

ORIGINAL ARTICLE

**Characterization of Maize Superoxide Dismutase Gene Family:
Identification of Two Novel Transcripts of Chloroplast SODs and Analysis
of Potential DNA-protective Function of Mitochondrial MnSOD**

A.I. Katyshev, V.V. Chernikova, I.Y. Subota, V.I. Tarasenko,

E.S. Klimenko, V.N. Shmakov, P.A. Grebnev, Y.M. Konstantinov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of RAS, Irkutsk, Russia

*E-Mail: alex@sifibr.irk.ru

Received August 29, 2013

The families of genes encoding such key antioxidant enzymes as superoxide dismutases usually have complex structure. They consist of genes encoding enzymes which differ by their metal cofactor, origin and subcellular localization. The maize SOD family consisting of multiple genes is one of the most interesting among the characterized plant SOD gene families. We re-investigated the structure of maize SOD gene family using different approaches. We revealed two novel gene transcripts encoding chloroplast Fe- and Cu/Zn-SOD. This finding indicates that the reactive oxygen species (ROS) detoxication system in maize chloroplasts has more complicated organization than it was considered earlier. At the same time it appeared that the number of maize genes encoding mitochondrial Mn-SODs is less than it was supposed. Using the recombinant proteins we showed that the functioning of MnSOD enzymes is posttranslationally regulated by phosphorylation/dephosphorylation. Possible involvement of Mn-SOD in the protection of mitochondrial DNA from oxidative damage is investigated.

Key words: reactive oxygen species, superoxide dismutase, chloroplasts, mitochondria

ORIGINAL ARTICLE

**Характеристика Семейства Генов Супероксиддисмутазы Кукурузы
(*Zea mays* L.): Выявление Транскриптов Двух Хлоропластных СОД и
Изучение Потенциальной ДНК-Защитной Функции
Митохондриальной Mn-СОД.**

А.И. Катышев, В.В. Черникова, И.Ю. Субота, В.И. Тарасенко,

Е.С. Клименко, В.Н. Шмаков, П.А. Гребнев,

Ю.М. Константинов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия

*E-Mail: alex@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 29 августа 2013 г.

Семейства генов, кодирующих ключевые ферменты антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (СОД) – обычно сложно организованы и представлены генами, кодирующими ферменты, различающиеся по используемому в качестве кофактора иону металла, происхождению и внутриклеточной локализации. Среди наиболее охарактеризованных семейств генов СОД растений значительный интерес вызывают представленное большим количеством генов семейство СОД культурного злака – кукурузы (*Zea mays* L.). Нами с использованием разных подходов произведено уточнение состава семейства генов СОД кукурузы. Обнаружены транскрипты двух ранее не описанных в литературе генов, кодирующих хлоропластные Fe- и Cu/Zn-содержащие СОД, что демонстрирует, что система детоксикации активных форм кислорода (АФК) в хлоропластах кукурузы более сложно организована, чем считалось ранее. В то же время оказалось, что количество генов митохондриальных Mn-СОД кукурузы меньше, чем предполагалось. С помощью полученных нами рекомбинантных белков показано, что для данных ферментов характерна посттрансляционная (фосфорилирование/дефосфорилирование) регуляция их функции. Исследуется возможное участие Mn-СОД митохондрий в защите ДНК этих органелл от повреждающего действия АФК.

Key words: активные формы кислорода, супероксиддисмутаза, хлоропласты, митохондрии

Высокий уровень компартментализации растительных клеток и, как следствие, пространственное разобщение метаболических процессов, побочными продуктами которых являются цитотоксичные активные формы кислорода (АФК), предполагают необходимость функционирования сложной системы детоксикации АФК в растительных клетках. Так,

семейства генов, кодирующих ключевые ферменты антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы – обычно сложно организованы и представлены генами, кодирующими ферменты разного типа, различающиеся по используемому в качестве кофактора иону металла, эволюционному происхождению и внутриклеточной локализации (Alscher, 2002; Mittler 2004). Выделяют три основных типа ферментов СОД растений - митохондриальные Mn-СОД, гены которых были перенесены в ядро из генома предшественников митохондрий; хлоропластные Fe-СОД, гены которых были перенесены в ядро из генома предшественников хлоропластов; и кодируемые генами ядерного происхождения цитозольные и хлоропластные Cu/Zn-СОД. Все три вышеперечисленные типа ферментов представлены также и у прокариот и строго функционально дифференцированы в бактериальной клетке (Hopkin et al., 1992).

