



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Josipa Mihalinec

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

SUPEROKSID-DISMUTAZE

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2017.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

8. kolovoza 2017.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujna 2017.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. SUPEROKSID-DISMUTAZE.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.2
2.1. Željezo-superoksid-dismutaze, FeSOD	4
2.1.1. Proteinska struktura i aktivno mjesto	4
2.1.2. Katalitički mehanizam	6
2.1.3. Usporedba FeSOD i MnSOD	6
2.2. Mangan-superoksid-dismutaze, MnSOD.....	8
2.2.1. Proteinska struktura.....	8
2.2.2. Aktivno mjesto.....	8
2.2.3. Katalitički mehanizam.....	10
2.3. Nikal-superoksid-dismutaze, NiSOD.....	11
2.3.1. Elektrodni potencijal.....	11
2.3.2. Proteinska struktura.....	11
2.3.3. Aktivno mjesto.....	12
2.3.4. Katalitički mehanizam.....	13
2.4. Bakar – cink-superoksid-dismutaze, CuZnSOD	14
2.4.1. Proteinska struktura i aktivno mjesto SOD1.....	15
2.4.2. Proteinska struktura i aktivno mjesto SOD2.....	17
2.4.3. Katalitički mehanizam SOD1	17
2.4.4. CuSOD	18
2.4.5. Amiotrofična lateralna skleroza, ALS.....	18
 Kratki pregled obrađene teme.....	20
2.5. Superoksid-reduktaze, SOR.....	21
2.6. Superoksid-dismutaze u patogena	22
2.7. Oksidativni stres i industrijska primjena SOD	23
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	25

§ Sažetak

Superoksidni anion, $O_2^{\cdot-}$, nastaje staničnim disanjem i kao imunološki odgovor na patogene organizme. Njegove povišene koncentracije uzrokuju oksidativan stres koji narušava normalnu funkciju stanice. Superoksid-dismutaze su metaloenzimi koji kataliziraju disproporcioniranje superoksidnog aniona na molekularni kisik i vodikov peroksid. Oni mogu sadržavati željezo, mangan, nikal te bakar i cink koji promjenom svog oksidacijskog stanja daju funkciju enzimu. Kataliza se odvija brzinom difuzije u dva koraka ping-pong mehanizmom te je neovisna o fiziološki bliskim pH-vrijednostima .

FeSOD je uglavnom prisutna u primitivnim organizmima i posjeduje dimernu proteinsku strukturu. MnSOD je u prokariota dimer smješten u citosolu stanice, dok je u eukariota većinom tetramer. U aerobnim stanicama se nalazi u mitohondrijskom matriksu, a u biljnim u kloroplastima. FeSOD i MnSOD posjeduju sličnu proteinsku strukturu i strukturu aktivnog mjesta te postoje oblici enzima koji su aktivni neovisno o tome koji je od ta dva metala vezan.

Neke bakterije i cijanobakterije upošljavaju NiSOD. NiSOD se po svojoj strukturi poprilično razlikuje od ostalih superoksid-dismutaza, no njezina katalitička aktivnost je jednako efikasna.

U sisavaca se nalazi CuZnSOD u unutarstaničnom (SOD1) i izvanstaničnom (SOD3 ili EC-SOD) prostoru, a prisutna je i u bakterija. U izvanstaničnom prostoru gljiva moguće je naći samo CuSOD. SOD1 je dimer, a SOD 3 tetramer. Samo je bakrov ion redoks aktivan. Poremećaji u strukturi SOD1 povezuju se s razvojem amiotrofične lateralne skleroze, no točan uzrok i metode liječenja su još nepoznati.

Osim SOD koje kataliziraju reakcije redukcije i oksidacije superoksidnih na iona, postoje i superoksid-reduktaze koje kataliziraju samo reduktivni proces. One u jednom polipeptidnom lancu mogu imati jedan ili dva atoma željeza.

Superoksid-dismutaze imaju potencijalnu primjenu u liječenju raznih oboljenja, no problem predstavlja unos u organizam i ciljano djelovanje, su danas predmet mnogih istraživanja .

§ 1. UVOD

Aerobnim metabolizmom glukoze proizvodi se mnogo više energije nego samom glikolizom. U oksidacijskoj fosforilaciji krajnji akceptor elektrona je kisik. Prijenos četiri elektrona na molekularni kisik katabolizira enzim oksidaza citokroma c pri čemu nastaje uobičajen i bezopasan metabolit – voda. Ukoliko dođe do prijenosa jednog elektrona nastaje superoksidni anion, O_2^- , a prijenosom dva elektrona nastaje peroksidni anion, O_2^{2-} . Oksidaza citokroma c i ostali proteini koji reduciraju kisik sprječavaju otpuštanje međuprodukata, ali ipak nastaju male količine superoksidnog aniona. Zajednički naziv za superoksid, vodikov peroksid i za ostale molekulske vrste koje iz njih nastaju je reaktivne kisikove vrste (*engl. Reactive Oxygen Species, ROS*). Smatra se da oni svojim oksidacijskim djelovanjem uzrokuju starenje i niz bolesti.

Život na Zemlji se pojavio prije 3,5 milijardi godina kada je razina kisika u atmosferi bila vrlo mala te nije bilo potrebe organizama za zaštitu od ROS-a. Prije 2,4 milijarde godina cijanobakterije su procesom fotosinteze povećale koncentraciju kisika što je potaknulo razvitak novih metaboličkih puteva. Aerobni i anaerobni organizmi, kako bi se zaštitili od štetnog djelovanja ROS-a, razvili su antioksidacijske enzime superoksid-dismutaze, SOD (*engl. Superoxide Dismutases*). SOD su enzimi koji kataliziraju pretvorbu superoksidnih radikala u vodikov peroksid i molekularni kisik te na taj način štite stanicu od potencijalnih oksidacijskih oštećenja.



Enzim katalaza uklanja vodikov peroksid reakcijom disproporcioniranja na vodu i molekularni kisik.



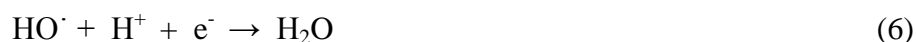
Postoje tri tipa superoksid-dismutaza koje su međusobno nezavisno evoluirale. To su redoks-aktivni metaloenzimi koji velikom brzinom selektivno reagiraju sa superoksidnim anionom, ali su strukturno različiti. Mogu sadržavati nikal (NiSOD), željezo ili mangan (FeSOD, MnSOD) te bakar i cink (CuZnSOD).^{1,2}

U ovom radu ću ukratko prikazati strukturu, mehanizame djelovanja superoksid-dismutaza, njihov utjecaj na neka patološka stanja te potencijalnu primjenu u liječenju.

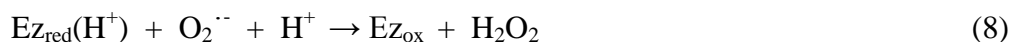
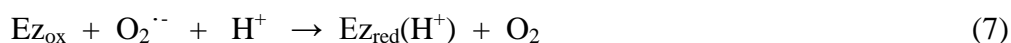
§ 2. SUPEROKSID-DISMUTAZE

Razgradnjom goriva nastaju NADH i FADH₂ čiji elektroni u ciklusu oksidacijske fosforilacije u konačnici reduciraju kisik uz nastanak protonskog gradijenta koji se kasnije koristi za sintezu ATP-a.

