

## СУПЕРОКСИДИСМУТАЗА В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ

© В. В. Бараненко

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного Национальной академии наук Украины, Киев;  
электронный адрес: cell@svitonline.com

Супероксиддисмутаза (СОД) является одним из ключевых компонентов системы защиты клеток и тканей от окислительной деструкции. В обзоре отмечена уникальность фермента среди других антиоксидантов. Обобщены данные литературы о локализации СОД внутри клетки и в апопласте, о реакции на воздействие различных неблагоприятных факторов и роли в устойчивости клеток и тканей растений в условиях стресса. Рассмотрены вопросы, касающиеся регуляции активности фермента и участия в процессах регуляции активных форм кислорода, ионов кальция, фитогормонов, глутатиона и оксида азота.

Антиоксидантный фермент супероксиддисмутаза (СОД; КФ 1.15.1.1) был обнаружен в конце 1930-х годов Манном и Кеилином (Mann, Keilin, 1938) как медьсодержащий белок и назван гемокупреином, а затем эритрокупреином. Предполагали, что биологическая роль этого белка заключалась в запасании ионов меди. И только в 1969 г. Мак-Кордом и Фридовичем (McCord, Fridovich, 1969) было обнаружено, что гемокупреин является ферментом, который катализирует реакцию дисмутации супероксидных радикалов ( $O_2^{\bullet -}$ ). Новый фермент приобрел название супероксиддисмутазы. В 1970-е годы из *Escherichia coli* были выделены ферменты с аналогичной функцией, но вместо ионов меди и цинка в активном центре они содержали ионы железа (Yost, Fridovich, 1973) или марганца (Keele et al., 1970). Таким образом, кроме CuZn СОД обнаружилось существование еще двух изоформ СОД — MnСОД и FeСОД. Дальнейшие исследования показали присутствие СОД в клетках живых организмов разного уровня организации: растений (Beauchamp, Fridovich, 1973), человека (Nyman, 1960), животных (McCord, Fridovich, 1969), микроорганизмов — грибов (Rapp et al., 1973), бактерий (Keele et al., 1970) и др.

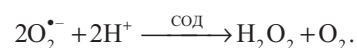
Цель настоящего обзора — обобщить данные литературы, касающиеся различных сторон изучения СОД в клетках растений. Характерной особенностью клеток растений, отличающих их от клеток других организмов, является наличие всех трех изоформ. В клетках животных, где фермент был впервые обнаружен, присутствуют только CuZnСОД и MnСОД (Wanders, Denis, 1992), а в клетках прокариот — FeСОД и MnСОД (Keele et al., 1970; Yost, Fridovich, 1973). Данные литературы указывают на большое сходство молекулярных свойств растительной CuZnСОД с таковой, обнаруженной в клетках животных и человека (Nyman, 1960; McCord, Fridovich, 1969; Beauchamp, Fridovich, 1973). Молекула CuZnСОД растительного и животного происхождения является димером, состоящим из двух равного размера субъединиц, связанных нековалентно; мол. масса изоформы колеб-

лется в пределах 32—34 кДа (McCord, Fridovich, 1969; Beauchamp, Fridovich, 1973). Каждая молекула фермента содержит по 2 г-атома меди и цинка в активном центре. Кристаллическая структура растительной CuZnСОД гомологична таковой из клеток животных: каждая субъединица фермента имеет структуру бочонка (бета-барреля) (Kitagawa et al., 1991). Отличительной особенностью растительной СОД является множественность изоформ разных форм СОД, что не удалось обнаружить автору в клетках животных. Так, в клетках листьев кукурузы обнаружено 9 изоформ СОД: 4 CuZnСОД в цитоплазме, 1 CuZnСОД в хлоропластах и 4 MnСОД в митохондриях (Zhu, Scandalios, 1994). Количество изоформ колеблется от одного вида растений к другому (Scandalios, 1997; Lee et al., 2001). CuZnСОД отличается молекулярными свойствами от двух других изоформ — FeСОД и MnСОД (см. таблицу), тогда как две последние по многим свойствам гомологичны таковым, выделенным не только из различных форм растений, но и из других источников (Yost, Fridovich, 1973; Parker et al., 1987). Все три изоформы объединяет функция дисмутации супероксидных радикалов.

В последующих разделах будут приведены данные литературы о структуре и функции СОД, локализации, реакции на воздействие стрессовых факторов, а также регуляции активности в клетках растений.

### Структура и функции СОД

СОД катализирует диспропорционирование супероксидных анион-радикалов до молекулярного кислорода и пероксида водорода (McCord, Fridovich, 1969):

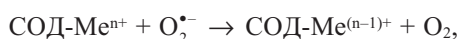


Механизм действия СОД заключается в последовательном восстановлении и окислении супероксидными

## Характеристика и локализация изоформ СОД в клетках растений

СОД	Характеристика СОД	Локализация в клетках растений
CuZnСОД	Гомодимер (33 кДа) (Christov, Bakardjieva, 1999); в активном центре содержится по 2 г-атома меди ( $\text{Cu}^{2+}$ ) и цинка ( $\text{Zn}^{2+}$ ) (Bannister et al., 1991)	Хлоропласты (Ogawa et al., 1995); митохондрии (Kuzniak, Sklodowska, 2004); пероксисомы (Corpas et al., 1998); цитоплазма (Hernandez et al., 1999); апопласт (Ogawa et al., 1997)
MnСОД	Гомодимер (46 кДа) или гомотетрамер (92 кДа) (Palma et al., 1998); в активном центре содержится 2 или 4 г-атома марганца ( $\text{Mn}^{3+}$ )	Митохондрии (Kuzniak, Sklodowska, 2004); пероксисомы (Palma et al., 1998)
FeСОД	Гомодимер (36—46 кДа) — в хлоропластах; содержание железа ( $\text{Fe}^{3+}$ ) в активном центре варьирует от 1 до 2 г-атомов (Salin, 1987) и 54 кДа — в цитоплазме клубеньков бобовых (Moran et al., 2003); в активном центре содержится 2 г-атома железа	Хлоропласты (Gomez et al., 2003/4); цитоплазма клубеньков некоторых бобовых (Moran et al., 2003)

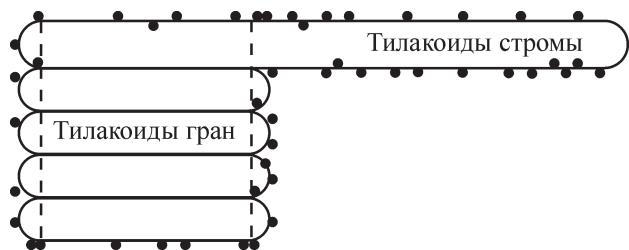
анион-радикалами металла (Me) активного центра фермента (Asada, 1996):



Скорость взаимодействия СОД с  $\text{O}_2^{\bullet-}$  в значительной степени определяется вязкостью мембран (Asada, 1996).

Дисмутация  $\text{O}_2^{\bullet-}$  может происходить спонтанно без участия СОД. Скорость спонтанной дисмутации  $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}/\text{c}^{-1}$  при pH 7.0, тогда как в присутствии СОД —  $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}/\text{c}^{-1}$ , т. е. приблизительно в  $10^4$  раз быстрее (Ogawa et al., 1996).

Изучению СОД уделяется много внимания, поскольку ей отводится важная роль в защите клеток и тканей от окислительной деструкции. Супероксидные радикалы — первичные продукты одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода — являются источником образования других, в том числе и более реакционноспособных, АФК (Мерзляк, 1989). Пероксид водорода, гидроксильные и гидроперекисные радикалы, синглетный кислород и пероксинитрит являются продуктами превра-



Схематическое изображение расположения CuZnСОД в хлоропластах шпината (Ogawa et al., 1995).

