

Modellazione formale applicata ad analisi *in silico* di reti metaboliche

Relatore:

Chiar.mo Prof. Mauro Magnani

Correlatori:

Chiar.mo Prof. Marco Bernardo

Dott.ssa Noemi Bigini

Dott.ssa Francesca Pierigè

Candidato:

Luca Salvatore Lorello

Anno Accademico 2017–2018



1506
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI URBINO
CARLO BO

Piano della presentazione

- 1 Introduzione
- 2 Deficienza della guanidinoacetato metiltransferasi (GAMT)
- 3 Analisi formale della deficienza GAMT
- 4 Conclusione

Introduzione

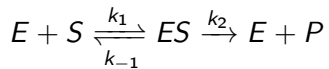
- Le tecniche *in silico* sono un'integrazione promettente alla sperimentazione *in vitro*, a causa di costi elevati e potenziale scarsità di informazioni preliminari
- I **metodi formali** sono efficaci per l'analisi di sistemi complessi e permettono di ottenere informazioni quantitative, prestazionali e temporali senza errori
- Necessario un approccio integrato di tecniche simulative e basate su verifica perché la prima presenta errori, mentre la seconda risulta spesso intrattabile
- Caso di studio: trattamento a base di RBC ingegnerizzati per la deficienza GAMT

Introduzione

- Le tecniche *in silico* sono un'integrazione promettente alla sperimentazione *in vitro*, a causa di costi elevati e potenziale scarsità di informazioni preliminari
- I **metodi formali** sono efficaci per l'analisi di sistemi complessi e permettono di ottenere informazioni quantitative, prestazionali e temporali senza errori
- Necessario un approccio integrato di tecniche simulative e basate su verifica perché la prima presenta errori, mentre la seconda risulta spesso intrattabile
- Caso di studio: trattamento a base di RBC ingegnerizzati per la **deficienza GAMT**

