

# Pràctica 11

---

*Enzims, metabòlits i regulació*

## Introducció

Una característica imprescindible per a la supervivència d'un organisme és la capacitat d'adaptar-se a canvis en el entorn. Així per exemple quan les cèl·lules poden obtenir un component bàsic de la seva estructura directament del seu entorn, les vies de síntesi d'aquell component es desactiven estalviant recursos. Alternativament, quan el component no es pot obtenir de l'entorn o aquest s'esgota, les cèl·lules tenen que activar-ne la seva síntesi. A més a més el consum d'un determinat precursor, rarament és constant. El consum a cada instant varia depenent de la disponibilitat de l'exterior així com de quants processos el consumeixen i a quina velocitat. Per tant la velocitat de síntesi ha d'estar regulada en tot moment. Un exemple d'aquest comportament el trobem en les vies de síntesi d'aminoàcids als microorganismes.

## Síntesi d'aminoàcids a microorganismes

Quan un bacteri o un llevat pot obtenir un aminoàcid del seu entorn manté les vies de síntesi de l'aminoàcid desactivades seguint un principi d'optimització de recursos. Quan l'aminoàcid de l'exterior s'esgota és necessari activar-ne la seva síntesi. Si ja s'estava sintetitzant però la demanda augmenta, cal incrementar-ne la síntesi i disminuir-la quan la demanda decreix. Per això cal regular la síntesi dels enzims que formen part de la seva via i fer-ho de manera que se'n sintetitzi la quantitat necessària per a la síntesi de proteïnes del microorganisme a cada instant. En aquest context es poden distingir dos nivells de regulació de diferent tipus (en aquest cas de la velocitat de síntesi de l'aminoàcid). La **regulació de la velocitat de reacció** de cada pas, a través de la cinètica de cada enzim, i la **regulació de la quantitat d'enzim** a cada pas de la via.

## Regulació de la velocitat de reacció de cada pas de la via

En qualsevol via metabòlica, un primer nivell de regulació es troba en l'efecte de la **concentració de substrats i productes** a cada pas de la via. En les vies de síntesi constituïdes per una seqüència de passos consecutius, habitualment sense embrancaments, una segona estratègia molt comú de regulació de la síntesi de producte, i per tant del flux de la via, consisteix en una **retroinhibició** del producte final sobre l'activitat del primer enzim de la seqüència (**feedback negatiu**). D'aquesta manera el primer enzim actua com un sensor dels nivells del producte final, activant el flux quan el producte s'exhaureix (baixa la concentració) i disminuint-lo quan s'acumula (augmenta la concentració).

Aquest nivell de regulació (anomenada a vegades **regulació metabòlica**) té habitualment una actuació més ràpida que el següent nivell (anomenada a vegades **regulació jeràrquica**).

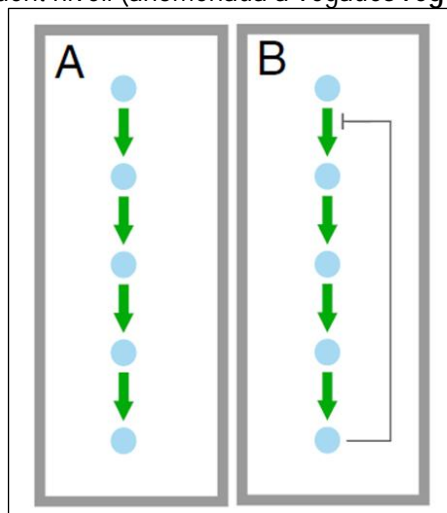


Figura 1: El flux d'una via (fletxes) es pot regular a través de l'efecte dels metabòlits (cercles) sobre la cinètica de cada pas (A) així com per retroinhibició de l'últim pas de la via sobre el primer pas de la seqüència (B).

