

## Efekat peroksinitrita na MnSOD: nitrovanje tirozina i inaktivacija enzima

*U ovom radu je ispitivan efekat peroksinitrita na strukturu i aktivnost MnSOD. Peroksinitrit deluje na MnSOD tako što dovodi do njegove inaktivacije. Inaktivacija enzima je povezana sa nitrovanjem tirozina i agregiranjem enzima usled nastajanja ditirozina. Kinetika nitrovanja pokazuje efekat zasićenja što jasno ukazuje da se ne radi o jednostavnoj reakciji nitrovanja već reakciji verovatno katalizovanoj manganom u aktivnom centru enzima. Glutathion pokazuje odličan protektivni efekat na enzim, pri koncentracijama koje su niže od fizioloških, dok je cistein slabo protektivno sredstvo. Vitamin C pokazuje suprotan efekat od očekivanog, ali se to može povezati sa nastajanjem proizvoda u reakciji sa ONOO<sup>-</sup> koji bi svojim raspadanjem mogao dati reaktivne azotne vrste koje bi dovele do nitrovanja specifičnog tirozina. Ovi rezultati bacaju novo svetlo na mehanizam nitrovanja in vivo i otvaraju mogućnost daljeg rada na njegovom razjašnjavanju.*

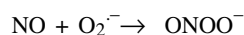
### Uvod

Mangan superoksid dismutaza (MnSOD) je SOD izoforma nađena u mitohondrijalnom matriksu eukariota i mnogih prokariota. Enzimi iz različitih izvora imaju visok stepen sličnosti i sadrže identične metal-helirajuće aminokiselinske ostatke u aktivnom centru (Bannister *et al.* 1987; Strobe *et al.* 2001). U eksperimentima vršenim na pacovima pokazano je da smanjena aktivnost MnSOD dovodi do patoloških promena u nizu organa, kao što je oštećenje miokarda, masna jetra i anemija (Melov *et al.* 1999, Li *et al.* 1995). MnSOD katalizuje dekompoziciju O<sub>2</sub><sup>-</sup> i stoga igra aktivnu ulogu u detoksifikaciji ćelije

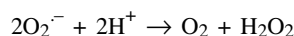
od reaktivnih kiseoničnih vrsta (Bannister *et al.* 1987; Strobe *et al.* 2001).

Azot monoksid (NO) je sveprisutni ćelijski glasnik koji reguliše brojne fiziološke procese, ali njegova prekomerna proizvodnja značajno doprinosi patologiji raznih bolesti (Moncada *et al.* 1991; Eiserich *et al.* 1998). Patološki efekti azot monoksida su povezani sa generisanjem reaktivnih azotnih vrsta (RNS, reactive nitrogen species), kao što je peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>).

Peroksinitrit nastaje u reakciji NO sa superoksid anjon radikalom (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) i smatra se glavnim medijatorom NO-indukovane citotoksičnosti (Eiserich *et al.* 1998; Groves 1999; Huie i Padmaja 1993).



Superoksid anjon radikal (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) nastaje kao sporedni proizvod u normalnom aerobnom metabolizmu, a njegova produkcija može biti povećana u raznim patološkim stanjima. Uloga enzima superoksid dismutaze (SOD), je da katalizuje disproporcionisanje superoksid anjon radikala u kiseonik i vodonik peroksid (Fridovich 1983; Fridovich 1986):



Nastajanje značajnijih količina peroksinitrita može se očekivati na mestima gde je lokalna koncentracija NO visoka (Lancaster 1994; Koppenol 1998), ili u delovima ćelije u kojima se SOD nalazi u manjim od mikromolarnih koncentracija (Wink i Mitchell, 1998).

Najviše izučavana reakcija peroksinitrita sa proteinima je reakcija nitrovanja ostataka tirozina. Nitrovanje ostataka tirozina *in vivo* često se uzima kao indikacija generisanja peroksinitrita. Ova reakcija može imati potencijalno štetne posledice za biološke sisteme (Koppenol *et al.* 1992; Koppenol 1998; Halliwell i Gutteridge 1999).