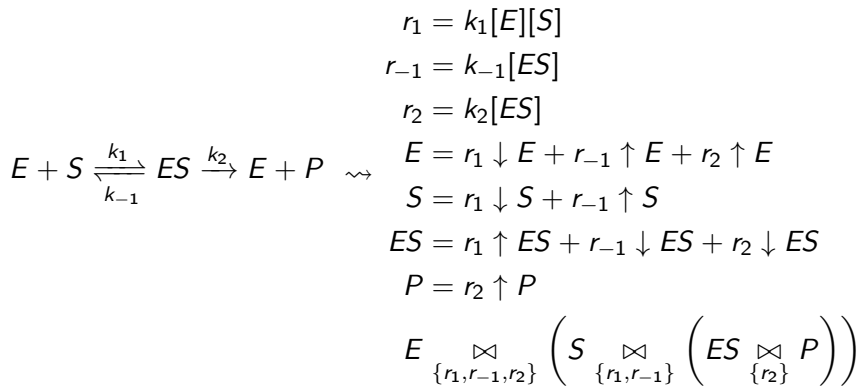
Esempio

Input



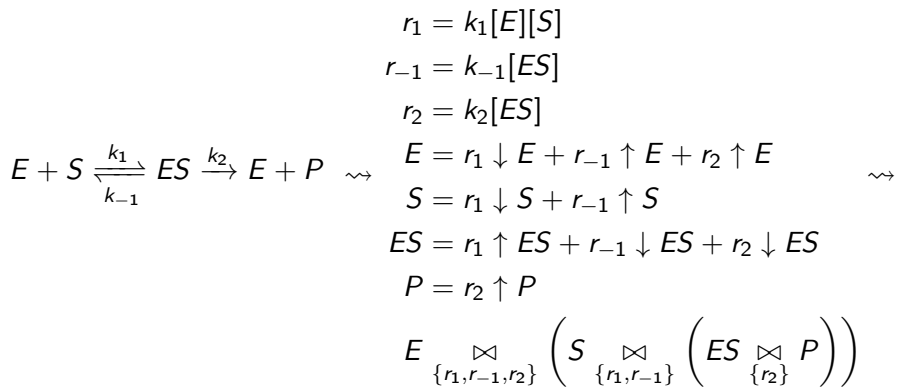
Esempio

Input



Esempio

Input



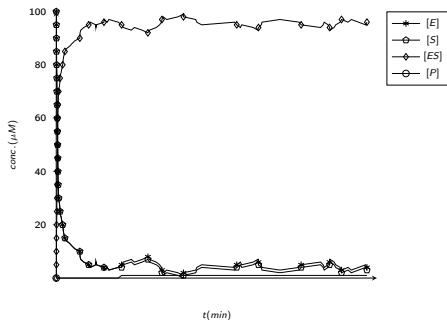
\rightsquigarrow

```
Type:      CTMC
States:    5151 (1 initial)
Transitions: 15151
```

Esempio

Output

Simulazioni



Verifiche formali

$$\mathbb{P}_{=?}[\mathcal{F}^{\leq 60}[P] > 50]$$

“Qual è la probabilità che la concentrazione di P sia maggiore di $50\mu M$ entro 60 minuti?”

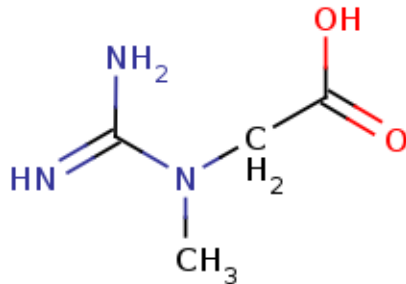
Esito: 13.1% (calcolato in 134 secondi)

Deficienza della guanidinoacetato metiltransferasi (GAMT)

Creatina

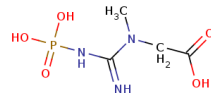
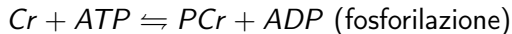
Creatina (Cr)

- Composto azotato usato da tessuti ad elevato dispendio energetico come intermedio e tampone energetico
- 6-50 μM nel siero, 11-244 mM nelle urine, mantenuti grazie a **sintesi endogena**, **assunzione con la dieta** e **degradazione**
- Alterazioni patologiche dei livelli causano modifica dell'espressione dei geni relativi al metabolismo energetico, ma possono essere bilanciate con la dieta

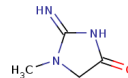
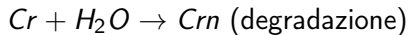


Deficienza della guanidinoacetato metiltransferasi (GAMT)

Creatina



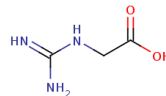
Fosfocreatina (PCr)



Creatinina (Crn)

Deficienza della guanidinoacetato metiltransferasi (GAMT)

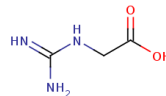
Sintesi della creatina



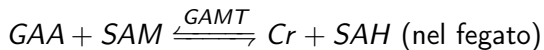
Acido guanidinoacetico (GAA)

Deficienza della guanidinoacetato metiltransferasi (GAMT)

Sintesi della creatina



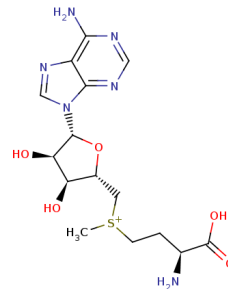
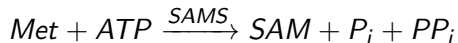
Acido guanidinoacetico (GAA)



S-adenosil omocisteina (SAH)

Deficienza della guanidinoacetato metiltransferasi (GAMT)

Sintesi dell'S-adenosil metionina



S-adenosil metionina (SAM)

Deficienza della guanidinoacetato metiltransferasi (GAMT)

Generalità

I difetti metabolici della creatina possono colpire gli enzimi AGAT, GAMT e di trasporto (SLC6A8 e OCT3)

La deficienza GAMT è la più grave perché il **GAA si accumula**, non essendo utilizzato da altre vie

