

PYRIDOXALFOSFÁT – KATALYZÁTOR PŘEMĚN AMINOKYSELIN

MICHAELA MARKOVÁ a BLANKA KRÁLOVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6

michaela.markova@vscht.cz

Došlo 25.4.02, přepracováno 16.4.03, přijato 27.4.03.

Klíčová slova: pyridoxalfosfát, pyridoxaminfosfát, enzymové reakce

Obsah

1. Úvod
2. Pyridoxalfosfát jako katalyzátor neenzymových reakcí
3. Pyridoxalfosfát v enzymových reakcích
4. Prostorové struktury PLP-dependenčních enzymů
 - 4.1. Aspartátaminotransferasová rodina
 - 4.2. Tryptofansynthasová rodina
 - 4.3. Rodina aminotransferasy D-aminokyseliny
 - 4.4. Alaninracemasová rodina
5. Závěr

1. Úvod

Pyridoxal-5'-fosfát (PLP) a pyridoxamin-5'-fosfát (PMP) jsou formy vitamínu B₆, které se mohou jako kofaktor účastnit metabolických pochodů spojených s přeměnami aminokyselin. Struktura PLP umožňuje jeho využití jako katalyzátoru velmi rozmanitých reakcí, zahrnujících například transaminaci, racemizaci, α -dekarboxylaci, aldolové štěpení a β - a γ -eliminaci¹. Taková univerzálnost není u organických sloučenin využívaných jako kofaktory enzymů příliš běžná. Ve všech výše zmíněných případech je pro katalýzu využívána aldehydová skupina PLP. Pyridinový kruh usnadňuje průběh reakcí díky aromatickému charakteru a schopnosti odtahovat elektrony z C α uhlíku substrátu a stabilizovat Schiffovu bázi vzniklou po navázání substrátu. Tím dojde k nezbytné labilizaci vazeb vycházejících z C α uhlíku.

2. Pyridoxalfosfát jako katalyzátor neenzymových reakcí

Bylo prokázáno, že samotný PLP je schopen katalyzovat některé reakce ve vodných roztocích, například konverzi některých aminokyselin na příslušné oxokyseliny, racemizaci některých aminokyselin², dekarboxylaci aminokyselin nebo eliminační^{3,4} reakce (serin $\rightarrow$ pyruvát + amo-

niak, serin $\rightarrow$ glycin + formaldehyd). Jako katalyzátory těchto reakcí mohou kromě PLP působit i další sloučeniny obsahující dusíkatý heterocyklus, volnou fenolovou a formylou skupinu¹, jako například 3-hydroxypyridin-4-aldehyd nebo 3-hydroxypyridin-2-aldehyd. Obdobné sloučeniny bez heterocyklu, jako například salicylaldehyd nebo *m*-nitrosalicylaldehyd, nejsou schopné uvést reakce katalyzovat.

