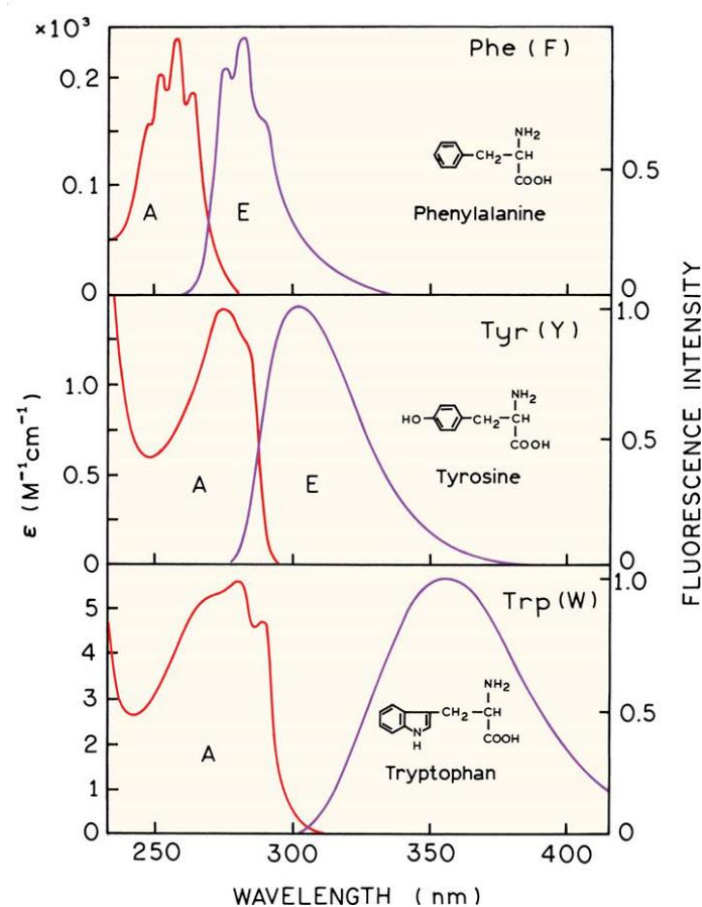


## 1. in 2. vaja: Karakterizacija interakcij med katepsinom K in glikozaminoglikani

Glikozaminoglikani (GAG) so linearni polimeri s heterogenimi vzorci modifikacij. Znani so kot regulatorji delovanja številnih zunajceličnih encimov, med njimi tudi cisteinske peptidaze katepsina K. Namen sklopa prvih dveh vaj je okarakterizirati interakcije med katepsinom K in različnimi GAG-i z dvema različnima spektroskopskima metodama in rezultate med seboj primerjati.

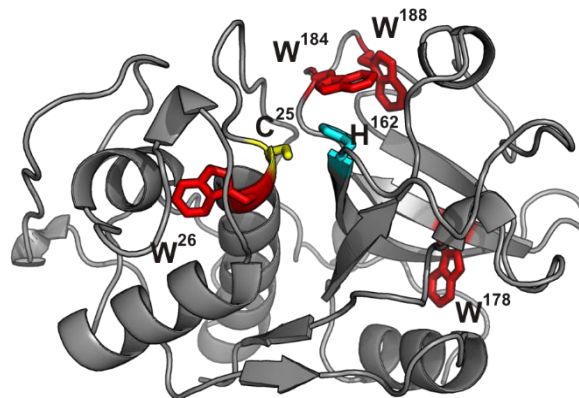
### 1. vaja: Spremljanje vezave glikozaminoglikanov z merjenjem intrinzične fluorescence proteina

