



УДК 577.156.41.02

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АКРИФЛАВИНА С ПЕПСИНОМ

*Антонов В. К., Дьяков В. Л.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Спектрофотометрическим и спектрофлуориметрическим методами изучено взаимодействие пепсина с акрифлавином. Сделан вывод о существовании у фермента двух участков связывания красителя, один из которых расположен в активном центре фермента. При взаимодействии красителя с участком связывания, расположенным вне активного центра фермента, наблюдается тушение флуоресценции акрифлавина, а также смещение максимума поглощения красителя в длинноволновую область.

В настоящее время достаточно широкое применение нашел метод исследования белков, в основе которого лежит их способность взаимодействовать с красителями [1]. При комплексообразовании красителя с активным центром фермента в молекулу белка фактически включается «репортерная группа», спектральные свойства которой позволяют следить за изменением в структуре активного центра при изменении внешних условий или при взаимодействии фермента с субстратом или ингибитором [2]. Так, акридиновый краситель, профлавин, был использован при выяснении механизма гидролиза под действием ряда протеолитических ферментов [3—5].

В данной работе этот метод использован для изучения пепсина. Одно из главных требований, которому должен отвечать используемый краситель, заключается в том, что комплексообразование фермента с красителем должно приводить к заметному изменению спектра поглощения последнего. В связи с этим нами была исследована эффективность взаимодействия с пепсином следующих красителей акридинового ряда: акридинового оранжевого, эдхризина, ауофосфин, ауофосфин В, акрифлавин, атэбрин и 4-аминоакридин. Для каждого красителя был снят разностный спектр поглощения системы краситель — пепсин относительно свободного красителя. Четкий разностный спектр был получен при использовании эдхризина, акридинового оранжевого, ауофосфина, ауофосфина В и акрифлавина. Во всех случаях происходило смещение максимума поглощения красителя в длинноволновую область. Наибольшее значение разностной оптической плотности наблюдалось у раствора акрифлавина в присутствии пепсина, причем величина плотности зависела от используемой концентрации пепсина. На рис. 1 представлен дифференциальный спектр этого красителя в присутствии пепсина. Если разностная оптическая плотность пропорциональна концентрации комплекса пепсин — акрифлавин, то, используя метод, предложенный ранее [3] для схемы



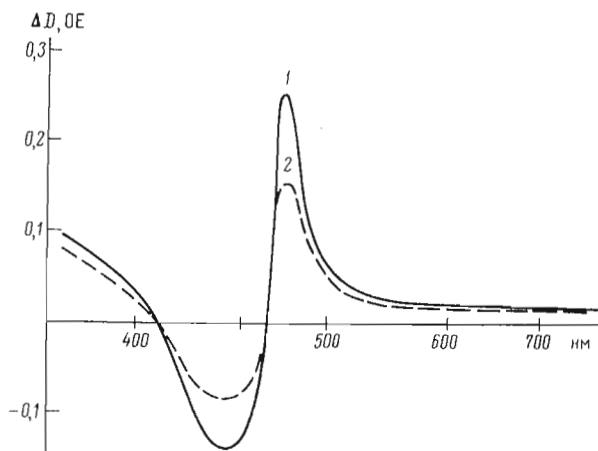


Рис. 1



Рис. 2

Рис. 1. Разностный спектр поглощения комплекса пепсина с акрифлавином относительно свободного красителя (1) и в присутствии 50 мМ хлоргидрата метилового эфира *L*-фенилаланина (2) при pH 4,05. Условия:  $[E]_0 = 2,2 \cdot 10^{-4}$  М,  $[A]_0 = 5,0 \cdot 10^{-6}$  М; 0,2 М ацетатный буфер pH 4,05, 37°,  $l = 1$  см

Рис. 2. Зависимость величины обратной разностной оптической плотности при 476 нм от обратной концентрации пепсина. Условия — см. подпись к рис. 1

