

Srpsko hemijsko društvo



**XLIII SAVETOVANJE
SRPSKOG HEMIJSKOG
DRUŠTVA**

KRATKI IZVODI RADOVA

Beograd, 24. i 25. januar 2005.

Da li bi mangan superoksid dismutaza (MnSOD) mogla da ima ulogu NO dismutaze?

Vesna Niketić, Srđan Stojanović, Dragana Stanić*, Milan Nikolić, Smiljana Raičević**, Mihajlo Spasić***

Hemijski fakultet, Beogra

*Centar za hemiju, IHTM, Beograd

**Centar za ispitivanje namirnica, Beograd

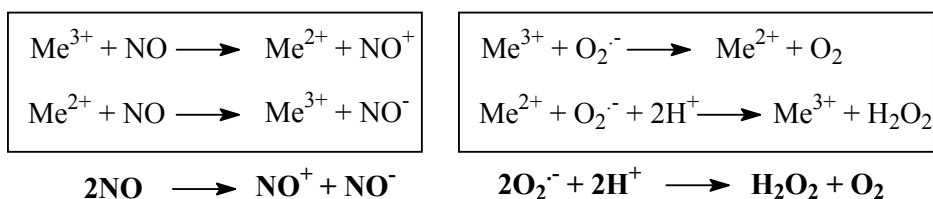
***Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Beograd

Uvod

Azot-monoksid (NO) je široko rasprostranjeni signalni molekul, koji reguliše brojne biološke procese, ali njegova prekomerna produkcija doprinosi nastanku i razvoju niza bolesti.¹ Patofiziološki efekti potiču od "reaktivnih vrsta NO" (RNOS), kao što su oksidi azota i peroksinitrit (ONOO⁻), koji nastaju u reakcijama NO sa kiseonikom, odnosno superoksidom.^{2,3} Smatra se da je peroksinitrit, koji je jak oksidujuć i nitrujuć agens, važan uzrok citotoksičnosti azot monoksida.⁴ Nedavno je razmatrana hipoteza da li bi u biološkim sistemima mogli da postoje protektivni enzimi, čija bi uloga bila da regulišu visoke, lokalno nastale koncentracije NO. Predloženo je da bi ovi enzimi mogli da deluju kao NO reduktaze ili kao NO dismutaze.⁵

Mangan-superoksid-dismutaza (MnSOD) je forma SOD koja se nalazi u mitohondrijama eukariotskih organizama, kao i u mnogim prokariotama. MnSOD katalizuje raspadanje superoksida (O₂⁻), i tako igra aktivnu ulogu u detoksifikaciji ćelije od ove reaktivne kiseonične vrste. Sve je više dokaza koji ukazuju na prisustvo NO u mitohondrijama, tako da je predloženo da dismutacijom O₂⁻ MnSOD sprečava njegovu reakciju sa NO pri kojoj nastaje peroksinitrit.^{6,7}

U našem ranijem radu smo pokazali da MnSOD (*E. coli*) katalizuje konverziju NO u NO⁺ i NO⁻ vrste. Pretpostavili smo katalitički mehanizam ove reakcije analogan sa katalitičkim mehanizmom dismutacije O₂⁻:



Kako se NO⁺, NO i NO⁻ mogu posmatrati i kao analozi redoks formi kiseonika: O₂, O₂⁻ i O₂²⁻⁸ predložili smo^{9,10} naziv dismutacija NO, da bi se ova metal-posredovana redoks transformacija NO razlikovala od drugih reakcija disproporcionisanja NO, koje su zapažene u koordinacionoj hemiji.¹¹ U ovom radu, u kojem smo nastavili i proširili svoja prethodna istraživanja, pokazali smo da bi mangan superoksid dismutaza (MnSOD) mogla da bude kandidat za NO dismutazu.

