

JERZY ŻUCHOWSKI

*Instytut Agrofizyki PAN*

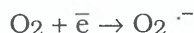
*ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27*

*e-mail: jzuch@demeter.ipan.lublin.pl*

## ROŚLINNE DYSMUTAZY PONADTLENKOWE

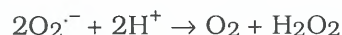
### WSTĘP

Aktywne formy tlenu (AFT), takie jak anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, oraz tlen singletowy, są ubocznymi produktami metabolizmu. Formy te są bardziej aktywne chemicznie niż tlen atmosferyczny (tlen tripletowy) i mogą powodować uszkodzenia struktur komórkowych. Anionorodnik ponadtlenkowy powstaje w wyniku jednoelektronowej redukcji cząsteczki tlenu:

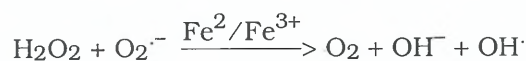


Głównym źródłem AFT w zielonych częściach roślin są prawdopodobnie chloroplasty (KANEMATSU i ASADA 1990). Powstawanie  $\text{O}_2^{\cdot -}$  jest związane z działaniem fotosystemu I i ferredoksyny. Przy niskim stężeniu NADP w chloroplastach, zredukowana ferredoksyna przekazywać może elektrony na cząsteczki tlenu. Dzieje się tak na przykład w warunkach silnego oświetlenia, gdy obniżone zostaje stężenie  $\text{CO}_2$  w chloroplastach. Alternatywnym źródłem  $\text{O}_2^{\cdot -}$  jest jedno z centrów Fe-S fotosystemu I. W chloroplastach powstawać może również tlen singletowy, w wyniku przeniesienia energii ze wzbudzonego chlorofilu na tlen atmosferyczny (SALIN 1987). Do powstania rodników ponadtlenkowych dochodzi również w mitochondriach, wskutek „wycieku” elektronów z łańcucha oddechowego. Zredukowane formy ubiquinonu i koenzymu dehydrogenazy NADH wchodzi w jednoelektronową reakcję z tlenem tworząc  $\text{O}_2^{\cdot -}$  (BARTOSZ 1995). Źródłem rodników ponadtlenkowych może być także retikulum endoplazmatyczne. We frakcji mikrosomalnej z komórek zwierzęcych występuje cytochrom P-450 i reduktaza NADH:cyt.P-450, białka mogą-

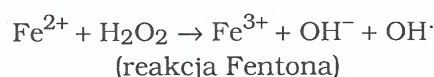
ce generować  $\text{O}_2^{\cdot -}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nie wykluczone, że są one obecne także w komórkach roślinnych (BARTOSZ 1995, BOWLER i współaut. 1992). W błonie komórkowej niektórych roślin wykryto oksydazę NAD(P)H – enzym wytwarzający  $\text{O}_2^{\cdot -}$ , służący prawdopodobnie do obrony przed pasożytami. Rodnik ponadtlenkowy może powstawać także w peroksysomach i glioksysomach, jako produkt cytochromu  $b_5$  i oksydazy moczynowej. Organella te są również głównym źródłem nadtlenu wodoru w komórce, dzięki obecności wielu rodzajów oksydaz flawinowych. Nadtlenek wodoru powstaje także w chloroplastach i innych organellach w wyniku spontanicznej lub enzymatycznej dysproporcjacji rodników ponadtlenkowych:



Nadtlenek wodoru i anionorodnik ponadtlenkowy, są stosunkowo mało groźne dla komórki i bezpośrednio nie powodują większych uszkodzeń. Jednak w obecności jonów metali przejściowych mogą one reagować ze sobą:



Jest to katalizowana przez jony metali reakcja Habera-Weissa (BARTOSZ 1995). Przebiega ona w dwóch etapach:



Powstający w niej wolny rodnik wodorotlenowy ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) jest niezwykle aktywny chemicznie.

Będąc bardzo silnym utleniaczem, reaguje praktycznie ze wszystkimi składnikami komórki, powodując uszkodzenia białek, DNA oraz peroksydację lipidów (BARTOSZ 1995). Niektórzy badacze kwestionują jednak zdolność anionorodnika ponadtlenkowego do wydajnej redukcji jonów żelazowych uważając, że są za to odpowiedzialne inne reduktory, na przykład NADH. Rodnik  $O_2^-$  ułatwia natomiast uwalnianie żelaza z białek (KEYER i współaut. 1995). Mechanizm powstawania samego  $OH^\cdot$ , na drodze reakcji Fentona, nie jest poddawany w wątpliwość.

