



УДК 577.153.2.02

ИЗУЧЕНИЕ ТОПОГРАФИИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА  
ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ МЕТОДОМ БИФУНКЦИОНАЛЬНОГО  
ОБРАТИМОГО ИНГИБИРОВАНИЯ БОРОРГАНИЧЕСКИМИ  
КИСЛОТАМИ

*Ротанова Т. В., Клаус Р., Иванова А. Г.,  
Гинодман Л. М., Антонов В. К.*

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

Исследовано действие борорганических кислот общей формулы  $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$  ( $n = 2-9$ ) и  $\text{Ph}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$  ( $n = 0, 2, 3, 4$ ) на ферментативную активность панкреатической липазы (КФ 3.1.1.3) в реакциях гидролиза трибутирина и *n*-нитрофенилацетата. Показано, что алкил- и аралкилборные кислоты являются эффективными бифункциональными обратимыми ингибиторами липазы. Для *n*-алкилборных кислот в интервале значений *n* от 2 до 8 наблюдается линейное увеличение  $pK_i$  с ростом *n*. Инкремент свободной энергии связывания составляет  $-700$  кал/моль, что характерно для гидрофобного взаимодействия. Ингибирование липазы аралкилборными кислотами не подчиняется простой закономерности, отмеченной для *n*-алкилборных кислот.

На основании полученных данных предлагается схема, согласно которой адсорбционный участок активного центра фермента непосредственно примыкает к каталитическому центру и имеет протяженность в восемь метиленовых звеньев; при этом в области 3-4-го метиленового звена имеется препятствие для связывания плоского бензольного кольца. Высказывается предположение о механизме активирования липазы в гетерогенной системе.

В последнее время для исследования «сериновых» гидролаз, содержащих в активном центре остатки серина и гистидина, весьма успешно используется метод бифункционального обратимого ингибирования борорганическими кислотами. С помощью этого метода удалось получить ценную информацию о строении активных центров таких ферментов, как  $\alpha$ -химотрипсин [1-4], щелочная мезентерикопептидаза [5], субтилизин [6, 7], ацетилхолинэстераза [8]. В частности, анализ взаимодействия фенилалкилборных кислот с  $\alpha$ -химотрипсином позволил сформулировать предположение о том, что структура образующегося фермент-ингибиторного комплекса может рассматриваться как модель переходного состояния для реакции  $\alpha$ -химотрипсина со специфическим субстратом [4, 9].

Остаток борной кислоты рассматриваемых ингибиторов реагирует с каталитическими группами, а углеводородный радикал — с гидрофобной субстратсвязывающей областью активного центра фермента [9, 10]. Изучение зависимости эффективности ингибирования ферментативной активности от величины и структуры углеводородной части молекулы ингибитора позволяет получить данные о топографии активного центра, т. е. о взаимном расположении каталитического и сорбционного участков, о размерах и форме последнего.

В настоящее время складывается представление о том, что каталитические участки активных центров липазы и  $\alpha$ -химотрипсина весьма сходны [11—13], кинетическая схема процесса липолиза, согласно работам Брокерхоффа [14] и Дэньюэлла с сотр. [11, 15], аналогична схеме процесса гидролиза эфирных субстратов сериновыми протеазами и включает три стадии — образование фермент-субстратного комплекса, ацилирование фермента и его деацилирование:



В свете этих данных представлялось интересным использовать метод бифункционального обратимого ингибирования борорганическими кислотами для изучения топографии активного центра палкреатической липазы.

Было изучено ингибирующее действие гомологического ряда  $n$ -алкилборных кислот общей формулы  $H(CH_2)_nB(OH)_2$  (где  $n = 2—9$ ) и ряда аралкилборных кислот  $C_6H_5(CH_2)_nB(OH)_2$  (где  $n = 0, 2, 3, 4$ ) на активность липазы в реакции гидролиза трибутирина. При кинетических исследованиях трибутирин имеет ряд преимуществ перед природными триглицеридами [11]: а) он легко образует стабильные эмульсии в отсутствие эмульгатора; это чрезвычайно важный фактор, поскольку взаимодействие эмульгатора с ферментом может привести к искажению кинетических данных; б) выделяющаяся в процессе гидролиза масляная кислота хорошо растворима в воде, что обеспечивает возможность титрования продукта реакции с помощью рН-стата.

