



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**RECONSTRUÇÃO E MODELAGEM *IN SILICO* DA VIA DE
BIOSSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS DA BACTÉRIA
PSICOTRÓFICA *Exiguobacterium antarticum* LINHAGEM B7**

REGIANE SILVA KAWASAKI FRANCÊS

Belém-PA
Abril de 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**RECONSTRUÇÃO E MODELAGEM *IN SILICO* DA VIA DE
BIOSSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS DA BACTÉRIA
PSICOTRÓFICA *Exiguobacterium antarticum* LINHAGEM B7**

REGIANE SILVA KAWASAKI FRANCÊS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Maria Paula Cruz Schneider

Belém-PA
Abril de 2016

Dedico este trabalho aos meus filhos, Isabelle e Paulo,
e aos meus pais Cleide e Kotaro Kawasaki.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Paula Schneider, por ter me dado oportunidade de fazer parte de sua equipe no Laboratório de Polimorfismo de DNA, por sua orientação e por sua disposição em me ajudar sempre;

Ao professor Dr. Artur Silva por ter me permitido trabalhar com a bactéria *Exiguobacterium antarcticum* B7;

À professora Luciana Xavier por toda ajuda, boa vontade, paciência e atenção;

Ao professor Leonardo Sena, por suas observações sempre pertinentes e inteligentes;

Ao meu amigo Glaucio Carvalho, por ter me apresentado à professora Paula Schneider e pelo auxílio na parte matemática de meu trabalho;

Ao meu amigo além-mar Rodolfo Marques, que mesmo no sufoco da redação de sua tese, dedicou seu tempo valioso para ajudar na codificação de programas computacionais e na interpretação de dados;

Ao prof. Dr. Rui Oliveira pela inestimável contribuição na escolha de métodos matemáticos adequados e na análise de dados;

À minha amiga Aline Melo. Amizade construída e solidificada ao longo do doutorado. Foram muitos os momentos alegres, descontraídos, outros, nem tanto! Mas em todos, o sentimento de companheirismo estava presente. Esta amizade é um presente do doutorado e será para a vida toda!

À minha amiga Danielle Costa, assim como a Aline, uma amizade conquistada ao longo do doutorado. Por termos a mesma formação na graduação, batalhamos juntas para entender a biologia por trás da bioinformática. Também considero esta amizade um presente do doutorado e para a vida toda!

A Roberta Rezende, pela amizade sincera e pela ajuda inestimável na fase final de meu trabalho.

A todos os colegas-amigos, que fizeram ou ainda fazem parte do LPDNA, com os quais convivi, estudei, trabalhei e me diverti. Um

agradecimento especial ao Rafael Baraúna, por ter me ajudado com a bactéria *Exiguobacterium antarticum* B7;

Um agradecimento especial ao mestrando do PPGCC-UFPA Renato Oliveira por ter me ajudado na etapa inicial deste trabalho;

A todos os meus amigos e colegas do ICEN-UFPA.

Aos meus pais Cleide e Kotaro Kawasaki pelo amor, dedicação, apoio e carinho;

Aos meus queridos irmãos Christiane, Paulo, Cleideane e Robson, pelo companheirismo, respeito e apoio em todos os momentos de minha vida. Um agradecimento especial à Christiane, minha irmã de sangue, mas, sobretudo minha amiga de coração e alma;

Aos meus filhos Isabelle Mayumi e Paulo Yuji, minhas maiores motivações para eu enfrentar os obstáculos, voluntários ou não, que surgem ao longo de minha estrada. Amo vocês!

À Universidade Federal do Pará pela minha formação profissional no decorrer dos anos de graduação e doutorado;

À CAPES e ao CNPq pelo financiamento da pesquisa.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

“Quem quer passar além do Bojador
tem que passar além da dor.”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 9 |
| LISTA DE TABELAS | 160 |
| LISTA DE FIGURAS | 16 |
| RESUMO..... | 12 |
| ABSTRACT..... | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 Considerações iniciais..... | 14 |
| 1.2 Gênero <i>Exiguobacterium</i>..... | 15 |
| 1.2.1 <i>Exiguobacterium antarcticum</i> | 17 |
| 1.2.1.1 <i>Exiguobacterium antarcticum</i> B7 | 18 |
| 1.2.1.1.1 Genômica..... | 19 |
| 1.2.1.1.2 Transcriptômica..... | 20 |
| 1.2.1.1.3 Proteômica | 20 |
| 1.2.1.1.4 Biossíntese de Ácidos Graxos da bactéria <i>Exiguobacterium antarcticum</i> B7 | 20 |
| 1.3 Biologia de Sistemas | 23 |
| 1.3.1 Reconstrução de Modelos Metabólicos | 24 |
| 1.3.1 Análise de modelos metabólicos | 25 |
| 1.3.1.1 Análise de Balanço de Fluxo (ABF) | 25 |
| 1.3.1.2 Modos Elementares (ME)..... | 28 |
| 1.4 Bancos de Dados e Ferramentas Genômicas..... | 28 |
| 1.4.1 <i>National Center for Biotechnology Information</i> (NCBI)..... | 28 |
| 1.4.2 <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> (KEGG)..... | 29 |
| 1.4.3 Servidor RAST | 29 |
| 1.4.4 <i>System Biology Markup Language</i> (SBML) | 30 |
| 1.4.5 MATLAB® | 31 |
| 2 OBJETIVOS | 32 |
| 2.1 Geral | 32 |

| | | |
|-----|----------------------------------|----|
| 2.1 | Específicos..... | 32 |
| 3 | ARTIGO | 33 |
| 4 | DISCUSSÃO | 64 |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 68 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 69 |
| 7 | APÊNDICES..... | 77 |
| 7.1 | Apêndice 1 | 77 |
| 7.2 | Apêndice 2 | 82 |
| 7.3 | Apêndice 3 | 84 |
| 7.4 | Apêndice 4 | 85 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| ABF | Análise de Balanço de Fluxo (do inglês <i>Flux balance analysis</i>) |
| AcCOA | Acetil-CoA |
| ACP | Proteína carreadora de acil (do inglês <i>acyl carrier protein</i>) |
| ATP | Trifosfato de adenosina (do inglês <i>Adenosine triphosphate</i>) |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| COA | Coenzima A |
| COBRA | Análise e reconstrução baseada em restrições (do inglês <i>COnstraints Based Reconstruction and Analysis</i>) |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| Eab7 | <i>Exiguobacterium antarcticum</i> linhagem B7 |
| FAS | Sistema de síntese de ácidos graxos (do inglês <i>fatty acid synthesis</i>) |
| GPR | Gene-Proteína-Reação |
| KAAS | Servidor de anotação automático do KEGG (do inglês <i>KEGG automatic annotation server</i>) |
| KEGG | Enciclopédia de genes e genomas de Kyoto (do inglês <i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>) |
| KGML | Linguagem de marcação do KEGG (do inglês <i>KEGG Markup Language</i>) |
| LPDNA | Laboratório de Polimorfismo de DNA |
| ME | Modos Elementares |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo – reduzida |
| NADP | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – reduzida |
| NCBI | Centro Nacional de Informações em Biotecnologia (do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>) |
| PROANTAR | Programa Antártico Brasileiro |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| rRNA | RNA ribossomal |
| RPKM | (do inglês <i>Reads Per Kilobase per Million mapped reads</i>) |
| SBML | Linguagem de Marcação de Biologia de Sistemas (do inglês <i>Systems Biology Markup Language</i>) |
| tRNA | RNA transportador |
| XML | Linguagem de Marcação de Dados (do inglês <i>Extensible Markup Language</i>) |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Conteúdo genômico das bactérias: psicrotólicas *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 e *Exiguobacterium antarcticum* B7; termofílica *Exiguobacterium* sp. AT1b, e psicrófila *Exiguobacterium* sp. MH3 (Fonte: NCBI)..... 17

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Posicionamento das categorias de micro-organismos de acordo com a faixa de temperatura onde se encontram as suas temperaturas ótimas de crescimento. Fonte: Dall’Agnol, 2012..... 14
- Figura 2.** Morfologia celular, por microscopia de contraste de fases de *E. sibiricum* linhagem 7-3. (A) crescimento a 24°C, 6 dias; (B) crescimento a -6°C, 43 dias; barra de escala corresponde a 5µm. Fonte: Carneiro, 2012..... 16
- Figura 3.** Imagem do local de isolamento de *E. antarcticum* B7. À esquerda, imagem do lago Ginger, Ilha Rei George, Península Antártica (Foto de Piotr Angiel). À direita, biofilme no referido lago onde as amostras foram coletadas. Fonte: Arquivo pessoal da Dra. Pellizari 19
- Figura 4.** Sistema FASII (*Fatty Acid Synthase* II) de síntese de novo de ácidos graxos de cadeia longa em bacilos gram-positivos da bactéria *E. antarcticum* B7. Os mesmos genes para o metabolismo dos ácidos graxos foram descritos no genoma da *Bacillus subtilis*, exceto para os genes *fabHA*, *fabHB* marcado com um X na figura. A primeira enzima envolvida é a acetil-CoA carboxilase, enzima multi-subunidades (AccABCD) (1) que catalisa a produção de malonil-CoA a partir de acetil-CoA. Em seguida, malonil-CoA é transferido para a proteína carreadora de acil-ACP pela enzima malonil-CoA-ACP transacilase (FabD) (2), gerando malonil-ACP. A biossíntese de ácidos graxos, propriamente dita, é iniciada pela condensação de malonil-ACP e acetil-CoA, catalisada pela enzima 3-oxoacil-ACP sintase III (FabH1) (3a). Após condensação a molécula crescente de ácido graxo passa por diversas reações mediadas pelos genes *fabG* (4), *fabZ* (5), *fabI* (6) e *plsX* (7). Ao final do primeiro ciclo uma

nova molécula de Acil-ACP com dois carbonos a mais na estrutura é gerada e utilizada para subseqüentes rodadas de alongamento catalisadas pela enzima FabF (3b). Quando a molécula de ácido graxo (Acil-ACP) atinge o tamanho esperado, ela sofre ação das enzimas PlsY (8) e PlsC (9) para gerar o produto intermediário da síntese. A expressão dos genes destacados em um círculo cinza é controlada pela proteína FapR, a qual é antagonizada pela molécula de Malonil-CoA. Figura adaptada de Schujman e Mendoza (2008)..... 22

Figura 5. Base conceitual da modelagem de sistemas baseada em restrições. Da esquerda para a direita: o primeiro gráfico corresponde a um espaço de soluções para um sistema biológico sem aplicação de restrições; o segundo gráfico mostra um espaço de solução permitido depois de aplicadas as restrições ao sistema; o terceiro gráfico mostra o ponto aonde a função objetivo Z é maximizada. Fonte: Orth et al., 2010 27

RESUMO

A modelagem matemática *in silico* baseada em restrições é uma abordagem adotada pela Biologia de Sistemas para analisar redes metabólicas. A bactéria Gram-positiva *Exiguobacterium antarcticum* B7 é um extremófilo capaz de sobreviver em ambientes frios como gelo glacial e *permafrost*. A capacidade de adaptação ao frio desses micro-organismos vem despertando grande interesse biotecnológico. Um fator importante para o entendimento do processo de adaptação ao frio está relacionado à modificação química de ácidos graxos que constituem a membrana celular das bactérias psicotróficas. A finalidade é manter a fluidez da membrana para evitar o congelamento da bactéria. Neste trabalho, a via metabólica de biossíntese de ácidos graxos da bactéria *E. antarcticum* B7 foi reconstruída a partir do genoma anotado disponível. As ferramentas de software KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e RAST (*The Rapid Annotation Server*) foram utilizadas para gerar o modelo preliminar da rede. O passo seguinte foi a etapa de cura manual baseada na combinação de informações genômicas, bioquímicas e fisiológicas disponíveis em diversos bancos de dados e literatura especializada. Durante este processo, as enzimas FabZ e DesK, responsáveis por adicionar insaturações na cadeia carbono-carbono ao longo da síntese de ácidos graxos, foram identificadas no genoma, entretanto de forma truncada. O fluxoma da via metabólica foi definido com a descrição das rotas das principais reações, desde o metabólito de entrada, o Acetil-CoA, até o produto final, o ácido Hexadecenóico. A modelagem computacional foi feita com o uso do software MATLAB® juntamente com *toolboxes* e funções específicos para biologia de sistemas. A quantificação de metabólitos produzidos pela via foi realizada por meio do método baseado em restrições Análise de Balanço de Fluxos (ABF). Para avaliar a influência da expressão gênica na análise do fluxoma, o método ABF foi calculado usando os valores de \log_2FC obtidos na análise transcriptoma a 0°C e 37°C. A via de biossíntese de ácido graxos possui um total de 13 rotas identificadas pelo método Modo Elementar, quatro das quais apresentam caminhos para a produção de ácido hexadecenóico. A via reconstruída demonstrou a capacidade da *E. antarcticum* B7 em produzir moléculas de ácidos graxos. Sob a influência do transcriptoma, o fluxoma foi alterado, estimulando a produção de cadeia curta em ácidos graxos. Os modelos obtidos contribuem para um melhor entendimento da adaptação bacteriana a ambientes frios.

Palavras Chave: *Exiguobacterium antarcticum* B7; biossíntese de ácidos graxos; reconstrução de vias metabólicas; análise baseada em restrições; transcriptoma.

ABSTRACT

Mathematical modeling *in silico* based restrictions is an approach adopted by systems biology to analyze metabolic networks. The Gram-positive bacterium *Exiguobacterium antarcticum* B7 is an extremophile organism able to survive in cold environments as glacial ice and *permafrost*. The ability of these microorganisms of adaptation to cold attracts great biotechnological interest. An important factor for the understanding of cold adaptation process is related to the chemical modification of fatty acids constituting the cell membrane of psychotrophic bacteria in order to maintain membrane fluidity to avoid freezing of the bacteria. In this work, the metabolic pathway of fatty acid biosynthesis of the bacterium *E. antarcticum* B7 was rebuilt from its annotated genome. The software tools KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) and RAST (*The Rapid Annotation Server*) were used to generate a preliminary network model. The next step was to cure manually the genomic, biochemical and physiological informations available in different databases and specific literature. During this process, the FabZ and DesK enzymes responsible for adding carbon-carbon unsaturations in the fatty acid chain during synthesis have been identified in the genome, though in a truncated form. The fluxome metabolic pathway was defined, describing the routes of the main reactions since the first monomer, Acetyl-CoA, to the final product, the Hexadecenoic acid. A computational modeling was done using the software MATLAB[®] with toolboxes and specific tools for systems biology. The quantification of metabolites produced via was performed by the method constraint-based Flux Balance Analysis (FBA). To evaluate the influence of the gene expression in the fluxome analysis, the FBA method was also calculated using the *log2FC* values obtained in the transcriptome analysis at 0°C and 37°C. The fatty acid biosynthesis pathway showed a total of 13 elementary flux modes, four of which showed routes for the production of hexadecenoic acid. The reconstructed pathway demonstrated the capacity of *E. antarcticum* B7 to produce fatty acid molecules. Under the influence of the transcriptome, the fluxome was altered, promoting the production of short-chain fatty acids. The calculated models contribute to better understand the bacterial adaptation at cold environments.

Key-words: *Exiguobacterium antarcticum* B7, fatty acids biosynthesis, metabolic pathway reconstruction; analysis based on constraints; transcriptome.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

Os procariotos denominados extremófilos possuem a capacidade de sobreviver em condições ambientais extremas. Esses micro-organismos se adaptam a uma ampla faixa de condições físico-químicas, como variações de temperatura, pressão, salinidade, pH, radiação, entre outras (Cava *et al.*, 2009; Ambily Nath & Loka Bharathi, 2011).

Considerada um dos fatores físicos limitantes para a vida, a temperatura determina a distribuição dos seres pelo globo terrestre; classificando os organismos em psicrófilos, aqueles que crescem em temperaturas abaixo de 15°C; termófilos, os que se desenvolvem em temperaturas acima de 50°C; e em mesófilos, que crescem em temperaturas “normais”, entre estes extremos (Cava *et al.*, 2009; Ayala-del-Rio *et al.*, 2010; Dall’Agnol, 2012) (Figura 1).

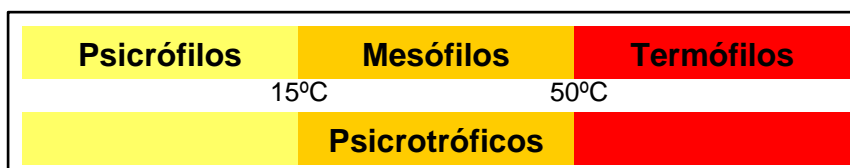


Figura 1 – Posicionamento das categorias de micro-organismos de acordo com a faixa de temperatura onde se encontram as suas temperaturas ótimas de crescimento. Fonte: Dall’Agnol, 2012.