Redukcija kisika odvija se u četiri koraka pri kojima nastaju međuprodukti koje nazivamo reaktivnim kisikovim vrstama. To su superoksidni anion, O₂^{•-}, vodikov peroksid, H₂O₂, i hidroksilni radikal, HO[•].



Taj proces katalizira oksidaza citokroma c. Njezina je uloga prijenos četiri elektrona sa citokroma c i četiri protona iz matriksa mitohondrija na kisik uz izbacivanje četiri protona iz matriksa u membranski prostor mitohondrija. Osim toga, ona zadržava reaktivne kisikove vrste do kraja reakcijskog ciklusa te na taj način sprječava njihovo štetno djelovanje na organizam uzrokovanim preranim otpuštanjem s enzima. Međutim, dio njih ipak biva otpušten. Disproporcioniranje superoksidnog aniona kataliziraju superoksid-dismutaze u dva koraka ping-pong mehanizmom. Brzina reakcije je bliska brzini difuzije te se mijenja vrlo malo u rasponu fiziološke pH vrijednosti.



Ovisno o kojem metalu se radi Ez_{ox} označava Cu²⁺Zn²⁺, Fe³⁺, Mn³⁺ ili Ni³⁺, a Ez_{red} označava Cu⁺Zn²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺ ili Ni²⁺. U prvoj reakciji dolazi do redukcije iona metala pri čemu se superoksidni anion prevodi u molekulski kisik. Drugom reakcijom obnavlja se oksidirani oblik metala uz potrošnju još jednog superoksidnog aniona te nastankom vodikova peroksida.

Dakle, enzim reakciju drugog reda s obzirom na superoksidni anion rastavlja na dvije reakcije prvog reda koje se odvijaju vrlo brzo čak i pri vrlo niskim koncentracijama superoksidnog aniona. Na taj način superoksid-dismutaze održavaju vrlo niske koncentracije

superoksidnog aniona ($[O_2^-] \approx 2 \times 10^{-10} \text{ mol dm}^{-3}$). Kako bi ova reakcija bila termodinamički povoljna, elektrodni potencijali, E , enzima moraju biti između $-0,18$ i $+0,19$ V. Redukciju oksidiranog oblika enzima prati prijenos protona na njegov ligand. U slučaju FeSOD i MnSOD protonira se OH^- pri čemu nastaje H_2O , a u slučaju CuZnSOD protonira se bočni lanac histidina. Nije poznato posjeduje li NiSOD to svojstvo.

Ukoliko reducirani oblik enzima reagira sa vodikovim peroksidom dolazi do njegove redukcije pri čemu nastaje hidroksilni radikal koji potom reagira s aminokiselinskim ostacima u blizini uzrokujući ireverzibilnu inhibiciju. U slučaju NiSOD inhibicija je reverzibilna jer se njegova aktivnost vraća kada se peroksid ukloni.

Bez obzira na navedene sličnosti, strukture i aktivna mjesta superoksid-dismutaza su različita i međusobno nepovezana zbog čega se može zaključiti da si ti enzimi nastali konvergentnom evolucijom, uz izuzetak FeSOD i MnSOD.^{2,3}

Tablica 1. Taksonomska rasprostranjenost i kvaterne strukture superoksid-dismutaza pronađenih ^acitosolu nekih zelenih algi, ^b*Tetrahymena pyriformis*, ^c*Candida albicans*, ^d*Methanosarcina activorans* i *Methanocella arvoryzae*²

	Archea	Bakterije	Eukarioti
NiSOD	nema	citosol (<i>heksamer</i>)	citosol ^a (<i>nepoznato</i>)
FeSOD	citosol (<i>tetramer</i>)	citosol (<i>dimer ili tetramer</i>)	citosol, glioksisomi, mitohondriji ^b (<i>tetramer^b</i>) kloroplasti (<i>dimer ili tetramer</i>)
MnSOD	citosol (<i>tetramer</i>)	citosol (<i>dimer ili tetramer</i>)	mitohondrijski matriks (<i>tetramer</i>) citosol ^c (<i>dimer</i>) peroksisomi (<i>tetramer</i>) kloroplasti (<i>nepoznato</i>)
CuZnSOD	geni pronađeni u metanobakterijama ^d	periplazma (<i>monomer ili dimer</i>)	citosol ^c (<i>dimer</i>) kloroplasti, peroksisomi (<i>dimer</i>) ekstracelularni prostor (<i>tetramer</i>)

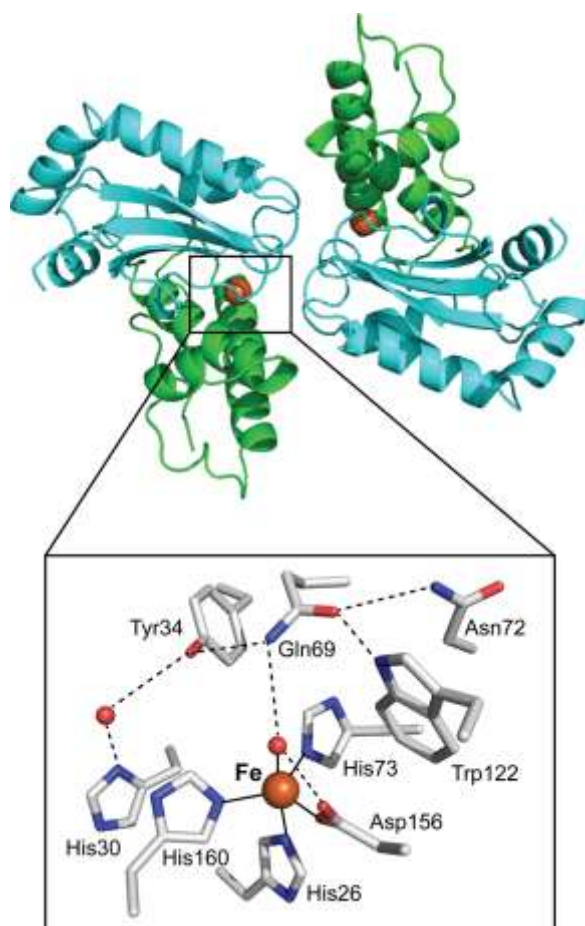
2.1. Željezo-superoksid-dismutaze, FeSOD

FeSOD smatraju se najstarijim oblikom superoksid-dismutaza jer su pristune u svim domenama. Mnogi primitivni organizmi ih posjeduju, no za sada nisu pronađeni u životinjama i gljivama, a u biljkama su pristune samo u kloroplastima. Iz toga možemo zaključiti da se katalitička aktivnost FeSOD smanjivala kako je razina kisika rasla te je u jednom trenutku evolucije zamijenjen sa MnSOD. Određivanjem strukture otkriveno je da su FeSOD vrlo slične MnSOD, ali potpuno različite od ostalih tipova dismutaza. Osim toga, sve poznate FeSOD i MnSOD posjeduju iste aminokiseline koordinirane u aktivnom mjestu.

