

MODELACIÓN DE CATÁLISIS ENZIMÁTICA CON ENZIMAS ALOSTÉRICAS**ENZYMMATIC CATALYSIS MODELLING WITH ALLOSTERIC ENZYMES**

J. S. Aranda* y E. Salgado

Departamento de Bioingeniería, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, IPN, Av. Acueducto s/n, Col. La Laguna Ticomán, Del. G. A. Madero, C. P. 07340, México, D. F., México.

Recibido 7 de Octubre 2007; Aceptado 15 de Abril 2008

Resumen

Las enzimas alostéricas regulan la velocidad de la reacción que catalizan en función de la concentración de un inhibidor que modifica su actividad enzimática, generando una curva de saturación sigmoidal característica. Las enzimas alostéricas son complejos enzimáticos generalmente constituidos de una subunidad catalítica y una fracción regulativa, y la actividad catalítica del complejo se establece por la cooperación entre esas subunidades enzimáticas. La simulación realista de fenómenos biocatalíticos alostéricos depende de la modelación del comportamiento cinético de la enzima. La cinética enzimática basada en la forma cooperativa del complejo alostérico puede modelarse utilizando interacciones entre agentes. La modelación con agentes permite la representación de curvas de saturación sigmoidales, sin requerir los valores numéricos de parámetros cinéticos necesarios en otros modelos cinéticos. Datos experimentales del complejo enzimático aspartato transcarbamila de *Escherichia coli* son comparados con resultados teóricos de diferentes modelos para sistemas enzimáticos alostéricos. Los resultados de la modelación de cinética enzimática basada en agentes muestran una correlación adecuada con curvas de saturación experimentales.

Palabras clave: reacciones enzimáticas, enzimas alostéricas, cinética enzimática, modelación con agentes.

Abstract

Allosteric enzymes control reaction rates in biochemical reactions. The catalytic activity of allosteric enzymes depends on the concentration of a certain regulating compound. A sigmoidal saturation curve is a characteristic of the enzymes that exert allosteric control of reaction rates. These enzymes are rather large enzymatic complexes usually composed of at least one catalytic subunit and a regulatory fraction, and the complex catalytic activity is given by the cooperative interactions between those enzymatic subunits. Realistic simulation of biocatalytic allosteric phenomena requires an appropriate modelling of the enzyme kinetic behavior. Modelling enzymes with cooperative kinetics can be achieved by defining interacting agents. Agent-based modelling allows an accurate representation of sigmoidal saturation curves, without the kinetic parameters that are needed in other kinetic models. Experimental data from *Escherichia coli* aspartate transcarbamylase are compared to theoretical results from different models for allosteric systems. Results from agent-based modelling show a good agreement with experimental saturation curves.

Keywords: enzymatic reactions, allosteric enzymes, enzyme kinetics, agent-based modelling.

1. Introducción

Las enzimas son proteínas cuya función es catalizar la transformación química de sustratos a productos específicos, mediante la estabilización de complejos transitorios (Zanotti y col., 2006). Ciertas enzimas (llamadas alostéricas) que controlan la velocidad de rutas metabólicas completas, tienen un mecanismo de regulación de su actividad catalítica por acumulación de algún intermediario de la ruta metabólica. El metabolito regulador se une a la enzima modificando su conformación estructural, y por tanto su actividad. El comportamiento cinético de las enzimas alostéricas genera curvas de

saturación de forma sigmoidal (Kantrowitz y Lipscomb, 1988).

La aspartato transcarbamila de *Escherichia coli* (E. C. 2.1.3.2) es el complejo enzimático considerado como modelo de estudio de la regulación alostérica (Roche y Field, 1999; Marchi y Horas, 1980). La enzima cataliza la condensación de carbamil-fosfato con aspartato para producir N-carbamil-L-aspartato y ortofosfato. Esta es una reacción inicial de la síntesis de las pirimidinas componentes de los ácidos nucleicos (Lee y col., 1995). La reacción procede en orden comenzando por la unión del carbamil-fosfato en el sitio catalítico, lo cual induce un cambio conformacional

* Corresponding author: E-mail: jaranda@acei.upibi.ipn.mx
Tel. y Fax 5729 6000 ext. 56 338

en la enzima que permite la unión del aspartato. Al final de la ruta metabólica de síntesis de pirimidinas, se producen los nucleótidos CTP y UTP que inhiben la actividad transcarbamila.