Использование метки иммунного золота показало, что около 70 % CuZnСОД прикреплено к стромальной поверхности тилакоидов хлоропластов шпината.

Schematic representation of CuZnSOD localization in spinach chloroplasts (Ogawa et al., 1995).

Immunogold labeling indicates that over 70 % of CuZnSOD attached to stroma-faced thylakoid membranes.

щения радикалов  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Мерзляк, 1989; Pryor, Squadrito, 1995). Поскольку гидроксильные радикалы, синглетный кислород и пероксинитрит активно окисляют белковые молекулы, специфических ферментов-дезактиваторов данных АФК не существует, уровень их в клетке опосредованно регулируется СОД путем уборки супероксидных радикалов — источника их образования. По этой причине СОД является первичной линией защиты от окислительных повреждений, обрывая окисление клеточных макромолекул еще на стадии иницирования. Кроме участия в образовании других АФК  $\text{O}_2^{\bullet-}$  могут непосредственно вызывать окислительные модификации определенных внутриклеточных макромолекул. Среди мишеней, способных к прямому окислению супероксидными анион-радикалами, — белковые молекулы, содержащие [FeS]-кластеры (Palatnik et al., 1999). Следствием этого являются инактивация белковых молекул и высвобождение  $\text{Fe}^{3+}$ , который в свою очередь может восстанавливаться клеточными редуцентами, в том числе и радикалами  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , до  $\text{Fe}^{2+}$  и затем принимать участие в реакции Фентона с образованием гидроксильных радикалов. Таким образом, супероксидные анион-радикалы могут вызывать прямые повреждающие эффекты, а также быть источником образования других, в том числе и более токсичных, форм кислорода. Поэтому клетка нуждается в строгом контроле над продукцией и своевременным удалением данных радикалов.

Изоформы СОД отличаются разной чувствительностью к ингибиторам  $\text{CN}^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Так, CuZnСОД ингибируется  $\text{CN}^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , FeСОД — только  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а MnСОД невосприимчива к обоим ингибиторам (Bowler et al., 1992).

Все охарактеризованные CuZnСОД являются главным образом гомодимерами, состоящими из двух субъединиц по 16.5 кДа каждая (Bueno, Del Rio, 1992; Christov, Bakardjieva, 1999) (см. таблицу). Молекула FeСОД — также гомодимер, имеющий мол. массу 36—46 кДа в хлоропластах (Salin, 1987) и 54 кДа — в цитозоле клубеньков бобовых (Moran et al., 2003). MnСОД имеет мол. массу 46 или 92 кДа и состоит соответственно из 2 или 4 одинакового размера субъединиц (Palma et al., 1998).

Изоформы СОД различаются не только молекулярной массой и чувствительностью к ингибиторам, но также локализацией в клетках растений.

### Локализация СОД

Фермент присутствует в клетках растений там, где происходят окислительно-восстановительные процессы, т. е. практически во всех ее компартментах, а также в апопласте. Сравнение данных о локализации разных форм СОД показывает, что наиболее изобильной в клетках растений является CuZnСОД. Она обнаружена во всех внутриклеточных компартментах — в цитозоле (Hernandez et al., 1999; Hurst et al., 2002), хлоропластах (Ogawa et al., 1995; Hernandez et al., 1999), митохондриях (Kuzniak, Slkowska, 2004), пероксисомах (Corpas et al., 1998), а также в апопласте (Ogawa et al., 1997) (см. таблицу). Что касается MnСОД и FeСОД, они обнаружены лишь в определенных органеллах. В частности, MnСОД расположена в митохондриях (Kuzniak, Slkowska, 2004) и пероксисомах (Palma et al., 1998), а FeСОД — в хлоропластах (Navari-Izzo et al., 1998; Gomez et al., 2003/4) и цитоплазме клубеньков некоторых бобовых (Moran et al., 2003). Рассмотрим более подробно локализацию изоформ СОД в клетках растений.

Цитозольная форма CuZnСОД обнаружена возле или на тонопласте, а также в самом ядре, что указывает на образование супероксидных радикалов внутри ядра (Ogawa et al., 1996). Предполагают, что в ядро фермента попадает через ядерные поры. В ядре СОД (до 80 %) связана с ДНК-филаментами, защищая их от окислительных повреждений (Ogawa et al., 1996). Данная изоформа обнаружена также возле или на цитоплазматической мембране (Ogawa et al., 1996). В хлоропластах CuZnСОД локализована в мембранах тилакоидов и строме (Ogawa et al., 1995; Gomez et al., 2003/4). В частности, около 70 % CuZnСОД прикреплено к стромальной поверхности мембран тилакоидов, где расположен комплекс фотосистемы I (Ogawa et al., 1995). Отмечено, что локальная концентрация фермента в мембранах тилакоидов составляет около 1 мМ, тогда как в строме — около 20 мкМ (Ogawa et al., 1995). Таким образом, большее количество СОД прикреплено к тилакоидным мембранам, и это свидетельствует о том, что продукция в них супероксидных радикалов выше по сравнению со стромой. Фермент обнаружен также во внутритилакоидном пространстве хлоропластов (около 4 % хлоропластной CuZnСОД) (Nayaka et al., 1984). Поскольку основное количество CuZnСОД в клетках листьев растений, как свидетельствуют данные литературы, локализовано в хлоропластах (Asada, 1996), очевидно, что последние являются важным источником супероксидных радикалов в клетке. Кроме хлоропластов CuZnСОД обнаружена в матриксе пероксисом (Sandalo, Del Rio, 1987; Corpas et al., 1998), где она является также преобладающей изоформой СОД. На долю пероксисомной CuZnСОД приходится около 18 % общей активности СОД в клетках растений (Sandalo, Del Rio, 1987). В апопласте данная изоформа принимает участие в лигнификации клеточных стенок и защите клеток и тканей растений от патогенов (Ogawa et al., 1997; Shinkel et al., 2001).

MnСОД обнаружена в матриксе митохондрий и пероксисом (Del Rio et al., 2003; Moller, 2001). Отмечена значительная гомология аминокислотных последовательностей фермента в митохондриях с таковой в пероксисомах (Del Rio et al., 2003).

FeСОД в клетках растений расположена главным образом в хлоропластах — как в строме, так и на мембранах тилакоидов (Navari-Izzo et al., 1998; Gomez et al.,

2003/4). Кроме хлоропластов обнаружена локализация фермента в нефотосинтезирующих органеллах и тканях: в пероксисомах листьев *Lycopersicon esculentum* (Mittova et al., 2003), пероксисомах лепестков гвоздики (Droillard, Paulin, 1990), а также в цитозоле клубеньков некоторых бобовых — клевера, сои и фасоли (Moran et al., 2003). Однако не у всех бобовых обнаружен фермент в цитозоле клубеньков: у люцерны и гороха он локализован исключительно в хлоропластах (Moran et al., 2003). Таким образом, существует несколько типов FeСОД в клетках растений.

Потребность клеток растений в изоформах СОД, имеющих разные характеристики, очевидно, объясняется необходимостью более эффективной защиты от окислительной деструкции.

