



УДК 577.153.02

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОФЛАВИНА
С ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗОЙ*Нущубидзе Н. Н., Ротанова Т. В., Дзяков В. Л.,
Антонов В. К.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Исследовано взаимодействие профлавиона с панкреатической липазой. Показано, что комплексообразование фермента с красителем вызывает изменение спектра поглощения и спектра флуоресценции профлавиона. Кинетическим методом показано, что профлавин является ингибитором липазы, конкурентным по отношению к трибутирину и неконкурентным по отношению к *n*-нитрофенилацетату и *n*-нитрофенилкарбонату. Сделано заключение о том, что профлавин связывается с липазой не в активном центре, а в центре активации фермента, взаимодействующем с поверхностью раздела фаз.

В настоящее время можно считать установленным, что панкреатическая липаза (КФ 3.1.1.3) относится к группе серин-гистидиновых гидролаз [1]. При изучении функционирования этого фермента широко применяются методы, разработанные ранее для таких хорошо изученных ферментов, как α -химотрипсин, трипсин, субтилизин. Среди информативных методов изучения сериновых гидролаз привлекает внимание использование красителей, комплексообразование которых с ферментом приводит к заметным изменениям в спектре красителя. Так, изучение взаимодействия с α -химотрипсином красителя акридинового ряда профлавиона позволило сделать ряд заключений о механизме функционирования этого фермента [2—4]. Весьма заметное влияние на спектр профлавиона оказывает и другая сериновая протеаза — трипсин [3, 5]. Кроме того, профлавин и другой акридиновый краситель, акрифлавин, были успешно использованы при изучении представителей класса кислых гидролаз, пепсина [6] и фосфолипазы A_2 [7]. Однако метод исследования ферментов с помощью профлавиона имеет недостатки: так, для некоторых сериновых протеаз (субтилизин, эластаза) и ряда других белков (химотрипсиноген, трипсиноген, лизоцим) профлавин не нашел применения в качестве репортерной метки, поскольку в присутствии этих белков спектр красителя не изменяется [3].

Задача настоящей работы — изучение возможности применения акридиновых красителей для исследования липолитического гидролиза.

1. *Исследование влияния липазы на спектральные характеристики профлавиона.* Взаимодействие профлавиона с липазой приводит к смещению максимума поглощения красителя в длинноволновую область, причем значение разностного поглощения зависит от концентрации фермента и, очевидно, является мерой образования комплекса фермент — краситель. Дифференциальный спектр (рис. 1) раствора профлавиона, наблюдаемый

по отношению к тому же раствору красителя в присутствии фермента, имеет максимум при 470 нм и минимум при 430 нм. Состояние равновесия при комплексообразовании красителя с липазой



описывается уравнением

$$K_{Pr} = \frac{([E]_0 - [EPr]) \cdot ([Pr]_0 - [EPr])}{[EPr]}, \quad (2)$$

которое, согласно работе [4], может быть представлено в форме, допускающей спрямление:

$$\frac{1}{[E]_0 - [EPr]} = -\frac{1}{K_{Pr}} + \frac{1}{K_{Pr}} \cdot \frac{[Pr]_0}{[EPr]}. \quad (3)$$

В соответствии с этим уравнением константа диссоциации (K_{Pr}) для комплекса фермент — краситель, EPr , может быть рассчитана по тангенсу угла наклона линейной зависимости $([E]_0 - [EPr])^{-1}$ от $[Pr]_0/[EPr]$. Равновесная концентрация комплекса EPr может быть вычислена на основании закона Ламберта — Бэра:

$$\Delta\Delta D_{470-430} = \Delta\Delta\epsilon_{470-430} \cdot l \cdot [EPr], \quad (4)$$

где $\Delta\Delta D_{470-430}$ — разность поглощения дифференциального спектра в области максимума и минимума, а $\Delta\Delta\epsilon_{470-430} = \Delta\epsilon_{470} - \Delta\epsilon_{430}$ — разность молярных коэффициентов экстинкции дифференциального спектра в максимуме и минимуме, соответственно. Использование для расчетов равновесной концентрации комплекса EPr величины $\Delta\Delta D_{470-430}$ вызвано опалесценцией растворов белка и стремлением в максимальной степени снизить ошибку в определении концентрации EPr . Непосредственное определение коэффициента экстинкции $\Delta\Delta\epsilon_{470-430}$ возможно только в условиях значительного избытка фермента по отношению к красителю ($[E]_0 \gg [Pr]_0$), что экспериментально в нашем случае трудно выполнимо. Поэтому для своих расчетов мы воспользовались разностью молярных коэффициентов экстинкции в максимуме и минимуме дифференциального спектра, вычисленной из литературных данных для комплексообразования с профлавином другого представителя сериновых гидролаз, α -химотрипсина [4], и равной $\sim 22\,500$.

