



INSTITUTO DE FÍSICA  
Universidade Federal Fluminense

# Prevendo fluxos do metabolismo celular



**Marcio Argollo de Menezes**

**Florência Noriega**

Instituto de Física, UFF, Niterói

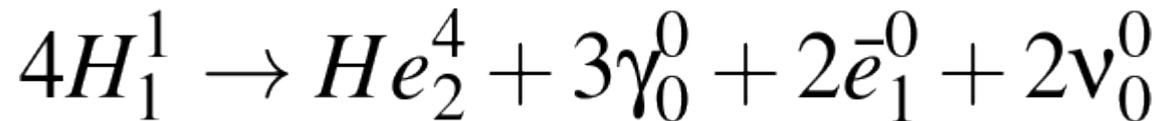
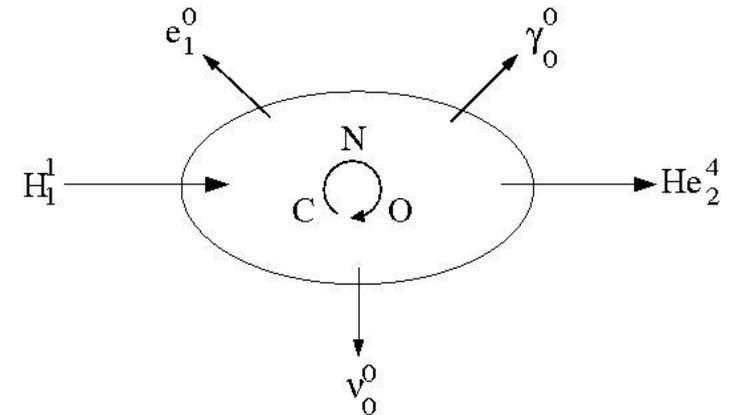
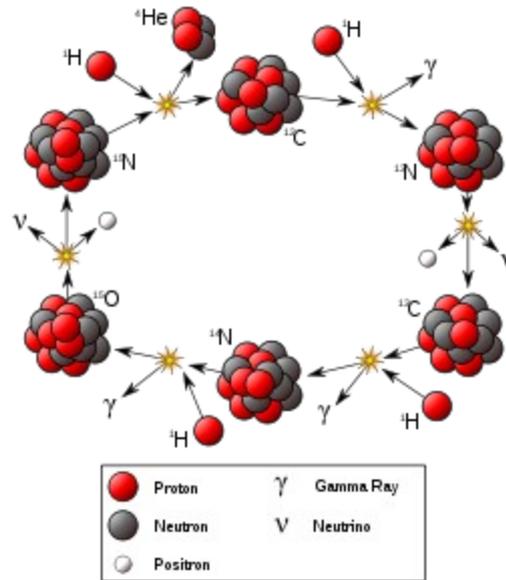
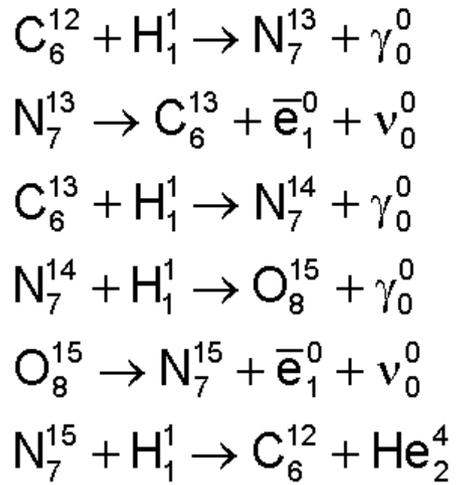
**Alexei Vazquez**

Cancer Institute of New Jersey-UMDNJ, NY

- Vida e interações químicas autocatalíticas: segregação e especialização
- Metabolismo: fábrica de energia e matéria
- Crescimento exponencial, estado estacionário e fluxo metabólico
- FBA e modelagem em larga-escala: reações *in-silico* e aplicações

• Vida e interações químicas autocatalíticas: segregação e especialização

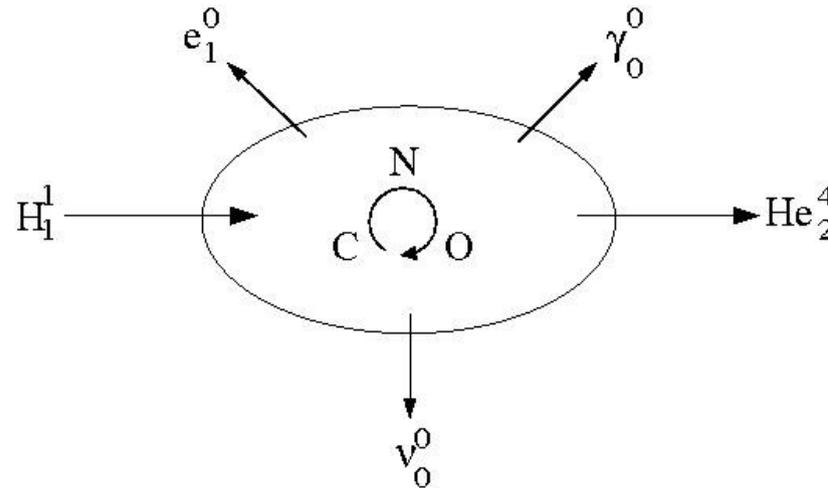
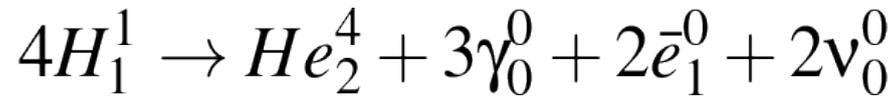
Autocatálise ≠ vida



Bethe, H. A. (1939). "Energy Production in Stars". Physical Review 55 (5): 434–456

• Vida e interações químicas autocatalíticas: segregação e especialização

Autocatálise ≠ vida



Bethe, H. A. (1939). "Energy Production in Stars". *Physical Review* 55 (5): 434–456

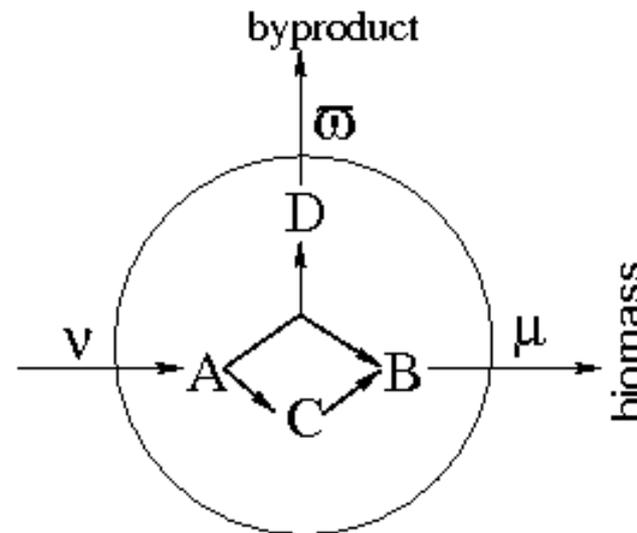
- Vida e interações químicas autocatalíticas: segregação e especialização

Aleksandr Oparin (1930)

Metano + Amônia + Hidrogenio + H<sub>2</sub>O → Carbono + Nitrogenio + Hidrogenio + Oxigenio  
CNHO + descarga elétrica → Aminoácidos + calor → proteínas → célula primitiva

- Meio espacialmente segregado, entrada e saída seletiva
- **Proteínas**: estrutura celular, **enzimas**, sinalização
- Metabolismo celular: substratos externos + reações internas + **enzimas** + bi-produtos
- Memória de longo-alcance: DNA (What is Life?, E. Schrödinger 1940)

