بررسی نظری اثر ایزوتوپی-سینتیکی بر روی واکنش کاتالیستی آنزیم گلی‌اکسالازI از باکتری ایشریچیاکولای

خالد حسینی، بهناز فرشیدفر و مهدی ایرانی*

گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، کدپستی: ۶۶۱۷۷-۱۵۱۷۵

(تاریخ دریافت: 1400/2/13 تاریخ پذیرش: 1400/8/1)

در این پژوهش، از نظریه تابعی چگالی برای مطالعه اثر ایزوتوپی-سینتیکی روی واکنش کاتالیستی انانتیومر *S* سوبسترای آنزیم گلی‌اکسالاز I از باکتری ایشریچیاکولای استفاده شده است. الگوسازی جایگاه فعال، بر اساس ساختار بلوری آنزیم، با استفاده از روش کوانتوم-کلاستر انجام شد. ساختار نقاط ایستا در طول مسیر واکنش بهینه و انرژی مولکول‌ها محاسبه شدند. اثر حلال روی نیمرخ انرژی پتانسیل با الگوی CPCM محاسبه گردید. نتایج نشان می‌دهند، هنگامی که اتم H1 (اتم هیدروژن متصل به کربن کایرال سوبسترا) با دوتریم جایگزین می‌شود، انرژی حالت‌های گذار اول و دوم نسبت به واکنشگر و حدواسط اول به مقدار کمتری کاهش می‌یابد، به طوری که انرژی فعال‌سازی افزایش می‌یابد و مقدار k_H/k_D بزرگتر از 2 به دست می‌آید (اثر ایزوتوپی-سینتیکی نوع اول مشاهده می‌شود). این نتیجه، در توافق با سازوکار واکنش کاتالیستی آنزیم گلی‌اکسالاز I است که در آن شکستن پیوند C1-H1 در مرحله تعیین‌کننده سرعت قرار دارد. همچنین، مشخص شد که با جایگزینی اتم H2 (هیدروژن گروه الکلی سوبسترا) با دوتریم، انرژی حالت‌های گذار اول و دوم به اندازه‌ای کاهش می‌یابند که مقدار k_H/k_D کمتر از 1 به دست آید و اثر ایزوتوپی وارونه مشاهده می‌شود.

کلید واژه: آنزیم گلی‌اکسالاز I، اثر ایزوتوپی-سینتیکی، سازوکار، نظریه تابعی چگالی

مقدمه

برای این که یک سازوکار قابل قبول از یک واکنش شیمیایی به دست آید، باید آزمایش‌هایی که سرنوشت اتم‌ها را در طول تشکیل فراورده‌ها تعیین می‌کنند، تجزیه و تحلیل گردند. مشاهده اثر ایزوتوپی-سینتیکی (کاهش یا افزایش سرعت واکنش شیمیایی، ناشی از جایگزینی یک اتم در واکنشگر، با ایزوتوپ سنگین آن اتم)، شکستن پیوند در مرحله تعیین کننده سرعت را نشان می دهد. اثر ایزوتوپی-سینتیکی به دو دسته طبقه‌بندی می‌شود: اثر ایزوتوپی سینتیکی اولیه (KIE1)، هنگامی مشاهده می‌شود که پیوند در برگیرنده ایزوتوپ سنگین در مرحله تعیین-کننده سرعت، شکسته شود، و اثر ایزوتوپی سینتیکی ثانویه (KIE2)، یعنی کاهش سرعت واکنش، هنگامی که پیوند در برگیرنده ایزوتوپ، شکسته نمی‌شود. هر دو اثر اولیه و ثانویه از تغییر در انرژی فعال‌سازی واکنش، که نتیجه تفاوت در انرژی‌های نقطه صفر ارتعاشی (ZPE) است، ناشی می‌شوند. نوع دیگری از اثر ایزوتوپی به نام اثر ایزوتوپی-سینتیکی معکوس وجود دارد که در آن سرعت واکنش در حضور ایزوتوپ سنگین‌تر افزایش می‌یابد. در بیشتر واکنش‌ها، نسبت ثابت سرعت حالت بدون دوتریم به حالت دوتریم‌دار، برای اثر ایزوتوپی-سینتیکی اولیه، ثانویه و معکوس، به ترتیب در محدوده 15-2، کمتر از 2 و کمتر از 1 گزارش شده است [1].

به علت تعداد زیاد اتم‌های موجود در آنزیم‌ها، برای مطالعه آنها با روش‌های کوانتوم مکانیکی و تابعی چگالی، استفاده از الگوهای کوچکتر اجتناب ناپذیر است. اساس روش کلاستر برای الگوسازی جایگاه فعال آنزیم‌ها و مطالعه سازوکار واکنش‌های آنزیمی، برش و جدا کردن بخش کوچکی از جایگاه فعال آنزیم و انجام محاسبات کوانتوم مکانیکی بر روی این بخش کوچک است [2و3].

