

УДК 581.11.2:581.573.4

РАЗЛИЧНЫЕ ФОРМЫ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ ИЗ КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА РАЗЛИЧАЮТСЯ ПО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К сАМР И ИОНАМ КАЛЬЦИЯ

© 2024 г. Л. А. Ломоватская^{а,*}, О. В. Захарова^а, А. М. Гончарова^а, А. С. Романенко^а,
Т. А. Кишинская^б

^а Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук,
Иркутск, 664033 Россия

^б Байкальский государственный университет, Иркутск, 664002 Россия
*e-mail: LidaL@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 02.10.2023

После доработки 21.12.2023

Принята к печати 28.12.2023

Установлено, что циклический аденозин монофосфат (сАМР) и ионы кальция (Ca^{2+}) способны дозозависимо модулировать активность различных форм супероксиддисмутазы (СОД) в клетках корня проростков гороха сорта Рондо. Влияние сАМР на активность СОД исследовали на интактных проростках, инкубируя их корни в растворе жирорастворимого аналога сАМР *n*-дибутирил-сАМР, что приводило к повышению внутриклеточной концентрации сАМР, а общая активность СОД, измеряемая в супернатанте, полученном из гомогената корней, возрастала до 230%. Инкубация аналогичных корней в растворе ингибитора трансмембранной аденилатциклазы сурамина существенно снижала эндогенный уровень сАМР, а активность СОД уменьшалась до 40%. В работе проводили ингибиторный анализ СОД: в присутствии 3мМ KCN или 3мМ H_2O_2 активность этого фермента уменьшалась на 40 или 50%. Инкубация проростков в растворе LaCl_3 приводила к снижению общей активности СОД до 73%, ингибиторы незначительно уменьшали активность фермента. Предварительная обработка проростков 1мМ EGTA снижала общую активность СОД до 68%, а ингибиторы фермента не оказывали никакого дополнительного эффекта. Влияние недостатка или избытка Ca^{2+} на активность СОД изучали в гомогенате корней проростков гороха. 100 мМ EGTA снижал активность этого фермента до 81%, а ингибиторы СОД (H_2O_2 и KCN) уменьшали ее активность до 65 и 51% соответственно. Добавление к гомогенату 500 нМ CaCl_2 незначительно повышало общую активность СОД, при этом KCN немного уменьшал активность фермента. Добавление 500 мкМ CaCl_2 не изменяло активность СОД, применение на этом фоне KCN снижало ее на 30%, а добавление H_2O_2 не влияло на активность фермента. Сделан вывод о том, что сАМР оказывает косвенное влияние на активность СОД, тогда как ионы кальция, вероятно, воздействуют непосредственно на активный центр молекулы фермента; при этом каждая форма СОД отличается по чувствительности к кальцию.

Ключевые слова: Cu,Zn-СОД, Fe-СОД, Mn-СОД, корень проростков гороха, сАМР, Ca^{2+}

DOI: 10.31857/S0233475524020073, **EDN:** xngoeb

ВВЕДЕНИЕ

Супероксиддисмутаза (СОД) (КФ 1.15.1.1) является первой линией защиты от окислительного стресса в живых клетках, катализируя дисмутацию супероксидного радикала до молекулярного кислорода и перекиси водорода. Характерной особенностью этого фермента является наличие металлов в составе активного центра. У растений этот фермент представлен Cu, Zn-, Fe- и Mn-содержащими формами СОД [1]. Отличительной особенностью растительных СОД

является множественность изоформ каждой из форм, которые локализуются как в цитозоле, так и в органеллах растений [2]. У всех эукариотов регуляция активности СОД может осуществляться на генетическом уровне (транскрипция, трансляция) [2, 3]. В этих процессах существенная роль принадлежит внутриклеточным вторичным мессенджерам. В литературе имеется много данных о влиянии различных видов активных форм кислорода (АФК) и ионов кальция (Ca^{2+}) на экспрессию генов СОД в растениях [4, 5]. Предполагается, что одним из механизмов их

действия может быть активация протеинкиназ, фосфорилирующих соответствующие факторы транскрипции [4]. Экспрессия генов и синтез новых форм фермента является долгосрочным процессом, направленным на перестройку и адаптацию метаболизма в стрессовых условиях [5, 6]. Однако помимо таких способов регуляции вторичные мессенджеры могут оказывать воздействие на уже имеющиеся молекулы СОД, приводя к активации или ингибированию ее активности в течение нескольких минут [7]. Такая модуляция активности фермента необходима как для регуляции роста и развития растений, так и для адаптации к кратковременным стрессовым условиям.

