

# Struktura i funkcija superoksid-dismutaza

---

**Kutleša, Lucija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:348088>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-27**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Lucija Kutleša

Studentica 3. godine Prijediplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **Struktura i funkcija superoksid-dismutaza**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović

Zagreb, 2023.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

03. srpnja 2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujna 2023.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Oksidativna šteta.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Superoksid-dismutaze.....</b>	<b>3</b>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Željezo-superoksid-dismutaza .....</b>	<b>4</b>
2.1.1. <i>Struktura proteina.....</i>	<i>4</i>
2.1.2. <i>Struktura aktivnog mjesta .....</i>	<i>4</i>
2.1.3. <i>Katalitički mehanizam i kinetika enzimski katalizirane reakcije .....</i>	<i>6</i>
<b>2.2. Mangan-superoksid-dismutaza.....</b>	<b>10</b>
2.2.1. <i>Struktura proteina.....</i>	<i>10</i>
2.2.2. <i>Struktura aktivnog mjesta .....</i>	<i>10</i>
2.2.3. <i>Katalitički mehanizam.....</i>	<i>13</i>
<b>2.3. Nikal-superoksid-dismutaza .....</b>	<b>18</b>
2.3.1. <i>Struktura proteina.....</i>	<i>18</i>
2.3.2. <i>Struktura aktivnog mjesta i uloga liganada.....</i>	<i>19</i>
2.3.3. <i>Katalitički mehanizam i kinetika enzimski katalizirane reakcije .....</i>	<i>21</i>
<b>2.4. Bakar-cink-superoksid-dismutaza.....</b>	<b>23</b>
2.4.1. <i>Struktura proteina.....</i>	<i>23</i>
2.4.2. <i>Struktura aktivnog mjesta .....</i>	<i>24</i>
2.4.3. <i>Katalitički mehanizam.....</i>	<i>26</i>
<b>2.5. Fiziološka funkcija i njeni poremećaji .....</b>	<b>29</b>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XXXI</b>



## § Sažetak

Superoksidni radikali nastaju aktivacijom i djelovanjem limfocita, nusprodukti su oksidativne fosforilacije i djelovanja ksantin oksidaze. Dok su pri fiziološkoj koncentraciji važni sudionici u prenošenju informacija između stanica, pri povišenoj koncentraciji mogu dovesti do oštećenja DNA, oksidaciju i denaturaciju proteina, promjenu permeabilnosti lipidne membrane. Pored toga, njihova štetnost povezana je i sa mnogim kardiovaskularnim poremećajima.

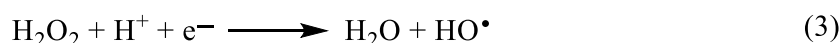
Kako bi se u stanici postigao potreban i nužan balans potrebno je djelovanje antioksidativnih enzima ili drugih molekula manje molekulske mase. Na prvoj crti obrane su enzimi superoksid-dismutaze (SOD). Radi se o metaloenzimima s visokom katalitičkom efikasnošću, pri fiziološkim vrijednostima pH, koja graniči samoj brzini difuzije supstrata. Prema metalnom ionu kojeg sadrže u aktivnom mjestu dijele se u četiri skupine, željezo-, mangan-, nikal- i bakar-cink-superoksid-dismutaze. Kataliziranje disproporcioniranja dvaju superoksidnih radikala odvija se tzv. ping-pong mehanizmom, a produkti su molekula vodikovog peroksida i molekula kisika. Metalni ioni se nalaze u aktivnom mjestu tih enzima i bez njih katalizirana reakcija ne bi bila moguća. Fe-SOD ističu se kao najstarije, dok Mn-SOD kao one s najkompleksnijim mehanizmom. CuZn-SOD posebne su po tome što su jedine koje sadrže dva iona metala u aktivnom mjestu, a niklove po jedinstvenom mehanizmu prilagodbe redukcijskog potencijala. Ni-SOD su kompleksnije, heksamerne strukture, dok ostale mogu postojati u obliku dimera ili tetramera ili u obliku monomera poput bakterijske CuZn-SOD. Aktivna mjesta željezove i manganove imaju jako sličnu prostornu građu aktivnog mjesta, jer se metalni ion nalazi u trigonsko-bipiramidalnom okružju. U oksidiranim oblicima niklove i bakar-cinkove dismutaze metalni ioni se nalaze u kvadratno-planarnom okružju.

Neadekvatan rad ovih enzima uslijed njihovog oštećenja povezan je s nastankom dodatnih poremećaja. Tako su CuZn-SOD dovedene u vezu s obiteljskom amiotrofičnom lateralnom sklerozom, a Mn-SOD s mentalnim poremećajima te neizravno sa stanicama karcinoma. Ipak, mimetici ovih enzima mogu se koristiti u terapiji oboljelih od karcinoma, ishemije, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, cistične fibroze, reumatoidnog artritisa te ublažavanja znakova starenja.

## § 1. UVOD

### 1.1. Oksidativna šteta

Stanicama je za normalno funkcioniranje neophodna energija. Aerobni organizmi glavnu energiju dobivaju oksidativnom fosforilacijom kojom iz jedne molekule kisika nastaju dvije molekule vode. Proces se odvija u mitohondriju, a s obzirom na to da njime nastaje znatno više molekula adenozin-trifosfata (ATP) nego glikolizom koja se može odvijati i u anaerobnim organizmima, korištenje kisika predstavlja evolucijski napredak. Transportom elektrona preko transmembranskih kompleksa na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani nastaje protonski gradijent koji pogoni sintezu ATP-a. Prilikom prolaska elektrona Kompleksima I i III postoji opasnost od otpuštanja reaktivnih međuprodukata redukcije kisika. Tako redukcijom jedne molekule kisika jednim elektronom nastaje superoksidni radikal. Reaktivne kisikove vrste mogu nastati i autooksidacijom katekolamina, ishemijom, aktivacijom limfocita, ksenobioticima, djelovanjem ksantin oksidaze.<sup>1</sup> Pri normalnim uvjetima u stanici, koncentracija superoksida u mitohondriju je približno jednaka  $10^{-11}$  mol dm<sup>-3</sup>. Reaktivne kisikove vrste, ROS, u kontroliranim koncentracijama važne su za signalne puteve te moduliranje ekspresije gena.<sup>1</sup> No, kada se naruši balans između količine ROS-a i djelovanja antioksidativnih enzima nastaje oksidativni stres. Reaktivne kisikove vrste su superoksidni radikal  $O_2^{\bullet-}$ , vodikov peroksid  $H_2O_2$  i hidroksilni radikal  $OH^{\bullet}$ . Nastaju postepenom jednoelektronskom redukcijom prikazanom jednadžbama (1) – (3). Superoksidni radikal je oksidans, ima jedan nesparen elektron što ga čini izuzetno reaktivnim te dalje potiče lančane reakcije nastajanja radikala.



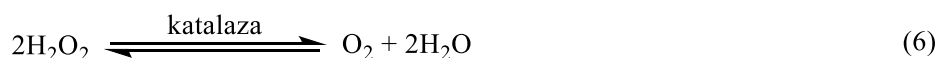
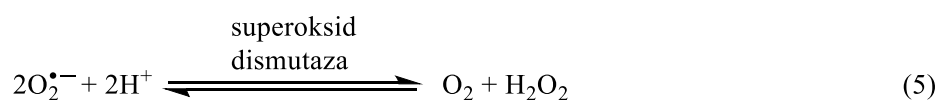
Uslijed nastanka oksidativnog stresa, reaktivne kisikove vrste mogu oksidirati lipide, proteine, DNA i time narušiti integritet stanice. Peroksidacija polinezasićenih masnih kiselina u lipidima je ireverzibilna, stoga se nastala šteta akumulira. Posljedice su promjene strukture ionskih kanala, proteina asociranih s lipidnom membranom, otvaranje novih kanala pomoću



kojih se mijenja permeabilnost te oksidacija aktivnih mjesta enzima asociranih s membranom.<sup>1</sup> Promjenom permeabilnosti narušava se kemijski gradijent. Lipidna peroksidacija opažena je u nealkoholnoj i alkoholnoj masnoj bolesti jetre.

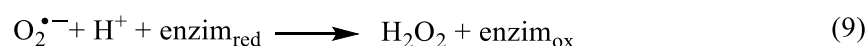
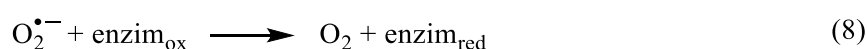
Interakcijom reaktivnih kisikovih vrsta s proteinima može doći do oksidacije bočnih ogranaka aminokiselina te induciranja agregacija i denaturacija. Osim toga, povezane su i s kardiovaskularnim poremećajima poput ateroskleroze, hipertenzije i dijabetesa.

Kako bi se izbjegao oksidativni stres i uspostavila homeostaza potrebno je uskladiti ravnotežu između oksidansa i antioksidansa. U zaštiti stanice od štetnih učinaka ROS-a sudjeluju superoksid-dismutaze, glutation peroksidaze i katalaze čija su djelovanja prikazana jednadžbama (5) – (7). Glutation peroksidaza katalizira redukciju molekule vodikovog peroksida. Glutation, GSH, se pri tome oksidira i povezuje disulfidnom vezom s drugom molekulom glutaciona. Katalaza je pak široko rasprostranjeni enzim koji katalizira disproporcioniranje molekule vodikovog peroksida na molekulu kisika i molekulu vode.



## 1.2. Superoksid-dismutaze

Superoksid-dismutaze su metaloenzimi klase EC 1.15.1.1. Kataliziraju disproporcioniranje superoksidnog radikala u dva koraka, tzv. ping-pong mehanizmom pri čemu ion metala u aktivnom mjestu izmjenjuje oksidacijska stanja. Prijenos elektrona spregnut je s prijenosom protona, a produkti disproporcioniranja su molekula kisika i molekula vodikovog peroksida kako je prikazano u pojednostavljenim jednadžbama (8) i (9). Djelovanjem superoksid-dismutaze održava se fiziološka koncentracija superoksida približne vrijednosti  $2 \cdot 10^{-10} \text{ mol dm}^{-3}$ .



Konstante brzina ovih enzima su vrlo blizu difuzijskog limita te gotovo posve neovisne o vrijednosti pH u granicama fizioloških vrijednosti. No, obzirom na kratko vrijeme raspada superoksidnog radikala te brzom djelovanju enzima, reakcijske mehanizme je zahtjevno odrediti.

