



https://github.com/SLFM23/BiologiaDeSistemas_Grupo1

Parte I – Implementation of FBA problem

Consider the *iML1515* stoichiometric model of *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 in SBML format (<http://bigg.ucsd.edu/models/iML1515>).

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

Através da simulação FBA recorrendo ao Mewpy package obtivemos um fluxo de produção nativa do composto atribuído (lactato) de 0 mmol/gDW/h (Figura 1).

2. What are the maximum compound production capabilities?

Mais uma vez recorrendo ao Mewpy package foi possível obter um valor de produção máxima do D-lactato de 12.256000 mmol/gDW/h (Figura2).

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

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

Recorrendo ao package Mewpy, e por razões de limitações computacionais, foram apenas processadas 20 deleções cada uma com apenas uma modificação através da formulação de um problema de otimização de deleção de genes, em inglês (Gene Knockout Optimization Problem), usando duas funções objetivo, a WYIELD (Weighted Yield) e a BPCY (Biomass-Product Coupled Yield), tendo sido implementadas com um valor alfa padrão de 0,3. Como não obtivemos qualquer deleção singular de um gene não podemos concluir nada acerca da interferência da deleção de um gene na produção do composto. Ainda assim, o código usado para obter estes resultados está no 'del_gene_list.py'.

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

Utilizando o Mewpy, dois problemas de otimização foram formulados e implementados: Gene Knockout (GKO) e Reaction Knockout (RKO) e apenas formulados (disponíveis no repositório GitHub), por motivos de limitação computacional, Gene Under/Overexpression (GOU) e Reaction Under/Overexpression (ROU). O número máximo de modificações, ao invés das anteriores modificações singulares, foi definido em 5 modificações. De referir ainda que foram feitos 20 processamentos.

Após a análise dos resultados de otimização, levando em conta a função objetivo WYIELD podemos concluir que o problema de otimização RKO resulta na otimização mais eficiente para a produção de lactato com a deleção dos genes GLUDy, ACALD e ACT2rpp, correspondendo ao valor mais elevado de produção do composto para um menor número de modificações. De forma semelhante foi feita a mesma análise tendo em conta a função objetivo BPCY concluímos que, uma vez mais, o problema de otimização RKO, resulta na otimização mais eficiente para a produção de lactato com a deleção dos genes ATPM, ACALD e ACT2rpp.

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

Do ponto de vista metabólico, a melhor estratégia é aquela que leva ao maior valor de produção do composto. No entanto, do ponto de vista laboratorial, a otimização mais viável é aquela que mais facilmente é reproduzida in vitro. De referir também que, no entender do grupo de trabalho, é mais fácil implementar deleções de genes do que de reações no laboratório. Assim, analisando os nossos resultados, concluímos que a deleção dos genes b3733, b2415 e b2284 é a estratégia de otimização mais viável para a produção de lactato no nosso modelo, partindo da função objetivo WYIELD. Partindo da função objetivo BPCY aferimos que a deleção dos genes b4154 e b3737 é a estratégia de otimização mais viável para a produção de biomassa no nosso modelo.

Parte II - Drug targeting with OptFlux

1. Consider the genome-scale metabolic model of a pathogenic organisms in the OptFlux repository or in the BiGG database. You can download the models in SBML, JSON format or import directly from the repository if available. Look for the associated publication and download it. Answer the following questions

a) Study the organism and discuss the diseases it can cause and known drugs and virulence factors.

Organismo: *Mycobacterium tuberculosis* → Bacteria; Terrabacteria group; Actinobacteria; Actinomycetia; Corynebacteriales; Mycobacteriaceae; Mycobacterium; Mycobacterium tuberculosis complex; *Mycobacterium tuberculosis*

Este patógeno humano é particularmente conhecido pelas doenças que causa como a Tuberculose pulmonar (lesão primária, onde previamente não existem lesões), Tuberculose cutânea, Tuberculose renal, Tuberculose óssea (lesões secundárias, que surgem após lesões primárias). O *Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da tuberculose (TB), principal causa de morte por um único agente infeccioso. Este infecta principalmente macrófagos alveolares. Dependendo do estado imunológico do hospedeiro, a infeção tem resultados diferentes. Nos hospedeiros imunocompetentes, a bactéria pode ser controlada por meio de mecanismos imunes inatos e / ou por imunidade adaptativa. Noutros indivíduos, o sistema imunológico não consegue controlar a infeção e a doença progride para tuberculose ativa. (Raffetseder et al., 2014) A evidência de DNA indica que o *M. tuberculosis* co-evoluiu com o *Homo sapiens* como espécie. Em humanos, *M. tuberculosis* reside principalmente dentro e entre células do sistema imunológico que podem conter ou erradicar a maioria das outras bactérias. As micobactérias entram no hospedeiro por via aérea e, uma vez nos pulmões, são fagocitadas pelos macrófagos. Isto pode levar à eliminação rápida do bacilo ou ao desencadeamento de uma infeção tuberculosa ativa. (Forrellad et al., 2013) No entanto, os humanos servem como o único hospedeiro natural conhecido e reservatório de *M. tuberculosis*, que adaptou a sua fisiologia para servir a funções fisiológicas e patogénicas de células interdependentes. (Ehrt et al., 2018) (Figura1)

