



УДК 577.152.31 \* 43.042

## АКТИВАЦИЯ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ ДЕТЕРГЕНТАМИ

## III. \* ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТА

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

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

Исследован процесс активации панкреатической липазы под действием истинного раствора додецилсульфата натрия. Методом гель-фильтрации установлено, что липаза под действием детергента образует октамер. Предложен метод титрования активных центров, основанный на исследовании стехиометрии связывания фермента с алкилборной кислотой. Установлено, что октамер липазы при оптимальной концентрации детергента содержит шесть активных центров.

Предлагается модель активированной формы панкреатической липазы, включающая шесть нативных субъединиц, образующих активные центры, и две конформационно измененные субъединицы. Правомерность этой модели проверена теоретико-вероятностным расчетом.

В предыдущих работах [1, 2] нами было обнаружено, что панкреатическая липаза (триацилглицерол-ацилгидролаза, КФ 3.1.1.3) активируется под действием истинного раствора додецилсульфата натрия (SDS), причем при оптимальной концентрации SDS это явление можно рассматривать как адекватную модель активации фермента гидрофобной поверхностью раздела фаз. Анализ изменения индивидуальных каталитических констант при активации панкреатической липазы показал, что активация обусловлена формированием каталитического участка активного центра фермента при отсутствии существенных изменений в его субстратсвязывающем участке. С другой стороны, методом КД был обнаружен происходящий под действием SDS конформационный переход, затрагивающий третичную (но не вторичную) структуру липазы. Наконец, были получены данные, указывающие на возможную агрегацию липазы под действием SDS.

Оказалось, однако, что изменение каталитических свойств липазы под действием SDS не коррелирует с изменением ее конформации: максимальная каталитическая активность достигается при концентрации SDS, соответствующей глубине конформационного перехода лишь ~25% [1]. Иными словами, ни нативный, ни трансформированный конформер панкреатической липазы нельзя, по-видимому, рассматривать как активную форму фермента. Связь между агрегацией липазы и ее активацией также не была выяснена.

Настоящая работа посвящена более детальному исследованию олигомеризации панкреатической липазы под действием SDS с целью выяснения связи этого явления с активацией фермента.

Для определения молекулярной массы олигомеров липазы, образующихся под действием SDS, мы воспользовались гель-фильтрацией на колонке с сефарозой CL-6B, уравновешенной 0,4 М раствором NaCl, содержащим 0,3 мМ SDS (оптимальная концентрация при данной ионной силе [1]), и откалиброванной по белкам с известными молекулярными массами. Данные, полученные при калибровке, хорошо линеаризуются (рис. 1) в координатах  $K_{av} - \lg M$ , где  $K_{av} = (V - V_0)/(V_t - V_0)$ ,  $V_0$  — свободный объем колонки,  $V_t$  — ее полный (геометрический) объем,  $V$  — объем элюции данного белка,  $M$  — его молекулярная масса. Как следует из рис. 1, липаза при оптимальной концентрации SDS ведет себя как гомогенный белок с молекулярной массой 400 000. При гель-фильтрации в

\* Сообщение II см. [1].

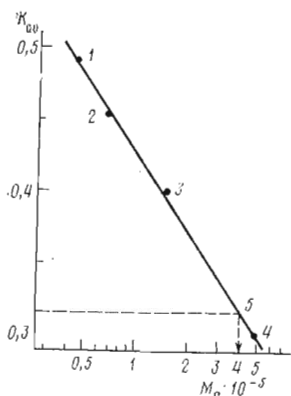


Рис. 1

Рис. 1. Определение молекулярной массы панкреатической липазы (5) при оптимальной концентрации SDS (0,3 мМ в 0,4 М NaCl) гель-фильтрацией на сефарозе CL-6B с использованием белков-маркеров (в скобках —  $M_r \cdot 10^{-3}$ ): 1 — овальбумин (45), 2 — БСА (67), 3 — альдолаза (147), 4 — ферритин (480)