- Bassi livelli di Cr causano deficit cognitivi e di sviluppo, e la sovraespressione dei geni mitocondriali per i *Complessi I, III e V*
- Elevati livelli di GAA sono neurotossici per antagonismo con il recettore $GABA_A$

Deficienza della guanidinoacetato metiltransferasi (GAMT)

Sintomi

Eccesso di GAA

- Epilessia
- Iperattività di globo pallido, campo H di Forel, sostanza nera e corteccia
- Disturbi extrapiramidali

Carenza di Cr

- Ritardo comportamentale
- Disabilità intellettuale (domini del linguaggio e del comportamento)

In pazienti gravemente deficienti vengono compromesse le funzionalità intellettuali e l'indipendenza in età adulta

Deficienza della guanidinoacetato metiltransferasi (GAMT)

Diagnosi

- Sequenziamento gene *gamt* (19p13.3)
- Tomografia a risonanza magnetica (segnale relativo al globo pallido elevato)
- Spettroscopia a risonanza magnetica 1H su urine e liquor (picchi relativi a Cr e Crn ridotti, picco relativo a GAA elevato)
- Spettroscopia a risonanza magnetica ^{31}P (picco relativo a PCr basso, presenza di picco relativo a PGAA)
- Reazione di Sakaguchi (sul campione si formano macchie rosso-arancio per reazione con GAA)

Gli esami di screening sono poco diffusi e la patologia viene tipicamente diagnosticata solo dopo la manifestazione dei sintomi

Deficienza della guanidinoacetato metiltransferasi (GAMT)

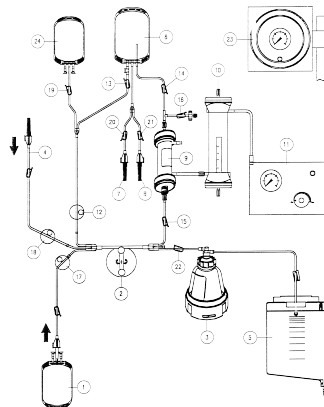
Terapie

- Integrazione creatina per via orale (durata del trattamento limitata per impedire sottoespressione di SLC6A8) nelle stesse dosi previste per i difetti del ciclo dell'urea (300-800 *mg/kg/die*)
- Limitazione della sintesi di guanidinoacetato tramite carenza di arginina (diete ipoproteiche), integrazione di ornitina (spostamento dell'equilibrio verso i reagenti)

Durante la terapia, si osserva il recupero dei livelli fisiologici di creatina, ma i danni da guanidinoacetato sul SNC permangono se il trattamento non è tempestivo (prenatale o entro i due mesi)

Red Cell Loader

Apparato



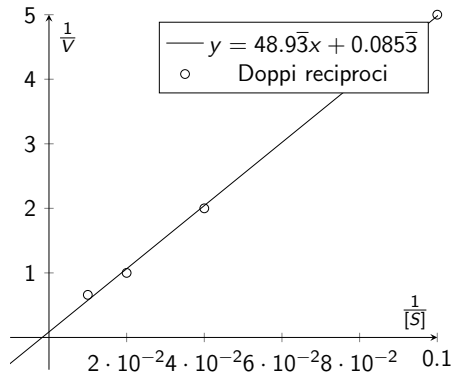
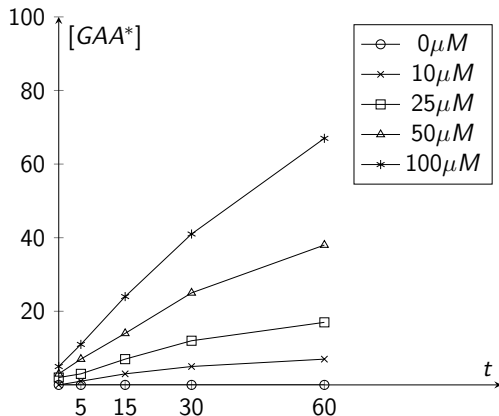
Red Cell Loader