Za uspješnu oksidaciju i redukciju superoksidnog radikala, njihov reduksijski potencijal mora biti između potencijala za jednoelektronsku redukciju oksida  $-0,18 \text{ V}$  i potencijala za jednoelektronsku redukciju superoksida  $0,91 \text{ V}$ . Optimalna vrijednost je prosjek između dviju navedenih te iznosi oko  $0,3 \text{ V}$ .<sup>2</sup>

Superoksid-dismutaze razlikuju se prema vrsti metalnog iona u aktivnom mjestu te se dijele na manganove Mn-SOD, željezove Fe-SOD, niklove Ni-SOD i bakar-cinkove superoksid-dismutaze CuZn-SOD. Međusobno strukturno najsličnije su Mn-SOD i Fe-SOD. Osim strukturne sličnosti, redoks aktivni metali u oba enzima alterniraju između oksidacijskih stanja +II i +III, što je slučaj i kod Ni-SOD. Uzimajući u obzir strukturnu homologiju, ove enzime može se podijeliti u tri skupine; prvu Fe-SOD i Mn-SOD, drugu Ni-SOD i treću CuZn-SOD. Na temelju značajnih razlika u aktivnom mjestu, tercijarnoj i kvaternoj strukturi između ove tri skupine, može se predložiti kako su nastali konvergentnom evolucijom.

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Željezo-superoksid-dismutaza

Fe-SOD smatraju se najrasprostranjenijim superoksid-dismutazama, a vjerojatno i najstarijima. Nalazi ih se u svim carstvima živog svijeta; arhejama, bakterijama i eukariotima. Prva dismutaza je otkrivena 1973. u bakteriji *Escherichia coli*. U arhejama i bakterijama lokalizirane su u citosolu, dok ih se u eukariotima nalazi u glioksisomima, mitohondrijima, citosolu i kloroplastima.

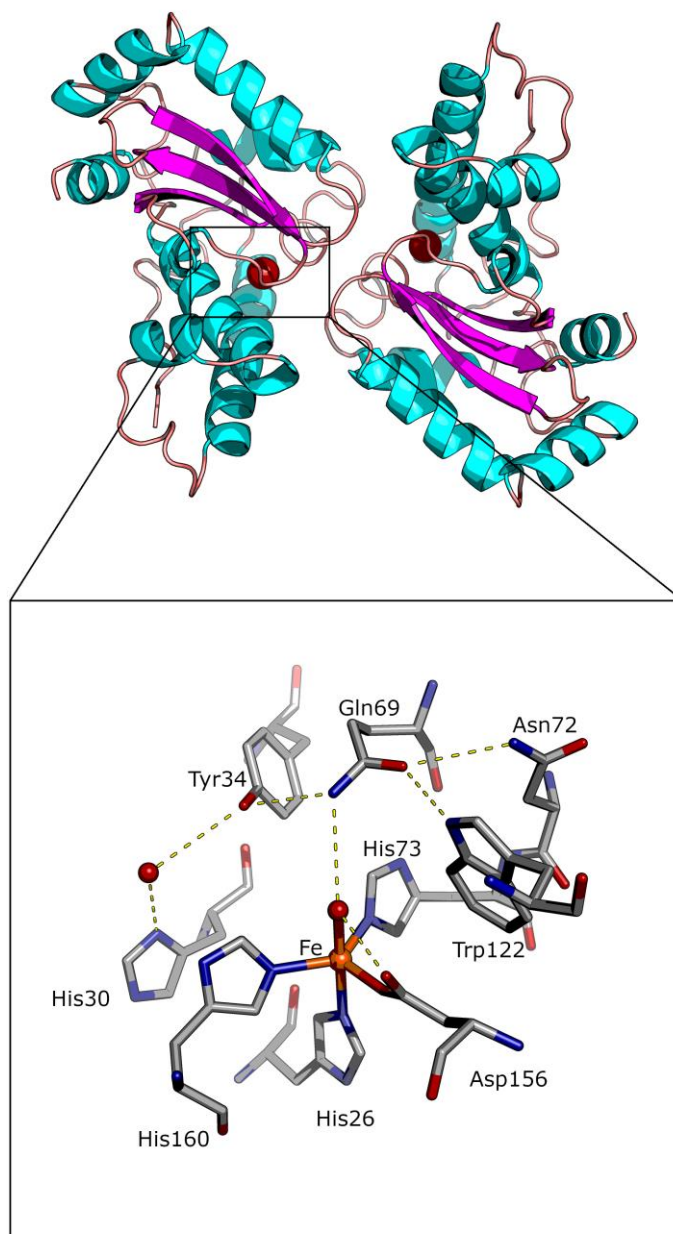
#### 2.1.1. Struktura proteina

Fe-SOD često tvore dimerne i tetramerne kvaterne strukture. Dimeri se pronalaze u citosolu arheja i bakterija, kloroplastima eukariota, dok tetrameri u citosolu, glioksisomima, mitohondrijima, kloroplastima eukariota i citosolu bakterija. Dimerne Fe-SOD imaju molekulsku masu oko 45 kDa.<sup>3</sup> Detaljno je proučena homodimerna struktura FeSOD iz *E. coli* (slika 1).<sup>2</sup> C-terminus monomera čine tri  $\beta$ -nabrane ploče okružene  $\alpha$ -zavojnica. Dva željezova iona nalaze se u trećoj  $\beta$ -nabranoj ploči i omći koja je slijedi. N-terminus polipeptida građen je od  $\alpha$ -zavojnica u kojima se nalaze preostala dva željezova liganda<sup>2</sup> Dominantne interakcije među monomerima su vodikove veze. Svaki monomer sadržava jedno aktivno mjesto.

#### 2.1.2. Struktura aktivnog mjesta

Tijekom reakcije koju katalizira Fe-SOD željezov ion mijenja oksidacijska stanja iz +II u +III i obratno. Željezov ion koordiniran je s pet liganada u trigonsko-bipiramidalnom okruženju. U ekvatorijalnoj ravnini željezov ion koordiniraju bočni ogranci His73, His160 i Asp156 (monodentatno vezan), dok su aksijalni ligandi bočni ogranak His26 i hidroksidni ion ili molekula vode (slika 1). Numeriranje odgovara Fe-SOD iz *E. coli*. Hidroksidni ion vezan je za željezov(III) ion, dok je molekula vode za željezov(II) ion. Cjelokupnu strukturu aktivnog mjesta podupire i stabilizira visoko očuvan sustav vodikovih veza koji osigurava specifičnost vezanja supstrata sprječavajući one neprikladne veličine i građe te naboja. His160 iz jednog

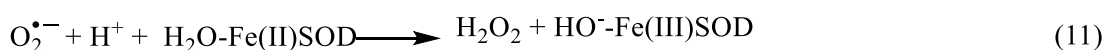
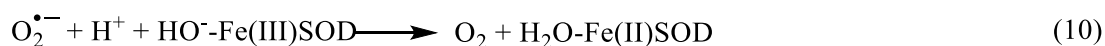
aktivnog mjesta povezan je vodikovom vezom s Glu159 iz drugog monomera pozicionirajući tako aktivna mjesta na dodiru dviju podjedinica (ta interakcija, zbog jednostavnosti prikaza, nije istaknuta na slici 1).<sup>4</sup> Za usporedbu, redukcijski potencijal visokospinskog heksaakvaželjezova kompleksa iznosi 0,77 V što je izvan raspona vrijednosti pri kojoj može katalizirati reakciju. Smanjenje redukcijskog potencijala postiže se ugađanjem prostorne građe aktivnog mjesta i izborom pogodnog skupa donorskih atoma iz bočnih ogranaka aminokiselina (poželjno je da su to polarizabilniji ili nabijeni atomi koji uspješnije stabiliziraju viša oksidacijska stanja). Primjerice, bočni ogranak Gln69 sudjeluje u mreži vodikovih veza i stabilizira hidroksidni ion. Taj ion ima snažan izravan utjecaj na redukcijski potencijal aktivnog centra jer će pogodovati vezanju na željezov(III) ion.



Slika 1. Vrpčasta struktura (gore) i struktura aktivnog mjesta (dolje) dimera enzima Fe-SOD iz *E. coli*. (PDB 1ISB). Isprekidanim linijama označene su vodikove veze.

### 2.1.3. Katalitički mehanizam i kinetika enzimski katalizirane reakcije

Fe-SOD katalizira pretvorbu dvaju superoksidnih radikala u molekulu kisika i molekulu vodikovog peroksida u dva koraka. U prvom koraku superoksidni radikal se oksidira do molekule kisika uz redukciju Fe(III) iona. U drugom koraku Fe(II) ion se oksidira, a drugi superoksidni radikal se reducira do molekule vodikovog peroksida. Pulsnom radiolizom\* potvrđeno je da se reakcija zbiva u dva koraka prikazana pojednostavljenim jednadžbama kemijskih reakcija (10) i (11).



Oksidacija, odnosno redukcija željezovih iona u aktivnom mjestu spregnuta je s izmjenom protona na OH<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O ligandu što je potvrđeno spektroskopijom NMR.<sup>4</sup> Nadalje, katalitička konstanta ovisi o ionskoj jakosti medija što potvrđuje distribuciju naboja na površini enzima koja odvodi supstrate u tunel koji vodi k aktivnom mjestu enzima.

U prvom koraku molekula supstrata se veže u ekvatorijalnu ravninu Fe(III) iona (trigonska bipiramida). Vežanjem supstrata, prostorna građa željezovog centra se mijenja u oktaedarsku. No, zbog brzine reakcije, model za proučavanje ovog koraka mehanizma bio je kompleks enzima s azidnim ionom, N<sub>3</sub><sup>-</sup>-Fe(III)-SOD. Uzimajući u obzir razliku u veličini azidnog i superoksidnog aniona ne može se s neograničenom sigurnošću potvrditi točnost predloženog mehanizma (iako su oba linearne građe).<sup>2</sup> Tyr34 sterički propušta molekule supstrata u aktivno mjesto na temelju njihove veličine. Tiocijanatni, kloridni, acetatni i sulfatni anioni ne vežu se na željezov ion, već sterički ometaju ulazak supstrata u aktivno mjesto. Ponašaju se kao kompetitivni inhibitori.<sup>2</sup> Do inhibicije dolazi i sa submilimolarnom količinom vodikova peroksida. Ipak, pri fiziološkim uvjetima reakcija je spora te enzim uspješno štiti stanice od štete.

Prijenos elektrona sa superoksidnog radikala na Fe(III) ion događa se trenutno. U isto se vrijeme jedan proton veže na koordinirani hidroksidni ion. Dovođenju potrebnog protona u aktivno mjesto potpomaže sustav vodikovih veza koji uključuje bočne ogranke aminokiselina Gln69, Tyr34 i His30.<sup>2</sup> Novonastala molekula kisika vrlo brzo disocira iz aktivnog mjesta.