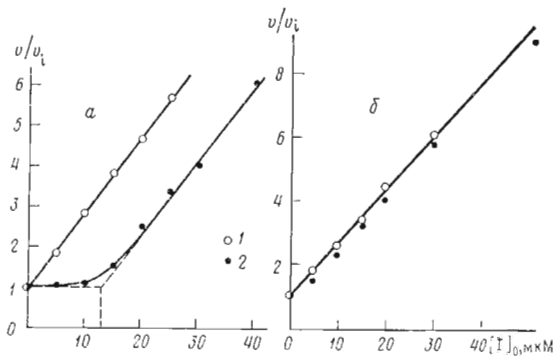


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость скорости гидролиза ацетилхоллина (0,1 мМ) под действием бутирилхолинэстеразы от концентрации октилборной кислоты (1) в отсутствие (1) и в присутствии (2) 1 мг/мл панкреатической липазы: а — концентрация SDS 0,4 мМ; б — в отсутствие SDS. Условия: 25° С, pH 7,5; 0,1 М NaCl

присутствии более высоких концентраций SDS (1, 2, 3 мМ) липаза ведет себя аналогично.

Молекулярная масса липазы, вычисленная на основании известной первичной структуры [3], равна 52 000; эта величина хорошо согласуется с данными гель-фильтрации в отсутствие SDS, приводящими к значению молекулярной массы ~50 000 [3].

Таким образом, панкреатическая липаза под действием SDS переходит в октамерную форму. По-видимому, активация липазы закономерно связана с формированием какой-то надмолекулярной структуры, а не сводится к внутримолекулярным конформационным перестройкам. Аналогичная олигомеризация под действием SDS, сопровождающая активацию, была обнаружена также для другого липолитического фермента — панкреатической фосфолипазы  $A_2$  [4].

Необходимо было выяснить, сколько же активных центров содержит октамерная форма панкреатической липазы. Однако известные из литературы методы определения абсолютных концентраций активных центров гидролаз в случае панкреатической липазы использовать не удастся. Так, «системы со взаимным истощением» [5] требуют использования концентраций фермента, сравнимых с величиной  $K_s$ , превышающей в данном случае  $10^{-4}$  М [1]. В случае использования методов предстационарной кинетики [6] величина «выброса» *n*-нитрофенола составляет при найденном нами соотношении величин  $k_2$  и  $k_3$  [1] лишь несколько процентов от концентрации фермента и не может быть измерена экспериментально. (Правда, в работе [7] описана предстационарная стадия взаимодействия неактивированной формы панкреатической липазы и *n*-нитрофенилацетата с периодом индукции ( $\tau$ ) 7 мин, но такое значение  $\tau$  едва ли можно признать правдоподобным; вероятно, авторы наблюдали медленное ацетилирование какого-то аминокислотного остатка, не входящего в состав активного центра.) Необратимые специфические модификаторы активного центра панкреатической липазы в литературе не описаны.

Мы использовали ранее не описанный метод определения концентрации активных центров, основанный на исследовании стехиометрии связывания фермента с алкилборной кислотой. Как известно [8–10], алкилборные кислоты выступают как субстратоподобные ингибиторы по отношению к достаточно широкому кругу серин-гистидиновых гидролаз весьма различной субстратной специфичности; благодаря этому concentra-

цию ингибитора, не связанного с исследуемым ферментом, можно определить по его ингибирующему действию на какую-либо другую гидролазу.

Мы исследовали ингибирование бутирилхолинэстеразы октилборной кислотой [10] в отсутствие и в присутствии панкреатической липазы. Предварительно нами было проверено, что бутирилхолинэстераза сохраняет каталитическую активность в условиях, соответствующих максимальной активации панкреатической липазы (0,1 M NaCl, 0,4 mM SDS, pH 7,5), и что липаза совершенно не катализирует гидролиз субстрата бутирилхолинэстеразы — ацетилхолина — как в отсутствие, так и в присутствии SDS.