Rezultati i diskusija

U ovom radu je korišćena MnSOD (*E. coli*) koja je izolovana po ranije opisanom postupku.¹² Pošto su NO⁺ i HNO/NO⁻ vrste izuzetno reaktivne one se ne mogu direktno detektovati, već se njihovo detektovanje vrši na osnovu karakterističnih reakcija i to: reakcije NO⁺ sa vodom, u kojoj nastaje nitrit, i reakcije sa SH grupama prisutnim u molekulu (ili tiolima dodatim u reakcionu smešu), u kojima nastaju S-nitrozotioli (za NO⁺) i hidroksilamin (za HNO/NO⁻).¹³ Ukratko, deaerisani (argonom tretirani) rastvori enzima (sa i bez dodatka niskomolekulskih tiola) u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,4 (KPi), koji je prethodno tretiran DATAPAC smolom radi kompleksiranja jona gvožđa prisutnih kao onečišćenje, zasićeni su gasovitim NO,¹⁰ ili je u njih dodat zasićeni rastvor NO do određene koncentracije, a potom inkubirani tokom različitih vremenskih intervala (15 minuta do 6 sati) na sobnoj temperaturi. Nakon inkubiranja, višak NO je odstranjen propuštanjem argona kroz sistem, a u sveže-tretiranim uzorcima je određivana aktivnost enzima,¹⁴ dok su preostali rastvori zamrznuti (-20°C) i korišćeni po potrebi u daljem radu.

Rezultati određivanja aktivnosti enzima, nitrita, S-nitrozotiola (RSNO) i hidroksilamina u rastvorima MnSOD (*E. coli*) tretiranih azot-monoksidom prikazani su u tabeli 1. Iz tabele se vidi da u uzorcima enzima tretiranih sa NO nastaje znatna količina nitrita, kao i da u prisustvu cisteina ili GSH nastaju RSNO i hidroksilamin u značajnom prinosu, što sve ukazuje da pri ovim uslovima dolazi do dismutacije NO u NO⁺ i NO⁻ vrste. Takođe se vidi da generisane RNOS izazivaju inaktivaciju enzima, dok tioli, u čijem prisustvu je stepen inaktivacije enzima znatno niži, pokazuju protektivni efekat.

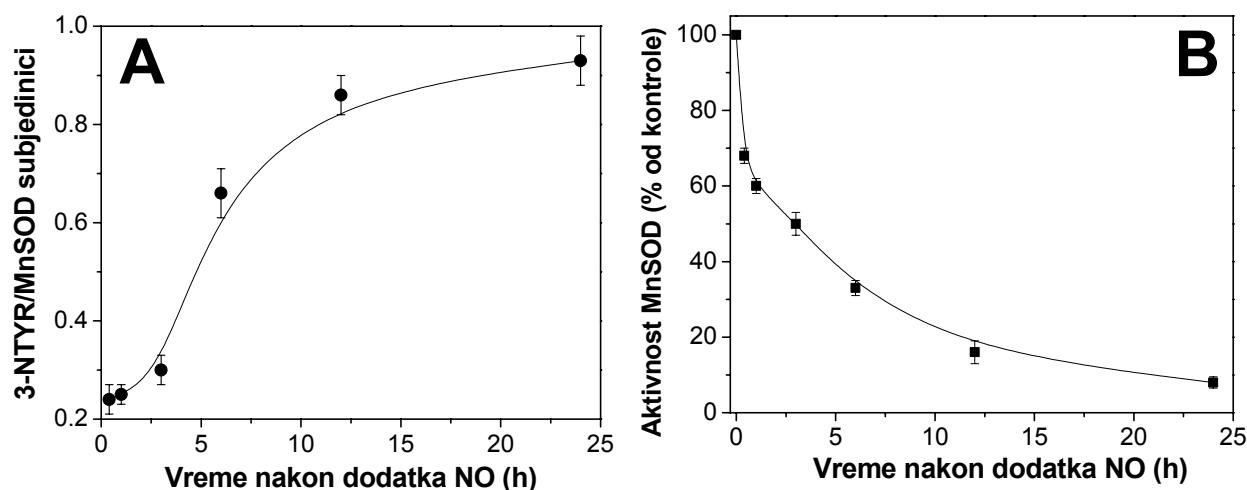
Tabela 1. Određivanje aktivnosti enzima, *S*-nitrozotiola (RSNO) i hidroksilamina u rastvorima MnSOD (*E. coli*) tretiranih azot-monoksidom