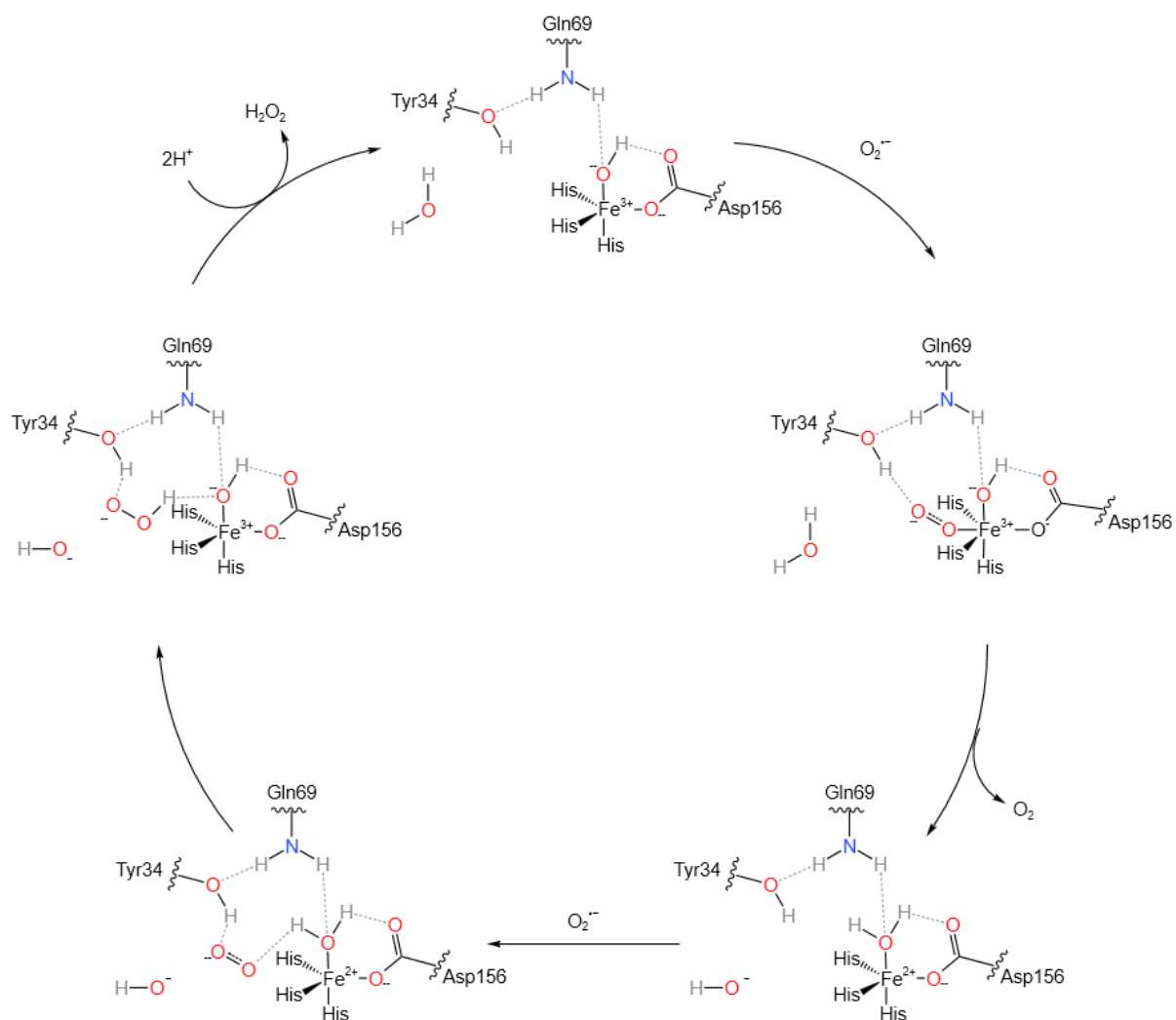
---

\* Pulsna radioliza je relativno novija metoda kojom se proučavaju kemijske reakcije koje su brže od 100 ms.

U sljedećem koraku ne dolazi do direktnog vezanja supstrata na Fe(II) ion. Novi ligand, molekula H<sub>2</sub>O, je neutralan, zbog čega dodatno dolazi do izražaja negativan naboj bočnog ogranka Asp156 te je vezanje supstrata u mjesto nasuprot njemu u ekvatorijalnoj ravnini otežano. Posljedično, supstrat se veže u sekundarnoj koordinacijskoj sferi. Također, povećanje vrijednosti pH otopine prati smanjena aktivnost enzima.

Usporedno s oksidacijom Fe(II) iona, jedan se proton iz koordinirane molekule vode predaje superoksidnom radikalu sustavom vodikovih veza.

Supstrat u završnom koraku prima još jedan proton iz sustava vodikovih veza u kojima sudjeluju His30 i Tyr34 nakon čega molekula vodikovog peroksida izlazi iz aktivnog mjesta. Opažen kinetički izotopni efekt sugerira kako ovaj korak određuje brzinu reakcije.<sup>2</sup>



Shema 1. Reakcijski mehanizam željezove superoksid-dismutaze.



## 2.2. Mangan-superoksid-dismutaza

Smanjivanjem biodostupnosti željezovih iona pojavile su se superoksid-dismutaze ovisne o posve novom kofaktoru, manganovom ionu. Prve su otkrivene u bakteriji *E. coli*, a nedugo zatim u arhejama i eukariotima. Poznate su kao mehanistički najkompleksnija skupina superoksid-dismutaza. Kodirane su genom SOD2, a nastala pre-mRNA podliježe posttranskripcijskim doradama. Nakon translacije sazrele mRNA slijede i jednako važne posttranslacijske dorade s ulogom reguliranja enzimske aktivnosti. Primjer su nitriranje, fosforilacija i acetilacija.<sup>5</sup> Povećana aktivnost ovog enzima utječe na apoptozu u mozgu, dijabetičku kardiomiopatiju, na stanice koje signaliziraju apoptozu u jetri te sudjeluje u regulaciji redoks-reakcija u miocitima tijekom fizičke aktivnosti.<sup>1</sup>

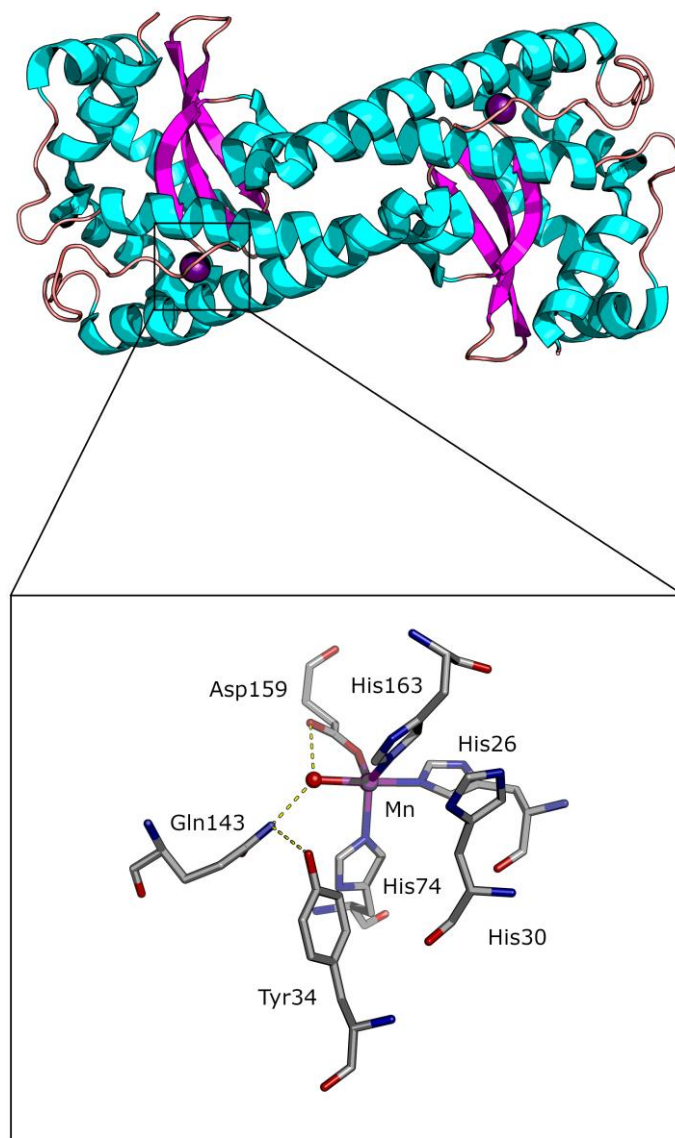
### 2.2.1. Struktura proteina

Svojom tercijskom strukturom bakterijske Mn-SOD jako nalikuju Fe-SOD s kojima dijele čak 43% primarnog aminokiselinskog slijeda. Pronađene su u citosolu arheja i bakterija, dok eukariotske, osim u citosolu, u matriksu mitohondrija, kloroplastima i peroksisomima, ovisno o vrsti stanica. Ljudske stanice posjeduju homotetramernu Mn-SOD jedino u matriksu mitohondrija. Kod cijanobakterija Mn-SOD je primjerice vezana za membranu. Bakterijski enzimi uglavnom su dimerne, a ostali tetramerne kvaterne strukture. Monomeri koji grade dimere su građeni na N-terminusu predominantno od  $\alpha$ -zavojnica, te na C-terminusu od malih  $\beta$ -nabranih ploča i  $\alpha$ -zavojnica. Svaki monomer sadrži jedno aktivno mjesto, a molekulska masa onih u ljudskim stanicama je 22 kDa. Kod monomera koji grade tetramernu strukturu N-terminusi sadrže duge  $\alpha$ -zavojnice koje stvaraju strukturu ukosnice, koja izostaje kod monomera koji grade dimerne strukture. Takvi monomeri imaju znatno kraće N-terminalne  $\alpha$ -zavojnice. Usporedbom dvaju enzima, tetramernog iz *S. cerevisiae* i dimernog iz *C. albicans* uočeno je kako je tetramerni znatno termostabilniji, otporniji na promijenu vrijednosti pH, toplinu te induciranu denaturaciju.<sup>2</sup>

### 2.2.2. Struktura aktivnog mjesta

Redoks aktivni par je pentakoordinirani Mn(III)/(II) ion. Aktivno mjesto Mn-SOD je narušene trigonosko bipiramidalne strukture (slika 2), a u središtu se nalazi manganov ion koordiniran s tri bočna ogranka histidina, jednim bočnim ogrankom aspartata te molekulom vode odnosno

hidroksidnim ionom ovisno o oksidacijskom stanju mangana. Dva histidina u primarnom aminokiselinskom slijedu nalaze se na N-terminusu polipeptida, a preostali histidin i aspartat na C-terminusu. Mangnov(III) ion koordiniran je hidroksidnim ionom, dok manganov(II) ion molekulom vode. Visokospinsko stanje Mn(III) iona ima četiri nesparena d-elektrona. Takav je ion podložan Jahn-Tellerovom efektu i energijski je povoljnije da se hidroksidni ion veže u aksijalnom položaju. Na taj način su u ekvatorijalnoj ravnini vezani drugi ligandi te je ostvarena maksimalna stabilnost kompleksa.<sup>3</sup> Osim samog aktivnog mjesta, neupitno ključnu ulogu za katalitičku aktivnost enzima ima visoko očuvan sustav vodikovih veza u sekundarnoj koordinacijskoj sferi manganova iona. Za tu su mrežu ključne aminokiseline Gln143, Tyr34, His30, Tyr166 (pri čemu oznake numeriranja odgovaraju Mn-SOD iz ljudskih stanica). Upravo te aminokiseline imaju ključnu ulogu u ostvarivanju jednoelektronskog-dvoprotonskog prijenosa tijekom katalize. Tyr34 osobito je važan za dovođenje molekula supstrata kroz tunel k aktivnom mjestu elektrostatskim navođenjem. Mutacijom bilo koje aminokiseline koja je sastavni dio sustava vodikovih veza dolazi do promjene stabilnosti i aktivnosti enzima, iako su strukturne promjene aktivnog mjesta minimalne. Najzanimljivija je mutacija Gln143 koja rezultira znatnim gubitkom aktivnosti enzima. Takav drastičan utjecaj posljedica je dokidanja cijelog sustava vodikovih veza jer je Gln143 prvi koji ga direktno povezuje s molekulom otapala iz prve koordinacijske sfere. Smatra se i kako je Gln143 važan za ostvarivanje specifičnosti enzima prema metalnom ionu.<sup>6</sup>



Slika 2. Vrpčasta struktura (gore) i struktura aktivnog mjesta (dolje) tetramer enzima Mn-SOD iz ljudskih stanica. (PDB: 1LUV) Isprekidanim linijama označene su vodikove veze.