سامانه گلی‌اکسالاز، یک سامانه آنزیمی مهم در بدن جانداران است که مسئول سمیت‌زدایی متیل‌گلی‌اکسال از درون سلول است (این ماده سمی در اثر واکنش‌هایی ویژه درون سلول جانداران ایجاد می‌شود). متیل‌گلی‌اکسال با برخی پروتئین‌ها و DNA، واکنش داده و باعث شکستن زنجیره نوکلئیک اسیدها، تخریب ساختار پروتئین‌ها و افزایش سرعت جهش‌ها می‌شود [6-4]. سامانه گلی‌اکسالاز از دو آنزیم گلی‌اکسالاز I و گلی‌اکسالاز II تشکیل شده است. گلی‌اکسالاز I که یک متالوآنزیم است، ایزومرشدن همی تیواستال‌هایی که از واکنش غیر آنزیمی بین متیل‌گلی‌اکسال و گلوتاتیون (GSH) تشکیل می‌شوند را بر عهده دارد. گلی‌اکسالاز II محصول ایجادشده توسط گلی‌اکسالاز I را هیدرولیز کرده وبه D-لاکتات تبدیل می‌کند. گلی‌اکسالاز I بر هر دو انانتیومر *R* و *S* سوبسترای همی‌تیواستال عمل می‌کند و آنها را فقط به انانتیومر *S*-D-لاکتویل‌گلوتاتیون تبدیل می‌کند [7]. در طرحواره 1، واکنش کاتالیزشده به وسیله سامانه گلی اکسالاز نشان داده شده است.

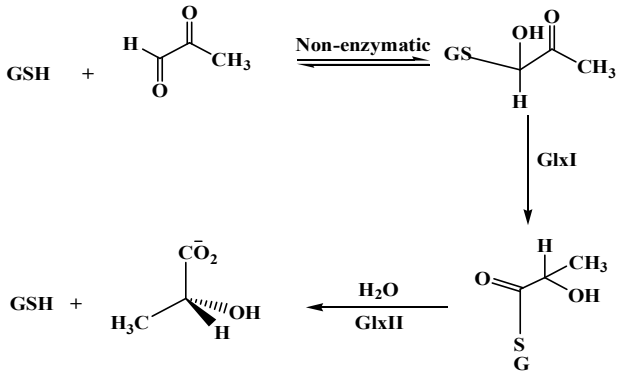
آنزیم گلی‌اکسالاز I استخراج‌شده از باکتری ایشریچیاکولای یک همودیمر دارای 135 آمینو اسید است که شامل دو زیر واحد یکسان است. ساختار کلی این آنزیم از خانواده‌ی ββαβ پروتیین‌ها است. در جایگاه فعال این آنزیم، دو آمینو اسید هیستیدین (His-74 و His-5)، دو آمینو اسید گلوتامیک اسید (Glu-122 و Glu-56)، و دو مولکول آب به صورت هشت وجهی به یک یون فلز نیکل کئوردینه شده‌اند [8]. ساختار جایگاه فعال این آنزیم در طرحواره 2 نشان داده شده است. این ساختار اندکی با ساختار جایگاه فعال آنزیم گلی‌اکسالاز I انسانی متفاوت است، که در آن یکی از گروه‌های هیستیدین با گلوتامین (Gln) و یون نیکل با یون روی جابجا شده‌اند [9].

برای واکنش سوبسترای نوع *S*، آنزیم گلی‌اکسالاز I انسانی، یک سازوکار بیشتر مورد توجه قرار گرفته و توسط روش‌های محاسباتی مورد تایید قرار گرفته است [12-10]. این سازوکار در طرحواره 3 نشان داده شده است. بر اساس این سازوکار، ابتدا پروتون H1 توسط گروه Glu-172 جدا و سپس یک حدواسط اندیولات تشکیل می‌شود (اسامی اتم‌ها در طرحواره 3 نشان داده شده‌اند). در ادامه اکسیژن گروه کربوکسیل Glu-99، پروتون الکلی (H2) را جدا کرده و همزمان H1 به اتم C2 سوبسترا منتقل می‌شود. در پایان، پروتون منتقل‌شده به گروه

ایمیل نویسنده مسئول: m.irani@uok.ac.ir

Glu-99 توسط اتم O2 سوبسترا جذب و محصول واکنش (*S*-D-لاکتویل‌گلوتاتیون) تشکیل می‌گردد.