Além da classificação anterior, os micro-organismos adaptados ao frio também podem ser organizados de acordo com a temperatura ótima de crescimento, sendo os psicrotróficos ou psicrotolerantes capazes de crescer em temperaturas abaixo de 15°C, e com temperaturas ótimas de crescimento mais elevadas, em torno de 20 a 40 °C (Casanueva *et al.*, 2010).

A Antártica é um dos ambientes mais hostis do planeta e os locais de sobrevivência de micro-organismos incluem neve, gelo glacial, águas marinhas, ar, solos de superfície e solos permanentemente congelados (*permafrost*). Por

possuírem características peculiares de adaptação ao frio, os seres psicrófilos e psicrotróficos, habitantes dessa região, são dotados de mecanismos de adaptação fisiológica, como: aumento da fluidez das membranas celulares; redução do ponto de congelamento da fase aquosa do citoplasma e estabilização de macromoléculas; resposta celular a diminuição de temperatura e manutenção da eficiência catalítica no frio (Casanueva *et al.*, 2010).

A compreensão dos mecanismos de modificações celulares que possibilitam a sobrevivência de micro-organismos em condições físico-químicas ótimas em baixas temperaturas vem despertando interesse na indústria biotecnológica. As proteínas de aclimatação térmica e as enzimas como proteases, lipases e celulasas podem ser utilizadas na indústria alimentícia; como biossensores; para biorremediação ambiental; na indústria farmacêutica, além de outras aplicações (Adrio & Demain, 2014; Margesin & Feller, 2010; Casanueva *et al.*, 2010).

1.2 Gênero *Exiguobacterium*

O gênero *Exiguobacterium* foi descrito como um novo táxon em 1983 por Collins e colaboradores, com a classificação da espécie *Exiguobacterium aurantiacum*. As espécies deste gênero são Gram-positivas, anaeróbios facultativos, com morfologia diversa: ovóides ou bacilares, em arranjo isolado, aos pares ou em cadeias, dependendo da cepa e das condições ambientais (Figura 2). Apresentam colônias convexas, pigmentadas em tons variados de laranja e não formam esporos. Possuem propriedades bioquímicas como: catalase positivo e oxidase variável (Vishnivetskaya *et al.*, 2007; Vishnivetskaya *et al.*, 2009).

Diversos estudos sinalizam importantes propriedades de membros deste gênero, despertando interesse em seu potencial para aplicações biotecnológicas: a linhagem YS1 produz uma protease alcalina que pode ser usada no tratamento de lodo ativado (Lee *et al.*, 2009); a linhagem

Exiguobacterium sp. TL, por ser tolerante a sal, pode ser aplicada para o biotratamento de resíduos de corantes usados na indústria têxtil (Tan *et al.*, 2009); linhagens como a GS1 e a ZM2 podem transportar e reduzir o cromo hexavalente (Cr^{6+}) rapidamente, diminuindo a poluição por esse metal (Alam & Malik, 2008; Okeke, 2008); homólogos de genes do operon de resistência bacteriana ao mercúrio foram identificados na linhagem *Exiguobacterium* sp. ED5138-1 (Petrova *et al.*, 2002).

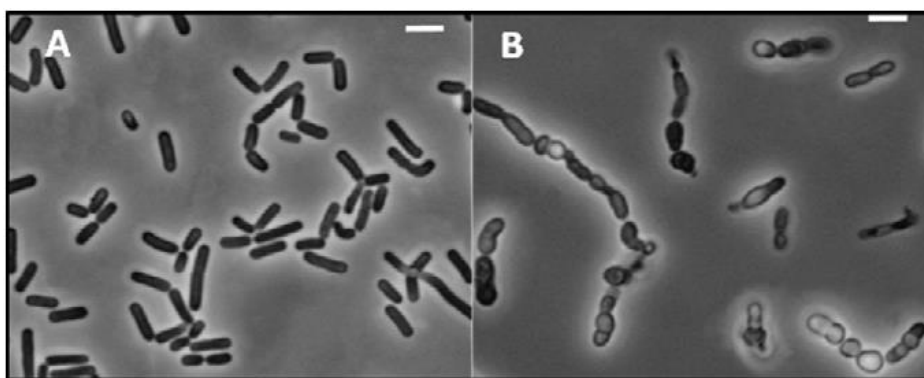


Figura 2 – Morfologia celular, por microscopia de contraste de fases de *E. sibiricum* linhagem 7-3. (A) crescimento a 24°C, 6 dias; (B) crescimento a -6°C, 43 dias; barra de escala corresponde a 5µm. Fonte: Carneiro, 2012.

Até o momento, o NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) tem depositado mais de 30 montagens do gênero *Exiguobacterium*. Desse total, apenas quatro espécies estão com seus genomas completos (Tabela 1): a espécie psicotrófica *Exiguobacterium sibiricum*, linhagem 255-15, isolada do *permafrost* siberiano a -10°C, em uma camada geológica com idade estimada entre 2 e 3 milhões de anos (Rodrigues *et al.*, 2008); a linhagem termofílica *Exiguobacterium* sp. AT1b, isolada de uma fonte termal com águas levemente alcalinas, do Parque Nacional de Yellowstone nos Estados Unidos (Rodrigues *et al.*, 2008, Vishnivetskaya *et al.*, 2009, Vishnivetskaya *et al.*, 2011). Em 2011, Karami e colaboradores isolaram esta bactéria de amostras de sedimento de regiões próximas à unidade petroquímica de Mahshahr, Golfo Pérsico, demonstrando que esta linhagem é capaz de crescer em altas concentrações de mercúrio; a bactéria psicotrófica

Exiguobacterium antarcticum linhagem B7, micro-organismo alvo deste trabalho, isolada de um biofilme do lago alcalino Ginger, localizado na Península Antártida (Carneiro *et al.*, 2012) e a linhagem *Exiguobacterium* sp. MH3, isolada da rizosfera de uma *Lemna minor* (lentilha da água), coletada em Shenzhen, China (Tang *et al.*, 2013).

Tabela 1. Conteúdo genômico das bactérias: psicrotróficas *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 e *Exiguobacterium antarcticum* B7; termofílica *Exiguobacterium* sp. AT1b, e psicrofílica *Exiguobacterium* sp. MH3 (Fonte: NCBI).

| <i>Exiguobacterium</i> Linhagem | <i>sibiricum</i> 255-15 | | | AT1b | <i>antarcticum</i> B7 | MH3 |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|-----------|--------------------------|------------|
| DNA circular | Cromosomo | Plasmídeo pEXIG01 | Plasmídeo pEXIG02 | Cromosomo | Cromossomo | Cromossomo |
| GenBank ID* | CP001022 | CP001023 | CP001024 | CP001615 | CP003063 | CP006866 |
| Tamanho (pb) | 3.034.136 | 4.885 | 1.765 | 2.999.895 | 2.815.863 | 3.164.195 |
| Conteúdo GC(%) | 47,7 | 37,1 | 41,4 | 48,5 | 47,5 | 47,2 |
| Genes | 3100 | 5 | 2 | 3092 | 2900 | 3267 |
| Proteínas | 2979 | 5 | 2 | 2989 | 2736 | 3160 |
| RNAs estruturais | 97 | - | - | 96 | 94 | 87 |
| Pseudogenes | 24 | - | - | 7 | 70 | 20 |

1.2.1 *Exiguobacterium antarcticum*

A classificação taxonômica posiciona esta espécie no Domínio Bacteria; Reino Bacteria; Filo Firmicutes; Classe Bacilli; Ordem Bacillales; Bacillales incertae sedis; Bacillales Família XII. *Incertae Sedis*; Gênero *Exiguobacterium*; Espécie *Exiguobacterium antarcticum* Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>.

Esta espécie foi descrita por Frühling e colaboradores, em 2002. Coletada no lago Frixell na Antártica, foi isolada de biofilmes microbianos e designada de linhagem H2^T (DSM14480^T, EMBL AJ297437) (Brambilla *et al.*,

2001). Este micro-organismo apresenta características comuns aos demais membros do gênero, como morfologia bacilar, motilidade por flagelos peritríquios e colônias convexas com pigmentação laranja brilhante. É capaz de crescer em condições aeróbicas e anaeróbicas, em temperaturas de 20°C a 40°C, mas não a 45°C, sendo 37°C definida como a sua temperatura ótima de crescimento (Fruhling *et al.*, 2002).

É incontestável a importância da Antártica para o equilíbrio térmico de nosso planeta. Os seus 14 milhões de quilômetros quadrados espalhados em uma variedade de nichos ambientais, funcionam como um laboratório natural e único, possibilitando caracterizar a diversidade microbiana por meio de estudos que usam técnicas de biologia molecular. Os dados gerados por estes métodos permitem uma análise genômica, transcriptômica e proteômica de membros da comunidade microbiana, como a *E. antarcticum*. O estudo de dados ômicos pode ajudar a elucidar os mecanismos de adaptação e sobrevivência a condições ambientais extremas, bem como possibilitar a identificação de propriedades bacterianas de interesse biotecnológico (Dall'agnol *et al.*, 2014).

1.2.1.1 *Exiguobacterium antarcticum* B7

A *Exiguobacterium antarcticum* linhagem B7 é uma bactéria psicotrófica, isolada de biofilme microbiano do lago alcalino Ginger, localizado na Ilha Rei George, Península Antártica. A denominação desse lago, Ginger (em Português: cor ruiva), é devido à coloração de suas águas (Figura 3); sua formação é resultado do derretimento glacial na região Antártica no período de cerca de 20 anos; e sua localização geográfica está sob as coordenadas — 62° 12' 37" S – 58° 27' 25" W, 85 m a.s.l. (Dall'agnol, 2012; Pudelko, 2003).

A *E. antarcticum* B7 foi coletada na Antártica pelo Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR), em 2007. O isolamento e a identificação da bactéria foram feitos pelo grupo de pesquisadores do projeto CNPq/PROANTAR “Microbiologia Antártica: Biodiversidade, Ecologia e aplicações tecnológicas”;

projeto coordenado e desenvolvido pela pesquisadora Dra. Vivian Helena Pellizari (Instituto Oceanográfico – USP). O PROANTAR situa-se na Base Brasileira Comandante Ferraz, localizada na Baía do Almirantado, Ilha Rei George.

A partir de uma parceria firmada entre a equipe da USP e o Laboratório de polimorfismo de DNA (LPDNA) da Universidade Federal do Pará, a linhagem B7 de *E. antarcticum* foi cedida para estudos genômicos, transcriptômicos e proteômicos, dentro do contexto da Rede Paraense de Genômica e Proteômica (RPGP).



Figura 3 – Imagem do local de isolamento de *E. antarcticum* B7. À esquerda, imagem do lago Ginger, Ilha Rei George, Península Antártica (Foto de Piotr Angiel). À direita, biofilme no referido lago onde as amostras foram coletadas. Fonte: Arquivo pessoal da Dra. Pellizari.

1.2.1.1.1 Genômica

O genoma da *E. antarcticum* B7 foi sequenciado, montado, anotado e curado pelo grupo de pesquisa do LPDNA (Laboratório de Polimorfismo de DNA) da UFPA. Este estudo gerou a tese de doutorado de Adriana Ribeiro Carneiro em 2012 (Carneiro, 2012). Atualmente, o genoma completo da *E. antarcticum* B7 encontra-se depositado no NCBI, acesso CP003063, com tamanho de 2,82 Mb, conteúdo G+C de 47,48%, 2.900 sequencias codificadoras (CDSs), 2.736 proteínas, 27 rRNAs, 67 tRNAs e 70 pseudogenes (Carneiro *et al.*, 2012); disponível em (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/11760>).

1.2.1.1.2 Transcriptômica

O estudo do transcriptoma da *E. antarcticum* linhagem B7 deu origem à tese de doutorado de Hivana Patrícia Melo Barbosa Dall'Agnol (Dall'Agnol, 2012). Nesta pesquisa foram realizadas as análises dos transcriptomas, por meio de RNA-seq, da bactéria alvo a 0°C e a 37°C. Este trabalho identificou as mudanças no perfil transcricional da *E. antarcticum* B7 provocadas pela variação de temperatura, especialmente a 0°C, confirmando o papel essencial de genes codificantes de proteínas de adaptação ao frio.

1.2.1.1.3 Proteômica

Uma abordagem proteômica para caracterizar o perfil de expressão protéica da *E. antarcticum* B7, cultivada a 0°C e 37°C, foi realizada na tese de doutorado de Rafael Azevedo Baraúna (Baraúna, 2014). Este trabalho integrou os dados de expressão protéica aos dados de transcriptoma gerados por Dall'Agnol (2012), com a finalidade de realizar uma análise mais robusta sobre o processo de adaptação da bactéria ao frio. Como resultado foi percebido que a *E. antarcticum* B7 possui uma rede regulatória de expressão gênica complexa, que garante sua sobrevivência em ambientes com grande variação de temperatura. Para se adaptar a estas variações, a bactéria aumenta a expressão da proteína de choque frio com a finalidade de estabilizar as moléculas de RNA do citosol bacteriano, além de realizar modificação química dos ácidos graxos que compõem a membrana celular para garantir a sobrevivência da bactéria no frio.

1.2.1.1.4 Biossíntese de Ácidos Graxos da bactéria *Exiguobacterium antarcticum* B7

A temperatura interna dos micro-organismos é semelhante ou idêntica à temperatura ambiental devido à ausência de uma regulação térmica celular.

Com isso, percebe-se que os organismos psicrotróficos possuem elementos estruturais e funcionais adaptados a ambientes frios (Dall'Agnol *et al.*, 2014). Com a diminuição da temperatura há uma elevação no grau de insaturação dos ácidos graxos, acarretando uma redução do tamanho médio das moléculas e um aumento da quantidade de grupos metila nas ramificações da cadeia (Casanueva *et al.*, 2010; Chattopadhyay, 2006). A finalidade dessas modificações é manter a fluidez da membrana para não comprometer a condução de moléculas através das barreiras celulares. A adição de insaturações nas cadeias lineares de ácidos graxos muda entre os microorganismos. Em bactérias Gram-positivas da ordem *Bacillales*, na qual a *E. antarcticum* B7 se posiciona, este mecanismo é regulado pelo sistema de dois componentes DesR-DesK (Aguilar *et al.*, 2001).

A FapR é a principal proteína reguladora da síntese de ácidos graxos nas bactérias. Segundo Schujman e Mendoza (2008), ela é responsável por ativar/desativar um regulon composto por seis operons na bactéria *B. subtilis*, espécie classificada na mesma ordem taxonômica da *E. antarcticum* B7. Todos os genes deste regulon estão diretamente envolvidos na síntese de novo e alongamento das cadeias de ácido graxo. Já na *E. antarcticum* B7 (Figura 4), os genes *fabHA*, *fabHB* e *yhfC* não estão presentes. Portanto presume-se que o regulon é composto por apenas cinco operons: *fabH1-fabF*; *fabI*; *fapR-plsX-fabD-fabG*; *plsC*; *fabZ*.