Protocollo sperimentale

- 1 Incapsulamento enzimi e substrati negli RBC tramite RCL
- 2 Verifica delle quantità incapsulate tramite cromatografia liquida ad alte prestazioni
- 3 Incubazione con metaboliti esterni (tra cui GAA marcato con ^{13}C), HEPES (tampone) e PIGPA (conservante)
- 4 Analisi elettrospray di GAA e Cr marcate, dopo blocco metabolico per essiccazione su cartoncino

Red Cell Loader

Esperimenti *in vitro*: uptake del guanidinoacetato da parte degli RBC ingegnerizzati



Red Cell Loader

Esperimenti *in vitro*: sintesi di creatina da parte degli RBC ingegnerizzati

RBC non ingegnerizzati

Tempo (ore)	[GAA] (μM)	[Cr] (μM)
0	0.13	59.80
1	0.15	72.20
2	0.16	75.25
3	0.20	75.86
20	0.27	76.31

250 $\mu g/ml$ di GAMT e 25 μM di SAM

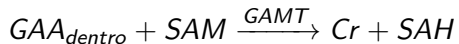
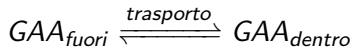
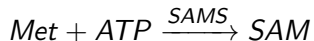
Tempo (ore)	[GAA] (μM)	[Cr] (μM)
0	2.61	66.01
1	3.10	61.90
2	4.62	63.37
3	5.11	67.50
20	5.26	59.31

250 $\mu g/ml$ di GAMT e 125 μM di SAM

Tempo (ore)	[GAA] (μM)	[Cr] (μM)
0	7.32	66.32
1	10.52	64.55
2	13.87	65.87
3	12.18	61.58
20	15.13	59.88

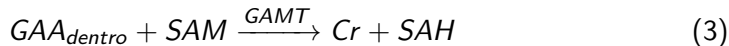
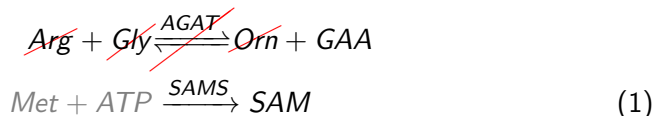
Modellazione formale

Dati preliminari



Modellazione formale

Dati preliminari



(1) e (3) hanno cinetica:

$$V(A, B) = \frac{\frac{V_{max}}{K_{MA} + [A]} \cdot [B]}{\frac{K_i \cdot K_{MA} + K_{MB} \cdot [A]}{K_{MA} + [A]} + [B]}$$

(2) ha cinetica:

$$V(X_{fuori}, X_{dentro}) = V_{uptake} \cdot ([X]_{fuori} - [X]_{dentro})$$

Modellazione formale

Modello Bio-PEPA: processi

$$SAM = sams \uparrow SAM + gamt \downarrow SAM$$

$$SAH = gamt \uparrow SAH$$

$$GAA_INT = uptake \uparrow GAA_INT + gamt \downarrow GAA_INT$$

$$GAA_EXT = uptake \downarrow GAA_EXT$$

$$CR = gamt \uparrow CR$$

$$(SAM \underset{gamt}{\bowtie} SAH \underset{gamt}{\bowtie} GAA_INT \underset{gamt}{\bowtie} CR) \underset{uptake}{\bowtie} GAA_EXT$$

Modellazione formale

Modello Bio-PEPA: parametri

Validazione uptake guanidinoacetato

- GAA esterno: 10, 25, 50, 100 μM
- Nessun'altra specie chimica
- Solo uptake (0.02 $\mu M/min$)

Validazione dosaggio creatina

- GAA esterno: 100 μM
- SAM: 3.5 (valore fisiologico), 10, 50 μM
- GAMT assente (controllo) e circa 0.66 mg/ml (33 $\mu M/min$)
- SAMS nativa (0.033 $\mu M/min$)