Neki organizmi posjeduju jedan gen koji kodira FeSOD ili MnSOD ovisno o prisutnosti kisika i/ili dostupnosti metalnog iona. Prilikom izlaganja kisiku ili nedostatku željeza dolazi do sinteze MnSOD, a u obrnutom slučaju do sinteze FeSOD. To su tkz. promjenjive ili Mn/FeSOD i one su aktivne neovisno o tome koji je od navedena dva metalna iona vezan. Nasuprot tome, postoje one koje su aktivne samo kada imaju vezano željezo (FeSOD) ili mangan (MnSOD).

2.1.1. Proteinska struktura i aktivno mjesto

FeSOD je dimerna molekula u kojoj svaki od monomera sadrži aktivno mjesto. Aktivno mjesto čini željezov ion koordiniran sa molekulom vode (ili hidroksidnim ionom), tri histidinska i jednim aspartatnim bočnim lancem koji zajedno čine geometriju trigonske bipiramide (slika 1). Kao ekvatorijalni ligandi vezani su bočni lanci His 73, His 160 i Asp 156, dok su bočni lanac His 26 i H₂O (ili OH⁻) vezani kao aksijalni. Kada je željezo u oksidiranom stanju (Fe³⁺) vezan je OH⁻, a kada je reducirano (Fe²⁺) vezana je voda. Hidroksidni ion, odnosno voda je vodikovom vezom povezana na Gln 69 koji je mrežom vodikovih veza povezan s Tyr 34 i His 30.^{2,3,4}



Slika 1. Vrpčasta struktura FeSOD iz *E. coli* (gore) i prikaz aktivnog mjesta (dolje) (PBD : 1ISB). Vodikove veze prikazane su isprekidanim linijama, a koordinativne veze punim linijama. U svakom monomeru zelena boja označava N-terminalnu domenu, a plava C-terminalnu domenu. FeSOD je dimerna molekula sa ionom željeza u aktivnom mjestu. Koordinacijski broj željeza je pet, a ligandi čine trigonsku bipiramidu. His 160, His 73 i Asp 156 su vezani ekvatorijalno, a voda/ hidroksilni ion i His 26 aksijalno.

(Ilustracija : Y.Sheng, I. A. Abreu, D. E. Cabelli, M. J. Maroney, A. Miller, M. Teixeira, J. S. Valentine, Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases, *Chem. Rev.* **114** (2014) 3854-3918.)

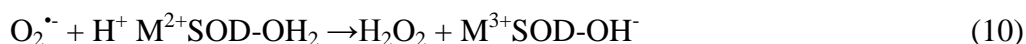
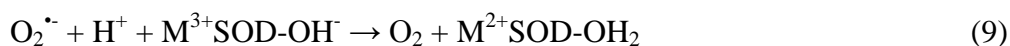
2.1.2. Katalitički mehanizam

Mehanizam reakcije se može podijeliti u pet koraka:

1. Vežanje superoksidnog iona u prvu (unutarnju) koordinacijsku sferu željezovog (III) iona enzima.
2. Redukcija željeza (III) u željezo (II) i otpuštanje molekularnog kisika. Ova reakcija se odvija vrlo brzo nakon vežanja $O_2^{\cdot-}$ i nije uočen međuprodukt u obliku enzim-supstrat.
3. Vežanje novog superoksidnog iona u drugu (vanjsku) koordinacijsku sferu željezovog (II) iona enzima.
4. Redukcija superoksidnog iona željezom (II) i nastanak peroksidnog dianiona
5. Nastanak vodikovog peroksida i njegovo otpuštanje iz aktivnog mjesta. Otpuštanje produkta je korak koji utječe na ukupnu brzinu reakcije i nije do kraja razjašnjen. ²

2.1.3. Usporedba FeSOD i MnSOD

Velika sličnost u strukturi aktivnog mjesta proizlazi iz približno jednakih ionskih radijusa Fe i Mn te izmjene oksidacijskih stanja između $2+$ i $3+$.



Redukcija Mn^{3+} u Mn^{2+} je mnogo povoljnija od redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+} zbog razlike u elektronskoj konfiguraciji između ta dva metala.



Prilikom redukcije mangana dolazni elektron puni praznu d orbitalu, dok redukcijom željeza dolazni elektron mora dijeliti orbitalu s već postojećim. Zbog toga mangan ima veći redukcijski potencijal što ga čini boljim oksidansom te sigurnijim metalnim ionom od željezovog u uvjetima oksidativnog stresa.

Ping-pong mehanizam zahtjeva da redukcijski potencijal enzima bude između redukcijskih potencijala oksidacije i redukcije superoksida. Aktivno mjesto s pre niskim

redukcijskim potencijalom neće moći oksidirati superoksid, ali će ga moći reducirati. Ukoliko je redukcijski potencijal previsok oksidacija peroksida će biti moguća, ali redukcija neće.

Razlika između redukcijskog potencijala željezovog ionskog para ($\text{Fe}^{3+/2+}$) i onog optimalnog nije velika (oko 400 mV). Najvjerojatnije je redukcijski potencijal željeza optimiziran upotrebom negativnog aspartatnog liganda. Manganov redukcijski potencijal je drastično veći od optimalnog stoga se enzim evolucijski prilagodio zamjenom nekoliko aminokiselinskih ostataka. Utjecaj proteinskog dijela enzima na vrijednost redukcijskog potencijala metala objašnjava neaktivnost superoksid-dismutaza u kojima je došlo do zamjene metala.⁴

2.2. Mangan-superoksid-dismutaze, MnSOD

Prvi oblik ovog enzima u dimernom obliku otkriven je u *E. coli*. MnSOD u prokariota nalaze se u citosolu, dok se u aerobnim eukariotskim stanicama nalazi većinom u mitohondrijskom matriksu. U biljaka se nalaze u kloroplastima.²

Mitohondrijski MnSOD se naziva SOD2. SOD2 iz stanica jetre čovjeka je homotetramer, a masa jedne monomerne jedinice iznosi 23 kDa. Otkriveno je da SOD2 ima veliku ulogu u promociji diferencijacije stanica i tumorigenezi te u zaštiti od hiperoksijom inducirano oštećenja pluća.