Dodaci	Aktivnost MnSOD (% od kontrole)	Nitriti (μM)	RSNO (μM)	NH ₂ OH (μM)
Bez dodataka	100	5 ± 2	n.d.	n.d.
NO	62 ± 2	78 ± 7	n.d.	n.d.
NO + Cys	76 ± 3	59 ± 4	n.d. *	32 ± 4
NO + GSH	91 ± 3	35 ± 3	28 ± 3	21 ± 3

Rastvori MnSOD (15 μM monomera) u KPi puferu pH 7,4 inkubirani su sa NO (1 mM) tokom 15 minuta na 23°C u prisustvu cisteina (1 mM), ili redukovanog glutationa (GSH, 1 mM). Aktivnost je izražena relativno u odnosu na enzim inkubiran pod istim uslovima bez prisustva NO. Vrednosti predstavljaju srednje vrednosti ± S.D. od tri eksperimenta urađena u duplikatu. n.d. nije detektovano. *Cys-NO je izuzetno nestabilan, zbog čega pri primenjenim eksperimentalnim uslovima nije mogao biti detektovan.¹⁵

Poređenjem količine nastalih proizvoda iz tabele 1 sa količinom MnSOD u reakcionoj smeši vidi se da je MnSOD posredovana reakcija transformacije NO u NO⁺ i NO⁻ vrste katalitičke prirode. Neophodnost prisustva metalnog centra u enzimu za redoks transformaciju NO potvrđena je eksperimentima u kojima je pod istim uslovima apoMnSOD⁷ izložen azot-monoksidu. U ovim eksperimentima nisu detektovane ni značajne količine nitrita i hidroksilamina, niti modifikacije bočnih aminokiselinskih ostataka u enzimu (videti dalji tekst).

Reaktivne NO vrste generisane MnSOD (*E. coli*) katalizovanom dismutacijom NO izazivaju ekstenzivnu modifikaciju molekula enzima: fragmentaciju polipeptidnog niza na ostacima histidina u aktivnom mestu, modifikacije amino grupa te nitrovanje (3-NTYR) i oksidaciju ostataka tirozina.^{10,16} Međutim, NO je u poređenju sa peroksinitritom mnogo manje invazivan. Tako, inkubiranje *E. coli* MnSOD sa NO (1 mM, 37°C, 2h) izaziva samo 50% inaktivacije enzima, dok izlaganje milimolarnim koncentracijama peroksinitrita dovodi do potpune inaktivacije enzima. Pored toga, dok peroksinitrit trenutno inaktivira MnSOD, gubitak aktivnosti i nitrovanje MnSOD u prisustvu NO je spor proces: za potpuni gubitak aktivnosti i nitrovanje (jednog) ostatka tirozina potrebno je produženo (24 sata) inkubiranje enzima sa NO (Slika 1).¹⁶ Pretpostavili smo da NO indukuje nitrovanje Tyr34 u *E. coli* MnSOD, koji se nalazi svega nekoliko angstroma udaljen od mangana u aktivnom centru,^{7,17} a primarno se nitruje i u reakciji humane MnSOD sa peroksinitritom.^{18,19}

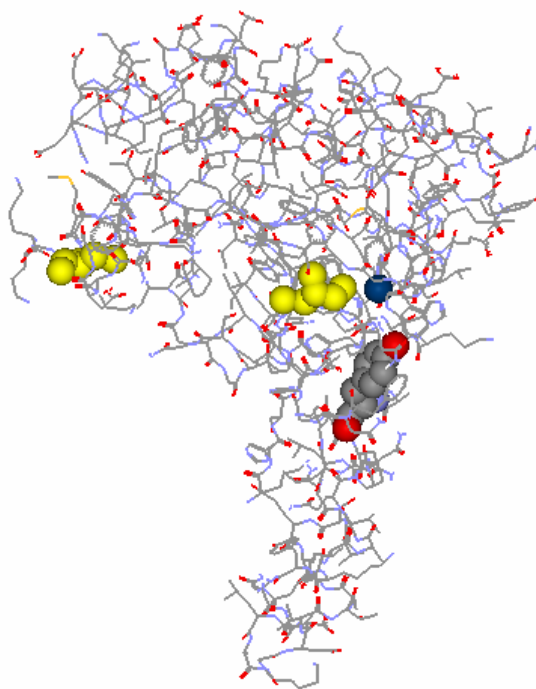


Slika 1. Vremenska zavisnost (A) nitrovanja ostatka tirozina (3-NTYR) i (B) inaktivacije MnSOD (*E. coli*) pod uticajem NO. Enzim je inkubiran sa zasićenim (1,7 mM) NO pod uslovima datim u tekstu.