Previsione nuovi esperimenti

- GAA esterno: 50 μM
- SAM: 3.5 μM
- 0.3 mg/ml di GAMT (15 $\mu M/min$)
- SAMS nativa (controllo) e di *E. coli* (400 $\mu M/min/mg$): 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 mg

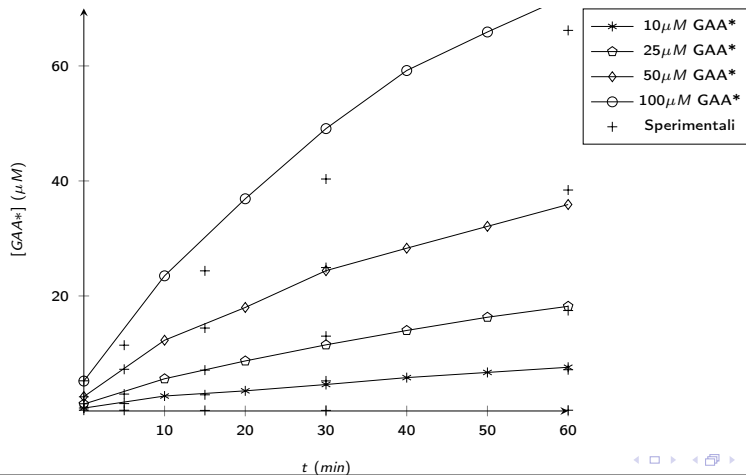
Modellazione formale

Modelli PRISM

```
Building model...  
Computing reachable states...  
Reachability (BFS): 2125 iterations in 2049.46 seconds (average 0.964450, setup 0.00)  
Time for model construction: 9922.264 seconds.  
Warning: Deadlocks detected and fixed in 1 states  
Type:          CTMC  
States:        42156649 (1 initial)  
Transitions:   125726277  
Rate matrix: 1330327117 nodes (157054 terminal), 125726277 minterns, vars: 50r/50c
```

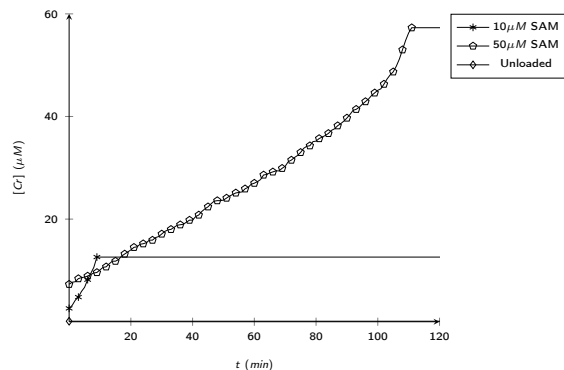
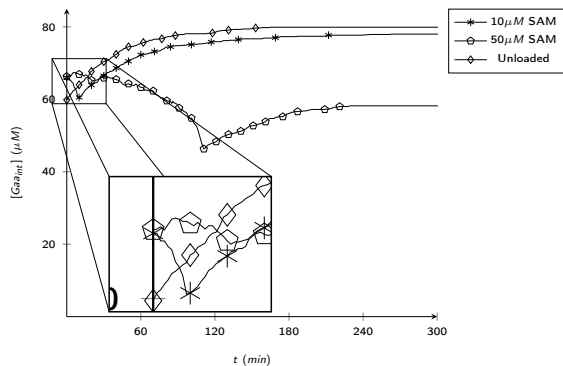
Analisi simulativa

