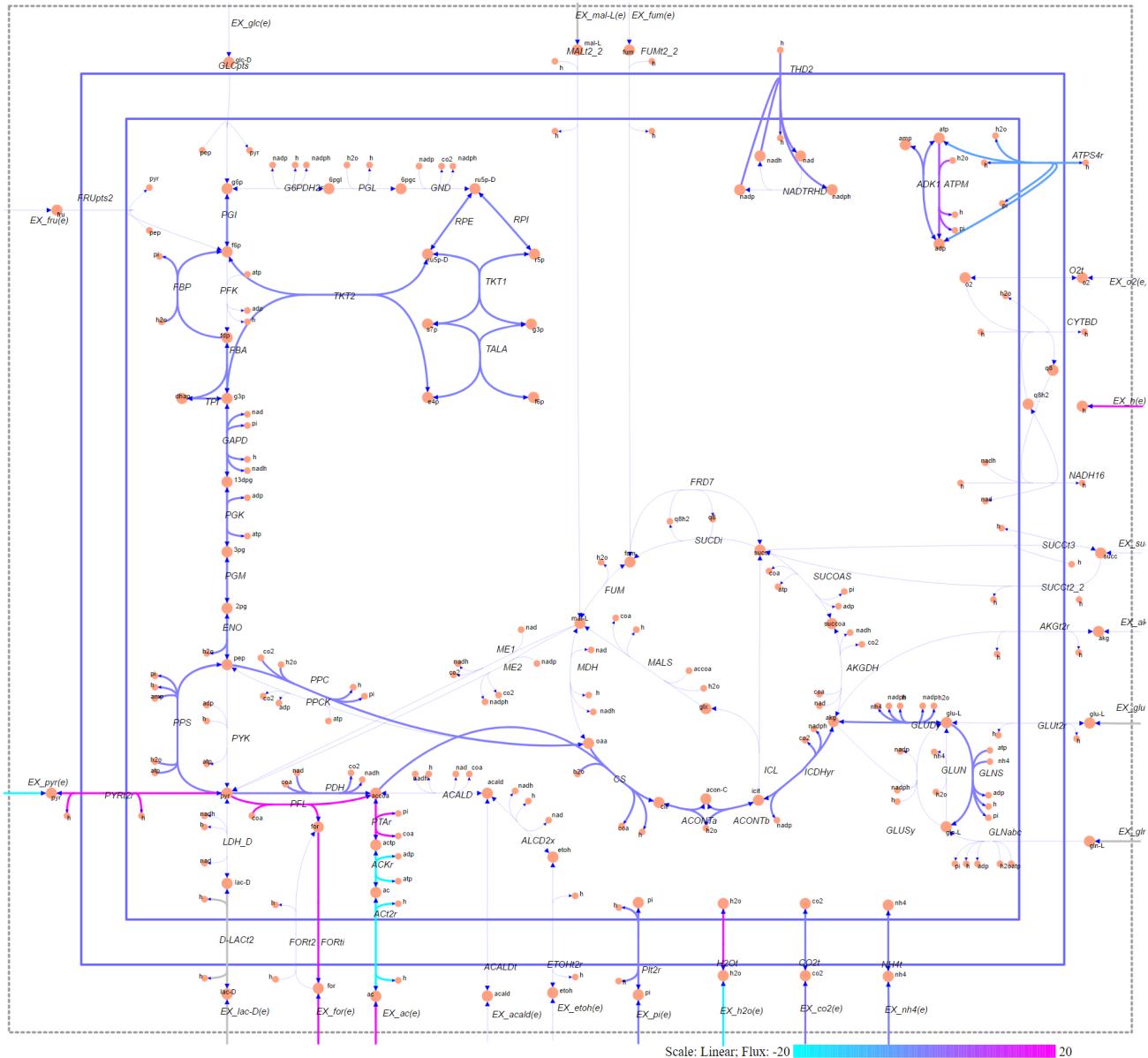


Figura 28. Captura de pantalla de la red central con piruato como fuente de carbono en un entorno anaeróbico.

