

Núria Vilaplana<sup>1</sup>, Cristina Balcells<sup>1,2</sup>, Sergio Madurga<sup>1</sup>, Josep Lluís Garcés<sup>3</sup>, Marta Cascante<sup>2</sup> i Francesc Mas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Secció de Química Física, Departament de Ciència de Materials i Química Física i Institut de Química Teòrica i Computacional (IQTCUB) de la Universitat de Barcelona.

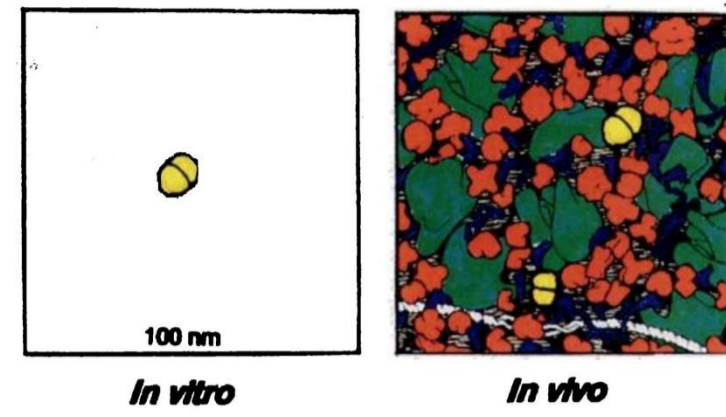
<sup>2</sup> Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular i Institut de Biomedicina (IBUB) de la Universitat de Barcelona.

<sup>3</sup> Departament de Química de la Universitat de Lleida (UdL).

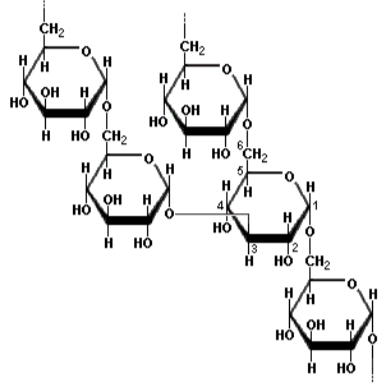
## Introducció

### L'Agglomeració Macromolecular

El medi cel·lular és un entorn complex format per una gran quantitat de diferents macromolècules que exclouen un cert volum al medi. Els efectes causats per aquest volum exclòs es coneixen com **aglomeració macromolecular**<sup>[1]</sup>. La majoria de les dades cinètiques experimentals s'han obtingut treballant en condicions de dissolució diluïda i no són representatives de l'entorn cel·lular.



Imatge 1. Comparació entre condicions de dissolució diluïda (*in vitro*) i medi cel·lular (*in vivo*).



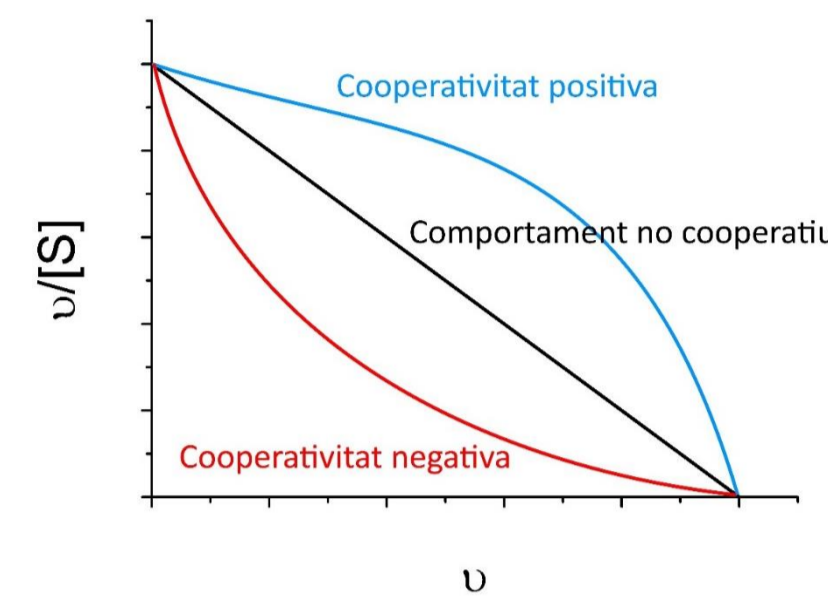
Imatge 2. Estructura molecular d'un dextrà.

