

Received: 2004.05.10
 Accepted: 2004.06.23
 Published: 2004.07.26

Zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa (EC-SOD) – budowa, właściwości i funkcje

Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) – structure, properties and functions

Michał Skrzycki, Hanna Czeczot

Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie

Zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa (EC-SOD) katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru i tlenu cząsteczkowego w międzykomórkowych przestrzeniach tkanek i płynach pozakomórkowych (w surowicy, płynie limfatycznym i mózgowo-rdzeniowym czy mazi stawowej). Eliminując ze środowiska komórki anionorodniki ponadtlenkowe zapobiega powstawaniu innych reaktywnych form tlenu i ich pochodnych. Jest glikoproteina zawierająca cynk i miedź, a w organizmie człowieka występuje głównie jako tetramer. Wykazuje duże powinowactwo do glikozoaminoglikanów, takich jak heparyna i siarczan heparanu. Odgrywa ważną rolę w utrzymaniu ciśnienia krwi, w funkcjonowaniu płuc, metabolizmie NO i w patologii chorób, takich jak miażdżyca, cukrzyca, reumatyzm. Praca opisuje strukturę EC-SOD, jej funkcjonowanie w tkankach oraz możliwości terapeutycznego zastosowania tego enzymu.

Słowa kluczowe:

zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa • wolne rodniki • stres oksydacyjny • choroby

Summary

EC-SOD catalyzes the dismutation of superoxide radical to hydrogen peroxide and oxygen in the interstitial spaces of tissues and in extracellular fluids (plasma, lymph, and synovial fluid). It eliminates superoxide radicals from the cell environment and prevents the formation of reactive oxygen species and their derivatives. EC-SOD is a secretory, tetrameric glycoprotein containing copper and zinc, with a high affinity to certain glycosaminoglycans, such as heparin and heparan sulfate. It plays an important role in maintaining vascular tone, lung function, and the metabolism of NO, and in the pathology of such diseases as atherosclerosis, diabetes, and arthritis. This paper describes EC-SOD structure, function in tissues, and possibilities of therapy with application of this enzyme.

Key words:

extracellular superoxide dismutase • free radicals • oxidative stress • diseases

Full-text PDF:

http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/5878.pdf

Word count:

4009

Tables:

–

Figures:

4

References:

125

Author's address: mgr Michał Skrzycki, Katedra i Zakład Biochemii AM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa,
e-mail: skrzyckimp@poczta.onet.pl

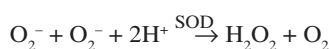
Wykaz skrótów: **AP-1** – białko aktywujące 1 (activating protein 1); **ARE** – element odpowiedzi na antyoksydanty (antioxidant response element); **CuZnSOD** – cynkowo-miedziowa dysmutaza ponadtlenkowa (copper-zinc superoxide dismutase); **CREB** – białko wiążące się z elementem odpowiadającym na cAMP (cAMP response element binding protein); **o.u.n** – ośrodkowy układ nerwowy; **DDC** – dietylodiotiokarbaminian; **EC-SOD** – pozakomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa (extracellular superoxide dismutase); **EGF** – śródbłonkowy czynnik wzrostowy (endothelial growth factor); **eNOS** – śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (endothelial nitric oxide syntase); **FGF** – czynnik wzrostowy fibroblastów (fibroblast growth factor); **FSH** – folitropina; **GRE** – element odpowiedzi na glukokortykoidy (glucocorticoids response element); **IFN** – interferon; **Iκβ** – inhibitor jądrowego czynnika NF-κβ; **IL** – interleukina; **MnSOD** – manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (manganese superoxide dismutase); **MRE** – element odpowiedzi na metale (metals response element); **NF-κβ** – czynnik jądrowy κβ (nuclear factor κβ); **PC7** – konwertaza preprotein 7 (preproteins convertase); **rECSOD** – rekombinowana ECSOD (recombined extracellular superoxide dismutase); **RFT** – reaktywne formy tlenu; **SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa (superoxide dismutase); **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor α); **XRE** – element odpowiedzi na ksenobiotyki (xenobiotics response element)

WSTĘP

Prawidłowemu metabolizmowi w komórkach organizmu towarzyszy powstawanie reaktywnych form tlenu i ich pochodnych. Zaburzenie fizjologicznej równowagi pomiędzy wytwarzaniem reaktywnych form tlenu, a ich nieuczynianiem prowadzi do stanu szoku tlenowego/stresu oksydacyjnego. Zwiększone wytwarzanie wolnych rodników w komórce występujące w stanach zaburzonego metabolizmu, niedotlenienia lub niedokrwienia, prowadzi do uszkodzenia podstawowych struktur komórkowych. Reaktywne pochodne tlenu łatwo reagują z komórkowymi makromolekułami, takimi jak lipidy, białka i DNA, prowadząc do zniszczenia błon komórkowych, niewłaściwej aktywacji lub inaktywacji enzymów oraz powstawania mutacji. Obecność różnych reaktywnych form tlenu oraz wolnych rodników wewnątrz i na zewnątrz komórek czy tkanek powoduje wiele zmian patologicznych. Ostatecznymi skutkami działania wolnych rodników tlenowych w komórkach organizmu są: mutacje, metaboliczne dysfunkcje, starzenie. Te z kolei są przyczyną rozwoju procesów zapalnych, nowotworów oraz zaburzonego funkcjonowania wielu narządów (serca, wątroby, nerek, płuc i innych) [31,32,47].

Przed uszkodzeniami oksydacyjnymi chroni organizm bariera antyoksydacyjna, w skład której wchodzi białka sekwestrujące metale, związki drobnocząsteczkowe, witaminy C, E i A oraz wyspecjalizowane enzymy o aktywności antyoksydacyjnej. Podstawowy enzym antyoksydacyjny – dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) w reakcji dysmutacji eliminuje ze środowiska komórki anionorodniki ponadtlenkowe zapobiegając powstawaniu innych reaktywnych form tlenu i ich pochodnych [30,122].

SOD



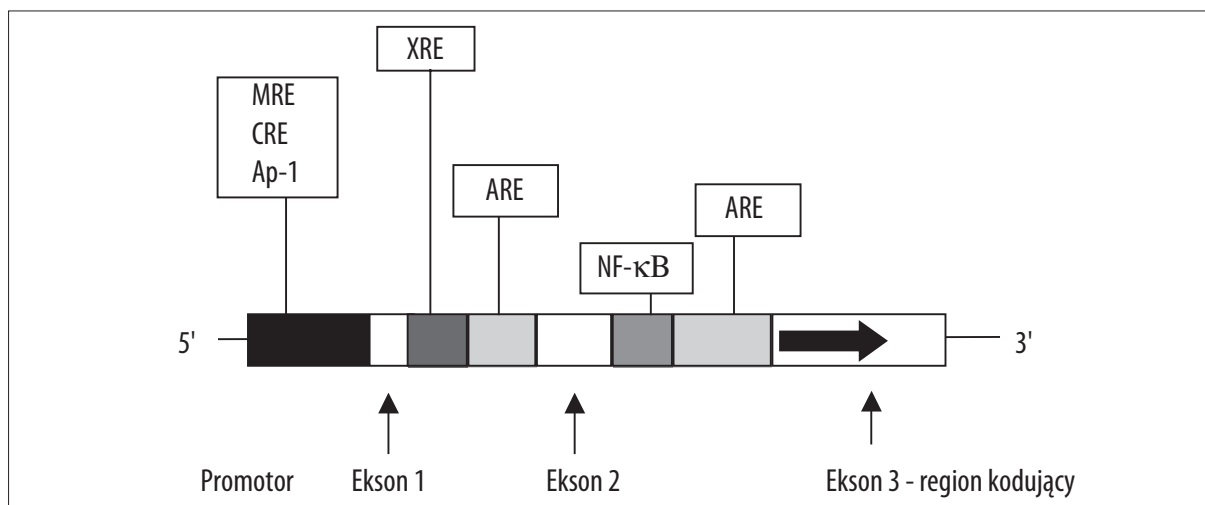
$$k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

W organizmie ssaków występują 3 izoenzymy dysmutazy: cytosolowa CuZnSOD (SOD-1) i mitochondrialna MnSOD (SOD-2) oraz dysmutaza pozakomórkowa EC-SOD (SOD-3). W cytoplazmie i jądrze każdej komórki obecna jest główna postać wewnątrzkomórkowej dysmutazy – CuZnSOD, która występuje jako 32 kDa homodimer. MnSOD, umiejscowiona przeważnie w macierzy mitochondrialnej jest 96 kDa homotetramerem. Na zewnątrz komórek, głównie na ich powierzchni, znajduje się związana z wielocukrami (proteoglikanami), pozakomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa (extracellular superoxide dismutase – EC-SOD). Nieprawidłowe działanie dysmutaz w komórkach organizmu prowadzi do rozwoju wielu patologii [80,114,123].