Одним из наиболее полно охарактеризованных семейств генов СОД растений является семейство генов СОД кукурузы (Fink, Scandalios, 2002). Несмотря на высокую степень его охарактеризованности, остаются вопросы о слабой представленности СОД в хлоропластах клеток кукурузы, в отличие от других видов растений (Kliebenstein et al. 1998, Mittler et al., 2004). В частности, интерес вызывает тот факт, что в геноме кукурузы не были выявлены гены Fe-СОД. Ранее рядом исследователей высказывалось предположение о том, что эволюционно более древние гены Fe-СОД у большинства видов растений могли быть функционально замещены генами Cu/Zn-СОД [Van Camp et al., 1997]. Эта гипотеза была основана на том, что изначально именно гены,

кодирующие Cu/Zn-СОД хлоропластной локализации, были обнаружены у многих растений, в то время как гены хлоропластных Fe-СОД у ряда активно изучаемых видов долгое время не удавалось идентифицировать. В связи с этим, одной из задач настоящей работы было подтвердить/опровергнуть на примере кукурузы вышеупомянутое предположение.

Предполагается, что различные ферменты СОД кукурузы не только выполняют разные функции в различных компартментах клетки, но и внутри отдельных органелл, в частности, в митохондриях, продукты четырех генов Mn-содержащей СОД ассоциированы специфично с различными сайтами производства активных форм кислорода (АФК). Как показано для прокариот, ассоциированная с ДНК Mn-СОД участвует в защите ДНК от окислительных повреждений (Hopkin et al., 1992). С учетом высокой эволюционной консервативности структуры Mn-СОД интерес представляет исследование возможности сохранения ДНК-защитной функции этих ферментов и в митохондриях эукариот. В связи с этим следующей задачей нашей работы было получение рекомбинантных белков митохондриальных Mn-СОД кукурузы с последующим исследованием их возможной ДНК-связывающей активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использованы 3-5-суточные этиолированные проростки кукурузы (гибрид ВРР 42МВ).

Выделение РНК из проростков кукурузы, ПЦР с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР), ПЦР, клонирование фрагментов кДНК в составе плазмиды pBlueScript KS, секвенирование и

эксперименты по ДНК-связыванию осуществляли как описано ранее (Тарасенко и др. 2008).

Праймеры для ПЦР и ОТ-ПЦР генов СОД подбирали с помощью пакета программ VectorNT15 (Bethesda, США) после выявления высококонсервативных участков в результате анализа выравнивания нуклеотидных последовательностей генов СОД растений, представленных в электронной базе данных GenBank. Для поиска гомологичных нуклеотидных последовательностей в электронной базе данных GenBank использовали программу BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>; McGinnis, Madden, 2004).

Для получения рекомбинантных белков последовательности кДНК генов СОД клонировали по сайтам *NcoI* и *BglII* в составе плазмиды pQE60 (QIAGEN, США). Рекомбинантные белки выделяли на колонках с Ni-NTA-агарозой (QIAGEN, США) согласно инструкции производителя. Электрофорез белков в ПААГ и определение активности СОД в геле осуществляли, как описано в (Гарник и др., 2004).

Исследование возможности фосфорилирования рекомбинантных белков *in vitro* осуществляли, как описано ранее в (Субота и др., 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хлоропласты и митохондрии являются основными источниками вырабатываемых в качестве побочных продуктов реакций токсичных АФК в клетках растений (Greene, 2002). Как следствие, в клетках растений в процессе эволюции были выработаны различные

механизмы ферментативной и неферментативной системы детоксикации АФК. Ключевыми ферментами антиоксидантной системы защиты клеток растений являются СОД, представленные множественными молекулярными формами в различных компартментах клетки. Так, в хлоропластах функцию удаления супероксидного радикала обычно выполняют продукты, как считается, эволюционно наиболее древних генов Fe-содержащих СОД и возникших позже в процессе эволюции генов Cu/Zn-содержащих СОД. Неудачные попытки выявить на ферментативном уровне Fe-СОД в клетках нескольких видов растений из различных таксономических групп позволили ряду авторов высказать предположение, что Fe-СОД в хлоропластах растений могла быть в процессе эволюции замещена Cu/Zn-СОД. В то же время, вследствие возможности существования специфических особенностей регуляции экспрессии генов Fe-СОД у исследованных растений, отсутствие ферментативной активности продуктов этих генов не может служить однозначным доказательством эволюционной утраты или замолкания этих генов.