Ulazak metalnog iona u aktivno mjesto je proces koji uključuje konformacijske promjene enzima. Promjenu iz zatvorene u otvorenu konformaciju u kojoj je aktivno mjesto dostupno metalnom ionu pokreće toplina. Kristalna struktura apoenzima iz *E. coli* jednaka je strukturi

holoenzima zbog čega se može zaključiti kako je tercijarna struktura Mn-SOD posljedica spontanog smatanja proteina na koje ne utječe vezanje metalnog iona.

Iako aktivno mjesto nije specifično samo za manganove ione te se i drugi metalni ionu mogu vezati, enzim je katalitički aktivan jedino kada je vezan manganov ion.

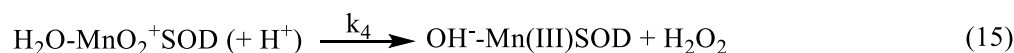
Sada postaje razvidna još jedna sličnost Mn-SOD i Fe-SOD, a to jest struktura aktivnog mjesta. Oba metalna iona koordinirana su istim aminokiselinama te strukturu oba aktivna mjesta obavlja visoko očuvan sustav vodikovih veza. Unatoč tome, Mn-SOD sa željezovim ionom u aktivnom mjestu nije katalitički aktivna. Vrijedi i obratno, a tome je razlog različito podešavanje redukcijskog potencijala metalnog iona u aktivnom mjestu, od strane apoenzima, kako bi bio u odgovarajućem rasponu vrijednosti. Redukcijski potencijal Mn(III) iona iznosi otprilike 1,51 V, dok za visokospinski heksaakvaželjezov kompleks 0,77 V. Rezultat je da Mn-SOD snižavaju redukcijski potencijal u većem iznosu nego Fe-SOD. Željezovim ionom supstituirana Mn-SOD imat će, stoga, prenizak redukcijski potencijal te neće moći katalizirati i redukciju i oksidaciju superoksidnog radikala. Mehanizam kojim Mn-SOD snižava redukcijski potencijal na optimalnu vrijednost jednak je kao za Fe-SOD, te uključuje glutamin iz sustava vodikovih veza. Jedina je razlika položaj glutamina u proteinu. Kod Mn-SOD on se nalazi u  $\beta$ -nabranoj ploči na C-terminusu, dok kod Fe-SOD u  $\alpha$ -zavojnici na N-terminusu. Razlika u veličini redukcijskog potencijala proizlazi iz činjenice da glutamin iz Mn-SOD stvara jače vodikove veze s vezanim hidroksidnim ionom nego što je to slučaj s glutaminom iz Fe-SOD.<sup>6, 7, 8</sup>

### 2.2.3. Katalitički mehanizam

Molekula supstrata se u aktivno mjesto dovodi ugađanjem naboja na vanjskoj površini enzima i tunelom na čijem se kraju nalazi Tyr34 koji ima ulogu konačnog propuštanja supstrata.<sup>6</sup> Dio vanjske površine negativno je nabijen dok su tunel i šupljina s aktivnim mjestom pozitivno nabijeni. Takva distribucija naboja omogućava brzu difuziju molekula supstrata u aktivno mjesto. Navedeno potvrđuje pulsnom radiolizom određena vrijednost konstante specifičnosti,  $10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , koja je vrlo blizu difuzijskog limita. Mn-SOD je katalitički gotovo savršen enzim.<sup>9</sup>

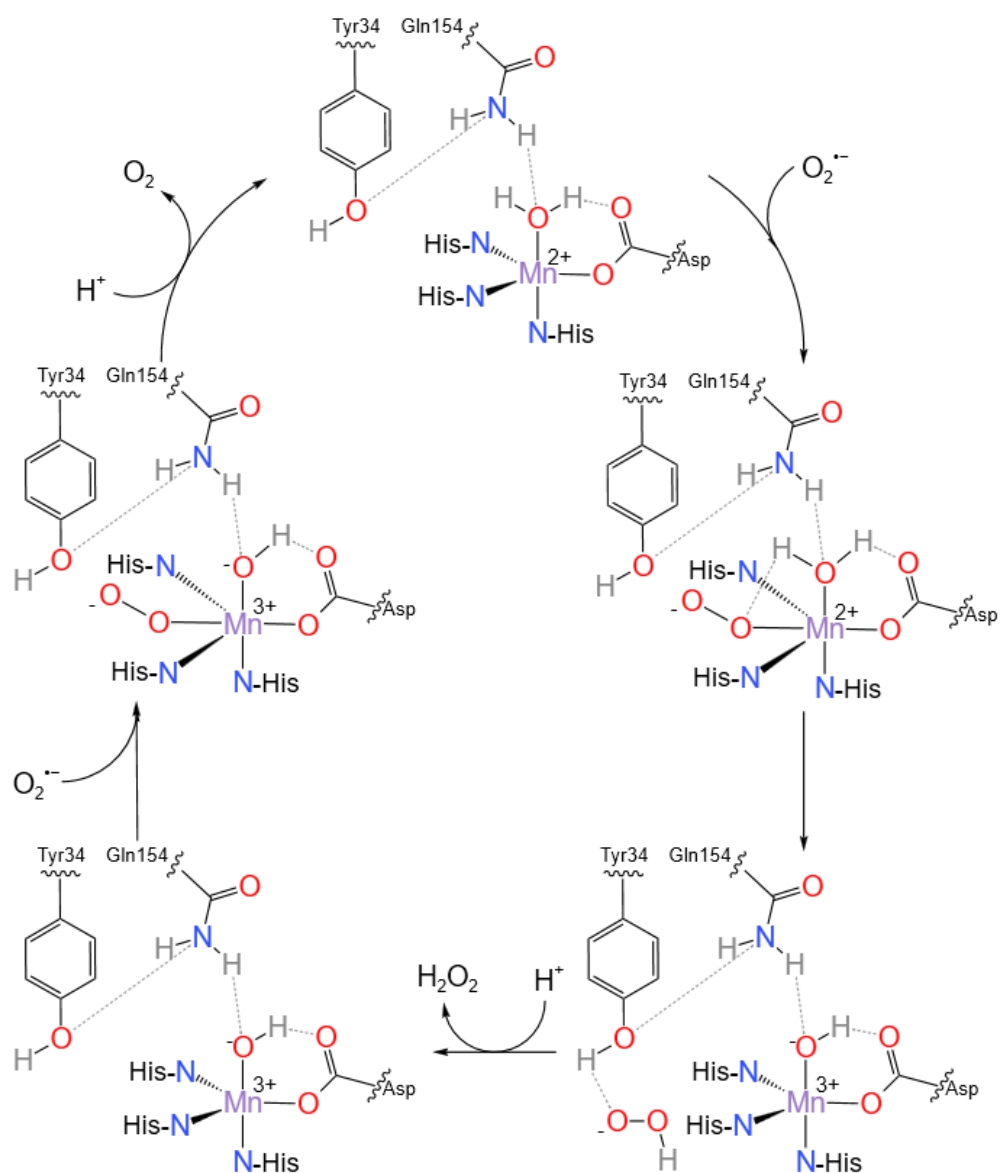
Katalitički mehanizam analiziran je metodom zaustavljenog protoka te pulsnom radiolizom. Uočeno je kako ovaj enzim ima različit katalitički mehanizam pri visokim i niskim koncentracijama superoksida. Pri niskim koncentracijama molekula supstrata, kada je omjer

koncentracija superoksida i enzima manji od pet, katalitički mehanizam analogan je onom kod Fe-SOD, te prati shemu „5-6-5“<sup>†</sup>. No, kada je omjer množinskih koncentracija znatno veći od pet, dolazi do neobičnog preokreta mehanizma. Prema predloženom mehanizmu omjer konstanti  $k_2/k_3$  (jednadžbe (12) i (13)) opisuje stupanj inhibicije produktom. Glavne razlike između mehanizama kojima se disproportcioniranje superoksida može odviti prikazuju jednadžbe (13) i (14). Mehanizam koji opisuju jednadžbe (12) i (13) odvija se trenutnom protonacijom i disocijacijom perokso vrste te se ne opaža međuprodukt. Navedeni mehanizam je tzv. „5-6-5“ mehanizam prikazan shemom 2. Jednadžbe (14) i (15) opisuju katalitički mehanizam u kojem nastaje perokso-Mn(III)SOD kompleks, tzv. inhibirani kompleks.

