

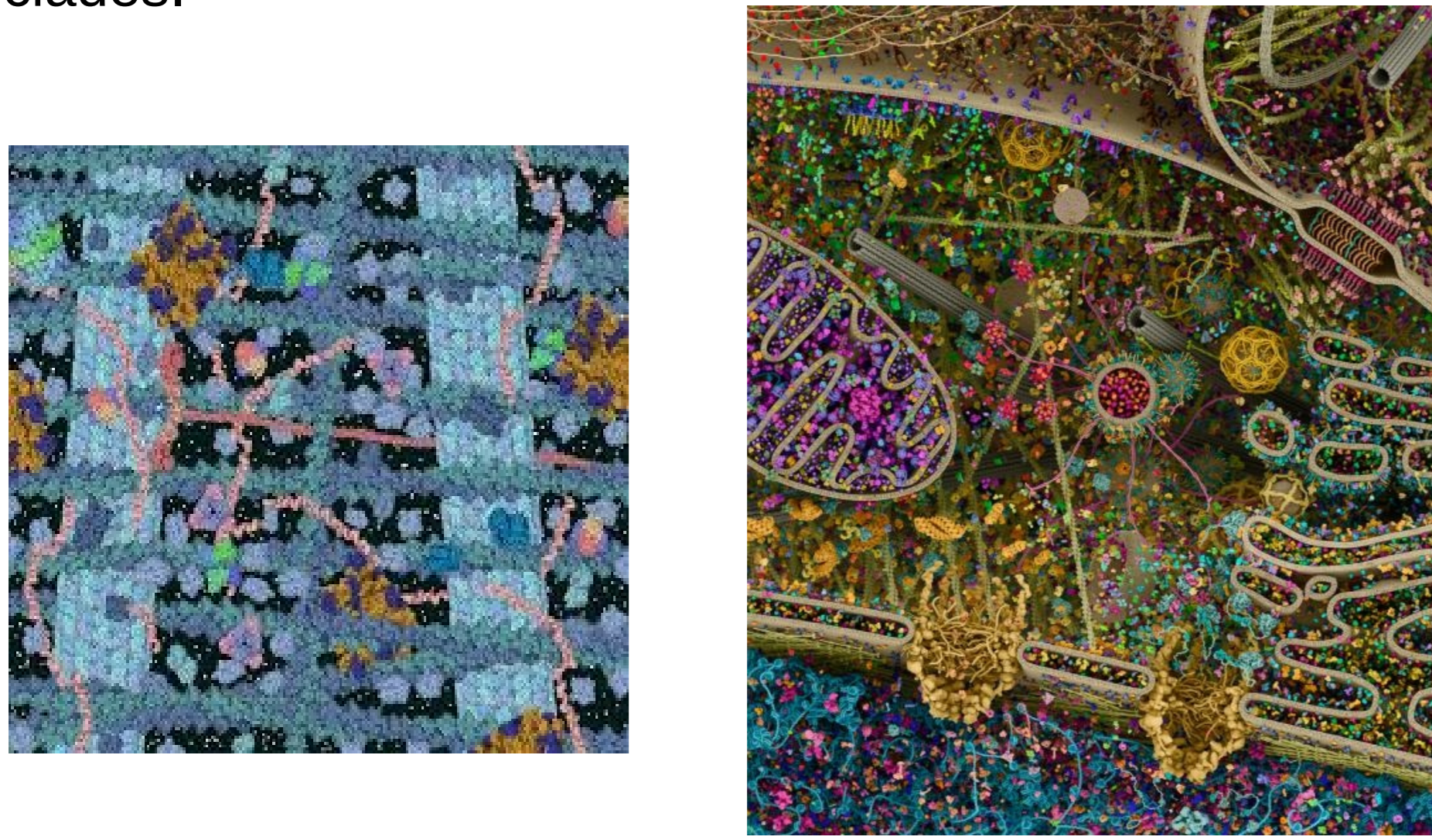
Martí López^{1,2}, Pablo M. Blanco^{1,2}, Francesc Mas^{1,2} i Sergio Madurga^{1,2}

¹ Grup BioPhysChem, Departament de Ciència de Materials i Química Física de la Universitat de Barcelona (UB)
² Institut de Química Tòrica i Computacional (IQTCUB)

