

1. Studio della reazione di deacilazione di un intermedio acil- α -chimotripsina

Considerazioni generali

L' α -chimotripsina **1** è un enzima proteolitico appartenente alla classe delle serina-proteasi. Il meccanismo della reazione di idrolisi dei legami peptidici catalizzata dall' α -chimotripsina prevede la formazione di un intermedio acil-enzima che poi viene velocemente idrolizzato rigenerando l'enzima nel suo stato iniziale. Questo intermedio ha, in genere, un tempo di vita molto breve ed è presenti in piccole concentrazioni stazionarie. Tuttavia in presenza di opportuni substrati è possibile generare una concentrazione significativa dell'intermedio acil-enzima permettendo un monitoraggio del processo di deacilazione. L'analisi di questa reazione, in particolare la determinazione della sua costante di velocità al variare del pH del mezzo consente di determinare quale sia la pKa del gruppo funzionale del sito attivo che è coinvolto nel processo. Inoltre l'analisi dell'effetto isotopico del solvente consentirà di verificare se il processo è consistente con un meccanismo di catalisi basica generale.

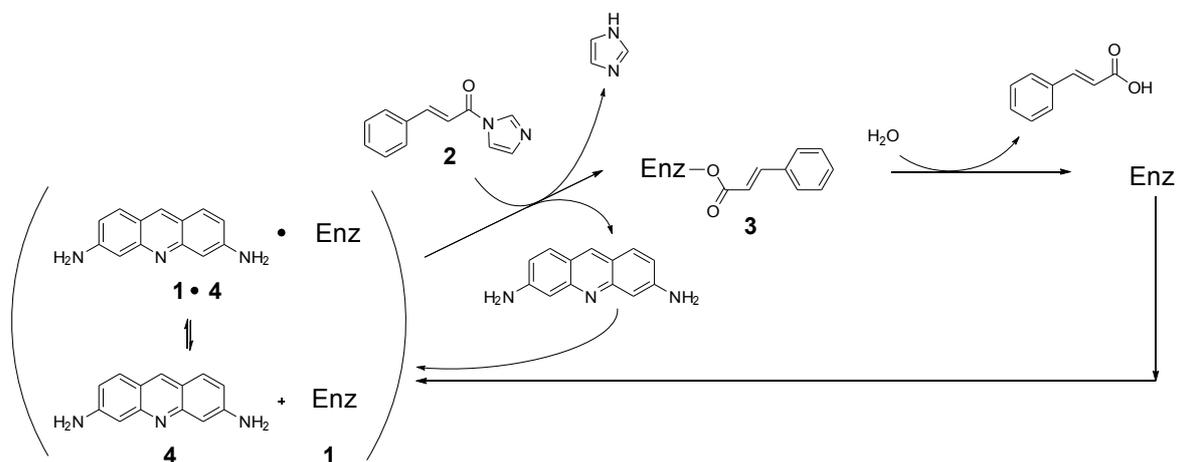


Figura 1. sequenza di reazioni che sono coinvolte nell'idrolisi del *trans*-cinnamoil imidazolo da parte dell' α -chimotripsina in presenza di proflavina.

Nell'esperienza utilizzerete il *trans*-cinnamoil imidazolo **2** come substrato, la reazione della α -chimotripsina con questo composto porta velocemente alla formazione dell'intermedio acil-enzima **3** che lentamente subisce idrolisi ripristinando l'enzima nel suo stato iniziale. È questo secondo processo che monitorerete per via spettrofotometrica. La reazione è dello pseudo primo ordine e decorre a completezza in un tempo variabile a seconda del pH del mezzo; da pochi minuti a pH basico fino ad alcune decine di minuti a pH acido. Per monitorare agevolmente la reazione sfrutterete la proprietà della proflavina **4** di formare un complesso labile con l' α -chimotripsina **1•4** in prossimità del suo sito attivo. Questo complesso è colorato in giallo e presenta un massimo di assorbimento a 465 nm. Tuttavia la proflavina è anch'essa colorata in giallo ma il suo massimo di assorbimento si trova a 440 nm. Per misurare solamente l'assorbimento del complesso enzima-proflavina sarà necessario utilizzare nella cella di riferimento dello spettrofotometro la stessa concentrazione di proflavina che realizzerete nella cella di misura. In questo modo l'assorbanza che leggerete sarà solamente imputabile alla presenza del complesso enzima-proflavina e non della proflavina libera. A seguito dell'aggiunta del substrato ad una soluzione dell'enzima si ha la veloce formazione dell'intermedio acil-enzima, durante questo processo la proflavina viene scalzata dal sito