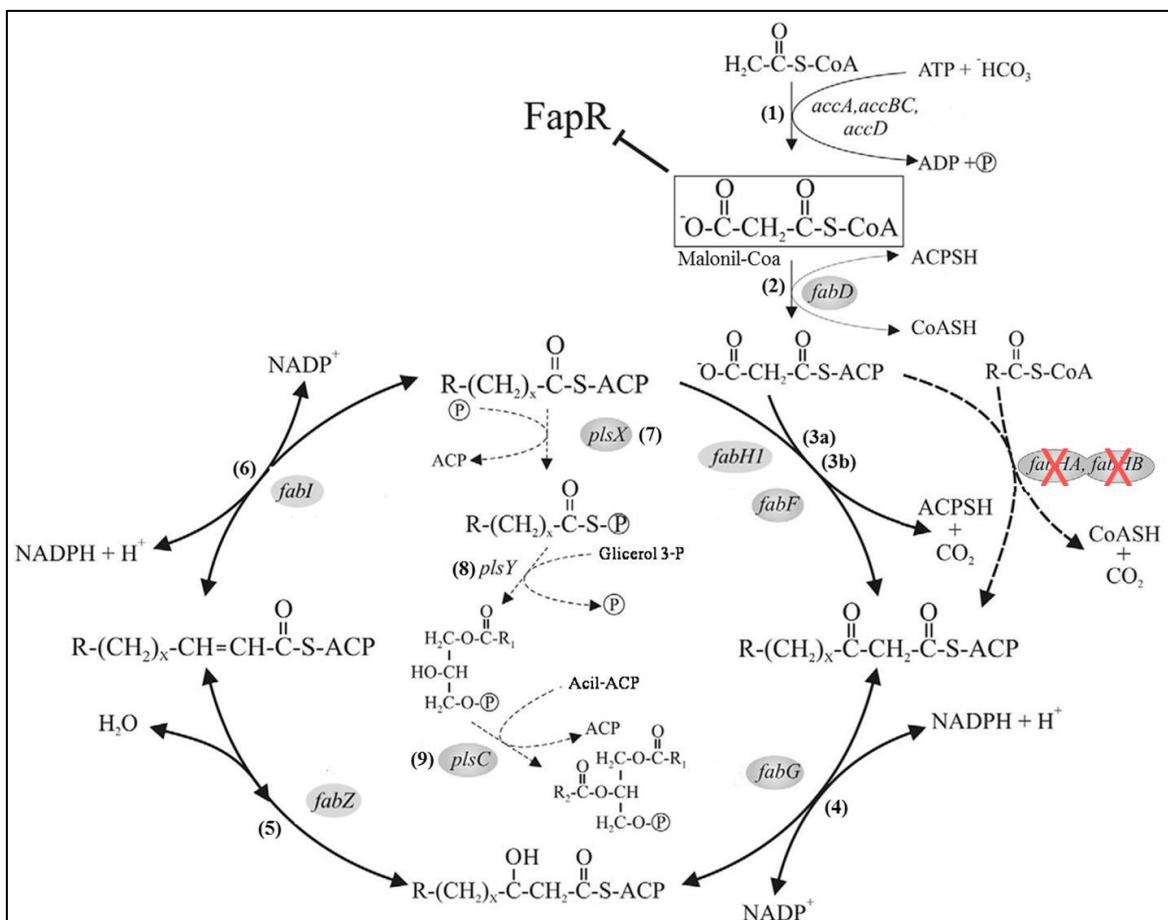


Figura 4 – Sistema FASII (Fatty Acid Synthase II) de síntese de novo de ácidos graxos de cadeia longa em bacilos gram-positivos da bactéria *E. antarcticum* B7. Os mesmos genes para o metabolismo dos ácidos graxos foram descritos no genoma da *Bacillus subtilis*. Os genes *fabHA*, *fabHB* marcado com um X na figura estão presentes na *B. subtilis*, mas ausentes em *E. antarcticum* B7. A primeira enzima envolvida é a acetil-CoA carboxilase, enzima multi-subunidades (AccABCD) (1) que catalisa a produção de malonil-CoA a partir de acetil-CoA. Em seguida, malonil-CoA é transferido para a proteína carreadora de acil-ACP pela enzima malonil-CoA-ACP transacilase (*FabD*) (2), gerando malonil-ACP. A biossíntese de ácidos graxos, propriamente dita, é iniciada pela condensação de malonil-ACP e acetil-CoA, catalisada pela enzima 3-oxoacil-ACP sintase III (*FabH1*) (3a). Após condensação a molécula crescente de ácido graxo passa por diversas reações mediadas pelos genes *fabG* (4), *fabZ* (5), *fabI* (6) e *plsX* (7). Ao final do primeiro ciclo uma nova molécula de Acil-ACP com dois carbonos a mais na estrutura é gerada e utilizada para subsequentes rodadas de alongamento catalisadas pela enzima *FabF* (3b). Quando a molécula de ácido graxo (Acil-ACP) atinge o tamanho esperado, ela sofre ação das enzimas *PlsY* (8) e *PlsC* (9) para gerar o produto intermediário da síntese. A expressão dos genes destacados em

um círculo cinza é controlada pela proteína FapR, a qual é antagonizada pela molécula de Malonil-CoA. Figura adaptada de Schujman e Mendoza (2008).

1.3 **Biologia de Sistemas**

É uma área multidisciplinar que integra conhecimentos da Biologia, Química, Engenharia, Física, Matemática e Computação para melhorar o entendimento de processos biológicos. A Biologia de Sistemas permite entender a funcionalidade e descrever o comportamento de um sistema biológico por meio do uso de métodos matemáticos e técnicas *in silico* (Brunk *et al.*, 2016; Snoep & Westerhoff, 2005).

A Biologia de Sistemas adota o ponto de vista holístico, indo contra a maré reducionista que tomou conta da Biologia Molecular desde as publicações do modelo de DNA (Watson & Crick, 1953) e do dogma central da biologia molecular (Crick, 1970). O surgimento das tecnologias "ômicas", como genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, propiciou a geração de uma grande quantidade de dados multiescalares, o que contribuiu fortemente para a transição do paradigma reducionista para o holístico. Neste, o estudo para decifrar a complexidade de um sistema biológico começa com a descrição do sistema como uma entidade única para, posteriormente, ser decomposto em partes a serem analisadas (Hyduke *et al.*, 2013; Kitano, 2002). A Biologia de Sistemas se baseia no entendimento de que o todo é maior do que a soma das partes (Bruggeman & Westerhoff, 2007; Yurkovich & Palsson, 2016). O objetivo principal é encontrar novos mecanismos moleculares por meio de um ciclo iterativo que começa com os dados experimentais do genoma, seguido da análise e integração de dados, e finalizando com a formulação de hipóteses referentes à regulação de tais grupos de moléculas (Palsson, 2015). A representação de um sistema biológico é feita por meio de redes, onde é possível visualizar a relação entre as reações bioquímicas, os substratos consumidos e os produtos formados; fornecendo assim, uma visão global do sistema (Bruggeman & Westerhoff, 2007).

1.3.1. Reconstrução de Modelos Metabólicos

A reconstrução de um modelo metabólico é, essencialmente, a organização e a montagem sistemática de todas as reações bioquímicas que constituem o metabolismo de um dado organismo (Borodina & Nielsen, 2005; Chen *et al.*, 2013; Lerman *et al.*, 2012; Thiele & Palsson, 2010). Esta ideia pressupõe que se uma reação bioquímica ocorre em um organismo é possível reconstruir essa mesma reação por meio das informações encontradas no genoma do organismo alvo (Schilling *et al.*, 1999; Oberhardt *et al.*, 2009; Papin *et al.*, 2003; Baart & Martens, 2012).

O processo de reconstrução de um modelo metabólico começa com um genoma anotado. As informações dessa sequência devem ser processadas com a finalidade de se identificar todas as reações bioquímicas realizadas pelo organismo, conhecendo, para cada reação, quais são os substratos, cofatores (se houver), produtos gerados, estequiometria, reversibilidade e localização celular (Papin *et al.*, 2003). Este modelo-rascunho ainda deve ser corrigido com informações de diversos bancos de dados e da literatura específicos para evitar a presença de reações falsas positivas e falsas negativas. Alguns trabalhos recentes descrevem detalhadamente este processo, tentando estabelecer um protocolo comum (Feist *et al.*, 2009; Thiele & Palsson, 2010). Esse processo termina com uma rede de metabólitos e enzimas que representam as reações bioquímicas realizadas pela célula. Os nós de uma rede representam metabólitos e as arestas são os fluxos metabólicos ou as taxas das reações bioquímicas. Os fluxos podem ser internos (reações que ocorrem no interior celular) ou de troca (processos de aquisição de substratos e exportação de produtos).

Todo o processo de reconstruir redes metabólicas pode ser resumido em quatro passos: 1) Identificação de todos os componentes dentro de uma célula (proteínas, reações bioquímicas, entre outras); 2) Os elementos identificados no passo anterior são conectados, formando um mapa da rede; 3) as redes produzidas na etapa anterior são traduzidas em formato matemático e

computacional; e 4) o modelo construído deve ser avaliado para verificar se o mesmo reproduz o sistema biológico estudado de forma fidedigna.

Após a obtenção de um modelo completo e validado, essa rede metabólica poderá ser utilizada como ponto de partida para diversos outros estudos, tais como: conectividade da rede (Alon, 2003), comparação evolutiva para busca de padrões entre organismos (Milo *et al.*, 2002), melhoramento genético (Famili *et al.*, 2003), estudos de robustez da rede metabólica (Stelling *et al.*, 2002) e análise de fluxo metabólico e variabilidade da rede (Burgard *et al.*, 2004).

1.3.2 Análise de modelos metabólicos

1.3.2.1 Análise de Balanço de Fluxo (ABF)

A Análise de Balanço de Fluxo (do inglês *Flux-balance analysis* – FBA) é uma abordagem amplamente utilizada para o estudo de redes metabólicas, principalmente nas reconstruções de redes em escala genômica. A ABF recupera as informações dos fluxos das reações e é fundamental para a localização de vias metabólicas e reações que tiveram seu fluxo alterado decorrente de uma variação ambiental e/ou genética (Orth *et al.*, 2010). Nesta análise, as relações quantitativas globais podem ser previstas entre as taxas de entrada de nutrientes, as taxas de subprodutos de saída e a taxa de crescimento (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

Conforme descrito por Orth *et al.*, 2010, reações metabólicas podem ser representadas como uma matriz estequiométrica S de tamanho $m \times n$. Cada linha desta matriz representa um único composto (para um sistema com m metabólitos) e cada coluna representa uma reação (n reações). Os valores de entrada desta matriz são os coeficientes estequiométricos dos metabólitos que estão participando de uma determinada reação. Valores positivos indicam que há um metabólito sendo produzido, enquanto que valores negativos apontam

para o consumo do metabólito. O coeficiente zero é usado para metabólitos que não participam da reação. Desta forma, S se apresenta como uma matriz grande, mas esparsa, pois a maioria das reações bioquímicas envolve somente alguns metabólitos diferentes. Logo, espera-se que o número de reações (n) exceda o número de metabólitos (m). O fluxo de todas as reações numa rede é representado pelo vetor v , que possui o tamanho n . As concentrações de todos os metabólitos são expressas pelo vetor x , de tamanho m .

Desta forma, pode-se representar matematicamente como a concentração de metabólitos varia em função do tempo:

$$\frac{dx_i}{dt} = S_{ij} \cdot v_j, \quad \forall i \in m, \forall j \in n$$

Porém, este conjunto de equações geradas resulta em um número infinito de soluções. Para resolver este problema é aplicada uma restrição ao modelo, assumindo que as concentrações dos metabólitos intracelulares não variam com o tempo, conseqüentemente sendo balanceadas. Com isto se tem o estado estacionário, que não permite o acúmulo de metabólitos internos. Entretanto, os metabólitos extracelulares podem mudar com o tempo, já que não estão balanceados, e serão os substratos absorvidos do meio e os produtos excretados pela célula. Assim, temos a seguinte equação:

$$S_{ij} \cdot v_j = 0, \quad \forall i \in m, \forall j \in n$$

O estado estacionário é amplamente aceito na biologia de sistemas, pois evita a necessidade de descrições detalhadas da dinâmica do metabolismo do organismo, incluindo a cinética das reações bioquímicas que, por muitas vezes, são difíceis de obter. Adicionalmente, o estado estacionário pode ser justificado pelo fato de que a ocorrência dos metabólitos transitórios é mais rápida que as taxas de crescimento celular e as mudanças dinâmicas no ambiente do organismo (Blazier & Papin, 2012). O metabolismo tipicamente possui metabólitos transitórios que duram pouco tempo e, portanto, os fluxos metabólicos estão em um estado quase estacionário em relação ao crescimento e alguns típicos processos transitórios (Varma & Palsson, 1994a).

Utilizando os dados obtidos e acrescentando mais restrições e informações, como reversibilidade das reações e requerimentos metabólicos conhecidos para o crescimento, pode-se encontrar e otimizar um vetor de fluxo, chamado de função objetivo (Z). A meta desta função pode ser maximizar o crescimento (produção de biomassa) e/ou a produção de determinado(s) metabólito(s) (Pardelha *et al.*, 2012) (Figura 5). Sem nenhuma restrição, a distribuição do fluxo de uma rede biológica pode resultar em uma solução em qualquer ponto do espaço de soluções. Quando restrições no balanceamento de massa são aplicadas à matriz S e restrições biológicas são aplicadas à rede, é definido um possível espaço de solução. A rede pode adquirir qualquer distribuição de fluxo dentro deste espaço, mas os pontos fora dele são negados pelas restrições. Através da otimização da função objetivo Z , a ABF pode identificar uma única distribuição de fluxo ótima que recai na extremidade do espaço de solução permitido. Deste modo, pode-se obter o fluxoma do modelo metabólico.

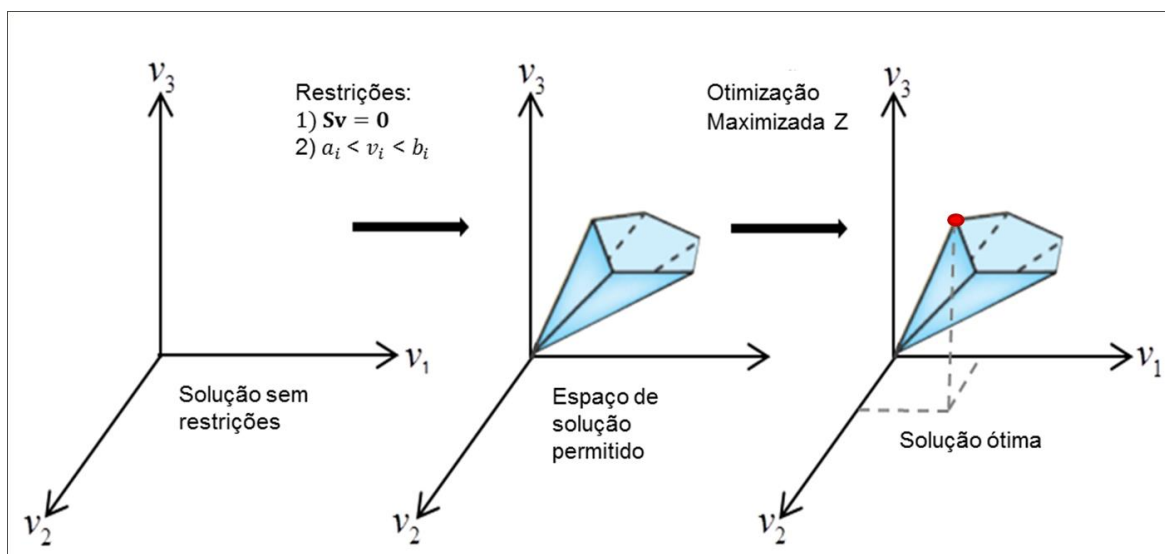


Figura 5. Base conceitual da modelagem de sistemas baseada em restrições. Da esquerda para a direita: o primeiro gráfico corresponde a um espaço de soluções para um sistema biológico sem aplicação de restrições; o segundo gráfico mostra um espaço de solução permitido depois de aplicadas as restrições ao sistema; o terceiro gráfico mostra o ponto aonde a função objetivo Z é maximizada. Fonte: Orth *et al.*, 2010.

1.3.2.2 Modos Elementares (ME)

Em situações onde não há uma função objetivo a ser otimizada e todos os fluxos possuem a mesma importância, uma questão interessante é encontrar o conjunto de fluxos que forma um Modo Elementar (ME).

Modo Elementar é um método que calcula todas as possíveis soluções de fluxos em um espaço amostral, de acordo com a equação abaixo:

$$S \cdot v = 0 \quad e \quad v_i \geq 0,$$

onde S é a matriz estequiométrica do modelo e v é o vetor de reações e i o índice das reações (Schuster *et al.*, 1999, Schuster *et al.*, 2000).

Cada solução representa um modo (fluxo) elementar. A indivisibilidade dos fluxos elementares garante a individualidade de cada ME, sendo que a remoção de qualquer reação do modo elementar automaticamente invalidará o caminho. Sendo assim, cada modo elementar pode ser definido como um conjunto mínimo de enzimas participantes de um fluxo completo (entrada de metabólito até a geração de um produto).

1.4 Bancos de Dados e Ferramentas Genômicas

Diversos bancos de dados e ferramentas computacionais têm sido criados com o objetivo de organizar e permitir o acesso rápido e eficiente às informações geradas pelas tecnologias de sequenciamento de nova geração. O armazenamento de dados de sequências de DNA e genomas inteiros, proteínas, assim como muitos outros elementos biológicos, têm ajudado o desenvolvimento da bioinformática e da biologia de sistemas ao disponibilizar todo esse conteúdo à comunidade científica.

1.4.1 *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)

O Centro Nacional de Informação Biotecnológica (do inglês, National Center for Biotechnology Information - NCBI) faz parte do Instituto Nacional de

Saúde dos Estados Unidos, foi criado em 1988, com o propósito de desenvolver sistemas de informações para a biologia molecular (Sayers *et al.*, 2012). O NCBI é formado por uma série de bancos de dados referenciais e textuais, sendo o GenBank (Benson *et al.*, 2012) um de seus principais. O GenBank é uma coleção de todas as sequências genéticas publicamente disponíveis; sua base de dados é formada por meio da colaboração internacional com o Banco de Dados de DNA do Japão (do inglês, *DNA Data Bank of Japan - DDBJ*), o Instituto de Bioinformática Europeu (do inglês, *European Bioinformatics Institute - EMBL-Bank*) e a comunidade científica. O NCBI também fornece sistemas de recuperação de dados e recursos computacionais para a análise de dados biológicos.

