

# Wybrane mechanizmy obronne organizmów przed stresem oksydacyjnym ze szczególnym uwzględnieniem dysmutaz ponadtlenkowych

Nikola Sikora, Zuzanna Znajewska, Grażyna Dąbrowska

DOI: 10.24131/3247.170403

## Streszczenie:

Stres oksydacyjny można określić jako brak równowagi pomiędzy reaktywnymi formami tlenu, RFT (tlenem singletowym, anionorodnikiem ponadtlenkowym, rodnikiem hydroksylowym i nadtlakiem wodoru) a systemem antyoksydacyjnym. Reaktywne formy tlenu reagują ze związkami organicznymi zaburzając homeostazę organizmu. W organizmach są one eliminowane poprzez nieenzymatyczne przeciwutleniające i enzymy usuwające lub dezaktywujące RFT. Wśród nich kluczową rolę odgrywają dysmutazy ponadtlenkowe (SOD), których poziom w komórkach roślinnych może

być regulowany wieloma czynnikami stresowymi. Dysmutazy ponadtlenkowe obecne są zarówno u organizmów tlenowych jak i beztlenowych, a ich klasyfikacja obejmuje izoformy miedziowo-cynkowe, manganowe, żelazowe i niklowe. W niniejszej pracy scharakteryzowano rodzinę roślinnych dysmutaz ponadtlenkowych, ich rolę podczas stresu oksydacyjnego oraz przedstawiono stopień pokrewieństwa między sekwencjami aminokwasowymi roślinnych i ludzkich SOD, a także tkankowo-specyficzną oraz rozwojowo-zróżnicowaną ekspresję genów *Sod*.

**Słowa kluczowe:** wzrost i rozwój roślin, stres oksydacyjny, SOD, reaktywne formy tlenu

otrzymano: 14.10.2017; przyjęto: 22.06.2018; opublikowano: 30.06.2018



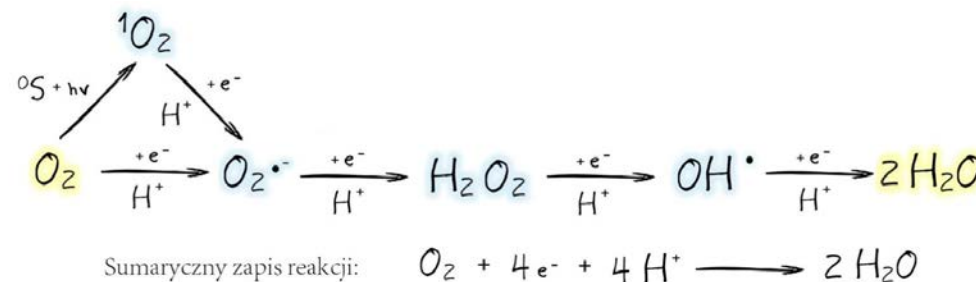
**Nikola Sikora:** Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu



**mgr Zuzanna Znajewska:** Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu



**dr hab. Grażyna Dąbrowska:** Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu



Ryc. 1. Schemat stopniowej redukcji cząsteczki tlenu do wody, w etapach jednoelektronowych lub przy wzbudzeniu, prowadzącej do wytworzenia różnych ROS (■), gdzie  $^1O_2$  to siarka, a  $h\nu$  energia

Źródło: oprac. własne na podst.: Scandaliosa (2005).

## Wstęp

Wzrost i rozwój organizmów zależy od współdziałania zarówno czynników endo-, jak i egzogennych. Czynniki te wpływają na metabolizm organizmu, przede wszystkim na poziomie ekspresji genów (Tretyn, 2002; Luscombe i wsp., 2004). Każdego roku stres wynikający z zaburzeń działania czynników środowiskowych powoduje znaczne straty w jakości i produktywności pól rolnych (Hatfield i wsp., 2011). Ekspozycja roślin na różnorodne czynniki abiotyczne, takie jak: promieniowanie UV, nadmiar promieniowania fotosyntetycznego (PAR – ang. *photosynthetically active radiation*), wahania temperatury, suszę, metale ciężkie, stres osmotyczny, zanieczyszczenia atmosferyczne ( $O_3$ ,  $SO_2$ ,  $NO$ ,  $NO_2$ ), niektóre herbicydy (np. parakwat), a także czynniki biotyczne (np. atak patogenu) przyczynia się do wytworzenia stresu oksydacyjnego, zwanego również stanem szoku tlenowego (Apel i Hirt, 2004).

Odpowiedź roślin na szok tlenowy może powodować uruchomienie takich procesów jak: lignifikacja, tworzenie brodawek korzeniowych i starzenie się komórek. Ze stanem szoku tlenowego bezpośrednio wiąże się wytworzenie na drodze częściowej redukcji cząsteczki

tlenu ( $O_2$ ) lub reaktywnych form tlenu (RFT, ROS, ang. *reactive oxygen species*), takich jak: tlen singletowy  $^1O_2$ , anionorodnik ponadtlenkowy  $O_2^{\cdot-}$ , rodnik hydroksylowy  $OH^{\cdot}$  i nadtlenek wodoru  $H_2O_2$  (Das i Roychoudhury, 2014) (Ryc. 1).

Reakcja stresu oksydacyjnego rozpoczyna się od nadmiernego wytwarzania przez organizm reaktywnych form tlenu i zaburzenia równowagi antyoksydantów (AOX, ang. *antioxidant*), co doprowadza do naruszenia homeostazy redoks w organizmie (Bhattacharyya i wsp., 2014) (Ryc. 2). Produkcja i akumulacja wolnych rodników jest obserwowana w reakcji organizmów na wiele różnych stresów środowiskowych (Lobo i wsp., 2010).

RFT są potencjalnie szkodliwe dla komórek i poszczególnych organelli komórkowych, ponieważ mogą wchodzić w reakcję z kwasami nukleinowymi, białkami, lipidami i węglowodanami (Baek i Skinner, 2005; Sharma i wsp., 2012).

Rośliny, jak i inne organizmy, posiadają mechanizmy umożliwiające skuteczne i szybkie usuwanie reaktywnych form tlenu, jest to tzw. „system wychwytyjący RFT”, inaczej nazywany antyoksydacyjnym systemem obronnym (Dat i wsp., 2001; Bałabusta i wsp., 2016; Hasanuzzaman i wsp., 2017). System ten skutecznie usuwa wolne rodniki tlenowe z organelli komórkowych, przede wszystkim z chloroplastów, mitochondriów, peroksyosomów oraz glioksysomów (Alscher i wsp., 2002). Wydajne funkcjonowanie antyoksydantów obu rodzajów ma fundamentalne znaczenie dla zachowania prawidłowej struktury i funkcji każdej żywej komórki w warunkach stresowych. Do przeciwutleniaczy nieenzymatycznych zalicza się m.in.: glutation (GSH),  $\alpha$ -tokoferol (witaminę E), kwas askorbinowy (witaminę C), a także cysteinę, homoglutation, karotenoidy, flawonoidy i mannitol. Natomiast enzymatyczny system wychwytyjący toksyczne rodniki tlenowe składa się z enzymów bezpośrednio

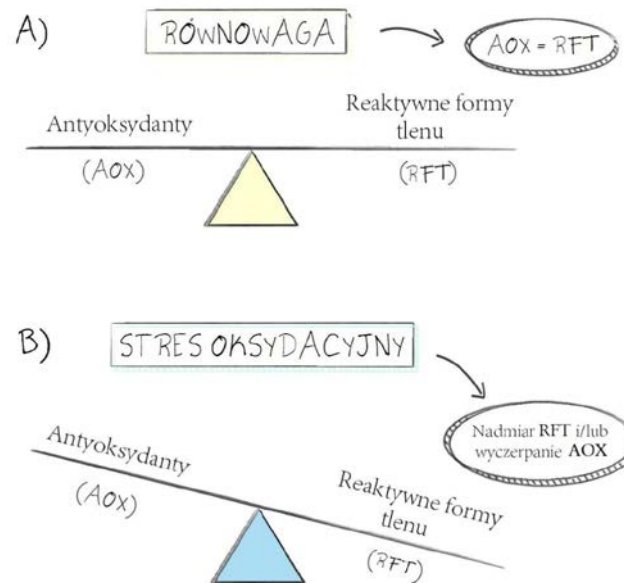
usuujących RFT – dysmutaz ponadtlenkowych (SOD), katalaz (CAT), peroksydaz (POX) oraz z enzymów cyklu Halliwell-Asada, uczestniczących w unieczynnieniu RFT poprzez antyutleniacze niskocząsteczkowe (Dąbrowska i wsp., 2007b). Generowanie RFT ogranicza także alternatywna oksydaza obecna w roślinnych mi-

tochondriach (Małecka i Tomaszewska, 2005; Sharma i wsp., 2012). Złożony antyoksydacyjny system obronny umożliwia roślinom wydajne przekształcanie energii słonecznej w chemiczną i prawidłowe funkcjonowanie w zmiennych warunkach środowiskowych.

Intensywność przemian zachodzących w komórce roślinnej z udziałem RFT zależy od ich stężenia, które jest wynikiem równowagi między szybkością powstawania reaktywnych form tlenu i ich eliminacji. Wzrost stężenia tych cząsteczek prowadzi do stresu oksydacyjnego. Do jego powstania przyczyniają się: zbyt niska/ zbyt wysoka temperatura, deficyt wody lub soli mineralnych, nadmiar jonów, promieniowanie UV, metale ciężkie, nadmiar promieniowania fotosyntetycznie czynnego, atak patogenu, stres osmotyczny (Kotchioni i Gachmo, 2006).

