

REAKTYWNE FORMY TLENU W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH I ENZYMATYCZNE SYSTEMY OBRONNE*

REACTIVE OXYGEN SPECIES IN PLANT CELLS AND ANTIOXIDATIVE DEFENSE SYSTEMS

Arleta MAŁECKA, Barbara TOMASZEWSKA

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im.
Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań

Streszczenie: Wszystkie organizmy żywe narażone są na działanie reaktywnych form tlenu (RFT), takich jak: nadtlenek wodoru, anionorodnik ponadtlenkowy czy rodnik hydroksylovowy, które powstają jako nieuchronny produkt metabolizmu tlenowego. Liczne czynniki biotyczne i abiotyczne, takie jak: patogeny, zanieczyszczenie powietrza, zasolenie, ksenobiotyki, metale ciężkie, promieniowanie UV, powodują wzmożone generowanie RFT. Głównymi źródłami RFT w komórkach roślinnych są: chloroplasty, peroksyzomy i mitochondria. RFT uszkadzają wiele makromolekuł, takich jak: białka, tłuszcze oraz kwasy nukleinowe, prowadząc do śmierci komórek. Przypisuje się im również funkcję cząsteczek sygnałowych. Organizmy aerobowe przed uszkodzeniami spowodowanymi przez RFT są chronione przez antyoksydacyjny system obronny, składający się z katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy i alternatywnej oksydazy oraz ze składników nieenzymatycznych: askorbinianu, glutationu, homoglutationu, cysteiny.

Słowa kluczowe: reaktywne formy tlenu, stres oksydacyjny, enzymy antyoksydacyjne.

Summary: All organisms are exposed to reactive oxygen species such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and hydroxyl radical ($\cdot OH$) as unavoidable products of oxidative metabolism. Many biotic and abiotic factors such as: pathogens, air pollutants, salts, xenobiotic, heavy metals, UV radiation initiate ROS formation. The main sites of ROS formation in plant cells are chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. ROS can cause wide-ranging damage to many macromolecules including proteins, lipids and nucleic acids, eventually leading to cell death. Recently considered positive biological roles of ROS act as signal-transducing molecules. To minimize the damaging effects of ROS, aerobic organisms evolved several antioxidant defense mechanisms, including catalase, superoxide dismutase, peroxidases and alternative oxidase, and non-enzymatic molecules such as: ascorbic, glutathione, homogluthathione, cysteine.

Keywords: reactive oxygen species, oxidative stress, antioxidant enzymes.

*Praca finansowana z grantu KBN nr 2PO4G 069 26

1. REAKTYWNE FORMY TLENU (RFT)

Paradoks związany z obecnością tlenu w atmosferze polega na tym, że z jednej strony metabolizm tlenowy dostarcza organizmom aerobowym więcej energii w porównaniu z metabolizmem beztlenowym u anaerobów, z drugiej jednak strony stopniowa redukcja O_2 do H_2O prowadzi do powstawania RFT, takich jak: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$). Różnorodne stresy środowiskowe, takie jak: wysoka i niska temperatura, zasolenie, promieniowanie UV, metale ciężkie, ksenobiotyki czy patogeny, prowadzą do podwyższenia poziomu reaktywnych form tlenu. Dowiedziono, że metale ciężkie, takie jak: Cd, Pb, Al, Zn, powodują generowanie RFT i przyczyniają się do wystąpienia w komórkach roślinnych warunków stresu oksydacyjnego [7, 14, 18, 68, 72, 78, 84]. RFT powstają również jako produkty uboczne transportu elektronów przez błony komórkowe [84]. Niebezpieczeństwo powstawania anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru polega na tym, że w obecności jonów metali (Fe, Cu, Cr, Ni, Co, Mn) zachodzi reakcja Fentona, której są one substratami, a produktem jest rodnik hydroksylowy, najbardziej reaktywna cząsteczka, jaka występuje w układach biologicznych [8, 14, 33, 71].

2. ŹRÓDŁA POWSTAWANIA RFT W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

W komórce roślinnej istnieje wiele potencjalnych źródeł RFT. Są to: chloroplasty, mitochondria, peroksysomy, błona komórkowa, dwuwarstwowa błona jądrowa i retikulum endoplazmatyczne oraz apoplast [4, 11–15, 29]. Organellami o szczególnie wysokiej aktywności metabolizmu tlenowego są: mitochondria, chloroplasty oraz peroksysomy.

2.1. Chloroplasty

W chloroplastach wytwarzany jest $O_2^{\cdot-}$ głównie w reakcji Mehlera [8, 66, 77, 86]. Stwierdzono, że szybkość wytwarzania tego rodnika w normalnych warunkach wynosi $120\text{--}250 \mu\text{Ms}^{-1}$ i zwiększa się do $720 \mu\text{Ms}^{-1}$ w warunkach stresowych [72]. W chloroplastach źródłem anionorodnika ponadtlenkowego może być także zredukowana forma monodehydroksyaskorbinianu, jak również elementy kompleksu PSII: chlorofil P_{680} i białko Q_A [19]. Chloroplasty, a dokładnie fotosystem II (PS II) stanowią również źródło tlenu singletowego [52, 86] oraz nadtlenuoazotynu ($ONOO^-$) [86].

2.2. Peroksysomy

W peroksysomach głównym źródłem H_2O_2 są oksydazy flawinowe. Nadtlenek wodoru jest wytwarzany także w procesie b-oksydacji przez oksydazę acylo-CoA. W matriks peroksysomalnej i NADH- zależnym łańcuchu transportu elektronów w błonie

peroksymalnej wykazano również wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego przez oksydazę ksantynową. Charakterystyczna dla peroksysomów brodawek korzeniowych roślin motylkowatych, oksydaza ksantynowa katalizuje reakcje przekształcenia ksantyny do kwasu moczowego w wyniku czego powstaje $O_2^{\cdot-}$. Kwas moczowy ulega przekształceniu do alantoiny przez oksydazę moczanową, co również jest źródłem powstawania RFT [8, 19, 21, 22].

W błonie peroksysomalnej występują trzy polipeptydy (PMPs) o masie cząsteczkowej 18 (PMP18), 29 (PMP29) i 32 kDa (PMP32), w obecności których powstaje $O_2^{\cdot-}$ [22, 48]. Przyjmuje się, że polipeptyd PMP18 należy do grupy cytochromów typu-b i jest NADH- zależny. PMP32 jest również NADH- zależny i najprawdopodobniej odpowiada reduktazie monodehydroaskorbinianowej (MDHAR), która została wcześniej wykryta w błonie peroksysomalnej komórek liści grochu [36].

W błonach peroksysomów i tylakoidach chloroplastów liści szpinaku również odkryto pośredni udział MDHAR w produkcji $O_2^{\cdot-}$ [56].

