

Vestn.Slov.Kem.Drus. 34/3/1987, pp. 369-377

NOVA METODA ZA HITRO DOLOČANJE KINETIČNIH KONSTANT PRI
INTERAKCIJI ENCIMA S KOMPETITIVNIM INHIBITORJEM

M.Kotnik, A.Šali, J.Kos, B.Turk in V.Turk

Odsek za biokemijo, Institut Jožef Stefan, Jamova 39, 61000 Ljubljana

A new computer-aided approach for the determination of kinetic constants is presented. The model is developed for a particular type of interaction of an enzyme with a competitive inhibitor. To the experimental product vs. time curve a mathematical function is fitted which contains parameters from which k_a , k_d and K_i can be calculated. The experimental model was tested for the interaction of human kidney cathepsin L with chicken egg white cystatin. The calculated kinetic constants were compared with published data on homologous low M_r cysteine proteinase inhibitors.

UVOD

Točno določanje kinetičnih parametrov interakcije med encimi in njihovimi inhibitorji je ključnega pomena za ugotavljanje učinkovitosti teh biološko aktivnih substanc. Pri tem sta možna dva pristopa: diskontinuirni in kontinuirni. Pri prvem načinu analiziramo alikvote, ki jih odvezamo v določenih časovnih intervalih, pri drugem pa opazujemo spremembe v reagenčni mešanici s pomočjo beleženja na rekorderju. V obeh primerih pa zasledujemo bodisi spreminjanje koncentracije produkta (dP) ali pa koncentracije substrata (dS) s časom.

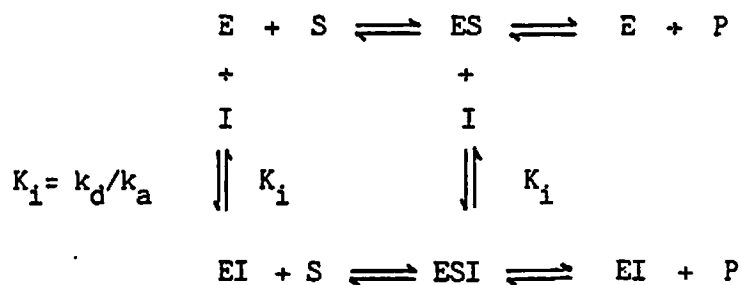
V zadnjem času se za določanje K_i uporabljajo predvsem ravnotežne metode (1, 2, 3), druga skupina metod, ki bazira na opazovanju približevanja reakcije encima in inhibitorja k ravnotežju, pa omogoča tudi izračun hitrostnih konstant k_a in k_d (4, 5, 6, 7). Na osnovi že znanih

postopkov smo razvili novo metodo z računalniško obdelavo podatkov in jo preizkusili na primeru interakcije cisteinske proteinaze katepsina L z nizkomolekularnim inhibitorjem cisteinskih proteinaz cistatinom iz jajčnega beljaka.

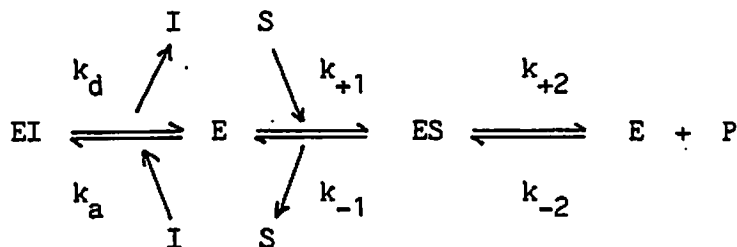
TEORIJA

Splošni model interakcije encima, inhibitorja in substrata opisuje shema 1 po Bottsu in Moralesu (8).

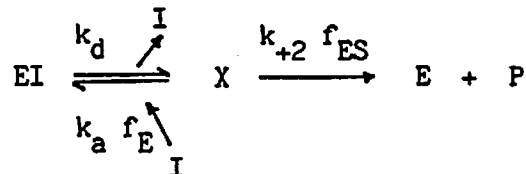
Shema 1



Omejimo se na primer interakcije kompetitivnega inhibitorja in encima, ki teče po shemi po Hanozetu in sod. (9) :



Predpostavljamo, da je k_{-2} zanemarljivo majhna, in da so hitrostne konstante k_{+1} , k_{-1} in k_{+2} veliko večje kot k_a in k_d (celotna hitrost reakcije je določena s hitrostjo interakcije encima in inhibitorja). Shema se v tem primeru poenostavi :



$$\begin{aligned}
 X &= (E) + (ES) \\
 f_{ES} &= (1 + K_m/S)^{-1} = (ES)/X \\
 f_E &= (1 + S/K_m)^{-1} = (E)/X
 \end{aligned}$$