## Tlen jako pierwiastek życia i śmierci

Tlen ( $O_2$ ), którego zawartość w dolnych warstwach atmosfery wynosi 21%, w atmosferze występuje jako tlen trypletowy i pełni funkcję najważniejszego biologicznego akceptora elektronów (Zahnle i wsp., 2010). Pierwiastek ten umożliwia życie organizmom tlenowym, ale stanowi także źródło poważnych zagrożeń fizjologicznych, będących nieuniknioną konsekwencją stresu oksydacyjnego i ceną jaką organizmy muszą płacić za życie w środowisku zawierającym tlen. Z tego względu, mówi się o paradoksie związanym z obecnością tlenu w atmosferze. Polega on na tym, że z jednej strony metabolizm tlenowy dostarcza organizmom aerobowym więcej energii w porównaniu z metabolizmem beztlenowym anaerobów, a z drugiej strony stopniowa redukcja  $O_2$  do  $H_2O$  prowadzi do powstawania toksycznych dla komórki RFT (Małecka i Tomaszewska, 2005; Müller i wsp., 2012). Presja ewolucyjna wywierana przez toksyczność tlenu doprowadziła do wytworzenia mecha-

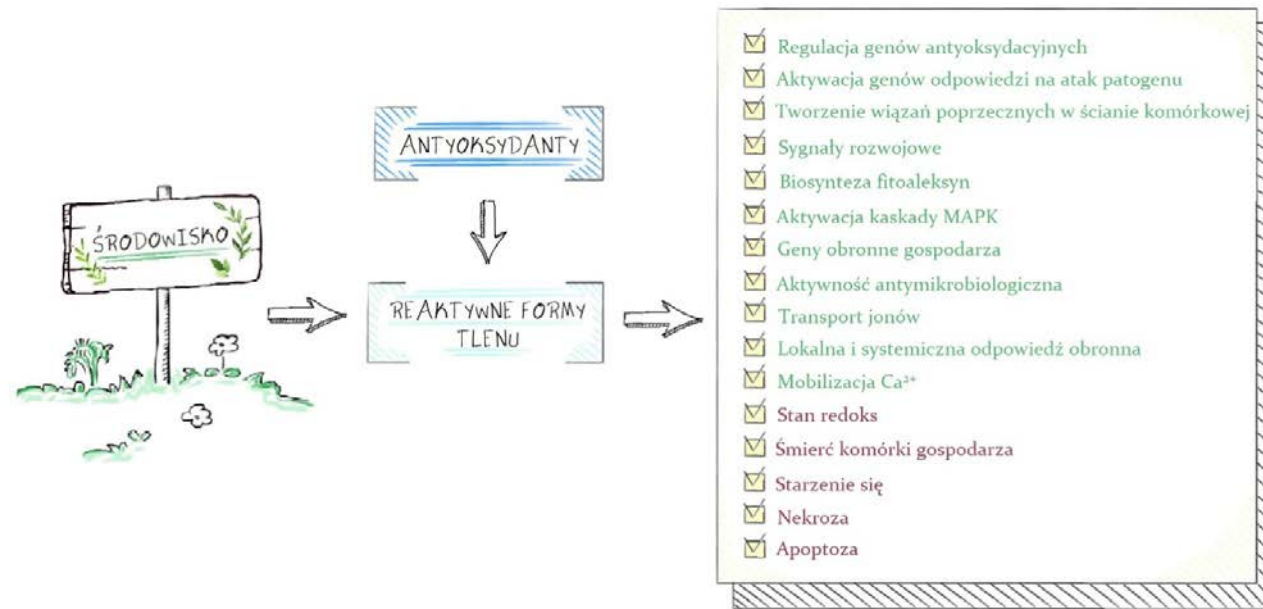


Ryc. 2. Schemat ilustrujący przyczyny stresu oksydacyjnego;

(a) w naturalnych warunkach komórki utrzymują dynamiczną równowagę między produkcją antyoksydantów (AOX) i reaktywnych form tlenu (RFT);

(b) w niekorzystnych warunkach środowiskowych dochodzi do wzrostu poziomów RFT i/lub wyczerpania antyoksydantów, w efekcie czego zakłócona zostaje równowaga redoks, prowadząca do powstania w komórce stresu oksydacyjnego.

Źródło: oprac. własne na podst.: Scandaliosa (2005).



Ryc. 3. Schemat przedstawiający niektóre z korzystnych (kolor zielony) oraz niekorzystnych (kolor czerwony) funkcji RFT; MAPK – kinazy aktywowane mitogenami

Źródło: Kotchioni i Gachmo, 2006.

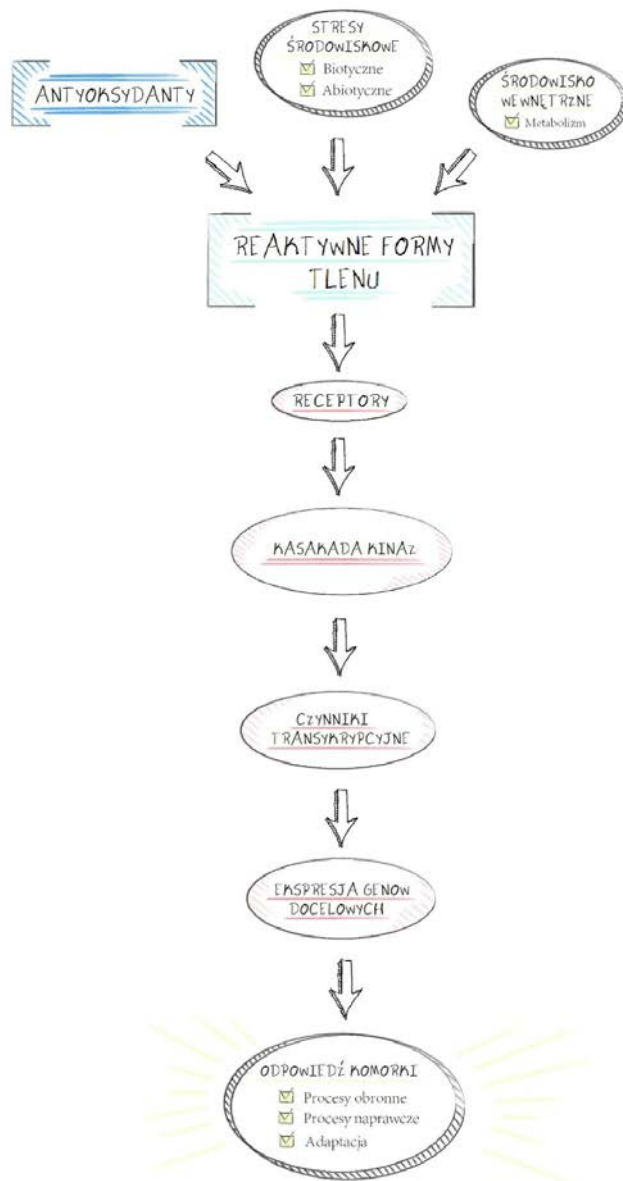
nizmów zmniejszających niepożądane skutki działania RFT oraz do konstruktywnego wykorzystania wolnych rodników tlenowych (Lobo i wsp., 2010; Bhattacharyya i wsp., 2014). Twierdzenie, że wolne rodniki tlenowe są jedynie toksycznymi produktami metabolizmu tlenowego zmieniło się wraz z odkryciem pełnienia przez RFT (szczególnie  $H_2O_2$  i  $O_2^{\cdot}$ ) roli obronnej przed patogenami oraz funkcji precyzyjnie regulowanych cząsteczek sygnałowych, przekazujących informacje do komórki (Scandalios, 2005; Ślesak i wsp., 2007) (Ryc. 3).

### Charakterystyka wybranych genów uruchamianych w odpowiedzi na obecność RFT

W trakcie ewolucji organizmy wykształciły skomplikowane systemy antyoksydacyjne w celu utrzymania równowagi i sprawnego funkcjonowania komórek. Poznane są dwa typy systemów przeciwutleniających: nieenzymatycznych i enzymatycznych. Tokoferol, glutation, flawonoidy, karotenoidy i kwas askorbinowy należą do tych pierwszych, a wśród enzymów można wyróżnić: dysmutazy ponadtlenkowe, peroksydazy (askorbiniano-

wa, glutationowa), katalazy i enzymy utleniające i redukujące askorbinian (Dąbrowska i wsp., 2007).

Zróznicowana ekspresja genów w komórce jest niezbędna dla jej prawidłowego funkcjonowania oraz pełnienia ściśle określonej roli metabolicznej. Organizm może reagować i odpowiadać na różne warunki środowiskowe w ściśle określony sposób, np. poprzez aktywację lub inaktywację wybranych genów. Uważa się, że geny, których ekspresja wzrasta podczas trwania stresu są odpowiedzialne za ochronę przed czynnikami powodującymi stres lub wymaganymi dla przetrwania organizmu w niekorzystnych warunkach. Wciąż potrzebne są badania na temat podstaw molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za rozpoznawanie RFT, poprzez które genom odbiera sygnały środowiskowe i mobilizuje organizm do reakcji. Wiadomo, że u organizmów należących do wyższych eukariontów odpowiedź na stres oksydacyjny jest bardziej złożona w porównaniu do prokariotów i drożdży. W systemie ssaczym w regulację odpowiedzi na stres oksydacyjny zaangażowane są czynniki transkrypcyjne NF- $\kappa$ B (ang. *nuclear factor  $\kappa$ B*) oraz AP-1 (ang. *activator protein-1*) (Skrzycki i Czeczot, 2004; Scandalios, 2005; Raininga i wsp., 2014). Ponadto indukcja specyficznych genów antyoksydacyjnych, takich jak: S-transferaza glutationowa (*Gst*), metalotioneina-I i manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (*MnSod*), zachodzi za pośrednictwem elementów warunkujących odpowiedź antyoksydacyjną (ARE – ang. *antioxidant responsive element*), występujących w regionach promotorowych tych genów. Miejsca wiązania NF- $\kappa$ B, AP-1 oraz motywy ARE zostały odkryte także w promotorach genów antyoksydacyjnych (np. w genach kodujących katalazy, *Cat*) u roślin wyższych. Działanie tych czynników nie jest ograniczone jedynie do aktywacji genów kodujących białka chroniące przed wybuchem tlenowym. Wiadomo, że szczególnie NF- $\kappa$ B pełni ważną rolę w modulacji



Ryc. 4. Schemat ilustrujący szlaki sygnalizacyjne prowadzące do oksydo-redukcyjnej aktywacji genów

Źródło: oprac. własne na podst. Scandalios (2005).

komórkowej odpowiedzi na inne stresy oraz w regulacji metabolizmu podstawowego (Skrzycki i Czczot, 2004; Scandalios, 2005).