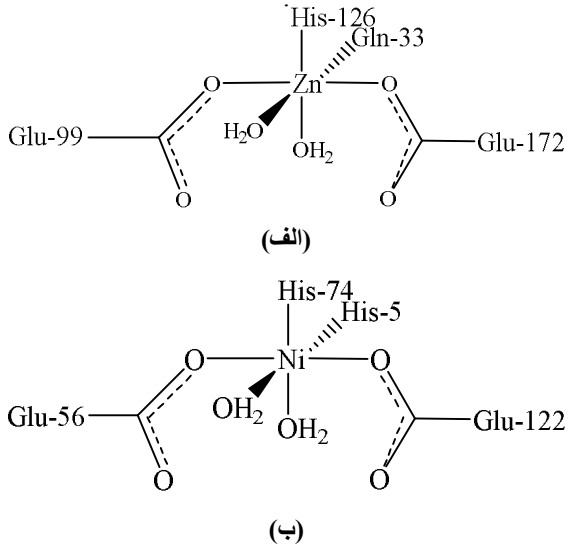
در این کار علاوه بر بسط سازوکار پیشنهادی نشان داده شده در طرح‌واره 3 برای انانتیومر *S* سوبسترا، به آنزیم گلی‌اکسالاز I باکتریایی، اثر ایزوتوپی-سینتیکی بر سازوکار واکنش انانتیومر *S* سوبسترای این آنزیم را با نظریه تابعی چگالی بررسی می‌کنیم.



طرح‌واره 1. واکنش کاتالیزشده به وسیله سامانه گلی‌اکسالاز.

محاسبات و الگوسازی

در این پژوهش، همه محاسبات با تابعی هیبریدی B3LYP [13و14] و با استفاده از برنامه گوسین 09 انجام شد [15]. ساختار هندسی واکنش دهنده‌ها، حالت‌های گذار و حدواسطها با استفاده از مجموعه پایه 6-31G+(d) [16] برای اتم‌های کربن، نیتروژن، اکسیژن و هیدروژن و مجموعه پایه lanl2dz برای اتم‌های نیکل و گوگرد بهینه شده است [17]. انرژی‌های دقیق این ساختارها با استفاده از مجموعه پایه 6-311++(2d,2p) به دست آمده است. برای بررسی اثر محیط، از الگوی حلال CPCM [18] و مجموعه پایه استفاده‌شده در مرحله بهینه‌سازی استفاده شد. ثابت دی الکتریک به کار رفته در این محاسبات، 4 در نظر گرفته شد، که یک مقدار استاندارد در الگوسازی محیط پروتیین



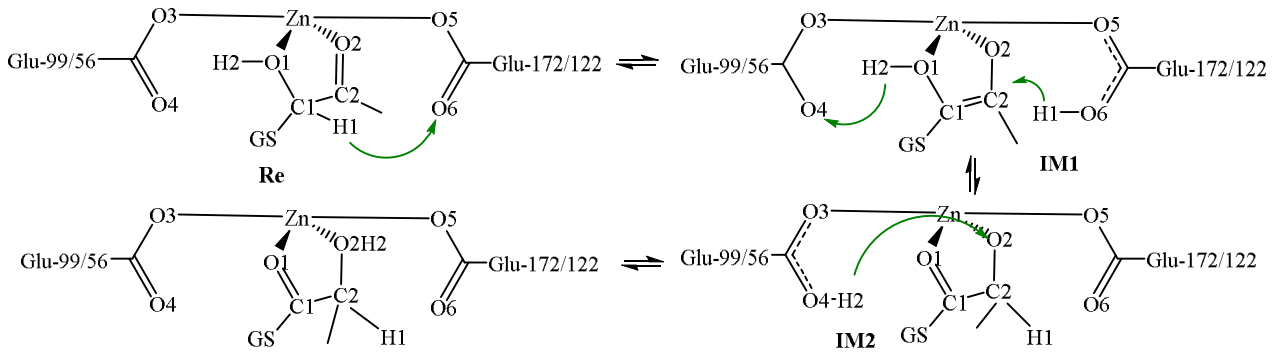
طرح‌واره 2. (الف) ساختار بلوری جایگاه فعال آنزیم گلی‌اکسالاز I انسانی (ب) ساختار بلوری جایگاه فعال آنزیم گلی‌اکسالاز I باکتریایی.

می‌باشد [3]. محاسبات بسامد برای تعیین انرژی نقطه صفر ارتعاشی انجام شد.

