



УДК 577.153.024

АКТИВАЦИЯ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ ДЕТЕРГЕНТАМИ

II *. ГИДРОЛИЗ СПЕЦИФИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ

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

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва*

Исследован процесс активации панкреатической липазы в присутствии додецилсульфата натрия. Установлено, что скорость ферментативного гидролиза специфического субстрата липазы, триацетилглицерина, в области истинных растворов существенно увеличивается в присутствии детергента, причем кинетика гидролиза подчиняется уравнению Михаэлиса – Ментен в широком диапазоне концентраций субстрата. На примере гидролиза *n*-нитрофенилпропаноата показано, что активация в присутствии детергента обусловлена увеличением кинетических констант скорости ацилирования и деацилирования фермента.

С помощью метода КД показано, что под действием детергента в молекуле липазы происходят локальные конформационные изменения, затрагивающие непосредственное окружение некоторых ароматических аминокислотных остатков.

Установлено, что при оптимальной для активации липазы концентрации додецилсульфата натрия (0,4–0,5 мМ) на две молекулы белка приходится одна связанная молекула детергента.

В предыдущей работе [1] мы впервые показали, что явление активации панкреатической липазы (КФ 3.1.1.3) на поверхности раздела фаз можно с успехом моделировать в гомогенной среде, добавляя детергенты в концентрациях ниже их критических концентраций мицеллообразования (ККМ). Было показано, что основные параметры, характеризующие поверхностную активацию фермента, полностью совпадают с параметрами катализируемого панкреатической липазой гидролиза водорастворимого субстрата – *n*-нитрофенилацетата в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС).

Необходимо было показать, что такое же влияние ДДС оказывает на гидролиз специфических субстратов липазы, а также выяснить, параметры какой стадии ферментативного процесса изменяются под действием детергента. Кроме того, важными вопросами являются стехиометрия взаимодействия детергента с ферментом и происходящие при активации структурные изменения белка. Решению этих вопросов и посвящено настоящее сообщение.

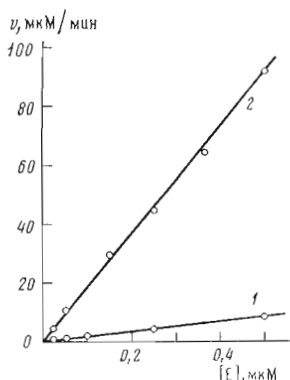
Триацетилглицерин (триацетин) – представитель истинных субстратов панкреатической липазы, способный образовывать молекулярные растворы при концентрациях, достаточных для кинетических измерений. При высоких концентрациях этот субстрат образует эмульсию (ККМ 10 мМ в 0,1 М NaCl [2]), на поверхности частиц которой происходит активация панкреатической липазы [2–4]; в этом и состоит отличие липаз от обычных эстеров.

Как установлено (рис. 1), скорость гидролиза триацетина линейно зависит от концентрации фермента, а добавление ДДС (0,4 мМ – оптимальная концентрация; ККМ 8,1 мМ [1]) существенно ее увеличивает.

Зависимость скорости гидролиза субстрата от его концентрации представлена на рис. 2. В отсутствие детергента гиперболическая зависимость скорости реакции от концентрации субстрата соблюдается лишь для концентраций, не превышающих ККМ (~10 мМ), а при дальнейшем повышении концентрации субстрата активность фермента резко возрастает. В присутствии ДДС в оптимальной концентрации панкреатическая липаза

* Сообщение I см. [1].

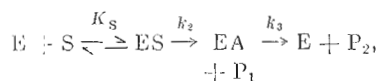
Рис. 1. Зависимость скорости гидролиза триацетина (9,2 мМ) от концентрации липазы в отсутствие (1) и в присутствии (2) 0,4 мМ ДДС. Условия: 25° С, рН 7,5



ведет себя как обычная эстераза — кинетика гидролиза триацетина подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен во всем исследованном диапазоне концентраций субстрата. Активность липазы при действии на эмульгированный субстрат (триацетин или трибутирил) при добавлении ДДС не повышается. Интересно, что в этом случае отсутствует и подавление ферментативной активности избытком детергента.