получим при условии  $[E]_0 \gg [A]_0 \psi$  ( $\psi$  — доля связанного с ферментом красителя) уравнение, связывающее изменение обратной величины разностной оптической плотности с обратной величиной концентрации используемого фермента:

$$\frac{1}{\Delta D_{476}} = \frac{1}{\Delta \epsilon_{476} \cdot l [A]_0} + \frac{K_A}{\Delta \epsilon_{476} \cdot l [A]_0} \cdot \frac{1}{[E]_0}, \quad (2)$$

где  $K_A$  — константа комплексообразования,  $\Delta D_{476} = \Delta \epsilon_{476} \cdot l [AE]$  — разностная оптическая плотность, а  $\Delta \epsilon_{476}$  — разностный молярный коэффициент экстинкции комплекса фермент — акрифлавин в максимуме разностного спектра ( $\lambda$  476 нм),  $l = 1$  см. На рис. 2 в координатах  $1/\Delta D_{476}$  —  $1/[E]_0$  представлены результаты эксперимента. Из тангенса угла наклона полученной экспериментальной прямой было вычислено  $K_A = 0,5 \pm \pm 0,15$  мМ; из результатов эксперимента может быть также определена величина молярной экстинкции  $\Delta \epsilon_{476} \approx 15 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ . Близкое значение  $K_A$  ( $0,6 \pm 0,2$  мМ) было получено при условии  $[E]_0 \gg \psi [A]_0$  из зависимости  $\Delta D_{476}$  от  $[A]_0$  при использовании ранее вычисленного коэффициента молярной экстинкции комплекса фермента с красителем.

Оказалось, что добавление к комплексу пепсин — акрифлавин субстрата —  $\gamma$ -морфолинпропиламида *N*-бензилоксикарбонил-*n*-нитро-*L*-фенилаланил-*L*-фенилаланина (I) — не влияет на параметры дифференциальных спектров комплекса, вплоть до 0,75 мМ концентраций субстрата. Однако конкурентные ингибиторы пепсина — метиловый эфир *L*-фенилаланина (II) и ацетил-*DL*-фенилаланин (III) — при pH 4,05 заметно вытесняют акрифлавин из комплекса, что проявляется в снижении интенсивности пика при 476 нм (рис. 1). В этом случае уравнение (1) должно быть дополнено уравнением (3):