در این محاسبات، از مجموعه پایه به کار رفته در مرحله بهینه‌سازی هندسی استفاده شد. انرژی‌های گزارش‌شده در این کار بر اساس معادله (1) محاسبه شده است:

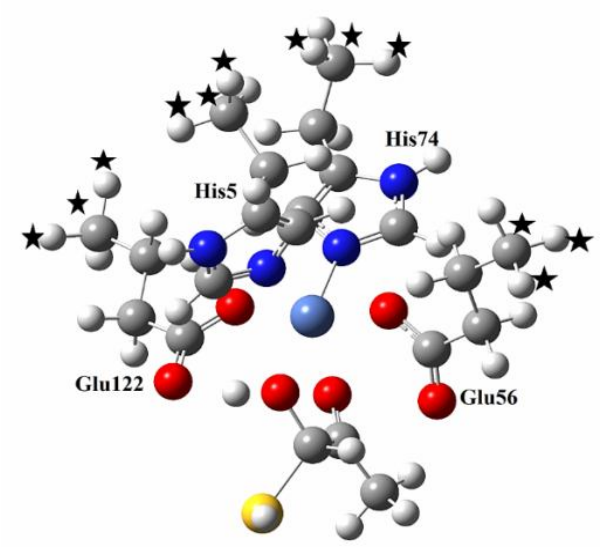
$$E = E(\mathrm{H}) + E(0) + E(\mathrm{S}) - E(\mathrm{e}) \qquad (1)$$

در این معادله، $E(\mathrm{H})$ انرژی الکترونی حاصل از محاسبات با مجموعه پایه بزرگ، $E(0)$ انرژی نقطه صفر ارتعاشی، $E(\mathrm{S})$ انرژی حاصل از محاسبات حلال و $E(\mathrm{e})$ انرژی الکترونی ساختار بهینه‌شده در حالت آزاد یا گازی می‌باشد. گفتنی است که مقدار انرژی نقطه صفر برای یک ساختار با تغییر ایزوتوپ تغییر می‌کند. برای محاسبات اثر ایزوتوپی-سینتیکی، هیدروژن‌های H1 و H2 با دوتریم جایگزین و محاسبات بسامد انجام و انرژی صفر هر حالت محاسبه شد.



طرح‌واره 3. سازوکار پذیرفته‌شده سوبسترای *S* آنزیم گلی‌اکسالاز I انسانی. اعداد اول و دوم در شماره‌های گلوتاماتها به ترتیب شماره این آمینو اسیدها در آنزیم انسانی و باکتریایی هستند. در آنزیم باکتریایی یون روی با یون نیکل جابجا شده است.

الگوی جایگاه فعال آنزیم گلی‌اکسالاز I بر اساس ساختار بلوری آن (با کد 1F9Z) ساخته شده است [8]. این الگو شامل یون نیکل موجود در آنزیم و آمینو اسیدهای His-74، His-5، Glu-56 و Glu-122 می‌باشد (طرح‌واره 2 الف). مولکول سوبسترا به صورت $HSCH(OH)COCH_3$ الگوسازی شد [19]. انتهای آمینو اسیدهای جایگاه فعال شامل کربن آلفا به همراه گروه کربوکسیل و گروه آمینو و همچنین زنجیر جانبی متصل به کربن آلفا الگوسازی شد (به جای نیتروژن و کربن متصل به کربن آلفا در تمام آمینو اسیدها هیدروژن قرار داده شد). کربن آلفا و این دو هیدروژن جایگزین‌شده در محاسبات بهینه‌سازی ثابت می‌شوند. این اتم‌های ثابت‌شده همان مسیر پیکره اصلی پروتئین هستند. این روش ثابت‌کردن اتم‌ها، همان روش استفاده شده توسط سیبان است که در کارهای قبلی از آن استفاده شده است [20]. الگوی ساخته‌شده دارای 69 اتم و 282 الکترون می‌باشد که در شکل 1 ساختار آن آورده شده است.



شکل 1. ساختار بهینه‌شده از جایگاه فعال آنزیم به همراه سوبسترا. اتم‌های ثابت‌شده با ستاره مشخص شده‌اند.

نتایج و بحث

مسیر واکنش

برای به دست آوردن نیمرخ انرژی واکنش، ساختار نقاط ایستا در طول مسیر واکنش (طرح‌واره 3) بهینه و سپس انرژی آنها محاسبه شد. بر اساس این سازوکار، ابتدا اتم H1 که در حالت واکنش‌دهنده (Re) به C1 متصل است، توسط اتم O6 گروه Glu-122 جدا می‌شود و تشکیل حدواسط اول واکنش (IM1) را می‌دهد (اسامی اتم‌ها بر اساس طرح‌واره 3 می‌باشد). حالت گذار این مرحله TS1 نام دارد و انرژی فعال‌سازی این مرحله از واکنش برابر 11/7 کیلوکالری‌برمول محاسبه شد. این مقدار با سدهای انرژی 13/0 و 14/4 کیلوکالری‌برمول که توسط گروه‌های دیگر و روش‌های متفاوت برای مرحله اول واکنش کاتالیستی آنزیم گلی‌اکسالاز I انسانی به دست آمده است، همخوانی دارد [21و22]. انرژی حدواسط اول (IM1) به اندازه 2/7 کیلوکالری‌برمول از انرژی واکنش‌دهنده‌ها بالاتر است.

