



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.153.2.02

СВЯЗЬ МЕЖДУ «ЦЕНТРОМ АКТИВАЦИИ» И КАТАЛИТИЧЕСКИМ
ЦЕНТРОМ В ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЕ

Антонов В. К., Гинодман Л. М., Ротанов Т. В.,
Нуцубидзе Н. Н.

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

Недавно [1] было показано, что активация панкреатической липазы (КФ 3.1.1.3) на границе раздела фаз обусловлена наличием «центра активации», в состав которого входят остатки дикарбоновой аминокислоты и серина. Модифицирование последнего диэтил-*n*-нитрофенилфосфатом (Е-600) приводит к утрате ферментом способности сорбироваться на границе раздела фаз и, по-видимому, вследствие этого гидролизовать мицеллярные субстраты. Однако активность по водорастворимым субстратам — *n*-нитрофенилацетату и триацетину — сохраняется [1].

Известно также, что остаток серина входит в каталитический центр липазы, образуя, как и в случае сериновых протеиназ, серин-гистидиновую пару. Это следует из опытов по ингибированию липазы борной и борорганическими кислотами [2] — специфическими обратимыми ингибиторами сериновых гидролаз [3—13], а также из способности фермента образовывать неактивное ацетилпроизводное при действии *n*-нитрофенилацетата [14].

Таким образом, следует полагать, что в липазе имеется два существенных для активности остатка серина: один — ответственный за катализ и второй — ответственный за сорбцию фермента на границе раздела фаз. Представлялось интересным установить пространственные отношения между этими группами в молекуле фермента.

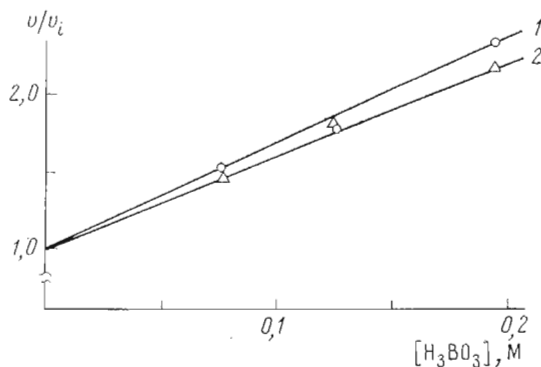
При работе с препаратом липазы, модифицированным фосфорорганическим ингибитором Е-600, были получены следующие результаты:

1) липаза, модифицированная Е-600, сохраняет активность по *n*-нитрофенилацетату (ср. [1]), однако эта активность ингибируется борной кислотой в той же степени, что и активность по этому субстрату нативного фермента ($K_i = (1,4 \pm 0,6) \cdot 10^{-1}$ и $(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^{-1}$ М соответственно для модифицированного и нативного фермента) (рисунок). Отсюда следует, что каталитически активный остаток серина не затрагивается модифицированием Е-600;

2) этилборная и гексилборная кислоты не ингибируют гидролиз *n*-нитрофенилацетата ферментом, модифицированным Е-600. Модификация фермента создает, очевидно, пространственные препятствия для присоединения алкилборных кислот с объемистым алкильным радикалом;

3) фермент, модифицированный Е-600, сохраняющий способность гидролизовать *n*-нитрофенилацетат, теряет активность в отношении *n*-нитрофениловых эфиров масляной и капроновой кислот, в то время как нативный фермент гидролизует последние быстрее, чем *n*-нитрофенилацетат [15].

Ингибирование гидролиза *p*-нитрофенилацетата борной кислотой. 1 — нативный фермент, 2 — фермент, модифицированный E-600. Условия определения: 0,1 М Трис-HCl-буфер, pH 7,5; 0,1 М NaCl, 25°, 4% CH₃CN, [S]₀ 3,12 · 10⁻³ М



Из приведенных данных следует, что остатки серина, ответственные за катализ и активацию фермента на границе раздела фаз, расположены в молекуле липазы достаточно близко. Модификация второго из них не только приводит к потере способности фермента сорбироваться на границе раздела фаз, но и препятствует подходу к каталитическому центру субстратов и ингибиторов с объемистым алкильным радикалом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Charus C., Sémériva M. (1976) *Biochemistry*, 15, 4988—4991.
2. Ротанова Т. В., Клаус Р., Иванова А. Г., Гинодман Л. М., Антонов В. К. (1976) *Биоорг. химия*, 2, 837—845.
3. Антонов В. К., Иванова Т. В., Березин И. В., Мартинек К. (1968) *Докл. АН СССР*, 183, 1435—1438.
4. Antonov V. K., Ivanina T. V., Berezin I. V., Martinek K. (1970) *FEBS Lett.*, 7, 23—25.
5. Антонов В. К., Иванова Т. В., Березин И. В., Мартинек К. (1970) *Молекуляр. биология*, 4, 558—569.
6. Antonov V. K., Ivanina T. V., Ivanova A. G., Berezin I. V., Levashov A. V., Martinek K. (1972) *FEBS Lett.*, 20, 37—40.
7. Rotanova T. V., Ivanova A. G., Antonov V. K., Rakadjieva A., Blagoev B. (1976) *Int. J. Peptide Protein Res.*, 8, 225—231.
8. Philipp M., Bender N. L. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68, 478—480.
9. Nakatani H., Hanai K., Uehara Y., Hiromi K. (1975) *J. Biochem. (Tokyo)*, 77, 905—908.
10. Lindquist R. N., Terry C. (1974) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 160, 135—144.
11. Matthews D. A., Alden R. A., Birktoft J. J., Freer S. I., Kraut J. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 7120—7126.
12. Koehler K. A., Hess G. P. (1974) *Biochemistry*, 13, 5345—5350.
13. Швидас В.-Ю. К., Клесов А. А., Березин И. В., Ротанова Т. В., Васильева Н. В., Гинодман Л. М., Антонов В. К. (1976) Тезисы III Всесоюзного симпозиума «Структура и функции активных центров ферментов», с. 25, «Наука», М.
14. Sémériva M., Charus C., Bovier-Lapierre C., Desnuelle P. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 58, 808—813.
15. Charus C., Sémériva M., Bovier-Lapierre C., Desnuelle P. (1976) *Biochemistry*, 15, 4980—4987.

Поступило в редакцию 22.VIII.1977

A RELATION BETWEEN THE «ACTIVATION SITE» AND CATALYTIC SITE IN PANCREATIC LIPASE

ANTONOV V. K., GINODMAN L. M., ROTANOVA T. V., NUTSUBIDZE N. N.

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

It has been found that the *p*-nitrophenyl acetate hydrolysis by the native or diethyl-*p*-nitrophenyl phosphate (E-600) modified pancreatic lipase is equally inhibited by boric acid. Ethylboronic and hexylboronic acids failed to inhibit the modified enzyme which does not hydrolyze *p*-nitrophenyl butyrate and *p*-nitrophenyl caproate. It is concluded that a serine residue (which reacts with E-600) in the «activation site» and the catalytic serine are positioned very closely in the enzyme active site.