Zamjena Ala 9 u Val uzrokuje preuranjeno starenje i povezana je s pojavom idiopatske kardiomiopatije. Zamjenom Ile 58 u Thr dolazi do smanjenja enzimske aktivnosti SOD2 što posljedično dovodi do smanjenja tumor-supresivnog djelovanja enzima.⁵

2.2.1. Proteinska struktura

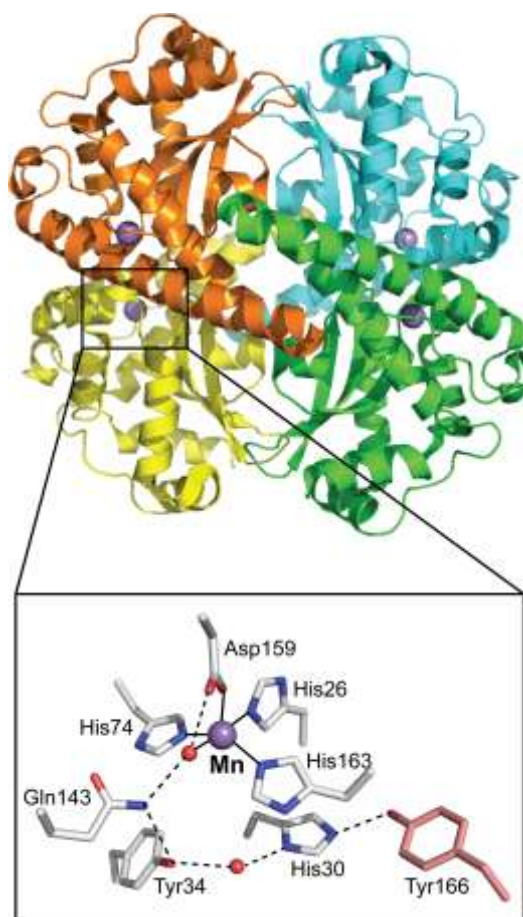
MnSOD pronađeni u bakterija i većini prokariota je u dimernom obliku, dok su u eukariota uglavnom u tetramernom. Monomerna struktura se sastoji od dvije domene: pretežno α -helikalna domena na N-terminalnom kraju i domena sastavljena od β -ploča i α -zavojnica na C-terminalnom kraju. Razlika između tetramerne i dimerne strukture je u N-terminalnoj regiji. U tetramernim MnSOD N-terminalna regija se sastoji od dugih α -zavojnica dok su one u dimernim MnSOD mnogo kraće.

Otkriveno je da MnSOD iz *C. albicans* kristalizira u obliku tetramera, dok je u otopini u obliku dimera ili „opuštenog“ tetramera. Usporedbom strukture i svojstava tetramernog mitohondrijskog enzima iz *S. cerevisiae* (ScMnSOD) i dimernog citosolnog enzima iz *C. albicans* (CaMnSOD) ustanovljeno je da je ScMnSOD otporniji na promjenu temperature i pH. Zaključeno je da tetramerizacija poboljšava stabilnost MnSOD.

2.2.2. Aktivno mjesto

Struktura aktivnog mjesta slična je onom u FeSOD. Ligandi vezani na metal su tri histidina, aspartat te voda/hidroksidni ion (slika 2). Dva od tri histidina su s N-terminalne domene, dok preostali histidin i aspartat dolaze sa C-terminalne domene. Ligandi oko metalnog centra

čine deformiranu trigonsku bipiramidu, a promjena u geometriji prilikom promjene oksidacijskog stanja enzima je vrlo mala.²



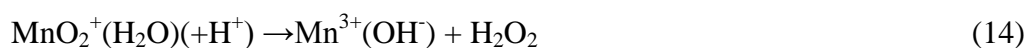
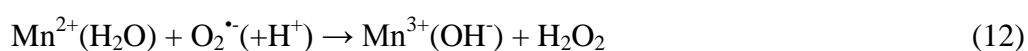
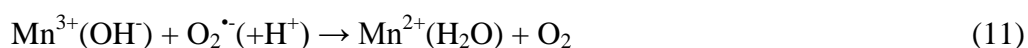
Slika 2. Vrpčasta struktura (gore) i struktura aktivnog mjesta (dolje) ljudskog MnSOD. Proteinska struktura je tetramerna, a koordinacijski broj mangana u aktivnom mjestu je pet. Ligandi (Asp 159, His 26, His 163, His 74, voda/ hidroksilni ion) vezani na metalni centar čine deformiranu trigonsku bipiramidu.

(Ilustracija : Y.Sheng, I. A. Abreu, D. E. Cabelli, M. J. Maroney, A. Miller, M. Teixeira, J. S. Valentine, Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases, *Chem. Rev.* **114** (2014) 3854-3918.)

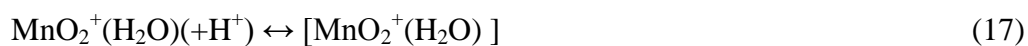
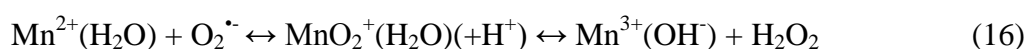
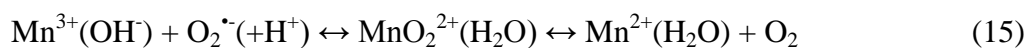
2.2.3. Katalitički mehanizam

Kada je omjer superoksidnog iona i enzima malen katalitički mehanizam je analogan onom kod CuZnSOD i FeSOD. Međutim, kada je koncentracija superoksidnog iona mnogo veća od koncentracije enzima mehanizam katalize je drugačiji. Prvi korak je vrlo brza reakcija prvog reda, a drugi spora reakcija nultog reda. Predložena su dva mehanizma koja objašnjavaju kinetiku ove enzimске reakcije.

1. Mehanizam



2. Mehanizam



U oba mehanizma između Mn^{2+}SOD i $\text{O}_2^{\bullet-}$ nastaje inhibirajući kompleks (*engl. dead-end complex*) $\text{MnO}_2^+(\text{H}_2\text{O})$. U prvom mehanizmu je predloženo da dolazi do konformacijske promjene, dok je u drugom pretpostavljena reverzibilna izomerizacija.²

2.3. Nikal-superoksid-dismutaze, NiSOD

Nikal-superoksid-dismutaze nastale su konvergentnom evolucijom kada je zbog porasta koncentracije kisika u oceanima smanjena aktivnost FeSOD. Prisutne su u bakterija i u nekim cijanobakterijama.² Ne nalazimo ih u arhejama i višim eukariotima.¹¹ NiSOD je drugačiji od Mn-, Fe-, i CuZnSOD po slijedu aminokiselina i spektroskopskim svojstvima, no bez obzira na te razlike NiSOD kao i sve druge poznate SOD, katalizira reakciju brzinom bliskoj brzini difuzije. Koncentracija niklovih (II) iona utječe na količinu aktivnog NiSOD jer ti ioni imaju regulatornu ulogu u transkripciji NiSOD gena i posttranslacijskoj doradi proteina.⁶

2.3.1. Elektroдни potencijal

Optimalni elektroдни redoks potencijal za oksidaciju i redukciju superoksidnog aniona iznosi oko 0,36 V. Računski je procijenjeno da redoks potencijal ionskog para $\text{Ni}^{3+/2+}_{\text{aq}}$ iznosi +2,26 V zbog čega ne dolazi do reakcija oksidacije i redukcije $\text{O}_2^{\cdot-}$ u vodenoj otopini. Nikal jedini od svih redoks aktivnih metala pronađenih u SOD koji ne može katalizirati disproporcioniranje superoksida u vodenom mediju. Zbog toga enzimi koji koriste niklove redoks - aktivne centre u svom aktivnom mjestu sadrže elektronima bogate tiolatne ligande potekle od cisteina koji stabiliziraju Ni^{3+} .²

2.3.2. Proteinska struktura

Proteinske strukture enzima iz *S. seoulensis* i *S. coelicolor* su približno jednake zbog 90% - tnog identičnog aminokiselinskog slijeda.² Analizom kristalne strukture iz *Streptomyces seoulensis* je otkriveno da je NiSOD homoheksamer mase 80 kDa sastavljen od monomera mase 13,4 kDa (slika 3). Monomeri sadrže četiri antiparalelne zavojnice i aktivno mjesto na N-terminalnom kraju. Niklova aktivna mjesta u ukupnoj heksamernoj strukturi raspoređena su u obliku deformiranog oktaedra, a udaljenosti između niklovih iona iznose između 23,4 do 27,7 Å. Homoheksamerna struktura u otopini ima globularni oblik u kojem svi atomi proteina tvore šuplju sferu vanjskog promjera 72 Å i unutarnjeg 23 Å. Interacije podjedinica su uglavnom hidrofobnog karaktera, dok su na N-krajevima između aktivnih mjesta interakcije polarne prirode.⁶



Slika 3. Vrpčasta heksamerna struktura NiSOD iz *S.coelicolor*.