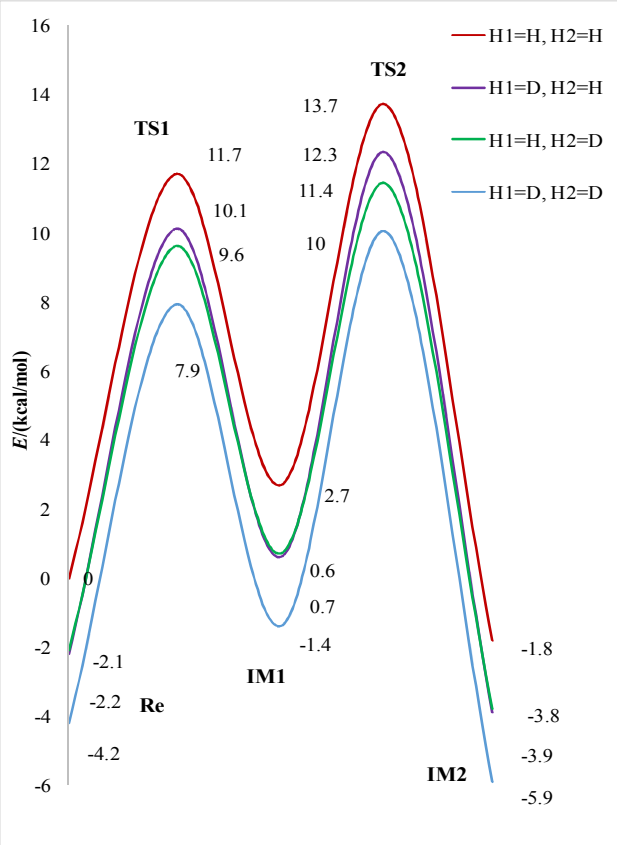
در مرحله دوم سازوکار پیشنهادی، H1 توسط C2 از O6 جدا و هم‌زمان H2 توسط O4 گروه Glu-56 کنده می‌شود و حدواسط دوم (IM2) تشکیل می‌گردد. این مرحله دارای حالت گذار TS2 می‌باشد. سد انرژی محاسبه‌شده برای مرحله دوم واکنش 11/0 کیلوکالری‌برمول می‌باشد. انرژی IM2 به اندازه 1/8 کیلوکالری‌برمول پایین‌تر از انرژی واکنش‌دهنده‌ها است. پس از تشکیل IM2، برای تشکیل محصول، O2 باید یک پروتون به‌دست آورد. این پروتون، می‌تواند H2 باشد که در حدواسط دوم به O4 متصل است یا پروتون دیگری از محیط آنزیم باشد. برای امتحان این موضوع، H2 را به O2 منتقل شد. نتایج محاسبات نشان دادند که پس از آزادسازی پیوند H2-O2، این پروتون روی H2 و به جای قبلی خود (Glu-56) بر می‌گردد. این امر به دلیل تمایل بیشتر H2، برای برقراری پیوند با O5 می‌باشد. از این‌رو پیشنهاد شد که اتم O2 برای تکمیل ظرفیت خود یک پروتون از محیط می‌گیرد. نیمرخ انرژی محاسبه‌شده واکنش از حالت Re تا IM2 به رنگ قرمز در شکل 2 رسم شده است.

بررسی اثر ایزوتوپی-سینتیکی

از آنجایی که اتم‌های H1 و H2 به طور مستقیم در واکنش شرکت دارند، از این‌رو مطالعه اثر ایزوتوپی-سینتیکی، با تغییر این اتم‌ها به ایزوتوپ سنگین‌تر هیدروژن (دوتریوم) انجام شد. برای مطالعه اثر ایزوتوپی-سینتیکی چهار حالت مختلف از نقاط ایستا، در طول واکنش به شرح زیر در نظر گرفته شده است: الف) حالت H1=H, H2=H: در محاسبات انرژی این حالت، تمام هیدروژن‌های موجود در مولکول به صورت ایزوتوپ سبک هیدروژن می‌باشد. ب) حالت H1=D, H2=H: در محاسبات انرژی این حالت، اتم H1 با دوتریم (D) جایگزین شده و اتم H2 همان ایزوتوپ سبک است. ج) حالت H1=H, H2=D: در محاسبات انرژی این حالت، اتم H2 با دوتریم جایگزین و اتم H1 همان ایزوتوپ سبک است. د) حالت H1=D, H2=D: در محاسبات انرژی این حالت، هر دو اتم H1 و H2 با دوتریم جانشین شده‌اند.