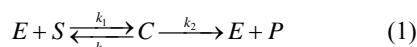
El complejo aspartato transcarbamila está compuesto de 12 cadenas de péptidos, agrupadas en 6 cadenas catalíticas que conforman dos unidades trímeras, y 6 cadenas regulativas asociadas en tres dímeros, y requiere del ion Zn^{2+} como cofactor (Kantrowitz y Lipscomb, 1988). Las subunidades catalíticas y regulativas de la aspartato transcarbamila se pueden disociar y funcionan independientemente (Porter y col., 1969; Kantrowitz y Lipscomb, 1988), pero la actividad catalítica del complejo se regula por cooperación entre las distintas subunidades (Zanotti y col., 2006).

Los fenómenos de cooperación han sido simulados mediante modelación con agentes (Axelrod, 1997). Un modelo basado en agentes para la catálisis con enzimas alostéricas consiste en considerar a la enzima, sustratos, productos y moléculas inhibidoras, como agentes que interactúan bajo determinadas reglas. El resultado de las interacciones se traduce en el comportamiento cinético de la enzima. En el presente trabajo se compara un modelo de agentes con otros modelos cinéticos de la enzima aspartato transcarbamila.

2. Fundamentos teóricos

2.1. Sistema enzimático sin regulación alostérica

La catálisis mediante la enzima (E) de la transformación de un sustrato (S) al producto (P) se representa por la reacción:



donde C simboliza la formación de un complejo enzima-sustrato de transición química y k_i ($i = 1, 2, 3$) son constantes de reacción. La dinámica de conversión enzimática ha sido descrita con los siguientes balances de masa (Chaplin y Bucke, 1990):

$$\begin{aligned} \frac{d[S]}{dt} &= -k_1 [E][S] + k_3 [C] \\ \frac{d[C]}{dt} &= -\frac{d[E]}{dt} = k_1 [E][S] - (k_2 + k_3)[C] \quad (2) \\ \frac{d[P]}{dt} &= k_2 [C] \end{aligned}$$

Se puede demostrar (Bohinski, 1976) que, si se supone el estado pseudo-estacionario para el complejo enzima-sustrato ($d[C]/dt = 0$), y definiendo al parámetro K_M (constante de Michaelis) como:

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}; \quad (3)$$

la expresión para el cálculo de la velocidad r de la reacción (1) es:

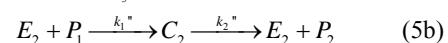
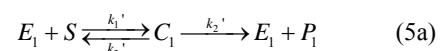
$$r = r_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (4)$$

ecuación conocida como la cinética de Michaelis-Menten para enzimas no alostéricas.

2.2. Análisis michaeliano para un sistema enzimático alostérico

La regulación de la actividad enzimática por un intermediario metabólico alostérico fue propuesta por J. Monod y col. (1965). En tal modelo se establece la existencia de dos estados conformativos enzimáticos, R y T , donde R corresponde a la enzima alostérica activa y T al estado de menor actividad catalítica (Roche y Field, 1999). El estado R se transmuta al T por la unión con la molécula inhibidora I : $R + I \leftrightarrow T$.

Un esquema simplificado de control alostérico en una ruta metabólica se representa en las ecs. (5):



El sustrato S produce al intermediario P_1 por la acción de la enzima alostérica E_1 . La molécula P_1 es el sustrato de la enzima E_2 que cataliza la formación de P_2 , el cual se acumula en el sistema. P_2 es un inhibidor alostérico de E_1 . Por tanto, en presencia de P_2 , la actividad enzimática E_1 disminuye generando una curva de saturación con forma sigmoidal. Los balances de materia que describen la dinámica del sistema enzimático alostérico simplificado son:

$$\begin{aligned} \frac{d[S]}{dt} &= -k_1 [E_1][S] + k_3 [C_1] \\ \frac{d[C_1]}{dt} &= k_1 [E_1][S] - (k_2 + k_3')[C_1] \\ \frac{d[P_1]}{dt} &= k_2 [C_1] - k_1'' [E_2][P_1] \\ \frac{d[C_2]}{dt} &= k_1'' [E_2][P_1] - k_2'' [C_2] \\ \frac{d[P_2]}{dt} &= k_2'' [C_2] \end{aligned} \quad (6)$$