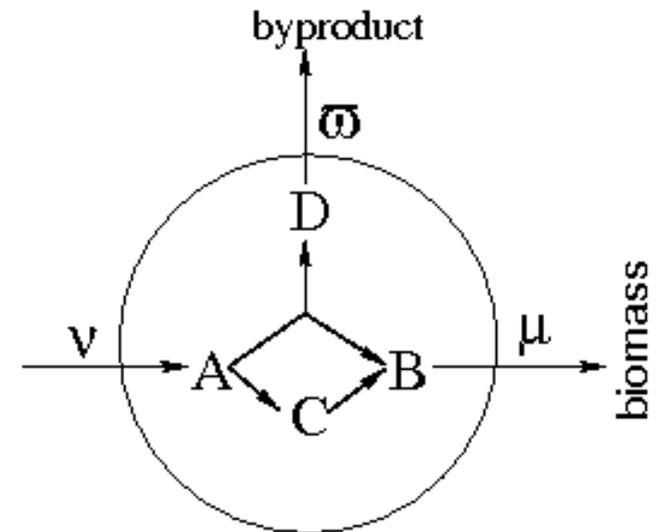
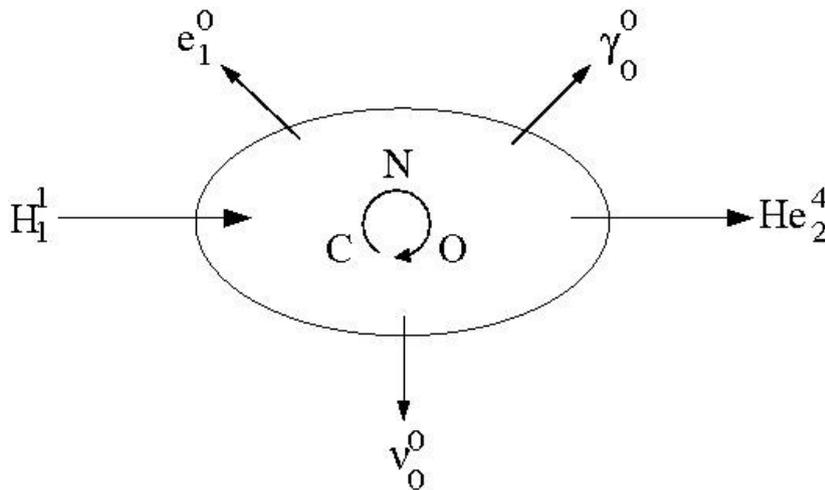
- Vida e interações químicas autocatalíticas: segregação e especialização



- Meio espacialmente segregado, entrada e saída seletiva
- **Proteínas**: estrutura celular, **enzimas**, sinalização
- Metabolismo celular: substratos externos + reações internas + **enzimas** + bi-produtos
- Memória de longo-alcance: DNA (What is Life?, E. Schrödinger 1940)

• Vida e interações químicas autocatalíticas: segregação e especialização

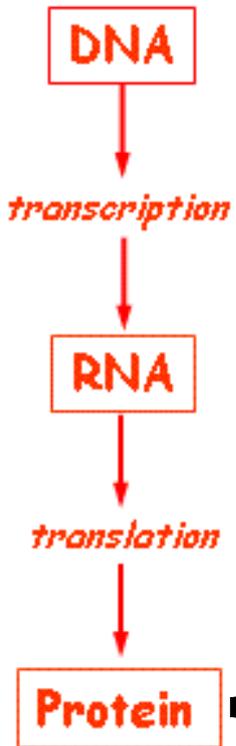
Autocatálise ≠ vida



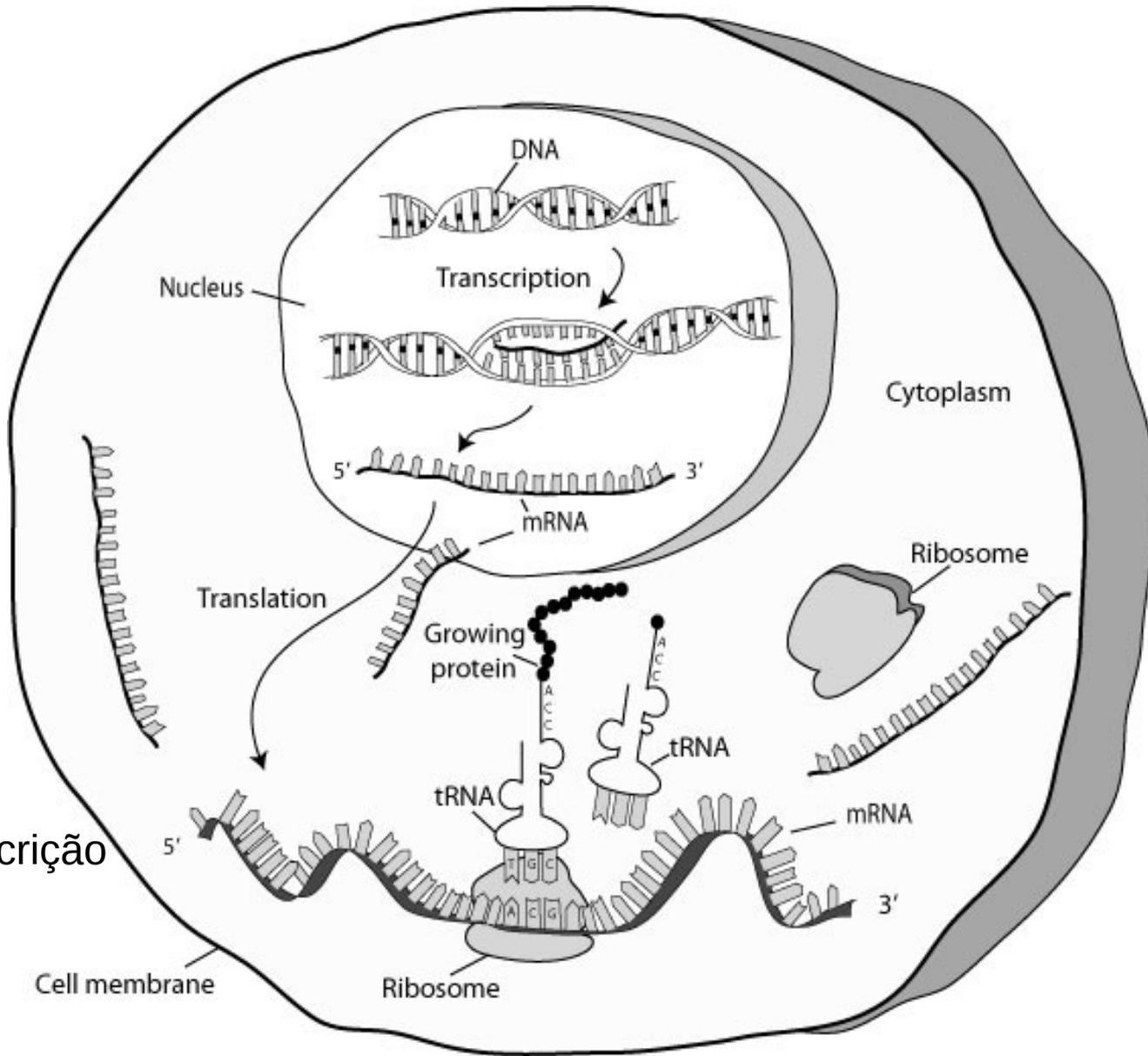
- Meio espacialmente segregado, entrada e saída seletiva
- **Proteínas**: estrutura celular, **enzimas**, sinalização
- Metabolismo celular: substratos externos + reações internas + **enzimas** + bi-produtos
- Memória de longo-alcance: DNA (**What is Life?, E. Schrödinger 1940**)