1.4.2 *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)

A Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (do inglês, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - KEGG*) é uma coleção de bancos de dados de genomas, de informações químicas e de interações moleculares (Gerasch *et al.*, 2014). O KEGG realiza a análise sistemática das funções dos genes, mostrando a ligação da informação genômica com suas funcionalidades de ordem superior. É composto por dezesseis bases de dados principais (Kanehisa *et al.*, 2006, 2010); um dos mais conhecidos é o KEGG Pathway, formado por um grande número de interações moleculares agrupados em vias bioquímicas (Goto *et al.*, 2001). Ele disponibiliza graficamente processos celulares, como o do metabolismo, o de transporte de membrana, e da transdução de sinal do ciclo celular.

1.4.3 Servidor RAST

O servidor para Anotação Rápida (de genoma) utilizando Tecnologia de Subsistema - RAST (do inglês, *Rapid Annotations using Subsystems Technology*) foi disponibilizado para acesso *online* em 2007. Destinado

inicialmente apenas para uso em pesquisas de patógenos, rapidamente o seu uso foi liberado à comunidade científica em geral devido à facilidade de uso e aos bons resultados apresentados. O RAST oferece o serviço de anotação totalmente automatizada de genomas completos ou quase completos de procariotos (arqueas e bactérias). Como saída, ele fornece uma avaliação das funções dos genes e uma reconstrução metabólica inicial feita pela execução do SEED (Aziz *et al.*, 2012; Overbeek *et al.*, 2014), um sistema criado para realizar genômica comparativa.

O RAST inicialmente cria um perfil funcional por meio de Subsistemas (Overbeek *et al.*, 2014; Keegan *et al.*, 2009). Estes são basicamente um conjunto de perfis funcionais associado a uma planilha que mapeia os genes de um genoma a suas respectivas funções. Quando se tem subsistemas bem anotados, pode-se identificar coleções de famílias proteicas, chamadas FIGfams. Os membros mapeados a um FIGfam exercem as mesmas funções. Os FIGfams formam o núcleo da tecnologia de anotação automática do RAST.

O RAST disponibiliza o resultado da anotação em diversos formatos, como GenBank, fasta, gff3, entre outros. Pode-se também exportar o resultado da reconstrução metabólica no formato de Linguagem de Marcação para Biologia de Sistemas - SBML (do inglês, *System Biology Markup Language*) que serve de entrada para outras ferramentas computacionais, como o COBRA toolbox do Matlab®.

1.4.4 *System Biology Markup Language* (SBML)

SBML é uma linguagem de marcação de biologia de sistemas utilizada para representar modelos de vias de reações químicas (Hucka *et al.*, 2003). Atualmente, a linguagem SBML encontra-se na versão 5, nível 2 (Hucka *et al.*, 2015).

Representações gráficas de modelos biológicos atuam como facilitadores na etapa de entendimento desses processos para os seres humanos; ao nível de software, um formato diferente é necessário para

quantificar esse modelo biológico para que o mesmo possa ser simulado computacionalmente. A SBML permite tornar o modelo biológico legível para a máquina. Ela é orientada a sistemas, onde são necessários que se descrevam todas as entidades biológicas envolvidas e modificadas por processos ao longo do tempo, como exemplo podemos citar uma rede de reações bioquímicas. Neste caso, a SBML modela uma reação bioquímica descrevendo seus elementos: reagentes, produtos, estequiometria, leis de velocidades e seus parâmetros (cinética da reação).

1.4.5 MATLAB®

O MATLAB® é um software comercial voltado para cálculo numérico bastante utilizado em diversas áreas da ciência, especialmente física e engenharia. A linguagem M, como também é conhecida, é baseada em script e possui um ambiente de desenvolvimento interativo e de fácil uso por parte do usuário, o que confere uma certa vantagem em relação a outros ambientes de programação como Java e C++ (Ullah *et al.*, 2006).

O elemento básico de informação do MATLAB® é uma matriz que não requer dimensionamento. Esta característica a torna primordial no processo de modelagem de sistemas biológicos, sobretudo os descritos por matrizes, como a matriz estequiométrica, importante no processo de modelagem de vias de reações bioquímicas.

O MATLAB® possui vários *toolboxes* específicos para modelagem e simulação. Essas *caixas de ferramentas* permitem ao programador usar funções pré-definidas ao criar um programa, reduzindo o tempo necessário para realizar esta tarefa. Para a modelagem de vias metabólicas reconstruídas baseadas em restrições o MATLAB disponibiliza a ferramenta de Reconstrução e Análise Baseada em Restrições - COBRA (do inglês, *CO*nstraint-*B*ased *R*econstruction and *A*nalysis) (Palsson, 2015; Price *et al.*, 2004). Ela permite fazer uma previsão quantitativa do comportamento celular por meio do uso de um método matemático, o ABF por exemplo, sob determinadas restrições.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Reconstruir a via de biossíntese de ácidos graxos da bactéria *Exiguobacterium antarcticum* B7 a partir de dados ômicos do micro-organismo e analisá-la por meio de modelagem matemática *in silico* baseada em restrições.

2.2 Específicos

- Avaliar o protocolo desenvolvido para reconstruções metabólicas e propor modificações;
- Criar um rascunho da via de biossíntese de ácidos graxos para o micro-organismo alvo;
- Curar o rascunho da via de biossíntese de ácidos graxos baseado em informações da literatura e bases de dados públicas;
- Identificar os metabólitos, as reações bioquímicas e as enzimas presentes na via de biossíntese de ácidos graxos;
- Criar a matriz estequiométrica da via;
- Converter a via curada no modelo matemático baseado em restrições ABF;
- Transformar o método matemático em uma representação computacional;
- Encontrar os modos elementares da via de biossíntese de ácidos graxos;
- Realizar a análise ABF do transcriptoma a 0°C e 37°C;
- Validar o modelo computacional.

3. ARTIGO

O manuscrito intitulado *Reconstruction of the fatty acid biosynthetic pathway of Exiguobacterium antarcticum B7 based on genomic and bibliomic data* foi submetido ao periódico *BioMed Research International* em setembro de 2015. Em janeiro de 2016, o editor do periódico retornou positivamente solicitando poucas revisões no manuscrito.

Situação: Artigo em revisão

Referência bibliográfica:

Kawasaki R, Baraúna RA, Silva A, Carepo MSP, Oliveira R, Marques R, Ramos RTJ, Schneider MPC (2015) Reconstruction of the fatty acid biosynthetic pathway of *Exiguobacterium antarcticum* B7 based on genomic and bibliomic data. *Biomed Research International*.

Research article

**Reconstruction of the fatty acid biosynthetic pathway of
Exiguobacterium antarcticum B7 based on genomic and
bibliomic data**

Regiane Kawasaki¹, Rafael A. Baraúna¹, Artur Silva¹, Marta S. P. Carepo², Rui Oliveira², Rodolfo Marques², Rommel T. J. Ramos¹, Maria P. C. Schneider^{1§}

¹ Genomics and Systems Biology Center, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará (Centro de Genômica e Biologia de Sistemas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará), Belém, Pará, Brazil.

² REQUIMTE/CQFB, Chemistry Department, FCT/Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal.

§Address correspondence to Dr. Maria Paula C. Schneider, email: paula@ufpa.br. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Centro de Genômica e Biologia de Sistemas, Rua Augusto Corrêa, No. 01, 66075-110, Guamá, Belém, Pará, Brazil.

Email addresses:

RK: kawasaki@ufpa.br

RAB: rabarauna@ufpa.br

AS: asilva@ufpa.br

MSPC: marta.carepo@fct.unl.pt

RO: rmo@fct.unl.pt

RM: rodolfo.marques@campus.fct.unl.pt

RTJR: rommelramos@ufpa.br

MPCS: paula@ufpa.br

Abstract

Exiguobacterium antarcticum B7 is an extremophile Gram-positive bacteria able to survive in cold environments. A key factor to understanding cold adaptation processes is related to the modification of fatty acids composing the cell membranes of psychrotrophic bacteria. In our study we show the *in silico* reconstruction of the fatty acid biosynthesis pathway of *E. antarcticum* B7. To build the stoichiometric model, a semi-automatic procedure was applied, which integrates genome information using KEGG and RAST/SEED. Constraint-based methods, namely Flux Balance Analysis (FBA) and Elementary Modes (EM) were applied. FBA was implemented in the sense of hexadecenoic acid production maximization. To evaluate the influence of the gene expression in the fluxome analysis, FBA was also calculated using the log₂FC values obtained in the transcriptome analysis at 0°C and 37°C. The fatty acid biosynthesis pathway showed a total of 13 elementary flux modes, four of which showed routes for the production of hexadecenoic acid. The reconstructed pathway demonstrated the capacity of *E. antarcticum* B7 to *de novo* produce fatty acid molecules. Under the influence of the transcriptome, the fluxome was altered, promoting the production of short-chain fatty acids. The calculated

models contributes to better understand the bacterial adaptation at cold environments.

Keywords: *Exiguobacterium antarcticum* B7; fatty acid biosynthesis; metabolic pathway reconstruction; constraint-based analysis.

Introduction

Bacteria are increasingly used in industrial processes to produce chemicals, foods and drugs, among other products [1]. The main biochemical pathways of bacteria may be manipulated and optimized to more efficiently produce compounds of industrial interest in various areas, e.g. metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* are rationally engineered to produce L-amino acids on an industrial scale [2]. To accomplish this task, specific tools are used such as FMM (From Metabolite to Metabolite) [3] Cytoscape [4], CellDesigner [5], SBW (Systems Biology Workbench) [6], COPASI (COMplex PATHway Simulator) [7], COBRA (CONstraints Based Reconstruction and Analysis) toolbox [8].

The genomes of several bacterial strains have been sequenced and annotated and have been used in combination with biochemical and physiological data to reconstruct metabolic networks at a genome-scale [9]. Recently, genomic models were reconstructed for some bacterial species aiming to increase the amount and quality of data that has been annotated in either the literature or databases [10, 11, 12]. The draft network generated from

the annotated genome still requires significant manual curation for a comprehensive and accurate metabolic representation of the organism [13].

The need to develop automatic or at least semi-automatic methods to reconstruct metabolic networks from genome annotation is increasing because the number of complete genome sequences available is growing fast. Recent studies [13,14] have highlighted the problems associated with genome annotations and databases, which perform automatic reconstructions and, thus, require manual assessment. The currently available 96-step protocol, proposed by Thiele & Palsson [15], is a well-established process for the assembly, curation and validation of metabolic reconstruction. This protocol is combined with computational tools, including the visualization and numerical calculation software package, MATLAB[®] (The MathWorks, USA).

Constraint-based modeling is frequently used as final validation step of the reconstructed network. This step is extremely useful for simulating the phenotypic behavior under different physiological environments [16, 17, 18] thereby allowing to assess if the reconstructed network represents well the *in vivo* cellular system. Microbial adaptation to cold environments is one of the applications of these methods.

Psychrotrophic microorganisms have an optimal growth temperature higher than 15°C but are also able to grow and adapt to extremely cold environments, with temperatures of approximately 0°C [19]. Thus, the unique physicochemical characteristics of their habitat and the biological apparatus developed by these microorganisms to survive under these conditions render these organisms valuable sources of biotechnological processes. The cellular

response to cold by psychotropic bacteria may be studied from a general standpoint with the advent of omics methods. Recently, the B7 strain of *Exiguobacterium antarcticum* was isolated from Ginger Lake sediments located in the Antarctic Peninsula region (69° 30' S, 65° W). This lake was formed due to the warming in the region, which led to partial melting of ice caps [20]. The genome of this strain was sequenced [21], and its response to cold was evaluated through differential expression of its genome at 37°C and 0°C using omics methods [22]. One of the mechanisms of cold adaptation of all psychrophilic or psychrotrophic organisms is the change in the chemical structures of the membrane phospholipids. The fatty acid chains become shorter and unsaturated at low temperatures. Accordingly, the fluidity of the membrane is kept intact [19, 23].

Bacterial *de novo* synthesis of fatty acids is regulated by the protein FapR [24], which is responsible for activating/disabling a regulon consisting of four operons in *E. antarcticum* B7. In cold, two of these operons are repressed (*fabH1-fabF* and *fabI*), and the expression levels of the other two remain unaltered [22]. The chemical components, which are included in this regulon, must be reconstructed and evaluated and then associated with their respective genetic elements to further understand this metabolic pathway and to reach more complete conclusions about its importance for adaptation to cold [23, 24]. Bioinformatics methods are used for *in silico* reconstruction of metabolic pathways [25].

In this work we present the *in silico* reconstruction of the fatty acid biosynthesis pathway of the *Exiguobacterium antarcticum* B7, based on linear

programming (FBA) and convex cone method (Elementary modes). The influence of transcriptome in FBA calculation was also evaluated.

Materials and Methods

Data collection

The genomic data of *E. antarcticum* B7 in the formats .gbk and .fasta were collected from NCBI under accession number NC_018665. The metabolic pathway of the fatty acid biosynthesis was initially evaluated in the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database [26]. When necessary, the visualization of the genome of the bacterium was performed using Artemis software [27].

Preliminary reconstruction

This step was performed following two methods: one semi-automatic and the other automatic. The tools within the KEGG databases were used essentially in the semi-automatic method. The fasta file with the *E. antarcticum* B7 genome was submitted to the online tool KAAS (KEGG Automatic Annotation Server) [28], available at http://www.genome.jp/kaas-bin/kaas_main. The parameters chosen to run this software were a) Bi-directional Best Hit (BBH) Method, recommended for complete genomes, performs the search for orthologous genes between a specific group of organisms; and b) Prokaryote, the set of genes chosen should be representative of the target organism, in this case, the bacterium *E. antarcticum* B7. Following the processing, a text file was generated (query.ko). Each line of this file is formed by two parameters: the first

consists of the sequence identified (gene), and the second, when present, consists of the KO assignment, termed K number. This value indicates orthologous groups encoding the same enzymatic activity. Afterwards, the file generated is passed through a filter, an auxiliary computer software program (script) Python developed for the present study, which only selects K numbers and individually and increasingly commands per line into a new file (new_query.ko). This file was used as entry in the option User Data Mapping of the Pathway Mapping tool of the KEGG.

The automatic method essentially consisted of submitting the .fasta file of the *E. antarcticum* B7 genome to the online tool RAST (Rapid Annotation using Subsystems Technology) [29], available at <http://rast.nmpdr.org>, to generate the drafts of the metabolic network and of the fatty acid biosynthesis pathway of the target microorganism. The final draft of this step was generated from the combination of the resulting pathways of the semi-automatic and automatic models. The common pathways were maintained, while surplus compounds, enzymes and reactions, that is, present in some, but absent in others, were not directly excluded but were instead reserved for the curated step.

Manual curation

The following steps were completed in this manual curation stage, following the protocol explained above: (i) Draft refinement: This phase began with the analysis of enzymes and reactions, components of the fatty acid biosynthesis pathway, by reading books and articles specifically on the subject. The objective was to diagnose the absence or presence of more than one

element of the study pathway. The online databases KEGG, ENZYME [30] and SEED [31] were consulted to ratify the enzymes and the structures of the reactions.

(ii) Assessment of the stoichiometry and reversibility of the reactions: In this step, all model reactions were assessed and stoichiometrically corrected, if necessary. The biochemical data on the organism are very important to determine the reversibility of the reaction. For this purpose, the databases (KEGG, SEED and ENZYME) and the tool eQuilibrator [32] were used to analyze the reversibility of the reactions. Thus, the thermodynamic constraints were respected.

(iii) Addition of gene data and reaction location: The Artemis tool was used to identify the genes of the reactions (enzymes) from their locations in the genome assessed using the draft generated.

(iv) Assessment of Gene-Protein-Reaction (GPR) associations: In this step, the function of each gene is indicated. GPR associations were identified using databases of the organism and specific literature.

(v) Definition of constraints: Some constraints were defined in the model in this manual curation step, including stoichiometric and thermodynamic constraints (through the reversibility and irreversibility of fluxes).

Metabolic model design

The metabolic model designed and refined following the manual curation step was converted into a mathematical representation, termed a stoichiometric

matrix, which encouraged the development of a wide variety of computational tools to analyze network properties.

The constraints of capacity, which are the upper and lower limits defining the maximum and minimum fluxes allowed for the reactions, were added in this step. The inputs of the stoichiometric matrix are the coefficients of the metabolites in the reactions with negative values for consumed metabolites (substrates) and positive values when the metabolites are produced or secreted (products) (Additional File 1).