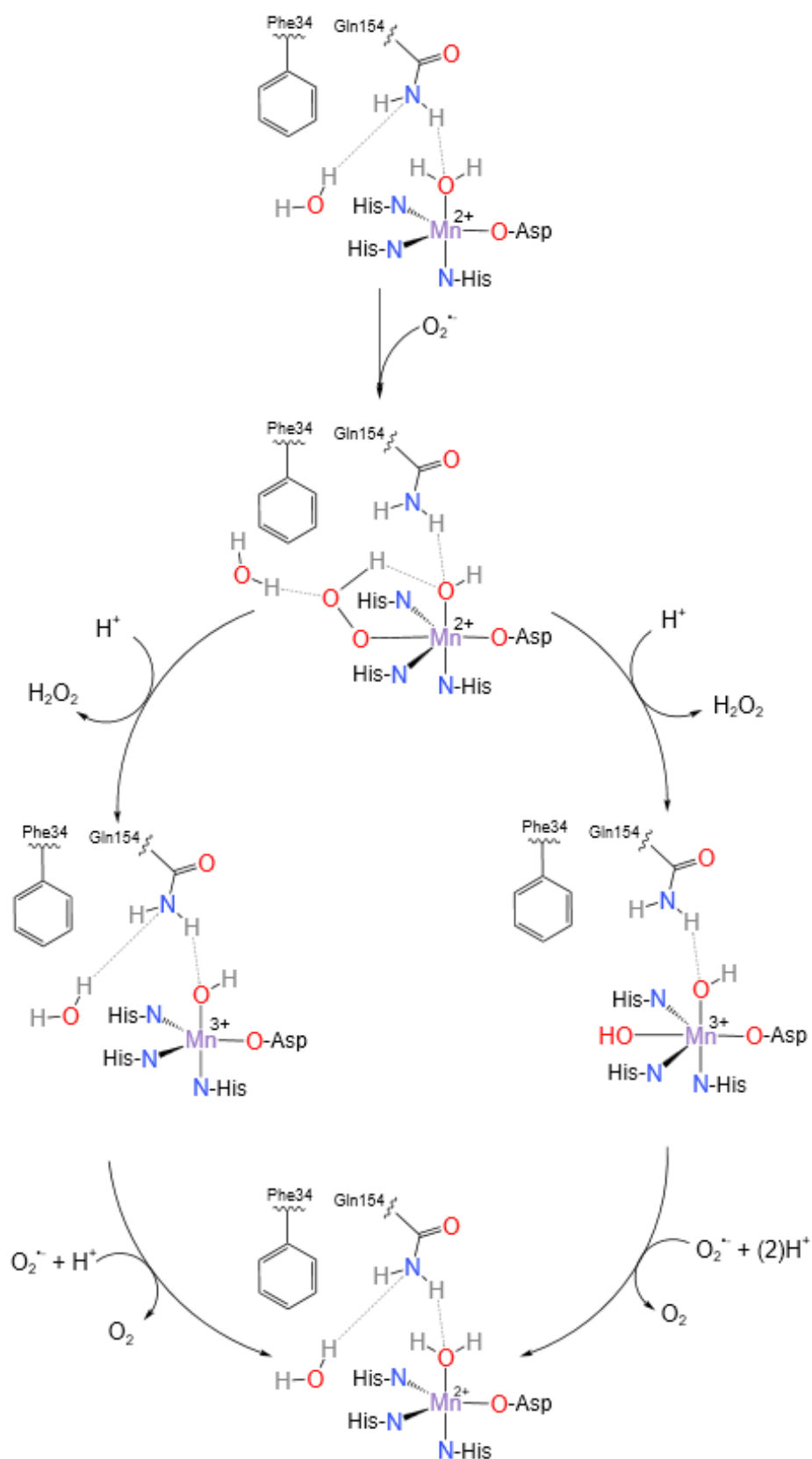


Nadalje, proučavan je katalitički mehanizam Tyr34Phe Mn-SOD iz gljivice *S. cerevisiae*.<sup>10</sup> Ustanovljeno je kako pri neutralnim vrijednostima pH iz perokso-Mn(III)-SOD kompleksa brzim prijenosom protona nastaje, iznenađujuće, heksakoordiniran manganov(III) ion. Pretpostavlja se kako je šesti ligand hidroksidni ion te takav kompleks dalje oksidira sljedeći superoksidni radikal. Pri vrijednostima pH većim od osam protonacija perokso-Mn(III)-SOD kompleksa je sporija, a nastala vrsta je pentakoordinirani manganov(III) ion (shema 3). Također, može se uočiti kako protonacijom atoma kisika superoksida koji je bliži manganovom ionu nastaje vrsta nevezana za manganov ion, dok protonacija udaljenijeg atoma kisika vodi k stvaranju vrste koordinirane na manganov ion. U konačnici ono što ovu skupinu enzima čini posebnom jest varijacija omjera  $k_2/k_3$  među vrstama, a time i enzimatske efikasnosti.

<sup>†</sup> „5-6-5“ mehanizam karakteriziran je promjenom koordinacije metalnog iona prilikom oksidacije i redukcije.



Shema 2. Katalitički mehanizam manganove superoksid-dismutaze, tzv. „5-6-5“ mehanizam.



Shema 3. Predložen katalitički mehanizam za mutant Tyr34Phe Mn-SOD iz *S. cerevisiae*.<sup>10</sup>

Postoji vrsta superoksid-dismutaza koje su katalitički aktivne i kada je u središtu aktivnog mjesta smješten manganov ion i kada je smješten željezov ion. Takva skupina enzima nazvana je promjenjivim Fe/Mn superoksid-dismutazama. Njihova katalitička efikasnost manja je od superoksid-dismutaza specifičnih za jedan određeni metalni ion. Otkrivene su u primitivnim anaerobnim organizmima. Za razliku od Fe-SOD nisu inhibirane molekulama vodikovog peroksida.<sup>4</sup>

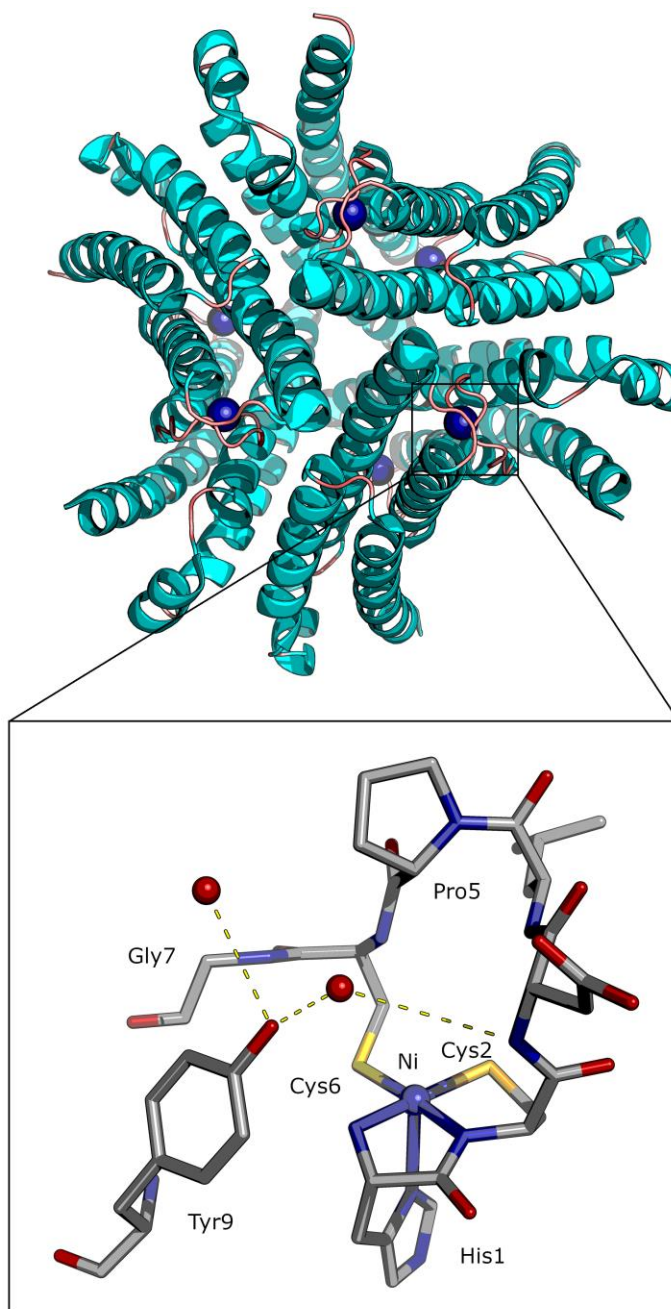


## 2.3. Nikal-superoksid-dismutaza

Porastom koncentracije kisika u atmosferi pojavila se fotosinteza. Biološka dostupnost željezovih iona se smanjivala. Uz takve uvjete konvergentnom evolucijom nastale su Ni-SOD. Ponajprije ih se nalazi u morskim organizmima. Pronađene su u citosolu bakterije *Streptomyces sp.*, cijanobakterija te kod određenih zelenih algi.<sup>11</sup> Poput ostalih superoksid-dismutaza, u aktivnom mjestu sadrži redoks aktivni ion metala, dok svakom razinom strukture značajno odstupa od ostalih enzima ove skupine.<sup>12</sup>

### 2.3.1. Struktura proteina

Proučavani su Ni-SOD izolirani iz *S. seoulensis* i *S. coelicolor* te je ultracentrifugiranjem, analizom ESI-MS i gel-filtracijom potvrđena heksamerna struktura s monomerima mase 13,4 kDa (slika 3). Monomere sačinjavaju četiri antiparalelne  $\alpha$ -zavojnice te svaki monomer sadrži aktivno mjesto s jednim niklovim ionom. Monomeri su sferične građe promjera 60 Å sa šupljinom promjera 20 Å. Među podjedinicama dominiraju hidrofobne interakcije i brojne vodikove veze. Primjer je vodikova veza između Glu17 iz jedne podjedinice i bočnog ogranka His1 koji je koordiniran na niklov ion u aktivnom mjestu druge podjedinice. Na površini enzima izloženoj otapalu nalaze se polarni i nabijeni bočni ogranci aminokiselina. Aktivna mjesta nalaze se na N-kraju svake podjedinice. Jedna funkcionalna Ni-SOD sadrži šest niklovih iona.<sup>2</sup>



Slika 3. Vrpčasta struktura (gore) i struktura aktivnog mjesta (dolje) heksamernog enzima NiSOD iz *S. coelicolor* s aktivnim mjestom u oksidiranom stanju (PDB: 1T6U)

### 2.3.2. Struktura aktivnog mjesta i uloga liganada

Spektroskopijom EPR potvrđen je redoks aktivni par Ni(III)/(II). Rendgenska apsorpcijska spektroskopija (XAS) otkrila je prisutnost nekoliko bogatih elektronima S-donornih liganada u aktivnom mjestu te promjenu strukture koja prati promjenu oksidacijskog stanja niklovog iona.