---

*Nemanja Marjanović (1987), Indija, Karađorđeva 32a/5, učenik 3. razreda Gimnazije u Indiji*

**MENTOR:**

*Miloš Filipović, IHTM-Centar za hemiju*

**Cilj** ovog rada bio je da se ispita i delimično karakteriše efekat peroksinitrita na strukturu i aktivnost MnSOD. Ispitani su i efekti cisteina, glutatona i vitamina C (askorbinske kiseline) na zaustavljanje inaktivacije enzima.

## Materijal i metode

### Priprema peroksinitrita

Peroksinitrit je pripreman po postupku datom u Feelisch-Stamler 1996.

### Tretiranje uzoraka

MnSOD (30 mL) je tretiran različitim koncentracijama peroksinitrita, a zatim inkubiran 15 minuta na 37°C. Eksperimenti su ponovljeni u prisustvu cisteina, glutatona i vitamina C (finalna koncentracija 100 mM) .

### UV-VIS spektrometrija enzima

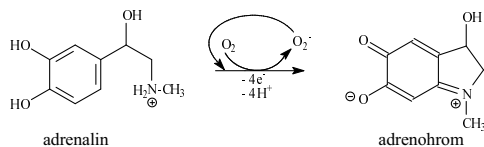
Zbog prisustva jona metala u aktivnom centru enzim apsorbuje svetlost u vidljivom delu spektra. Snimanje spektra enzima pre i posle tretmana peroksinitritom može da ukaže na strukturne promene u enzimu. Snimljen je spektar enzima u opsegu 250-500 nm, kao i spektri enzima sa različitim koncentracijama peroksinitrita.

### Određivanje 3-nitrotirozina spektrofotometrijski (Riordan & Vallee 1972)

3-nitrotirozin (3-NTYR) je određen spektrofotometrijski tako što je pH uzorka podešen na 9. 3-NTYR ima karakterističan spektar u alkalnoj sredini sa maksimumom na 428 nm. Snimljen je spektar uzorka i potom je određena koncentracija na osnovu absorbance na 428 nm. Molarni apsorpcioni koeficijent 3-nitrotirozina na 428 nm je  $4200 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ .

### Određivanje aktivnosti MnSOD

Metoda za određivanje aktivnosti SOD (modifikovano iz Misra & Freedovich, 1971) zasniva se na autooksidaciji adrenalina pri kojoj se oslobađa superoksid anjon radikal i adrenohrom koji apsorbuje na 480 nm.



Postupak je sledeć: U 3 mL 0.05 M karbonatnog pufera pH 10.2 dodata je određena zapremina (10–80  $\mu\text{L}$ )  $310^{-4}$  M rastvora adrenalina u 0.02 M HCl dok se ne postigne promena apsorbance od 0.019–0.024 u minuti, tokom 4 minuta (promena apsorbance je praćena spektrofotometrijski na 480 nm). Ukoliko je promena apsorbance veća ili manja, eksperiment se ponavlja sa manjom, odnosno većom zapreminom rastvora adrenalina. Dobijena vrednost za promenu apsorbance (brzine autooksidacije adrenalina) predstavlja  $K$  u jednačini za izračunavanje aktivnosti SOD. Brzina autooksidacije adrenalina u prisustvu SOD ( $A$ ) dobija se tako što se merenje ponovi uz dodatak one količine SOD (0.3–0.5 mg/mL) koja će izazvati smanjenje apsorbance na 0.010–0.014 u minuti, tokom 4 minuta. Ukoliko je promena apsorbance veća ili manja, eksperiment se ponavlja sa većom, odnosno manjom zapreminom rastvora SOD ( $V$  u jednačini za izračunavanje aktivnosti SOD). Ovako određene vrednosti za  $K$ ,  $A$ ,  $V$ ,  $R$  i  $C_{\text{prot}}$  uvrstiti u jednačinu za određivanje aktivnosti SOD.

