



锰超氧化物歧化酶的催化原理与酶活性调节机制*

张 旭^{1)**} 张 蕾²⁾ 许鹏琳³⁾ 李天然⁴⁾ 晁瑞青⁵⁾ 韩正好⁶⁾

(¹⁾ 郑州大学医学院基础医学院生物化学与分子生物学系, 郑州 450001; (²⁾ 郑州大学体育学院, 郑州 450001;

(³⁾ 郑州大学第一附属医院妇科, 郑州 450001; (⁴⁾ 郑州大学医学院临床医学系, 郑州 450001;

(⁵⁾ 郑州大学化学学院, 郑州 450001; (⁶⁾ 河南应用技术职业学院, 郑州 450042)

摘要 锰超氧化物歧化酶(MnSOD)催化两分子超氧自由基歧化为分子氧和过氧化氢。超氧自由基被 Mn^{3+} SOD氧化成分子氧的反应以扩散的方式进行。超氧自由基被 Mn^{2+} SOD还原为过氧化氢的反应以快循环和慢循环两条途径平行进行。在慢循环途径中, Mn^{2+} SOD与超氧自由基形成产物抑制复合物,然后该复合物被质子化而缓慢释放出过氧化氢。在快循环途径中,超氧自由基直接被 Mn^{2+} SOD转化为产物过氧化氢,快速循环有利于酶的复活与周转。本文提出温度是调节锰超氧化物歧化酶进入慢速或者快速循环催化途径的关键因素。随着在生理温度范围内的温度升高,慢速循环成为整个催化反应的主流,因而生理范围内的温度升高反而抑制该酶的活性。锰超氧化物歧化酶的双相酶促动力学特性可以用该酶保守活性中心的温度依赖性配位模型进行合理解释。当温度降低时,1个水分子(或者 OH^-)接近Mn、甚至与Mn形成配位键,从而干扰超氧自由基与Mn形成配位键而避免形成产物抑制。因此在低温下该酶促反应主要在快循环通路中进行。最后阐述了几种化学修饰模式对该酶的调节,说明锰超氧化物歧化酶受到多种形式的快速调节(变构调节与化学修饰)。这些快速调节直接改变酶的活化状态,进而调节细胞中超氧自由基和过氧化氢的平衡与流量,为揭示锰超氧化物歧化酶和超氧自由基的生理作用提供新理论。

关键词 锰超氧化物歧化酶, 变构调节, 共价修饰, 活性氧, 生物氧化, 温度, 酶催化机制

中图分类号 Q5, Q6

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0572

锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)定位于真核细胞的线粒体和原核细胞的细胞质中,在植物细胞的叶绿体也有表达。其存在的广泛性以及特殊的定位表明MnSOD在生命活动中的重要作用。线粒体是细胞能量代谢中心。除了提供>90%的细胞ATP外,线粒体也提供了热源以维持和调节生物体体温^[1-2]。MnSOD催化2分子超氧自由基歧化为分子氧(O_2)和过氧化氢(H_2O_2),而被认为是一种重要的抗氧化酶。但是,目前大部分学者认为活性氧(reactive oxygen species, ROS, 主要包括超氧自由基和 H_2O_2 等)可以调控细胞的氧化还原状态和蛋白质等生物大分子的功能,可以作为信号分子产生生理学效应,比如其介导衰老、神经退行性疾病、代谢病、肿瘤等许多生理和病理过程^[3-4]。但是ROS具体介导了什么

信号,目前没有定论。MnSOD酶活性受到化学修饰与变构调节等多种形式的快速调节,这些调节直接改变该酶的活化状态,进而可能改变超氧自由基和 H_2O_2 的代谢速度和方向。因此,研究MnSOD的催化原理与调节机制无疑可以揭示MnSOD的生理作用和ROS的信号转导作用。MnSOD基因的表达调控已经有很多文章报道,但是从来没有人报道过其快速的酶活性调节模式。以前的研究提出MnSOD受温度调控的变构调节模式,该模式提示,锰超氧化物酶是特异性地被低温激活的酶,并且可能是生物体和细胞中原始的和普遍的温度感受

* 河南省郑州市市科技局(52110549)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 18511068760, E-mail: johnsir@zzu.edu.cn

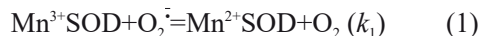
收稿日期: 2022-12-20, 接受日期: 2023-03-29

器^[5]。本综述首先论述MnSOD催化反应的基本原理, 然后讨论MnSOD温度依赖性的酶促动力学特征, 及其酶促动力学特征的结构基础和分子机制。最后阐述几种MnSOD的化学修饰模式, 如乙酰化和硝基化修饰^[6-7], 说明MnSOD受到多种形式的调节, 这些调节可以改变细胞中的ROS水平和流量, 为揭示ROS的信号转导作用提供帮助。

1 MnSOD催化反应的基本原理

MnSOD通过快循环和慢循环的两种途径催化超氧自由基(superoxide radical, $O_2^{\cdot-}$)歧化为 O_2 和 H_2O_2 ^[8-11]。定性描述该催化机理如方程式(1)~(4)。第一个超氧自由基分子被氧化成 O_2 的过程是一个在快循环和慢循环中都以相同的速率常数 k_1 进行的反应, 其速度接近于扩散速度。第二个超氧自由基分子被还原为 H_2O_2 的反应可以通过快循环(2)或者慢循环(3)和(4)两条途径平行进行。在慢循环途径中, MnSOD与超氧自由基形成一种叫产物抑制(product inhibition)复合物的中间产物, 然后中间产物被质子化而缓慢释放出 H_2O_2 。反应速率常数 k_3 描述了抑制复合物的形成速率, k_4 是抑制复合物的质子化和酶的复活速率。在快循环途径中, $O_2^{\cdot-}$ 直接被转化为产物 H_2O_2 , Mn^{2+} 与 $O_2^{\cdot-}$ 之间的电子转移与质子化反应同步完成, 其反应速率为 k_2 。快循环途径有助于产物释放和酶的快速周转(turnover)与复活。反应速度 k_2/k_3 的比值被命名为门控比(gating ratio)。门控比衡量了MnSOD进入

快循环通路和慢速循环通路的相对速度, 高的门控比表示这个酶更快地进入快循环通路催化反应、减少产物抑制复合物的形成^[12]。



2 双相催化反应的结构基础

MnSOD是由相同的亚基组成的二聚体或四聚体, 每个亚基含有1个Mn离子。从微生物到人类的所有MnSODs具有高度的同源性, 其活性中心由保守的氨基酸组成并且表现出几乎相同的空间结构。为方便起见、除非另外特别注明, 本文使用人类MnSOD(HuMnSOD)氨基酸序列号。Mn离子嵌入在酶活性位点中, 并且与4个氨基酸残基(His26、His74、His163、Asp159)和1个游离的含氧分子(H_2O 或 OH^- (WAT1), 位于His26的对位, 图1)形成5个配位键^[13-14]。这5个配体形成了酶活性位点的“内球(inner sphere)”。His30和Tyr34以及其他几个氨基酸残基形成了控制底物($O_2^{\cdot-}$)进入和产物(O_2 和 H_2O_2)释放出“内球”的通道。His30和Tyr34之间大约有5 Å的间隙(室温), 该间隙是底物进入和产物释放进出“内球”的“门”, 1个水分子(WAT2)通常在门口与Tyr34形成氢键(图1)。Gln143、Tyr34、WAT2和His30形成了“外球(outer sphere)”, 并与WAT1

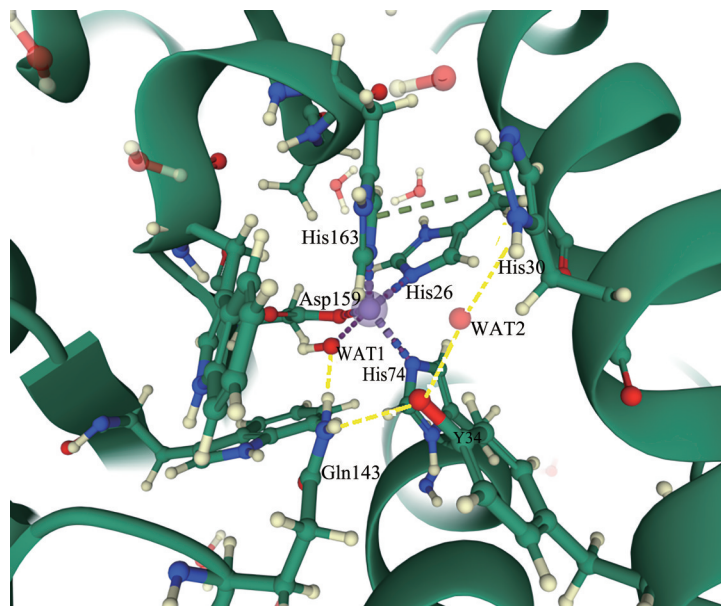


Fig. 1 Structure of the active site of HuMnSOD (PDB 7KKS, oxidized type)