Ja que no és viable realitzar mesures cinètiques *in vivo* per la complexitat del medi cel·lular, per estudiar els fenòmens relacionats amb l'aglomeració macromolecular es poden afegir polímers inerts que actuen com a agents aglomerants o obstacles (*in vivo-like*). En aquest cas s'han fet servir diferents concentracions d'un dextrà de pes molecular 250 kDa.

### Cooperativitat

Els enzims oligomèrics poden presentar comportaments que difereixen del model cinètic clàssic de Michaelis-Menten. Aquest fenomen s'anomena **cooperativitat** i és degut a que la unió d'un substrat a un dels centres actius altera l'afinitat de la resta de centres actius pel substrat.

La cooperativitat pot ser de dos tipus: positiva, si l'afinitat dels centres actius augmenta per la unió de molècules de substrat; i negativa, si l'afinitat disminueix.



Imatge 3. Gràfica d'Scathard comparant els tipus de comportaments cooperatius.

[S] és la concentració de substrat i  $v$  és el nombre mig d'ocupació:

$$v = s \cdot \frac{v_0}{v_{max}}$$

$s$  és el nombre total de centres actius,  $v_0$  és la velocitat inicial i  $v_{max}$  és la velocitat màxima.

## Objectiu

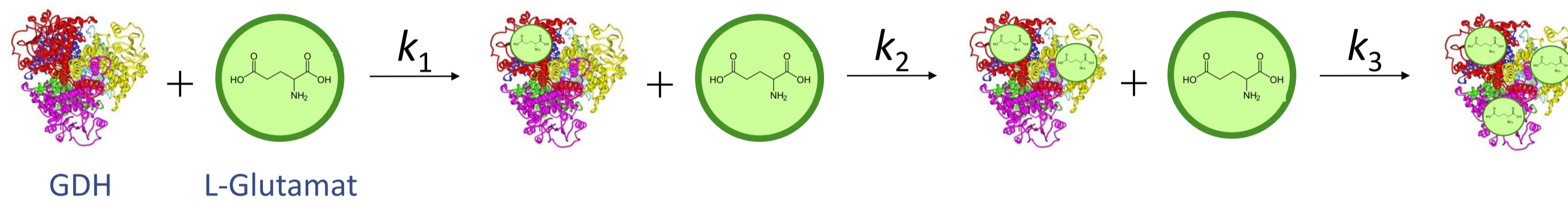
Estudiar la cooperativitat i l'efecte de l'aglomeració macromolecular sobre aquesta en el cas de l'enzim L-Glutamat Deshidrogenasa (GDH).

L'enzim que s'ha estudiat, **L-Glutamat Deshidrogenasa (GDH)**, és un **hexàmer** que catalitza la reacció de desaminació oxidativa del L-glutamat a  $\alpha$ -oxoglutarat mitjançant la reducció del  $NAD^+$  a  $NADH$ <sup>[2]</sup> i presenta cooperativitat negativa<sup>[3]</sup>.

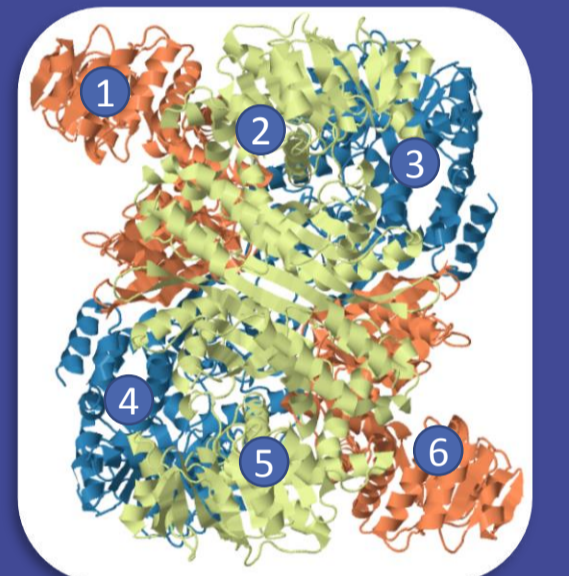
La reacció s'ha seguit mitjançant mesures espectrofotomètriques.<sup>[4]</sup>

## Resultats

Per interpretar el mecanisme de la cooperativitat de la GDH es van proposar uns models basats en les interaccions entre el substrat i els centres actius de les diferents subunitats que formen l'enzim<sup>[5]</sup>. El model que millor ajusta les dades experimentals té en compte tres constants microscòpiques d'associació ( $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$ ), que es poden representar segons l'esquema:



Imatge 4. Esquema de les constants microscòpiques d'associació del model de cooperativitat proposat. En aquest esquema només es representen les constants d'un dels trimers que formen l'enzim (hexàmer), per l'altre trimer les constants són iguals.



