

Die Ausrichtung des Substrats als geschwindigkeitsbestimmender Schritt bei der enzymatischen Spaltung von Ester und Amid durch Chymotrypsin A*

Von GERHARD FINK und FRANZ PATAT

Aus dem Institut für Technische Chemie der Technischen Hochschule München**

(Der Schriftleitung zugegangen am 23. Juli 1969)

Zusammenfassung: Die durch Chymotrypsin A katalysierte Hydrolyse von L-Tyrosin-äthylester läßt sich nicht mit dem MICHAELIS-MENTEN-Schema beschreiben. Die Aufgliederung der Temperaturabhängigkeit der Bruttogeschwindigkeit in die Einzeltemperaturabhängigkeiten des MICHAELIS-Gleichgewichts und der Abreaktion des Komplexes führt zu physikalisch nicht sinnvoll deutbaren Größen.

Behandelt man aber die Reaktion vom Standpunkt der heterogenen Katalyse, so ergibt die Auswertung der experimentellen Ergebnisse, daß der dem phy-

sikalischen Adsorptionsgleichgewicht folgende endotherme Chemisorptionsschritt geschwindigkeitsbestimmend und die Abreaktion demgegenüber zu vernachlässigen ist.

Dies wird zusätzlich belegt durch NMR-Messungen am reagierenden Substrat in Abhängigkeit von der Temperatur, die eine Zerlegung des Gesamtvorgangs in die kinetischen Teilschritte gestatten und überdies Aussagen über molekulares stereochemisches Detail der Enzym-Substrat-Wechselwirkung ermöglichen.

Summary: *The adjustment of the substrate as the rate-determining step in the enzymic cleavage of esters and amides by chymotrypsin A.* The hydrolysis of L-tyrosine ethyl ester catalysed by chymotrypsin A does not fit the MICHAELIS-MENTEN scheme. Resolution of the temperature dependence of the overall rate into the separate temperature dependence of the MICHAELIS equilibrium and the decomposition reaction of the complex leads to physically nonsensical values.

If, however, the reaction is considered as an hetero-

geneous catalysis, the experimental results show that the endothermic chemisorption step that follows the physical adsorption equilibrium is rate-determining and the back reaction is, by comparison, negligible.

This is confirmed by NMR measurements of the reacting substrate at different temperatures, whereby the overall process may be separated into its kinetic part reactions and the molecular stereochemistry of the enzyme-substrate interaction may be studied.

Obwohl die Röntgenstrukturanalyse uns ausreichenden Einblick in den strukturellen Aufbau des enzymatischen Makromoleküls gestattet, konnte bisher noch keine generelle Vorstellung über die

notwendige Art und Größe und die spezifische Rolle dieses makromolekularen Aufbaus für den Ablauf des enzymatischen Prozesses entwickelt werden. Hierzu fehlen noch Experimente am *reagierenden*

* Aus der Dissertation „Zum Aussagewert kinetischer Analysen von Enzymreaktionen“ von GERHARD FINK, TH München, 1969.

** Postanschrift: Prof. Dr. Dr. h. c. F. PATAT, D-8 München, Arcisstraße 21.

Enzym: Chymotrypsin A (EC 3.4.4.5)

Abkürzungen: CHTR = Chymotrypsin A; PF = Proflavin; TEE = L-Tyrosin-äthylester.

Substrat und Enzym, die ein detailliertes stereochemisches Bild der einzelnen Reaktionsschritte ermöglichen.

Bezüglich chymotrypsinkatalysierter Reaktionen bestätigt die Röntgenstrukturanalyse¹ eindeutig die Mehrzentrenreaktion zwischen Serin 195, Histi-

din 57 und der $R-C(=O)-O-R'$ -Gruppierung von Estersubstraten, die aufgrund kinetischer Messungen (BENDER²) vorhergesagt wurde. In Abb. 1 ist die Formulierung von BENDER dieses durch Säure-Base-Katalyse charakterisierten Teiles des „Chymotrypsinmechanismus“ wiedergegeben. Aufgrund ihrer neueren Ergebnisse entwickeln BLOW et al.³ die Vorstellung, daß sich der gekoppelte Protonen-

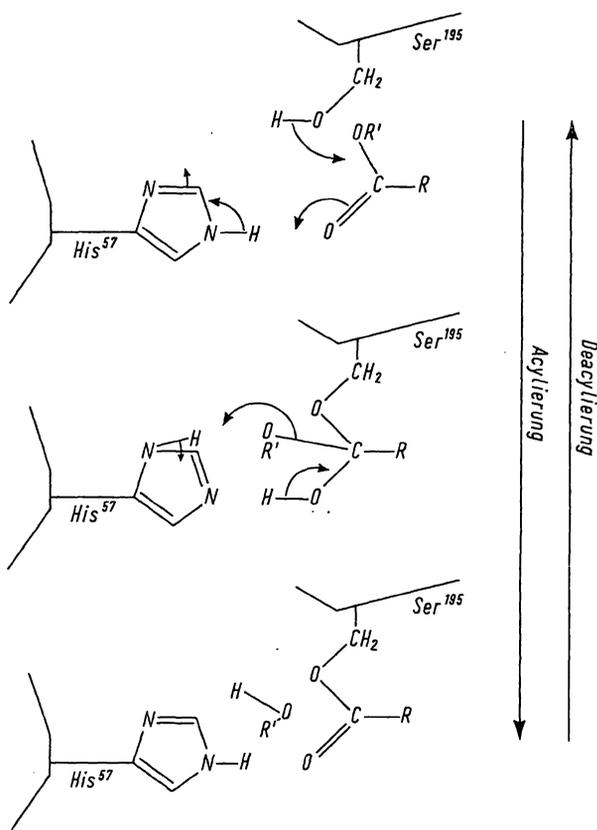


Abb. 1. Mehrzentrenreaktion am Chymotrypsin A zwischen Histidin 57, Serin 195 und einem Estersubstrat; Acylierungs- und Deacylierungsschritt; nach BENDER².

¹ a) B. W. MATTHEWS, P. B. SIGLER, R. HENDERSON u. D. M. BLOW, *Nature* [London] **214**, 652 [1967]; b) P. B. SIGLER, D. M. BLOW, B. W. MATTHEWS u. R. HENDERSON, *J. Mol. Biol.* **35**, 143 [1968].

² M. L. BENDER, *Trans. New York Acad. Sci.*, Jan. 1967.

³ D. M. BLOW, J. J. BIRKTOFT u. B. S. HARTLEY, *Nature* [London] **221**, 337 [1969].

übergang am Histidin zwischen der proximalen Asparaginsäure 102 einerseits und der Substrat-O-R'-Gruppierung (bzw. NHR') andererseits abspielt. Durch das „charge relay system“ ist dann der nucleophile Angriff des Serinsauerstoffs forciert. Da für unsere spätere Betrachtung allein die Zeitkonstante des gekoppelten Protonenwechsels maßgebend ist, und es nicht unser Ziel war zwischen beiden Mechanismen zu entscheiden, sind diese im folgenden pauschal als Mehrzentrenreaktion bezeichnet.

Zur Interpretation von kinetischen Befunden, die vom Schema nach MICHAELIS und MENTEN abweichen (das sich natürlich formal um das Acylenzym erweitern läßt (z. B. KAPLAN⁴)), nimmt man Konformationsänderungen des Proteinmakromoleküls zu Hilfe, die aber bezüglich ihrer Ursache und Auswirkung auf die Reaktion genau unterschieden werden sollten. So erfolgt nach HIMOE, PARKS und HESS⁵, MCCONN et al.⁶ sowie BENDER und WEDLER⁷ im alkalischen pH-Bereich während der Komplexbildung zwischen Enzym und kompetitivem Inhibitor eine von einer Konformationsänderung begleitete „Absorption“ eines Protons aus der Lösung. Die daher anomale pH-Abhängigkeit der Reaktion im alkalischen pH-Bereich erklärt sich nach HIMOE⁵ durch ein pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen zwei Konformationen des Enzyms, wobei die „nämliche ionisierte Gruppe vom $pK \sim 8,5$ beides regelt, sowohl das Konformationsgleichgewicht als auch die Abnahme in den katalytischen Eigenschaften des Enzyms“. Auch hier vermag die Röntgenstrukturanalyse noch Hinweise zur Klärung zu geben: Die Gruppe vom $pK \sim 8,5$ kann mit der terminalen Aminogruppe (Ile 16) der B-Kette identifiziert werden, die mit der Carboxylgruppe der dem Serin 195 benachbarten Asparaginsäure ein Ionenpaar bildet. Die Aufhebung dieser Beziehung muß die Stabilisierung der Konformation des aktiven Zentrums stark vermindern und dadurch die Substratanlagerung erschweren.