Vezava GAG-ov povzroči konformacijske spremembe v katepsinu K, katere lahko spremljamo z ustreznimi spektroskopskimi metodami (cirkularni dikroizem, intinzična fluorescenca, ipd.). Pri tej vaji bomo za zasledovanje vezave GAG-ov na katepsin K uporabili metodo merjenja intrinzične fluorescence proteinov. Fluorescenčne lastnosti proteinov so odvisne od vsebnosti aromatskih aminokislinskih ostankov Phe, Tyr in Trp. Kot je razvidno iz slike 1, najmočneje absorbirajo in fluorescirajo Trp ostanki, najmanj pa Phe. Prav tako se vse tri aminokisliline razlikujejo v položajih maksimumov ter širini spektra absorbirane in emitirane svetlobe. Glede na izbiro valovne dolžine ekscitacije imamo torej možnost regulirati, katere ostanke v proteinu bomo vzbudili. V praksi se pri proteinski fluorescenci odločimo ali za vzbujevalno valovno dolžino 280 nm, kjer vzbudimo tako Tyr kot Trp ostanke ali za vzbujevalno valovno dolžino 295 nm, kjer selektivno vzbudimo le Trp ostanke, posledično pa je intenziteta emitirane svetlobe manjša.



Slika 1: Absorpcijski (A) in emisijski (E) spektri fenilalanina, tirozina in triptofana.

Katepsin K vsebuje štiri Trp ostanke (slika 2), od katerih se trije nahajajo v aktivnem mestu ali njegovi neposredni okolici. Zato lahko spremembe v emisijskem spektru zadovoljivo dobro povežemo s spremembami konformacije aktivnega mesta. Ker GAG-i ne absorbirajo svetlobe z valovno dolžino nad 250 nm, pri uporabljenih eksperimentalnih pogojih ne dajejo merljivega signala, torej izmerjen emisijski spekter v celoti pripada katepsinu K (z izjemo ozadja reakcijskega pufra, ki ga pri analizi odštejemo od celotnega spektra).



**Slika 2:** Kristalna struktura katepsina K z označenimi triptofanskimi ostanki in katalitično diado Cys<sup>25</sup>-His<sup>162</sup>.

#### Reagenti:

- založna raztopina rekombinantnega človeškega katepsina K (neaktivna mutanta Cys25Ser) s koncentracijo 80  $\mu$ M
- reakcijski pufer #1: 50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA
- reakcijski pufer #2: 100 mM acetat pH 5.5, 1 mM EDTA
- založna raztopina hondroitinsulfata s koncentracijo 20 mg/ml
- založna raztopina heparina s koncentracijo 20 mg/ml

#### Izvedba vaje:

1. Pripravite raztopino katepsina K, tako da bo končna koncentracija proteina v kiveti 1  $\mu$ M. Končni volumen reakcijske mešanice naj bo 1500  $\mu$ l.
2. Kiveto postavite v celico fluorimetra in počakajte nekaj minut, da se temperatura vzorca ustali na 25 °C.
3. Izmerite emisijski spekter vzorca v območju od 310 nm do 550 nm pri vzbujevalni valovni dolžini 295 nm. Za primerjavo izmerite še spekter pri vzbujevalni valovni dolžini 280 nm.
4. V kiveto postopoma dodajajte raztopino hondroitinsulfata oz. heparina in po vsakem dodatku izmerite spekter. Razpon končnih koncentracij GAG v kiveti naj bo od 0,1  $\mu$ g/ml do 200  $\mu$ g/ml.
5. Posebej izmerite še emisijska spektra reakcijskega pufra ter raztopine GAG z najvišjo končno koncentracijo.

#### Analiza rezultatov:

Analizirajte spektre v programu Excel (ali drugem programu za risanje grafov). Odštejte emisijski spekter ozadja (pufra) od vseh meritev. Narišite graf odvisnosti intenzitete fluorescence od koncentracije GAG pri valovni dolžini, kjer je intenziteta najvišja. V zapiskih s predavanj poiščite model mehanizma, za katerega menite, da je najustreznejši in analizirajte podatke z enačbo, ki opisuje model.

## 2. vaja: spremljanje vezave glikozaminoglikanov z merjenjem encimske aktivnosti

Vezavo GAG-ov na katepsin K lahko seveda spremljamo tudi tako, da merimo njihov vpliv na encimsko aktivnost katepsina K. Za spremljanje encimske aktivnosti boste uporabili sintetičen kolorimetrični substrat Z-Phe-Arg-pNA (benziloksikarbonil-Phe-Arg-*p*-nitroanilid).