U oksidiranom stanju, Ni(III) ion je koordiniran s pet liganada čime prostorna građa nalikuje četverostranoj piramidi (slika 3). Ligandi su tiolatne skupine iz bočnih ogranaka Cys2 i Cys6, amidna skupina Cys2, N-terminalni amin te bočni ogranak His1. Koordinaciju niklovih(III) iona s bočnim ograncima cisteina potvrđuje elektronski apsorpcijski spektar izolirane Ni-SOD u kojem maksimum pri 380 nm odgovara prijenosu naboja s liganda na metal (engl. *ligand to metal charge transfer*). Isto je potvrđeno Ramanovom spektroskopijom. Redukcijom niklovih(III) iona dolazi do otpuštanja bočnog ogranka His1 te se mijenja prostorna građa oko niklovih iona – prelazi u kvadratno-planarnu. Usporedbom izoliranih Ni-SOD iz *Prochlorococcus marinus*, *Synechococcus*, *Prochlorococcus marinus*, *Trichodesmium erythraeum*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor* i *Streptomyces seoulensis*, ustanovljeno je postojanje konzerviranog aminokiselinskog slijeda od devet ostataka na N-kraju polipeptida, u čijem se slijedu nalaze aminokiseline čijim atomi koordiniraju niklove ione. Taj visoko očuvani slijed aminokiselina poznat je pod nazivom niklova udica (od engl. *nickel hook*) motiv s redoslijedom aminokiselina; (N-terminalni) His-Cys2-X-X-Pro-Cys6-Gly7-X-Tyr.<sup>10</sup> Njegova uloga je zaštita od prodiranja molekula otapala u aktivna mjesta enzima s obzirom na to da se ona nalaze blizu površine enzima izložene otapalu. Prolin iz očuvane sekvence ima ključnu ulogu u pozicioniranju koordinirajućih atoma prema niklovom ionu.<sup>13</sup> Točnije, Pro5 mora biti u cis-konformaciji kako bi se Cys6 nalazio u položaju koji odgovara budućoj ekvatorijalnoj ravnini niklovih iona.<sup>13</sup> Stoga, njegovim uklanjanjem ostale aminokiseline iz sekvence ne mogu pravilno koordinirati niklov(II) ion.<sup>14</sup>

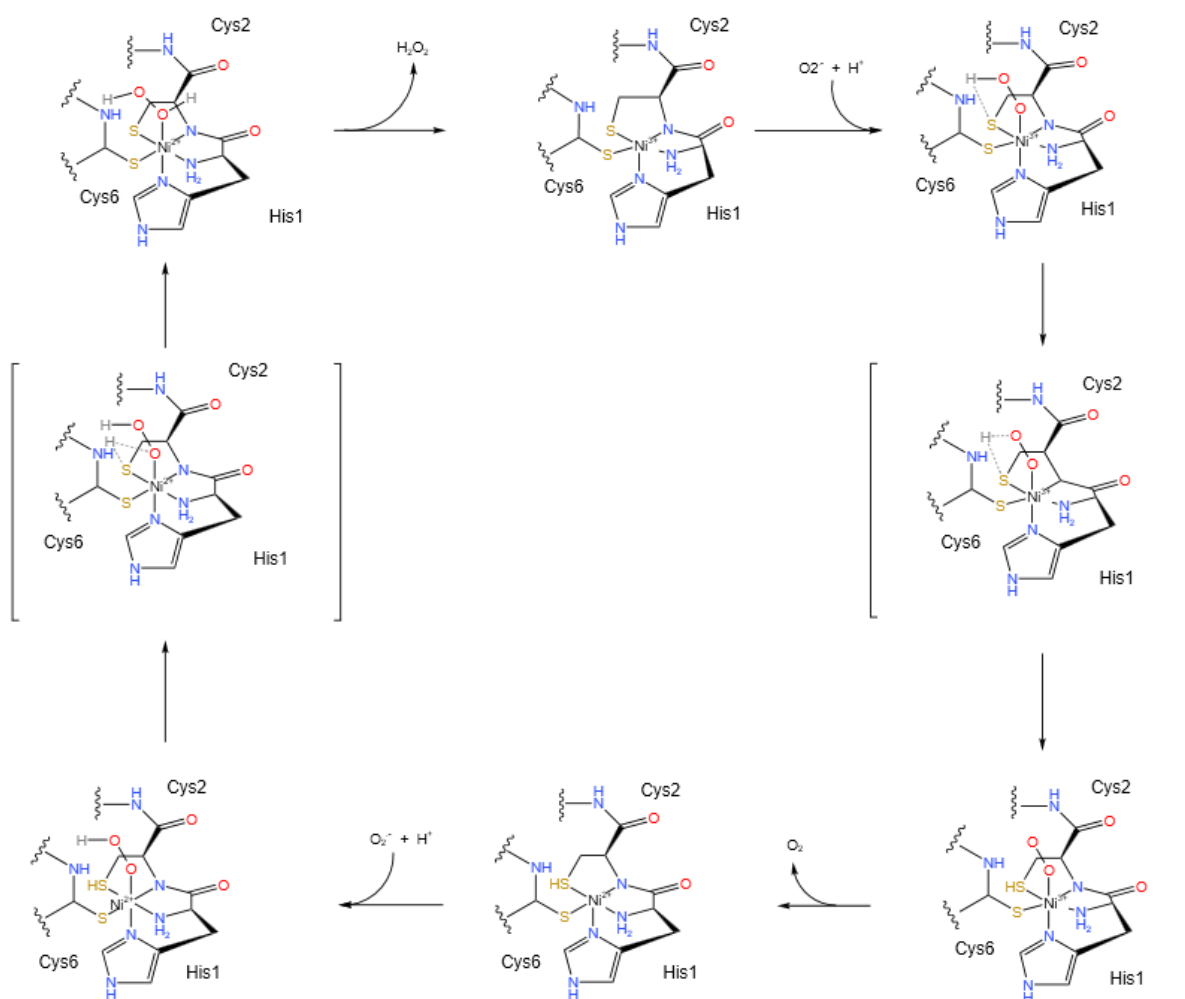
U vodenoj otopini redukcijski potencijal niklovih(III) iona je 2,26 V što je daleko izvan raspona u kojem superoksid-dismutaze mogu disproporcionirati superoksidne radikale. Od svih metalnih iona pronađenih u različitim superoksid-dismutazama, niklovi ioni jedini ne mogu katalizirati pretvorbu superoksida u vodenoj otopini. Ipak Ni-SOD jesu pronađene, a rješenje koje koristi ova skupina enzima su elektronima bogati tiolatni ligandi Cys2 i Cys6 koji stabiliziraju visoko oksidacijsko stanje niklovih(III) iona. Navedeno podupiru i DFT računalne analize (engl. *density functional theory*).<sup>15</sup> Kao rezultat evolucijskih prilagodbi, redukcijski potencijal Ni-SOD iznosi 0,29 V i kataliza je vrlo uspješna. Računalnim metodama otkriveno je i kako je udaljenost između niklovog iona i aksijalnog liganda His veća od udaljenosti s ostalim ligandima te iznosi između 2,3 Å i 2,6 Å. Povećanje udaljenosti dodatno ugađa redukcijski potencijal metalnog centra. Na drugu važnu ulogu liganada ukazuje DSC termogram divljeg tipa Ni-SOD iz *Streptomyces coelicolor* i Cys-Ser odgovarajući mutant. U

termogramu divljeg tipa NiSOD prisutan je maksimum pri 84,8 °C, a u termogramu mutanta pri ≈70 °C. Navedeno upućuje na važnu ulogu cisteina iz aktivnog mjesta u stabiliziranju kvaterne strukture heksamera.<sup>15</sup>

### 2.3.3. Katalitički mehanizam i kinetika enzimski katalizirane reakcije

Kao i kod ostalih superoksid-dismutaza, kataliza pomoću NiSOD odvija se u dva koraka tzv. ping-pong mehanizmom. Za razliku od ostalih, katalitička konstanta Ni-SOD ne ovisi o ionskoj jakosti medija što sugerira nepostojanje distribucije naboja na površini enzima. Smatra se da je razlog tomu smještenost aktivnih mjesta blizu vanjske površine enzima. Osim za postizanje optimalnog redukcijskog potencijala, ligandi imaju funkciju kontroliranja ulaska molekula supstrata, superoksidnog iona, u aktivno mjesto. Preciznije, tu ulogu ima Tyr9 analogno kao i kod Mn-SOD Tyr34 i Fe-SOD. Nadalje, struktura tunela koji vodi k aktivnom mjestu, u kojem se Tyr34 nalazi, slična je onima kod Mn-SOD i Fe-SOD.

Katalitički mehanizam, određen računalnom metodom modeliranja DFT odvija se preko dva prijelazna stanja (shema 4). Cys2 služi kao izvor protona za redukciju superoksida. Ista analiza sugerira kako aksijalni His1 ostaje vezan za niklov(III) ion prilikom redukcije, iako takva vrsta eksperimentalno nije opažena.<sup>2</sup>

Shema 4. Predloženi katalitički mehanizam Ni-SOD.<sup>2</sup>

Pulsna radioliza otkriva kako je konstanta specifičnosti enzima vrlo blizu difuzijskog limita,  $10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , te ne ovisi o vrijednosti pH (kada su u granicama fizioloških vrijednosti). Niklova superoksid-dismutaza je stoga katalitički gotovo savršen enzim. Skoro ista ovisnost o vrijednostima pH opažena je i kod Mn-SOD iako im se primarne i strukture aktivnog mjesta značajno razlikuju. Ni-SOD je moguće inhibirati cijanidnim ionima, vodikovim peroksidom reverzibilno te vrlo slabo azidom.

## 2.4. Bakar-cink-superoksid-dismutaza

Uz povećanje volumnog udjela kisika u atmosferi, bakrovi(II) ioni postali su biološki dostupniji te su se postupno razvile CuZn-SOD. Ovi enzimi smatraju se mlađim od ostalih vrsta superoksid-dismutaza. Prva CuZn-SOD otkrivena je 1969. kada su McCord i Fridovich otkrili kako je eritrokuprein, protein iz goveda, zapravo superoksid-dismutaza. Nedugo nakon, pronađene su i u ostalim eukariotima, bakterijama i arhejama. Smatra ih se najrasprostranjenijima.<sup>16</sup> Mutacije u ljudskom genu koji kodira CuZnSOD, *sod1*, povezuju se s obiteljskom amiotrofičnom laterlanom sklerozom. Kako bi enzim postao aktivan potrebne su posttranslacijske dorade koje često uključuju acetilaciju N-terminusa, nastajanje disulfidnih veza, dimerizaciju proteina i umetanje bakrovih i cinkovih iona.