attivo ritornando in soluzione e portando ad una marcata diminuzione dell'assorbanza. Durante la successiva reazione di idrolisi dell'intermedio acil-enzima, la proflavina ritorna a legare l' α -chimotripsina con conseguente aumento dell'assorbanza.

Procedura sperimentale

1) Preparazione delle soluzioni

-Preparazione delle soluzioni tampone

L'esperienza richiede di preparare una serie di soluzioni tampone 0,5 M in matracci tarati da 50 ml. Le soluzioni tampone dovranno avere pH compresi nell'intervallo 5,5-8,5, indicativamente dovrete realizzare soluzioni tampone con i seguenti pH: 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5. Avrete a disposizione KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaOH. Queste soluzioni concentrate dovranno poi essere diluite per ottenere le soluzioni di lavoro che saranno 0,05 M. Nel caso degli esperimenti di effetto isotopico la diluizione dovrà essere condotta in D_2O .

-Preparazione della soluzione di substrato

Sarà necessario preparare una soluzione 5 mM di *trans*-cinnamoil imidazolo (MM 198,22) in acetonitrile (circa 2 ml).

-Preparazione delle soluzioni di enzima

Per ogni pH analizzato preparerete una soluzione concentrata (1,5 mM) di enzima (MM 25000) in 400 μl di tampone 0,05 M. La soluzione dovrà essere preparata poco prima dell'uso. AVVERTENZA: nella preparazione della soluzione dell'enzima è necessario agitare molto debolmente per evitare la formazione di schiuma.

-Soluzione di proflavina

Troverete già preparata una soluzione di proflavina 0,85 mM in acqua.

2) Esperimenti cinetici

Per ogni esperimento cinetico dovrete introdurre 800 μl di soluzione tampone 0,05 M al pH opportuno e 20 μl di soluzione di proflavina in due celle per spettrofotometria. Nella cella che userete per la misura introdurrete 60 μl di soluzione di enzima, nella cella che costituirà il riferimento introdurrete invece altri 60 μl di soluzione tampone. La lunghezza d'onda dovrà essere impostata a 465 nm e lo spettrofotometro azzerato. La reazione viene iniziata introducendo nella cella di misura la soluzione di substrato; il volume di soluzione da utilizzare deve essere tale che il substrato sia in concentrazione equimolare con l'enzima. AVVERTENZA: prima introdurrete il substrato nella cella di riferimento, e inserirete la cella nel portacelle. Successivamente introdurrete il substrato nella cella di misura e dopo BREVE agitazione verificando che NON SI FORMINO bolle, inserirete la cella nel proprio vano portacelle e inizierete a registrare la cinetica. Questo processo deve essere condotto il più velocemente possibile. Dopo una iniziale diminuzione osserverete un aumento dell'assorbanza con un andamento del primo ordine. Un esempio tipico è quello riportato in figura 2A.