Količina SOD izražena je u jedinicama SOD aktivnosti po mg proteina:

$$U = \frac{2 (\Delta K - \Delta A) \cdot R}{\Delta K \cdot V \cdot C_{\text{prot}}}$$

gde je  $K$  – promena apsorbance u kontrolnoj probi u minuti,  $A$  – promena apsorbance u uzorku sa enzimom u minuti,  $V$  – zapremina uzorka u mL,  $C_{\text{prot}}$  – koncentracija proteina u mg/mL, a  $R$  – razblaženje uzorka

### SDS-PAGE (Laemmli 1970)

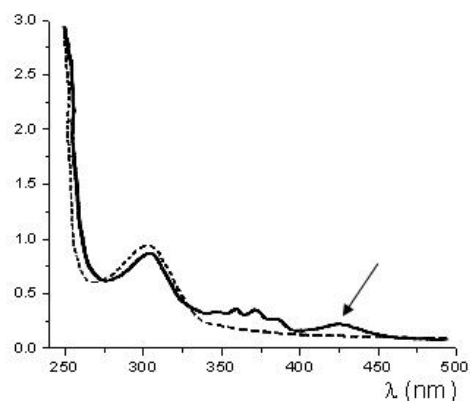
Natrijum dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza izvedena je na 10% gelu pri naponu od 160 V, jaćini struje od 30 mA, na 4 °C, tokom 2 sata na sistemu za elektroforezu (Mighty Small, Hoefer, San Francisco). Za bojenje gela korišćena ja boja Coomassie Blue R-250.

## Rezultati i diskusija

### Inaktivacija enzima: formiranje 3-NTYR i diTYR

Štetna dejstva peroksinitrita ogledaju se u njegovoj snažnoj nitrujućoj i oksidujućoj moći, pri čemu on neselektivno reaguje sa molekulima u okolini. Snimanjem UV-VIS spektara pre i posle tretmana

MnSOD sa  $\text{ONOO}^-$  uočeno je pojavljivanje apsorpcionog maksimuma na 428 nm, što odgovara nitrotirozinu (slika 1A). Kako MnSOD u neposrednoj blizini aktivnog mesta ima tirozinski ostatak (Tyr 34), čije bi nitrovanje dovelo do inaktivacije enzima (MacMillan-Crow *et al.* 2001), u daljem radu je praćena promena aktivnosti MnSOD u zavisnosti od količine dodatog peroksinitrita kao i korelaciju sa nastalim 3-NTYR (slika 1B).



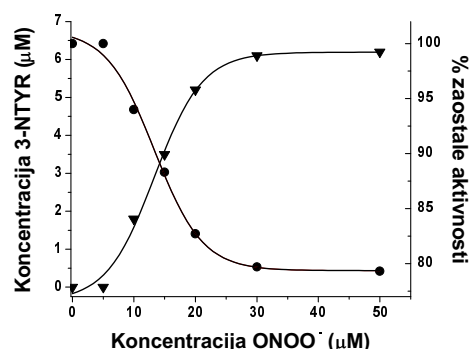
Slika 1A. Strukturne promene MnSOD izazvane peroksinitritom. UV-VIS spektar enzima pre (isprekidana linija) i posle tretiranja sa 30 mM  $\text{ONOO}^-$  (puna linija). pH rastvora je pre snimanja spektra podešeno na 9. Strelicom je označen maksimum na 428 nm, karakterističan za 3-nitrotirozin.

Figure 1A. The effects of  $\text{ONOO}^-$  on MnSOD structure. UV-VIS spectra from untreated and peroxyinitrite treated MnSOD. pH of the solution were adjusted to 9. Arrow indicates the specific peak at 428 nm that originate from 3-NTYR.

Rezultati jasno ukazuju da je pri niskim koncentracijama peroksinitrit efikasniji nitrujući agens, ali da se njegova nitrujuća moć smanjuje kako koncentracija premašuje koncentraciju enzima. Pri koncentracijama  $\text{ONOO}^-$  većim od 30 mM količina nastalog 3-NTYR se ne menja.

Maksimalna količina detektovanog 3-NTYR iznosi 6  $\mu\text{M}$  što odgovara inaktivaciji od 20%. Inaktivacija potpuno prati pojavu nitrotirozina ukazujući da on najverovatnije nastaje u aktivnom centru.