где  $K_i$  — константа диссоциации комплекса IE. Тогда в формуле (2) кон-

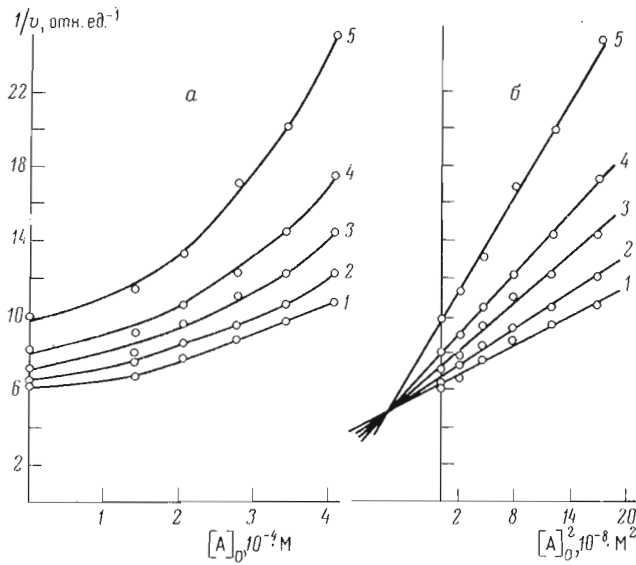


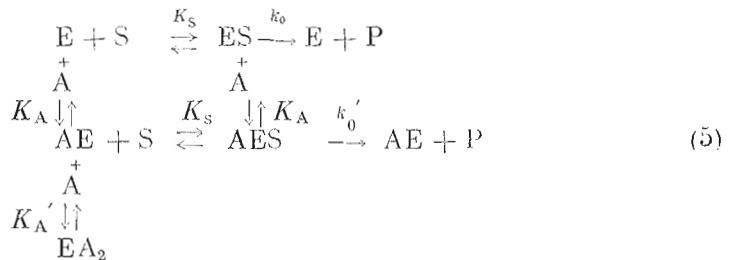
Рис. 3. Зависимость величины обратной скорости гидролиза субстрата (1) от концентрации акрифлавина: *a* —  $[A]_0$ , *б* —  $[A]_0^2$  концентрация субстрата (мМ): 1 — 1,0, 2 — 0,75, 3 — 0,5, 4 — 0,375 и 5 — 0,25;  $[E]_0 = 0,57 \cdot 10^{-6}$  М; 0,1 М ацетатный буфер (рН 4,05), 37°

станта комплексообразования красителя с ферментом будет эффективной величиной, зависящей от концентрации конкурентного ингибитора:

$$K_{A(\text{каж})} = K_A \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right). \quad (4)$$

Согласно формулам (2) и (4), величина тангенса угла наклона, полученная из экспериментальной зависимости  $1/\Delta D_{476}$  от  $1/[E]_0$ , должна линейно зависеть от концентрации конкурентного ингибитора и тогда возможна оценка величины  $K_i$ . Вычисленная из результатов эксперимента константа ингибирования для конкурентного ингибитора (II) существенно выше значения  $K_i$  для этого ингибитора, которое было получено из данных по ингибированию катализируемого пепсином гидролиза синтетических субстратов ( $K_i$  22 мМ, рН 4,0, 37° [6]) и составляет приблизительно 0,1 М. Аналогичная тенденция наблюдается также и в случае ингибитора (III) при рН 4,05 и 37°.

При изучении ингибирования акрифлавином катализируемого пепсином гидролиза субстрата (I) было обнаружено, что зависимость величины обратной скорости гидролиза от концентрации акрифлавина не линейна и носит скорее всего квадратичный характер (рис. 3). Полученные результаты удовлетворительно согласуются со следующей схемой процесса:



Поскольку экспериментальные данные, представленные в координатах Лайнуивера — Берка, дают при фиксированных концентрациях акрифлавина значения  $1/V$ , различающиеся между собой не более чем на 20% (рис. 4), то в этом случае выполняется условие  $k_0 \approx k_0'$  и схеме (5) отвечает следующее выражение для скорости реакции:

$$v = \frac{k_0 [E]_0 [S]}{K_m \left[ 1 + \frac{[A]_0^2}{K_A (K_A + [A]_0)} \right] + [S]} \quad (6)$$

или при  $K_A > [A]_0$  после преобразования:

$$\frac{1}{v} \approx \frac{1}{k_0 [E]_0} + \frac{K_m}{k_0 [E]_0 [S]} + \frac{K_m}{k_0 [E]_0 [S]} \cdot \frac{[A]_0^2}{K_A K_A'} \quad (7)$$

Таким образом, из графиков зависимости  $1/v$  от  $[A]_0^2$  при разных концентрациях субстрата по точке их пересечения можно определить произведение  $K_A \cdot K_A' \approx 6 \cdot 10^{-8} \text{ M}^2$  и, зная из данных по титрованию фермента акрифлавином величину  $K_A$ , оценить величину  $K_A' \approx 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ .

Из этих данных очевидно, что пепсин имеет два участка, связывающих акрифлавин, причем один из них совпадает с субстратсвязывающим центром. Следует отметить, что на существование второго участка связывания в молекуле пепсина, локализованного вне субстратсвязывающего центра, указывалось ранее в работах, посвященных изучению изменения интенсивности флуоресценции дансильных производных ароматических пептидов [7], а также 9—пептидиламиноакридинов [8] в присутствии пепсина.