### Reagenti:

- založna raztopina rekombinantnega človeškega katepsina K z aktivno koncentracijo 5  $\mu$ M
- reakcijski pufer #1: 50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA
- reakcijski pufer #2: 100 mM acetat pH 5.5, 1 mM EDTA
- založna raztopina hondroitinsulfata s koncentracijo 20 mg/ml
- založna raztopina heparina s koncentracijo 20 mg/ml
- založna raztopina Z-Phe-Arg-pNA s koncentracijo 10 mM
- založna raztopina DTT s koncentracijo 1 M

### Izvedba eksperimenta:

Merili boste encimsko aktivnost v prisotnosti naraščajočih koncentracij GAG. Vse meritve boste izvajali v kivetih v končnem volumnu reakcijske mešanice 3 ml. Absorbanco nastalega *p*-nitroanilina merimo pri valovni dolžini 405 nm.

Za izvedbo vsake meritve pripravite reakcijsko mešanico, ki vsebuje:

- substrat Z-Phe-Arg-pNA
- 2,5 mM DTT
- GAG (končna koncentracija od 0,2  $\mu$ g/ml do 200  $\mu$ g/ml, na začetku še meritev brez GAG)
- reakcijski pufer do končnega volumna po dodatku encima 3 ml

Reakcije sprožite z dodatkom encima v reakcijsko mešanico (končna koncentracija encima v kivetih je 2 nM) in takoj začnete kontinuirno spremljati nastanek produkta. Vsako meritev spremljate 2 min.

Izmerite dve seriji meritev – eno pri 10  $\mu$ M koncentraciji substrata, drugo pa pri 30  $\mu$ M.

*Vsako opravljeno meritev sproti analizirajte.*

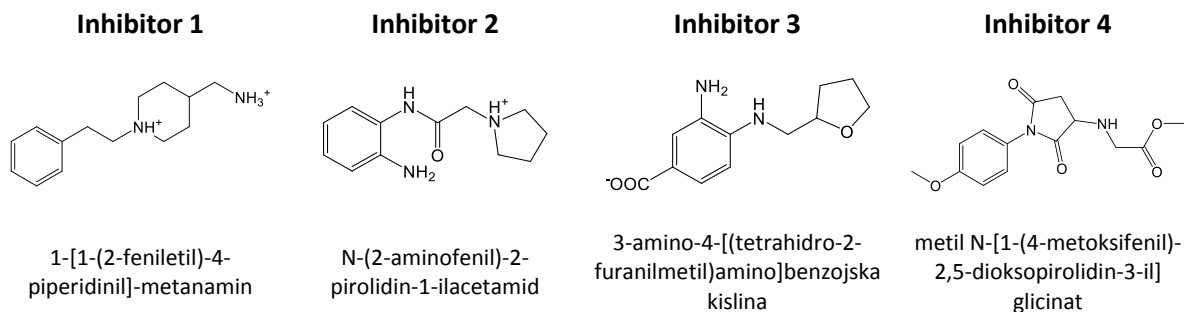
### Analiza rezultatov:

Analizirajte ukrivljenost/linearnost izmerjenih krivulj. Za potrebe te vaje bomo analizirali le hitrosti v dinamičnem ravotežju. Ugotovite, kdaj se pri vsaki reakciji le-to vzpostavi in določite hitrost reakcije v tej stopnji. Narišite graf odvisnosti hitrosti reakcije od koncentracije GAG. Vse meritve normalizirajte tako, da hitrost reakcije izrazite relativno glede na hitrost reakcije v odsotnosti GAG. V zapiskih s predavanj poiščite model mehanizma, za katerega menite, da je najustreznejši in analizirajte podatke z enačbo, ki opisuje model.

### 3. vaja: Določanje mehanizma delovanja alosteričnega inhibitorja

Namen vaje je okarakterizirati mehanizem delovanja alosteričnih inhibitorjev katepsina K z diagramom specifičnih hitrosti ter drugimi analitičnimi metodami.