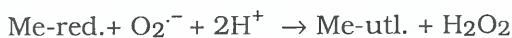
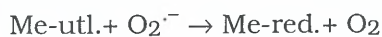
Reaktywne formy tlenu wykorzystywane są przez rośliny w różnych procesach fizjologicznych, na przykład w procesie syntezy ligniny lub do obrony przed patogenami. Pełnią więc w ich życiu istotną rolę i uznanie ich za produkty wyłącznie szkodliwe byłoby błędem (BARTOSZ 1995); ponieważ jednak są to związki potencjalnie niebezpieczne, ich ilość musi być ściśle kontrolowana.

Niekorzystne warunki środowiskowe oraz obecność ksenobiotyków powodują zwiększenie koncentracji aktywnych form tlenu w komórkach. Prowadzi to do zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej w komórce, zaczynają dominować reakcje utleniania. Stan taki definiowany jest jako stres oksydacyjny. W tych warunkach rośliny aktywują swoje systemy obronne.

Wszystkie organizmy tlenowe posiadają system ochrony komórek przed aktywnymi formami tlenu. W jego skład wchodzi białka oraz niskocząsteczkowe antyoksydanty, takie jak: kwas askorbinowy, glutation, tokoferole, karotenoidy i wiele innych. Ze względu na ogromną reaktywność rodników wodorotlenowych, nie jest możliwe ich usuwanie enzymatyczne. Istnieją natomiast enzymy chroniące przed jego prekursorami. Nadtlenek wodoru jest rozkładany przez katalazy i peroksydazy, natomiast rodniki ponadtlenkowe są neutralizowane przez dysmutazy ponadtlenkowe (BARTOSZ 1995).

#### DYSMUTAZY PONADTTLENKOWE

Dysmutazy ponadtlenkowe (ang. superoxide dismutase [SOD]; oksydoreduktaza ponadtlenek: ponadtlenek, E.C.1.15.1.1.) są metaloproteinami katalizującymi reakcję dysproporcji (dysmutacji) anionorodników ponadtlenkowych. Jest ona przeprowadzana w dwóch etapach; związany z enzymem jon metalu przejściowego ulega kolejno redukcji i utlenieniu przez anionorodnik ponadtlenkowy:



Bardzo wysoka stała szybkości katalizowanej reakcji (ok.  $2 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ ) świadczy o tym, że jest ona ograniczana praktycznie tylko przez dyfuzję substratu (SALIN 1987). Dysmutazy ponadtlenkowe występują u niemal wszystkich organizmów tlenowych oraz u większości anaerobów fakultatywnych (BARTOSZ 1995). Uważane są za podstawowy element systemu obrony komórek przed stresem oksydacyjnym, decydujący o stężeniu  $O_2^-$  i nadtlenu wodoru, substratów reakcji Habera-Weissa (BOWLER i współaut. 1992). Znaczenie tych enzymów dla prawidłowego funkcjonowania komórek w warunkach tlenowych zostało wykazane w badaniach nad pozbawionymi aktywności SOD mutantami *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, które są nadwrażliwe na obecność tlenu (KEYER i współaut. 1995, BOWLER i współaut. 1992).

Ze względu na rodzaj związanego kofaktora, wyróżnia się trzy klasy dysmutaz ponadtlenkowych: 1) dysmutazy cynkowo-miedziowe (Cu-ZnSOD), 2) dysmutazy manganowe (MnSOD), 3) dysmutazy żelazowe (FeSOD).

Poszczególne formy izomeryczne enzymu różnią się wrażliwością na jony  $CN^-$  i nadtlenek wodoru. Aktywność CuZnSOD jest hamowana przez oba związki, FeSOD tylko przez  $H_2O_2$ , natomiast MnSOD jest niewrażliwy na oba inhibitory (SALIN 1987). W organizmach roślinnych występują wszystkie trzy typy dysmutaz ponadtlenkowych.

CuZnSOD przez długi czas uważano za białka wyłącznie eukariotyczne. Wykrycie ich obecności w komórkach kilku symbiotycznych i pasożytniczych gatunków bakterii uznane zostało za zjawisko wyjątkowe, związane z przejęciem genów gospodarza. Jednak w świetle późniejszych badań wydaje się, że ta forma enzymu występuje wśród Procaryota znacznie częściej niż pierwotnie sądzono. Bakteryjne dysmutazy cynkowo-miedziowe stanowią odrębną grupę, znacznie różniącą się od eukariotycznych odpowiedników (KROLL i współaut. 1995). Dysmutazy cynkowo-miedziowe występują u niemal wszystkich gatunków roślin. Jedynie większość glonów, z wyjątkiem gatunków tworzących fragmoplast (*Charophyceae*), jest pozbawiona enzymów tej klasy (BOWLER i współaut. 1992, SALIN 1987).