### Активность СОД в условиях действия неблагоприятных факторов

В обычных условиях существования поддерживает баланс между продукцией радикалов  $O_2^{\cdot-}$  и их своевременным удалением. При действии неблагоприятных факторов увеличивается образование активных форм кислорода, в том числе и радикалов супероксида (Edreva et al., 1998; Kamińska-Rożek, Pukacki, 2004). Активность СОД при этом изменяется разнонаправленно; в одних случаях отмечено ее увеличение, в других — снижение, что зависит от напряженности действия стрессового фактора (интенсивности и длительности воздействия), а также от восприимчивости организма, стадии развития растений и др. Увеличение активности фермента отмечено в условиях водного дефицита (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998; Kamińska-Rożek, Pukacki, 2004) и переувлажнения почвы (Калашников и др., 1994), при тепловом шоке (Курганова и др., 1997; Kang, Saltveit, 2001) и охлаждении (Kuk et al., 2003), солевом стрессе (Lee et al., 2001; Hurst et al., 2002), при УФ-облучении (Schmitz-Eiberger, Noga, 2001), интенсивном освещении (Logan et al., 1998), обработке растений озоном (Alonso et al., 2001), тяжелыми металлами (Garcia et al., 1999; Skorzynska-Polit et al., 2003/4), абсцизовой кислотой (Jiang, Zhang, 2001), при инокуляции патогенами (Babithaa et al., 2002; Kuzniak et al., 2004). Таким образом, разнообразные неблагоприятные воздействия, даже противоположные по своей природе (засуха—переувлажнение), могут приводить к активации СОД. Увеличение активности фермента при различных стрессовых воздействиях может быть обусловлено активацией его латентных форм и(или) синтезом новых молекул фермента. Так, одновременное увеличение активности СОД и количества соответствующих белков отмечено при солевом стрессе в хлоропластах гороха (Gomez et al., 2003/4) и листьях толерантного сорта *Lycopersicon pennellii* (Mittova et al., 2003), хлоропластах пшеницы при обработке растений раствором меди (Navari-Izzo et al., 1998), что свидетельствует об увеличении синтеза фермента в условиях действия стрессового фактора.

Активация СОД при неблагоприятных воздействиях является ответом на увеличение продукции радикалов супероксида в этих условиях, что обеспечивает защиту клеток и тканей растений от окислительных повреждений. Изучение поведения фермента в растениях, различающихся по устойчивости к тому или иному воздействию, показывает, что устойчивые растения по сравнению

с восприимчивыми характеризуются более высокими активностями СОД и менее выраженными окислительными повреждениями (Babithaa et al., 2002; Mittova et al., 2003; Wu et al., 2003). Так, в условиях солевого стресса отмечено увеличение активности СОД в митохондриях и пероксисомах листьев толерантного сорта томатов *Lycopersicon pennellii*, тогда как у растений обычного сорта (*Lycopersicon esculentum*) происходило снижение активности фермента в митохондриях, а в пероксисомах изменения отсутствовали (Mittova et al., 2003). При этом показатели окислительного стресса (накопление пероксида водорода и интенсивность пероксидного окисления липидов) были значительно выражены у обычных растений, тогда как у толерантного сорта имело место даже снижение уровня окисления в пероксисомах (Mittova et al., 2003). Таким образом, устойчивые растения имеют более эффективную систему защиты, что обеспечивает возможность функционирования в условиях стресса. Трансгенные растения, имеющие повышенные уровни антиоксидантов, в том числе и СОД, также являются более устойчивыми к воздействию неблагоприятных факторов по сравнению с обычными растениями (Van Camp et al., 1996a; Van Breusegem et al., 1999; Basu et al., 2001; Gao et al., 2003). Так, в трансгенных растениях *Brassica napus* количество транскриптов и общая активность СОД были выше по сравнению с таковыми в клетках обычных растений (Basu et al., 2001). При обработке алюминием у обоих типов растений отмечено ингибирование роста корней и увеличение уровня пероксидного окисления липидов, однако эти показатели были менее выражены у трансгенных растений (Basu et al., 2001). В клетках растений-мутантов, дефицитных по гену СОД, при инокуляции патогенами также отмечены значительные повреждения по сравнению с обычными растениями (Rolke et al., 2004). Таким образом, литературные данные свидетельствуют о существовании тесной связи между устойчивостью растений к тому или иному воздействию и повышенными уровнями или активностями компонентов системы защиты, в том числе и СОД, т. е. с повышенной способностью клеток и тканей убирать активные формы кислорода.

Однако при достижении определенного уровня окислительного стресса происходит снижение активности СОД. Например, в листьях пшеницы в условиях засухи вначале отмечена активация фермента, затем с увеличением длительности воздействия происходило снижение активности (Zhang, Kirkham, 1994). Такая же тенденция отмечена при увеличении не только длительности воздействия (Jiang, Huang, 2001), но и его интенсивности: при водном дефиците (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998; Fu, Huang, 2001), переувлажнении (Калашников и др., 1999), солевом стрессе (Santos et al., 2001), обработке абсцизовой кислотой (Jiang, Zhang, 2001) и тяжелыми металлами (Garcia et al., 1999), фумигации HF (Гришко, Сыщиков, 1999) и др.

Снижение активности фермента может происходить и без его предварительной активации в случае довольно интенсивного воздействия, что отмечено при обработке растений тяжелыми металлами (Mishra, Shoudhuri, 1999; Sandalio et al., 2001), UV-C-облучения (Barka, 2001), соевом стрессе (Muthukumarasamy et al., 2000; Santos et al., 2001), охлаждения (Michaeli et al., 2001), тепловом стрессе (Liu, Huang, 2000), затоплении (Калашников и др., 1999), инокуляции патогенами (Hernandez et al., 2004) и др. Постепенное снижение активности СОД отмечено в клетках и тканях растений при их старении (Abarca et al., 2001; Sairam et al., 2003). Причины сниже-

ния активности СОД могут быть разнообразными, например истощение пула ферментов усиленным его расходом на гашение радикалов  $O_2^{\bullet-}$ . Кроме того, поскольку активность СОД является результатом как ее синтеза, так и деградации, уменьшение активности может быть следствием снижения синтеза и(или) повышения деградации молекул СОД. В инактивации и деградации СОД могут принимать участие АФК — гидроксильные радикалы и пероксид водорода (Casano et al., 1997). В частности,  $H_2O_2$  может восстанавливать  $Cu^{2+}$  в активном центре фермента до  $Cu^+$ , который, взаимодействуя с новой молекулой пероксида водорода, образует  $Cu^{2+}OH^{\bullet}$ .

Этот связанный *in situ* радикал  $OH^{\bullet}$  вызывает окислительную модификацию аминокислотных последовательностей в активном центре фермента, что приводит к его инактивации (Casano et al., 1997). Не только связанные, но и свободные радикалы  $OH^{\bullet}$  повреждают молекулы СОД, вызывая их фрагментацию (Casano et al., 1997). Подтверждением участия АФК в снижении активности СОД является работа Мутукумарасами и соавторов (Muthukumarasamy et al., 2000), в которой отмечено, что обработка растений редиса растворами паклобутразола и триадимефона, химическими антиоксидантами способствовала сохранению активности СОД и улучшала устойчивость растений к солевому стрессу.

Снижение активности фермента при неблагоприятных воздействиях способствует дальнейшему увеличению продукции АФК и развитию окислительных повреждений клеток и тканей растений (Jiang, Huang, 2001).