Pojava zasićujućeg platoa može se objasniti visokom nestabilnošću peroksinitrita u rastvoru fiziološkog pH, ali i činjenicom da prisustvo metalnog jona u aktivnom centru enzima dodatno katalizuje njegovo



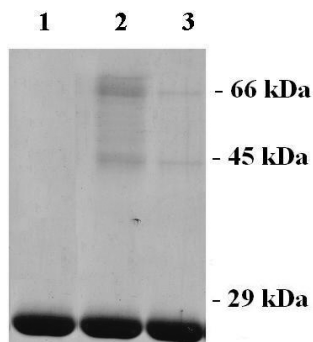
Slika 1B. Efekat  $\text{ONOO}^-$  na aktivnost i formiranje 3-NTYR u enzimu. Uzorci su tretirani naznačenim koncentracijama peroksinitrita i inkubirani 15 minuta na 37 °C. Nakon toga su određivani aktivnost i koncentracija 3-NTYR kao što je objašnjeno u Materijalu i metodama.

Figure 1B. The effects of peroxyinitrite on MnSOD to 3-NTYR formation. All samples were treated with indicated concentrations of peroxyinitrite and incubated for 15 min at 37 °C. Enzyme activity and 3-NTYR concentrations were determined as described in Material and methods section. Circles represent MnSOD activity, while triangles correspond to 3-NTYR.

raspadanje. Naime skoriji radovi pokazuju da joni mangana ubrzavaju raspadanje  $\text{ONOO}^-$  na  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{OH}^-$ , tako da ovako dobijena kinetika jako liči na enzimsku kinetiku zasićenja (Radi *et al.* 2002).

Pored nitrujućih sposobnosti, peroksinitrit je jak oksidacioni agens, što se najčešće ogleda u nastajanju ditirozina. Kao posledica formiranja ditirozina dolazi do agregiranja proteina. Rezultati SDS PAGE (slika 2) pokazuju postojanje dodatnih traka u uzorcima tretiranim peroksinitritom. Molekulske mase proteina u ovim trakama odgovaraju dimernim i trimernim formama, verovatno nastalim građenjem ditirozina od ostataka Tyr koji se nalaze na površini enzima.

Uzeti zajedno, ovi rezultati jasno demonstriraju da peroksinitrit ima dramatičan efekat na strukturu i aktivnost MnSOD. Radovi MacMillan-Crow *et al.* 2001. pokazuju da se kod poremećaja povezanih sa overprodukcijom NO, MnSOD nitruje i agregira. Ova selektivnost u nitrovanju svakako je izuzetak, uzimajući u obzir veliku reaktivnost  $\text{ONOO}^-$ , i može se objasniti ranijim radovima (Radi *et al.* 2002) da



Slika 2. SDS-PAGE uzoraka tretiranih različitim koncentracijama peroksintrita. Traka 1 predstavlja kontrolu, traka 2 MnSOD tretiran sa 30 mM peroksintrita, a traka 3 MnSOD tretiran sa 15  $\mu\text{M}$  ONOO<sup>-</sup>. Sa strane su naznačeni markeri definisanih molekulske masa.

Figure 2. SDS-PAGE of peroxynitrite-treated MnSOD. Lane 1: Control MnSOD; Lanes 2 and 3: MnSOD treated with ONOO<sup>-</sup> (30 mM and 15 mM, respectively).

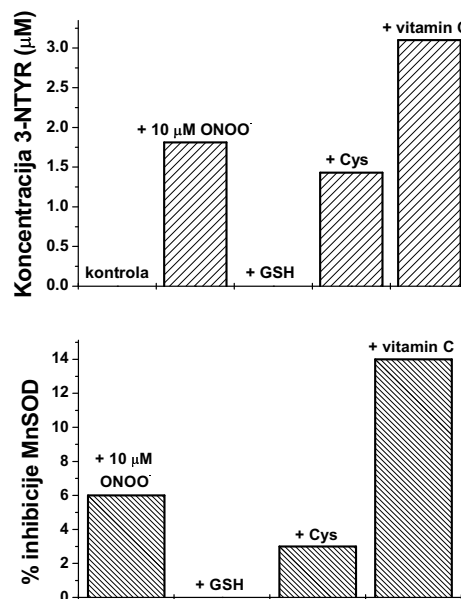
metalni centri katalizuju raspadanje peroksintrita na reaktivne vrste, na šta i ovde prikazani rezultati ukazuju (slika1B).