Temperatursprung-Relaxationsmessungen führen HAVSTEEN⁸ zu dem auch für die Reaktion gültigen

⁴ H. KAPLAN u. K. J. LAIDLER, *Canad. J. Chem.* **45**, 547 [1967].

⁵ A. HIMOE, P. C. PARKS u. G. P. HESS, *J. biol. Chemistry* **242**, 919 [1967].

⁶ J. MCCONN, E. KU, C. ODELL, G. CZERLINSKI u. G. P. HESS, *Science* [Washington] **161**, 274 [1968].

⁷ M. L. BENDER, F. C. WEDLER, *J. Amer. chem. Soc.* **89**, 3052 [1967].

⁸ B. H. HAVSTEEN, *J. biol. Chemistry* **242**, 769 [1967].

Tab. 1. Geschwindigkeitskonstanten des Chymotrypsin-Inhibitor-Komplexes.

Inhibitor	pH	k_{12} [l · Mol ⁻¹ · Sek. ⁻¹]	k_{21} [Sek. ⁻¹]	k_{23} [Sek. ⁻¹]	k_{32} [Sek. ⁻¹]	Lit.
Proflavin	8,42	$0,63 \cdot 10^8$	$1,23 \cdot 10^3$	$0,52 \cdot 10^3$	$7,04 \cdot 10^3$	l. c. ⁸
Proflavin	9,18	$1,14 \cdot 10^8$	$2,15 \cdot 10^3$	$7,30 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$	l. c. ⁸
<i>N</i> -Trifluoracetyl-D-phenylalanin	7,8	$1,0 \cdot 10^4$	$4,9 \cdot 10^2$			l. c. ⁹

Schluß, daß Konformationsänderungen im Enzym-Substrat-Komplex vor den katalytischen Schritten ablaufen. Bei pH 8,5 verursacht die Wechselwirkung Chymotrypsin-Proflavin zwei Relaxationseffekte, die sich dem bimolekularen Zusammenstoß, gefolgt von einer Isomerisierung des Chymotrypsin-Proflavin-Komplexes gemäß dem Schema



zuordnen lassen. Bei pH 6,7 aber findet sich nur der Relaxationsprozeß zweiter Ordnung. HAVSTEEN sieht die kompetitive Hemmung des Proflavins durch eine enge strukturelle Ähnlichkeit mit Chymotrypsin-Substraten gegeben. Uns erscheint Proflavin räumlich zu groß und daher der Relaxationseffekt im alkalischen pH-Bereich als Sonderfall der induzierten konformativen Adaptation, die in dieser Größe nur bei labiler Enzymkonformation im alkalischen pH-Bereich möglich ist. Dies spiegelt sich auch in den ermittelten Konstanten wieder, die in Tab. 1 den Werten von SYKES* (Inhibitor: *N*-Trifluoracetyl-D-phenylalanin)⁹ gegenübergestellt sind. SYKES' Konstanten beziehen sich auf NMR-Messungen an der zwischen freier Lösung und dem aktiven Zentrum des Enzyms rasch austauschenden Inhibitormolekel. Da bei dieser Meßmethode gerade die „chemische Umgebung“ der Inhibitormolekel in der Folge der Sorptionszustände erfaßt wird, wobei die Art und die Stärke der Bindung, wie unsere Ergebnisse zeigen, von Einfluß sind, darf die „NMR-Konstante“ k_{12} nach SYKES⁹ nicht mit dem Relaxationswert k_{12} verglichen werden, sondern beschreibt den langsamsten Teilschritt beim Anlagerungsvorgang des Inhibitors. Der Befund, daß SYKES Wert weit unter der Größenordnung von dem diffusionsbestimmter Reaktionen (EIGEN¹⁰) liegt, läßt die

* Die Arbeit von SYKES erschien nach Abschluß unserer eigenen NMR-Arbeiten. Unsere Ergebnisse weisen in die gleiche Richtung.

⁹ B. D. SYKES, J. Amer. chem. Soc. **91**, 949 [1969].

¹⁰ M. EIGEN u. G. G. HAMMES, Advances in Enzymol. **25**, 1 [1963].

Folgerung zu, daß entweder die Orientierung des Substrats oder Konformationsanpassungen des Proteins oder beides geschwindigkeitsbestimmend sind. Daß SYKES' Wert für k_{12} (bei pH 7,8) größer als der HAVSTEENS für k_{23} ist, bestätigt unsere Unterscheidung zwischen substratinduzierter Konformationsanpassung bei neutralem pH und den oben geschilderten Konformationsänderungen im alkalischen pH-Bereich. Allein um die Rolle der substratinduzierten Konformationsanpassung im Reaktionsoptimum im neutralen pH-Bereich bemüht sich die vorliegende Untersuchung. Eine Klärung dieses Problems schien uns nur durch den Einblick in molekulares stereochemisches Detail während der Reaktion möglich, wie ihn die Anwendung von NMR-Methoden erlaubt.

Konformationsänderungen sollten in Lösung stets zusammen mit den kleinen Wechselwirkungen, die im Bereich der Wasserstruktur und des Einflusses von Zusätzen (hierzu zählt im weitesten Sinne auch das Substrat) für subtilste Veränderungen der Proteinkonformation eine Rolle spielen, betrachtet und diskutiert werden.

Versuche und Ergebnisse

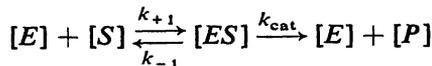
Wir wählten für alle Untersuchungen die Hydrolyse von L-Tyrosin-äthylester (TEE) durch Chymotrypsin A. Das bisher kinetisch nicht näher untersuchte Substrat L-Tyrosin-äthylester schien uns als einfacher Vertreter der Aromatensubstrate im Vergleich zu den schneller umgesetzten *N*-substituierten Verbindungen *N*-Acetyl-L-tyrosin-äthylester¹¹ und *N*-Benzoyl-L-tyrosin-äthylester¹² von Interesse. Außerdem ermöglichte dieses Substrat Resultate nach zwei experimentell verschiedenen Methoden: Über die UV-Differenzspektrenmethode konnte die „overall“ Reaktion verfolgt, durch NMR-Messungen diese Reaktion in Teilschritte zerlegt werden.

¹¹ H. HIRSCH, Dissertat. TH München 1965.

¹² S. KAUFMAN, H. NEURATH u. G. W. SCHWERT, J. biol. Chemistry **177**, 793 [1949].

1. Kinetische Analyse auf der Grundlage des Michaelis-Menten-Mechanismus

Ziel der konventionellen Analyse (z. B. KAUFMAN¹²) ist die Bestimmung der thermodynamischen Daten des vorgelagerten Enzym-Substrat-Gleichgewichts (ΔG , ΔH , ΔS) und des folgenden Aktivierungsgleichgewichtes (ΔG^{++} , ΔH^{++} , ΔS^{++}) sowie ihre eventuelle Aufteilung in Lösungs- und Strukturanteile (z. B. LAIDLER¹³). Voraussetzung für die Anwendung der EYRINGSchen Theorie ist hier aber, daß in der Folge



tatsächlich $k_{cat} \ll k_{+1}$ und k_{-1} ist und man somit bei Substratsättigung die Temperaturabhängigkeit von $k_{cat} = V/[E_0]$ dem Aktivierungsschritt zuordnen kann. Jedoch zeigen die NMR-Befunde, daß dies nicht generell zutrifft.