Кинетические параметры гидролиза триацетина в отсутствие и в присутствии ДДС соответственно равны: $k_{кат}$ 0,8 и 88 с⁻¹, K_m 7 и 245 мМ.

Как известно [5—8], катализируемый панкреатической липазой гидролиз протекает по трехстадийной схеме



где EA — ацилфермент, и наблюдаемые кинетические параметры равны:

$$k_{кат} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \quad \text{и} \quad K_m (\text{каж}) = K_s \frac{k_3}{k_2 + k_3}.$$

Чтобы определить, на какие стадии каталитического процесса влияет ДДС, мы воспользовались методом селективного ингибирования стадии ацилирования (k_2) борной кислотой по аналогии с тем, как это делалось для химотрипсина [9]. Поскольку присутствие борной кислоты обуславливает высокую буферную емкость реакционной смеси, в качестве субстрата в данном случае мы были вынуждены использовать *n*-нитрофенилкарбонат, позволяющий измерять скорость реакции спектрофотометрически.

Определив по методу Иди [10] значения V и K_m при различных концентрациях ингибитора, с помощью уравнений [11]

$$\frac{K_m}{V} = \frac{K_s}{k_2 [E]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

и

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{k_2 [E]} + \frac{1}{k_3 [E]} + \frac{[I]}{k_2 [E] K_i}$$

нетрудно получить (рис. 3) значения K_1 , $K_s/k_2[E]$, $1/k_2[E]K_1$ и $\left(\frac{1}{k_2[E]} + \frac{1}{k_3[E]} \right)$, позволяющие вычислить величины индивидуальных констант каталитического процесса (табл. 1).

Обнаруживается, что активация связана с возрастанием не только k_3 , но и k_2 (возрастание k_3 при активации панкреатической липазы было впервые показано в работе [12]). Величина K_s при активации практически не изменяется. При активации липазы существенно возрастает также ее сродство к ингибитору — борной кислоте (K_i снижается более чем в 10 раз). Поскольку известно, что борная кислота связывается с каталитическим участком активного центра фермента [13], можно заключить, что активация липазы под действием ДДС обусловлена «формированием» каталитического участка (серин-гистидиновой пары) активного центра

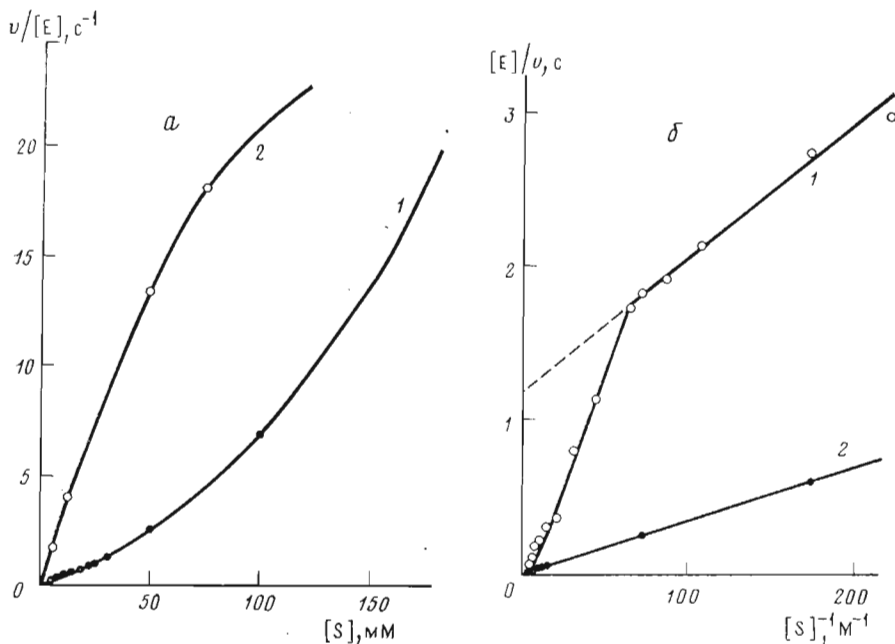


Рис. 2. Зависимость скорости гидролиза триацетина от его концентрации в отсутствие (1) и в присутствии 0,4 мМ ДДС (2) в прямых (а) и обратных (б) координатах. Условия: 25° С, рН 7,5; 0,1 М NaCl

фермента и не связана с существенными изменениями в сорбционном участке («гидрофобном кармане») активного центра.