MnSOD występują powszechnie u Procaryota i Eukaryota, także u roślin. Organizmy jądrowe

we, podobnie jak niektóre archebakterie (*Thermus thermophilus*, *Th. aquaticus*), zawierają formy tetrameryczne tych białek, w przeciwieństwie do pozostałych bakterii, posiadających enzymy złożone z dwóch podjednostek.

Według obecnych danych dysmutazy żelazowe, często spotykane u bakterii, w królestwie roślin występują rzadko. Są rozpowszechnione wśród jedno — i wielokomórkowych glonów, natomiast u roślin wyższych posiadają je przedstawiciele tylko kilku rodzin: *Ginkgoaceae*, *Nymphaeaceae*, *Cruciferae*, *Rutaceae*, *Papilionaceae* i *Solanaceae* (SALIN 1987, SAKURAI i współaut. 1993). Oczyszczony enzym uzyskano (przez izolację z tkanek lub metodami biologii molekularnej) między innymi z miłorzębu (*Ginkgo biloba*), grążela (*Nuphar luteum*), gorczycy (*Brassica campestris*), pomidora (*Lycopersicon esculentum*) (SALIN 1987), tytoniu (*Nicotiana glauca*) (VAN CAMP i współaut. 1990) i soi (*Glycine max*) (SAKURAI i współaut. 1993). Występowanie FeSOD w chloroplastach przedstawicieli kilku filogenetycznie odległych rodzin jest zastanawiające. Obecność tej izoformy SOD w roślinach była wykrywana najczęściej poprzez badanie aktywności dysmutazowej w żelach elektroforetycznych lub spektrofotometrycznie. Są to metody o ograniczonej czułości. Roślinne dysmutazy żelazowe nie są białkami syntetyzowanymi konstytutywnie, co dodatkowo może utrudniać ich wykrycie. Ekspresja genów FeSOD wzrasta w warunkach stresowych, gdy zwiększona jest produkcja  $O_2^{\cdot -}$  w chloroplastach (VAN CAMP i współaut. 1990). Ponadto, większość z badanych gatunków posiada w chloroplastach również CuZnSOD. Nie wykluczone, że dysmutazy żelazowe występują u roślin częściej niż pierwotnie sądzono, lecz ponieważ są one białkami indukowanymi, mogą pozostać nie wykryte w badaniach aktywności enzymatycznej. W ostatnich latach sklonowane zostały FeSOD z tytoniu i rzodkiewnika. Możliwe są więc już badania z wykorzystaniem sond molekularnych. Zapewne znacznie ułatwią one dokładniejsze poznanie problemu występowania omawianych białek.

Tabela 1. Lokalizacja dysmutaz ponadtlenkowych w komórkach roślinnych.

ENZYM	LOKALIZACJA				
	Cyt.	Chl.	Mit.	Per.	P.m.
CuZnSOD	+	+	-	+	+
MnSOD	-	+	+	+	-
FeSOD	-	+	-	-	-

Cyt.— cytoplazma, Chl.— chloroplasty, Mit.— mitochondria, Per.— peroksysonomy, P.m.— przestrzeń międzykomórkowa

Obecność dysmutaz żelazowych i manganowych, uważanych za ewolucyjnie starsze i typowe dla Procaryota, stanowić może kolejny argument na poparcie teorii o endosymbiotycznym pochodzeniu chloroplastów i mitochondriów (BARTOSZ 1995).