Константа ингибирования панкреатической липазы октилборной кислотой составляет  $0,37 \cdot 10^{-6}$  M [9]. Известно, что прочность связывания этого ингибитора с активными центрами других гидролаз существенно ниже (см., например, [8–10]); тем более можно предположить неспецифическим связыванием октилборной кислоты с функциональными группами липазы, не входящими в состав активного центра. Поэтому при достаточно высоких концентрациях октилборной кислоты, когда все активные центры липазы связаны с ингибитором, справедливо равенство

$$[I] = [I]_0 - [L]_0,$$

где  $[I]$  — концентрация свободного ингибитора в растворе,  $[I]_0$  — полная концентрация ингибитора,  $[L]_0$  — концентрация активных центров липазы. (Связыванием ингибитора с бутирилхолинэстеразой мы пренебрегаем, поскольку концентрация этого фермента мала по сравнению с концентрацией липазы.) Следовательно, в рассматриваемом диапазоне концентраций ингибитора зависимость активности холинэстеразы от концентрации октилборной кислоты должна описываться в координатах Диксона прямой линией, параллельно смещенной вдоль оси абсцисс на величину  $[L]_0$  относительно графика той же зависимости в отсутствие липазы.

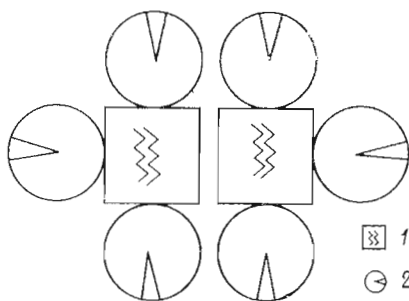
Полученные данные представлены на рис. 2. Концентрация активных центров в 19,2 мкМ (1,0 мг/мл) растворе липазы при оптимальной концентрации SDS (рис. 2а) составила 13,0 мкМ. В отсутствие SDS (рис. 2б) связывания октилборной кислоты с липазой практически не наблюдается. Этот факт подтверждает сделанный нами на основании кинетических данных [1] вывод о том, что формирование активных центров панкреатической липазы происходит лишь при активации фермента.

Использованный нами препарат фермента был гомогенен по данным диск-электрофореза в полиакриламидном геле и имел удельную активность, близкую к активности полностью очищенной липазы, полученной с помощью аффинной хроматографии [11]. Следовательно, полученные нами данные позволяют заключить, что октамерная форма липазы, образующаяся в присутствии оптимальной концентрации SDS, содержит 6 активных центров; содержание активного фермента в препарате составляет 90%. Можно предполагать, что две из молекул липазы, входящих в состав октамера, активных центров не образуют и играют роль «структурирующих субъединиц»; возможно, эти молекулы отличаются по конформации от шести других — «каталитических» — субъединиц. Действительно, как следует из данных КД [1], при оптимальной концентрации SDS липаза присутствует в виде двух конформеров, соотношение концентраций которых составляет  $\sim 1:3$  (на три молекулы, активных по данным КД, приходится одна конформационно измененная молекула).

Полученные данные можно объяснить, предположив следующую схему активации панкреатической липазы. Комплекс SDS—липаза представляет собой октамер, в котором две субъединицы претерпели под действием SDS конформационный переход и образовали каждая комплекс с тремя нативными молекулами липазы; в каждой из последних формируется при этом каталитически активный центр (рис. 3). Такую структуру можно рассматривать как два тетрамера, содержащих три одинаковых и одну конформационно измененную молекулу липазы.

Для проверки правомерности этой гипотезы мы попытались рассчитать на ее основании зависимость степени активации липазы от концен-

Рис. 3. Схема строения активированной формы панкреатической липазы, образующейся под действием SDS: 1 — конформационно измененные молекулы (структурирующие субъединицы), 2 — нативные молекулы (каталитические субъединицы)



трации SDS и сравнить полученный результат с данными независимого эксперимента. Для выполнения такого расчета наиболее удобным оказался теоретико-вероятностный подход.