(Ilustracija : Y.Sheng, I. A. Abreu, D. E. Cabelli, M. J. Maroney, A. Miller, M. Teixeira, J. S. Valentine, Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases, *Chem. Rev.* **114** (2014) 3854-3918.)

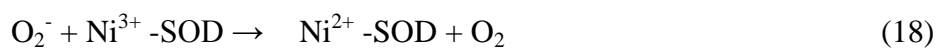
2.3.3. Aktivno mjesto

FeSOD i MnSOD sadrže vodu kao ligand te njeno protonacijsko stanje i vodikove veze služe za prilagođavanje redukcijskog potencijala. NiSOD umjesto vode sadrži tiolatne ligande. Spektroskopijom X-zrakama detektirano je više S-donora u aktivnom mjestu nikla te je utvrđeno da njegovom redukcijom dolazi do promjene koordinacijskog broja pet u četiri i promjene geometrije iz kvadratne piramide u planarnu kvadratnu.^{2,7} Katalitički centar se nalazi na N-terminalnom kraju gdje je Ni(III) ion koordiniran amino-skupinom His 1, amidnom skupinom Cys 2, dvije tiolatne skupine Cys 2 i Cys 6 te imidazolnim prstenom His 1. His 1 je vezan kao aksijalni ligand koji se gubi prilikom redukcije nikla.⁶

Ligandi vezani na nikal imaju tri važne uloge: (1) prilagodba redukcijskog potencijala metala blizu optimalnog potrebnog za katalizu; (2) kontrola pristupa superoksidnog aniona aktivnom mjestu; (3) izvor protona za sintezu vodikovog peroksida.²

2.3.4. Katalitički mehanizam

Pretpostavlja se da mehanizam NiSOD kao i kod ostalih SOD ide u dva koraka.⁶



Za stvaranje vodikovog peroksida su potrebna dva vodikova iona. Iz dobivene kristalne strukture je vidljivo da u blizini metalnog centra postoje potencijalni proton donori.⁶ Redoks titracijama određeno je da NiSOD, kao i ostale SOD, ima redukcijski potencijal blizu optimalnom potrebnom za katalizu. Ustanovljeno je da brzina katalize blizu brzine difuzije ($10^9 \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$) i neovisna o pH u granicama fizioloških pH vrijednosti ($\text{pH} \approx 5 - 9,5$). Inhibiran je vodikovim peroksidom, cijanidom te nešto slabije azidom.²

2.4. Bakar- cink-superoksid-dismutaze, CuZnSOD

U sisavaca postoje dva izozimska oblika ovog enzima. Unutarstanični oblik se naziva SOD1, a izvanstanični EC-SOD, odnosno SOD3.⁵ SOD1 je otkriven 1969. godine. McCord i Fridovich otkrili su da je eritrokuperin, protein iz goveda nepoznate funkcije koji sadrži bakar, zapravo superoksid-dismutaza. Kasnije je otkriveno da sadrži i cink. Smatran je isključivo eukariotskim enzimom sve dok nije izoliran iz bakterije *Photobacterium leiognathi* 1974. g. SOD3 pronađen je u čovjeka 1987. godine, a prisutan je u većini sisavaca i nekim biljkama.² Osim SOD1 i SOD3 u sisavaca je prisutan i SOD2 (MnSOD).⁵

Izradom evolucijskog stabla CuZnSOD se pokazalo da je ekstracelularna SOD divergirala iz intracelularne u ranom stadiju evolucije, prije diferencijacije gljiva, biljaka i višestaničnih organizama. Određivanjem genomske sekvence u štakora, miša i čovjeka otkriveno je da geni koji kodiraju SOD1 pokazuju veliku međusobnu sličnost. SOD3 dijeli 40 – 60 %-tnu sličnost s genom koji kodira SOD1, ali ne pokazuje sličnost sa SOD2.

Gen koji kodira SOD1 se nalazi na kromosomu 21 u čovjeka, kromosomu 1 u govedu, a u miša na kromosomu 16. Ljudski kromosom 21 je istraživao zbog povezanosti Downova sindroma s trisomijom 21. Oboljeli od Downova sindroma pokazuju aktivnost SOD1 veću za 50% od normalne zbog njegove veće koncentracije, ali nije pronađena povezanost između povećane enzimске aktivnosti i navedene bolesti. Osim toga, u 2% sporadične te 10-15 % slučajeva nasljedne amiotrofične lateralne skleroze pokazalo se da postoji mutacija u kodirajućem genu za SOD1.

Gen za SOD3 u čovjeku nalazi se na kromosomu 4. Za razliku od intracelularnih superoksid-dismutaza (SOD1, SOD2), EC-SOD je eksprimiran u samo nekoliko tipova stanica. Visoke koncentracije tog enzima pronađene su u alveolarnim stanicama tipa II, bubrežnim tubularnim stanicama, nekim mišićnim stanicama i makrofagima pluća.

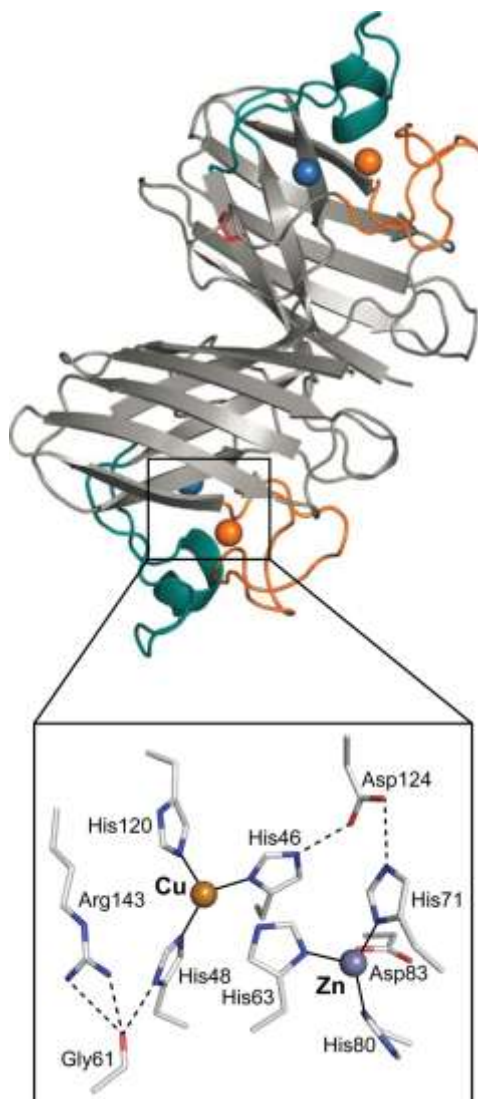
Organizam nakon rođenja se nalazi u okolišu s relativno velikom koncentracijom kisika zbog čega je potrebna veća ekspresija i aktivnost SOD. Pluća, ali i bubrezi su najvažniji organi za zaštitu novorođenčeta od štetnih kisikovih radikala. Aktivnost SOD1 i koncentracija pripadne mRNA raste od rođenja do odrasle dobi u plućima zamorca, štakora i zeca. Porast koncentracije SOD1 je zbog povećane sinteze mRNA. Njenu sintezu stimulira toplinski šok, UVB-, X-zračenje, teški metali, vodikov peroksid, ozon, dok hipoksija djeluje represorski.