Экспериментальные данные, представленные в координатах уравнения (3), удовлетворительно ложатся на прямую линию (рис. 2), из тангенса угла наклона которой можно вычислить величину $K_{Pr} = 0,035$ мМ. Хорошая корреляция экспериментальных точек с линейной зависимостью также свидетельствует об оправданности выбранного коэффициента экстинкции. Данные по титрованию профлавиона липазой в присутствии 0,5 М борной кислоты, являющейся неконкурентным ингибитором этого фермента [8], практически не выпадают из зависимости, полученной в отсутствие борной кислоты (рис. 2), т. е. борная кислота не препятствует связыванию профлавиона с ферментом. Таким образом, можно сделать заключение, что борная кислота и профлавин связываются с различными участками молекулы липазы.

Близкое к указанному выше значение константы диссоциации комплекса липаза — профлавин получено спектрофлуорометрическим методом. Нами было установлено, что добавление препарата липазы к раствору красителя вызывает тушение флуоресценции последнего. Из зависимости I_0/I (где I_0 и I — интенсивность флуоресценции профлавиона в отсутствие и в присутствии липазы) от концентрации фермента (рис. 3) по формуле (5) [9]

$$\frac{I_0}{I} = 1 + \frac{[E]_0}{K_{Pr}} \quad (5)$$

вычислено значение константы диссоциации комплекса EPr , равное 0,040 мМ.

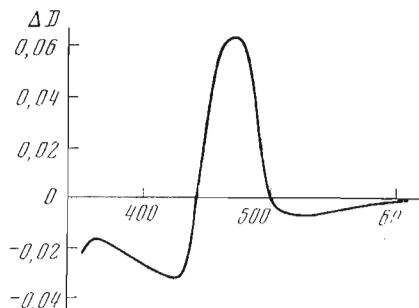


Рис. 1. Дифференциальный спектр поглощения комплекса липазы (40 мкМ) с профлавином (60 мкМ) относительно свободного красителя

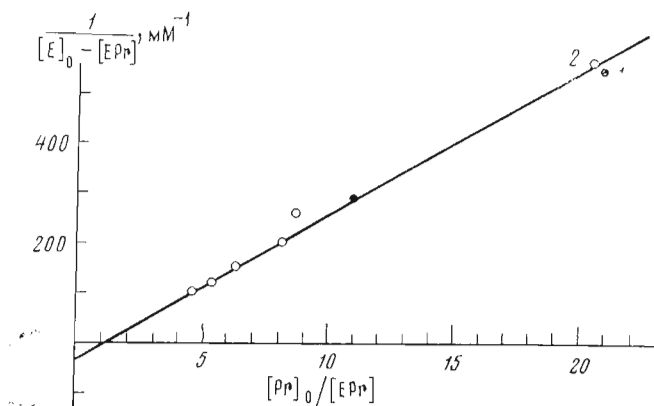


Рис. 2. Определение константы диссоциации K_{Pr} комплекса липаза — профлавин в присутствии 0,5 М H_3BO_3 (1) и без H_3BO_3 (2). $[E]_0$ 4,4–16,7 мМ, $[Pr]_0$ 3,4–5,5 мкМ

Таким образом, профлавин эффективно комплексуется с гидрофобным участком на молекуле липазы, причем этот участок пространственно удален от каталитического центра фермента, что следует из данных спектрофотометрического титрования в присутствии борной кислоты.

2. *Исследование влияния профлавина на кинетику гидролиза липазой растворимых и эмульгированных субстратов.* Мы изучили взаимодействие профлавина с липазой кинетическим методом, используя специфические триглицеридные субстраты — трибутирин (в эмульгированной форме) и триацетин (в форме истинных растворов), а также неспецифические водорастворимые субстраты — *n*-нитрофениловые эфиры уксусной и капроновой кислот.

Было показано, что профлавин ингибирует гидролиз эмульгированного триглицеридного субстрата липазы — трибутирина — по конкурентному типу (рис. 4). Полученное при этом значение константы ингибирования K_i 0,23 мМ заметно отличается от величины K_{Pr} , полученной спектральными методами (см. раздел 1).