Обозначим глубину конформационного перехода через  $p$ , т. е.  $[E^*] = p[E]_0$ , где  $E^*$  — липаза, претерпевшая конформационный переход. Конформационно измененная молекула липазы связывает еще три молекулы фермента, которые могут быть как нативными, так и конформационно измененными. Вероятность того, что все эти три молекулы нативны, составит, согласно биномиальному закону распределения вероятностей [12],  $(1-p)^3$ . (Мы предполагаем, что из тетрамеров липазы различного состава —  $E^*E_3$ ,  $E_2^*E_2$  и т. д. — ни один не образуется преимущественно.) Следовательно, концентрация активного тетрамера  $E^*E_3$  равна  $(1-p)^3 p[E]_0$ , а доля молекул липазы, входящих в состав таких тетрамеров, от общего числа молекул фермента составляет  $Q = 4p(1-p)^3$ .

На рис. 4 представлено изменение величин  $p$  и  $Q$  в зависимости от концентрации SDS. Вероятность образования активного тетрамера круто возрастает при повышении концентрации SDS от нуля до оптимального значения (0,3 мМ), а при дальнейшем возрастании концентрации детергента столь же резко падает, практически достигая нуля при концентрации SDS, равной 1 мМ. Полученная зависимость весьма близка к зависимости активности липазы от концентрации SDS [2]. Более того, мы обнаружили полное совпадение при сравнении рис. 4 с зависимостью

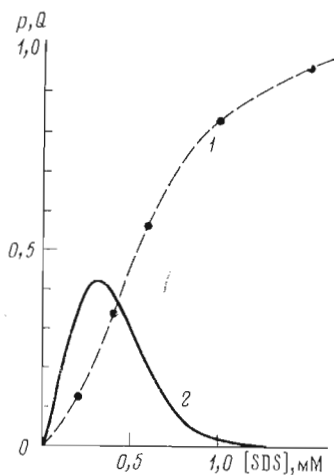


Рис. 4

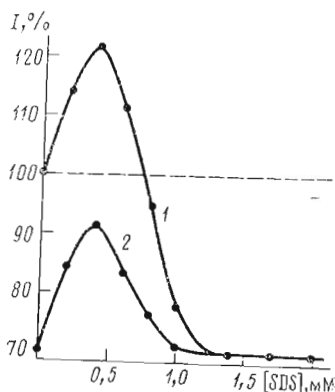


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость глубины конформационного перехода  $p$  (1) и величины  $Q = 4p(1-p)^3$  (2) от концентрации SDS. Величина  $p$  определена на основании данных КД [1]

Рис. 5. Зависимость интенсивности флуоресценции остатков триптофана в молекуле нативной липазы (1) и фермента, модифицированного нитрофенилсульфенилхлоридом (2), от концентрации SDS. Условия: 0,1 М трис-HCl, 0,1 М NaCl, pH 7,5. За 100% принята интенсивность флуоресценции нативного фермента в отсутствие SDS

(рис. 5, 2) интенсивности флуоресценции остатков триптофана от концентрации SDS для препарата липазы, модифицированного нитрофенилсульфенилхлоридом (см. «Экспериментальную часть»). Модифицированный препарат по каталитическим свойствам не отличается от нативного, однако изменения его флуоресценции более адекватно отражают изменение концентрации активной формы липазы, чем в случае нативного фермента: для нативного фермента (рис. 5, 1) картина осложнена беспрецизионным тушением под действием высоких концентраций детергента флуоресценции двух наиболее доступных остатков триптофана (из шести имеющихся в молекуле липазы).