Con un razonamiento similar al de L. Michaelis, esto es, considerando que $d[C_1]/dt = d[C_2]/dt = 0$; la velocidad r_1 de la reacción (5a) está dada por:

$$r_1 = r_{1,\max} \frac{[S]}{[S] + K'_M} - r_2 \left(1 + \frac{[S]}{[S] + K'_M} \right); \quad (7)$$

con $K'_M = \frac{k_2' + k_3'}{k_1'}$ y para la velocidad r_2 de la reacción (5b):

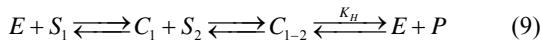
$$r_2 = r_{2,\max} \frac{[P_1]}{[P_1] + K''_M}; \quad (8)$$

$$\text{con } K''_M = \frac{k''_2}{k''_1}.$$

Se debe observar que la enzima sujeta a control alostérico es E_1 , de modo que la velocidad r_1 depende de la velocidad con la que se produzca el inhibidor P_2 , es decir, de r_2 .

2.3. Análisis cinético de Hill para enzimas alóstéricas

La teoría de A. V. Hill se fundamenta en las interacciones en el equilibrio entre varias moléculas. En la reacción enzimática catalizada por la aspartato transcarbamila, la interacción entre la molécula de enzima y las moléculas sustrato es secuencial, es decir, primero se presenta la unión con un sustrato y luego con el otro, antes de que ocurra la reacción que genera al producto. Este mecanismo conduce al siguiente esquema:



cuya ecuación cinética es de la forma (Hofmeyr y Cornish-Bowden, 1997):

$$r = r_{\max} \frac{[S]^n}{[S]^n + K_H} \quad (10)$$

conocida como la ecuación de Hill (Weiss, 1997). El parámetro n representa el número de sitios de regulación en la enzima, y el parámetro K_H reagrupa las constantes de reacción del paso limitante en el esquema (9).

2.4. Análisis molecular de la cinética enzimática alóstérica

La estructura molecular de la aspartato transcarbamila puede utilizarse como fundamento de la descripción cinética de su actividad catalítica. E. Marchi y J. Horas (1980), propusieron un modelo basado en la función de partición Z para describir los estados R y T de la enzima. El modelo considera parámetros asociados a las energías de interacción entre las subunidades catalíticas y regulativas que conforman al complejo enzimático aspartato transcarbamila. La velocidad de la reacción enzimática alóstérica está expresada mediante (Marchi y Horas, 1980):

$$r = \frac{1}{2} + \frac{1}{6n} \frac{\partial Z}{\partial y} \quad (11)$$

donde y representa la probabilidad de que un sitio regulativo esté ocupado, y por tanto es proporcional a la concentración de sustrato.

2.5. Análisis basado en agentes de enzimas alóstéricas y simulación de Monte Carlo para reacciones enzimáticas alóstéricas

La modelación de reacciones enzimáticas puede plantearse suponiendo a las moléculas como agentes

con propiedades definidas y reglas de interacción formales. Las especies químicas participantes en la reacción son agentes con dos propiedades: (a) El tipo de agente (sustrato, enzima, complejo enzima-sustrato o producto), y (b) La orientación espacial del agente (definida por dos estados posibles, 0 o 1). El progreso de la reacción enzimática se define mediante la aplicación de tres reglas de interacción: (a) Regla de reacción (dos agentes producen reacción si y sólo si uno es del tipo sustrato y el otro del tipo enzima), (b) Regla de orientación (dos agentes producen reacción si las orientaciones espaciales de los agentes coinciden), y (c) Regla alóstérica (un agente E_1 no reacciona si está unido a un agente P_2). El espacio discretizado donde la reacción ocurre se simboliza como un arreglo matricial de agentes (Fig. 1).