Če izberemo eksperimentalne pogoje tako, da se koncentracija substrata s časom ne spremeni bistveno ($(S)_0 = (S)_t$), in da je koncentracija encima mnogo manjša od koncentracije inhibitorja (iz tega sledi, da se tudi koncentracija inhibitorja s časom bistveno ne spreminja ($(I)_0 = (I)_t$), lahko nastajanje kompleksa EI opišemo z enačbo :

$$d(EI)/dt = k_a(I)f_E X - k_d(EI) \quad (1)$$

Ker je $X = (E)_T - (EI)$ in $(E)_T = (E) + (ES) + (EI)$, lahko enačbo (1) zapišemo drugače :

$$d(EI)/dt = k_a(I)f_E(E)_T - k_a(I)f_E(EI) - k_d(EI) \quad (2)$$

Enačbo (2) uredimo in uvedemo koeficient b :

$$\begin{aligned}
 d(EI)/dt &= -(k_d + k_a(I)f_E)(EI) + k_a(I)f_E(E)_T = -b(EI) + \\
 &+ k_a(I)f_E(E)_T \quad (3)
 \end{aligned}$$

Z integracijo enačbe (3) dobimo (robni pogoji $(EI)(0) = 0$, $(EI)(t) = (EI)$) :

$$(EI) = (k_a(I)f_E(E)_T/b)(1 - e^{-bt}) \quad (4)$$

Ker je $v = d(P)/dt = k_{+2}(ES) = k_{+2}f_{ES}X$ in $X = (E)_T - (EI)$, lahko napišemo hitrost reakcije kot :

$$d(P)/dt = k_{+2}f_{ES}(E)_T/b + (k_{+2}f_{ES}(I)f_E(E)_T/b)e^{-bt} \quad (5)$$

Po integraciji enačbe (5) (robni pogoji $(P)(0) = 0$, $(P)(t) = (P)$) dobimo :

$$(P) = (k_{+2}f_{ES}k_d(E)_T/b)t + (k_{+2}f_{ES}k_a(I)f_E(E)_T/b^2)(1 - e^{-bt}) \quad (6)$$

Enačba (6) je osnova nekaterim metodam za določanje kinetičnih konstant (4, 5, 9), vendar te metode bazirajo na večih neodvisnih meritvah in ekstrapolacijah. Naš namen je bil, da model, opisan z enačbo (6) in nelinearno metodo najmanjših kvadratov (13) uporabimo za direktno določanje kinetičnih konstant iz netransformiranih eksperimentalnih podatkov (krivulja $(P)(t)$). Vendar enačba (6) ni najprimer-

nejša za obdelavo z nelinearno metodo najmanjših kvadratov, ker vsebuje več nenatančno določenih konstant (k_{+2} , f_E , f_{ES} , $(E)_T$, (I)). Funkcijsko zvezo med (P) , t , k_a in k_d smo skušali poenostaviti in s tem izboljšati določenost parametrov z eksperimentom. Z uporabo enačb :

$$v_{\max} = k_{+2}(E)_T \quad (7)$$

$$v_o = (v_{\max}(S))/((S) + K_m) \quad (8)$$

$$v_o = (k_{+2}(E)_T(S))/((S) + K_m) = k_{+2}(E)_T f_{ES} \quad (9)$$

Lahko napišemo linearni člen enačbe (6) v obliki :

$$k_{+2} f_{ES} k_d (E)_T / b = v_o k_d / b = c / b$$

Eksponentni člen pa kot :

$$\begin{aligned} k_{+2} k_a f_E f_{ES} (E)_T (I) / b^2 &= v_o f_E k_a (I) / b^2 = v_o f_E k_a (I) + v_o k_d - v_o k_d = \\ &= (v_o (f_E k_a (I) + k_d) - v_o k_d) / b^2 = (v_o b - c) / b^2 = v_o / b - c / b^2 \end{aligned}$$

Torej je preoblikovana enačba (6) :

$$(P) = (v_o / b - c / b^2)(1 - e^{-bt}) + ct / b \quad (10)$$

V enačbi (10) nastopajo samo zelo natančno določena konstanta v_o in parametra b ter c . Ta dva parametra izračunamo z nelinearno metodo najmanjših kvadratov. Ko imamo parametra znana, pa lahko kinetične konstante enostavno izračunamo z uporabo zvez :

$$b = k_d + k_a (I) f_E$$

$$c = v_o k_d$$

$$K_i = k_d / k_a$$

Pogoj je še, da poznamo $(I)_o$, K_m in $(S)_o$.