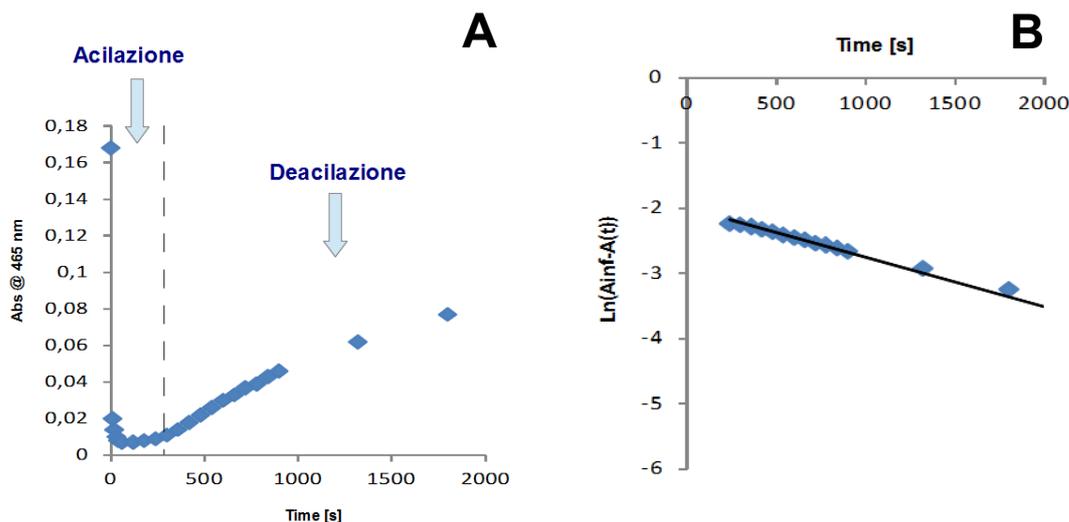


Figura 2. A: tipico andamento dell'assorbanza nel tempo. Si distinguono due fasi: la prima che porta ad una drastica diminuzione dell'assorbanza è dovuta alla formazione dell'intermedio acil-enzima; la seconda che invece porta ad un aumento dell'assorbanza con un andamento del primo ordine è dovuta all'idrolisi dell'intermedio acil-enzima. B Linearizzazione del tratto di curva che è dovuto all'idrolisi dell'intermedio acil-enzima.

Gli esperimenti di effetto isotopico potranno essere condotti a pH 7.0; 7.5; 8.0. La procedura da seguire è del tutto analoga a quella delineata nei casi precedenti. La preparazione delle soluzioni tampone di lavoro, potrà essere condotta diluendo le soluzioni stock concentrate con D_2O . Per la registrazione delle cinetiche non è necessario che la cella di riferimento contenga D_2O .

Analisi dei dati

la parte dei dati sperimentali relativa al processo di deacilazione può essere analizzata per linearizzazione ricavando la costante di velocità del processo. Infatti considerando l'equazione che descrive l'evoluzione temporale di un processo del primo ordine (1), è possibile ottenere l'equazione (2) che è l'equazione di una retta con pendenza $-k_{obs}$ ed intercetta $\ln(A_{\infty})$ (figura 2B).

$$A(t) = A_{\infty} (1 - e^{-k_{obs} t}) \quad (1)$$

$$\ln(A_{\infty} - A(t)) = -k_{obs} t - \ln(A_{\infty}) \quad (2)$$

Ogni gruppo riporterà il dato ottenuto in una tabella predisposta in laboratorio in modo che tutti possano prenderne nota e costruire il grafico di reattività (k_{obs}) in funzione del pH.

Bibliografia

Kantrowitz, E. R.; Eisele, G. J. *Chem. Educ.* **1975**, *52*, 410.