(a)	1	2	3	4	5	6
	7	8	9	10	11	12
	13	14	15	16	17	18
	19	20	21	22	23	22
	25	26	27	28	29	30
	31	32	33	34	35	36

(b)	b ₈	b ₁	b ₂
	b ₇	a	b ₃
	b ₆	b ₅	b ₄

Fig. 1. (a) Representación de un espacio reaccionante para la catálisis enzimática de un sustrato (S) en producto (P) conformado de $n = 36$ agentes. (b) Cada agente interactúa con 8 agentes circundantes para determinar la catálisis enzimática.

El arreglo matricial de agentes representa entonces a un sistema de reacción enzimática (Berry, 2002). Al inicio de la simulación, se distribuyen aleatoriamente agentes de los tipos sustrato y enzima en el arreglo matricial, y conforme transcurre el tiempo, la fracción inicial de sustrato disminuye mientras se originan agentes del tipo producto. Las fracciones de cada tipo de agente en el arreglo matricial son registradas. Cuando han concluido todas las interacciones posibles, se redistribuyen los agentes con un algoritmo aleatorio para iniciar un nuevo ciclo de interacciones. El registro de la evolución de cada tipo de agente en cada ciclo representa el seguimiento de la reacción enzimática en el tiempo.

3. Metodología

3.1. Datos experimentales

Los resultados de modelación cinética de la reacción enzimática catalizada por una enzima alostérica, son comparados con datos experimentales obtenidos por J. C. Gerhart y A. B. Pardee (1962) para la aspartato transcarbamila de *Escherichia coli*. En ese trabajo experimental se determinan diferentes velocidades de reacción como función de la concentración del sustrato (curva de saturación), con el nucleótido de regulación alostérica de la enzima (CTP). Experimentos con la subunidad catalítica de la aspartato transcarbamila (Porter y col., 1969) mostraron un comportamiento cinético michaeliano (no alostérico) en esa fracción catalítica de la enzima.

Por otra parte, también se ha reportado la disminución relativa de actividad enzimática para la aspartato transcarbamila con relación a la concentración del inhibidor alostérico (Gerhart, 1970). Resultados equivalentes fueron generados por modelación basada en agentes con fines comparativos.

3.2. Cinéticas enzimáticas de Michaelis-Menten

Datos experimentales de cinética enzimática para la subunidad catalítica permitieron determinar los parámetros de Michaelis (r_{\max} y K_M) mediante un algoritmo de regresión no lineal cuyo criterio de búsqueda es la minimización de los cuadrados de los residuos, es decir, de las diferencias entre los datos experimentales (Porter y col., 1969) y los valores calculados mediante la Ec. (4).

La curva de saturación experimental obtenida por J. C. Gerhart y A. B. Pardee (1962), una sigmoidal característica de enzimas alostéricas, fue utilizada para ajustar los parámetros de las ecs. (7) y (8), por el método de regresión no lineal basado en el criterio de mínimos cuadrados.

3.3. Cinética de Hill para enzimas alostéricas

La ecuación de Hill (10) también fue utilizada para describir la curva sigmoidal de saturación, con la velocidad máxima estimada para la subunidad catalítica (r_{\max}), aplicando el parámetro n para la aspartato transcarbamila, y considerando $K_H = K_M$.

3.4. Cinética basada en el modelo molecular de la aspartato transcarbamila alostérica

Las curvas sigmoidales de saturación basadas en las predicciones de la cinética enzimática del modelo molecular de E. Marchi y J. Horas (1980), Ec. (11), son comparadas con los datos experimentales de J. C. Gerhart y A. B. Pardee (1962).

3.5. Modelación basada en agentes de reacciones enzimáticas

El algoritmo para la representación de reacciones enzimáticas intracelulares fue implementado en Matlab ® 6.0 R12 bajo el siguiente pseudocódigo:

- Distribución aleatoria de agentes en un arreglo matricial. Con una matriz cuadrada ($m^{1/2} \times m^{1/2}$) de m agentes, se asignaron aleatoriamente una fracción de agentes tipo enzima ($E_0 = 0.1$) y el resto de agentes tipo sustrato ($S_0 = 0.9$), como condición inicial de la reacción enzimática. A cada agente se atribuye al azar una de las dos orientaciones espaciales posibles.
- Procedimiento de interacción agente-agente. Para cada agente del arreglo matricial se evalúa el tipo de agente de los ocho circundantes uno a la vez (Fig. 1b), el primer agente circundante compatible con la Regla de reacción se selecciona para luego verificar la Regla de orientación. En caso de compatibilidad tanto del tipo de agente ($E-S$) como de orientación espacial (0-0 o 1-1), procede la formación transitoria de complejo (C) y la posterior liberación de un agente tipo producto (P), excepto cuando se forma la interacción E_1-P_2 para una reacción controlada por enzima alostérica. En caso de no haber compatibilidad con alguno de los agentes circundantes, se reasigna al agente central como el siguiente a la derecha del arreglo matricial y reinicia la búsqueda de compatibilidad entre los agentes circundantes actuales.
- Progreso de la reacción. Cuando se han evaluado las interacciones de la totalidad del arreglo matricial inicial, se habrán generado un cierto número de agentes-producto y se habrá reducido el número de agentes-sustrato mientras el número total de agentes-enzima se conserva sin cambio al concluir el ciclo. Luego, se redistribuyen aleatoriamente todos los agentes del arreglo para reiniciar el procedimiento de interacción. Así, la conversión de sustrato a producto se incrementa en cada ciclo, describiendo el progreso de la reacción enzimática.
- Generación de resultados gráficos. En cada ciclo del algoritmo se registra el número de agentes de cada tipo (E , S , P y C), y se representa gráficamente al finalizar un cierto número de ciclos predeterminado. El tiempo de la reacción es proporcional al número de ciclos.

4. Resultados y discusión

4.1. Curvas de saturación de sustrato hiperbólicas (enzimas no alóstéricas)

La subunidad catalítica de la aspartato transcarbamila puede funcionar como una enzima no alóstérica (Porter y col., 1969), de modo que la curva de saturación de sustrato es hiperbólica (ver Fig. 2). Los parámetros de la Ec. (4) estimados a partir de los datos experimentales son: $r_{\max} = 1.15$ y $K_M = 0.16$, en unidades normalizadas.

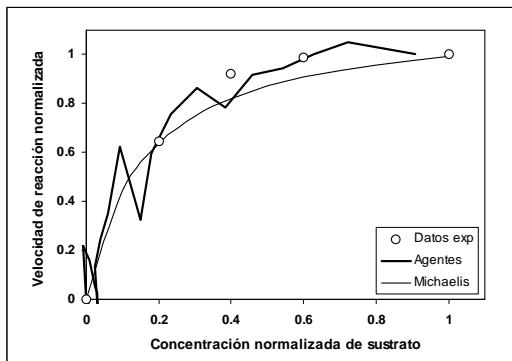


Fig. 2. Curvas hiperbólicas de saturación de sustrato para la subunidad catalítica de la aspartato transcarbamila de *Escherichia coli*.

En la Fig. 2 se incluyen los resultados de la cinética enzimática obtenida con el modelo basado en agentes (sin aplicación de la Regla alóstérica). Después de una simulación de Monte Carlo de 20 ciclos, se observa la misma tendencia de saturación para la fracción catalítica de la enzima. La suma de los residuos entre los datos experimentales y la ecuación cinética de Michaelis (Ec. (4)) es $\Sigma R_{\text{Michaelis}} = 0.195$, y la correspondiente al modelo de agentes es $\Sigma R_{\text{Agentes}} = 0.199$. Por lo tanto, aunque se aprecia mayor dispersión aparente en el modelo de agentes, si se dictamina la adecuación de los modelos en términos de sus residuos, se tienen descripciones matemáticas básicamente equivalentes de los datos experimentales con los dos modelos.

4.2. Curvas sigmoidales de saturación de sustrato (enzimas alóstéricas)

Cuando las fracciones catalítica y regulativa de la aspartato transcarbamila interactúan en forma cooperativa, se produce un comportamiento sigmoidal en la curva de saturación (ver Fig. 3).

En la región de bajas concentraciones de sustrato, con diminutas variaciones en la concentración de sustrato o de inhibidor alóstérico se inducen incrementos sustanciales en la velocidad de la reacción enzimática (punto de inflexión sigmoidal), como consecuencia directa del aumento en la actividad catalítica de la enzima. Además, la

presencia de un inhibidor alóstérico en el medio reaccionante, ocasiona la disminución drástica de la actividad enzimática (ver Fig. 4). De ese modo, el mecanismo de control alóstérico de la actividad permite la regulación de la velocidad de reacción en rutas metabólicas. La modelación del comportamiento cinético de enzimas alóstéricas es, por tanto, un aspecto importante en la simulación realista de fenómenos biocatalíticos (Hofmeyr y Cornish-Bowden, 1997).