En este mapa podemos ver que a medida que el piruvato ingresa a la célula, parte del flujo se dirige hacia arriba a través de la ruta de la glucólisis (gluconeogénesis) hacia la ruta de las pentosas fosfato para crear los precursores de 4, 5 y 7 carbonos. Parte del flujo también se dirige al ciclo de TCA para alimentar el

metabolismo del nitrógeno, y el flujo restante se dirige a través de las vías de fermentación para producir formiato, acetato y algo de atp[c] a través de la fosforilación del sustrato.

Los valores de flujo para esta condición se calculan a continuación. [Tiempo: segundos]

```
printFluxVector(model,FBAsolution.x,true) % solo imprime reacciones distintas de cero
```

Preguntas

¿Qué reacciones componen los modelos centrales de fosforilación oxidativa y cadena de transferencia de electrones?

¿Qué metabolitos se crean en los modelos centrales de fosforilación oxidativa y cadena de transferencia de electrones?

¿Qué reacciones constituyen las vías de fermentación?

¿Qué metabolitos se crean en las vías de fermentación?

4.G. Metabolismo del Nitrógeno

El subsistema final que se discutirá en este tutorial es el metabolismo del nitrógeno. El nitrógeno ingresa a la célula como ion amonio ($\text{nh}_4[\text{c}]$), o como un resto dentro de la glutamina ($\text{glu-L}[\text{c}]$) o glutamato ($\text{gln-L}[\text{c}]$). El modelo central de E.coli cubre las vías entre el 2-oxoglutarato, el L-glutamato y la L-glutamina. La ubicación de las reacciones del metabolismo del nitrógeno en el mapa central de E.coli se muestra en la Figura 29.