## Регуляция активности СОД

Регуляция активности СОД на уровне транскрипции, трансляции и путем посттрансляционной модификации. Достаточно важным является вопрос относительно регуляции СОД. Литературные данные свидетельствуют о том, что регуляция активности фермента происходит на разных уровнях: на уровне транскрипции, трансляции и(или) путем посттрансляционной модификации молекул СОД. В частности, показано, при обработке растений кукурузы метилвиологеном активация СОД в листьях растений была обусловлена увеличением транскрипции соответствующих генов (Scandalios, 1993). Параллельное увеличение активности СОД и количества соответствующих транскриптов при стрессовых воздействиях отмечено и другими авторами (Casano et al., 1994; Hernandez et al., 2000; Hurst et al., 2002; Del Rio et al., 2003). Однако не всегда изменения в активности СОД коррелируют с соответствующими изменениями в количестве транскриптов (Williamson, Scandalios, 1992; Madamanchi et al., 1994; Slesak et al., 2003). Так, при обработке растений кукурузы церкоспоринотом отмечено снижение количества транскриптов СОД в листьях, однако общая активность фермента и количество белка не изменились (Williamson, Scandalios, 1992). Также обработка растений гороха  $SO_2$  вызвала увеличение активности фермента, однако количество соответствующих матричных РНК (мРНК) осталось константным, что свидетельствует о существовании адаптивных посттранскрипционных событий и(или) синтезе дополнительных молекул СОД с мРНК, которые уже присутствовали в клетках к моменту воздействия (Madamanchi et al., 1994). Данные о регуляции активности СОД на посттрансляционном уровне приведены в работах

Броетто и соавторов (Broetto et al., 2002), Дель Рио и соавторов (Del Rio et al., 2003) и Гомеоз и соавторов (Gomez et al., 2003/2004). Поскольку фермент активируется субстратом (Thompson et al., 1987), активация молекул СОД при этом, очевидно, обусловлена увеличением продукции супероксидных радикалов в условиях стресса.

Таким образом, на первых этапах стрессового воздействия, вероятно, происходит активация существующих молекул СОД и, возможно, синтез фермента с присутствующими матриц (мРНК). Если этого недостаточно для обеспечения адаптации растений, включается синтез новых мРНК и молекул СОД, т. е. в каждом конкретном случае активность фермента регулируется в зависимости от метаболических потребностей клеток, что в свою очередь определяется интенсивностью стрессового воздействия, его длительностью, чувствительностью растений и др.

Внутриклеточные молекулы и ионы, оказывающие регулирующее влияние на активность СОД и экспрессию ее генов. Очень мало известно о путях сигнальной трансдукции, которые приводят к индукции антиоксидантной защиты, в том числе и СОД. Как свидетельствуют литературные данные, предполагаемыми участниками в цепи передачи сигналов, приводящих к активации СОД и экспрессии ее генов, являются АФК (Kardish et al., 1994; Herbette et al., 2003), ионы кальция (Jiang, Zhang, 2003), оксид азота (NO) (Herbette et al., 2003; Neil et al., 2003), глутатион (Herouart et al., 1993), фитогормоны, в частности АБК (Kaminaka et al., 1999; Bellaire et al., 2000), и салициловая кислота (Scandalios, 1997; Herbette et al., 2003). Рассмотрим более подробно возможное участие каждого из этих компонентов в активации СОД и регуляции экспрессии ее генов.

Что касается АФК, известно, что в повышенных количествах они оказывают не только вредное воздействие на клетки и ткани, но также являются сигнальными молекулами, участвующими в активации защитных систем (Foyer et al., 1997; Neill et al., 2002). Существует предположение о том, что так называемая окислительная вспышка — усиленная вне- или внутриклеточная продукция АФК в 1-е мин воздействия — является начальным событием в цепи передачи сигналов, которое запускает (включает) работу других механизмов защиты (Foyer et al., 1997; Lamb, Dixon, 1997). Увеличение продукции АФК, очевидно, изменяет редокс-состояние определенных внутриклеточных макромолекул; их окисление или восстановление приводит к активации или ингибированию последующих процессов в цепи передачи сигналов. Так, Слесак и соавторы (Slesak et al., 2003) предположили, что экспрессия генов СОД в хлоропластах регулируется, хотя бы частично, изменением редокс-состояния переносчиков электронов в электрон-транспортной цепи фотосинтетического аппарата. Результаты исследований Хербетт и соавторов (Herbette et al., 2003) также свидетельствуют о том, что АФК индуцируют экспрессию генов СОД на уровне транскрипции. При этом было отмечено, что гены СОД по-разному (специфично) отвечают на увеличение продукции АФК ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $^1O_2$ ,  $H_2O_2$ ). Количество транскриптов пластидной изоформы листьев подсолнуха, обозначенной авторами СОДha-1, увеличено в 2 раза в ответ на внеклеточную и хлоропластную продукцию супероксидных анион-радикалов, тогда как другие АФК не влияли на экспрессию данного гена (Herbette et al., 2003). Количество транскриптов другой изоформы (цитозольной СОДha-2) увеличено в ответ на  $^1O_2$  и внеклеточную продукцию  $O_2^{\cdot-}$ . Пероксид водорода при этом

не оказывал влияния на транскрипцию обоих генов (Herbette et al., 2003). Однако на основании имеющихся литературных данных невозможно конкретно определить роль и место АФК в процессах, приводящих к экспрессии генов СОД. Действия АФК, при этом, очевидно, могут быть прямыми, поскольку в промоторных участках генов СОД обнаружены локусы, чувствительные к АФК (Kardish et al., 1994; Tsukamoto et al., 2005), что будет рассмотрено ниже. Также участие АФК в экспрессии генов СОД может быть опосредовано, как отмечено выше, изменением окислительно-восстановительного состояния определенных внутриклеточных молекул, являющихся звеньями в цепи передачи сигналов. В любом случае экспрессия генов СОД является чувствительной к редокс-состоянию в клетке (цитоплазматическому и(или) ядерному), и нарушение баланса между продукцией и ликвидацией АФК в сторону повышенной продукции, очевидно, является необходимым событием в изменении экспрессии генов СОД.

Кроме АФК в регуляции активности СОД принимают участие также ионы кальция ( $Ca^{2+}$ ). Отмечено, что увеличение концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле клеток являлось одним из необходимых условий активации фермента в листьях кукурузы (Jiang, Zhang, 2003). Однако в работе Прайс и соавторов (Price et al., 1994) показано ингибирующее влияние ионов кальция на активность СОД в растениях табака при их обработке раствором перекиси водорода. Обработка ингибитором кальциевых каналов лантаном привела к увеличению активности СОД. Механизм ингибирования действия фермента кальцием неизвестен, но, как предполагают авторы, возможно, здесь действуют Са-зависимые протеинкиназы и(или) протеазы (Price et al., 1994). Отмечено, что внешняя обработка растений райграса раствором кальция ( $CaCl_2$ ) на активность СОД не влияла, хотя и приводила к увеличению содержания внутриклеточного кальция (Jiang, Huang, 2001). Таким образом, имеющиеся в литературе данные об участии  $Ca^{2+}$  в регуляции СОД различны, и необходимы дальнейшие исследования в изучении данного вопроса.

Что касается участия фитогормонов в регуляции активности СОД и экспрессии ее генов, то здесь отмечена некая специфика ответов (Zhu, Scandalios, 1994; Herbette et al., 2003). Так, при обработке листьев подсолнуха жасмоновой кислотой, этефоном, салициловой и абсцизовой кислотами не было изменений в количестве мРНК хлоропластной изоформы СОДha-1 (Herbette et al., 2003). Однако при обработке растений этефоном имело место накопление транскриптов другой изоформы СОД — цитозольной СОДha-2 (Herbette et al., 2003). В других работах отмечено влияние абсцизовой кислоты (Zhu, Scandalios, 1994; Kaminaka et al., 1999), гиббереллина и кинетина, но не АБК (Курепа et al., 1997) на регуляцию генов СОД. Что касается АБК, отмечено ее участие в индукции экспрессии генов, кодирующих разные изоформы фермента: CuZnСОД (Sakamoto et al., 1995; Kaminaka et al., 1999), MnСОД (Bueno et al., 1998; Kaminaka et al., 1999) и FeСОД (Kaminaka et al., 1999). При этом действие фитогормонов, как и в случае АФК, может быть прямым, поскольку в промоторных участках генов СОД обнаружены локусы, чувствительные к фитогормонам (Scandalios, 1997; Bellaire et al., 2000). Кроме того, очевидно, существует сложная внутриклеточная рабочая сеть, включающая в себя кроме фитогормонов другие компоненты, в частности уже отмеченные АФК и ионы кальция. Отмечено одновременное участие АФК и  $Ca^{2+}$  в активации