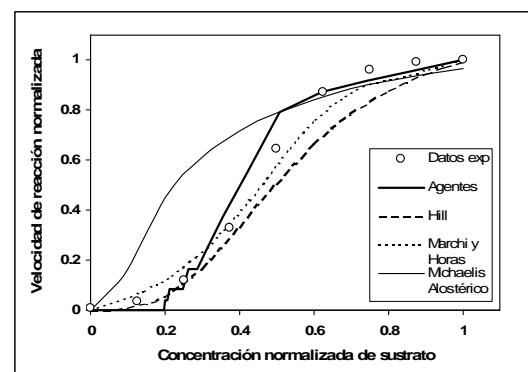


Fig. 3. Curvas sigmoidales de saturación de sustrato para el complejo enzimático de la aspartato transcarbamila de *Escherichia coli*.

En la Fig. 3 se observan los comportamientos cinéticos correspondientes a distintos modelos que describen la actividad enzimática alóstérica, comparados con mediciones experimentales de la velocidad de reacción para la aspartato transcarbamila.

Los parámetros estimados para la ecuación de Michaelis de sistemas alóstéricos simplificados (Ec. (7)) son: $r_{1,\max} = 1.15$, $r_{2,\max} = 0.05$, $K'_M = 0.16$ y $K''_M = 0.001$, en unidades normalizadas. Nótese la predicción temprana de la curva sigmoidal michaeliana respecto a los datos experimentales, lo que produce un aumento importante en la suma de los residuos del modelo, $\Sigma R_{\text{Michaelis alóstérico}} = 1.18$.

El modelo de Hill (Ec. (10)) considera la unión secuencial del carbamil-fosfato y del aspartato a la enzima, y genera una buena aproximación a los datos experimentales basada en los parámetros de Michaelis para la subunidad catalítica no alóstérica ($r_{\max} = 1.15$ y $K_H = 0.16$), pero corregida por el parámetro $n = 3$ (puesto que el complejo enzimático aspartato transcarbamila tiene tres sitios regulativos de unión al inhibidor alóstérico CTP). La suma de residuos para la ecuación de Hill es $\Sigma R_{\text{Hill}} = 0.694$, por lo que constituye una mejor descripción que el modelo de Michaelis para sistemas alóstéricos.

El conocimiento de la estructura molecular de la aspartato transcarbamila es muy amplio, así que resulta posible predecir su actividad enzimática en términos de las propiedades del complejo enzimático y de las interacciones entre sus subunidades catalítica

y regulativa (Marchi y Horas, 1980). Aunque la descripción del comportamiento cinético de la enzima a partir un modelo molecular como la Ec. (11) es muy confiable ($\Sigma R_{\text{Marchi-Horas}} = 0.352$), requiere de un esfuerzo matemático importante y de la medición o estimación de un buen número de parámetros.

La modelación de la actividad enzimática alostérica con agentes representa los datos experimentales de manera equiparable al modelo molecular de Marchi y Horas, puesto que la suma de los residuos del modelo es menor: $\Sigma R_{\text{Agentes alostérico}} = 0.354$. El modelo basado en agentes parece entonces una alternativa viable para la simulación de sistemas de reacción enzimática sujetos a control alostérico. Además, el modelo de agentes permite describir la pérdida de actividad enzimática de la aspartato transcarbamila como función de la concentración del inhibidor alostérico (ver Fig. 4).

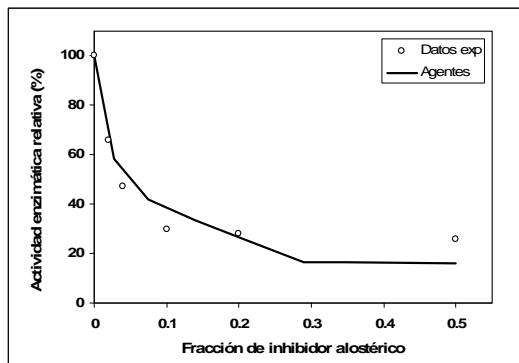


Fig. 4. Comparativo de datos experimentales y de modelación basada en agentes para la reducción de actividad enzimática en la aspartato transcarbamila como resultado del inhibidor de control alostérico.

