

GLUTATIONA E ENZIMAS RELACIONADAS: PAPEL BIOLÓGICO E IMPORTÂNCIA EM PROCESSOS PATOLÓGICOS

Paula C. Huber e Wanda P. Almeida*

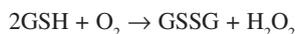
Curso de Farmácia e Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas - SP, Brasil

Ângelo de Fátima

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte - MG, Brasil

GLUTATIONA OXIDASE: CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS

As glutatona oxidases pertencem à classe de sulfidril oxidases dependentes de flavina, que catalisam a oxidação de proteínas e peptídeos com a formação de dissulfetos e peróxido de hidrogênio:



A primeira destas enzimas foi caracterizada por Ostrowski e Kistler¹ como um monômero. Os estudos mostraram que esta enzima possui de 66 kDa de massa molecular. Ela não demonstrou especificidade para a glutatona, oxidando também outros aminiótóis. Dentre as glutatona oxidases conhecidas, apenas a GO T-1, obtida de cultura de Basidiomycetes² é específica para GSH. O principal interesse pela glutatona oxidase reside no desenvolvimento de biossensores baseados em glutatona.³ Nenhuma enzima desta classe possui a sua estrutura quaternária determinada até o presente momento.⁴

GLUTATIONA PEROXIDASES: CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS

Glutatona peroxidase (GPx) converte peróxido de hidrogênio a água, oxidando a GSH ao seu correspondente dissulfeto (GSSG). GSH é regenerada pela glutatona redutase por intermédio da oxidação de NADPH. As glutatona peroxidases intracelulares compreendem duas proteínas distintas: a GPx clássica (cGPx), atualmente denominada como GPx1, e a hidroperóxido-fosfolípido

(PHGPx), presente no núcleo, mitocôndria e citosol.⁵

Todas as GPxs contêm uma selenocisteína no sítio ativo, que é sucessivamente oxidada e reduzida no ciclo catalítico (Figura 1S). O selenolato (E-Se⁻) na GPx reduzida e o ácido selenínico puderam ser observados por métodos cristalográficos.⁶

Existem 4 membros da família GPx: cGPx (GPx1), GPx-GI (GPx2), pGPx (GPx3) e PHGPx (GPx4). As GPxs-1, -2 e -3 são tetrâmeros, com subunidades variando entre 20 e 25 kDa, enquanto a GPx-4 é um monômero de 20-22 kDa.⁷ Além de ser a única dentre as glutatona peroxidases que usa hidroperóxidos fosfolípidicos como substratos, a GPx4 reage com uma grande variedade de outros hidroperóxidos, incluindo os derivados do colesterol^{8,9} e os de timina.

A Figura 2S é uma representação esquemática das interações da glutatona com o sítio ativo da glutatona peroxidase,⁶ destacando-se os resíduos aminoácidos importantes. Os dados bioquímicos suportam a formação de ligações selenocisteína através da redução do substrato doador, GSH.

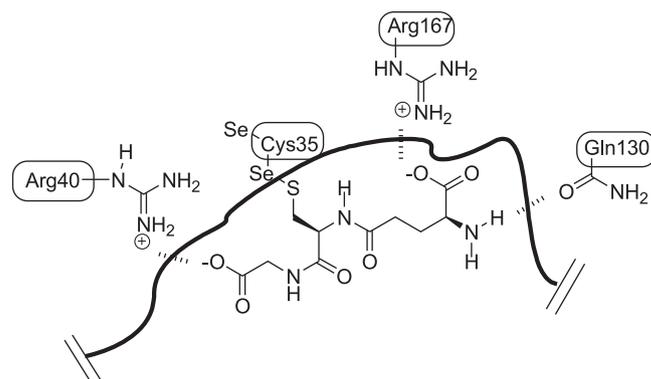


Figura 2S. Representação das interações da glutatona com o sítio ativo da glutatona peroxidase: participação da Arg40 e Gly-GSH (interação iônica); Se-Cys35 e Cys-GSH (ligação covalente); Arg167 e carboxilato-Glu-GSH (interação iônica); Gln130 e amino-Glu-GSH (ligação de hidrogênio)