Ранее неоднократно высказывались предположения о возможной обусловленности активации липазы конформационными переходами в белковой глобуле [13, 14]. Однако никаких доказательств реальности таких переходов получено до сих пор не было. Более того, предлагался ряд моделей, в которых активация липазы связывалась не с конформационными переходами, а с повышением локальной концентрации субстрата [15], эффектами ориентации [16] и т. д. Однозначно решить вопрос о связи активации липазы с конформационными переходами в ее молекуле стало возможно лишь с появлением метода активации липазы под действием ДДС [1] в гомогенной среде, допускающего исследование конформационного состояния фермента с помощью спектральных методов.

На рис. 4 представлено изменение под действием ДДС интенсивности флуоресценции остатков триптофана в молекуле липазы. Как отмечалось в предыдущем сообщении [1], наблюдаемое в области концентраций ДДС от 0 до ~1 мМ изменение интенсивности флуоресценции четко коррелирует с изменением ферментативной активности.

При изучении спектров КД растворов липазы, содержащих ДДС в различных концентрациях (рис. 5), было обнаружено, что введение детергента вызывает значительное изменение спектра в области поглощения ароматических хромофорных групп. Эффект монотонно возрастает по мере увеличения концентрации ДДС от 0 до 2,5 мМ. В интервале длин волн от 190 до 220 нм спектр КД липазы в присутствии ДДС не изменяется. Это означает, что конформационные изменения, происходящие в молекуле липазы под действием ДДС, носят локальный характер, затрагивая лишь непосредственное окружение некоторых ароматических аминокислотных остатков. Можно предполагать, что эти остатки играют существенную роль в процессе активации.

Наличие на графике (рис. 5) изобестической точки (при λ 254 нм) говорит о том, что в исследуемой системе имеет место равновесие между двумя дискретными конформациями белка [17], смещаемое при изменении концентрации ДДС. Однако в координатах $1/[\theta_0 - \theta]_{272} - 1/[\text{ДДС}]$, где θ_0 и θ — эллиптичность липазы в отсутствие и в присутствии детергента,

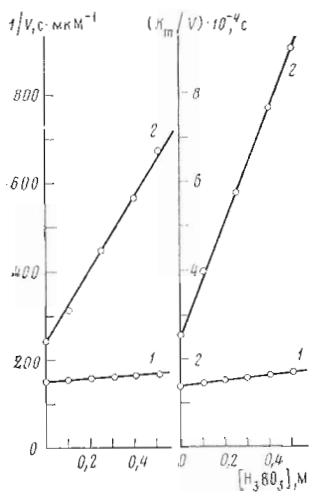


Рис. 3

Рис. 3. Обработка результатов эксперимента по ингибированию борной кислотой гидролиза *n*-нитрофенилкарбоната, катализируемого липазой в отсутствие (1) и в присутствии 0,4 мМ ДДС (2)

Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции остатков триптофана в молекуле липазы от концентрации ДДС (0,1 М трис-НСl, рН 7,5)