Ингибирование ферментативной активности липазы изучали при комнатной температуре в рН-оптимуме действия фермента в присутствии метилового синтра. Эмульгирование субстрата проводили с помощью ультразвукового генератора.

Константа Михаэлиса для трибутирина, определенная по Лайнуверу — Бэрку (данные обработаны по методу наименьших квадратов), составляет  $(1,320 \pm 0,007) \cdot 10^{-3}$  М. В литературе приводятся несколько отличающиеся значения  $K_{m(\text{вак})}$ , а именно  $1,9 \cdot 10^{-2}$  [11] и  $4,6 \cdot 10^{-3}$  М [16]. Наблюдаемые расхождения обусловлены, по-видимому, различной степенью эмульгирования трибутирина, достигнутой в упомянутых работах [17], а также некоторыми различиями в условиях определения.

Для характеристики ингибирующих свойств борорганических кислот определяли скорость ферментативного процесса при различных концентрациях ингибитора. Линейный тип зависимости, наблюдающийся в широком интервале концентраций  $n$ -гексилборной кислоты (рис. 1), характерен также для действия и других исследованных борорганических кислот.

Для определения численного значения константы ингибирования ( $K_i$ ) необходимо было установить тип торможения. Приведенные на рис. 2 данные по ингибированию липазы  $n$ -гексилборной кислотой (график построен по методу Диксона [18]) исключают неконкурентный тип торможения. Кроме того, численные значения констант ингибирования, полученные из рис. 2 и по данным рис. 1 (расчет для случая конкурентного типа ингибирования проводится по формуле

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{1}{K_i} \cdot \frac{K_{m(\text{вак})}}{K_{m(\text{вак})} + [S]_0},$$

где  $\operatorname{tg} \alpha$  — тангенс угла наклона прямой), совпадают. Это позволило сделать заключение о конкурентном типе ингибирования липазы борорганическими кислотами. Сопоставление значений  $K_i$  (см. таблицу) свидетельст-

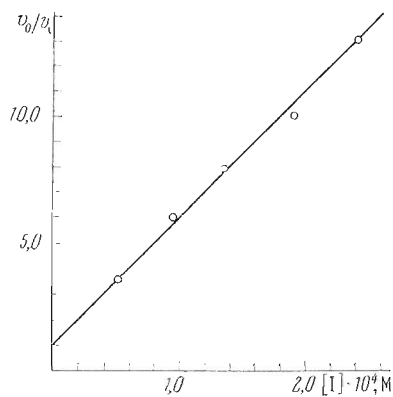


Рис. 1

Рис. 1. Ингибирование реакции липолиза трибутирина *n*-гексилборной кислотой при  $[S]_0 = 6,67 \cdot 10^{-3}$  М

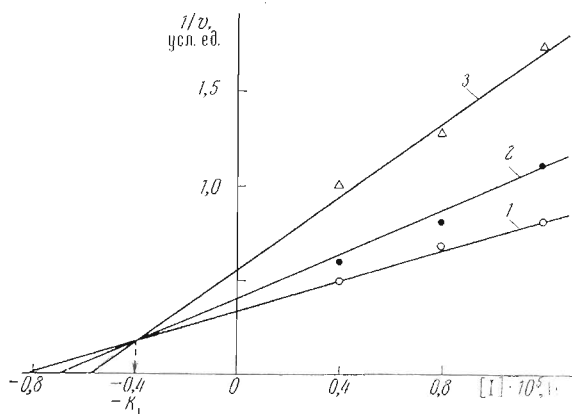


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость скорости липолиза трибутирина от концентрации *n*-гексилборной кислоты.  $[S]_0$  (М): 1— $6,67 \cdot 10^{-3}$ ; 2— $2,22 \cdot 10^{-3}$ ; 3— $1,33 \cdot 10^{-3}$

вует о том, что эффективность ингибирования липазы борорганическими кислотами в значительной степени зависит от величины и структуры углеводородной части ингибитора.