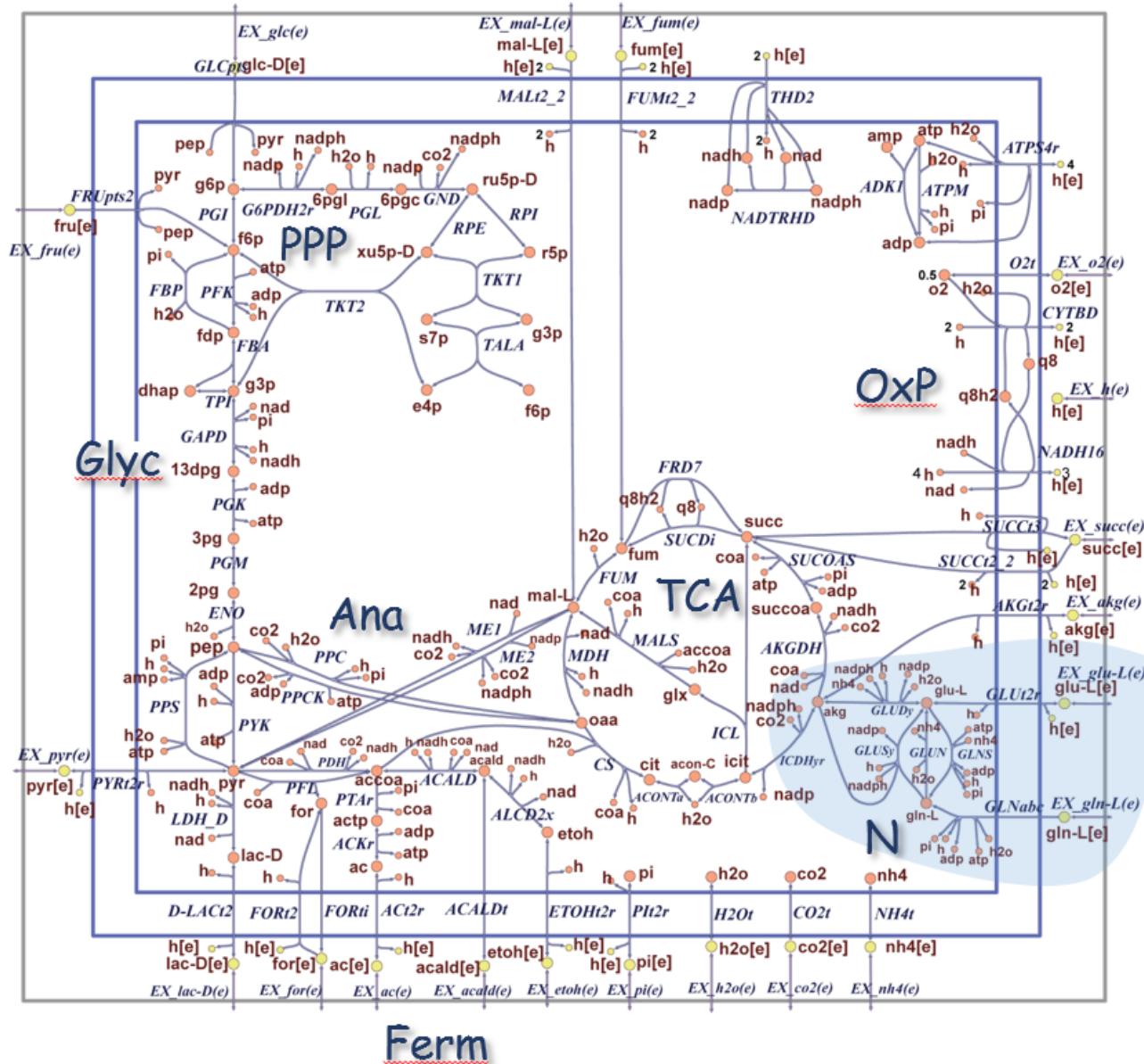


Figura 29. Reacciones del metabolismo del nitrógeno resaltadas en azul en el mapa central de *E.coli* [3].

Las reacciones del metabolismo del nitrógeno incluyen: [Tiempo: segundos]

```
% Establecer restricciones iniciales para la sección de metabolismo del nitrógeno
model = e_coli_core;
NIT_Reactions = transpose({'GLNabc', 'GLU2r', 'GLUDy', 'GLNS', 'GLUSy', 'GLUN'});
[tmp,NIT_rxnID] = ismember(NIT_Reactions,model.rxnns);
Reaction_Names = model.rxnNames(NIT_rxnID);
Reaction_Formulas = printRxnFormula(model,NIT_Reactions,0);
T = table(Reaction_Names,Reaction_Formulas,'RowNames',NIT_Reactions)
```

Las reacciones, las relaciones GRPA y los precursores de esta sección sobre el metabolismo del nitrógeno se muestran en la Figura 30 a continuación.