Resum

El medi a l'interior d'una cèl·lula està altament ocupat per tot tipus de macromolècules, però n'és tanta la diversitat, que individualment totes elles i són presents a concentracions ínfimes. Aquest fet determina una singularitat en aquest tipus d'entorns que, si no es té present en el seu estudi, pot provocar importants desviacions. En l'estudi de reaccions intracel·lulars, aquest efecte s'ha de considerar, ja que les interaccions no específiques entre els agents de reacció i la resta de macromolècules afectaran la difusió de les mateixes i, per tant, la cinètica del sistema. El volum ocupat per aquestes macromolècules és el que s'entén per **volum exclòs** Φ i l'efecte que aquest pot produir en les reaccions intracel·lulars és el que intenta aclarir aquest projecte.

Per a estudiar aquests fenòmens de reacció-difusió les tècniques computacionals són un bon recurs. El moviment de les partícules se simula seguint una **dinàmica Browniana**¹ mentre que les reaccions es realitzen seguint criteris **Monte Carlo**^{2,3}. A partir de l'evolució espacio-temporal del sistema es pot calcular el coeficient de difusió de l'enzim o del substrat a l'hora que, analitzant la variació de les concentracions de les espècies de reacció respecte del temps permet entendre l'efecte del volum exclòs sobre la cinètica del sistema i trobar la seva relació amb les constants cinètiques associades.



• Il·lustracions exemple de l'elevada densitat de macromolècules presents en una cèl·lula

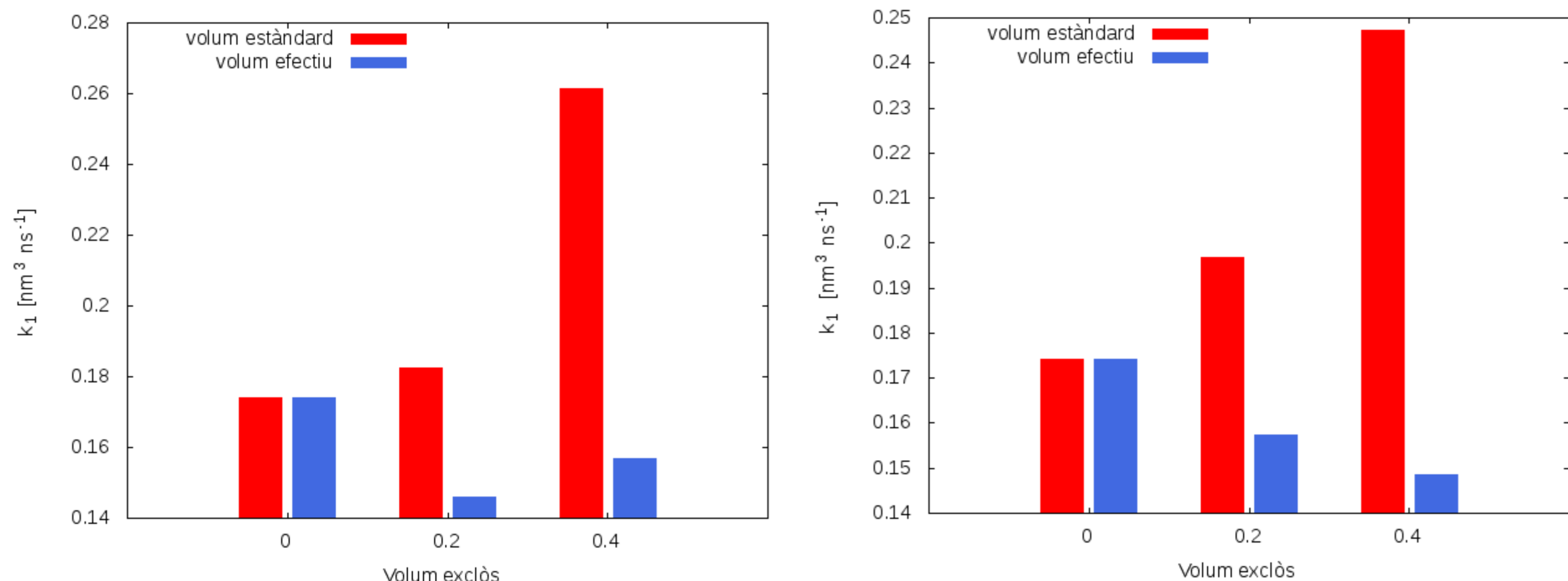
Resultats

Obstacles mòbils	0%	20%	20% efectiu*	40%	40% efectiu*
K_1 [nm ² ns ⁻¹]	0,17	0,19	0,15	0,26	0,16
k_1 [ns ⁻¹]	7,46x10 ⁻⁵	4,60x10 ⁻⁵	4,60x10 ⁻⁵	9,05x10 ⁻⁵	9,05x10 ⁻⁵
K_2 [ns ⁻¹]	7,37x10 ⁻⁵	7,33x10 ⁻⁵	7,33x10 ⁻⁵	7,34x10 ⁻⁵	7,34x10 ⁻⁵