Из анализа зависимости констант ингибирования от размера углеводородного радикала в ряду *n*-алкилборных кислот (рис. 3) следует, что в интервале *n* от 2 до 8 наблюдается увеличение  $pK_i$  с ростом *n*; при переходе же от соединения с *n*, равным 8, к  $\text{H}(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{B}(\text{OH})_2$  с *n*, равным 9,  $pK_i$  не изменяется. По величине наклона графика вычислено, что для кислот со значениями *n* от 2 до 8 каждая  $\text{CH}_2$ -группа боковой цепи вносит в среднем в свободную энергию связывания  $\Delta\Delta F_i(\text{CH}_2)$  ( $\Delta\Delta F_i(\text{C}_6\text{H}_5) = -2,3 RT \lg (K_{i,(n-1)}/K_{i,(n)})$ ) величину, равную  $-700$  кал/моль. Найденное значение инкремента характерно для гидрофобных взаимодействий [19]. Точно такой же инкремент характерен для связывания липазой исследованных алифатических спиртов (рис. 3); это позволяет полагать, что спирты моделируют взаимодействие с липазой углеводородной части *n*-алкилборных кислот. То обстоятельство, что график зависимости  $pK_i$  от *n* для спиртов при экстраполяции не проходит через нулевую точку, можно объяснить влиянием гидроксильной группы. Приведенные на рис. 3 данные свидетельствуют о том, что ингибирующая способность боралкановых кислот значительно превышает ингибирующее действие соответствующих спир-

#### Константы ингибирования реакции липолиза трибутирина борорганическими кислотами

<i>n</i> -Алкилборные кислоты	$K_i \cdot 10^6, \text{ M}^{-1}$	Алкилборные кислоты	$K_i \cdot 10^6, \text{ M}^{-1}$
$\text{H}(\text{CH}_2)_2\text{B}(\text{OH})_2$	260	$\text{C}_6\text{H}_5\text{B}(\text{OH})_2$	5,8
$\text{H}(\text{CH}_2)_3\text{B}(\text{OH})_2$	59	$\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_2\text{B}(\text{OH})_2$	27
$\text{H}(\text{CH}_2)_4\text{B}(\text{OH})_2$	36	$\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_3\text{B}(\text{OH})_2$	16
$\text{H}(\text{CH}_2)_5\text{B}(\text{OH})_2$	12	$\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_4\text{B}(\text{OH})_2$	0,81
$\text{H}(\text{CH}_2)_6\text{B}(\text{OH})_2$	4,0		
$\text{H}(\text{CH}_2)_7\text{B}(\text{OH})_2$	1,0		
$\text{H}(\text{CH}_2)_8\text{B}(\text{OH})_2$	0,37		
$\text{H}(\text{CH}_2)_9\text{B}(\text{OH})_2$	0,33		

\* Приведенные значения  $K_i$  являются средними арифметическими из не менее чем 5 опытов.

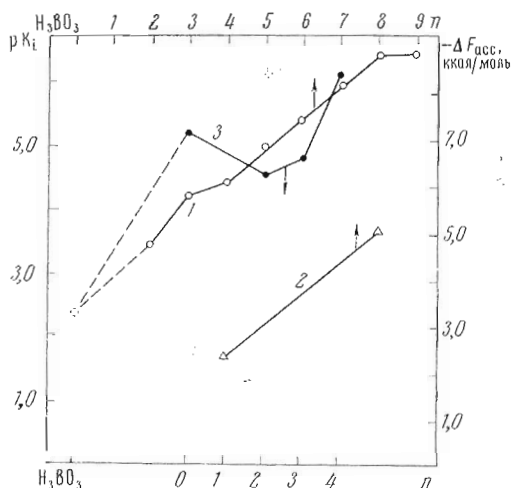


Рис. 3. Зависимость эффективности ингибирования реакции липолиза трибутирина от величины ( $n$ ) углеводородного радикала в молекулах  $n$ -алкилборных кислот  $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$  (1), алифатических спиртов  $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{OH}$  (2) и арилалкилборных кислот  $\text{Ph}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$  (3).  $\Delta F_{\text{асс}}$  — свободная энергия ассоциации фермента с ингибитором