Для проверки правомочности этого предположения нами были предприняты попытки проверить наличие экспрессии Fe-СОД в этиолированных проростках кукурузы на транскрипционном уровне. Для решения этой задачи были подобраны праймеры, соответствующие наиболее высококонсервативным участкам последовательностей генов Fe-СОД (табл.1). Использование этих праймеров в ОТ-ПЦР с мРНК проростков кукурузы позволило получить ДНК-продукт ожидаемого размера, который был очищен,

клонирован и секвенирован. Выравнивание полученной последовательности кДНК кукурузы с высокомолекулярными последовательностями в электронных базах данных показало, что данный фрагмент имеет высокий уровень гомологии с последовательностями кДНК гена Fe-СОД риса и других видов растений (GenBank accession numbers: XM_550626, XM_493744, AK071301, AK062073, AB014056). Эти данные позволили нам сделать заключение, что секвенированная нами последовательность является частью кДНК ранее не охарактеризованного гена Fe-СОД кукурузы, и поместить ее с соответствующей аннотацией в электронные базы данных EMBL/GenBank (асс. № AJ854254). Более того, нами было продемонстрировано наличие соответствующей продукции гена Fe-СОД ферментативной активности с помощью ингибиторного анализа активности в геле (данные не приводятся).

Обнаружение продукта экспрессии гена Fe-СОД в кукурузе, наряду с проведенным нами анализом электронных баз данных EST (expressed sequence tags), который показал наличие транскриптов Fe-СОД и у других видов растений, у которых до сих пор не удавалось выявить активность Fe-СОД на ферментативном уровне (данные не приводятся), позволяет нам поставить под сомнение выдвигавшееся ранее в литературе предположение о возможном функциональном замещении генов Fe-СОД генами Cu/Zn-СОД (Van Camp et al., 1997). Вероятно, ферменты Fe-СОД выполняют особую функцию в клетках растений, и экспрессия кодирующих их генов имеет ткане-, орган-, стадийспецифичный характер или же активируется в ответ лишь на определенные стимулы, природа которых до сих пор

однозначно не установлена.

Использование аналогичного подхода для получения с помощью ОТ-ПЦР кДНК генов Cu/Zn-СОД позволило выявить два экспрессируемых на высоком уровне в этиолированных проростках кукурузы транскрипта. Одна из секвенированных нами кДНК соответствовала мРНК описанного в работе (Kernodle, Scandalios, 2001) гена Sod1 кукурузы, а вторая – ранее не описанному в литературе гену Cu/Zn-СОД. Сравнительный анализ последовательностей кДНК данного гена с последовательностями высокомолекулярных генов СОД других видов растений показал, что обнаруженный нами ген (GenBank асс. № AJ972407) близок по структуре нуклеотидной и кодируемой аминокислотной последовательностей белка генам хлоропластных Cu/Zn-СОД растений. Таким образом, выявление нами экспрессии в проростках кукурузы двух ранее не охарактеризованных генов свидетельствует о том, что антиоксидантная система защиты этого вида растений в хлоропластах организована значительно сложнее и требует более глубокого исследования.

Наибольший интерес среди всех представителей генов семейства СОД вызывают Mn-СОД, продукты которых у растений локализованы обычно в митохондриях, причем в отличие от других клеточных компартментов, где могут сосуществовать ферменты различного типа (Fe- и Cu/Zn-СОД), в митохондриях растений ферменты другого типа не обнаружены. Высокая эволюционная консервативность генов Mn-СОД наряду с тем фактом, что функция кодируемых этими генами белков в митохондриях растений не может быть замещена ферментами другого типа, предполагает выполнение ими уникальной

роли в митохондриях растений, определяемой их биохимическими особенностями. С целью исследования таких возможных функциональных особенностей Mn-СОД, а также с целью выявления индивидуальных особенностей различных ферментов Mn-СОД кукурузы нами были предприняты попытки по получению рекомбинантных белков SOD3.1, SOD3.2, SOD3.3 и SOD3.4, последовательности которых представлены в работе (Zhu, Scandalios, 1995).