2. Studio dell'equilibrio di complessazione proflavina- α -chimotripsina

Considerazioni generali

La formazione del complesso proflavina- α -chimotripsina è sfruttata per la determinazione della velocità di idrolisi dell'acil-enzima; questo è possibile perché con la formazione dell'acil-enzima la proflavina viene scalzata dal sito attivo mentre dopo l'idrolisi la proflavina si lega nuovamente al sito attivo, Figura 1. Come avete visto nella prima parte dell'esperienza, questo complesso è colorato in giallo con un massimo di assorbimento a 465 nm mentre la proflavina libera presenta un massimo di assorbimento a 444 nm. E' questo spostamento delle lunghezze d'onda di massimo assorbimento che consente di monitorare la formazione del complesso mano a mano che l'acil-enzima (non lega la proflavina) viene idrolizzato ed il sito attivo viene riportato al suo stato iniziale (lega la proflavina). Nella prima parte dell'esperienza abbiamo tacitamente assunto che il complesso enzima-proflavina sia un complesso 1:1, in questa parte dell'esperienza verificherete che questo è effettivamente il caso e determinerete la costante di equilibrio che regola il processo.

Un modo semplice per ottenere informazioni sulla stechiometria di complessazione deriva dall'applicazione del metodo delle variazioni continue. Questo approccio richiede di misurare una proprietà del complesso per una serie di soluzioni che contengano concentrazioni variabili delle specie che entrano nella sua formazione mentre la loro concentrazione totale è mantenuta fissa. La proprietà che viene misurata deve essere direttamente proporzionale alla concentrazione del complesso come, ad esempio, l'assorbanza.

Consideriamo l'equilibrio di complessazione definito dall'equazione (3):



per applicare il metodo delle variazioni continue è necessario preparare una serie di soluzioni in cui le concentrazioni C_A e C_B vengono variate ma $C_A + C_B = C$ rimane costante. In questo modo la frazione molare X_A (o X_B) può essere variata nell'intervallo $[0,1]$ senza introdurre effetti di diluizione. Si può dimostrare che il valore massimo della proprietà osservata (ad esempio assorbimento) è raggiunto per la soluzione che contiene le specie A e B nel corretto rapporto stechiometrico. Riportando in un grafico i valori di questa proprietà in funzione della frazione molare di X_A (o X_B), si ottiene una curva a campana (Job plot) il cui massimo corrisponde alla frazione di A (o B) nel complesso, Figura 3.

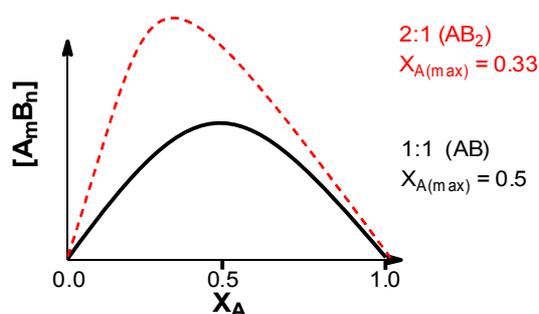


Figura 3. Tipici Job plot per una stechiometria di complessazione 1:1 (curva nera) e 2:1 (curva rossa). Il massimo della curva, riportata in funzione della frazione molare della specie A, si osserva per la frazione molare di A nel complesso.

Una volta determinata la composizione del complesso, si può procedere con la determinazione della costante di complessazione mediante interpolazione dei dati della titolazione. Il metodo che userete per la determinazione della costante di equilibrio richiede la costruzione di una curva di titolazione. In generale le curve di titolazione possono essere costruite aggiungendo una soluzione concentrata del titolante ad una soluzione della specie titolata e monitorando la variazione di assorbanza imputabile alla formazione del complesso. Con questo metodo è inevitabile introdurre una diluizione mano a mano che la titolazione procede, e per minimizzare questo effetto è necessario usare una soluzione concentrata di specie titolante. Alternativamente, è possibile preparare una serie di soluzioni in cui la specie titolata viene mantenuta a concentrazione costante e viene gradualmente aumentata la concentrazione del titolante mentre il volume totale delle soluzioni viene mantenuto costante. In questo caso non si osservano effetti di diluizione e non è necessario utilizzare soluzioni molto concentrate del titolante. Per la costruzione della curva di titolazione della proflavina con l'enzima utilizzeremo questo secondo approccio, la formazione del complesso sarà monitorata a 465 nm. Nel ramo di riferimento dello spettrofotometro dovrete porre una soluzione contenente solamente proflavina alla concentrazione utilizzata per la titolazione in questo modo l'assorbanza letta sarà imputabile solamente alla presenza del complesso.

