



УДК 577.152.361*1.02

**КОНФОРМАЦИОННАЯ ГИПОТЕЗА ПЕРЕЛИГАНДИРОВАНИЯ
МЕТАЛЛОВ, АКТИВИРУЮЩИХ ПИРОФОСФАТАЗУ
И РОДСТВЕННЫЕ ФЕРМЕНТЫ***Куранова И. П., Соколов В. И.***Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова Академии наук СССР, Москва;***Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова
Академии наук СССР, Москва*

Предложен механизм каталитического действия неорганической пирофосфатазы, включающий стадию образования нейтрального бициклического интермедиата с топологией бицикло[3.3.1]нонана, в котором пирофосфат использует для координации двух ионов M^{2+} все четыре анионных атома кислорода. Ион-активатор, связанный с ферментом в отсутствие субстрата, в процессе перелигандирования действует по типу реле с участием карбоксильной группы фермента. Рассмотрено соответствие предлагаемой схемы литературным данным.

В исследованиях механизма действия неорганической пирофосфатазы (КФ 3.6.1.1) важное место занимает вопрос о роли различных ионов металлов — активаторов фермента и субстрата — и их влиянии на расположение субстрата в активном центре. Природный субстрат — пирофосфат магния, $MgPP^{2-}$ взаимодействует с ферментом, вероятно, в хелатной форме [1]; кроме того, известно, что энзиматическому гидролизу подвергается пирофосфатная связь и в ряде других комплексов металлов [1—3].

Согласно современным представлениям [4—7], гидролиз PP_i протекает по $S_N 2$ -механизму без образования фосфорилированного фермент-субстратного интермедиата в результате атаки одного из атомов фосфора молекулой воды, фиксированной в активном центре. Биохимическими и рентгеноструктурными исследованиями [6—8] в районе активного центра фермента выявлен ряд функциональных групп, которые могут принимать участие в связывании субстрата и в каталитическом акте. Несколько остатков тирозина и карбоксильные группы, расположенные вблизи субстрата, могут способствовать активации воды для нуклеофильной атаки, быть донорами протонов на отдельных стадиях процесса, а также входить в координационную сферу ионов металла. Из двух фосфатных групп, образующихся при распаде пирофосфата, та, которая подвергалась нуклеофильной атаке, слабее связана с ферментом, чем другая [9]. Последняя находится в центре более высокого средства и взаимодействует электростатически с гуанидиновой группировкой Arg^{77} . Из кинетических данных сделан вывод [10—11], что для функционирования пирофосфатазы необходимо наличие по меньшей мере трех ионов металла: один поступает в комплексе с субстратом, а два иона-активатора связаны на поверхности макромолекулы фермента в центрах с разной величиной средства [12, 13]. Методами рентгеноструктурного анализа [6] и ЯМР [4] на поверхности обнаружено четыре центра, способных связывать катионы металлов.

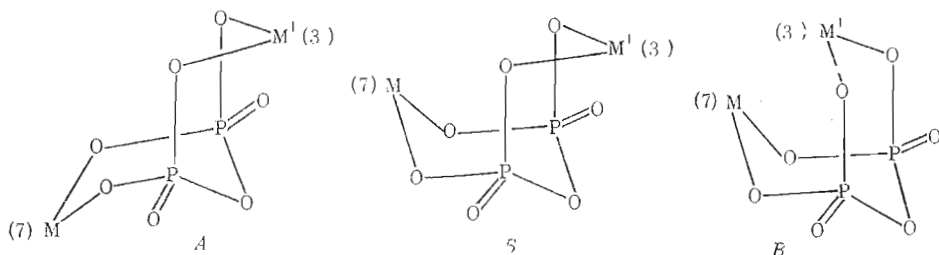
Предлагавшиеся ранее механизмы действия пирофосфатазы [4—6] основаны на том, что двуханионный субстрат — пирофосфат металла — в раскрытой, ациклической, или же в хелатной, моноциклической, конформации атакуется по атому фосфора молекулой воды, чему способствует внешняя координация других ионов металла, связанных на поверхности фермента.

Здесь будет предложен механизм, согласно которому предполагается, что при связывании хелатной формы субстрата в активном центре обра-

зуется нейтральный бициклический интермедиат с топологией бицикло-[3.3.1]нонана, в котором пирофосфат использует для координации двух ионов M^{2+} все четыре анионных кислорода. Развитые ранее представления о роли функциональных групп фермента, которые осуществляют общий основной, общий кислотный катализ или электростатическое взаимодействие, в основном сохраняют свою силу.