Imatge 5. Estructura 3D de la GDH (330 kDa) amb cada subunitat numerada.

### Model cooperatiu

El model proposat es basa en l'equació d'Adair:

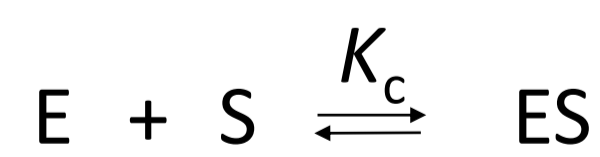
$$v([S]) = \frac{\sum_{j=1}^s j \cdot b_j \cdot [S]^j}{\sum_{i=0}^s b_i \cdot [S]^i} ; \quad b_j \equiv \prod_{i=1}^j K_i$$

on  $j$  representa el diferent nombre de centres actius de l'enzim ( $j=1, \dots, s$ ). Els paràmetres  $b_j$  són els productors de les constants d'associació estequiomètriques.

La relació d'aquests paràmetres amb les constants d'associació microscòpiques segons el model proposat és:

$$\begin{array}{cccc} b_0 & b_1 & b_2 & b_3 \\ \hline 1 & 6k_1 & 3k_1(3k_1+2k_2) & 2k_1^2(9k_2+k_3) \\ \hline b_4 & b_5 & b_6 \\ \hline 3k_1^2k_2(3k_2+2k_3) & 6k_1^2k_2^2k_3 & k_1^2k_2^2k_3^2 \end{array}$$

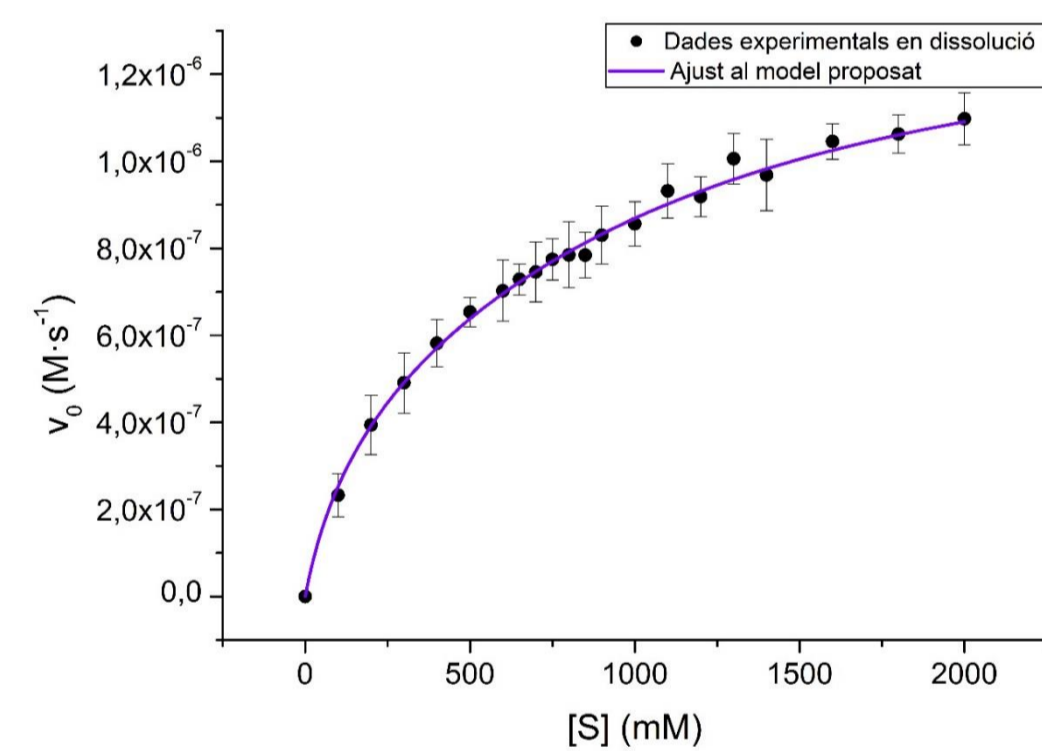
$K_c$  és la constant d'associació efectiva del substrat:



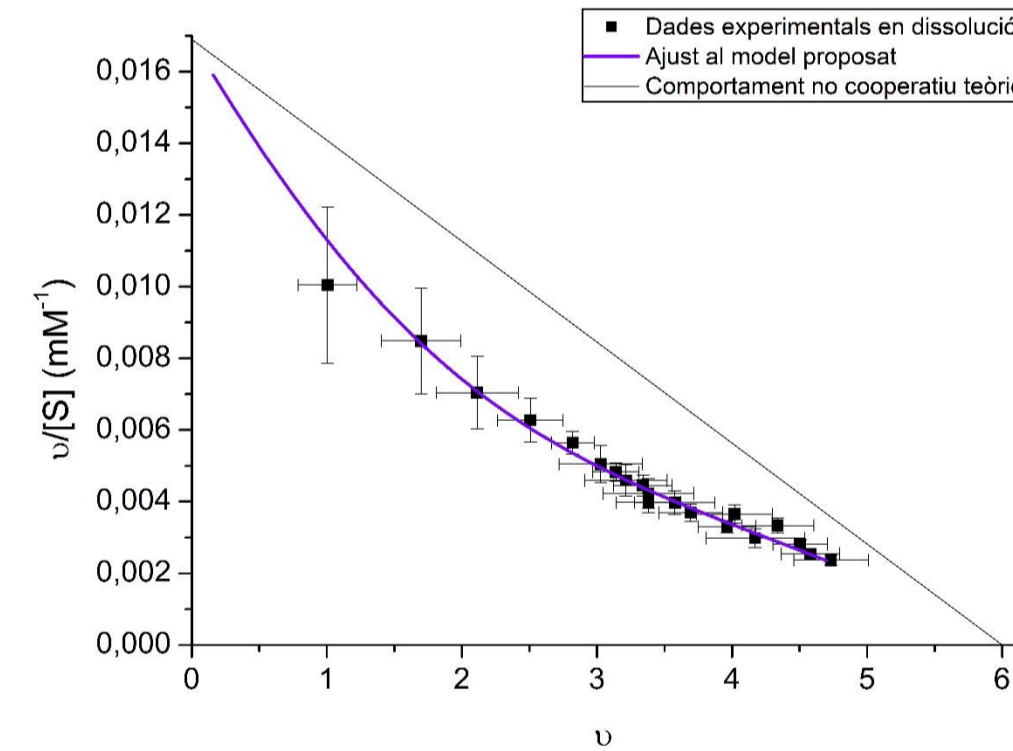
La relació de  $K_c$  amb el nombre mig d'ocupació és:

$$K_c([S]) = \frac{1}{[S]} \left( \frac{v}{s-v} \right)$$

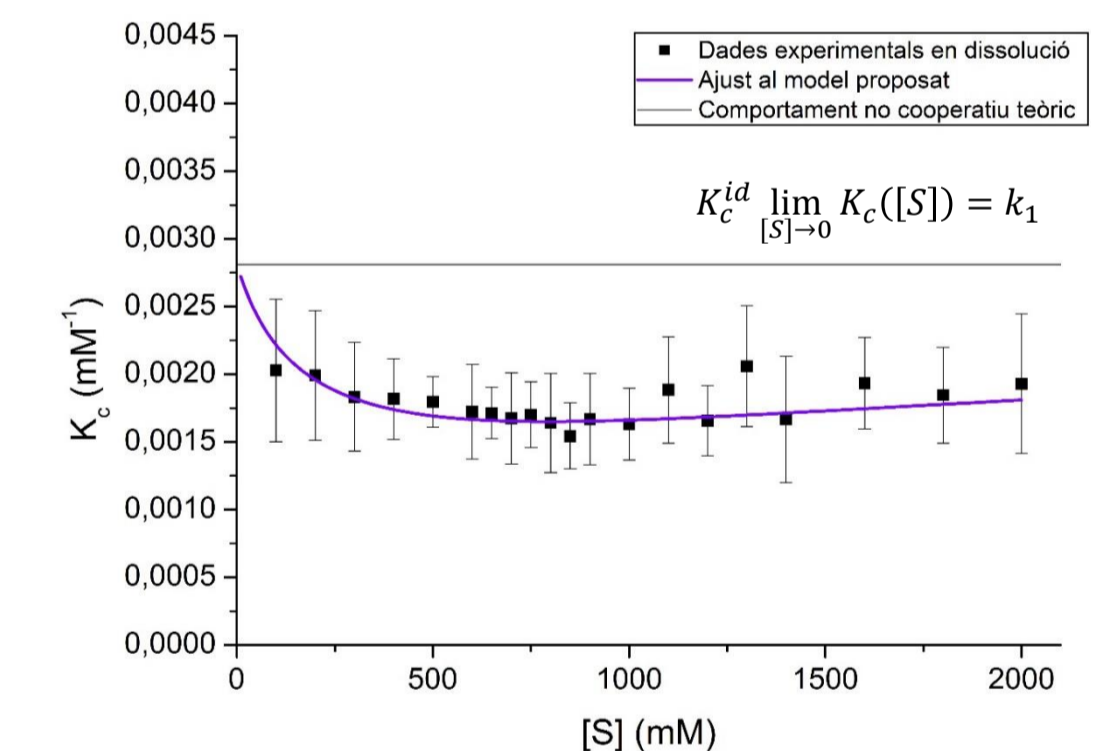
### Comportament en condicions de dissolució diluïda