Peroksysomalna syntaza tlenu azotu (EC 1.14.13.39) wytwarza NO w reakcji NADPH-zależnej przekształcenia L-argininy do NO i cytruliny w obecności tlenu, wapnia, kalmoduliny, FAD, FMN i tetrahydrobiopteryny [5]. NO może reagować z $O_2^{\cdot-}$ tworząc silnie utleniający anion ponadtlenoazotynowy, który może wpływać na przekształcanie dehydrogenazy ksantynowej w generującą $O_2^{\cdot-}$ oksydazę ksantynową [19].

2.3. Mitochondria

W mitochondrialnym łańcuchu oddechowym do 2% tlenu ulega przekształceniu do RFT [9, 13, 32]. Anionorodnik ponadtlenkowy może powstawać w łańcuchu oddechowym w wyniku jednoelektronowej redukcji zachodzącej z udziałem flavin lub ubichinonu [58]. Miejscem tworzenia $O_2^{\cdot-}$ jest kompleks I [oksydoreduktaza NADH : ubichinon], kompleks II [oksydoreduktaza bursztynian : ubichinon] oraz kompleks III [oksydoreduktaza ubichinol : cytochrom c] [13, 19, 27, 58]. W mitochondriach w obecności substratu oddechowego, lecz w stanie wyczerpania akceptora fosforanu (ADP) oraz przy spadku aktywności oksydazy cytochromowej wzrasta powstawanie RFT. W obu sytuacjach wzrasta stężenie tlenu i poziom zredukowanych donorów jednoelektronowych, co w konsekwencji powoduje wzrost tempa ich reakcji z tlenem [46]. Mitochondria roślinne, w odróżnieniu od zwierzęcych, charakteryzują się występowaniem alternatywnej drogi oddechowej, która kontroluje generowanie RFT i pełni funkcje ochronne. Alternatywna oksydaza katalizuje przeniesienie elektronów z puli ubichinonu bezpośrednio na tlen, z wyłączeniem drogi cytochromowej. Regulacja ta prowadzi do zmniejszenia generowania RFT w mitochondriach [27, 28, 38, 76]. Ponadto mitochondrialna syntaza tlenu azotu (NOS) powoduje powstanie NO, który w wyniku reakcji z $O_2^{\cdot-}$ prowadzi do powstania nadtlenoazotynu. Oprócz tego anionorodnik ponadtlenowy w reakcji dysmutacji ulega przekształceniu do nadtlenu wodoru [40, 41, 43, 86].

2.4. Inne źródła RFT

RFT powstają także w błonach komórkowych, w reakcjach katalizowanych przez oksydazę NADPH [33] oraz w apoplacie i ścianie komórkowej, gdzie pH-zależne

peroksydazy ściany komórkowej odpowiadają za powstawanie nadtlenu wodoru [19, 65]. Przymuszczalnie źródłem RFT w apoplazmie mogą być takie enzymy, jak oksydaza szczawianowa oraz diamino- i poliamino-oksydazy [45]. Ponadto źródłem RFT może być retikulum endoplazmatyczne. W mikrosomach występuje kompleks cytochrom P-450 i reduktaza NADH, które mogą generować $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 [91].

3. SKUTKI DZIAŁANIA RFT NA KOMÓRKI ROŚLINNE

RFT w wysokich stężeniach działają negatywnie na funkcje wszystkich organelli komórkowych, uszkadzając białka, lipidy oraz kwasy nukleinowe [64, 72, 73, 84, 89]. W wyniku działania RFT na białko może dochodzić do specyficznych modyfikacji ich reszt aminokwasowych, fragmentacji łańcucha polipeptydowego, powstawania wiązań poprzecznych i agregacji lub zmiany ładunku. Szczególnie podatne na uszkodzenia oksydacyjne są białka zawierające reszty histydyny, argininy, lizyny, proliny, metioniny i cysteiny oraz białkowe centra żelazowo-siarkowe. Główną konsekwencją oksydacyjnych uszkodzeń białek jest zwiększenie ich degradacji przez proteazy [68].

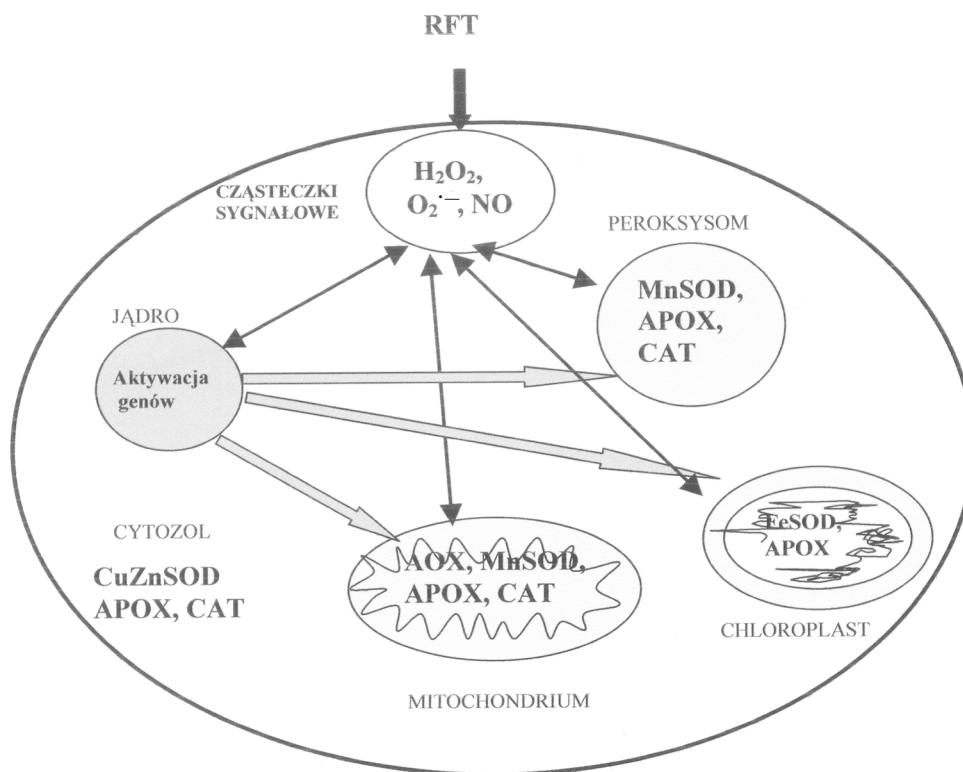
RFT są przyczyną szerokiego spektrum uszkodzeń DNA. Uszkodzenia te obejmują pęknięcia zarówno pojedynczej, jak i obu nici w helisie DNA, powstanie miejsc apurynowych i apirymidowych oraz modyfikacje zasad [37]. Rodnik hydroksylowy powoduje zmiany w zasadach azotowych, polegające na usuwaniu lub wstawianiu atomów H, co prowadzi do zakłócenia prawidłowej struktury podwójnej helisy DNA [15].