Na razpolago so štiri različni alosterični inhibitorji:



#### Reagenti:

- založna raztopina rekombinantnega človeškega katepsina K z aktivno koncentracijo 5  $\mu\text{M}$
- reakcijski pufer #1: 50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA
- reakcijski pufer #2: 100 mM acetat pH 5.5, 1 mM EDTA
- založne raztopine inhibitorjev (vsak 100 mM v DMSO)
- založna raztopina Z-Phe-Arg-AMC s koncentracijo 2 mM
- založna raztopina DTT s koncentracijo 1 M

#### Izvedba eksperimenta:

Encimsko aktivnost boste pri tej vaji spremljali fluorimetrično z uporabo substrata Z-Phe-Arg-AMC pri vzbujevalni valovni dolžini 370 nm in emisijski valovni dolžini 455 nm. Za določitev mehanizma boste izmerili matriko meritev pri različnih koncentracijah substrata (S) in inhibitorja (I). Tako dobljene rezultate lahko analizirate z diagramom specifičnih hitrosti ali katerim drugim diagnostičnim pripomočkom.

#### Tabela meritev:

	2 $\mu\text{M}$ S	5 $\mu\text{M}$ S	10 $\mu\text{M}$ S	20 $\mu\text{M}$ S
0 $\mu\text{M}$ I				
100 $\mu\text{M}$ I				
250 $\mu\text{M}$ I				
500 $\mu\text{M}$ I				
1000 $\mu\text{M}$ I				

Meritve je smiselno meriti v serijah iste koncentracije substrata (4 serije po 5 meritev). Pri vsaki meritvi določite začetno hitrost reakcije.

Za izvedbo vsake meritve pripravite reakcijsko mešanico, ki vsebuje:

- ustrezno koncentracijo substrata in inhibitorja
- 2,5 mM DTT
- reakcijski pufer do končnega volumna po dodatku encima 2 ml

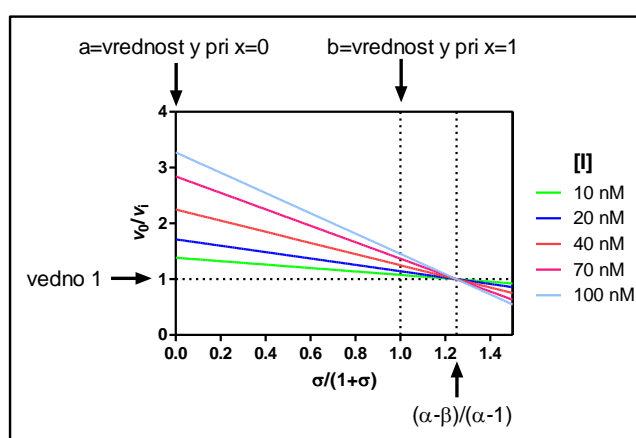
Reakcije sprožite z dodatkom encima v reakcijsko mešanico (končna koncentracija encima v kiveti je 0,5 nM) in takoj začnete kontinuirno spremljati nastanek produkta. Vsako meritev spremljate 2 min.

#### Analiza podatkov z diagramom specifičnih hitrosti:

Diagram je podan z enačbo:

$$\frac{v_0}{v_i} = \frac{[I] \left( \frac{1}{\alpha K_i} - \frac{1}{K_i} \right) \sigma}{1 + \beta \frac{[I]}{\alpha K_i}} \frac{\sigma}{1 + \sigma} + \frac{1 + \frac{[I]}{K_i}}{1 + \beta \frac{[I]}{\alpha K_i}}$$

kjer je  $\sigma = \frac{[S]}{K_m}$ . Enačba torej predstavlja odvisnost razmerja hitrosti reakcije v odsotnosti in prisotnosti inhibitorja  $v_0/v_i$  od koncentracije substrata (v obliki  $\frac{\sigma}{1+\sigma}$ ). Odvisnost je linearna, torej vsaki koncentraciji inhibitorja ustreza premica, ki kaže odvisnost hitrosti reakcije od koncentracije substrata pri tej koncentraciji inhibitorja, kot je prikazano na sliki 3.