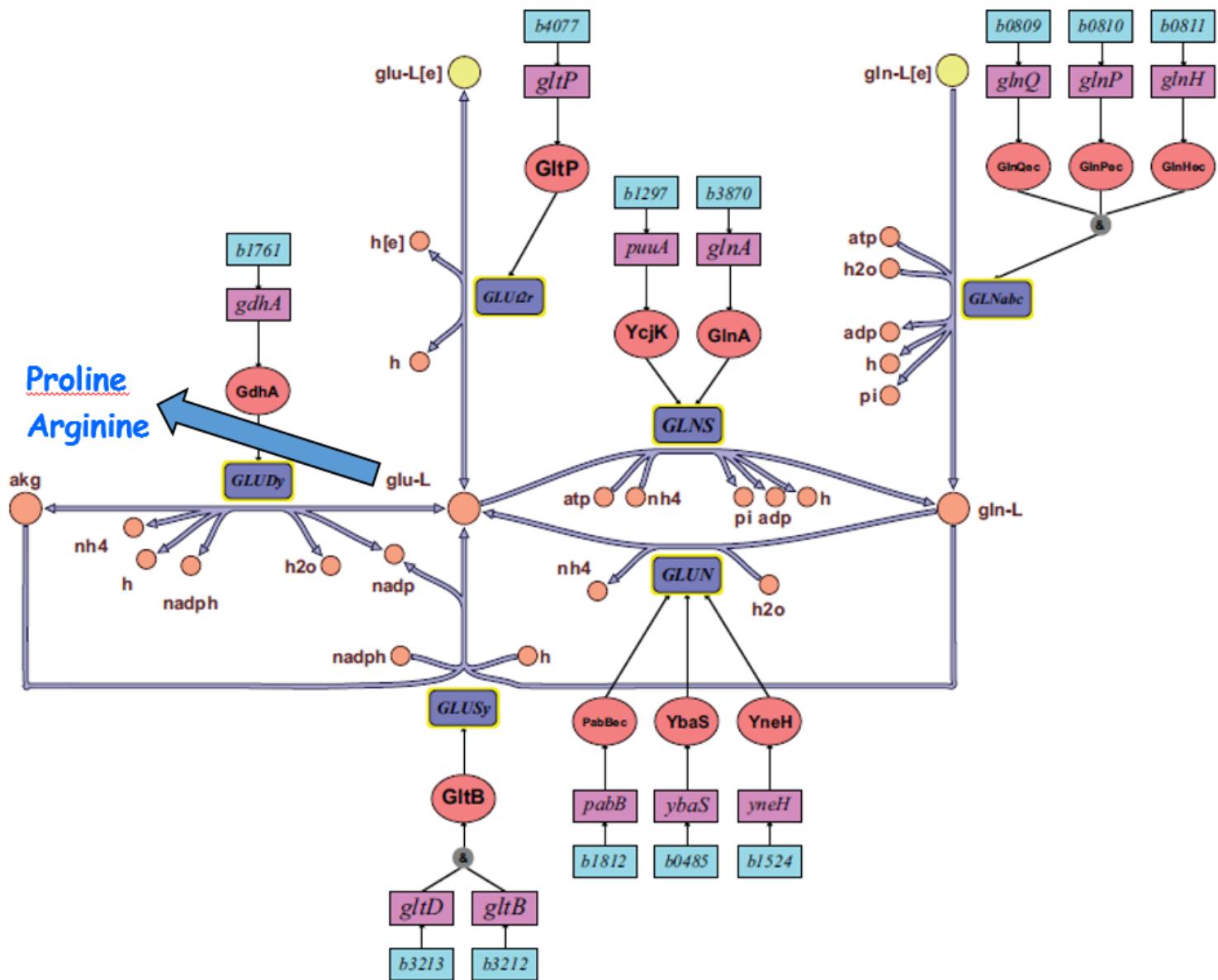


Figura 30. Reacciones Relaciones GRPA y precursores asociados con el metabolismo del nitrógeno [3].

Tenga en cuenta que los precursores soportados por el metabolismo del nitrógeno son la prolina y la arginina.

En este modelo simple, una de las fuentes potenciales de nitrógeno es el amonio que se transporta al interior de la célula a través de un transportador (NH_4^+). Dentro de la célula solo hay dos reacciones (GLNS, GLUDy) que también pueden asimilar el nitrógeno necesario en la célula. Esto se puede ver usando la función "surfNet".

[Tiempo: segundos]

```
surfNet(model, 'nh4[c]', 0, FBAsolution.x, 1, 1)
```

El nitrógeno también puede ingresar a la célula a través de la absorción de glutamato o glutamina. Como recordatorio, la configuración predeterminada para el modelo central no permite que ningún aminoácido ingrese al modelo central. Para cambiar esto, necesitaría usar la función de caja de herramientas COBRA "changeRxnBounds" para permitir la capacidad de absorción de glutamato o glutamina.