Rodnik hydroksylowy i tlen singletowy reagują z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi odrywając od nich atom wodoru, co w konsekwencji prowadzi do powstania hydroksynadtlenków lipidów. Związki te mogą być degradowane do różnych produktów, w tym aldehydów i alkoholi, a w obecności katalizatora metalicznego biorą udział w reakcji Fentona, która prowadzi do powstania reaktywnych rodników alkoksylowych ($RO\cdot$). Rodnik hydroksylowy inicjuje więc reakcję łańcuchową prowadzącą do peroksydacji lipidów [8, 57]. RFT mogą indukować niespecyficzne uprzepuszczalnianie błony mitochondrialnej, co powoduje obniżenie potencjału błonowego i wypływ Ca^{2+} z mitochondriów [6, 40].

3.1. RFT jako cząsteczki sygnałowe

Dwoisty charakter RFT przejawia się tym, iż poza wcześniej opisanymi właściwościami pełnią one funkcję cząsteczek sygnałowych [19, 64, 71, 80]. H_2O_2 jest niezwykle mobilną cząsteczką i może indukować szereg molekularnych, biochemicznych i fizjologicznych odpowiedzi komórkowych. Nadtlenek wodoru indukuje ekspresję genów kodujących takie białka, jak np. S-transferazy glutationowe (GST) oraz peroksydazy glutationowe (GPOX).

Wykazano, że akumulacja H_2O_2 w zawiesinie komórkowej *Arabidopsis thaliana* indukowała ekspresję genów GST i amoniakolizazy fenyloalaniny (PAL) [63]. Ponadto wykazano, że H_2O_2 aktywował geny kodujące oksydazę NADPH [24] i peroksydazę askorbinianową w liściach *Arabidopsis thaliana* [39], a także katalazę w nasionach i liściach kukurydzy [31].



RYCINA 1. Model ilustrujący komunikację między organelami komórkowymi (mitochondrium, jądrem, chloroplastem i peroksysomem) za pośrednictwem cząstek sygnałowych (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, NO) oraz lokalizację enzymów antyoksydacyjnych w komórce roślinnej

Wielu autorów wskazuje, że RFT aktywują kaskadę kinaz białkowych MAPK. W zawieszynie komórkowej *Arabidopsis thaliana* scharakteryzowano kaskadę MAPK, której funkcją jest odbieranie sygnału redoks i indukowanie ekspresji genów białek obronnych np. S-transferazy glutationowej. Na szczycie tej kaskady znajduje się kinaza ANP1 (o funkcji MAPKKK), a kolejne jej elementy stanowią kinazy AtMPK3 i AtMPK6. Liście transgenicznego tytoniu z nadekspresją ANP1 cechowały się zwiększoną tolerancją na szok cieplny, zamarzanie oraz zasolenie. Wskazuje to na fakt, iż indukowanie określonych etapów drogi przekazywania sygnałów w roślinach może chronić je przed różnymi stresami środowiskowymi [42].

Funkcje cząsteczki sygnałowej pełni również NO. Tlenek azotu bierze udział w regulacji różnorodnych procesów w komórkach roślinnych, takich jak: wzrost i rozwój, metabolizm oddechowy, reakcja na patogeny, procesy starzenia i dojrzewania oraz odpowiedź na warunki stresowe. Cząsteczka NO pełni funkcję sygnałową. Transdukcja sygnału NO odbywa się przez cGMP (cykliczny guanozynomonofosforan) i aktywację cyklicznej guanylowej [10, 30].

W ostatnich latach ukazało się szereg prac [19, 20, 71] sugerujących, iż również $O_2^{\cdot-}$, niezależnie od H_2O_2 , funkcjonuje jako cząsteczka sygnałowa w roślinnych reakcjach obronnych.

3. 2. Udział RFT w programowanej śmierci komórki

Stres oksydacyjny może być przyczyną programowanej śmierci komórki, czyli apoptozy (ang. *Programmed Cell Death* – PCD), która jest istotnym, fizjologicznym procesem występującym w czasie rozwoju rośliny i jest odpowiedzią na stres biotyczny i abiotyczny.

Apoptozę komórek wywołują zarówno reaktywne formy tlenu i azotu, jak i produkty ich reakcji, związki powstające z rozpadu tych produktów oraz czynniki indukujące lub podwyższające generowanie RFT oraz powodujące zakłócenia w procesach energetycznych, aktywację polimerazy poli-A, wzrost poziomu wapnia w cytoplazmie [6, 10, 20]. RFT mogą indukować apoptozę powodując fragmentację DNA, aktywowanie lub hamowanie aktywności kaspaz, czy też interferencję z komórkowymi szlakami przekazywania informacji zależnymi od fosforylacji reszt tyrozynowych [6]. Kluczowym etapem PCD jest wzrost przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz uwolnienie cytochromu c do cytoplazmy, gdzie ma miejsce kaskada zdarzeń promująca PCD [40, 49].

Stwierdzono, że podanie cytochromu c techniką mikroiniekcji do izolowanych komórek spowodowało wystąpienie apoptozy [90]. W zawiesinie komórkowej soi [17] i w komórkach liści tytoniu [4] zaobserwowano, że generowanie H_2O_2 w warunkach stresu oksydacyjnego, spowodowanego atakiem patogena lub elicytora, indukuje szybki wypływ Ca^{2+} z komórki prowadząc do apoptozy. Jedną z hipotez zakłada, że niespecyficzne uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej w warunkach stresu oksydacyjnego prowadzące do apoptozy jest jednym z komórkowych mechanizmów obronnych przeciwko nadmiernej produkcji RFT [6, 40].

Wielu autorów [25, 55] wykazało udział H_2O_2 w programowanej śmierci komórki. Śmierć komórki roślinnej poznano najlepiej w reakcji nadwrażliwości komórek (HR, ang. *hypersensitive response*) roślinnych podczas infekcji patogenem. Zmiany poziomu H_2O_2 nie są same w sobie bezpośrednimi egzekutorami programu śmierci, ale wywołują kaskadę transdukcji sygnału, która ostatecznie uruchamia program śmierci komórkowej. Prawdopodobnie następuje to, w wyniku wzajemnego oddziaływania H_2O_2 z innymi cząsteczkami sygnałowymi, takimi jak: etylen czy kwas salicylowy [64, 65] oraz NO [30]. Źródłem wybuchu tlenowego, który indukuje reakcję nadwrażliwości, może być zarówno kompleks oksydazy NADPH, jak i pH- zależne peroksydazy ściany komórkowej [12]. Stwierdzono spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych w reakcji nadwrażliwości komórki w trakcie ataku patogena, powodujący wzrost poziomu RFT.

W komórkach roślin tytoniu, poddanych reakcji nadwrażliwości spowodowanej przenikaniem elicytorów grzybowych, akumulacja H_2O_2 była skorelowana z obniżeniem poziomu transkryptów *CAT1* i *CAT2* oraz obniżeniem aktywności katalazy [14]. Stwierdzono, że H_2O_2 już w 5 mM stężeniu inicjował śmierć komórek w zawiesinie komórkowej *Arabidopsis thaliana*. Zainicjowany proces śmierci komórki był już nieodwracalny [25].