图1 HuMnSOD的活性位点结构图(PDB 7KKS, 氧化型)

一起共同形成一条延伸的氢键链,该氢键链被认为参与歧化反应中的质子转移^[15]。

由于超氧自由基的半衰期很短,在晶体学和光谱学的研究中往往使用叠氮化物(N_3^-)和氟化物(F^-)作为超氧自由基的类似物来研究底物或产物与Mn之间的相互作用^[14]。已发表的结构显示,叠氮化物在Asp159残基的对位与Mn形成第6个配位键(例如HuMnSOD, PDB 5T30)。尽管叠氮化物和超氧自由基的分子大小不同,但是基于叠氮化物与Mn相互作用的研究表明,MnSOD催化的歧化反应有内球途径和外球途径两种反应机制。在内球反应途径中, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 进入内球并作为第6配体与Mn离子配位结合,然后释放出 O_2 和 H_2O_2 。超氧自由基氧化成分子氧伴随着 Mn^{3+} 的还原,是接近于扩散速度的反应。超氧自由基还原为 H_2O_2 伴随着 Mn^{2+} SOD的氧化是整个歧化反应关键的限速步骤,如果超氧自由基结合的还原态锰($\text{O}_2^{\cdot-}\text{Mn}^{2+}$)转化氧化态锰($\text{O}_2^{\cdot-}\text{Mn}^{3+}$),并且 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 不能快速地被质子化而释放,活性的酶就转化为产物抑制复合物^[16-20]。在外球途径中,超氧自由基不与Mn配位而直接转化为产物, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 还原为 O_2^{2-} 的过程同时伴随着质子的转移,而一步释放出 H_2O_2 。外球途径有利于产物释放并且有助于酶的快速复活。叠氮化物浸泡的MnSOD的结构表明叠氮化物也与WAT2相互作用,并且在这种情况下Mn的第6配位键位置是空的,这可以解释为该催化反应也可能在内球以外发生,并且通过外球的氢键网络传递质子^[21-22]。

快速循环是通过外球途径进行的氧化还原反应, k_2 是快速的外球途径反应的速率常数。慢速循环是内球反应途径, k_3 表征 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 进入内球反应的速率常数,并可以解释为产物抑制复合物的形成速率。速率常数 k_4 是过氧化物离子从内球体释放出来的速率^[9-10]。当 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 进入内球并配位Mn离子时,酶很容易形成抑制复合物而难以解离。本文认为MnSOD的活性主要是通过控制门控比来调节的,调节产物抑制复合物的解离速度是低效率的,干扰 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 进入内球以利于减少产物抑制是保持高酶活性的更有效策略^[5]。

3 温度对MnSOD活性的调节

有人提出MnSOD进入快循环可能是调节线粒体或者细胞中过氧化氢流通量的机制。然而,对MnSOD双相催化过程的确切化学原理及其生理学

意义目前尚不清楚。不同物种来源的MnSODs是一项保守特征,即其在高温下迅速形成产物抑制复合物。在低温下MnSODs较少被抑制,并且在形成产物抑制复合物之前经历更多的快速循环途径催化反应。笔者认为温度是控制MnSOD进入慢速或者快速循环途径催化的重要因素。

3.1 低温激活MnSOD

20世纪70年代对来自大肠杆菌(*Escherichia coli*)的MnSOD(EcMnSOD)和嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*, 生长温度大于 65°C)的MnSOD(*Bs*MnSOD)的研究发现:MnSOD通过快循环和慢循环的两种途径催化超氧自由基歧化^[9-11]。对于*Bs*MnSOD来说,在温度为 25°C 和pH为9.4的情况下,其反应速率常数 k_1 ($\approx k_2$)= $5.6 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $k_3=4.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $k_4=70 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_{\text{cat}}=4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ 。最初发现MnSOD双相催化机制的McAdam等^[9-10]同时还分析了 H_2O_2 、pH、温度和其他可能参与调节*Bs*MnSOD酶活性的因素,他们发现该酶的门控比主要受温度调节。还发现反应常数 k_1 和 k_2 在 $10\sim 60^\circ\text{C}$ 之间几乎不随温度变化而变化,因此*Bs*MnSOD催化的快速循环反应速率在这个温度范围内与温度变化无关。另一方面,慢循环的反应常数 k_3 和 k_4 随着温度(在 $5\sim 55^\circ\text{C}$ 之间)的增高而加快。在 25°C 时,*Bs*MnSOD催化的快速与慢速反应的门控比为12:1,而在 55°C 时其门控比仅为3:1。与高温导致 k_3 的快速增加相比,温度仅引起 k_4 值微小的变化。由于反应(4)的效率低下,伴随着 k_3 随温度升高,抑制复合物的形成速率(k_3)远低大其解离速率(k_4)。随着反应的继续,每进行一次循环,就有更多的酶分子转化为抑制复合物而不能及时复活。最终在高温下,酶不能及时周转与复活而导致所有反应都会进入以 k_4 速率进行的慢循环途径。

随着生理范围内的温度升高,MnSOD催化反应的门控比反而降低,因而生理范围内的升高温度反而促进该酶更快地进入慢速反应途径。当 k_2/k_3 在较高温度下下降到一定的低比率范围时,反应更快地进入慢循环途径,这时在反应中几乎观察不到快循环反应。在较低的温度下,酶更快地进入快循环通路催化反应而减少抑制复合物的形成。在足够低的温度下,当 k_2 远大于 k_3 时,自由的酶会迅速再生而复活,所有反应都将转向高效的快速循环途径(图2)。这个足够低的温度点是所有反应切换到快

速循环的阈值温度, 或者是“设定点”温度。这一特性意味着 MnSOD 是一种特异性地被低温活化的酶。

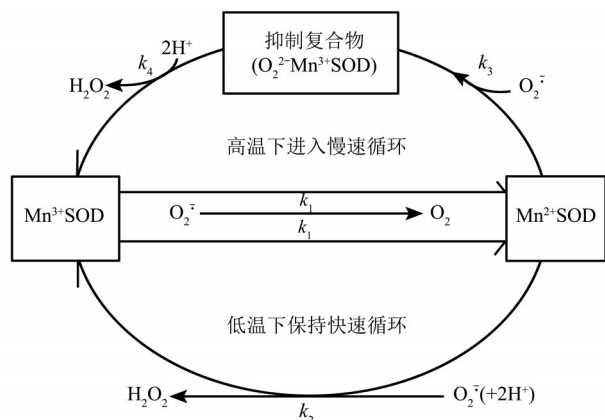


Fig. 2 MnSOD catalyzes the disproportionation of superoxide radicals in two parallel pathways of fast- or slow-cycle depending on temperature

图2 MnSOD依赖于温度变化通过快循环或慢循环两种平行途径催化超氧自由基的歧化反应

超氧自由基的氧化是一个在快循环和慢循环中都以相同的恒定速率 (k_1) 进行的单一过程。超氧自由基被还原为过氧化氢的反应可以通过快循环或慢循环途径平行地进行。发生快循环 (k_2) 与慢循环 (k_3) 的相对比例 (门控比, k_2/k_3) 会随着温度升高而降低, 这意味着MnSOD在高温下更快地形成产物抑制复合物。在低温下, MnSOD保持在快循环途径中催化反应 (k_2), 而较少发生产物抑制。

