

# Modelado de una reacción enzimática simple con retardo y discretización

José Manuel Albornoz<sup>1</sup> y Antonio Parravano<sup>2</sup>

Departamento de Electrónica y Comunicaciones, Universidad de Los Andes<sup>1</sup>.

Centro de Física Fundamental, Universidad de los Andes<sup>2</sup>

albornoz@ula.ve<sup>1</sup>, parravan@ula.ve<sup>2</sup>

23 de marzo de 2009

## Resumen

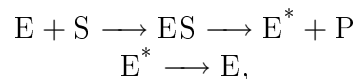
Se realiza una comparación entre dos modelos que toman en cuenta la duración de los cambios conformacionales que tienen lugar a nivel molecular durante el ciclo catalítico de un monómero. En el primer modelo proponemos un autómata que toma en cuenta los retardos asociados a los cambios conformacionales y la discretización inherente a las reacciones enzimáticas que tienen lugar en volúmenes muy pequeños. En el segundo modelo la dinámica es descrita por un conjunto de ecuaciones diferenciales con retardo. Ambos modelos coinciden cuando el número de moléculas consideradas es grande; sin embargo la dinámica del modelo continuo difiere de la del discreto cuando la concentración de substrato es muy pequeña; adicionalmente, el modelo discreto permite simular de una manera sencilla efectos de retardo en oligómeros.

## Abstract

A comparison is made between two models that take into account the duration of the conformational changes that take place at the molecular level during the catalytic cycle of a monomer. In the first model we propose an automaton that takes into account the delays associated to conformational changes and the discretization inherent to enzyme reactions. In the second model, the dynamics is described by a set of delayed differential equations. The models agree when the the number of substrate molecules considered is large; however the dynamics shown by the continuous delayed model differs from the dynamics of the discrete delayed model when the substrate concentration is very small; additionally, the discrete model can be used delay effects in oligomers in a straightforward way.

# 1. Introducción

Una reacción enzimática puede ser descrita a nivel molecular por medio del siguiente esquema simplificado,



donde una molécula de enzima E adhiere una molécula de sustrato S para formar un complejo enzima-sustrato ES. Una vez que transcurre un tiempo  $\tau_p$  la enzima libera una molécula de producto P, permaneciendo en un estado inactivo  $E^*$  por un tiempo  $\tau_r$  hasta que recupera su conformación activa original. (Blumenfeld, 1984). Esta secuencia de eventos puede ser representada por un modelo discreto como el propuesto por Hess y Mikhailov (1994) y Stange et al (1988,1989), en el que un autómatas representa los cambios conformacionales de la enzima a lo largo del ciclo catalítico.

En este trabajo se propone una representación alternativa en la que los cambios conformacionales de una enzima son representados por la evolución de una función recursiva a la que nos referiremos como mapa enzimático. Es posible establecer una equivalencia entre los parámetros del mapa y los parámetros cinéticos como  $V_{max}$ ,  $K_M$  and  $K_I$ ; de esta manera el mapa puede ser empleado para representar y simular redes enzimáticas en términos de redes de mapas acoplados (Waller y Kapral, 1984). La descripción resultante es simple y completamente determinística, a diferencia de aquellos métodos basados en simulación estocástica (Puchalka y Kierzek, 2004).

Cuando se consideran ensembles grandes de moléculas, la descripción proporcionada por el mapa enzimático coincide con la descripción de campo medio empleada para describir reacciones por medio de conjuntos de ecuaciones diferenciales acopladas no-lineales (EDs). Sin embargo, cuando se considera un número pequeño de moléculas, la descripción continua proporcionada por las EDs es inadecuada ya que no puede reproducir cambios discretos en las cantidades de reactantes. Otra limitación de las EDs es que ellas no toman en cuenta las fluctuaciones que han sido observadas en estudios de enzimas aisladas (Lu et al., 1998; Xie y Lu, 1999) y de espectroscopía por resonancia nuclear (Huang y Monetelione, 2005). Por último, las EDs no pueden ser empleadas para estudiar fenómenos colectivos no-triviales.