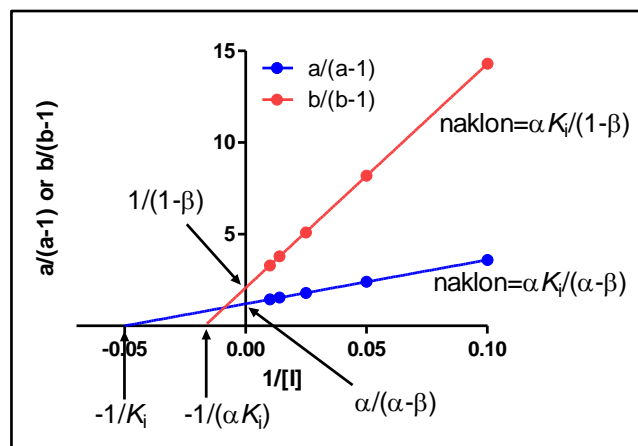
Slika 3: Primer diagrama specifičnih hitrosti.

Za diagram je značilno, da se vse premice, ki predstavljajo različne koncentracije inhibitorja, sekajo pri vrednosti  $\frac{v_0}{v_i} = 1$ , vrednost presečišča na x-osi pa je odvisna od koeficientov  $\alpha$  in  $\beta$ , ki veljata za dan mehanizem. Konstante koeficientov  $\alpha$  in  $\beta$  ter vrednost  $K_i$  določimo iz sekundarnega diagrama, ki ga narišemo iz vrednosti a (presečišča premic pri  $x=0$ ) in b (presečišča premic pri  $x=1$ ) v oblikah:

$$\frac{a}{a-1} = \frac{\alpha K_i}{\alpha - \beta} \frac{1}{[I]} + \frac{\alpha}{\alpha - \beta}$$

$$\frac{b}{b-1} = \frac{\alpha K_i}{1 - \beta} \frac{1}{[I]} + \frac{1}{1 - \beta}$$

V obeh primerih je vrednost  $y$  linearno odvisna od recipročne vrednosti koncentracije inhibitorja. Vrednost parametrov  $\alpha$ ,  $\beta$  in  $K_i$  določimo iz grafov, kot kaže slika 4.



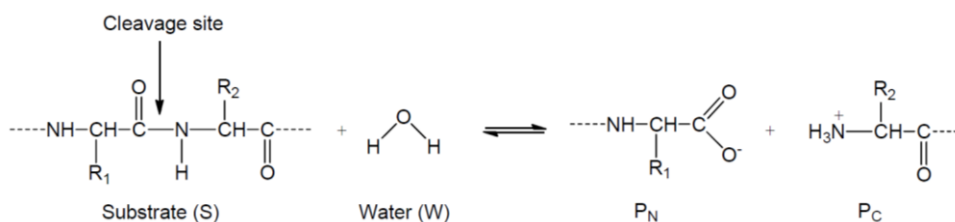
Slika 4: Sekundarni diagram specifičnih hitrosti na osnovi slike 3.

#### Praktična navodila za uporabo diagrama specifičnih hitrosti:

1. Najprej iz hitrosti reakcij brez inhibitorja narišete Michaelis-Mentenov diagram in iz njega ocenite  $K_m$ . Ne glede na to, da imate le štiri točke, je taka ocena bolj realna kot uporaba podatkov iz literature.
2. Iz določene vrednosti  $K_m$  izračunate vrednosti  $\frac{\sigma}{1+\sigma}$ , ki ustrezajo uporabljenim koncentracijam substrata.
3. Za vsako meritev v prisotnosti inhibitorja izračunate  $v_0/v_i$  in narišete primarni diagram.
4. Z linearno regresijo narišete premice, ki ustrezajo posameznim koncentracijam inhibitorja. Položaj presečišča premic da kvalitativno informacijo o mehanizmu inhibicije.
5. Določite vrednosti  $a$  in  $b$  ter skonstruirate sekundarni diagram.
6. Iz sekundarnega diagrama določite vrednosti parametrov  $\alpha$ ,  $\beta$  in  $K_i$ .