3.2 MnSOD是受温度调控的变构酶

室温下采集的 MnSOD 晶体结构活性中心的 Mn 是一个五配位的结构^[23-25]。Borgsdahl 等^[26] 在低温 (100 K) 条件下捕获到了 *Ec*MnSOD 的六配位晶体结构, Mn 的第 6 配位键配体是 1 个水分子 (WAT2 或 OH^-) (图 3, PDB 1D5N)。低温俘获的晶体与一般晶体之间的不同反映了 MnSOD 活性位点的配位状态是温度依赖性的。在低温冷却过程中, WAT2 从外球“门”的位置移动到内球并作为第 6 配体与 Mn 配位, 这表明 MnSOD 是一种受温度调控的变构酶。人们早就知道, 配体与 Mn 之间的相互作用是压力和温度依赖性的, 因为配位键的形成对 Mn 与配体之间距离敏感^[13, 26]。随着温度的降低, Tyr34 氨基酸残基改变其与锰的角度和距离, 并在空间上调节其氢键伴侣 (WAT2) 与 Mn 的距离。在足够低的温度 (100 K) 下 WAT2 接近甚至与 Mn 形成配位键。而在室温下随着活性位点的受

热膨胀或者水分子热运动加剧, WAT2 脱离 Mn, 这可能就是为什么在室温下采集的一般晶体中没有观察到六配位 WAT2-Mn 的原因。变构配位表明 WAT2 和 Mn 之间的距离受温度控制, 在生理温度范围内 WAT2 和 Mn 之间的距离变化可能与 MnSOD 的生理学功能相关。在活性位点遇冷收缩时, WAT2 更接近 Mn, WAT2 可能会在空间上干扰 O_2^- 进入内球并迫使反应进入更快的外球循环通路, 从而导致更高的门控率和酶活性以及较低的产物抑制水平。

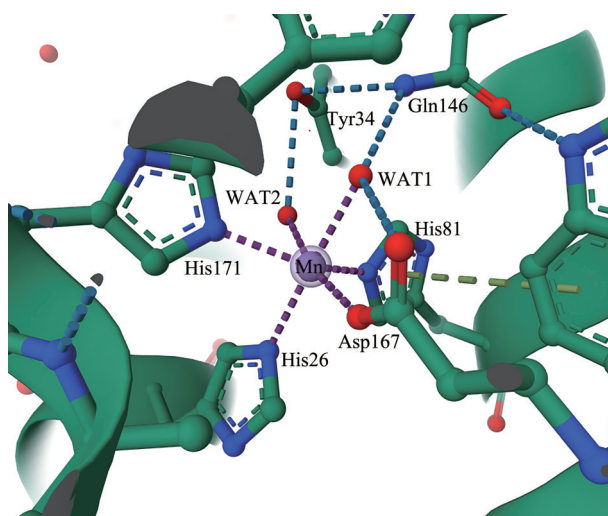


Fig. 3 The six-coordinated crystal structure of *Ec*MnSOD captured at a low temperature (100 K)

图3 低温 (100 K) 条件下捕获到的 *Ec*MnSOD 六配位晶体结构

室温条件下捕获的 *Ec*MnSOD 晶体结构 (PDB 1VEW)^[22-24] 与 *Hu*MnSOD 的结构 (PDB 7KKS) 具有相同五配位的活性中心。1D5N 在与 1VEW 相似的条件下载晶, 但在数据收集前 *Ec*MnSOD 晶体被冷冻到 100 K。1D5N 结构显示 WAT2 与 Mn 配位成为活性位点中的第六个配体^[26], 表明 MnSOD 是一种温度依赖性的变构酶。

上述晶体结构的研究表明, *Ec*MnSOD 可以根据温度的变化处于不同的配位状态。要捕获到 MnSODs 配位结构发生转变, 需要很大的温度变化 (室温到 100 K)。光谱学研究表明, 该酶活性位点的 Mn 在生理或者亚生理温度范围内, 处于五配位和六配位的动态平衡中。Whittaker 等^[27] 最先报道了叠氮化物与 Mn^{3+}SOD 的相互作用依赖于温度的变化。他们在 *Ec*MnSOD 观察到, 其发生六配位到五配位转变的中位点温度是 220 K ($\approx -53^\circ\text{C}$), 在生理温度 (300 K $\approx 27^\circ\text{C}$) 下完全转变为五配位结构。同时, 来自嗜热杆菌 HB8 (*Thermus thermophilus*) 的 MnSOD (*Tt*MnSOD) 表现出类似

于*Ec*MnSOD的变构行为,但*Tt*MnSOD在发生六配位到五配位转变的中位点温度在更高的温度305 K ($\approx 32^\circ\text{C}$)^[28]。*Tt*MnSOD和*Ec*MnSOD两种酶的活性位点结构几乎相同,但对温度反应的敏感点明显不同,显然每个生物体的生理生长温度与MnSOD变构的温度敏感点有关。这些结果为MnSOD结构的微妙变化在协调生物适应极端物理环境中的作用提供了证据。

光谱和计算化学研究表明,MnSOD的活性位点处于无叠氮化物的五配位和加合叠氮化物的六配位之间的动态平衡之中,其动态平衡点依赖于温度。在室温环境中,伴随着MnSOD活性位点的受热膨胀,与Tyr34以氢键连接的叠氮化物脱离 Mn^{3+} ,因此室温下该酶的活性中心为五配位状态^[16, 21-22]。如前所述,超氧自由基氧化成氧气伴随着 Mn^{3+} SOD还原为 Mn^{2+} SOD是一个与温度变化无关的过程,在快循环和慢循环中都以相同的速率常数 k_1 进行。还原态的 Mn^{2+} SOD与阴离子(叠氮化物)的相互作用可以提供更多关于温度依赖性 Mn^{2+} 的氧化过程和产物抑制信息,但是 Mn^{2+} 与阴离子的相互作用不同于 Mn^{3+} 与阴离子的相互作用,因为 Mn^{2+} 较低的表面电荷导致 Mn^{2+} SOD的活性中心趋向于静电力平衡状态。 Mn^{2+} SOD在低温下更有可能不与阴离子配位,而是与水分子配位^[29-30]。Tabares等^[31]基于高场电子顺磁共振谱(high-frequency and high-field electron paramagnetic resonance, HFEP R)的光谱分析表明, Mn^{2+} SOD温度依赖性地向 H_2O 相互作用。他们检测到天然(无阴离子)*Ec* Mn^{2+} SOD的独特六线HFEP R光谱,该六线光谱的强度随着孵育温度的降低而增加,而在高温下完全逆转。新检测到的六线光谱是由于在MnSOD的五配位中心上添加了一个水分子(WAT2)。在室温下WAT2位于外球的“门”处并且与Tyr34以氢键结合。天然(无阴离子)*Ec* Mn^{2+} SOD的五配位中心添加水分子在结构上类似于低温条件下(100 K)捕获的*Ec*MnSOD蛋白晶体。五配位转换到加合WAT2六配位*Ec* Mn^{2+} SOD的热力学参数与先前报道的叠氮化物加合物中*Ec* Mn^{3+} SOD转换的热力学参数几乎相同。

3.3 MnSOD是一种被低温活化的变构酶

本文认为,MnSOD的配位方式主要受温度调节,温度变化导致其严格保守的内外球网关氨基酸残基Tyr34改变其与锰的角度和距离,并调节Tyr34的氢键伙伴与Mn的距离、甚至与锰形成配

位键。水、叠氮离子、氟化物和 O_2^- 都是Tyr34的氢键伙伴^[16, 21-22]。叠氮化物因为它的分子半径足够大可以作为第6配体直接与Mn配位。伴随着MnSOD酶活性位点的遇冷收缩,叠氮化物可以在空间上接触到Mn而与Mn配位。而相反,较小分子半径的氟阴离子在低温环境中不能接触到(或连接)Mn,而是非常接近Mn离子。在低温下, Mn^{3+} SOD优先配位叠氮化物,而 Mn^{2+} SOD的主要配体是WAT2。叠氮化物与 Mn^{3+} SOD的相互作用与MnSOD的生理学作用无关,因为 Mn^{3+} SOD还原成 Mn^{2+} SOD是在快循环和慢循环中以相同速率常数(k_1)的过程。与温度变化相关的WAT2/ Mn^{2+} SOD相互作用是门控比随温度降低而增加的结构学基础^[29, 31-32]。