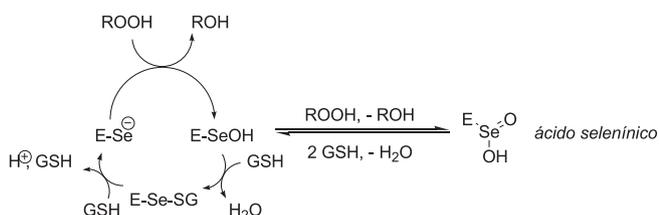


Figura 1S. Mecanismo hipotético para a redução de hidroperóxido catalisada pela glutatona peroxidase (GPx)

GLUTATIONA REDUTASE: CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS SOBRE SUA ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO

O sítio ativo da glutatona redutase é caracterizado pela presença de uma ponte dissulfeto formada pelos resíduos Cys58 e Cys63, uma tirosinila (Tyr197), além dos resíduos de glutamato

*e-mail: wanda@fcm.unicamp.br

(Glu427) e histidina (His467).

A Figura S3 é uma representação esquemática do sítio ativo da GR com o anel aloxazolínico da coenzima FAD. Na primeira etapa ocorre a redução da coenzima, via transferência de elétrons do NADPH para a flavina dinucleotídico (Figura 3S-a), que requer uma mudança de conformação do resíduo tirosinila (Tyr197). O sistema redox representado pelo dissulfeto Cys58-Cys63 aceita um par de elétrons do ânion FAD⁻, formando uma ligação covalente entre o carbono 4 da flavina e o enxofre da Cys63 (Figura 3S-b). O ânion tiolato gerado no resíduo de Cys58 é protonado, formando então um complexo estável com a His467 (Figura 3S-c). Um ataque nucleofílico do grupo sulfidríla ao enxofre da ligação dissulfeto da GSSG, formando um dissulfeto misto ESSG, seguido de protonação do GS⁻ formado libera uma molécula de GSH (Figura 3S-c). A transferência de elétrons da ligação Cys63-FAD para Cys58 (Figura 3S-d), libera uma segunda molécula de GSH. A regeneração do dissulfeto Cys58-Cys63 completa o ciclo catalítico.

GLUTATIONA TRANSFERASE: ALGUMAS CONSIDERAÇÕES SOBRE SUA ESTRUTURA MOLECULAR

As glutionas transferases (GSTs) geralmente se encontram no meio biológico como homo ou heterodímeros (outros complexos também podem existir), apresentando dois sítios ativos por dímero cujas atividades são independentes uma da outra (Figura

4S)¹⁰. Cada sítio ativo consiste no mínimo de duas regiões de ligação, um para a glutationa (GSH) que é muito específico para este tripeptídeo (Figura 4S), e outro sítio de ligação com menor especificidade para os eletrófilos (Figura 4S). Os substratos (eletrófilos) mais comuns das glutationa transferases incluem: haletos de alquila, epóxidos, compostos α,β -insaturados (como quinonas, iminoquinonas, aldeídos, cetonas, lactonas e ésteres), haletos de arila e nitro aromáticos. Após se combinar com a glutationa reduzida (GSH), as glutationas transferases (GSTs) apresentam maior especificidade para um segundo substrato (os eletrófilos)¹⁰.

Nas glutationas transferases (GSTs), o domínio 1 (em azul) é altamente conservado, sendo o sítio de ligação da glutationa reduzida (GSH). Os domínios 1 e 2 estão ligados entre si através de uma pequena seqüência de aminoácidos (a seqüência de aminoácidos representada na cor violeta) como mostrado na Figura 4S.¹ O domínio 2 (em vermelho, apresenta aproximadamente 87-210 resíduos de aminoácidos) consiste de cinco α -hélices no caso das classes Pi e Um^{11,12} e seis α -hélices no caso da classe Alpha.¹³ De fato, o número de hélices presente no domínio 2 é bem variável entre as classes e este número não é um parâmetro fundamental para a classificação destas enzimas.