Gràfica 1. Variació de la velocitat inicial respecte la concentració de substrat per les dades experimentals i l'ajust al model proposat.

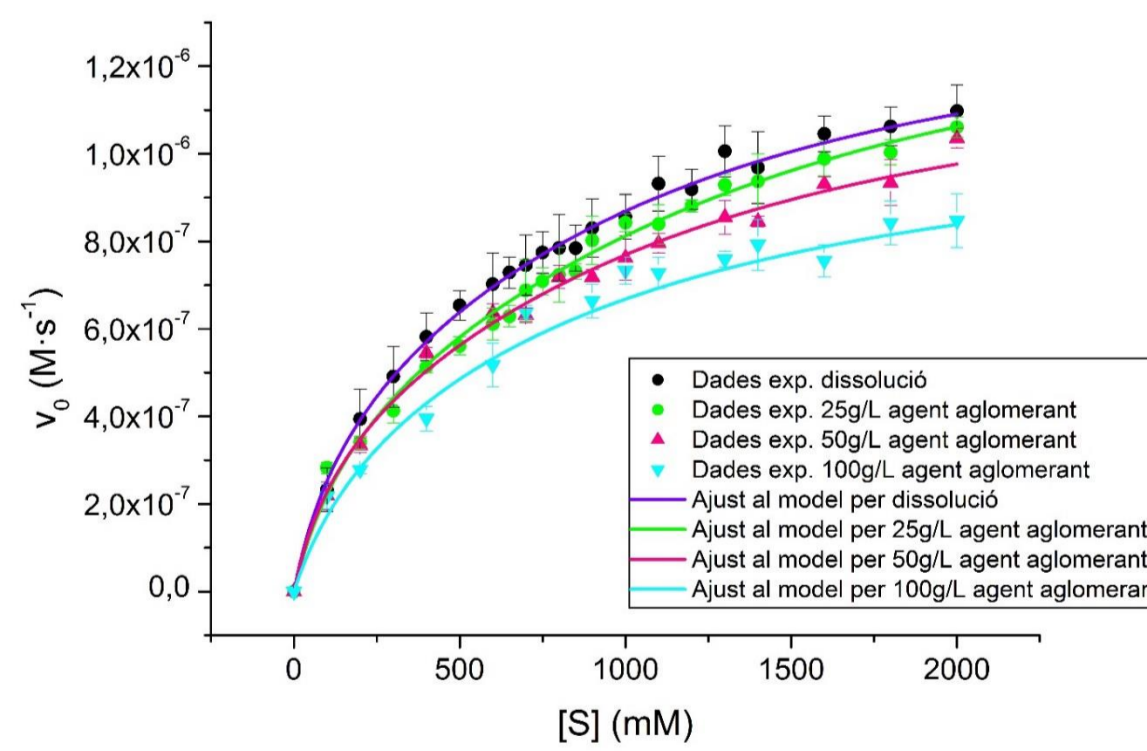


Gràfica 2. Gràfica d'Scathard per les dades experimentals, l'ajust al model proposat i el comportament no cooperatiu teòric. S'observa cooperativitat negativa.