Metabolic pathway validation

The computational model sought to examine the metabolic capabilities and to evaluate the system properties they may perform under the constraints imposed on the cell. Thus, the final step in the reconstruction process consisted of assessing, evaluating and validating the fatty acid biosynthesis pathway of *E. antarcticum* B7. The validation of that metabolic model was performed using simulation and flux analysis. The fatty acid biosynthesis pathway is well described in the literature because it is a highly conserved process among organisms, which facilitated its complete definition. Thus, most gaps had already been filled during the manual curation process.

Results and Discussion

The expectation to understand the relationship between the genome and the physiology of a particular organism was a key incentive for reconstructing metabolic networks. Protocol adaptations using semi-automatic and automatic

methods are necessary to reconstruct the metabolic networks of organisms with few reported data on their metabolic capabilities, including *E. antarcticum* B7.

Pathway reconstruction using the semi-automatic method

The draft of the metabolic network of *E. antarcticum* B7 was retrieved from the KEGG database [26]. The KEGG Metabolic Pathway tool was used to highlight the fatty acid biosynthesis pathway from the resulting draft of the metabolic network. The genes annotated and identified using KEGG and their respective enzymes are shown in Figure 1a in green, and the others are listed in white boxes. Table 1 shows the genes, locus tags and enzymes identified using the KEGG Metabolic Pathway tool. A total of 11 *locus tags* associated with their respective genes, and Enzyme Commission (EC) numbers were identified; only the locus tag Eab7_2235 has no added gene associated with it. An initial analysis performed using Artemis software revealed that the *fabZ* gene is truncated. A search of this gene was performed against the genomes of bacteria *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* str 168 [33] and *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 [34], showing the absence of *fabZ* in the genome of *B. subtilis* and 93% identity with the *locus tag* Exig_2658 of *E. sibiricum* 255-15.

Pathway reconstruction using the automatic method

The RAST/SEED tool does not provide graphic display of the metabolic map draft as KEGG; for this purpose, it uses a standard table to list the 247 metabolic pathways that compose the network, regardless of whether they were identified in the genome of the microorganism. RAST identified 25 reactions, 40

compounds and 20 EC numbers in the fatty acid biosynthesis pathway of *E. antarcticum* B7. Table 1 outlines the genes, locus tags and enzymes identified at this step. Annotated genes identified by RAST and their respective enzymes are colored in blue, and the others are listed in white boxes (Figure 1b).

The analysis of both fatty acid biosynthetic pathway drafts shows that the draft generated using KEGG apparently has the most complete flux, except for enzyme 6.3.4.14, which is exclusively present in the draft resulting from the RAST tool. The draft generated using RAST has a gap in which the enzymes FabA and FabB are not included in the pathway elongation process. The flux for the production of hexadecenoic acid is also absent from the pathway generated using RAST.

The KGML file produced by KEGG was submitted to the software KEGGtranslator [35] to be converted into a SBML (System Biology Markup Language) file [36]. This file was converted into an Excel spreadsheet using MATLAB functions. The files in SBML format and the Excel spreadsheets are the most used formats in metabolic reconstructions. The reactions and metabolites of the preliminary network generated using KEGG could be visualized in the spreadsheet.

The data generated using the RAST/SEED tool were analyzed and added to the first step of the process, supplementing the data collected using KEGG. The files generated with both platforms were used to manage the manual curation data.

The higher number of genes identified using KEGG (12) compared to those found using RAST/SEED (9) may be explained because the former uses

orthology (KEGG Orthology - KO) through protein homology to identify the so-called metabolite genes [37] in a genome, which facilitates finding gene-protein-reaction (GPR) associations.

Manual curation of the metabolic pathway of *de novo* fatty acid synthesis

The reactions of the fatty acid synthesis pathway were annotated and refined. The metabolites were organized into two compartments (cytoplasm and extracellular compartment) based on the location of the enzymes associated with each pathway. The co-factors and the reversibility of the reactions were compiled from the data published in the literature and online tools (ENZYME and BRENDA). The EC number was noted, and the genes were identified. A summary of those results is shown in Table 2. Thermodynamic analysis of the reactions revealed that malonyl CoA synthesis from acetyl-CoA (AcCoA) is an irreversible process, similar to the process regarding the *fabF* gene, the Eab7_2235 locus tag and the extracellular metabolites the other processes are reversible.

It is very important to assess the quality of the annotated genome submitted to the online tools during curation. The literature categorically states that the quality of the reconstructed network directly depends on the annotated genome of the organism. The rule is to use the latest updated version of the annotated genome [38, 39, 40].

The pipeline, in the draft design step, identified the enzyme FabZ in the *E. antarcticum* B7 genome. However, when performing the manual curation, the *fabZ* gene was found noticeably truncated in the genome. It is unknown whether

that truncation resulted from the annotation or is a genomic characteristic of the bacterium. The *fabZ* and *fabI* genes are responsible for adding unsaturation to the carbon chain.

Curated metabolic network

The previous step added constraints regarding the stoichiometry (chemical balance), thermodynamics (reversibility of reactions) and physiology (co-factors used) of the study model. The result was a system of equations that describes the cell metabolism according to the metabolites of interest. The mathematical representation of this model essentially consisted of describing the performance of the fatty acid biosynthesis pathway using a stoichiometric matrix. This data structure consists of 54 metabolites and 59 reactions, resulting in a 54×59 stoichiometric matrix (Additional file 1). Additional File 2 shows the list of biochemical reactions identified in the curated model.

The reconstructed pathway model was converted into SBML in the using MATLAB toolbox. The SBML file was validated using the tool SBML validator and was then submitted to the tool Cystoscape, which generated the network of Figure 2. The gene-protein-reaction (GPR) representation therein describes the degree of connectivity of each enzyme in the pathway. Vertices with few connections are in green, the vertices with regular numbers of connections are in yellow, and the vertices with high numbers of connections are in red. The network connectivity obeys to a scale-free model [41].

Flux Balance Analysis (FBA)

The FBA was coded in MATLAB implementing a constrained linear program using the GLPK (GNU Linear Programming Kit) linear optimization library [8]. All fluxes were calculated in percentage of the input flux of AcCoA (reaction 39), which was fixed to 100. Hexadecenoic acid is the key metabolic product, thus the respective flux (reaction 41) was set as the maximization target for FBA. To improve convergence, upper and lower bounds were as [0,100] for irreversible reactions and [-100,100] for reversible reaction. The final optimized fluxes are shown in Additional file 3. The target maximum, reaction R41 in Table 3, was 7.69, which may be read as 7.69 moles of hexadecenoic acid produced for every 100 moles of AcCoA consumed per unit time per unit cell mass.

Figure 3a shows the generated flux plot, which shows the variation occurring between the response fluxes, with the majority, approximately 37, showing positive values smaller than 20, while 15 are above that range.

Influence of transcriptome in FBA calculation

Log base 2-fold change values (\log_2FC) obtained *in vitro* by Dall'agnol and colleagues [22] were used to evaluate the influence of differential expression in the FBA calculation. These values were obtained by comparison of RPKM (reads per kilobase per million reads sequenced) generated in the transcriptome of the bacterium at 0°C and 37°C. The \log_2FC of genes that composes the fatty acid biosynthesis pathway are shown in table 2.

As presented by Dall'Agnol and colleagues [22], the aerobic energetic metabolism of *E. antarcticum* B7 at 0°C is repressed, and a fraction of the acetyl-CoA is probably used as a substrate to synthesize short-chain fatty acids in cold. The synthesis begins with the conversion of acetyl-CoA to malonyl-CoA catalyzed by the multimeric enzyme encoded by the genes *accABCD*. In FBA analysis, only half of the input of acetyl-CoA (100 mM) is converted to malonyl-CoA, which binds to the acyl carrier protein (ACP) at 0°C (Figure 3b). As stated earlier, the other half of acetyl-CoA is probably used to energy generation.

The remaining route is cyclical, being the reactions catalyzed by enzymes encoded by *fabF*, *fabG*, *fabZ* and *fabI* genes. At each round, two carbons are added to the growing chain of fatty acid. In these reactions, the flow of metabolites remains unchanged until the fatty acid molecule reaches a size of eight carbons (octadecanoyl-ACP in reaction 28) where the percentage of the flow amount decreases (Figure 3b). These results are consistent with the previously published data which affirm that bacteria decrease their fatty acid chains to survive in cold. These short fatty acid molecules will be converted into membrane phospholipids in order to maintain the fluidity of this biological barrier.

Elementary flux modes

The calculation of elementary modes was performed in MATLAB using the Metatool toolbox [42] (*modo_elementar.m* code in the Supplemental Information). A total of 13 elementary flux modes were found for the fatty acid biosynthesis pathway of *E. antarcticum* B7 (Additional File 4). Of these, only 4

elementary modes (2, 5, 8 and 11) have a positive nonzero coefficient for reaction 41, which indicates that the target product hexadecenoic acid may only be generated by one of these four elementary modes. The routes identified in EM2 and EM5 begins at the second reaction (R2) which is catalyzed by the enzyme FabD. The value of R2 for both elementary modes indicates a considerable production of malonyl-CoA. The remaining reactions of EM2 and EM5 are presented in additional file 4. In EM8 and EM11, the routes begin from R1. The value 1 for this reaction indicates a lower activity, reflecting in a lower production of hexadecenoic acid. Regarding reaction 41, the values of elementary modes 2 and 5, in this case 1, are higher than the values of 8 and 11 (0.142857 each), indicating that both elementary modes 2 and 5 produce 1 mol hexadecenoic acid when they are active, while elementary modes 8 and 11 produce 0.142857 moles.

Conclusions

The first metabolic pathway of *E. antarcticum* B7, reconstructed following the steps defined in this work, suggests that the protocol used is a suitable tool for further metabolic reconstruction studies. Almost all the first steps of the process were automated; however, manual curation was, as usual, laborious because it required an intensive search for available data.

The metabolic pathway of fatty acid biosynthesis was representative and consistent under the limits and boundary conditions set. The FBA and Elementary mode methods were used to examine the hexadecenoic acid

production potential of the reconstructed pathway. The application of constraint-based modeling revealed to be very useful to assess network operation plasticity, even if the intracellular kinetics are unknown. The *in silico* analysis performed using FBA enabled a quantitative assessment of hexadecenoic acid production potential.

Finally, a key issue involves deciding when to stop the process and to consider the reconstruction finalized, at least temporarily. This decision is usually based on the reconstruction purpose. The most complete metabolic model currently available is the *E. coli* model, which has been researched and refined for over 20 years [43, 44, 45, 46, 47]. Other studies constantly updating their models are *Homo sapiens*, with three reconstructions [48, 49, 50], and *S. cerevisiae*, with more than a dozen reconstructions, including two in 2013 [51, 52]. The protocol reported in the present study may be used to compile several data available in the literature aimed at proposing possible metabolic pathways, thereby enabling deeper research of the metabolism under study.

Acknowledgments

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] Lee JW, Na D, Park JM, Lee J, Choi S, Lee SY. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nat Chem Biol.* 2012;8(6):536-46.
- [2] Becker J, Wittmann C. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production – the heartbeat of industrial strain development. *Current Opinion in Biotechnology.* 2012;23:718–726.
- [3] Chou C, Chang W, Chiu C, Huang C, Huang H. FMM: a web server for metabolic pathway reconstruction and comparative analysis. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:W129–W134.
- [4] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* 2003;13:2498-2504.
- [5] Funahashi A, Matsuoka Y, Jouraku A, Morohashi M, Kikuchi N, Kitano H. CellDesigner 3.5: A Versatile Modeling Tool for Biochemical Networks. *Proceedings of the IEEE.* 2008;96(8):1254-1265.
- [6] Frank T B, Herbert M S. SBW - a modular framework for Systems biology. *Proceedings of the 37th conference on Winter simulation WSC '06*
Publisher: Winter Simulation Conference. 2006;1637-1645.
- [7] Hoops S, Sahle S, Gauges R, Lee C, Pahle J, Simus N, Singhal M, Xu L, Mendes P, Kummer U. COPASI—a COmplex PATHway Simulator. *Bioinformatics.* 2006;22(24): 3067-3074.

- [8] Schellenberger J, Que R, Fleming RMT, Thiele I, Orth JD, Feist AM, Zielinski DC, Bordbar A, Lewis NE, Rahmanian S, Kang J, Hyduke DR, Palsson B Ø. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nature Protocols*. 2011;6:1290-1307.
- [9] Terzer M, Maynard ND, Covert MW, Stelling J. Genome-scale metabolic networks. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009;1(3):285-97.
- [10] McCloskey D, Palsson BØ, Feist AM. Basic and applied uses of genome-scale metabolic network reconstructions of *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol*. 2013;9:661.
- [11] Fondi M, Maida I, Perrin E, Mellera A, Mocali S, Parrilli E, Tutino M L, Liò P, Fani R. Genome-scale metabolic reconstruction and constraint-based modelling of the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Environ Microbiol*. 2015;17:751–766.
- [12] McCloskey D, Palsson B Ø, Feist A M. Basic and applied uses of genome-scale metabolic network reconstructions of *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*. 2013;9:661.
- [13] Feist A M, Herrgard M J, Thiele I, Reed J L, Palsson BØ. Reconstruction of biochemical networks in microorganisms. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(2):129–43.
- [14] Reed J, Famili I, Thiele I, Palsson B Ø. Towards multidimensional genome annotation. *Nat Rev Genet*. 2006;7(2):130-41.
- [15] Thiele I, Palsson B Ø. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature Protocols*. 2010;5:93–121.

- [16] Edwards J, Ibarra R, Palsson B Ø. In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nat Biotechnol.* 2001;19(2):125-30.
- [17] Mahadevan R, Palsson B Ø, Lovley D R. In situ to in silico and back: elucidating the physiology and ecology of *Geobacter spp.* using genome-scale modelling. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(1):39-50.
- [18] Trawick J, Schilling C. Use of constraint-based modeling for the prediction and validation of antimicrobial targets. *Biochem Pharmacol.* 2006;71:1026-35.
- [19] Morita RY. Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews.* 1975;39(2):144-67.
- [20] Mulvaney R, Abram NJ, Hindmarsh RCA, Arrowsmith C, Fleet L, et al. Recent Antarctic Peninsula warming relative to Holocene climate and ice-shelf history. *Nature.* 2012;489:141-44.
- [21] Carneiro AR, Ramos RTJ, Dall'Agnol H, Pinto AC, Soares SC, Santos AR, et al. Genome sequence of *Exiguobacterium antarcticum* B7, isolated from a biofilm in Ginger Lake, King George Island, Antarctica. *J Bacteriol.* 2012;194:6689-90.
- [22] Dall'Agnol HPMB, Baraúna RA, de Sá PHCG, Ramos RTJ, Nóbrega F, Nunes CIP, et al. Omics profiles used to evaluate the gene expression of *Exiguobacterium antarcticum* B7 during cold adaptation. *BMC Genomics* 2014;15:986.

- [23] Casanueva A, Tuffin M, Cary C, Cowan D A. Molecular adaptations to psychrophily: the impact of 'omic' technologies. *Trends in Microbiology*. 2010;18:374-81.
- [24] Schujman GE, Paoletti L, Grossman AD, et al. FapR, a Bacterial transcription factor involved in global regulation of membrane lipid biosynthesis. *Developmental Cell*. 2003;4:663-72..
- [25] Pitkänen E, Rousu J, Ukkonen E. Computational methods for metabolic reconstruction. *Current Opinion in Biotechnology*. 2010;21:70–77.
- [26] Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucl. Acids Res*. 1999;27(1):29-34.
- [27] Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics*. 2012; 28:464-469.
- [28] Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa A C and Kanehisa M. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Research*. 2007;35:W182–W185.
- [29] Aziz R K, Bartels D, Best A A, DeJongh M, Disz T, Edwards R A, Formsma K, Gerdes S, et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*. 2008;9(1):75.
- [30] Bairoch A. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Res* 28:304-305.
- [31] Overbeek R, Olson R, Pusch GD, et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*. 2014;42(Database issue):D206-D214.

- [32] Flamholz A, Noor E, Bar-even A, Milo R. eQuilibrator - the biochemical thermodynamics calculator. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:D770-775.
- [33] Barbe V, Cruveiller S, Kunst F, Lenoble P, et al. From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology.* 2009;155:1758–75.
- [34] Rodrigues DF, Goris J, Vishnivetskaya T, Gilichinsky D, Thomashow MF, Tiedje JM. Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov. *Extremophiles.* 2009;10:285-94.
- [35] Wrzodek C, Dräger A, Zell A. KEGGtranslator: visualizing and converting the KEGG PATHWAY database to various formats. *Bioinformatics.* 2011;27(16):2314-2315.
- [36] Hucka M, Finney A, Sauro HM, Bolouri H, Doyle JC, Kitano H, et al. The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. *Bioinformatics.* 2003;19(4): 524-531.
- [37] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet.* 2000;25(1):25–29.
- [38] Hamilton JJ, Reed JL. Software platforms to facilitate reconstructing genome-scale metabolic networks. *Environmental Microbiology.* 2014;16(1):49–59.
- [39] Baart GJE, Martens DE. Genome-Scale Metabolic Models: Reconstruction and Analysis. *Neisseria meningitidis.* *Methods in Molecular Biology.* 2012;799:107-26.