1.1. Experimentelles

Substanzen: L-Tyrosin-äthylester, Sigma Chem. Comp. L-Tyrosin, Serva-Heidelberg. Die Reinheitsprüfung erfolgte über die UV-Spektren. Chymotrypsin A aus Rinderpankreas (EC 3.4.4.5), Fa. Boehringer Mannheim GmbH, salzfrei, aus kristallisiertem Chymotrypsin A hergestellt. Jede Stammlösung wurde vor weiteren Messungen bei 6000 U./Min. zentrifugiert. Dann wurde die Konzentration spektralphotometrisch (280 nm) und mit der Biuretreaktion (546 nm) bestimmt.

Zum Molekulargewicht von Chymotrypsin A: In der Ultrazentrifuge mit UV-Absorptionsmeßeinrichtung (Scanner) wurde über den Konzentrationsbereich von 0,05% bis 0,001% der Molekulargewichtswert in Abhängigkeit von pH-Wert, Puffermolarität und Salzzusätzen nach der Methode des Sedimentationsgleichgewichtes bestimmt. Von Bedeutung für die kinetischen Versuche ist, daß bei den von uns verwendeten „kinetischen Konzentrationen“ (0,0005%) Chymotrypsin A eindeutig monomer (Mol.-Gew. 21 600) vorliegt, also weder „Active site to active site“-Dimerisation¹⁴ noch Oligomerisation^{15,16} eintritt. Dies gilt von pH 3–pH 7; im Alkalischen zeigt sich eine starke Beeinflussbarkeit der Enzymstruktur (Aufquellung) durch das gesamte Lösungsmilieu an den Molekulargewichtswerten.

Umsatzbestimmung: Spektralphotometrische Verfolgung (Zeiss Einstrahl- und Zweistrahlgerät; temperierbare Hellma-Quarküvetten, Lichtweg 1 cm, Temperaturkonstanz $\pm 0,02^\circ\text{C}$; Reaktionsvolumen: 0,99 ml,

¹³ K. LAIDLER, *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, p. 248, Oxford 1958.

¹⁴ F. J. KÉZDY u. M. L. BENDER, *Biochemistry* [Washington] **4**, 104 [1965].

¹⁵ G. W. SCHWERT, *J. biol. Chemistry* **179**, 655 [1949].

¹⁶ K. MORIMOTO u. G. KEGELES, *Biochemistry* [Washington] **6**, 3007 [1967].

Enzymzugabe mit 50- μl -Pipetten) der Hydrolyse von Tyrosin-äthylester nach der Methode des Differenzspektrums¹⁷. $\Delta\epsilon = \epsilon_{TEE} - \epsilon_{TYR} = 672 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (233 nm; pH 7, 0,06M Phosphatpuffer). Die Methode wurde nach einer genauen Extinktionsanalyse bezüglich pH- und gerätbedingter Konzentrationsabhängigkeit verbessert, die Extinktionsgleichung berechnet*.

Zur Auswertung wurde stets die Anfangsgeschwindigkeit herangezogen, so daß die Konkurrenzreaktion des Produktes zu vernachlässigen war.

Die Bedingung $[S] \gg [E_0]$ (McCLURE und NEURATH¹⁸) wurde auch bei den niedrigen Substratkonzentrationen eingehalten. Die Bilanzgleichung $[S] = [S_0] - [ES]$ war daher nicht zu berücksichtigen.

Der Fehler, im wesentlichen bedingt durch das Anlegen der Tangente an die Ursprungsneigung, beträgt für alle Substratkonzentrationen (außer der höchsten mit $\pm 4\%$) maximal $\pm 2\%$. Die Reproduktion der Messungen ist genauer.

1.2. Ergebnis

Die MICHAELIS-MENTEN-Auftragung (Abb. 2) zeigt den nicht erwarteten Befund, daß bei der Temperatur von $16,5^\circ\text{C}$ die berechnete Maximalgeschwindigkeit (V) wesentlich über der vom experimentellen

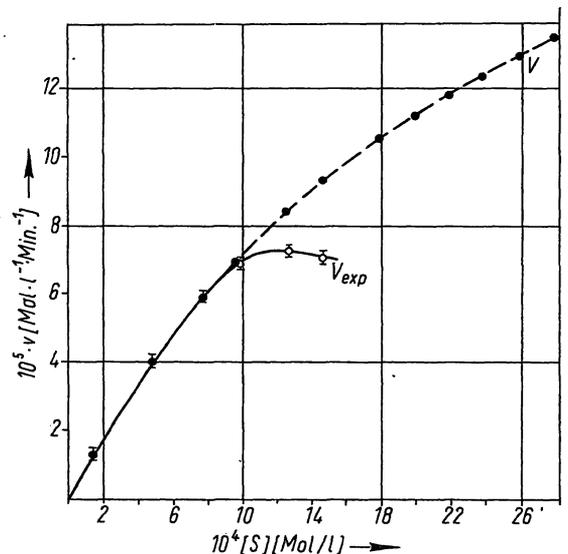


Abb. 2. MICHAELIS-MENTEN-Kurve der Reaktion von Chymotrypsin A mit Tyrosin-äthylester. $[E_0] = 8,2\gamma/\text{ml}$; Tyrosin-äthylester in 0,06M Phosphatpuffer; Temperatur $16,5^\circ\text{C}$. Die Werte der gestrichelten Kurve (\bullet) wurden berechnet, die der ausgezogenen Kurven experimentell bestimmt.

* Dissertation G. FINK, unveröffentlicht.

¹⁷ G. W. SCHWERT u. Y. TAKENAKA, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **16**, 570 [1955]; M. T. HAKALA u. G. W. SCHWERT, ebenda **16**, 489 [1955].

¹⁸ W. O. McCLURE u. H. NEURATH, *Biochemistry* [Washington] **5**, 1425 [1966].

Verlauf der Kurve angezeigten Maximalgeschwindigkeit (V_{exp}) liegt. Ohne hierfür zunächst eine Deutung geben zu wollen folgt daraus, daß das Gebiet der Substratsättigung nicht erreichbar ist und daher die aus der Temperaturabhängigkeit von V_{exp} resultierende Aktivierungsenergie E_{exp} sich aus einem zur Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes relativen Enthalpieteilbetrag (ΔH_{K_m}) und der Aktivierungsenergie (E_R) der Abreaktion zusammensetzt. Beide Größen sollten daher getrennt über LINEWEAVER-BURK-Diagramme bei verschiedenen Temperaturen zu ermitteln sein, denn durch diese Auftragung beziehen wir uns auf den Anfangsteil der MICHAELIS und MENTEN-Kurven. Zunächst ist nun in Abb. 3 die gemessene Geschwindigkeit gegen die Temperatur angetragen. Zusätzlicher Parameter ist die über eine Zehnerpotenz variierte Substratkonzentration. Man erkennt eine weitere Komplikation: Die Kurven steigen nur bis etwa 20°C exponentiell mit der Temperatur an, darüber beginnt „anomalies Verhalten“^{19, 20}, das die Auswertung nach LINEWEAVER und BURK unmög-

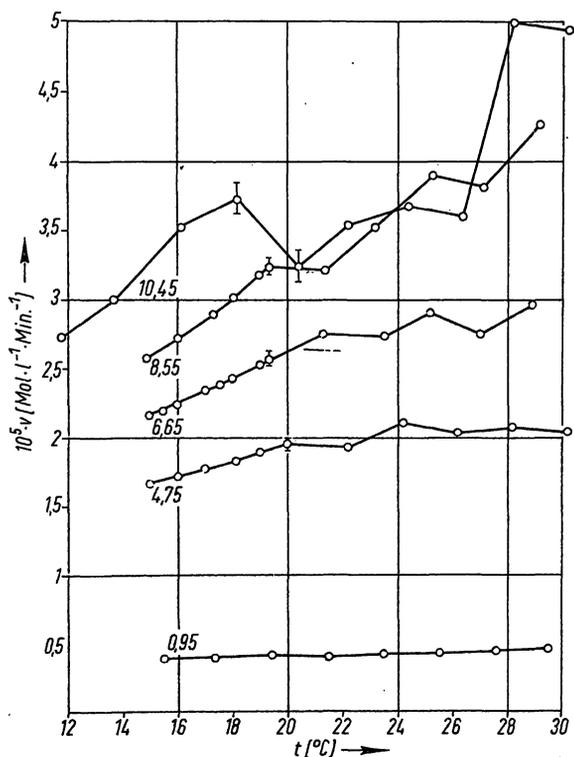


Abb. 3. Auftragung der experimentellen Geschwindigkeit gegen die Temperatur für verschiedene Substratkonzentrationen. $[E_0] = 2,3 \cdot 10^{-7} \text{ Mol/l}$; die Zahlen an den Kurven geben die Substratkonzentration in 10^{-4} Mol/l an.