## Regulació del nivell d'enzim a cada pas de la via

Quan, per exemple, el producte de d'una via és subministrat externament, cal reduir o eliminar l'expressió de tots els enzims de la mateixa per estalviar recursos. En molts casos aquest procés té lloc a través de factors de transcripció que regulen l'expressió dels gens dels enzims de la via i per tant el nivell d'enzim.

En el cas d'un dels organismes model més coneguts, el llevat *Saccharomyces cerevisiae*, s'han trobat diferents tipus d'estructures (o arquitectures) de regulació entre les quals són molt comuns (i rellevants per la pràctica que ens ocupa), les dues descrites a continuació. En tots dos casos el nivell dels enzims de la via son regulats per mitjà d'un factor de transcripció que constitutivament es troba unit al promotor.

En un primer cas, el producte final de la via actua directament sobre el factor de transcripció, impedit que s'activi la transcripció dels gens dels enzims (figura 2 C). Aquesta disposició s'anomena arquitectura d'inhibició per producte final (End Product Inhibition, EPI architecture).

En un segon cas, és un metabòlit intermediari de la via el que regula l'efecte del factor de transcripció (figura 2 D). En aquest cas la unió del metabòlit intermediari al factor de transcripció fa que aquest pugui activar la transcripció del corresponent gen. Aquesta disposició s'anomena arquitectura d'activació per metabòlit intermediari (Intermediate Metabolite Activation, IMA architecture).

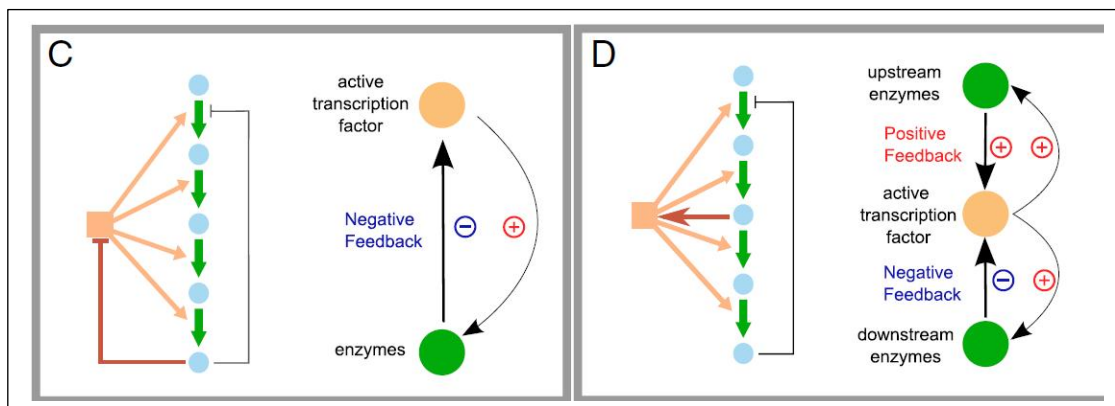


Figura 2: Exemples de 2 tipus de regulació de la síntesi d'enzims d'una via de síntesi d'aminoàcids a *S.cerevisiae*. (C) Efecte negatiu del producte de la via sobre la síntesi dels enzims de la via per actuació directa sobre el factor de transcripció que regula la seva síntesi. Arquitectura EPI. (D) Efecte d'un intermediari de la via sobre la síntesi dels enzims de la via, a través del factor de transcripció que activa la síntesi dels enzims. Arquitectura IPA.

Un exemple del primer tipus de regulació (EPI) es troba en la via de síntesi de l'arginina (Figura 3). En aquest cas el factor de transcripció ArgR reprimeix la transcripció dels gens dels enzims quan s'uneix a l'arginina. En absència d'arginina els enzims es sintetitzen normalment.