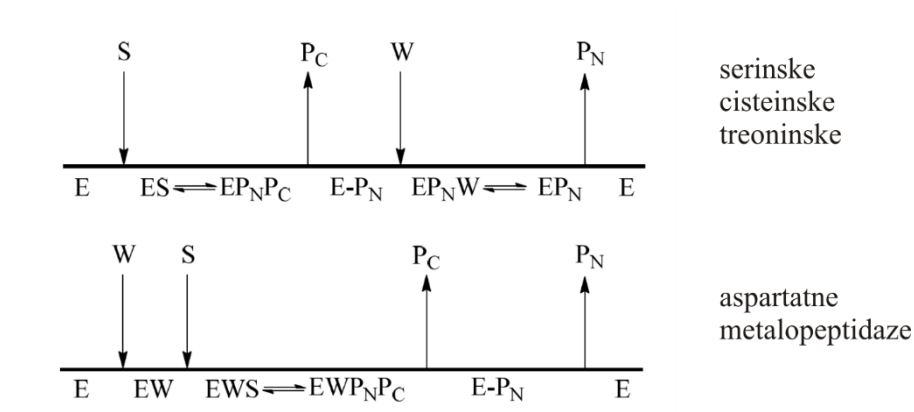
#### 4. vaja: Predravnotežna kinetika kimotripsina

Peptidaze katalizirajo reakcijo hidrolize peptidne vezi:



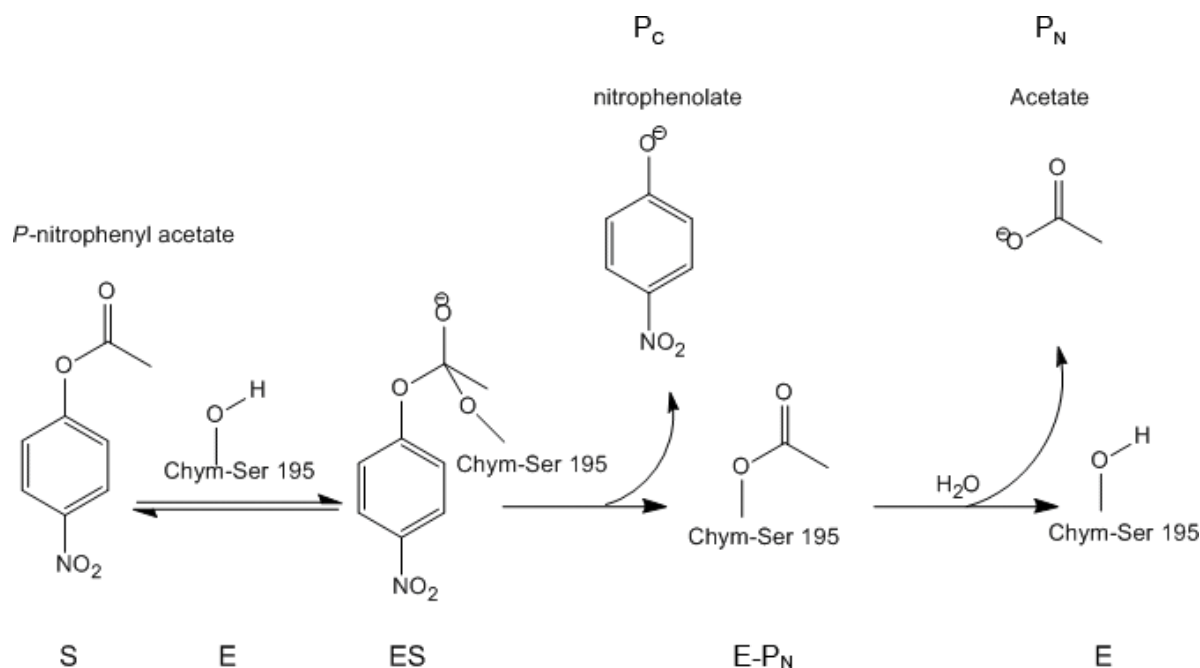
Slika 5: Reakcija, ki jo katalizirajo peptidaze.

Glede na to, da je voda v bioloških sistemih v prebitku, ponavadi reakcijo poenostavljeno tretiramo kar kot enosubstratno reakcijo. V resnici pa gre za dvosubstratno reakcijo, ki poteče po urejenem mehanizmu. Pri peptidazah glede na katalitično skupino poznamo dva različna mehanizma reakcije (slika 6). Mehanizem delovanja prve skupine imenujemo Ping Pong Bi Bi mehanizem, tistega druge skupine pa urejen Bi Bi mehanizem.