WAT2和 O_2^- 是一对相互竞争的与Mn离子配位的天然配体。随着温度的降低,WAT2更接近Mn离子从而在空间上竞争性地干扰 O_2^- / Mn^{2+} 配位。在足够低的温度下,WAT2占据Mn的第6配位键的位置,可以完全阻断 O_2^- / Mn^{2+} 形成配位键,结果是所有反应都在快速的外球路径下进行。因此,WAT2和 O_2^- 竞争性地与Mn配位揭示了一种新的酶促反应机制,竞争性促进酶活性模型。当WAT2竞争性地占据Mn的第6配位键的时候反而促进了MnSOD的酶活性。在较高温度下,Tyr34将其氢键搭档WAT2稳定在外球体从而为 O_2^- 打开了进入内球的通道, O_2^- 可以通过Mn和WAT2之间的间隙进入内球体并与Mn离子形成抑制复合物。快速的外球反应和慢速的内球反应是两个独立的平行反应,预形成产物抑制复合物再质子化解离不是快速外球循环的必须途径。光谱研究表明,天然MnSOD的活性中心处于无WAT2的五配位和加合WAT2六配位的动态平衡之中,该动态平衡的平衡点取决于温度,并在低温下转变为六配位结构,表明快速的外球反应发生的比例随着温度的降低而增加,反之亦然(图4)。该模型符合MnSOD的门控比动力学和MnSOD生理学功能。门控比表示了由温度决定的快外球反应和慢内球反应的比例。温度是人体或环境的冷热程度,门控比随温度不断变化,这使得MnSOD可以感知不断变化的温度并不断调整门控比,因此,MnSOD很可能是一种完美地感知温度变化的变构酶。不断变化的温度可以通过细胞内总的MnSOD分子连续监测,然后微调细胞内MnSOD内外球反应的总比例以适应温度变化。

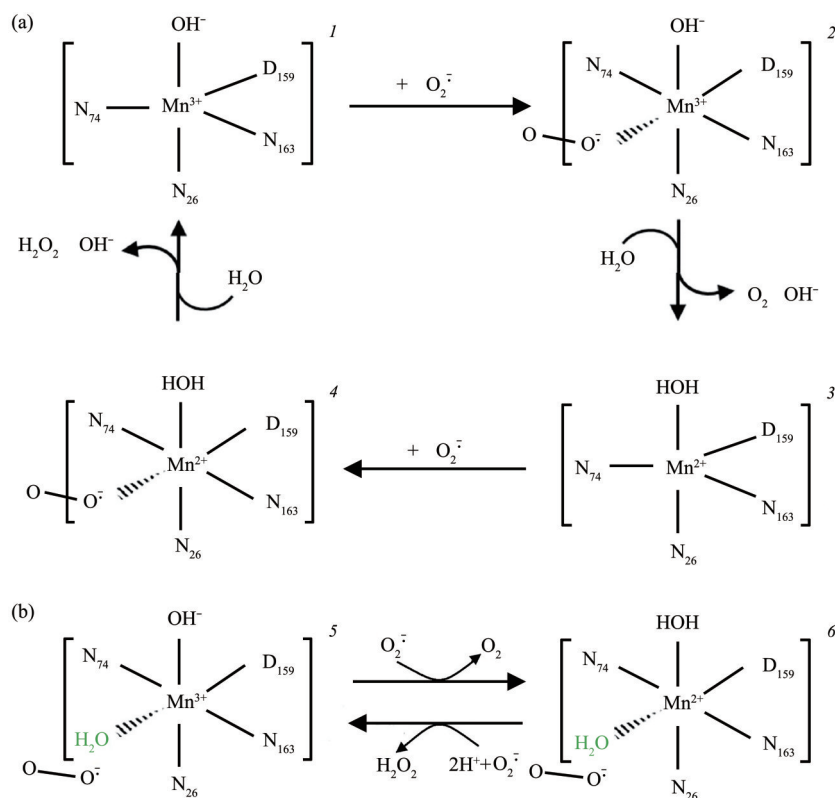


Fig. 4 MnSOD functions as an allosteric enzyme activated by low temperature

图4 MnSOD是一种被低温激活的变构酶

MnSOD通过 Mn^{3+} 还原态和 Mn^{2+} 氧化态之间变化催化 O_2^- 歧化为 O_2 和 H_2O_2 。Mn与 O_2^- 之间的电子交换可以通过内球或外球机制发生。(a)显示了内球反应途径,该途径也是著名的5-6-5途径。第一个 O_2^- ($\text{O}-\text{O}^-$)进入MnSOD活性中心的内球并且与Mn配位,导致 Mn^{3+} 从五配位转变成六配位状态(1到2),当 O_2^- 释放出 O_2 的时候(2到3),六配位的 Mn^{3+} 转变成五配位 Mn^{2+} ;第二个 O_2^- ($\text{O}-\text{O}^-$)进入内球导致 Mn^{2+} 从五配位转变成六配位(3到4),该反应可能导致产物抑制复合物($\text{O}_2^{2-}\text{Mn}^{3+}$)的形成;伴随着产物抑制复合物释放出 H_2O_2 ,六配位的 Mn^{2+} 转变成五配位的 Mn^{3+} (4到1),MnSOD恢复到活性状态。(b)显示在足够低的温度下进行的快速的外球反应,在该机制中Mn不直接与 O_2^- 配位而通过简单的两步反应完成歧化反应(5到6)。低温下 H_2O (绿色)作为第六配体与Mn配位,从而阻挡 O_2^- ($\text{O}-\text{O}^-$)进入内球,并且避免 O_2^- 与 Mn^{2+} 配位而形成产物抑制复合物,导致MnSOD催化的反应会全部通过快速的外球途径进行^[29, 31-35]。MnSOD通过内球和外球反应途径平行地催化反应进行,温度越低则快速的外球反应发生的比例越高,温度越高则发生慢速的内球反应的比例越高。

4 MnSOD的化学修饰调节

蛋白质的翻译后修饰调节蛋白质的活化、失活或功能继而来控制许多生物过程。MnSOD主要受到乙酰化、硝化和磷酸化等共价修饰调节,这些修饰普遍导致该酶活性降低。由于MnSOD的化学修饰已被证明可能具有可逆性,因此这些修饰可能与细胞中的氧化还原信号传导过程有关,其中乙酰化和硝化修饰被证明与炎症性热疼痛的发生有关^[36-39]。

4.1 乙酰化修饰

HuMnSOD的特定赖氨酸残基的乙酰化修饰导致该酶的活性降低和线粒体超氧化物水平增加。

Benovic等^[36]提出带正电荷的赖氨酸通过静电引导超氧化物阴离子进入酶的活性中心,该观点也得到认可^[40],而赖氨酸的乙酰化修饰导致MnSOD活性中心的静电引力降低从而降低酶活性^[41]。Sirt3 (sirtuin-3, 主要位于线粒体的 NAD^+ 依赖性去乙酰化酶)可以去除MnSOD的乙酰化修饰而维持MnSOD的酶活性^[42-43]。线粒体 Ca^{2+} 内流导致 NAD^+/NADH 比值下调,进一步导致依赖 NAD^+ 的SIRT3去乙酰化酶活性降低而抑制MnSOD的活性,导致ROS生产增多^[44-48]。上述论文的结果提示,在 NAD^+/NADH 平衡状态下MnSOD是被乙酰化修饰的,氧化态 NAD^+ 增多导致MnSOD被去除乙酰化而活化。MnSOD乙酰化与去乙酰化修饰可能是一种在代谢压力下(营养匮乏或缺氧)维持代谢平

衡的反馈机制。

有研究表明, MnSOD的乙酰化修饰与炎症性热敏疼痛的发生有关。Lauro等^[42]认为, 细胞中超过90%的ROS是在线粒体中产生的, 过量的超氧化物可导致DNA、脂质和蛋白质损伤, 这些伤害性信号转导到神经中枢引起小鼠对炎症性热疼痛的敏感。SIRT3活性降低导致MnSOD失活而不能维持超氧自由基和线粒体稳态, 导致动物对热痛觉更敏感^[43, 45-46]。同时, MnSOD活性降低导致的氧化应激会抑制SIRT3活性, 进而导致线粒体高乙酰化水平的修饰和氧化应激加剧。这些相互作用导致放大SIRT3作用的反馈回路, 进一步增强氧化损伤和炎症过程的正反馈信号。已知的天然或化学合成的抗氧化剂具有抗热痛觉过敏的作用, 如膳食多酚(如白藜芦醇)具有抗氧化和持久的抗热敏感作用。进一步的研究发现, 白藜芦醇在体内和体外均可以有效促进SIRT3的去乙酰化酶活性, 白藜芦醇通过维持SIRT3活性来清除内源性超氧自由基, 从而抑制炎症性热疼痛^[47-48]。