MATERIALI IN METODE

Človeški katepsin L (10) in cistatin iz jajčnega beljaka (11) sta bila izolirana v elektroforetsko homogeni obliki. Točno koncentracijo katepsina L smo določili s titracijo aktivnega mesta z inhibitorjem Ep475 (Peptide Research Institute, Japonska) po Barrettovi metodi (12) in potem s katepsinom L titrirali jajčni cistatin. Jajčni cistatin je bil 100 % aktiven in smo zato lahko njegovo proteinsko koncentracijo jemali kot aktivno koncentracijo. Za opazovanje interakcije med encimom, substratom in inhibitorjem ter računanje kinetičnih konstant smo izdelali in uporabljali sistem, ki je bil sestavljen iz fluorimetra PERKIN - ELMER LS-3, povezanega preko RS 232C vmesnika s hišnim računalnikom APPLE II+, ta pa je bil povezan z IBM/XT računalnikom. Prva računalniška enota je služila za shranjevanje podatkov iz fluorimetra in njegovo krmiljenje, druga pa za obdelavo podatkov in računanje kinetičnih konstant. Fluorescenco smo merili pri $\lambda_{\text{eksc}} = 370 \text{ nm}$ in

$\lambda_{\text{emis}} = 460 \text{ nm}$ v 10 x 10 mm kiveti v celici termostatirani na 25°C. Fluorimeter je bil umerjen s 100 nM 7 - aminometilkumarinom (produkt encimske reakcije). Aktivnost katepsina L smo merili s fluorogenim substratom Z-Fhe-Arg-NHMec (Serva, ZRN). V kiveto smo dali substrat (končna koncentracija $(S)_0 = 20 \mu\text{M}$ in aktivator DTT (končna koncentracija 2 mM) v aktivacijskem pufri (0.34 mM Na-acetatni pufer, pH = 5.5 s 4 mM EDTA in 0.1 % Brij 35). Tej mešanici smo dodali encim (končna koncentracija $(E)_0 = 22 \text{ pM}$) in počakali, dokler reakcija ni stekla s konstantno hitrostjo v_0 . Vzorci encima so bili pripravljene iz koncentrirane raztopine ter takoj razdeljeni na alikvote in zamrznjeni, tako da je bil vsak alikvot uporabljen le enkrat. Tudi raztopini substrata (1 mM v DMSO) in aktivatorja (8 mM v aktivacijskem pufri) sta bili sveže pripravljene. Ko je reakcija dosegla konstantno hitrost ($dP/dt = v_0$), smo reakcijski zmesi dodali sveže pripravljeno raztopino inhibitorja v majhnem volumnu (30 μl) in v 30-kratnem koncentracijskem prebitku ($(I)_0 = 0.66 \text{ nM}$). Reakcijo smo zasledovali 40 minut, pri čemer je računalnik zabeležil spremembo (P) vsako sekundo v koncentracijskih enotah. Podatke, ki so se shranili na disketi, smo prenesli na IBM/XT in eksperimentalni krivulji (P)(t) priredili "fitano" krivuljo, ki je opisana z enačbo (10). Pri tem smo dobili najboljše vrednosti za koefici-

enta b in c, iz katerih smo naknadno izračunali kinetične konstante k_a , k_d in K_i .

OBDELAVA PODATKOV

- a) Eksperimentalno krivuljo $(P)(t)$ smo najprej zgladili in skrčili z nekaj tisoč na nekaj sto točk.
- b) Algoritem uporabljen pri nelinearni metodi najmanjših kvadratov, je gradientnega tipa (13). Uporabili smo naš program FIT (napisan v Pascalu).