Innymi enzymami biorącymi udział w redukcji reaktywnych form tlenu w organizmach są peroksydazy i katalazy. Katalaza to białko posiadające w swojej strukturze hem i katalizuje reakcję dysproporcjonowania nadtlenu wodoru. Występuje w organizmach zwierzęcych, roślinnych, jak i bakteryjnych, przy czym w komórkach eukariotycznych zlokalizowana jest głównie w peroksosomach (Ścibor i Czczot, 2006). Aktywność katalityczna tego enzymu zależy od stężenia nadtlenu wodoru w środowisku. W przypadku niskiego stężenia  $H_2O_2$  następuje jego rozkład do wody i tlenu (Bartosz, 2003; Ścibor i Czczot, 2006). Natomiast wśród peroksydaz jedną z najważniejszych grup antyoksydacyjnych enzymów u roślin jest peroksydaza askorbinianowa (APX). Są to białka zawierające grupę hemo-prostetyczną, podobnie jak katalazy, w której żelazo odgrywa ważną rolę w miejscu katalitycznym enzymu i wpływa na jego aktywność (Dąbrowska i wsp., 2007b). Peroksydazy obecne są praktycznie we wszystkich organizmach, u których ze względu na różną lokalizację, właściwości, czy strukturę podjednostek wyróżnia się 4 ich różne formy. Ich główną rolą jest rozkładanie nadtlenu wodoru, a także działanie zapobiegające deformacji lipidów, dzięki czemu enzymy te chronią błonę komórkową przed uszkodzeniem (Łukaszewicz-Hussain, 2003).

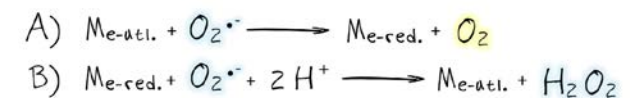
Istnieją dowody potwierdzające indukcję RFT przez różne stresy biotyczne i abiotyczne, w których wolne rodniki tlenowe służą jako wspólny element regulacji różnych szlaków sygnalizacyjnych. Stresy aktywują także kaskadę kinaz białkowych MAPK, dlatego sugeruje się, że MAPK mogłyby być jednym z kilku zbieżnych punktów w obronnej sieci sygnalizacyjnej (Scandalios, 2005; Taj i wsp., 2010; Saucedo-García i wsp., 2015) (Ryc. 4).

## Roślinne dysmutazy ponadtlenkowe

Spośród RFT najbardziej toksyczne są rodniki hydroksylowe ( $OH^\bullet$ ) – niezwykle silne utleniacze, których dyfuzja i reakcje z cząsteczkami organicznymi zachodzą w podobnym tempie, stąd rodniki hydroksylowe nie mogą podlegać bezpośredniej kontroli. Dlatego organizmy tlenowe eliminują mniej reaktywne formy prekursorowe ( $H_2O_2$  i  $O_2^{\bullet -}$ ) najskuteczniej, jak tylko to możliwe (Imlay, 2008; Sharma i wsp., 2012).

W bezpośrednią regulację komórkowego stężenia  $O_2^{\bullet -}$  i  $H_2O_2$  zaangażowane są dysmutazy ponadtlenkowe (E.C.1.15.1.1; SOD, ang. *superoxide dismutase*), których funkcja katalityczna została odkryta przez McCorda i Fridovicha (1969). SOD katalizują reakcję dysproporcjonowania (dysmutacji) dwóch anionorodników ponadtlenkowych do nadtlenu wodoru i tlenu cząsteczkowego (Dat i wsp., 2001; Nowak, 2012) (Ryc. 5). Dysmutazy ponadtlenkowe eliminują pierwszy produkt jednoelektronowej redukcji tlenu przekształcając go w nadtlenek wodoru, który usuwany jest następnie przez katalazy lub peroksydazy oraz metalotioneiny (Scandalios, 2005; Koszucka i Dąbrowska, 2006; Lobo i wsp., 2010).

Dysmutazy ponadtlenkowe, wraz z katalazami, uważane są za najskuteczniejsze enzymy antyoksydacyjne



Ryc. 5 Dwuetapowa reakcja dysmutacji anionorodników ponadtlenkowych katalizowana przez SOD

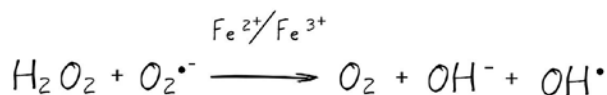
W pierwszym etapie (a) związany z enzymem jon metalu przejściowego ( $M_{e-utl.}$  – jon metalu w formie utlenionej) ulega redukcji do jonu metalu zredukowanego ( $M_{e-red.}$ ), a w drugim etapie (b) utlenieniu przez anionorodnik ponadtlenkowy.

Źródło: oprac. własne na podst. Żuchowski (1999).

(Fukai i Ushio-Fukai, 2011). Charakteryzują się bardzo wysoką stałą szybkości katalizowanej reakcji ( $K = 2-3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), świadczącą o tym, że jest ona ograniczona praktycznie tylko przez dyfuzję substratu, a stężenie SOD w większości komórek wynosi ok.  $10^{-5} \text{ M}$  (Fink i Scandalios, 2002; Forman i wsp., 2010). Szybkość reakcji dysmutazy ponadtlenkowej z  $\text{O}_2^{\cdot-}$  możliwa jest dzięki mechanizmowi naprowadzania elektrostatycznego (ang. *electostatic guidance*). SOD ma na swojej powierzchni układ naładowanych reszt aminokwasowych, które tworzą gradient pola elektrostatycznego, dzięki czemu anion kierowany jest wprost do centrum aktywnego enzymu (Bartosz, 2003).

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej zabezpiecza przed reakcją nadtlenu wodoru z anionorodnikiem ponadtlenkowym (reakcja Habera-Weissa), która zachodzi w obecności jonów metali przejściowych i prowadzi do powstania, niezwykle toksycznego dla układów biologicznych, rodnika hydroksylowego (Ryc. 6). SOD uważa się za pierwszą linię obrony przed toksycznym działaniem RFT (Alscher i wsp., 2002).

Poszczególne formy izomeryczne enzymu różnią się ponadto wrażliwością na KCN i  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Aktywność Cu/ZnSOD jest hamowana zarówno przez  $\text{H}_2\text{O}_2$ , jak i KCN. Dysmutazy żelazowe ulegają inhibicji tylko przez cząsteczki  $\text{H}_2\text{O}_2$ , natomiast MnSOD jest niewrażliwa na oba inhibitory (Bowler i wsp., 1994; Staimer i wsp., 2012).



Ryc. 6. Katalizowana przez jony żelaza reakcja Habera-Weissa (biologiczna reakcja Fentona)

Źródło: oprac. własne na podst.: Bartosz (2003).

## Występowanie i klasyfikacja SOD

Dysmutaza ponadtlenkowa jest bardzo rozpowszechniona w przyrodzie. Jej obecność stwierdzono u większości organizmów tlenowych, anaerobów względnych (beztlenowców fakultatywnych), a nawet u niektórych anaerobów bezwzględnych (beztlenowców obligatoryjnych) (Fink i Scandalios, 2002; Imlay, 2008). Obecność SOD u większości aerobów pełni główną rolę w procesie molekularnej adaptacji do życia w atmosferze tlenowej. Znaczenie SOD dla organizmów tlenowych zostało opisane w licznych badaniach nad pozbawionymi aktywności SOD mutantami, zarówno prokariotycznymi, jak i eukariotycznymi (np. *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*), które są nadwrażliwe na tlen, w konsekwencji czego umierają po ekspozycji na warunki tlenowe (Miller, 2012).

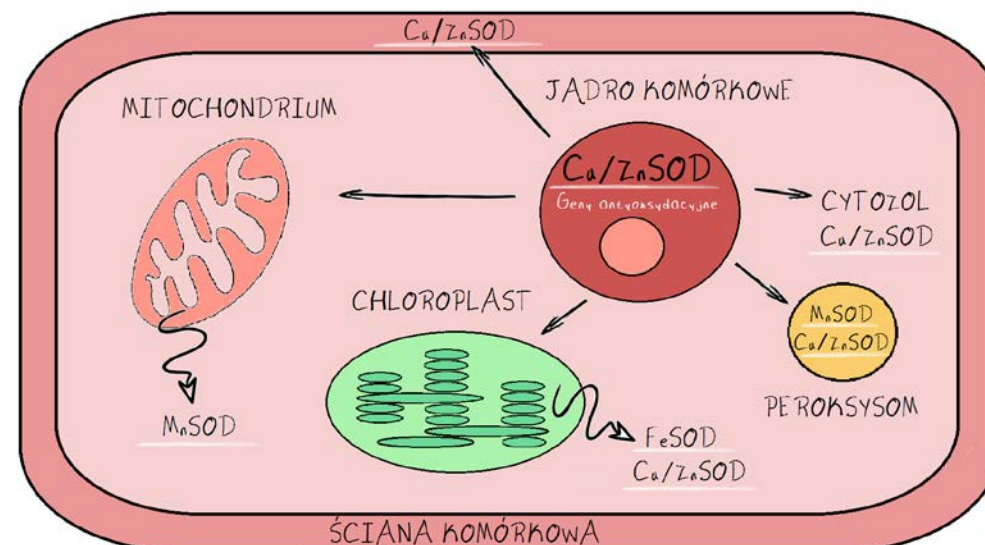
Ze względu na rodzaj, związanego w centrum aktywnym, metalicznego kofaktora wyróżnia się cztery klasy dysmutaz ponadtlenkowych:

- miedziowo - cynkowe dysmutazy ponadtlenkowe [Cu(II), Zn(II); Cu/ZnSOD]
- manganowe dysmutazy ponadtlenkowe [Mn(III); MnSOD]
- żelazowe dysmutazy ponadtlenkowe [Fe(III); FeSOD]
- niklowe dysmutazy ponadtlenkowe [Ni(II/III); Ni-SOD].