Tanto el glutamato como la glutamina pueden servir como fuentes de carbono y nitrógeno en condiciones aeróbicas. Un ejemplo de glutamato que sirve como fuente de carbono y nitrógeno se muestra en el código COBRA y en la Figura 31 a continuación. [Tiempo: segundos]

```
% Parámetros clave para la sección de fermentación
model = e_coli_core;
model = changeRxnBounds(model, 'EX_glc(e)', -0, 'l');
model = changeRxnBounds(model, 'EX_glu_L(e)', -20, 'l');
model = changeRxnBounds(model, 'EX_nh4(e)', -0, 'l');
model = changeRxnBounds(model, 'EX_o2(e)', -30, 'l'); % Establecer en -30 para aeróbicos
model = changeObjective(model, 'Biomass_Ecoli_core_w_GAM');

% Realiza FBA con Biomass_Ecoli_core_N(w/GAM)_Nmet2 como objetivo,
FBAsolution = optimizeCbModel(model, 'max', 0, 0);

% Importa el mapa central de E.coli y ajuste los parámetros
map=readCbMap('ecoli_core_map');
options.zeroFluxWidth = 0.1;
options.rxnDirMultiplier = 10;
drawFlux(map, model, FBAsolution.x, options);
```

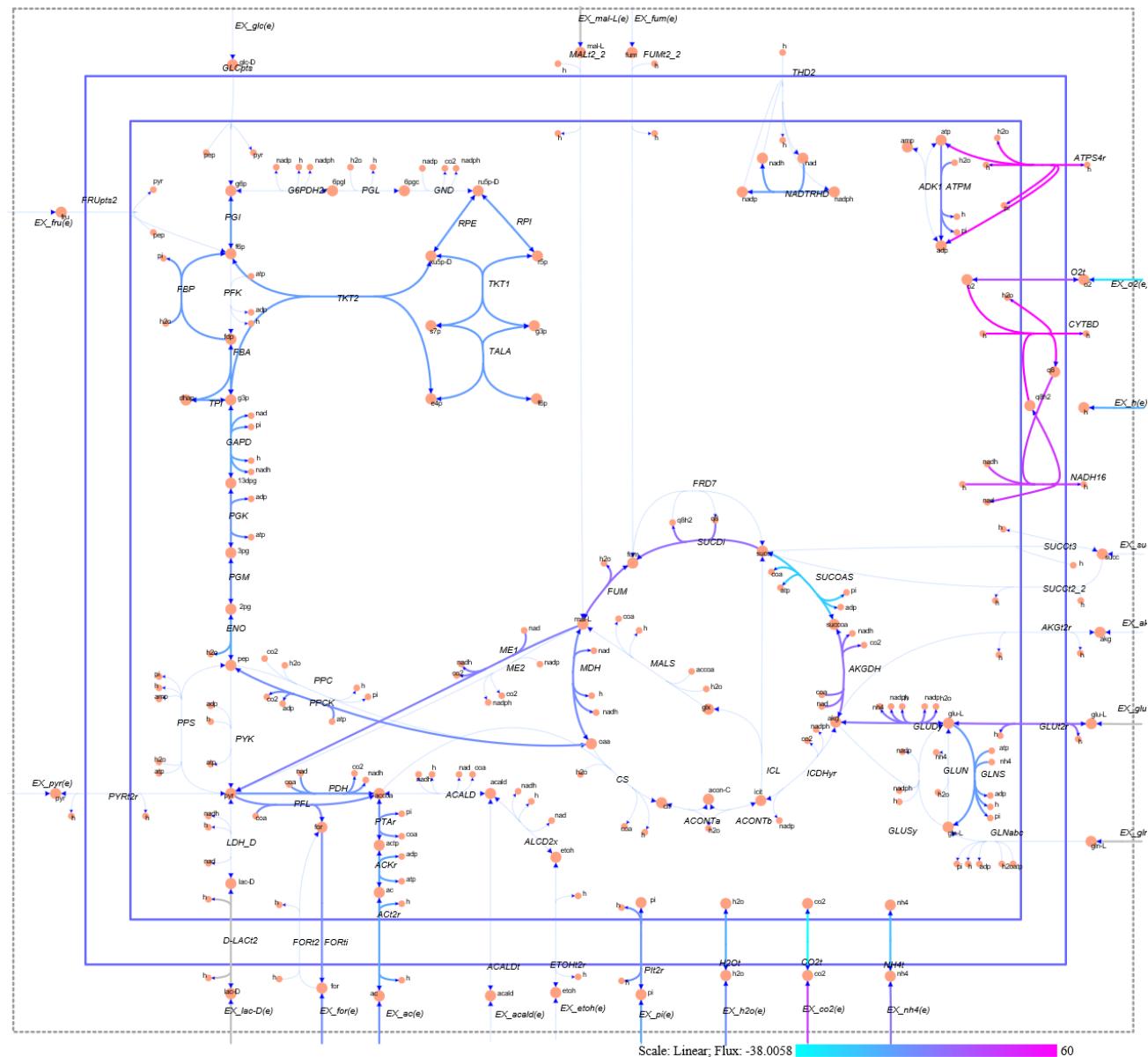


Figura 31. Una captura de pantalla del glutamato que sirve como fuente de carbono y nitrógeno.

En esta figura, se puede ver que el glutamato ingresa a la celda por la parte inferior derecha. Pasa a través del metabolismo del nitrógeno produciendo 2-oxoglutarato (akg[c]) que luego alimenta la parte superior del ciclo TCA. Las reacciones anapleuróticas y la gluconeogénesis sustentan el flujo necesario para crear los precursores de 4, 5 y 7 carbonos. Parte del flujo del ciclo TCA también se dirige a los precursores de la vía de fermentación, además de secretar formiato y acetato.

Los flujos para este ejemplo se muestran a continuación: [Tiempo: segundos]

```