СОД при обработке растений кукурузы растворами АБК (Jiang, Zhang, 2003). К сожалению, авторы не изучали концентрацию АБК в клетках, а применили только экзогенную обработку растений растворами АБК. При этом отмечено увеличение продукции  $O_2^{\bullet-}$ , ионов кальция и активации СОД. Обработка растений ингибиторами НАДФ-оксидазы имидазолом и пиридином блокировала увеличение продукции  $O_2^{\bullet-}$ ; активность СОД при этом не изменялась (Jiang, Zhang, 2003). Таким образом, для активации СОД необходимо увеличение количества супероксидных радикалов. При обработке растений хелатором кальция (ЭГТА) и ингибиторами кальциевых каналов (верапамилом и  $La^{3+}$ ) не отмечено активации НАДФ-оксидазы, увеличения количества АФК и активности СОД. Таким образом, не только АФК, но и  $Ca^{2+}$  вовлечены в активацию СОД, вызванную обработкой АБК. При этом мы все же можем установить некую последовательность событий: увеличение концентрации  $Ca^{2+}$  в клетке необходимо для активации НАДФ-оксидазы и соответственно возрастания продукции супероксидных радикалов. Однако не всегда изменения концентрации  $Ca^{2+}$  в клетке предшествуют увеличению продукции АФК. Отмечено, что в клетках суспензийной культуры табака, обработанных раствором салициловой кислоты, возрастание продукции  $O_2^{\bullet-}$  происходит раньше увеличения концентрации  $Ca^{2+}$  в клетке (Kawanabe et al., 1998). В любом случае эти события тесно связаны и необходимы для активации СОД.

Регулирующее влияние на активность СОД оказывает также глутатион. Отмечено участие глутатиона в экспрессии гена, кодирующего цитозольную изоформу CuZnСОД в клетках листьев табака (Herouart et al., 1993). При этом показано, что только восстановленный глутатион (но не его окисленная форма) индуцирует экспрессию гена. Таким образом, окисление глутатиона или его восстановление (т. е. уже отмеченное редокс-состояние) влияет на экспрессию генов СОД. Механизм действия глутатиона при этом не установлен. В экспериментах на клетках печени крыс показано, что введение глутатиона, цистеина и других сульфгидрильных соединений привело к активации СОД, что, по мнению авторов, обусловлено восстановлением SH-соединениями ионов меди ( $Cu^{2+}$ ) в активном центре фермента (Hoshino et al., 1985).

Важной сигнальной молекулой в клетках растений является оксид азота (NO) (Neill et al., 2003). Отмечено участие NO в регуляции экспрессии генов СОД (Herbette et al., 2003). При этом показано, что количество мРНК гена, кодирующего СОДha-1, не изменилось в ответ ни на продукцию NO, ни на его удаление, тогда как количество транскриптов другой изоформы (СОДha-2) значительно увеличилось при обеих обработках (Herbette et al., 2003). Таким образом, как и в случае АФК, мы видим специфику ответов генов СОД на изменение концентрации NO. Однако непосредственная роль NO в экспрессии генов СОД не установлена.

Отмечено также участие фосфатаз и(или) киназ и соответственно процессов фосфорилирования—дефосфорилирования в регуляции экспрессии генов СОД (Herbette et al., 2003). Обработка листьев подсолнуха ингибитором фосфатазы кантаридином, а также ингибитором серин/треонин-киназы стаурополином не влияла на экспрессию гена СОДha-1, тогда как количество транскриптов гена, кодирующего СОДha-2, увеличилось при обеих обработках (Herbette et al., 2003). Очевидно, фосфорилирование—дефосфорилирование определенных белков приводит к изменению их активности, что в свою

очередь косвенно влияет на экспрессию генов СОД. Высказано предположение о том, что процессы фосфорилирования—дефосфорилирования при этом модулируются изменением концентрации АФК в клетке (Herbette et al., 2003).

Таким образом, рассмотрено возможное участие АФК, ионов кальция, глутатиона, фитогормонов, киназ и(или) фосфатаз в активации СОД и экспрессии ее генов. Очевидно, это далеко не полный перечень, и еще предстоит определить и изучить новые компоненты и их место и роль в регуляции СОД.

Гены СОД: специфика их ответов. Для понимания механизмов, при помощи которых геном воспринимает воздействия стрессовых факторов, необходимо идентифицировать соответствующие гены, изучить их структуру и регуляцию. Выделены и изучены гены, кодирующие различные изоформы СОД в клетках кукурузы (Scandalios, 1997), табака (Van Camp et al., 1996b), риса (Kaminaka et al., 1999; Lee et al., 2001), арабидопсиса (Kleibenstein et al., 1998) и др. В частности, в листьях кукурузы изоформы СОД кодируются 9 неаллельными генами: 4 генами цитозольной формы CuZnСОД (*Sod-2*, *Sod-4*, *Sod-4A* и *Sod-5*), 4 — митохондриальной MnСОД (*Sod-3.1*, *Sod-3.2*, *Sod-3.3* и *Sod-3.4*) и 1 геном хлоропластной CuZnСОД (Zhu, Scandalios, 1994; Scandalios, 1997). Изучение аминокислотных последовательностей изоформ СОД каждого семейства показало их гомологичность в пределах семейств (95 %); кодирующие участки соответствующих генов также высокогомологичны (Kernodle, Scandalios, 1996; Scandalios, 1997). Однако эти гены, как мы отметили выше, по-разному отвечают на воздействия стрессовых факторов, увеличение количества АФК, обработку фитогормонами и т. д. Они по-разному регулируются во время роста и развития растений (Zhu, Scandalios, 1994; Guan, Scandalios, 1998). Так, количество матричной РНК CuZnСОД хлоропластов молодых листьев табака было в 4 раза выше по сравнению с таковым зрелых листьев (Kurepa et al., 1997). Что касается FeСОД, то ее активность, наоборот, повышалась с увеличением возраста растений. Показано, что количество транскриптов генов *Sod-4* и *Sod-4A* было одинаковым при проращивании семян кукурузы (Guan, Scandalios, 1998), однако в клетках молодых листьев проростков значительно преобладало количество транскриптов гена *Sod-4A* (Guan, Scandalios, 1998). Кроме того, гены по-разному отвечали на разнообразные стрессовые воздействия, такие как интенсивное освещение, обработка церкоспорином,  $H_2O_2$  и АБК (Kernodle, Scandalios, 1996; Guan, Scandalios, 1998). Причиной различной регуляции экспрессии генов СОД в процессе роста и развития, а также при стрессовых воздействиях является различие их промоторных участков, и это говорит о том, что они регулируются разными механизмами. Так, промоторные участки гена, кодирующего пластидную CuZnСОД, содержат локусы, контролируемые световыми сигналами, что, очевидно, говорит об участии в этих процессах кислородных радикалов (Kardish et al., 1994). Кроме того, в данных генах обнаружены участки, которые действуют не в условиях окислительного стресса, а в процессах роста и развития растений. Промоторный участок гена *Sod-3.1* в листьях кукурузы содержит локус, отвечающий на воздействие салициловой кислоты, тогда как в других генах этого семейства (*Sod-3.2*, *Sod-3.3* и *Sod-3.4*) данный локус отсутствует (Scandalios, 1997). Однако последние имеют участки, отвечающие на воздействие