MacMillan et al.¹⁸ su našli da se humana MnSOD ne inaktivira u značajnoj meri pri inkubiranju sa NO, što je iznenađujuće s obzirom na identičnost strukture aktivnih centara ova dva enzima.¹⁷ Međutim, za razliku od *E. coli* MnSOD, koja ne sadrži ostatke cisteina, humana MnSOD sadrži dva ostatka cisteina po subjedinici.²⁰ Uzimajući u obzir da su niskomolekulski tioli mete za RNOS (Tabela 1),²¹⁻²³ pretpostavili smo da i humana MnSOD može da vezuje i katalizuje dismutaciju NO, ali da ostatak cisteina Cys140 u humanoj MnSOD, koji je blizu aktivnog centra enzima (Slika 2), reaguje sa generisanim RNOS, usporavajući njihovu reakciju sa ostatkom tirozina u aktivnom mestu, što bi dovelo do inaktivacije enzima. Ovo objašnjava i zašto je efekat NO

na humanu MnSOD prošao nezapaženo u studiji McMillan-Crow et al.¹⁸ Ukratko, može se pretpostaviti da bi i humana MnSOD imala svojstvo da dismutuje NO (mada sporije od enzima iz *E. coli*). Katalizovanjem dismutacije NO MnSOD bi dodatno sprečavala nastajanje peroksinitrita, koji je reaktivniji od oba svoja prekursora. S druge strane, ovo bi imalo za posledicu i (sporo) nitrovanje i inaktivaciju MnSOD, što bi vremenom dovelo do oksidativnih oštećenja u ćeliji.²⁴ Opisani procesi bi mogli da budu relevantni za patofiziološke procese koje karakteriše prekomerna produkcija NO tokom dužeg perioda.

Naša nedavna ispitivanja su pokazala da pored MnSOD i joni gvožđa, u prisustvu biološki relevantnih liganada, mogu da katalizuju dismutaciju NO.²⁵ Zajedno, ovi rezultati ukazuju da je metal-posredovana dismutacija NO u biološkim uslovima ne samo moguća nego je i fiziološki relevantna. Zbog toga fiziološki značaj metal posredovane dismutacije NO zaslužuje dalja istraživanja.



Slika 2. Struktura jedne subjedinice humane MnSOD.
Plavo - jon mangana, žuto - ostaci cisteina i sivo - Tyr34.

Zaključak

Rezultati određivanja nitrita, S-nitrozotiola (RSNO) i hidroksilamina (karakterističnih proizvoda NO⁺ odnosno NO⁻ vrsta) u rastvorima MnSOD (*E. coli*) i niskomolekulskih tiola tretiranih azot-monoksidom, pod striktno anaerobnim uslovima, ubedljivo pokazuju da ovaj enzim katalizuje dismutaciju NO u NO⁺ i NO⁻ vrste. Generisane RNOS izazivaju modifikacije (uključujući i nitrovanje ostatka tirozina) molekula enzima, što ima za posledicu inaktivaciju enzima. Modifikacija i inaktivacija MnSOD nastala kao posledica NO dismutacije mnogo je manja i sporija u odnosu na one izazvane peroksinitritom.

Polazeći od sličnosti u strukturi MnSOD (*E. coli*) i humane MnSOD pretpostavljeno je da i humana MnSOD katalizuje NO dismutaciju, te da ostatak cisteina u blizini aktivnog centra molekula enzima reaguje primarno sa generisanim RNOS, usporavajući tako nitrovanje ostatka tirozina u aktivnom mestu, a time i inaktivaciju enzima. Ponašanje MnSOD kao NO dismutaze imalo bi protektivnu ulogu u uslovima prekomerne produkcije NO, jer bi sprečavalo njegovu transformaciju u štetne RNOS.

Zahvalnica

Ovaj rad je finansiran od strane MNTR Republike Srbije (Projekat HE1569).

Could manganese superoxide dismutase (MnSOD) play a role as NO dismutase?