Estudos cristalográficos realizados por Sinning e colaboradores permitiram definir os sítios de ligação da glutationa (GSH) e identificar os resíduos de aminoácidos presentes na vizinhança dos mesmos (Figura 5S).¹³ Nestes estudos foi realizada a co-cristaliza-

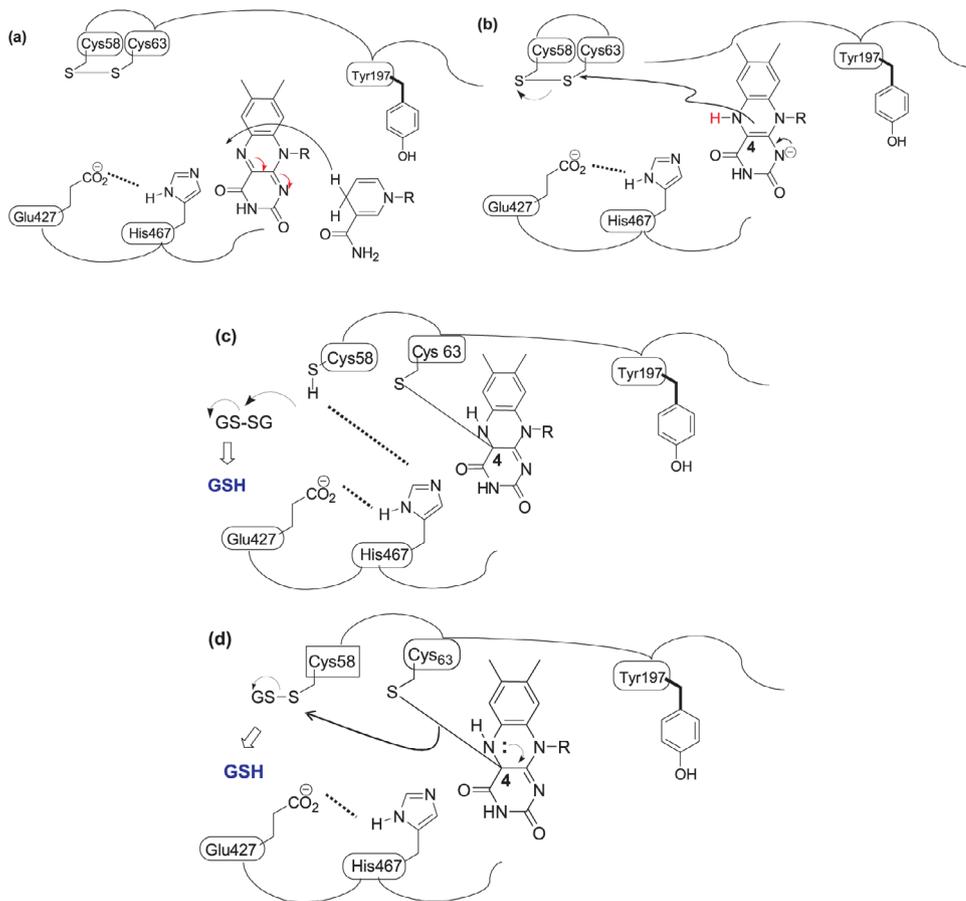


Figura 3S. Representação esquemática das etapas envolvidas na formação de GSH. (a) sítio ativo da GR com o anel isoaloxazolínico do FAD e sua redução pelo NADPH; (b) ataque nucleofílico do FADH sobre o dissulfeto Cys58-Cys63; (c) ataque nucleofílico do grupo sulfidríla (Cys63) sobre a GSSG, liberação de GSH e formação do dissulfeto misto; (d) regeneração do dissulfeto Cys58-Cys63, via regeneração do FAD e liberação de uma segunda molécula de GSH