- [40] Lacroix V, Cottret L, Thébault P, Sagot M-F. An Introduction to Metabolic Networks and Their Structural Analysis. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*. 2008;5(4):594-617.
- [41] Barabási A-L, Öltvai ZN. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature Reviews Genetics*. 2004;5:101-113.
- [42] Pfeiffer T et al. METATOOL: for studying metabolic networks. *Bioinformatics*. 1999;15(3):251-257.
- [43] Almaas E, Kovacs B, Vicsek T, Oltvai Z, Barabasi A. Global organization of metabolic fluxes in the bacterium *Escherichia coli*. *Nature*. 2004;427(6977):839-843.
- [44] Edwards JS, Palsson BØ. The *Escherichia coli* MG1655 in silico metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(10):5528-33.
- [45] Keseler I, Collado-Vides J, Gama-Castro S, Ingraham J, Paley S, et al. EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:334-37.
- [46] Orth JD, Conrad TM, Na J, Lerman JA, Nam H, Feist AM, Palsson BØ. A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism. *Mol Syst Biol*. 2011;7:535.
- [47] Feist A; Palsson BØ. The growing scope of applications of genome-scale metabolic reconstructions using *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*. 2008;26(6):659-67.
- [48] Duarte N, Becker S, Jamshidi N, Thiele I, Mo M, Vo T, Srivas R, Palsson BØ. Global reconstruction of the human metabolic network based on

genomic and bibliomic data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(6):1777-82.

- [49] Kim TY, Sohn SB, Kim YB, Kim WJ, Lee SY. Recent advances in reconstruction and applications of genome-scale metabolic models. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012;23:617–23.
- [50] Thiele I et al. A community-driven global reconstruction of human metabolism. *Nature Biotechnology*. 2013;31:419–25.
- [51] Heavner BD, Smallbone K, Price ND, Walker LP. Version 6 of the consensus yeast metabolic network refines biochemical coverage and improves model performance. *Database*. 2013. Article ID bat059.
- [52] Österlund T, Nookaew I, Bordel S, Nielsen J. Mapping condition-dependent regulation of metabolism in yeast through genome-scale modeling. *BMC Systems Biology*. 2013;7:36.

Figures

Figure 1. Drafts of the fatty acid biosynthesis pathway of *E. antarcticum* B7 bacteria. The drafts were designed using the (a) Semi-automatic and (b) Automatic methods. Colored boxes indicate the possibility of the presence of enzymes in the pathway.

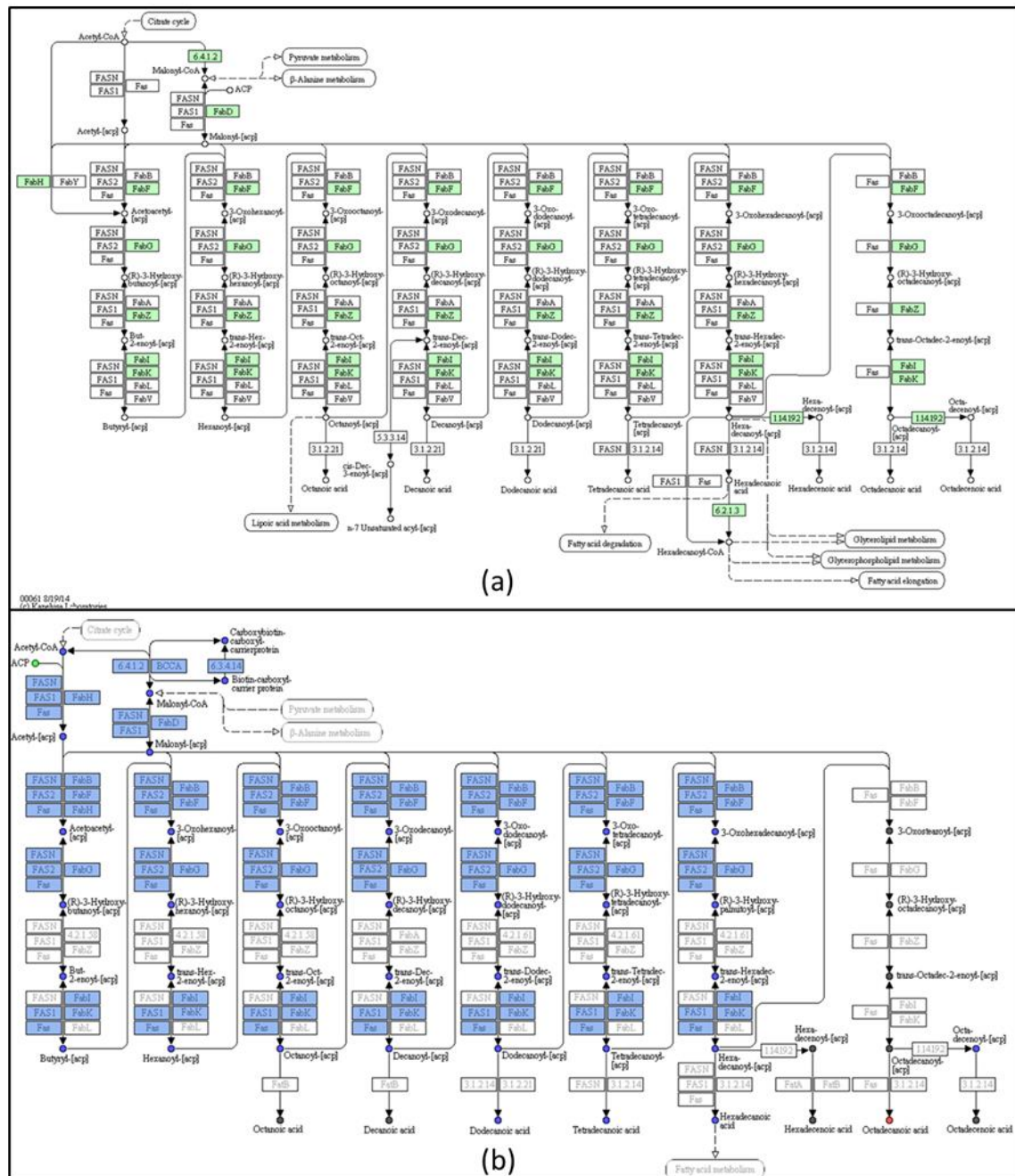


Figure 2. Layout of the fatty acid biosynthesis pathway generated using Cytoscape. Green vertices: fewer connections. Yellow vertices: regular number of connections. Red vertices: large number of connections. This network is a free model scale.

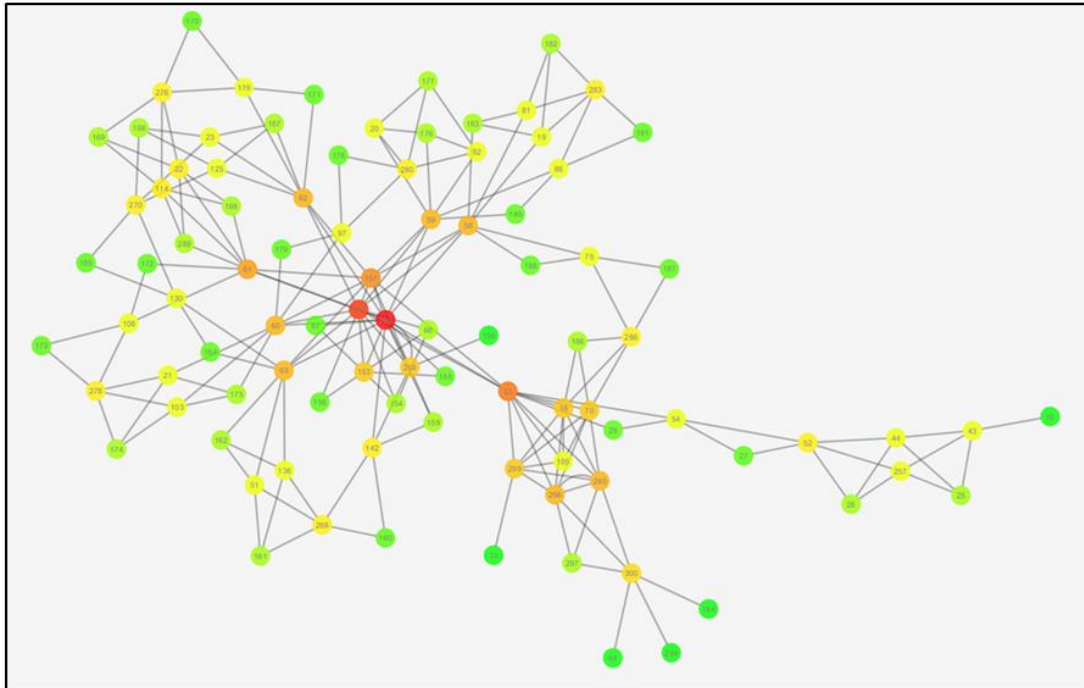
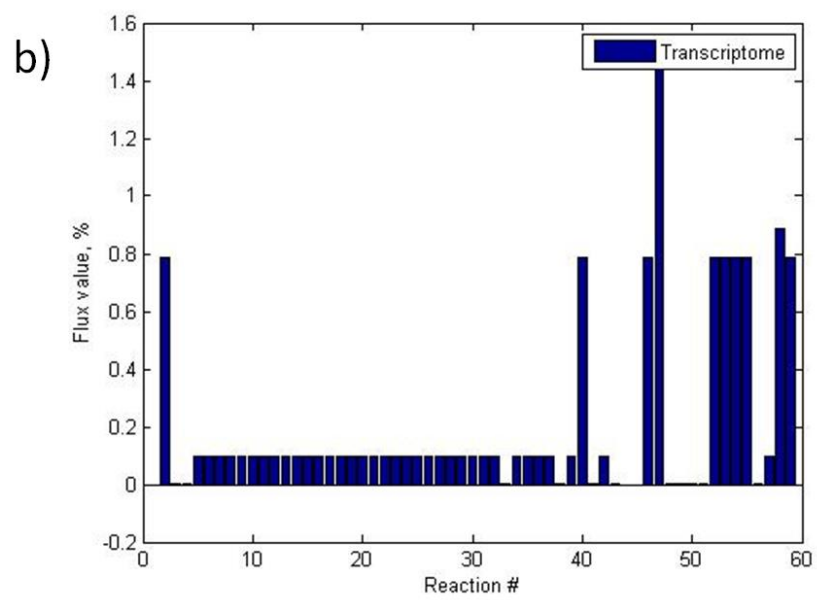
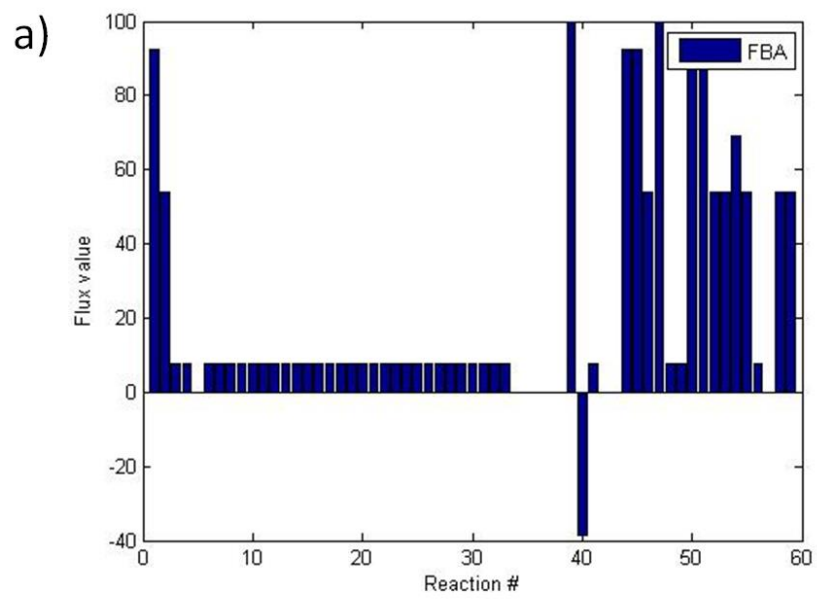


Figure 3. Flux graph generated using the software MATLAB, which uses methods based on FBA constraints. The vertical axis represents the fluxes calculated from the input of 100 moles of acetyl-CoA (AcCoA). The horizontal axis represents the reactions participating in the fatty acid biosynthesis pathway. The blue bars determine the output percentage for each pathway reaction. a) FBA for maximizing the production of hexadecenoic acid. b) FBA calculated with the log2FC values obtained from the transcriptome.



Tables

Table 1. Genes, locus tags and EC numbers identified in the draft of the fatty acid biosynthesis pathway of *E. antarcticum* B7. The features displayed were generated using the methods: semi-automatic and automatic

| Semi-Automatic Method | | | Automatic Method | | |
|-----------------------|-----------|-----------|------------------|-----------|-----------|
| Gene | Locus tag | EC Number | Gene | Locus tag | EC Number |
| accA | Eab7_2059 | 6.4.1.2 | accA | Eab7_2059 | 6.4.1.2 |
| accB | Eab7_0870 | 6.4.1.2 | accB | Eab7_0870 | 6.4.1.14 |
| accC | Eab7_0871 | 6.4.1.2 | accC | Eab7_0871 | 6.4.1.2 |
| accD | Eab7_2060 | 6.4.1.2 | accD | Eab7_2060 | 6.4.1.14 |
| fabD | Eab7_1760 | 2.3.1.39 | fabD | Eab7_1760 | 2.3.1.39 |
| fabH1 | Eab7_1911 | 2.3.1.180 | fabH1 | Eab7_1911 | 2.3.1.180 |
| fabF | Eab7_1910 | 2.3.1.179 | fabF | Eab7_1910 | 2.3.1.179 |
| fabG | Eab7_1795 | 1.1.1.100 | fabG | Eab7_1795 | 1.1.1.100 |
| fabZ | Eab7_2463 | 4.2.1.59 | fabI | Eab7_1885 | 1.3.1.10 |
| fabI | Eab7_1885 | 1.3.1.10 | | | |
| fabK | Eab7_0377 | 1.3.1.9 | | | |
| - | Eab7_2235 | 1.14.19.2 | | | |

Table 2. Relationships between components of the *E. antarcticum* B7 fatty acid biosynthesis pathway following curation. The signals => and <=> indicate irreversible and reversible reactions, respectively.

| Gene | Locus tag | EC Number | Enzyme | Reaction | Fold Change (log2FC) |
|-------|-----------|---------------------|---|--|----------------------|
| accA | Eab7_2059 | 6.4.1.2 | Acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase alpha subunit | ATP + Acetyl-CoA + HCO ₃ ⁻ => ADP + Orthophosphate + Malonyl-CoA | 0.4562 |
| accB | Eab7_0870 | 6.4.1.2 | Acetyl-CoA carboxylase biotin-carboxyl carrier protein | ATP + Acetyl-CoA + HCO ₃ ⁻ => ADP + Orthophosphate + Malonyl-CoA | -0.05773 |
| accC | Eab7_0871 | 6.4.1.2 6.4.1.14 | Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit | ATP + Acetyl-CoA + HCO ₃ ⁻ => ADP + Orthophosphate + Malonyl-CoA | -0.5623 |
| accD | Eab7_2060 | 6.4.1.2 | Acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase beta subunit | ATP + Acetyl-CoA + HCO ₃ ⁻ => ADP + Orthophosphate + Malonyl-CoA | -0.2811 |
| fabD | Eab7_1760 | 2.3.1.39 | ACP S- malonyl transferase | Malonyl-CoA + ACP <=> CoA + Malonyl-(acp) | 0.9448 |
| fabH1 | Eab7_1911 | 2.3.1.180 | 3-oxoacil-ACP synthase III | Acetyl-CoA + Malonyl-(acp) <=> Acetoacetyl-(acp) + CoA + CO ₂ | 0.8512 |
| fabF | Eab7_1910 | 2.3.1.179 | 3-oxoacil-ACP synthase II | Acetyl-(acp) + Malonyl-(acp) => Acetoacetyl-(acp) + CO ₂ + ACP | 0.6942 |
| fabG | Eab7_1895 | 1.1.1.100 | 3-oxoacil-ACP reductase | Acetoacetyl-(acp) + NADPH + H ⁺ <=> (R)-3- Hydroxybutanoyl-(acp) + NADP ⁺ | 0.8523 |
| fabZ | Eab7_2463 | 4.2.1.59 | 3- hydroxyacyl -ACP dehydratase | (R)-3- Hydroxybutanoyl-(acp) <=> But-2-enoyl-(acp) + H ₂ O | 0.12902 |
| fabI | Eab7_1885 | 1.3.1.9 1.3.1.10 | enoyl-ACP reductase I | But-2-enoyl-(acp) + NADH + H ⁺ <=> Butyryl-(acp) + NAD ⁺ | 0.2969 |
| - | Eab7_2235 | 1.14.19.2 | acyl-ACP desaturase | Hexadecanoyl -(acp) + Acceptor_reduced + O ₂ => Hexadecenoyl-(acp) + Acceptor + 2 H ₂ O | 1.3768 |

Additional Files

Additional file 1. Stoichiometric matrix of the fatty acid biosynthetic pathway. Matrix of 54 lines and 59 columns (54x59). Lines represent the 54 metabolites generated through the reactions, and the 59 columns represent the respective reactions that generate each metabolite. Positive values are used to indicate products, while negative values indicate substrate.