En este trabajo consideraremos la reacción simple  $A \xrightleftharpoons[\beta]{\alpha} B$ , en la que la conversión entre dos sustratos A y B es realizada por medio de dos enzimas unidireccionales  $\alpha$  and  $\beta$ . La evolución temporal de los reactantes es seguida utilizando el modelo discreto e integrando las ecuaciones diferenciales que describen la reacción en la aproximación de campo medio, a fines de resaltar las diferencias entre ambos modelos.

## 2. El modelo discreto

Hay tres etapas en el ciclo catalítico de una enzima que son representadas por el modelo discreto; cada una de ellas requiere de un cierto tiempo para su completación: 1) La enzima

está libre, a la espera de adherir sustrato. El tiempo promedio  $\langle \tau_b \rangle$  requerido para adherir una molécula de sustrato dependerá de la afinidad de la enzima por tal sustrato y de su concentración en el medio. 2) La enzima ha adherido un sustrato y un complejo ES se ha formado. En promedio, un tiempo  $\langle \tau_p \rangle$  transcurre hasta que una molécula de producto es liberada. 3) El producto P ha sido liberado y la enzima está recobrando su conformación original; la duración promedio de esta etapa es  $\langle \tau_r \rangle$ . Consideraremos que el tiempo promedio  $\langle \tau_p \rangle$  requerido por la etapa 2 es una fracción  $c \leq 1$  del tiempo de recambio promedio de una enzima  $\langle \tau \rangle = \langle \tau_p \rangle + \langle \tau_r \rangle$ .

La fase  $x$  asociada al movimiento conformacional de una molécula de enzima está determinada por una función recursiva  $f(x)$  (en adelante denominada el mapa enzimático). El mapa es un procedimiento determinístico para evolucionar la fase de la enzima desde el estado de fase  $x_n$  en el tiempo discreto  $t_n$  hasta  $x_{n+1}$  en el tiempo discreto  $t_{n+1}$ , con  $t_{n+1} = t_n + \Delta t$ , como se muestra en la Fig. 1. Se distinguen tres regiones en  $f(x)$ : a) Una región caótica constituida por un mapa tienda modificado (Miller y Huse, 1993) definido entre  $0 \leq x \leq 1$ ,  $0 \leq f(x) \leq 1 + a$ ; b) Una región laminar definida en  $1 \leq x \leq 2$ ; y c) Una región de re-inyección definida para  $x > 2$ . El número de iteraciones que la fase  $x_n$  permanece en la región caótica representa el tiempo variable  $\tau_b$  que la enzima requiere para adherir una molécula de sustrato. Este tiempo es inversamente proporcional a  $p$ , el ancho entre las dos intersecciones del mapa en  $f(x) = 1$  (ver la Fig. 1). Cuando un iterado  $x_n$  en la región caótica yace en el rango