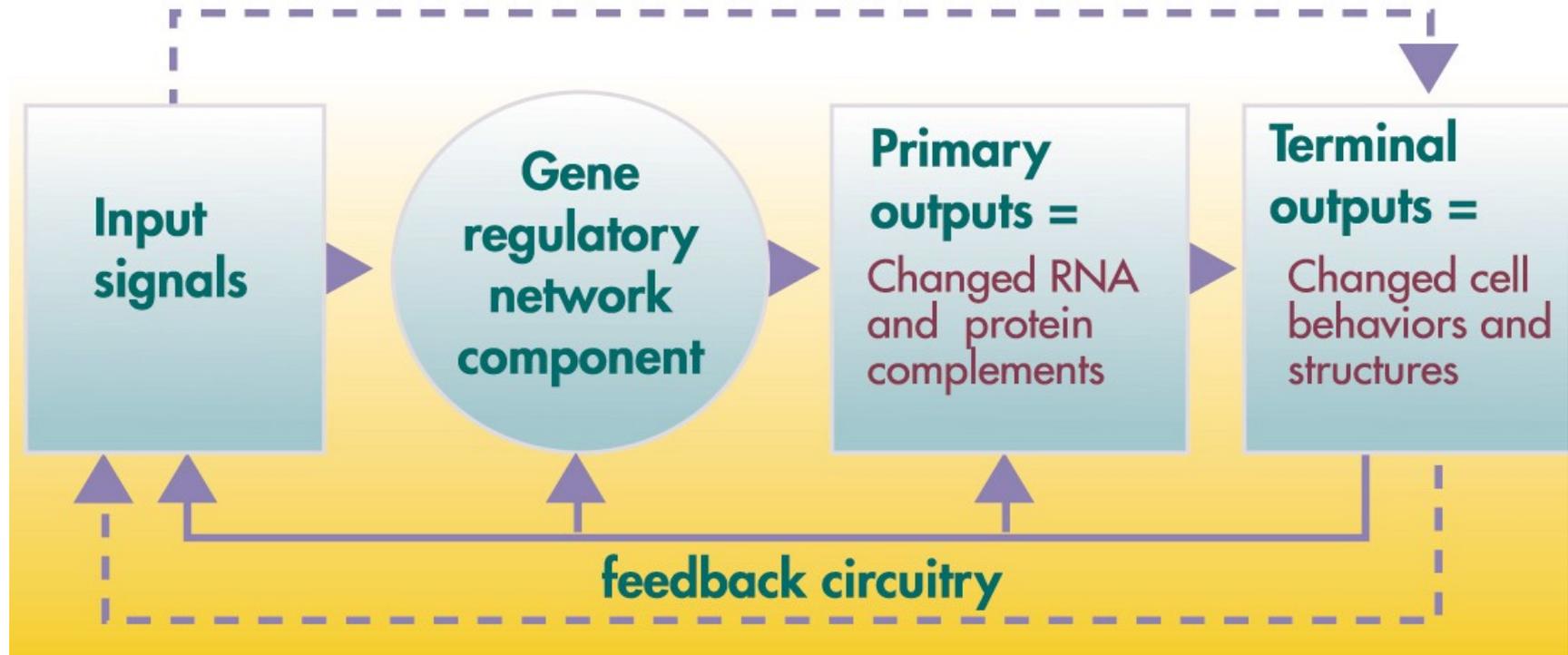
# Dogma central da biologia molecular



Enzimas  
Hormônios  
Estrutura celular  
Reguladores de transcrição  
etc...



**Mutação genética+seleção=adaptação:**  
reações metabólicas coordenadas para utilização eficiente de energia e espaço



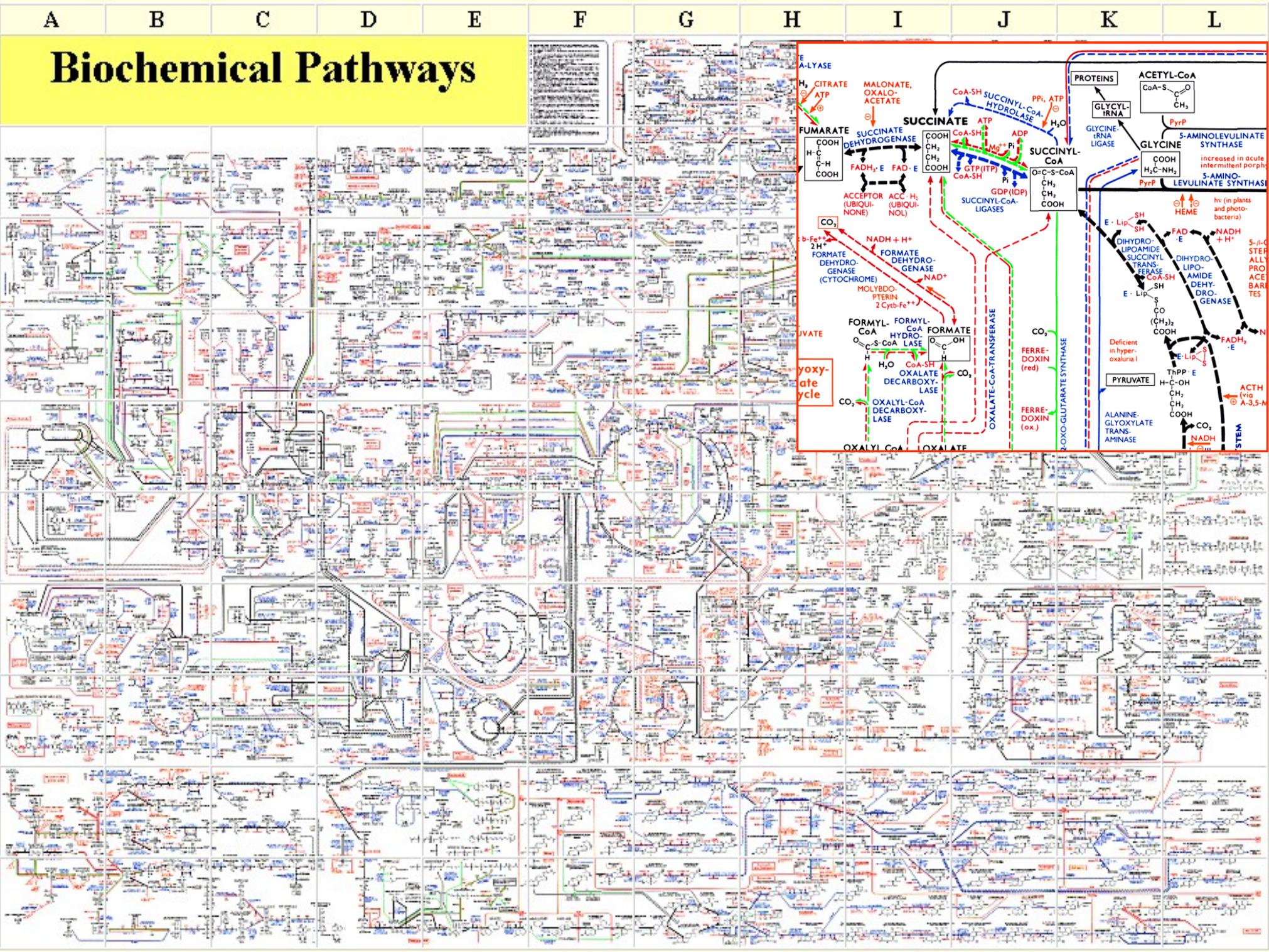
**Escherichia coli K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth**, Nature 420, 186 (2002), Rafael U. Ibarra, Jeremy S. Edwards & Bernhard O. Palsson.

**Optimality and evolutionary tuning of the expression level of a protein**, Nature 436, 588 (2005), Erez Dekel & Uri Alon.

