

PROYECTO 1

Herramientas Computacionales para Ingeniería Metabólica

Modelación de redes metabólicas

Alejandro Castellanos^{1,2,3*} | Sergio Pachón^{1,2*}

¹Maestría en Biología Computacional, Departamento de Ciencias Biológicas y Departamento de Ingeniería de Sistemas y Computación, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

²Grupo de Biología de Sistemas (BioSys), Laboratorio de Biofísica, Departamento de Física, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

³Max Planck Tandem Group en Biología Computacional y Ecología Microbiana (BCEM), Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

† **Repositorio de GitHub del Proyecto:**
<https://github.com/alejandroc98/Proyectos-HCIM/tree/main/Proyecto-01>

Correspondencia

Email: a.castellanos@uniandes.edu.co,
s.pachond@uniandes.edu.co

La treonina es un aminoácido esencial de alto interés industrial. La ruta de síntesis de este aminoácido ha sido ampliamente estudiada en organismos modelo como *E. coli*, tanto experimentalmente como mediante modelación *in silico*. En este artículo se analiza la dinámica de la ruta de síntesis de treonina utilizando un modelo previamente reportado. Además, se hace un análisis de efectos de concentraciones iniciales, una optimización de parámetros cinético y un análisis de estabilidad. Se encontró que el primer y último paso de la ruta son los más importantes para regular y optimizar la producción de treonina.

PALABRAS CLAVE

Síntesis de treonina, Modelos metabólicos *in silico*, Optimización de parámetros cinéticos, Análisis de estabilidad

1 | INTRODUCCIÓN

La treonina es un aminoácido esencial, es decir, un aminoácido que los seres humanos no producen en cantidades suficientes para suplir sus necesidades metabólicas [1]. Por esta razón, la ruta metabólica implicada en su síntesis ha sido ampliamente estudiada en humanos y otros organismos (particularmente microorganismos), lo que ha resultado en un profundo conocimiento de la mecanística y cinética de las reacciones implicadas en este proceso metabólico [2].

La ruta metabólica de la síntesis de treonina en *E. coli* a partir del aspartato involucra 4 especies intermedias, necesita de 3 cofactores distintos y cuenta con varios loops de regulación en distintos puntos de la ruta (**Figura 1**). De

Abreviaciones: Asp: aspartato, AspP: aspartil-fosfato, ASA: aspartato-semialdehído, ASD: aspartato semialdehído deshidrogenasa, HS: homoserina, HDH: homoserina deshidrogenasa, HSP: O-fosfo-homoserina, HK: homoserina kinasa, TS: treonina sintasa, Thr: treonina, Lys: lisina, Met: metionina, P_i: fosfato inorgánico, PLP: piridoxal fosfato.

* Estos autores contribuyeron igualmente.

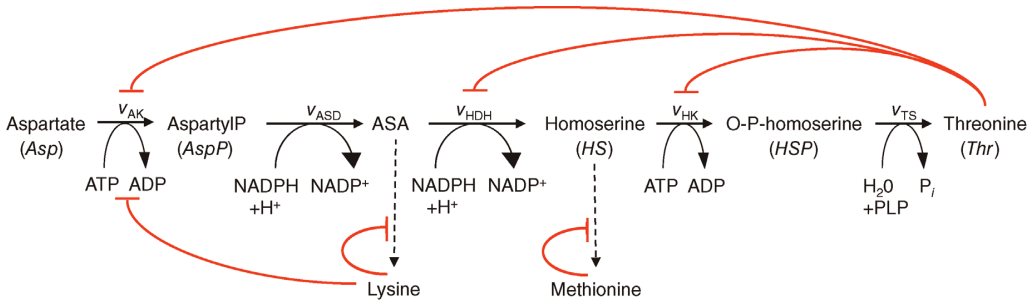


FIGURA 1 Modelo de la síntesis de treonina a partir del aspartato. La ruta involucra 4 pasos intermedios, 2 reacciones paralelas y el consumo de ATP y NADPH. Se puede observar cómo la treonina ejerce una retroalimentación negativa a varios pasos de la ruta para regular su producción. Tomado de [2].

igual forma, las **Ecuaciones 1-7** describen la dinámica de las especies implicadas en este proceso [2]. Las ecuaciones extendidas con el detalle de la cinética de cada reacción y sus respectivas especies químicas implicadas se pueden encontrar en la **Información suplementaria - A**.