Tlenkowi azotu przypisuje się również udział w programowanej śmierci komórki [20] i aktywacji kaskady kinaz białkowych MAPK [64].

4. ENZYMATYCZNY SYSTEM ANTYOKSYDACYJNY

Rośliny wykształciły różne mechanizmy obronne, które umożliwiają usuwanie RFT, a tym samym zapobiegają postępującym uszkodzeniom komórki prowadzącym do jej śmierci lub je minimalizują. System antyoksydacyjny składa się zarówno z enzymów (dysmutazy ponadtlenkowe, katalaza, peroksydaza askorbinianowa oraz alternatywna oksydaza), jak i związków niskocząsteczkowych (askorbinian, cysteina, glutation, α -tokoferol). Enzymy antyoksydacyjne można podzielić na: bezpośrednio usuwające RFT i enzymy cyklu Halliwella-Asady, uczestniczące w ich unieczynianiu poprzez antyoksydanty niskocząsteczkowe.

4.1. Katalaza (CAT)

Katalaza [EC 1.11.1.6] jest tetramerem hemoproteinowym o masie cząsteczkowej 240 kDa kodowanym przez genom jądrowy. Wyizolowano trzy formy izoenzymatyczne: CAT-1, CAT-2 i CAT-3. Dwie pierwsze formy występują głównie w miejscach obfitego powstawania H_2O_2 : peroksydomach, glioksydomach i cytozolu, uniemożliwiając jego rozprzestrzenianie się. CAT-3 jest obecny w mitochondriach i cytozolu [27, 79]. Enzym ten katalizuje reakcje dysmutacji nadtlenu wodoru. Katalaza ma również właściwości peroksydazowe, może utleniać takie substancje, jak: metanol, etanol, formaldehyd, azotyny i chinony [8, 14]. Jest to enzym o bardzo wysokiej liczbie obrotów, reagujący z nadtlakiem wodoru 10 000 razy szybciej niż typowe peroksydazy roślinne. Stała szybkości katalizowanej przez nią reakcji wynosi $1,7 \times 10^7 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{s}^{-1}$, lecz wartość stałej Michaelisa K_m jest duża, rzędu $1 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ [8].

Wielu autorów [14, 34] stwierdziło, iż forma izoenzymatyczna CAT-1 związana jest z tkankami fotosyntetyzującymi, bierze udział w usuwaniu H_2O_2 powstałego podczas fotooddychania. Druga izoforma tego enzymu CAT-2 występuje w dużych ilościach w tkankach roślin naczyniowych i być może bierze udział w lignifikacji ścian komórkowych, jego właściwa rola biologiczna pozostaje dotychczas nieznana. Natomiast izoforma CAT-3 występuje w znacznych ilościach w nasionach i młodych roślinach, a jego aktywność związana jest z usuwaniem H_2O_2 powstałego podczas degradacji kwasów tłuszczowych w cyklu glioksalowym w glioksydomach.

Prawdopodobnie to produkty genu *CAT2* pełnią znaczącą rolę ochronną w warunkach stresu oksydacyjnego. Ekspozycja roślin na ozon, dwutlenek siarki czy promieniowanie UV prowadzi do szybkiego obniżenia poziomu transkrypcji genu *CAT1*, a jednocześnie zaobserwowano wzrost transkrypcji genu *CAT2* [34].

Z rzodkiewnika, tytoniu, ryżu i kukurydzy wyizolowano cDNA dla trzech klas katalazy. U *Nicotiana plumbaginifolia* *CAT1* występuje głównie w komórkach miękiszu palisadowego, a jego produkty stanowią około 80% całkowitej aktywności katalazy w liściu. Natomiast gen *CAT2* zlokalizowany jest głównie we floemie, zaś jego produkty stanowią około 20% całkowitej aktywności katalazy.

Badania transgenicznej linii tytoniu CAT1AS, z wyciszonym genem *CAT1* wykazały większą wrażliwość tych roślin niż roślin dzikich na herbicydy, ozon, stres solny [14].

4.2. Dysmutazy ponadtlenkowe (SOD)

Dysmutazy ponadtlenkowe [EC 1.15.1.1] katalizują reakcję dysmutacji anionorodników ponadtlenkowych i odgrywają ważną rolę w ochronie komórek przed toksycznym działaniem $O_2^{\cdot -}$, wytwarzanym w różnych kompartmentach komórkowych. Wykazano obecność SOD w chloroplastach, mitochondriach i peroksosomach, a więc w organellach komórkowych zaangażowanych w wytwarzanie RFT [22].

Bardzo wysoka stała szybkość katalizowanej reakcji wynosząca ok. $2 \times 10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$ świadczy o tym, że jest ona ograniczana praktycznie tylko przez dyfuzję $O_2^{\cdot -}$ [91]. Dysmutazy ponadtlenkowe są metaloproteinami i ze względu na rodzaj związanego kofaktora wyróżniamy: CuZnSOD, MnSOD i FeSOD. Wszystkie izoformy SOD są kodowane przez genom jądrowy, a ich ekspresja jest regulowana niezależnie.

Dysmutazy miedziowo-cynkowe (CuZnSOD) występują głównie w chloroplastach, cytozolu, przestrzeniach międzykomórkowej i mitochondrialnej oraz w peroksosomach [2, 9, 44, 91]. CuZnSOD można podzielić na dwie grupy: pierwszą stanowią formy cytoplazmatyczna i periplazmatyczna, występujące w postaci homodimerów, a drugą występujące w chloroplastach i na powierzchni komórek (pozakomórkowa EC-SOD) będące homotetramerami. CuZnSOD przez długi czas była uważana za enzym wyłącznie eukariotyczny, do czasu wykrycia ich w komórkach bakterii, takich jak: *Photobacterium leiognathi*, *Caulobacter crescentus* czy *Pseudomonas*. Dalsze badania sugerują, iż ta forma enzymu pierwotnie występowała u *Prokaryota*, a znacznie później pojawiła się u organizmów eukariotycznych [2].

Dysmutazy miedziowo-cynkowe występują u niemal wszystkich gatunków roślin. Komórki jednego gatunku zawierać mogą kilka izoform CuZnSOD. Enzymy pochodzące z chloroplastów wykazują większą odporność na nadtlenek wodoru i wysoką temperaturę, co jest zapewne związane z wysoką produkcją $O_2^{\cdot -}$ i H_2O_2 w tych organellach [91]. Ostatnie badania immunologiczne z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw cytozolowej CuZnSOD dowiodły występowania tego enzymu w apoplacie oraz w jądrze komórkowym. Wysunięto tezę, iż CuZnSOD apoplastyczna uczestniczy w procesie lignifikacji, natomiast jądrowa chroni przed fatalnymi w skutkach mutacjami spowodowanymi przez $O_2^{\cdot -}$ [2].