Здесь надо отметить, что профлавин в концентрации, сравнимой с константой диссоциации K_{Pr} , оказывает весьма слабое ингибирующее влияние на липазу. Для увеличения ингибирующего эффекта нам пришлось использовать концентрации красителя, в 5–10 раз превышающие концентрацию, при которой начинается агрегирование молекул профлавина. Поэтому полученное таким образом значение константы ингибирования оказывается завышенным. Так как изучение влияния липазы на спектральные характеристики профлавина (раздел 1) проводилось в той области концентраций красителя, где практически отсутствуют ассоциирован-

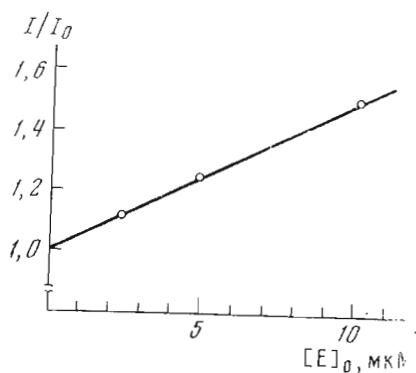


Рис. 3. Тушение флуоресценции профлавина (16,5 мМ) панкреатической липазой

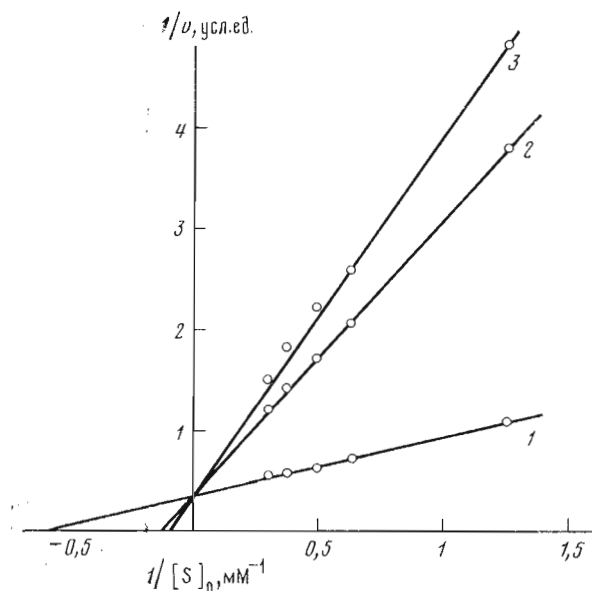


Рис. 4. Гидролиз трибутирина, катализируемый липазой (10^{-8} М) без добавок (1) и при добавлении 1,0 мМ (2) и 1,4 мМ (3) профлавина

ные формы, можно предположить, что в связывании с ферментом участвуют только мономерные частицы красителя. Тогда по данным, приведенным в работе [10], можно рассчитать содержание мономерного профлавина в использованных нами растворах. Так, при концентрациях красителя, равных 1,0 и 1,4 мМ (рис. 4), содержание мономера в растворе составляет только 19,80 и 15,64%, соответственно. При этом константа ингибирования липолиза трибутирина, вычисленная по данным рис. 4 в пересчете на мономерную концентрацию профлавина, составляет 0,042 мМ. Хорошее совпадение рассчитанной величины K_i с константой диссоциации комплекса липазы с профлавином K_{pf} подтверждает наше предположение об участии неассоциированной формы красителя в связывании с ферментом.

Интересно, что и в случае α -химотрипсина наблюдалось значительное расхождение между константами взаимодействия профлавина с ферментом, полученными кинетическим методом с использованием растворов красителя высокой концентрации [11], и по спектрофотометрическим методами [2–4].

Сравнительно недавно было показано, что липаза способна катализировать гидролиз эфирных субстратов и в отсутствие поверхности раздела фаз [12, 13]. Представлялось интересным сравнить результаты исследования взаимодействия профлавина с липазой в гетерогенной среде с аналогичными результатами, полученными в гомогенной среде. В качестве водорастворимого субстрата мы использовали *n*-нитрофениловый эфир капроновой кислоты. Неожиданным оказался тот факт, что в отношении этого субстрата профлавин проявляет свойства неконкурентного ингибитора (рис. 5). Константа ингибирования, рассчитанная по данным рис. 5 в пересчете на содержание мономера профлавина, равна 0,138 мМ. Для двух других водорастворимых субстратов липазы — *n*-нитрофенилацетата и триацетина — константы ингибирования равны 0,290 и 0,268 мМ соответственно. Таким образом, в гомогенной среде профлавин проявляет менее выраженное ингибирующее действие на липолитическую активность, чем в гетерогенной.