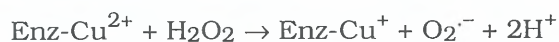
#### DYSMUTAZY CYNKOWO-MIEDZIOWE

Badania nad subkomórkową lokalizacją dysmutaz cynkowo-miedziowych w roślinach wykazały, że występują one w cytoplazmie, chloroplastach i w peroksysonomach (RABINOVITCH i FRIDOVITCH 1983, BUENO i współaut. 1995). Są one kodowane przez odrębne geny jądrowe. Komórki jednego gatunku zawierać mogą kilka izoform CuZnSOD. Chloroplastowa SOD dominuje w tkankach zielonych, natomiast enzymy cytosolowe przeważają w kiełkach i roślinach etiolowanych (BOWLER i współaut. 1992, SAKAMOTO i współaut. 1992). Enzymy pochodzące z chloroplastów są przy tym mniej wrażliwe na nadtlenek wodoru i wysoką temperaturę. Ich większa odporność jest zapewne związana z wysoką produkcją  $O_2^{\cdot -}$  i  $H_2O_2$  w chloroplastach (KANEMATSU i ASADA 1990). Prawdopodobnie istnieje jeszcze czwarty rodzaj CuZnSOD. Ze szpilek sosny (*Pinus sylvestris*) wyizolowano cztery odmiany pozakomórkowej dysmutazy ponadtlenkowej (EC-SOD) (STRELLER i WINGSLE 1994). Istnienie dysmutaz pozakomórkowych wykazano wcześniej w organizmach ssaków, ptaków, ryb, a także u nicienia *Trichinella spiralis* i u promieniowca *Nocardia asteroides* (enzym związany ze ścianą komórkową). EC-SOD z organizmów kręgowych są glikoproteinami, złożonymi z czterech jednakowych podjednostek o masie cząsteczkowej około 30 kDa. Natomiast enzymy pochodzące z sosny są homodimerami o masie około 33 kDa i nie są glikozylowane. Tak więc różnica w budowie roślinnych i zwierzęcych EC-SOD jest bardzo znaczna.

Roślinne dysmutazy cynkowo-miedziowe są białkami o masie cząsteczkowej 32–33kDa, złożonymi z dwóch jednakowych podjednostek (RABINOVITCH i FRIDOVICH 1983, SALIN 1987). Każda z podjednostek zawiera 8 fragmentów o strukturze  $\beta$ . Podjednostki są dodatkowo stabilizowane przez wewnątrzłańcuchowe mostki disulfidowe. W centrach aktywnych znajdują się jony miedzi i cynku. Jon miedziowy bezpośrednio uczestniczy w procesie katalitycznym. Jego ligandami są cztery reszty imidazolowe histydyny. W pobliżu znajduje się również jon  $Zn^{2+}$ , zwiększający stabilność podjednostek enzymu. Jest on kompleksowany przez trzy reszty histydynowe i resztę asparaginianową. Jedna z

reszt histydyny uczestniczy równocześnie w wiązaniu jonu miedzi. Taka budowa cząsteczki sprawia, że szybkość działania dysmutaz cynkowo-miedziowych jest nieco wyższa niż MnSOD i FeSOD, są one również mniej wrażliwe na działanie czynników fizycznych i chemicznych (BARTOSZ 1995).

Dysmutazy cynkowo-miedziowe są hamowane przez nadtlenek wodoru. Inaktywacja enzymu jest przypuszczalnie spowodowana reakcją wolnego rodnika  $\text{OH}^\cdot$  z resztą histydyny w centrum aktywnym enzymu.  $\text{CuZnSOD}$  może wytwarzać wolny rodnik wodorotlenowy w reakcji z nadtlenkiem wodoru. Prawdopodobny mechanizm tej reakcji jest następujący:



Reakcja ma charakter katalityczny. Cząsteczka enzymu może wytworzyć pewną ilość rodników wodorotlenowych, zanim sama nie ulegnie inaktywacji (YIM i współaut. 1990).

Enzymy pochodzące z różnych gatunków roślin cechuje wysoki stopień homologii struktury pierwszorzędowej. Porównano sekwencje aminokwasowe dwóch cytosolowych  $\text{CuZnSOD}$  z ryżu (*Oryza sativa*), oraz izoenzymów cytoplazmatycznych i chloroplastowych z kukurydzy, szpinaku, petunii i pomidora. Podobieństwo sekwencji analizowanych białek cytoplazmatycznych jest rzędu 80–92%. Niższa, choć wciąż wysoka, jest homologia do enzymów pochodzących z chloroplastów: 61–67% (SAKAMOTO i współaut. 1992). Dysmutazę z peroksysomów arbuza (*Citrullus vulgaris*) cechuje bardzo wysoka, ponad 90% homologia sekwencyjna do izoenzymów chloroplastowych z różnych gatunków roślin oraz około 70% wobec izoform cytosolowych. Ponadto białko to zawiera o połowę mniej miedzi i cynku niż cząsteczki dotąd poznanych  $\text{CuZnSOD}$ . Jest również, podobnie jak dysmutazy chloroplastowe, bardziej odporne na  $\text{H}_2\text{O}_2$  (BUENO i współaut. 1995). Większe różnice obserwuje się porównując dysmutazy roślinne z enzymami pochodzącymi z organizmów zwierzęcych, choć podobieństwo nadal jest znaczne. Porównano 154 aminokwasową sekwencję  $\text{CuZnSOD}$  ze szpinaku z sekwencjami dysmutaz z komórek wołu, konia, człowieka, ryby-miecznika oraz muszki owocowej. Różniły się one odpowiednio w 70, 68, 71, 73 i 71 pozycjach. Tak więc stopień homologii badanych enzymów zwierzęcych nie przekracza 56% (KITAGAWA i współaut. 1986). Natomiast podobieństwo sekwencji i struktury przestrzennej dysmutaz cynkowo-miedziowych do MnSOD i FeSOD jest niewielkie (BARTOSZ 1995).