lich macht. Die Möglichkeit eines deutbaren Ergebnisses ist also beschränkt auf den Anfangsteil der Kurven von 15–20°C. Für diese Temperaturen wurde aus Abb. 3 v in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ermittelt und daraus V und K_m . Aus der Auftragung von $\lg V$ bzw. $\lg K_m$ gegen $1/T$ ergaben sich schließlich $E_R = 34,3 \text{ kcal/Mol}$ sowie eine mit $\Delta H = -34,7 \text{ kcal/Mol}$ exotherme Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes. Die ungewöhnliche Größe dieser Werte läßt sich physikalisch nicht sinnvoll deuten und legt den Verdacht nahe, daß die Auswertung nach MICHAELIS-MENTEN hier dem wahren Sachverhalt nicht gerecht wird.

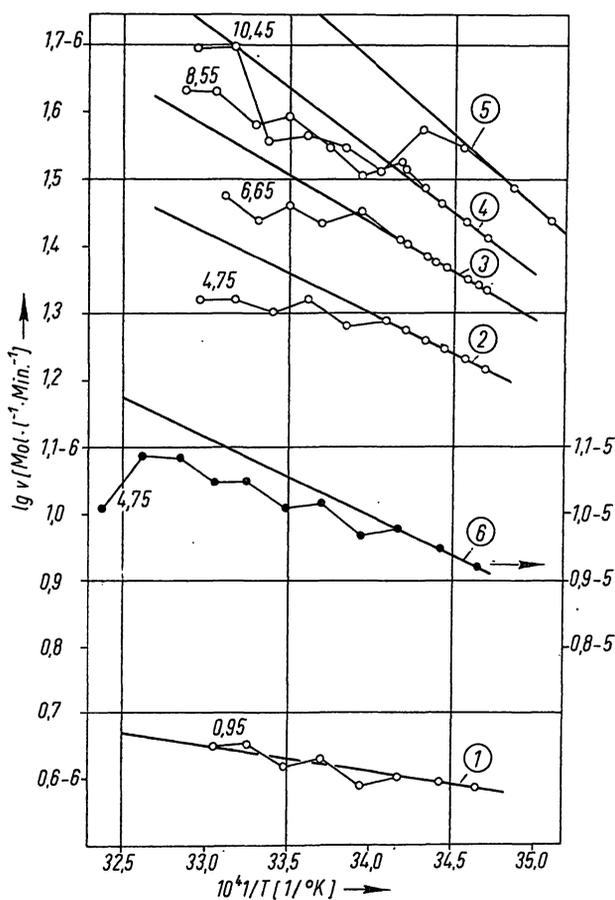


Abb. 4. ARRHENIUSsche Auftragung der Kurven von Abb. 3. $[E_0] = 11,5 \cdot 10^{-7} \text{ Mol/l}$ (●) und $2,3 \cdot 10^{-7} \text{ Mol/l}$ (○). Die den Geraden entnommenen Aktivierungsenergien s. Text, Tab. 2. Die Zahlen an den Kurven geben die Substratkonzentration in 10^{-4} Mol/l an.

¹⁹ F. PATAT u. G. TALSZY, Z. Naturforsch. 22b, 524 [1967].

²⁰ G. TALSZY u. G. FINK, diese Z. 348, 1141 [1967].

Tab. 2. Aktivierungsenergien bei verschiedenen Enzym- und Substrat-Konzentrationen.

Kurve	[E ₀] [Mol/l]	[S] [Mol/l]	E _{exp} * [kcal/Mol]	E _{exp} ** [kcal/Mol]		
				15°C	16°C	17°C
1	2,3 · 10 ⁻⁷	0,95 · 10 ⁻⁴	1,9	1,8	1,5	1,4
2	2,3 · 10 ⁻⁷	4,75 · 10 ⁻⁴	5,7	6,7	5,6	4,9
3	2,3 · 10 ⁻⁷	6,65 · 10 ⁻⁴	6,8	8,6	7,0	6,4
4	2,3 · 10 ⁻⁷	8,55 · 10 ⁻⁴	8,6	10,0	8,8	7,5
5	2,3 · 10 ⁻⁷	10,45 · 10 ⁻⁴	10,5	11,6	9,9	8,8
6	11,5 · 10 ⁻⁷	4,75 · 10 ⁻⁴	5,7	6,7	5,6	4,9

* Werte aus Abb. 4. ** Berechnet nach I. c.¹⁹.

Nach der von GIBSON²¹ abgeleiteten Beziehung

$$E_{\text{exp}} = E_{\text{R}} - \left(\frac{K_m}{K_m + [S]} \right) \Delta H$$

sollte die jeweils gemessene experimentelle Aktivierungsenergie in ihrer Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration zu überprüfen sein. In Abb. 4 sind die Kurven von Abb. 3 nach ARRHENIUS angetragen, im erwähnten Anfangsteil von 15–20°C resultiert jeweils eindeutig eine Gerade. Wenn aber K_m temperaturabhängig ist, muß dies auch der Faktor $K_m/(K_m + [S])$ sein, und E_{exp} müßte, wie die für drei Temperaturen berechneten Werte in Tab. 2 zeigen, bei konstanter Substratkonzentration mit steigender Temperatur abnehmen, also in Abb. 4 einen gekrümmten Kurvenverlauf zeigen.

Da die GIBSONSCHE Beziehung auf der Grundlage des MICHAELIS-MENTEN-Schemas abgeleitet ist, kann sie unsere Experimentalbefunde nicht beschreiben. Ihre experimentelle Überprüfung schien uns aber aus Gründen einer sicheren Interpretation der Ergebnisse der folgenden Abschnitte nötig.

Die in Abb. 4 mit eingezeichnete Kurve 6 diente zur Prüfung auf Denaturierungseinflüsse. Sie hat mit Kurve 2 identische Substratkonzentration, aber eine fünffach höhere Enzymkonzentration. Normiert man beide Kurven auf die Enzymkonzentration, wie in Abb. 5, so müssen sie zusammenfallen. Ab etwa 26°C divergieren sie jedoch wieder, bis Kurve 6 mit der höheren Chymotrypsin-Konzentration bei 33°C ebenfalls stark absinkt. Aus dem unterschiedlichen Kurvenverlauf läßt sich näherungsweise die Wärmetönung der reversiblen Denaturierung zu $\Delta H = -40$ kcal/Mol berechnen.

2. Behandlung der Enzymkatalyse als einen Spezialfall der heterogenen Katalyse

Die formale Analogie zwischen MICHAELIS-MENTEN-Gleichung und LANGMUIR-Isotherme, die

²¹ K. D. GIBSON, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 10, 221 [1953].