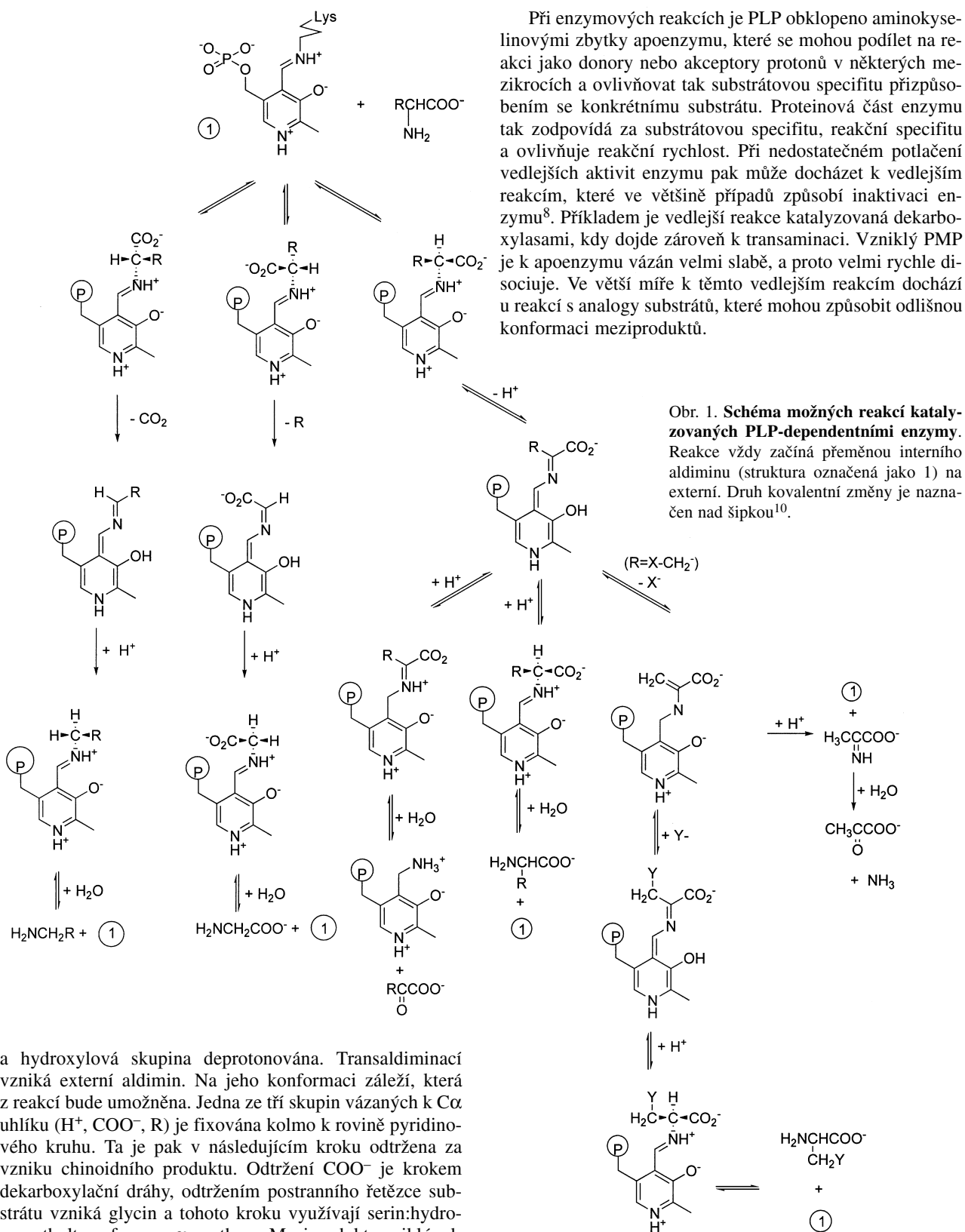
Průběh reakcí katalyzovaných volným PLP je významně ovlivněn teplotou a pH a přítomností některých iontů⁵, jako například Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Al³⁺, které zde mohou mít několik funkcí. Mohou napomáhat vzniku komplexu PLP a aminokyseliny ve vodných roztocích, depolarizovat nabitou karboxylovou skupinu nebo se mohou podílet na odtahování elektronu z C α uhlíku aminokyseliny tvorbou chelátů, které podporují vznik planární konformace aldiminového komplexu. Všechny tyto funkce jsou při enzymové katalýze zajišťovány aminokyselinovými zbytky proteinu.

Již v padesátých letech byl pro reakce katalyzované volným PLP navržen základní mechanismus vzniku komplexu PLP-aminokyselina⁶, jeho stabilizace kovovými ionty a byly objasněny jednotlivé kroky vedoucí k racemizaci, transaminaci, dekarboxylaci a vzniku glycinu, acetaldehydu a threoninu. Později se ukázalo, že enzymově katalyzované reakce probíhají shodnými mechanismy (obr.1 na následující straně). Je zajímavé a celkem očekávatelné, že reakce katalyzované „neenzymovým“ PLP mají nízkou reakční specifitu, a může tedy současně probíhat několik typů reakcí.

3. Pyridoxalfosfát v enzymových reakcích

V šedesátých letech bylo objeveno a izolováno množství enzymů obsahujících PLP jako kofaktor. Porovnáním meziproductů reakcí byl prokázán shodný mechanismus u enzymových i neenzymových reakcí¹. Při enzymové katalýze se vliv vnějších podmínek (teplota, pH, přítomnost kovových iontů, koncentrace substrátů aj.) snižuje, zároveň dochází k významnému zvýšení reakční rychlosti a reakční specifity.