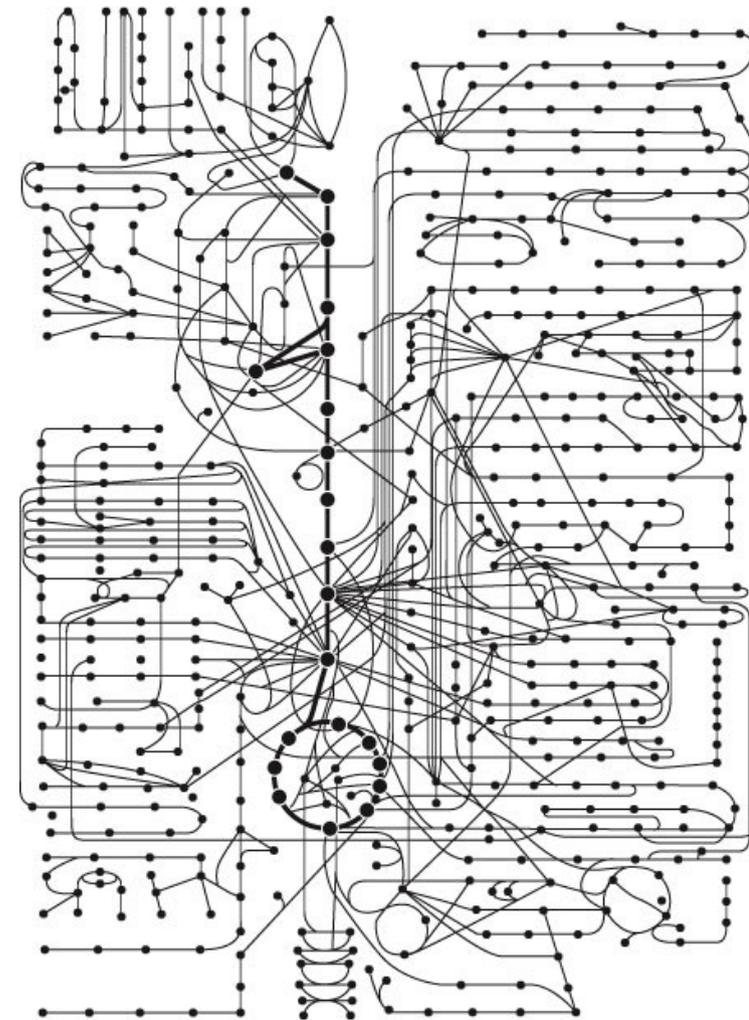
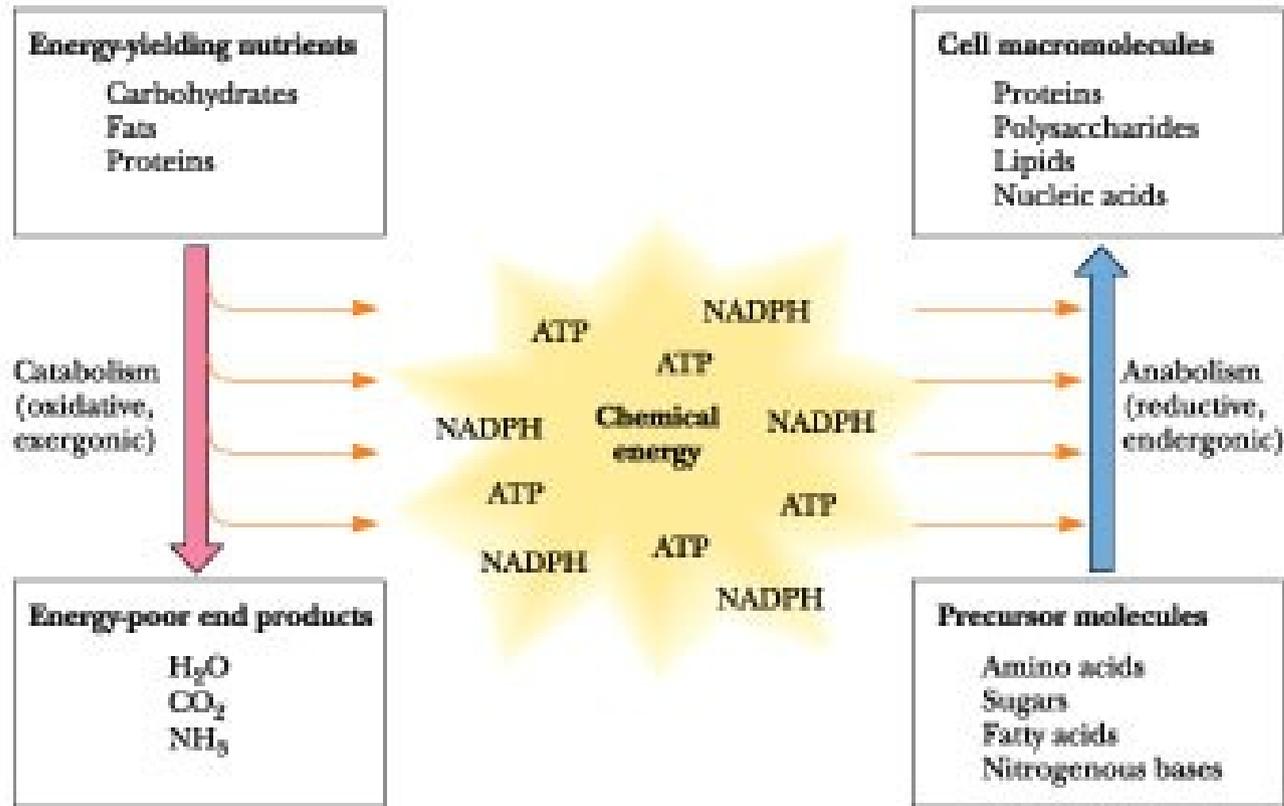
**Intracellular crowding defines the mode and sequence of substrate uptake by Escherichia coli and constrains its metabolic activity**, Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 12663 (2007), Q. Beg, A. Vazquez, J. Ernst, M. Argollo de Menezes, Z. Bar-Joseph, A.-L. Barabási and Z.N. Oltvai.

# Biochemical Pathways

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10



- Vida e interações químicas autocatalíticas: segregação e especialização
- **Metabolismo: fábrica de energia e matéria**
- Crescimento exponencial, estado estacionário e fluxo metabólico
- FBA e modelagem em larga-escala: reações *in-silico* e aplicações



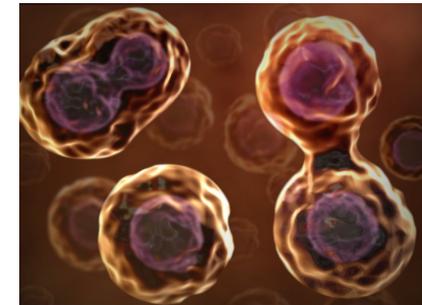
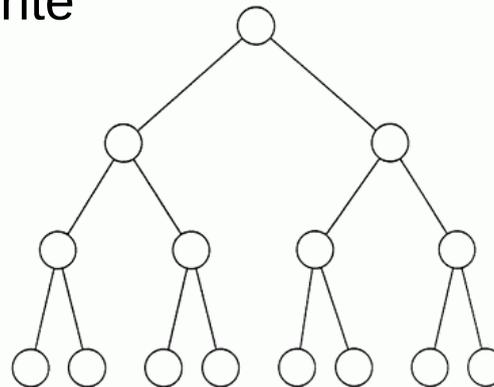
- Vida e interações químicas autocatalíticas: segregação e especialização
- Metabolismo: fábrica de energia e matéria
- **Crescimento exponencial, estado estacionário e fluxo metabólico**
- FBA e modelagem em larga-escala: reações *in-silico* e aplicações