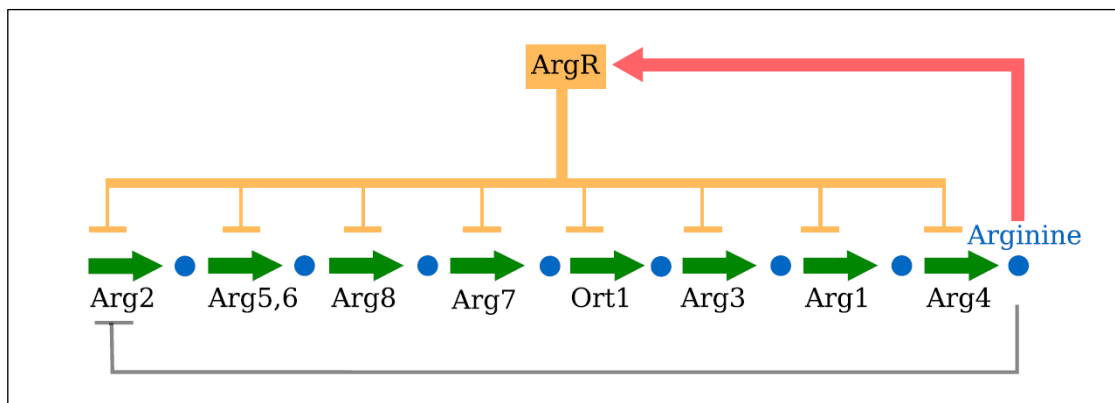


Figura 3: Exemple d'arquitectura de regulació de tipus EPI. Via de síntesi de l'arginina.

Un exemple del segon tipus de regulació (IMA) el trobem en la síntesi de la leucina (figura 4) on una seqüència de nou enzims consecutius, sintetitza leucina a partir del piruvat. En aquest cas, és un intermediari de la via, el  $\alpha$ IPM (alfa-isopropil malat), el que interacciona amb el factor de transcripció Leu3 activant-lo amb el que es fa possible la transcripció dels gens dels enzims de la via.

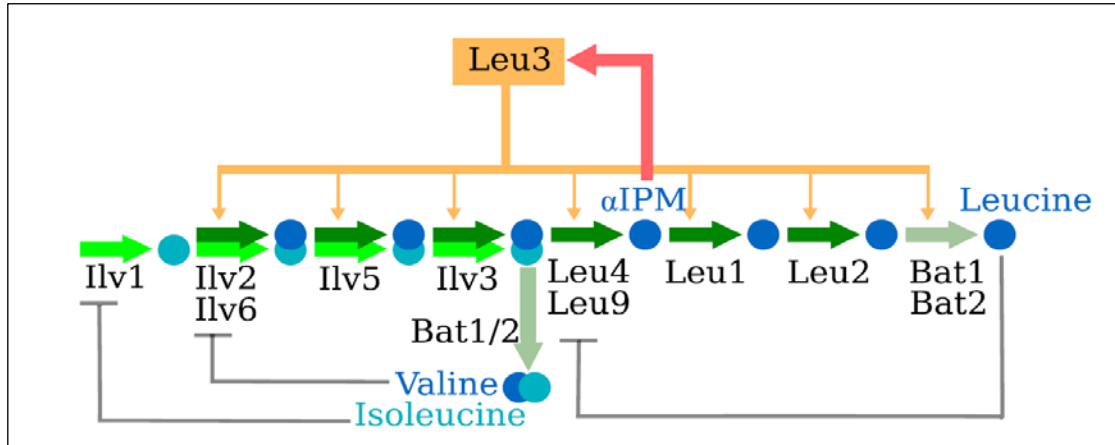


Figura 4 Exemple d'arquitectura de regulació de tipus IMA. Via de síntesi de la leucina.