Razina aktivnosti SOD3 također raste do odrasle dobi, ali razina samog proteina ostaje skoro nepromjenjena. Moguće je da se nalazi unutarstaničnim odjeljcima gdje je inaktivan.⁵

2.4.1. Proteinska struktura i aktivno mjesto SOD1

SOD1 je homodimerni protein mase 32 kDa te se nalazi u lizosomima i citoplazmi stanice. Svaka podjedinica u aktivnom mjestu sadrži po jedan bakrov te jedan cinkov ion u međusobnoj blizini (slika 4). Struktura binuklearnog metalnog veznog centra ovisi o oksidacijskom stanju bakra. Kada je reduciran, (Cu^+), na njega je vezan u His 46, His 48 i His 120 u razmještaju koji odgovara približno trigonsko-planarnoj geometriji. U blizini se nalazi cinkov ion čija je koordinacija približno tetraedarska. Koordiniran je sa tri histidinska imidazolna prstena (His 63, His 71, His 80) i aspartatom (Asp 83). Kada je bakrov ion oksidiran, (Cu^{2+}), histidinski ostatak (His 68) premošćuje bakar i cink. Osim toga, na bakrov ion se veže molekula vode. Koordinacijski broj bakra se mijenja u 5, a prostorni razmještaj liganada čine deformiranu kvadratnu piramidu, dok koordinacija cinka ostaje nepromjenjena.

2



Slika 4. Vrpčasta dimerna struktura ljudskog SOD1 (gore) i struktura aktivnog mjesta kada je bakar u reduciranom stanju (Cu^+) (dolje). Na reducirani bakrov ion vezani su His 46, His 48 i His 120. Cink je koordiniran sa His 63, His 71, His 80 i Asp 83 u tetraedarskom rasporedu.

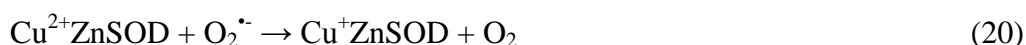
(Ilustracija : Y.Sheng, I. A. Abreu, D. E. Cabelli, M. J. Maroney, A. Miller, M. Teixeira, J. S. Valentine, Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases, *Chem. Rev.* **114** (2014) 3854-3918.)

2.4.2. Proteinska struktura i aktivno mjesto SOD3

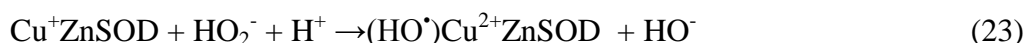
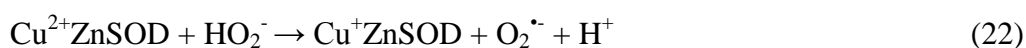
Zadnje otkriven enzim ovog tipa je EC-SOD (SOD3). Prvo je pronađen u ljudskoj krvi i limfi. Njegova ekspresija i aktivnost je strogo određena za specifične tipove stanica i tkiva gdje njegova aktivnost može biti veća od SOD1 i SOD2. Ovaj homotetramerni protein mase 135 kDa ima visoki afinitet za heparin i nalazi se u ekstracelularnom prostoru.^{2,5}

2.4.3. Katalitički mehanizam

Pojednostavljena superoksidne reakcije opisane su jednadžbama (20) i (21). Aktivnost enzima je pH-neovisna u rasponu 5.0 – 9.5.

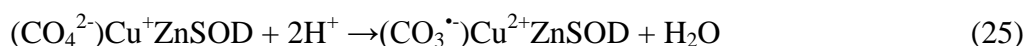


Osim superoksidne, enzim posjeduje i peroksidativnu aktivnost. Peroksidativna reakcija je reakcija $\text{Cu}^{2+}\text{ZnSOD}$ s molekulom H_2O_2 koja u prvom koraku dovodi do redukcije bakra i nastajanja superoksida. Cu^+ZnSOD reagira s drugom molekulom peroksida uz nastanak hidroksilnog radikala vezanog na aktivno mjesto i hidroksidnog iona što dovodi do inaktivacije enzima. Brzina ove reakcije raste s porastom pH 7-11.²



Mehanizam inaktivacije SOD1 i EC-SOD vodikovim peroksidom je sličan te u oba slučaja dolazi do oksidacije prolinskog i histidinskog bočnog ogranka koji su proksimalno smješteni u odnosu na aktivno mjesto bakra.⁸

Karbonatni ion, CO_3^{2-} , ubrzava inaktivaciju SOD1 vodikovim peroksidom u odsutnosti fosfata. U ovom mehanizmu oksidacija Cu^+ZnSOD se odvija preko peroksikarbonata. Peroksikarbonat nastaje iz HO_2^- reakcijom s CO_3^{2-} vezanim na enzim. Nastanak $(\text{CO}_3^{\bullet-})\text{Cu}^{2+}\text{ZnSOD}$ dovodi do inaktivacije enzima.



Liochev i Fridovich postavili su alternativni mehanizam za inaktivaciju posredovanu karbonatom: Cu^+ZnSOD je oksidiran peroksidom u $\text{Cu}^{2+}\text{ZnSOD}$. On veže hidroksilni radikal (HO^\cdot) koji reagira s CO_2 pri čemu nastaje karbonatni radikal $\text{CO}_3^{\cdot-}$.²

2.4.4. *CuSOD*

Nedavno je u eukariotskom organizmu, *C. albicans*, otkrivena superoksid-dismutaza koja sadrži samo bakar, *CuSOD* (*SOD5*). Bez obzira što ne posjeduje cink, brzina katalize je određena brzinom difuzije. *CuSOD* je prisutna u gljiva i algašicama, ali je njena ekspresija moguća i u bakterija. Algašice su organizmi slični gljivama; stjenka im je građena od hitina i hrane se saprofitski, ali pripadaju praživotinjama. To je ekstracelularni enzim, vezan na staničnu membranu ili staničnu stjenku. U gljiva je *CuSOD* jedina superoksid-dismutaza pristuna u ekstracelularnom prostoru.