Uptake



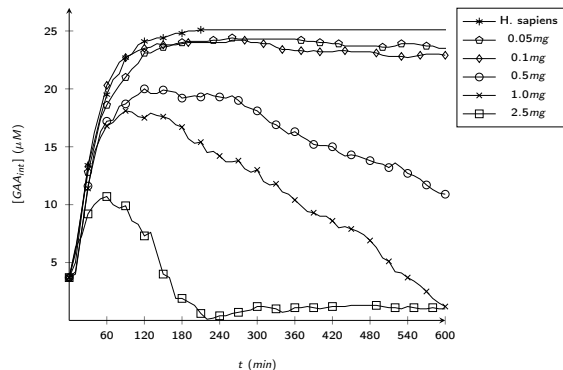
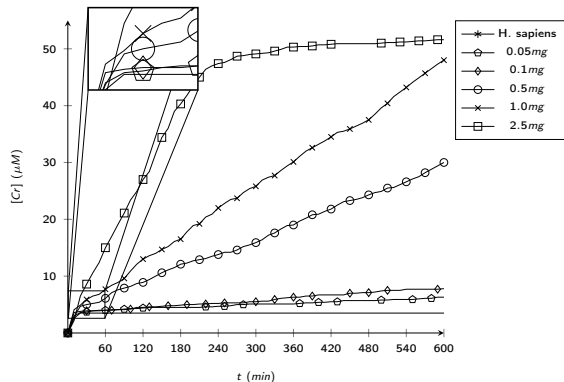
Analisi simulativa

Dosaggio



Analisi simulativa

Nuovi esperimenti



Verifica formale

Nuovi esperimenti

Proprietà	Esito	Tempo impiegato
$\mathbb{P}_{=?}[\mathcal{F}^{\leq 600min} \text{_SAM_at_maximum}]$	0.99999	67152.519 secondi
$\mathbb{P}_{=?}[\mathcal{F}^{[600min, 600min]} \text{_GAA_INT_at_maximum}]$	0	65071.259 secondi
$\mathbb{R}_{\{ \text{_UM_SAM} \}}{=?}[\mathcal{I} = 600min]$	58.49219 μM	65468.829 secondi
$\mathbb{R}_{\{ \text{_UM_SAH} \}}{=?}[\mathcal{I} = 600min]$	34.57216 μM	66046.642 secondi
$\mathbb{R}_{\{ \text{_UM_GAA_INT} \}}{=?}[\mathcal{I} = 600min]$	9.61583 μM	65381.08 secondi
$\mathbb{R}_{\{ \text{_UM_GAA_EXT} \}}{=?}[\mathcal{I} = 600min]$	10.812000 μM	65364.411 secondi
$\mathbb{R}_{\{ \text{_UM_CR} \}}{=?}[\mathcal{I} = 600min]$	33.27216 μM	65343.736 secondi
$\mathbb{R}_{\{ \text{_sams} \}}{=?}[\mathcal{C} \leq 600min]$	882.566 (simulazione)	N/A
$\mathbb{R}_{\{ \text{_gamt} \}}{=?}[\mathcal{C} \leq 600min]$	332.971 (simulazione)	N/A
$\mathbb{R}_{\{ \text{_uptake} \}}{=?}[\mathcal{C} \leq 600min]$	392.443 (simulazione)	N/A
$\mathbb{P}_{=?}[\mathcal{FG_SAM} \leq 10\mu M]$	0	292.23 secondi

Conclusioni

Pro e contro

Analisi simulativa

- + ampia diffusione
- + rapido (ma dipende dalla durata della simulazione)
- + richiede poche risorse
- non esaustivo
- accumula errori
- necessaria la media di più simulazioni

Model checking

- + esaustivo
- + esente da errori di approssimazione
- + indipendente dai limiti temporali imposti
- difficile da utilizzare
- lento e computazionalmente complesso
- avido di risorse

Conclusioni

Sviluppi futuri

- 1 Verifica *in vitro* della fedeltà delle analisi *in silico*
- 2 Aggiunta di interazioni complesse *in vivo*
- 3 Model checking di aspetti che emergeranno eventualmente da nuovi esperimenti
- 4 Semplificazione del modello per verificare altre proprietà (e.g.
 $\mathbb{P}_{=?}[\mathcal{G}(_SAM = 0 \rightarrow \mathcal{F}^{\leq T} _SAM > soglia)], \mathbb{P}_{=?}[\mathcal{FG}^{\leq T} _GAA_INT > soglia])$