Hlavní odlišnost v mechanismu enzymových reakcí je ve tvorbě aldiminového meziproductu. PLP je v enzymech vázáno v aktivním místě k ϵ -aminoskupině lysinového zbytku apoenzymu jako Schiffova báze (interní aldimin), 5'-fosfátová skupina je fixována až devíti vodíkovými vazbami. PMP je v aktivním místě ukotven zejména pomocí 5'-fosfátové skupiny. Tvorba externího aldiminu se substrátem pak probíhá transaldiminací za vzniku aldaminu jako meziproductu, namísto karbinolaminu při neenzymových reakcích⁷. Schéma klíčových meziproductů v reakcích katalyzovaných PLP-dependenčními enzymy je na obr. 1. Všechny reakce vychází z protonovaného interního aldiminu mezi PLP a lysinem z aktivního místa enzymu. Ve většině případů je dusíkový atom pyridinu protonován



a hydroxylová skupina deprotonována. Transaldiminací vzniká externí aldimin. Na jeho konformaci záleží, která z reakcí bude umožněna. Jedna ze tří skupin vázaných k C α uhlíku (H⁺, COO⁻, R) je fixována kolmo k rovině pyridinového kruhu. Ta je pak v následujícím kroku odtržena za vzniku chinoidního produktu. Odtržení COO⁻ je krokem dekarboxylační dráhy, odtržením postranního řetězce substrátu vzniká glycin a tohoto kroku využívají serin:hydroxymethyltransferasa a α -synthasy. Meziprodukt vzniklý odtržením protonu je typický pro racemasy, aminotransferasy, β - a γ -synthasy a pro enzymy katalyzující β -eliminaci.

4. Prostorové struktury PLP-dependentních enzymů

Vztah prostorové struktury a funkce je v současné době jednou z priorit výzkumu pyridoxalfosfátových enzymů. Přestože první struktura PLP-dependentního enzymu⁹ byla publikována již v roce 1980, větší množství prostorových struktur bylo vyřešeno až v posledních osmi letech¹⁰ díky moderním krystalografickým metodám, které umožnily určit strukturu i pro molekuly větší než 90 kDa, mezi které PLP-enzymy ve většině případů patří. Pro známé enzymy je pomocí substrátových analogů a cílené mutagenese sledován vliv jednotlivých aminokyselinových zbytků na mechanismus reakce. U publikovaných struktur byly nalezeny mnohé podobné strukturní znaky. V současné době je obecně přijímáno rozdělení PLP-enzymů do čtyř základních rodin nazvaných podle jejich charakteristických zastupců jako aspartátaminotransferasová, tryptofansynthasová, alaninracemasová a rodina aminotransferasy d-aminokyselin^{10,11}.

4.1. Aspartátaminotransferasová rodina

Aspartátaminotransferasa (AAT) je nejvíce prostudovanou aminotransferasou^{1,12}, její vlastnosti i struktura byly podrobně popsány. Přestože nejvíce pozornosti bylo věnováno prasečí mitochondriální AAT, struktura byla určena i pro enzymy z jiných organismů^{13–16}, obratlovců i bakterií. Shoda ve strukturách je natolik velká, že je možné poznatky o vlivu jednotlivých aminokyselinových zbytků na mechanismus prasečího enzymu aplikovat i na AAT z prokaryotních zdrojů.

Aspartátaminotransferasa je kompaktně uspořádaný homodimer s dvoučetnou osou symetrie, podjednotky o molekulové hmotnosti přibližně 45 kDa obsahují tři domény (centrální vážící PLP, C-koncovou a N-koncovou). Centrální doména je tvořena otevřenou α/β strukturou s jedinečným uspořádáním sedmiřetězcového β -sheetu *agfedbc*, ve kterém jsou kromě *g* všechny řetězce paralelní. Lysin vážící PLP se nachází ve smyčce mezi řetězci *f* a *g*. Aktivní místa se nacházejí na rozhraní podjednotek a domén a podílejí se na nich aminokyselinové zbytky z obou podjednotek. Vazba substrátu vyvolává v enzymu významné strukturní změny, které v obdobném rozsahu nebyly pozorovány u žádného dalšího PLP-enzymu.