- $\mu$  reflete o status interno da (cultura de) célula(s)
- Estado estacionário  $\mu$ -dependente

$$\tau = \frac{\log(2)}{\mu}$$

$$\frac{dN}{dt} = \mu N$$



- Vida e interações químicas autocatalíticas: segregação e especialização
- Metabolismo: fábrica de energia e matéria
- Crescimento exponencial, estado estacionário e fluxo metabólico
- **FBA e modelagem em larga-escala: reações *in-silico* e aplicações**

Biochem. J. (1986) 238, 781–786 (Printed in Great Britain)

## **Fat synthesis in adipose tissue**

### **An examination of stoichiometric constraints**

David A. FELL and J. Rankin SMALL

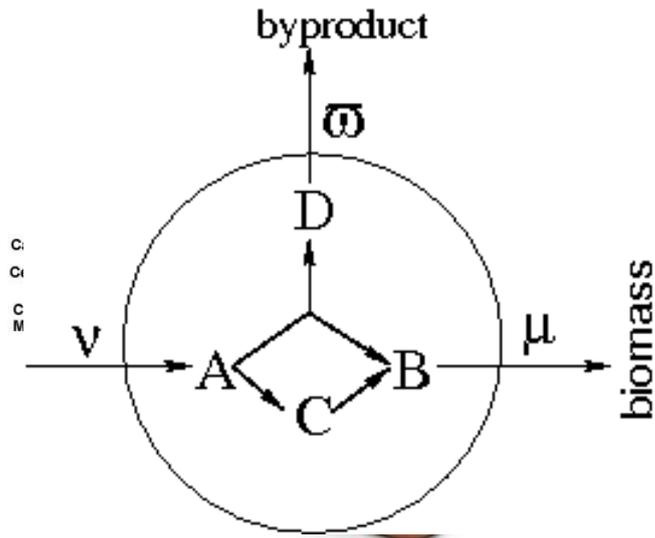
Department of Biology, Oxford Polytechnic, Headington, Oxford OX3 0BP, U.K.

---

The requirement for net balance of synthesis, degradation and transport for all intermediates in the pathways from glucose to fat imposes constraints on the balance of fluxes between different pathways. Linear programming has been used to examine the interactions between these constraints on metabolism in adipocytes and the requirement for efficiency in the conversion of glucose into fat. The circumstances under which excessive ATP synthesis would accompany this conversion have been investigated.

---

# Flux Balance Analysis (FBA)



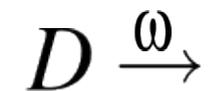
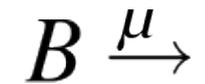
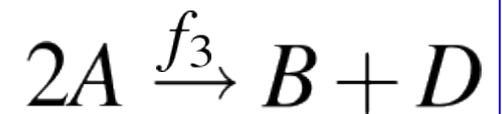
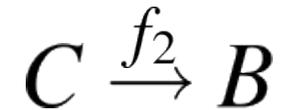
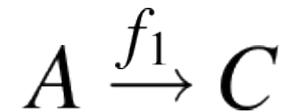
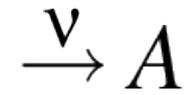
## Dados para análise de fluxos:

Lista de reações metabólicas

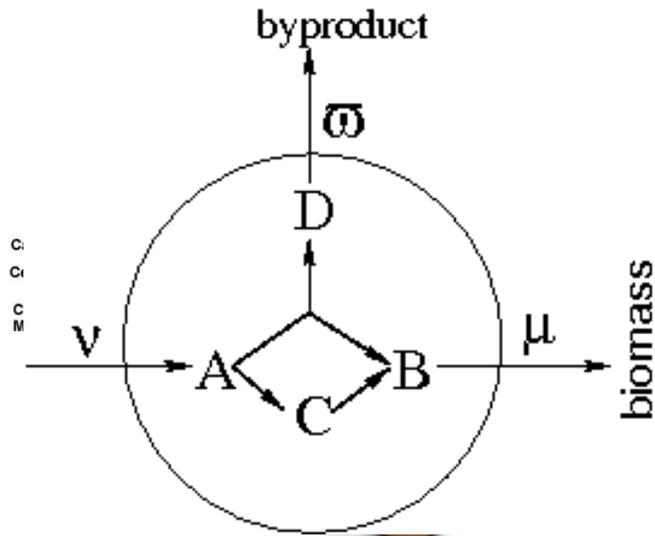
Balço de massa **imposto** (estoiquiometria)

Estado estacionário **imposto**

Objetivo **opcional**



# Flux Balance Analysis (FBA)



## Dados para análise de fluxos:

Lista de reações metabólicas

Balço de massa **imposto** (estoiquiometria)

Estado estacionário **imposto**

Objetivo **opcional**

$$\frac{d[A]}{dt} = v - f_1([e_1]) - 2f_3([e_3])$$

$$\frac{d[B]}{dt} = f_2([e_2]) + f_3([e_3]) - \mu$$

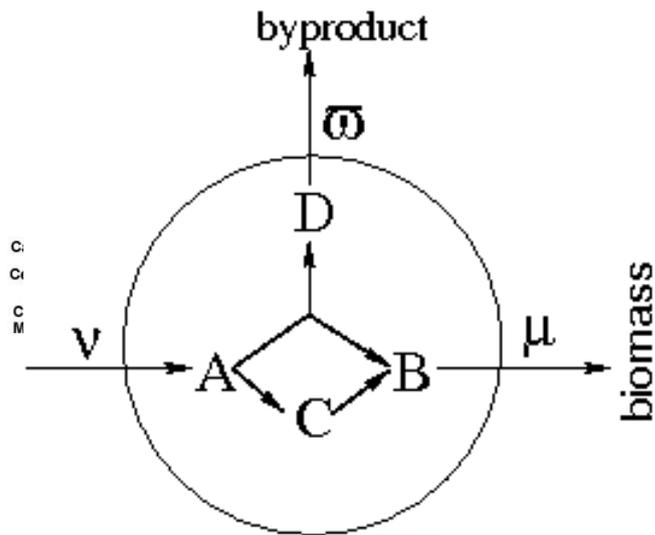
$$\frac{d[C]}{dt} = f_1([e_1]) - f_2([e_2])$$

$$\frac{d[D]}{dt} = f_3([e_3]) - \omega$$

$$\frac{d[A_i]}{dt} = \sum_{j=1}^N S_{ij} f_j$$

$$S = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & -2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 \end{pmatrix}$$

# Flux Balance Analysis (FBA)



## Dados para análise de fluxos:

Lista de reações metabólicas

Balço de massa **imposto** (estoiquiometria)

Estado estacionário **imposto** (crescimento exponencial)

Objetivo **opcional**

$$\frac{d[A]}{dt} = v - f_1([e_1]) - 2f_3([e_3])$$

$$\frac{d[B]}{dt} = f_2([e_2]) + f_3([e_3]) - \mu$$

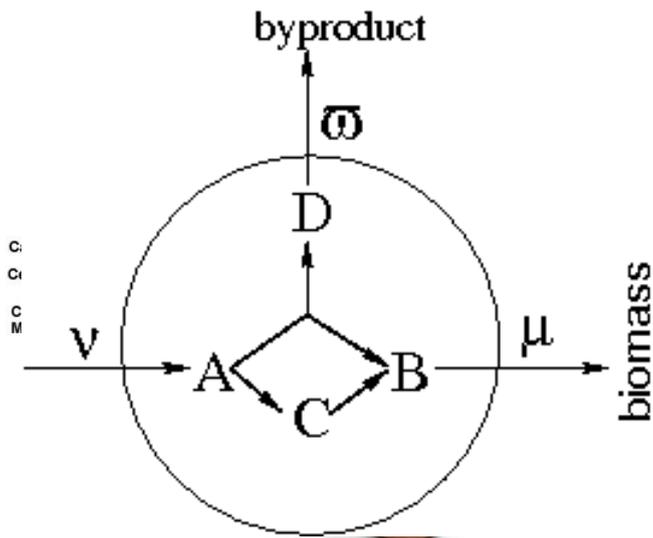
$$\frac{d[C]}{dt} = f_1([e_1]) - f_2([e_2])$$

$$\frac{d[D]}{dt} = f_3([e_3]) - \omega$$

$$\sum_{j=0}^N S_{ij} f_j = 0$$

$$S = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & -2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 \end{pmatrix}$$