Субстрат, связываясь в активном центре, практически не конкурирует (в испытанных концентрациях, ограниченных растворимостью компонентов системы пепсин — акрифлавин — субстрат) с акрифлавином, однако ингибиторы (II) и (III), имеющие высокую растворимость, способны связываться с обоими участками, но сродство их ко второму, неспецифическому участку ниже, чем сродство к активному центру. Очевидно, этим объясняется более высокое значение  $K_i$  для ингибитора (II), полученное при исследовании диссоциации комплекса акрифлавина — фермент. Следует отметить также, что присоединение молекулы акрифлавина в активном центре становится возможным только после того, как произойдет связывание первой молекулы красителя с неспецифическим участком связывания (вынужденный механизм, схема (5)), поскольку альтернативный путь неупорядоченного присоединения двух молекул красителя к молекуле фермента не приводит к квадратичной зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации акрифлавина. Такая квадратичная зависимость может проявиться, если предположить, что с активным центром фермента взаимодействует димерный комплекс акрифлавина,

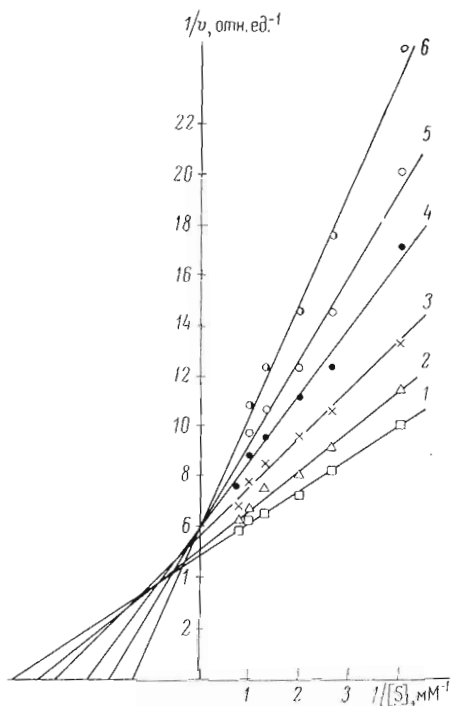


Рис. 4. Зависимость скорости гидролиза субстрата (1) под действием пепсина от концентрации субстрата в двойных обратных координатах; концентрация акрифлавина (M): 1 — 0, 2 —  $1,4 \cdot 10^{-4}$ , 3 —  $2,1 \cdot 10^{-4}$ , 4 —  $2,77 \cdot 10^{-4}$ , 5 —  $3,4 \cdot 10^{-4}$  и 6 —  $4,07 \cdot 10^{-4}$ ;  $[E]_0 = 0,57 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ , pH 4,05, 37°

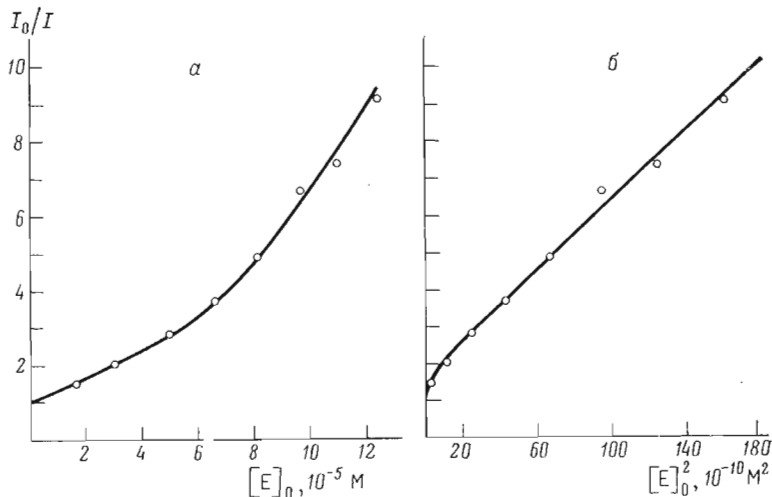


Рис. 5. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции (504 нм) раствора акрифлавина от концентрации фермента: а —  $[E]_0$ , б —  $[E]_0^2$ . Условия:  $5 \cdot 10^{-6}$  М акрифлавин, 0,2 М ацетатный буфер, рН 4,05, 25°.  $I_0$  — интенсивность флуоресценции свободного раствора акрифлавина,  $I$  — в присутствии пепсина

однако это предположение не согласуется с приведенными выше данными спектрофотометрического изучения реакции фермент — краситель и ингибирования красителем катализируемого пепсином гидролиза.