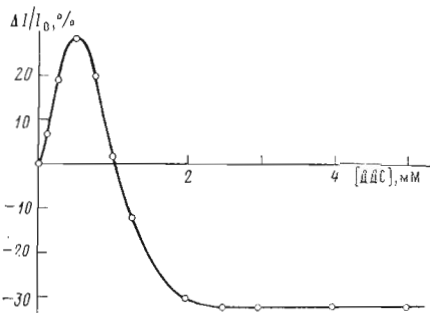


Рис. 4

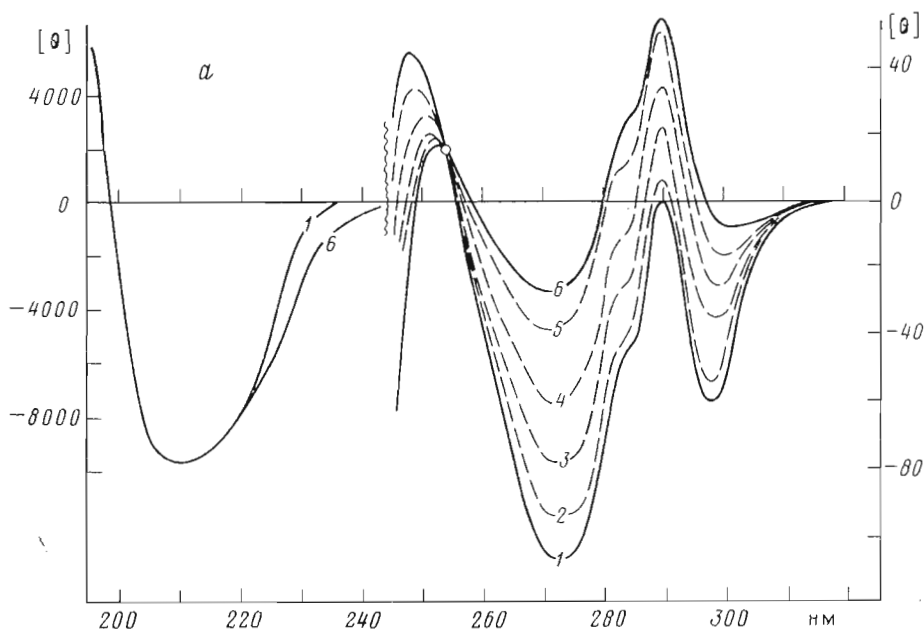
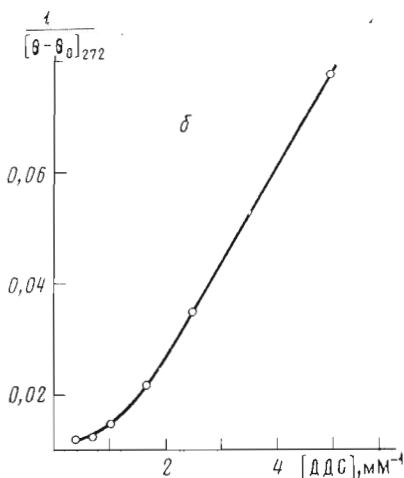


Рис. 5. а - Спектры КД липазы ($2,15 \cdot 10^{-5}$ М) в 0,1 М трис-НСl-буферном растворе, рН 7,5, содержащем 0,4 М NaCl и ДДС в концентрации (мМ): 0 (1), 0,2 (2), 0,4 (3), 0,6 (4), 1,0 (5), 2,5 (6). б - Зависимость эллиптичности липазы (λ 272 нм) от концентраций ДДС в двойных обратных координатах



[ДДС], мМ	K_1 , М	k_2 , с ⁻¹	k_3 , с ⁻¹	K_S , мкМ
0	2,6	0,08	0,16	142
0,45	0,2	0,24	0,555	155

Таблица 2

Концентрация ДДС, мМ			Связанный ДДС/белок, моль/моль
в диализном растворе	в белковом растворе	связанного с белком	
0,45	0,565	0,115	0,48
1,0	1,47	0,47	1,96
2,5	3,65	1,15	4,8

полученные данные не линеаризуются (см. рис. 5б), что свидетельствует о более сложном характере взаимодействия детергента с липазой, чем простое комплексобразование одной молекулы детергента с ферментом.

Для исследования стехиометрии взаимодействия липазы с ДДС мы воспользовались методом равновесного диализа [18] с использованием радиоактивно меченного детергента (табл. 2).