Покажем сначала, что такой интермедиат вполне возможен с точки зрения конформационного анализа. При хелатировании тетрааниона пирофосфата одним ионом металла образуется 6-членный цикл, в котором два отрицательных заряда рассредоточены по четырем атомам кислорода. Для 6-членных циклов обычно наиболее выгодна конформация кресла, в которой аксиальные 1,3-связи направлены параллельно, что допускает хелатирование ими второго иона металла с образованием бициклической структуры с топологией бицикло[3.3.1]нонана. Устойчивость конформаций последнего, вообще говоря, возрастает в порядке: ванна-ванна < кресло-ванна < кресло-кресло [14]. Однако в пирофосфатном аналоге, где атомы 3 и 7 являются центрами лигандных октаэдров, а углы изменены по сравнению с углами в молекуле углеводорода, стерическое взаимодействие $M(3) - M'(7)$ в конформере *B* (схема 1) увеличивается и предпочтительным, вероятно, станет конформер *B* или *A*. К тому же, как было отмечено ранее [15], пирофосфат может в широких пределах изменять свою конформацию, адаптируясь к структурным требованиям.

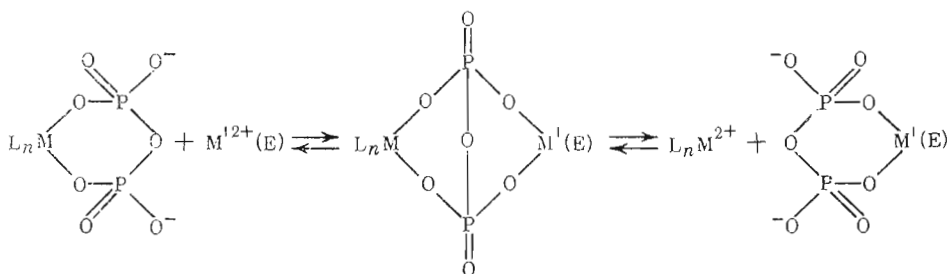
Схема 1



Образование такого интермедиата или переходного состояния может произойти при захвате из раствора монохелатного пирофосфата одним из двух ионов металла, которые уже находятся в активном центре фермента. Выгодность замыкания цикла обусловлена энтропийным фактором, это «хелатный эффект», хорошо известный в координационной химии для 5- и 6-членных циклов [16].

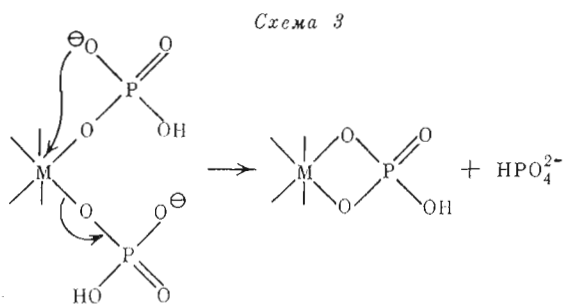
Роль бициклической структуры в механизме действия фермента может быть двойной. С одной стороны, эта структура может быть промежуточной в процессе перелигандирования — передачи пирофосфата от иона M в растворе к иону-активатору M' , связанному в активном центре. Такая передача вполне возможна для субстратов с легко обменивающимися лигандами (пирофосфаты Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+}), в особенности для нативной комбинации, где $M = M' = Mg$ (схема 2).

Схема 2



В последнем случае роль бициклического интермедиата, возможно, ограничивается доставкой пирофосфата к месту протекания enzymатической реакции, которая идет с монохелатом пирофосфата.

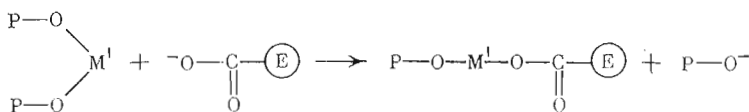
Однако для субстратов с необмениваемыми лигандами типа L_4MPP_1 , где $M = Co^{3+}, Cr^{3+}$, а $L = NH_3, NH_2CH_2CH_2NH_2, H_2O$ [1, 17], такое перелигандирование невозможно. Тем не менее в присутствии двухвалентных ионов-активаторов (Mg^{2+}, Zn^{2+}) enzymатический гидролиз идет с образованием *цис*-дифосфата $L_4M(OPO_3H)_2$, что доказано рентгеноструктурным анализом [17]. Зафиксировано и дальнейшее превращение в растворе полученного производного в $L_4M(\mu_2-PO_3OH)$, происходящее в результате внутримолекулярного нуклеофильного замещения одного фосфата у атома металла (механизм $S_N 1 (M)$) (схема 3).



Поэтому рассмотрим подробно вторую возможность — прямой enzymатический гидролиз бициклического интермедиата, что, вообще говоря, подходит и для нативных субстратов.