En este proyecto, primero se simuló la dinámica de la síntesis de treonina a partir del modelo descrito previamente. Luego, se realizó un proceso de exploración de parámetros para determinar el efecto de los valores de las concentraciones iniciales y los parámetros cinéticos del modelo para determinar el efecto que tiene su modificación en la dinámica del sistema y encontrar los parámetros óptimos para aumentar la concentración de la treonina. Finalmente, se realizó un análisis de estabilidad del sistema para determinar si este alcanza un estado estable.

$$\frac{d}{dt} Asp = -v_{AKI} - v_{AKIII} \quad (1)$$

$$\frac{d}{dt} AspP = v_{AKI} + v_{AKIII} - v_{VASD} \quad (2)$$

$$\frac{d}{dt} ASA = v_{VASD} - v_{VHDH} \quad (3)$$

$$\frac{d}{dt} HS = v_{VHDH} - v_{VHK} \quad (4)$$

$$\frac{d}{dt} HSP = v_{VHK} - v_{VTS} \quad (5)$$

$$\frac{d}{dt} Thr = v_{VTS} \quad (6)$$

$$\frac{d}{dt} ATP = -ATP \cdot v_{ATP} \quad (7)$$

2 | MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 | Simulación del modelo para la ruta de síntesis de treonina

Se resolvió el sistema de ecuaciones diferenciales (**Ecuaciones 1-7**) en Python como un problema de valor inicial (lapso de tiempo: [0,100]) utilizando la función `solve_ivp()` del módulo `integrate` de la librería SciPy implementando el método de integración de numérica de Runge-Kutta de 4to orden. Los parámetros utilizados en esta simulación se

obtuvieron de [2] y en el caso de las velocidades máximas de reacción se estimaron a partir de las características de las reacciones de la ruta (**Información suplementaria - B**).

2.2 | Estudio de los efectos de las concentraciones iniciales de las variables en la dinámica de síntesis de la treonina

Se implementó un algoritmo en Python de exploración de parámetros para variar los valores de las concentraciones iniciales de las especies químicas. Con estos valores se resolvía el sistema (utilizando la aproximación descrita en la sección anterior) y se monitorio la concentración de treonina en función del tiempo y la concentración final de treonina en función de la variación de estas concentraciones iniciales.

2.3 | Exploración de la optimización de parámetros cinéticos relevantes para aumentar la concentración final de treonina

Se implementó un algoritmo en Python de exploración de parámetros para variar los valores de las constantes de cinética de inhibición y de las velocidades máximas de reacción del sistema. La implementación de código variaba solo un parámetro a la vez y mantenía el resto de los parámetros sin modificar con respecto a la solución inicial de la dinámica del sistema. Con estos valores se resolvía el sistema (utilizando la aproximación descrita en la sección anterior) y se monitorio la concentración final de treonina en función de cada parámetro modificado.

2.4 | Análisis de estabilidad de la ruta de síntesis de treonina

Para el análisis de estabilidad, primero se calcularon los valores en estado estacionario de las especies químicas del sistema (**Ecuaciones 1-7**) en Python utilizando la función `least_squares()` del módulo `optimize` del paquete SciPy que soluciona el sistema de mínimo cuadrados no lineal con fronteras en las variables. Posteriormente, se calculó la Jacobiana analítica del sistema utilizando el método `Matrix.jacobian()` y luego se evaluó en los valores en estado estacionario utilizando el método `Matrix.evalf()`, ambos del paquete de programación matemática simbólica SymPy. Por último, se calcularon los valores propios de esta matriz utilizando la función `eigvals()` del módulo `linalg` del paquete Numpy, y se evaluó el comportamiento del sistema a partir de estos.