Do této rodiny enzymů patří i ornithinaminotransferasa, γ -aminobutyrylaminotransferasa, glutamát-1-semialdehydaminomutasa, ω -aminokyseliny:pyruvát-aminotransferasa, ornithindekarboxylasa, dialkylglycindekarboxylasa, tyrosin:fenolylasa, tryptofan:indolylasa a cystathionin β -lyasa¹⁰. První dva jmenované enzymy jsou homodimery se strukturou velmi blízkou AAT a dialkylglycindekarboxylase. Glutamát-1-semialdehydaminomutasa¹⁷ (GSAT) se skládá ze dvou podjednotek o shodném aminokyselinovém složení, ale rozdílné prostorové struktury podjednotek, jedna z nich obsahuje PMP namísto obvyklého PLP vázaného přes lysin a vstup do aktivního místa je blokován tři-

cet aminokyselin dlouhou smyčkou. Tyrosin:fenolylasa¹⁸ a tryptofan:indolylasa¹⁹ jsou vzájemně velmi podobné tetramerní enzymy (50% identita sekvencí). V obou dvou hrají významnou roli při katalýze draselné ionty, pokud se nahradí sodnými ionty, enzym ztrácí aktivitu. Cystathionin β -lyasa²⁰ je také homotetramer a je ze všech enzymů této rodiny nejméně podobná AAT. Přestože PLP-vazebná i C-koncová doména jsou podobné AAT, N-koncová se liší jak ve své struktuře, tak i v poloze vůči ostatním doménám. Vstup substrátu do aktivního místa vyvolává podobné konformační změny jako u AAT, avšak v menším rozsahu, studované inhibitory nejsou schopné tuto změnu vyvolat.

4.2. Tryptofansynthasová rodina

Tryptofansynthasa²¹ je enzym o podjednotkovém složení $(\alpha\beta)_2$, kde dimery $\alpha\beta$ jsou schopné katalyzovat reakci, avšak vazbou na druhý dimer se zvyšuje molární aktivita komplexu. Enzym katalyzuje syntézu L-tryptofanu z indolylglycerolfosfátu a L-serinu, kde α -podjednotka katalyzuje vznik indolu a glyceraldehyd-3-fosfátu z indolylglycerolfosfátu a β -podjednotka vznik tryptofanu z indolu a serinu. Pouze β -podjednotka obsahuje PLP. Aktivní místa jsou spojena 2,5 nm dlouhým hydrofobním tunelem, který se vytvoří pouze za přítomnosti substrátů a draselného iontu, sodný iont tvorbu kanálu blokuje.

Kromě tryptofansynthasy patří do této rodiny ještě threonindeaminasa a O-acetylserinsulfhydrolasa. Podobnost mezi enzymy v této rodině je významně menší než u aspartátaminotransferasové rodiny. Threonindeaminasa²² je homotetramer, jehož podjednotky se skládají z katalytické N-koncové a regulační C-koncové domény. Katalytická doména obsahuje PLP a je podobná β -podjednotce tryptofansynthasy, regulační doména je strukturou podobná fosfoglycerát dehydrogenase.

O-Acetylserinsulfhydrolasa²³ je dimer s vysokou strukturní, avšak nízkou sekvenční homologií s β -podjednotkou tryptofansynthasy, oproti které je významně zkrácena v N-koncové oblasti.

4.3. Rodina aminotransferasy d-aminokyselin

DAAT (cit.²⁴) je homodimer, který se od AAT liší velikostí a orientací PLP v enzymu. Oproti AAT je kratší o zhruba 100 aminokyselin, na tvorbě aktivního místa se podílejí opět aminokyselinové zbytky z obou podjednotek a PLP je vázán k proteinu shodnými vodíkovými vazbami. Na rozdíl od AAT je rozpouštědlo vystavena A-strana kofaktoru (v ostatních rodinách to je většinou B-strana⁹), díky tomu se při vzniku externího aldiminu dostane C α vodík do blízkosti aminoskupiny lysinového zbytku zodpovědného za deprotonaci C α aldiminu a protonaci C4' chinoidního meziprojektu. Karboxylová skupina aminokyselinového substrátu je fixována tvorbou iontového páru s argininovým zbytkem. Tím je zaručena specifita pro D-aminokyseliny. Velikost aktivního místa umožňuje vstup i relativně větších