printFluxVector(model,FBAsolution.x,true) % solo imprime reacciones distintas de cero
```

Dado que la fuente normal de nadh[c] de la vía de la glucólisis no está disponible durante la gluconeogénesis, exploremos dónde se produce y consume el nadh[c]. [Tiempo: segundos]

```
surfNet(model, 'nadph[c]', 0, FBAsolution.x, 1, 1)
```

Podemos ver aquí que hay muchas fuentes de producción de nadh[c] que incluyen: AKGDH y MDH de las vías reductoras del ciclo TCA, la reacción anapleurótica ME1, PDH del metabolismo de fermentación e incluso con las reacciones de gestión de energía donde el exceso de nadph [c] se convierte en nadh[c]. Los consumidores son principalmente NADH16 donde proporciona el poder reductor necesario para la cadena de transporte de electrones y GAPD que se requiere para el funcionamiento de la gluconeogénesis.

Preguntas

¿Cuáles son los precursores biosintéticos creados por el metabolismo del nitrógeno?

¿Qué reacciones componen el metabolismo del nitrógeno?

¿Qué metabolitos se crean en el metabolismo del nitrógeno?

5. Preguntas reflexivas

¿Cuál es el propósito de la función "changeCobraSolver"?

¿Cuál es el propósito de la función "readCbMap"?

¿Qué son los ID de genes?

¿Cuál es el propósito de la función "printLabeledData"?

¿Cuál es el propósito de la función "findRxnsFromGenes"?

¿Describa las capacidades de la función "surfNet"?

¿Cuáles son las restricciones del modelo predeterminado para el modelo central de E.coli?

¿Cuál es el propósito de la función "findRxnIDs"?

¿Cuál es el propósito de la función objetivo?

¿Cuál es el propósito de la reacción de la biomasa?

¿Describa las capacidades de la función "printFluxVector"?

¿Cuáles son las unidades de flujo en los modelos COBRA?