3. *Идентификация области связывания профлавина с липазой.* Полученные в разделе 2 результаты заключают в себе кажущееся противоречие. Действительно, из данных по ингибированию профлавином липолиза *n*-нитрофенилкапроната следует, что краситель связывается с липазой в зоне, не принадлежащей субстратсвязывающему участку ее активного центра. В то же время профлавин конкурирует с трибутирином за общее место связывания на ферменте. Однако, учитывая сложный характер взаимодействия липазы с эмульгированным субстратом, это противоречие можно разрешить. При действии липазы на эмульсию субстрата происходит сорбция фермента на капельках эмульсии (взаимодействие с «центром активации»), приводящая к увеличению ферментативной активности, а также каталитическое превращение молекулы субстрата в активном центре фермента. Оба этих центра пространственно разделены в молекуле фермента (или частично перекрываются) [1, 14, 15]. Тогда связывание профлавина в «центре активации» липазы будет вызывать торможение реакции гидролиза эмульгированного субстрата — трибутирина — по конкурентному типу, ингибирование же водорастворимого субстрата не обязано носить конкурентный характер.

Мы предприняли ряд экспериментов для подтверждения гипотезы о связывании профлавина в «центре активации» липазы. Так, мы использовали хорошо изученный нами бифункциональный конкурентный ингибитор липазы — гексилборную кислоту, связывающуюся как с каталитическим, так и с сорбционным участками активного центра липазы, но не взаимодействующую с «центром активации» [8], в опытах по двухкомпонентному ингибированию фермента. Из данных рис. 6 видно, что гексилборная кислота и профлавин выступают как взаимонезависимые ингибиторы [16] (т. е. ингибиторы, взаимодействующие с различными участками поверхности фермента) при гидролизе эмульгированного трибутирина. Аналогичные результаты были получены при изучении двухкомпонентного ингибирования липазы профлавином и этилборной кислотой.

Кроме того, нами было установлено, что введение гексилборной кислоты не влияет ни на дифференциальный спектр профлавина с ферментом, ни на спектр тушения флуоресценции красителя липазой (см. раздел 1).

Совокупность этих данных свидетельствует о том, что краситель связывается с липазой вне зоны ее активного центра. Ранее из рассмотрения ингибирующего действия борорганических кислот на липазу нами было показано, что сорбционный участок активного центра этого фермента имеет изогнутую конфигурацию и ограниченные размеры [8], поэтому естественно, что весьма объемная, хотя и обладающая высокой гидрофобностью, молекула профлавина не способна разместиться в его зоне.

Для идентификации области связывания профлавина с ферментом предпринималось также изучение взаимодействия с красителем модифицированного фермента — так называемой Е-600-липазы. В 1976 г. [14] было

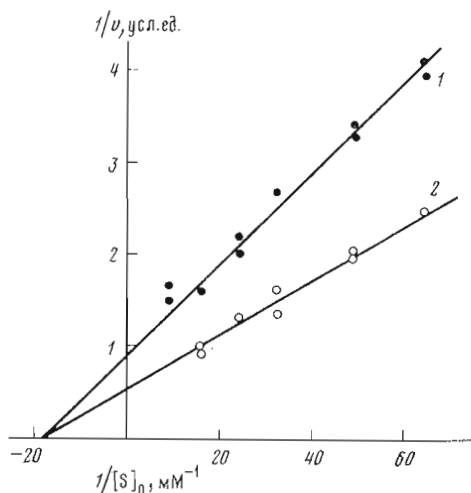


Рис. 5

Рис. 5. Гидролиз *n*-нитрофенилового эфира капроновой кислоты, катализируемый липазой (7 мкМ) в присутствии 0,15 М профлафина (1) и без него (2)