4.3. Limitaciones de los modelos de reacción enzimática con control alostérico

La ecuación de Michaelis para sistemas enzimáticos alostéricos es un modelo no estructurado. No requiere información molecular de la enzima alostérica y los parámetros michaelianos son relativamente fáciles de calcular. Por esa razón las ecuaciones cinéticas de Michaelis son ampliamente utilizadas en la modelación de reacciones bioquímicas (Nielsen y Villadsen, 1992), aunque no siempre sea válida su aplicación en reacciones alostéricas. El modelo de Michaelis extendido (Ec. (7)) supone el estado pseudo-estacionario para los complejos enzima-sustrato C_i ($i = 1, 2$) de una cinética alostérica, lo cual no es admisible en el caso de la aspartato transcarbamila puesto que su mecanismo de reacción implica una formación secuencial de complejos $C_1 = E-S_1$ y $C_2 = S_1-E-S_2$, antes de la liberación del producto $C_2 \rightarrow E + P$.

La ecuación de Hill aunque es de estructura simple, incorpora información respecto a los sitios

disponibles para la regulación del complejo enzimático alostérico. Sin embargo, presenta el inconveniente de que el parámetro n es incorrectamente utilizado como parámetro de ajuste empírico, lo cual reduce la precisión de la interpretación descriptiva del comportamiento cinético enzimático.

El modelo de E. Marchi y J. Horas es altamente estructurado e incluye parámetros del arreglo molecular del complejo aspartato transcarbamila. Esto implica a las energías de interacción asociadas a los estados conformacionales R y T de la enzima, así como un cierto número de variables de escala molecular del complejo enzimático. Por tanto, la representación de la velocidad de reacción catalizada por la enzima alostérica genera una descripción a nivel molecular útil para predicciones cinéticas precisas. Sin embargo, la complejidad matemática de la función de partición en que se fundamenta el modelo molecular limita su uso a solo ciertos casos de modelación de cinética enzimática, por ejemplo, sistemas reaccionantes con una sola enzima.

La modelación mediante interacción de agentes permite niveles de descripción sólo a escala microscópica, porque no requiere de conocimientos a nivel molecular de la enzima alostérica. La formulación de reglas de interacción a partir de propiedades generales de la enzima es suficiente para generar una representación adecuada del sistema alostérico, incluso en sistemas enzimáticos con más de una enzima. No obstante, con la modelación basada en agentes no es posible concentrar la información contenida en un amplio grupo de datos experimentales dentro de un conjunto reducido de parámetros cinéticos característicos del sistema enzimático.

Conclusiones

El modelo de cinética enzimática más utilizado es la ecuación de Michaelis-Menten. Sin embargo, esta ecuación se restringe a enzimas no alostéricas. Aún la ecuación de Michaelis extendida para sistemas enzimáticos alostéricos simplificados tiene limitaciones. Otros modelos cinéticos estructurados describen adecuadamente el comportamiento sigmoidal característico de las enzimas alostéricas, pero su uso en el análisis cinético de las reacciones enzimáticas depende de la estimación de parámetros cinéticos, que regularmente introduce errores debidos a la imprecisión en los valores numéricos de los parámetros.

La modelación basada en agentes parece representar adecuadamente el comportamiento cinético de enzimas alostéricas. Las propiedades o atributos asignados a los agentes discretos son simplificaciones de las propiedades reales de las entidades que representan (E, S, P y C), y las reglas de interacción emulan el comportamiento cualitativo

observado en sistemas de reacción enzimática. Por tanto, la modelación matemática con agentes se fundamenta en aspectos físicos básicos del sistema real que describe, aunque no incluye explícitamente propiedades moleculares específicas de la enzima alostérica.

Las aplicaciones estudiadas en reacciones enzimáticas a bajas densidades (o concentraciones) de moléculas reactivas muestran la congruencia de las estimaciones teóricas obtenidas por modelación con agentes. También la comparación de los cálculos de actividad enzimática con resultados experimentales de la enzima aspartato transcarbamila presenta una correspondencia aceptable.