Alguns fatores que contribuem para a progressão da doença incluem coinfeção por HIV, desnutrição e variações genéticas predisponentes. Para além disso, este agente está cada vez mais associado à resistência aos medicamentos mediada por

mutações e rearranjos no seu cromossoma circular. (Koch & Mizrahi, 2018). O tratamento desta doença passa pela utilização de 4 drogas/medicamentos em simultâneo durante 2 meses. Posteriormente, há uma segunda fase de tratamento (fase de manutenção em que são usadas 2 drogas/medicamentos por mais 4 meses. Este tipo de tratamento prolongado contribui para o surgimento de TB resistente aos medicamentos. (Raffetseder et al., 2014)

1a fase→Isoniazida + Rifampicina + Pirazinamida + etambutol (2 meses)

2a fase→Isoniazida + Rifampicina (4 meses)

Fatores de virulência são estruturas, produtos ou estratégias que contribuem para a bactéria aumentar sua capacidade em causar uma infeção. No caso das *Mycobacterium*, os principais fatores de virulência estão relacionados com a sua parede lipídica complexa, catabolismo do colesterol, proteínas e lipoproteínas do invólucro celular responsáveis pela aderência bacteriana às células do hospedeiro, proteínas que inibem a resposta antimicrobiana dos macrófagos pela resistência a compostos tóxicos do hospedeiro, controlo do mecanismo de apoptose e da progressão e transformação dos fagossomas em fagolisossomas. Para além de abranger ainda fatores que controlam e regulam a expressão genética em situações de diferente atividade do patógeno. Infelizmente, ainda não está claro quais são os principais fatores de virulência do *M. tuberculosis* envolvidos no desenvolvimento da patogenicidade desse microrganismo. Isso ocorre porque *M. tuberculosis* não possui os fatores de virulência clássicos que outras bactérias patogênicas possuem, como toxinas produzidas por *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli* O157: H7, *Shigella dysenteriae* e *Vibrio cholerae*. Por esse motivo, muitas pesquisas têm tentado encontrar uma definição precisa da virulência do *M. tuberculosis* procurando fatores que são importantes para a progressão da doença. No entanto, existem vários genes que atuam neste caso, como podemos ver no excerto da tabela 3.

b) Compute the specific growth rate under adequate conditions for your organism? What are the main products excreted under each of those circumstances?

Através do software Optflux: Realizou-se uma simulação wild-type (FBA) para determinar a taxa de crescimento específica sem as condições ambientais adequadas a este organismo utilizando a ferramenta Bioinformática OptFlux. A partir da mesma conseguimos obter o valor da função objetivo, com finalidade de maximizar a biomassa do organismo analisado. O valor obtido foi de 0.05812 mmol/gDW/h (max: R_BIOMASS_2 = 0.058173873). Com esta análise foi também possível ver os metabolitos consumidos e produzidos, bem como os valores e distribuições de fluxo do modelo, com criação do modelo metabólico importando os dados do ficheiro SBML retirado anteriormente. (Figura2) Simulação wild-type maximizando a biomassa, com metabolitos produzidos e consumidos. (Figura3). Os principais metabolitos produzidos são Ferro, Citrato, Fosfato, H⁺, O₂, Sulfato, Etanol, L-Asparagina, Glicerol. Os principais metabolitos consumidos são Amónia, Ácido Carbónico, 4-Hidro-benzyl álcool, H₂O e Succinato. Tendo em conta os valores de consumo de substratos os valores são baixos, mas esperados. Para obter valores maiores poderíamos aumentar o consumo de, por exemplo, citrato até uns 10 ou 15 mmol/g/h

Através de código em python: Em primeiro começamos por extrair o ficheiro da base de dados BIGG no formato SBML. Posteriormente, criamos o modelo e simulamos o mesmo o que permitiu realizar tarefas básicas, como listar metabolitos, reações, genes, compartimentos, reações de captação e reações de transporte. (Figura4) Realizou-se uma simulação wild-type (FBA) para determinar a taxa de crescimento específica sob as condições ambientais adequadas a este organismo (aeróbio) utilizando o código disponibilizado nas aulas. (Figura5) A partir da mesma conseguimos obter o valor da função objetivo, com finalidade de maximizar a biomassa do organismo analisado. O valor obtido foi de 0.0525 mmol/gDW/h. Ao colocarmos as condições ideais, aumentamos o valor do O₂ para infinito, aumentando assim a biomassa, 0.30597 mmol/gDW/h.

c) List all genes/reactions that can be potential drug targets.