3 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 | Se logró replicar la dinámica de la síntesis de treonina reportada en la literatura

En la **Figura 2A** se ilustran los resultados de la dinámica obtenida en este estudio. Se puede observar que a medida que la concentración de treonina incrementa, las tasas de las reacciones sobre las que la treonina ejerce retroalimentación negativa disminuyen. De igual manera, se puede observar un comportamiento monótonico tanto para el aspartato, que siempre disminuye en concentración, como para la treonina, que se mantiene aumentando en concentración, como para el ATP, que se consume consistentemente a lo largo del proceso. En la **Figura 2B** se encuentran los resultados de la dinámica registrados en [2]. Cómo se puede ver, ambas dinámicas son prácticamente idénticas, por lo que se puede concluir que los estimados para las velocidades máximas de reacción fueron óptimos, y que se obtuvo una dinámica confiable que probablemente se ajusta adecuadamente a la dinámica real de la ruta.

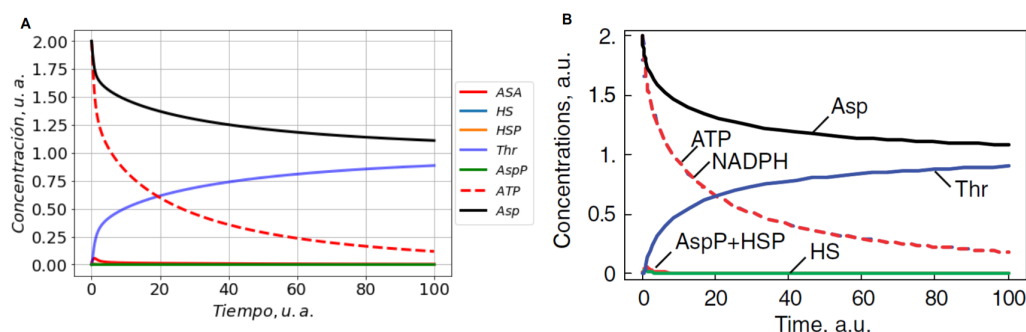


FIGURA 2 Dinámica del modelo de síntesis de treonina. **A)** Resultados de la simulación del modelo planteado en las Ecuaciones 1-7 utilizando los parámetros reportados en la Información suplementaria - **B.** Resultados de la modelación *in silico* reportados en [2].

3.2 | La concentración inicial de Asp y de ATP rigen la síntesis final de treonina

Se hizo una exploración general de parámetros y se observó que únicamente la concentración inicial de Asp y de ATP tenían un efecto significativo en la dinámica de la ruta. Esto se detectó durante la fase de replicación de la dinámica obtenida en [2], en donde de hecho, estas dos especies son las únicas 2 que no son inicializadas en 0.

Posteriormente se exploró el efecto de la concentración inicial de estas dos especies en mayor profundidad. Vale la pena mencionar, que el efecto de estos dos parámetros fueron explorados de manera sinérgica, es decir, que siempre que se varió una concentración inicial siempre se varió la otra de la misma manera. Esto debido a que de esta manera se observaron los efectos más drásticos, además de que en el modelo del que se partió, estas dos especies arrancaron con la misma cantidad.

En la **Figura 3** se observa que a medida que se incrementa la concentración inicial de ASP y ATP, la producción final de treonina del sistema también aumenta. De estos resultados se puede inferir que la concentración inicial de Asp y ATP tienen un efecto significativo en la dinámica del sistema y que entre mayor sea la concentración inicial de estas especies químicas, mayor será la producción final de treonina.

3.3 | $K_{iThr,AKI}$, $K_{iThr,AKI}$ y $K_{iATP,HK}$ son los parámetros cinéticos de inhibición que más influyen en la concentración final de treonina

Se escogió variar únicamente estos parámetros ya que son los que ejercen algún efecto de retroalimentación negativa en la ruta, por lo que se asume que los demás parámetro no tendrán un efecto regulatorio en esta.