#### DYSMUTAZY MANGANOWE

W roślinach, tak jak u innych organizmów jądrowych, manganowe dysmutazy ponadtlenkowe zlokalizowane są w mitochondriach (BARTOSZ 1995). Wykryto także ich obecność w peroksysomach roślinnych (BUENO i współaut. 1995). Istnieją też doniesienia o występowaniu MnSOD w chloroplastach (SALIN 1987). MnSOD z komórek roślin są tetramerami o masie cząsteczkowej około 92 kDa. Podjednostka zawiera dwie domeny: N-końcową, zawierającą pięć odcinków  $\alpha$ -helikalnych i domenę C-końcową zawierającą trzy fragmenty o strukturze  $\beta$  i dwie niewielkie  $\alpha$ -helisy. Biorący udział w procesie katalitycznym jon manganu jest wiązany przez trzy reszty histydyny i resztę kwasu asparaginowego (BARTOSZ 1995).

Dysmutazy manganowe, podobnie jak ogromna większość białek mitochondrialnych, są kodowane przez genom jądrowy. Z tego względu są syntetyzowane jako białko prekursorowe, wyposażone w N-końcową sekwencję kierującą (ang. leader sequence) do mitochondriów, długości kilkudziesięciu aminokwasów. Aktywność enzymatyczna proenzymu jest niższa w stosunku do enzymu dojrzałego. Jest on transportowany do mitochondriów, gdzie sekwencja kierująca zostaje odcięta (BOWLER i współaut. 1989). Struktury pierwszorzędowe MnSOD z różnych, nie spokrewnionych ze sobą gatunków, są bardzo do siebie podobne. Na przykład enzym z grochu (*Pisum sativum*) wykazuje odpowiednio 79,8% i 71,5% homologii w porównaniu z *N. plumbaginifolia* oraz kukurydzą (WONG-VEGA i współaut. 1991). Podobieństwo sekwencyjne roślinnych MnSOD do ich zwierzęcych odpowiedników jest już niższe. Przykładowo, stopień homologii enzymów z tytoniu *N. plumbaginifolia* i kukurydzy do ludzkiej dysmutazy manganowej wynosi odpowiednio 57 i 59% (VAN CAMP i współaut. 1990).

#### DYSMUTAZY ŻELAZOWE

Roślinne dysmutazy żelazowe zlokalizowane są w chloroplastach. FeSOD jest dimerem zbudowanym z dwóch jednakowych podjednostek o masie cząsteczkowej około 20 kDa. W miejscu aktywnym enzymu znajduje się jon żelaza. Jego ligandami są trzy reszty histydyny i reszta kwasu asparaginowego, podobnie jak u izoformy manganowej (VAN CAMP i współaut. 1990). Dysmutazy żelazowe i manganowe cechuje wysoka homologia struktury pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowej. Enzymy pochodzące z niektórych bakterii mogą wiązać żelazo lub mangan, w zależ-

ności od tego, który z pierwiastków jest dostępny w podłożu hodowlanym (SALIN 1987). Na znaczne podobieństwo pomiędzy obydwoma białkami wskazywać może również obecność w ekstraktach bakteryjnych dysmutaz hybrydowych, złożonych z podjednostek Fe i MnSOD. Van Camp i współaut. (1990) dokonali zestawienia sekwencji aminokwasowych FeSOD pochodzących z komórek tytoniu (*N. plumbaginifolia*), rzodkiewnika (*A. thaliana*), oraz bakterii *Anacystis nidulans*, *Pseudomonas ovalis*, *E. coli*, *Photobacterium leiognathi*, z sekwencjami MnSOD z kukurydzy, *N. plumbaginifolia*, bakterii *E. coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, a także myszy (*Mus musculus*) i człowieka. FeSOD pochodzące z roślin cechuje duże, dochodzące do 76%, podobieństwo strukturalne. Natomiast stopień ich homologii w stosunku do analizowanych białek bakteryjnych jest znacznie niż-