REZULTATI IN DISKUSIJA

Rezultati določanja kinetičnih konstant po novi metodi so prikazani v Tabeli 1 :

Tabela 1

Eksperimentalno določeni parametri :

začetna koncentracija encima $(E)_0$: 2.20×10^{-11} M
 začetna koncentracija inhibitorja $(I)_0$: 6.60×10^{-10} M
 začetna koncentracija substrata $(S)_0$: 2.00×10^{-5} M
 Michaelis-Mentenova konstanta K_m : 2.00×10^{-6} M (15)

Izračunane kinetične konstante :

začetna hitrost v_0 : 6.54×10^{-11} Ms⁻¹
 konstanta asociacije k_a : 3.87×10^8 M⁻¹s⁻¹
 konstanta disociacije k_d : 6.65×10^{-4} s⁻¹
 konstanta inhibicije K_i : 1.71×10^{-12} M

Naše prave konstante smo preračunali tudi v navidezne ($k_{a \text{ nav}} = 3.52 \times 10^7$ M⁻¹s⁻¹, $K_{i \text{ nav}} = 1.89 \times 10^{-11}$ M), da bi jih primerjali z vrednostmi drugih avtorjem, ki niso upoštevali vpiva koncentracije substrata pri kompetitivni inhibiciji ($K_{i \text{ nav}} = K_i \times (1 + (S)/K_m)$), $k_{a \text{ nav}} = k_a / (1 + (S)/K_m)$). Konstanto inhibicije za par katepsin L/jajčni cistatin smo določali tudi z ravnotežno metodo po Hendersonu in določili vrednost

3×10^{-11} M (10), Green in sodelavci pa so določili vrednost K_i nav = 1.9×10^{-11} M (14). Jajčni cistatin sicer velja za enega najmočnejših in najhitrejših proteinskih inhibitorjev cisteinskih proteinaz, zato lahko smatramo interakcijo tega para kot mejni primer. Nicklin in Barrett (5) sta opazovala interakcijo rastlinske cisteinske proteinaze papaina (ki je strukturno zelo podoben katepsinu L) z jajčnim cistatinom, in ugotovila, da se cistatin veže tako močno, da je bilo možno le oceniti zgornjo mejo vrednosti K_i nav (5×10^{-12} M), medtem ko je bila k_a nav = 1×10^7 M⁻¹s⁻¹. Zaradi strukturnih podobnosti katepsina L in papaina lahko sklepamo, da je K_i reda velikosti 10^{-12} M za interakcijo z jajčnim cistatinom bližje realnosti. To nakazujejo tudi podatki, da se človeški cistatin C (homologen jajčnemu cistatinu) enako močno veže na papain in katepsin L (16), podobno pa je tudi v primeru interakcije katepsina L in papaina s kininogenom (17), ki je sestavljen iz treh polipeptidnih verig, homolognih cistatinu.

Določanje K_i vrednosti reda velikosti 10^{-12} M je možno samo z uporabo zelo občutljivih metod, kot je fluorimetrija, kjer lahko delamo z zelo nizkimi koncentracijami encima in inhibitorja (reda velikosti 10^{-12} M). To območje predstavlja spodnjo mejo iz več razlogov. V zelo razredčenih raztopinah pride do pojava inaktivacije cisteinskih proteinaz, posebno katepsina L in papaina. Zato je treba zagotoviti optimalen interval merjenja odvisnosti (P) od t, kjer do tega fenomena še ne pride. Ker je pri naši metodi potrebno delati s prebitkom inhibitorja, moramo pri inhibitorjih, ki se zelo močno vežejo na encim, izbrati takšno koncentracijo, da še velja pogoj $(I)_0 \gg (E)_0$. Istočasno mora biti po dodatku inhibitorja sprememba dP/dt še dovolj velika, da omogoča računanje kinetičnih konstant. Nova metoda ima tudi svoje prednosti: predvsem je zelo hitra (30–40 minut) in enostavna, saj delamo pri eni koncentraciji substrata in inhibitorja, zadostuje pa tudi samo en eksperiment. Za določitev vseh treh kinetičnih konstant, ki opisujejo interakcijo encima in inhibitorja, potrebujemo izjemno majhne količine reaktantov, rezultati meritev pa so ponovljivi. Ker je stehiometrija vezave cisteinskih proteinaz s cistatinom znana (16), je potrebno vedeti le točno koncentracijo inhibitorja $(I)_0$. Naša študija kaže, da je ta metoda potencialno uporabna v primerih, ko imamo na razpolago

malo encima in inhibitorja, omogoča pa tudi veliko število poskusov in s tem primerjavo interakcij encima z različnimi inhibitorji ali različnih encimov z istim inhibitorjem, kar vodi do boljšega poznavanja narave teh inhibicij. V povezavi s klasičnimi že uveljavljenimi metodami določanja kinetičnih konstant pa ta metoda predstavlja poleg hitrosti in enostavnosti tudi možnost določitve vseh parametrov, ki opisujejo biološko pomembnost interakcije (18) in s tem kontrolo delovanja encima v telesu.