Nomenclatura

C	complejo enzima-sustrato o su fracción en modelación con agentes.
CTP	trifosfato de Citosina.
E	enzima o su fracción en modelación con agentes.
I	inhibidor alostérico o su fracción en modelación con agentes.
i_0	condición inicial de la especie i .
$[i]$	concentración de la especie i .
K_H	constante de Hill.
K_M	constante de Michaelis-Menten.
k_i	constantes cinéticas para la conversión enzimática de S a P .
m	número de agentes en el arreglo matricial.
n	parámetro de Hill, número de sitios de regulación en la aspartato transcarbamila.
P_i	producto i o su fracción en modelación con agentes.
R	estado activo o relajado de la aspartato transcarbamila.
ΣR_{mod}	suma de residuos del modelo mod respecto a datos experimentales.
r_j	velocidad instantánea de la reacción enzimática j .
$r_{j,\max}$	velocidad máxima de la reacción enzimática j .
S_i	sustrato i o su fracción en modelación con agentes.
T	estado inactivo o tenso de la aspartato transcarbamila.
t	tiempo de reacción.
y	probabilidad de ocupación de un sitio de regulación para una enzima alostérica.
Z	función de partición entre los estados R y T de la aspartato transcarbamila.

Agradecimientos

Los autores expresan su reconocimiento a la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el soporte financiero necesario para la realización del presente trabajo.

Referencias

- Axelrod, R. (1997). *The complexity of cooperation*. Princeton University Press, E.U.
- Bohinski, R. C. (1976). *Modern concepts in Biochemistry*, 2^a ed., Allyn and Bacon, E.U.
- Berry, H. (2002). Monte Carlo simulations of enzyme reactions in two dimensions: Fractal kinetics and spatial segregation. *Biophysics Journal* 83, 1891-1901.
- Chaplin, M.F. y Bucke, C. (1990). *Enzyme technology*. Cambridge Univ. Press, U.K.
- Gerhart, J. C. (1970). A Discussion of the regulatory properties of aspartate transcarbamylase from *Escherichia coli*. *Current Topics in Cellular Regulation*. Academic Press, E. U.
- Gerhart, J. C. y Pardee, A. B. (1962). The enzymology of control by feedback inhibition. *The Journal of Biological Chemistry* 237, 891-896.
- Hofmeyr, J-H.S. y Cornish-Bowden, A. (1997). The reversible Hill equation: How to incorporate cooperative enzymes into metabolic models. *Computers Applied Biosciences* 13, 377-385.
- Kantrowitz, E. R. y Lipscomb, W. N. (1988). *Escherichia coli* aspartate transcarbamylase: The relation between structure and function. *Science* 241, 669-674.
- Lee, B. H., Ley, B. W., Kantrowitz, E. R., O'Leary, M. H. y Welder, F. C. (1995). Domain closures in the catalytic chains of *Escherichia coli* aspartate transcarbamylase influence the kinetic mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 15620-15627.
- Marchi, E. y Horas, J. (1980). On aspartate transcarbamylase kinetics. *Journal of Theoretical Biology* 85, 413-421.
- Monod, J., Wyman J. y Chantoux, P. (1965). On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *Journal of Molecular Biology* 12, 88-118.
- Nielsen, J. y Villadsen, J. (1992). Modelling microbial kinetics. *Chemical Engineering Science* 47, 4225-4270.
- Porter, W. R., Modebe, M. O. y Stark, G. R. (1969). Aspartate transcarbamylase, kinetic studies of the catalytic subunit. *The Journal of Biological Chemistry* 244, 1846-1859.
- Roche, O. y Field, M. J. (1999). Simulations of the T→R conformational transition in aspartate transcarbamylase. *Protein Engineering* 12, 285-295.
- Weiss, J. N. (1997). The Hill equation revisited: Uses and misuses. *The FASEB Journal* 11, 835-841.
- Zanotti, J-M., Hervé, G. y Bellissent-Funel, M-C. (2006). Picosecond dynamics of T and R forms of aspartate transcarbamylase: A neutron scatterin study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764, 1527-1535.