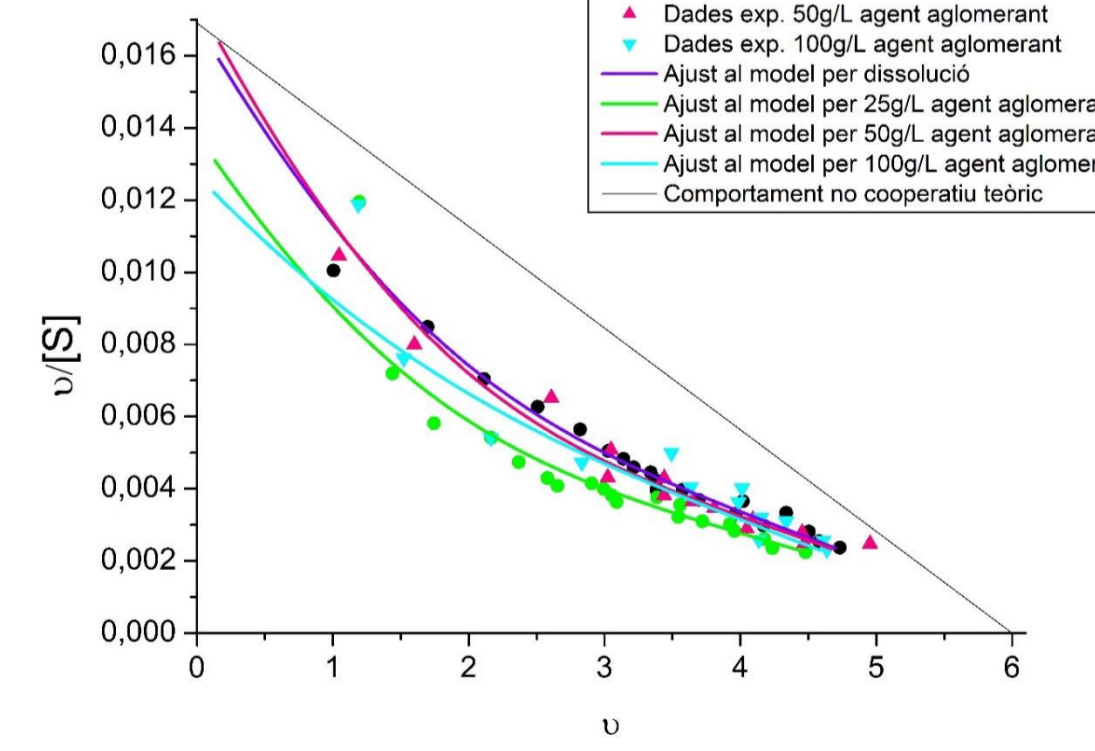


Gràfica 3. Evolució de  $K_c$  en funció de la concentració de substrat per les dades experimentals, l'ajust al model proposat i el comportament no cooperatiu teòric (ideal). Observant-se cooperativitat negativa.

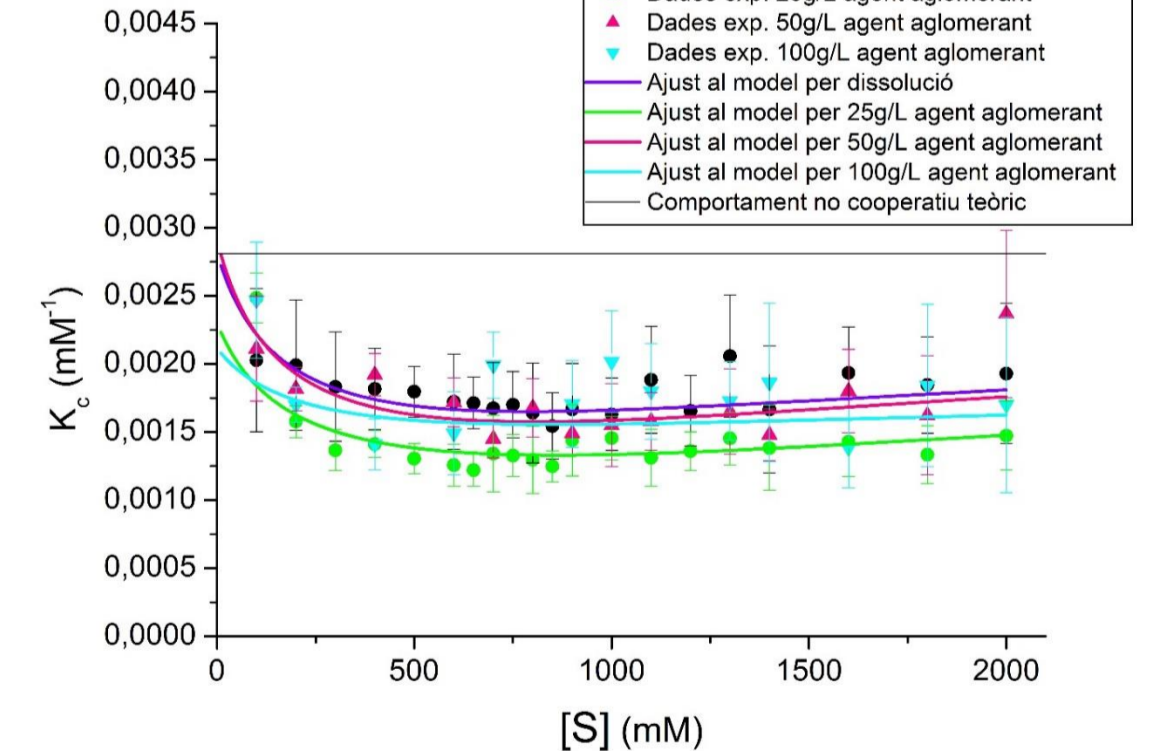
### Comportament en condicions de d'aglomeració macromolecular