The nitrogen monoxide molecule (NO) is ubiquitous cellular messenger, which regulates numerous biological processes, but its overproduction appears to contribute essentially to the pathology of disease. Pathophysiological effects are related to the generation of "reactive nitrogen species" (RNOS), such as peroxynitrite (ONOO⁻), which is formed by the reaction of NO with superoxide. Peroxynitrite, strong oxidizing and nitrating agent, is now thought of as a potent mediator of NO induced cytotoxicity. The hypothesis of the existence of protective enzymes whose role would be to regulate the high local NO concentrations that are released in NO generating cells was recently examined. It was proposed that these enzymes should play the role, with respect to NO either of reductase or of dismutase. In this work we extend our previous study to show that superoxide dismutase (MnSOD) could be a candidate for NO dismutase.

Literatura

1. S. Moncada, R.M.J. Palmer, E.A. Higgs, *Pharmacol. Rev.*, **43** (1991) 109
2. D.A. Wink, I. Hanbauer, M.B. Grisham, F. Laval, R.W. Nims, J. Laval, J. Cook, R. Pacelli, J. Liebmann, M. Krishna, P.C. Ford, J.B. Mitchell, *Curr. Top. Cell Regul.*, **34** (1996) 159
3. J. P. Eiserich, R. P. Patel, V. B. O'Donnell, *Mol. Aspects Med.*, **19** (1998) 221
4. J. T. Groves, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3** (1999) 226
5. J.P. Gerin, C. Ferradini, *Biochimie*, **82** (2000) 161
6. J. V. Bannister, W. H. Bannister, G. Rotilio, *Crit. Rev. Biochem.*, **22** (1987) 111
7. M. E. Stroupe, M. DiDonato, J. A. Tainer, in *Manganese superoxide dismutase. Handbook of Metalloproteins*. A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt, Eds., John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2001, p. 940
8. J.S. Stamler, D.J. Singel, J. Loscalzo, *Science*, **258** (1992) 1898
9. V. Niketić, S. Stojanović, M. Spasić, *Iugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta*, **34** (1998) 463
10. V. Niketić, S. Stojanović, A. Nikolić, M. Spasić, A. M. Michelson, *Free Radic. Biol. Med.*, **27** (1999) 992
11. P.C. Ford, I.M. Lorkovic, *Chem. Rev.* **102** (2002) 993
12. B. B. Keele, Jr., J. M. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **245** (1970) 6176
13. L. Arnelle, J. Stamler, in *Methods in nitric oxide research*. M. Feelicsh, J.S. Stamler, Eds., John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 1996, p. 541
14. H. P. Misra, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **247** (1972) 3170
15. A.F. Vanin, I.V. Malenkova, V.A. Serezhenkov, *Nitric Oxide*, **1** (1997) 191
16. S. Stojanović, D. Stanić, M. Nikolić, S. Raičević, M. Spasić, V. Niketić, *J. Serb. Chem. Soc.*, (2005), u štampi
17. R.A. Edwards, H.M. Baker, M.M. Whittaker, J.W. Whittaker, G.B. Jameson, E.N. Baker, *JBIC*, **3** (1998) 161
18. L. A. MacMillan-Crow, J. P. Crow, J. A. Thompson, *Biochemistry*, **37** (1998) 1613
19. F. Yamakura, H. Taka, T. Fujimura, K. Murayama, *J. Biol. Chem.*, **273** (1998) 14085
20. G.E. Borgstahl, H.E. Parge, M.J. Hickey, W.F. Beyer, R.A. Hallewell, J.A. Tainer, *Cell*, **71** (1992) 107
21. D.R. Arnelle, J.S. Stamler, *Arch. Biochem. Biophys.*, **318** (1995) 279
22. A.R. Butler, F.W. Flitney, D.L. Williams, *Trends Pharmacol. Sci.*, **16** (1995) 18
23. N. Hogg, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **42** (2002) 585
24. L.A. MacMillan-Crow, D.L. Cruthirds, *Free Radic. Res.*, **34** (2001) 325
25. S. Stojanović, D. Stanić, M. Nikolić, M. Spasić, V. Niketić, *Nitric Oxide*, **11** (2004) 256