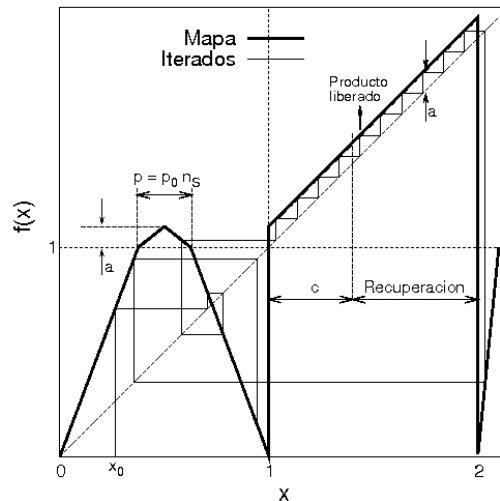


Figura 1: El mapa enzimático

$(1 - p)/2 < x_n < (1 + p)/2$  se asume que la enzima ha adherido una molécula de sustrato: el siguiente iterado deja la región caótica y entra en la región laminar. La región laminar modela el tiempo  $\tau_p$  que transcurre entre la formación del complejo ES y la liberación de una molécula de sustrato, así como el tiempo  $\tau_r$  requerido para que la enzima recupere su conformación inicial. La región laminar está dividida en dos secciones: la sección desde  $x = 1$  hasta  $x = 1 + c$  representa la presencia del complejo ES; una vez que  $x_t > 1 + c$  una molécula de producto es liberada, como se indica en la Fig. 1. La sección desde  $x = 1 + c$  hasta  $x = 2$  representa la recuperación de la enzima. La región de re-inyección entre  $x = 2$  y  $x = 2 + a$  permite que el iterado sea re-inyectado en un solo paso en la región caótica, donde la enzima está de nuevo disponible para adherir un sustrato.

### 3. Comparación entre los modelos

La evolución de un ensamble discreto de mapas enzimáticos debe coincidir con la evolución de la aproximación de campo medio cuando se consideran grandes números de enzimas y reactantes. Sin embargo, a medida que el número de moléculas considerado se hace más pequeño, surgirán diferencias entre ambos modelos. Para ilustrar tales diferencias consideraremos la reacción simple  $A \xrightleftharpoons[\beta]{\alpha} B$ , donde la conversión entre dos sustratos A y B es catalizada por dos enzimas unidireccionales  $\alpha$  and  $\beta$ . Cuando se consideran los retardos asociados con la formación de complejos ES y los tiempos de recuperación de las enzimas la reacción es descrita por un conjunto de ecuaciones diferenciales con retardo (EDRs):

$$\frac{d[A]}{dt} = \frac{1}{V_r} \{g_\beta[B(t - \tau_{\beta p})]M_{\beta 1}(t - \tau_{\beta p}) - g_\alpha[A(t)]M_{\alpha 1}(t)\} + [\dot{A}_{ext}(t)] \quad (1)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = \frac{1}{V_r} \{g_\alpha[A(t - \tau_{\alpha p})]M_{\alpha 1}(t - \tau_{\alpha p}) - g_\beta[B(t)]M_{\beta 1}(t)\} \quad (2)$$

$$\frac{dM_{\alpha 1}}{dt} = \mu_\alpha g_\alpha \{[A(t - \tau_\alpha)]M_{\alpha 1}(t - \tau_\alpha) - [A(t)]M_{\alpha 1}(t)\} \quad (3)$$

$$\frac{dM_{\beta 1}}{dt} = \mu_\beta g_\beta \{[B(t - \tau_\beta)]M_{\beta 1}(t - \tau_\beta) - [B(t)]M_{\beta 1}(t)\} \quad (4)$$

donde  $M_{\alpha 1}(t)$ ,  $M_{\beta 1}(t)$  representan la masa de enzima libre disponible para adherir sustrato,  $g_\alpha = V_{max_\alpha}/K_\alpha$ ,  $g_\beta = V_{max_\beta}/K_\beta$  repre-

sentan las tasas netas a las que el sustrato es adherido por las enzimas,  $V_{max_\alpha}$ ,  $V_{max_\beta}$  son las velocidades máximas de cada enzima,  $K_\alpha$ ,  $K_\beta$  sus respectivas constantes de Michaelis, y  $\tau_{\alpha p} = c_\alpha \tau_\alpha$ ,  $\tau_{\beta p} = c_\beta \tau_\beta$ . El término  $[\dot{A}_{ext}(t)]$  representa la tasa a la cual se le agrega sustrato al sistema. El volumen en el que la simulación es realizada es  $V_r = 10.3$  attolitros, correspondiente a un glicosoma de *T. brucei* (Navid y Ortoleva, 2006).

La integración numérica de las Ecs. (1-4) fue realizada para comparar los resultados con los del modelo discreto equivalente. La Fig. 2(a) muestra la evolución de [A] en los modelos discreto y EDR para una concentración total de sustrato  $[S_0] = 50 \mu\text{M}$ ; se consideró que la reacción tiene lugar en un volumen de  $V_r = 10.4$  attolitros, lo que corresponde a 310 moléculas de sustrato. La reacción es catalizada por 200 enzimas de cada tipo, lo que corresponde a una masa de 1.66 attogramos por cada enzima. La coincidencia entre modelos es tan buena que las diferencias en los resultados no pueden ser apreciadas en la Fig. 2.