Dysmutazy miedziowo-cynkowe, o masie cząsteczkowej 32–33 kDa, składają się z dwóch podjednostek zawierających 8 fragmentów o strukturze β . Jon miedziowy bezpośrednio uczestniczy w procesie katalitycznym. Jego ligandami są cztery reszty imidazolowe histydyny. W pobliżu znajdujący się jon Zn^{2+} jest kompleksowany przez trzy reszty histydynowe i resztę asparaginową. Jedna z reszt histydyny uczestniczy równocześnie w wiązaniu jonu miedzi. Stabilna budowa cząsteczki sprawia, że szybkość działania dysmutaz miedziowo-cynkowych jest nieco wyższa niż MnSOD i FeSOD, są one również mniej wrażliwe na działanie różnych czynników fizycznych i chemicznych [8, 91]. Dysmutazy miedziowo-cynkowe cechuje wysoki stopień homologii struktury pierwszorzędowej dla różnych gatunków roślin, dla enzymów chloroplastowych podobieństwo jest rzędu 80–90%, a dla form cytozolowych około 68% [2].

Dysmutazy pozakomórkowe (ECSOD) są tetramerami zlokalizowanymi głównie w komórkach ssaków, związanymi z osoczem krwi, limfą, płynem maziowym i płynem śródmiąższowym stawów [2, 8, 53]. ECSOD wykryto również u roślin, np. w szpilkach sosny *Pinus sylvestris* [8] oraz u bakterii gram-dodatnich, np. *Nocardia asteroides* [85]. Te dysmutazy są tetramerami o masie cząsteczkowej każdej z podjednostek wynoszącej około 30 kDa, a w centrum aktywnym zawierają miedź i cynk [53].

Dysmutazy manganowe (MnSOD) występują prawie u wszystkich organizmów żywych: bakterii, glonów, grzybów, zwierząt i roślin wyższych. MnSOD u roślin wyższych występują głównie w mitochondriach i peroksysomach [23]. MnSOD są tetramerami o masie cząsteczkowej około 92 kDa lub homodimerami o masie 41 kDa, np. u bakterii brodawkowych roślin motylkowatych. Podjednostka zawiera dwie domeny: N-końcową, zawierającą pięć odcinków α -helikalnych i domenę C-końcową zawierającą trzy fragmenty o strukturze β i dwie niewielkie α -helisy. Jon manganu biorący udział w procesie katalitycznym jest wiązany przez trzy reszty histydyny i resztę kwasu asparaginowego [9, 91]. Struktury pierwszorzędowe MnSOD z różnych, niespokrewnionych ze sobą gatunków roślin, są bardzo do siebie podobne, np. enzym z grochu (*Pisum sativum*) wykazuje odpowiednio 79,8% i 71,5% homologii w porównaniu z tym z tytoniu (*Nicotiana plumbaginifolia*) oraz kukurydzy (*Zea mays*) [91].

Dysmutazy żelazowe (FeSOD) występują zarówno u organizmów eukariotycznych, jak i prokariotycznych. Roślinne dysmutazy żelazowe zlokalizowane są w chloroplastach. FeSOD można podzielić na dwie grupy. Pierwszą grupę stanowią formy homodimeryczne, zbudowane z dwóch identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej 20 kDa każda, które wykazano między innymi u: *Escherichia coli*, w chloroplastach *Ginkgo biloba* czy *Brassica campestris*. Druga grupa tych enzymów występuje u roślin wyższych, a są one tetramerami zbudowanymi z czterech równych podjednostek o masie cząsteczkowej 80–90 kDa [2]. W miejscu aktywnym znajduje się jon żelaza, a jego ligandami są trzy reszty histydyny i reszta kwasu asparaginowego. FeSOD pochodzenia roślinnego cechuje duże, dochodzące do 76%, podobieństwo sekwencyjne [91].

4.3. Peroksydazy (POX)

Peroksydazy powszechnie występują w świecie roślin, katalizują reakcje rozkładu H_2O_2 , utleniając jednocześnie różne substraty organiczne lub nieorganiczne. Są hemoproteinami o różnej lokalizacji i specyficzności wobec substratu, który wykorzystują jako donor elektronów [84]. Można je podzielić na dwie grupy. Pierwszą stanowią peroksydazy o znaczeniu fizjologicznym, zaliczane do kluczowych enzymów kontrolujących różnicowanie się i rozwój komórek roślinnych. Biorą one udział w takich procesach, jak: opadanie liści i owoców, starzenie się, tolerancja na zimno, stan odretwienia, dojrzewanie owoców, kiełkowanie, wczesny rozwój, reakcje przeciw patogenom, a także lignifikacja i metabolizm auksyn.

Drugą grupę stanowią enzymy uczestniczące w unieczynnianiu RFT, takie jak: peroksydaza glutationowa, gwajakolowa czy askorbinianowa [51, 70].

Peroksydaza glutationowa [EC 1.11.1.9] (GPOX) powszechnie występuje u zwierząt, obecna jest także u roślin. Wyróżnia się wiele izoenzymów, które katalizują redukcję H_2O_2 i hydroksynadtlenków lipidów przez zredukowany glutation [16].

TABELA 1. Enzymy pełniące funkcję antyoksydacyjną w komórkach roślinnych (AH₂* – zredukowany askorbinian; QH₂** – zredukowany ubichinon)

Nazwa enzymu	Funkcja
Dysmutazy ponadtlenkowe	Katalizowanie reakcji dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Katalazy	Katalizowanie reakcji dysmutacji nadtlenu wodoru $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$
Peroksydazy np. peroksydaza askorbinianowa	Katalizowanie reakcji usuwania nadtlenu wodoru i nadtlenków organicznych (ROOH) oraz utleniania związków np. AH ₂ * w cyklu Halliwella-Asady $AH_2^* + H_2O_2 (ROOH) \rightarrow 2H_2O (ROH + H_2O) + A$
Alternatywna oksydaza	Katalizowanie reakcji redukcji tlenu do wody w łańcuchu oddechowym przy ograniczeniu drogi cytochromowej w warunkach stresowych, zachowując stężenie O ₂ na niskim poziomie. Pełni funkcje obronną w warunkach stresowych ograniczając generowanie RFT. $QH_2^{**} + e^- + 1/2O_2 \rightarrow H_2O + Q$

Peroksydaza gwajakolowa [EC 1.11.1.7] jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 50 kDa, zlokalizowaną w cytozolu, wakuoli, ścianie komórkowej i przestrzeni międzykomórkowej. Bierze ona udział zarówno w procesach lignifikacji, biosyntezy etylenu, obrony przed patogenami, jak i wykazuje właściwości antyoksydacyjne [9, 84].