Procedure sperimentali

A) Determinazione della stechiometria del complesso.

1) Preparazione delle soluzioni

-Preparazione della soluzione tampone

L'esperienza richiede la preparazione di una soluzione di tampone fosfato 0.5 M a pH 7.5 in un matraccio tarato da 50 ml, avrete a disposizione KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaOH. Questa soluzione dovrà poi essere diluita alla concentrazione finale 0.05 M.

-Preparazione della soluzione di enzima

Preparerete una soluzione concentrata (0.75 mM) di enzima (MM 25000) in 1.2 ml di tampone 0.05 M pH 7.5. La soluzione dovrà essere preparata poco prima dell'uso. **AVVERTENZA:** nella preparazione della soluzione dell'enzima è necessario agitare molto debolmente per evitare la formazione di schiuma.

-Soluzione di proflavina

Troverete già preparata una soluzione di proflavina 0.85 mM in tampone fosfato 0.05 M pH 7.5; questa soluzione dovrà essere diluita con tampone fosfato 0.05 M fino ad ottenere una concentrazione finale di proflavina uguale 0.43 mM (diluizione 1:2).

2) Esperimenti spettrofotometrici

Dovrete preparare 11 soluzioni contenenti proflavina ed enzima a diverse concentrazioni in modo tale da coprire in modo il più possibile omogeneo l'intervallo di frazioni molarie [0,1]. La concentrazione totale delle specie deve essere 0.1 mM ($C_{enzima} + C_{proflavina} = 0,1$ mM).

In aggiunta dovete preparare 11 diverse soluzioni contenenti solo proflavina da usare come riferimento, in questo modo avrete 11 coppie di soluzioni, ciascuna coppia conterà di una soluzione contenete enzima e proflavina ed un'altra soluzione contenente proflavina alla stessa concentrazione. Le soluzioni devono essere preparate direttamente in celle per spettrofotometria. Il volume totale di soluzione deve essere 820 μ l.

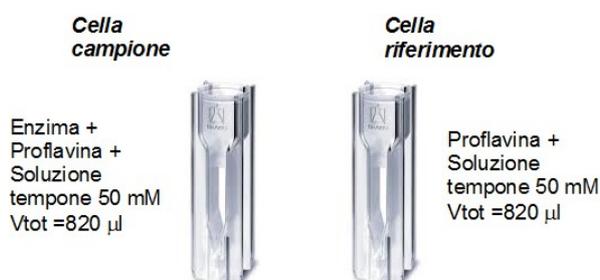


Figura 4. Modalità di preparazione delle soluzioni per la costruzione del Job plot che permette la determinazione della stechiometria del complesso enzima-proflavina.

Tabella 1. Composizione delle soluzioni da utilizzare per la costruzione del Job plot (ramo di misura) che permette la determinazione della stechiometria del complesso enzima-proflavina. Le soluzioni da porre sul ramo di riferimento devono contenere la stessa quantità di proflavina ma senza enzima.

Campione	V Enzima (μ L)	V Proflavina (μ L)	V Tampone (μ L)	[Enzima] (mM)	[Proflavina] (mM)	X Enzima	X Proflavina
0	0,0	190,7	629,3	0	0,1	0	1
1	10,9	171,6	637,4	0,01	0,09	0,1	0,9
2	21,9	152,6	645,6	0,02	0,08	0,2	0,8
3	32,8	133,5	653,7	0,03	0,07	0,3	0,7
4	43,7	114,4	661,8	0,04	0,06	0,4	0,6
5	54,7	95,3	670,0	0,05	0,05	0,5	0,5
6	65,6	76,3	678,1	0,06	0,04	0,6	0,4
7	76,5	57,2	686,3	0,07	0,03	0,7	0,3
8	87,5	38,1	694,4	0,08	0,02	0,8	0,2
9	98,4	19,1	702,5	0,09	0,01	0,9	0,1
10	109,3	0,0	710,7	0,1	0	1	0

Di ciascun campione dovete registrare l'assorbanza a 465 nm, avendo cura porre la cella campione sul ramo di misura e la cella di riferimento nel ramo di riferimento.