4.2 硝化修饰

活性氮(reactive nitrogen species, RNS, 包括 $\cdot\text{NO}$ 、过氧化亚硝酸盐 ONOO^- 和 $\cdot\text{NO}_2$ 等)会引起蛋白质、不饱和脂肪酸、核苷酸和其他生物分子的硝化。体内RNS的生物学作用是硝化蛋白质中的酪氨酸而产生3-硝基酪氨酸, 导致蛋白质的结构和功能改变, 如酶的催化活性失活、对蛋白水解酶的敏感性改变等。硝化修饰还可以阻碍酪氨酸被磷酸化修饰而影响酪氨酸蛋白激酶的生物信号转导作用^[19, 49-50]。MnSOD中的Tyr34是被过氧亚硝酸盐硝化的主要氨基酸残基, Tyr34残基位于MnSOD活性位点中距离锰 $\sim 5.5 \text{ \AA}$ 的范围内, 硝基化修饰MnSOD足以导致MnSOD丧失了大部分酶活性^[51-53]。科学家提出MnSOD的Tyr34残基被硝基修饰而降低活性的3种可能机制: a. 空间位阻干扰底物(O_2^-)进入酶的活性中心; b. 减弱支持催化中质子转移的氢键网络; c. 由硝基的存在而引起的该酶活性中心的氧化还原电位变化和静电效应降低。

有证据表明, 在热刺激下, 外周和中枢神经中活性氧和活性氮的含量增加。而同时, 去除ROS和RNS的药物可以逆转和预防与多种病因的热疼痛相关的特征性表现, 包括炎症性疼痛、神经性疼痛或吗啡诱导的痛觉过敏和耐受性。热刺激诱导ROS/RNS形成的增加, 可能会促进神经系统对热

刺激的敏感性。MnSOD被硝化而失活导致 O_2^- 增加, 对于炎症和热刺激诱导的痛觉过敏的发展至关重要^[43-47]。

5 讨 论

生物能转化的本质是发生在线粒体中的氧化还原反应。通过三羧酸循环(tricarboxylic acid cycling, TCA)产生的还原态烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)和还原态黄素腺嘌呤二核苷酸(FADH_2)与 O_2 反应是生物产生和利用能量的主要途径^[52, 54]。 O_2 包含两个不成对的顺磁电子, 因此, 分子氧的还原面临自旋限制因而必须通过单电子还原步骤进行, 而不可避免地产生超氧自由基中间体。含有单电子辅因子(例如过渡金属离子锰、铁、铜等)的酶可以帮助分子氧克服自旋限制而避免产生氧自由基。高效的细胞色素c氧化酶(cytochrome c oxidase, 一种血红素-铜氧化酶)直接催化分子氧还原为水而避免产生超氧自由基。细胞色素c氧化酶是呼吸链(respiratory chain, ETC)最终端的限速酶, 它将质子拉过线粒体内膜(mitochondrial inner membrane, IMM, 在真核生物中)或细胞膜(在原核生物中)而形成跨膜的质子梯度。存储在跨膜的电化学质子梯度中的自由能最终用于合成ATP, 这个过程被称为氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)。

从呼吸链泄漏的电子可以直接传递给分子氧而生成超氧自由基。SODs(MnSOD、FeSOD、Cu-ZnSOD、NiSOD)将单电子超氧自由基催化为 O_2 和 H_2O_2 , H_2O_2 被其他级联的抗氧化酶(例如过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶, 所有这些酶构成级联的抗氧化系统)转化为水。级联的分子氧被还原生成水的单电子过程释放的能量只能通过热量形式而被耗散^[55-56]。从呼吸链泄漏的电子形成的超氧自由基主要产生在线粒体基质中, 只有两个电子泄漏位点主要将超氧自由基释放到线粒体内膜与外膜的间隙(IMM)^[57-59]。超氧自由基以其高反应性的不成对电子参与许多非特异性生物化学反应而被认为是有害的分子^[60]。因为定位在线粒体基质中, MnSOD是控制超氧自由基代谢方向(成为有害的自由基分子或者产热性呼吸的中间分子 H_2O_2)的主要的酶。由于底物(O_2^-)被认为有限, SODs也一直被认为是一种为防止瞬时的超氧自由基爆发而备用的抗氧化酶。然而据观察, 过表达MnSOD会导致细胞中 H_2O_2 水平升高和 O_2^- 水平

降低, 因此, MnSOD可作为调节超氧自由基和过氧化氢平衡的变阻器^[61]。此外, 动力学模型证明, 在过表达MnSOD的线粒体中, 降低的 $O_2^{\cdot-}$ 水平会“拉动”反应 $CoQ^{\cdot-}+O_2\rightarrow CoQ+O_2^{\cdot-}$ 向前进行, 从而导致更多电子从CoQ $^{\cdot-}$ 位点泄漏出ETC。总而言之, MnSOD的活性不仅可以影响 $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ 的稳态, 还可以影响 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 在细胞或者线粒体里的流量。理论上来说, 冷活化的特性表明MnSOD可以直接响应温度变化并主动调节 $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ 平衡和流量。

在研究的初始阶段(1970s年), MnSOD的主要生理功能被定义为抗氧化酶。但是目前的研究表明, MnSOD在维持细胞中ROS的平衡和调节细胞和线粒体的功能方面起着重要作用。虽然ROS被认为是一类重要的信号分子, 但是还没有明确的理论阐明ROS信号作用的原理。在较高(或过高)的温度下, MnSOD更容易在较慢的产物抑制途径中催化反应, 并且导致 $O_2^{\cdot-}$ 不能被及时清除而过量。我们认为, 如果 $O_2^{\cdot-}$ 是一种有害分子, 它更可能是由体温过高引起的; 如果 $O_2^{\cdot-}$ 是一种信号分子, 它似乎会转导身体(或环境)温度过高的信号。在较低(或过低)的温度下, MnSOD主要通过快速循环途径催化反应, 因此, NADH和FADH₂更容易与 O_2 燃烧(通过级联的单电子还原途径进行)而产生热量。如果低温下冷活化的MnSOD活性高于过氧化物酶和谷胱甘肽过氧化物酶等 H_2O_2 清除酶的活性, 则 H_2O_2 更有可能过量。如果 H_2O_2 是信号分子, 它似乎是介导了低温信号, 并且可能诱发一系列生理反应反馈低温应激^[3, 57]。MnSOD遇冷激活是对低温的主动性反应, 冷活化的MnSOD的活性(k_2)显著超过细胞中超氧化物的稳态水平。因此, MnSOD的冷活化不能解释为其在低温下应对氧化应激的适应性反应, 而是为适应温度变化而做出的应答, 并且主动调节 $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ 的平衡和流量以反馈温度变化。

环境温度作为自然选择关键的因素, 在推动生命进化中发挥了至关重要的作用。不同的生物体有不同的适应生长范围, 比如, 大肠杆菌的生长温度范围是15~46℃, 而*Thermus thermophilus*是一种极端嗜热的、好氧性的、棒状的革兰氏阴性菌, 其生长温度能够达到85℃, 具有75℃的最适生长温度。这两者生长温度的差异与Whittaker等^[27-28]报道的引起其MnSOD变构的温度敏感点具有相关性, 说明每个生物体的生理生长温度与其MnSOD的活化/

抑制状态有关。MnSOD在较高温度下处于产物抑制状态似乎指示该温度点是有利生物体的生长的温度。人类的MnSOD在25℃的门控比为1:1, 因而被认为容易产生产物抑制^[62]。Hsu等^[63]发现在20℃时人类MnSOD的门控比为4:1。说明25℃是界定人MnSOD进入慢速循环或者快速循环的重要温度结点。有趣的是, 25℃这个所谓的室温正是人体感觉舒适的温度。人MnSOD在高于25℃时的酶促动力学特征没有见到报道, 但是基于合理的推测, 人体的MnSOD在35~37℃的生理环境中处于产物抑制状态, 这可以很好地解释为什么发生生物氧化的主要亚细胞器-线粒体, 在35~37℃的生理环境中, 人体线粒体里的 H_2O_2 水平反而处于比较低的状态^[55-56]。