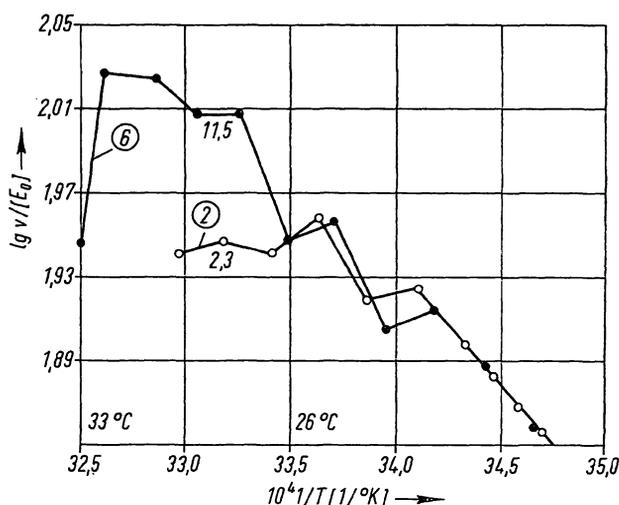


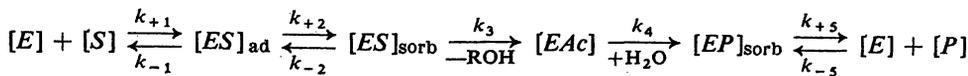
Abb. 5. $\lg v/[E_0]$ gegen $1/T$ bei gleicher Substratkonzentration, aber verschiedener Enzymkonzentration. $[S] = 4,75 \cdot 10^{-4}$ Mol/l; die Zahlen an den Kurven geben die Enzymkonzentration in 10^{-7} Mol/l an. Die Meßwerte wurden den entsprechenden Kurven aus Abb. 4 entnommen.

zwangsläufig aus den kinetischen Ableitungen auf der Grundlage des Massenwirkungsgesetzes folgt, wurde bereits von WEIDENHAGEN²² und SCHWAB^{23, 24} aufgezeigt. Zur Präzisierung dieser Ansätze, die den MICHAELIS-MENTEN-Komplex aber nur als physikalischen Adsorptionskomplex auffassen und daher praktisch zu analogen Deutungsweisen kommen, trennen wir den eigentlichen Reaktionsablauf in einen Chemisorptionsschritt und in die Abreaktion des chemisorbierten Substrats:

²² R. WEIDENHAGEN u. LANDT, Z. Ver. dtsh. Zuckerind. 80, 25 [1930].

²³ G.-M. SCHWAB, Ergebn. exakt. Naturwiss. 7, 276 [1928].

²⁴ G.-M. SCHWAB, Z. physik. Chem. A [Frankfurt/M.] 187, 313 [1940].



(EAc = Acylenzym innerhalb der Mehrzentrenreaktion).

Aus der Messung der Umsatzgeschwindigkeit (Abb. 3) kann nicht entschieden werden, ob die den Reaktionsablauf bestimmende Hemmung in der Sorption oder in der Abreaktion liegt. Hinweise gibt aber die Wechselzahl. Sie beträgt bei 25°C etwa 200 μMol Tyrosin-äthylester/Min. je μMol Chymotrypsin, d. h., der Durchgang eines Tyrosin-äthylester-Moleküls benötigt etwa 0,3 Sek. Da aber die Zeitkonstante für den gekoppelten Protonenwechsel beim Zusammenwirken mit räumlich benachbarten Donator- und Akzeptorgruppen bei 10⁻⁵ Sek. liegt (EIGEN¹⁰), d. h., die Mehrzentrenabreaktion also in dieser zeitlichen Größenordnung verläuft, ergibt sich die Folgerung, daß das Chemisorptionsgleichgewicht maßgebend für die Umsatzgeschwindigkeit sein muß. Eine weitere wichtige Größe gewinnen wir aus der Tatsache, daß im Gegensatz zu Katalysatoren das Sorptionsgeschehen an Enzymen für jedes einzelne Substratmolekül immer das gleiche ist. Unter diesen Voraussetzungen können wir die Enthalpie der Chemisorption nach CLAUDE CLAUPEYRON gemäß der Gleichung

$$\frac{d \ln[S]}{d(1/T)} = \frac{\Delta H}{R}$$

aus den Substratabhängigkeiten bei verschiedenen Temperaturen bestimmen. Dazu sind in Abb. 6 zunächst aus Abb. 3 für die niedrigen Substratkonzentrationen die „Isothermen“ angetragen. Die durch Pfeile gekennzeichneten Schnitte entsprechen den „Isosteren“. Diese praktisch parallelen Geraden ergeben nach Abb. 7 (lg[S] gegen 1/T) eine Wärmetönung von ΔH = +7 bis 8 kcal/Mol. Dieser Befund bestätigt unsere Folgerung, daß bei dieser Enzymreaktion die Erhöhung der Bruttogeschwindigkeit bei Temperatursteigerung nicht durch die beschleunigte Abreaktionsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes bedingt ist, sondern eben durch den endothermen Chemisorptionsvorgang, über den nun molekulare Vorstellungen zu erarbeiten sind.

3. NMR-Messungen am reagierenden Substrat

Gemäß unserem Reaktionsschema analog der heterogenen Katalyse wird ein der eingesetzten Enzymmenge proportionaler Teil der Substratmolekeln im Chemisorptionszustand sein, wovon wiederum ein

Teil gerade die Mehrzentrenreaktion durchlaufen wird. Der beobachtete „chemical shift“ der Austauschsignale jeder einzelnen Protonengruppe des Substrats wird dann das gewogene Mittel der „shifts“ der genannten Spezies und der Signale in freier Lösung sein. Dazu wird durch die Reaktion

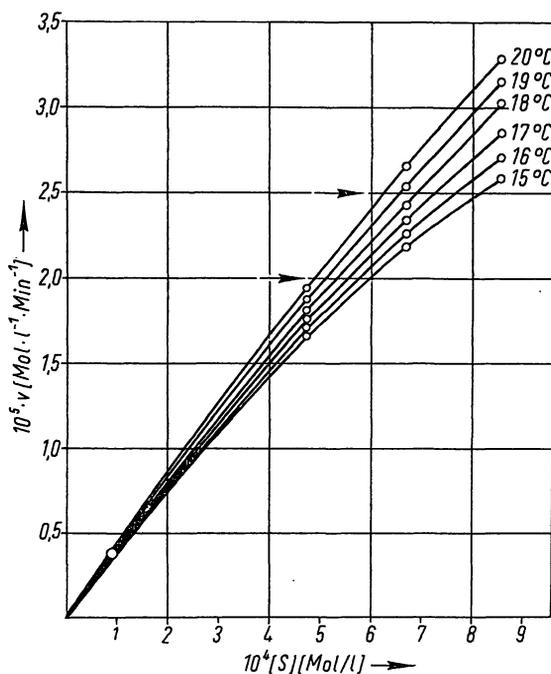


Abb. 6. Auftragung von v gegen die Substratkonzentrationen 0,95, 4,75, 6,65 und 8,55 · 10⁻⁴ Mol/l bei verschiedenen Temperaturen. Die Meßwerte wurden aus Abb. 3 entnommen. (Die Bedeutung der Pfeile s. Text.)

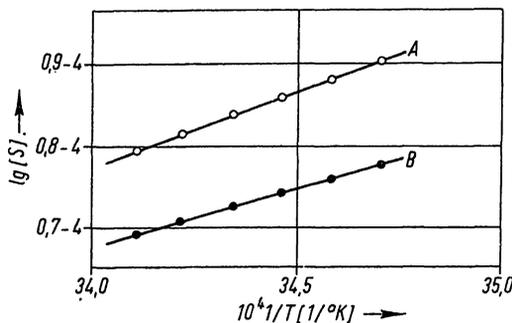


Abb. 7. CLAUDE CLAUPEYRON-Auswertung von Abb. 6. A: ΔH = 8,2 kcal/Mol; B: ΔH = 7,2 kcal/Mol; Mittelwert ΔH 7,7 ± 0,5 kcal/Mol.

eine Abhängigkeit der Austauschsignale vom Umsatz zu berücksichtigen sein. Eine differentielle Änderung der den einzelnen Gruppen des Substrats Tyrosin-äthylester (Phenyl-, β -CH₂-, O-CH₂- und CH₃-Gruppe) zugeordneten Signale sollte Rückschlüsse auf deren spezifische Funktion beim Reaktionsablauf zulassen. Aus einer Abhängigkeit der Effekte von der Temperatur schließlich müßten sich Aussagen über die Dynamik der gesamten Enzym-Substrat-Wechselwirkung ergeben.

SYKES⁹ schloß von der Fluor-substituierten *N*-Acetyl-Gruppe auf das Verhalten der gesamten Inhibitormolekel; unsere Methode unterscheidet alle Gruppen des Substratmoleküls.