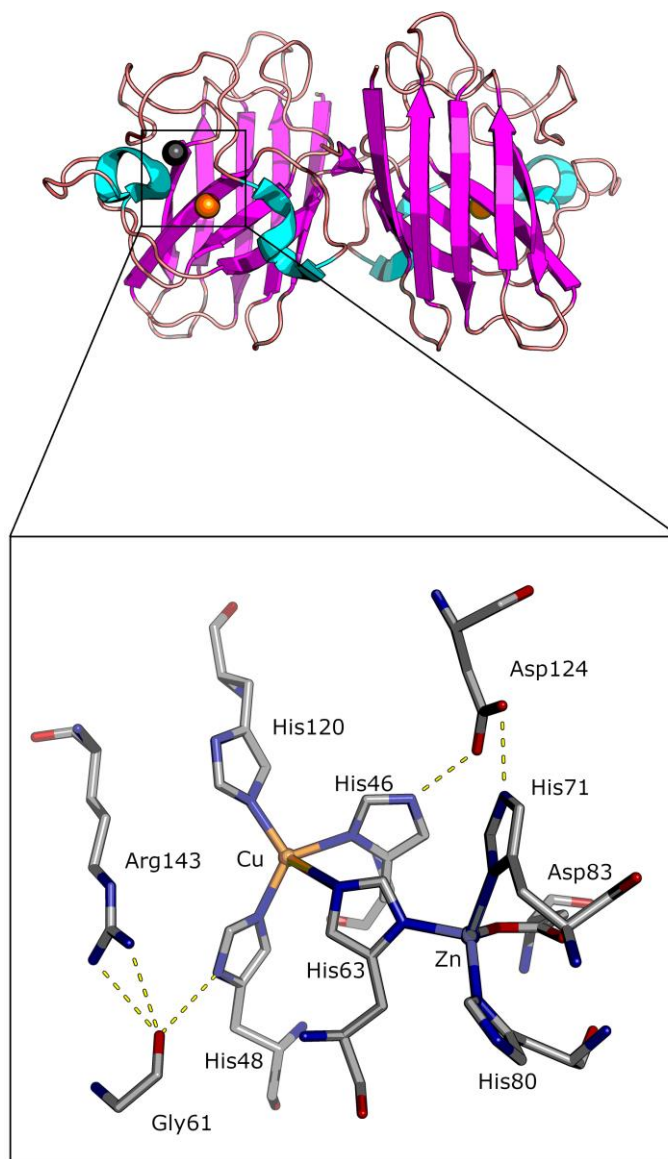
### 2.4.1. Struktura proteina

Eukariotski unutarstanični CuZn-SOD su dimeri stabilne kvaterne strukture. Dok su kod biljaka smješteni u kloroplastima i citoplazmi, kod životinja nalaze se u citosolu, jezgri stanice, lizosomima te mitohondrijskom intermembranskom prostoru.<sup>4</sup> Izvanstanični, poznati kao EC-SOD, su tetrameri pronađeni kod većine sisavaca te u mnogim biljkama. Prvi ovakav gljivični enzim otkriven u *S. cerevisiae* je dimer, manje stabilan nego eukariotski. Bakterijski periplazmatski mogu biti dimeri ili monomeri. Iako je struktura eukariotskih i prokariotskih podjedinica jednaka, odnosno sačuvana, interakcije među monomerima u dimernim strukturama znatno su različite.<sup>2</sup> CuZn-SOD iz ljudskih stanica je izvanstanični homotetramer s molekulskom masom 135 kDa (slika 4). Često je glikoziliran heparinom i heparan sulfatom. Homodimerna ljudska CuZn-SOD iznimno je stabilan enzim s temperaturom mekšanja 92 °C. Apoenzim pak, nastao uklanjanjem bakrova i cinkova iona, ima sniženu temperaturu mekšanja vrijednosti od 54 °C te je znatno manje stabilan.<sup>17</sup> Homodimerna unutarstanična eukariotska CuZn-SOD ima molekulsku masu 32 kDa. Obje podjedinice sadrže jedno aktivno mjesto s jednim bakrovim ionom i jednim cinkovim ionom koji su premošteni bočnim ogrankom histidina. Tercijarna struktura je oblika osmostruke antiparalelne  $\beta$ -bačve sa sedam spojnih petlji.<sup>2</sup> Osobitu strukturnu važnost imaju petlje IV i VII. U petlji IV nalaze se sva četiri ogranka koji koordiniraju cinkov ion te Cys57 (numeriranje se odnosi na enzim iz ljudskih stanica). Cys57 sa Cys146 stvara disulfidne veze ključno važne za stabilnost i građu svake podjedinice. Njihovu važnost potvrđuje izmjerena temperatura mekšanja apoenzima s reduciranim disulfidnim vezama od 42 °C. Petlja VII, nazvana elektrostatskom petljom, u svom

primarnom aminokiselinskom slijedu sadrži aminokiseline koje se prostorno nalaze u sekundarnoj sferi aktivnog mjesta te Arg143 važan za katalitičku funkciju. Elektrostatska petlja bitna je i za zaštitu aktivnog mjesta od molekula otapala.<sup>2</sup> Aktivno mjesto smješteno je na vanjskoj strani  $\beta$ -bačve.<sup>4</sup> Otkriveno je kako vezanje cinkovog iona na jednu podjedinicu humanog CuZn-SOD stabilizira drugu bez cinkovog iona te potiče na dimerizaciju, a temperatura mekšanja apopodjedinice poraste s 54 °C na 61 °C. Kada asociiraju dvije podjedinice koje obje sadrže cinkov ion temperatura mekšanja dodatno poraste.

#### 2.4.2. *Struktura aktivnog mjesta*

Trodimenzijska struktura aktivnog mjesta ovisna je o oksidacijskom stanju bakrovog iona. Bakrov(I) ion koordiniran je s bočnim ograncima His46, His48 i His120. Geometrija takvog aktivnog mjesta nalikuje na nepravilnu trigonsko-planarnu (slika 4). Cinkov ion koordiniran je četirima ligandima, bočnim ograncima His63, His71, His80 i Asp83 (monodentatno), u gotovo tetraedarskom okruženju. Na bakrov(II) ion dodatno je vezana molekula vode i bočni ogranak His63 koji ga premošćuje s cinkovim ionom. Prostorna struktura opisuje se nepravilnom četverostranom piramidom. Asp124 iz sekundarne sfere bočnim ogranakom stvara vodikove veze sa His71 i His46 (slika 4) te na taj način povezuje dva centra. Arg143 iz elektrostatske petlje i Gly61 također su važan dio sustava vodikovih veza.



Slika 4. Vrpčasta struktura (gore) i struktura aktivnog mjesta (dolje) dimernog enzima CuZnSOD iz ljudskih stanica. (PDB: 1PU0) Isrtakane linije predstavljaju vodikove veze, a pune linije koordinacijske veze.



### 2.4.3. Katalitički mehanizam

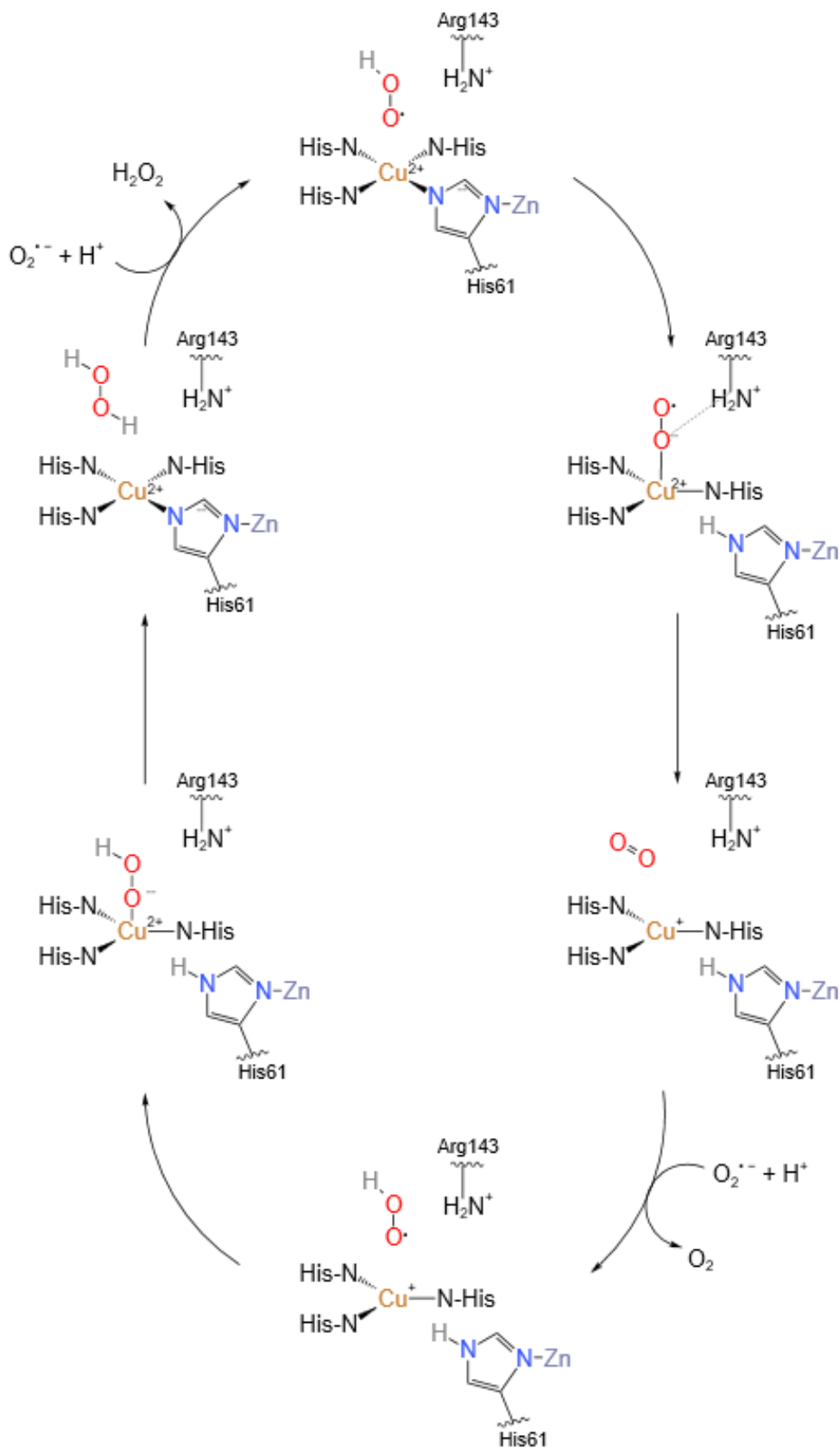
Disproporcioniranje supstrata zbiva se u dva koraka, tzv. ping-pong mehanizmom. Distribucija naboja na površini enzima izloženoj otapalu pomaže odvođenju supstrata u aktivno mjesto. U tom je procesu neizostavan bliski Arg143. U okviru vrijednosti pH od 5,0 do 9,5 konstanta specifičnosti gotovo je regulirana samom brzinom difuzije supstrata te neovisna o vrijednosti pH. Eukariotski CuZn-SOD inhibirani su molekulama vodikovog peroksida, dok prokariotski nisu. Inhibirani su i cijanidnim ionima kao i Ni-SOD te fluoridnim i azidnim ionima. Oksidacija molekule supstrata i redukcija bakrova(II) iona je neovisna o vrijednosti pH. S druge pak strane, reakcija redukcije molekule supstrata u molekulu vodikovog peroksida (uz oksidaciju bakrovog(I) iona) ovisi o vrijednosti pH. U odsutnosti cinkova iona pri vrijednosti pH većoj od 6, reaktivnost pada što je posljedica migracije bakrovog iona iz aktivnog mjesta u mjesto gdje se inače veže cinkov ion.<sup>2</sup> Uz disproporcioniranje superoksidnog supstrata, CuZn-SOD posjeduju i peroksidaznu aktivnost. Bakrov(II) ion u aktivnom mjestu reagira s hidroperoksidnim radikalom koji se oksidira te nastaje superoksidni radikal, a bakrov(II) ion se reducira. Sljedeća reakcija obuhvaća reakciju bakrovog(I) iona i hidroperoksidnog radikala. Nastali produkt je kompleks vezanog hidroksilnog radikala za aktivno mjesto u kojem je bakrov ion oksidiran. Vrlo reaktivan hidroksidni radikal ima potencijal oksidiranja histidinskih liganada oko iona bakra, a time i potencijal inaktivacije enzima.