Obstacles fixes	0%	20%	20% efectiu*	40%	40% crowding*
K_1 [nm ² ns ⁻¹]	0,17	0,20	0,16	0,25	0,15
k_1 [ns ⁻¹]	7,47x10 ⁻⁵	2,31x10 ⁻⁵	2,31x10 ⁻⁵	4,17x10 ⁻⁵	4,17x10 ⁻⁵
K_2 [ns ⁻¹]	7,37x10 ⁻⁵	7,04x10 ⁻⁵	7,04x10 ⁻⁵	6,88x10 ⁻⁵	6,88x10 ⁻⁵

* L'ajust a l'equació diferencial s'ha fet tenint en compte que el volum de la cel·la era el del volum predeterminat menys el volum exclòs.

• Al augmentar la densitat d'obstacles al sistema, sembla que la reacció és va veient afavorida (k_1 va augmentant), però si es corregeix el volum aplicant el volum efectiu en l'ajust la k_1 és manté molt aprop del valor inicial (inclús decaïent) fent veure, així, que l'efecte del volum exclòs sobre la cinètica pot ser important. De fet, per descriure la cinètica a nivell analític el volum que percebran les espècies serà el **volum efectiu** i no el volum total del sistema.



Model

El model de reacció utilitzat ha estat tipus **Michaelis-Menten**: $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} P + E$

K_1^{macro} [M ⁻² s ⁻¹]	K_1^{micro} [nm ² ns ⁻¹]	$K_2^{micro 4(1)}$ [ns ⁻¹]	$K_1^{(2)}$ [ns ⁻¹]	$K_2^{(3)}$ [ns ⁻¹]	$P_1^{(4)}$	$P_2^{(4)}$	$P_3^{(4)}$
10 ³	1,66x10 ⁻¹	1,77x10 ⁻³	3,5x10 ⁻⁵	7,1x10 ⁻⁵	1,77x10 ⁻⁴	3,5x10 ⁻⁵	7,1x10 ⁻⁵

1. $k_1^{macro} = 4\pi D_{ES} \left(\frac{1}{R_{ES}} + \frac{1}{k_1^{micro}} \right) \left(\frac{1}{D_{ES}} \right)$ 2. $k_{-1}^{macro} = k_{-1}^{micro}; k_{-1} = 0,02 k_1^{micro}$ 3. $k_2^{macro} = k_2^{micro}; k_{-1} = 0,04 k_1^{micro}$ 4. Probabilitat de Poisson: $p(\Delta t) = 1 - \exp(-\Delta t k_{total})$

L'estudi s'ha dut a terme a partir de la k_1^{macro} 10³ ja que és una de les constants emprada més comuna dins de la literatura., a partir d'aquesta s'han trobat la resta de constants, tant les k^{micro} com les probabilitats necessàries per a dur a terme la part estocàstica del càlcul.

Les equacions del model de Michaelis-Menten estan àmpliament utilitzades en molts models de reacció.

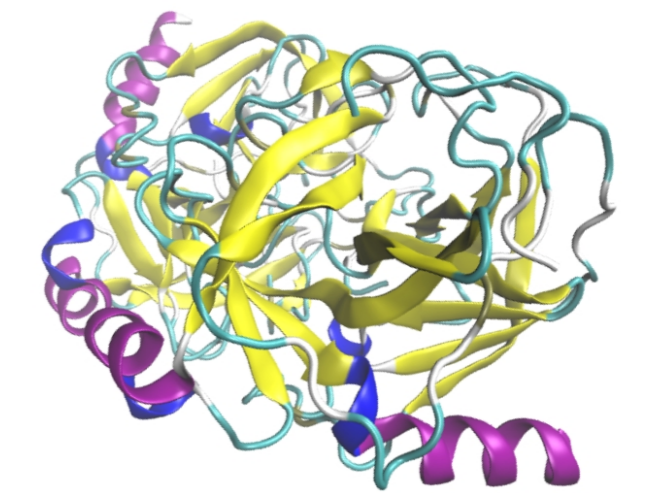
$$\frac{d[E]}{dt} = (k_{-1} + k_2)[C] - k_1[E][S] \quad \frac{d[S]}{dt} = k_{-1}[C] - k_1[E][S] \quad \frac{d[C]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[C] \quad \frac{d[P]}{dt} = k_2[C]$$