Tabulka I

Přehled reakcí katalyzovaných PLP-enzymy se známou strukturou

Název enzymu	Substráty	Produkty
<i>Aspartátaminotransferasová rodina</i>		
Aspartátaminotransferasa	L-aspartát	oxalacetát
	α -ketoglutarát	L-glutamát
Ornithinaminotransferasa	L-ornithin	L-glutamát-5-semialdehyd
	α -ketoglutarát	glutamát
γ -Aminobutyráminotransferasa	γ -aminobutyrát	sukcinát semialdehyd
	α -ketoglutarát	L-glutamát
Glutamát-1-semialdehydaminomutasa	glutamát-1-semialdehyd	5-aminolevulinát
ω -Aminokyseliny:pyruvát-aminotransferasa	β -alanin	2-oxopropanoát
	pyruvát	alanin
Ornithindekarboxylasa	L-ornithin	putrescin
		CO ₂
Dialkylglycindekarboxylasa	2,2-dialkylglycin	dialkylketon
	pyruvát	CO ₂
		L-alanin
Tyrosin:fenolylasa	L-tyrosin	fenol
	H ₂ O	pyruvát
		NH ₃
Tryptofan:indolylasa	tryptofan	indol
	H ₂ O	pyruvát
		NH ₃
Cystathionin β -lyasa	cystathionin	L-homocystein
	H ₂ O	pyruvát
		NH ₃
<i>Tryptofansynthasová rodina</i>		
Tryptofansynthasa	L-serin	L-tryptofan
	1-(indol-3-yl)glycerol 3-fosfát	glyceraldehyd-3-fosfát
		H ₂ O
Threonideaminasa	L-threonin	2-oxobutanoát
	H ₂ O	NH ₃
		H ₂ O
O-Acetylserinsulfhydrolasa	O-acetyl-L-serin	L-cystein
	H ₂ S	acetát
<i>Rodina aminotransferasy D-aminokyselin</i>		
Aminotransferasa D-aminokyselin	D-alanin	pyruvát
	α -ketoglutarát	D-glutamát
Aminotransferasa větvených aminokyselin	L-leucin	4-methyl-2-oxopentanoát
	α -ketoglutarát	L-glutamát
<i>Alaninracemasová rodina</i>		
Alaninracemasa	L-alanin	D-alanin

substrátů a vysvětluje poměrně malou substrátovou specifitu enzymu.

Kromě DAAT je do této rodiny řazena i aminotransferasa větvených aminokyselin²⁵. Je to homohehexamer složený ze tří katalytických dimerů uspořádaných do tvaru trojbokého hranolu. Přestože i tento enzym má u kofaktoru odhalenou A-stranu, je specifický pro L-aminokyseliny. To je zajištěno poměrně malou změnou v aktivním místě, kdy karboxylová skupina aminokyselinového substrátu interaguje s NH-skupinami peptidového řetězce na opačné straně aktivního místa.

4.4. Alaninracemasová rodina

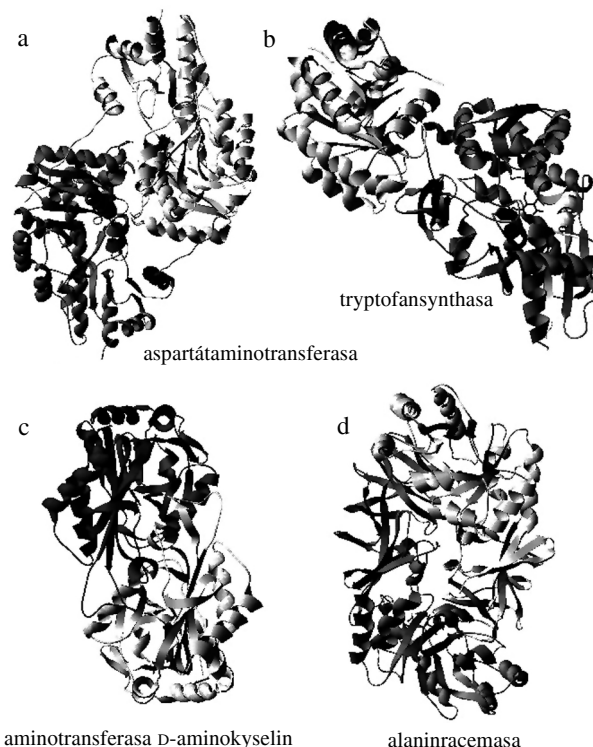
Alaninracemasa²⁶ se vyskytuje jako homodimer, na každou podjednotku se váže jedno PLP. Monomer se skládá ze dvou domén, N-koncové tvořené β -soudkem a C-koncové tvořené převážně β -strukturami. Podjednotky jsou ve velmi těsném uspořádání a smyčka z druhé podjednotky se podílí na tvorbě aktivního místa první podjednotky. PLP je vázán na rozhraní domén a podobně jako u DAAT má obnaženou A-stranu. Ze získané struktury samotného enzymu však zatím nebylo možné určit, které aminokyselinové zbytky se podílejí na reakci, ani jeden z dosud vytvořených modelů plně nevyhovuje sterickým a kinetickým požadavkům.