szy (choć bezwzględnie nadal znaczny) i wynosi 48–55%. Homologia struktury pierwszorzędowej roślinnych dysmutaz żelazowych i MnSOD jest jeszcze niższa, nie przekracza 39% sekwencji dla MnSOD z roślin i 47% dla enzymów bakteryjnych lub zwierzęcych. Porównywano także budowę różnych FeSOD z liczącą 216 aminokwasów sekwencją najwyższej homologii (ang. consensus sequence) MnSOD z wymienionych wcześniej organizmów. Głównymi aminokwasami odróżniającymi dysmutazy żelazowe od manganowych są prawdopodobnie: alanina 76, glutamina 77, tryptofan 79 i alanina 155. Analizowana sekwencja MnSOD w pozycjach 76,77, 155 zawiera odpowiednio dwie reszty glicyny i glutaminę. Reszta tryptofanu w pozycji 79 jest prawdopodobnie odpowiedzialna za wrażliwość FeSOD na nadtlenek wodoru (VAN CAMP i współaut. 1990).

#### REGULACJA EKSPRESJI SOD

Molekularne mechanizmy prowadzące do indukcji ekspresji genów SOD są słabo poznane. Nie wiadomo, co jest czynnikiem bezpośrednio aktywującym transkrypcję. Ekspresja niektórych genów pro- i eukariotycznych jest regulowana przez czynniki transkrypcyjne, których aktywatorami są aktywne formy tlenu. Przykładem może być białko OxyR z *Salmonella typhimurium*, regulujące ekspresję kilku genów indukowanych przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. W podobny sposób regulowana jest aktywność pewnych czynników transkrypcyjnych u zwierząt. Czynnikiem jądrowym NF-κB jest aktywatorem ekspresji wielu genów w komórkach poddanych działaniu czynników indukujących stres oksydacyjny (TNFα, interleukina 1, estry forbolu). NF-κB stymuluje między innymi transkrypcję genów białek chroniących komórkę przed aktywnymi formami tlenu — tioredoksyny i MnSOD (BOWLER i współaut. 1992, BARTOSZ 1995). Ekspresja genów niektórych białek roślinnych również zależy od stanu oksydoredukcyjnego komórki. Tak jest w przypadku białek wiążących chlorofil a/b (geny *cab*) i niektórych innych białek chloroplastowych (FOYER i współaut. 1997). W procesie regulacji ekspresji genów dysmutaz ponadtlenkowych oraz innych białek roślinnych, ważną rolę może pełnić glutation. Zwiększenie stężenia formy utlenionej glutationu powoduje podwyższenie poziomu mRNA cytoplazmatycznej i (w mniejszym stopniu) chloroplastowej CuZnSOD z sosny (*P. sylvestris*). Prawdopodobnie decydującą rolę odgrywa tu zmiana stosunku GSH/GSSG, zmiany bezwzględ-

nych stężeń obu form tego związku są mniej istotne. Zwiększenie stężenia GSH prowadziło do zmniejszenia poziomu transkrypcji genów SOD (WINGSLE i KARPINSKI 1996). Uzyskiwano również rezultaty przeciwne. W protoplastach tytoniu *N. plumbaginifolia*, oraz w dojrzałym tytoniu *N. tabacum*, do których wprowadzono gen reporterowy β-glukuronidazy połączony z promotorem cytosolowej CuZnSOD, obserwowano wzrost ekspresji genu reporterowego pod wpływem GSH i innych związków tiolowych (HEROUART i współaut. 1993, 1994). Nie zmienia to jednak faktu, że stężenie glutationu oraz stosunek GSH/GSSG wpływają na wiele procesów związanych z reakcją roślin na stres środowiskowy, w tym także na syntezę białek.

Wszystkie izoformy SOD są kodowane w genomie jądrowym, a ich ekspresja jest regulowana niezależnie. W warunkach stresu oksydacyjnego indukowane są geny dysmutaz ponadtlenkowych pochodzących z tych przedziałów komórkowych, w których wzrosła zawartość AFT. Być może w procesie przekazywania sygnałów do jądra uczestniczą związki powstające w mitochondriach, chloroplastach i cytosolu wskutek zachodzących tam przemian oksydacyjnych. Taką rolę mogłyby pełnić pochodne kwasów tłuszczowych specyficznych dla różnych przedziałów komórkowych (BOWLER i współaut. 1992).

