



УДК 577.152.342'102/104

© 1991 г.

*Д. Э. Хоштария, Н. Г. Гогоадзе, Е. Ульstrup \****КИНЕТИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ КОНФОРМАЦИОННОЙ ДИНАМИКИ, СОПРОВОЖДАЮЩЕЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ БЕНЗОИЛГЛИЦИЛФЕНИЛЛАКТАТА КАРБОКСИПЕПТИДАЗОЙ А***Институт неорганической химии и электрохимии АН Грузии, Тбилиси;  
\* Отделение химии А, Датский технический университет, Лингби*

Изучено влияние температуры, вязкости и Н—D-изотопного замещения среды на кинетические параметры гидролиза О-(бензоилглицил)-L-β-фениллактата карбоксипептидазой А. В области 15—50°С каталитическая константа скорости  $k_{\text{cat}}$  четко описывается уравнением Аррениуса с эффективной энергией активации  $E_a = 45,5$  кДж/моль, а в широкой области значений вязкости (0,9—43,9 мПа·с, 25°С) в водно-сахарозных растворах (0—60 мас.%) обнаруживает степенную зависимость с показателем степени —0,65. В водно-глицериновых растворах наблюдается заметное отклонение от этой зависимости, вызванное специфическим взаимодействием молекул глицерина с каталитическими группами активного центра фермента. Замена H<sub>2</sub>O на D<sub>2</sub>O в качестве растворителя приводит к кинетическому изотопному эффекту  $k_{\text{cat}}^{\text{H}}/k_{\text{cat}}^{\text{D}} \approx 1,20$ , вероятно обусловленному изменением вязкости раствора. Кажущаяся константа Михаэлиса ( $K_m$ ) под воздействием перечисленных факторов практически не меняется (исключение составляют водно-глицериновые растворы).

Полученные данные проанализированы на основе современных теоретических представлений о механизме элементарного химического акта. Сделан вывод о конформационно-неадиабатической природе скоростьопределяющей стадии — предположительно образования тетраэдрического аддукта с участием остатка (Glu-270) фермента и карбонила сложноэфирной группы субстрата.

Карбоксипептидаза А (КФ 3.4.12.2) — один из самых интенсивно исследуемых и в то же время «загадочных» ферментов [1—10]. Несмотря на успехи рентгеноструктурного анализа [2, 7—13] и различных комбинированных методов исследования структуры и функции [14—19], разнообразие имеющихся кинетических данных [20—25], свойства этого фермента не поддаются простой и однозначной интерпретации, как, например, в случае сериновых и тиоловых гидролаз [4, 5]. В частности, различное кинетическое поведение фермента в процессе гидролиза пептидных и сложноэфирных субстратов привело к предположению о различии каталитических механизмов этих превращений [2—9]. Кроме того, было высказано предположение о различии в скоростьопределяющих стадиях при гидролизе сложноэфирных субстратов различной степени специфичности [8, 25]. Однако при этом остается неясной роль таких основных компонентов активного центра, как Glu-270 и Tyr-248, а также иона Zn<sup>2+</sup>. Неясно также, какую роль в катализе играют обнаруженные методом рентгеноструктурного анализа конформационные изменения, сопровождающие элементарные химические превращения [2, 7—13].

Гэвиш [26, 27] и Фрауенфельдер с сотр. [28, 29] разработали феноменологический подход, позволяющий детектировать конформацион-

Работа выполнена в рамках совместной научной программы ОХА ДТУ и ИНХЭЛ АН Грузии с участием лаборатории бионеорганической химии (Лингби) и лаборатории теоретических исследований им. Р. Р. Догондзе (Тбилиси). Использованы следующие нестандартные сокращения: CPLA — О-(транс-циннамойл)-L-β-фениллактат, HPLA — О-(бензоилглицил)-L-β-фениллактат или О-гиппурил-L-β-фениллактат, КИЭ — кинетический изотопный эффект.

ную динамику белка в ходе его функционирования. Суть этого подхода заключается в исследовании зависимости константы скорости элементарной биохимической стадии от изменения вязкости среды (растворителя). Однако соответствующие константы скорости не всегда обнаруживают вязкостную зависимость [28, 30, 31]. Общая ситуация здесь в основном аналогична ситуации для простых гомогенных или электрохимических процессов, где также наблюдалась зависимость константы скорости элементарного химического акта от вязкости среды ( $\eta$ ) или от дебаевского времени релаксации молекул растворителя ( $\tau_D$ ) ( $\eta \sim \tau_D$ ) [32—35]. Общий вид феноменологического выражения зависимости константы скорости (каталитической константы) химического (биохимического) процесса от вязкости среды дается формулой

$$k = A\eta^{-\delta} \exp(-E_a^*/RT), \quad (1)$$

где  $A$  — предэкспоненциальный множитель,  $E_a^*$  — «внутренняя» энергия активации ( $A$  и  $E_a^*$  не зависят от вязкости среды);  $\delta$  — параметр, принимающий в зависимости от механизма элементарного акта процесса значения от 0 до 1. Случай  $\delta = 0$  соответствует отсутствию вязкостной зависимости и, следовательно, интерпретируется в рамках традиционной теории абсолютных скоростей реакций [35]. Случай  $\delta = 1$  соответствует так называемому диффузионному пределу в теории Крамерса [36]. Ситуация же с  $0 < \delta < 1$  характерна в большей степени для систем, где химические превращения протекают вблизи границы раздела фаз (биохимические и электрохимические реакции), и отражает закономерность передачи вязкостных характеристик из гомогенной фазы в приграничные слои [27, 28, 33].

В работах [30, 31, 37—41] элементарный акт биохимических процессов с учетом роли конформационных степеней свободы белка был рассмотрен на основе более современных теоретических представлений: квантово-статистической теории (теории возмущений, или золотого правила) [42, 43] и стохастической квантовой теории (теории сильного взаимодействия) [44, 45] элементарного химического акта. В частности, в работе [40] был обобщен ранее предложенный критерий проявления вязкостной зависимости [45] в виде

$$\frac{4\pi V^2 \lambda}{\hbar \tilde{\nu} E_r} \gg 1; \quad \tilde{\nu} = \tau_k^{-1} (\epsilon_s/\epsilon_0), \quad (2)$$

где  $V$  — энергия резонансного взаимодействия квантовых частиц (если таковые участвуют в процессе),  $\lambda$  — фактор туннелирования квантовых частиц (если таковые участвуют в процессе),  $\epsilon_s$ ,  $\epsilon_0$  — статическая и оптическая диэлектрические проницаемости среды,  $E_r$  — энергия реорганизации полярной среды, связанная с перераспределением заряда в элементарном биохимическом акте,  $\tau_k$  — характерное время релаксации фрагментов фермент-субстратного комплекса вдоль конформационной координаты реакции. Согласно [40, 45], при выполнении неравенства (2) константа скорости выражается формулой

$$k = A' \tau_k^{-1} \exp(-E_a^*/RT), \quad (3)$$

которая превращается в соотношение (1), если принять, что  $\tau_k = \beta \tau_D^\delta \sim \eta^\delta$  [40].

В настоящей работе исследовано влияние температуры, вязкости и изотопного замещения ( $H_2O$  на  $D_2O$ ) среды на кинетические параметры ( $k_{cat}$  и  $K_m$ ) реакции гидролиза *O*-(бензоилглицил)-*L*- $\beta$ -фениллактата (HPLA) карбоксипептидазой А. Полученные данные проанализированы на основе современных теоретических представлений о механизме элементарного химического (биохимического) акта.

Температурная зависимость данной реакции была исследована ранее лишь в узком температурном интервале (20—35 °C) [20]. Нами обнаружено, что в широкой области температур (15—50 °C) каталитическая константа проявляет прямолинейную зависимость в координатах Аррениуса (рис. 1). Полученные значения эффективной энергии активации  $E_a =$

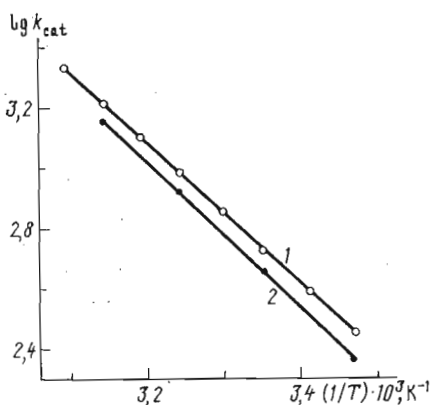


Рис. 1. Зависимости  $k_{\text{cat}}$  от температуры для процесса гидролиза HPLA карбоксипептидазой А в  $\text{H}_2\text{O}$  (1) и  $\text{D}_2\text{O}$  (2)

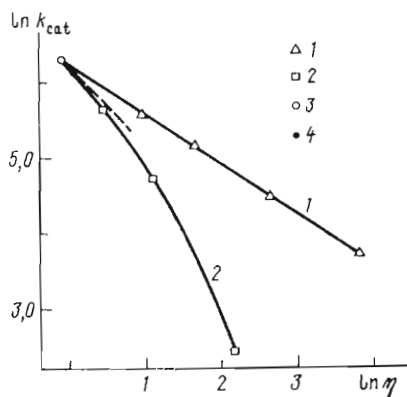


Рис. 2. Зависимости  $k_{\text{cat}}$  от вязкости водно-сахарозных (1) и водно-глицериновых растворов (2). Для сравнения приведены значения  $k_{\text{cat}}$  в чистой  $\text{H}_2\text{O}$  (3) и  $\text{D}_2\text{O}$  (4)

$= 45,5$  кДж/моль, а также каталитической константы  $k_{\text{cat}} = 526 \text{ с}^{-1}$  ( $25^\circ \text{C}$ ) и кажущейся константы Михаэлиса  $K_m = (5,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-4} \text{ M}$  (средняя величина в интервале  $15\text{--}50^\circ \text{C}$ ) хорошо согласуются с литературными данными [20—22, 24]. Найденное нами значение КИЭ  $k_{\text{cat}}^{\text{H}}/k_{\text{cat}}^{\text{D}} \approx 1,2 \pm 0,05$  (по данным рис. 1) по величине существенно меньше типичных значений, характерных для первичного КИЭ  $\sim 2\text{--}4$  [4, 6, 38, 46, 47] (см. ниже). В растворах  $\text{D}_2\text{O}$  были получены следующие значения параметров:  $k_{\text{cat}} = 438 \text{ с}^{-1}$  ( $25^\circ \text{C}$ ),  $E_a = 46,6$  кДж/моль,  $K_m = (4,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-4} \text{ M}$  (средняя величина в интервале  $15\text{--}45^\circ \text{C}$ ).

В водно-сахарозных растворах (0, 30, 40 и 60 масс.%,  $25^\circ \text{C}$ ) в широкой области значений вязкости (0,9—43,9 мПа·с, значения взяты из [48])  $k_{\text{cat}}$  подчиняется степенной зависимости  $k_{\text{cat}} \sim \eta^{-\delta}$  типа (1) с показателем  $\delta = 0,65$  (на рис. 2 эта зависимость представлена в логарифмических координатах). В водно-глицериновых растворах (20, 40, 60 масс.%,  $25^\circ \text{C}$ ) в области значений вязкости, 0,9—3,3 мПа·с зависимость в логарифмических координатах приблизительно линейна с аномальным (с точки зрения зависимости (1)) значением  $\delta = 1,20$  и при увеличении концентрации глицерина резко отклоняется от прямой (рис. 2, 2). В 80% растворе глицерина кинетические измерения провести не удалось из-за чрезвычайно низкой скорости гидролиза.

На основе вышеизложенных данных можно прийти к выводу, что исследованный нами процесс проявляет избирательность относительно природы добавляемого вязкого агента. Для исследованного ранее в работах [27, 49] процесса гидролиза карбоксипептидазой А трипептидного субстрата Cbz-Ala-Ala-Ala (в водно-метанольных и водно-глицериновых растворах) наблюдалась аномалия другого типа — выпадение из общей вязкостной зависимости ( $\delta = 0,76$ ) точки, соответствующей нулевой концентрации метанола и глицерина. Для сравнения можно отметить, что константы скорости, соответствующие элементарным стадиям внутренней диффузии различных лигандов внутри молекулы миоглобина, проявляли зависимость от вязкости среды независимо от природы применяемого вязкого агента [28]. По-видимому, рыхлость активных центров ферментов, находящихся вблизи границы белок—среда, создает условия для проявления избирательности относительно вязких агентов (если, разумеется, вязкостная зависимость вообще наблюдается). Так, меньшие по размерам молекулы глицерина могут располагаться ближе к каталитически важным группам и в большей степени замедлять характерные времена их конформационной релаксации. Этому будут соответствовать большие значения параметра  $\delta$  ( $\delta \rightarrow 1$ , см. также данные по кинетическому изотопному эффекту). Что касается аномального значения  $\delta = 1,20$  и отклоне-



ния вязкостной зависимости от линейности в логарифмических координатах для водно-глицериновых растворов, можно полагать, что глицерин помимо «вязкого» влияния оказывает дополнительное специфическое воздействие на процесс, возможно, путем блокирования групп, ответственных за «правильное» связывание данного субстрата. Такое предположение подтверждается также анализом величины  $K_m$ . При повышении концентрации глицерина значение этой константы начинает отклоняться от обычного значения  $(5,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$  М и в 40% глицериновом растворе составляет  $9,1 \cdot 10^{-4}$  М, а в 60% растворе — уже  $1,4 \cdot 10^{-3}$  М. Здесь следует отметить, что снижение мольной доли  $H_2O$  в водно-сахарозных и водно-глицериновых растворах не может быть причиной уменьшения  $k_{cat}$ , так как данные по кинетическому изотопному эффекту свидетельствуют против участия молекулы (молекул) воды в скоростьопределяющей стадии процесса (см. ниже).

Рассмотрим теперь данные по влиянию изотопного замещения ( $H_2O$  на  $D_2O$ ) среды на исследуемый ферментативный процесс. В литературе имелись лишь ссылки на неопубликованные данные по кинетическому изотопному эффекту (КИЭ) гидролиза НРЛА карбоксипептидазой А:  $k_{cat}^H/k_{cat}^D \sim 2$  (см. [7, 8]). В этом плане неожиданной оказалась полученная нами для температурного интервала 15—45° С величина  $k_{cat}^H/k_{cat}^D \approx 1,2 \pm 0,05$  (по данным рис. 1). В то же время для реакции гидролиза карбоксипептидазой А другого (менее специфического) сложноэфирного субстрата О-(транс-циннамоил)-L-β-фениллактата (СРЛА) ранее было надежно установлено наличие более существенного КИЭ ( $\approx 2$ ) [23]. Профили рН-зависимости  $k_{cat}$  для гидролиза рассматриваемых субстратов существенно различаются. Согласно данным [24],  $k_{cat}$  гидролиза НРЛА в области рН 5—10 рН-независима, тогда как для  $k_{cat}$  гидролиза СРЛА в этой же области наблюдаются два перегиба, обусловленные ионогенными группами с  $pK_1 \approx 6,5$  и  $pK_2 \approx 9,5$  [25].

Данные для КИЭ в совокупности с данными по рН-профилям  $k_{cat}$  убедительно свидетельствуют в пользу наличия различных скоростьопределяющих стадий гидролиза двух исследованных сложноэфирных субстратов. Величина КИЭ  $\approx 2$  согласуется с возможным переносом протона на скоростьопределяющей стадии (общесосновной катализ с сопряженным переносом протона от молекулы  $H_2O$  — протонированного нуклеофила). Такой механизм характерен для хорошо описанного процесса дезацилирования ацилпроизводных α-химотрипсина и других сериновых гидролаз [4, 6, 38, 47]. Отсутствие первичного КИЭ в случае гидролиза НРЛА свидетельствует в пользу того, что скоростьопределяющей стадией является нуклеофильная атака карбонильного атома С субстрата депротонированной формой остатка Glu-270 молекулы фермента (с  $pK_a \sim 4$ , типичной величиной для нормальной γ-карбоксильной группы) [24]. рН-Независимость параметра  $k_{cat}$  того же субстрата в области рН 5—10 также согласуется с данным предположением.

Важный, на наш взгляд, вывод вытекает из сопоставления данных по влиянию  $D_2O$  и изменения вязкости среды на каталитические константы. Принимая во внимание, что вязкость  $D_2O$  превосходит вязкость  $H_2O$  в  $\approx 1,2$  раза (при 25° С) и учитывая обнаруженную нами зависимость  $k_{cat}$  гидролиза НРЛА карбоксипептидазой А от η, можно предположить, что наблюдаемый нами КИЭ в основном обусловлен увеличением вязкости среды при переходе к  $D_2O$ . На рис. 2 точка, соответствующая значению  $k_{cat}$  в  $D_2O$ , приблизительно попадает на прямую с наклоном  $\delta = 1$ . Это обстоятельство можно объяснить в рамках уже обсуждаемого выше представления об избирательной чувствительности исследуемого процесса к типу молекул, увеличивающих вязкость.

Таким образом, несмотря на некоторое различие в закономерности влияния добавок сахарозы и глицерина на каталитическую константу исследованного ферментативного процесса, наблюдаемые вязкостные эффекты следует отнести к кинетическому проявлению конформационной динамики фермент-субстратного комплекса, сопровождающей гидролити-

ческий процесс. Согласно ранее предложенной терминологии [30, 37], данный процесс надо рассматривать как конформационно-неадиабатический и к нему можно применить соответствующий теоретический подход (1м. формулы (2), (3)) [40]. Формулу (3) можно представить в более строгом виде [31, 44, 45]:

$$k = \frac{\varepsilon_s}{4\varepsilon_0} \left( \frac{E_r}{\pi k_b T} \right)^{1/2} \tau_k^{-1} \exp(-E_a^*/RT), \quad (4)$$

где  $k_b$  — константа Больцмана,  $E_r$  — энергия реорганизации среды [42, 43].

Как уже отмечалось выше, параметр  $E_a^*$  в выражении (4) не зависит от вязкости среды и, следовательно, отличается от эффективной энергии активации процесса  $E_a$ . Если учесть, что энергия активации (температурный коэффициент) вязкости воды ( $H_2O$ ) в области 15—30° С составляет  $E_\eta = 15,7$  кДж/моль [50], можно оценить внутреннюю энергию активации процесса, обусловленного движением вдоль классических «химических» координат реакции (не зависящую от  $\eta$ ):  $E_a^* = E_a - \delta E_\eta = 45,5 - 0,65 \cdot 15,7 = 35,3$  (кДж/моль)\*. Подставляя в формулу (4) полученное значение  $E_a$  и соответствующие значения остальных параметров ( $E_r$ ,  $\varepsilon_s$ ,  $\varepsilon_0$ ), а также используя экспериментальную величину  $k_{cat} = 526$  с<sup>-1</sup>, можно получить значение характерного времени релаксации вдоль конформационной координаты реакции  $\tau_k \sim 4 \cdot 10^{-9}$  с (25° С,  $H_2O$ ). Эта величина лежит в пределах разумных значений для времен релаксации фрагментов белковых молекул [31, 40], однако существенно отличается от полученной ранее величины для гидролиза карбоксипептидазой А трипептида Cbz-Ala-Ala-Ala ( $\sim 10^{-7}$  с). Это обстоятельство дополнительно указывает на существование различий в механизмах гидролиза пептидных и сложноэфирных субстратов карбоксипептидазой А.

Полученные в данной работе результаты также сопоставить с ранее полученными данными по КИЭ [23] и влиянию вязкости [31] на гидролиз пептидного аналога HPLA. бензоилглицилфенилаланина Vz-Gly-Phe. При гидролизе Vz-Gly-Phe карбоксипептидазой А установлено полное отсутствие влияния вязкости на  $k_{cat}$  (водно-сахарозные и водно-глицериновые растворы) [31]. В то же время для Vz-Gly-Phe авторами работы [23] обнаружен КИЭ  $k_{cat}^H/k_{cat}^D \approx 1,33$ . Причины возникновения КИЭ для Vz-Gly-Phe и HPLA (1,33 и 1,20 соответственно), несмотря на их близость, совершенно различны. Для HPLA, как это вытекает из данной работы, КИЭ обусловлен вязкостным эффектом  $D_2O$ . Для Vz-Gly-Phe влияние вязкости на  $k_{cat}$  полностью отсутствует [31]. Следовательно, гидролитический процесс с участием последнего носит конформационно-адиабатический характер. А это означает неадиабатичность механизма относительно химических превращений. Причиной химической неадиабатичности такого процесса может быть наличие туннельного переноса протона на лимитирующей скорости стадии [30, 31, 38, 39]. В таком случае КИЭ  $\approx 1,33$  может быть связан с переносом протона от каталитической группы остатка Glu-270 фермента (выполняющей в случае гидролиза пептида роль общего основания и общей кислоты) на атом азота уходящей аминокислотной группы [2, 3, 8, 9].

В заключение авторы выражают надежду, что предложенный ранее [30, 31, 40] и развитый в данной работе подход параллельного исследования КИЭ и вязкостной зависимости с использованием современных теоретических представлений о механизме элементарного химического акта, существенно повышая информативность получаемых данных, может дать новый импульс к применению кинетических методов изучения биохимических процессов.

\* Классическими «химическими» координатами в данном случае являются координата нуклеофильного присоединения (образования O—C-связи) [39—41] и координата реорганизации полярной среды (в основном окружающих белок диполей «свободных» молекул воды) [51—53].



## Экспериментальная часть

В работе использовали карбоксипептидазу А (КФ 3.4.17.1) из поджелудочной железы быка типа I в виде водной суспензии с добавлением толуола (Sigma, США). Базовый раствор получали разбавлением исходного препарата до концентрации  $\approx 0,5$  мг/мл в трис-НСl-буфере (рН 7,5) с добавлением 2 М NaCl. Раствор подвергали ультрафильтрации при 4 °С на мембране УМ5 (Amicon, США). Концентрацию фермента в базовых растворах устанавливали, используя величину молярного коэффициента поглощения  $6,42 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  при 278 нм [20, 22]. НРЛА — продукт фирмы Sigma (США). Ранее было показано, что при использовании рацемата НРЛА карбоксипептидаза А расщепляет лишь L-форму, а D-форма не оказывает ощутимого ингибирующего влияния на данный процесс [20—22]. Тяжелая вода (D<sub>2</sub>O 99,8%)—Всесоюзного объединения «Изо-топ». Сахароза, глицерин и другие использованные реактивы марки ч.д.а. или ос. ч.

*Кинетические измерения* проводили на автоматическом титраторе RTS-822 (Radiometer, Дания) в режиме рН-стагирования. Растворы субстрата, содержащие необходимые добавки 2 М NaCl (во всех случаях), сахарозы, глицерина (буфер не добавляли), до ввода фермента термостагировали в стандартной ячейке с интенсивным перемешиванием (во избежание диффузионных ограничений) и продували аргоном. Реакцию запускали быстрым вводом раствора фермента в объеме 0,1 мл. Рабочий объем растворов 10,0 мл, концентрация титранта КОН  $10^{-3}$  М.

Начальную скорость реакции определяли по наклону кинетической кривой, записываемой на самописце в течение 20—30 с после запуска реакции (мертвое время процесса не превышало 10 с). Кинетические параметры  $k_{\text{cat}}$  и  $K_m$  рассчитывали по методу Лайнуивера — Берка по 4—6 значениям концентрации субстрата. Аналогично рассчитывались параметры  $E_a$  и  $\delta$ . Концентрация субстрата во всех случаях была такой, чтобы можно было избежать ингибирования его избытком:  $(2—20) \cdot 10^{-5}$  М, т. е.  $(4—40) \cdot 10^{-5}$  М рацемического препарата. Рабочая концентрация фермента  $(1—10) \cdot 10^{-9}$  М.

*Выбор рН (рD) кинетических измерений.* По данным работы [24], при гидролизе НРЛА  $k_{\text{cat}} = \text{const}$  при рН 5—10;  $K_m = \text{const}$  при рН 6,5—8,5 и  $K_m$  увеличивается при  $6,5 > \text{рН} > 8,5$ . Полученные в настоящей работе для растворов в H<sub>2</sub>O результаты согласуются с приведенными данными, а для растворов в D<sub>2</sub>O кривая зависимости целиком сдвигается в щелочную область на  $\approx 0,7$  ед. рН (рD).

Согласно работам [54, 55] (см. также [48]), при использовании стеклянных (или соответствующих комбинированных) электродов к растворам D<sub>2</sub>O: рD = рН<sub>изм</sub> + 0,4. В то же время значения рK различных ионогенных групп белка в D<sub>2</sub>O в слабощелочных средах изменяются на  $\Delta \text{рK} \approx \approx 0,6$  [48, 56] (см. также [23]). С учетом этого обстоятельства условие равенства заряда белка (фермента) в H<sub>2</sub>O и D<sub>2</sub>O выражается как рН<sub>изм} = рD — 0,4 = рН + 0,2. Полученные нами данные по рD-зависимости скорости гидролиза НРЛА согласуются с изложенными представлениями. Исходя из этого, основную серию экспериментов в растворах D<sub>2</sub>O мы проводили при рD 8,2 (рН<sub>изм} 7,8), которая примерно соответствует середине рD-независимой области как для  $k_{\text{cat}}$  и  $K_m$ , так и для  $v_0$ . В растворах H<sub>2</sub>O основные серии экспериментов проводили соответственно при рН 7,5.</sub></sub>

Авторы благодарны д-ру хим. наук Р. Д. Кацараве за содействие в работе.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neurath H., Schvert G. W. // Chem. Rev. 1950. V. 46. № 1. P. 69—100.
2. Людвиг М. Л., Липскомб В. Н. // Неорганическая биохимия. Т. 1. / Ред. Эйчхорн Г. Л. М.: Мир, 1978. С. 504—560.
3. Vallee B. L., Galdes A., Auld D. S., Riordan J. F. // Metal Ions in Biology / Ed. Spiro T. G. N. Y., Wiley, 1983. P. 27—75.
4. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980. С. 344—420.

5. Клесов А. А., Березин И. В. Ферментативный катализ. Т. 1. М.: Изд. МГУ, 1980. С. 29—80.
6. Антонов В. К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1983. С. 238—274.
7. Lipscomb W. N. // Accounts Chem. Res. 1970. V. 3. № 1. P. 81—87.
8. Kaiser E. T., Kaiser B. L. // Accounts Chem. Res. 1972. V. 5. № 2. P. 219—224.
9. Breslow R., Schepartz A. // Chem. Lett. 1987. V. 1. № 1. P. 1—4.
10. Christianson D. W., Lipscomb W. N. // Accounts Chem. Res. 1989. V. 22. № 1. P. 62—69.
11. Christianson D. W., Lipscomb W. N. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. № 16. P. 4998—5003.
12. Christianson D. W., Kuo L. C., Lipscomb W. N. // J. Amer. Chem. Soc. 1985. V. 107. № 26. P. 8281—8283.
13. Christianson D. W., Lipscomb W. N. // J. Amer. Chem. Soc. 1988. V. 110. № 16. P. 5560—5565.
14. Makinen M. W., Yamamura K., Kaiser E. T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. № 10. P. 3882—3886.
15. Клесов А. А., Валу Б. Л. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 5. С. 806—815.
16. Kuo L. C., Makinen M. W. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 1. P. 24—27.
17. Kuo L. C., Fukuyama J. M., Makinen M. W. // J. Mol. Biol. 1983. V. 163. № 1. P. 63—105.
18. Hilvert D., Gardel S. T., Rutter W. J., Kaiser E. T. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. № 17. P. 5298—5304.
19. Geoghogen K. F., Galdes A., Hanson G., Holmquist B., Auld D. S., Vallee B. L. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 16. P. 4669—4674.
20. Mc Clure W. O., Neurath H., Welsh K. A. // Biochemistry. 1964. V. 3. № 12. P. 1897—1901.
21. Whitaker J. R., Menger F., Bender M. L. // Biochemistry. 1966. V. 5. № 1. P. 386—392.
22. Davies R. C., Riordan J. F., Auld D. S., Vallee B. L. // Biochemistry. 1968. V. 7. № 3. P. 1090—1099.
23. Kaiser B. L., Kaiser E. T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1969. V. 64. № 1. P. 36—41.
24. Bunting J. W., Murphy J., Myers C. D., Cross G. G. // Can. J. Chem. 1974. V. 52. № 14. P. 2648—2659.
25. Suh J., Kaiser E. T. // J. Amer. Chem. Soc. 1976. V. 98. № 7. P. 1940—1947.
26. Gavish B. // Biophys. Struct. Mechanism. 1978. V. 4. № 1. P. 37—52.
27. Gavish B., Werber M. M. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 7. P. 1269—1275.
28. Beece D., Eisenstein L., Frauenfelder H., Good D., Marden M. C., Reinisch L., Reynolds A. H., Sorensen M. C., You K. T. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 23. P. 5147—5157.
29. Debrunner P. G., Frauenfelder H. // Ann. Rev. Phys. Chem. 1982. V. 33. P. 283—299.
30. Хоштария Д. Э., Гогуадзе Н. Г. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 12. С. 1621—1626.
31. Khoshdariya D. E., Ulstrup J. // Biochim. et biophys. acta. 1991. In press.
32. Burshstein I. V., Khudyakov I. V., Yakobson B. I. // Progr. React. Kinetics. 1984. V. 13. № 1, P. 221—305.
33. Zhang X., Leddy J., Bard A. J. // J. Amer. Chem. Soc. 1985. V. 107. № 12. P. 3719—3721.
34. Grampp G., Harrer W., Janicke W. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1. 1987. V. 83. № 1. P. 161—166.
35. Глестон С., Лейдлер К., Эйрлинг Г. Теория абсолютных скоростей реакций. М.: ИЛ, 1948.
36. Kramers H. A. // Physica. 1940. V. 4. № 2. P. 284—304.
37. Dogonadze R. R., Kuznetsov A. M., Ulstrup J. // J. Theor. Biol. 1977. V. 69. № 2. P. 239—263.
38. Хоштария Д. Э., Тополов В. В., Кришталик Л. И. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 10. С. 1341—1351.
39. Хоштария Д. Э., Кришталик Л. И. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1984. № 8. С. 1727—1734.
40. Хоштария Д. Э. // Биофизика. 1986. Т. 31. № 3. С. 391—393.
41. Sumi H., Ulstrup J. // Biochim. et biophys. acta. 1988. V. 955. № 1. P. 26—42.
42. Догонадзе Р. Р., Кузнецов А. М. // Итоги науки и техники. Физическая химия. Князепика. Т. 2. М.: ВИНТИ, 1973.
43. Ulstrup J. Charge Transfer Processes in Condensed Media. Berlin: Springer, 1979.
44. Zusman L. D. // Chem. Phys. 1980. V. 49. № 2. P. 295—304.
45. Гельман А. Б. // Теорет. и эксперим. химия. 1983. Т. 19. № 3. С. 281—288.
46. Хоштария Д. Э. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 12. С. 1673—1677.
47. Лобышев В. И., Калиниченко Л. П. Изотопные эффекты D<sub>2</sub>O в биологических системах. М.: Наука, 1978. С. 35—51.
48. Справочник химика. Т. 3. М.: Химия, 1984. С. 722—725.
49. Gavish B. Preprint № 33. Illinois University. Urbana, 1980.
50. Хоштария Д. Э., Гогуадзе Н. Г. // Журн. физ. химии. 1987. Т. 61. № 12. С. 3334—3336.
51. Krishtalik L. I. // J. Theor. Biol. 1980. V. 86. № 3. P. 757—764.
52. Krishtalik L. I. Charge Transfer Reactions in Electrochemical and Chemical Processes. N. Y.: Consultants Bureau, 1986.

53. *Krishtalik L. I.* // *J. Theor. Biol.* 1989. V. 139. № 1. P. 143—154.  
54. *Glasoe P. K., Long F. A.* // *J. Phys. Chem.* 1960. V. 64. № 1. P. 188—190.  
55. *Covington A. K., Paabo M., Robinson R. A., Bates R. G.* // *Analyt. Chem.* 1968. V. 40. № 4. P. 700—706.  
56. *Bell R. P.* *The Proton in Chemistry.* N. Y.: Cornell Univ. Press. 1959.

Поступила в редакцию  
3.IV.1990

D. E. KHOSHTARIYA, N. G. GOGUADZE, J. ULSTRUP \*

KINETIC MANIFESTATION OF CONFORMATIONAL DYNAMICS,  
ACCOMPANYING ENZYMATIC HYDROLYSIS  
OF BENZOYLGLYCYLPHENYLACTATE BY CARBOXYPEPTIDASE A

*Institute of Inorganic Chemistry and Electrochemistry,  
Georgian Academy of Sciences, Tbilisi;*

\* *Chemistry Department A, The Technical University of Denmark, Lyngby*

The influence of temperature, viscosity and H—D isotope substitution on kinetic parameters of the carboxypeptidase-catalysed hydrolysis of O-(benzoylglycyl)-L-β-phenyl-lactate has been studied. In a wide temperature range (15—50° C) the catalytic constant,  $k_{\text{cat}}$ , displays a linear Arrhenius dependence yielding the activation energy value  $E_a = 45.5$  kJ/mol. In a wide range of viscosities (0.9—43.9 mPa·s) in water-sucrose solutions (0—60% w/w),  $k_{\text{cat}}$  displays a negative power-law dependence (linear in logarithmic coordinates) with an index of -0.65. In water-glycerol solutions we observed a significant deviation from linearity due to a specific interaction of glycerol molecules with the catalytic groups. Substitution of H<sub>2</sub>O by D<sub>2</sub>O as a solvent yields a kinetic isotope effect,  $k_{\text{cat}}^{\text{H}}/k_{\text{cat}}^{\text{D}} \approx 1.20$ , caused by a greater viscosity of D<sub>2</sub>O.

The obtained data analysed in terms of the modern elementary chemical act theory led to the conclusion that the rate-limiting step, probably the tetrahedral adduct formation via the substrate carbonyl nucleophilic attack by (Glu-270)—CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, has a conformational-nonadiabatic nature.