АБК, тогда как ген *Sod-3.1* не имеет такового (Scandalios, 1997). В промоторном участке гена, кодирующего цитозольную CuZnСОД в проростках риса, обнаружен *cis*-элемент, чувствительный к окислительному стрессу и названный CORE (coordinative regulatory element for antioxidative defense; Tsukamoto et al., 2005). Этот элемент отвечал на обработку метилвиологеном (индуктором супероксидных радикалов) и не активировался при действии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Также отмечено участие MAP-киназ в изменении активности CORE и экспрессии гена (Tsukamoto et al., 2005). При этом MAP-киназы выступают в роли негативного регулятора этих процессов: обработка образцов ингибитором MAP-киназ стауроспорином увеличивала как активность CORE, так и экспрессию гена, кодирующего CuZnСОД (Tsukamoto et al., 2005). Таким образом, экспрессия генов СОД контролируется уникальными для каждого гена механизмами, что обусловлено различием их промоторных участков. У *Escherichia coli* за экспрессию гена СОД отвечает двухгенный локус *soxRS*, в котором оба гена действуют последовательно (Hidalgo, Demple, 1997). Продукт первого гена *soxR* (SoxR) является редокс-чувствительным; его прямое окисление или восстановление анион-радикалами супероксида приводит к активации или ингибированию транскрипции следующего гена — *soxS*, который отвечает за синтез активатора транскрипции (SoxS), непосредственно стимулирующего экспрессию гена СОД (Hidalgo, Demple, 1997). В клетках растений не обнаружено гомологов транскрипционных факторов SoxR и SoxS, однако известны другие факторы транскрипции, такие как AP-1 (activator protein-1) и NF-IB (nuclear factor) (Scandalios, 1997). Возможно, изменение редокс-состояния факторов транскрипции влияет на экспрессию генов *Sod* (Zhu, Scandalios, 1994).

Регуляция активности изоформ СОД, находящихся в различных внутриклеточных компартментах. Также представляет интерес специфическая регуляция изоформ СОД, т. е. то, каким образом митохондриальная MnСОД отвечает на события в митохондриях, а хлоропластная FeСОД — в хлоропластах, тогда как все гены СОД расположены в ядре. Очевидно, существуют сигнальные компоненты, специфичные для каждого клеточного компартмента. Эти молекулы, вероятно, являются первичными сенсорами и одновременно переносчиками; они должны быть небольшими по молекулярной массе, поскольку им необходимо быстро транспортироваться из компартмента в ядро. Предполагают, что таковыми являются оксипирины, производные окисления свободных жирных кислот (Bowler, 1992). Жирные кислоты, специфические для хлоропластов, митохондрий и плазматической мембраны, окисляются активными формами кислорода с образованием гидрофильных молекул, которые могут транспортироваться в ядро и взаимодействовать с определенными факторами транскрипции, что приводит к активации экспрессии гена, кодируемого необходимой форму СОД. Аналогами оксипиринов в клетках животных и человека являются простагландины, лейкотриены и липоксины (Samuelsson et al., 1987).

Мы рассмотрели участие в регуляции активности СОД и экспрессии ее генов различных внутриклеточных макромолекул. Скорее всего, они работают не самостоятельно, а вовлечены в сложную внутриклеточную рабочую сеть. Однако многие детали функционирования рабочей сети не установлены.

Таким образом, супероксиддисмутаза играет важную роль в защите клеток и тканей от окислительных повреждений в условиях роста и развития растений, а также при действии неблагоприятных факторов. Однако при работе СОД образуется пероксид водорода, который, как уже отмечено, является ингибитором фермента. Поэтому эффективное функционирование СОД в значительной степени определяется функционированием других компонентов системы защиты, в частности тех, которые удаляют пероксид водорода (каталазы, пероксидазы) и ферментов аскорбат-глутатионного цикла.

### Список литературы

- Гришко В. Н., Сыщицков Д. В. 1999. Пероксидное окисление липидов и функционирование некоторых антиокислительных ферментных систем у кукурузы и овса при остром поражении флористым водородом. Укр. биохим. журн. 71 (3) : 51—57.
- Калашников Ю. Е., Балахнина Т. И., Бенничелли Р. П., Степневский В., Степневская С. 1999. Активность антиокислительной системы и интенсивность перекисного окисления липидов в растениях пшеницы в связи с сортовой устойчивостью к переувлажнению почвы. Физиол. раст. 46 (2) : 268—275.
- Калашников Ю. Е., Балахнина Т. И., Закржевский Д. А. 1994. Действие почвенной гипоксии на активацию кислорода и систему защиты от окислительной деструкции в корнях и листьях ячменя. Физиол. раст. 41 (4) : 583—588.
- Курянова Л. Н., Веселов А. П., Гончарова Т. А., Синицына Ю. В. 1997. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная система защиты хлоропластов гороха при тепловом шоке. Физиол. раст. 44 (5) : 725—730.
- Мерзляк М. Н. 1989. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки. Итоги науки и техники. Сер. «Физиология растений». М.: ВИНТИ. 6 : 167 с.
- Abarca D., Martin M., Sabater B. 2001. Differential leaf response in young and senescent plants. *Physiol. Plant.* 113 : 409—415.
- Alonso R., Elvira S., Castillo F. J., Gimeno B. S. 2001. Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis*. *Plant, Cell Envir.* 24 : 905—916.
- Asada K. 1966. Radical production and scavenging in the chloroplasts. In: *Photosynthesis and the environment*. Netherlands: Kluwer Acad. Publ., Dordrecht. 123—150.
- Babithaa M. P., Bhath S. G., Prakasha H. S., Shetty H. S. 2002. Different induction of superoxide dismutase in downy mildew-resistant and -susceptible genotypes of pearl millet. *Plant Pathol.* 51 : 480—486.
- Barka E. A. 2001. Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits in response to low amounts of UV-C. *Austr. J. Plant Physiol.* 28 : 785—791.
- Basu U., Good A. G., Taylor G. J. 2001. Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminium-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminium. *Plant, Cell Envir.* 24 : 1269—1278.
- Beauchamp C. O., Fridovich I. 1973. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochim. biophys. acta.* 317 : 50—64.
- Bellaire B. A., Carmody J., Braud J., Gossett D., Banks S., Lucas M., Fowler T. E. 2000. Involvement of abscisic acid-dependent and -independent pathways in the upregulation of antioxidant enzyme activity during NaCl stress in cotton callus tissue. *Free Radic. Res.* 33 : 531—545.
- Bowler C., Van Montagu M., Inze D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43 : 83—116.
- Broetto F., Lüttge U., Ratajczak R. 2002. Influence of light intensity and salt-treatment on mode of photosynthesis and enzymes

of the antioxidative response system of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Funct. Plant Biol.* 29 : 13—23.

Bueno P., Del Rio L. A. 1992. Purification and properties of glyoxysomal cuprozinic superoxide dismutase from watermelon cotyledons (*Citrullus vulgaris* Schrad). *Plant Physiol.* 98 : 332—336.

Bueno P., Piqueras A., Kurepa J., Savoure A., Verbruggen N., Van Montagu M., Inze D. 1998. Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Sci.* 138 : 27—34.

Casano L. M., Gomes L. D., Lascano H. R., Gonzales C. A., Trippi V. S. 1997. Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant Cell Physiol.* 38 : 433—440.

Casano L. M., Martin M., Sabater B. 1994. Sensitivity to superoxide dismutase transcript levels and activities to oxidative stress is lower in mature-senescent than in young barley leaves. *Plant Physiol.* 106 : 1033—1039.

Christov K., Bakardjieva N. T. 1999. Effect of calcium and zinc on subcellular distribution, activity and thermosensitivity of superoxide dismutase in *Mniun affine*. *Biol. Plant.* 42 : 57—63.

Corpas F. J., Sandalio L. M., Del Rio L. A., Trelease R. N. 1998. Copper-zinc superoxide dismutase is a constituent enzyme of the matrix of peroxisomes in the cotyledons of oilseed plants. *New Phytol.* 138 : 307—314.