Bardzo niewiele wiadomo o białkach uczestniczących w regulacji ekspresji SOD. Do poznanych należy czynnik transkrypcyjny ACE1 z pochodzący z drożdży *S. cerevisiae*. Był on zna-

ny już wcześniej, jako regulator transkrypcji genu metalotioneiny. ACE1 może wiązać miedź, która jest jego aktywatorem (GRALLA i współaut. 1991). W przypadku roślin znane są mutanty, zawierające mutacje w genach związanych z

regulacją ekspresji SOD, lecz samych genów, a tym bardziej ich produktów białkowych, nie udało się wyizolować (BOWLER i współaut. 1992).

#### UWAGI KOŃCOWE

Podstawowymi składnikami systemu obrony roślin przed stresem oksydacyjnym są enzymy antyoksydacyjne, w tym dysmutazy ponadtlenkowe. Generalnie ich aktywność wzrasta w warunkach niekorzystnych dla organizmów. Ponadto rośliny odporne na różne typy stresu środowiskowego mają zwykle zwiększoną aktywność jednego lub kilku tych enzymów (ALLEN 1995). Dysmutazy ponadtlenkowe, będąc ważnym elementem systemu obronnego organizmów, są intensywnie badane. Duże zainteresowanie budzą zwłaszcza zmiany aktywności SOD w roślinach pod wpływem takich czynników jak susza lub zalanie wodą, zanieczyszczenia atmosferyczne, herbicydy, nadmierne oświetlenie, zbyt wysoka lub zbyt niska temperatura i inne (BOWLER i współaut. 1992). Czytelnikom szczególnie zainteresowanym tymi właśnie zagadnieniami polecić można przeglądową pracę Bowlera i współaut. (1992).

Prowadzone są również badania nad transgenicznymi roślinami o podwyższonej aktywności SOD. Uzyskane efekty są różne, w zależności od testowanej rośliny, użytego izoenzymu oraz poziomu ekspresji wprowadzonego genu. Bardzo wysoki, 30–50-krotny wzrost aktywności chloroplastowej CuZnSOD nie zwiększał w istotny sposób odporności badanych roślin na

czynniki stresowe, co było prawdopodobnie związane z akumulacją  $H_2O_2$  w chloroplastach, powodującą inhibicję enzymu. Dlatego lepsze rezultaty uzyskiwano przy niewielkiej tylko nadekspresji SOD. Tak zmodyfikowany tytoń był znacznie bardziej odporny na hamowanie fotosyntezy w warunkach intensywnego naświetlenia i niskich temperatur, i w mniejszym stopniu, na herbicyd parakwat. Natomiast transgeniczne rośliny, wzbogacone o MnSOD w chloroplastach, okazały się bardzo odporne na parakwat i inne czynniki chemiczne, ale nie na silne oświetlenie (ALLEN 1995, BOWLER i współaut. 1992).

Nie wykluczone, że rola SOD nie ogranicza się jedynie do neutralizacji rodników ponadtlenkowych. Z drożdży *S. cerevisiae* hodowanych na podłożu zawierającym srebro, wyizolowano dysmutazę ponadtlenkową zawierającą srebro zamiast miedzi, pozbawioną oczywiście aktywności enzymatycznej. Sugeruje to, iż dysmutazy ponadtlenkowe mogą pełnić również rolę chelatora metali ciężkich, przynajmniej u drożdży (CIRIOLO i współaut. 1994). Nie wszystkie tajemnice tych enzymów zostały więc jeszcze odkryte. Jednak najbliższe lata przyniosą zapewne rozwiązanie wielu problemów poruszonych w tym artykule.

#### VEGETABLE SUPEROXIDE DISMUTASES

##### Summary

The paper deals with vegetable superoxide dismutases (SOD). These enzymes are present in almost all organisms living in the atmosphere of oxygen and they protect cells against toxicity of highly reactive superoxide radical anions ( $O_2^{\cdot-}$ ). In the introduction, general information about reactive oxygen species (superoxide radical anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, singlet oxygen) is presented.

Next chapters contain data about the enzymes themselves. There are three classes of SOD present in plants: copper-zinc superoxide dismutase, manganese superoxide dismutase and iron superoxide dismutase. Their subcellular localization, structure, as well as expression of the respective genes are discussed.