A diferencia del modelo discreto, el modelo EDR falla cuando el número de moléculas de sustrato es pequeño. La Fig. 3 muestra un ejemplo de esta limitación: se muestra la evolución de sustrato en los modelos discreto y EDR para los mismos valores de los parámetros empleados en la Fig. 2 cuando  $[S_0]$  es reducido a  $24.2 \mu\text{M}$ , una concentración equivalente a 150 moléculas de sustrato. La evolución de [A] muestra que los resultados producidos por el modelo discreto tienden a seguir aquellos que corresponden al modelo EDR, sin embargo pueden aprecia-

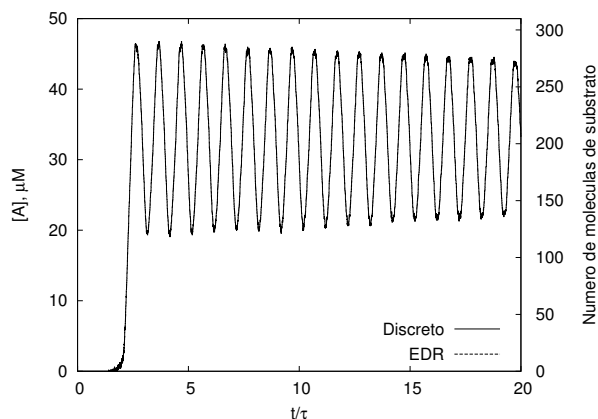


Figura 2: Resultados de la integración de los modelos MM y EDR vs. modelo discreto. El eje  $y$  de la izquierda muestra concentraciones mientras que el de la derecha muestra el número de sustratos correspondiente. Los valores de los parámetros son  $V_{max\alpha} = 500 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ,  $V_{max\beta} = 1000 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ,  $K_\alpha = K_\beta = 0.16 \mu\text{M}$ ,  $\mu_\alpha = \mu_\beta = 5 \text{ kDa}$ ,  $m_\alpha = m_\beta = 1.66 \text{ attogramos}$ ,  $c_\alpha = 0.5$ ,  $c_\beta = 0.01$ ,  $[S_0] = 50 \mu\text{M}$

se observan fluctuaciones en  $[A]$  debido a la adhesión y liberación de moléculas de reactante. Más aún, la sincronización entre los modelos continuo y discreto se pierde a medida que la reacción progresa. Este tipo de situaciones se presenta en condiciones de escasez de sustrato o en volúmenes muy pequeños.

Una de las limitaciones del modelo continuo es que aún en el caso más sencillo resulta difícil establecer las ecuaciones diferenciales que describen a un oligomero con efectos de retardo, ya que es necesario considerar un continuo de retardos debido a las infinitas posibles combinaciones para los estados  $x$  de cada subunidad. Este es un problema que

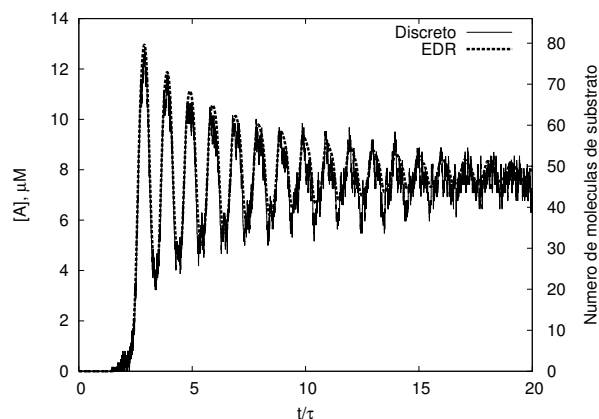


Figura 3: Igual que la Fig. 2 pero con  $[S_0] = 24.2 \mu\text{M}$

presenta un considerable grado de dificultad aún en el caso más sencillo (un dímero); para un tetramero la tarea es formidable. El modelo discreto resuelve esta dificultad al permitir representar y simular de una manera sencilla este tipo de efectos. La Fig. 4 presenta una simulación en que el modelo discreto es empleado para simular la misma reacción correspondiente a las figuras anteriores, pero en este caso las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  son tetrameros.