По литературным данным, обработка целых растений экзогенными ионами кальция может приводить к изменению активности общего пула СОД [8]. Механизм этого явления пока неизвестен, но предполагается, что в нем участвует кальций-кальмодулин-активируемая протеинкиназа, т.е. Ca^{2+} оказывают косвенный эффект на активность СОД [8]. В то же время в литературе отсутствуют сведения о непосредственной роли Ca^{2+} в регуляции активности некоторых форм СОД у растений. Между тем кальций хорошо известен как модулятор активности многих видов ферментов, непосредственно влияя на их конформационные перестройки.

Известно, что в регуляции уровня внутриклеточного кальция принимает участие вторичный мессенджер аденилатциклазной сигнальной системы циклический аденозин монофосфат (сАМР) [9]. Вместе с тем участие сАМР в регуляции активности ферментов практически не исследовано, помимо его способности активировать/ингибировать соответствующие протеинкиназы/протеинфосфатазы растений [9].

Поэтому целью данного исследования являлось изучение влияния сАМР и ионов кальция на активность различных форм СОД в корнях проростков гороха.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили проростки гороха сорта Рондо. Семена гороха последовательно стерилизовали в течение 30 мин в 94% этаноле, 5 мин в 3% перексиде водорода и 5 мин в 5% растворе перманганата калия. На конечном этапе отмывали стерильной дистиллированной водой и замачивали в воде (56°C) на 4 ч. Затем семена проращивали в стерильных чашках Пети на увлажненной фильтровальной бумаге

в течение 3 сут в темноте при 23–25°C. В каждом варианте эксперимента использовали по 10 проростков.

Определение активности различных форм СОД.

Корни 10 проростков гороха гомогенизировали в среде следующего состава: 0.02 М фосфатный буфер, pH 7.2; 1 мМ дитиотрейтол; 10 мкг/мл фенолметилсульфонилфторид; 50 мкг/мл гидроксимеркурийбензоат; 1 мкг/мл лейпептин. Гомогенат фильтровали через капрон и центрифугировали при 16000g в течение 10 мин (Allegra 64 R). Об активности СОД судили по степени торможения восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) (Sigma-Aldrich, США) в присутствии NADH и феназинметасульфата (ФМС) (Sigma-Aldrich) [10]. Для этого к 0.1 мл растительного супернатанта добавляли 3.9 мл реакционной среды. К контрольному образцу объемом 0.1 мл H_2O добавляли также 3.9 мл реакционной среды; образцы инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре.

Реакционная среда для определения активности СОД содержала: 3.5 мл 150 мМ Na, К-фосфатного буфера (pH 7.8), 0.1 мл 0.01 мМ EGTA, 0.1 мл 0.186 мМ феназинметасульфата, 0.1 мл 0.4 мМ нитросинего тетразолия, 0.1 мл 1 мМ NADH.

Содержание бисформазана определяли на планшетном спектрофотометре при длине волны 560 нм. Активность СОД (мкмоль формазана/мг белка/мин) рассчитывали по формуле:

$$\text{Акт. СОД (мкмоль формазана/мг белка/мин)} = \frac{[(\text{Оп}_{\text{контр.}} - \text{Оп}_{\text{оп.}}) / t] \times V_1 \times V_2 \times 10^3}{V_3 \times \epsilon_{560} \times m}$$

где $\text{Оп}_{\text{контр.}}$ — оптическая плотность контрольного образца; $\text{Оп}_{\text{оп.}}$ — оптическая плотность опытного образца; V_1 — суммарный объем реакционной смеси, мл; V_2 — объем буферной смеси, используемый для гомогенизации и экстракции проростков, мл; V_3 — объем экстракта, вносимый в реакционную смесь и используемый для анализа, мл; m — концентрация белка, мг/мл; ϵ_{560} — молярный коэффициент экстинкции бисформазана, $3.98 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Ингибиторный анализ. В супернатант после гомогенизации и центрифугирования корней добавляли 3мМ KCN или 3мМ H_2O_2 . В контрольные варианты добавляли аналогичный объем воды. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд. Концентрацию сАМР измеряли методом иммуноферментного анализа (ИФА), применяя первичные поликлональные антитела к сАМР (Santa Cruz Biotechnology, США) и

вторичные, меченные пероксидазой хрена (Santa Cruz Biotechnology) [11].