¿Cuál es el propósito de la función "computeFluxSplits"?

¿Describa las capacidades de la función "optimizeCbModel"?

¿Cuál es el propósito de la función "changeRxnBounds"?

¿Cuáles son los resultados producidos por la función "optimizeCbModel"?

Encuentre el máximo de $atp[c]$, $nadh[c]$ y $nadph[c]$ que puede producir el modelo central de E.coli en un entorno aeróbico suponiendo una tasa fija de consumo de glucosa de -1. Sugerencia: para $atp[c]$ puede configurar ATPM como la función objetivo, pero para $nadh[c]$ y $nadph[c]$ deberá crear funciones de demanda separadas. Véase el capítulo 19 del libro de Palsson [1].

Compare la diferencia en la tasa de flujo aeróbico frente a anaeróbico a través de la vía de la glucólisis estableciendo la función de biomasa en una tasa fija de 0,8739. ¿Por qué el flujo anaeróbico es mucho mayor que el flujo aeróbico? Sugerencia: establezca la función objetivo en la reacción de intercambio de glucosa.

6. Conclusión

Esto concluye el tutorial sobre el modelo central de E.coli. Ha intentado mostrar cómo se puede utilizar la caja de herramientas COBRA para explorar la reconstrucción de una red metabólica a escala del genoma utilizando el modelo central como ejemplo. ¡Ahora, con este conjunto de habilidades para principiantes, puede comenzar a explorar las reconstrucciones de redes más grandes y precisas!

Referencias

1. Palsson, B. (2015). Systems biology : constraint-based reconstruction and analysis. Cambridge, United Kingdom, Cambridge University Press.
2. Palsson, B. (2006). Systems biology : properties of reconstructed networks. Cambridge ; New York, Cambridge University Press.
3. Orth, Fleming, and Palsson (2010), *EcoSal Chapter 10.2.1 - Reconstruction and Use of Microbial Metabolic Networks: the Core Escherichia coli Metabolic Model as an Educational Guide* - <http://www.asmscience.org/content/journal/ecosalplus/10.1128/ecosalplus.10.2.1#backarticlefulltext>
4. Becker, S. et al., "[Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: The COBRA Toolbox](#)", *Nat. Protoc* **2**, 727-738 (2007).
5. Schellenberger J, Que R, Fleming RMT, Thiele I, Orth JD, Feist AM, Zielinski DC, Bordbar A, Lewis NE, Rahmanian S et al., [Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0](#) *Nat. Protoc* **6**(9):1290-307 (2011).
6. Feist, A. M., Herrgard, M. J., Thiele, I., Reed , J . L., and Palsson, B. O., (2009). Reconstruction of biochemical networks in microorganisms. *Nat. Rev Microbiol* **7** : 129-143.
7. Price, N. D., Papin, J . A., Schilling, C. H. , and Palsson, B. O., (2003) Genome-scale microbial *in silico* models: the constraints-based approach. *Trends Biotechnol* **21**:162-169.
8. Orth, J. D., I. Thiele, et al. (2010). "What is flux balance analysis?" *Nature biotechnology* **28**(3): 245-248.
9. Schellenberger, J., Park, J. O., Conrad, T. M., and Palsson, B. O., (2010) "[BiGG: a Biochemical Genetic and Genomic knowledgebase of large scale metabolic reconstructions](#)", *BMC Bioinformatics*, **11**:213.
10. King, Z.A., Lu, J., Draeger, A., Miller, P., Federowicz, S., Lerman, J.A., Palsson, B.O., Lewis, N.E., (2015) "[BiGG models: A platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models](#)", *Nucleic Acids Research*.
11. Schaechter, M., Ingraham, J. L., Neidhardt, F. C. (2006), "Microbe", ASM Press, Washington, D. C.
12. Edwards, J. S. and B. O. Palsson (2000). "Robustness analysis of the Escherichia coli metabolic network." *Biotechnology progress* **16**(6): 927-939.