OKRAJŠAVE

(P): koncentracija produkta; (S): koncentracija substrata; $(E)_T$: totalna koncentracija encima; (E): koncentracija encima; (ES): koncentracija kompleksa encim/substrat; (EI): koncentracija kompleksa encim/inhibitor; K_i : konstanta inhibicije; $K_{i,nav}$: navidezna konstanta inhibicije; k_a : asociacijska konstanta kompleksa encim/inhibitor; $k_{a,nav}$: navidezna asociacijska konstanta kompleksa encim/inhibitor; k_d : disociacijska konstanta kompleksa encim/inhibitor; K_m : Michaelis-Mentenova konstanta; v_{max} : maksimalna hitrost reakcije; v_0 : začetna hitrost reakcije; Z-Phe-Arg-NHMec: benziloksikarbonil-fenilalanil-arginin-N-metil-kumarilamid; DTT: ditiotreitol; DMSO: dimetilsulfoksid; Ep 475: L-3-karboksil-trans-2,3-epoksiopropil-leucilamido(4-benziloksikarbonilamino)butan.

POVZETEK

Na osnovi znanih metod smo razvili nov postopek za določanje kinetičnih konstant pri interakciji encima s kompatibilnim inhibitorjem z računalniško obdelavo podatkov. Bistvo te metode je, da se eksperimentalni krivulji odvisnosti (P) od t priredi matematična funkcija, ta pa vsebuje parametre, iz katerih je možno izračunati k_a , k_d in K_i . Model smo preizkusili na primeru interakcije človeškega katepsina L z jajčnim cistatinom in primerjali izračunane konstante s podatki za homologne nizkomolekularne proteinske inhibitorje cisteinskih proteinov.

LITERATURA

- 1) M.Dixon, Biochem.J. 129, 197-202 (1972).
- 2) P.J.F.Henderson, Biochem.J. 127, 321-333 (1972).
- 3) J.G.Bieth, Biochem.Medicine 32, 387 (1984).
- 4) A.Baici, M.Gyger-Marazzi, Eur.J.Biochem. 124, 33-41 (1982).
- 5) M.J.H.Nicklin, A.J.Barrett, Biochem.J. 223, 245-253 (1984).
- 6) E.I.Canela, R.Franco, Biochem.J. 233, 599-605 (1986).
- 7) W.Machleidt, I.Machleidt, W.Müller-Esterl, J.Brzin, M.Kotnik, T.Popovič, V.Turk, V: Cysteine Proteinases and Their Inhibitors (V.Turk,ed.), Walter de Gruyter, Berlin-New York, pp 705-727 (1986).
- 8) J.Botts, M.Morales, Trans.Faraday Soc. 49, 696-707 (1953).
- 9) G.Hanozet, H.P.Pircher, P.Vanni, B.Oesch, G.Semenza, J.Biol.Chem. 256, 3703-3710 (1981).
- 10) M.Kotnik, T.Popovič, V.Turk, V: Cysteine Proteinases and Their Inhibitors (V.Turk,ed.), Walter de Gruyter, Berlin-New York, pp 43-50 (1986).
- 11) J.Kos, M.Dolar, V.Turk, V: Cysteine Proteinases and Their Inhibitors (V.Turk,ed.), Walter de Gruyter, Berlin-New York, pp 583-591 (1986).
- 12) A.J.Barrett, H.Kirschke, Methods in Enzymol. 80, 535-561 (1981).
- 13) J.G.Reich, Eur.J.Biochem. 26, 308-379 (1972).
- 14) G.D.J.Green, A.A.Kembhavi, M.E.Davies, A.J.Barrett, Biochem. J. 218, 939-946 (1984).
- 15) W.R.Mason, G.D.J.Green, A.J.Barrett, Biochem.J. 226, 233-241 (1985).
- 16) A-J.Barrett, M.E.Davies, A.Grubb, Biochem.Biophys.Res.Comm. 120, 631-636 (1984).
- 17) W.Müller-Esterl, H.Fritz, W.Machleidt, A.Ritonja, J.Brzin, M.Kotnik, V.Turk, J.Kellermann, F.Lottspeich, FEBS Lett. 182, 310-314 (1985).
- 18) J.G.Bieth, V: Cysteine Proteinases and Their Inhibitors (V.Turk, ed.), Walter de Gruyter, Berlin-New York, pp 693-703 (1986).

Sprejeto: 25.5.1987
 Received:

UDK: 541.127