



УДК 577.153.024

## АКТИВАЦИЯ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ ДЕТЕРГЕНТАМИ

Дьяков В. Л., Мишин А. А., Антонов В. Б.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Установлено, что додецилсульфат натрия активирует катализируемый панкреатической липазой гидролиз водорастворимых субстратов — *n*-нитрофениловых эфиров уксусной и капроновой кислот. Активация сопровождается изменением интенсивности флуоресценции остатков триптофана в белке. Фермент, модифицированный диэтил-*n*-нитрофенилфосфатом, не активируется детергентом. Действие детергента является удобной моделью для исследования механизма активации липолиза на границе раздела фаз.

Липолитические ферменты отличаются способностью активироваться на поверхности раздела фаз [1]. Механизм этого явления остается малоизученным. Существует предположение [2], что активация панкреатической липазы (КФ 3.1.1.3) обусловлена конформационными изменениями, происходящими при связывании ее на поверхности липидной капли. Трудность исследования этого вопроса связана с ограниченной применимостью физико-химических методов к гетерогенным системам.

Ранее [3] мы показали, что панкреатическая липаза активируется в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС). В настоящей работе приводятся результаты подробного изучения этого явления с целью выяснения сходства и различия процессов активации детергентом и на границе раздела фаз.

Активация панкреатической липазы поверхностью может быть продемонстрирована на зависимости удельной активности фермента по гидролизу водорастворимых неспецифических субстратов *n*-нитрофенилацетата или *n*-нитрофенилкапроната от концентрации липазы. При понижении концентрации фермента наблюдалось существенное возрастание (рис. 1, 2) его удельной активности, что, по-видимому, связано с активирующим действием стенок кюветы спектрофотометра, поскольку в присутствии избытка силиконизированных стеклянных шариков [4] удельная активность не зависит от концентрации фермента. Оказалось, что и в присутствии ДДС, взятого в концентрации, существенно меньшей, чем концентрация мицеллообразования ( $K_{CM}=8,1$  мМ), удельная активность не зависит от концентрации фермента (рис. 1, 1) и близка к активности липазы, «заактивированной» введенным силиконизированных шариков. Таким образом, истинные растворы ДДС проявляют эффект активации, аналогичный эффекту поверхностной активации.

Такая же аналогия обнаруживается и при рассмотрении взаимодействия липазы с диэтил-*n*-нитрофенилфосфатом (ингибитор «Е-600»). Известно [5, 6], что липаза эффективно ингибируется в присутствии эмульсии

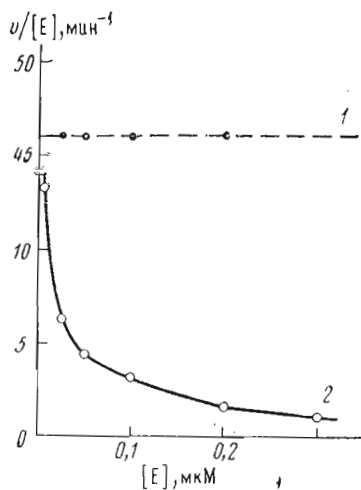


Рис. 1

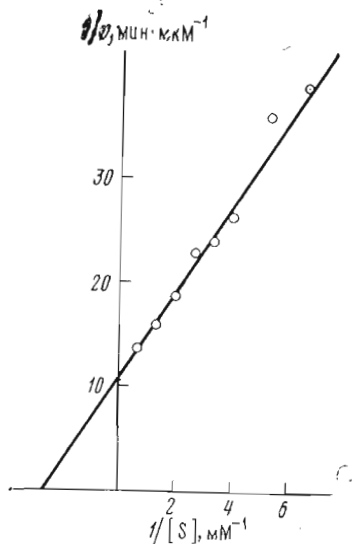


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость активности липазы по отношению к *n*-нитрофенилацетату (3 мМ) от ее концентрации в присутствии (1) и в отсутствие (2) ДДС (0,4 мМ)