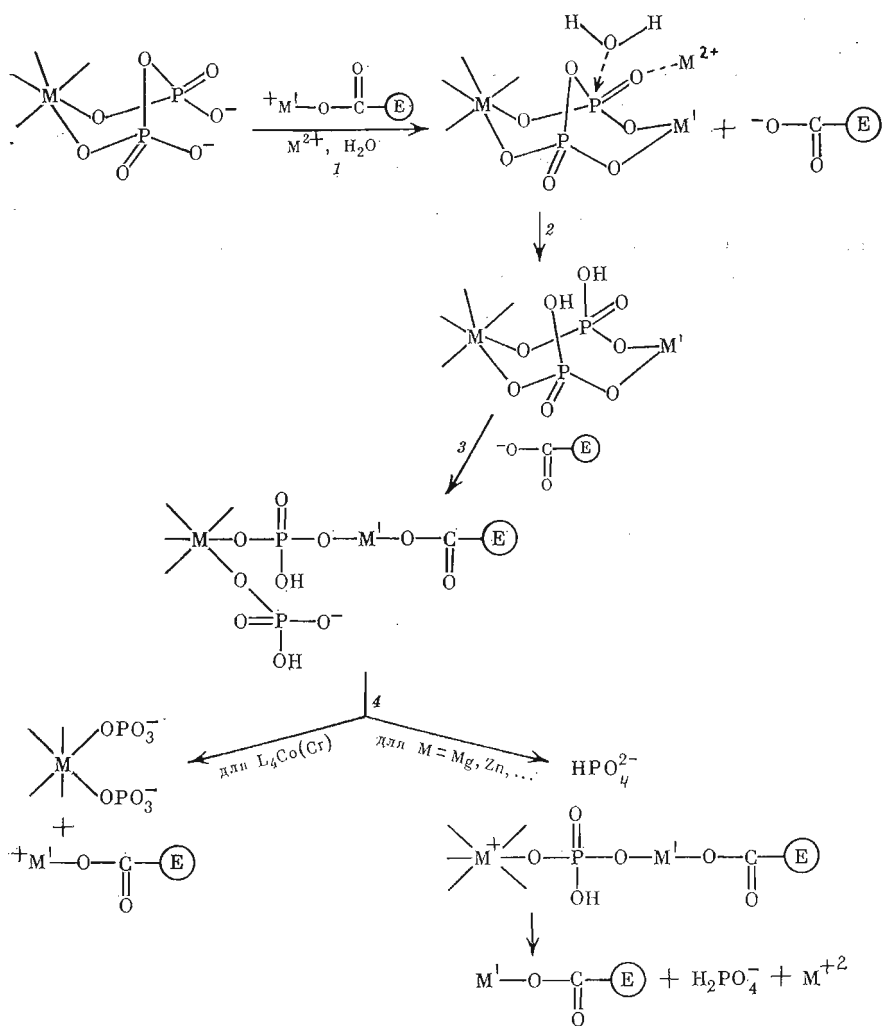
По сравнению с дианионным моноциклическим комплексом нейтральный бициклический интермедиат имеет определенные преимущества для протекания enzymатической реакции: нейтрализация двух отрицательных зарядов препятствует погашению частичного положительного заряда на атомах фосфора. Вследствие этого фосфорные центры становятся более чувствительными к нуклеофильной атаке, чем в дианионном комплексе. Дополнительная координация фосфорильного кислорода с третьим ионом металла, также связанным на поверхности фермента, определяет фосфорный центр, наиболее обедненный электронной плотностью, по которому и происходит атака молекулой воды, приводящая к разрыву пирофосфорильного мостика (схема 4).

Следующий этап — разрыв связи между фосфатом и ионом металла-активатора M' может происходить аналогично для всех субстратов: или за счет протонирования, или в результате вытеснения из сферы M' фосфата более нуклеофильным карбоксилатом, принадлежащим одному из остатков дикарбоновой аминокислоты в активном центре фермента по механизму $S_N 2(M')$:



На этой стадии, протеканию которой способствует выигрыш энергии, получаемый при распаде конформационно невыгодного 8-членного цикла, ион-активатор M' восстанавливает свою связь с карбоксильной группой, утраченную на начальных стадиях каталитического цикла. Следует отметить, что присутствие в неорганической пирофосфатазе «особой» карбоксильной группы было показано Аваевой и сотр. [18, 19]. Большое число дикарбоновых кислот в зоне связывания субстратов и ионов металлов было обнаружено и при рентгенографическом исследовании [6].