Влияние *n*-дibuтирил-сАМР (д-б-сАМР) на активность СОД. Корни интактных проростков гороха инкубировали 30 мин в 50 нМ растворе *n*-дibuтирил-сАМР (д-б-сАМР).

(Sigma-Aldrich), затем корни промывали в воде, гомогенизировали по вышеприведенной схеме, центрифугировали и в супернатанте определяли активность СОД.

Влияние сурамина на активность СОД. Аналогичные проростки гороха инкубировали 30 мин в 800 мкМ растворе сурамина (ингибитора трансмембранной аденилатциклазы, Sigma-Aldrich). Далее эксперимент проводили по той же схеме, как и в случае с д-б-сАМР.

Влияние ингибитора неспецифических кальциевых каналов LaCl_3 и хелатора кальция EGTA на активность СОД. Проростки гороха инкубировали 30 мин в 400 мкМ растворе LaCl_3 или в 1 мМ растворе EGTA. Далее эксперимент проводили по той же схеме, как и в случае с д-б-сАМР.

Во всех экспериментах (“д-б-сАМР”, “сурамин”, “ LaCl_3 ”, “EGTA”) полученные результаты сравнивали с контролем, которым служили проростки, инкубированные в воде (контроль, H_2O). В каждом варианте эксперимента проводили ингибиторный анализ (с добавлением KCN, H_2O_2) и результаты сравнивали с аналогичными без добавления ингибиторов (контроль I).

Влияние дефицита/избытка Ca^{2+} на активность СОД. К супернатанту, полученному из гомогената корней проростков, инкубированных в воде, добавляли растворы следующих веществ: 100 мМ EGTA или 500 нМ CaCl_2 , или 500 мкМ CaCl_2 , инкубировали 10 мин при 23°C, затем нагревали 3 мин до 100°C и определяли активность СОД. Контролем служили образцы супернатанта без добавления EGTA и CaCl_2 . В каждом варианте эксперимента проводили ингибиторный анализ (с добавлением KCN, H_2O_2) и результаты сравнивали с аналогичными без добавления ингибиторов.

Статистический анализ данных. Эксперименты проводили в трех биологических и восьми аналитических повторностях. Для оценки статистической значимости результатов использовали *t*-критерий. Результаты считали статистически значимо различающимися при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления активности отдельных форм СОД применяли специфические ингибиторы [2, 12]: добавление к гомогенату корней 3 мМ KCN (ингибитора Cu-Zn-СОД) приводило к снижению общей активности фермента на 70%, тогда как инкубация с 3 мМ H_2O_2 (ингибитором Cu-Zn-СОД и Fe-СОД) уменьшала активность на 49% (табл. 1).

Влияние сАМР на активность СОД в клетках корней гороха исследовали на интактных проростках, инкубируя корни проростков гороха в 50 нМ растворе *n*-дibuтирил-сАМР, что приводило к повышению внутриклеточной концентрации сАМР (табл. 2). Инкубация аналогичных корней с ингибитором трансмембранной аденилатциклазы сурамином [11] способствовала существенному снижению эндогенного уровня сАМР (табл. 2).

Во всех вариантах экспериментов изменялась активность разных форм СОД. Под воздействием *n*-дibuтирил-сАМР общая активность достигала 230%, добавление к гомогенату ингибиторов СОД (H_2O_2 и KCN) вызывало уменьшение ее активности до 180–190% соответственно. На фоне инкубации с сурамином общая активность снижалась до 40% от контроля, тогда как при дополнительном применении ингибиторов СОД – до 50–60% (рис. 1). Возможно, что увеличение детектируемой активности произошло за счет изменения активности Mn-СОД, на которую не действуют ингибиторы KCN и пероксид водорода.

Инкубация проростков с 400 мкМ раствором LaCl_3 приводила к снижению общей активности СОД до 73%, 3 мМ H_2O_2 уменьшали активность СОД до 67%, а под влиянием 3 мМ KCN ее активность опускалась до 56% от контроля (контролем служил вариант “+ LaCl_3 ”) (табл. 1). Предварительная обработка проростков 1 мМ EGTA приводила к снижению общей активности фермента на 32%, но ингибиторы не оказывали никакого дополнительного эффекта (табл. 1).