Приведенная выше схема подтверждается исследованиями флуоресценции комплексов акрифлавина с пепсином. Акрифлавин дает максимум флуоресценции при 502—504 нм при возбуждении светом с  $\lambda$  290 нм. При добавлении пепсина интенсивность флуоресценции заметно уменьшается, что вызвано, вероятнее всего, комплексообразованием красителя с ферментом, которое гасит флуоресценцию красителя. Тушение флуоресценции акрифлавина пепсином при условии  $[E]_0 \gg \psi [A]_0$  сложным образом зависит от концентрации фермента (рис. 5, а); эта зависимость может быть удовлетворительно представлена в линейном виде в координатах  $I_0/I \div [E]_0^2$  (рис. 5, б). Процесс тушения флуоресценции акрифлавина пепсином может быть представлен следующей схемой, которая не противоречит полученным данным



и отвечающим ей уравнением

$$I_0/I = 1 + \frac{[E]_0}{K_A} + \frac{[E]_0^2}{KK_A} \quad (9)$$

Для отдельного определения констант  $K$  и  $K_A$  удобно пользоваться формулой, полученной после элементарного преобразования уравнения (9):

$$\frac{I_0/I - 1}{[E]_0} = \frac{1}{K_A} + \frac{[E]_0}{KK_A} \quad (10)$$

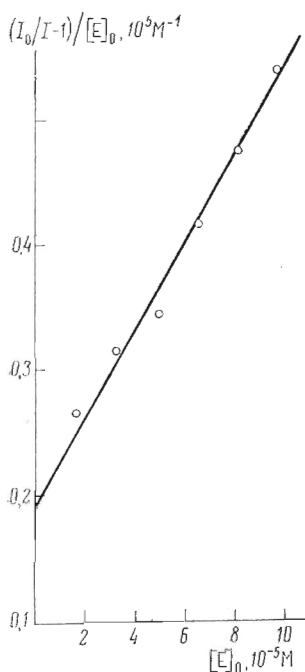


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость  $(I_0/I - 1)/[E]_0$  от концентрации пепсина. Условия — см. рис. 5

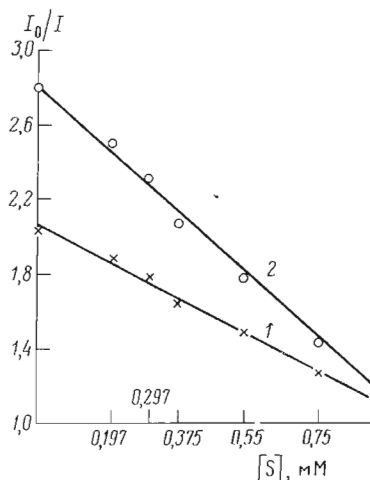


Рис. 7

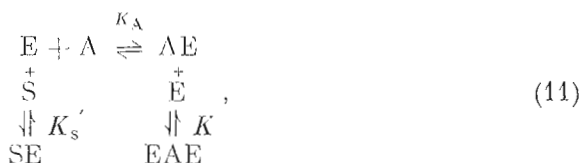
Рис. 7. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции от концентрации субстрата при фиксированных концентрациях пепсина: 1 —  $3,4 \cdot 10^{-5}$  М; 2 —  $5,0 \cdot 10^{-5}$  М;  $[A]_0 = 5,0 \cdot 10^{-6}$  М; 0,2 М ацетатный буфер рН 4,05, 25°

На рис. 6 экспериментальные данные представлены в координатах  $(I_0/I - 1)/[E]_0 \div [E]_0$ . Из тангенса угла наклона и величины отрезка, отсекаемого полученной прямой на оси ординат, вычислено  $K_A \approx 5,3 \cdot 10^{-5}$  и  $K \approx 5,4 \cdot 10^{-5}$  М. Как следует из этих величин, константы комплексообразования, определенные на основании спектроскопических и спектрофлуориметрических данных, отличаются приблизительно на порядок. Результаты специального спектроскопического исследования связывания акрифлавина пепсином при разных температурах показали, что такое существенное различие в константах не может быть объяснено различием в температурах, при которых проводили эксперименты (25° — спектрофлуориметрические измерения, 37° — разностная спектроскопия). Вероятнее всего тушение флуоресценции возможно непосредственно на поверхности участка сорбции, за которым следует небольшой конформационный переход в молекуле пепсина, вызывающий уже сдвиг максимума поглощения красителя.