Imposant tant el balanç de masses de l'enzim ($[E]_0 = [E] + [C]$) com el del substrat ($[S]_0 = [S] + [C] + [P]$) el sistema es pot expressar en tan sols dues equacions diferencials. A canvi però, al fer l'anàlisi de resultats no és obviar el caràcter determinista de les ODE's.

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{-1}[C] - k_1[S][E]_0 - [C] \quad \frac{d[C]}{dt} = k_1[S][E]_0 - [C] - (k_{-1} + k_2)[C]$$

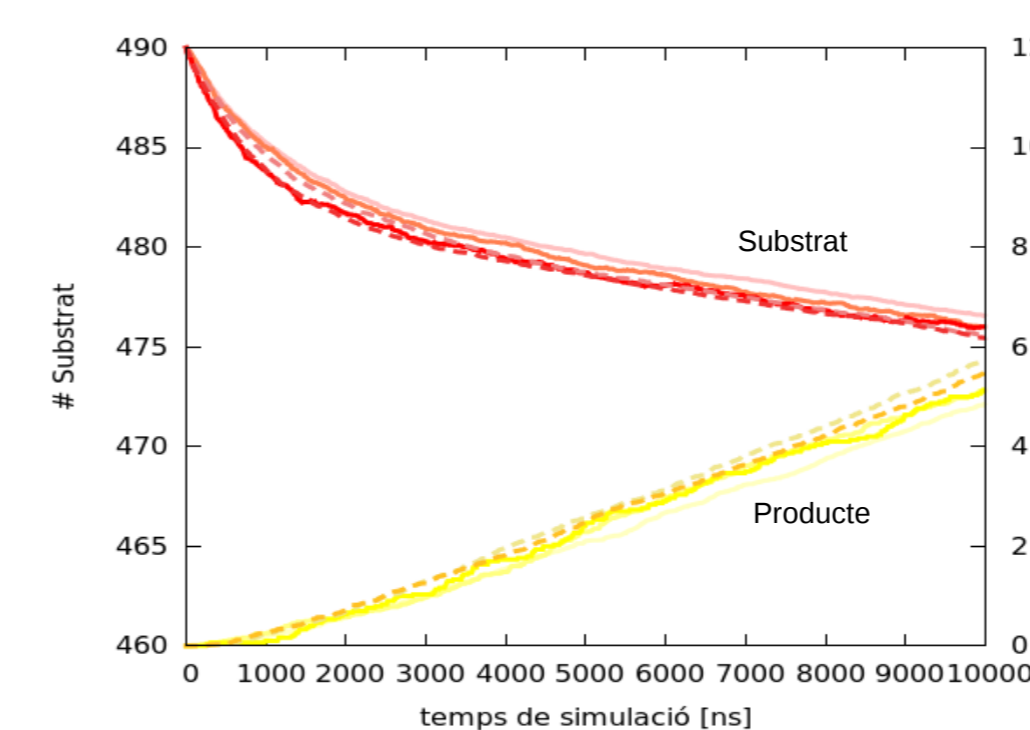
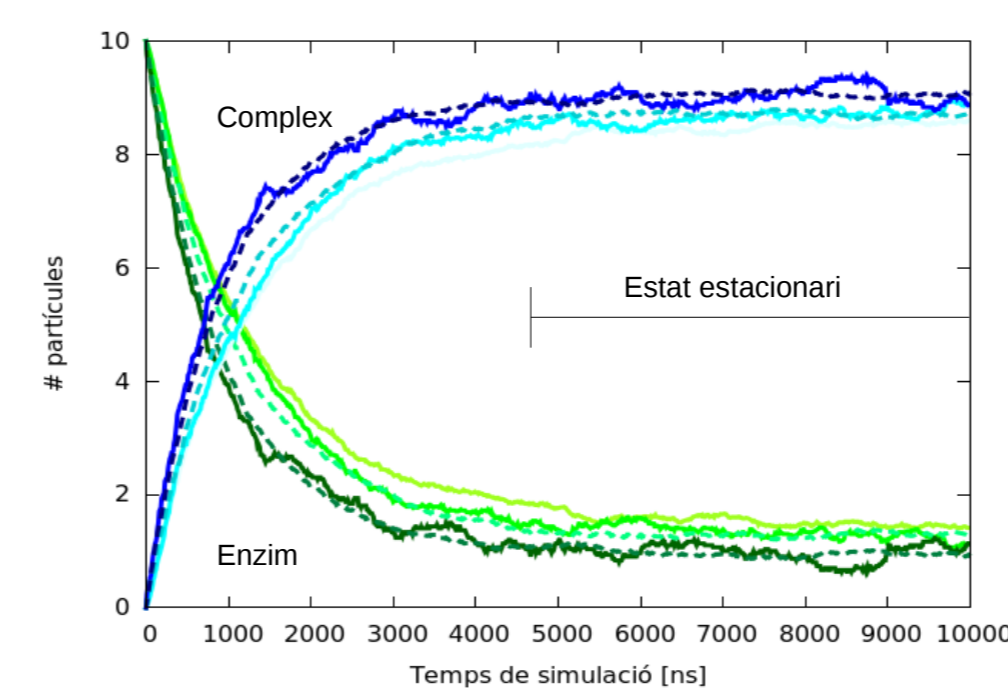
Especie	Radi [nm]	Coefficient de difusió ⁽¹⁾ [nm ² ns ⁻¹]
E/C	2,33	0,1053
S/P	0,5	0,4360
Obstacles	4,0	0,0311