Таким образом, зависимость концентрации активированной формы панкреатической липазы от концентрации SDS, вычисленная на основании предложенной нами модели, хорошо согласуется с результатами независимого эксперимента. Этот факт позволяет заключить, что наша модель, несмотря на введенные упрощающие предположения, достаточно адекватно отражает действительный механизм активации панкреатической липазы: формирование каталитического участка активного центра фермента под действием SDS [1] происходит при ассоциации одной молекулы липазы, претерпевшей конформационный переход, с тремя молекулами нативного фермента.

### Экспериментальная часть

Свиную панкреатическую липазу (смесь изоферментов, различающихся лишь структурой углеводной части молекулы [3]) получали по разработанной нами методике, описанной ранее [1]. Препарат был гомогенен (по данным электрофореза в полиакриламидном геле) и имел активность  $\sim 4000$  мкмоль продукта/мин·мг ( $25^\circ\text{C}$ , pH 7,5; 0,1 М NaCl, субстрат — эмульсия трибутирина, регистрируемый продукт гидролиза — масляная кислота).

Бутирилхолинэстераза — препарат Пермского НИИ вакцин и сывороток. Активность 1,5 мкмоль/мин·мг ( $20^\circ\text{C}$ , pH 7,5; 0,1 М NaCl, субстрат — 20 мМ ацетилхолин). Использовали без дополнительной очистки.

Додецилсульфат натрия (SDS), голубой декстран и набор нативных белков-маркеров для калибровки колонки при гель-фильтрации — продукты фирмы Serva (ФРГ). Ацетилхолин бромистый (ч.) — препарат фирмы Chemapol (ЧССР), сефароза CL-6B — фирмы Pharmacia (Швеция).

*n*-Октилборная кислота была любезно предоставлена Т. В. Ротановой (ИБХ АН СССР). Метод получения и характеристики этого препарата представлены в работе [8].

*o*-Нитрофенилсульфенилхлорид был синтезирован нами по методике [13]. Препарат имел температуру плавления  $74,5\text{--}75^\circ\text{C}$ , что соответствует литературным данным.

Тиаоацетамид — продукт фирмы Fluka (Швейцария).

Гель-фильтрацию на колонке с сефарозой CL-6B ( $0,8 \times 50$  см), уравновешенной 0,3 мМ раствором SDS в 0,4 М NaCl, проводили при  $20^\circ\text{C}$ . Скорость тока 5 мл/ч. Ход элюции контролировали прибором Uvicord II (ЛКВ, Швеция).

Концентрацию активных центров липазы определяли по ее влиянию на ингибирование октилборной кислотой реакции гидролиза ацетилхолина под действием бутирилхолинэстеразы. Условия:  $25^\circ\text{C}$ , pH 7,5. Реакционная смесь содержала 1 мг/мл панкреатической липазы, 0,05 мг/мл холинэстеразы, 0,1 мМ ацетилхолин, 0–50 мМ октилборную кислоту, 0,1 М NaCl, в присутствии и в отсутствие 0,4 мМ SDS. В контрольном опыте реакционная смесь содержала те же компоненты, за исключением липазы. Скорость гидролиза ацетилхолина определяли методом потенциометрического титрования (титрант —  $10^{-2}$  М раствор NaOH). Постоянную концентрацию субстрата в ходе реакции поддерживали путем добавления в реакционную смесь запасного раствора субстрата в количестве, эквивалентном количеству добавленной при титровании щелочи. Для этого использовали рН-стат ТТТ-60 с рН-метром РНМ-63 и бюретками АБУ-12

и SBU-1a, механически связанными через самописец REC-61 (Radiometer, Дания).