恒定的体温可能是哺乳动物获得生存优势的关键因素, 因为稳定的体温可以保持生物体的生物化学反应在合适温度范围内进行。但是, 对于哺乳动物恒定体温的进化机制及其深层次的控制机制仍未完全揭示。近年发现线粒体局部微环境温度远高于哺乳动物体温^[64], 说明线粒体是维持体温恒定的重要“热源”, 是控制体温的最佳位点。已经有大量文献报道线粒体中的解偶联蛋白通过诱导质子回流泄漏到线粒体基质中的生热。我们创新地提出冷活化MnSOD的催化产物 H_2O_2 可以直接诱导解偶联蛋白的活化而增加产热^[65]。哺乳动物在进化过程中建立了多种温度应答体系, 如神经-内分泌系统, 而使得哺乳动物体温稳定在35~37℃。据报道, ROS可以提高温度敏感型瞬时电位受体(transient receptor potential, TRP)对辣椒素诱导的热痛觉和机械痛觉的敏感性^[2, 66-71]。因此不能排除MnSOD和ROS也参与了温度敏感性TRPs离子通道的调控。MnSOD可能是所有细胞的基础的和普遍的温度感受器, 因为所有的细胞都表达MnSOD并且都对温度变化敏感。MnSOD的共价修饰导致其活性降低, 从而导致神经细胞对热刺激引起的疼痛更敏感。以上论述想说明, 体温恒定的基础是细胞的氧化还原状态, 因为细胞可以主动调节线粒体里(或者生物体里)的氧化还原反应以维持体温恒定。哺乳动物的神经-内分泌系统可以感知和放大细胞的氧化还原状态的信号而提醒哺乳动物回避温度-氧化应激引起的伤害, 从而使哺乳动物的体温稳定在更狭窄的温度范围。

6 结 论

本文回溯了已经确立的 MnSOD 门控动力学说, 并且重点说明了温度是影响其快速反应与慢速反应的门控比的关键因素。较高的温度加快 MnSOD 与 $O_2^{\cdot-}$ 形成产物抑制复合物, 从而使慢循环反应成为催化反应的主流。温度降低反而诱导 MnSOD 进入快速循环途径, 这是从微生物到人类的所有 MnSODs 的通用催化机制。MnSOD 的门控动力学催化特性与该酶活性中心的构象变化有关。在结构上, MnSOD 通过两个独立的、平行的途径催化反应, 即慢速的内球和快速外球反应途径。超氧自由基被氧化成 O_2 的第一段反应是与温度变化无关的反应, 并且在快速的外球和慢速的内球通路中以相同速率常数 (k_1) 进行。超氧自由基被还原为 H_2O_2 是歧化反应循环中的关键的限速步骤, 该步骤可能通过快速的外球或慢速的内球两条途径平行进行。当 $O_2^{\cdot-}$ 进入内球并且配位 Mn 离子时, 酶很容易形成抑制复合物而不能复活, 这时方程式 (4) 中的质子转移就成为了超氧自由基歧化反应的限速步骤。干扰 $O_2^{\cdot-}$ 进入 MnSOD 活性中心的内球而避免形成抑制复合物是维持歧化反应在快速循环途径中进行的有效策略。结构学和光谱学的研究表明, MnSOD 活性中心中 Mn 的配位状态是温度依赖性, 这可能是 MnSOD 遇冷活化的分子基础。随着 MnSOD 活性中心的遇冷收缩, 一个水分子 (WAT2) 接近 Mn (甚至与 Mn 形成配位键), 从而竞争性地干扰超氧自由基与 Mn 配位、并且减少产物抑制的形成, 因此该反应在低温下主要在较快的外球途径中进行。

变构调节是酶活性调节方式中最灵活和快速的调节模式, 因此, 变构调节往往与酶的生理学功能相关。MnSOD 遇冷活化的特性说明该酶的生理学功能为: 感受温度变化进一步调节 $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ 信号。MnSOD 的温度依赖性产物抑制为温度应激和氧化应激之间关系的基本原理提供了全新的见解。在极端温度下, 由于高温会导致 MnSOD 快速地形成产物抑制而不能有效清除超氧自由基, 因此热应激可能与氧自由基不能被有效清除而过量有关。而于低温下, MnSOD 被过度活化而导致 H_2O_2 生成增加, 因此冷应激可能与 H_2O_2 过量相关。遇冷激活是 MnSOD 对温度变化的最独特的应答, 而不是对氧化应激的被动适应, 因为 MnSOD 遇冷激活的抗氧化酶活性显著超过细胞 (或者线粒体) 中的超氧自

由基的水平。从生理学上讲, MnSOD 的冷活化是一种快速释放过氧化氢的调节机制, 过氧化氢可以作为第二信使诱导一系列针对冷应激的生理反馈。越来越多的证据表明, ROS 在许多与温度相关的生理现象中发挥信号转导功能, 例如解偶联、适应性产热, 以及温度敏感瞬时受体电位通道、蛋白质的折叠和热休克蛋白的表达等^[72-74]。

MnSOD 主要受到乙酰化、硝化和磷酸化等共价修饰调节, 这些修饰导致该酶活性降低。由于 MnSOD 的化学修饰已被证明可能具有可逆性, 因此这些修饰可能与细胞中的氧化还原信号转导过程有关, 其中乙酰化和硝化修饰被证明与炎症性热疼痛的发生有关。主要位于线粒体的 NAD^+ 依赖性去乙酰化酶 Sirt3 可以去除 MnSOD 的乙酰化修饰, 而调节细胞 MnSOD 的酶活性以适应环境变化。白藜芦醇等天然抗氧化剂通过增加 SIRT3 活性来促进 MnSOD 的活化, 从而高效清除 $O_2^{\cdot-}$ 而抑制炎症性疼痛。MnSOD 的乙酰化修饰一般是可逆的和可以调节的, 该修饰因此理论上是生物体调节体内 ROS 平衡和信号转导的方式。亚硝酸盐硝化修饰 MnSOD 活性中心的 Tyr34 氨基酸残基, 导致 MnSOD 丧失大部分酶活性和 ROS 失去平衡, 而发出危险信号甚至引起细胞死亡。MnSOD 被乙酰化和亚硝酸盐硝化修饰都与炎症性热疼痛的发生有关。过度的化学修饰会导致细胞中 MnSOD 的活性过低而产生过量的超氧化物, 导致 DNA、脂质和蛋白质损伤, 伤害性信号转导到中枢引起哺乳动物对炎症性热疼痛更加敏感。

参 考 文 献

- [1] Lane N. Hot mitochondria?. *PLoS Biol*, 2018, **16**(1): e2005113
- [2] Beignon F, Gueguen N, Tricoire-Leignel H, *et al.* The multiple facets of mitochondrial regulations controlling cellular thermogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 2022, **79**(10): 525
- [3] Liu M F, Sun X Y, Chen B Y, *et al.* Insights into manganese superoxide dismutase and human diseases. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(24): 15893
- [4] Meng J, Lü Z Y, Zhang Y M, *et al.* Precision redox: the key for antioxidant pharmacology. *Antioxid Redox Signal*, 2021, **34**(14): 1069-1082
- [5] Zhang X, Zhang D, Xiang L, *et al.* MnSOD functions as a thermoreceptor activated by low temperature. *J Inorg Biochem*, 2022, **229**: 111745
- [6] Cao D, Wang M, Qiu X, *et al.* Structural basis for allosteric, substrate-dependent stimulation of SIRT1 activity by resveratrol. *Genes Dev*, 2015, **29**(12): 1316-1325
- [7] Yi W, Zhang Y, Liu B, *et al.* Protein S-nitrosylation regulates