Vedle alaninracemasy lze do této skupiny zařadit i ornithindekarboxylasu, diaminopimelátdekarboxylasu a arginindekarboxylasu; přestože u těchto enzymů nebyla doposud experimentálně určena prostorová struktura, jejich modely vykazují shodné znaky s alaninracemasou¹⁰.

5. Závěr

PLP je schopný katalyzovat mnohé reakce i samotný ve vodném prostředí, avšak bez zásadního praktického využití. V živých systémech je to však nezastupitelná složka, která se podílí na katalýze mnoha zásadních reakcí v buňce. Přestože je schopný katalyzovat přeměnu jednoho substrátu na několik různých produktů, peptidová část enzymů zaručí, že bude probíhat téměř výhradně reakce jediná. Zároveň je tato část zodpovědná i za substrátovou specifitu, která je ve většině případů poměrně úzká.

V současné době již bylo určeno značné množství prostorových struktur PLP-enzymů a u většiny z nich byl navržen a později i potvrzen vliv jednotlivých aminokyselinových zbytků na mechanismus reakce. Přestože PLP-enzymy jsou schopné katalyzovat širokou škálu reakcí, rozdíly v jejich struktuře jsou relativně malé. Všechny mají jako základní katalytickou jednotku dimer (i když se některé vyskytují jako tetra- nebo hexamery) o molekulové hmotnosti kolem 90 kDa (obr. 2) a všechny mají velmi kompaktní strukturu, aktivní místa se pak ve většině případů vyskytují na rozhraní podjednotek. Do jedné rodiny pak mohou patřit enzymy schopné využívat jak D-, tak L-aminokyseliny a přitom jsou jejich aktivní místa velmi podobná. U mnoha enzymů s poměrně malou sekvenční homologií je až překva-



Obr. 2. Stuhlé diagramy zástupců jednotlivých strukturálních typů; podjednotky jsou rozlišeny odstíny šedi, (a) aspartataminotransferasa (PDB číslo 7AAT), (b) tryptofansynthasa (PDB číslo 1TTQ), (c) aminotransferasa D-aminokyselin (PDB číslo 1DAA), (d) alaninracemasa (PDB číslo 1SFT)

pující shoda ve struktuře nejen enzymu jako celku, ale i v umístění a struktuře aktivního místa.

Studium vztahu struktury a funkce PLP-enzymů vyvolává v současnosti i řadu dalších otázek. Proč například existují významné rozdíly v interakcích apoenzymu s PLP, když cíl – fixace PLP v aktivním místě – je shodný. Další neznámou je příčina odlišných nároků na uzavření aktivního místa při reakci a fixaci substrátu; byly popsány enzymy vyžadující úplné uzavření aktivního místa a zabránění vstupu vody, ale i enzymy, kdy se vstup do aktivního místa po vstupu substrátu nezmění a molekuly vody mohou i nadále do aktivního místa vstupovat. Stejně tak jsou známy enzymy, které pro zdárný průběh reakce vyžadují zcela rigidně fixovaný substrát a naopak enzymy, u kterých je substrát v aktivním místě držen pouze velmi volně. Zcela neznámý je důvod, proč se od sebe strukturou liší sekvenčně shodné podjednotky dimeru GSAT a proč je v tomto případě vázáno na jednu podjednotku PLP a na druhou PMP.

Odpovědi na tyto otázky mohou být odhaleny pomocí současných molekulárně biologických metod umožňujících cílené mutace v enzymových strukturách a sledování jejich vlivu na prostorovou strukturu a funkci enzymů. Také vyřešení dalších struktur příbuzných enzymů a identifikace nových, dosud neznámých PLP-enzymů, může přinést mnohé překvapující odpovědi, které by mohly být zajímavé i z obecně enzymologického hlediska.