Модификацию липазы нитрофенилсульфенилхлоридом проводили в 20 мМ Na-фосфатном буфере, pH 5,7, содержащем 0,4 М NaCl, в присутствии и в отсутствие 0,2 мМ SDS. 1 мл раствора фермента (1 мг/мл) инкубировали в течение 1 сут при 20° С с 65-кратным молярным избытком модификатора, который добавляли в виде концентрированного раствора в диоксане (концентрация диоксана в реакционной смеси 1–2%). Затем белок осаждали равным объемом ацетона (при температуре не выше 0° С); непрореагировавший модификатор переходил при этом в раствор. Осадок белка промывали 1–2 раза охлажденным ацетоном и суспендировали в 1 мл 20 мМ раствора тиацетамида (при этом в белке деблокируются все аминокислотные остатки, кроме триптофана [14]). Суспензию инкубировали в течение 1 ч при 20° С, отделяли нерастворимый осадок и очищали раствор модифицированного белка гелем-фильтрацией на сефадексе G-25. Степень модификации определяли спектрофотометрически ( $\Delta\epsilon_{365}=4000$  [15]). Липаза, модифицированная в присутствии SDS, содержала два остатка модификатора на одну молекулу белка. Липаза, подвергшаяся такой же обработке в отсутствие SDS, оказалась идентичной нативному ферменту.

Флуоресценцию белка измеряли на однолучевом спектрофлуориметре Hitachi MPF-3 (Япония) в 0,1 М трис-HCl-буфере, pH 7,5. Концентрация фермента в кювете 1 мкМ, длина волны возбуждения 295 нм, эмиссии — 330–340 нм.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Мишин А. А., Дьяков В. Л., Антонов В. К. Биоорганич. химия, 1982, т. 8, № 4, с. 462–469.
2. Дьяков В. Л., Мишин А. А., Антонов В. К. Биоорганич. химия, 1980, т. 6, № 2, с. 296–299.
3. De Caro J., Boudouard M., Bonicel J., Guidoni A., Desnuelle P., Ravery M. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 671, № 2, p. 129–138.
4. Hille J. D. R., Egmond M. R., Dijkman R., van Oort M. G., Jirgensons B., de Haas G. H. Biochemistry, 1983, v. 22, № 23, p. 5347–5353.
5. Березин И. В., Класов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: Изд-во МГУ, 1976, с. 114–116.
6. Березин И. В., Варфоломеев С. Д. Биокинетика. М.: Наука, 1979, с. 33–35.
7. Charas C., Sémériva M., Bovier-Lapierre C., Desnuelle P. Biochemistry, 1976, v. 15, № 23, p. 4980–4987.
8. Антонов В. К., Иванова Т. В., Березин И. В., Мартинек К. Молекулярн. биология, 1970, т. 4, № 4, с. 558–570.
9. Роганова Т. В., Клаус Р., Иванова А. Г., Гинодман Л. М., Антонов В. К. Биоорганич. химия, 1976, т. 2, № 6, с. 837–845.
10. Яре Я. Л., Спэкс М. А., Лангель Ю. Л., Роганова Т. В. Биоорганич. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1364–1371.
11. Patton J. S., Anderson L. FEBS Lett., 1978, v. 86, № 2, p. 179–182.
12. Смирнов Н. В., Дунин-Барковский И. В. Курс теории вероятности и математической статистики для технических приложений. М.: Наука, 1965, с. 65.
13. Синтезы органических препаратов. М.: ИЛ, 1949, сб. 2, с. 560–561; сб. 1, с. 200.
14. Стьюарт Дж., Янг Дж. Твердофазный синтез пептидов. М.: Мир, 1971, с. 46, 113.
15. Scoffone E., Fontana A., Rocchi R. Biochemistry, 1968, v. 7, № 3, p. 971–979.

Поступила в редакцию  
4.II.1985

#### ACTIVATION OF PANCREATIC LIPASE BY DETERGENTS. III. OLIGOMERIZATION OF THE ENZYME

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 non-micellar solution of sodium dodecylsulphate (SDS) has been studied. By means of gel-filtration it was found that SDS forces the lipase to form an octamer. A new method of the active sites titration using alkylboronic acids is proposed. The octameric form of the lipase was shown to contain six active sites at the optimal SDS concentration. The activated form of pancreatic lipase supposedly contains six native subunits, each of them forming an active site, and two conformationally altered subunits. This model was confirmed by a probability-theoretic calculation.