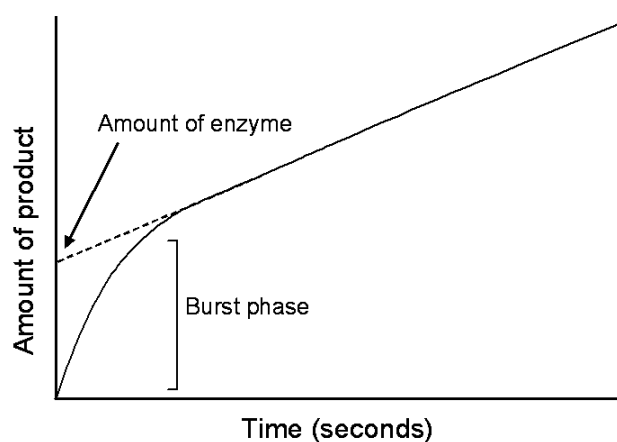
Slika 6: Shematski prikaz mehanizmov delovanja različnih skupin peptidaz.

V primeru prvega mehanizma pri reakciji nastane kovalentno povezan acilencimski intermediat (E-P<sub>N</sub>), katerega bomo pri tej vaji posredno detektirali. Za izvedbo eksperimenta bomo uporabili substrat *p*-nitrofenilacetat, katerega kimotripsin hidrolizira enako učinkovito kot amidne substrate. Reakcija hidrolize je prikazana na sliki 7.



Slika 7: Mehanizem hidrolize *p*-nitrofenilacetata. (vir: <http://chemwiki.ucdavis.edu/>)

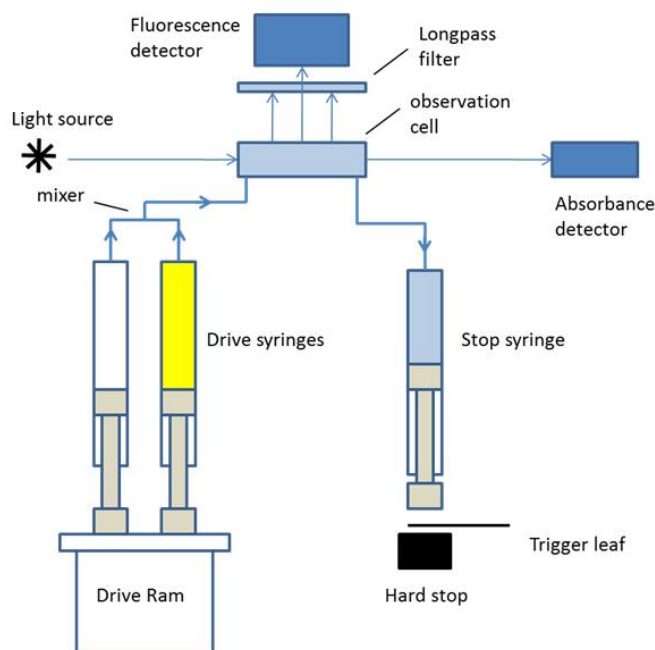
Časovni potek reakcije spremljamo z merjenjem absorbance sproščenega *p*-nitrofenolata pri 347,5 nm. Odvisnost absorbance od časa je prikazana na sliki 8. Kot vidite, se pred vzpostavitvijo dinamičnega ravnotežja v reakcijski mešanici odvije predravnotežni cikel, ki ga imenujemo »burst« faza (angl. *burst phase*). Predravnotežna faza predstavlja prvo reakcijo, ki jo katalizira vsaka molekula encima. Oblika je posledica tega, da je najpočasnejša stopnja v mehanizmu hidroliza acilencimskega intermedija (E-P<sub>N</sub>), eksperimentalno pa zasledujemo nastanek prve molekule produkta (P<sub>C</sub>), ki zapusti encim pred nastankom acilencimskega intermedija. Nastanek prve molekule produkta je torej hitrejši kot celoten katalitični cikel encima. Za tvorbo vsake naslednje molekule produkta P<sub>C</sub>, se mora encim regenerirati, vezati novo molekulo substrata in sprostiti P<sub>C</sub>. poteči mota torej celoten katalitičen cikel encima, katerega hitrost je enaka hitrosti reakcije v dinamičnem ravnotežju. Praktična posledica »burst« faze je ta, da je koncentracija produkta, ki v tej fazi nastane, enaka koncentraciji aktivnega encima, torej lahko reakcijo izkoristimo za določitev *l<sub>e</sub>*-te.