# Flux Balance Analysis (FBA)



## Dados para análise de fluxos:

Lista de reações metabólicas

Balço de massa **imposto** (estoiquiometria)

Estado estacionário **imposto** (crescimento exponencial)

Objetivo **opcional** (competição/evolução)

**Max  $\{\mu\}$**

$$\frac{d[A]}{dt} = v - f_1([e_1]) - 2f_3([e_3])$$

$$\frac{d[B]}{dt} = f_2([e_2]) + f_3([e_3]) - \mu$$

$$\frac{d[C]}{dt} = f_1([e_1]) - f_2([e_2])$$

$$\frac{d[D]}{dt} = f_3([e_3]) - \omega$$

dado

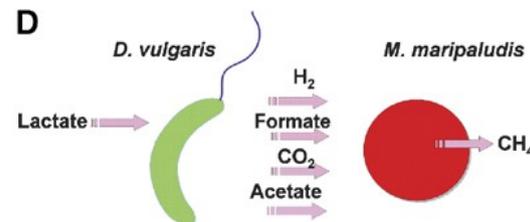
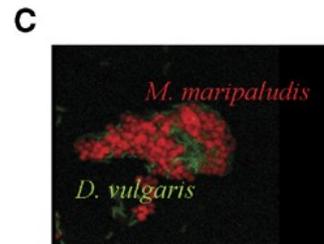
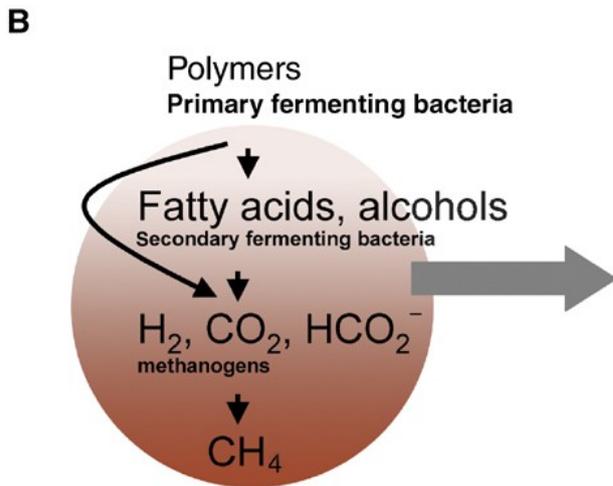
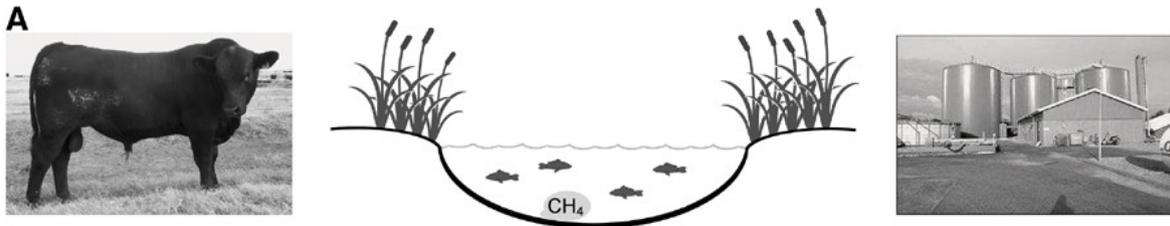
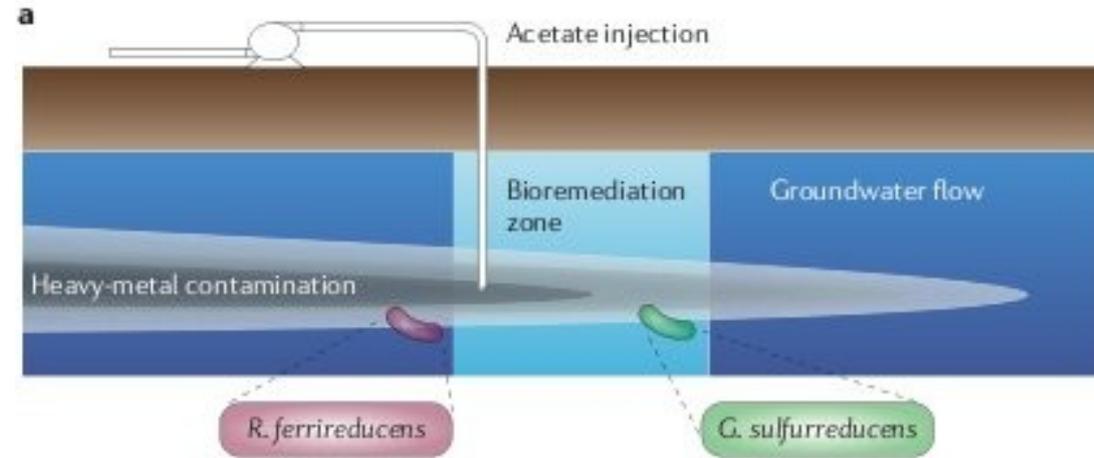
$$\sum_{j=0}^N S_{ij} f_j = 0$$

com

$$S = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & -2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 \end{pmatrix}$$

# Flux Balance Analysis (FBA): Aplicações

- Essencialidade de genes [1,2]
- Ecologia de bactérias [3,4]
- Bioremediação [5]
- Metagenômica [6]



# Flux Balance Analysis (FBA): Aplicações

- Essencialidade de genes: inativação de enzimas vs. variação de  $\mu$  [1,2]
- Ecologia de bactérias: coevolução e equilíbrio químico vs.  $\mu$  [3,4]
- Bioremediação: População modulada por agentes externos [5]
- Metagenômica: Populações e coexistência [6]

[1] Predicting gene essentiality using genome-scale in silico models, Joyce AR, Palsson BØ, Methods Mol Biol. 416:433-57 (2008)

[2] A genome-scale metabolic reconstruction for Escherichia coli K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information, Feist et al., Mol. Sys. Biology 3:121(2007)

[3] Metabolic modeling of a mutualistic microbial community, Stolyar et al., Molecular Systems Biology 3:92 (2007)

[4] Ecosystems biology of microbial metabolism, Niels Klitgord & Daniel Segrè, Current Opinion in Biotechnology, 22(4) 541-546 (2011)

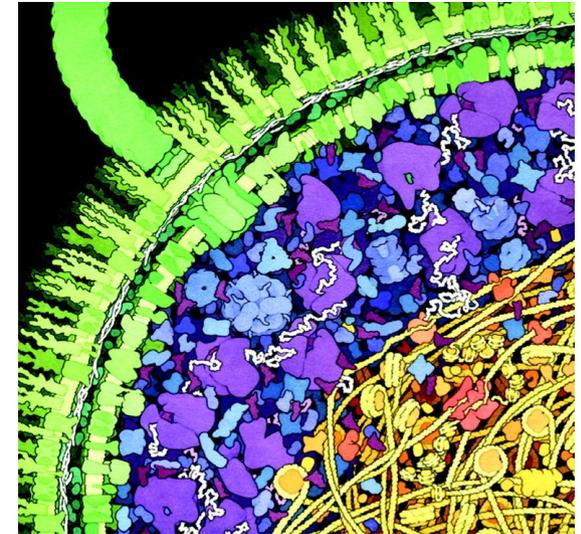
[5] In situ to in silico and back: elucidating the physiology and ecology of Geobacter spp. using genome-scale modelling, R. Mahadevan, B.Ø. Palsson & D.R. Lovley, Nature Reviews Microbiology 9, 39-50 (2011)