بعد از انجام محاسبات مربوطه با ایزوتوپهای سنگین دوتریوم، نیمرخ انرژی واکنش در حالت‌های بالا محاسبه و در شکل 2 رسم شدند. نتایج نشان می‌دهد که سطح انرژی Re، با تعویض اتم‌های H1 یا H2 با دوتریم، در حدود 2 کیلوکالری‌برمول، پایین آمده است. این کاهش انرژی ناشی از پایین آمدن انرژی نقطه صفر ارتعاشی برای پیوند کربن-هیدروژن یا پیوند اکسیژن-هیدروژن، در اثر تعویض اتم هیدروژن با دوتریم می‌باشد. همچنین در اثر جایگزینی اتم H1 با دوتریم، انرژی حالت گذار اول (TS1) به مقدار کمتری نسبت به واکنشگر کاهش یافته است (1/6 در مقابل 2/1 کیلوکالری‌برمول). می‌توان گفت پیوند H1 در TS1 با دو اتم مجاورش (C1…H1…O6) در حال ضعیف‌شدن است. در اثر این جابجایی ایزوتوپی، میزان کاهش انرژی در IM1 به طور تقریبی مانند Re است (حدود 2 کیلوکالری‌برمول). همچنین نتایج نشان می‌دهند که در اثر جایگزینی اتم H1 با دوتریم، انرژی TS2 به مقدار کمتری نسبت به IM1 و Re کاهش یافته است (1/4 در مقابل 2 کیلوکالری‌برمول). به عبارت دیگر پیوند H1 با دو اتم مجاورش (C2…H1…O6) در TS2 در حال ضعیف شدن است که با سازوکار پیشنهادی در طرح‌واره 3 هم‌خوانی دارد. از طرف دیگر، با تعویض اتم H2 با دوتریم انرژی‌های حالتهای گذار تقریبا به اندازه انرژی واکنشگر و وحدواسطها تغییر می‌کنند (نیمرخ انرژی سبز رنگ را با نیمرخ‌های

انرژی قرمز و بنفش در شکل 3 مقایسه کنید). همچنین، نتایج نشان می‌دهد که در اثر جانشینی همزمان هر دو اتم H1 و H2 با دوتریم، میزان کاهش انرژی برای تمام حالت‌ها حدود 4 کیلوکالری‌برمول می‌باشد که به طور تقریبی برابر با مجموع کاهش انرژی در حالت‌های H1=D, H2=H و H1=H, H2=D می‌باشد. از این امر می‌توان نتیجه گرفت که گونه‌های ارتعاشی حالت‌های مختلف با هم تداخل نداشته‌اند (نیمرخ انرژی آبی رنگ را با نیمرخ‌های انرژی دیگر در شکل 2 مقایسه کنید).



شکل 2. نیمرخ‌های انرژی پتانسیل نسبی برای حالت بدون دوتریم و سه حالت دوتریم‌دار.

انرژی‌های فعال‌سازی و نسبت ثابت‌های سرعت در حالت بدون دوتریوم و سه حالت مختلف دوتریوم‌دار محاسبه، و در جدول 1 خلاصه شده است. برای هر یک از سه حالت دوتریم‌دار و حالت بدون دوتریم در جدول 1، E_{a1}، اختلاف انرژی بین Re و TS1 است که به عنوان انرژی فعال‌سازی مرحله اول واکنش در نظر گرفته شده است. E_{a2}، اختلاف انرژی بین IM1 و TS2 است که به عنوان انرژی فعال‌سازی مرحله دوم واکنش می‌باشد. همچنین E_{ov}، سد انرژی بین Re و حالت گذار با بیشترین انرژی (TS2) است که به عنوان انرژی فعال‌سازی کل واکنش در نظر گرفته شده است.

با توجه با داده‌های جدول 1، E_{a1} در اثر جایگزینی H1 با دوتریم به اندازه 0/6 کیلوکالری‌برمول افزایش یافته است. انرژی فعال‌سازی مرحله

جدول 1. انرژی‌های فعال‌سازی بر حسب‌کیلوکالری برمول و نسبت ثابت‌های سرعت حالت بدون دوتریوم و حالت‌های دوتریوم‌دار

	H1=H, H2=H	H1=D, H2=H	H1=H, H2=D	H1=D, H2=D
E_{a1}	11.7	12.3	11.7	12.2
E_{a2}	11.0	11.7	10.7	11.5
E_{ov}	13.7	14.6	13.5	14.3
$(k_H/k_D)1$	-	2.7	1.0	2.3
$(k_H/k_D)2$	-	3.6	0.6	2.3
(k_H/k_D)ov	-	4.6	0.7	2.7

اول واکنش، با تعویض همزمان هر دو اتم H1 و H2 با دوتریم به اندازه 0/5 کیلوکالری‌برمول افزایش یافته و با تعویض اتم H2 با دوتریم تغییری نکرده است. این نشان می‌دهد که اتم H1 در مرحله اول نقش مستقیم دارد و اتم H2 فقط نظاره‌گر واکنش است.