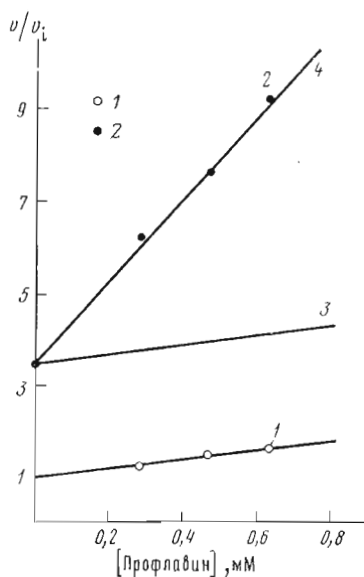


Рис. 6

Рис. 6. Ингибирование профлавином гидролиза трибутирина, катализируемого липазой (10^{-8} М), без добавок (1) и в присутствии 35,7 мкМ гексилборной кислоты (2). Прямые 3 и 4 проведены теоретически для случаев взаимозависимого и взаимонезависимого ингибирования, соответственно

показано, что модификация единственного остатка серина в молекуле липазы диэтил-*n*-нитрофенилфосфатом (Е-600) приводит к утрате ферментом способности к сорбции на поверхности раздела фаз и связанной с этим активации, однако модифицированная липаза полностью сохраняет активность по отношению к водорастворимым субстратам с короткой углеводородной цепью — *n*-нитрофенилацетату и триацетину. Мы убедились, что профлавин не ингибирует процесс гидролиза *n*-нитрофенилацетата модифицированной Е-600-липазой. Из этих данных следует, что профлавин связывается с панкреатической липазой в «центре активации» или вблизи него.

Таким образом, нами установлено:

1) профлавин взаимодействует с панкреатической липазой, и это взаимодействие приводит к изменениям в спектре поглощения красителя и в спектре его флуоресценции;

2) профлавин ингибирует липолиз эмульгированных субстратов (формально по конкурентному типу) и растворенных субстратов (по неконкурентному типу);

3) взаимодействие профлафина с липазой осуществляется не в зоне субстратсвязывающего участка активного центра фермента, а в центре его активации (или вблизи него).

Экспериментальная часть

Препарат панкреатической липазы (смесь изоферментов, не различающихся по каталитическим свойствам) получали по методике Денюэля и сотр. [17]. Характеристики фермента и критерии чистоты представлены в работе [8].

Трибутирин, $C_{15}H_{26}O_6$ (ч.), отечественного производства, очищали перегонкой в вакууме, т. кип. $190^\circ C/15$ мм рт. ст. [18]; триацетин, $C_9H_{14}O_6$ (ч.),

отечественного производства, очищали перегонкой в вакууме, т. кип. $172^{\circ}\text{C}/40\text{ мм рт. ст.}$ [18]; характеристики *n*-нитрофениловых эфиров уксусной и капроновой кислот приведены в работе [19].

Профлавин (ч.д.а., «Союзреактив») перекристаллизовывали из воды, концентрацию красителя в растворе рассчитывали по величине поглощения, исходя из значения молярного коэффициента экстинкции 33400 при 444 нм [3]; характеристики борорганических кислот приведены в работе [20].

Все остальные препараты и компоненты буферных растворов были марки х.ч. или ч.д.а.

Комплексообразование профлавина с липазой изучали при 25°C в 0,1 М трис- HCl -буфере (рН 7,5), 0,1 М NaCl , 3,3 мМ CaCl_2 . Спектрофотометрические измерения проводили на самопишущем спектрофотометре Gilford 2400-2 (США). Флуоресценцию растворов профлавина измеряли на флуориметре Hitachi MPF-3 (Япония) при $\lambda_{\text{возб}}$ 266 нм и $\lambda_{\text{эмис}}$ 518 нм.

Начальные скорости липолиза трибутирина (ТБ) и триацетина (ТАЦ) измеряли методом потенциометрического титрования образующейся в реакции кислоты на рН-стате Radiometer TTT-60, REA 160, ABU-13 (Дания). Реакции проводили в полиэтиленовой (ТБ) или стеклянной (ТАЦ) кювете. Объем реакционной смеси 2 мл. Начальные концентрации субстратов 0,8–1,25 мМ (ТБ) и 20–70 мМ (ТАЦ), фермента — 10^{-8} М (для ТБ) и 10^{-6} М (для ТАЦ), рН 7,5; 20°C , 0,1 М NaCl .

Исходную эмульсию трибутирина готовили непосредственно перед использованием путем эмульгирования рассчитанного количества ТБ в 0,2 М растворе NaCl при помощи ультразвукового генератора типа УЗДН-1 У4.2 в течение 0,5–1 мин при 44 кГц.