[6] Metagenomic Sequencing of an In Vitro-Simulated Microbial Community, J.L. Morgan, A.E. Darling & J.A. Eisen, . PLoS ONE 5(4): e10209



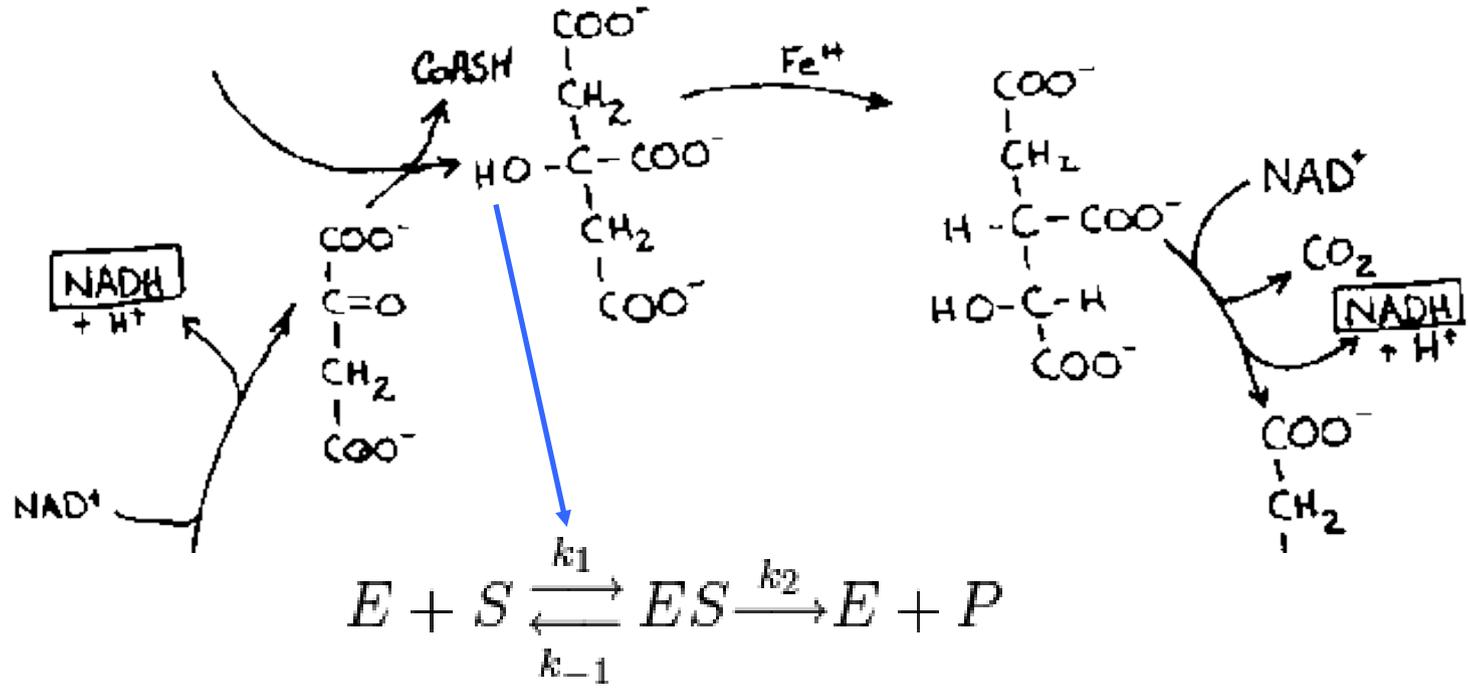
# Volume celular como fator limitante de crescimento

- Reações aceleradas na presença de enzimas
- Enzimas ocupam espaço considerável no citoplasma
- Alternativa: reorganização de fluxos metabólicos



- Ellis, R. J. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. Trends Biochem Sci 26, 597-604 (2001).
- Hall, D. & Minton, A. P. Macromolecular crowding: qualitative and semiquantitative successes, quantitative challenges. Biochim Biophys Acta 1649, 127-39 (2003).
- Minton, A. P. Influence of macromolecular crowding upon the stability and state of association of proteins: Predictions and observations. J Pharm Sci 94, 1668-75 (2005).

# Cinética enzimática: modelo de Michaelis-Menten



Timescale separation (quasi-equilibrium)

$$\frac{d[E]}{dt} = \frac{d[ES]}{dt} = 0$$

$$E_T = \left[ 1 + \frac{K_M}{S_T - v/k_2} \right] v/k_2 \approx v/k_2$$

Mass conservation

$$E_T = [E] + [ES]$$

$$S_T = [S] + [ES]$$

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$$

$$K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

# Flux Balance Analysis com crowding molecular

- Reações aceleradas na presença de enzimas
- Enzimas ocupam espaço no citoplasma: **volume ocupado como vínculo relevante**
- Crescimento limitado: reorganizações do metabolismo como estratégia de otimização

Balanço de fluxo

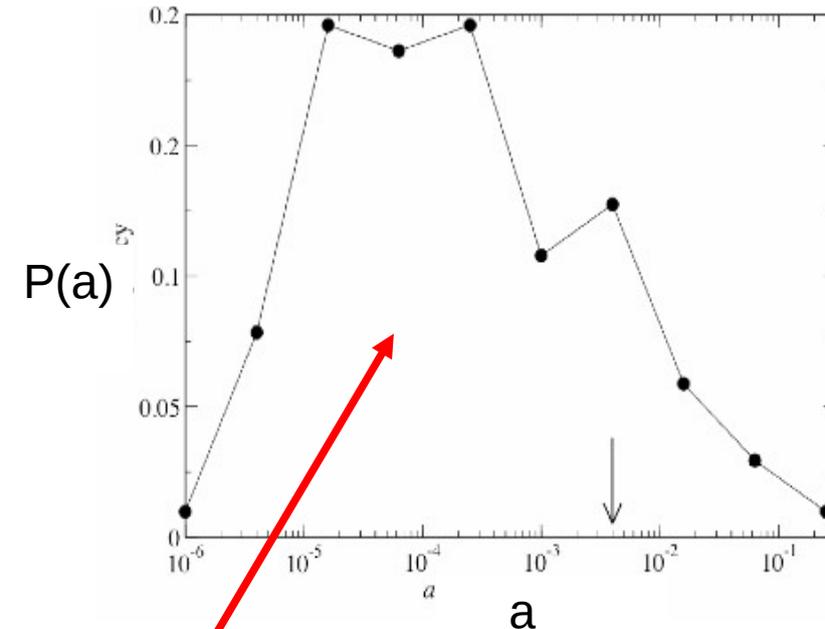
$$\sum_{j=0}^N S_{ij} f_j = 0$$

Volume ocupado por mol de enzima  $i$   
( $n_i$ =num. de moles,  $v_i$ =volume molar)