Del Rio L. A., Sandalio L. M., Altomare D., Zilinskas B. 2003. Mitochondria and peroxisomal manganese superoxide dismutase: different expression during leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 54 : 923—933.

Droillard M., Paulin A. 1990. Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiol.* 94 : 1187—1192.

Edreva A., Yordanov I., Kardjieva R., Gesheva E. 1998. Heat shock responses of bean plants: involvement of free radicals? Antioxidants and free radical/active oxygen scavenging systems. *Biol. Plant.* 41 : 185—191.

Foyer C. H., Delgado H. L., Dat J. F., Scott I. M. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol. Plant.* 100 : 241—254.

Fu J., Huang B. 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Envir. Exp. Bot.* 45 : 105—114.

Gao X., Ren Z., Zhao Y., Zhang H. 2003. Overexpression of SOD increases salt tolerance of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133 : 1873—1881.

Garcia A., Baquedano F. J., Navarro P., Castillo F. J. 1999. Oxidative stress induced by copper in sunflower plants. *Free Radic. Res.* 31 : 51—57.

Gomez J., Jimenez A., Olmos E., Sevilla F. 2003/4. Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum*, cv. Puget) chloroplasts. *J. Exp. Bot.* 55 : 119—130.

Guan L., Scandalios J. G. 1998. Two structurally similar maize cytosolic superoxide dismutase genes, *Sod4* and *Sod4A*, respond differentially to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiol.* 117 : 217—224.

Hayakawa T., Kanematsu S., Asada K. 1984. Occurrence of CuZn-superoxide dismutase in the thylakoid space of spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 25 : 883—889.

Herbette S., Lene C., de Iabrouhe D., Drevet J., Roeckel-Drevet P. 2003. Transcripts of sunflower antioxidant scavengers of the SOD and GPX families accumulate differentially in response to downy mildew infection, photohormones, reactive oxygen species, nitric oxide, protein kinase and phosphatase inhibitors. *Physiol. Plant.* 119 : 418—428.

Hernandez J. A., Campillo A., Jimenes A., Alarcon J. J., Sevilla F. 1999. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea. *New Phytologist.* 141 : 241—251.

Hernandez J. A., Jimenes A., Mullineaux P., Sevilla F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with the induction of antioxidant defences. *Plant, Cell Environ.* 23 : 853—862.

Hernandez J., Rubio M., Olmos E., Ros-Barcelo A., Martinez-Gomez P. 2004. Oxidative stress induced by long-term plum pox virus infection in peach (*Prunus persica*). *Physiol. Plant.* 122 : 486—495.

Herouart D., Van Montagu M., Inze D. 1993. Redox-activated expression of the cytosolic copper/zinc superoxide dismutase gene in *Nicotiana*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 90 : 3108—3112.

Hidalgo E., Demple B. 1997. Spacing of promoter elements regulates the basal expression of the *soxS* gene and converts SoxR from a transcriptional activator into a repressor. *EMBO J.* 16 : 1056—1065.

Hoshino T., Ohta V., Ishigino I. 1985. The effect of sulfhydryl compounds on the catalytic activity of Cu,Zn-superoxide dismutase purified from rat liver. *Experientia.* 41 : 1416—1419.

Hurst A., Grams T., Ratajczak R. 2002. Effects of salinity, high irradiance, ozone, and ethylene on mode of photosynthesis, oxidative stress and oxidative damage in the C3/CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant, Cell Environ.* 27 : 187—197.

Iturbe-Ormaetxe I., Escuredo P., Arrese-Igor C., Becana M. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiol.* 116 : 173—181.

Jiang Y., Huang B. 2001. Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses. *J. Exp. Bot.* 52 : 341—349.

Jiang M., Zhang J. 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiol.* 42 : 1265—1273.

Jiang M., Zhang J. 2003. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defence in leaves of maize seedlings. *Plant, Cell Environ.* 26 : 929—939.

Kaminaka H., Morita S., Tokumoto M., Masumura T., Tanaka K. 1999. Differential gene expression of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stresses. *Free Radic. Res.* 31 : 219—225.

Kamińska-Rożek E., Pukacki P. 2004. Effect of water deficit on oxidative stress and degradation of cell membranes in needles of Norway spruce (*Picea abies*). *Acta physiol. plant.* 26 : 431—442.

Kang H.-M., Saltveit M. 2001. Activity of enzymatic antioxidant defense systems in chilled and heat shocked cucumber seedling radicles. *Physiol. Plant.* 113 : 548—556.

Kardish N., Magal N., Aviv D., Galun E. 1994. The tomato gene for the chloroplastic Cu,Zn-superoxide dismutase: regulation of expression imposed in transgenic tobacco plants by a short promoter. *Plant Mol. Biol.* 25 : 887—897.

Kawano T., Sahashi N., Takahashi K., Uozumi N., Muto S. 1998. Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture; the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiol.* 39 : 721—730.

Keele B. B., McCord J. M., Fridovich I. 1970. Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B. A new manganese-containing enzyme. *J. Biol. Chem.* 245 : 6176—6181.

Kernodle S. P., Scandalios J. G. 1996. A comparison of the structure and function of the highly homologous maize antioxidant Cu/Zn superoxide dismutase genes, *Sod4* and *Sod4A*. *Genetics.* 144 : 317—328.

Kitagawa Y., Tanaka Y., Hata M., Kusunoki M., Lee G. P. 1991. Three-dimensional structure of CuZn-superoxide dismutase from spinach at 2.0 Å resolution. *J. Biochem.* 109 : 477—485.

Kliebenstein D. J., Monde R.-A., Last R. L. 1998. Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol.* 118 : 637—650.

Kuk Y. I., Shin J. S., Burgos N., Hwang T., Han O., Cho B. H., Jung S., Guh J. O. 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Sci.* 43 : 2109—2117.

Kurepa J., Herouart D., Van Montagu M., Inze D. 1997. Differential expression of Cu,Zn- and Fe-superoxide dismutase genes of tobacco during development, oxidative stress and hormonal treatment. *Plant Cell Physiol.* 38 : 463—470.