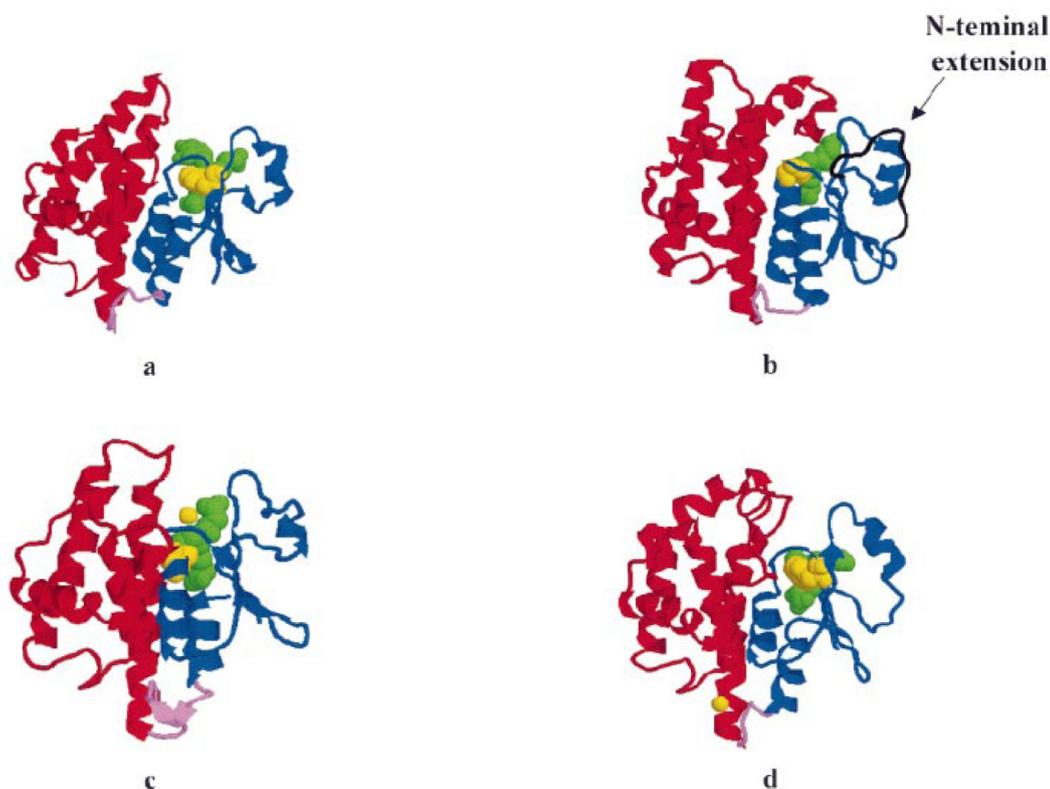


Figura 4S. Representação das estruturas tridimensionais das subunidades das glutacionas transferases (GSTs). O domínio N-terminal 1 está destacado em azul, enquanto o domínio C-terminal está destacado em vermelho. Os resíduos importantes para a catálise destas enzimas (tirosina em **a** e **d**; cisteína em **b** e **c**) estão destacados em amarelo, enquanto os ligantes com os quais as enzimas foram co-cristalizadas são destacadas em verde. A seqüência de aminoácidos que liga os dois domínios está destacada em violeta. Os códigos das bases de dados são apresentados entre parênteses: (a) GST de calamar, classe Sigma (1GSQ);¹⁴ (b) GST humana, classe Omega (1EEM, a extensão dos resíduos de aminoácidos -19 no total – presente nesta classe de GTS está destacada em preto);¹⁵ (c) GTS bacteriana (Proteus mirabilis), classe Beta (1PM7)¹⁶; (d) GTS de Fasciola hepática, classe Mu (1FHE)¹⁷. Reproduzido da ref. 13, com permissão da Elsevier Ltda

ção da glutaciona transferase (GST) humana da classe Alpha (A1-1) com (*S*)-benzilglutaciona (GSBn) e as análises dos dados de raio-X revelaram que a maioria das interações entre a glutaciona e a

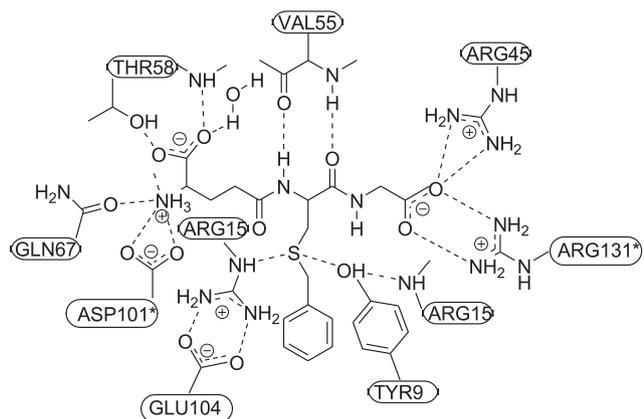


Figura 5S. Representação esquemática das principais interações entre os resíduos de aminoácidos da glutaciona transferase (GST) humana da classe Alpha (A1-1) presentes na vizinhança do sítio de ligação da glutaciona (GSH) na mesma. ASP101* e ARG131* são resíduos de aminoácidos da vizinhança do sítio catalítico destas enzimas. Reproduzido da ref. 13, com permissão da Elsevier Ltda