Wszystkie wymienione izoformy SOD oprócz ostatniej, którą wykryto tylko u *Streptomyces*, mogą występować u organizmów roślinnych (Fink i Scandalios, 2002). W organizmach roślinnych SOD rozmieszczone są w różnych przedziałach subkomórkowych, tzw. kompartmentach, w których dochodzi do wzmożonego powstawania reaktywnych form tlenu (Ryc. 7).

Ryc. 7. Schemat subkomórkowej lokalizacji SOD u roślin

Źródło: oprac. własne na podst.: Alscher i wsp. (2002).



Cu/ZnSOD zlokalizowana jest zazwyczaj w cytozolu, chloroplastach, głównie na powierzchni błon tylakoidów gran od strony stromy, gdzie zlokalizowany jest fotosystem I (PSI) lub w peroksysomach. Reakcje immunolokalizacji z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw cytozolowej Cu/ZnSOD potwierdziły występowanie tego enzymu w jądrze komórkowym i apoplacie. Sądzi się, że apoplastyczna Cu/ZnSOD uczestniczy w procesie lignifikacji, natomiast jądrowa chroni przed skutkami mutacji DNA spowodowanymi przez anionorodnik ponadtlenkowy (Alscher i wsp., 2002; Małecka i Tomaszewska, 2005). Formy cytoplazmatyczne Cu/ZnSOD są homodimerami<sup>1</sup>, natomiast enzymy chloroplastowe wykazują budowę homotetrameryczną<sup>2</sup> (Bordo i wsp., 1994; Sheng i wsp., 2014). Stwierdzono również, że chloroplastowa forma SOD dominuje w elementach zielonych, a enzymy cytozolowe przeważają w kielkach i roślinach etiolowanych (Żuchowski, 1999; Myounga i wsp., 2008). Ponadto ze szpilek *Pinus sylvestris* wyizolowano, niespotykany wcześniej u roślin, rodzaj Cu/ZnSOD określany mianem pozakomórkowej dysmutazy ponadtlenkowej (ECSOD – ang. *extracellular SOD*). Jednakże ECSOD pochodząca z sosny, w przeciwieństwie do swoich zwierzęcych odpowiedników, ma budowę homodimeryczną i nie podlega procesowi glikozylacji (Żuchowski, 1999).

Obecność u roślin homotetramerycznej MnSOD stwierdzono w matriksie mitochondrialnej oraz w peroksysomach. Podobnie jak ogromna większość białek mitochondrialnych, MnSOD kodowane są przez genom jądrowy. Z tego względu syntetyzowane są jako białko prekursorowe, bogate w sekwencję N-końcową kierującą do mitochondriów długości kilkudziesięciu aminokwasów (ok. 30), bogatą w reszty aminokwasów

1 Homodimer – białko, którego struktura IV-rzędowa złożona jest z dwóch identycznych podjednostek.

2 Homotetramer – białko, którego struktura IV-rzędowa składa się z czterech identycznych podjednostek.

zasadowych. Aktywność enzymatyczna proenzymu jest niższa w stosunku do enzymu dojrzałego. Jest on transportowany do mitochondriów, gdzie odcinana jest sekwencja skierowująca (Sheng i wsp., 2014). Peroksysomalna MnSOD została wykryta m.in. u *Pisum sativum*, jednakże u żadnej ze znanych sekwencji MnSOD nie znaleziono charakterystycznego peptydu sygnałowego kierującego białko do peroksysomów (Alscher i wsp., 2002). Masa cząsteczkowa roślinnej MnSOD wynosi około 92 kDa, a każda z czterech podjednostek zawiera dwie domeny: N-końcową, obejmującą pięć odcinków  $\alpha$ -helikalnych oraz domenę C-końcową, zawierającą trzy fragmenty o strukturze  $\beta$  i dwie niewielkie  $\alpha$ -helisy (Żuchowski, 1999; Pedersen i wsp., 2009).

Roślinne FeSOD zlokalizowane są w stromie chloroplastów i ze względu na różnice w budowie klasyfikuje się je na dwie grupy (Tsang i wsp., 1991; Alscher i wsp., 2002; Sheng i wsp., 2014). Pierwsza grupa obejmuje formy homodimeryczne występujące powszechnie u prokariotów, ale także u kilku gatunków roślin: miłorzębu dwuklapowego (*Ginkgo biloba*), kapusty (*Brassica campestris*) i grążela żółtego (*Nuphar luteum*). Druga grupa FeSOD jest typowa dla większości roślin wyższych i obejmuje enzymy homotetrameryczne (Alscher i wsp., 2002). Występowanie SOD w tak wielu różnych kompartmentach komórkowych jest konsekwencją miejsca wytwarzania oraz właściwości anionorodnika ponadtlenkowego.  $O_2^{\cdot -}$  jest cząsteczką hydrofilową, obdarzoną ładunkiem, która z trudnością przechodzi przez błony biologiczne, dlatego musi zostać usunięty przez SOD obecne w tych samych przedziałach komórkowych, w których jest on wytwarzany (Alscher i wsp., 2002; Fink i Scandalios, 2002).

W przeciwieństwie do większości organizmów, które posiadają zazwyczaj tylko jeden enzym z każdej klasy SOD, rośliny mają wiele form każdego rodzaju, kodowanych przez więcej niż jeden gen. Wydaje się, że

występowanie w świecie roślin wielogenowych rodzin SOD jest odzwierciedleniem pełnienia przez nie różnicowanych funkcji oraz konsekwencją większego narażenia roślin na niekorzystne warunki środowiskowe. Rośliny nie mogą bowiem fizycznie unikać czynników stresowych. Ponadto spośród wszystkich organizmów żywych komórkowe stężenie  $O_2$  (źródła RFT) jest u roślin najwyższe, gdyż nie tylko zużywają one tlen jak inne aeroby, ale także wytwarzają go w procesie fotosyntezy (Scandalios, 1993; Fink i Scandalios, 2002).

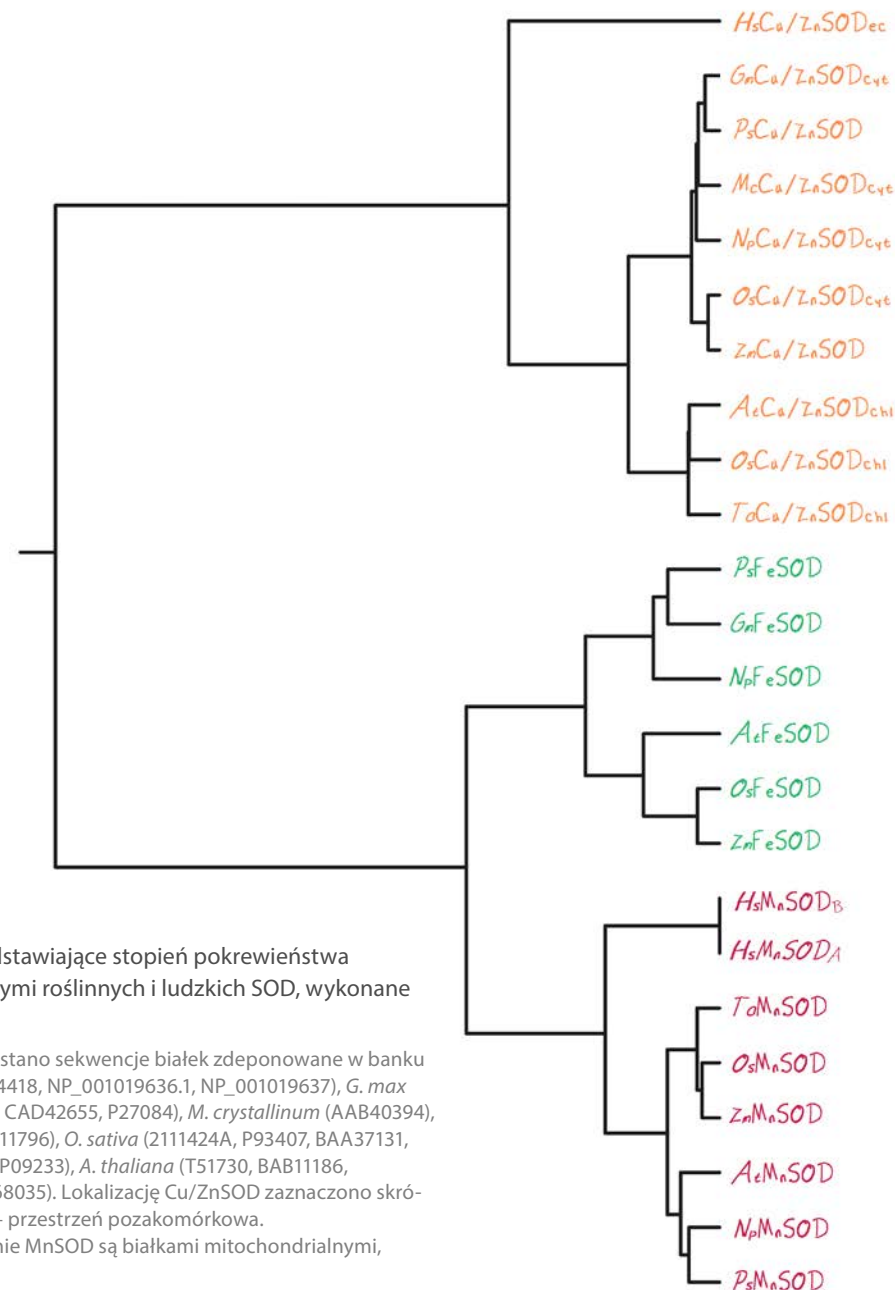
## Ewolucja rodziny SOD

Ewolucyjne pochodzenie różnych typów SOD nie zostało jeszcze do końca poznane. Obecny stan wiedzy pozwala przypuszczać, że najstarszą grupą wśród dysmutaz ponadtlenkowych są FeSOD (Pilon i wsp., 2010). Szereg bezwzględnych anaerobów zawiera właśnie ten rodzaj SOD, co sugeruje, że białko to powstało jeszcze przed pojawieniem się znaczących ilości tlenu w atmosferze, co nastąpiło w środku prekambriu, przed 1,5-2 mld lat temu. Z tego względu uważa się, że FeSOD przynajmniej początkowo mogła odgrywać inną niż obecnie rolę fizjologiczną (Bartos, 2003).