Влияние недостатка или избытка ионов кальция на активность СОД изучали в гомогенате корней проростков гороха. При добавлении к гомогенату корней хелатора ионов кальция EGTA (100 мМ) наблюдалось снижение общей активности СОД до 81%, при применении ингибиторов выявлено еще большее уменьшение активности – до 65% (в случае применения KCN) и 51% (в случае применения H_2O_2) (рис. 2). Добавление к гомогенату 500 нМ раствора CaCl_2 незначительно повышало общую активность СОД, однако дополнительная обработка KCN снижала

Таблица 1. Изменение активности СОД после инкубации интактных корней проростков гороха в 400 мкМ LaCl_3 или 1 мМ EGTA

Вариант опыта	H_2O , контроль I		3 мМ H_2O_2 (ингибитор Cu, Zn-СОД)		3 мМ KCN (ингибитор Cu, Zn-СОД и Fe-СОД)	
	мкМ формазана/мг белка/мин	% к контролю	мкМ формазана/мг белка/мин	% к контролю I*	мкМ формазана/мг белка/мин	% к контролю I*
Контроль, H_2O	0.37 ± 0.02	100	0.19 ± 0.01	51	0.11 ± 0.01	30
400 мкМ LaCl_3	0.27 ± 0.01	73	0.18 ± 0.01	67	0.15 ± 0.01	56
1 мМ EGTA	0.25 ± 0.01	68	0.17 ± 0.01	68	0.16 ± 0.01	64

* В вариантах экспериментов “ LaCl_3 ”, “EGTA” полученные результаты сравнивали с контролем, которым служили проростки, инкубированные в воде (контроль, H_2O). Результаты ингибиторного анализа (с добавлением KCN, H_2O_2) сравнивали с аналогичными экспериментами (“ LaCl_3 ”, “EGTA”) без добавления ингибитора (контроль I).

Таблица 2. Влияние 50 нМ *n*-дibuтирил-сАМР и 800 мкМ сурамина на содержание эндогенного сАМР в корне проростков гороха

Вариант опыта	сАМР	
	нмоль/г сыр. веса	% к контролю
H_2O , контроль	5.2 ± 0.5	100
д-б-сАМР, 50 нМ	9.8 ± 0.8	188
Сурамин, 800 мкМ	2.2 ± 0.2	42

активность фермента примерно на 20%, а H_2O_2 не оказывал влияния на этот показатель (рис. 2). При добавлении более высокой концентрации CaCl_2 (500 мкМ) общая активность СОД не изменялась (100%), на фоне этого KCN уменьшал этот показатель на 30%, а при добавлении H_2O_2 активность фермента оставалась практически неизменной (рис. 2).

Сигнальная система растений формируется и функционирует за счет взаимодействующих компонентов различных сигнальных путей [13]. Одним из наиболее известных примеров этого является взаимозависимое изменение содержания внутриклеточных Ca^{2+} и H_2O_2 . Считается, что концентрация цитозольных Ca^{2+} регулируется АФК, и наоборот, Ca^{2+} имеют решающее значение для производства АФК [14, 15].

Исследованию растительной СОД посвящено достаточно много работ, в которых этот фермент чаще всего рассматривается как маркер стрессовых реакций растений [6, 16]. В связи с этим возникает вопрос о том, какие внутриклеточные события, например, изменение ионного окружения под влиянием вторичных мессенджеров могут непосредственно вызывать изменение активности СОД. В отдельных работах исследовалось влияние экзогенного кальция, применяемого в качестве удобрения, на общую активность исследуемого фермента [17]. В некоторых

источниках обсуждается взаимосвязь между абсцизовой кислотой, кальцием и активностью СОД в растениях кукурузы [18]. Результаты этих исследований не дают четкого представления о механизмах кратковременной модуляции активности СОД, в которой могут участвовать внутриклеточные сигнальные молекулы. Это важно и по той причине, что этот фермент представлен в растениях несколькими формами, которые могут обладать индивидуальной чувствительностью к вторичным мессенджерам. Краткосрочное влияние сигнальных молекул на активность различных форм СОД может осуществляться как в условиях нормального роста и развития растений, так и под воздействием стрессоров.

Наши эксперименты показали, что все формы СОД из клеток корней проростков гороха реагировали на изменение эндогенного уровня сАМР (рис. 1). Согласно результатам ингибиторного анализа (табл. 1), при повышении концентрации сАМР в наибольшей степени активировалась Mn-СОД. Известно, что действие вторичного мессенджера аденилатциклазной сигнальной системы, сАМР, направлено на индукцию активности внутриклеточных сигнальных каскадов. В основном, от него зависит активация соответствующих протеинкиназ, которые фосфорилируют специфические белки и факторы транскрипции, передавая таким образом

информацию в геном. Кроме того, эта сигнальная молекула является регулятором активности нуклеотид-зависимых кальциевых ионных каналов [19]. В литературе показано, что кратковременное и локальное повышение уровня эндогенного сАМР приводит к их активации и повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [19], за которым следует резкое увеличение уровня АФК [20]. Таким образом, сАМР напрямую не оказывает влияние на ферменты, генерирующие АФК, но участвует опосредованно, модулируя уровень эндогенных Ca^{2+} , которые могут непосредственно взаимодействовать с активными центрами соответствующих ферментов. Очевидно, что такая многоступенчатая взаимосвязь вторичных мессенджеров должна быть дозозависимой. Подтверждением этому может служить дифференцированное ингибирование всех форм СОД при уменьшении уровня эндогенного сАМР (рис. 1): заметно, что активность Mn-СОД в этих условиях снижалась в меньшей степени. Согласно литературным данным можно предположить, что непосредственной причиной изменения активности СОД в клетках корней гороха в этих условиях могло быть изменение концентрации эндогенного кальция. В связи с этим показательны результаты по изменению активности всех форм СОД под влиянием неспецифического ингибитора кальциевых каналов LaCl_3 и хелатора кальция EGTA, применяемого в низкой концентрации на интактных корнях проростков (табл. 1). LaCl_3 , вероятно, блокировал выход внутриклеточных Ca^{2+} , что отразилось на

активности СОД. Применение различных концентраций EGTA на разных моделях (на корнях интактных проростков и в гомогенате корней) показало существенные изменения в активности всех форм СОД, причем в меньшей степени они наблюдались в Mn-СОД, что указывает на чувствительность исследуемого фермента к кальцию.

Ингибиторный анализ не дает точного представления о вкладе каждой формы СОД в ее общую активность, однако можно отметить, что все формы фермента из корней гороха проявляли разнонаправленную чувствительность к 500 нМ CaCl_2 , которая близка к физиологической у растений: активности Cu,Zn-СОД и Fe-СОД незначительно снижались, тогда как Mn-СОД повышалась. Увеличение концентрации экзогенного кальция на три порядка (500 мкМ) оказывало подавляющий эффект на все формы СОД, однако на Mn-СОД в меньшей степени. Таким образом, можно сделать вывод о том, что СОД из клеток корней проростков гороха является кальций-зависимым ферментом, а каждая форма СОД имеет индивидуальную чувствительность к Ca^{2+} .

Можно полагать, что дифференцированная чувствительность различных форм СОД к кальцию является одним из способов тонкой регуляции внутриклеточной сигнализации у растений. Это представляется вполне возможным, поскольку известно, что наиболее низкий уровень Ca^{2+} наблюдается в цитоплазме (в покое составляет 100–200 нМ), тогда как во внутриклеточных компартментах может достигать 1 мМ, как, например, в митохондриях [21]. В связи с этим