- Kuzniak E., Sklodowska M. 2004. The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves. *J. Exp. Bot.* 55 : 605—612.
- Lamb C., Dixon R. A. 1977. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48 : 251—275.
- Lee D. H., Kim Y. S., Lee C. B. 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 158 : 737—745.
- Liu X., Huang B. 2000. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop. Sci.* 40 : 503—510.
- Logan B. A., Demmig-Adams B., Adams W. W. 1998. Antioxidants and xanthophyll cycle-dependent energy dissipation in *Cucurbita pepo* L. and *Vinca major* L. Upon a sudden increase in growth PPFD in the field. *J. Exp. Bot.* 49 : 1881—1888.
- Madamanchi N., Donahue J., Cramer C., Alschler R., Pederson K. 1994. Differential response of Cu,Zn superoxide dismutase in two pea cultivars during a short term exposure to sulfur dioxide. *Plant Mol. Biol.* 26 : 95—103.
- Mann T., Keilin D. 1938. Hemocuprein and hepatocuprein copper-protein compounds of blood and liver in mammals. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 126 : 303—315.
- McCord J. M., Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244 : 6056—6063.
- Michaeli R., Philosoph-Hadas S., Rion J., Shahak Y., Meir S. 2001. Chilling-induced leaf abscission of *Ixora coccinea* plants. III. Enhancement by high light via increased oxidative processes. *Physiol. Plant.* 113 : 338—345.
- Mishra A., Choudhuri M. A. 1999. Effects of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice. *Biol. Plant.* 42 : 409—415.
- Mittova V., Tal M., Volokita M., Guy M. 2003. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant, Cell Environ.* 26 : 845—856.
- Möller I. M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52 : 561—591.
- Moran J. F., James E. K., Rubio M. C., Robert G. S., Klucas V., Becana M. 2003. Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules. *Plant Physiol.* 133 : 773—782.
- Muthukumarasamy M., Dutta Gupta S., Panneerselvam R. 2000. Enhancement of peroxidase, polyphenol oxidase and superoxide dismutase activities by triadimefon in NaCl stressed *Raphanus sativus* L. *Biol. Plant.* 43 : 317—320.
- Navari-Izzo F., Quartacci M. F., Pinzino C., Vecchia F. D., Sgherri C. L. M. 1998. Thylakoid-bound and stromal antioxidative enzymes in wheat treated with excess copper. *Physiol. Plant.* 104 : 630—638.
- Neill S. J., Desican R., Hancock J. T. 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5 : 388—395.
- Neill S. J., Desican R., Hancock J. T. 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.* 159 : 11—35.
- Nyman P. O. 1960. A modified method for the purification of erythrocyte cytochrome c. *Biochim. biophys. acta.* 45 : 387—389.
- Ogawa K., Kanematsu S., Asada K. 1996. Intra and extra-cellular localization of «cytosolic» CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 37 : 790—799.
- Ogawa K., Kanematsu S., Asada K. 1997. Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. *Plant Cell Physiol.* 38 : 1118—1126.
- Ogawa K., Kanematsu S., Takabe K., Asada K. 1995. Attachment of CuZn-superoxide dismutase to thylakoid membrane at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplast: detection by immunogold labeling after rapid freezing and substitution method. *Plant Cell Physiol.* 36 : 565—573.
- Palatnik J. F., Carrillo N., Valle E. M. 1999. The role of photosynthetic electron transport in the oxidative degradation of chloroplastic glutamine synthetase. *Plant Physiol.* 121 : 471—478.
- Palma J. M., Huertas E. L., Corpas F. J., Sandalio L. M., Gomez M., Del Rio L. A. 1998. Peroxisomal manganese superoxide dismutase: purification and properties of the isozyme from pea leaves. *Physiol. Plant.* 104 : 720—726.
- Parker M. W., Blake C. C., Barra D., Bossa F., Schinina M. E., Bannister W. H., Bannister J. V. 1987. Structural identity between the iron and manganese-containing superoxide dismutases. *Protein Engineering.* 1 : 393—397.
- Price A., Taylor A., Ripley A., Griffiths A., Trewavas A., Knight M. 1994. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell.* 6 : 1301—1310.
- Pryor W., Squadrito G. 1995. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Amer. J. Physiol.* 268 : L699—L700.
- Rapp I., Adams W. C., Miller R. W. 1973. Purification of superoxide dismutase from fungi and characterization of the reaction of the enzyme with catechols by electron spin resonance spectroscopy. *Can. J. Biochem.* 51 : 158—171.
- Rolke Y., Liu S., Quidde T., Williamson B., Schouten A., Weltling K.-M., Siewers V., Tenberge K., Tudzynski B., Tudzynski P. 2004. Functional analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu,Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Mol. Plant Pathol.* 5 : 17—22.
- Sairam R. K., Singh D. V., Srivastava G. C. 2003. Changes in activity of activity of antioxidant enzymes in sunflower leaves of different ages. *Biol. Plant.* 47 : 61—66.
- Sakamoto A., Okumura T., Kaminaka H., Sumi K., Tanaka K. 1995. Structure and differential response to abscisic acid of two promoters for the cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase genes, *SodCc1* and *SodCc2* in rice protoplasts. *FEBS Lett.* 358 : 62—66.
- Salin M. L. 1987. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol. Plant.* 72 : 681—689.
- Samuelsson B., Dahlen S.-E., Lindgren J. A., Rouzer C. A., Serhan C. N. 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science.* 237 : 1171—1176.
- Sandalio L., Dalurzo H., Gomez M., Romero-Puertas M., Del Rio L. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* 52 : 2115—2126.
- Sandalio L. M., Del Rio L. A. 1987. Localization of superoxide dismutase in glyoxysomes from *Citrullus vulgaris*. Functional implications in cellular metabolism. *J. Plant Physiol.* 127 : 395—409.
- Santos C., Campos A., Azevedo H., Caldeira G. 2001. *In situ* and *in vitro* senescence induced by KCl stress: nutritional imbalance, lipid peroxidation and antioxidant metabolism. *J. Exp. Bot.* 52 : 351—360.
- Scandalios J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 101 : 7—12.
- Scandalios J. G. 1997. Molecular genetics of superoxide dismutase in plants. In: J. G. Scandalios. (Ed.). *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 527—568.
- Schinkel H., Hertzberg M., Wingsle G. 2001. A small family of novel CuZn-superoxide dismutases with high isoelectric points in hybrid aspen. *Planta.* 213 : 272—279.
- Schmitz-Eiberger M., Noga G. 2001. UY-B-radiation-influence on antioxidative components in *Phaseolus vulgaris* leaves. *J. Appl. Bot.* 75 : 210—215.
- Skórzyńska-Polit E., Drazkiewicz M., Krupa Z. 2003/4. The activity of the antioxidant system in cadmium-treated *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Plant.* 47 : 71—78.
- Slesak I., Karpinska B., Surowska E., Miszalski Z., Karpinski S. 2003. Redox changes in the chloroplasts and hydrogen peroxide are essential for regulation of C<sub>3</sub>-CAM transition and photooxidative stress responses in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Cell Physiol.* 44 : 573—581.

Thompson J. E., Legge R. L., Barber R. F. 1987. The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist*. 105 : 317—344.

Tsukamoto S., Morita S., Hirano E., Yokoi H., Masumara T., Tanaka K. 2005. A novel *cis*-element that is responsive to oxidative stress regulates three antioxidant defense genes in rice. *Plant Physiol.* 137 : 317—327.

Van Breusegem F., Slooten L., Stassart J., Moens T., Botterman J., Van Montagu M., Inze D. 1999. Overproduction of *Arabidopsis thaliana* FeSOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize. *Plant Cell Physiol.* 40 : 515—523.

Van Camp W., Capiou K., Van Montagu M., Inze D., Slooten L. 1996a. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol.* 112 : 1703—1714.

Van Camp W., Herouart D., Willekens H., Takahashi H., Saito K., Van Montagu M., Inze D. 1996b. Tissue-specific activity of two manganese superoxide dismutase promoters in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 112 : 525—535.

Wanders R. J. A., Denis S. 1992. Identification of superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. *Bopchim. biophys. acta.* 1115 : 259—262.

Williamson J. D., Scandalios J. G. 1992. Differential response of maize catalases and superoxide dismutases to the photoactivated fungal toxin cercosporin. *Plant J.* 2 : 351—358.

Wu F., Zhang G., Dominy P. 2003. Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environ. Exp. Bot.* 50 : 67—78.

Yost F., Fridovich I. 1973. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 248 : 4905—4908.

Zhang J., Kirkham M. B. 1994. Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol.* 35 : 785—791.

Zhu D., Scandalios J. G. 1994. Differential accumulation of manganese-superoxide dismutase transcripts in maize in response to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiol.* 106 : 173—178.

Поступила 8 VIII 2005

## SUPEROXIDE DISMUTASE IN PLANT CELLS

V. V. Baranenko

Institute of Botany, National Academy of Sciences of the Ukraine, Kiev;  
e-mail: cell@svitonline.com

Superoxide dismutase (SOD) is one of the key components of defense system, which protect cells and tissues from oxidative destruction. The unique nature of this enzyme among other antioxidants, its localization in different intracellular compartment are reviewed in addition to enzyme behaviour under unflavourable influences. Besides, we considered questions of regulation of SOD activity, participation of such intracellular macromolecules as reactive oxygen species, calcium ions, phytohormones, and nitric oxide in this regulation, as well as phosphoralation/dephosphorylation process.