3.1. Experimentelles

Meßmethode

Um auswertbare Effekte zu erzielen, muß die zeitliche Konzentration des adsorbierten Substrats möglichst groß sein. Danach ist die Substratmenge auszurichten, die, um lange Reaktionszeiten und folglich Zeit zur wiederholten Messung der Signale zur Verfügung zu haben, wesentlich größer sein muß. Andererseits ist Tyrosin-äthylester in D₂O nur bis etwa $5 \cdot 10^{-2}$ Mol/l quantitativ löslich. Aus zahlreichen Vorversuchen ergaben sich als optimale Konzentrationen: $[E_0] = 2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l und $[S] = 5 \cdot 10^{-2}$ Mol/l. Pro Zeit-Umsatz-Versuch konnte das gesamte Spektrum vier- bis fünfmal durchfahren werden.

Das entstehende Tyrosin bleibt stets unter der NMR-Erfassungsgrenze. Seine Löslichkeit in D₂O ist so gering, daß es mit fortschreitendem Umsatz ausfällt (der Niederschlag wurde über IR-Messungen geprüft), und als Festkörper in dieser Konzentration die Signale des Esters nicht verfälscht. Gemäß Vorversuchen zeigte eine bei 60°C gesättigte Tyrosinlösung keine Signale.

Bei einem Molverhältnis 1:1 der beiden Komponenten ES_{sorb} und $S_{\text{Lösung}}$ liegt (wenn die Ungleichung $2\pi(\delta_i - \delta_j) < 1/\tau < \omega_0$ erfüllt ist) das gemittelte Signal

auf halbem Weg zwischen den Frequenzen an den beiden Aufenthaltsorten. Da am Anfang der Reaktion $[S]_{\text{Lösung}}$ überwiegt, liegt das beobachtete Austauschsignal zunächst nahe der Frequenz des Substratsignals ohne Austausch. Mit fortschreitendem Umsatz wird das Populationsverhältnis 1:1 durchlaufen. Schließlich wird das Verhältnis vom Substrat unterschritten, es sinkt die $[ES]_{\text{sorb}}$ -Konzentration und das resultierende Signal verliert an Intensität und verschwindet, wenn die NMR-Erfassungsgrenze erreicht ist. Der maximal beobachtbare Endshift entspricht also dem Molverhältnis 1:1, die Differenz der Resonanzfrequenzen an den beiden Aufenthaltsorten ($\delta_i - \delta_j$) ist demnach der doppelte Wert unseres ausgewerteten Endshifts.

Alle Messungen wurden in einem Varian-A-60-Spektrometer durchgeführt. Tyrosin-äthylester und Chymotrypsin (s. 1.1.) wurden ohne weitere Vorbehandlung in D₂O gelöst, der geringe Gehalt an H₂O störte die Auswertung der Spektren nicht.

Standard: DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentan-SO₃[⊖]Na[⊕]). Das Spektrum des reinen Substrats mit Standard wurde zuerst aufgenommen. Die Reaktion, gestartet durch Zugabe von Chymotrypsin mittels einer Spritze, wurde dann in einem zweiten Röhrchen mit Substrat ohne Standard durchgeführt, da dieser mit dem Enzym reagierte. Thermostatisierung erfolgte durch Anblasen des Röhrchens mit temperiertem Stickstoff. Hierdurch ist leider nur eine Temperaturkonstanz von $\pm 0,5^\circ\text{C}$ zu erreichen, so daß kleinere Temperaturintervalle als 4°C nicht sinnvoll waren. Temperaturbereich: 13°C bis 28°C . Die Temperaturmessung erfolgte gesondert über die temperaturabhängige Verschiebung der beiden Banden von reinem Methanol vor und nach der Reaktion.

Auswertung

Zur Typisierung des NMR-Spektrums von Tyrosin-äthylester in D₂O folgten wir der von DISCHLER²⁵ vorgeschlagenen Systematik. In Tab. 3 (s. auch Abb. 8) sind die Signale von reinem Tyrosin-äthylester, das sind also die Signale ohne Austausch bei dieser Temperatur, zusammengestellt.

Tab. 3. NMR-Signale von reinem Tyrosin-äthylester im Temperaturbereich von 13–28°C.

	Phenyl-H	α -CH	β -CH ₂	Äthylgruppe —O—CH ₂ — —CH ₃	
τ	2,8 Mitte	durch H ₂ O-Bande bei 5 verdeckt	6,99	5,71	8,79
Multiplizität	Quartett		Dublett	Quartett	Triplett
Typ	AA'BB'		AX ₂		X ₂ A ₃
$\nu_0\delta$	16,1 Hz ($\nu_0\delta_{AB}$ berechnet)		120 Hz		185 Hz
<i>J</i>	9 Hz (<i>J</i> _{AB})		6,5 Hz	7,5 Hz	7,5 Hz

²⁵ B. DISCHLER, Angew. Chem. 78, 653 [1966].

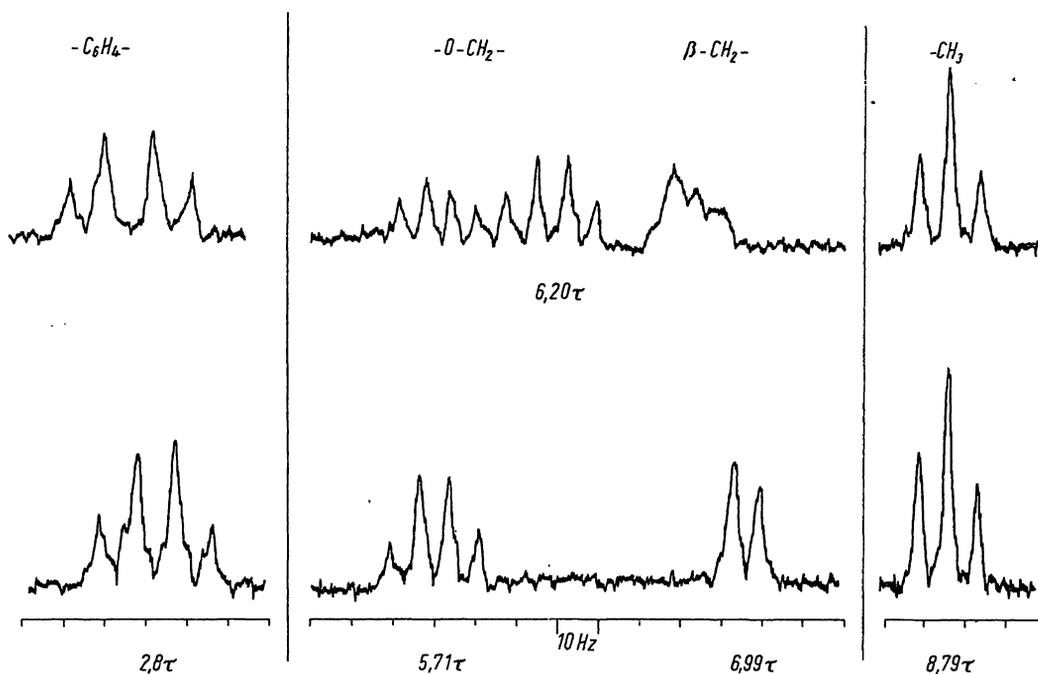


Abb. 8. Übersicht der Veränderungen des NMR-Spektrums von Tyrosin-äthylester während der Reaktion mit Chymotrypsin A (obere Zeile).

Untere Zeile: Signallagen in Lösung (Temp. 13,5°C).

$\nu_0\delta$ der Phenylprotonen wurde nach den theoretischen Ansätzen von RICHARDS et al.²⁶ und MARTIN et al.²⁷ sowie nach l. c.²⁸ berechnet. Die Daten der übrigen Gruppen, einschließlich der des entstehenden Äthanol bzw. C_2H_5OD , konnten direkt aus den Spektren ermittelt werden. Zu jedem Peak jeder obigen Gruppe wurde bis zum Ende des meßbaren Umsatzes die Reaktionszeit notiert und der weiter oben definierte Endshift für die zusammengehörigen Signalgruppen ausgemessen bzw. im Fall der Phenylprotonen $\nu_0\delta$ daraus berechnet. Quantitativ in Abhängigkeit von der Temperatur auswerten ließ sich dann die Differenz $(\nu_0\delta_{AB})_i - (\nu_0\delta_{AB})_j = (\nu_0\delta_{AB})$ der Phenylprotonen zwischen „Lösungs“- und „Reaktions“-Signalen sowie die Differenz $\delta_i - \delta_j$ des β - CH_2 -Dubletts zwischen „Lösungs“- und „Reaktions“-Signalen.