Схема 4*



Возможная последовательность стадий ферментативного гидролиза пирофосфата через бициклический интермедиат (реле-механизм)

Совокупность стадий, изображенная на схеме 4, образует реле-механизм, описывающий роль иона-активатора в образовании и распаде бициклического интермедиата.

Стадия 1. Ион-активатор M' , связанный ковалентно с карбоксильной группой фермента, захватывает монохелатированный дианионный пирофосфат MPP_i с образованием бициклического интермедиата. Этой стадии благоприятствует хелатный эффект, она выгодна благодаря энтропийному фактору.

Стадия 2. Пирофосфорильная связь в нейтральном бициклическом интермедиате подвергается гидролизу в результате атаки молекулой воды на атом фосфора, активированный координацией с тремя ионами металлов.

Стадия 3. Невыгодный 8-членный цикл распадается, причем более нуклеофильный карбоксилат-ион вытесняет один эквивалент фосфата по механизму $S_N2 (M')$. Этот фосфат, согласно [4], по-видимому, связан в центре низкого средства.

* На схеме не показаны функциональные группы фермента, роль которых, согласно предлагаемому механизму, не отличается от описанной ранее [6].

Стадия 4. Второй фосфат, расположенный в центре высокого сродства, связан и с M' , и с M . Скорость его удаления из комплекса с ферментом зависит от природы металла M , поступившего с субстратом; эта стадия является одной из стадий, определяющих суммарную скорость всего процесса [20]. Она возвращает каталитическую систему в исходную позицию, в которой система оказывается подготовленной к совершению следующего цикла при поступлении новой порции пирофосфата.

Предложенная гипотеза объясняет ряд особенностей ферментативной реакции.

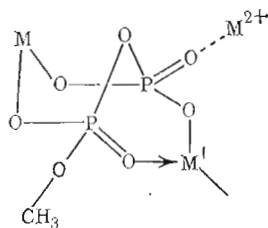
1. За счет хелатирования со вторым ионом металла легко осуществляется «заякоривание» монохелатных субстратов (в том числе с необходимыми лигандами) на поверхности фермента с одновременным образованием бициклической конформации, оптимальной для протекания энзиматической реакции. В то же время понятно, почему монодентатный $Co(NH_3)_5PP_i$ не является субстратом [1]: он не в состоянии образовать бициклический интермедиат требуемого типа.

2. Известно, что трехвалентные ионы металлов не могут служить активаторами пирофосфатазы [2], а некоторые из них являются ингибиторами [21]. В свете изложенной гипотезы это может означать, что бициклический интермедиат с M^{3+} , если он образуется, обладает повышенной устойчивостью благодаря тому, что дополнительная валентность осуществляет ковалентную связь с карбоксилем. Вследствие этого описанный релее-механизм становится невозможным.

3. По данным ЯМР- и ЭПР-спектроскопии [22, 23], минимальное расстояние $Mn^{2+} - Mn^{2+}$ на поверхности фермента в присутствии аналога субстрата (оксиметилендифосфоната) составляет 7—8 Å (верхний предел). Аналогичным образом для расстояния $Mn^{2+} - Cr^{3+}$ в комплексе с L_4CrPNP найдено значение 7 Å. Эти цифры можно сравнить с оценкой для l (3—7), полученной на молекулярных моделях бициклического интермедиата в конформациях *A*, *B* и *B'*: соответственно 6, 5 и 3 Å.

4. В работе Аваевой и сотр. [24] было показано, что неорганический (PP_i) и органический (CH_3PP_i , метилпирофосфат) субстраты по-разному укладываются в активном центре пирофосфатазы. Различно и влияние ионов металлов на гидролиз этих субстратов: CH_3PP_i гидролизуется в присутствии ионов Zn^{2+} , но не Mg^{2+} . Это можно объяснить следующим образом. Наличие только одного целого отрицательного заряда в монохелатированном MCH_3PP_i затрудняет (но не исключает) образование бициклического интермедиата, которое может осуществиться за счет координации M' с сильно поляризованной фосфорильной связью (схема 5).

Схема 5



При этом вторая группа $P=O$ еще остается доступной для координации с третьим ионом M^{2+} . Интересно, что большая склонность d-элементов служить акцептором координационной связи, отмеченная в работе [24], по-видимому, и делает возможным образование такого интермедиата или переходного состояния для иона цинка, но не магния.

Некоторые другие фосфорилпереносящие ферменты, например 3-фосфоглицераткиназа (КФ 2.7.1.31) или пируваткиназа (КФ 2.7.1.40) требуют для проявления активности двух ионов металла: одного — связанного с ферментом, другого — в составе субстрата. Рассмотренный выше механизм, возможно, окажется применимым и для этой группы ферментов.