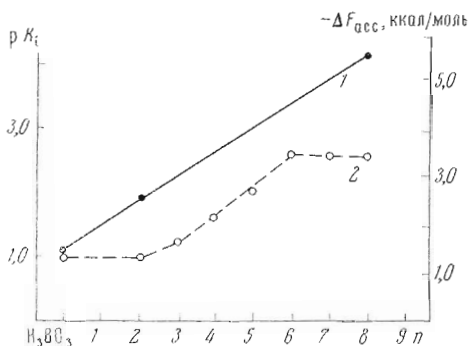


Рис. 4. Зависимость эффективности ингибирования ферментативной активности липазы (1) (субстрат —  $n$ -нитрофенилацетат) и  $\alpha$ -химотрипсина (2) [2] от величины ( $n$ ) углеводородного радикала в молекуле  $n$ -алкилборной кислоты  $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$

тов (различие в энергиях связывания составляет  $-3,8$  ккал/моль). Это различие следует отнести за счет высокой энергии связывания с ферментом боратного остатка алкилборной кислоты в гетерогенной системе.

Если предположить, что связывание алифатического радикала осуществляется на всем его протяжении, т. е. участки связывания боратного остатка и углеводородного радикала непосредственно примыкают друг к другу, то, экстраполируя кривую 1 на рис. 3 к  $n = 0$ , можно получить значение энергии связывания боратного остатка в алкилборной кислоте  $\Delta F = -3,4$  ккал/моль. Рассчитанное значение находится в хорошем соответствии с найденной разностью энергий связывания боралкапоновых кислот и алифатических спиртов, что говорит в пользу справедливости сделанного выше предположения.

Для экспериментальной проверки этого предположения необходимы данные о значении  $pK_1$  для борной кислоты в той же системе, т. е. при гидролизе липазой трибутирина. Однако используемый при этом метод рН-статирования оказывается неподходящим, поскольку при введении бор-

ной кислоты система приобретает большую буферную емкость. В связи с этим нами была использована другая система, предложенная ранее Дэньюэллом и сотр. [15], в которой в качестве субстрата применяется *n*-нитрофенилацетат; образование продукта гидролиза регистрируется спектрофотометрически.

Как видно из рис. 4, значения  $pK_1$  для борной и алкилборных кислот укладываются на прямую с инкрементом  $\Delta\Delta F_{i(\text{CH}_2)}$ , равным  $-525$  ккал/моль, что близко к величине, характеризующей гидрофобное взаимодействие. На том же рис. 4 для сравнения приведен график зависимости  $pK_1$  от величины *n* алкилборных кислот  $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$  для  $\alpha$ -химотрипсина, из которого, как установлено ранее [3, 4], следует, что в активном центре этого фермента участки связывания боратной группы и углеводородного радикала не примыкают непосредственно один к другому, а находятся на расстоянии, соответствующем длине цепи из трех метиленовых звеньев. Линейный характер зависимости, наблюдаемой для липазы, экспериментально подтверждает сделанное выше заключение о непосредственном примыкании участков связывания боратной группы и углеводородного радикала в ее активном центре.

Интересно сопоставить данные, полученные при ингибировании липазы в гомогенной и гетерогенной средах. В гомогенной системе (рис. 4) различие в энергиях связывания между октилборной и борной кислотами составляет 4,2 ккал/моль, что следует отнести за счет энергии связывания углеводородного остатка. Полученная величина удовлетворительно согласуется со значением энергии связывания октилового спирта в гетерогенной системе (рис. 3, 2). Это позволяет заключить, что эффективность связывания липазой углеводородного радикала в гомогенной и гетерогенной системах примерно одинакова. В то же время эффективность связывания борорганической кислоты в рассматриваемых системах сильно различается (например, для октилборной кислоты это различие составляет 3,2 ккал/моль), т. е. при взаимодействии липазы с мицеллами трибутирина увеличивается средство активного центра фермента к бифункциональному ингибитору.