Wewnątrzkomórkowe dysmutazy CuZnSOD i MnSOD były bardzo intensywnie badane. Ich budowa i funkcje zostały szczegółowo opisane w wielu publikacjach naukowych. Stosunkowo najmniej wiadomo o działaniu pozakomórkowej dysmutazy EC-SOD w fizjologii i patologii [21,30,100,115,124].

WYSTĘPOWANIE

EC-SOD (EC 1.15.1.1) została odkryta stosunkowo późno, bo w 1982 roku. Występuje w tkankach, osoczu krwi i płynach wewnątrzkomórkowych takich jak limfa, maź stawowa, płyn śródmiąższowy i mózgowo-rdzeniowy [66,67,69]. Głównym miejscem występowania EC-SOD w tkankach jest macierz pozakomórkowa i powierzchnia komórek, gdzie występuje w stężeniu 20-krotnie wyższym niż w osoczu. Tkankowa EC-SOD stanowi 90–99% EC-SOD w organizmie [68,69]. Około 1% EC-SOD znajduje się w układzie naczyniowym, w równowadze pomiędzy osoczem a śródbłonkiem. Jej zawartość w tkankach jest bardzo różna. W największych ilościach występuje w naczyniach krwionośnych, płucach i łożysku. Mniejsze jej ilości znajdują się w mięśniach szkieletowych, wątrobie, mózgu i nerce [10,68,117]. Obecność EC-SOD wyka-



Ryc. 1. Budowa genu EC-SOD; AP-1 – sekwencja wiążąca białko aktywujące 1 (activating protein 1); ARE – element odpowiedzi na antyoksydanty (antioxidant response element); CRE – element odpowiedzi na cAMP (cAMP response element); MRE – element odpowiedzi na metale (metals response element); NF- κ B – sekwencja wiążąca czynnik jądrowy κ B (nuclear factor κ B); XRE – element odpowiedzi na ksenobiotyki (xenobiotics response element)

zono również w wielu liniach komórkowych np. fibroblastów, komórek glejowych i komórek śródbłonna [69,72]. Istnieje zgodność pomiędzy zawartością EC-SOD, a jej ekspresją w tkankach.

SWOISTOŚĆ TKANKOWA EC-SOD

U ludzi, w porównaniu z innymi gatunkami poziom ekspresji EC-SOD jest bardzo wysoki [69]. Szczególnie silna ekspresja ludzkiego mRNA EC-SOD (4,2 kb) występuje w sercu, łożysku, trzustce i płucach. Średni poziom ekspresji tego enzymu obserwowano w nerce, mięśniach szkieletowych i wątrobie. Natomiast najniższą ekspresję mRNA SOD stwierdzono w mózgu [27]. Podobny profil ekspresji mRNA EC-SOD wykazano u myszy [85].

Porównanie tkankowej aktywności EC-SOD z jej poziomem mRNA w sercu, trzustce, płucach i mózgu, wykazuje bardzo często wyraźną rozbieżność pomiędzy tymi wartościami, co prawdopodobnie wynika z różnej wydajności procesu translacji. Gen EC-SOD zawiera unikalne elementy odpowiedzialne za regulację jego ekspresji na poziomie potranskrypcyjnym i/lub potranslacyjnym [27].

BUDOWA GENU EC-SOD

Ludzki gen EC-SOD zbudowany z 5900 par zasad, jest umiejscowiony w chromosomie 4 (4p-q21) i składa się z trzech eksonów, przedzielonych dwoma intronami. Region kodujący o długości 720 par zasad jest w całości umiejscowiony wewnątrz 3 eksonu. W regionie promotorowym genu EC-SOD zidentyfikowano miejsce wiązania czynnika AP-1 i NF- κ B [11,27]. Nie występują w nim sekwencje TATA i CAAT, ale zawiera sekwencje nukleotydowe bogate w puryny [35,41,123]. Region 5' genu EC-SOD ma kilka potencjalnych sekwencji regulatorowych, takich jak: elementy odpowiedzi (response element) na glukokortykoidy, ksenobiotyki, antyoksydanty, metale ciężkie oraz estry forbolu (GRE, XRE, ARE, MRE, CREB) [123].

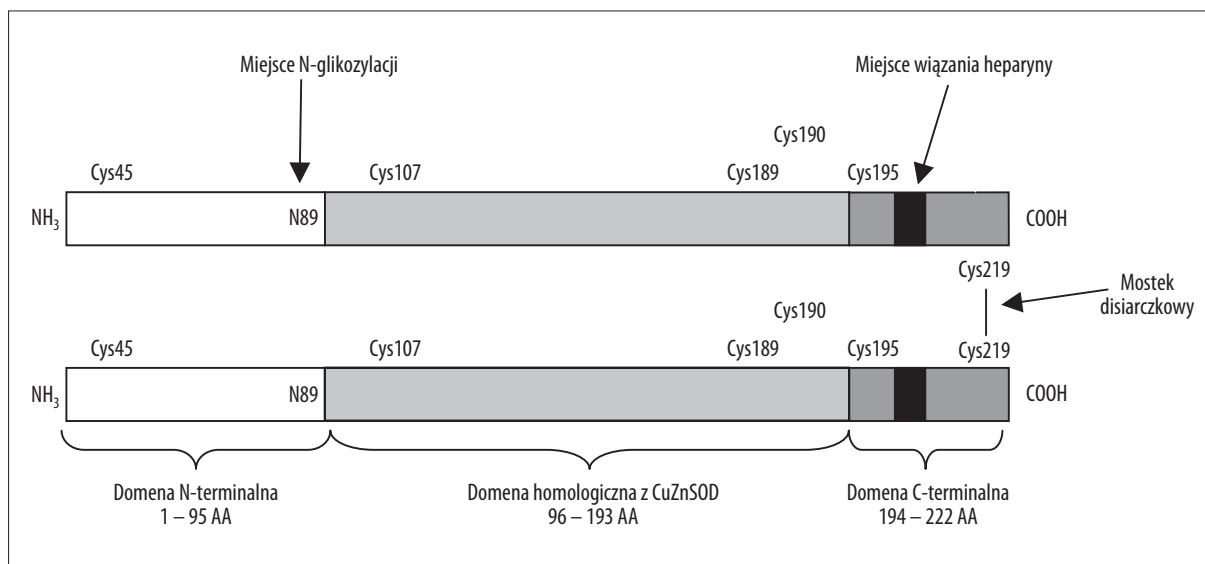
Gen EC-SOD jest w 60% homologiczny z genem CuZnSOD i wykazuje niewielką homologię z genem MnSOD [43,123] (ryc. 1).

BUDOWA BIAŁKA EC-SOD

EC-SOD jest słabo hydrofobową glikoproteiną o całkowitej masie molekularnej 135 kDa [66]. Występuje w organizmach głównie jako tetramer, rzadziej jako dimer [25,36,90]. Oprócz dimerów i tetramerów, EC-SOD może tworzyć także większe multimery. Tetramer składa się z dwóch dimerów, połączonych mostkami disiarczkowymi, utworzonymi pomiędzy C-terminalnymi resztami cysteiny obecnymi w każdej podjednostce [25,90]. Każda podjednostka EC-SOD zbudowana z 222 aminokwasów, zawiera jeden atom miedzi i jeden atom cynku [66,111]. Wykazano, że miedź i cynk są prawdopodobnie włączane do EC-SOD w chwili jego wydzielania lub bezpośrednio po wydzieleniu do przestrzeni pozakomórkowej. Proces wbudowywania jonów do EC-SOD zależy od ich stężenia w przestrzeni pozakomórkowej. Istnieją dane, że u człowieka i myszy, za tworzenie tetramerów jest odpowiedzialna reszta waliny położona w pozycji 28 łańcucha białkowego. Natomiast w przypadku szczura w pozycji 28 zamiast waliny jest obecna reszta kwasu asparaginowego, co sprawia, że EC-SOD występuje w postaci dimerów [15].

Każda podjednostka EC-SOD o wielkości 30 kDa, dzieli się na trzy domeny funkcjonalne poprzedzone peptydem sygnałowym, zbudowanym z 18 reszt aminokwasowych [66,111].

Domę N – terminalną stanowią reszty aminokwasowe 1-95, zawierające jedno miejsce N- glikozylacji w pozycji Asn89. Glikozylacja w tym miejscu zwiększa rozpuszczalność enzymu [20,42,105]. Sekwencja aminokwasów nie wykazuje homologii z CuZnSOD. Hydrofobowy charakter (tworzony przez reszty aminokwasów 14-32) α -helikalnych elementów tej domeny spełnia ważną funkcję we wzajemnych oddziaływaniach podjednostek i powstawaniu tetramery [90].



Ryc. 2. Budowa białka EC-SOD

W domenie środkowej, zawierającej centrum aktywne, reszty aminokwasów od His 96 do Gly 193 wykazują silną homologię z CuZnSOD, z czego 49 z 76 reszt jest identyczna. Domena ta stanowi centralną część podjednostki i jest odpowiedzialna za funkcje katalityczne. Zarówno w przypadku CuZnSOD jak i EC-SOD ligandami w centrum aktywnym dla Cu są reszty aminokwasów His 96, His 98, His 113, His 163, natomiast dla Zn reszty aminokwasów His 113, His 121, His 124, Asp 127. Domena ta zawiera również Cys 107 i Cys 189, które tworzą wewnętrzny mostek disiarczkowy w każdej podjednostce zarówno EC-SOD jak i CuZnSOD.

Domena C- terminalna składa się z reszt aminokwasów 194-222, która jest silnie hydrofilowa i w pozycjach 210-218 zawiera sekwencję dziewięciu dodatnio naładowanych aminokwasów (sześć Arg i trzy Lys) [42]. Jest to bardzo unikalna domena, która ma zdolność wiązania się z proteoglikanami, występującymi powszechnie na powierzchni komórek i w zewnątrzkomórkowej macierzy [67] (ryc. 2).

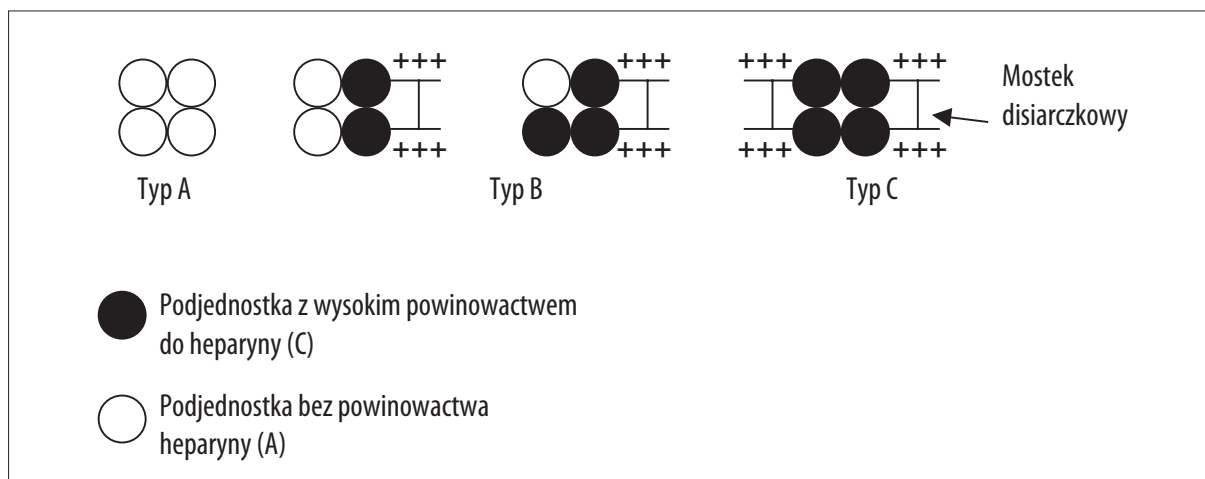
Każda podjednostka EC-SOD zawiera sześć reszt cysteiny, z których Cys219 jest odpowiedzialna za połączenie pomiędzy podjednostkami. Cys107 i Cys189 tworzą wewnętrzny mostek disiarczkowy w każdej podjednostce, natomiast rola pozostałych reszt cysteiny jest nieznana. W zależności od umiejscowienia mostków disiarczkowych w trzeciorzędowej strukturze EC-SOD występuje w dwóch postaciach (aktywnej i nieaktywnej). Postać aktywna EC-SOD wykazuje podobną aktywność katalityczną, lokalizację i układ mostków disiarczkowych jak cytosolowa CuZnSOD. Druga postać EC-SOD (nieaktywna) charakteryzuje się innym układem mostków disiarczkowych i nie ma aktywności katalitycznej [94].

EC-SOD jest enzymem bardzo stabilnym, wykazuje oporność na działanie wysokiej temperatury, $\text{pH} > 10$ i wysokich stężeń mocznika [110]. Jej aktywność jest hamowana przez nadtlenek wodoru, azydki, cyjanki czy dietyloditiokarbaminian (DDC) [70]. Ma duże powinowactwo do heparyny [64,67]. C-terminalna domena EC-SOD (aminokwasy

210-215) jest niezbędna do interakcji enzymu z heparyną i siarczanem heparanu [5,82,96,112]. Oba te proteoglikany oddziałują elektrostatycznie z dodatnio naładowanymi argininami i lizynami w C-terminalnym regionie EC-SOD [49]. Chemiczna modyfikacja reszt tych aminokwasów znosi powinowactwo EC-SOD do heparyny i siarczanu heparanu [2]. Interakcje EC-SOD z proteoglikanami, występującymi na powierzchni komórek i w macierzy zewnątrzkomórkowej decydują o jej pozakomórkowej lokalizacji [52]. W wyniku proteolizy domena wiążąca heparynę może być usunięta z EC-SOD [5,48,74,97]. Proces ten decyduje o umiejscowieniu EC-SOD w tkankach organizmu.

W osoczu krwi człowieka, w zależności od powinowactwa do heparyny, wykazano obecność 3 frakcji EC-SOD. Frakcja A EC-SOD wykazuje brak powinowactwa do heparyny. Frakcja B ma słabe powinowactwo. Frakcja C charakteryzuje się dużym powinowactwem do heparyny [53,67,82,97]. W tkankach ssaków występuje głównie EC-SOD typu C [69,97]. Możliwe jest również występowanie w tkankach typu A i B EC-SOD np. u szczurów [53]. Frakcja C składa się z tetramerów EC-SOD zawierających podjednostki z funkcjonalną C-terminalną domeną wiążącą heparynę (CCCC). Frakcja B składa się z heterogennych tetramerów EC-SOD, w skład których wchodzi funkcjonalne domeny wiążące heparynę i domeny bez powinowactwa do heparyny (CCCA i CCAA). Frakcja A składa się z homotetramerów, których wszystkie podjednostki nie mają domen wiążących heparynę (AAAA) [96] (ryc. 3).

U ludzi syntetyzowana jest głównie EC-SOD typu C, związana z siarczanem heparanu, znajdującym się na powierzchni komórek (np. komórek śródbłonna) i obecnym w macierzy pozakomórkowej. W płynach pozakomórkowych EC-SOD typu C występuje w niewielkich ilościach w postaci wolnej. Dożylnie wstrzyknięcie heparyny prowadzi do gwałtownego wzrostu poziomu EC-SOD typu C w surowicy, co wskazuje na jej uwolnienie z powierzchni komórek [7]. O ile typy A i B EC-SOD obecne są głównie w surowicy, to typ C EC-SOD może występować zarówno w postaci związanej na powierzchni komórek śródbłonna,



Ryc. 3. Podjednostkowa budowa EC-SOD z podziałem na typy ze względu na powinowactwo do heparyny

jak i w postaci wolnej w surowicy [91]. Wiązanie EC-SOD na powierzchni komórek śródbłonna jest efektywnym sposobem ich ochrony przed O_2^- powstającym w przestrzeni pozakomórkowej [53,54].

Heterogenne postacie EC-SOD (typy A i B) w osoczu są obecne dzięki proteolitycznemu odcięciu z enzymu domeny wiążącej heparynę [22]. Osłabia to interakcję tego enzymu z proteoglikanami (siarczanem heparanu) na powierzchni komórek i ze składnikami macierzy oraz przyspiesza przejście przez naczynia włosowate i limfatyczne EC-SOD do krwiobiegu. Proces ten wiąże się również z zamianą EC-SOD typu C w typ A lub B [97].

Dotąd nie poznano proteazy odpowiedzialnej za odcięcie domeny wiążącej heparynę w EC-SOD. Działanie takie przypisywane jest trypsynie [48]. W badaniach *in vitro* wykazano, że proteazą o takim działaniu jest furyna. Proteolityczne odcięcie domeny wiążącej heparynę w EC-SOD z udziałem furyny jest procesem dwuetapowym. W pierwszym etapie furyna przecina EC-SOD wewnątrz zasadowego regionu domeny wiążącej heparynę. Prawdopodobnie istnieją jeszcze inne wewnątrzkomórkowe proteazy o podobnym działaniu do furyny, które również uczestniczą w tym procesie. Następnie włącza się karboksypeptydaza, która usuwa pozostałe reszty aminokwasów zasadowych (argininy, lizyny), a na końcu C łańcucha pozostaje kwas glutaminowy. W konsekwencji tych przemian zmniejsza się powinowactwo EC-SOD do heparyny. Mutacja Arg213Gly sprawia, że EC-SOD jest odporna na działanie furyny.

Proces odcięcia domeny wiążącej heparynę EC-SOD zależny od furyny wydaje się mieć istotny wpływ na tkankową lokalizację i okres półtrwania enzymu, który dla typu C wynosi około 85 h, natomiast dla pozostałych typów tylko 7 h [13, 56].

Proteoliza EC-SOD typu C i nagromadzenie EC-SOD typu A i B w surowicy prowadzi do zaburzeń statusu antyoksydacyjnego w poszczególnych tkankach. W wyniku zmniejszenia powinowactwa do heparyny, EC-SOD pozbawiona C-końcowego fragmentu, z powierzchni komórek i macierzy zewnątrzkomórkowej dostaje się do krwiobiegu, przez co naraża te struktury na uszkodzenia oksydacyjne.

Ostatnie doniesienia naukowe sugerują, że w wielu typach komórek EC-SOD może również wiązać się z błoną jądra komórki. Pozwala to przypuszczać, że EC-SOD może zapewniać ochronę antyoksydacyjną dla DNA i białek jądrowych. Proteoliza domeny wiążącej heparynę może częściowo pozbawić jądro ochrony antyoksydacyjnej i tym samym spowodować naruszenie integralności genomu i zaburzenia ekspresji genów biorących udział w odpowiedzi na zmiany stanu redoks [48,86].

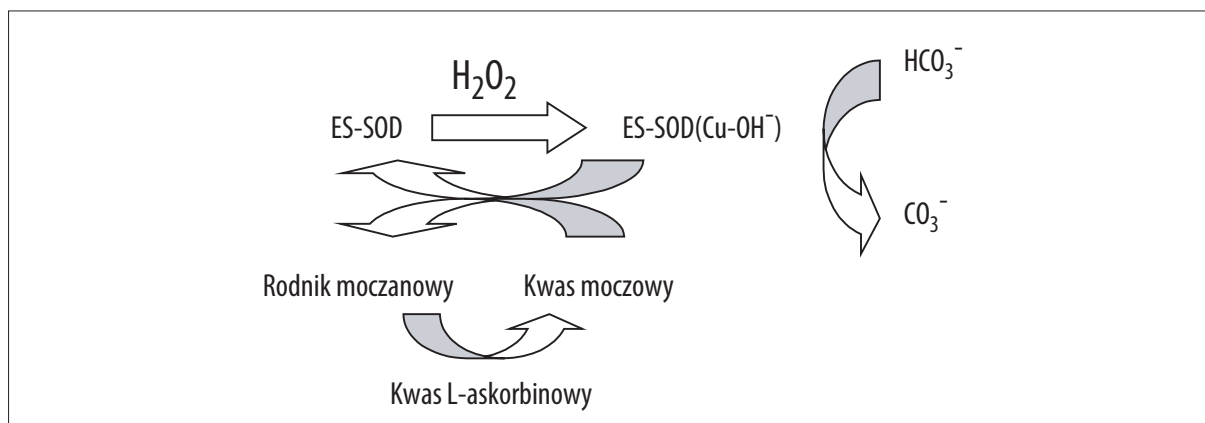
FUNKCJE EC-SOD

Pozakomórkowa dysmutaza nadadtlenkowa unieczynniana anionorodnik nadadtlenkowy w przestrzeniach międzykomórkowych, w macierzy pozakomórkowej oraz w naczyniach krwionośnych. Jest to możliwe ponieważ występuje ona zarówno w postaci związanej z macierzą pozakomórkową, jak i wolnej, dzięki czemu może chronić powierzchnię komórek, a także wymiatać wolne rodniki ze światła naczyń krwionośnych [71].

Jest ona najważniejszym enzymem antyoksydacyjnym, unieczynnającym anionorodnik nadadtlenkowy w przestrzeni pozakomórkowej. EC-SOD nie tylko katalizuje dysmutację O_2^- do nadtlenu wodoru, ale podobnie jak CuZnSOD wykazuje również aktywność peroksydazową.

EC-SOD katalizują reakcję, w której H_2O_2 wykorzystywany jako substrat, tworzy związek przejściowy (EC-SOD Cu-OH⁻), gdzie rodnik hydroksylowy (OH⁻) utlenia histydynę w centrum aktywnym enzymu, co prowadzi do jego inaktywacji. Utworzony związek przejściowy EC-SOD Cu-OH⁻ reaguje z anionem HCO_3^- , który jest utleniany przez Cu-OH⁻ do rodnika węglanowego CO_3^- . Związek ten ma właściwości utleniające i może wchodzić w reakcje z innymi związkami. Natomiast EC-SOD wraca do postaci aktywnej. Brak HCO_3^- prowadzi do inaktywacji EC-SOD przez nadtlenek wodoru [122] (ryc. 4).

Niedawno wykazano, że obecność kwasu moczowego w osoczu krwi (już w fizjologicznym stężeniu) zapobiega inaktywacji EC-SOD i CuZnSOD przez nadtlenek wodoru. Powstający w reakcji rodnik moczanowy jest szyb-



Ryc. 4. Aktywność peroksydazowa EC-SOD

ko regenerowany w reakcji z kwasem L-askorbinowym do kwasu moczowego [59].

Ponieważ katalaza i peroksydaza glutationowa – enzymy rozkładające H₂O₂ znajdują się głównie wewnątrz komórki, to EC-SOD spełnia dominującą rolę w jego rozkładzie poza komórką. Jest to szczególnie istotne w homeostazie układu naczyniowego i wskazuje, że EC-SOD nie tylko redukuje śródmiąższowy O₂⁻, ale również zmniejsza ilość nadtlenu wodoru [59,125].

Szczególną funkcją EC-SOD jest ochrona bioaktywności NO w układzie naczyniowym i w tkance śródmiąższowej [65]. Tlenek azotu dyfundując z komórek śródbłonna do komórek mięśni gładkich naczyń jest narażony na inaktywację przez O₂⁻, do którego ma duże powinowactwo. W reakcji tej powstaje toksyczny nadtlenuazotyn (ONOO⁻), który jest odpowiedzialny za nitrowanie reszt tyrozynowych białek, co prowadzi do zaburzenia ich funkcji i powoduje dalsze uszkodzenia komórek. EC-SOD wymiatając anionorodnik ponadtlenkowy z przestrzeni pozakomórkowej nie tylko chroni komórki przed bezpośrednimi uszkodzeniami oksydacyjnymi, ale także przed uszkodzeniami indukowanymi przez pochodne rodników tlenowych. Zapewnia to prawidłowe funkcjonowanie procesów regulowanych przez NO, związanych głównie z przepływem krwi przez naczynia krwionośne. EC-SOD unieczynnijając anionorodnik ponadtlenkowy zwiększa dostępność NO, który w jej obecności może działać jako cząsteczka sygnałowa w układzie krążenia [92].

Ilość EC-SOD na powierzchni komórek i w naczyniach krwionośnych zmienia się w stanach chorobowych, co może świadczyć o jej roli w ich powstawaniu. Podwyższenie poziomu EC-SOD obserwowano u osób z chorobami nerek, wątroby oraz w cukrzycy. Natomiast obniżenie ilości EC-SOD stwierdzono w astmie oraz w niektórych chorobach płuc. Z kolei w chorobach serca czy naczyń krwionośnych nie zaobserwowano znaczących zmian w poziomie EC-SOD [4,55,57,109].

REGULACJA EKSPRESJI EC-SOD

W komórkach mięśni, naczyń krwionośnych i komórkach pęcherzykowych płuc typu 2 cytokiny prozapalne, takie jak IFN-γ oraz IL-1 zwiększają ekspresję mRNA i biał-

ka EC-SOD, natomiast TNF-α i IL-1α obniżają ją [73,102]. W regionie promotorowym EC-SOD istnieje element regulatorowy dla czynnika transkrypcyjnego NF-κβ, który jest aktywowany przez działanie cytokin.

Ekspresja EC-SOD w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych zwiększa się również pod wpływem wielu czynników wazoaktywnych (np. histamina, wazopresyna, oksytocyna, endotelina 1, angiotensyna II i serotonina) w sposób zależny od białek G [34]. Heparyna i siarczan heparanu również zwiększają ekspresję EC-SOD, jednakże nie jest jasne czy dzieje się to poprzez wiązanie z receptorem czy poprzez bezpośrednie oddziaływanie z elementami promotora. Stopień indukcji genu EC-SOD wydaje się zależny od poziomu sulfatacji glikoaminoglikanów (proteoglikanów) [2,26].

Natomiast wszystkie czynniki wzrostowe obniżają ekspresję EC-SOD poprzez oddziaływanie z receptorem o aktywności kinazy tyrozynowej [103].

Z kolei, mechanizmem regulującym poziom białka EC-SOD w naczyniach krwionośnych jest internalizacja i degradacja EC-SOD w komórkach śródbłonna [83].

Ekspresja EC-SOD może być regulowana również przez hormony (np. FSH, estrogeny), cAMP i wiele czynników utleniających np. hydrochinon, katechol, kumen, selen, cynk, jony Fe²⁺ i Cu²⁺ oraz wysokie ciśnienie parcjale tlenu [8,17,76,77,84,87]. Wykazano że, estrogeny powodują zwiększenie ekspresji EC-SOD i MnSOD oraz są odpowiedzialne za stabilizację mRNA EC-SOD. Można więc przypuszczać, że jednym ze sposobów w jaki estrogeny chronią naczynia krwionośne jest ich działanie poprzez pobudzenie ekspresji EC-SOD i MnSOD [104].

POLIMORFIZM EC-SOD

W każdej populacji u około 2% ludzi obserwowano w surowicy wyższą aktywność EC-SOD. Szczegółowe badania przeprowadzone w Japonii i Szwecji wykazały, że ze względu na poziom EC-SOD w surowicy można ludzi podzielić na dwie grupy: z małą (120–400 ng/ml) i dużą (powyżej 400 ng/ml) jej zawartością [4,5,98]. W przeprowadzonych badaniach w Japonii wyodrębniono w badanej populacji dominującą grupę osób (93,6% całości) o małym stężeniu

EC-SOD i grupę z dużym stężeniem EC-SOD (6,4% całości) w surowicy. W grupie pierwszej, EC-SOD wykazywała heterogenność pod względem powinowactwa do heparyny (typ A i B). Natomiast w grupie drugiej dominował typ C EC-SOD [5]. Duże stężenie EC-SOD w surowicy osób z grupy drugiej i u jednego z ich rodziców wskazuje na uwarunkowanie genetyczne [4]. Podobne badanie przeprowadzone na populacji szwedzkiej, również wykazały występowanie osób charakteryzujących się fenotypowym wariantem EC-SOD ze zmniejszonym powinowactwem do heparyny (typ A i B), co w rezultacie 10-krotnie podwyższało poziom tego enzymu w surowicy.

Przeprowadzone badania z zastosowaniem technik biologii molekularnej wykazały, że jest to związane z wystąpieniem mutacji typu substytucji G-C, gdzie arginina w pozycji 213 jest zastąpiona przez glicynę (Arg213Gly) w domenie wiążącej heparynę każdej podjednostki EC-SOD [29,98]. Mutacji towarzyszy zwiększenie stężenia EC-SOD w surowicy. Wynika to ze zmniejszenia powinowactwa EC-SOD do heparyny na powierzchni komórek śródbłonka i co powoduje uwalnianie tego enzymu do światła naczyń krwionośnych [3,9]. Następstwa tej mutacji nie są do końca poznane. W większości przypadków, u osób z mutacją Arg213Gly, nie stwierdzano żadnych bezpośrednich fizycznych czy klinicznych zaburzeń. Jednak obecność tej mutacji jest niebezpieczna dla chorych z cukrzycą i wymagających hemodializy [119] ponieważ w trakcie przetaczania krwi dochodzi u nich do utraty EC-SOD z krwiobiegu. U ludzi z tą mutacją obserwuje się także przyspieszony postęp rozwoju wad nerek [120].

U ludzi oprócz wyżej opisanych mutacji rozpoznano i opisano dwie dodatkowe mutacje w genie EC-SOD. Jedna to zastąpienie treoniny alaniną w pozycji 40 na N-końcu EC-SOD. Druga to cicha mutacja w pozycji aminokwasu 280. Obecnie, mutacjom tym nie zostały przypisane żadne objawy chorobowe [120].

ROLA EC-SOD W UKŁADZIE KRWIONOŚNYM

Naczynia krwionośne ludzi, w porównaniu z tkankami (np. mięśnie szkieletowe) zawierają wyjątkowo duże ilości EC-SOD, co wskazuje na jej istotną funkcję wewnątrz ścian naczyń [51,59]. U ludzi EC-SOD jest dominującą postacią SOD i stanowi 70% całkowitej jej aktywności w naczyniach krwionośnych, szczególnie w ścianach tętnic. Głównym źródłem tego enzymu w ścianie naczyń krwionośnych są komórki mięśni gładkich. W naczyniach krwionośnych EC-SOD występuje przede wszystkim w macierzy pozakomórkowej i w mniejszym stopniu na powierzchni komórek śródbłonka, połączona z proteoglikanami siarczanu heparanu. Niewielkie ilości EC-SOD występują również w surowicy [50,89,91,101,116].

Mimo bardzo dużego zainteresowania rolą EC-SOD oraz intensywnych badań, mechanizm działania EC-SOD w układzie krwionośnym nie jest jeszcze do końca poznany. Uważa się, że EC-SOD, unieczyniając anionorodnik ponadtlenkowy, pozwala na swobodne działanie tlenu azotu, który jest wyjątkowo wrażliwy na inaktywację przez ten rodnik [38,58,92]. Reaktywność NO z anionorodnikiem ponadtlenkowym znacznie przewyższa stopień dysmutacji tego rodnika przez SOD [65]. EC-SOD jest obecna w dużych

ilościach pomiędzy śródbłonkiem a mięśniami gładkimi otaczającymi naczynia krwionośne [50,89,91]. Jest to ten sam obszar, w którym NO dyfunduje od komórek wydzielających go do komórek efektorowych (mięśnie gładkie). Duża aktywność EC-SOD w tym regionie jest ważnym czynnikiem w utrzymaniu małych stężeń anionorodnika ponadtlenkowego i tym samym zabezpieczania fizjologicznej funkcji NO [92], dlatego EC-SOD przypisuje się udział w regulacji napięcia naczyń krwionośnych. Jest to możliwe, ponieważ obecna w nich EC-SOD związana z proteoglikanami siarczanu heparanu na powierzchni komórek śródbłonka, dysmutuje anionorodnik ponadtlenkowy, co zapewnia prawidłową relaksację mięśni gładkich naczyń, wywołaną przez NO [1].

Ponieważ ekspresja EC-SOD w naczyniach krwionośnych jest bardzo duża to nawet przy silnym stresie oksydacyjnym nie brakuje tego enzymu [46]. Wydaje się, że regulacja syntezy NO i ekspresja EC-SOD są ze sobą powiązane [6,37,45]. Wykazano wyraźny wpływ tlenu azotu na ekspresję EC-SOD. Zwiększenie ekspresji EC-SOD przez NO wydaje się ważnym mechanizmem dodatniego sprzężenia zwrotnego, gdzie śródbłonkowy NO stymuluje ekspresję EC-SOD w przylegających komórkach mięśni gładkich. Mechanizm ten zabezpiecza NO przed degradacją przez O_2^- , podczas jego przemieszczania pomiędzy tymi dwoma typami komórek układu krwionośnego [33,113,121].

ROLA EC-SOD W FUNKCJONOWANIU PŁUC

Płuca są narządem szczególnie wrażliwym na działanie wysokich stężeń tlenu. Stres oksydacyjny towarzyszy wielu chorobom układu oddechowego np. astmie, chronicznym zapaleniom płuc, chorobom mięszu płuc, samostnym zwłóknieniom płuc i ziarnicy, złośliwym nowotworom płuc [11,18,23,39,89,108]. Płuca są chronione przed działaniem reaktywnych form tlenu (RFT) i ich pochodnych przez wiele antyoksydacyjnych mechanizmów. Utrzymanie równowagi pomiędzy wolnymi rodnikami tlenowymi/wolnymi rodnikami azotowymi, a antyoksydantami w płucach jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania tego narządu. Jest to bardzo ważne, ponieważ drogi oddechowe bardziej niż inne tkanki są narażone na duże stężenia tlenu [91]. Wytwarzanie małych ilości wolnych rodników tlenowych/wolnych rodników azotowych jest bardzo istotne do prawidłowych funkcji fizjologicznych w płucach: rozluźniania mięśni gładkich w drogach oddechowych i naczyniach krwionośnych oraz odpowiedzi immunologicznej. Zaburzenie równowagi oksydant/antyoksydant w płucach jest uważane za główną przyczynę rozwoju wielu chorób dróg oddechowych. Szczególną rolę w modulowaniu lub zapobieganiu chorobom płuc pełni między innymi EC-SOD. Jest ona najważniejszym pozakomórkowym enzymem antyoksydacyjnym w tkance płucnej. Jej szczególna rola w ochronie płuc przed RFT została potwierdzona w wielu doświadczeniach *in vitro* oraz *in vivo* [16,28,70].

EC-SOD ulega selektywnie ekspresji tylko w niektórych komórkach płuc, tj. nabłonku oskrzeli, śródbłonku naczyń krwionośnych, komórkach pęcherzyków płucnych typu 2, makrofagach pęcherzyków [28,107]. Takie precyzyjne umiejscowienie EC-SOD może świadczyć o jej swoistych funkcjach: ochronie przed stresem oksydacyjnym

składników macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak kolagen, a także o regulacji sygnałów komórkowych, które są przekazywane i modulowane przez RFT [89].

W płucach ludzi EC-SOD jest umiejscowiona głównie w macierzy zewnątrzkomórkowej naczyń, dróg oddechowych i przegrody płucnej. W mniejszych ilościach występuje wewnątrz komórek nabłonka oskrzeli i makrofagów pęcherzyków, związana z kolagenem typu I dookoła naczyń dróg oddechowych i przegrody płucnej [24,63,89].

W fizjologicznych warunkach poziom EC-SOD w płucach wystarcza do unieczynnienia powstającego w przestrzeni pozakomórkowej anionorodnika ponadtlenkowego. W stanach patologicznych (stany zapalne dróg oddechowych) często występuje jego nadmiar, co może odgrywać ważną rolę zarówno w zmniejszaniu biodostępności tlenu azotu, jak i prowadzić do uszkodzeń wywołanych nadmiarem RFT [12].

Skutkiem stanów zapalnych w płucach jest wyraźne obniżenie poziomu EC-SOD, co związane jest z napływem neutrofilów do ogniska zapalnego. Proteazy wydzielane z neutrofilów powodują odcięcie fragmentu C-końcowego EC-SOD i uwolnienie enzymu z macierzy zewnątrzkomórkowej tkanki płucnej do płynu nawilżającego pęcherzyki płucne. Ponadto, powstający anionorodnik ponadtlenkowy indukuje wydzielanie kolagenaz przez neutrofile, co zapoczątkowuje degradację kolagenu. Prowadzi to do nasilenia odpowiedzi zapalnej [14,75,99]. Wymiatanie anionorodnika ponadtlenkowego przez EC-SOD może wspomagać rozluźnianie mięśni gładkich w naczyniach płucnych lub drogach oddechowych oraz zapobiegać degradacji tkanki płucnej i tym samym osłabiać reakcje zapalne.

ROLA EC-SOD W FUNKCJONOWANIU MÓZGU

Badania dotyczące roli EC-SOD w mózgu były przeprowadzane głównie na modelach zwierzęcych (mysich oraz szczurzych). W badaniach tych wykazano, że EC-SOD znajduje się głównie w hipokampie i prążkowie. Jej obecność stwierdzono również w płynie mózgowo-rdzeniowym. Ekspresję EC-SOD obserwowano *in vitro* także w komórkach glejowych i astrocytach. Ekspresja EC-SOD w mózgu, w porównaniu z innymi organami myszy jest mała [68,79,81,88].

Ważną rolę w obronie antyoksydacyjnej mózgu pełnią także astrocyty. Neuroprotekcynna rola astrocytów jest związana m.in. z aktywnością EC-SOD, która uzupełnia działanie innych enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów [59,118].

W warunkach hiperoksji, zwężenie naczyń krwionośnych w mózgu zmniejsza ilości tlenu dostarczanego do mózgu i częściowo w ten sposób chroni mózg przed nadmiernym natlenieniem tkanki. Z kolei NO działając jako środek rozszerzający naczynia może znosić działanie zwężające tlen, tym samym zwiększając natlenienie mózgu i prowadzić do stresu oksydacyjnego oraz związanych z nim konsekwencji dla mózgu.

W warunkach hiperoksji mózgu EC-SOD podwyższa biodostępność NO, co powoduje zwiększenie dopływu krwi do mózgu i nasila stres oksydacyjny w tkance mózgowej [19]. Podawanie inhibitora syntazy tlenu azotu N-nitro-L-argininy, zdecydowanie zmniejszało toksyczność tlenu w o.u.n. u myszy [88].

Wydaje się, że do prawidłowego funkcjonowania mózgu musi być zachowana równowaga pomiędzy oksydantami i antyoksydantami.

EC-SOD JAKO CZYNNIK TERAPEUTYCZNY

Ponieważ aktywność EC-SOD jest obniżona w wielu chorobach, wydaje się, że może być ona potencjalnym celem w terapii antyoksydacyjnej. Istnieją przekonujące dane doświadczalne dotyczące jej zastosowania. Czas półtrwania EC-SOD w naczyniach krwionośnych wynoszący około 20 h i duże powinowactwo EC-SOD do siarczanu heparanu w ścianach naczyń wskazują, że podawanie rekombinowanej EC-SOD (rEC-SOD) może przeciwdziałać zaburzeniom związanym z nasilonym wytwarzaniem anionorodnika ponadtlenkowego [40,56,60,106].

W wielu badaniach wykazano przydatność EC-SOD w terapii i zapobieganiu takich chorób jak artretyzm, zatrucia wątroby, choroba wieńcowa, patologia naczyń krwionośnych mózgu itp. [44,61,62,78,108]. Badano również przydatność EC-SOD w terapii genowej, jako czynnika chroniącego komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [44]. Zdolność EC-SOD do wiązania się z powierzchnią komórek pozwala na lepszą ochronę ścian naczyń krwionośnych i serca niż inne izoformy SOD podawane dożylnie, ponieważ nie mogą one przenikać do przestrzeni międzykomórkowej. Natomiast EC-SOD podawana w postaci wirusowego wektora jest jedyną izoformą SOD, która jest naturalnie wydzielana z komórek, a więc jest wyjątkowo dobrze przystosowana do wytwarzania w wątrobie i transportu w organizmie [95,108].

Terapia genowa z zastosowaniem EC-SOD daje szerokie możliwości ochrony układu krwionośnego przed miażdżycą, a w szczególności przed zawałem serca. Ma to istotne znaczenie dla rozwoju nowych strategii kardioprotekcji [93,95].

Istnieją dane, że wykorzystanie transferu genu EC-SOD do komórek wątroby wyraźnie zmniejsza uszkodzenia i nekrozę komórek wątroby wywołane przez paracetamol [61]. Zastosowanie terapii genowej z użyciem EC-SOD w leczeniu reumatyzmu, również było korzystne ponieważ redukowało kliniczne objawy chorobowe [44].

Możliwość modyfikowania poziomu i aktywności EC-SOD w organizmie może okazać się użyteczne w leczeniu wielu chorób. Z kolei lepsze poznanie i zrozumienie roli EC-SOD w patogenezie chorób powinno dostarczyć wiedzy o potencjalnych terapeutycznych możliwościach EC-SOD.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abrahamsson T, Brandt U, Marklund S.L., Sjoqvist P.O.: Vascular bound recombinant extracellular superoxide dismutase type C protects against the detrimental effects of superoxide radicals on endothelium-dependent arterial relaxation. *Circ. Res.*, 1992; 70: 264–271
- [2] Adachi T, Marklund, S.L.: Interactions between human extracellular superoxide dismutase C and sulfated polysaccharides. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 8537–8541
- [3] Adachi T, Morihara N, Yamazaki N, Yamada H, Futenma A, Kato K, Hirano K.: An arginine-213 to glycine mutation in human extracellular superoxide dismutase reduces susceptibility to trypsin-like proteinases. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1996; 120: 184–188
- [4] Adachi T, Nakamura M, Yamada H, Kitano M, Futenma A, Kato K, Hirano K.: Pedigree of serum extracellular superoxide dismutase level. *Clin. Chim. Acta*, 1993; 223: 185–187
- [5] Adachi T, Ohta H, Yamada H, Futenma A, Kato K, Hirano K.: Quantitative analysis of extracellular superoxide dismutase in serum and urine by ELISA with monoclonal antibody. *Clin. Chim. Acta*, 1992; 212: 89–102
- [6] Adachi T, Wang X.L.: Association of extracellular superoxide dismutase phenotype with the endothelial constitutive nitric oxide synthase polymorphism. *FEBS Lett.*, 1998; 433: 166–168
- [7] Adachi T, Yamada H, Futenma A, Kato K, Hirano K.: Heparin-induced release of extracellular superoxide dismutase form (v) to plasma. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1995; 117: 586–590
- [8] Adachi T, Yamada H, Hara H, Futenma A, Kakumu S.: Increase of urinary extracellular superoxide dismutase level correlated with cyclic adenosine monophosphate. *FEBS Lett.*, 1999; 458: 370–374
- [9] Adachi T, Yamada H, Yamada Y, Morihara N, Yamazaki N, Murakami T, Futenma A, Kato K, Hirano K.: Substitution of glycine for arginine-213 in extracellular superoxide dismutase impairs affinity for heparin and endothelial cell surface. *Biochem. J.*, 1996; 313: 235–239
- [10] Behndig A, Svensson B, Marklund S.L., Karlsson K.: Superoxide dismutase isoenzymes in the human eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1998; 39: 471–475
- [11] Bowler R.P., Arcaroli J., Crapo J.D., Ross A., Slot J.W., Abraham E.: Extracellular superoxide dismutase attenuates lung injury after hemorrhage. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001; 164: 290–294
- [12] Bowler R.P., Crapo J.D.: Oxidative Stress in Airways. Is There a Role for Extracellular Superoxide Dismutase? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2002; 166: S38–S43
- [13] Bowler R.P., Nicks M, Olsen D.A., Thogersen I.B., Valnickova Z., Hojrup P., Franzusoff A., Enghild J.J., Crapo J.D.: Furin proteolytically processes the heparin-binding region of extracellular superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 16505–16511
- [14] Burkhardt H, Hartmann F, Schwingel M.L.: Activation of latent collagenase from polymorphonuclear leukocytes by oxygen radicals. *Enzyme*, 1986; 36: 221–231
- [15] Carlsson L.M., Marklund S.L., Edlund T.: The rat extracellular superoxide dismutase dimer is converted to a tetramer by the exchange of a single amino acid. *PNAS*, 1996; 93: 5219–5222
- [16] Chang L.Y., Crapo J.D.: Inhibition of airway inflammation and hyperreactivity by an antioxidant mimetic. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 33: 379–386
- [17] Davis C.D., Milne D.B., Nielsen F.H.: Changes in dietary zinc and copper affect zinc status indicators of postmenopausal women, notably, extracellular superoxide dismutase and amyloid precursor proteins. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; 71: 781–788
- [18] Day B.J., Crapo J.D.: A metalloporphyrin superoxide dismutase mimetic protects against paraquat-induced lung injury *in vivo*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1996; 140: 94–100
- [19] Demchenko I.T., Oury T.D., Crapo J.D., Piantadosi C.A.: Regulation of the brain's vascular responses to oxygen. *Circ. Res.*, 2002; 91: 1031–1037
- [20] Edlund A, Edlund T, Hjalmarsson K, Marklund S.L., Sandstrom J, Stromqvist M, Tibell L.: A nonglycosylated extracellular superoxide dismutase variant. *Biochem. J.*, 1992; 288: 451–456
- [21] Emerit I, Filipe P, Freitas J, Fernandes A, Garban F, Vassy J.: Assaying binding capacity of Cu,ZnSOD and MnSOD: demonstration of their localization in cells and tissues. *Methods Enzymol.*, 2002; 349: 321–327
- [22] Enghild J.J., Thogersen I.B., Oury T.D., Valnickova Z., Hojrup P., Crapo J.D.: The heparin-binding domain of extracellular superoxide dismutase is proteolytically processed intracellularly during biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 14818–14822
- [23] Fasske E., Morgenroth K.: Experimental bleomycin lung in mice. A contribution to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Lung*, 1983; 161: 133–146
- [24] Fattman C.L., Chu C.T., Kulich S.M., Enghild J.J., Oury T.D.: Altered expression of extracellular superoxide dismutase in mouse lung after bleomycin treatment. *Free Radic Biol Med.*, 2001; 31: 1198–1207
- [25] Fattman C.L., Enghild J.J., Crapo J.D., Schaefer L.M., Valnickova Z., Oury T.D.: Purification and characterization of extracellular superoxide dismutase in mouse lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 275: 542–548
- [26] Fattman C.L., Schaefer L.M., Oury T.D.: Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine *Free Radic Biol Med.*, 2003; 35: 226–256
- [27] Folz R.J., Crapo J.D.: Extracellular superoxide dismutase (sod3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC-SOD gene. *Genomics*, 1994; 22: 162–171
- [28] Folz R.J., Guan J., Seldin M.F., Oury T.D., Enghild J.J., Crapo J.D.: Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue-specific gene expression, chromosomal localization, and lung *in situ* hybridization. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1997; 17: 393–403
- [29] Folz R.J., Peno-Green L., Crapo J.D.: Identification of a homozygous missense mutation (Arg to Gly) in the critical binding region of the human EC-SOD gene (SOD3) and its association with dramatically increased serum enzyme levels. *Hum. Mol. Genet.*, 1994; 3: 2251–2254
- [30] Fridovich I.: Superoxide dismutases: studies of structure and mechanism. *Adv Exp Med Biol*, 1976; 74: 530–539
- [31] Fridovich I.: The biology of oxygen radicals. *Science*, 1978; 201: 875–880
- [32] Fridovich I.: Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 18515–18517
- [33] Fukai T., Siegfried M.R., Ushio-Fukai M., Cheng Y., Kojda G., Harrison D.G.: Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J. Clin. Invest.*, 2000; 105: 1631–1639
- [34] Fukai T., Siegfried M.R., Ushio-Fukai M., Griendling K.K., Harrison D.G.: Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ. Res.*, 1999; 85: 23–28
- [35] Gallagher D.S. Jr, Gibbs L.S., Shaffer J.B., Womack J.E.: Somatic cell mapping of bovine EC-SOD and SOD11 loci. *Genomics*, 1992; 12: 610–612
- [36] Gerlach D., Reichardt W., Vettermann S.: Extracellular superoxide dismutase from streptococcus pyogenes type 12 strain is manganese-dependent. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998; 160: 217–224
- [37] Gielen S., Schuler G., Hambrecht R.: Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. *Circulation*, 2001; 103: E1–E6
- [38] Goldstein S., Czapski G.: The reaction of NO with O₂⁻ and HO₂[•]: a pulse radiolysis study. *Free Radic. Biol. Med.*, 1995; 19: 505–510
- [39] Guner G., Islekel H., Oto O., Hazan E., Acikel U.: Evaluation of some antioxidant enzymes in lung carcinoma tissue. *Cancer Lett*, 1996; 103: 233–239
- [40] Hansson L., Edlund M., Edlund A., Johansson T., Marklund S.L., Fromm S., Stromqvist M., Tornell J.: Expression and characterization of biologically active human extracellular superoxide dismutase in milk of transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 5358–5363
- [41] Hendrickson D.J., Fisher J.H., Jones C., Ho Y.S.: Regional localization of human extracellular superoxide dismutase gene to 4pter-q21. *Genomics*, 1990; 8: 736–738
- [42] Hjalmarsson K., Marklund S.L., Engstrom A., Edlund T.: Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 6340–6344
- [43] Ho Y.S., Howard A.J., Crapo J.D.: Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1991; 4: 278–286
- [44] Iyama S., Okamoto T., Sato T., Yamauchi N., Sato Y., Sasaki K., Takahashi M., Tanaka M., Adachi T., Kogawa K., Kato J., Sakamaki S., Niitsu Y.: Treatment of murine collagen-induced arthritis by *ex vivo* extracellular superoxide dismutase gene transfer. *Arthritis Rheum.*, 2001; 44: 2160–2167