Для получения кДНК интересующих нас генов Mn-СОД использовали специфические праймеры, подобранные на основе представленных в работе (Zhu, Scandalios, 1995) последовательностей. Успешной амплификации с использованием в качестве матрицы первой цепи кДНК кукурузы удалось добиться только при использовании специфичных к последовательности *sod3.1* праймеров. Невозможность получения кДНК других генов Mn-СОД кукурузы могла объясняться особенностями последовательностей этих генов в геноме использованного в нашей работе гибрида ВИР 42МВ. В связи с этим нами был проведен детальный анализ всех представленных в электронных базах данных последовательностей кДНК EST генов Mn-СОД кукурузы, который позволил выявить только две консенсусные последовательности транскриптов Mn-СОД, которые имели наиболее высокую гомологию с транскриптами генов *sod3.1* и *sod3.4* из работы (Zhu, Scandalios, 1995). Выявленные консенсусные последовательности оказались высококонсервативными у кукурузы различных линий и сортов, но существенно отличались от представленных в работе (Zhu, Scandalios, 1995) последовательностей. С

использованием подобранных к двум консенсусным последовательностям Mn-СОД кукурузы специфичных праймеров нам удалось получить кДНК, соответствующие двум разным генам Mn-СОД кукурузы, определение последовательности которых показало практически полное соответствие их выявленным консенсусным последовательностям. Гены, соответствующие полученным кДНК, были обозначены нами как MSD3.1 и MSD3.4 в соответствии с классификацией, предложенной в работе (Zhu, Scandalios, 1995). Отсутствие в электронных базах данных EST, соответствующих генам *sod3.2* и *sod3.3*, а также невозможность амплификации кДНК этих генов в нашей работе, может объясняться генетическими особенностями использованной в работе (Zhu, Scandalios, 1995) линии кукурузы W64A или техническими ошибками исследования этих авторов.

кДНК генов MSD3.1 и MSD3.4 были клонированы в составе экспрессирующего вектора pQE60 в клетках *E.coli*. После выявления клонов, в которых наблюдается экспрессия зрелого олигомерного, обладающего супероксиддисмутазной активностью фермента было проведено количественное выделение (до 1 мг) и очистка растворимой формы данного фермента с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе с последующим диализом и концентрированием. Оценка степени чистоты препаратов рекомбинантного белка проводилась с помощью электрофореза белков в ПААГ в нативных условиях (Рис.1).

У прокариот Mn-содержащая СОД является ферментом, защищающим бактериальную ДНК от повреждающего действия АФК (Hopkin et al, 1992). Существуют также предварительные

данные, свидетельствующие в пользу возможности связывания с ДНК MSD3.4 и в митохондриях кукурузы (Descheneau, Newton, 2005). В связи с этим представляло интерес выяснение, характерна ли и для второго фермента MSD3.1 кукурузы, высокомолекулярного MSD3.4, ДНК-связывающая активность.

Нами было проведено изучение возможности ДНК-связывания данного белка с небольшими последовательностями митохондриальной ДНК кукурузы с использованием метода ДНК-ретардации. В этих экспериментах ДНК-связывающей активности у данного фермента с короткими последовательностями линейной ДНК обнаружено не было. Это может говорить: а) о разделении функций разных Mn-СОД в митохондриях растений. В частности, в митохондриях кукурузы MSD3.4 может выполнять функции защиты ДНК, будучи ассоциированной с ней, а MSD3.1 может быть локализована непосредственно в участках генерации АФК в митохондриях; б) ДНК-связывание Mn-СОД возможно только при участии или в комплексе с какими-то пока не охарактеризованными белковыми факторами.

Помимо изучения потенциальной ДНК-связывающей активности Mn-СОД нами проводилось также исследование возможности регуляции активности этих ферментов на посттрансляционном уровне с участием механизма фосфорилирования /дефосфорилирования. В работе (Horper et al., 2006) показано, что в изолированных митохондриях, полученных из сердца свиньи, в условиях, соответствующих окислительному стрессу (в частности, при высоком уровне АФК)