Peroksydaza askorbinianowa [EC 1.11.1.11] (**APOX**) występuje w chloroplastach, cytozolu, wakuoli i apoplasmie. APOX jest hemoproteiną, zawierającą 4 cysteiny, które są odpowiedzialne za jego wrażliwość na związki inaktywujące grupy tiolowe. Stwierdzono wzrost aktywności tego enzymu w warunkach stresu oksydacyjnego spowodowanego takimi czynnikami, jak: intensywne światło, niska i wysoka temperatura, ozon, parakwat czy susza [79]. APOX stanowi element cyklu askorbinianowo-glutationowego, nazywanego cyklem Halliwella-Asady, którego funkcją jest usunięcie H₂O₂ z kompartmentów komórkowych. Enzymy tego szlaku zlokalizowano głównie w chloroplastach, ale także w cytozolu [62] oraz mitochondriach i peroksysomach [36]. W liściach grochu potwierdzono występowanie APOX o masie cząsteczkowej 35 kDa w błonie peroksysomalnej, po stronie cytozolowej [22, 36].

Nie tylko enzymy uczestniczą w obronie antyoksydacyjnej przed szkodliwym działaniem RFT. Bardzo efektywnymi zmiataczami RFT są również antyoksydanty niskocząsteczkowe, występujące w stosunkowo dużych stężeniach w komórkach roślinnych, takie jak: askorbinian, glutation, cysteina i α-tokoferol.

4.4. Alternatywna oksydaza (AOX)

Mitochondria wszystkich roślin, niektórych grzybów, glonów i nielicznych pierwotniaków zawierają niewrażliwą na cyjanek, alternatywną oksydazę, która przy ograniczeniu drogi cytochromowej katalizuje reakcję redukcji tlenu do wody w łańcuchu oddechowym [56, 59, 60, 76, 81]. Droga alternatywna jest drogą nefosforylującą, elektrony omijają kompleksy III i IV, stąd jest ona niewrażliwa na inhibitory drogi cytochromowej

– antymycynę i cyjanek [75]. Przepływ elektronów przez alternatywną oksydazę nie prowadzi do przemieszczania protonów w poprzek błony wewnętrznej mitochondriów, przez co cała uwalniana energia podczas transportu elektronów z ubichinolu na tlen jest rozpraszana w postaci ciepła [38, 74, 76].

Alternatywna oksydaza jest homodimerem, o masie cząsteczkowej 32–36 kDa. Ostatnio poznanie sekwencji genów *AOX* pozwoliło stwierdzić, iż alternatywna oksydaza nie jest białkiem transbłonowym, lecz białkiem peryferycznie zasocjowanym od strony matriks z wewnętrzną błoną mitochondrialną i połączonym z nią oddziaływaniami białko-białko [1, 3]. Występuje w dwóch formach: utlenionej (nieaktywnej) i zredukowanej (aktywnej). W formie utlenionej dwa łańcuchy polipeptydowe są połączone mostkiem disulfidowym, natomiast w formie zredukowanej grupy sulfhydrylowe nie tworzą wiązania, zatem dimer jest utrzymywany przez oddziaływania konwalencyjne [59].

AOX u roślin wyższych jest kodowane przez genom jądrowy. Wyizolowano geny *AOX1*, *AOX2a* oraz *AOX2b* (nazywany *AOX3*) wśród roślin nietermogennych, jednoliściennych i dwuliściennych. Gen *AOX1* występuje zarówno u roślin jedno-, jak i dwuliściennych, zaś gen *AOX2* jest głównie obecny u roślin dwuliściennych. Przyjęto, iż ekspresja genu *AOX1* jest wynikiem adaptacji roślin na różne czynniki stresowe, natomiast ekspresja genu *AOX2* zależy od tkanki i stadium rozwojowego rośliny i jest wymagana dla prawidłowego funkcjonowania metabolizmu oddechowego [38]. Ostatnio wyznaczono sekwencje cDNA dla białka *AOX* kilku roślin wyższych i grzybów [26, 27, 83]. Analiza sekwencyjna roślinnych białek alternatywnej oksydazy wykazuje dużą konserwatywność na poziomie helis, począwszy od pierwszej hydrofobowej helisy przy N-końcu aż do znacznej części domeny hydrofilowej przy C-końcu [81].

Wielu autorów [27, 38, 61, 81] zaobserwowało zwiększony udział drogi alternatywnej w oddychaniu mitochondrialnym w warunkach niskiej temperatury, zranienia, ataku patogena, dojrzewania roślin, stresu osmotycznego czy zwiększenia poziomu kwasu salicylowego. Podanie antymycyny A, inhibitora drogi cytochromowej, do zawiesiny komórek tytoniu indukowało transkrypcję genu *AOX1* w ciągu 60 minut, indukcję syntezy białka *AOX* w ciągu 3–5 godzin, a po upływie 5 godzin obserwowano wyraźny wzrost aktywności alternatywnej oksydazy. To samo obserwowano po dodaniu cytrynianu lub nadtlenu wodoru [50]. Transkrypcja genu *AOX* w komórkach roślinnych indukowana jest przez różne czynniki, takie jak: niska temperatura [35], nadtlenek wodoru, cytrynian czy cysteina [82]. U *Magnaporthe grisea* [88] i *Arabidopsis thaliana* [69] stwierdzono wzrost ilości transkryptu mRNA *AOX* na skutek zahamowania drogi cytochromowej poprzez inhibicję kompleksu III.

Stwierdzono, że droga cytochromowa może być hamowana przez NO, którego poziom w mitochondriach gwałtownie wzrasta w warunkach stresowych [54]. W mitochondriach wątroby świń, u których nie występuje alternatywna oksydaza, zaobserwowano wzrost poziomu H_2O_2 pod wpływem NO, natomiast w mitochondriach hipokotyli fasoli nie stwierdzono stymulacji generowania H_2O_2 przez NO. Te wyniki podtrzymują hipotezę, że droga alternatywna obniża wytwarzanie nadtlenu wodoru w sytuacji, gdy droga cytochromowa jest hamowana przez NO [87]. Purvis i Shewfelt [67] jako pierwsi zasugerowali udział *AOX* w regulacji poziomu RFT w mitochondriach oraz w ich usuwaniu.

Wykazano ponadto, że również białko rozprzegające (UCP), które powoduje rozproszenie siły protonomotorycznej wytworzonej w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej, powoduje obniżenie poziomu RFT w tych organellach. Białko rozprzegające i AOX można uważać za endogenne mitochondrialne systemy antyoksydacyjne, chroniący przed oksydacyjnymi uszkodzeniami, ale działający kosztem wydajności fosforylacji oksydacyjnej [58, 78].