## 4. Conclusiones

Se ha propuesto un modelo enzimático discreto que incluye tiempos de procesamiento y recuperación para tomar en cuenta de una forma simple los cambios conformacionales que ocurren durante el ciclo catalítico y sus efectos en la dinámica resultante. El modelo discreto concuerda con el modelo continuo con retardo cuando se consideran grandes números de moléculas. Cuando este número es

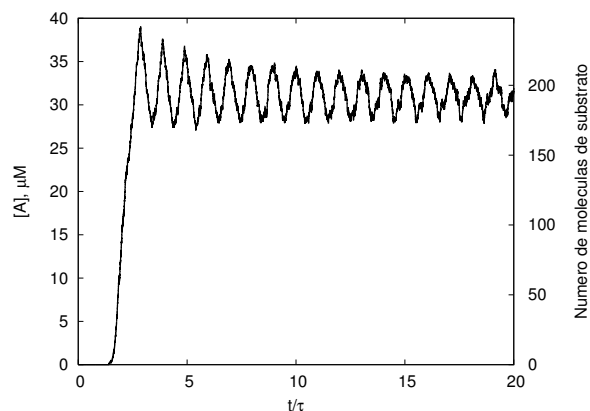


Figura 4: Resultado para el modelo discreto. Los valores de los parámetros son  $V_{max\alpha} = V_{max\beta} = 500 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ,  $K_{\alpha} = 16.3 \mu\text{M}$ ,  $K_{\beta} = 1.6 \mu\text{M}$ ,  $\mu_{\alpha} = \mu_{\beta} = 20 \text{ kDa}$ ,  $m_{\alpha} = m_{\beta} = 1.66 \text{ attogramos}$ ,  $c_{\alpha} = 0.5$ ,  $c_{\beta} = 0.01$ ,  $[S_0] = 50 \mu\text{M}$ . La cooperatividad para ambos tetrameros es la misma (0.33).

pequeño el modelo discreto exhibe las discontinuidades asociadas a la naturaleza discreta de las reacciones a escalas microscópicas. El modelo discreto representa una herramienta de modelado y simulación que evita la complejidad de la simulación estocástica, sin adolecer de las deficiencias de los modelos basados en ecuaciones diferenciales; esta característica es especialmente importante cuando se consideran sistemas biológicos que operan en volúmenes muy pequeños como es el caso de las organelas.

## Referencias

Blumenfeld, L., Tikhonov, A., (1984). Biophysical thermodynamics of intracellular processes: Molecular machines of

the living cell. Springer, Berlin, pp 86-111

Hess, B., Mikhailov A., (1994). *Science*, 264, 223-224.

Huang, Y., Montelione, G., (2005). *Nature*, 438, 36-37.

Lu, H., Xun, L., Xie, S., (1998). *Science*, 282, 1877-1882

Miller J., Huse, D., (1993). *Phys. Rev. E*, 48, 2528 - 2535.

Navid A., Ortoleva P., (2004). *J. Theor. Bio.*, 228, 449-458, doi:10.1016/j.jtbi.2004.02.007

Puchalka, J., Kierzek., A., (2004). *Biophys. J.*, 86, 1357-1372.

Stange, P., Mikhailov, A., Hess, B., (1998). *J. Phys. Chem. B*, 102, 6273-6289.

Stange, P., Zanette, D., Mikhailov, A., Hess, B., (1999). *Biophys. Chem.*, 79, 233-247.

Waller, I., Kapral, R., (1984). *Phys. Rev. E*, 30, 4, 2047-2055.

Xie, S., Lu, P., (1999). *J. Biol. Chem.*, 274, 23, 15967-15970.