Additional file 2. Overview of all reactions of the fatty acid biosynthetic pathway from *E. antarcticum* B7 after manual curation. The signals => and <=> indicate irreversible and reversible reactions, respectively.

Additional file 3. Fluxes of metabolite concentration for the fatty acid biosynthetic pathway of *E. antarcticum* B7. The 'R1' initials means 'Reaction 1' and so on. Flux values were calculated based on the input of 100 Molar of Acetyl-CoA. 'R41' is the final product of the pathway. Reactions above R41 are of external metabolites.

Additional file 4. Elementary Modes for the fatty acid biosynthetic pathway from *E. antarcticum* B7. A total of 13 Elementary Modes were possible. 'R41' final reaction is highlighted in red.

4 DISCUSSÃO

A expectativa de entender a relação entre o genoma e a fisiologia de um determinado organismo foi um incentivo importante para reconstruir redes metabólicas. O protocolo desenvolvido por Thiele e Palsson (2010) foi muito bem estruturado para redes metabólicas em grande escala e para organismos bem estudados e com detalhados dados experimentais. Para organismos com poucas informações relatadas sobre suas capacidades metabólicas, como a *E. antarcticum* B7, as adaptações no protocolo foram necessárias para a reconstrução da rede metabólica. A modelagem *in silico* envolveu a combinação de resultados biológicos e da literatura especializada a modelos computacionais de sistemas biológicos. A primeira via metabólica da *E. antarcticum* B7, gerada a partir da aplicação de parte do protocolo proposto por Thiele e Palsson (2010), revelou-se difícil, mas igualmente interessante. Os primeiros passos do processo foram quase todos automatizados; no entanto, a cura manual foi, como de costume, trabalhosa, pois exigiu uma busca intensa das informações disponíveis.

A quantidade superior de genes identificados pelo KEGG (12) em relação aos encontrados pelo RAST/SEED (9) pode ser explicada devido ao fato do primeiro utilizar ortologia (*KEGG Orthology - KO*) por homologia de proteínas, para identificar os chamado genes metabólitos¹ (Agren *et al.*, 2013; Ashburner *et al.* 2000; Hamilton & Reed, 2014) em um genoma, tornando mais natural encontrar as associações GPR.

Outro ponto a ser observado é a qualidade do genoma anotado submetido às ferramentas *online*. A literatura especializada é categórica em afirmar que a qualidade da rede reconstruída depende diretamente do genoma anotado do organismo. A regra é usar a última versão atualizada do genoma anotado (Bart & Martens, 2012; Durot *et al.*, 2009; Hamilton & Reed, 2014; Lacroix *et al.*, 2008; Thiele & Palsson, 2010).

¹ Associação de enzima, EC números e grupos ortólogos. Genes com a mesma função enzimática.

Este *pipeline*, na etapa de criação do rascunho, identificou a enzima FabZ no genoma da *E. antarcticum* B7. Entretanto, ao fazer a curadoria manual percebeu-se que o gene *fabZ* se encontra truncado no genoma. Não se tem como afirmar se esse truncamento foi decorrente da anotação ou se é uma característica genômica da bactéria. O gene *fabZ*, assim como o *fabI*, é responsável por adicionar insaturações à cadeia carbono-carbono. O ácido Hexadecenóico, também conhecido como ácido Palmitoleico (16:1 Δ^9), gerado pela adição de mais uma ligação entre os carbonos 9 e 10 (Marr & Ingraham, 1962), foi o ácido graxo insaturado resultante identificado neste trabalho.

Segundo Casanueva e colaboradores (2010) e Chattopadhyay (2006), a diminuição da temperatura aumenta o grau de insaturação dos ácidos graxos. Esta alteração ocorre com a finalidade de manter a fluidez da membrana por meio da diminuição da temperatura do ponto de fusão da mesma a fim de não comprometer o transporte de moléculas através destas barreiras celulares. O mecanismo de adição de insaturações nas cadeias lineares de ácidos graxos varia entre os micro-organismos. No caso de bactérias Gram-positivas da ordem *Bacillales*, este mecanismo é regulado pelo sistema de dois componentes DesR-DesK (Aguilar *et al.*, 2001). No entanto, este sistema encontra-se truncado no genoma da *E. antarcticum* B7, apresentando apenas Desk (Eab7_0490). Novamente, não se tem como afirmar se essa truncagem é decorrente da notação do genoma ou se foi devido à adaptação da bactéria às condições inóspitas de sobrevivência.

A via metabólica da biossíntese de ácidos graxos foi representativa e consistente sob os limites e condições de contorno definidos. A partir da conversão desta reconstrução para um formato matemático-computacional, os métodos de ABF e ME foram utilizados para investigar a otimização de um produto e o comportamento da via, respectivamente. A aplicação de modelos baseados em restrições mostrou que muitas informações podem ser extraídas a partir deles, mesmo se a cinética intracelular for desconhecida. Por meio da análise *in silico* realizada pela ABF foi possível determinar quantitativamente a produção de ácido Hexadecenóico.

Ao analisar a distribuição de fluxos maximizando a produção de ácido hexadecenóico, os resultados mostraram que a bactéria tem a capacidade de utilizar a Acetil-CoA como fonte de carbono para as condições de crescimento impostas. A maximização da produção de ácido hexadecenóico caracterizou a função objetivo calculada por ABF.

Conforme estudo realizado por Dall'AgnoI e colaboradores (2014), o metabolismo energético aeróbico de *E. antarcticum* B7 a 0°C é reprimido, e uma fração de acetil-CoA é, provavelmente, usada como um substrato para sintetizar os ácidos graxos de cadeia curta no frio. A síntese começa com a conversão da acetil-CoA para malonil-CoA catalisada pela enzima multimérica codificada pelos genes *accABCD*. No método ABF, apenas metade da entrada de acetil-CoA (100 mM) é convertido para malonil-CoA, que se liga à proteína transportadora de acilo (ACP) a 0°C. Como comentado anteriormente, a outra metade da acetil-CoA é provavelmente usada na geração de energia.

A rota restante é cíclica, sendo as reações catalisadas por enzimas codificadas pelos genes *fabF*, *fabG*, *fabZ* e *fabI*. Em cada ronda, dois átomos de carbono são adicionados à crescente cadeia de ácido graxo. Nestas reações, o fluxo de metabolitos permanece inalterada até que a molécula de ácido graxo atinja um tamanho de oito átomos de carbono (octadecanoil-ACP) em que a percentagem da quantidade de fluxo decresce. Estes resultados são consistentes com os dados publicados por Dall'AgnoI e colaboradores (2014) em que afirmam que as bactérias diminuem as suas cadeias de ácido graxos para sobreviverem no frio. Essas moléculas de ácidos gordos curto serão convertidas em fosfolípidos da membrana de modo a manter a fluidez da barreira biológica.

A modelagem baseada em restrições é frequentemente usada como passo final no processo de validação da rede reconstruída. Esta etapa é muito útil, pois permite simular o comportamento fenotípico em ambientes fisiológicos diferentes, possibilitando, assim, avaliar se a rede reconstruída representa de fato um sistema celular *in vivo*. Adaptação microbiana para ambientes frios é uma das aplicações destes métodos.

Por fim, uma questão importante é decidir quando parar o processo e considerar a reconstrução pronta, pelo menos momentaneamente. Esta decisão se baseia normalmente no propósito da reconstrução. Observa-se que o modelo metabólico mais completo atualmente é o da bactéria *E. coli* que vem sendo investigado e aprimorado há mais de 20 anos (Almaas *et al.*, 2004; Edwards & Palsson, 2000; Edwards *et al.*, 2001; Feist e Palsson, 2008; Karp *et al.*, 2007; Keseler *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2015; Orth *et al.*, 2011; Varma & Palsson, 1994b). Outras pesquisas que constantemente atualizam seus modelos são: *Homo sapiens* (Aurich & Thiele, 2016; Duarte *et al.*, 2007; Thiele *et al.*, 2013) e *Saccharomyces cerevisiae* (Förster *et al.*, 2003; Heavner *et al.*, 2013; Österlund *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2016).

O protocolo apresentado neste trabalho pode servir para compilação de muitos dados disponíveis na literatura com o intuito de propor rotas metabólicas possíveis e assim poder fazer um estudo mais aprofundado do metabolismo pesquisado.

5 CONCLUSÃO

- ✓ Este trabalho adaptou de maneira satisfatória o protocolo proposto por Thiele e Palsson (2010) e reconstruiu, em escala genômica, a via de biossíntese de ácidos graxos da bactéria psicotrófica *E. antarcticum* linhagem B7;
- ✓ As vias do metabolismo de ácidos graxos da *E. antarcticum* B7 e da *Bacillus subtilis* foram comparadas durante a etapa de cura, apresentando pouca diferença entre elas;
- ✓ A via de biossíntese de ácidos graxos é um processo bem conservado entre os organismos, gerando um rascunho com poucas lacunas (*gaps*) a ser preenchidas;
- ✓ A abordagem utilizada neste estudo permitiu integrar os dados de genômica e transcriptoma da *E. antarcticum* B7 e realizar uma análise mais precisa do processo de adaptação bacteriana ao frio;
- ✓ A associação gene-enzima-reação conseguiu mostrar a atuação dos operons *fapR-pslX-fabD-fabG*, *fabH1-fabF*, *fabZ* e *fabI* no processo de biossíntese de ácidos graxos;
- ✓ Os dados gerados sugerem que a *E. antarcticum* B7 realiza uma modificação química dos lipídios que compõem a membrana celular, sendo isso um fator crucial para a sobrevivência da bactéria no frio.
- ✓ Mesmo na ausência de valores cinéticos experimentais, a ABF conseguiu representar o fluxoma da biossíntese de ácidos graxos de forma satisfatória;
- ✓ A otimização de produção de ácido Hexadecenóico foi a função objetivo do método ABF;
- ✓ Para avaliar a influência da expressão do gene no fluxoma, o método ABF foi calculado usando os valores de *log2FC* obtidos na análise transcriptoma a 0°C e 37°C.
- ✓ A possibilidade de utilizar este protocolo em outros trabalhos relacionados à reconstrução de redes metabólicas completas ou parciais a partir do genoma anotado e transcriptoma é promissora.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agren R, Liu L, Shoaie S, Vongsangnak W, Nookaew I, Nielsen J (2013) The RAVEN Toolbox and Its Use for Generating a Genome-scale Metabolic Model for *Penicillium chrysogenum*. *PLoS Comput Biol* 9(3): e1002980.
- Adrio JL, Demain AL. (2014) Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules*. 4(1):117-139.
- Aguilar PS, Hernandez-Arriaga AM, Cybulski LE, Erazo AC, de Mendoza D (2001) Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J* 20: 1681-1691.
- Alam MZ, Malik A (2008) Chromate resistance, transport and bioreduction by *Exiguobacterium* sp. ZM-2 isolated from agricultural soil irrigated with tannery effluent. *J Basic Microbiol* 48:416-420.
- Almaas E, Kovacs B, Vicsek T, Oltvai Z, Barabási A (2004) Global organization of metabolic fluxes in the bacterium *Escherichia coli*. *Nature* 427(6977): 839-843.
- Alon U (2003) Biological networks: the tinkerer as an engineer. *Science* 301(5641): 1866–1867.
- Ambily Nath IV, Loka Bharathi PA (2011) Diversity in transcripts and translational pattern of stress proteins in marine extremophiles. *Extremophiles* 15: 129-153.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D et al. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics* 25(1):25-29.
- Aurich MK, Thiele I (2016) Computational Modeling of Human Metabolism and Its Application to Systems Biomedicine. *Systems Medicine: Methods in Molecular Biology* 1386:253-281.
- Ayala-del-Río HL, Chain PS, Grzymiski JJ, Ponder MA, Ivanova N et al. (2010) The genome sequence of *Psychrobacter arcticus* 273-4, a psychroactive Siberian permafrost bacterium, reveals mechanisms for adaptation to low-temperature growth. *Applied and Environmental Microbiology* 76(7):2304-2312.
- Aziz RK, Devoid S, Disz T, Edwards RA, Henry CS et al. (2012) SEED Servers: High-Performance Access to the SEED Genomes, Annotations, and

Metabolic Models. PLoS ONE 7(10): e48053.

- Baart GJE, Martens DE (2012) Genome-Scale Metabolic Models: Reconstruction and Analysis. *Neisseria meningitidis*. *Methods in Molecular Biology* 799:107-26.
- Baraúna RA (2014) Proteoma diferencial e caracterização da proteína reguladora da síntese de ácidos graxos em *Exiguobacterium antarcticum* B7. Tese de Doutorado. PPGBM/ICB/UFPA.
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, *et al.* (2013) GenBank. *Nucleic Acids Research* 41(Database issue):D36-D42.
- Blazier AS, Papin JA (2012) Integration of expression data in genome-scale metabolic network reconstructions. *Front Physiol* 3:299.
- Borodina I, Nielsen J (2005) From genomes to *in silico* cells via metabolic networks. *Current Opinion in Biotechnology* 16:350–355.
- Brambilla E, Hippe H, Hagelstein A, Tindall BJ, Stackebrandt E (2001) 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Extremophiles* 5: 23-33.
- Bruggeman FJ, Westerhoff HV (2007) The nature of systems biology. *Trends in Microbiology* 15:45-50.
- Brunk E, Mih N, Monk J *et al.* (2016) Systems biology of the structural proteome. *BMC Systems Biology*. DOI: 10.1186/s12918-016-0271-6.
- Burgard AP *et al.* Flux coupling analysis of genome-scale metabolic network reconstructions. *Genome Research* 14(2): 301–312.
- Carneiro AR (2012) Genômica e Transcriptoma Estrutural da Bactéria Psicotrófica *Exiguobacterium antarcticum* Linhagem B7. Tese de Doutorado. PPGBM/ICB/UFPA.
- Carneiro AR, Ramos RTJ, Dall'agnol H, Pinto AC, De Castro Soares S, Santos AR, Guimarães LC, Almeida SS, Barauna RA, Das Gracas DA, Carepo MSP, Azevedo V, Schneider MPC, Pellizari VH, Silva A (2012) Genome Sequence of *Exiguobacterium antarcticum* B7, Isolated from a Biofilm in Ginger Lake, King George Island, Antarctica. *Journal of Bacteriology* 194:6689-6690.
- Casanueva A, Tuffin M, Cary C, Cowan DA (2010) Molecular adaptations to

- psychrophily: the impact of 'omic' technologies. *Trends in Microbiology* 18(8):374-381.
- Cava F, Hidalgo A, Berenguer J (2009) *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles* 13: 213-231.
- Chattopadhyay MK (2006) Mechanisms of bacterial adaptation to low temperature. *Journal of Biosciences* 31:157-165.
- Chen L, Zeng WM, Cai YD, Huang T (2013) Prediction of Metabolic Pathway Using Graph Property, Chemical Functional Group and Chemical Structural Set. *Current Bioinformatics* 8:200-207.
- Crick FH (1970) Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 227:561-563.
- Dall'Agnol HPMB (2012) Análise Transcriptoma da Expressão Diferencial Térmica de *Exiguobacterium antarcticum* Linhagem B7. Tese de Doutorado. PPGBM/ICB/UFPA.
- Dall'Agnol HPMB, Baraúna RA, Schneider MPC, Silva A et al. (2014) Omics profiles used to evaluate the gene expression of *Exiguobacterium antarcticum* B7 during cold adaptation. *BMC Genomics* 15:986-997.
- Duarte N, Becker S, Jamshidi N, Thiele I, Mo M, Vo T, Srivas R, Palsson BØ. Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(6):1777-82.
- Durot M, Bourguignon PY, Schachter V (2009) Genome-scale models of bacterial metabolism: reconstruction and applications. *FEMS Microbiol Rev* 33(1): 164-190.
- Edwards JS, Palsson BØ (2000) The *Escherichia coli* MG1655 *in silico* metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(10):5528-33.
- Edwards JS, Ibarra R, Palsson BØ (2001) *In silico* predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nat Biotechnol* 19(2): 125-130.
- Famili I *et al.* (2003) *Saccharomyces cerevisiae* phenotypes can be predicted by using constraint-based analysis of a genome-scale reconstructed metabolic network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(23):13134-9.