Авторы благодарны акад. Б. К. Вайнштейну за внимание к работе.

1. Knight W. B., Ting S., Chuang S., Dunaway-Mariano D., Haromy T., Sundaralingam M. Arch. Biochem. and Biophys., 1983, v. 227, № 1, p. 302—309.
2. Ting S.-J., Dunaway-Mariano D. FEBS Lett., 1984, v. 165, № 2, p. 251—253.
3. Мое О. А., Jr., Pham S., Selinsky B., Dang T. Biochim. et biophys. acta, 1985, v. 827, № 1, p. 207—214.
4. Welsh K. M., Cooperman B. S. Biochemistry, 1984, v. 23, № 21, p. 4947—4955.
5. Knight W. B., Filts S. W., Dunaway-Mariano D. Biochemistry, 1981, v. 20, № 14, p. 4079—4086.
6. Куранова И. П., Терзян С. С., Воронова А. А., Смирнова Е. А., Вайнштейн Б. К., Хёне В., Хансен Г. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 12, с. 1611—1619.
7. Gonzalez M. A., Webb M. R., Welsh K. M., Cooperman B. S. Biochemistry, 1984, v. 23, № 5, p. 797—801.
8. Cooperman B. S. Meth. Enzymol., 1982, v. 77, p. 526—548.
9. Cooperman B. S., Panackal A., Springs B., Hamm D. J. Biochemistry, 1981, v. 20, № 21, p. 6051—6060.
10. Cooperman B. S., Panackal A., Springs B., Hamm D. J. Biochemistry, 1981, v. 20, № 21, p. 6384—6391.
11. Вауков А. А., Там-Виллосладо J. J., Аваева С. М. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 569, № 2, p. 228—238.
12. Braga E., Аваева С. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1972, v. 49, № 2, p. 528—535.
13. Rapoport T. A., Höhne W. E., Heitmann P., Rapoport S. M. Eur. J. Biochem., 1973, v. 33, № 2, p. 341—347.
14. Зефирос Н. С. Успехи химии, 1975, т. 44, № 4, с. 413—430.
15. Mandel N. S. Acta Cryst., 1975, v. B31, № 6, p. 1730—1734.
16. Romeo R., Lansa S., Tobe M. L. Inorg. Chem., 1977, v. 16, № 3, p. 785—789.
17. Haromy T. P., Knight W. B., Dunaway-Mariano D. Biochemistry, 1982, v. 21, № 26, p. 6950—6956.
18. Аваева С. М., Воробьева Н. Н., Мельник М. С., Назарова Т. И. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 10, с. 1510—1578.
19. Аваева С. М., Bakuleva N. P., Baratova L. A., Nazarova T. I., Fink N. Yu. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 482, p. 173—184.
20. Welsh K. M., Jakobyan A., Springs B., Cooperman B. S. Biochemistry, 1983, v. 22, № 9, p. 2243—2248.
21. Hansen G., Höhne W. E., Kuranova I. P. Acta biol. med. Germ., 1982, B. 41, № 1, S. 23—30.
22. Vanerjee A., Cooperman B. S. Inorg. Chem. Acta, 1983, v. 79, № 1, p. 146—148.
23. Knight W. B., Dunaway-Mariano D., Ransom S. C., Villafranca J. J. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 5, p. 3016—3020.
24. Мельник М. С., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биоорган химия, 1984, т. 10, № 11, с. 1483—1489.

Поступила в редакцию
16.IX.1985

A CONFORMATIONAL HYPOTHESIS OF THE TRANS-LIGATION OF METALS WHICH ACTIVATE PYROPHOSPHATASE AND RELATED ENZYMES

KURANOVA I. P., SOKOLOV V. I.*

A. V. Shubnikov Institute of Crystallography and *A. N. Nesmeyanov
Institute of Organo-Element Compounds, Academy of Sciences of
the USSR, Moscow

A mechanism for the catalytic action of inorganic pyrophosphatase has been proposed which involves the formation of a neutral bicyclic intermediate with the bicyclo-[3.3.1]nonane topology wherein pyrophosphate uses all four anionic oxygen atoms to coordinate two metal ions. The existence of such an intermediate has been shown to be quite possible in terms of conformational analysis. A plausible role of this intermediate in the hydrolysis of different substrates is rationalized and the pattern of trans-ligation is suggested. The metal-activator bound to the enzyme in the absence of substrate is supposed to act during the trans-ligation in a relay-like fashion involving a carboxyl group of the enzyme. The correspondence between the proposed scheme and literature data is discussed.