انرژی فعال‌سازی مرحله دوم واکنش، با جایگزینی اتم H1 با دوتریم به اندازه 0/7 و با جایگزینی همزمان هر دو اتم H1 و H2 با دوتریم به اندازه 0/5 کیلوکالری‌برمول افزایش و با جایگزینی اتم H2 با دوتریم به مقدار 0/3 کیلوکالری‌برمول کاهش یافته است. این امر نشان می‌دهد که در TS2 اتم H1 بیشتر در حال شکستن پیوند با اتم مجاورش است ولی پیوند H2 با اتم مجاورش در TS2 در حال تشکیل است. انرژی فعال‌سازی کل واکنش با تعویض اتم H1 و تعویض همزمان هر دو اتم H1 و H2 با دوتریم، به ترتیب به میزان 0/9 و 0/6 کیلوکالری‌برمول افزایش ولی با تعویض اتم H2 با دوتریم به مقدار 0/2 کاهش یافته است. در اثر جایگزینی اتم H2 با دوتریم، انرژی نقطه صفر حالت گذار دوم، نسبت به واکنشگر به میزان بیشتری کاهش یافته است.

برای مرحله اول واکنش، ثابت سرعت حالت بدون دوتریم به حالت دوتریم‌دار $(k_H/k_D)1$، 2/7 به‌دست آمد که بیانگر اثر ایزوتوپی-سینتیکی اولیه می‌باشد. این نتیجه، سازوکار واکنش کاتالیستی آنزیم گلی‌اکسالاز I را که در آن شکستن پیوند C1-H1 در مرحله تعیین‌کننده سرعت سهم دارد، تایید می‌کند [23و24].

برای مرحله اول واکنش با تعویض اتم H2 با دوتریم، مقدار $(k_H/k_D)1$، 1 به دست آمد که بیانگر اثر ایزوتوپی-سینتیکی ثانویه می‌باشد. این امر نیز در توافق با سازوکار پیشنهادی است، زیرا در مرحله اول واکنش، اتم H2 شرکت نمی‌کند. در اثر جایگزینی همزمان هر دو اتم H1 و H2 با دوتریم، سد انرژی مرحله اول واکنش افزایش یافته است و مقدار $(k_H/k_D)1$، 2/3 به دست آمد که بیانگر اثر ایزوتوپی-سینتیکی اولیه در اثر این جابجایی‌های ایزوتوپی می‌باشد.

همچنین در مرحله دوم واکنش، با تعویض اتم H1 با دوتریم، مقدار 3/6 برای $(k_H/k_D)2$ حاصل شد. این امر بیانگر اثر ایزوتوپی-سینتیکی اولیه در مرحله دوم واکنش در اثر جابجایی H1 با دوتریوم می‌باشد. این امر در توافق با ساز و کار پیشنهادی است زیرا در مرحله دوم

واکنش، پیوند H1-O6 می‌شکند (طرح‌واره 3 را ببینید).

در اثر جایگزینی اتم H2 با دوتریم مقدار $2(k_H/k_D)$، برابر 0/6 حاصل شد. این امر بیانگر اثر ایزوتوپی-سینتیکی ثانویه از نوع معکوس می‌باشد. از طرف دیگر، با تعویض همزمان هر دو اتم H1 و H2 با دوتریم، مقدار $2(k_H/k_D)$، 2/3 حاصل شد که بیانگر اثر ایزوتوپی-سینتیکی اولیه است.

برای کل واکنش، حالت گذار دوم بیشترین انرژی را دارد. با جایگزینی اتم H1 با دوتریم مقدار (k_H/k_D)ov برابر 4/6 به دست آمد، که بیانگر اثر ایزوتوپی-سینتیکی اولیه برای کل واکنش در اثر تعویض اتم H1 با دوتریم است. با جایگزینی اتم H2 با دوتریم، انرژی حالت گذار دوم نسبت به واکنشگر به میزان بیشتری کاهش پیدا کرده است و سد انرژی کل واکنش کاهش یافته است. در نتیجه، مقدار (k_H/k_D)ov ، برابر 0/7 به دست آمد، که بیانگر اثر ایزوتوپی-سینتیکی ثانویه از نوع معکوس در اثر جابجایی اتم H2 با پروتون می‌باشد. ولی با تعویض همزمان هر دو اتم H1 و H2 با دوتریم، مقدار (k_H/k_D)ov، برابر 2/7 به‌دست آمد و اثر ایزوتوپی-سینتیکی اولیه مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