enzima é realizada entre a GSBn e os resíduos de aminoácidos do domínio 1. Duas interações iônicas são observadas nas terminações do tripeptídeo (GSH) e os resíduos ASP101* e ARG131* do domínio 2 da enzima. As principais interações observadas - em sua grande maioria trata-se de ligações de hidrogênio e interações iônicas. As interações da (*S*)-benzilglutaciona (GSBn) com a glutaciona transferase (GST) humana da classe Alpha (A1-1) estão apresentadas na Figura 5S¹³. No exemplo apresentado na Fig. S5, não há um centro nucleofílico -SH uma vez que o enxofre está ligado ao grupo benzílico. Porém, no caso da glutaciona (GSH) o grupo nucleofílico -SH forma uma ligação de hidrogênio com o resíduo tirosina (TYR9), diminuindo o seu valor de pKa, levando a estabilização do ânion tiolato, que então, se adiciona aos eletrófilos, substratos para estas enzimas. No caso de glutacionas transferases (GST) da classe Theta e possivelmente da classe Zeta, um resíduo de serina é o responsável pelo aumento de nucleofilicidade da glutaciona, enquanto que para as classes Omega e Beta este papel seria realizado por um resíduo de cisteína (na realidade ocorre a formação de um disulfeto misto transitório)¹⁰.

REFERÊNCIAS

- Ostrowski, M. C.; Kistler, W. S.; *Biochemistry* **1980**, *19*, 2639.
- Matsui, S.; Uchida, S. Taniguchi, T.; *US pat.* 4,610,963 **1985** (CA103:84147).
- Compagnone, D.; Federici, G.; Scarciglia, L.; *Biosens. Bioelectron.* **1993**, *8*, 257.
- <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, acessada em Junho 2007.
- Imai, H.; Nakagawa, Y.; *Free Radical Biol. Med.* **2003**, *34*, 145.
- Epp, O.; Ladenstein, R.; Wendel, A.; *Eur. J. Biochem.* **1983**, *133*, 51.

7. Ursini, F.; Maiorino, M.; Gregolin, C.; *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *839*, 62.
8. Maiorino, M.; Girotti, A. W.; Ursini, F.; *Free Radical Res. Commun.* **1991**, *12-13*, 131.
9. Thomas, J. P.; Maiorino, M.; Ursini, F.; Girotti, A. W.; *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 454.
10. Sheehan, D.; Meade, G.; Foley, V. W.; Dowd, C. A.; *Biochem. J.* **2001**, *360*, 1.
11. Ji, X.; Zhang, P.; Armstrong, R. N.; Gilliland, G. L.; *Biochemistry* **1992**, *31*, 10169.
12. Reinemer, P.; Dirr, H. W.; Ladenstein, R.; Schaefer, J.; Gallay, O.; Huber, R.; *EMBO J.* **1991**, *10*, 1997.
13. Sinning, I.; Kleywegt, G. J.; Cowan, S. W.; Reinemer, P.; Dirr, H. W.; Huber, R.; Gilliland, G. L.; Armstrong, R. N.; Ji, X.; Board, P. G.; Olin, B.; Mannervik, B.; Jones, T. A.; *J. Mol. Biol.* **1993**, *232*, 192.
14. Board, P. G.; Coggan, M.; Chelvanayagam, G.; Easteal, S.; Jermin, L. S.; Schulte, G. K.; Danley, D. E.; Hoth, L. R.; Griffon, M. C.; Kamath, A. V.; Rosner, M. H.; Chrnyk, B. A.; Perregaux, D. E.; Gabel, C. A.; Geoghegan, K. F.; Pandit, J.; *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 24798.
15. Ji, X. H.; von Rosenvinge, E. C.; Johnson, W. W.; Tomarev, S. I.; Piatigorsky, J.; Armstrong, R. N.; Gilliland, G. L.; *Biochemistry* **1995**, *34*, 5317.
16. Rossjohn, J.; Polekhina, G.; Feil, S. C.; Allocati, N.; Masulli, M.; Di Ilio, C.; Parker, M. W.; *Structure* **1998**, *6*, 721.
17. Rossjohn, J.; Feil, S. C.; Wilce, M. C. J.; Sexton, J. L.; Spithill, T. W.; Parker, M. W.; *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 857.