LITERATURA

1. Christen P., Metzler D. E.: *Transaminases*. Wiley, New York 1985.
2. Olivard J., Metzler D. E., Snell E. E.: *J. Biol. Chem.* 169, 643 (1952).
3. Metzler D. E., Snell E. E.: *J. Biol. Chem.* 198, 353 (1952).
4. Metzler D. E., Longenecker J. B., Snell E. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 630 (1954).
5. Metzler D. E., Snell E. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 979 (1952).
6. Metzler D. E., Ikawa M., Snell E. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 648 (1954).
7. Snell E. E.: *Brookhaven Symp. Biol.* 15, 32 (1962).
8. John R. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1248, 81 (1995).
9. Ford G. C., Eichele G., Jansonius J. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 2559 (1980).
10. Jansonius J. N.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 759 (1998).
11. Grishin N. V., Phillips M. A., Goldsmith E. J.: *Protein Sci.* 4, 1291 (1995).
12. Mehta P. K., Hale T. I., Christen P.: *Eur. J. Biochem.* 186, 249 (1989).
13. Jeffery C. J., Barry T., Doonan S., Petsko G. A., Ringe D.: *Protein Sci.* 7, 1380 (1998).
14. Okamoto A., Higuchi T., Hirotsu K., Kuramitsu S., Kagamiyama H.: *J. Biochem.* 116, 95 (1994).
15. Malshkevich V. N., Strokopytov B. V., Borisov V. V., Dauter Z., Wilson K. S., Torchinsky Y. M.: *J. Mol. Biol.* 247, 111 (1995).
16. McPhalen C. A., Vincent M. G., Jansonius J. N.: *J. Mol. Biol.* 225, 495 (1992).
17. Hennig M., Grimm B., Contestabile R., John R. A., Jansonius J. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4866 (1997).
18. Sundararaju B., Antson A. A., Phillips R. S., Demidkina T. V., Barbolina M. V., Gollnick P., Dodson G. G., Wilson K. S.: *Biochemistry* 36, 6502 (1997).
19. Isupov M. N., Antson A. A., Dodson E. J., Dodson G. G., Dementieva I. S., Zakomirdina L. N., Wilson K. S., Dauter Z., Lebedev A. A., Harutyunyan E. H.: *J. Mol. Biol.* 276, 603 (1998).
20. Clausen T., Huber R., Laber B., Pohlenz H.-D., Messerschmidt A.: *J. Mol. Biol.* 262, 202 (1996).
21. Hyde C. C., Ahmed S. A., Padlan E. A., Wilson Miles E., Davies D. R.: *J. Biol. Chem.* 263, 17857 (1988).
22. Gallagher D. T., Gilliland G. L., Xiao G., Zondlo J., Fisher K. E., Chinchilla D., Eisenstein E.: *Structure* 6, 465 (1998).
23. Burkhard P., Rao G. S. J., Hohenester E., Schnackerz K. D., Cook P. F., Jansonius J. N.: *J. Mol. Biol.* 283, 121 (1998).
24. Sugio S., Petsko G. A., Manning J. M., Soda K., Ringe D.: *Biochemistry* 34, 9661 (1995).
25. Okada K., Hirotsu K., Sato M., Hayashi H., Kagamiyama H.: *J. Biochem.* 121, 637 (1997).
26. Shaw J. P., Petsko G. A., Ringe D.: *Biochemistry* 36, 1329 (1997).

Seznam zkratek

PLP	pyridoxal-5'-fosfát
PMP	pyridoxamin-5'-fosfát
AAT	aspartátaminotransferasa
DAAT	aminotransferasa D-aminokyselin
GSAT	glutamát-1-semialdehydaminomutasa

M. Marková and B. Králová (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Pyridoxal Phosphate in Enzymatic and Non-Enzymatic Catalysis**

This review covers recent results on the ability of pyridoxal phosphate, either alone or as an enzyme cofactor of enzymes, to catalyze reactions with amino acids. Although pyridoxal phosphate catalyzes many different reactions in water solutions, its reaction specificity is quite poor. In biological systems, both reaction and substrate specificity is determined by apoenzymes. So far, more than twenty structures of pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes have been solved. Most of them are evolutionarily related to aspartate aminotransferase. On the basis of structure motifs, they have been divided into four families with aspartate aminotransferase, tryptophan synthase, D-amino acid transferase and alanine racemase as representatives. A remarkable convergent evolution is observed in two fold types with a similar cofactor binding and reaction mechanism.