##### LITERATURA

- ALLEN R. D., 1995. *Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants*. Plant Physiol. 107, 1049–1054.
- BARTOSZ G., 1995. *Druga twarz tlenu*. PWN, Warszawa.
- BOWLER C., ALLIOTTE T., VAN DEN BULCKE M., BAUW G., VANDEKERCKHOVE J., VAN MONTAGU M., INZE D., 1989. *A plant manganese superoxide dismutase is efficiently imported and correctly processed by yeast mitochondria*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 3237–3241.
- BOWLER C., VAN MONTAGU M., INZE D., 1992. *Superoxide dismutase and stress tolerance*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43, 83–116.
- BUENO P., VARELA J., GIMENEZ-GALLEGO G., DEL RIO L. A., 1995. *Peroxisomal copper,zinc superoxide dismutase. Characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons*. Plant Physiol. 108, 1151–1160.

- CIRIOLO M. R., CIVITAREALE P., CARRI M. T., DE MARTINO A., GALIAZZO F., ROTILIO G., 1994. Purification and characterization of Ag,Zn-superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae* exposed to silve. *J. Biol. Chem.* 269, 25783–25787.
- FOYER C. H., LOPEZ-DELGADO H., DAT J. F., SCOTT I. M., 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol. Plant.* 100, 241–254.
- GRALLA E. B., THIELE D. J., SILAR P., VALENTINE J. S., 1991. ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper,zinc-superoxide dismutase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 8558–8562.
- HEROUART D., VAN MONTAGU M., INZE D., 1993. Redox-activated expression of the cytosolic copper/zinc superoxide dismutase gene in *Nicotiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 3108–3112.
- HEROUART D., VAN MONTAGU M., INZE D., 1994. Developmental and environmental regulation of the *Nicotiana plumbaginifolia* cytosolic Cu/Zn Superoxide dismutase promoter in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 104, 873–880.
- KANEMATSU S., ASADA K., 1990. Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutases in spinach, rice and horsetail. *Plant Cell Physiol.* 31, 99–112.
- KEYER K., STROHMEIER G., IMLAY J.A., 1995. Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* 177, 6782–6790.
- KITAGAWA Y., TSUNASAWA S., TANAKA N., KATSUBE Y., SASIYAMA F., ASADA K., 1986. Amino acid sequence of copper,zinc superoxide dismutase from spinach leaves. *J. Biochem.* 99, 1289–1298.
- KROLL J. S., LANGFORD P. R., WILKS K. E., KEIL A. D., 1995. Bacterial Cu,Zn-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eucaryotic enzyme, and not so rare after all!. *Microbiol.* 141, 2271–2279.
- RABINOVITCH H. D., FRIDOVICH I., 1983. Superoxide radicals, superoxide dismutases, and oxygen toxicity in plants. *Photochem. Photobiol.* 37, 679–690.
- SAKAMOTO A., OKSUGA H., TANAKA K., 1992. Nucleotide sequences of two cDNA clones encoding different Cu/Zn-superoxide dismutases expressed in developing rice seed (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* 19, 323–327.
- SAKURAI H., KUSUMOTO N., KITAYAMA K., TOSAKAGI R. K., 1993. Isozymes of superoxide dismutase in *Chlamydomonas* and purification of one of the major isozymes containing Fe. *Plant Cell Physiol.* 34, 1133–1137.
- SALIN M. L., 1987. Toxic oxygen species and protective system of the chloroplast. *Physiol. Plant.* 72, 681–689.
- STRELLER S., WINGSLE G., 1994. *Pinus sylvestris* L. needles contain extracellular Cu,Zn-superoxide dismutase. *Planta.* 192, 195–201.
- VAN CAMP W., BOWLER C., VILLARROEL R., TSANG E.W. T., VAN MONTAGU M., INZE D., 1990. Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9903–9907.
- WINGSLE G., KARPINSKI S., 1996. Differentiation redox regulation by glutathione of glutathione reductase and Cu,Zn-superoxide dismutase gene expression in *Pinus sylvestris* L. *Planta* 198, 151–157.
- WONG-VEGA L., BURKE J. J., ALLEN R. D., 1991. Isolation and sequence analysis of a cDNA that encodes pea manganese superoxide dismutase. *Plant Mol. Biol.* 17, 1271–1274.
- YIM M.B., CHOCK P. B., STADTMAN E. R., 1990. Copper,zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5006–5010.