Gràfica 4. Variació de la velocitat inicial respecte la concentració de substrat per les dades experimentals i els diferents ajustos al model proposat.



Gràfica 5. Gràfica d'Scathard per les dades experimentals, els diferents ajustos al model proposat i el comportament no cooperatiu teòric. S'observa cooperativitat negativa. Per claredat no es mostren els errors, que són de l'ordre dels obtinguts per dissolució diluïda que es troben al gràfic 2.



Gràfica 6. Evolució de  $K_c$  en funció de la concentració de substrat per les dades experimentals, els diferents ajustos al model proposat i el comportament no cooperatiu teòric (ideal). Observant-se cooperativitat negativa.

Condicions	$k_1 (10^{-6} M^{-1})$	$k_2 (10^{-6} M^{-1})$	$k_3 (10^{-6} M^{-1})$	$v_{max} (10^{-6} M \cdot s^{-1})$
Dissolució	$2,8 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,4$	$1,39 \pm 0,03$
25 g/L agent aglomerant	$2,3 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,6$	$1,42 \pm 0,05$
50 g/L agent aglomerant	$2,9 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,6$	$1,25 \pm 0,05$
100 g/L agent aglomerant	$2,1 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,5$	$1,11 \pm 0,05$

Taula 1. Valors obtinguts per les constants d'associació microscòpiques i la velocitat màxima a partir dels ajustos al model proposat.

## Conclusions

- El model ajusta correctament les dades tant en condicions de dissolució diluïda com en condicions d'aglomeració macromolecular.
- L'enzim presenta cooperativitat negativa tant en condicions de dissolució diluïda com en condicions d'aglomeració macromolecular ja que, en totes les condicions treballades, la constant d'associació efectiva ( $K_c$ ) disminueix respecte a la concentració de substrat i la gràfica d'Scathard presenta la curvatura típica de la cooperativitat negativa.
- L'efecte de l'aglomeració molecular provoca una disminució en el valor de la velocitat màxima, probablement causat per canvis conformationals. Tanmateix, no es veu un canvi significatiu en el comportament cooperatiu.

## Referències

- [1] Zhou, H.X.; Rivas, G.; Minton, A.P., *Annu. Rev. Biophys.* 37 (2008) 375; Kuznetsova, I. M.; Turoverov, K. K.; Uversky, V. N., *Int. J. Mol. Sci.*, 15 (2014) 23090.
- [2] Smith, T. J.; Stanley, C. A., *Trends. Biochem. Sci.* 33 (2008) 557.
- [3] Engel, P. C.; Dalziel, K., *The Biochem. J.*, 115 (1969) 621.; Kurganov, B.I., *Biophys. Chem.*, 87 (2000) 185.
- [4] Balcells, C.; Pastor, I.; Vilaseca, E.; Madurga, S.; Cascante, M.; Mas, F., *J. Phys. Chem.* 118 (2014) 4062.
- [5] Garcés, J. L.; Acerenza, L.; Mizraji, E.; Mas, F., *J. Biol. Phys.*, 34 (2008) 213.