Wiele analiz zarówno samej sekwencji, jak i budowy strukturalnej białek, wskazuje na to, że FeSOD i MnSOD posiadają wspólnego przodka i wyewoluowały najprawdopodobniej z formy FeSOD (Ryc. 8) (Fink i Scandalios, 2002; Perry i wsp., 2010). Zakłada się, że początkowo łatwo dostępne w atmosferze redukującej sole żelazowe ( $Fe^{2+}$ ), na skutek pojawienia się tlenu w atmosferze, uległy utlenieniu i powstały z nich słabiej rozpuszczalne i trudniej dostępne sole żelazowe ( $Fe^{3+}$ ). W takich warunkach jony  $Mn^{2+}$  mogły stać się bardziej użytecznym zamiennikiem  $Fe^{2+}$ . Ponadto za większą użytecznością formy manganowej przemawiał fakt, że w przeciwieństwie do FeSOD, nie jest ona wrażliwa na

działanie  $H_2O_2$  (Bartosz, 2003). Sugeruje się, że druga najprawdopodobniej najstarsza dysmutaza ponadtlenkowa – MnSOD wyewoluowała z przodka FeSOD poprzez Fe/MnSOD. Obecna u archebakterii Fe/MnSOD może wiązać w centrum aktywnym jony żelaza lub manganu, w zależności od tego, który z tych pierwiastków jest bardziej dostępny. Podobne właściwości żelaza i manganu pozwalają funkcjonować Fe/MnSOD z którymkolwiek z tych metali bez istotnych zmian konformacyjnych w strukturze białka (Alscher i wsp., 2002).

Za najmłodszą grupę SOD uważa się Cu/ZnSOD, które pojawiły się prawdopodobnie przed miliardem lat, w późnym prekambrze, kiedy stężenie tlenu w atmosferze osiągnęło około 1% dzisiejszej zawartości. Być może Cu/ZnSOD powstała w wyniku ewolucji białka miedziowego, które nie pełniło żadnej funkcji katalitycznej, a wiązało jedynie miedź. Sugeruję się, że samo wiązanie miedzi mogło mieć istotne funkcje antyoksydacyjne (Bartosz, 2003). Miedziowo-cynkowe SOD przez długi okres uważane były za enzymy wyłącznie eukariotyczne, do czasu wykrycia ich u kilku gatunków bakterii: *Photobacterium leiognathi*, *Caulobacter crescentus* oraz bakterii z rodzaju *Pseudomonas* (Małecka i Tomaszewska, 2005). Wysunięto trzy hipotezy tłumaczące obecność Cu/ZnSOD u *Procaryota*. Pierwsza zakłada niezależną ewolucję tych białek u pro- i eukariotów. Według drugiej, zaproponowanej przez Martina i Fridovicha (1981), geny Cu/ZnSod powstały u *Eucaryota*, po czym zostały przeniesione do *Procaryota*. Taki scenariusz ewolucyjnych zdarzeń znalazł poparcie w badaniach Bannistera i Parkera (1985), wykazujących 30% podobieństwo między sekwencjami aminokwasowymi Cu/ZnSOD ryby kucyka (*Leiognathus splendens*) i jej bakteryjnego symbionta *P. leiognathi*. Jednakże hipoteza ta nie tłumaczy występowania Cu/ZnSOD u prokariotów niebędących symbiontami. Ostatnia



Ryc. 8. Drzewo filogenetyczne przedstawiające stopień pokrewieństwa między sekwencjami aminokwasowymi roślinnych i ludzkich SOD, wykonane w programie proMLK

Do sporządzenia dendrogramu wykorzystano sekwencje białek zdeponowane w banku genów pod numerami: *H. sapiens* (AAH14418, NP\_001019636.1, NP\_001019637), *G. max* (Q7M1R5, P28759), *P. sativum* (BAD90559, CAD42655, P27084), *M. crystallinum* (AAB40394), *N. plumbaginifolia* (P27082, CAA00826, P11796), *O. sativa* (2111424A, P93407, BAA37131, AAA57130), *Z. mays* (P23345, BAD89495, P09233), *A. thaliana* (T51730, BAB11186, AAC24832), *T. aestivum* (AAB67991, AAB68035). Lokalizację Cu/ZnSOD zaznaczono skrótami: cyt – cytozol, chl – chloroplast, ec – przestrzeń pozakomórkowa.

Wszystkie przedstawione w dendrogramie MnSOD są białkami mitochondrialnymi, a FeSOD chloroplastowymi.

z hipotez przyjmuje, że Cu/ZnSOD powstała początkowo u *Prokaryota* i dopiero potem została przeniesiona do *Eucaryota*. Jednakże, powyższe założenie pociąga za sobą nieprawdopodobny wymóg, że wspólny przodek posiadał Cu/ZnSOD jeszcze przed tym jak te dwie grupy organizmów oddzieliły się od siebie i który istniał przed dostępnością jonów  $\text{Cu}^{2+}$  w atmosferze (Alscher i wsp., 2002).

Enzymy SOD pochodzące z różnych gatunków roślin cechuje wysoki stopień homologii struktury pierwszorzędowej (Żuchowski, 1999). Porównania roślinnych sekwencji aminokwasowych FeSOD i MnSOD wskazują na wyższy stopień homologii w obrębie grupy MnSOD (>70%) aniżeli wśród FeSOD (~60%). Podobieństwo mitochondrialnych MnSOD i chloroplastowych FeSOD u eukariontów do ich odpowiedników u prokariotów stanowi kolejny argument na poparcie teorii o endosymbiotycznym pochodzeniu tych organelli komórkowych. Wysokie podobieństwo MnSOD i FeSOD dotyczy nie tylko struktury pierwszorzędowej (~50% homologii), ale również drugo- i trzeciorzędowej. Znacząca homologia istnieje także między sekwencjami roślinnych Cu/ZnSOD, przy czym wyższy stopień homologii cechuje chloroplastowe (80-90%) niż cytozolowe Cu/ZnSOD (~68%) (Ryc. 8) (Alscher i wsp., 2002; Fink i Scandalios, 2002). Większe różnice obserwuje się porównując dysmutazy roślinne z enzymami pochodzącymi z organizmów zwierzęcych, choć podobieństwo nadal jest znaczne (Ryc. 8) (Żuchowski, 1999).

Wśród roślinnych i zwierzęcych Cu/ZnSOD najwyższa homologia dotyczy C-końca białka, gdzie zlokalizowany jest kanał elektrostatyczny mieszczący się w strukturalnej pętli siódmej tego enzymu. Ponadto wszystkie aminokwasy zaangażowane w koordynację jonów miedzi i cynku są także wysoce konserwowane, podobnie jak aminokwasy biorące udział w tworzeniu mostków dwusiarczkowych. Znaczny stopień homolo-

gii w obrębie MnSOD oraz FeSOD pochodzących z różnych organizmów dotyczy głównie domen odpowiadających pierwszej i drugiej  $\alpha$ -helisie oraz aminokwasów zaangażowanych w koordynację jonów metali (Fink i Scandalios, 2002). W przypadku MnSOD, jon manganu, biorący udział w procesie katalitycznym, jest wiązany przez silnie konserwowane – trzy reszty histydyny i resztę kwasu asparaginowego.

Aby lepiej zrozumieć ewolucyjną dywergencję genów *Sod* u roślin wyższych Fink i Scandalios (2002) porównali pozycje i ilość intronów pomiędzy znanymi, genomowymi sekwencjami dysmutaz ponadtlenkowych roślin okrytonasiennych. Uzyskane przez nich wyniki sugerują, że liczba i pozycje intronów są ewolucyjnie konserwowane wśród poszczególnych typów *Sod* u roślin. Geny kodujące cytozolowe Cu/ZnSOD zawierają siedem intronów, podczas gdy geny chloroplastowych form tego enzymu mają ich osiem. Chloroplastowe *Sod* mają dodatkowy intron, który rozdziela sekwencję drugiego eksonu cytozolowych Cu/ZnSod. Wyjątkiem jest gen *Sod1* *Zea mays*, który chociaż koduje chloroplastową Cu/ZnSOD, to nie zawiera dodatkowego intronu, ma więc ich tylko siedem. Sugeruje się, że roślinne Cu/ZnSOD wzięły początek od wspólnego przodka, a później różnicowały się według kompartmentów komórkowych, w których obecnie występują (Ryc. 8). Porównanie liczby i pozycji intronów roślinnych i zwierzęcych Cu/ZnSod wskazuje na znaczne różnice. *Sod* pochodzące np. z *Homo sapiens* i *Rattus norvegicus* mają zaledwie cztery introny we wzajemnie podobnych pozycjach, ale odmiennych niż u roślin. Pozycje i liczba intronów genu *MnSod* są także silnie konserwowane wśród gatunków roślinnych, ale nie między roślinami a zwierzętami. Roślinne *MnSod* zawierają sześć eksonów, podczas gdy zwierzęce geny, np. *Homo sapiens* i *Mus musculus* składają się tylko z pięciu. Sekwencje intronów nie są konserwo-

wane, a ich długości są zmienne (Fink i Scandalios, 2002; Zelko i wsp., 2002). Większość różnic między roślinnymi SOD dotyczy przede wszystkim sekwencji regulatorowych w regionach 5' genów kodujących te białka. Najprawdopodobniej różnice w ekspresji tych genów są spowodowane różnymi warunkami powodującymi stres oksydacyjny (Fink i Scandalios, 2002; Zelko i wsp., 2002).

## Regulacja ekspresji genów *Sod*

Zachowanie równowagi antyoksydacyjnej ma podstawowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórki, dlatego też wszystkie enzymy należące do systemu antyoksydacyjnego muszą podlegać precyzyjnej regulacji na różnych poziomach.