Тот факт, что при оптимальной концентрации ДДС на две молекулы белка приходится одна связанная молекула детергента, может указывать на олигомеризацию липазы под действием ДДС. Для выяснения этого вопроса мы подвергли липазу гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-150, уравновешенным раствором ДДС в концентрации, вызывающей максимальную активацию липазы. Было показано, что в этих условиях липаза элюируется в свободном объеме, что соответствует молекулярной массе не менее 400 000 (или степени олигомеризации не менее 8).

По этой причине определить константу связывания ДДС липазой, равно как и число центров связывания, не представляется возможным [18]. Для качественной оценки прочности связывания липазы с ДДС следует отметить, что при гель-фильтрации комплекса липазы с радиоактивно меченым ДДС на колонке с сефадексом G-150, не содержащим ДДС, удается получить белок, полностью свободный от детергента; олигомеры липазы при этом диссоциируют до мономера и димера (рис. 6).

С целью выяснения природы взаимодействия ДДС с липазой мы исследовали влияние ионной силы раствора на активацию детергентом реакции ферментативного гидролиза *n*-нитрофенилацетата и на изменения под действием детергента флуоресценции остатков триптофана в молекуле липазы. Оказалось, что при повышении ионной силы раствора оптимальная концентрация ДДС существенно понижается (рис. 7). Величина максимального эффекта (достигаемого при оптимальной концентрации ДДС) от ионной силы не зависит. Этот факт доказывает гидрофобный характер взаимодействия липазы с ДДС, поскольку известно [19], что повышение ионной силы раствора усиливает гидрофобные взаимодействия.

Экспериментальная часть

Препарат свиной панкреатической липазы (смесь изоферментов L_A и L_B , не различающихся по каталитическим свойствам) получали по методике Верже и сотр. [20], модифицированной путем замены диализа, предшествующего хроматографии белка на DEAE-целлюлозе, ацетоновым фракционированием белка при -6°C в пределах от 0 до 46% ацетона [21]. Эта модификация наряду со значительной экономией времени (стадия занимает 1–2 ч вместо 16) дает возможность одновременно с полным удалением солей освободиться также от 50% балластного белка. Кроме того, ацетоновое фракционирование в отличие от диализа не сопряжено с опас-

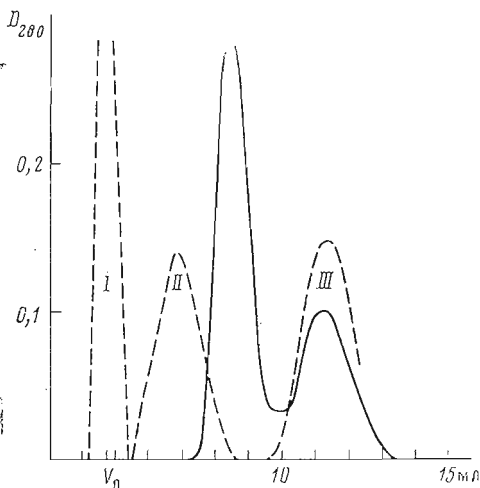


Рис. 6

Рис. 6. Гель-фильтрация комплекса липазы с ДДС на колонке с сефадексом G-150 (0,7×50 см), уравновешенным 0,4 М NaCl. Пунктиром представлена калибровка колонки голубым декстраном (I), альдолазой (M 147 000) (II), нативной липазой (III)

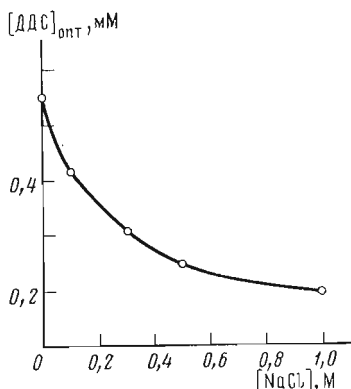


Рис. 7

Рис. 7. Зависимость оптимальной концентрации ДДС от ионной силы раствора. (Концентрация ДДС, соответствующая максимальному повышению интенсивности флуоресценции остатков триптофала, совпала с концентрацией, оптимальной для ферментативной активности, во всех случаях)

ностью протеинолиза [21]. На ход ионообменной хроматографии примесь ацетона в наносимом образце влияния не оказывает; инактивация липазы под действием ацетона отсутствует.