3. 2. Ergebnisse

Zur Übersicht sind in Abb. 8 in der oberen Zeile die Veränderungen und der Endshift der einzelnen

²⁶ R. E. RICHARDS u. T. SCHAEFER, Trans. Farad. Soc. **54**, 1280 [1958].

²⁷ J. MARTIN u. B. P. DAILEY, J. chem. Physics **37**, 2594 [1962].

²⁸ J. W. EMSLEY, J. FEENEY u. L. H. SUTCLIFFE, High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Vol. 1 and 2, Pergamon Press 1967.

Tyrosin-äthylester-Signalgruppen zusammengestellt. Die untere Zeile entspricht dem Aufenthaltsort in Lösung.

Reaktionsabhängige Effekte:

a) Das gesamte Phenylprotonenquartett zeigt eine Verschiebung zu niedriger Feldstärken. Zusätzlich verschiebt sich $\nu_0\delta_{AB}$ mit fortlaufender Reaktion in Richtung eines $AA'XX'$ -Systems. Dies zeigt, im Zusammenhang mit der durch den Austauschprozeß bedingten Gesamtverschiebung des Quartetts gesehen, an, daß die „chemische Umgebung“ des AA' -Teils gegenüber dem BB' -Teil in adsorbiertem Zustand stärker verändert ist. Dies deutet auf eine „Ausrichtung“ der adsorbierten Molekel hin.

b) Das β - CH_2 -Dublett verschiebt sich ebenfalls als Ganzes, aber doppelt so stark wie das Phenylquartett, nach niederen Feldstärken. Zusätzlich erscheint hier starke Verbreiterung und teilweise Aufspaltung in ein Triplet ($J \sim 4,5$ Hz).

c) Das O - CH_2 -Quartett bei 5,6 τ und das Methyltriplett erfahren keine Veränderung der Verschiebung, der Linienbreite oder der Kopplungskonstanten. Nur die Intensität des O - CH_2 -Quartetts läßt reaktionsabhängig nach. Dafür erscheint bei 6,2 τ ein Quartett gleicher Form, dessen Intensität

zunimmt. Frequenzort und Kopplungskonstante entsprechen den üblichen Werten der O-CH₂-Protonen in Äthanol, so daß hier diese Gruppe des durch die Hydrolyse des Esters entstehenden Alkohols vorliegt. Die gegenläufige Intensitätsbewegung der „Ester-O-CH₂“ und der „Alkohol-O-CH₂“-Signale bestätigen den Befund.

Aus diesen reaktionsabhängigen Effekten folgt, daß der Austauschvorgang eine Verschiebung der Signale der Phenylprotonen und der β -CH₂-Protonen, *nicht* aber der Äthylprotonen zu niedrigen Feldstärken bewirkt. Dies bedeutet: In der am Enzym adsorbierten Substratmolekel hat die Äthylgruppe die gleiche unveränderte chemische Umgebung der Lösung und zusätzlich, da Kopplungskonstante und Relaxationszeit unverändert sind, gleiche Rotationsmöglichkeit wie in Lösung. Daraus folgt, daß die Enzym-Substrat-Wechselwirkung über die Phenylgruppe des Substrats erfolgt. Die Äthylgruppe des Esters muß im sorbierten Zustand von der Enzymoberfläche soweit abstehen, daß sie nicht in direkte Wechselwirkung mit dem Protein treten kann. Hieraus ist sofort verständlich, warum die Hydrolysegeschwindigkeit von Estern unabhängig von der Alkoholkomponente ist (BENDER^{2,3}).

Zusätzliche temperaturabhängige Effekte:

Folgerung aus a):

Beim Austauschvorgang tritt keine unpolare Wechselwirkung des Substratphenylringes mit einer aromatischen Gruppe des Enzyms auf, da keine Verschiebung zu höheren Feldstärken erfolgte. Es findet auch kein direkter Kontakt mit einem Kettensegment statt, da sonst die Phenylprotonenlinien stark verbreitert wären²⁹. Die Vergrößerung von $\nu_0\delta$ in Richtung niedriger Feldstärken gibt uns den direkten Hinweis, daß die Phenylgruppe im sorbierten Zustand sich in einer weniger polaren Lösungs-umgebung befindet. Dies erweist den Chemisorptionsvorgang als eine *hydrophobe* Wechselwirkung zwischen einer geeigneten Enzymmicelle (hydrophobe Tasche) im unmittelbaren Bereich des aktiven Zentrums und der in diese Tasche eintauchenden Phenylgruppe. Die Bestätigung liefert die Temperaturabhängigkeit von $\Delta\nu_0\delta$ in Abb. 9 ($\lg\Delta\nu_0\delta$ gegen $1/T$): Der ermittelte ΔH -Wert (+8 kcal/Mol) ist gemäß der thermodynamischen Eigenart hydrophober Bindungen positiv, der Chemisorptions-

schritt („Eintauchprozeß“) wird also mit steigender Temperatur bis 20°C erleichtert und beschleunigt.

Folgerung aus b):

Zur Erklärung der Verbreiterung und Aufspaltung der β -CH₂-Signale hilft die Betrachtung des Tyrosin-äthylester-Moleküls. Normalerweise bedingt die Rotation der β -CH₂-Gruppe um die Molekülachse zum α -C-Atom eine effektive magnetische Gleichwertigkeit der beiden H-Atome. Das Spektrum des Lösungs-Tyrosin-äthylester-Moleküls zeigt demnach ein klares Dublett mit einer Kopplungskonstanten. Fehlt die Mittelung durch Rotation, werden die beiden Kerne der CH₂-Gruppe ungleichwertig. Denkt man sich das abreagierende Tyrosin-äthylester-Molekül am Enzym über die Phenylgruppe in der hydrophoben Tasche einerseits und über das Carboxyl-C-Atom, an dem ungeestert wird, andererseits festgehalten, so bleibt der CH-CH₂-Gruppierung kaum noch die Möglichkeit einer Bewegung. Es resultiert die Aufspaltung und Linienverbreiterung. Zusätzlich nun geraten die H-Atome der β -CH₂-Gruppe während dieses eigentlichen katalytischen Ereignisses permanent in das induzierte Magnetfeld des Ringstromes der benachbarten Phenylgruppe, womit die beobachtete stärkere Verschiebung verständlich ist. Dieser Effekt nimmt nun nach Abb. 10 überraschenderweise mit steigender Temperatur ab, d. h., die Zahl der Abreaktionsereignisse wird geringer. Von Bedeutung ist ferner, daß nach Abb. 10 über den gesamten Temperaturbereich von 13 bis 28°C (vgl. Abb. 9) die Anzahl der Mehrzentrenreaktionen stetig abnimmt. Die Auftragung des $\lg(\delta_i - \delta_j)$ gegen $1/T$ zeigt, daß dieser Teil der enzymatischen Reaktion ohne Aktivierungsenergie abläuft.

Diskussion

Die Gültigkeit des MICHAELIS-MENTEN-Mechanismus galt bisher nur bei Enzymen aufgehoben, die Allosterie zeigen. In dieser Arbeit ist ein Beispiel behandelt, bei dem einerseits das physikalische Adsorptionsgleichgewicht, das aus den Vorstellungen von MICHAELIS-MENTEN folgt, für den Ablauf der Enzymreaktion ohne Bedeutung ist, und andererseits die A-priori-Annahme, daß der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes geschwindigkeitsbestimmend ist, nicht zutrifft. Entscheidend und geschwindigkeitsbestimmend ist vielmehr der das Substrat spezifisch orientierende Eintauchvorgang der Phenylgruppe in die hydrophobe Mjcelle, der

²⁹ O. JARDETZKY, *Naturwissenschaften* **54**, 149 [1967], sowie Zitate hierin.