В кювету титратора вносили 1 мл эмульсии ТБ (или раствора ТАЦ в 0,2 М NaCl) и 1 мл воды (или соответствующего раствора профлавина в воде), доводили рН до 7,5, после чего добавляли 20–50 мкл раствора липазы. Аналогично проводили опыты по двухкомпонентному ингибированию.

Измерения начальных скоростей ферментативного гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров уксусной и капроновой кислот осуществляли спектрофотометрическим методом при 400 нм с помощью регистрирующего четырехканального спектрофотометра Gilford 2400-2 (США) на шкале 0,1 ОЕ. В четыре кварцевые кюветы (11 см) вносили по 1,7 мл 0,1 М трис- HCl -буфера (рН 7,5), добавляли по 0,2 мл раствора профлавина в воде, инкубировали 5–10 мин (25°C), прибавляли по 80 мкл исходного раствора субстрата в ацетонитриле, затем вносили в первую кювету (контрольный раствор) 20 мкл буфера, а в остальные — по 20 мкл раствора липазы в том же буфере. Спонтанный гидролиз (контрольный раствор) автоматически вычитался из общей скорости гидролиза, наблюдаемой в трех остальных кюветах.

Точность определения величин констант ингибирования составляет около 20%.

Авторы выражают благодарность Л. М. Гинопдану за полезное обсуждение результатов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. К., Гинопдан Л. М., Ротанова Т. В., Нуцубидзе Н. Н. (1978) Биоорганическая химия, 4, 276–277.
2. Bernhard S. A., Lee B. F., Tashjian Z. H. (1966) J. Mol. Biol., 18, 405–420.
3. Glazer A. N. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54, 171–176.
4. Мартынек К., Левашов А. В., Березин И. В. (1970) Молекулярная биология, 4, 339–347, 517–529.
5. Bernhard S. A., Gutfreund H. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53, 1238–1243.
6. Антонов В. К., Дьяков В. Л. (1975) Биоорганическая химия, 1, 1324–1331.
7. Желковский А. М., Дьяков В. Л., Антонов В. К. (1978) Биоорганическая химия, 4, 404–409.

8. Ротанова Т. В., Клаус Р., Иванова А. Г., Гиномдмае Л. М., Антонов В. К. (1976) Биорган. химия, 2, 837-845.
9. Dimitrov D. (1977) Int. J. Biochem., 8, 369-372.
10. Shiao D. D. F., Sturtevant J. M. (1969) Biochemistry, 8, 4910-4917.
11. Wallace R. A., Kurtz A. N., Niemann C. (1963) Biochemistry, 2, 824-836.
12. Entressangles B., Desnuelle P. (1974) Biochim. et biophys. acta, 341, 437-446.
13. Semeriva M., Chapus C., Bovier-Lapierre C., Desnuelle P. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 58, 808-813.
14. Chapus C., Semeriva M. (1976) Biochemistry, 15, 4988-4991.
15. Ротанова Т. В., Алексеева Е. Г., Гиномдмае Л. М., Антонов В. К. (1977) Четвертый Всесоюзный симпозиум по химии белков и пептидов. Тезисы докладов. Минск, с. 80.
16. Березин И. В., Мартинек К. (1967) Теор. и эксперим. химия, 3, 458-462.
17. Verger R., de Haas G. H., Sarda L., Desnuelle P. (1969) Biochim. et biophys. acta, 188, 272-282.
18. Справочник химика (1964) т. II, с. 626, «Химия», М.-Л.
19. Нуцубидзе Н. Н., Дьяков В. Л., Ротанова Т. В., Антонов В. К. (1978) Биорган. химия, 4, 89-94.
20. Антонов В. К., Иванова Т. В., Березин И. В., Мартинек К. (1970) Молекулярн. биология, 4, 558-570.

Поступила в редакцию
23.VII.1979

INTERACTION OF PROFLAVINE WITH THE PANCREATIC LIPASE

NUTSUBIDZE N. N., ROTANOVA T. V., DYAKOV V. L., ANTONOV V. K.

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

Interaction of the acridine dye, proflavine, with the pancreatic lipase has been investigated. It is shown that the formation of the proflavine-lipase complex causes some changes in the dye absorption and fluorescence spectra. Proflavine is a competitive inhibitor of the hydrolysis of the specific substrate (tributylin emulsion) and noncompetitive inhibitor of nonspecific water-soluble substrates: *p*-nitrophenyl acetate and *p*-nitrophenyl caproate. It is concluded that proflavine is bound not at the substrate binding site but at a separate site, namely, at the activation site of the pancreatic lipase.