- Feist AM, Palsson BØ (2008). The growing scope of applications of genome-scale metabolic reconstructions using *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol.* 26(6):659-67.
- Feist AM, Herrgard MJ, Thiele I, Reed JL, Palsson BØ (2009) Reconstruction of biochemical networks in microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 7(2):129–143.
- Förster J, Famili I, Fu P, Palsson BØ, Nielsen J (2003) Genome-Scale Reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* Metabolic Network. *Genome Res* 13:244-253
- Fruhling A, Schumann P, Hippe H, Straubler B and Stackebrandt E (2002) *Exiguobacterium undae* sp. nov. and *Exiguobacterium antarcticum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1171–1176.
- Gerasch A, Kaufmann M, Kohlbache O (2014) Rebuilding KEGG Maps: Algorithms and Benefits. *IEEE Pacific Visualization Symposium* 97-104.
- Goto S, Okuno Y, Hattori M, Nishioka T, Kanehisa M (2001) LIGAND: database of chemical compounds and reactions in biological pathways. *Nucleic Acids Res* 30:402-404.
- Hamilton JJ, Reed JL (2014) Software platforms to facilitate reconstructing genome-scale metabolic networks. *Environ Microbiol* 16(1):49-59.
- Heavner BD, Smallbone K, Price ND, Walker LP (2013) Version 6 of the consensus yeast metabolic network refines biochemical coverage and improves model performance. *Database (Oxford)*:bat059.
- Hucka M (2003) The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. *Bioinformatics* 19 (4):524-531.
- Hucka M, Bergmann FT, Dräger A *et al.* (2015) Systems Biology Markup Language (SBML) Level 2 Version 5: Structures and Facilities for Model Definitions. *J Integr Bioinform.* 12(2):271.
- Hyduke DR, Lewis NE, Palsson BØ (2013) Analysis of omics data with genome-scale models of metabolism. *Molecular BioSystems* 9:167-174.
- Kanehisa M, Goto S, Hattori M *et al.* (2006) From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Research* 34(Database issue):D354-D357.

- Kanehisa M, Goto S, Furumichi M, Tanabe M, Hirakawa M (2010) KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Research* 38:D355-D360.
- Karp PD *et al.* (2007) Multidimensional annotation of the *Escherichia coli* K-12 genome. *Nucl Acids Res* 35(22):7577-7590.
- Keegan KP, Glass EM, Meyer F (2016) MG-RAST, a Metagenomics Service for Analysis of Microbial Community Structure and Function. *Methods Mol Biol.* 1399:207-33.
- Keseler I, Collado-Vides J, Gama-Castro S, Ingraham J, Paley S, Paulsen I, Peralta-Gil M, Karp P (2005) EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 33:334-337.
- Kitano H (2002) Systems Biology: A Brief Overview. *Science*, 295:1662-1664.
- Lacroix V, Cottret L, Thébault P, Sagot MF (2008) An introduction to metabolic networks and their structural analysis. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 5(4):594-617.
- Lee SH, Chung CW, Yu YJ, Rhee YH (2009) Effect of alkaline protease-producing *Exiguobacterium* sp. YS1 inoculation on the solubilization and bacterial community of waste activated sludge. *Bioresour Technol* 100: 4597-4603.
- Lerman JA, Hyduke DR, Latif H, Portnoy VA, Lewis NA, Orth JD, Schrimpe-Rutledge AC, Smith RD, Adkins JN, Zengler K, Palsson BØ (2012) *In silico* method for modelling metabolism and gene product expression at genome scale. *Nat Commun* 3:929.
- Marr AG, Ingraham JL (1962) Effect of temperature on the composition on fatty acids in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 84(6):1260-1267.
- Margesin R, Feller G (2010) Biotechnological applications of psychrophiles. *Environ Technol* 31:835-844.
- Milo R *et al.* (2002) Network motifs: simple building blocks of complex networks. *Science* 298(5594): 824–827.
- Müller JEN, Meyer F, Litsanov B *et al.* (2015) Engineering *Escherichia coli* for methanol conversion. *Metabolic Engineering* 28:190-201.
- Oberhardt MA, Palsson BØ, Papin JA (2009) Applications of genome-scale metabolic reconstructions. *Mol Syst Biol* 5:320.

- Okeke BC (2008) Bioremoval of hexavalent chromium from water by a salt tolerant bacterium, *Exiguobacterium* sp. GS1. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 1571-1579.
- Orth JD, Thiele I, Palsson BØ (2010) What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology* 28:245–248.
- Orth JD, Conrad TM, Na J, Lerman JA, Nam H, Feist AM, Palsson BØ (2011) A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism. *Mol Syst Biol* 7:535.
- Österlund T, Nookaew I, Nielsen J (2012) Fifteen years of large scale metabolic modeling of yeast: Developments and impacts. *Biotechnology Advances* 30(5):979-988.
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, et al. (2014) The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research* 42(Database issue):D206-D214.
- Palsson BØ (2015) *Systems Biology: Constraint-based Reconstruction and Analysis*. 1st edition. Cambridge University Press, New York, 531 pp.
- Pardelha F, Albuquerque MGE, Reis MAM, Dias JML, Oliveira R (2012) Flux balance analysis of mixed microbial cultures: Application to the production of polyhydroxyalkanoates from complex mixtures of volatile fatty acids. *Journal of Biotechnology* 162: 336– 345.
- Papin J, Price N, Wiback S, Fell D, Palsson BØ (2003) Metabolic pathways in the post-genome era. *Trends in Biochemical Sciences* 28(5):250-258.
- Petrova MA, Mindlin SZ, Gorlenko Zh M, Kaliaeva ES, Soina VS, Bogdanova ES (2002) Mercury-resistant bacteria from permafrost sediments and prospects for their use in comparative studies of mercury resistance determinants. *Genetika* 38:1569-1574.
- Price N, Reed J, Palsson BØ (2004) Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. *Nat Rev Micro* 2(11):886-897.
- Pudelko R (2003) Topographic map of the SSSI No. 8, King George Island, West Antarctica. *Polish Polar Research* 24: 53-60.
- Rodrigues DF, Ivanova N, He Z, Huebner M, Zhou J, Tiedje JM (2008) Architecture of thermal adaptation in an *Exiguobacterium sibiricum* strain isolated from 3 million year old permafrost: a genome and

transcriptome approach. *BMC Genomics* 9:547.

Sayers EW, Barrett T, Benson DA, *et al.* (2012) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* 40(Database issue):D13-D25.

Schilling CH, Shuster S, Palsson BØ (1999) Reinhart Heinrich. *Metabolic Pathway Analysis: Basic Concepts and Scientific Applications in the Post-genomic Era*. *Biotechnol Prog* 15:296-303.

Schujman GE, Mendoza D (2008) Regulation of type II fatty acid synthase in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 11:148-152.

Schuster S, Fell DA, Dandekar T (1999) Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *Trends in biotechnology* 17(2):53–60.

Schuster S, Fell DA, Dandekar T (2000) A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. *Nature Biotechnology* 18:326-332.

Snoep JL, Westerhoff HV (2005) From isolation to integration, a systems biology approach for building the Silicon Cell. *Topics in Current Genetics: Systems Biology* 13:13-30.

Stelling J *et al.* (2002) Metabolic network structure determines key aspects of functionality and regulation. *Nature* 420(6912):190–193.

Stephanopoulos G, Aristidou A, Nielsen J (1998) *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*. San Diego, CA: 1998.

Tan L, Qu YY, Zhou JT, Li A, Gou M (2009) Identification and characteristics of a novel salt-tolerant *Exiguobacterium* sp. for azo dyes decolorization. *Appl Biochem Biotechnol* 159:728-738.

Thiele I, Palsson BØ (2010) A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature Protocols* 5:93–121.

Ullah M, Schmidt H, Cho K-H and Wolkenhauer O (2006) Deterministic modeling and stochastic simulation of biochemical pathways using MATLAB. *IEEE Proceedings - Systems Biology* 153(2):53–60.

Varma A, Palsson BØ (1994a) *Metabolic Flux Balancing: Basic Concepts, Scientific and Practical Use*. *Nature Biotechnology* 12:994-998.

- Varma A, Palsson BØ (1994b) Metabolic Flux Balancing: Basic Concepts, Scientific and Practical Use. *Nature Biotechnology* 12:994-998.
- Vishnivetskaya TA, Siletzky R, Jefferies N, Tiedje JM, Kathariou S (2007) Effect of low temperature and culture media on the growth and freeze-thawing tolerance of *Exiguobacterium* strains. *Cryobiology* 54:234-240.
- Vishnivetskaya TA, Kathariou S, Tiedje JM (2009) The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles* 13:541-555.
- Vishnivetskaya TA, Lucas S, Copeland A et al. (2011) Complete genome sequence of the Thermophilic Bacterium *Exiguobacterium* sp. AT1b. *J Bacteriol* 193: 2880-2881.
- Watson JD, Crick FHC (1953) The Structure of DNA. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press 18:123-131.
- Yurkovich JT, Palsson BØ (2016) Solving Puzzles With Missing Pieces: The Power of Systems Biology. In *Proceedings of the IEEE* 104:2-7.
- Zhao Y, Wang Y, Zou L, Huang J (2016) Reconstruction and applications of consensus yeast metabolic network based on RNA sequencing. *FEBS Open Bio*. doi:10.1002/2211-5463.12033

7.2. Apêndice 2

Relação de todas as reações presentes na via de biossíntese de ácidos graxos da *E. antarcticum* B7 após a curadoria manual.



R38 : Octadecanoil-(acp) + Reduced_acceptor + Oxygen = Oleoil-(acp) + Acceptor + 2 H₂O
R39 : Acetil-CoA_ext => Acetil-CoA
R40 : Malonil-CoA_ext = Malonil-CoA
R41 : Hexadecenoil-(acp) => Hexadecenoil-(acp)_ext
R42 : Octadecanoil-(acp) => Octadecanoil-(acp)_ext
R43 : Oleoyl-(acp) => Oleoyl-(acp)_ext
R44 : ATP_ext => ATP
R45 : HCO₃⁻_ext => HCO₃⁻
R46 : NADPH_ext => NADPH
R47 : H_ext => H⁺
R48 : Acceptor_reduzido_ext => Acceptor_reduzido
R49 : Oxigênio_ext => Oxigênio
R50 : ADP => ADP_ext
R51 : Osrtofosfato => Osrtofosfato_ext
R52 : CO₂ => CO₂_ext
R53 : NADP⁺ => NADP⁺_ext
R54 : H₂O => H₂O_ext
R55 : NAD⁺ => NAD⁺_ext
R56 : Aceptor => Aceptor_ext
R57 : ACP_ext => ACP
R58 : CoA => CoA_ext
R59 : NADH_ext => NADH

7.3. Apêndice 3

Resultado ABF: Fluxos de concentração de metabólitos para a via de biossíntese de ácidos graxos da *E. antarcticum* B7.

| Reaction | Flux | Reaction | Flux | Reaction | Flux |
|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|
| 'R1' | 92.30784 | 'R21' | 7.692288 | 'R41' | 7.692739 |
| 'R2' | 53.84586 | 'R22' | 7.692312 | 'R42' | 7.51E-11 |
| 'R3' | 7.655269 | 'R23' | 7.692337 | 'R43' | 1.66E-10 |
| 'R4' | 7.655263 | 'R24' | 7.692364 | 'R44' | 92.30784 |
| 'R5' | 0.036882 | 'R25' | 7.692393 | 'R45' | 92.30784 |
| 'R6' | 7.69214 | 'R26' | 7.692425 | 'R46' | 53.84598 |
| 'R7' | 7.692138 | 'R27' | 7.692458 | 'R47' | 100 |
| 'R8' | 7.692137 | 'R28' | 7.692492 | 'R48' | 7.69269 |
| 'R9' | 7.692138 | 'R29' | 7.692528 | 'R49' | 7.69269 |
| 'R10' | 7.69214 | 'R30' | 7.692566 | 'R50' | 92.30784 |
| 'R11' | 7.692145 | 'R31' | 7.692607 | 'R51' | 92.30784 |
| 'R12' | 7.692151 | 'R32' | 7.692649 | 'R52' | 53.84586 |
| 'R13' | 7.69216 | 'R33' | 7.692694 | 'R53' | 53.84598 |
| 'R14' | 7.69217 | 'R34' | -7.16E-22 | 'R54' | 69.23149 |
| 'R15' | 7.692182 | 'R35' | -3.39E-06 | 'R55' | 53.84625 |
| 'R16' | 7.692196 | 'R36' | -4.44E-06 | 'R56' | 7.69269 |
| 'R17' | 7.692211 | 'R37' | -4.81E-06 | 'R57' | 0.03688 |
| 'R18' | 7.692228 | 'R38' | -3.27E-06 | 'R58' | 53.88274 |
| 'R19' | 7.692247 | 'R39' | 100 | 'R59' | 53.84625 |
| 'R20' | 7.692267 | 'R40' | -38.462 | | |

7.4. Apêndice 4

Modos elementares da via de biossíntese de ácidos graxos da *E. antarcticum* B7.

| Modos Elementares | EM1 | EM2 | EM3 | EM4 | EM5 | EM6 | EM7 | EM8 | EM9 | EM10 | EM11 | EM12 | EM13 |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------|-------|-------|----------|-------|-------|
| Reações | | | | | | | | | | | | | |
| 'R1' | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 'R2' | 0 | 7 | 8 | 8 | 7 | 8 | 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 'R3' | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R4' | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R5' | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0 | 0 | 0 |
| 'R6' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R7' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R8' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R9' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R10' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R11' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R12' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R13' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R14' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R15' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R16' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R17' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R18' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R19' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R20' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R21' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R22' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R23' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R24' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R25' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R26' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R27' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R28' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R29' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R30' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R31' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R32' | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 |
| 'R33' | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0,142857 | 0 | 0 | 0,142857 | 0 | 0 |
| 'R34' | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0,125 | 0,125 | 0 | 0,125 | 0,125 |
| 'R35' | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0,125 | 0,125 | 0 | 0,125 | 0,125 |
| 'R36' | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0,125 | 0,125 | 0 | 0,125 | 0,125 |
| 'R37' | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0,125 | 0,125 | 0 | 0,125 | 0,125 |
| 'R38' | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0,125 | 0 | 0 | 0,125 | 0 |
| 'R39' | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1,142857 | 1,125 | 1,125 | 1,142857 | 1,125 | 1,125 |
| 'R40' | -1 | 7 | 8 | 8 | 7 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 'R41' | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0,142857 | 0 | 0 | 0,142857 | 0 | 0 |
| 'R42' | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0,125 | 0 | 0 | 0,125 |
| 'R43' | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0,125 | 0 | 0 | 0,125 | 0 |
| 'R44' | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 'R45' | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 'R46' | 0 | 7 | 8 | 8 | 7 | 8 | 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 'R47' | 0 | 13 | 15 | 15 | 13 | 15 | 15 | 1,857143 | 1,875 | 1,875 | 1,857143 | 1,875 | 1,875 |
| 'R48' | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0,142857 | 0,125 | 0 | 0,142857 | 0,125 | 0 |
| 'R49' | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0,142857 | 0,125 | 0 | 0,142857 | 0,125 | 0 |
| 'R50' | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 'R51' | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 'R52' | 0 | 7 | 8 | 8 | 7 | 8 | 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 'R53' | 0 | 7 | 8 | 8 | 7 | 8 | 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 'R54' | 0 | 9 | 10 | 8 | 9 | 10 | 8 | 1,285714 | 1,25 | 1 | 1,285714 | 1,25 | 1 |
| 'R55' | 0 | 7 | 8 | 8 | 7 | 8 | 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 'R56' | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0,142857 | 0,125 | 0 | 0,142857 | 0,125 | 0 |
| 'R57' | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0,142857 | 0,125 | 0,125 | 0 | 0 | 0 |
| 'R58' | 0 | 7 | 8 | 8 | 8 | 9 | 9 | 1,142857 | 1,125 | 1,125 | 1 | 1 | 1 |
| 'R59' | 0 | 7 | 8 | 8 | 7 | 8 | 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |