



УДК 577.156.3.02

ИЗУЧЕНИЕ ПЕРЕНОСА ПРОТОНА  
ПРИ ФЕРМЕНТАТИВНОМ ГИДРОЛИЗЕ  
МЕТОДОМ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ЗАВИСИМОСТИ КИНЕТИЧЕСКОГО  
ИЗОТОПНОГО ЭФФЕКТА

I. ГИДРОЛИЗ ЭТИЛОВЫХ ЭФИРОВ N-АЦЕТИЛ- И N-БЕНЗОИЛ-*L*-ТИРОЗИНА  
 $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНОМ

*Хоштария Д. Э., Тополев В. В., Кришталик Л. И.*

*Институт электрохимии Академии наук СССР, Москва*

Получена температурная зависимость каталитических констант ( $k_{\text{кат}}$ ) и кажущихся констант Михаэлиса ( $K_{\text{m(каж)}}$ ) для реакций гидролиза этиловых эфиров *N*-ацетил- и *N*-бензоил-*L*-тирозина  $\alpha$ -химотрипсином, протекающих в  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{D}_2\text{O}$ . Показано практическое равенство энергий активации для процессов переноса водорода и дейтерия. Кинетический изотопный эффект при гидролизе в  $\text{D}_2\text{O}$  обуславливается в основном изменением предэкспоненты. Полученные результаты противоречат классической модели элементарного акта переноса протона, связывающей процесс активации с постепенным растяжением связи протона с его донором. Они согласуются с квантово-механической теорией, согласно которой активация связана с реорганизацией полярной среды без растяжения ковалентной связи водорода.

В настоящее время в биохимической кинетике, так же как и в химической, широко используется модель элементарного акта переноса протона, восходящая к работе Хориучи и Поляни [1] и описывающая поведение протона по сути дела в рамках классической механики. В этой модели реакция с переносом протона представляется как постепенное растяжение связи протона с донором и постепенное образование связи протона с акцептором с промежуточным образованием активированного комплекса. Энергия активации реакции определяется как разность энергии взаимодействия протона с донором в начальном и активированном состояниях. Координатой реакции является путь вдоль связи донор — протон и протон — акцептор [1—3]. Обычно модель дополняют учетом нулевых энергий протона, а часто также и учетом его туннелирования в верхней части барьера. Однако такие квантовые поправки вводятся непосредственно, как некоторое дополнение к классической модели. Они не изменяют самой сути модели: активация обуславливается растяжением связи донор — протон.

В настоящее время развита и успешно применяется к ряду процессов квантово-механическая теория элементарного акта переноса заряда (теория реорганизации растворителя) [4—7]. В рамках этой теории рассматриваются все возможные пути перехода частицы из начального в конечное состояние — от классического надбарьерного перехода до квантового подбарьерного

(туннельного). При этом оказывается, что поведение частицы является чисто квантовым, если характерная частота ее колебаний существенно больше тепловой частоты  $kT/h$  (при обычных температурах  $\sim 200$  см<sup>-1</sup>). Для протона в разных соединениях частота колебаний обычно близка к 3000 см<sup>-1</sup>, и поэтому он ведет себя как квантовая частица. Протон не переходит постепенно от донора к акцептору, поднимаясь на возбужденные уровни, а туннелирует подбарьерно с нулевого начального уровня на нулевой конечный уровень. Однако в силу принципа Франка — Кондона для туннелирования частицы необходимо равенство ее энергий в начальном и конечном состояниях. Согласно квантово-механической теории, выравнивание начального и конечного энергетических уровней протона достигается флуктуационным изменением классической подсистемы (реорганизацией среды, обычно растворителя). Реорганизация среды, например переориентация диполей молекул воды, требует затраты энергии, это и обуславливает энергию активации элементарного акта переноса протона. Таким образом, в данной теории активированное состояние не есть состояние растянутой связи с промежуточным положением протона между его начальной и конечной равновесными координатами, а состояние среды с ориентацией диполей, промежуточной между двумя равновесными значениями. Если энергия активации в этой теории определяется реорганизацией среды, то предэкспоненциальный фактор в кинетическом уравнении существенно зависит от вероятности туннелирования протона из начального состояния в конечное.

В классической модели энергия активации связана с движением протона. В квантово-механической модели энергия активации обусловлена реорганизацией среды и не имеет отношения к туннелированию протона. Эти представления были прежде всего подвергнуты экспериментальной проверке и получили подтверждение на примере электрохимических реакций переноса протона [6—8].

Выводы квантово-механической теории распространяются на любые реакции, протекающие в конденсированной среде и сопровождающиеся переносом заряда, в том числе на биохимические. Однако ферментативные реакции отличаются некоторой спецификой. По крайней мере в случае ряда ферментативных реакций перенос заряда происходит в щели (активном центре), т. е. фактически внутри белковой глобулы, и средой протекания реакции является сам фермент [9]. В этой среде флуктуации ориентации диполей (пептидных групп и большинства полярных и заряженных групп белка) затруднены ковалентными и водородными связями. В то же время появляется возможность предорганизации среды, т. е. такой структуры белка, такой конфигурации его зарядов, которая способствовала бы частичному выравниванию начального и конечного энергетических уровней протона перед его туннелированием [10]. Энергия активации (существенно пониженная по сравнению с неферментативной реакцией) в этом случае может обуславливаться флуктуациями подвижных групп белка и внешних и внутренних молекул воды. Эти флуктуации приводят к окончательному выравниванию начального и конечного протонных энергетических уровней.

Классическая и квантово-механическая модели приводят к существенно разным выводам о влиянии различных факторов на энергию активации и предэкспоненциальный множитель для реакций переноса протона, в том числе и ферментативных. Целью данной работы было определение энергий активации и предэкспоненциальных факторов для реакции гидролиза  $\alpha$ -химоитрипсином (КФ 3.4.4.5) этиловых эфиров *N*-ацетил-*L*-тирозина (Ac-Tyr-OEt) и *N*-бензоил-*L*-тирозина (Bz-Tyr-OEt) в легкой и тяжелой воде и попытка, путем сопоставления их с двумя теоретическими моделями переноса протона, сделать определенные выводы о механизме элементарного акта переноса протона в этой ферментативной реакции.

Аррениусовская зависимость для реакции ферментативного гидролиза Ac-Tyr-OEt как в H<sub>2</sub>O, так и в D<sub>2</sub>O в интервале 5—30° дает четкие прямые

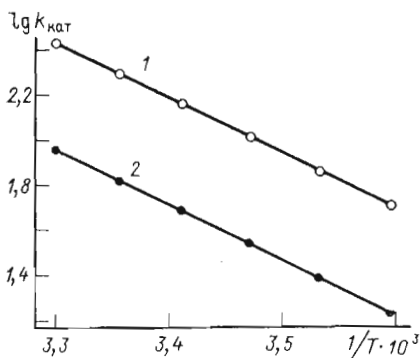


Рис. 1

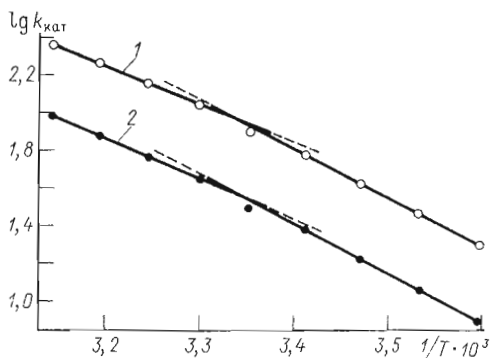


Рис. 2

Рис. 1. Аррениусовские зависимости гидролиза Ас-Тур-ОЕт  $\alpha$ -химотрипсином в  $\text{H}_2\text{O}$  (1) и  $\text{D}_2\text{O}$  (2)

Рис. 2. Аррениусовские зависимости гидролиза Вз-Тур-ОЕт  $\alpha$ -химотрипсином в  $\text{H}_2\text{O}$  (1) и  $\text{D}_2\text{O}$  (2)

с одинаковыми наклонами (рис. 1). Точность определения энергии активации характеризуется дисперсией этой величины (таблица). Энергии активации в  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{D}_2\text{O}$  совпадают с точностью  $0,02 \pm 0,1$  ккал/моль. Энергетический изотопный эффект в указанном температурном интервале составляет в среднем 2,94. Как известно,  $k_{\text{кат}} = k_2 k_3 / (k_2 + k_3)$ , соотношение констант скорости ацилирования и дезацилирования для гидролиза Ас-Тур-ОЕт в  $\text{H}_2\text{O}$   $k_2^{\text{H}_2\text{O}}/k_3^{\text{H}_2\text{O}} \approx 20-25$  (при  $25^\circ$ ) [11-15], поэтому  $k_{\text{кат}} \approx k_3$  и можно считать, что измерена энергия активации переноса протона при дезацилировании. Для гидролиза Ас-Тур-ОЕт в  $\text{D}_2\text{O}$  можно сделать такое же заключение, так как, исходя из литературных данных, для  $k_2^{\text{H}_2\text{O}}/k_2^{\text{D}_2\text{O}}$  можно ожидать величину порядка 2-3 [16] и отсюда  $k_2^{\text{D}_2\text{O}}/k_3^{\text{D}_2\text{O}} \approx \approx 25$ .

Для Вз-Тур-ОЕт (рис. 2) в температурных интервалах 5-20 и 30-45 $^\circ$  аррениусовские зависимости также дают четкие прямые для реакций, протекающих в  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{D}_2\text{O}$ . Около 25 $^\circ$  наблюдаются изменения наклона и переход к новому прямолинейному участку. Энергии активации в указанных температурных интервалах разные (таблица), но для реакций в  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{D}_2\text{O}$  совпадают с точностью  $0,10 \pm 0,09$  ккал/моль (5-20 $^\circ$ ) и  $0,03 \pm \pm 0,12$  ккал/моль (30-45 $^\circ$ ). Кинетический изотопный эффект составляет в среднем 2,50 во всем интервале 5-45 $^\circ$ . По имеющимся данным, для

Активационные параметры гидролиза  $\alpha$ -химотрипсином в  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{D}_2\text{O}$

Субстрат	Интервал температур	Растворитель	$E_a$ , ккал/моль	Дисперсия		$A \cdot 10^{-3}$ , с $^{-1}$	Дисперсия		$\Delta H^\ddagger$ , ккал/моль **	$-\Delta S^\ddagger$ , э.е. **
				$E_a$	$E_a^{\text{D}_2\text{O}} - E_a^{\text{H}_2\text{O}}$ *		$A \cdot 10^{-3}$	$A^{\text{H}_2\text{O}}/A^{\text{D}_2\text{O}}$		
Ас-Тур-ОЕт	5-30	$\text{H}_2\text{O}$	11,14	0,05	0,10	289	4	0,09	10,5	12,7
		$\text{D}_2\text{O}$	11,16	0,09		102	3		10,5	14,7
Вз-Тур-ОЕт	5-20	$\text{H}_2\text{O}$	12,30	0,02	0,09	907	6	0,20	11,7	10,4
		$\text{D}_2\text{O}$	12,40	0,09		429	13		11,8	11,9
Вз-Тур-ОЕт	30-45	$\text{H}_2\text{O}$	9,29	0,06	0,12	5,63	0,10	0,08	8,7	20,5
		$\text{D}_2\text{O}$	9,32	0,10		2,38	0,07		8,7	22,2

\* Дисперсия разности определялась как корень из суммы квадратов дисперсий энергий активации.

\*\*  $\Delta H^\ddagger$  и  $-\Delta S^\ddagger$  рассчитаны в рамках теории абсолютных скоростей реакции. Для сравнения см. [11].

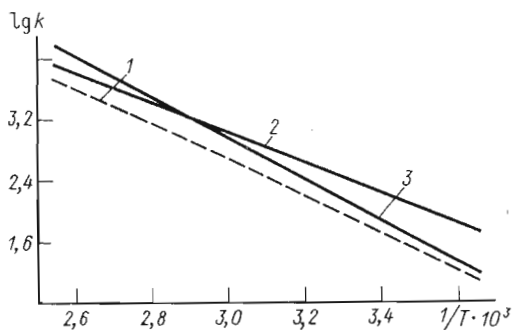


Рис. 3

Рис. 3. Рассчитанная кривая аррениусовской зависимости для  $k_{\text{кат}}$  (1) и для стадий ацилирования (2) и деацилирования (3) при  $E_{a2}$  9,3 и  $E_{a3}$  12,3 ккал/моль при условии  $k_2/k_3 = 2$  ( $25^\circ$ )

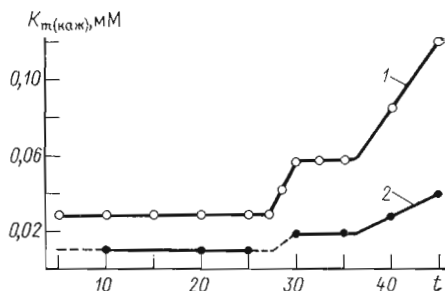


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость  $K_{m(\text{каж})}$  от температуры для гидролиза Vz-Тур-ОEt  $\alpha$ -химотрипсина в  $\text{H}_2\text{O}$  (1) и  $\text{D}_2\text{O}$  (2)

Vz-Тур-ОEt при  $25^\circ$   $k_2/k_3 \approx 2$  [11, 12, 17]. Выражение для  $k_{\text{кат}}$  можно записать в виде

$$k_{\text{кат}} = \frac{e^{\Delta E_a' RT}}{e^{\Delta E_a RT} + (k_3/k_2)_{T_0} e^{\Delta E_a RT_0}} \cdot A_3 e^{-E_{a3}/RT} = A_{\text{эфф}} e^{-E_{a(\text{эфф})}/RT},$$

где  $A_2$  и  $A_3$  — предэкспоненциальные факторы,  $E_{a2}$  и  $E_{a3}$  — энергии активации стадий ацилирования и деацилирования,  $\Delta E_a = E_{a3} - E_{a2}$ ,  $T_0 = 298,15$  К,  $(k_3/k_2)_{T_0} = 1/2$ . Из рассчитанной по этой формуле зависимости при заданных значениях  $E_{a2}$  9,3 и  $E_{a3}$  12,3 ккал/моль (рис. 3) видно, что кривая для  $k_{\text{кат}}$  в широком интервале температур практически не отличается от прямолинейной аррениусовской зависимости и в интервале  $5-45^\circ$  дает  $E_{a(\text{эфф})}$  11,5 ккал/моль. Таким образом, наблюдаемый перелом экспериментальных кривых не может быть связан со сменой стадии, определяющей скорость при данной температуре. Переломы для Vz-Тур-ОEt на графиках аррениусовской зависимости, а также зависимости  $K_{m(\text{каж})}$  от температуры тоже примерно при  $25^\circ$  (рис. 2, 4), видимо, свидетельствуют о конформационном переходе  $\alpha$ -химотрипсина [18, 19]. Этот переход не для всех субстратов отражается на кинетических параметрах или иногда отражается частично [20].

Расчет по той же формуле температурной зависимости  $k_{\text{кат}}$  для разных  $E_{a2}$  показывает (рис. 5), что, если энергии активации переноса протона в стадиях ацилирования и деацилирования различаются на величину до 2 ккал/моль, то экспериментально измеряемая в изученном нами интервале температур энергия активации  $E_{a(\text{эфф})}$  будет близка большей из них ( $E_{a3}$ ). В предельном случае, когда энергии активации стадий ацилирования и деацилирования равны, экспериментально будет измерена величина, равная им, т. е. будем иметь  $E_{a2} = E_{a3} = E_{a(\text{эфф})}$ . В этом случае для предэкспоненциального фактора имеем  $A_{\text{эфф}} = A_2 A_3 / (A_2 + A_3)$ . Как видно из таблицы, для обоих субстратов кинетический изотопный эффект в основном определяется изменением предэкспоненциального фактора.

Рассмотрим поведение константы Михаэлиса

$$K_{m(\text{каж})} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_2} \cdot \frac{k_3}{k_2 + k_3}.$$

Для рассматриваемых реакций величиной  $k_2$  по сравнению с  $k_{-1}$  можно пренебречь [14]. Изотопный эффект  $K_{m(\text{каж})}^{\text{H}_2\text{O}} / K_{m(\text{каж})}^{\text{D}_2\text{O}} \sim 2-3$  определяет

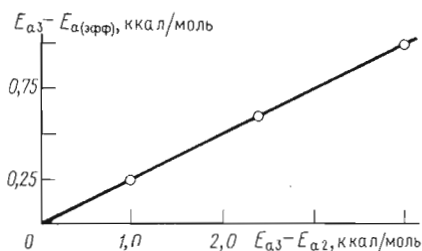


Рис. 5

Рис. 5. Отклонение эффективной энергии активации ферментативного гидролиза от энергии активации дезацилирования при увеличении разности энергий активации стадий ацилирования и дезацилирования при условии  $k_2/k_3 = 2$  ( $25^\circ$ )

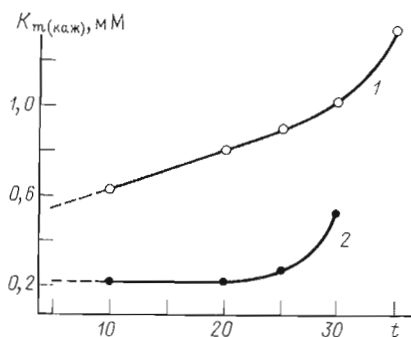


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость  $K_{m(каж)}$  от температуры для гидролиза Ac-Tyr-OEt  $\alpha$ -химотрипсином в  $H_2O$  (1) и  $D_2O$  (2)

ся изменением соотношения  $k_2/k_3$  в тяжелой воде (например, если принять  $k_3^{H_2O}/k_3^{D_2O} = 3$ ,  $k_2^{H_2O}/k_2^{D_2O} = 2$  [16], этот фактор может дать сомножитель  $\sim 1,5$ , а если принять  $k_2^{H_2O}/k_2^{D_2O} = 1,5$  [21], то сомножитель  $\sim 2$ ), а также изменением  $k_s$ , в частности из-за усиления гидрофобности в тяжелой воде (сомножитель порядка 1,3—1,5) [22].

В ряде случаев в части или во всем температурном интервале, где аррениусовские зависимости прямолинейны, наблюдаются области независимости  $K_{m(каж)}$  от температуры (рис. 4, 6). Чтобы объяснить независимость  $K_{m(каж)}$  от температуры, следует допустить либо взаимно компенсирующие изменения двух независимых величин,  $k_{-1}/k_1 = K_s$  и  $k_2/k_3^*$ , характеризующих две различные системы, в широких интервалах температуры (что кажется нам маловероятным), либо постоянство этих величин в вышеуказанных температурных областях (для Vz-Tyr-OEt: 5—25 и 30—35° в  $H_2O$  и  $D_2O$ , для Ac-Tyr-OEt: 5—20° в  $D_2O$ ). Постоянство соотношения  $k_2/k_3$  означает равенство энергий активации этих стадий  $E_{a2} = E_{a3}$  в данных областях температур. Далее нам представляется разумным предположить близость  $E_{a2}$  и  $E_{a3}$  во всех температурных интервалах, где аррениусовская зависимость дает прямые, поскольку резкое изменение отношения  $k_2/k_3$  отразилось бы на прямолинейности этих зависимостей. Температурные изменения  $K_{m(каж)}$  разумно отнести за счет изменений константы связывания  $K_s$ . На основании изложенного можно думать, что, хотя в разных температурных областях мы имеем два разных состояния фермента и при переходе из одного в другое меняются энергии активации стадий, но до и после перехода для стадий ацилирования и дезацилирования энергии активации остаются близкими.

Суммируя изложенные выше результаты, мы можем сказать, что при гидролизе Ac-Tyr-OEt энергии активации стадии дезацилирования с участием как протия, так и дейтерия практически совпадают. Эффективные энергии активации гидролиза Vz-Tyr-OEt с переносом протия и дейтерия также практически совпадают для обоих конформационных состояний  $\alpha$ -химотрипсина. Последнее в сочетании с другими результатами позволяет с большой вероятностью полагать, что энергии активации каждой стадии гидролиза Vz-Tyr-OEt с участием протия и дейтерия одинаковы. Учитывая дисперсию разностей, мы можем утверждать, что с 95%-ной надежностью разность энергий активации для легкого и тяжелого изотопов не

\* В случае  $k_2 \gg k_3$  постоянство  $k_3/k_2 + k_3$  означает постоянство  $k_2/k_3$ . При  $k_3 \gg k_2$  изменение величины  $k_2/k_3$  было бы экспериментально необнаружимо.

превосходит 0,2 ккал/моль для Ac-Tyr-OEt и 0,3 ккал/моль для Vz-Tyr-OEt \*.

Сравним полученные нами результаты с оценками, которые можно сделать в рамках ранее рассмотренных моделей.

При различных возможных механизмах гидролиза, обсуждаемых в литературе, протон переносится либо от атома кислорода ( $O^{\nu}$  Ser-195 или кислорода воды), либо от атома азота имидазольного кольца (см., например, [23]). Частоты валентных колебаний связи O—H для воды и спирта (Ser) близки и равны  $\sim 3650 \text{ см}^{-1}$  [24]. В гармоническом приближении для нулевого уровня энергии связи имеем

$$E_0^2 = \frac{1}{2} h\nu_0 = h/4\pi \sqrt{k/m},$$

где  $h$  — постоянная Планка;  $\nu_0$  — частота основного колебания;  $k$  — силовая постоянная;  $m$  — масса частицы.

Для энергий нулевых уровней O—H и O—D получим соответственно 5,2 и 3,7 ккал/моль. Кроме валентного имеется еще дважды вырожденное деформационное колебание с частотой около половины частоты валентного, т. е. с примерно такой же суммарной нулевой энергией. В модели растяжения связи валентное колебание исчезает в переходном состоянии, так как при переносе протона колебательное движение по соответствующей координате заменяется поступательным. Деформационные колебания в активированном комплексе сохраняются, и их влияние примерно компенсируется. Поэтому разность энергий активации для протона и дейтрона в рамках этой модели будет близка разности нулевых энергий их валентных колебаний  $E_a^{D_2O} - E_a^{H_2O} \approx 1,5$  ккал/моль. Для переноса протона от атома азота аналогично получаем  $E_a^{D_2O} - E_a^{H_2O} \approx 1,4$  ккал/моль. Таким образом, как для ацилирования, так и для дезацилирования в рамках модели растяжения связи надо ожидать существенной ( $\sim 1,5$  ккал/моль) разности в энергиях активации стадий с переносом протона и дейтрона [2, 3]. Эксперимент несомненно противоречит этому выводу.

В ряде работ (см. обзор [3]) для объяснения величины изотопного эффекта делаются различные допущения о нулевых энергиях переходного состояния, позволяющие снизить разность энергии активации по сравнению с  $\Delta E_0$  для валентных колебаний. Следует, однако, подчеркнуть, что для объяснения изотопного эффекта, равного 3, в рамках этих предположений, необходимо принять разность энергий активации не меньше величины  $RT \ln 3 \approx 0,7$  ккал/моль, т. е. несомненно большую, чем это вытекает из эксперимента.

Исходя из квантово-механической теории (теории реорганизации среды), можно сделать следующую оценку. Энергия активации зависит от теплоты элементарного акта и энергии реорганизации среды. В теплоту элементарного акта входит разность нулевых энергий начального и конечного состояний. Поскольку при переносе протона в рассматриваемом случае разрываются и образуются связи с очень близкими энергетическими характеристиками, можно ожидать лишь относительно малых изменений нулевых энергий. Например, при  $\Delta r_K$  двух связей O—H, равном 5, разность энергий связи составляет  $\sim 7$  ккал, т. е.  $\sim 6\%$  полной энергии связи. Так как частоты колебаний ряда связей водорода пропорциональны их энергиям связи [25], это дает изменение нулевой энергии  $\sim 0,6$  ккал/моль (здесь учтен и вклад деформационных колебаний). Соответствующая величина для O—D составит  $\sim 0,45$  ккал/моль, т. е. разность тепловых эффектов для двух изотопов  $\sim 0,15$  ккал/моль, причем она мо-

\* Вывод о равенстве энергий активации переноса H и D при гидролизе 2,4-динитрофенилтриметилацетата  $\alpha$ -химотрипсином в легкой и тяжелой воде мог бы быть сделан также на основании данных, приведенных в работе [21]. К сожалению, разброс экспериментальных точек в этой работе слишком велик для получения надежных результатов.

жет быть как положительной, так и отрицательной, в зависимости от того, в каком направлении переносится протон: от более кислой к более основной группе или наоборот. В энергию активации тепловой эффект входит с коэффициентом переноса  $\alpha$ , обычно близким к  $1/2$ . Таким образом, изменение нулевых энергий в рамках данной модели приведет к изменению энергии активации на величину порядка  $\pm 0,1$  ккал/моль.

Что касается энергии реорганизации среды, то в идеальном случае для переноса протона и дейтрона белковая глобула должна реорганизоваться одинаково, поскольку заряд этих частиц одинаков и переносится он на одно и то же расстояние, определяемое структурой полипептидного каркаса глобулы\*.

Оценим возможный порядок вклада изменения энергии реорганизации. Максимальной разницы можно было бы ожидать, если бы все окружение реакционного центра представляло собой жидкую воду и мы бы произвели замену  $H_2O$  на  $D_2O$ . В простейшем варианте теории, рассматриваемом растворитель как изотропную среду без пространственной и частотной дисперсии диэлектрической проницаемости, природа растворителя сказывается через его полярионную характеристику ( $1/\epsilon_0 - 1/\epsilon_s$ , где  $\epsilon_0$  — оптическая диэлектрическая проницаемость, равная квадрату показателя преломления, а  $\epsilon_s$  — статическая проницаемость). Воспользовавшись данными о соответствующих константах [26], найдем, что для  $D_2O$  эта характеристика больше, чем для  $H_2O$ , на 0,7%. Соответствующий вклад в энергию активации не превышает  $\sim 0,15$  ккал/моль, а для ферментативной реакции, для которой большая часть пространства вблизи реакционного центра занята не водой, а жесткой глобулой, вряд ли больше половины этой величины. Хотя эти оценки сделаны в рамках весьма упрощенной модели, ясно, что порядок величин вряд ли изменится при более точных расчетах — речь идет об эффектах порядка 0,1 ккал/моль. Таким образом, в рамках теории реорганизации среды мы можем ожидать различий в энергиях активации переноса протия и дейтерия от нуля до немногих десятых долей килокалории на моль. Именно такой результат получился и на опыте.

Обращает на себя внимание сильное — более чем на два порядка — уменьшение предэкспоненциального множителя для гидролиза Vz-Tyr-OEt при переходе от низкотемпературной к высокотемпературной конформации  $\alpha$ -химотрипсина (в иной форме это выражается как сильное увеличение отрицательного значения энтропии активации). Такое изменение может быть в принципе связано как со значительным уменьшением энтропии активированного комплекса (энтропии классической подсистемы) за счет иной конфигурации среды, так и со значительным уменьшением вероятности туннелирования. Данные по изотопному эффекту позволяют сделать однозначный выбор в пользу первой причины. Действительно, изменение вероятности туннелирования на любой из стадий гидролиза должно было бы привести к сильному изменению соотношения предэкспонент для протия и дейтерия (в рамках описания связи O—H как гармонического осциллятора уменьшение вероятности туннелирования протия в  $10^3$  раз приводит к уменьшению этой вероятности для дейтерия в  $10^{2\sqrt{2}} = 6,7 \cdot 10^2$  раз). Вместе с тем экспериментально отношение предэкспонент для протия и дейтерия в пределах ошибки опыта не изменилось: для низкотемпературной формы оно составляет  $2,12 \pm 0,20$ , а для высокотемпературной —  $2,37 \pm 0,08$ . Неизменность изотопного эффекта указывает на практическую неизменность расстояния туннелирования протона — иными словами, и в высокотемпературной и в низкотемпера-

\* Расстояние переноса заряда в белке фиксировано более жестко, чем в низкомолекулярных жидкостях, в которых из-за большей относительной подвижности молекул меньшая вероятность туннелирования дейтерия может быть частично скомпенсирована некоторым сближенным реагирующих частиц.

турной конформациях взаимное расположение донора и акцептора протона одинаково.

Вывод об одинаковой вероятности туннелирования в двух конформациях позволяет сделать еще одно независимое сравнение двух теоретических моделей. С точки зрения модели растяжения связи вероятность туннелирования и энергия активации определяются одним и тем же барьером — барьером на пути движения протона. В данном случае мы наблюдаем большее снижение энергии активации без одновременного повышения вероятности туннелирования. Этот результат трудно объяснить в рамках представления о растяжении связи как основной причине появления энергии активации. Вместе с тем он является вполне естественным в теории, связывающей энергию активации и туннелирование с физически разными барьерами — изменение барьера на пути переориентации диполей вообще не сказывается на барьере для туннелирования протона.

Обсуждение наших данных мы проводили в рамках механизма, в котором протон переносится в стадии, определяющей скорость. Вывод об участии протона в лимитирующей стадии был сделан Бендером [16] на основании значительного изотопного эффекта для этих реакций. Целесообразно рассмотреть и другую возможность, когда перенос протона предшествует стадии, определяющей скорость. Такой механизм предложен Березиным и Мартинекком [27, 28], принявшими, что вода, участвующая в дезацилировании, полностью депротонирована, т. е. что с ацил-ферментом реагирует ион гидроксония. Поскольку при таком механизме протон от атакующего нуклеофила не переносится и связанный с этим первичный кинетический изотопный эффект отсутствует, следует рассмотреть возможные источники наблюдаемого изотопного эффекта. Таковыми могут быть:

а) различие в связывании субстрата и соответственно в его реакционной способности [28]. По приведенным выше данным,  $K_s$  в легкой воде больше, чем в тяжелой, т. е. связывание в  $D_2O$  прочнее. Если бы это сказывалось на константе скорости, то она была бы больше в  $D_2O$ , тогда как наблюдается обратное соотношение;

б) разная степень депротонирования  $H_2O$  и  $D_2O$  — большая доля депротонированных молекул  $H_2O$ . В этом случае изотопный эффект был бы связан с различием констант этого равновесия и пропорционален  $e^{\Delta\Delta E_0/RT}$ , где  $\Delta\Delta E_0$  — разность соответствующих разностей нулевых энергий. Чтобы объяснить изотопный эффект, равный 3, требуется иметь  $\Delta\Delta E_0 \gtrsim 1,3$  ккал/моль\*. Такую же величину должна иметь разность энергий активации, что противоречит эксперименту;

в) разная реакционная способность нуклеофилов  $OD^-$  и  $OH^-$ . По данным [29], это различие, обусловленное изменением водородных связей с окружением, невелико, причем  $OD^-$  более активен. Этот фактор мог бы объяснить лишь небольшой эффект, противоположный по знаку наблюдаемому;

г) некоторые различия в конформации обычного и дейтерированного белка, приводящие к изменениям расстояний между реагирующими частями в активном центре. Неясно, однако, в каком направлении изменяются эти расстояния. С одной стороны, водородные связи с участием дейтерия на сотые доли ангстрема длиннее, чем с участием протия, что должно привести к некоторому расширению глобулы. С другой стороны,

---

\* Степень депротонирования воды  $\theta$  (равная степени протонирования имидазола) связана с разностью нулевых энергий начального и конечного состояний соотношением  $\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right)^2 = ke^{-\Delta E_0/RT}$ , где постоянная  $k$  не зависит от массы изотопа. Если  $\theta \ll 1$  как для  $H_2O$ , так и для  $D_2O$ , то  $\theta_H/\theta_D \approx 3$  соответствует  $\Delta\Delta E_0 \approx 1,3$  ккал/моль. Если же принять, как в работе [27],  $\theta_H \approx 1$ , то для выполнения условия  $\theta_H/\theta_D \approx 3$  требуется  $\Delta\Delta E_0$  больше 1,3 ккал/моль. Например, при  $\theta_H$  0,9 величина  $\theta_D$  0,3 достигается при  $\Delta\Delta E_0 \approx 3,6$  ккал/моль, а при  $\theta_H$  0,99 — при  $\Delta\Delta E_0$  6,4 ккал/моль.



в  $D_2O$  гидрофобные взаимодействия сильнее [22], чем в  $H_2O$ , что ведет к сжатию белка. Поэтому трудно оценить не только величину, но даже направление влияния этого фактора. Ясно, однако, что если процесс представляет собой реакцию, не сопровождающуюся туннелированием протона, то изменение скорости при изменении исходных расстояний между реагентами должно быть связано в первую очередь с изменением энергии активации процесса. Соответственно наблюдаемый изотопный эффект потребовал бы разности энергий активаций 0,7 ккал/моль, что существенно отличается от экспериментальных величин.

Следует отметить, что изменения расположения реагентов в активном центре должны сказываться и при участии переноса протона в медленной стадии процесса. Однако небольшие сдвиги частиц, порядка сотых долей ангстрема, практически не отразятся на энергии реорганизации среды, а заметно скажутся лишь на вероятности туннелирования. Поэтому учет указанного эффекта не изменит основного вывода теории: малое влияние изотопного замещения на энергию активации и основной эффект — на экспоненциальные множители.

Все сказанное выше заставляет нас считать, что полученные нами данные предпочтительнее объяснять в рамках представлений о переносе протона в медленной стадии процесса. Это не значит, однако, что мы рассматриваем эти данные как решающий аргумент против атаки карбонильного углерода депротонированным нуклеофилом ( $OH^-$  или  $серии-O^-$ ) — идея, которая нам по некоторым теоретическим соображениям представляется привлекательной [30]. Этот механизм способен объяснить первичный кинетический изотопный эффект при условии переноса протона от другого донора, например от иона имидазолия в ходе нуклеофильной атаки (согласованный механизм, неоднократно обсуждавшийся для ряда гидролитических реакций, — см., например, [3, 23, 31]).

### Экспериментальная часть

В работе использовали:  $\alpha$ -химотрипсин Олайнского завода химреактивов, обессоленный на колонке с сефадексом LH-20 и лиофилизированный по обычной методике; Ac-Tyr-OEt (Reanal, Венгрия); Vz-Tyr-OEt (Calbiochem, США);  $D_2O$  99,8%, перегнанная (Ленинградский завод изотопных реактивов); ацетонитрил (ч. д. а., перегнанный); KCl (ч. д. а., перекристаллизованный и прокаленный); KOH (Chemapol, СССР), ч. д. а.

Раствор  $\alpha$ -химотрипсина готовили в день эксперимента стандартным методом: сначала готовили раствор концентрации 1 мг/мл, нужная концентрация достигалась вторичным разбавлением. Концентрация активного фермента, определенная по методу [32] спектрофотометрическим титрованием *N-транс*-циннамоилимидазолом, составляла 80% всей концентрации фермента. Все растворы  $\alpha$ -химотрипсина готовили в  $10^{-3}$  н. HCl или DCl, так как в этих условиях  $\alpha$ -химотрипсин наиболее устойчив [16]. То, что в  $D_2O$   $\alpha$ -химотрипсин сохраняет свою активность, установлено экспериментально [16] мгновенным вводом раствора  $\alpha$ -химотрипсина в  $D_2O$  в водный ( $H_2O$ ) раствор субстрата. Этот эксперимент был нами воспроизведен в условиях рН-статирования.  $10^{-3}$  н. DCl готовили разбавлением 2,5 н. HCl в  $D_2O$ . Рабочая концентрация  $\alpha$ -химотрипсина  $(1-10) \cdot 10^{-8}$  моль/л.

Растворы Ac-Tyr-OEt и Vz-Tyr-OEt готовили сначала концентрированными в ацетонитриле. Количество ацетонитрила в рабочем растворе Ac-Tyr-OEt — 3,33 об. %, в растворе Vz-Tyr-OEt — 1,67 об. %. Рабочие концентрации Ac-Tyr-OEt 0,5—5 мМ, Vz-Tyr-OEt 0,1—0,5 мМ.

Растворы KOH, KOD (титрант),  $10^{-2}$  н., готовили растворением твердой KOH в  $H_2O$ ,  $D_2O$ . Концентрация KCl (фоновая соль) 0,1 н. Конечный объем рабочего раствора в кювете 3 мл.

Количество  $H_2O$ , вносившейся с реактивами в  $D_2O$ , не превышало 0,2%, так что общее количество  $H_2O$  составляло менее 0,4% количества  $D_2O$ .

В работе [33] найдено, что скорость гидролиза эфиров  $\alpha$ -химотрипсином линейно зависит от содержания  $H_2O$  в  $D_2O$ ; следовательно, ошибка, вызванная присутствием  $H_2O$ , не должна в наших измерениях превышать 0,8%.

Кинетические измерения проводили на рН-стате фирмы Radiometer (Дания). Для измерения скорости реакции брались начальные участки кинетических кривых (первые 0,5—1 мин) при глубине превращения для Ac-Tyr-OEt 1—2%, в отдельных случаях до 5%, для Vz-Tyr-OEt 10—15%, в отдельных случаях до 25%. Раствор с субстратом перед вводом  $\alpha$ -химотрипсина термостатировали с точностью  $\pm 0,1^\circ$  и продували азотом,  $\alpha$ -химотрипсин вводили в ячейку в последнюю очередь, мгновенно, в количестве 0,1 мг. После ввода фермента сохранялась азотная атмосфера. Кинетические измерения проводились в рН (рD)-независимой области при рН 8,5 [16]. Проводился контроль концентрации субстрата по полному гидролизу.

Данные взяты из трех-четырёх серий экспериментов для каждой зависимости  $\lg k_{\text{кат}}$  от  $1/T$ . Для всех серий становился контроль активности фермента в начале и конце серии в стандартных условиях. Для каждой температуры получено расхождение кинетических данных не более 2%. Для Ac-Tyr-OEt измерения проводили при 6 значениях температуры, для Vz-Tyr-OEt — при 9. Энергии активации, предэкспоненциальные факторы и их дисперсии рассчитаны по методу наименьших квадратов. Найденное значение энергии активации гидролиза Ac-Tyr-OEt с точностью до 0,2 ккал/моль совпадает с приведенным в работе [11].

Авторы выражают благодарность Ю. И. Хургину за методическую помощь.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Noriuti L., Polanyi M. (1935) Acta Physicoch. USSR, 2, 505—532.
2. Richards T. H. (1970) in The Enzymes (Boyer P. D., ed.), Third Edition, vol. 2, pp. 324—333, Acad. Press, N. Y.—London.
3. Белл Р. (1977) Протон в химии, с. 178—188, 297—346, «Мир», М.
4. Догонадзе Р. Р., Кузнецов А. М., Левич В. Г. (1967) Электрохимия, 3, 739—742.
5. Догонадзе Р. Р., Кузнецов А. М. (1973) в сб. Итоги науки и техники. Серия «Физическая химия. Кинетика», т. 2, с. 7—203, ВИНТИ, М.
6. Догонадзе Р. Р., Кришталик Л. И., Левич В. Г. (1971) Ж. Всес. хим. с-ва им. Д. И. Менделеева, 16, 613—620.
7. Догонадзе Р. Р., Кришталик Л. И. (1975) Успехи химии, 44, 1987—2000.
8. Кришталик Л. И. (1977) в сб. Итоги науки и техники. Серия «Электрохимия», т. 12, 5—55, ВИНТИ, М.
9. Perutz M. (1967) Proc. Roy. Soc. London, B167, 448—450.
10. Кришталик Л. И. (1974) Молекулярн. биология, 8, 91—98.
11. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A. (1971) FEBS Lett., 15, 121—124.
12. Березин И. В., Казанская Н. Ф., Клесов А. А. (1971) Биохимия, 36, 108—117.
13. McCoon J., Ku E., Himoe A., Brandt K. G., Hess G. P. (1971) J. Biol. Chem., 246, 2918—2925.
14. Zerner B., Bender M. L. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 3669—3674.
15. Bender M. L., Kezdy F. J., Gunter C. R. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 3714—3721.
16. Bender M. L., Clement C. E., Kezdy F. J., Heck H. d'A. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 3680—3690.
17. Березин И. В., Вильх Х., Мартинек К., Яцимирский А. К. (1968) Докл. АН СССР, 179, 214—217.
18. Kim X. D., Lumry R. (1971) J. Amer. Chem. Soc., 93, 1003—1013.
19. Kaplan H., Laidler K. J. (1967) Can. J. Chem., 45, 547—557.
20. Rajender S., Han M., Lumry R. (1970) J. Amer. Chem. Soc., 92, 1378—1385.
21. Gutnik L. M., Linkletter J. M., Stewart J. A. (1975) Proc. North Dakota Acad. Sci., 27, 149—158.
22. Kreshak G. C., Schneider H., Sheraga H. A. (1965) J. Phys. Chem., 69, 3132—3144.
23. Bender M. L. (1971) Mechanisms of Homogeneous Catalysis from Protons to Proteins, pp. 510—514, Wiley—Interscience, N. Y.—London—Sydney—Toronto.
24. Гордон А., Форд Р. (1976) Спутник химика, с. 200—234, «Мир», М.
25. Кришталик Л. И. (1957) Ж. физ. химии, 31, 2403—2413.

26. Киршенбаум И. (1953) Тяжелая вода, с. 37, 40, Изд-во иностр. лит., М.
27. Березин И. В., Мартишек К. (1975) Биоорган. химия, 1, 520—531.
28. Березин И. В., Мартишек К. (1977) Основы физической химии ферментативного катализа, с. 150—166, «Высшая школа», М.
29. Bunton C. A., Shiner V. J. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 3214—3220.
30. Krishtalik L. I. (1977) in IFIAS Workshop on Physico-Chemical Aspects of Electron Transfer Processes in Enzyme Systems, pp. 76—79, IFIAS, Stockholm.
31. Дженкс В. (1972) Катализ в химии и энзимологии, с. 163—184, «Мир», М.
32. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. (1961) J. Biol. Chem., 236, 2930—2935.
33. Pollock E., Hogg J. L., Schowen R. L. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 968—969.

Поступила в редакцию

1.II.1978

После доработки

30.III.1978

**STUDY ON PROTON TRANSFER IN ENZYMATIC HYDROLYSIS BY THE METHOD  
OF TEMPERATURE DEPENDENCE OF KINETIC ISOTOPE EFFECT.**

**I.  $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN CATALYZED HYDROLYSIS OF N-ACETYL- AND  
N-BENZOYL-*L*-TYROSINE ETHYL ESTERS**

**KHOSHTARIYA D. E., TOPOLEV V. V., KRISHTALIK L. I.**

*Institute of Electrochemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

Temperature dependences of the catalytic constants and the apparent Michaelis constants for  $\alpha$ -chymotrypsin catalyzed hydrolysis of N-acetyl-*L*-tyrosine and N-benzoyl-*L*-tyrosine ethyl esters were studied in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O. The activation energy for transfer of hydrogen and deuterium was found to be practically equal. The results obtained are in discrepancy with classical model of the elementary act of the proton transfer, which associates the activation with gradual stretching of the bond between proton and its donor. The results are in agreement with quantum-mechanical theory describing activation as a reorganization of the polar medium without stretching hydrogen covalent bond, proton being tunnelled from the ground initial to the ground final state.

---