### Efekat cisteina, glutationa i vitamina C

Niskomolekulski tioli i vitamin C, inače rasprostranjeni u organizmu, dobri su hvatači (scavenger) peroksintrita i mogu da spreče njegovo štetno dejstvo (Feelisch & Stampler 1996). Da bi se to ispitalo, korišteni su cistein, glutation i vitamin C u koncentraciji od 100 mM, što odgovara realnim fiziološkim uslovima. Efekti na aktivnost i stvaranje 3-NTYR su prikazani na slici 3. Glutation, koji je inače najzastupljeniji u organizmu, potpuno blokira dejstvo ONOO<sup>-</sup>. Cistein pokazuje određeno protektivno dejstvo ali slabo, dok je askorbat pokazao suprotan efekat od očekivanog i povećao nitrovanje enzima. Međutim noviji radovi pokazuju da askorbat reaguje sa peroksintritom dajući proizvode koji imaju NO donorsko dejstvo. Oslobođeni NO bi mogao da bude dismutovan od strane enzima dajući vrtse koje mogu direktno reagovati u aktivnom centru (Filipović *et al.* 2005).

Uzimajući u obzir da je glutation u organizmu zastupljen u milimolarnim koncentracijama, ostaje

pitanje kako je moguće da je MnSOD nitrovan pri uslovima povećane produkcije NO (MacMillan-Crow *et al.* 1998, 2001). Kako rezultati pokazuju, peroksintrit zaista izaziva modifikacije koje su nađene *in vivo* u ovim slučajevima. Čini se verovatnim da ovi efekti potiču od ONOO<sup>-</sup> koji bi mogao nastati u aktivnom centru (Niketić *et al.* 1999), nego od onog koji nastaje iz nezavisnih izvora, pa zatim difunduje do enzima. Takođe, uzimajući u obzir da nitrovanje enzima pokazuje kinetiku zasićenja, moguće je da ova selektivnost potiče od specifičnih svojstava enzima, pre svega mangana u aktivnom centru. Ostaje zanimljivo videti kojim bi mehanizmom ONOO<sup>-</sup> mogao nastati u aktivnom centru i da li bi efekti bili isti kao i nakon tretmana već formiranim peroksintritom.



Slika 3. Efekat Cys, GSH i AscH<sup>-</sup> na stvaranje 3-NTYR (gore) i inhibiciju MnSOD (dole). U uzorke koji su sadržavali 30 mM MnSOD dodati su Cys, GSH ili AscH<sup>-</sup>, finalno do 100 mM i tretirani sa 10 mM peroksintrita.

Figure 3. Effects of Cys, GSH and AscH<sup>-</sup> on 3-NTYR formation (above) and MnSOD activity (below). In samples containing 30 mM MnSOD Cys, GSH or AscH<sup>-</sup> were added to final concentration of 100 mM and then treated with 10 mM peroxynitrite

## Zaključak

Peroksinitrit deluje na MnSOD tako što dovodi do njegove inaktivacije. Inaktivacija enzima je povezana sa nitrovanjem tirozina i agregiranjem enzima usled nastajanja ditirozina. Glutation pokazuje odličan protektivni efekat na enzim, pri koncentracijama koje su niže od fizioloških, dok je cistein slabo protektivno sredstvo. Vitamin C pokazuje suprotan efekat od očekivanog, ali se to može povezati sa nastajanjem proizvoda u reakciji sa ONOO<sup>-</sup> koji bi svojim raspadanjem mogao dati reaktivne azotne vrste koje bi dovele do nitrovanja tirozina. Rezultati bacaju novo svetlo na mehanizam nitrovanja *in vivo* i otvaraju mogućnost daljeg rada na njegovom razjašnjavanju.