- proteostasis and viability of hematopoietic stem cell during regeneration. *Cell Rep*, 2021, **34**(13): 108922
- [8] Fridovich I. Superoxide dismutase - regularities and irregularities. *Harvey Lectures*, 1985, **79**: 51-75
- [9] Mcadam M E, Fox R A, Lavelle F, *et al.* A pulse-radiolysis study of the manganese-containing superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus*. A kinetic model for the enzyme action. *Biochem J*, 1977, **165**(1): 71-79
- [10] Mcadam M E, Leville F, Fox R A, *et al.* A pulse-radiolysis study of the manganese-containing superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem J*, 1977, **165**(1): 81-87
- [11] Pick M, Rabani J, Yost F, *et al.* The catalytic mechanism of the manganese-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli* studied by pulse radiolysis. *J Am Chem Soc*, 1974, **96**(23): 7329-7333
- [12] Azadmanesh J, Borgstahl G E O. A review of the catalytic mechanism of human manganese superoxide dismutase. *Antioxidants (Basel)*, 2018, **7**(2): 25
- [13] Azadmanesh J, Lutz W E, Coates L, *et al.* Direct detection of coupled proton and electron transfers in human manganese superoxide dismutase. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 2079
- [14] Azadmanesh J, Trickle S R, Borgstahl G E O. Substrate-analog binding and electrostatic surfaces of human manganese superoxide dismutase. *J Struct Biol*, 2017, **199**(1): 68-75
- [15] Abreu I A, Cabelli D E. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2010, **1804**(2): 263-274
- [16] Miller A-F. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett*, 2012, **586**(5): 585-595
- [17] Sheng Y, Abreu I A, Cabelli D E, *et al.* Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem Rev*, 2014, **114**(7): 3854-3918
- [18] Perry J J P, Hearn A S, Cabelli D E, *et al.* Contribution of human manganese superoxide dismutase tyrosine 34 to structure and catalysis. *Biochemistry*, 2009, **48**(15): 3417-3424
- [19] Demicheli V, Moreno D M, Radi R. Human Mn-superoxide dismutase inactivation by peroxynitrite: a paradigm of metal-catalyzed tyrosine nitration *in vitro* and *in vivo*. *Metallomics*, 2018, **10**(5): 679-695
- [20] Valentino R B. The structure-function relationships and physiological roles of MnSOD mutants. *Biosci Rep*, 2022, **42**(6): BSR20220202
- [21] Jackson T A, Xie J, Yikilmaz E, *et al.* Spectroscopic and computational studies on iron and manganese superoxide dismutases: nature of the chemical events associated with active-site pKs. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**(36): 10833-10845
- [22] Amin M, Mohamed Z, El-Sayed M, *et al.* Combined QM/MM and Monte Carlo study for redox leveling in Mn and Fe superoxide dismutase. *J Biol Inorg Chem*, 2018, **23**(2): 285-293
- [23] Edwards R A, Baker H M, Whittaker M M, *et al.* Crystal structure of *Escherichia coli* manganese superoxide dismutase at 2.1-angstrom resolution. *J Biol Inorg Chem*, 1998, **3**(2): 161-171
- [24] Ludwig M L, Metzger A L, Patridge K A, *et al.* Manganese superoxide dismutase from thermus-thermophilus - a structural model refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol*, 1991, **219**(2): 335-358
- [25] Wagner U G, Patridge K A, Ludwig M L, *et al.* Comparison of the crystal-structures of genetically engineered human manganese superoxide-dismutase and from *Thermus thermophilus*: differences in dimer-dimer interaction. *Protein Sci*, 1993, **2**(5): 814-825
- [26] Borgstahl G E O, Pokross M, Chehab R, *et al.* Cryo-trapping the six-coordinate, distorted-octahedral active site of manganese superoxide dismutase. *J Mol Biol*, 2000, **296**(4): 951-959
- [27] Whittaker M M, Whittaker J W. Low-temperature thermochromism marks a change in coordination for the metal ion in manganese superoxide dismutase. *Biochemistry*, 1996, **35**(21): 6762-6770
- [28] Whittaker M M, Whittaker J W. A "thermophilic shift" in ligand interactions for *Thermus thermophilus* manganese superoxide dismutase. *J Biol Inorg Chem*, 1997, **2**(5): 667-671
- [29] Tabares L C, Cortez N, Agalidis I, *et al.* Temperature-dependent coordination in *E-coli* manganese superoxide dismutase. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(16): 6039-6047
- [30] Jackson T A, Karapetian A, Miller A F, *et al.* Spectroscopic and computational studies of the azide-adduct of manganese superoxide dismutase: definitive assignment of the ligand responsible for the low-temperature thermochromism. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(39): 12477-12491
- [31] Tabares L C, Cortez N, Hiraoka B Y, *et al.* Effects of substrate analogues and pH on manganese superoxide dismutases. *Biochemistry*, 2006, **45**(6): 1919-1929
- [32] Whittaker J W. Manganese superoxide dismutase. *Met Ions Life Sci*, 2000, **37**: 587-611
- [33] Renault J P, Morgenstern-Badarau I, Piccioli M. Thermochromic conformational change of methanobacterium thermoautotrophicum iron superoxide dismutase. *Inorg Chem*, 1999, **38**(4): 614-615
- [34] Tabares L C, Cortez N, Un S. Role of tyrosine-34 in the anion binding equilibria in manganese(II) superoxide dismutases. *Biochemistry*, 2007, **46**(32): 9320-9327
- [35] Kitada M, Xu J, Ogura Y, *et al.* Manganese superoxide dismutase dysfunction and the pathogenesis of kidney disease. *Front Physiol*, 2020, **11**: 755
- [36] Benovic J, Tillman T, Cudd A, *et al.* Electrostatic facilitation of the reaction catalyzed by the manganese-containing and the iron-containing superoxide dismutases. *Arch Biochem Biophys*, 1983, **221**(2): 329-332
- [37] Zhou B D, Xiao M, Hu H, *et al.* Cardioprotective role of SIRT5 in response to acute ischemia through a novel liver-cardiac crosstalk mechanism. *Front Cell Dev Biol*, 2021, **9**: 687559
- [38] Tao R D, Coleman M C, Pennington J D, *et al.* Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol Cell*, 2010, **40**(6): 893-904
- [39] Balasubramaniam A, Li G, Ramanathan A, *et al.* SIRT3 activation promotes enteric neurons survival and differentiation. *Sci Rep*, 2022, **12**(1): 22076
- [40] Ren T, Zhang H, Wang J, *et al.* MCU-dependent mitochondrial