در کار حاضر، الگویی از جایگاه فعال آنزیم گلی‌اکسالاز I به همراه سوبسترا با روش کلاستر ساخته شد. اثر ایزوتوپی-سینتیکی بر سازوکار پیشنهادی واکنش کاتالیستی انانتیومر *S* سوبسترای آنزیم گلی‌اکسالاز I از باکتری ایشریچیاکولای، با روش تابعی چگالی مورد بررسی قرار گرفت. از آنجا که اتم‌های H1 و H2 سوبسترا به طور مستقیم در واکنش شرکت دارند، از این‌رو، مطالعه اثر ایزوتوپی-سینتیکی، با تعویض این اتم‌ها با دوتریم انجام شد. نتایج نشان داد که در اثر جایگزینی اتم H1 با دوتریم، انرژی فعال‌سازی کل واکنش افزایش یافته و اثر ایزوتوپی-سینتیکی اولیه مشاهده می‌شود. این نتیجه در توافق با سازوکار پیشنهادی برای واکنش کاتالیستی آنزیم گلی اکسالاز I است، که در آن شکستن پیوند C1-H1 در مرحله تعیین کننده سرعت قرار دارد [23]. همچنین نتایج نشان می‌دهند که جابجایی اتم H2 با دوتریم باعث ایجاد اثر ایزوتوپی معکوس در واکنش می‌شود. در حالت کلی با جابجایی هر دو اتم H1 و H2 با دوتریوم اثر ایزوتوپی-سینتیکی اولیه مشاهده می‌شود.

اثر ایزوتوپی-سینتیکی اولیه با تعویض H1، در هر دو مرحله از واکنش مشاهده می‌شود. در حالی که با جابجایی H2 با دوتریوم، در مرحله اول واکنش، اثر ایزوتوپی-سینتیکی ثانویه و در مرحله دوم واکنش، اثر ایزوتوپی-سینتیکی ثانویه مشاهده می‌شود.

مراجع

1) D. Roston, Z. Islam, A. Kohen, Mol. 18 (2013).
2) P. Georgieva, F. Himo, J. Comput. Chem. 31 (2010) 1707.
3) P.E.M. Siegbahn, F. Himo, Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci. 1 (2011) 323.
4) A.T. Lee, A. Plump, C. DeSimone, A. Cerami, R. Bucala, Diabetes 44 (1995) 20.
5) N. Murata-Kamiya, H. Kamiya, H. Kaji, H. Kasai, Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 468 (2000) 173.
6) C. Sibbersen, J. Palmfeldt, J. Hansen, N. Gregersen, K.A. Jørgensen, M. Johannsen, Chem. Commun. 49 (2013) 4012.
7) S. Yamazoye, J. Biochem. 23 (1936) 319.
8) M.M. He, S.L. Clugston, J.F. Honek, B.W. Matthews, Biochemistry 39 (2000) 8719.
9) A.D. Cameron, M. Ridderström, B. Olin, M.J. Kavarana, D.J. Creighton, B. Mannervik, Biochemistry 38 (1999) 13480.
10) S. Jafari, U. Ryde, A.E.A. Fouda, F.S. Alavi, G. Dong, M. Irani, Inorg. Chem. 59 (2020) 2594.
11) U. Richter, M. Krauss, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 6973.
12) D.J. Creighton, D.S. Hamilton, Arch. Biochem. Biophys. 387 (2001) 1.
13) A.D. Becke, Phys. Rev. A 38 (1988) 3098.
14) C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Phys. Rev. B 37 (1988) 785.
15) D.J. Frisch, M.J. Trucks, G.W. Schlegel, H.B. Scuseria, G.E. Robb, M.A. Cheeseman, J.R. Scalmani, G. Barone, V. Mennucci, B. Petersson, G.A. Nakatsuji, H. Caricato, M. Li, X. Hratchian, H.P. Izmaylov, A.F. Bloino, J. Zheng, G. Sonnenb, Gaussian, Inc. Wallingford CT, 2009.
16) G.A. Petersson, M.A. Al-Laham, J. Chem. Phys. 94 (1991) 6081.
17) P.J. Hay, W.R. Wadt, J. Chem. Phys. 82 (1985) 270.
18) V.B.M. Cossi, V. Barone, M. Cossi, J. Phys. Chem. A 102 (1998) 1995.
19) S. Parvaneh, H. Parsa, M. Irani, Comput. Theor. Chem. 1188 (2020) 112944.
20) P.E.M. Siegbahn, Chem. Phys. Chem. 12 (2011) 3274.
21) F. Himo, P.E.M. Siegbahn, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 10280.
22) I. Feierberg, A.D. Cameron, J. Åqvist, FEBS Lett. 453 (1999) 90.
23) K.Y. Mullings, N. Sukdeo, U. Suttisansanee, Y. Ran, J.F. Honek, J. Inorg. Biochem. 108 (2012) 133.
24) M.J. Maroney, S. Ciurli, Chem. Rev. 114 (2014) 4206.