### Conseqüències de l'arquitectura de regulació

Des del punt de vista de la regulació del nivell dels enzims, l'efecte dels nivells d'enzims sobre el nivell de regulador tenen com a conseqüència una regulació diferent per cada arquitectura. Així, l'arquitectura EPI es pot sintetitzar en bucle de **retroalimentació negativa**. Es a dir, l'augment dels enzims desencadena un procés que té com a conseqüència la disminució de la seva síntesi (**més** enzim  $\rightarrow$  **més** producte  $\rightarrow$  **menys** factor de transcripció actiu  $\rightarrow$  **menys** enzim). En canvi l'arquitectura IMA desencadena un procés en el que els enzims dels passos previs al metabòlit regulador actuen en un bucle de **retroalimentació positiva** (**més** enzim, **més** activador, **més** transcripció, **més** enzim), mentre que els enzims dels passos posteriors al metabòlit regulador queden immersos en un bucle de **retroalimentació negativa** (**més** enzim  $\rightarrow$  **menys** activador,  $\rightarrow$  **menys** transcripció  $\rightarrow$  **menys** enzim).

Un altre factor important en la regulació, el trobem en la **dinàmica de la regulació**. Es a dir les seqüències i velocitats de canvi de concentracions de metabòlits i enzims. Aquestes són en primer lloc conseqüència de paràmetres cinètics (d'enzims i factors de transcripció) així com també de la seva posició i de l'arquitectura. Una manera d'estudiar aquesta dinàmica és posar la síntesi d'una proteïna fluorescent (yeGFP), sota el control del mateix promotor de la proteïna que s'estudia. Fent això amb els promotors dels enzims de les vies metabòliques permet fer un seguiment de l'evolució de l'activació o desactivació de la síntesi dels enzims analitzats enregistrant a temps curts el nivell de fluorescència amb un citòmetre de flux. Habitualment es calcula quantes vegades (fold changes, mesura/referència) s'incrementa la fluorescència sobre el nivell inicial al activar la transcripció. Les dades obtingudes d'aquesta manera permeten analitzar el comportament temporal així com fer-ne un model i relacionar l'arquitectura de la xarxa amb la seva resposta.

Els autors observen que en l'arquitectura IMA el primer enzim després del metabòlit regulador, es troba sota un fort control transcripcional mentre que les enzims localitzats abans del metabòlit reguladors mostren una regulació transcripcional més dèbil. (per exemple a la via de la leucina, els enzims anteriors al regulador s'indueixen a una velocitat d'un 1% de canvi per minut i només ho fan entre 2 i 4 vegades (fold-changes) el valor inicial. Els posteriors s'indueixen primer lentament (2% per minut) i després acceleren (5% per minut) però al final han augmentant 400 vegades (fold changes)). Aquest patró no s'observa en altres arquitectures i es conseqüència de que els enzims localitzats després del regulador són els que

tenen l'efecte negatiu ja mencionat mentre que els localitzats abans el tenen positiu.

Com a resultat global els autors proposen que els paràmetres de cada cinètica han evolucionat de manera que són la 'solució òptima' per cada arquitectura.

Per estudiar aquestes respostes, avantatges i desavantatges els autors fan servir models simplificats del sistema que seran l'objecte d'aquesta practica (ref. 1).