La **Figura 4** muestra los resultados de la exploración de parámetros para los parámetros cinéticos de inhibición del sistema. Se puede observar que al variar K_{1Lys} , K_{Pi} , K_{iThr2} , K_{iLysHK} y K_{iHSHK} el efecto sobre la concentración final de treonina es prácticamente nulo. Por otro lado, entre mayor sea el valor de $K_{iThrAKI}$ y de K_{iATPHK} , mayor es la concentración final de treonina (y de igual manera, entre menor sean estos valores, menor es la concentración final de treonina). Por otro lado, entre menor sea K_{iThrHK} , mayor es la concentración final de treonina. Esto quiere decir que en cuanto a la regulación de la ruta, el primer paso y el último son los más importantes para optimizar la producción

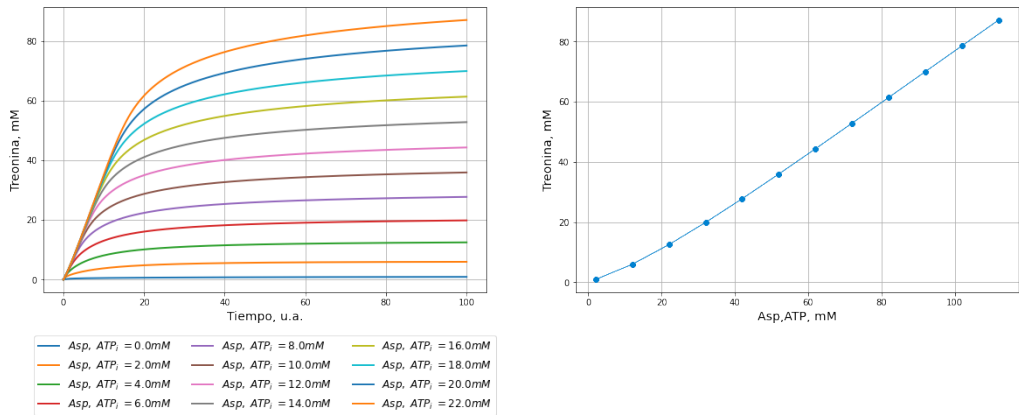


FIGURA 3 Efecto de la concentración inicial de Asp y ATP en la síntesis de treonina. **Izquierda.** Dinámica de de la concentración de treonina para cada valor de concentración de Asp y ATP. **Derecha.** Concentración final de treonina en función de la concentración inicial de Asp y ATP.

de treonina.

3.4 | V_{AKI} , V_{HK} y V_{ATPII} son las velocidades máximas de reacción que más influyen en la concentración final de treonina

La **Figura 5** muestra los resultados de la exploración de parámetros para las velocidades máximas de reacción del sistema. Se puede observar que al variar V_{AKI} y V_{HDK} , el efecto sobre la concentración final de treonina es muy pequeño. Por otro lado, entre mayor sea el valor de V_{AKI} y de V_{HK} , mayor es la concentración final de treonina (y de igual manera, entre menor sean estos valores, menor es la concentración final de treonina). Por otro lado, entre menor sea V_{ATP} y de V_{ATPII} , mayor es la concentración final de treonina. Nuevamente se puede apreciar que el primer paso y el último son los más importantes para optimizar la producción de treonina en términos de la velocidad de reacción.

3.5 | El sistema no posee un estado estable no trivial

Todos los valores de las especies químicas implicadas en el sistema tendieron a 0, con la excepción de la treonina, la cual obtuvo un valor muy elevado. Esto sugiere que la treonina se mantiene produciendo mientras que los demás metabolitos se consumen perpetuamente. Esto es algo que además ya se había observado en la dinámica del sistema ilustrada en la **Figura 2**. A partir de estas observaciones se puede plantear la sospecha *a priori* de que el sistema no va a alcanzar un estado estable.

Continuando con el análisis de estabilidad, la matriz Jacobiana del sistema evaluada en estado estacionario se encuentra en la **Información suplementaria - C** (la Jacobiana analítica resultó ser muy grande para incluirla en el artículo, pero se puede consultar en el código del proyecto), y sus respectivos valores propios (*eigenvalues*) están registrados en el **Cuadro 1**. Cómo se puede observar, los valores propios 1, 3, 4 y 6 satisfacen las condiciones de estabilidad, es decir, son negativos. No obstante, los valores propios 2, 5 y 7 son positivos, y a pesar de que los valores propios 5 y 7 son apreciablemente pequeños, por lo que se puede argumentar que ante una aproximación