Slika 8: Diagram koncentracije nastalega *p*-nitrofenolata v odvisnosti od časa.



Reakcija med kimotripsinom in *p*-nitrofenilacetatom poteče v nekaj sekundah, zato je ne moremo zasledovati s konvencionalnimi spektrometri, temveč potrebujemo aparature za merjenje hitrih reakcij. Na vaji boste uporabljali spektrometer z ustavljenim pretokom, ki omogoča spremljanje hitrih reakcij z mrtvim časom (delom reakcije, ki ga zamudimo) nekaj milisekund. Shema delovanja takega spektrometra je prikazana na sliki 9. Brizgalki («drive syringes») napolnimo z raztopino encima oz. substrata. Ob aktivaciji mehanizem potisne vsebino obeh brizgalk v mešalnik, kjer pride do mešanja encima in substrata in posledično začetka reakcije, nato pa dalje v merilno celico in v brizgalko za zaustavitev («STOP syringe»). Ko se slednja napolni, pritisne ob sprožilec, s čimer se začne meritev. Aparatura omogoča detekcijo absorbance ali fluorescence, za vsako pa uporablja ločen detektor.



Slika 9: Shema spektrometra z ustavljenim pretokom. (vir: <http://thelab.photophysics.com/stopped-flow/>)

#### Reagenti:

- kimotripsin iz govejega pankreasa v kristalinični obliki
- reakcijski pufer – 50 mM HEPES pH 7,4
- založna raztopina *p*-nitrofenilacetata (40 mM v acetonitrilu)

#### Izvedba eksperimenta:

Ob začetku dela vam bo asistent predstavil aparaturu in rokovanje z njo. Sistem boste sprali z destilirano vodo.

Za izvedbo eksperimenta boste na aparaturi z ustavljenim pretokom napolnili brizgalko A (končen maksimalni volumen 200  $\mu$ l) z raztopino kimotripsina, brizgalko B (končen maksimalni volumen 4 ml) pa z raztopino *p*-nitrofenilacetata.

Kimotripsin raztopite v reakcijskem pufri do koncentracije 30 mg/ml in ga shranite na ledu. Iz te raztopine pripravite še redčitvi s koncentracijo 15 mg/ml in 7,5 mg/ml v reakcijskem pufri. Tudi ti redčitvi shranite na ledu.

Tik pred začetkom merjenja razredčite založno raztopino *p*-nitrofenilacetata v destilirani vodi do 1 mM končne koncentracije. Estri so v vodnih raztopinah nestabilni in spontano hidrolizirajo. Opazili boste, da se bo brezbarvna raztopina *p*-nitrofenilacetata po določenem času obarvala zaradi nastajanja *p*-nitrofenolata.

Napolnite brizgalki A in B z raztopino kimotripsina oz. *p*-nitrofenilacetata. Izmerite dve do tri reakcije v časovnem razponu meritev 5-20 s (čas merjenja lahko variirate, da dosežete optimalne rezultate).

Eksperiment ponovite še s preostalima dvema redčitvama kimotripsina.

Dodatno na spektrofotometru NanoDrop izmerite še absorbance vseh proteinskih vzorcev pri 280 nm.

#### Analiza rezultatov:

Način analize rezultatov je tak, kot je prikazan na sliki 8. Najprej določite hitrost vsake reakcije v dinamičnem ravnotežju. Premico ekstrapolirajte do časa 0 (osi Y). Iz razlike vrednosti absorbanc med ekstrapolirano premico in eksperimentalno izmerjeno krivuljo izračunajte aktivno koncentracijo encima. Ekstinkcijski koeficient *p*-nitrofenolata pri 347.5 nm je  $5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Izračunajte še koncentracijo encima na podlagi meritve  $A_{280}$ . Ekstinkcijski koeficient kimotripsina pri 280 nm je  $50.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Izračunajte tudi molarno koncentracijo kimotripsina na podlagi masne koncentracije raztopine, ki ste jo pripravili. Molekulska masa kimotripsina je 25.000 Da.

Primerjajte vse tri vrednosti med seboj in rezultate ustrezno komentirajte.