Hidrogenkarbonat ubrzava inaktivaciju CuZn-SOD vodikovim peroksidom u odsustvu fosfata. Oksidacija bakrovog(I) iona u aktivnom mjestu uz hidrogenkarbonat odvija se preko peroksikarbonata.

Alternativni mehanizam, kojeg su predložili Liochev i Fridovich, obuhvaća oksidaciju Cu(I) iona molekulama vodikovog peroksida i nastajanje radikala vezanog za Cu(II) ion. U sljedećem koraku radikal reagira s molekulom ugljikovog dioksida te nastaje karbonatni radikal, a enzim postaje inaktivan. U konačnici može doći i do agregacije molekula proteina.<sup>18</sup>

Katalitički mehanizam CuZn-SOD detaljno je proučen pulsnom radiolizom te prikazan shemom 5. Važna pretpostavka u postuliranju mehanizma je protoniranje superoksidnog radikala prije nego se veže u aktivno mjesto. Na taj način vezani supstrat je neutralan hidroperoksidni radikal. Iako se s njegovim nastajanjem javlja opasnost od peroksidativne reakcije i oksidacije okolnih aminokiselina, ovaj mehanizam pruža brzo i sigurno disproporcioniranje takvog radikala. Otkrivena je vrlo slabo vezana molekula vode za Cu(II) ion, no katalitički je nevažna.<sup>16</sup> Dok se molekula supstrata u koraku oksidacije veže u

koordinacijsku sferu, korak redukcije molekule supstrata odvija se u sekundarnoj sferi gdje sustav vodikovih veza sudjeluje u prijenosu protona.<sup>4</sup> Bitno je naglasiti kako prostorne građe složenih bakrovih vrsta prikazane u mehanizmu nisu pravilne kvadratne niti kvadratno piramidalne strukture, već se radi o shematskom prikazu.



Shema 5. Predložen reakcijski mehanizam CuZnSOD.<sup>16</sup>

## 2.5. Fiziološka funkcija i njeni poremećaji

Fiziološka funkcija superoksid-dismutaza je zaštita stanica od oksidativne štete koju mogu uzrokovati superoksidni radikali. Mutacijama gena koji kodiraju superoksid-dismutaze i drugim vrstama oštećenja enzima, poput izostanka posttranslacijskih dorada, nastaju disfunkcionalni proteini koji dovode do raznih poremećaja i nagomilavanja oksidativnog stresa.

Jedan slučaj oštećenja enzima dovodi do obiteljske amiotrofične lateralne skleroze, tzv. FALS. Amiotrofična lateralna skleroza je neurodegenerativna bolest karakterizirana progresivnim odumiranjem neurona dovodeći do paralize pa čak i smrti. Većinom ALS je sporadičan, dok obiteljski obuhvaća samo manji broj slučajeva. Uzrok 10-15 % slučajeva obiteljskog ALS-a povezan je s mutacijama u SOD1 genu koje mogu biti locirane u regiji oko aktivnog mjesta ili u regijama udaljenim oko aktivnog mjesta. Radi se uglavnom o točkastim mutacijama, insercijama, delecijama i skraćivanju C-terminusa polipeptida.<sup>2</sup> Mutirani SOD1 ne uzrokuje FALS gubitkom superoksid-dismutazne aktivnosti, nego dobivjem nove toksične, peroksidativne.<sup>6</sup> Kako se kod neurodegenerativnih bolesti često pronalaze amiloidni fibrili i inkluzije, bolesti se mogu povezati sa agregacijom proteina. Sazrela, dimerna bakar cinkova superoksid-dismutaza je vrlo stabilna pa se predlaže kako do stvaranja oligomera ovog proteina dolazi prije posttranslacijskih dorada, inače potrebnih za njegovo sazrijevanje. Navedeno je i potvrđeno praćenjem agregacije apoenzima CuZn-SOD s reduciranim disulfidnim vezama elektronskom mikroskopijom.<sup>2</sup>

Jedna od važnosti manganovih superoksid-dismutaza očituje se u njihovoj povezanosti s mentalnim poremećajima. Smatra se kako je abnormalna aktivnost ovog enzima faktor rizika za pojavu shizofrenije, a povezuje ga se i s poremećajima raspoloženja poput manične depresije. Razlog tomu je njegova obrambena uloga od ozljede mozga i smrti neurona uslijed oksidativnog stresa.<sup>1</sup> Transkripcijom SOD2 gena nastaje pre-mRNA Mn-SOD koja dalje mora biti procesirana kako bi sazrela u mRNA koja će dalje biti translatirana. Pretpostavlja se kako je smanjena količina Mn-SOD u stanicama raka povezana s nedostatkom sazrelih mRNA, jer translacijom pre-mRNA nastaju neaktivni enzimi. Dodatna pretpostavka o uzroku smanjene količine Mn-SOD jest mutacija u dijelu gena koja rezultira ne prevođenjem enzima iz citosola u matriks mitohondrija gdje se generira najveća količina superoksida. Ipak, izravna veza između mutacije SOD2 gena i rizika nastajanja karcinoma nije poznata.<sup>5</sup>

Nadalje, proučavana je poveznica između Mn-SOD i stanica karcinoma. Stanice karcinoma su rapidne proliferacijske stanice koje za proliferaciju i dijeljenje troše veliku količinu energije.

U nekim stanicama karcinoma količine Mn-SOD su znatno manje, a u nekim znatno veće od količine Mn-SOD u normalnim stanicama. Stoga se nameće pitanje kako objasniti navedeno. Prema Warburgovom efektu, stanice karcinoma s malom količinom Mn-SOD dobivaju energiju putem glikolize te zahtijevaju velik utrošak glukoze s obzirom na to da glikolizom iz jedne molekule glukoze nastaju samo dvije molekule ATP-a. Potvrđeno je kako stanice karcinoma ne posjeduju defektne mitohondrije, te predloženo da one koje posjeduju malu količinu Mn-SOD, energiju za stanični ciklus crpe iz glikolize. Drugo objašnjenje za upotrebu glikolize jest da je ono posljedica prilagodbe na hipoksične uvjete u ranim stadijima razvoja stanica karcinoma. Pri kasnijim stadijima karcinogeneze, prilikom metastaziranja agresivnih karcinoma, potreba za energijom još je veća. U takvim slučajevima opažena je veća količina Mn-SOD nego u normalnim stanicama te objašnjena upravo znatno većom potrebom za energijom koju glikoliza više ne može nadoknaditi pa se energija crpi iz oksidativne fosforilacije.<sup>5</sup> Dodatno, ROS aktiviraju stanično signaliziranje te kroz niz reakcija u konačnici potiču proliferaciju i metastazu karcinoma.

Mnoge bolesti nastaju uslijed neadekvatnih upala koje su sastavni dio djelovanja limfocita i makrofaga u obrani od stranih „tijela“. Ključnu regulaciju u razvoju upala imaju antioksidativni enzimi od kojih je najbitniji Mn-SOD.<sup>19</sup>

Superoksidni radikal uzrokuje vaskularnu disfunkciju koja dovodi do hipertenzije. Pokazano je kako superoksid-dismutaze imaju ulogu u reduciranju pojave hipertenzije modulacijom vazodilatacije, vazokonstrikcije, srčane hipertrofije, neuronske kontrole aktivnosti simpatikusa.<sup>20</sup>

Mimetiци superoksid-dismutaza koriste se u terapijske svrhe, odnosno u kliničkim liječenjima oboljelih od karcinoma, ishemije, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, akutnih i kroničnih upalnih stanja poput cistične fibroze i reumatoidnog artritisa te kod prevencije i ublažavanja znakova starenja. Primjeri takvih mimetika su metaloporfirini, koordinacijski spojevi mangana i cikličkih poliamina ili derivata *N,N'*-etilenbis(salicilimina). Nativni CuZn-SOD može se koristiti kod liječenja multipla mijeloma, te pokazuje obećavajuće rezultate kod tretiranja akutnih i kroničnih upalnih stanja poput dermatosa, opekline i rana. Kao potencijalni inhibitori upala pokazali su se i Mn-SOD i izvanstanični CuZn-SOD.<sup>21</sup>

## § 3. LITERATURNI IZVORI

1. G. Bresciani, I. B. Manica da Cruz, J. Gonzalez-Gallego, *Adv. Clin. Chem.* **68** (2015) 87-130.
2. Y. Sheng, I. A. Abreu, D. E. Cabelli, M. J. Maroney, A.-F. Miller, M. Teixeira, J. S. Valentine, *Chem. Rev.* **114** (2014) 3854-3918.
3. J. A. Miller, *FEBS Letters* **586** (2012) 585-595.
4. A.-F. Miller, *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Vol. 8, Elsevier Ltd., 2003, 479-506.
5. S. K. Dhar, D. K. St. Clair, *Free Radical Biology and Medicine* **52** (2012) 2209-2222.
6. J. J. P. Perry, D. S. Shin, E. D. Getzoff, J. A. Tainer, *Biochim. Biophys. Acta* **1804** (2010) 245-262.
7. A.-F. Miller, K. Padmakumar, D. L. Sorkin, A. Karapetian, C. K. Vance, *J. Inorg. Biochem.* **93** (2003) 71-83.
8. T. A. Jackson, C. T. Gutman, J. Maliekal, A.-F. Miller, T. C. Brunold, *Inorg. Chem.* **52** (2013) 3356-3367.
9. J. Azadmanesh, G. E. O. Borgstahl, *Antioxidants* **7** (2018) 1-16.
10. Y. Sheng, E. B. Gralla, M. Schumacher, D. Cascio, D. E. Cabelli, J. S. Valentine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109** (2012) 14314-14319.
11. V. Pelmeshnikov, P. E. M. Siegbahn, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 7466-7475.
12. P. A. Bryngelson, M. J. Maroney, *Met. Ions Life Sci.* **2** (2007) 417-444.
13. D. P. Barondeau, C. J. Kassmann, C. K. Bruns, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, *Biochemistry* **43** (2004) 8038-8047.
14. C. L. Dupont, K. Neupane, J. Shearer, B. Palenik, *Environ. Microbiol.* **10** (2008) 1831-1843.
15. K. C. Ryan, O. E. Johnson, D. E. Cabelli, T. C. Brunold, M. J. Maroney, *J. Biol. Inorg. Chem.* **15** (2010) 795-807.
16. V. Pelmeshnikov, P. E. M. Siegbahn, *Inorg. Chem.* **44** (2005) 3311-3320.
17. I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 18515-18517.
18. S. I. Liochev, I. Fridovich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004) 743-744.
19. C. Li, H.-M. Zhou, *Enzyme Res.* **2011** (2011) 1-6.

20. T. Fukai, M. Ushio-Fukai, *Antiox. Redox Signaling* **15** (2011) 1583-1606.
21. H. Younus, *Int J Health Sci* **12** (2018) 88-93.