Рис. 2. Гидролиз *n*-нитрофенилацетата липазой (0,5 мкМ), модифицированной диэтил-*n*-нитрофенилфосфатом, при разных концентрациях субстрата

Рис. 3. Зависимость скорости ферментативного гидролиза *n*-нитрофенилацетата (1) и интенсивности флуоресценции I (2) от концентрации ДДС. Концентрация фермента 0,05 (1), 1 мкМ (2)

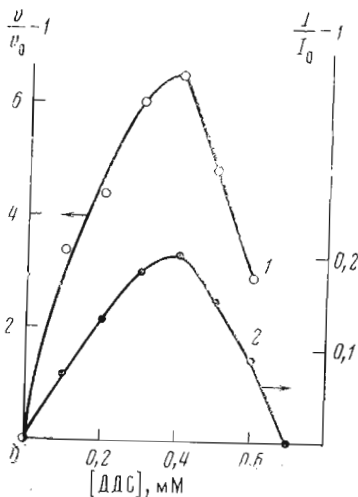


Рис. 3

ингибитора или солей желчных кислот, причем фермент теряет активность в отношении мицеллярных субстратов (например, трибутирина), но сохраняет ее в отношении водорастворимых субстратов. С истинным раствором ингибитора (в отсутствие поверхности раздела фаз) фермент не реагирует. Нами было показано, что введение в реакционную смесь ДДС в концентрации 0,4 мМ оказывает такое же влияние на скорость и полную ингибирование липазы, как и введение поверхности раздела фаз. Препарат ингибированного фермента, полученный по этой методике, гидролизует *n*-нитрофенилацетат с константами  $k_{кат}$  0,18 мин<sup>-1</sup> и  $K_m$  0,36 мМ (рис. 2) и не гидролизует *n*-нитрофенилкапроат и мицеллярные субстраты, т. е. не отличается по каталитическим свойствам от липазы, модифицированной в стандартных условиях [5].

Полученный препарат фермента, модифицированного диэтил-*n*-нитрофенилфосфатом, не активируется в отношении гидролиза *n*-нитрофенилацетата ни гидрофобными поверхностями, ни ДДС, т. е. блокирование в ферменте «центра активации поверхностью» [7] ликвидирует также способность его к активации детергентом.

Все это свидетельствует о сходстве механизмов активации липазы в присутствии ДДС и на поверхности раздела фаз. Но поскольку эффект ДДС проявляется в области его концентраций, соответствующих истинным растворам, возникает возможность беспрепятственно использовать физико-химические (например, оптические) методы для исследования процесса активации липазы.

Пример практического использования этого подхода представлен на рис. 3, демонстрирующем влияние ДДС на каталитические свойства панкреатической липазы и на интенсивность флуоресценции остатков триптофана в ее молекуле. Видно, что характер получаемых зависимостей одинаков, причем максимумы изменения флуоресценции и увеличения активности совпадают (0,4 мМ). Понижение как активности, так и флуоресценции при дальнейшем повышении концентрации детергента носит обратимый характер и обусловлено ингибирующим воздействием ДДС на ферментативную активность.

Еще одним аргументом в пользу того, что ДДС взаимодействует с «центром активации поверхностью», может служить тот факт, что в присутствии ДДС вплоть до концентрации 1 мМ параметры флуоресценции липазы, модифицированной диэтил-*n*-нитрофенилфосфатом, практически не изменяются (увеличение интенсивности флуоресценции не превышает 1,5–2%).

Полученные нами данные открывают перспективы детального изучения конформационных изменений, сопровождающих активацию панкреатической липазы поверхностью раздела фаз.

### Экспериментальная часть

В работе использовали трис (ч) отечественного производства, дважды перекристаллизованный из смеси этанол — вода (в присутствии активированного угля), ДДС (Serva, ФРГ), диэтил-*n*-нитрофенилфосфат (Sigma, ФРГ).