Оказалось далее, что ингибитор пепсина пепстатин ( $K_i \approx 10^{-8}$  М, рН 2) не изменяет флуоресценцию системы пепсин — акрифлавин при добавлении в эквимолекулярном соотношении по отношению к пепсину (условия эксперимента — см. рис. 5,  $[E]_0 = 3,4 \cdot 10^{-5}$  М). Следовательно, тушение флуоресценции акрифлавина происходит не за счет взаимодействия его с активным центром фермента, а за счет взаимодействия со вторым связывающим центром, обнаруженным спектрофотометрически, или с каким-то иным участком молекулы фермента.

Правильность этого вывода была подтверждена экспериментальными данными тушения флуоресценции пепсином при разных концентрациях субстрата (I). Опыты проводили в условиях, при которых  $[E]_0 \gg \psi[A]_0$ .

В контрольных опытах был установлен факт тушения флуоресценции акрифлавина в присутствии субстрата. Поэтому при условии  $[S]_0 \gg \gg [ES]$  ( $ES$  — комплекс Михаэлиса) после добавления фермента в раствор, содержащий акрифлавин и субстрат, сразу же измеряли интенсивность флуоресценции красителя в системе. В этих условиях тушение флуоресценции акрифлавина в результате изменения концентрации субстрата за счет комплексообразования с активным центром фермента и гидролиза было незначительным. Измерения интенсивности флуоресценции в зависимости от концентрации субстрата при различных фиксированных концентрациях пепсина дает серию прямых с различным наклоном (рис. 7), т. е. субстрат частично вытесняет краситель из комплекса, причем в соответствии с результатами, полученными в опытах с пепстатином, происходит вытеснение тех молекул красителя, которые связываются вне активного центра. Прямые, аналогичные изображенным на рис. 7, могут быть получены также и при больших концентрациях фермента, однако интерпретация графиков в этом случае становится более трудной в связи с большой скоростью гидролиза субстрата при более высоких концентрациях фермента и в связи с нарушением условия  $[S]_0 \gg [ES]$ . Реакции, происходящие в системе фермент — краситель, могут быть описаны следующей схемой:



где  $SE$  — неспецифический (непродуктивный) комплекс фермента с субстратом. Тогда при условии  $[E]_0 \gg \psi [A]_0$  и  $K'_s \gg [S]_0$ :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + \frac{[E]_0 \left(1 - \frac{[S]}{K'_s}\right)}{K_A} + \frac{[E]_0^2 \left(1 - \frac{[S]}{K'_s}\right)^2}{KK_A} \quad (12)$$

или, так как  $K'_s \gg [S]_0$ :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + \frac{[E]_0}{K_A} + \frac{[E]_0^2}{KK_A} - \left( \frac{[E]_0}{K_A} + \frac{2[E]_0^2}{KK_A} \right) \frac{[S]}{K'_s} \quad (13)$$

При условии  $[S]_0 < K'_s$  равенства (12) и (13) следует применять с известной долей осторожности. Из равенства (13) при условии, что  $K_A$  и  $K$  известны, возможна оценка величины  $K'_s$  при фиксированных концентрациях пепсина, тогда в соответствии с результатами, приведенными на рис. 7,  $K'_s \approx 1,5$  мМ. Таким образом, второй связывающий центр также способен связывать субстрат, однако средство в этом случае значительно слабее, чем к активному центру.