Molekularne mechanizmy prowadzące do ekspresji genów *Sod* są słabo poznane. Wiadomo natomiast, iż wszystkie izoformy SOD są kodowane w genomie jądrowym, a ich ekspresja jest regulowana niezależnie. W warunkach stresu oksydacyjnego indukowane są geny dysmutaz ponadtlenkowych tych przedziałów komórkowych, w których wzrosła zawartość RFT (Żuchowski, 1999; Morano i wsp., 2012). Badania przeprowadzone na różnych gatunkach roślin dowodzą, że do akumulacji mRNA *FeSod* dochodzi, gdy stres generowany jest w chloroplastach, zaś ilość transkryptu *MnSod*, regulowana jest w odpowiedzi na obecność czynników stresowych w mitochondriach (Candas i Li, 2014).

Tsang i wsp. (1991) badali wpływ wysokiej aktywności fotosyntetycznej, fotoinhibicji oraz parakwatu na poziomy mRNA wszystkich typów dysmutazy ponadtlenkowej występujących u *Nicotiana glauca*. Zaobserwowano spadek ilości transkryptów *Sod* w liściach po przeniesieniu roślin do ciemności oraz wzrost (szczególnie mRNA *FeSod*) po ekspozycji roślin na światło. Odmiennie wyniki uzyskano dla etio-

lowanych siewek, w których przeniesienie na światło indukowało jedynie ekspresję genu *FeSod*, natomiast poziomy mRNA mitochondrialnej *MnSod* oraz cytozolowej *Cu/ZnSod* utrzymywane były na stałym, wysokim poziomie. Wyszukiwano wniosek, że wysoki poziom transkryptu *MnSod*, który odnotowano po przeniesieniu etiolowanych siewek na światło, jest odzwierciedleniem wzrostu oddychania mitochondrialnego, wynikającego ze zwiększonego rozkładu cukrów na drodze wzmoczonej fotosyntezy (Hartl i Finkemeier, 2012). Rośliny poddane stresowi termicznemu i oświetleniu wędły. Traktowanie zimnem i światłem powodowało jedynie wzrost mRNA *FeSod*, podczas gdy poziomy transkryptów *MnSod* i *Cu/ZnSod* pozostawały niezmienione. Wzrost ilości tych ostatnich obserwowano po przeniesieniu roślin do normalnych warunków wzrostu. Silnie indukowanym przez szok cieplny genem *Sod* u dzikiego tytoniu jest gen kodujący cytozoolową *Cu/ZnSOD* (Tsang i wsp., 1991).

Parakwat (ang. *paraquat/methyl viologen*), bipirydylowy herbicyd, który przechwytuje elektrony, przekazywane zwykle z PSI na  $\text{NADH}^+$  i transportuje je na tlen przyczyniając się do powstania w chloroplastach anionorodnika ponadtlenkowego. Herbicyd ten wpływa na reakcje transdukcji elektronów w retikulum endoplazmatycznym i mitochondrium (Alscher i wsp., 2002). Badania zmian w poziomach mRNA *Sod* u *N. plumbaginifolia* spowodowane światło- i ciemno-zależną toksycznością parakwatu wskazują na wzrost ilości transkryptów wszystkich typów dysmutazy ponadtlenkowej w odpowiedzi na działanie parakwatu w obecności światła. Słabszy wpływ parakwatu zaobserwowano natomiast w ciemności, w której wzrasta tylko poziom transkryptu *Cu/ZnSod* (Tsang i wsp., 1991). Indukcyjne oddziaływanie parakwatu na ekspresję genów *Sod* wykazano także u *Arabidopsis thaliana* (Alscher i wsp., 2002) i *Zea mays* (Bartosz, 1997).

Wzrost transkrypcji *Sod* zaobserwowano ponadto w odpowiedzi na ozon ( $\text{O}_3$ ) i  $\text{SO}_2$ . Udowodniono również występowanie pozytywnej regulacji genu *MnSod* przez stres solny, toksyczność manganu (Hossain i Dietz, 2016), stres chłodu (Baek i Skinner, 2003) oraz suszę (Wu i wsp., 1999). W ostatnim z wymienionych przykładów odnotowano różnice w ekspresji genu *MnSod* pomiędzy pszenicą jara i ozimą. Indukcja genu *MnSod* w odpowiedzi na suszę jest bardziej gwałtowna w siewkach pszenicy ozimej w porównaniu do jarej, co może wiązać się z wysoką tolerancją na stres roślin zboża ozimego. Z przeprowadzonych przez Wu i wsp. (1999) badań wynikało, że geny chloroplastowej *Cu/ZnSod* indukowane są przez niską temperaturę zarówno u pszenicy jarej jak i ozimej, natomiast nie ulegają zmianom w warunkach suszy.

Zróżnicowana ekspresja roślinnych genów *Sod* dotyczy nie tylko trzech głównych form dysmutazy ponadtlenkowej, ale także członków konkretnej klasy. Zaobserwowano m.in. odmienną ekspresję wśród rodziny *MnSod* w odpowiedzi na kwas abscysynowy i stres osmotyczny u *Zea mays* (Feng i wsp., 2016), niską temperaturę u *Triticum aestivum* (Baek i Skinner, 2005) oraz członków rodziny *FeSod Arabidopsis* w odpowiedzi na światło i rytm okołodobowy (Kliebenstein i wsp., 1998). Istnieją dane świadczące o tkankowo-specyficznej regulacji genów *Sod*. U *N. plumbaginifolia* ekspresja *MnSod* jest bardzo niska w liściach, 2-3 krotnie wyższa w korzeniach i około 50 razy wyższa w hodowanych w ciemności kulturach zawieszinowych komórek. Najprawdopodobniej wysoki poziom ekspresji genu *MnSod* w kulturach zawieszinowych wynika ze zmiany w typie tych komórek lub z odmiennych warunków ich hodowli. Badania wpływu składu pożywki na ekspresję *MnSod* doprowadziły do stwierdzenia, że za wysoki poziom transkryptu obserwowany w kulturze zawieszinowej odpowiedzialne były cukry: sacharoza i glukoza,

ale nie mannitol. Była to zatem obserwacja efektu raczej troficznego niż osmotycznego (Bowler i wsp., 1989). Zróżnicowaną regulację *Sod* zaobserwowano także w organach *Raphanus sativus*. Stwierdzono, że spośród wszystkich typów *Sod* występujących u tego gatunku jedynie *MnSod* ulega wysokiej ekspresji w korzeniach (Kwon i An, 2003). Podobny wynik uzyskano również dla *MnSod Hevea brasiliensis* (Miao i Gaynor, 1993). Występowanie tkankowo-specyficznej oraz rozwojowo-zróżnicowanej ekspresji genów *Sod* wykazano także w badaniach przeprowadzonych na *Prunus persica* (Bagnoli i wsp., 2002).

Niezwykle wysoki poziom transkryptu *MnSod* uzyskano ponadto w kalusie embriogenicznej *Hevea brasiliensis* (Miao i Gaynor, 1993) oraz w somatycznych zarodkach *Aesculus hippocastanum*. W tych ostatnich izozym<sup>3</sup> *MnSOD* pojawił się jako jedyny w odpowiedzi na traktowanie kultur tkankowych czynnikami środowiskowymi indukującymi stres oksydacyjny w mitochondriach (Bagnoli i wsp., 1998). Ponadto sprawdzono poziom ekspresji *MnSOD* kalusa *Vicia faba ssp. minor* w trakcie regeneracji w kulturze *in vitro* i stwierdzono, że może być to jeden z markerów różnicowania tkanek w warunkach *in vitro* (Dąbrowska i wsp., 2007a).

### Stres oksydacyjny w kulturach tkankowych

Kultury tkankowe są szczególnie narażone na wpływ czynników powodujących stres. W warunkach *in vitro* dochodzi do zmiany charakteru, stężenia i kierunku transportu substancji troficznych obecnych w podłożu. Labilne są także stężenia regulatorów wzrostu, warunki tlenowe i stężenie etylenu. Manipulacja, podczas izolacji eksplantatów, może generować stres oksydacyjny na skutek ekspozycji tkanek, leżących *in vivo* w głębi, na bezpośrednie działanie tlenu atmosferycznego. Pomimo

3 Izozym – jeden z wariantów występowania danego enzymu.

negatywnych skutków, stres może mieć również charakter pozytywny. Boddźce stresowe mogą przyczynić się do przywrócenia komórkom zdolności mitotycznej, a następnie do ponownego różnicowania, kończącego się często regeneracją nowej, kompletnej rośliny (Dubert, 2003). Dodatkowo udowodniono, że manipulacje mechaniczne są bezpośrednią przyczyną powstawania stresu oksydacyjnego w hodowlach komórkowych (Cassells i wsp., 2006).

Akumulację mRNA *MnSod* zaobserwowano dla *H. brasiliensis*. W kalusie embriogenicznym tego gatunku stwierdzono około 50 razy wyższy poziom transkryptu *MnSod* niż w dojrzałych liściach (Miao i Gaynor, 1993).

Wyniki wielu badań dowodzą, że aktywność mitochondrialnej MnSOD odpowiada aktywności oddechowego łańcucha transportu elektronów, co wydaje się być związane z radykalnym wzrostem tempa oddychania oraz ze wzmożoną produkcją anionorodników nadadtlenkowych w odpowiedzi na działanie stresora (Bowler i wsp., 1989). Bowler i wsp. (1989) wykazali również istnienie pozytywnej korelacji między aktywnością oksydazy cytochromowej i ekspresją *MnSod* u *N. plumbaginifolia*.