$$\sum_{i=1}^N v_i n_i \leq V$$

$$e_i = b_i f_i$$

$$\sum_{i=1}^N a_i f_i \leq 1$$

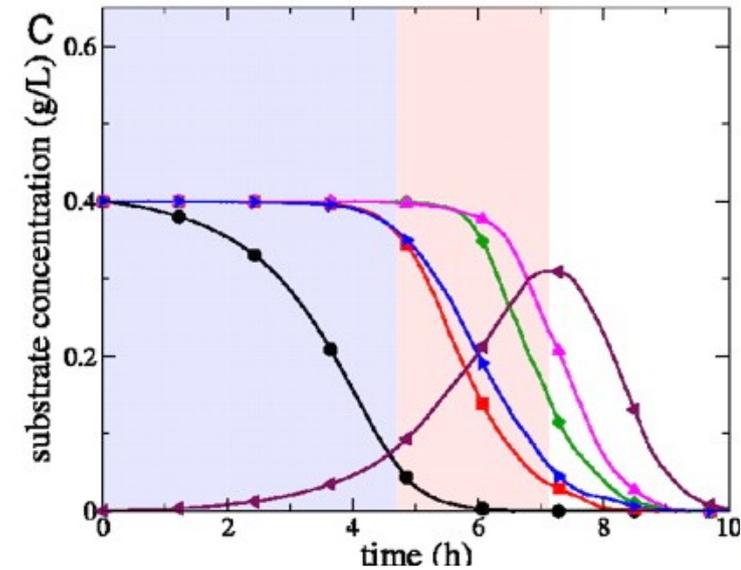
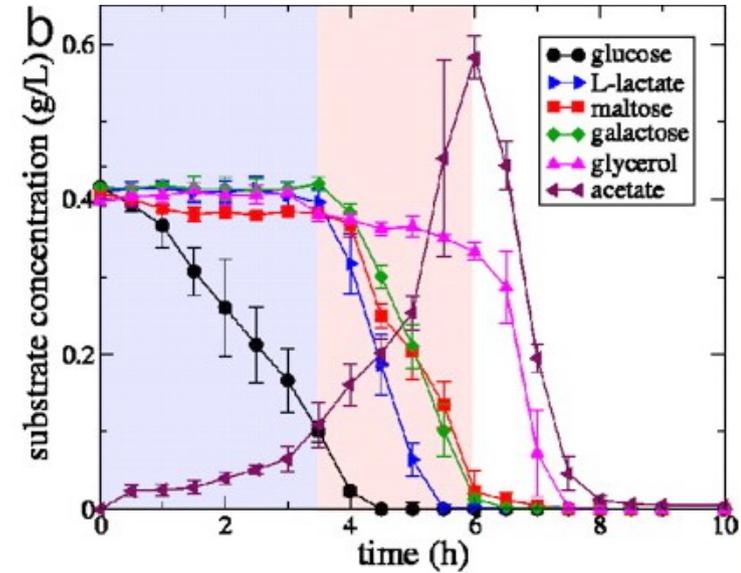


# Experiments with E. Coli: selective substrate consumption

Lac-operon and diauxic growth (Monod):

“Lactose is consumed only after glucose is depleted from the medium”

Genetic regulation of lactate production  
Evolutionary origin of regulation



**Impact of limited solvent capacity on metabolic rate, enzyme activities and metabolite concentrations of *S. cerevisiae* glycolysis**, A. Vazquez, M. Argollo de Menezes, A.-L. Barabási and Z.N. Oltvai, **PLoS Computational Biology** 4:10, 1-6 (2008).

**Impact of the solvent capacity constraint on *E. coli* metabolism**, A. Vazquez, Q. Beg, M. Argollo de Menezes, J. Ernst, Z. Bar-Joseph, A.-L. Barabási, L. Boros and Z.N. Oltvai, **BMC Systems Biology** 2,2:7 (2008).

**Intracellular crowding defines the mode and sequence of substrate uptake by *Escherichia coli* and constrains its metabolic activity**, Q. Beg, A. Vazquez, J. Ernst, M. Argollo de Menezes, Z. Bar-Joseph, A.-L. Barabási and Z.N. Oltvai. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 104, 12663 (2007).

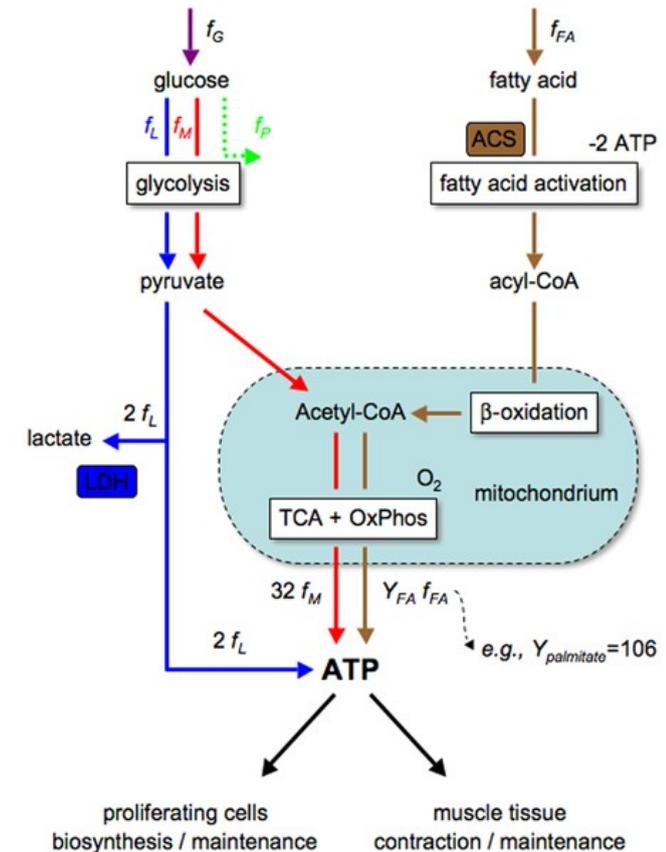
# Flux Balance Analysis (FBA): crowding molecular

## Consumo seletivo de substrato

Intracellular crowding defines the mode and sequence of substrate uptake by *Escherichia coli* and constrains its metabolic activity, Q. Beg, A. Vazquez, J. Ernst, M. Argollo de Menezes, Z. Bar-Joseph, A.-L. Barabási and Z.N. Oltvai. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 12663 (2007).

## Limiar láctico

Molecular Crowding Defines a Common Origin for the Warburg Effect in Proliferating Cells and the Lactate Threshold in Muscle Physiology, A. Vazquez & Z.N. Oltvai, *PLoS ONE* 6(4): e19538 (2011).



# Flux Balance Analysis (FBA): crowding molecular

## Consumo seletivo de substrato

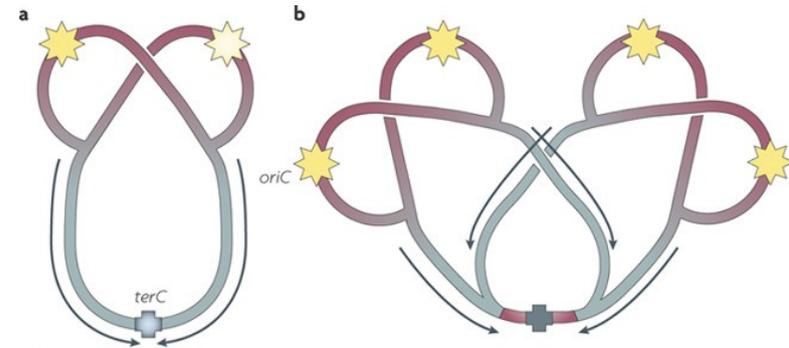
Intracellular crowding defines the mode and sequence of substrate uptake by *Escherichia coli* and constrains its metabolic activity, Q. Beg, A. Vazquez, J. Ernst, M. Argollo de Menezes, Z. Bar-Joseph, A.-L. Barabási and Z.N. Oltvai. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 12663 (2007).

## Limiar láctico

Molecular Crowding Defines a Common Origin for the Warburg Effect in Proliferating Cells and the Lactate Threshold in Muscle Physiology, A. Vazquez & Z.N. Oltvai, *PLoS ONE* 6(4): e19538 (2011).

## DNA multiforking e limites do crescimento

Em andamento, A. Vazquez, F. Noriega & M. Argollo de Menezes



Nature Reviews | Microbiology

$$G = \frac{\tau}{t_c \log 2} \left[ 2^{\frac{t_c + t_c}{\tau}} - 2^{\frac{t_d}{\tau}} \right]$$

$$\tau = \frac{\log(2)}{\mu}$$

# THANK YOU!