наблюдается дефосфорилирование Mn-СОД. Дефосфорилирование данного фермента, согласно этому исследованию, приводит к его активации. В проведенных нами экспериментах *in vitro* с использованием в качестве источника митохондриальных протеинкиназ кукурузы фракций, полученных путем хроматографической очистки митохондриального экстракта, а в качестве субстрата для фосфорилирования – рекомбинантной MSD3.1, было показано, что Mn-СОД кукурузы является фосфобелком. Кроме того, нами исследовалось возможное влияние редокс-агентов на процесс фосфорилирования этого фермента. Обнаружено, что окисляющий агент феррицианид калия вызывал дефосфорилирование Mn-СОД, в то время как восстанавливающие агенты дитионит натрия и восстановленный глутатион не оказывали какого-либо эффекта на фосфорилирование данного белка (рис.2). Эти данные свидетельствуют в пользу возможности регуляции экспрессии Mn-СОД митохондрий кукурузы в ответ на изменение редокс-статуса этих органелл.

Таким образом, суммируя вышесказанное, в данной работе с использованием разных подходов произведено уточнение состава генов СОД кукурузы. Были обнаружены транскрипты двух ранее не описанных в литературе генов, кодирующих хлоропластные Fe- и Cu/Zn-содержащие СОД, что демонстрирует, что система детоксикации АФК в хлоропластах кукурузы более сложно организована, чем считалось ранее. В то же время оказалось, что количество генов митохондриальных Mn-СОД кукурузы меньше, чем предполагалось. С помощью полученных нами рекомбинантных

белков показано, что для данных ферментов характерна посттрансляционная регуляция (фосфорилирование/дефосфорилирование) их экспрессии. С использованием рекомбинантных

белков также исследуется возможное участие Mn-SOD митохондрий в защите ДНК этих органелл от повреждающего действия АФК.

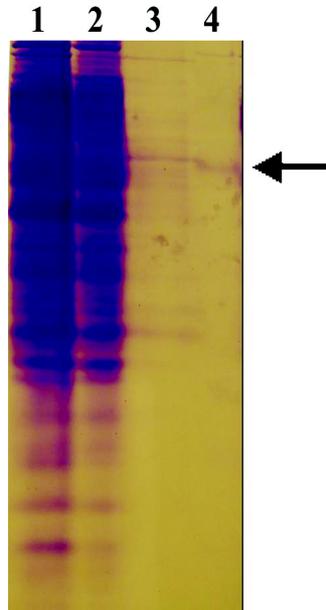


Рисунок 1. Оценка чистоты выделенного из клеток бактерий рекомбинантного белка SOD3.1. 1 – бактериальный лизат, 2 – не связавшиеся с Ni-NTA бактериальные белки, 3 – элюция неспецифично связанных с Ni-NTA бактериальных белков, 4 – очищенный рекомбинантный белок. Стрелкой обозначена тетрамерная форма белка.

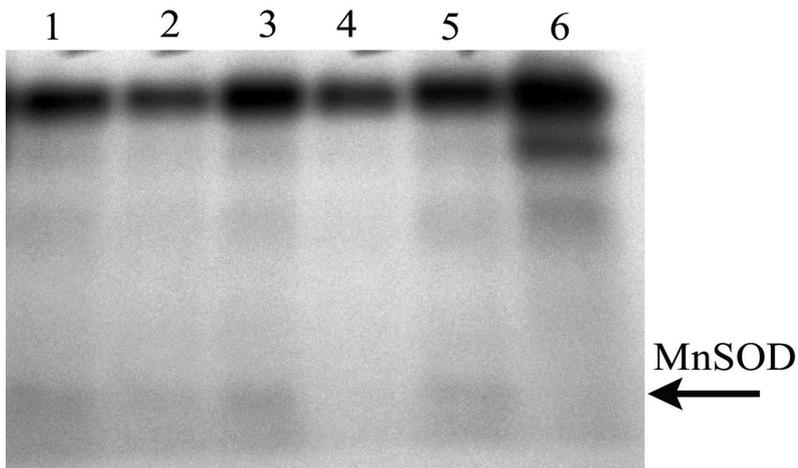


Рисунок 2. Эффект редокс-агентов на фосфорилирование рекомбинантного белка Mn-SOD кукурузы. Для анализа использовали хроматографические фракции митохондриального лизата кукурузы. 1. - митохондриальная фракция + Mn-SOD + GSH; 2. - митохондриальная фракция + Mn-SOD + GSSG; 3. - митохондриальная фракция + Mn-SOD + дитионит натрия; 4. - митохондриальная фракция + Mn-SOD + феррицианид калия; 5. - митохондриальная фракция + Mn-SOD; 6. - митохондриальная фракция.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе.