Analisi dei dati

Con i dati di assorbanza così ottenuti costruirete il Job plot e dalla posizione del massimo della curva determinerete la stechiometria di formazione del complesso. Un esempio tipico è quello riportato in Figura 5.

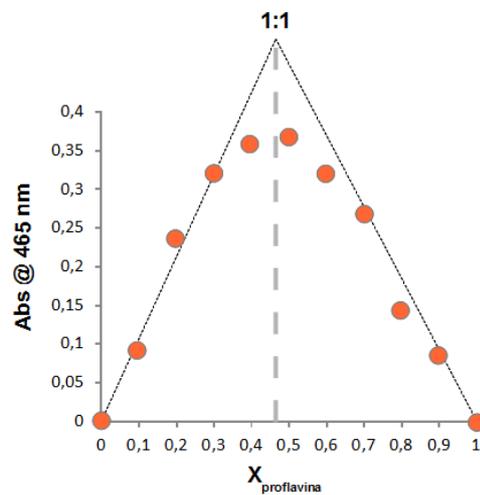


Figura 5. Job plot per la formazione del complesso enzima-proflavina in soluzione di tampone fosfato 50 mM pH 7,5.

La posizione del massimo della curva può essere determinato con maggior facilità se si tracciano le tangenti ai due rami discendenti. Il punto di intersezione delle tangenti indica la posizione del massimo.

B) Determinazione della costante di formazione del complesso enzima-proflavina

Per la costruzione della curva di titolazione preparerete 11 soluzioni direttamente in celle per spettrofotometria. Ciascuna di queste soluzioni conterrà proflavina alla concentrazione 16.7 μM , mentre la concentrazione di enzima sarà variata gradualmente nell'intervallo 0 – 0.3 mM, la modalità di preparazione delle soluzioni è schematizzata in Figura 5.



Figura 5. Modalità di preparazione delle soluzioni per la costruzione della curva di titolazione da cui determinare la costante di legame della proflavina per l' α -chimotripsina.

Per la preparazione delle soluzioni utilizzerete una soluzione madre di proflavina 0.85 mM in tampone fosfato 0.05 mM ed una soluzione madre 1.0 mM di enzima, il volume finale delle soluzioni dovrà essere 800 μl e come complemento a 800 μl utilizzerete il tampone fosfato 0.05 M pH 7.5. I valori delle concentrazioni di enzima e i volumi delle soluzioni di enzima e proflavina che dovrete usare sono riportati in Tabella 2. Come riferimento (ramo di riferimento) utilizzerete soluzioni di proflavina alle stesse concentrazioni utilizzate per la preparazione delle soluzioni contenenti anche l'enzima.

Tabella 2. Concentrazioni di enzima che è necessario realizzare in cella per la titolazione della proflavina 16.7 μM . In tabella sono anche riportati i volumi di soluzione madre di enzima 1 mM, proflavina 0.85 mM e tampone fosfato 50 mM pH 7.5 che è necessario utilizzare per la preparazione delle soluzioni.

Campione	[Enzima], M	V Enzima (μl)	V Proflavina (μl)	V Tampone (μl)
0	0	0,00	16	784,00
1	1,00E-05	8,00	16	776,00
2	2,00E-05	16,00	16	768,00
3	3,00E-05	24,00	16	760,00
4	5,00E-05	40,00	16	744,00
5	7,00E-05	56,00	16	728,00
6	8,00E-05	64,00	16	720,00
7	1,00E-04	80,00	16	704,00
8	1,50E-04	120,00	16	664,00
9	2,00E-04	160,00	16	624,00
10	3,00E-04	240,00	16	544,00

1) Preparazione delle soluzioni

-Preparazione della soluzione tampone

L'esperienza richiede la preparazione di una soluzione di tampone fosfato 0.5 M a pH 7.5 in un matraccio tarato da 50 ml, avrete a disposizione KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaOH. Questa soluzione dovrà poi essere diluita alla concentrazione finale 0.05 M.