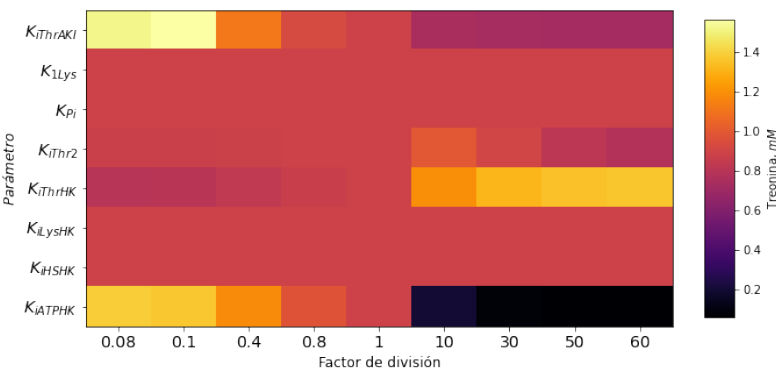


FIGURA 4 Cambio en la producción final de treonina en función de los valores de los parámetros cinéticos del sistema. El eje vertical representa el parámetro que se está variando (mientras todos los demás se mantienen constantes). El eje horizontal contiene el factor por el cual se dividió el valor base para cada parámetro (estos valores son los que se utilizaron en la primera dinámica simulada), lo que quiere decir que entre menor sea el número, menor es el valor del parámetro en cuestión (así que de izquierda a derecha el valor de los parámetros disminuye). La escala de colores representa la concentración final de treonina para cada simulación.

CUADRO 1 Valores propios de la matriz Jacobiana en estado estacionario.

λ_i	Valor
1	-1.509×10^4
2	4.577×10^1
3	-3.325×10^1
4	-5.186×10^{-5}
5	3.951×10^{-4}
6	-3.317×10^{-14}
7	9.480×10^{-20}

λ_i : valores propios

lineal cumplen con los supuestos de estabilidad, el valor propio 2 es mucho mayor a 0, lo que viola los supuestos de estabilidad. A partir de estos resultados, confirmamos nuestra hipótesis de que lo más seguro es que el sistema no alcance un estado estacionario (diferente al trivial, es decir, cuando todas las especies químicas son igual a 0).

4 | CONCLUSIONES

Se obtuvo un modelo y parámetros confiables que representan la dinámica de la ruta de síntesis de la treonina. Además, se encontró que las concentraciones iniciales del Asp y del ATP afectan positivamente la síntesis de treonina, mientras que la concentración inicial de las demás especies no parecen tener un efecto significativo. Finalmente, se determinó que el primer y último paso de la ruta metabólica son los más importantes para regular la síntesis de treonina, así que para optimizar su producción, se debería enfocar en estos dos pasos modificando los parámetros cinéticos de inhibición y la velocidad máxima de reacción implicados en estos pasos.

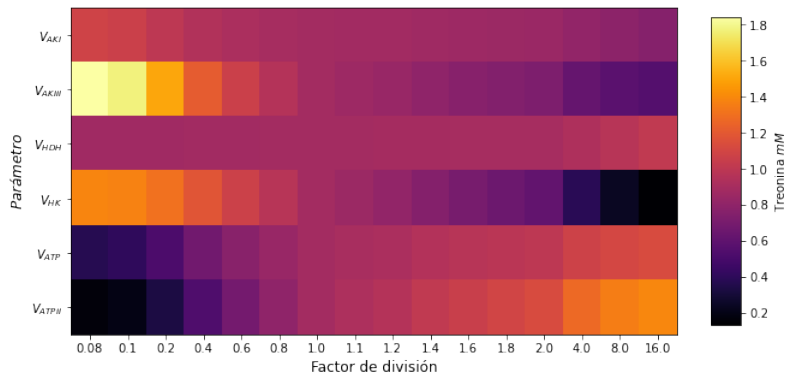


FIGURA 5 Cambio en la producción final de treonina en función de los valores de las velocidades máximas de reacción del sistema. El eje vertical representa el parámetro que se está variando (mientras todos los demás se mantienen constantes). El eje horizontal contiene el factor por el cual se dividió el valor base para cada parámetro (estos valores son los que se utilizaron en la primera dinámica simulada), lo que quiere decir que entre menor sea el número, menor es el valor del parámetro en cuestión (así que de izquierda a derecha el valor de los parámetros disminuye). La escala de colores representa la concentración final de treonina para cada simulación.