## Literatura

- Bannister J.V., Bannister W.H. & Rotilio G. 1987. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **22**: 111.
- Eiserich J.P., Patel R.P., & O'Donnell V.B. 1998. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol. Aspects Med.* **19**: 221.
- Feelisch M. & Stamler J.S. 1996 Donors of nitrogen oxides. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler J.S.), pp. 71-115. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Filipović M., Stanić D., Nikolić M., Stojanović S., Raičević S. & Niketić V. 2005. The effects of nitric oxide and peroxynitrite on MnSOD (*E. Coli*). *Free Radical School 2004 - Free radicals and diseases: gene expression, cellular metabolism and pathophysiology*, Proceedings in press
- Fridovich I. 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**: 239.
- Fridovich I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* **247**: 1.
- Fukuto J.M. & Ignarro L.J. 1997. In vivo aspects of nitric oxide chemistry: Does peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) play a major role in cytotoxicity? *Accounts Chem. Res.* **30**: 149.
- Groves J.T. 1999. Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**: 226.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, University Press, Oxford.
- Huie R.E. & Padmaja S. 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* **18**: 195.
- Koppenol W.H. 1998. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Rad. Biol. Med.* **25**: 385.
- Koppenol W.H., Moreno J.J., Pryor W.A., Ischiropoulos H., & Beckman J.S. 1992. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* **5**: 834.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680.
- Lancaster J.R., Jr. 1994. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **91**: 8137.
- Li Y., Huang T.T., Carlson E.J., Melov S., Ursell P.C., Olson J.L., Noble L.J., Yoshimura M.P., Berger C., & Chan P.H. 1995. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* **11**: 376.
- Macmillan-Crow L.A. & Cruthirds D.L. 2001. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic. Res.* **34**: 325.
- MacMillan-Crow L.A., Crow J.P., & Thompson J.A. 1998. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* **37**: 1613.
- Melov S., Coskun P., Patel M., Tuinstra R., Cottrell B., Jun A.S., Zastawny T.H., Dizdaroglu M., Goodman S.I., Huang T.T., Miziorko H., Epstein C.J., & Wallace D.C. 1999. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 846.
- Misra H. P. & Fridovich I. 1971. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and the simple assay for superoxide dismutase. *JBC.* **217**: 3170.
- Moncada S., Palmer R.M., & Higgs E.A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109.
- Niketić V., Stojanović S., Nikolić A., Spasić M., & Michelson A.M. 1999. Exposure of Mn and FeSODs, but not Cu/ZnSOD, to NO leads to

nitrosonium and nitroxyl ions generation which cause enzyme modification and inactivation: an in vitro study. *Free Rad. Biol. Med.* **27**: 992.

Radi R., Cassina A., Hodara R., Quijano C. & Castro L. 2002. Peroxynitrite reaction and formation in mitochondria. *Free Rad. Biol. Med.* **33**: 1451.

Riordan J.F. & Vallee B.L. 1972. Nitration with tetranitromethane. In *Methods in Enzymology* (ed. Hirs C.H.W. and Timasheff S.N.), Vol.25, pp. 515-521. Academic Press, New York.

Stroupe M.E., DiDonato M., and Tainer J.A. 2001. Manganese superoxide dismutase. In *Handbook of Metalloproteins* (ed. Messerschmidt A., Huber R., Poulos T., and Wieghardt K.), pp. 940-951. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.

Wink D.A. & Mitchell J.B. 1998. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad. Biol. Med.* **25**: 434.

---

*Nemanja Marjanović*

## Effect of Peroxynitrite on MnSOD: Tyrosine Nitration and Enzyme Inactivation

Manganese superoxide dismutase (MnSOD) is the SOD isoform found in mitochondrial matrix of eukaryotes and in variety of prokaryotes. The biological role of MnSOD is detoxification of superoxide radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) (via its catalytic dismutation to molecular oxygen and  $H_2O_2$ ) which is continually generated via misfires of the electron transport chain as well as other sources. Peroxynitrite, product of reaction of nitric oxide (NO) with superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), is considered to be major mediator of NO-induced cytotoxicity. This paper examines the effects of peroxynitrite on structure and activity of MnSOD. The results show that  $ONOO^-$  causes MnSOD inactivation through specific tyrosine residue nitration and oxidation. Nitration reaction shows a saturation kinetics, indicating that reaction is more complex, presumably catalyzed by manganese at the active site of the enzyme. Glutathione shows protective effects on MnSOD inactivation, even at concentration levels lower than physiological. Cysteine exhibits moderate protective effects, while vitamin C enhances nitrotyrosine formation. This may be due to its reaction with peroxynitrite which leads to different products formation that may be sources of reactive nitrogen species. The results shed a new light on nitration mechanisms *in vivo* and open a possibility of further research on their elucidation.