Genes críticos são genes essenciais à sobrevivência de um organismo ou de uma célula (Zhang & Ren, 2015). Por esta razão têm sido bastante utilizados, pela comunidade científica, para identificar possíveis drug targets de seres vivos patogénicos, tais como bactérias e fungos (Hughes et al., 2011; Schenone et al., 2013). Se uma proteína codificada por um gene crítico for suscetível a um determinado composto este pode ser usado para controlar o organismo ou a célula em questão, impedindo a sua sobrevivência. Ao saber o organismo que provoca uma determinada doença é possível criar fármacos que combatam a sua proliferação através do uso de inibidores, para isso é necessário identificar os possíveis inibidores das proteínas codificadas pelos genes críticos (drug target). Para a identificação de um drug target é necessária a descoberta dos genes ou reações essenciais para o crescimento, replicação, viabilidade e sobrevivência do microrganismo, que quando bloqueados podem causar a morte do organismo (Sakharkar et al., 2004).

OptFlux: Procedeu-se então às simulações de knockout de genes e reações, para obter aqueles que provoquem mais efeitos negativos na produção da biomassa, relativamente ao wild-type. (Tabela 4 e 5)

Python: Com a ajuda da ferramenta MEWpy foi possível obter uma lista com 312 reações críticas e outra com 188 genes essenciais para sobrevivência do organismo. Começamos por identificar as reações e genes críticos, procurando os genes e as reações essenciais para ambos os organismos. Estes são aqueles que são essenciais à sobrevivência do modelo, de modo que o valor da biomassa seja superior a 0. (Figura 6)

d) Discuss two of these genes/reactions and the corresponding drug. Select one present in the host and one absent. Include in the discussion facts regarding potential side effects of the drug on other reactions.

Rv3791 gene para a enzima - decaprenylphospho-beta-D-erythro-pentofuranosid-2-ulose 2-reductase (DprE2) decaprenylphospho-beta-D-ribofuranose 2-oxidase DprE1 e decaprenylphospho-beta-D-erythro-pentofuranosid-2-ulose 2-reductase DprE2 juntos catalisam a epimerização da decaprenylphosphoryl-beta-D-ribofuranose para decaprenylphosphoryl-beta-D-arabinofuranose, o dador de arabinosil para a biossíntese de polímeros arabianos, sendo estes um dos 3 principais componentes da parede da célula desta bactéria. Nenhuma das proteínas individualmente é suficiente para suportar a atividade. Para possível fármaco temos o etambutol, que é um bacteriostático contra o crescimento ativo do bacilo de Tuberculose. Funciona obstruindo a formação da parede celular. Os ácidos micólicos ligam-se aos grupos de 5'-hidroxilo de resíduos D- arabinose do arabinogalactano e formam o complexo micólico-arabinogalactano-peptidoglicano na parede celular. Interrompe a síntese do arabinogalactano ao inibir a enzima arabinosil transferase. A rutura da síntese do arabinogalactano inibe a formação deste complexo e leva a uma maior permeabilidade da parede celular.

PGMT- Phosphoglucomutase

Reação: alpha-D-glucose 1-phosphate = alpha-D-glucose 6-phosphate

Esta enzima desempenha um papel importante na formação de cápsulas de polissacarídeo e virulência em vários agentes patogénicos bacterianos. Foi possível encontrar 1 inibidor desta enzima para a bactéria, sendo este, um inibidor partilhado com o hospedeiro. Mas esta enzima não representa um bom alvo para fármacos, pois a sua inibição poderá inibir também uma

reação enzimática humana. Inibidor da reação (Tabela 6)

Bibliografia

Ehrt S, Schnappinger D, Rhee KY. Metabolic principles of persistence and pathogenicity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Aug;16(8):496-507. doi: 10.1038/s41579-018-0013-4. PMID: 29691481; PMCID: PMC6045436.

Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, Cataldi AA, Bigi F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. 2013 Jan 1;4(1):3-66. doi: 10.4161/viru.22329. Epub 2012 Oct 17. PMID: 23076359; PMCID: PMC3544749.

Hughes, J., Rees, S., Kalindjian, S., & Philpott, K. (2011). Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 162(6), 1239–1249. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>

Koch A, Mizrahi V. *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol*. 2018 Jun;26(6):555-556. doi: 10.1016/j.tim.2018.02.012. Epub 2018 Mar 23. PMID: 29580884.

Raffetseder J, Pienaar E, Blomgran R, Eklund D, Patcha Brodin V, Andersson H, Welin A, Lerm M. Replication rates of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages do not correlate with mycobacterial antibiotic susceptibility. *PLoS One*. 2014 Nov 11;9(11):e112426. doi: 10.1371/journal.pone.0112426. PMID: 25386849; PMCID: PMC4227709.

Sakharkar K. R., Sakharkar, M. K., & Chow, V. T. (2004). A novel genomics approach for the identification of drug targets in pathogens, with special reference to *Pseudomonas aeruginosa*. *In silico biology*, 4(3), 355-360.

Zhang, Z., & Ren, Q. (2015). Why are essential genes essential? - The essentiality of *Saccharomyces* genes. *Microbial cell* (Graz, Austria), 2(8), 280–287. <http://doi.org/10.15698/mic2015.08.218>

<https://www.brenda->

[enzymes.org/enzyme.php?ecno=5.4.2.2&Suchword=&reference=&UniProtAcc=&organism%5B%5D=Mycobacterium+tuberculosis](https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=5.4.2.2&Suchword=&reference=&UniProtAcc=&organism%5B%5D=Mycobacterium+tuberculosis)