Полученный препарат фермента был гомогенен (по данным электрофореза в полиакриламидном геле) и имел активность, соответствующую литературным данным [20]. Запасной раствор фермента (0,4 М NaCl, 0,02% NaN₃, концентрация белка 1 мг/мл) хранили при -15°C . В случае необходимости белок концентрировали ультрафильтрацией на ацетилцеллюлозной мембране УАМ-100 (ВНИИСС, г. Владимир). Молярную концентрацию фермента определяли, используя литературные значения $E_{280}^{1\%} = 13,4$ и M 48 000 [3].

Субстраты — триацетин (ч.д.а.) и трибутирин (ч) отечественного производства — очищали перегонкой в вакууме (т. кип. $172^{\circ}\text{C}/40$ мм рт. ст. и $214^{\circ}\text{C}/40$ мм рт. ст. соответственно). Получение *n*-нитрофениловых эфиров уксусной и капроновой кислот описано в работе [5].

Трис (ч) отечественного производства дважды перекристаллизовывали из смеси этанол — вода в присутствии активированного угля.

В работе использовали ДДС фирмы «Serva» (ФРГ). Радиоактивный (меченный тритием) ДДС, полученный по методике [22], был любезно предоставлен А. Ю. Скрипкиным (ИХФ АН СССР). Препарат имел активность 2,5 Ки/мМ.

Кинетические измерения. Начальные скорости ферментативного гидролиза триацетина и трибутирина измеряли методом потенциометрического титрования с использованием рН-стага ТТТ-60 (Radiometer, Дания) при 25°C и рН 7,5 в 0,1 М растворе NaCl. В качестве титранта использовали 10 мМ раствор NaOH, приготовленный из фиксанала. Скорость гидролиза хромогенных субстратов — *n*-нитрофениловых эфиров уксусной и капроновой кислот — измеряли на спектрофотометре «Gilford 2400-2» (США) при 400 нм и 25°C в 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН 7,5), содержащем 4% ацетонитрила (по объему). Кинетические параметры липазы определяли по методу Иди при концентрациях *n*-нитрофенилкапроната от 10 до 50 мкМ в отсутствие ДДС и от 25 до 100 мкМ в присутствии ДДС. Скорость гидролиза *n*-нитрофенилацетата определяли при постоян-

ной концентрации субстрата 3 мМ. Скорость спонтанного гидролиза субстрата измеряли перед внесением фермента в реакционную смесь и вычитали из общей скорости гидролиза.

Флуоресценцию белка измеряли на однолучевом спектрофлуориметре «Hitachi MPF-3» (Япония), концентрация фермента в кювете 0,5–1 мкМ, длина волны возбуждения 295 нм, эмиссии — 330–340 нм.

Спектры КД снимали на приборе «Dichrographe III» (Jobin Yvon, Франция) при концентрации фермента в кювете 21,5 мкМ. Буфер 0,1 М трис-НСl, 0,4 М NaCl, рН 7,5. Длина оптического пути составляла 0,5 см для $\lambda > 245$ нм и 0,01 см для λ 245–190 нм.

Равновесный диализ осуществляли в микроячейке, аналогичной описанной в работе [23]. В ячейку помещали 50 мкл раствора липазы, сконцентрированного до 15–20 мг/мл, и диализовали против 1 мл раствора меченого ДДС в 0,1 М трис-НСl-буфере, рН 7,5. Раствор ДДС получали добавлением к запасному раствору радиоактивного препарата (2,5 мкг/мл) немеченого ДДС до нужной концентрации. Равновесие (постоянная концентрация ДДС в белковом растворе) устанавливалось в течение 2–3 сут.