Referencias

- [1] Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. Lehninger principles of biochemistry. Seventh edition ed. New York, NY : Houndmills, Basingstoke: W.H. Freeman and Company ; Macmillan Higher Education; 2017. OCLC: ocn986827885.
- [2] Klipp E, Liebermeister W, Wierling C, Kowald A. Systems biology: a textbook. 2., completely revised and enlarged edition ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2016.

Información suplementaria

A. Ecuaciones cinéticas del sistema

$$v_{AKI} = \frac{V_{AKI} \cdot \left(Asp \cdot ATP - \frac{AspP \cdot ADP}{K_{eq,AK}} \right)}{\left(K_{Asp,AKI} \cdot \frac{1 + \left(\frac{Thr}{K_{iThr,AKI}} \right)^{h_1}}{1 + \left(\frac{Thr}{\alpha_{AKI} \cdot K_{iThr,AKI}} \right)^{h_1}} \right) \cdot \left(K_{ATP,AKI} \cdot \left(1 + \frac{ADP}{K_{ADP,AKI}} \right) + ATP \right)} \quad (8)$$

$$v_{AKIII} = \frac{V_{AKIII} \cdot \left(Asp \cdot ATP - \frac{AspP \cdot ADP}{K_{eq,AK}} \right)}{\left(1 + \left(\frac{Lys}{K_{iLys}} \right)^{h_{Lys}} \right) \cdot \left(K_{Asp,AKIII} \cdot \left(1 + \frac{AspP}{K_{AspP,AKIII}} \right) + Asp \right) \cdot \left(K_{ATP,AKIII} \cdot \left(1 + \frac{ADP}{K_{ADP,AKIII}} \right) + ATP \right)} \quad (9)$$

$$v_{ASD} = \frac{V_{ASD} \cdot \left(AspP \cdot NADPH - \frac{ASA \cdot NADP^+ \cdot P_i}{K_{eq,ASD}} \right)}{\left(K_{AspP,ASD} \cdot \left(1 + \frac{ASA}{K_{ASA,ASD}} \right) \cdot \left(1 + \frac{P_i}{K_{P_i}} \right) + AspP \right) \cdot \left(K_{NADPH} \cdot \left(1 + \frac{NADP^+}{K_{NADP^+}} \right) + NADPH \right)} \quad (10)$$

$$v_{HDH} = \frac{V_{HDH} \cdot \left(ASA \cdot NADPH - \frac{HS \cdot NADP^+}{K_{eq,HDH}} \right)}{\left(\frac{1 + \left(\frac{Thr}{K_{iThr,2}} \right)^{h_2}}{1 + \left(\frac{Thr}{\alpha_2 \cdot K_{iThr,2}} \right)^{h_2}} \right) \cdot \left(K_{ASA,HDH} \cdot \left(1 + \frac{HS}{K_{HS,HDH}} \right) + ASA \right) \cdot \left(K_{NADPH,HDH} \cdot \left(1 + \frac{NADP^+}{K_{NADP^+,AKIII}} \right) + NADPH \right)} \quad (11)$$

$$v_{HK} = \frac{V_{HK} \cdot HS \cdot ATP}{\left(K_{HS,HK} \cdot \left(1 + \frac{ATP}{K_{iATP,HK}} \right) \cdot \left(1 + \frac{Thr}{K_{iThr,HK}} \right) + HS \right) \cdot \left(K_{ATP,HK} \cdot \left(1 + \frac{HS}{K_{iHS,HK}} \right) + ATP \right) \cdot \left(1 + \frac{Lys}{K_{iLys,HK}} \right)} \quad (12)$$

$$v_{TS} = \frac{V_{TS} \cdot HSP}{K_{HSP,TS} + HSP} \quad (13)$$

$$v_{ATP} = V_{ATP} \cdot Asp + V_{ATPII} \cdot HS \quad (14)$$

| **B. Parámetros cinéticos del sistema**

CUADRO 2 Parámetros cinéticos del sistema reportados en [2] que se utilizaron en la simulación de la dinámica de la síntesis de treonina.