## La pràctica

- 1) El primer pas ha de consistir en construir el model. Els autors el descriuen a la pàgina 1349 i a la figura 7 del primer paper adjunt. Els paràmetres es troben en el fitxer accessori també adjunt. Intenta construir el model dins el simulador amb aquesta informació. Una vegada fet, o si no te'n surts, pots consultar el resum que es troba com a apèndix a aquest guió.
- 2) El model creat hauria de reproduir les dades dels autors. Segons ells es varen ajustar els paràmetres amb dades experimentals per tal de reproduir el comportament de la figura 8. Crea dues gràfiques. Una per veure la variació en el nivell d'enzims i un altra per veure la variació en el nivell de metabòlits. Posa el eix Y de les gràfiques en escala logarítmica.
- 3) Crea un esdeveniment (event) que s'activi a partir de 100 minuts (Trigger expression, Time >100). En aquell moment s'ha de passar el valor de Fext (Target) al valor de zero (Expression).
- 4) Fes una simulació (time course) fins a un temps de 400 minuts. Reprodueix la simulació el comportament de la figura 8? (al paper els valors estan dividits pel valor inicial). (Comenta-ho segons el que diu el paper a la pàgina 1349 sobre els enzims 'downstream'). Els autors també comenten que els paràmetres trobats no son únics. Quina és la utilitat del model per ells llavors?.
- 5) Per veure l'efecte de nivells més elevats de  $\alpha$ IPM, com els que es trobarien si s'afegís externament el metabòlit, afegeix una nova reacció de síntesi fictícia de  $\alpha$ IPM amb un valor constant de 0.18 mmol/min. Explica quin és l'efecte sobre els metabòlits i els enzims. Descriu el model la resposta tal com s'espera?
- 6) Una sobreexpressió del gen que genera  $E_{leu1}$  es pot simular afegint una reacció fictícia de síntesi constant de  $E_{leu1}$  (p.ex. 0.00018 mmol·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>) al primer model de referència. Quin és l'efecte sobre els metabòlits  $\alpha$ IPM i  $\beta$ IPM en comparació amb el model de referència?
- 7) Els resultats anteriors es poden comparar amb l'efecte de la sobreexpressió del gen que genera  $E_{leu2}$  (p.ex. 0.00018 mmol·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>) afegint una reacció fictícia de síntesi constant de  $E_{leu2}$ . Quin és l'efecte sobre els metabòlits  $\alpha$ IPM i  $\beta$ IPM en comparació amb el cas anterior? Com ho expliques?
- 8) Un altra estratègia per millorar la dinàmica consistiria en modificar les velocitats de transcripció dels promotors per a  $E_{leu1}$  i  $E_{leu2}$ . Per veure quin efecte tindria en cada cas amb el model, s'hauria de modificar els valors dels paràmetres  $c_{max}$  al model de referència. Fes-ho per a la síntesi de  $E_{leu1}$  (reacció SE $_{leu1}$ ) aprofitant la utilitat 'Parameter scan'. A la pantalla del menú corresponent polsa el botó 'create' i al menú emergent selecciona Reactions->Reaction parameters->SE $_{leu1}$ -> $c_{max}$  i polsa 'OK'. Selecciona els valors mínim (0.0001), màxim (0.001) i 10 intervals. Assegurat que està seleccionada la tasca 'time course' i pressiona 'run'. Quin és l'efecte d'augmentar  $c_{max}$  sobre els enzims i els metabòlits?. Repeteix el procediment per al paràmetre  $c_{max}$  de SE $_{leu2}$  amb valors els valors mínim (0.00001), màxim (0.0001). Compara amb l'article (pg 1351 i fig. 9) i explica els resultats.

**Apartats Opcionals**

- 9) Es pot comparar l'estructura reguladora anterior, amb una de tipus EPI modificant la cinètica de síntesi dels enzims per una de tipus inhibidor com la següent;

$$v = c_{\min} + \frac{c_{\max} \cdot Ki^2}{(Ki^2 + Leu^2)}$$

S'ha de canviar també el metabòlit intermedi per el producte final (Leucina) com a regulador. Sense canviar el valor de cap paràmetre, quines diferències i semblances de comportament observes?.