- Ca²⁺ inhibits NAD(+) /SIRT3/SOD2 pathway to promote ROS production and metastasis of HCC cells. *Oncogene*, 2017, **36**(42): 5897-5909
- [41] Yuan Q, Zeng Z L, Yang S Q, *et al.* Mitochondrial stress in metabolic inflammation: modest benefits and full losses. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, **2022**: 8803404
- [42] Lauro F, Ilari S, Giancotti L A, *et al.* Pharmacological effect of a new idebenone formulation in a model of carrageenan-induced inflammatory pain. *Pharmacol Res*, 2016, **111**: 767-773
- [43] Ilari S, Proietti S, Russo P, *et al.* A systematic review and meta-analysis on the role of nutraceuticals in the management of neuropathic pain in *in vivo* studies. *Antioxidants (Basel)*, 2022, **11**(12): 2361
- [44] Lauro F, Giancotti L A, Ilari S, *et al.* Inhibition of spinal oxidative stress by bergamot polyphenolic fraction attenuates the development of morphine induced tolerance and hyperalgesia in mice. *PLoS One*, 2016, **11**(5): e0156039
- [45] Ilari S, Giancotti L A, Lauro F, *et al.* Antioxidant modulation of sirtuin 3 during acute inflammatory pain: the ROS control. *Pharmacol Res*, 2020, **157**: 104851
- [46] Ilari S, Giancotti L A, Lauro F, *et al.* Natural antioxidant control of neuropathic pain-exploring the role of mitochondrial SIRT3 pathway. *Antioxidants (Basel)*, 2020, **9**(11): 1103
- [47] Singh A K, Vinayak M. Resveratrol alleviates inflammatory hyperalgesia by modulation of reactive oxygen species (ROS), antioxidant enzymes and ERK activation. *Inflamm Res*, 2017, **66**(10): 911-921
- [48] Bartsaghi S, Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol*, 2018, **14**: 618-625
- [49] Macmillan-Crow L A, Crow J P, Thompson J A. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry*, 1998, **37**(6): 1613-1622
- [50] Surmeli N B, Litterman N K, Miller A F, *et al.* Peroxynitrite mediates active site tyrosine nitration in manganese superoxide dismutase. Evidence of a role for the carbonate radical anion. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**(48): 17174-17185
- [51] Quijano C, Hernandez-Saavedra D, Castro L, *et al.* Reaction of peroxynitrite with Mn-superoxide dismutase - role of the metal center in decomposition kinetics and nitration. *J Biol Chem*, 2001, **276**(15): 11631-11638
- [52] Demicheli V, Moreno D M, Jara G E, *et al.* Mechanism of the reaction of human manganese superoxide dismutase with peroxynitrite: nitration of critical tyrosine 34. *Biochemistry*, 2016, **55**(24): 3403-3417
- [53] Quint P, Reutzler R, Mikulski R, *et al.* Crystal structure of nitrated human manganese superoxide dismutase: mechanism of inactivation. *Free Radic Biol Med*, 2006, **40**(3): 453-458
- [54] Wang Z Q, Porreca F, Cuzzocrea S, *et al.* A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, **309**(3): 869-878
- [55] Sies H, Belousov V V, Chandel N S, *et al.* Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, **23**(7): 499-515
- [56] Sies H, Reichert A S. Selectively addressing mitochondrial glutathione and thioredoxin redox systems. *Cell Chem Biol*, 2019, **26**(3): 316-318
- [57] Kadenbach B. Complex IV-the regulatory center of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Mitochondrion*, 2021, **58**: 296-302
- [58] Brand M D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*, 2010, **45**(7-8): 466-472
- [59] Brand M D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic Biol Med*, 2016, **100**: 14-31
- [60] Han D, Canali R, Rettori D, *et al.* Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. *Mol Pharmacol*, 2003, **64**(5): 1136-1144
- [61] Buettner G R, Ng C F, Wang M, *et al.* A new paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state. *Free Radic Biol Med*, 2006, **41**(8): 1338-1350
- [62] Hearn A S, Tu C K, Nick H S, *et al.* Characterization of the product inhibited complex in catalysis by human manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 1999, **274**(35): 24457-24460
- [63] Hsu J L, Hsieh Y S, Tu C K, *et al.* Catalytic properties of human manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 1996, **271**(30): 17687-17691
- [64] Ramzan R, Kadenbach B, Vogt S. Multiple mechanisms regulate eukaryotic cytochrome C oxidase. *Cells*, 2021, **10**(3): 514
- [65] Zhang X, Liu H, Zhang D. MnSOD serves as the central molecule in adaptive thermogenesis (MnSOD functions as a thermoreceptor). *Adv Redox Res*, 2021, **3**: 100027
- [66] Acharya T K, Kumar A, Majhi R K, *et al.* TRPV4 acts as a mitochondrial Ca²⁺-importer and regulates mitochondrial temperature and metabolism. *Mitochondrion*, 2022, **67**: 38-58
- [67] Kozai D, Ogawa N, Mori Y. Redox regulation of transient receptor potential channels. *Antioxid Redox Signal*, 2014, **21**(6): 971-986
- [68] Ogawa N, Kurokawa T, Mori Y. Sensing of redox status by TRP channels. *Cell Calcium*, 2016, **60**(2): 115-122
- [69] Takahashi N, Kozai D, Kobayashi R, *et al.* Roles of TRPM2 in oxidative stress. *Cell Calcium*, 2011, **50**(3): 279-287
- [70] Takahashi N, Mori Y. TRP channels as sensors and signal integrators of redox status changes. *Front Pharmacol*, 2011, **2**: 58
- [71] Yamamoto S, Shimizu S. Significance of TRP channels in oxidative stress. *Eur J Pharmacol*, 2016, **793**: 109-111
- [72] Yang J, Zhang H, Gong W B, *et al.* S-glutathionylation of human inducible Hsp70 reveals a regulatory mechanism involving the C-terminal α -helical lid. *J Biol Chem*, 2020, **295**(24): 8302-8324
- [73] Wang L, Wang C C. Oxidative protein folding fidelity and redox-taxis in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*, 2023, **48**(1): 40-52
- [74] Yang J, Gong W, Wu S, *et al.* PES inhibits human-inducible Hsp70 by covalent targeting of cysteine residues in the substrate-binding domain. *J Biol Chem*, 2021, **296**: 100210

The Catalytic Mechanism and Activity Modulation of Manganese Superoxide Dismutase*

ZHANG Xu^{1**}, ZHANG Lei², XU Peng-Lin³, LI Tian-Ran⁴, CHAO Rui-Qing⁵, HAN Zheng-Hao⁶

⁽¹⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Academy of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

⁽²⁾School of Physical Education, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

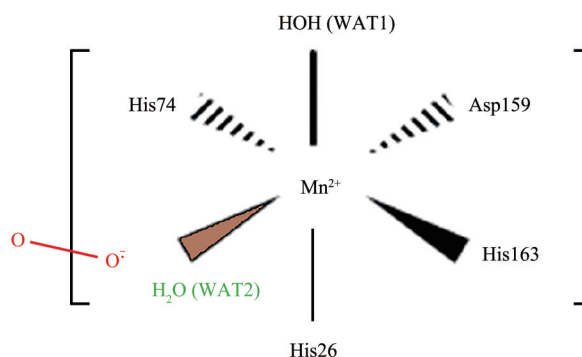
⁽³⁾Department of Gynecology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

⁽⁴⁾Department of Clinical Medicine, Medical School, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

⁽⁵⁾School of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

⁽⁶⁾Henan Vocational College of Applied Technology, Zhengzhou 450042, China)

Graphical abstract



Abstract Manganese superoxide dismutase catalyzes the dismutation of two molecules of superoxide radicals to one molecule of oxygen and one molecule of hydrogen peroxide. The oxidation of superoxide anion to oxygen by Mn^{3+}SOD proceeds at a rate close to diffusion. The reduction of superoxide anion to hydrogen peroxide by Mn^{2+}SOD can be progressed parallelly in either a fast or a slow cycle pathway. In the slow cycle pathway, Mn^{2+}SOD forms a product inhibitory complex with superoxide anion, which is protonated and then slowly releases hydrogen peroxide out. In the fast cycle pathway, superoxide anion is directly converted into product hydrogen peroxide by Mn^{2+}SOD , which facilitates the revival and turnover of the enzyme. We proposed for the first time that temperature is a key factor that regulates MnSOD into the slow- or fast-cycle catalytic pathway. Normally, the Mn^{2+} rest in the pent-coordinated state with four amino acid residues (His26, His74, His163 and Asp159) and one water (WAT1) in the active center of MnSOD. The sixth coordinate position on Mn (orange arrow) is open for water (WAT2, green) or O_2^- to coordinate. With the cold contraction in the active site as temperature decreases, WAT2 is closer to Mn, which may spatially interfere with the entrance of O_2^- into the inner

* This work was supported by a grant from Science and Technology Bureau of Zhengzhou City, Henan Province (52110549).

** Corresponding author.

Tel: 86-18511068760, E-mail: johnsir@zzu.edu.cn

Received: December 20, 2022 Accepted: March 29, 2023

sphere, and avoid $O_2^{\cdot-}/Mn^{2+}$ coordination to reduce product inhibition. Low temperature compels the reaction into the faster outer sphere pathway, resulting in a higher gating ratio for the fast-cycle pathway. As the temperature increases in the physiological temperature range, the slow cycle becomes the mainstream of the whole catalytic reaction, so the increasing temperature in the physiological range inhibits the activity of the enzyme. The biphasic enzymatic kinetic properties of manganese superoxide dismutase can be rationalized by a temperature-dependent coordination model of the conserved active center of the enzyme. When the temperature decreases, a water molecule (or OH^-) is close to or even coordinates Mn, which can interfere with the formation of product inhibition. So, the enzymatic reaction occurs mainly in the fast cycle pathway at a lower temperature. Finally, we describe the several chemical modifications of the enzyme, indicating that manganese superoxide dismutase can be rapidly regulated in many patterns (allosteric regulation and chemical modification). These regulatory modulations can rapidly and directly change the activation of the enzyme, and then regulate the balance and fluxes of superoxide anion and hydrogen peroxide in cells. We try to provide a new theory to reveal the physiological role of manganese superoxide dismutase and reactive oxygen species.

Key words manganese superoxide dismutase (MnSOD), allosteric regulation, covalent modification, reactive oxygen species (ROS), redox, temperature, enzyme catalytic mechanisms

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0572