SOD5 su proteini mase 20-25 kDa te sadrže disulfidne mostove na sličnim mjestima kao i u *CuZnSOD*. Nisu svi cinkovi ligandi iz *CuZnSOD* zadržani u *CuSOD*. *CuSOD* ne sadrži dva histidinska ostatka (His 71, His 80). Asp 83 i His 63 imaju svoje ekvivalente Asp 113 i His 93, dok se mjestu koje odgovara His 80 nalazi se glutamat ili glutamin. Kao i u *CuZnSOD*, His 93 koordinira Cu^{2+} , ali ne i Cu^+ . Glu 110 je preuzeo ulogu cinka. On je preko kisika vezan s dušikom imidazolnog prstena His 93 te tako usmjerava njegovo vezanje na Cu^{2+} .¹³

2.4.5. *Amiotrofična lateralna skleroza, ALS*

Mutacije u *sod* genu povezuju se s razvojem amiotrofične lateralne skleroze (ALS). ALS je neurodegenerativna bolest u kojoj dolazi do progresivne smrti pokretačkih živčanih stanica, paralize te smrti. Uzrok oboljenja može biti sporadičan (nepoznat), *sALS*, ili familijaran (nasljedan), *fALS*. *fALS* uzrokovan mutacijama, a pronađeno ih je više od 160. One se mogu podijeliti u dvije skupine ovisno o njihovoj lokaciji: (a) mutacije u metal-veznoj-regiji; (b)

mutacije divljeg tipa. Mutacije u metal-veznoj regiji se odnose na one mutacije nastale u aktivnom mjestu, dok sve one van njega su mutacije divljeg tipa. Uzrok smrti neurona su mutacije zbog kojih nastaju amiloidne niti netopljivih nakupina SOD1, a ne zbog njezine smanjene aktivnosti. Tu činjenicu potkrijepila su mnoga istraživanja poput onog u kojem miševi bez SOD1 nisu pokazali simptome degradacije neurona, dok oni s ekspresijom fALS SOD1 jesu. Pretpostavljeno je da do agregacije dolazi zbog nedostatka jedne ili više postranslacijske dorade. U pacijentu oboljelom od SOD1-povezanog ALS-a pronađena su antitijela koja prepoznaju izloženo dimerno sučelje nepravilno smotanog proteina. Osim toga, mnoge vrste fALS pokazuju normalnu enzimsku aktivnost SOD1.^{2,11}

Mutirani oblik SOD1, L126Z-SOD1, je toksičan jer je potpuno izgubio mogućnost smatanja u nativnu strukturu β -bačve, a stekao je izrazit afinitet prema membranama endoplazmatskog retikuluma. Njegovo vezanje na endoplazmatski retikulum dovodi do daljnjeg staničnog oštećenja karakterističnog za ALS. Istraživanje je pokazalo da i u sALS dolazi do abnormalne interakcije SOD1 s membranama. Pretpostavljeno je da genetički i okolišni faktori mogu usporiti ili ubrzati transformaciju SOD1 u takav citotoksičan oblik.¹²

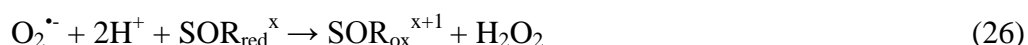
Kratki pregled obradene teme

Tablica 2. Osnovne strukturne karakteristike i taksonomska rasprostranjenost pojedinih tipova superoksid-dismutaza

	Taksonomska rasprostranjenost	Kvaterna struktura	Koordinacija metala
FeSOD	<ul style="list-style-type: none"> • prokarioti • eukarioti • protoktisti • biljke 	Homodimer	<p>Trigonska bipiramida</p> <p><i>Asp156, His73, His160, His26, H₂O /OH</i></p>
MnSOD	<ul style="list-style-type: none"> • prokarioti <i>citosol</i> 	Homodimer	<p>Trigonska bipiramida</p> <p><i>Asp159, His26, His163, His74, H₂O /OH</i></p>
	<ul style="list-style-type: none"> • eukarioti <i>mitohondrijski matriks</i> <i>kloroplasti</i> 	Homotetramer	
NiSOD	<ul style="list-style-type: none"> • prokarioti • bakterije • neke cijanobakterije 	Homoheksamer	<p>Kvadratna piramida <i>redukcijom metala mijenja u kvadrat</i></p> <p><i>tiolatne skupine Cys2 i Cys6, N-terminalna i imidazolni prsten His1, amidna skupina Cys2</i></p>
CuZnSOD	<ul style="list-style-type: none"> • eukarioti • većina sisavaca • pojedine biljke 	Homodimer <i>intracelularni</i>	<p>Bakar (<i>reducirani</i>): Trigonsko-planarna <i>His 46, His48, His120</i></p>
	<ul style="list-style-type: none"> • neki prokarioti 	Homotetramer <i>ekstracelularni</i>	<p>Bakar (<i>oksidirani</i>): Kvadratna piramida <i>His 68, H₂O, His 46, His48, His120</i></p> <p>Cink: Tetraedarska <i>His 63, His 71, His 80, Asp 83</i></p>

2.5. Superoksid-reduktaze, SOR

Nedavno je otkriveno da osim superoksid-dismutaza postoje i superoksid-reduktaze (*engl. Superoxide Reductases, SOR*). SOD kataliziraju reakcije redukcije i oksidacije superoksidnih na iona, dok SOR kataliziraju samo redukciju superoksida u peroksid.



SOD svojim katalitičkim djelovanjem oscilira između dva oksidacijska stanja, dok katalitičko djelovanje SOR je suicidalno. SOR posjeduje fiziološkog partnera koji ga redukcijom ponovno aktivira. Ulogu reduktanta ima NADH, ali moguće i NADPH. Osim spomenute razlike u načinu promjene oksidacijskog stanja u SOD i SOR, SOD troši dva superoksidnog aniona po ciklusu, dok SOR troši jedan.

Prvo su otkrivene u anaerobnim bakterijama, ali kasnije se pokazalo da su prisutne u svim carstvima. Sadrže samo 110 do 180 aminokiselina u svojoj proteinskoj strukturi, a u jednom polipeptidnom lancu mogu sadržavati jedan ili dva atoma željeza. Određene su kristalne strukture 2Fe-SOR iz *Desulfovibrio desulfuricans* i 1Fe-SOR iz *Pyrococcus furiosus*. 1Fe-SOR je tetramer čije podjedinice tvore kocku s dijagonalno smještenim aktivnim mjestima. 2Fe-SOR je dimer .

2.6. Superoksid-dismutaze u patogena

Patogeni mikroorganizmi proizvode ROS –kao nusprodukt aerobnog metabolizma, ali osim toga njihovi domaćini (makrofagi i neutrofilni) koriste superoksid kao imunološki odgovor. Kako bi se zaštitile od štetnog djelovanja reaktivnih kisikovih vrsta, patogene bakterije i gljive sadrže superoksid-dismutaze. U gram-negativnoj bakteriji, kao što je *E. coli*, mogu postojati tri tipa ovog enzima. MnSOD i/ili FeSOD se nalaze u citosolu, dok CuZnSOD je eksprimiran u periplazmi ili izvanstaničnom prostoru. Za bakterijske SOD nomenklatura glasi: SodA (MnSOD), SodB (FeSOD), SodC (CuZnSOD). SodA i SodB uklanjaju superoksid koji se nalazi unutar stanice, dok SodC djeluje kao zaštita od superoksida domaćina.