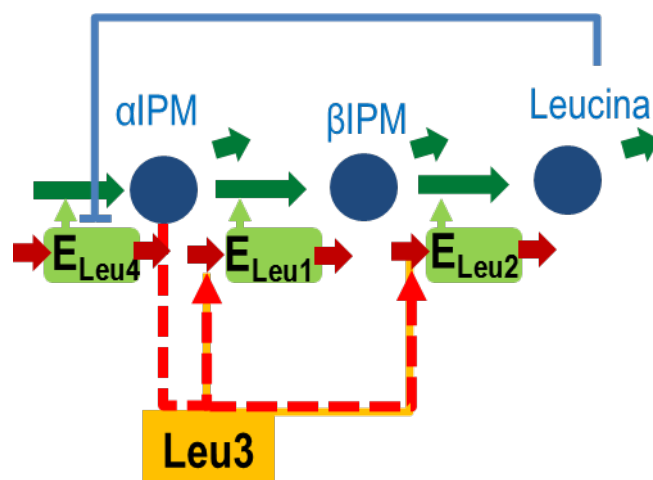
- 10) Executa el procediment de trobar l'estat estacionari per al cas de referència i per als dos casos dels apartats 6 i 7 i mira els canvis observats més significatius (Nota: dona un error donat que hi ha un esdeveniment però es pot ignorar). Executa també el procediment de 'Metabolic control analysis' del procediment de referència. Mira quins valors positius i negatius hi ha a les columnes de la síntesi de l'enzim  $E_{Leu1}$  i  $E_{Leu2}$ . Compara els canvis en els valors a l'estat estacionari dels tres casos corresponents a aquests valors i mira si augmenten i disminueixen d'igual manera. Com ho expliques?. (Nota: el tema del control metabòlic es donarà més endavant. Per tant aquesta part és per a que més endavant ho tornis a mirar a la llum del que vagis aprenent sobre aquest tema).

**Referències**

1. Dynamics and design principles of a basic regulatory architecture controlling metabolic pathways. Chin CS, Chubukov V, Jolly ER, DeRisi J, Li H. PLoS Biol. 2008 Jun 17;6(6):e146.
2. Regulatory architecture determines optimal regulation of gene expression in metabolic pathways. Chubukov V, Zuleta IA, Li H. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Mar 27;109(13):5127-32.

## APÈNDIX 1:

### Descripció de la xarxa simplificada de síntesi de Leucina



Esquema de les reaccions

### Llista d'espècies

Espècie	Valor inicial	unitats
αIPM	0.0018	mmol·l <sup>-1</sup>
βIPM	0.0086	mmol·l <sup>-1</sup>
Leucina	18.4	mmol·l <sup>-1</sup>
ELeu4	1	mmol·l <sup>-1</sup>
ELeu1	0.00022	mmol·l <sup>-1</sup>
ELeu2	7.9e-5	mmol·l <sup>-1</sup>

### Reaccions

#### Síntesi αIPM

(-> αIPM)

L'enzim de la primera reacció presenta inhibició al·lostèrica pel producte de la via (Pi). En aquest cas la quantitat d'enzim (ELeu4) es tracta com una constant donat que es considera suficient per convertir tot el precursor que l'hi arriba mentre no hi ha inhibició.

Cinètica:

$$v = \frac{k_{cat} \cdot E_{Leu4} \cdot Ki^2}{(Ki^2 + Pi^2)}$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
kcat	0.32	min <sup>-1</sup>
Ki	0.66	mmol·l <sup>-1</sup>

#### Síntesi βIPM

(αIPM -> βIPM)

La reacció està catalitzada per un enzim amb cinètica Michaelis-Menten.

Cinètica:

$$v = \frac{k_{cat} \cdot E_{Leu1} \cdot \alpha IPM}{(Km + \alpha IPM)}$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
kcat	2640	min <sup>-1</sup>
Km	2.71	mmol·l <sup>-1</sup>

**Síntesi Leucina**

(βIPM → Leucina)

La reacció està catalitzada per un enzim amb cinètica Michaelis-Menten.

Cinètica:

$$v = \frac{k_{cat} \cdot E_{Leu2} \cdot \beta IPM}{(Km + \beta IPM)}$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
kcat	108	min <sup>-1</sup>
Km	0.22	mmol·l <sup>-1</sup>

**Degradació i dilució αIPM**

(αIPM →)

Degradació de primer ordre proporcional al contingut.