⁽¹⁾ El coeficient de difusió de Stokes-Einstein a 298,15K en aigua: $D_i = k_B T / 6\pi \eta r_i$



El radi i el coeficient de difusió utilitzats per a l'enzim i el complex són els que corresponen a α -Quimotripsina

Reactivitat



• L'evolució de l'enzim (verd), el complex de reacció (blau), el producte (groc) i el substrat (vermell) es mostren a les figures adjacents. Els càlculs han estat realitzats amb una relació S:E = 50:1. Com més intensitat de color el volum exclòs és major. En línies contínues es mostren les simulacions on els obstacles també difonien lliurement per la cèl·lula, mentre que en línies tallades les simulacions on estaven fixes.

• Tal com s'observa a la primera de les figures a major volum exclòs o presència de macromolècules la quantitat de complex present a l'estat estacionari també és major, l'efecte de la mobilitat dels obstacles no sembla tenir un efecte gaire apreciable.

• Per contra en el cas dels productes i reactius, sembla que la mobilitat dels obstacles facilita la producció de producte, però és massa poc destacat com perquè la fluctuació no sigui causa del soroll. Tot i així en línies generals la quantitat de producte, de la mateixa manera que el complex, quan augmenta el volum exclòs del sistema.

Conclusions

- La presència d'altres agents al medi de reacció, en aquest cas macromolècules, afecta lleugerament la seva cinètica com a conseqüència del **confinament macromolecular**, la quantitat de producte augmenta.
- En consonància la k_1 macromolecular augmenta en la mesura que ho fa el volum exclòs. Per contra, l'ajust del sistema tenint en compte el **volum efectiu** mostra una constant més estable que sembla no acompanyar l'augment observat del producte de reacció.
- La mobilitat o no mobilitat dels macromolècules no participants de la reacció, tot hi un evident efecte sobre la difusió, sembla no afecta la cinètica d'aquesta. Per tant en les concentracions estudiades el control del procés és per reacció.

Referències

- 1.) Blanco, P.M.; Via, M.; Garcés, J.L.; Madurga, S.; Mas, F. *Entropy*, 19, 2017, 105.
- 2.) Vilaseca, E.; Isvoran, A.; Madurga, S.; Pastor, I.; Garcés, J.L.; Mas, F. *Phys Chem Chem Phys*, 13, 2011, 7396-7404.
- 3.) Pitulice, L.; Vilaseca, E.; Pastor, I.; Madurga, S.; Garcés, J.L.; Isvoran, A.; Mas, F. *Mathematic Biosciences*, 251, 2014, 72-82.
- 4.) Erban, R.; Chapman, S. J. *Phys Biol*, 2009, 6, 046001.