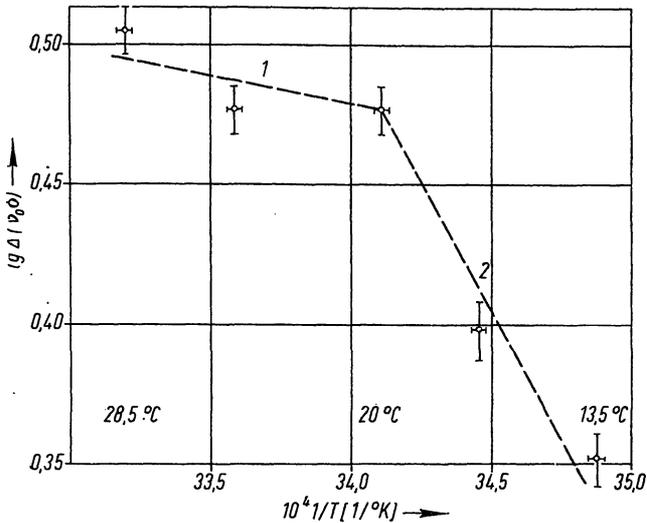


Abb. 9. Temperaturabhängigkeit des Substratanlagevorganges (s. Text).

1: $\Delta H \sim 1$ kcal/Mol; 2: $\Delta H \sim 8$ kcal/Mol.

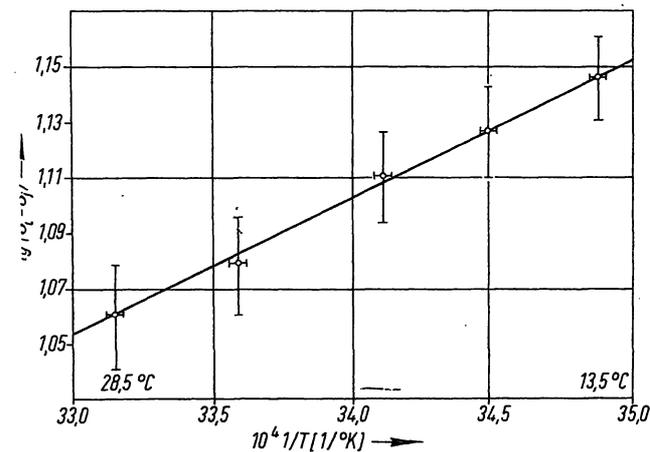


Abb. 10. Temperaturabhängigkeit der Mehrzentrenreaktion (s. Text).

erst zum reaktionsfähigen Komplex führt. Durch diese Eintauchrichtung gerät die Carboxylgruppe des Substrats in die räumlich günstige Lage zu den beiden funktionellen Gruppen des Enzyms. Das sich so einlagernde Substrat verursacht eine partielle Umordnung der Enzymicelle zumindest derart, daß Seitengruppen der Peptidketten sich durch Umorientierung dem Volumenbedarf der Phenylgruppe anpassen. Dies kann zur Vergrößerung der Micelle führen, wenn man die Ketten beweglich und versetzbar annimmt. Die energetische Summe dieser kleinen Wechselwirkungen, zu der auch Beiträge

des an der Proteinoberfläche nachgeordneten Wassers kommen, ergibt den aus Abb. 9 resultierenden ΔH -Wert, der bis $20^\circ\text{C} + 8$ kcal/Mol beträgt. Mechanistisch bedeutet dies: Die Substratmolekel erfährt mit steigender Temperatur leichter und damit schneller die günstige Orientierung in der hydrophoben Tasche. Die Ursache kann in einer durch die Temperaturbewegung erleichterten Segmentverschiebung zu suchen sein. Übersteigert sich bei weiterer Temperaturerhöhung der Effekt, so kann die Anordnung der hydrophoben Tasche verloren gehen, die Zahl der erfolgreichen Substratmoleküle vermindert sich, womit in Abb. 9 der Abfall bei Temperaturen über 20°C zu erklären ist. Daß dieser Abfall allein vom Substratanlagevorgang bedingt ist, beweist ein Vergleich mit Abb. 10. Die Abreaktion wird stetig abnehmend gefunden, da entsprechend der Erhöhung der Rotation der drei funktionellen Gruppen bei Temperatursteigerung das katalytische Ereignis (die Mehrzentrenreaktion der Protonierung und Deprotonierung) nur noch mit geringerer Wahrscheinlichkeit eintreten kann. Die Aussage von Abb. 10 lautet mit anderen Worten: Der mit steigender Temperatur hier verminderte Häufigkeitsfaktor wird stärker maßgebend für den Ablauf der Gesamtreaktion. Addieren wir die in Abb. 9 und 10 analysierten Teilschritte der Gesamtreaktion, so ergibt sich in Übereinstimmung mit dem Befund von Abb. 3 oder 4: Bis etwa 20°C überwiegt der stärker positive Temperaturkoeffizient des Sorptionsvorganges über die geringer werdende Abreaktion und bedingt so die Geschwindigkeitserhöhung der Gesamtreaktion, über 20°C treten die kompensierenden strukturellen Effekte auf.

Zum Abschluß seien noch einige spekulative Gedanken über die Lage der sorbierten Substratmolekel zur Diskussion gestellt. Bei Betrachtung des Röntgenstrukturmodells von α -Chymotrypsin^{1a, 1b} erkennt man in unmittelbarer räumlicher Nähe der beiden funktionellen Gruppen des Enzyms zwei benachbarte Schleifen der C-Kette, die über die Disulfidbrücke 191—220 „verspannt“ sind. Die eine (I) trägt das aktive Serin, die andere Schleife (II) ist diesem gegenüber und dem Histidin-57 näher gelegen. Läßt man nun die Mehrzentrenreaktion nach der für die aromatischen Estersubstrate wahrscheinlicheren³ Formulierung von BENDER² (Abb. 1) ablaufen, so müßte die Phenylgruppe der in der L-Form reagierenden Tyrosin-äthylestermolekel in die durch Schleife II geformte Micelle eintauchen, da nur so das Carboxyl-C-Atom die optimale Position zu beiden funktionellen Gruppen

des Enzyms erreicht. Der Äthoxyrest muß gemäß unseren Ergebnissen von der Enzymoberfläche abstehen. In dieser Lage nun erstreckt sich die α -Amino-Gruppe des Substrats in Richtung zu der durch Schleife I geformten Micelle, so daß eine am Stickstoff eingeführte Acetyl- oder Benzoyl-Gruppe ebenfalls die Möglichkeit zu hydrophober Wechselwirkung haben sollte. Die so entstehende Klammer festigt die günstige Orientierung im sorbierten Zustand und, da die interne Rotation um die α -CH- β -CH₂-Achse erschwert ist, wird zusätzlich auch die Abreaktion häufiger sein. Bei D-Tyrosin-äthylester und N-substituierten D-Tyrosin-äthylestern gerät — gleichgültig welche Seitenkette man in welche hydrophobe Tasche eintauchen läßt — nach dieser Vorstellung das Carboxyl-C-Atom stets nur in die günstige Position zu *einer* der beiden funktionellen Gruppen am Enzym, so daß deren Wirkung als Inhibitoren verständlich wird. Die Ausnahme N-Benzoyl-D-alanin-methylester⁴ ist wiederum zu erklären, wenn man dem Benzoylrest die

Sorptionsfunktion zuschreibt; die Methylgruppe des Alanins ist klein genug, um dem restlichen Teil des Moleküls durch Drehung um die N- α -CH und α -CH- β -CH₂-Achse die optimale Stellung zur Abreaktion erreichen zu lassen.

Bedenkt man nun außerdem den von BLOW et al. vorgeschlagenen Mechanismus³, bei dem Histidin als „charge relay“ fungiert und allein Serin in günstiger Position zum Substrat stehen muß — dies scheint z. B. bei N-Acetyl-L-tyrosin-aniliden der Fall zu sein (PARKER und WANG³⁰) —, und bei dem dann Micelle I als hydrophobe Tasche günstiger läge, so ist die allgemeine Konsequenz nahegelegt, daß jedes Einzelsubstrat auf der gleichen Basis der hydrophoben Wechselwirkung die zu seiner optimalen Mehrzentrenreaktion notwendige Lage über eine andere Weise erreichen kann.

³⁰ L. PARKER u. J. H. WANG, J. biol. Chemistry 243, 3729 [1968].