Методы получения и характеристика *n*-нитрофениловых эфиров уксусной и капроновой кислот представлены в работе [3].

Препарат панкреатической липазы (смесь изоферментов  $L_A$  и  $L_B$ , не различающихся по каталитическим свойствам) получали по методике Дэшоуэля и сотр. [8]. Полученный препарат был гомогенен (по данным электрофореза в полиакриламидном геле) и имел активность, соответствующую литературным данным [8]. Запасной раствор фермента (0,4 М NaCl, 0,02%  $NaN_3$ , концентрация белка 1 мг/мл) хранили при  $-15^\circ C$ .

Липазу, модифицированную диэтил-*n*-нитрофенилфосфатом, получали добавлением к 5 мл запасного раствора фермента 6 мкл модификатора и ДДС до концентрации 0,4 мМ. Через 24 ч инкубации при  $20^\circ C$  белок отделяли от избытка модификатора на колонке с сефадексом G-25 ( $40 \times 1,2$  см), уравновешенной раствором 0,4 М NaCl, 0,02%  $NaN_3$ .

Кинетические измерения проводились в соответствии с методикой [3] на спектрофотометре Gilford 2400-2 (США) при 400 нм и  $25^\circ C$  в 0,1 М трис-HCl-буфере (рН 7,5), содержащем 4 об.% ацетонитрила. Спонтанный гидролиз (контрольный раствор) автоматически вычитался из общей скорости гидролиза. Кинетические параметры липазы, модифицированной диэтил-*n*-нитрофенилфосфатом, определяли по методу Лайнуивера — Берка при концентрациях *n*-нитрофенилацетата 0,2–1,5 мМ (рис. 2). В остальных случаях измеряли начальную скорость реакции при постоянной концентрации субстрата: *n*-нитрофенилацетата — 3 мМ, *n*-нитрофенилового эфира капроновой кислоты — 50 мкМ.

Флуоресценцию белка измеряли в тех же условиях на однолучевом спектрофлуориметре Hitachi MPF-3 (Япония), концентрация фермента в кювете 25–50 мкг/мл, длина волны возбуждения 295 нм, эмиссии — 330–340 нм.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Брокерхоф Х., Дженсен Р. (1978) Липолитические ферменты, с. 66–69, «Мир», М.
2. Verger R., de Haas G. H. (1976) *Ann. Rev. Biophys. and Bioengng*, **5**, 77–117.
3. Нуцубидзе Н. Н., Дьяков В. Л., Ротанова Т. В., Антонов В. К. (1978) *Биооргани. химия*, **4**, 89–94.
4. Charus C., Sémériva M., Bovier-Lapierre C., Desnuelle P. (1976) *Biochemistry*, **15**, 4980–4987.
5. Charus C., Sémériva M. (1976) *Biochemistry*, **15**, 4988–4991.
6. Maylié M. F., Charles M., Desnuelle P. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **276**, 162–175.
7. Pieterse W. A., Vidal J. C., Volwerk J. J., de Haas G. H. (1974) *Biochemistry*, **13**, 1455–1460.
8. Verger R., de Haas G. H., Sarda L., Desnuelle P. (1969). *Biochim. et biophys. acta*, **188**, 272–282.

Поступила в редакцию  
9.VII.1979

## ACTIVATION OF PANCREATIC LIPASE BY DETERGENTS

DYAKOV V. L., MISHIN A. A., ANTONOV V. K.

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

It was shown that sodium dodecylsulphate activates the hydrolysis of *p*-nitrophenyl esters of acetic and caproic acids catalyzed by pancreatic lipase. The activation is accompanied by the increase in the tryptophan fluorescence of the enzyme. No detergent activation was observed for the enzyme modified with diethyl *p*-nitrophenylphosphate. The detergent action may be considered as a convenient model for studying the mechanism of interfacial activation of lipolytic enzymes.