LITERATURA

- [1] AFFOURTIT C, MOORE AL. Purification of the plant alternative oxidase from *Arum maculatum* measurement, stability and metal requirement. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1608**: 181–189.
- [2] ALSCHER RG, ERTURK N, HEATH LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 2002; **53**: 1331–1341.
- [3] ANDERSON ME, NORDLUND P. A revised model of the active site of alternative oxidase. *FEBS Lett* 1999; **449**: 17–22.
- [4] BAKER CJ, ORLANDI EW, MOCK NM. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiol* 1993; **102**: 1341–1344.
- [5] BARROSO JB, CORPAS JF, CARRERAS A, SANDALIO LM, VALDERRAMA R, PALMA JM, LUPIANEZ JA, DEL RIO LA. Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *J Biol Chem* 1999; **274**: 36729–36733.
- [6] BARTOSZ G. Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie. *Post Biochem* 1998; **44**: 22–29.
- [7] BARTOSZ G. Oxidative stress in plants. *Acta Physiol Plant* 1997; **19**: 47–64.
- [8] BARTOSZ G. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydaw. Nauk. PWN, Warszawa 2003.
- [9] BECANA M, DALTON DA, MORAN JF, ITURBE-ORMAETXE I, MATAMOROS MA, RUBIO MC. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. *Physiol Plant* 2000; **109**: 372–381.
- [10] BLAISE GA, GAUVIN D, GANGAL M, AUTHIER S. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* 2005; **208**: 177–192.
- [11] BLOKHINA O, VIROLAINEN E, FAGERSTEDT KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 2003; **91**: 179–194.
- [12] BOLWELL GP, WOJTASZEK P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiol Mol Plant Pathol* 1997; **51**: 347–366.
- [13] BRAIDOT E, PETRUSSA E, VIANELLO A, MACRI F. Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. *FEBS Lett* 1999; **451**: 347–350.
- [14] BREUSEGEM FV, VRANOVA E, DAT JF, INZE D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci* 2001; **161**: 405–414.
- [15] BRIAT JF, LEBRUN M. Plant responses to metal toxicity. *Live Sci* 1999; **322**: 43–54.
- [16] BRIGELIUS-FLOHE R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Rad Biol Med* 1999; **27**: 951–965.
- [17] CHANDRA S, LOW PS. Role of phosphorylation in elicitation of the oxidative burst in cultured soybean cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4120–4123.
- [18] CLIJSTERS H, CUYPERS A, VANGRONSVELD J. Physiological responses to heavy metals in higher plants defence against oxidative stress. *Zeitschrift für Naturforschung* 1999; **54c**: 730–734.
- [19] CORPAS FJ, BARROSO JB, DEL RIO LA. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 145–150.
- [20] DELLEDONNE M, MURGIA I, EDERLE D, SBICEGO PF, BIONDANI A, POLVERARI A, LAMB CH. Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease-resistance response. *Plant Physiol Biochem* 2002; **40**: 605–610.
- [21] DEL RIO LA, PASTORI GM, SANDALIO LM, SEVILLA F, CORPAS FJ, JIMENEZ A, LOPEZ-HUERTAS E, HERNANDEZ JA. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol* 1998; **116**: 1195–1200.

- [22] DEL RIO LA, CORPAS FJ, SANDALIO LM, PALMA JM, GOMEZ M, BARROSO JB. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* 2002; **372**: 1255–1272.
- [23] DEL RIO LA, SANDALIO LM, ALTOMARE DA, ZILINSKAS BA. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *J Exp Bot* 2003; **54**: 923–933.
- [24] DESIKAN R, BURNETT EC, HANCOCK JT, NEILL SJ. Harpin and hydrogen peroxide induce the expression of a homologue of gp91-phox in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J Exp Bot* 1998; **49**: 1767–1771.
- [25] DESIKAN R, REYNOLDS A, HANCOCK JT, NEILL SJ. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem J* 1998; **330**: 115–120.
- [26] DINANT M, BAURAIN D, COOSEMANS N, JORIS B, MATAGNE RF. Characterization of two genes encoding the mitochondrial alternative oxidase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet* 2001; **39**: 101–108.
- [27] DUTILLEUL C, GARMIER M, NOCTOR G, MATHIEU C, CHETRIT P, FOYER CH, DE PAEPE R. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell Preview* 2003; **15**: 1212–1226.
- [28] FANG J, BEATTIE DS. Alternative oxidase present in procyclic *Trypanosoma brucei* may act to lower the mitochondrial production of superoxide. *Arch Biochem Biophys* 2003; **414**: 294–302.
- [29] FOYER CH, LOPEZ-DELGADO H, DAT JF, SCOTT IM. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* 1997; **100**: 241–254.
- [30] GNIAZDOWSKA A. Rola tlenku azotu w metabolizmie komórki roślinnej. *Kosmos* 2004; **53**: 343–353.
- [31] GUAN LM, SCANDALIOS JG. Hydrogen peroxide-mediated catalase gene expression in response to wounding. *Free Rad Biol Med* 2000; **28**: 1182–1190.
- [32] HAN D, WILLIAMS E, CADENAS E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 2001; **353**: 411–416.
- [33] HIPPELI S, HEISER I, ELSTNER EF. Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants. *Plant Physiol Biochem* 1999; **37**: 167–178.
- [34] INZE D, MONTAGU MV. Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotech* 1995; **6**: 153–158.
- [35] ITO Y, SAISHO D, NAKAZONO M, TSUTSUMI N, HIRAI A. Transcript level of tandem-arranged oxidase genes in rice are increased by low temperature. *Gene* 1997; **203**: 121–129.
- [36] JIMENEZ A, HERNANDEZ JA, DEL RIO LA, SEVILLA F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol* 1997; **114**: 275–284.
- [37] JURGOWIAK M, OLIŃSKI R. Uszkodzenia jądrowego i mitochondrialnego DNA w procesach starzenia. *Kosmos* 1999; **243**: 235–244.
- [38] JUSZCZUK IM, RYCHTER AM. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochim Pol* 2003; **50**: 1257–1271.
- [39] KARPIŃSKI S, REYNOLDS H, KARPIŃSKA B, WINGSLE G, CREISSEN G, MULLINEAUX P. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 1999; **284**: 654–657.
- [40] KOWALTOWSKI AJ, VERCESI AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1999; **26**: 463–471.
- [41] KOWALTOWSKI AJ. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. *Braz J Med Biol Res* 2000; **33**: 241–250.
- [42] KOVTUN Y, CHIU WL, TENA G, SHEEN J. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 2940–2945.
- [43] LACZA Z, SNIPES JA, ZHANG J, HORVATH EM, FIGUEROA JP, SZABO C, BUSIJA DW. Mitochondrial nitric oxide synthase in not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Rad Biol Med* 2003; **35**: 1217–1228.
- [44] LANDIS GN, TOWER J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev* 2005; **126**: 365–379.
- [45] LANGEBARTELS CH, WOHLGEMUTH H, KSCHIESCHAN S, GRÜN S, SANDERMANN H. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiol Biochem* 2002; **40**: 567–575.
- [46] LENZA G, BOVINA C, FORMIGGINI G, CASTELLI GP. Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences. *Acta Biochim Pol* 1999; **46**: 1–21.
- [47] LINO-NETO T, PIQUES MC, BARBETA C, SOUSA MF, TAVARES RM, PAIS MS. Identification of *Zantedeschia aethiopica* Cat1 and Cat2 catalase genes and their expression analysis during spathe senescence and regreening. *Plant Sci* 2004; **167**: 889–898.