Código	Parámetro	Valor	Unidad
KeqAK	$K_{eq,AK}$	$6,4 \times 10^{-4}$	
KAspAKI	$K_{Asp,AKI}$	$0,97 \pm 0,48$	mM
KATPAKI	$K_{ATP,AKI}$	$0,98 \pm 0,5$	mM
KAspPAKI	$K_{AspP,AKI}$	$0,017 \pm 0,004$	mM
KADPAKI	$K_{ADP,AKI}$	0,25	mM
KiThrAKI	$K_{iThr,AKI}$	$0,167 \pm 0,003$	mM
h1	h_1	$4,09 \pm 0,26$	
alphaAKI	α_{AKI}	$2,47 \pm 0,17$	
KAspAKII	$K_{Asp,AKIII}$	$0,32 \pm 0,08$	mM
KATPAKIII	$K_{ATP,AKIII}$	$0,22 \pm 0,02$	mM
KAspPAKIII	$K_{AspP,AKIII}$	$0,017 \pm 0,004$	mM
KADPAKIII	$K_{ADP,AKIII}$	0,25	mM
KiLys	K_{iLys}	$0,391 \pm 0,08$	mM
hlys	h_{Lys}	$2,8 \pm 1,4$	
KeqASD	$K_{eq,ASD}$	$2,84 \times 10^5$	
KAspPASD	$K_{AspP,ASD}$	$0,022 \pm 0,001$	mM
KNADPHASD	$K_{NADHPH,ASD}$	$0,029 \pm 0,002$	mM
KASAASD	$K_{ASA,ASD}$	$0,11 \pm 0,008$	mM
KNADPplusASD	$K_{NADP+,ASD}$	$0,144 \pm 0,02$	mM
KPi	K_{Pi}	$10,2 \pm 1,4$	mM
KeqHDH	$K_{eq,HDH}$	1×10^{11}	M ⁻¹
KASAHDH	$K_{ASA,HDH}$	$0,24 \pm 0,03$	mM
KNADPHHDH	$K_{NADPH,HDH}$	$0,037 \pm 0,006$	mM
KHSHDH	$K_{hs,HDH}$	$3,39 \pm 0,33$	mM
KNADPplusHDH	$K_{NADP+,HDH}$	$0,067 \pm 0,006$	mM
KiThr2	$K_{iThr,2}$	0,097	mM
h2	h_2	1,41	
alpha2	α_2	3,93	
KHSHK	$K_{HS,HK}$	0,11	mM
KATPHK	$K_{ATP,HK}$	0,072	mM
KiThrHK	$K_{iThr,HK}$	1,09	mM
KiLysHK	$K_{iLys,HK}$	9,45	mM
KiHSHK	$K_{iHS,HK}$	4,7	mM
KiATPHK	$K_{iATP,HK}$	4,35	mM
KHSPTS	$K_{HSP,TS}$	$0,31 \pm 0,03$	mM

CUADRO 3 Velocidades máximas de reacción utilizadas en la simulación de la dinámica de la síntesis de treonina.

Código	Parámetro	Valor
VAKI	V_{AKI}	0.088
VAKIII	V_{AKIII}	0.0094
VASD	V_{ASD}	2
VHDH	V_{HDH}	10
VHK	V_{HK}	45
VTs	V_{TS}	10
VATP	V_{ATP}	0.012
VATPII	V_{ATPII}	500

C. Matriz Jacobiana del sistema evaluada en estado estable

0,00028246	$-8,5521 \cdot 10^{-27}$	0	0	0	$-1,8616 \cdot 10^{-22}$	$-1,6333 \cdot 10^{-15}$
-0,00028246	45,775	$2,5511 \cdot 10^{-15}$	0	0	$1,8616 \cdot 10^{-22}$	$1,6333 \cdot 10^{-15}$
0	-45,775	0,031843	0,0093931	0	$6,6044 \cdot 10^{-14}$	0
0	0	-0,031843	-764,99	0	$-5,1027 \cdot 10^{-14}$	$1,0387 \cdot 10^{-13}$
0	0	0	764,98	-33,258	$-1,5016 \cdot 10^{-14}$	$-1,0387 \cdot 10^{-13}$
0	0	0	0	33,258	0	0
0,00036059	0	0	15,025	0	0	$6,3766 \cdot 10^{-14}$