Обозначение	Продукт	Последовательность праймеров
<i>chcs</i>	Хлоропластные Cu/Zn-СОД	Л: ATGCGGGTGACCTGGGAAACAT П: ATGTTTCCCAGGTCACCCGCAT
<i>fsd</i>	Fe-СОД	Л: TGGATGCTTTGGAACCACATATGAG П: TCAAGGTAGTACGCATGCTCCCA
<i>mnc</i>	Mn-СОД, универсальные праймеры	Л: TTCAACGGCGGAGGTCACGTTAA П: CATATTTCCAGTTGATCACTTTCCA
<i>Sod3.1</i>	Mn-СОД3.1	Л: GATACAGCGAGCGAGCGACCA П: CCGTTAAGACAGATCTAGCAAGAACA
<i>Sod3.4</i>	Mn-СОД3.4	Л: AGCGAGCGAGCGAGCGA П: GTCCATTAAGACAGATCTAGCAAGAACA
<i>Mn3Lc</i>	Mn-СОД, праймеры использованные для клонирования рекомбинантных белков	Л: GCGTCTGCCATGGGGGTGAC П: CCGTTAAGACAGATCTAGCAAGAACA

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 12-04-01027-а и Минобрнауки Российской Федерации (соглашение № 8266). В работе использовано оборудование Байкальского аналитического центра (ЦКП) СО РАН при президиуме ИНЦ СО РАН.

ЛИТЕРАТУРА

- Гарник Е.Ю., Лазарева Е.В., Константинов Ю.М. (2004) Особенности изоферментных спектров анионных пероксидаз и супероксиддисмутазы в каллусной культуре *Larix sibirica* Ledeb. и *Larix gmelinii* Rupr. Rupr. *Физиология растений*, **51(3)**, 429-434.
- Субота И.Ю., Арзиев А.Ш., Сенженко Л.П., Тарасенко В.И., Константинов Ю.М. (2007) Ингибиторный анализ фосфорилирования /дефосфорилирования белков в митохондриях кукурузы. *Физиология растений*. **54(2)**, 369-396.
- Тарасенко В.И., Катышев А.И., Кобзев В.Ф., Константинов Ю.М. (2008) Сравнительная

характеристика ядерной и митохондриальной ДНК-топоизомеразы I кукурузы. *Молекулярная биология*, **42(1)**, 88-95.

- Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.*, **53**, 1331-1341.
- Descheneau A.T., Newton K. (2005) Maize mitochondrial DNA-binding proteins. // International Congress on Plant Mitochondrial Biology, Obernai, France, May 28 – June 2, p.23.
- Fink R.C., Scandalios J.G. (2002) Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperm and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Arch. Biochem. Biophys.*, **399**, 19-36.
- Grene R. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. // *In: The Arabidopsis book* (2002), American Society of Plant Biologists.
- Hopkin K.A., Papazian M.A., Steinman H.M. (1992)

- Functional differences between manganese and iron superoxide dismutases in *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.*, **267**, 24253-24258.
- Hopper R.K., Carroll S., Aponte A.M., Johnson D.T., French S., Shen R.-F., Witzmann F.A., Harris R.A. Balaban R.S. (2006) Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium. *Biochem.*, **45**, 2524-2536.
- Kernodle S.P., Scandalios J.G. (2001) Structural organization, regulation, and expression of the chloroplastic superoxide dismutase Sod1 gene in maize. *Arch Biochem. Biophys.*, **391**, 137-147.
- Kliebenstein D.J., Monde R.A., Last R.L. (1998) Superoxide dismutases in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization *Plant Physiol.*, **118**, 637-650.
- McGinnis S., Madden T.L. (2004) BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **32**, W20-W25.
- Mittler R., Vanderauwera S., Golery M., Van Breusegem F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* **9**, 490-498.
- Van Camp W., Inze D., Van Montagu M. (1997) The regulation and function of tobacco superoxide dismutases. *Free Radic. Biol. Med.*, **23**, 515-520.
- Zhu D., Scandalios J.G. (1995) The maize mitochondrial MnSODs encoded by multiple genes are localized in the mitochondrial matrix of transformed yeast cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **18**, 179-183.