Stres osmotyczny wydaje się być czynnikiem indukującym ekspresję *MnSod* u wielu gatunków roślin. Wzrost ekspresji genu *MnSod* w odpowiedzi na 10% mannitol lub 10% sacharozę odnotowano w siewkach *Raphanus sativa* (Kwon i An, 2003). Z badań Skrzypek i Szechyńskiej-Hebdy (2005) wynika, że mogą to być również substancje pozwalające określić potencjał morfogenetyczny tkanek. Sacharoza oraz mannitol są to substancje regulujące ciśnienie osmotyczne, wpływające na turgor komórek oraz procesy wymiany substancji między komórką a środowiskiem zewnętrznym. Poziom mRNA *MnSod* zwiększa się pod wpływem sacharozы także u *H. brasiliensis* (Miao i Gaynor, 1993) i *Nicotiana glauca* (Bowler i wsp., 1989). U tytoniu

dzikiego stwierdzono, że reakcja ta jest liniowo skorelowana ze stężeniem sacharozы oraz że mannitol nie stymuluje ekspresji *MnSod*, co wydaje się świadczyć o podłożu troficznym obserwowanej aktywacji transkrypcji. Scandalios i Zhu (1994) odnotowali zróżnicowaną odpowiedź izoform *MnSod* na stres osmotyczny (20% sacharozę) w tarczkach zarodkowych *Zea mays*.

W wielu badaniach wykazano stymulujący wpływ niskiej temperatury na ekspresję genów *Sod*. Baek i Skinner (2003) zasugerowali, że pozytywna regulacja transkrypcji *MnSod* przez zimno może mieć związek z funkcjonowaniem mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów, który wykazuje labilność w obniżonej temperaturze. W warunkach stresu termicznego, elektrony mogą bowiem „wyciekać” z łańcucha oddechowego, przyczyniając się do zwiększonej produkcji anionorodnika nadadtlenkowego – substratu dla SOD. Istotną rolę *MnSod* w tolerancji roślin na chłód wydają się także potwierdzać badania nad roślinami transgenicznymi. Podwyższoną odporność na niską temperaturę stwierdzono m.in. u transgenicznej lucerny z nadekspresją genu *MnSod* tytoniu w chloroplastach lub mitochondriach (McKersie i wsp., 1993).

Uważa się, że aklimatyzacja roślin do warunków chłodu przebiega pod kontrolą hormonów – przede wszystkim kwasu abscysynowego (ABA – ang. *abscisic acid*) oraz etylenu. Dlatego też, przedmiotem intensywnych badań stał się ostatnio udział ABA w selektywnej regulacji ekspresji genów u roślin reagujących na czynniki stresowe. Uważa się, że elementy warunkujące odpowiedź na ABA (ABRE – ang. *ABA-responsive element*), związane są z genami reagującymi na niską temperaturę, suszę i zasolenie (Alscher i wsp., 2002; Osakabe i wsp., 2014). Elementy te znaleziono m.in. w genach *Cu/ZnSod1* i *FeSod3* *A. thaliana* (Alscher i wsp., 2002). Baek i wsp. (2006) badając strukturę i organizację *MnSod* pszenicy wykazali obecność w promotorze tego

genu elementu CE1, działającego w pozycji *cis*, który najprawdopodobniej odpowiada za wywołaną przez obniżoną temperaturę akumulację ABA. O występowaniu w genie *MnSod* *Raphanus sativus* dwóch elementów zaangażowanych w odpowiedź na temperaturę donoszą też Kwon i An (2003). W promotorze genu *MnSod1* *A. thaliana* nie stwierdzono obecności ABRE, wykryto natomiast sekwencję regulatorową HSE (ang. *heat shock element*), charakterystyczną dla promotorów białek szoku cieplnego, miejsca wiązania NF- $\kappa$ B oraz kasetę Y (ang. *Y-box*), która pośredniczy w redoks-zależnej aktywacji transkrypcji (Alscher i wsp., 2002). Z danych literaturowych wynika, że zróżnicowana regulacja genów antyoksydacyjnych u roślin zachodzi przez interakcje białko-DNA w regionie ARE, NF- $\kappa$ B i ABRE oraz że bezpośrednią rolę sygnalizacyjną spełnia tu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Scandalios, 2005). Baek i wsp. (2006) stwierdzili, że miejsce inicjacji transkrypcji genu *MnSod* *T. aestivum* poprzedza promotor bogaty w pary G+C (wyspa CpG), nie zawierający ani kasety TATA ani kasety CAAT, w przeciwieństwie do genów dysmutaz manganowych *A. thaliana*, *H. brasiliensis*, *P. sativum* oraz *O. sativa*, które posiadają kasetę TATA.

## Podsumowanie

Stres jest powszechnie postrzegany jako niekorzystny czynnik środowiskowy, prowadzący do miejscowego uszkodzenia lub nawet zamierania tkanek oraz efektów metabolicznych, głównie podwyższonego poziomu oddychania i nagromadzenia się substancji szkodliwych, takich jak RFT i fenole. Roślinne dysmutazy nadadtlenkowe tworzą złożony i bardzo skuteczny system pierwszej linii obrony przed stresem oksydacyjnym. Chociaż rodzina SOD obejmuje kilka izozymów, to udowodniono, że jedynie MnSOD jest niezbędna do przetrwania organizmów w środowisku tlenowym. Regulacja

ekspresji genu *MnSod* w stanie stresu oksydacyjnego pozwala komórce na precyzyjną, zróżnicowaną w sile i czasie trwania odpowiedź na czynniki wywołujące stres. MnSOD, ze względu na lokalizację subkomórową, uważana jest za główny enzym chroniący przed wybuchem ROS w mitochondriach. Sugeruje się, że różne izoformy MnSOD występują w odmiennych subkompartymenciech matryks mitochondrialnej, wydzielonych przez wewnętrzną błonę tych najbardziej narażonych na oksydacyjny atak wolnych rodników.

Szerokie zastosowanie w badaniach procesów różnicowania oraz zmian genetycznych zachodzących w kulturach *in vitro* znalazły markery biochemiczne i molekularne. Wielu naukowców, w wyniku analizy tkanki uzyskanej w kulturze, stwierdziło zróżnicowane wzory izoenzymatyczne dla hodowli embriogennej i nieembriogennej. Od kilkunastu lat podejmowane są próby identyfikacji markerów różnicowania się tkanki wśród enzymów antyoksydacyjnych. Wydaje się, że oprócz peroksydaz i katalaz to właśnie dysmutazy stanowią ważne źródło oceny kompetencji kultur tkankowych do regeneracji.

Praca częściowo finansowana z funduszy na działalność statutową UMK.

## Literatura

- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot.* 53: 1331-1341.
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 55: 373-399.
- Baek K-H, Skinner DZ (2003). Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Sci.* 165: 1221-1227.
- Baek K-H, Skinner DZ (2005). Differential expression of manganese superoxide dismutase sequence variants in near isogenic lines of wheat during cold acclimation. *Plant Cell Rep.* 25: 223-230.
- Baek K-H, Skinner DZ (2006). Differential mRNA stability to endogenous ribonucleases of the coding region and 3' untranslated regions of wheat (*Triticum aestivum* L.) manganese superoxide dismutase genes. *Plant Cell Rep.* 25: 133-139.
- Baek K-H, Skinner DZ, Ling P, Chen X (2006). Molecular structure and organization of the wheat genomic manganese superoxide dismutase gene. *Genome.* 49: 209-218.
- Bagnoli F, Capuana M, Racchi ML (1998). Developmental changes of catalase and superoxide dismutase isoenzymes in zygotic and somatic embryos of horse chestnut. *J Plant Physiol.* 25: 909-913.
- Bagnoli F, Giannino D, Caparrini S, Camussi A, Mariotti D, Racchi ML (2002). Molecular cloning, characterization and expression of manganese superoxide dismutase gene from peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). *Mol Genet Genom.* 267: 321-328.
- Balabusta M, Szafrńska K, Posmyk MM (2016). Exogenous Melatonin Improves Antioxidant defense in cucumber seeds (*Cucumis sativus* L.) germinated under chilling stress. *Front Plant Sci.* 7(575):1-12.
- Bannister JV, Parker MW (1985). The presence of a copper/zinc superoxide dismutase in the bacterium *Photobacterium leiognathi*: a likely case of gene transfer from eukaryotes to prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82: 149-152.
- Bartosz G (1997). Oxidative stress in plants. *Acta Physiol Plant.* 19: 47-64.
- Bartosz G (2003). Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. *Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa.
- Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev.* 94: 329-354.
- Bordo D, Djinovic K, Bolognesi M (1994). Conserved patterns in the Cu, Zn superoxide dismutase family. *J Mol Biol.* 238: 366-386.
- Bowler C, Alliotte T, De Loose M, Van Montagu M, Inzé D (1989). The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana glauca*. *EMBO J.* 8: 31-38.
- Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D (1994). Superoxide dismutase in plants. *Crit Rev Plant Sci.* 13: 199-218.
- Candas D, Li JJ (2014). MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx. *Antioxid Redox Sign.* 20(10): 1599-1617.
- Cassels AC, Jouce SM, O'Herlihy EA, Perez-Sanz MJ, Walsh C (2006). Stress and quality in *in vitro* culture. XXVI International Congress: Biotechnology in Horticultural Crop Improvement: Achievements, Opportunities and Limitation.
- Das K, Roychoudhury A (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environ Sci.* 2, 53: 1-13.
- Dat JF, Inzé D, Van Breusegem F (2001). Catalase-deficient tobacco plants: tools for *in planta* studies on the role of hydrogen peroxide. *Redox Rep.* 6: 37-42.
- Dąbrowska G, Kaczmarek K, Skrzypek E, Szechyńska-Hebda M (2007a). Klonowanie cDNA i ekspresja genu kodującego manganową dysmutazę nadadtlenkową *Vicia faba* ssp. *minor* w kalusie regenerującym i nieregenerującym. *Zesz Probl Post Nauk Rol.* 523: 83-92.
- Dąbrowska G, Aleksandra K, Goc A, Szechyńska-Hebda M, Skrzypek E (2007b). Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. *Acta Biol Cracov Bot ser Bot.* 49(1): 7-17.
- Dąbrowska G, Mierek-Adamska A, Goc A (2012). Plant metallothioneins: Putative functions identified by promoter analysis *in silico*. *Acta Biol Cracov Bot ser Bot.* 54(2): 109-120.
- Dubert F (2003). Reakcje tkanek roślinnych *in vitro* na stres temperatury. X Ogólnopolska konferencja kultur *in vitro* i biotechnologii roślin. Biotechnologia roślinna w biologii, farmacji i rolnictwie. *Wydawnictwa Uczelniane Akademii Techniczno-Rolniczej*, Bydgoszcz, 18.
- Feng K, Yu J, Cheng Y, Ruan M, Wang R, Ye Q, Zhou G, Li Z, Yao Z, Yang Y, Zheng Q, Wan H (2016). The SOD Gene Family in Tomato: Identification, Phylogenetic Relationships, and Expression Patterns. *Front Plant Sci.* 7, 1279: 1-12.
- Fink RC, Scandalios JG (2002). Molecular evolution and structure - function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Arch Biochem Biophys.* 399:19-36.
- Forman HJ, Maorino M, Ursini F (2010). Signaling Functions of Reactive Oxygen Species. *Biochemistry.* 49(5): 835-842.
- Fukai T, Ushio-Fukai M (2011). Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid Redox Sign.* 15(6): 1583-1606.
- Hartl M, Finkemeier I (2012). Plant mitochondrial retrograde signaling: post-translational modifications enter the stage. *Front Plant Sci.* 3, 253: 1-7.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Hossain MS, Al Mahmud J, Rahman A, Inafuku M, Oku H, Fujita M (2017). Coordinated Actions of Glyoxalase and Antioxidant defense systems in conferring abiotic stress tolerance in plants. *Int J Mol Sci.* 18(1): 200-228.
- Hatfield JL, Boote KJ, Kimball BA, Ziska LH, Izaurralde RC, Ort D, Thomson AM, Wolfe D (2011). Climate impacts on agriculture: implications for crop production. *Agron J.* 103(2): 351-370.
- Hossain MS, Dietz KJ (2016). Tuning of Redox Regulatory Mechanisms, Reactive Oxygen Species and Redox Homeostasis under Salinity Stress. *Front Plant Sci.* 7, 548: 1-15.
- Imlay JA (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem.* 77: 755-776.
- Kliebenstein DJ, Monde R, Last RL (1998). Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation

- and protein localization. *Plant Physiol.* 118: 637-650.
- Koszucka B, Dąbrowska G (2006). Roślinne metalotioneiny. *Post Biol Kom.* 33(2): 285-302.
- Kotchioni SO, Gachmo EW (2006). The reactive oxygen species network pathways: an essential pre-requisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *J Biosci.* 31(3): 389-404.
- Krueger T, Fisher PL, Becker S, Pontasch S, Dove S, Hoegh-Guldberg O, Leggat W, Davy SK (2015). Transcriptomic characterization of the enzymatic antioxidants FeSOD, MnSOD, APX and KatG in the dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *BMC Evol Biol.* 15(48): 1-20.
- Kwon SI, An CS (2003). Cloning and expression of mitochondrial MnSOD from the small radish (*Raphanus sativus* L.). *Mol Cell.* 16: 194-200.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Phcog Rev.* 4(8): 118-126.
- Luscombe NM, Babu MM, Yu H, Snyder M, Teichmann SA, Gerstein M (2004). Genomic analysis of regulatory network dynamics reveals large topological changes. *Nature.* 431: 308-312.
- Łukaszewicz-Hussain A (2003). Rola glutationu i enzymów z nim związanych w procesach antyoksydacyjnych organizmu. *Med Pr.* 54 (5): 473-479.
- Małecka A, Tomaszewska B (2005). Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obronne. *Post Biol Komórki.* 32: 311-325.
- Martin JrJP, Fridovich I (1981). Evidence for a natural gene transfer from the ponyfish to its bioluminescent bacterial symbiont *Photobacter leiognathi*. The close relationship between bacteriocuprein and the copper-zinc superoxide dismutase of teleost fishes. *J Biol Chem.* 256: 6080-6089.
- McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte. *J Biol Chem.* 244: 6049-6055.
- McKersie BD, Chen Y, de Beus M, Bowley SR, Bowler C, Inzé D, D'Halluin K, Botterman J (1993). Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 103: 1155-1163.
- Miao Z, Gaynor J (1993). Molecular cloning, characterization and expression of Mn-superoxide dismutase from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Mol Biol.* 23: 267-277.
- Mierek-Adamska A, Dąbrowska G, Kotowicz K, Goc A (2014). Analiza funkcjonalna metalotionein rzepaku w komórkach bakteryjnych w warunkach stresu oksydacyjnego. *XLVIII Międzynarodowe Sympozjum Mikrobiologia a Ochrona Środowiska.* 78-79.
- Miller AF (2012). Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett.* 586: 585-595.
- Morano KA, Grant ChM, Moye-Rowley WS (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 190(4): 1157-1195.
- Müller M, Mentel M, van Hellemond JJ, Henze K, Woehle Ch, Gould SB, Yu RY, van der Giezen M, Tielens AGM, Martin WF (2012). Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76(2): 444-495.
- Myounga F, Hosoda Ch, Umezawa T, Lizumi H, Kuromori T, Motohashi R, Shono Y, Nagata N, Ikeuchi M, Shinozaki K (2008). A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 20: 3148-3162.
- Nowak M (2012). Wpływ toksycznego stężenia jonów  $Cu^{2+}$  na ekspresję genu MnSOD w roślinach pszenicy zwyczajnej, pszenżyta i żyta. *Ann UMCS.* 67(3): 31-38.
- Osakabe Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS (2014). ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytol.* 202: 35-49.
- Pedersen HL, Willassen NP, Leiros I (2009). The first structure of a cold-adapted superoxide dismutase (SOD): biochemical and structural characterization of iron SOD from *Aliivibrio salmonicida*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun.* 65: 84-92.
- Perry JJP, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta.* 1804(2): 245-262.
- Pilon M, Ravet K, Tapken W (2011). The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta.* 1807: 989-998.
- Raninga PV, Di Trapani G, Tonissen KF (2014). Cross talk between two antioxidant system, Thioredoxin and DJ-1: consequences for cancer. *Oncosci.* 1(1): 95-110.
- Saucedo-García M, Gavilanes-Ruíz M, Arce-Cervantes O (2015). Long-chain bases, phosphatidic acid, MAPKs, and reactive oxygen species as nodal signal transducers in stress responses in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 6, Article 55: 1-14.
- Scandalios JG (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101: 7-12.
- Scandalios JG (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.* 38: 995-1014.
- Scandalios JG, Zhu D (1994). Differential accumulation of manganese-superoxide dismutase transcripts in maize in response to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiol.* 106:173-178.
- Schwarzländer M, Finkemeier I (2013). Mitochondrial Energy and Redox Signaling in Plants. *Antioxid Redox Signal.* 18(16): 2122-2144.
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plant under stressful conditions. *J Bot.* Article ID 217037.
- Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller AF, Teixeira M, Valentine JS (2014). Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem Rev.* 114: 3854-3918.
- Skrzycki M, Czeczot H (2004). Ekspresja genów dysmutazy ponadtlenkowej w stanie stresu oksydacyjnego. *Post Biol Kom.* 31: 81-92.
- Staimer N, Nguyen TB, Nizkorodov SA, Delfino RJ (2012). Glutathione peroxidase inhibitory assay for electrophilic pollutants in diesel exhaust and tobacco smoke. *Anal Bioanal Chem.* 403(2): 431-441.
- Szechyńska-Hebda M, Skrzypek E, Dąbrowska G, Wędzony M (2012). The effect of endogenous hydrogen peroxide induced by cold treatment in the improvement of tissue regeneration efficiency. *Acta Physiol Plant.* 34: 547-560.
- Ścibor D, Czeczot H (2006). Katalaza – budowa, właściwości, funkcje. *Post Hig Med Dośw.* 60: 170-180.
- Ślesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S, Miszalski Z (2007). The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochim Pol.* 54(1): 39-50.
- Taj G, Agarwal P, Grant M, Kumar A (2010). Recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signal Behav.* 5(11): 1370-1378.
- Tretny A (2002). Regulacja procesów wzrostu i rozwoju przez czynniki środowiskowe. W: Fizjologia roślin, red. Kopcewicz J, Lewak S. *Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa. 167-191.
- Tsang EWT, Bowler C, Hérouart D, Van Camp W, Villarreal R, Genetello C, Van Montagu M, Inzé D (1991). Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell.* 3: 783-792.
- Wu G, Wilen RW, Robertson AJ, Gusta LV (1999). Isolation, chromosomal localization, and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase genes in wheat. *Plant Physiol.* 120: 513-520.
- Zahnle K, Schaefer L, Fegley B (2010). Earth's Earliest Atmospheres. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2: a004895, 1-17.
- Zelko IN, Mariani TJ, Foltz RJ (2002). Superoxide dismutase multi-gene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 33: 337-349.
- Żuchowski J (1999). Roślinne dysmutazy ponadtlenkowe. *Kosmos.* 48: 87-93.

### Defence mechanisms of organisms against oxidative stress with particular focus on superoxide dismutases

Nikola Sikora, Zuzanna Znajewska, Grażyna Dąbrowska

Oxidative stress may be defined an imbalance between reactive oxygen species, ROS (i.a. singlet oxygen, superoxide anion, hydroxyl radical and hydrogen peroxide and the antioxidant defense system. Reactive oxygen species easily react with organic compounds and disturb homeostasis of the whole organism. In the organism they are eliminated by non-enzymatic antioxidants and by enzymes which remove or inactivate ROS. Among them, superoxide dismutase (SOD) plays a main role, which in the plant cells is regulated by many stress factors. Superoxide dismutases are present in both aerobic and anaerobic organisms, and their classification includes copper-zinc, manganese, iron and nickel isoforms. The family of plant superoxide dismutases, their role in oxidative stress and the relationship between amino acid sequences of plant and human SOD, as well as tissue-specific and developmental-differentiated expression of SOD genes were characterized in this paper.

**key words:** growth and development of plants, oxidative stress, SOD, reactive oxygen species