-Preparazione della soluzione di enzima

Preparerete una soluzione concentrata (1.0 mM) di enzima (MM 25000) in 1.2 ml di tampone 0.05 M. La soluzione dovrà essere preparata poco prima dell'uso. AVVERTENZA: nella preparazione della soluzione dell'enzima è necessario agitare molto debolmente per evitare la formazione di schiuma.

-Soluzione di proflavina

Troverete già preparata una soluzione di proflavina 0.85 mM in tampone fosfato 0.05 M pH 7.5.

Titolazione

Per la titolazione dovrete preparare 11 soluzioni in 11 celle per spettrofotometria. In ciascuna cella introdurrete 16 μl di soluzione di proflavina e volumi crescenti della soluzione di enzima, il complemento sarà costituito da tampone fosfato 50 mM, il volume finale in cella dovrà essere 800 μl (assumendo i volumi additivi). I valori dei volumi delle due soluzioni da usare sono riportati in Tabella 2. Per ciascuna coppia di soluzioni, registrerete l'assorbanza a 465 nm, riportando in grafico l'assorbanza in funzione della concentrazione di enzima otterrete un andamento simile a quella riportata in Figura 6.

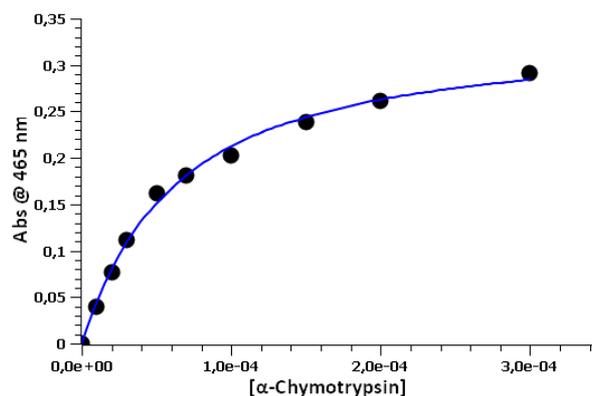


Figura 6. esempio di curva di titolazione della proflavina 16.7 mM con concentrazioni crescenti di enzima e relativa interpolazione con SciDAVis.

Analisi dei dati

L'analisi consta della interpolazione dei punti sperimentali con un modello che descrive il binding 1:1 e potrà essere effettuata con un programma che avrete a disposizione in laboratorio. Per il fitting occorre definire la relazione funzionale che lega la concentrazione di complesso alla concentrazione totale di enzima ed alla concentrazione totale di proflavina. Per trovare questa relazione funzionale dovrete far ricorso alla definizione di costante di equilibrio per questo processo.



Dove [AB] rappresenta la concentrazione di equilibrio del complesso, ciò che misurate, C_A rappresenta la concentrazione totale di enzima, che è la concentrazione del titolante, e C_B rappresenta la concentrazione iniziale di proflavina. Risolvendo per [AB] otterrete la relazione funzionale $[AB] = f(C_A, [K_{eq}, C_B, \epsilon])$ che deve essere impostata per l'interpolazione dei dati sperimentali. Il fitting dei dati sperimentali richiederà di impostare alcuni parametri noti, come ad esempio C_B , mentre altri parametri come K_{eq} , saranno determinati nel processo di interpolazione. Naturalmente, poiché il vostro dato sperimentale è l'assorbanza, la concentrazione [AB] dovrà essere moltiplicata per il coefficiente di estinzione molare del complesso (che non conoscete) e sarà anch'esso determinato dal fitting.