- [48] LOPEZ-HUERTAS E, SANDALIO LM, GOMEZ M, DEL RIO LA. Superoxide radical generation in peroxisomal membranes: evidence for the participation of the 18 kDa integral membrane polypeptide. *Free Radic Res* 1997; **26**: 497–506.
- [49] LYAMZAEV KG, IZYUMOV DS, AVETISYAN AV, YANG F, PLETJUSHKINA OY, CHERNYAK BV. Inhibition of mitochondrial bioenergetics: the effects on structure of mitochondria in the cell and on apoptosis. *Acta Biochim Pol* 2004; **51**: 553–562.
- [50] MCINTOSH L, EICHLER T, GRAY G, MAXWELL D, NICKELS R, WANG Y. Biochemical and genetic controls exerted by plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1365**: 278–284.
- [51] MEHLHORN H, LELANDAIS M, KORTH HG, FOYER CH. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Lett* 1996; **378**, 203–206.
- [52] MELONI DA, OLIVA MA, MARTINEZ CA, CAMBRAIA J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environ Exp Bot* 2003; **49**: 69–76.
- [53] MICHALSKI WP. Chromatographic and electrophoretic methods for analysis of superoxide dismutases. *J Chrom B* 1996; **684**: 59–75.
- [54] MILLAR AH, DAY DA. Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett* 1996; **398**: 155–158.
- [55] MITTLER R, HERR EH, ORVAR BL, VAN CAMP W, WILLEKENS H, INZE D, ELLIS BE. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1999; **96**: 14165–14170.
- [56] MIYAKE C, SCHREIBER U, HORMANN H, SANO S, ASAKA K. The FAD-enzyme monodehydroascorbate radical reductase mediates the photoproduction of superoxide radicals in spinach thylakoid membranes. *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 821–829.
- [57] MOHAMMADI M, KARR AL. Membrane lipid peroxidation, nitrogen fixation and leghemoglobin content in soybean root nodules. *J Plant Physiol* 2001; **158**: 9–19.
- [58] MÖLLER IA. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001; **52**: 561–591.
- [59] MOORE AL, SIEDOW JN. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1059**: 121–140.
- [60] MOORE AL, UMBACH AL, SIEDOW JN. Structure - function relationships of the alternative oxidases of plant mitochondria: a model of the active site. *J Bioenerg Biomembr* 1995; **27**: 367–377.
- [61] MOORE AL, ALBURY MS, CRICTON PG, AFFOURTIT C. Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 478–481.
- [62] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 1981; **22**: 867–880.
- [63] NAVARRE DA, WINDEHENNE D, DURNER J, NOAD R, KLESSIG DF. Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiol* 2000; **122**: 573–582.
- [64] NEILL SJ, DESIKAN R, CLARKE A, HURST RD, HANCOCK JT. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Expl Bot* 2002; **53**: 1237–1247.
- [65] OVERMYER K, BROSCHE M, KANGASJÄRVI J. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 335–342.
- [66] POLLE A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer stimulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol* 2001; **126**: 445–462.
- [67] PURVIS AC, SHEWFELT RL. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plants tissues? *Physiol Plant* 1993; **88**: 712–718.
- [68] ROMERO-PUERTAS MC, PALMA JM, GOMEZ M, DEL RIO LA, SANDALIO LM. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ* 2002; **25**: 677–686.
- [69] SAISHO D, NAMBARA E, NAITO S, TSUTSUMI N, HIRAI A, NAKAZONO M. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 1997; **35**: 585–596.
- [70] SAKHAROV IY, VESGA BMK, GALAEV IY, SAKHAROVA IV, PLETJUSHKINA OY. Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties. *Plant Sci* 2001; **161**: 853–860.
- [71] SCANDALIOS JG. The rise of ROS. *Trends Biochem Sci* 2002; **27**: 483–486.
- [72] SCHÜTZENDÜBEL A, POLLE A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Experimen Botany* 2002; **53**: 1351–1365.
- [73] SHAH K, KUMAR G, VERMA S, DUBEY RS. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci* 2001; **161**: 1135–1144.

- [74] SIEDOW JN, MOORE AL. A kinetic model for the regulation of electron transfer through the cyanide-resistant pathway in plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1142**: 165–174.
- [75] SIEDOW JN, UMBACH AL, MOORE AL. The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a coupled binuclear iron center. *FEBS Lett* 1995; **362**: 10–14.
- [76] SIEDOW JN, UMBACH AL. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1459**: 432–439.
- [77] SLOOTEN L, MONTAGU MV, INZE D. Manipulation of oxidative stress tolerance in transgenic plants. Transgenic plant research, Harwood Academic Publishers, 1998; 241–257.
- [78] SLUSE FE, JARMUSZKIEWICZ W. Uncoupling proteins outside the animal and plant kingdoms: functional and evolutionary aspects. *FEBS Lett* 2002; **510**: 117–120.
- [79] STROIŃSKI A. Some physiological and biochemical aspects of plant resistance to cadmium effect. I. Antioxidative system. *Acta Physiol Plant* 1999; **21**: 175–188.
- [80] TIAN M, GU Q, ZHU M. The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. *Plant Sci* 2003; **165**: 701–707.
- [81] WAGNER AM, MOORE AL. Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism. *Biosci Rep* 1997; **17**: 319–333.
- [82] VANLERBERGHE GC, MCINTOSH L. Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria. *Plant Physiol* 1996; **111**: 589–595.
- [83] VANLERBERGHE GC, MCINTOSH L. Alternative oxidase: from gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 1997; **48**: 703–734.
- [84] VERMA S, DUBEY RS. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 2003; **164**: 645–655.
- [85] YAMAHARA T, SHIONO T, SUZUKI T, TANAKA K, TAKIO S, SATO K, YAMAZAKI S, SATOH T. Isolation of a germin-like protein with manganese superoxide dismutase activity from cells of a moss, *Barbula unguiculata*. *J Biol Chem* 1999; **274**: 33274–33278.
- [86] YAMASAKI H. Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition *in vivo*. *The Royal Soc*, 2000; **355**: 1477–1488.
- [87] YAMASAKI H, SHIMOJI H, OHSHIRO Y, SAKIHAMA Y. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric oxide: Biology and Chemistry* 2001; **5**: 261–270.
- [88] YUKIOKA H, INAGAKI S, TANAKA R, KATOH K, MIKI N, MIZUTANI A, MASUKO M. Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1442**: 161–169.
- [89] ZACCHINI M, REA E, TULLIO M, DE AGAZIO M. Increased antioxidative capacity in maize calli during and after oxidative stress induced by a long lead treatment. *Plant Physiol Biochem* 2003; **41**: 49–54.
- [90] ZHIVOTOVSKI B, ORRENIUM S, BRUSTUGUM O, DOSKELAND SO. Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature* 1998; **391**: 449–450.
- [91] ŻUCHOWSKI J. Roślinne dysmutazy ponadtlenkowe. *Kosmos* 1999; **242**: 82–93.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 22.12.2004 r.

Przyjęto: 10.03.2005 r.

Adres autora: ul. Fredry 10, 61-701 Poznań.

arlkas@amu.edu.pl