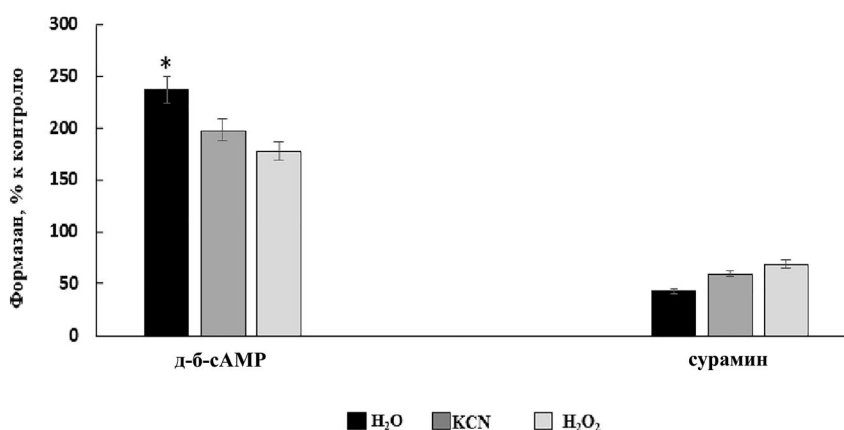


Рис. 1. Изменение активности СОД в интактных корнях проростков гороха под влиянием 50 нМ *n*-дибутирил-сАМР или 800 мкМ сурамина. Расчет активности СОД проводили, сравнивая значения СОД, полученные в опытных вариантах (д-б-сАМР, сурамин), со значениями, полученными из корней проростков, инкубированных в воде (контроль). % ингибирования рассчитывали, сравнивая значение " H_2O " и значение СОД, полученное при добавлении ингибитора. В опыте сравнивали значение активности СОД (д-б-сАМР или сурамин) со значением, полученным в присутствии ингибиторов. * - $p < 0.05$.

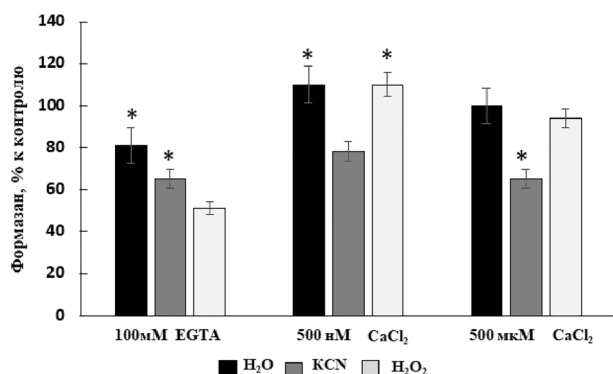


Рис. 2. Влияние EGTA и CaCl₂ на активность СОД в гомогенате из корней проростков гороха. Расчет проводили, сравнивая значения СОД, полученные в опытных вариантах (EGTA, CaCl₂) со значениями, полученными при добавлении к супернатанту воды (контроль). % ингибирования рассчитывали, сравнивая значение “H₂O” и значение СОД, полученное при добавлении ингибитора. В каждом из опытных вариантов проводили ингибиторный анализ и результаты сравнивали с аналогичными (100 мМ EGTA/500 нМ CaCl₂/500 мкМ CaCl₂) без добавления ингибиторов. * - $p < 0.05$.

следует упомянуть локализацию различных форм СОД в растительной клетке. Cu,Zn-СОД считается наиболее широко распространенной формой и обнаружена в цитоплазме и большинстве внутриклеточных органелл [2], Fe-СОД преимущественно локализуется в различных участках хлоропластов, тогда как Mn-СОД – в митохондриях и пероксисомах [2]. При этом в большинстве органелл расположены компоненты и других сигнальных систем, как, например, растворимая аденилатциклаза и нуклеотид-зависимые кальциевые ионные каналы [22, 23]. Тем самым, внутриклеточные органеллы растений выполняют роль сигнальных микродоменов. В частности, они участвуют в ретроградной передаче сигнала в клетке, в том числе путем генерации H₂O₂ [24]. Так, в литературе есть сведения о том, что повышенный синтез H₂O₂ пероксисомами способствует индукции экспрессии генов, определяющих адаптацию растений к стрессу и/или толерантности, тогда как пероксид водорода, образуемый в хлоропластах, обеспечивает экспрессию генов, связанных с синтезом вторичных сигнальных молекул [25]. Более того, H₂O₂, поступающий от хлоропластов и пероксисом, модулирует транскрипцию генов, участвующих в ретроградной регуляции сигналинга митохондрий [25].

Таким образом, вторичные мессенджеры аденилатциклазной и кальциевой сигнальных систем сАМР и Ca²⁺ могут оказывать

модулирующий эффект на активность СОД из клеток корней проростков гороха. Эндогенный сАМР действует опосредованно, а Ca²⁺, вероятно, могут дозозависимо взаимодействовать с активным центром каждой из форм этого фермента. При этом формы СОД обладают индивидуальной чувствительностью к ионам кальция, что позволяет точно передавать и интегрировать внутриклеточные сигналы.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией этой статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках проекта исследований СИФИБР № 0277-2021-0004.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dvořák P., Krasylenko Y., Zeiner A., Šamaj J., Takáč T. 2021. Signaling toward reactive oxygen species-scavenging enzymes in plants. *Front. Plant Sci.* **11**, 618835. doi 10.3389/fpls.2020.618835
2. Бараненко В.В. 2006. Супероксиддисмутаза в клетках растений. *Цитология.* **48** (6), 465–474.
3. 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. doi 10.3389/fpls.2013.00191
4. 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.
5. Zameer R., Fatima K., Azeem F., Hussah I.M. ALgwaiz H.I.M., Sadaqat M., Rasheed A., Batool R., Shah A.N., Zaynab M., Shah A.A., Attia K.A., AlKahtani M.D.F., Fiaz S. 2022. Genome-wide characterization of superoxide dismutase (SOD) genes in *Daucus carota*: Novel insights into structure, expression, and binding interaction with hydrogen peroxide (H₂O₂) under abiotic stress condition. *Front. Plant Sci.* **13**, 870241. doi 10.3389/fpls.2022.870241
6. Babitha M.P., Bhat S.G., Prakash H.S., Shetty H.S. 2002. Different induction of superoxide dismutase in downy mildew-resistant and -susceptible genotypes of pearl millet. *Plant Pathol.* **51** (4), 480–486. doi 10.1046/j.1365-3059.2002.00733.x

7. 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. doi 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029186
8. Yan J., Guan L., Sun Y., Zhu Y., Liu L., Lu R., Jiang M., Tan M., Zhang A.C. 2015. Calcium and ZmCCaMK are involved in brassinosteroid-induced antioxidant defense in maize. *Plant Cell Physiol.* **56** (5), 883–896. doi 10.1093/pcp/pcv014
9. Blanco E., Fortunato S., Viggiano L., Concetta de Pinto M. 2020. Cyclic AMP: A polyhedral signalling molecule in plants. *J. Mol. Sci.* **21**, 4862. doi 10.3390/ijms21144862
10. Beuchamp I., Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**, 276–287. doi 10.1016/0003-2697(71)90370-8
11. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V., Dudareva L.V. 2011. Determination of cAMP in plant cells by a modified enzyme immunoassay method. *Plant Cell Rep.* **30**, 125–132. doi 10.1007/s00299-010-0950-5
12. Ahmed H., Schott E.J., Gauthier J.D., Vasta J.R. 2003. Superoxide dismutases from the oyster parasite *Perkinsus marinus*: Purification, biochemical characterization, and development of a plate microassay for activity. *Anal. Biochem.* **318**, 132–141. doi 10.1016/S0003-2697(03)00192-1
13. Ma Yi, Zhao Y., Robin K. Walker R.K., Berkowitz G.A. 2013. Molecular steps in the immune signaling pathway evoked by plant elicitor peptides: Ca²⁺-dependent protein kinases, nitric oxide, and reactive oxygen species are downstream from the early Ca²⁺ signal. *Plant Physiol.* **163**, 1459–1471. doi 10.1104/pp.113.226068
14. Choi W.G., Toyota M., Kim S.H., Hilleary R., Gilroy S. 2014. Salt stress-induced Ca²⁺ waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 6497–6502. doi 10.1073/pnas.1319955111
15. Gaupels F., Durner J., Kogel K.-H. 2017. Production, amplification and systemic propagation of redox messengers in plants? The phloem can do it all! *New Phytol.* **214** (2), 554–560. doi 10.1111/nph.14399
16. Kunos V., Cséplő M., Seress D., Eser A., Kende Z., Uhrin A., Bányai J., Bakonyi J., Pál M., Mészáros K. 2022. The stimulation of superoxide dismutase enzyme activity and its relation with the pyrenophora teres f. teres infection in different barley genotypes. *Sustainability.* **14** (2597), 1–15. doi 10.3390/su14052597
17. Sairam R.K., Vasanthan B., Arora A. 2011. Calcium regulates gladiolus flower senescence by influencing antioxidative enzymes activity. *Acta Physiol. Plant.* **33**, 1897–1904. doi 10.1007/s11738-011-0734-8
18. Hu X., Jiang M., Zhang J., Zhang A., Lin F., Tan M. 2007. Calcium–calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H₂O₂ production in leaves of maize (*Zea mays*) plants. *New Phytol.* **173**, 27–38. doi 10.1111/j.1469-8137.2006.01888.x
19. Jarratt-Barnham E., Wang L., Ning Y., Davies Y.M. 2021. The complex story of plant cyclic nucleotide-gated channels. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 874. doi 10.3390/ijms22020874
20. Saxena I., Srikanth S., Chen Z. 2016. Cross talk between H₂O₂ and interacting signal molecules under plant stress response. *Front. Plant Sci.* **7**, 570. doi 10.3389/fpls.2016.00570
21. Швартау В.В., Вирыч П.А., Маковейчук Т.И., Артеменко А.Ю. 2014. Кальций в растительных клетках. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol.* **22** (1), 19–32. doi 10.15421/011403
22. Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Криволапова Н.В., Копытчук В.Н. 2007. Функционирование “растворимой” и связанной с мембраной форм аденилатциклазы в органеллах растительных клеток при биотическом стрессе. *Биол. мембраны.* **24** (5), 363–371.
23. Романенко А.С., Ломоватская Л.А. 2017. Влияние экзополисахаридов бактериального возбудителя кольцевой гнили на субклеточную локализацию регулируемых циклическими нуклеотидами ионных каналов (CNGC) в клетках корней картофеля. *Биол. мембраны.* **34** (3), 231–238. doi 10.7868/S0233475517020062
24. Юрина Н.П., Одинцова М.С. 2019. Ретроградная сигнальная система хлоропластов. *Физиол. растений.* **66** (4), 243–255. doi 10.1134/S0015330319040146
25. Sewelama N., Jasperta N., Van Der Kelenc K., Tognetti V.B., Schmitza J., Frerigmanne H., Stahl E., Zeier J., Van Breusegem F., Maurino V.G. 2014. Spatial H₂O₂ signaling specificity: H₂O₂ from chloroplasts and peroxisomes modulates the plant transcriptome differentially. *Mol. Plant.* **7**, 1191–1210. doi 10.1093/mp/ssu070

Different Forms of Superoxide Dismutase from Pea Seedling Roots Differ in Sensitivity to cAMP and Calcium

© 2024 г. L. A. Lomovatskaya^{1, *}, O. V. Zaharova¹, A. M. Goncharova¹, A. S. Romanenko¹,
T. A. Kishinskaya²

¹ *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033, Russia*

² *Baikal State University, Irkutsk, 664002 Russia*

*e-mail: LidaL@sifbr.irk.ru

It has been established that cyclic adenosine monophosphate (cAMP), a second messenger of the adenylate cyclase signaling system, and Ca^{2+} are able to dose-dependently modulate the activity of various forms of superoxide dismutase (SOD) in the root cells of pea seedlings of the Rondo variety. The effect of cAMP on SOD activity in pea root cells was studied on intact seedlings by incubating their roots in 50 nM n-dibutyryl-cAMP, a fat-soluble analogue of cAMP, which led to an increase in the intracellular concentration of cAMP. Incubation of similar roots in 800 μM suramin, an inhibitor of transmembrane adenylate cyclase, contributed to a significant decrease in endogenous cAMP levels. In each of these variants, the SOD activity measured in the supernatant obtained from the root homogenate changed. Under the influence of n-dibutyryl-cAMP, the total SOD activity increased to 230%; SOD inhibitors, 3 mM KCN or 3 mM H_2O_2 , added to the homogenate, reduced its activity (180 and 190% of the control, respectively). During incubation with suramin, the total activity decreased to 40% of the control value, while with the additional use of SOD inhibitors it decreased to 50–60%. Incubation of seedlings in 400 μM LaCl_3 solution resulted in a decrease in total SOD activity to 73% and in the presence of 3 mM KCN, to 56% of the control, and when 3 mM H_2O_2 was added to the homogenate, to 67%. A similar incubation of seedlings in 1 mM EGTA led to a decrease in total activity by 32%, and the inhibitors had no additional effect. The effect of calcium deficiency or excess on SOD activity was studied in a homogenate of pea seedling roots. When a calcium ion chelator, 100 mM EGTA, was added to the root homogenate, a decrease in the total SOD activity to 81% was observed; when inhibitors (H_2O_2 or KCN) were added, an even greater decrease in SOD activity occurred, up to 65 and 51%, respectively. The addition of 500 nM CaCl_2 to the homogenate slightly increased the total SOD activity; KCN reduced SOD activity by approximately 20%, and H_2O_2 had no effect on this indicator. When a higher concentration of CaCl_2 , 500 μM , was added, the total activity did not change (100%), in the variant with KCN it decreased by 30%, and when H_2O_2 was added it remained almost unchanged. We conclude that cAMP most likely has an indirect effect on SOD activity, while calcium ions probably act directly on the active site of the enzyme molecule; Moreover, each form of SOD differs in sensitivity to calcium.

Keywords: Cu, Zn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD, pea seedling root, cAMP, Ca^{2+}