### Экспериментальная часть

В работе использовали пепсин Олайнского завода химреактивов, предварительно очищенный хроматографией на DEAE-целлюлозе [9]. Удельная активность препарата, определенная по ранее описанному методу [10], равна 2800 ед/мг. Акридиновый оранжевый, эдхризин, ауофосфин, ауофосфин В, акрифлавин, атебрил и 4-аминоакридин, любезно предоставленные А. В. Зелениным (Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва), применяли без дальнейшей очистки, за исключением акрифлавина, который предварительно был перекристаллизован из метанола. Субстрат (I), ацетил-*DL*-фенилаланин и метиловый эфир *L*-фенил-

аланина получали по ранее описанным методам [11—13]. Компоненты буферного раствора — марки «ч. д. а.». В специальном опыте было проверено, что растворы акрифлавина в диапазоне использованных концентраций ( $5 \cdot 10^{-6}$  —  $5 \cdot 10^{-5}$  М) подчиняются закону Ламберта — Бэра. В области концентрации акрифлавина от  $10^{-6}$  до  $5 \cdot 10^{-6}$  М интенсивность флуоресценции акрифлавина ( $\lambda_{\text{макс}}$  502—504 нм) пропорциональна концентрации красителя. В работе были использованы самопишущий двулучевой спектрофотометр «Spectord UV VIS» (ГДР) и спектрофлуориметр «Hitachi MPF-3» (Япония).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Klotz I. M., Burkhard R. K., Urganhart J. M. (1952) J. Amer. Chem. Soc., 74, 202—208.
2. Варфоломеев С. Д., Мартинек К., Березин И. В. (1973) Молекулярн. биология, 7, 115—123.
3. Bernhard S. A., Lee V. F., Tashjian Z. H. (1966) J. Mol. Biol., 18, 405—420.
4. Мартинек К., Левашов А. В., Березин И. В. (1970) Молекулярн. биология, 4, 339—347; 517—529.
5. Varman T. E., Gutfreund H. (1966) Biochem. J., 101, 411—416.
6. Inouye K., Fruton J. S. (1968) Biochemistry, 7, 1611—1615.
7. Sachdev G. P., Brownstein A. D., Fruton J. S. (1973) J. Biol. Chem., 248, 6292—6299.
8. Sachdev G. P., Brownstein A. D., Fruton J. S. (1974) J. Biol. Chem., 249, 420—427.
9. Гинодман Л. М. (1962) в сб. Актуальные вопросы современной биохимии, т. 2, стр. 54—70, Медгиз, М.
10. Worthington Enzyme Manual (1972) p. 122, Worthington Biochemical Corporation Freehold, New Jersey, U.S.A.
11. Тиходеева А. Г., Зинченко А. А., Румш Л. Д., Автонов В. К. (1974) Докл. АН СССР, 214, 355—357.
12. Geipel H. (1959) J. pract. Chem., 9, 104—106.
13. Гринштейн Дж., Вияц М. (1965) Химия аминокислот и пептидов, стр. 425—427, «Мир», М.

Поступила в редакцию  
30.1.1975

#### INTERACTION OF THE ACRIDINE DYE-ACRIFLAVINE WITH PEPSIN

ANTONOV V. K., DYAKOV V. L.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The interaction of swine pepsin with acriflavine has been studied by spectrophotometric and spectrofluorometric methods. Complex formation of dye with the enzyme leads to the red shift of the maximum of dye absorbance. The dissociation constant of the complex have been found to be  $(0.5 \pm 0.15)$  mM ( $37^\circ$ , pH 4.05). On the basis of the acriflavine inhibition kinetics of the pepsin-catalyzed hydrolysis of N-benzylhydroxycarbonyl-p-nitro-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl- $\gamma$ -morpholinopropyl-amide (I) it has been concluded that the enzyme contains two dye-binding sites, one of them corresponding to the enzyme active site. The changes of the spectral and also luminescent properties of the dye are due to the binding of acriflavine to the second binding site which is distinct from the substrate binding loci. However, as have been found spectrofluorometrically this second binding site can bind the substrate (I) with very low efficiency.