Cinètica:

$$v = \delta \cdot [\alpha IMP]$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
delta	0.011	min <sup>-1</sup>

**Degradació i dilució βIPM**

(βIPM →)

Degradació de primer ordre proporcional al contingut.

Cinètica:

$$v = \delta \cdot [\beta IMP]$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
delta	0.008	min <sup>-1</sup>

**Consum, degradació i dilució Leucina**

(Leucina →)

Degradació de primer ordre proporcional al contingut.

Cinètica:

$$v = \delta \cdot [Leucina]$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
delta	0.077	min <sup>-1</sup>



### Síntesi enzim Eleu1 (SEleu1)

(-> Eleu1)

La síntesi de l'enzim s'assumeix que hi ha un nivell basal mínim de síntesi ( $c_{\min}$ ) i per sota d'una velocitat màxima ( $c_{\max}$ ). El nivell per sobre del mínim segueix una cinètica sigmoïdal proporcional al metabòlit activador (A).

Cinètica:

$$v = c_{\min} + \frac{c_{\max} \cdot A^2}{(K_A^2 + A^2)}$$

On A representa la concentració de metabòlit activador ( $\alpha$ IPM) i  $c_{\min}$  i  $c_{\max}$  els nivells mínim i màxim de síntesi. (Encara que en realitat sigui el Leu3 unit al  $\alpha$ IPM els que de veritat regulen la transcripció, per al model s'ha assumit que Leu3 està sempre unit al DNA i per tant la transcripció és directament proporcional al  $\alpha$ IPM. Per tant només cal considerar aquest donat que la constant de proporcionalitat es pot considerar englobada en les altres constants. Al segon paper hi ha un exemple d'un altra variant).

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
$c_{\min}$	1.02e-6	mmol·l <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>
$c_{\max}$	0.000508	mmol·l <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>
$K_A$	0.053	mmol·l <sup>-1</sup>

### Síntesi enzim Eleu2 (SEleu2)

(-> Eleu2)

La síntesi de l'enzim també s'assumeix que hi ha un nivell basal mínim de síntesi ( $c_{\min}$ ) i per sota d'una velocitat màxima ( $c_{\max}$ ). El nivell per sobre del mínim segueix una cinètica sigmoïdal proporcional al metabòlit activador (A).

Cinètica:

$$v = c_{\min} + \frac{c_{\max} \cdot A^2}{(K_A^2 + A^2)}$$

On A representa la concentració de metabòlit activador ( $\alpha$ IPM) i  $c_{\min}$  i  $c_{\max}$  els nivells mínim i màxim de síntesi. (Encara que en realitat sigui el Leu3 unit al  $\alpha$ IPM els que de veritat regulen la transcripció, per al model s'ha assumit que Leu3 està sempre unit al DNA i per tant la transcripció és directament proporcional al  $\alpha$ IPM. Per tant només cal considerar aquest donat que la constant de proporcionalitat es pot considerar englobada en les altres constants).

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
$c_{\min}$	3.5e-7	mmol·l <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>
$c_{\max}$	5.18e-5	mmol·l <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>
$K_A$	0.035	mmol·l <sup>-1</sup>

### Degradació-dilució enzim Eleu1

(Eleu1->)

Degradació de primer ordre proporcional al contingut.

Cinètica:

$$v = \delta \cdot [Eleu1]$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
delta	0.0079	min <sup>-1</sup>

**Degradació-dilució enzim Eleu2**

(Eleu2-&gt;)

Degradació de primer ordre proporcional al contingut.

Cinètica:

$$v = \delta \cdot [Eleu2]$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
delta	0.0064	min <sup>-1</sup>

**Entrada de Leucina externa inicial**

(-&gt; Leucina)

Per veure millor el canvi a l'estat de síntesi es simula una entrada inicial constant de leucina externa que s'anul·larà a un temps determinat amb un esdeveniment (event).

Cinètica:

Flux constant irreversible.

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
Fext	1.42	mmol·l <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>