Согласно развиваемым в последнее время представлениям, борорганические кислоты в активном центре серинового фермента моделируют переходное состояние субстрата [9, 20], образуя тетраэдрический аддукт с  $\gamma$ -кислородным атомом каталитически активного остатка серина. В настоящее время принято считать [21, 22], что активные центры ферментов обладают наибольшим сродством к субстратам именно в их переходном состоянии. Тогда увеличение эффективности ингибирования липазы борорганическими кислотами в гетерогенной системе можно объяснить конформационным изменением активного центра фермента, происходящим при взаимодействии его с поверхностью раздела фаз, в результате которого он становится комплементарным к тетраэдрическому аддукту. Подобная интерпретация позволяет объяснить также значительное увеличение скорости гидролиза субстратов в гетерогенной системе, а также увеличение каталитической активности липазы при действии ее на растворимые субстраты в присутствии силиконизированных стеклянных шариков [15, 23], т. е. активацию липазы на поверхности раздела фаз.

Сопоставляя данные по ингибированию липазы (рис. 3) и  $\alpha$ -химотрипсина (рис. 4) *n*-алкилборными кислотами, можно оценить размер участка гидрофобного связывания липазы. В то время как участок связывания у  $\alpha$ -химотрипсина имеет протяженность в три-четыре метиленовых звена [2], у липазы он значительно больше и может связать до восьми метиленовых звеньев (до  $n = 8$  наблюдается постоянный инкремент  $\Delta\Delta F_{i(\text{CH}_2)}$ ).

С целью получения дополнительной информации о топографии гидрофобного связывающего участка липазы было изучено ингибирующее действие на фермент аралкилборных кислот  $\text{Ph}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$ . Аралкилборные кислоты — эффективные ингибиторы липазы (рис. 3, 3), однако

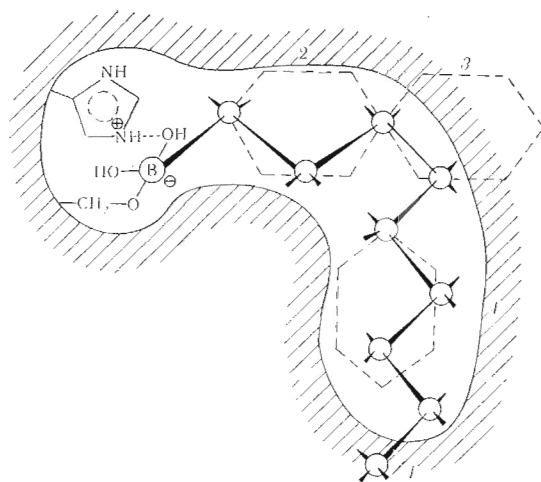


Рис. 5. Гипотетическая схема топографии активного центра панкреатической липазы. Вероятное расположение в активном центре липазы *n*-нонилборной (1), фенилборной (2), фенилэтилборной (3) и фенилбутилборной (4) кислот

их ингибирующее действие не подчиняется простой закономерности, отмеченной выше для *n*-алкилборных кислот (рис. 3, 1). Если бы связывание алкильной и арильной частей аралкильного радикала осуществлялось беспрепятственно на всем протяжении связывающего центра липазы, то при переходе от соединений с  $n = 0$  к соединениям с  $n = 4$  должно было бы наблюдаться линейное увеличение  $pK_i$  (с инкрементом  $\Delta\Delta F_{i(\text{CH}_2)} \approx -700$  кал/моль).

Наблюдаемая зависимость, однако, не является линейной; при этом  $\beta$ -фенилэтилборная кислота и  $\gamma$ -фенилпропилборная кислота ( $n = 2$  и 3 соответственно) оказываются более слабыми ингибиторами, чем фенилборная кислота ( $n = 0$ ). Известно [4], что в фенилборной кислоте связывающая способность боратного остатка выше, чем в фенилалкилборных кислотах; ожидаемая поправка, однако, относительно невелика. Наблюдаемый в эксперименте нелинейный ход графика зависимости  $pK_i$  от  $n$  в  $\text{Ph}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$  можно объяснить, исходя из предположения, что связывание фенильного радикала осуществляется с разной эффективностью на различном удалении от боратного остатка. Более того, на определенном участке гидрофобной зоны, по-видимому, имеется препятствие для связывания плоского бензольного кольца. Это препятствие может представлять собой изгиб гидрофобного связывающего участка, расположенный на удалении трех-четырех метиленовых звеньев от зоны связывания боратного остатка. В таком случае плоское бензольное кольцо, попадая в область изгиба, взаимодействует с ферментом менее эффективно; при этом может ухудшаться связывание алкильной цепи. При дальнейшем увеличении алкильной цепи бензольное кольцо попадает в зону, благоприятную для взаимодействия, и эффективности связывания аралкилборной и *n*-алкилборной кислот, содержащих радикалы примерно одинаковой длины, становятся весьма близкими (рис. 3).

В пользу предположения о наличии изгиба гидрофобного участка на удалении трех-четырех метиленовых звеньев от зоны связывания боратного остатка говорит также отклонение от линейности зависимости  $K_i$  от  $n$  для  $\text{H}(\text{CH}_2)_3\text{B}(\text{OH})_2$  при связывании алкилборных кислот (рис. 3, 1).

Результаты проведенного исследования позволяют высказать следующие предположения о взаимном расположении каталитического и сорбционного участков активного центра липазы и о размерах и форме последнего (рис. 5):

1) участок связывания боратной группы (каталитически активные остатки серина и гистидина) и участок гидрофобного связывания алкильной цепи субстрата непосредственно примыкают друг у другу;

2) протяженность гидрофобного связывающего участка примерно соответствует длине углеводородной цепи из восьми метиленовых звеньев;

3) на удалении трех-четырех метиленовых звеньев от каталитического центра гидрофобный связывающий участок имеет изгиб.

Согласно точке зрения, изложенной в работе [14], активный центр липа-

зы фиксирует только  $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C} \\ \diagdown \\ \text{O}- \end{array}$  -группировку триглицеридных субстратов и

не связывает их углеводородные цепи. Из предшествующего изложения следует, что мы рассматриваем гидрофобный участок липазы, связывающий углеводородные группы борорганических кислот, как адсорбционную зону активного центра фермента. В пользу этого представления можно привести ряд аргументов: а) непосредственное примыкание гидрофобного связывающего участка к каталитическому центру фермента; б) определенная геометрия этого участка (о чем свидетельствует характер ингибирования липазы аралкилборными кислотами); в) зависимость эффективности ингибирования липазы *n*-алкилборными кислотами от размера их углеводородного радикала при гидролизе *n*-нитрофенилацетата в гомогенной среде, т. е. в отсутствие гидрофобных поверхностей раздела. В пользу рассматриваемого представления говорит также установленный нами конкурентный характер ингибирования липазы борорганическими кислотами при гидролизе трибутирила.

Заслуживает дополнительного обсуждения вопрос о размерах гидрофобного связывающего участка активного центра липазы. Как отмечалось выше, обнаруженный нами участок связывает углеводородную цепь из восьми метиленовых звеньев. Можно предположить, что это единственный гидрофобный связывающий участок активного центра липазы. Эффективность связывания субстрата в этом центре достаточно велика для образования стабильного фермент-субстратного комплекса. Наряду с этим остающиеся в жирной фазе мицеллы фрагменты углеводородной цепи облегчают последующий уход освобождающейся жирной кислоты на поверхность раздела фаз.

Нельзя исключить другое предположение, согласно которому адсорбционная зона активного центра липазы имеет дополнительную область гидрофобного связывания для более удаленных метиленовых групп ацильного радикала субстрата. Несомненно, однако, что в таком случае между рассматриваемыми зонами (в области 9—10 метиленовых звеньев) должен находиться участок, в котором гидрофобное взаимодействие не осуществляется. Интересно отметить, что в состав природных триглицеридов, расщепляемых панкреатической липазой, обычно входят ненасыщенные жирные кислоты, у которых первая двойная связь располагается не ближе  $C_{(9)}$ -атома, т. е. именно в той области, где мы постулируем зону отсутствия гидрофобного связывания.

Таким образом, полученные нами, а также литературные данные позволяют сделать заключение, что борорганические кислоты являются ценным инструментом для изучения топографии активных центров и механизма действия группы серин-гистидиновых ферментов, в том числе липазы.

### Экспериментальная часть

Препарат панкреатической липазы (КФ 3.1.1.3) (смесь изоферментов  $L_A$  и  $L_B$ , не различающихся по каталитическим свойствам) получали по методике Дэньюэлла и сотр. [20]. Активность препарата на стадии делипидизации соответствовала активности, приведенной в работе [20] для ана-

логичного препарата. Полученный на последней стадии очистки препарат липазы, по данным электрофореза в полиакриламидном геле, являлся практически гомогенным. При этом было достигнуто увеличение удельной активности фермента в 30 раз по сравнению с активностью препарата на стадии делипидизации. Следует отметить, что операция лиофильного высушивания приводит к значительной потере ферментативной активности.