При измерении радиоактивности использовался сцинтиллятор «Oxysolve T» (Koch-Light Laboratories Ltd, Англия). Объем сцинтиллятора в кювете счетчика 5 мл, объем вносимой пробы раствора ДДС 5 мкл. Фоновую радиоактивность измеряли перед внесением пробы и затем вычитали из суммарной активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дьяков В. Л., Мишин А. А., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 2, с. 296–299.
2. Entressangles B., Desnuelle P. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 159, № 2, p. 285–295.
3. Desnuelle P. In: The Enzymes / Ed. Boyer P. New York – London: Acad. Press, 1972, v. VII, p. 575–616.
4. Sarda L., Desnuelle P. Biochim. et biophys. acta, 1958, v. 30, № 3, p. 513–521.
5. Нуцубидзе Н. П., Дьяков В. Л., Роганова Т. В., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 1, с. 89–94.
6. Sémériva M., Chapus C., Bovier-Lapierre C., Desnuelle P. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 58, № 3, p. 808–813.
7. Brockerhoff H. Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 212, № 1, p. 92–101.
8. Sémériva M., Dufour C., Desnuelle P. Biochemistry, 1971, v. 10, № 11, p. 2143–2149.
9. Березин И. В., Коломийцева Г. Я., Левашов А. В., Мартинек К. Молекулярн. биология, 1967, т. 1, № 1, с. 67–74.
10. Березин И. В., Класов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: Изд-во МГУ, 1976, с. 79.
11. Березин И. В., Класов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: Изд-во МГУ, 1976, с. 156.
12. Chapus C., Sémériva M., Bovier-Lapierre C., Desnuelle P. Biochemistry, 1976, v. 15, № 23, p. 4980–4987.
13. Роганова Т. В., Клаус Р., Иванова А. Г., Гинодман Л. М., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 6, с. 837–845.
14. Verger R., de Haas G. H. Ann. Rev. Biophys. and Bioengng, 1976, v. 5, p. 77–117.
15. Brockman H. L., Law J. H., Kezdy F. J. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 14, p. 4965–4970.
16. Brockerhoff H. Chem. phys. lipids, 1973, v. 10, № 2, p. 215–222.
17. Чанг Р. Физическая химия в приложении к биологическим системам. М.: Мир, 1980, с. 228.
18. Белки / Ред. Нейрат Г., Бэйли К. М.: Изд-во иностр. лит., 1956, т. II.
19. Lairon D., Nalbone G., Lafont H., Leonardi J., Domingo N., Hanton J. C., Verger R. In: Enzymes of lipid metabolism. N. Y.: Plenum Press, 1978, p. 95–100.
20. Verger R., de Haas G. H., Sarda L., Desnuelle P. Biochim. et biophys. acta, 1969, v. 188, № 2, p. 272–282.
21. Sarda L., Marchis-Mouren G., Constantin M. J., Desnuelle P. Biochim. et biophys. acta, 1957, v. 23, № 2, p. 264–274.
22. Шишков А. В., Филагова Э. С., Симонов Е. Ф., Унукович М. С., Гольданский В. И., Несмеянов А. Н. Докл. АН СССР, 1976, т. 228, № 5, с. 1237–1239.
23. Methods in Enzymology. Vol. XXII. Enzyme purification and related techniques / Ed. Jakoby W. B. New York – London: Acad. Press, 1971, p. 255–257.

Поступила в редакцию
18.XI.1981

ACTIVATION OF PANCREATIC LIPASE BY DETERGENTS.
II. HYDROLYSIS OF SPECIFIC SUBSTRATES

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

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

Activation of pancreatic lipase by sodium dodecylsulphate (SDS) has been studied. It was found that the rate of enzymatic hydrolysis of specific substrate, triacetin, in concentration range corresponding to a true solution is significantly increased in the presence of SDS, the kinetics of hydrolysis obeying the Michaelis-Menten equation over a wide range of substrate concentrations. With *p*-nitrophenylcaproate it was shown that the lipase activation in the presence of SDS is due to an increase in the enzyme acylation and deacylation rate constants. CD studies revealed that SDS brings about local conformational changes in the lipase molecule which affect the environment of some aromatic amino acid residues. A ratio of one molecule of bound SDS per two molecules of protein was found at the SDS concentration (0,4-0,5 mM) optimal for lipase activation.