Superoksid u normalnim uvjetima ne prelazi staničnu membranu, no u okolišu s niskim pH vrijednostima dolazi do njegove protonacije i ulaska u stanicu. U tom slučaju i unutarstanični SOD sudjeluju u borbi protiv takvog oblika imunološkog odgovora.

Patogene gljive sadrže CuSOD u citosolu i MnSOD u mitohondrijskom matriksu. One se mogu prilagoditi na količinu dostupnih bakrovih iona te u slučaju njegova nedostatka mogu preživjeti koristeći samo MnSOD. Osim njih, sadrže i ekstracelularni CuSOD vezan na staničnu stjenku.¹⁰

2.7. Oksidativni stres i industrijska primjena SOD

Male koncentracije ROS-a su potrebni za održavanje signalnih puteva i obranu od patogena, ali povišene koncentracije povezane su sa razvojem mnogih bolesti. One reagiraju s proteinima, lipidima i DNA te nanose štetu stanici. Oksidativni stres uzrokovan reaktivnim kisikovim vrstama povezuje se sa starenjem, kardiovaskularnim bolestima, aterosklerozom, autoimunim bolestima, dijabetesom, asmom, tumorima i dr..

Do oksidativnog stresa i smanjene SOD aktivnosti dovodi i konzumacija alkohola i cigareta. Smatra se da bi uklapanjem formulacija SOD u duhanske proizvode mogla smanjiti oštećenja respiratornog sustava. SOD imaju primjenu u kozmetičkoj industriji i nadomjescima prehrani: spriječavanje starenja, zacijeljivanje rana, smanjivanje bora, hiperpigmentacijskih mrlja i nakupljanja mliječne kiseline u mišićima. Imaju potencijalnu primjenu u terapeutske svrhe, čuvanju hrane i organa za transplantaciju, kao biosenzor za $O_2^{\cdot-}$, cjepivo, sastojak u deterdžentima za pranje rublja.

Okolišni faktori također mogu uzrokovati oksidativni stres. Dugo izlaganje ultraljubičastom- i X-zračenju, toksinima, patogenim mikroorganizmima i teškim metalima oštećuje proteine, DNA, stanične membrane. Kao odgovor na to fagociti proizvode ROS i dovode organizam u stanje oksidativnog stresa.

Pokazalo se da je regulacija ekspresije SOD povezana s prehranom. Koncentracija MnSOD je povećana u vegetarijanaca u odnosu na svejede zbog smanjene CpG metilacije u promotorskom mjestu. To je objasnilo manju stopu pojedinih vrsta tumora i kroničnih kardiovaskularnih bolesti u vegetarijanaca.⁹ Drugo istraživanje¹⁴ pokazalo je da MnSOD nema klasično supresivno djelovanje na tumore. Nedostatak MnSOD nije ubrzao razvitak p53-induciranog tumora u stanicama miša, već ga je spriječio zbog nepovoljnih staničnih uvjeta koji su nastali. Zaključeno je da je potrebno održavanje homeostazne koncentracije MnSOD za pravilnu funkciju stanice.

Oksidativni stres u organizmu može se smanjiti unosom antioksidansa bogatih namirnica. Neki od antioksidansa su omega-3 masne kiseline, vitamini A i E. Nedostatak ovakvog liječenja je taj što dolazi samo do privremenog uklanjanja simptoma. Istraživanja su usmjerena prema proizvodnji i upotrebi suplementarnih enzima jer se vjeruje kako bi takav pristup uklonio i uzrok oksidativnog stresa. Nakon otkrića SOD znanstvenici su počeli razvijati metode njihove proizvodnje i primjene kao potencijalnog antioksidansa. Prvo su ih

ekstrahirali iz tkiva životinja, a sada uglavnom iz bakterija. U terapijskoj primjeni javljaju se mnogi problemi: antigenost, stabilnost, farmakokinetika, specifično djelovanje, pristup negativno nabijenim staničnim površinama, ulazak u stanicu. Provođe se klinička istraživanja i primjenjuju različiti pristupi rješavanja navedenih problema.^{9, 11,15}

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 517-518.
2. Y. Sheng, I. A. Abreu, D. E. Cabelli, M. J. Maroney, A. Miller, M. Teixeira, J. S. Valentine, Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases, *Chem. Rev.* **114** (2014) 3854-3918.
3. A. Miller, Superoxide dismutases: active sites that save, but protein that kills, *Current Opinion in Chemical Biology* **8** (2004) 162-168.
4. A. Miller, Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights, *FEBS Letters* **586** (2012) 585-595.
5. I. N. Zelko, T. J. Mariani, R. J. Folz, Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZnSOD (SOD1), MnSOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and, *Free Radical Biology and Medicine* **33** (2002) 337-349.
6. J. Wuerges, J. Lee, Y. Yim, H. Yim, S. Kang, K. Carugo, Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site, *PNAS* **101** (2004) 8569-8574.
7. D. P. Barondeau, C. J. Kassmann, C. K. Bruns, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, Nickel Superoxide Dismutase Structure and Mechanism, *Biochemistry* **43** (2004) 8038-8047.
8. R. H. Gottfredsen, U. G. Larsen, J. J. Enghild, S. V. Petersen, Hydrogen peroxide induce modifications of human extracellular superoxide dismutase that results enzyme inhibition, *Redox Biology* **1** (2013) 24-31.
9. A. Bafana, S. Dutt, S. Kumar, P. S. Ahuja, Superoxide dismutase: an industrial perspective, *Critical Reviews in Biotechnology* **31** (2011) 65-76.
10. C. N. Broxton, V. C. Culotta, SOD Enzymes and Microbial Pathogens: Surviving the Oxidative Storm of Infection, *PLoS Pathog* **12** (2016)
11. W. H. Chung, Unraveling new functions of superoxide dismutase using yeast model system: Beyond its conventional role in superoxide radical scavenging, *Journal of Microbiology* **55** (2017) 409-416.
12. L. Lim, J. Song, SALS-linked WT-SOD1 adopts a highly similar helical conformation as FALS-causing L126Z-SOD1 in a membrane environment, *Biochimica et Biophysica Acta* **1858** (2016) 2223-2230.

13. R. Peterson, A. Galaleldeen, J. Villarreal, A. B. Taylor, D. E. Cabelli, P.J. Hart, V.C. Culotta, The Phylogeny and Active Site Design of Eukaryotic Copper-only Superoxide Dismutases, *Journal of Biological Chemistry* **291** (2016) 20911-20923.
14. A. J. Case, F. E. Domann, Absence of manganese superoxide dismutase delays p53-induced tumor formation, *Redox Biology* **2** (2014) 220–223.
15. S . Srivastava, D. Singh, S. Patel, M.R. Singh, Role of enzymatic free radical scavengers in management of oxidative stress in autoimmune disorders, *International journal of biological macromolecules* **101** (2017) 502-517