Субстраты: трибутирин  $C_{15}H_{26}O_6$  квалификации ч., препарат Ереванского завода химреактивов, очищали перегонкой в вакууме, т. кип.  $190^\circ/15$  мм рт. ст. [21], *n*-нитрофенилацетат  $C_8H_7NO_4$  синтезировали по методике [22], т. пл.  $80-81^\circ$ .

Ингибиторы: борорганические кислоты,  $H(CH_2)_nB(OH)_2$  ( $n = 2-9$ ) и  $C_6H_5(CH_2)_nB(OH)_2$  ( $n = 2-4$ ), синтезированы по методикам, приведенным в работе [3], фенилборная кислота  $C_6H_5B(OH)_2$  — препарат фирмы «Schuchart» (ФРГ).

Ацетонитрил очищали по методике [23], остальные реактивы и растворители применяли без дополнительной очистки.

*Кинетические измерения.* Измерения начальных скоростей ферментативного гидролиза трибутирина проводили методом потенциометрического титрования при постоянном рН (рН-стат ТТТ-1с, «Radiometer», Дания). Сущность метода заключается в титровании выделяющейся в результате реакции кислоты раствором щелочи определенной концентрации.

Реакцию проводили в полиэтиленовой кювете. Объем реакционной смеси 5,1 мл. Начальные концентрации субстрата  $(0,6-1,0) \cdot 10^{-2}$  М; фермента —  $10^{-7}-10^{-8}$  М; рН 7,5;  $20^\circ$ , 0,1 М NaCl, 10% (по объему)  $CH_3OH$ .

Исходную эмульсию субстрата готовили непосредственно перед использованием путем эмульгирования рассчитанного количества трибутирина в растворе, содержащем 0,2 М NaCl и 10% (по объему)  $CH_3OH$ , при помощи ультразвукового генератора типа УЗДН-1 У4.2 в течение 0,5—1 мин при 44 кГц.

В кювету титратора вносили 2,5 мл эмульсии субстрата и 2,5 мл 10%-ного водного раствора  $CH_3OH$  (или соответствующий объем раствора ингибитора в 10%-ном  $CH_3OH$ ), доводили рН до нужного значения, после чего добавляли 0,1 мл раствора липазы.

В опытах по определению типа ингибирования (рис. 2) реакцию проводили в стеклянной кювете в объеме 10,1 мл, остальные условия те же.

За реакцией ферментативного гидролиза *n*-нитрофенилацетата (рис. 4) следили с помощью самопишущего двухлучевого спектрофотометра «Spectord» (ГДР), измеряя скорость образования *n*-нитрофенолят-иона (рН 7,5; 0,05 М трис-НСl-буфер, 0,1 М NaCl,  $20^\circ$ , 10%-ный водный  $CH_3OH$ ). Реакцию проводили в кварцевой кювете толщиной 1 см, регистрировали изменение поглощения при 400 нм в условиях  $[E]_0 \ll [S]_0$ . В кюветы спектрофотометра вносили по 2 мл буфера, содержащего 10%-ный  $CH_3OH$ , 0,8 мл 10%-ного  $CH_3OH$  (или соответствующий объем раствора ингибитора в 10%-ном  $CH_3OH$ ) и 0,2 мл раствора липазы (в рабочую кювету) или 0,2 мл воды (в кювету сравнения). Растворы перемешивали и добавляли по 0,15 мл 0,13 М раствора *n*-нитрофенилацетата в ацетонитриле.

Авторы выражают благодарность А. М. Шкробу за полезное обсуждение результатов работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. К., Иванина Т. В., Березин И. В., Мартинек К. (1968) Докл. АН СССР, 183, 1435—1438.
2. Antonov V. K., Ivanina T. V., Berezin I. V., Martinek K. (1970) FEBS Lett., 7, 23—25.
3. Антонов В. К., Иванина Т. В., Березин И. В., Мартинек К. (1970) Молекулярная биология, 4, 558—569.
4. Antonov V. K., Ivanina T. V., Ivanova A. G., Berezin I. V., Levashov A. V., Martinek K. (1972) FEBS Lett., 20, 37—40.



5. Ротанова Т. В., Воротынцева Т. И., Бакарджиева А., Генев Н. (1973) Материалы Всесоюзного симпозиума по химии протеолитических ферментов, с. 102, Вильнюс.
6. Philipp M., Bender M. L. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 478—480.
7. Nakatani H., Hanai K., Uehara Y., Hiroimi K. (1975) J. Biochem. (Tokyo), 77, 905—908.
8. Koehler K. A., Hess G. P. (1974) Biochemistry, 13, 5345—5350.
9. Rawn J. D., Lienhard G. E. (1974) Biochemistry, 13, 3124—3130.
10. Березня И. В., Коломийцева Г. Я., Мартинек К. (1967) Молекулярн. биология, 1, 425—435.
11. Desnuelle P., Smeriva M., Dufour C. (1974) Biochemistry, 10, 2143—2149.
12. Maylić M. F., Charles M., Desnuelle P. (1972) Biochim. et biophys. acta, 276, 162—175.
13. Brockerhoff H. (1973) Chem. and Phys. Lipids, 10, 215—222.
14. Brockerhoff H. (1970) Biochim. et biophys. acta, 212, 92—101.
15. Smeriva M., Chapus C., Bovier-Lapierre C., Desnuelle P. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 58, 808—813.
16. Maylić M. F., Charles M., Astier M., Desnuelle P. (1973) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 52, 291—297.
17. Benzonana G., Desnuelle P. (1965) Biochim. et biophys. acta, 105, 121—136.
18. Диксон М., Уэбб Э. (1966) в кн. Ферменты, с. 291—292, «Мир», М.
19. Мартинек К., Левашов А. В., Березня И. В. (1970) Молекулярн. биология, 4, 517—528.
20. Robillard G., Schulman R. G. (1974) J. Mol. Biol., 86, 541—558.
21. Pauling L. (1948) Amer. Sci., 36, 58—61.
22. Lienhard G. E. (1973) Science, 180, 149—155.
23. Brockman H. L., Law J. H., Kézdy F. J. (1973) J. Biol. Chem., 248, 4965—4970.
24. Verger R., de Haas G. H., Sarda L., Desnuelle P. (1969) Biochim. et biophys. acta, 188, 272—282.
25. Weatherby L. S., Ilvaine Mc. L., Matlin D. (1925) J. Amer. Chem. Soc., 47, 2250—2252.
26. Kaufmann A. (1909) Ber. Dtsch. Chem. Ges., 42, 3480—3483.
27. Lewis H. F., Smyth C. P. (1939) J. Chem. Phys., 7, 1085—1087.

Поступила в редакцию  
13.X.1975

После переработки  
4.XII.1975

## STUDIES ON THE ACTIVE SITE TOPOGRAPHY OF PANCREATIC LIPASE WITH ORGANO-BORONIC ACIDS AS BIFUNCTIONAL REVERSIBLE INHIBITORS

ROTANOVA T. V., CLAUS R., IVANOVA A. G.,  
GINODMAN L. M., ANTONOV V. K.

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

The hydrolysis of tributyrin and *p*-nitrophenyl acetate by pancreatic lipase has been studied in the presence of boronic acids of general formula  $H(CH_2)_n B(OH)_2$  ( $n = 2-9$ ) and  $Ph(CH_2)_n B(OH)_2$  ( $n = 0, 2, 3, 4$ ). Alkyl and aralkylboronic acids were shown to be effective bifunctional reversible inhibitors of the enzyme. The  $pK_1$  values of *n*-alkylboronic acids are linearly dependent on their chain length ( $n = 2-8$ ), an increment of the free energy of binding being 700 cal/mole which is characteristic of hydrophobic interactions. The lipase inhibition by aralkylboronic acids is of more complex character. The data obtained provided a basis for the scheme which implies that the sorption site corresponds to 8 methylene groups of the inhibitor molecule and is adjacent to the catalytic site. Some hindrance for binding the planar benzene ring appears to exist in the middle of the sorption site.