- [45] Jukka S., Luoma J.S., Strålin P., Marklund S.L., Hiltunen T.P., Särkioja T., Ylä-Herttua S.: Expression of Extracellular SOD and iNOS in Macrophages and Smooth Muscle Cells in Human and Rabbit Atherosclerotic Lesions Colocalization With Epitopes Characteristic of Oxidized LDL and Peroxynitrite-Modified Proteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1998; 18: 157–167
- [46] Jung O., Marklund S.L., Geiger H., Pedrazzini T., Busse R., Brandes R.P.: Extracellular Superoxide Dismutase Is a Major Determinant of Nitric Oxide Bioavailability *In Vivo* and *Ex Vivo* Evidence From eNOS-Deficient Mice. *Circ Res.*, 2003; 93: 622–629
- [47] Kang D.H.: Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. *Aacn Clin Issues*, 2002; 13: 540–549
- [48] Karlsson K., Edlund A., Sandstrom J., Marklund S. L.: Proteolytic modification of the heparin-binding affinity of extracellular superoxide dismutase. *Biochem. J.*, 1993; 290: 623–626
- [49] Karlsson K., Lindahl U., Marklund S.L.: Binding of human extracellular superoxide dismutase C to sulphated glycosamino-glycans. *Biochem. J.*, 1988; 256: 29–33
- [50] Karlsson K., Marklund S.L.: Heparin-induced release of extracellular superoxide dismutase to human blood plasma. *Biochem. J.*, 1987; 242: 55–59
- [51] Karlsson K., Marklund S.L.: Extracellular superoxide dismutase in the vascular system of mammals. *Biochem. J.*, 1988; 255: 223–228
- [52] Karlsson K., Marklund S.L.: Heparin-, dextran sulfate-, and protamine-induced release of extracellular superoxide dismutase to plasma in pigs. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988; 967: 110–114
- [53] Karlsson K., Marklund S.L.: Plasma clearance of human extracellular superoxide dismutase C in rabbits. *J. Clin. Invest.*, 1988; 82: 762–766
- [54] Karlsson K., Marklund S.L.: Binding of human extracellular superoxide dismutase C to cultured cell lines and to blood cells. *Lab. Invest.*, 1989; 60: 659–666
- [55] Karlsson K., Sandstrom J., Edlund A., Edlund T., Marklund S.L.: Pharmacokinetics of extracellular superoxide dismutase in the vascular system. *Free Radic. Biol. Med.*, 1993; 14: 185–190
- [56] Karlsson K., Sandstrom J., Edlund A., Marklund S. L.: Turn-over of extracellular superoxide dismutase in tissues. *Lab. Invest.*, 1994; 70: 705–710
- [57] Kawamura N., Ookawara T., Suzuki K., Konishi K., Mino M., Taniguchi N.: Increased glycosylated Cu,Zn superoxide dismutase levels in erythrocytes of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1992; 74: 1352–1354
- [58] Kobayashi S., Imajoh-Ohmi S., Kuribayashi F., Nunoi H., Nakamura M., Kanegasaki S.: Characterization of the superoxide-generating system in human peripheral lymphocytes and lymphoid cell lines. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1995; 117: 758–765
- [59] Landmesser U., Drexler H.: Toward Understanding of Extracellular Superoxide Dismutase Regulation in Atherosclerosis A Novel Role of Uric Acid? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.*, 2002; 22: 1367
- [60] Laukkanen M.O., Lehtolainen P., Turunen P., Aittomaki S., Oikari P., Marklund S.L., Ylä-Herttua S.: Rabbit extracellular superoxide dismutase: expression and effect on LDL oxidation. *Gene*, 2000; 254: 173–179
- [61] Laukkanen M.O., Leppanen P., Turunen P., Tuomisto T., Naarala J., Ylä-Herttua S.: EC-SOD gene therapy reduces paracetamol-induced liver damage in mice. *J. Gene Med.*, 2001; 3: 321–325
- [62] Li Q., Bolli R., Qiu Y., Tang X.L., Murphree S.S., French B.A.: Gene therapy with extracellular superoxide dismutase attenuates myocardial stunning in conscious rabbits. *Circulation*, 1998; 98: 1438–1448
- [63] Loenders B., Van Mechelen E., Nicolai S., Buysens N., Van Osselaer N., Jorens P.G., Willems J., Herman A.G., Slegers H.: Localization of extracellular superoxide dismutase in rat lung: neutrophils and macrophages as carriers of the enzyme. *Free Radic Biol Med.*, 1998; 24: 1097–1106
- [64] Lookene A., Stenlund P., Tibell L.A.: Characterization of heparin binding of human extracellular superoxide dismutase. *Biochemistry*, 2000; 39: 230–236
- [65] Luoma J.S., Stralin P., Marklund S.L., Hiltunen T.P., Särkioja T., Ylä-Herttua S.: Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 1998; 18: 157–167
- [66] Marklund S.L.: Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982; 79: 7634–7638
- [67] Marklund S.L., Holme E., Hellner L.: Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin. Chim. Acta*, 1982; 126: 41–51
- [68] Marklund S.L.: Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem. J.*, 1984; 222: 649–655
- [69] Marklund S.L.: Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J. Clin. Invest.*, 1984; 74: 1398–1403
- [70] Marklund S.L.: Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem. J.*, 1984; 220: 269–272
- [71] Marklund S.L.: Product of extracellular superoxide dismutase catalysis. *FEBS Lett.*, 1985; 184: 237–239
- [72] Marklund S.L.: Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochem. J.*, 1990; 266: 213–219
- [73] Marklund S.L.: Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 6696–6701
- [74] McCord J.M., Gao B., Leff J., Flores S.C.: Neutrophil-generated free radicals: possible mechanisms of injury in adult respiratory distress syndrome. *Environ. Health Perspect.*, 1994; 102(Suppl.10): 57–60
- [75] Monboisse J.C., Bellon G., Dufer J., Randoux A., Borel J.P.: Collagen activates superoxide anion production by human poly-morphonuclear neutrophils. *Biochem. J.*, 1987; 246: 599–603
- [76] Mruk D., Cheng C.H., Cheng Y.H., Mo M.Y., Grima J., Silvestrini B., Lee W.M., Cheng C.Y.: Rat testicular extracellular superoxide dismutase: its purification, cellular distribution, and regulation. *Biol. Reprod.*, 1998; 59: 298–308
- [77] Mruk D.D., Cheng C.Y.: *In vitro* regulation of extracellular superoxide dismutase in sertoli cells. *Life Sci.*, 2000; 67: 133–145
- [78] Nakane H., Chu Y., Faraci F.M., Oberley L.W., Heistad D.D.: Gene transfer of extracellular superoxide dismutase increases superoxide dismutase activity in cerebrospinal fluid. *Stroke*, 2001; 32: 184–189
- [79] Nicolai S., Willems J., Zwijsen A., Van Mechelen E., Slegers H.: Cyclic AMP-induced differentiation increases the synthesis of extracellular superoxide dismutase in rat C6 glioma. *Free Radic. Biol. Med.*, 1996; 21: 481–486
- [80] Oberley T.D., Zhong W., Szewda L.J., Oberley L.W.: Localization of antioxidant enzymes and oxidative damage products in normal and malignant prostate epithelium. *Prostate*, 2000; 44: 144–155
- [81] Ohe Y., Ishikawa K., Itoh Z., Tatemoto K.: Cultured lepto-meningeal cells secrete cerebrospinal fluid proteins. *J. Neuro-chem*, 1996; 67: 964–971
- [82] Ohta H., Adachi T., Hirano K.: The nature of heterogeneous components of extracellular superoxide dismutase purified from human umbilical cords. *Free Radic. Biol. Med.*, 1993; 15: 151–158
- [83] Ohta H., Adachi T., Hirano K.: Internalization of human extracellular superoxide dismutase by bovine aortic endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 1994; 16: 501–507
- [84] Olin K.L., Golub M.S., Gershwin M.E., Hendrickx A.G., Lonnerdal B., Keen C.L.: Extracellular superoxide dismutase activity is affected by dietary zinc intake in nonhuman primate and rodent models. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995; 61: 1263–1267
- [85] Ookawara T., Imazeki N., Matsubara O., Kizaki T., Oh-Ishi S., Nakao C., Sato Y., Ohno H.: Tissue distribution of immunoreactive mouse extracellular superoxide dismutase. *Am. J. Physiol.*, 1998; 275: C840–C847
- [86] Ookawara T., Kizaki T., Takayama E., Imazeki N., Matsubara O., Ikeda Y., Suzuki K., Li-Ji L., Tadakuma T., Taniguchi N., Ohno H.: Nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 296: 54–61
- [87] Oteiza P.I., Adonaylo V.N., Keen C.L.: Cadmium-induced testes oxidative damage in rats can be influenced by dietary zinc intake. *Toxicology*, 1999; 137: 13–22
- [88] Oury T.D., Card J.P., Klann E.: Localization of extracellular superoxide dismutase in adult mouse brain. *Brain Res.*, 1999; 850: 96–103
- [89] Oury T.D., Chang L.Y., Marklund S.L., Day B.J., Crapo J.D.: Immunocytochemical localization of extracellular superoxide dismutase in human lung. *Lab. Invest.*, 1994; 70: 889–898
- [90] Oury T.D., Crapo J.D., Valnickova Z., Enghild J.J.: Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers: a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase. *Biochem. J.*, 1996; 317: 51–57
- [91] Oury T.D., Day B.J., Crapo J.D.: Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Radic. Biol. Med.*, 1996; 20: 957–965

- [92] Oury T.D., Day B.J., Crapo J.D.: Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab. Invest.*, 1996; 75: 617–636
- [93] Patel M., Day B.J.: Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1999; 20: 359–364
- [94] Petersen S.V., Oury T.D., Valnickova Z., Thøgersen I.B., Højrup P., Crapo J.D., Enghild J.J.: The dual nature of human extracellular superoxide dismutase: One sequence and two structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 13875–13880
- [95] Qianhong Li., Bolli R., Yumin Qiu., Xian-Liang T., Guo Y., French B.A.: Gene therapy with extracellular superoxide dismutase protects conscious rabbits against myocardial infarction. *Circulation*, 2001; 103: 1893–1898
- [96] Sandstrom J., Carlsson L., Marklund S.L., Edlund T.: The heparin-binding domain of extracellular superoxide dismutase C and formation of variants with reduced heparin affinity. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 18205–18209
- [97] Sandstrom J., Karlsson K., Edlund T., Marklund S.L.: Heparin-affinity patterns and composition of extracellular superoxide dismutase in human plasma and tissues. *Biochem. J.*, 1993; 294: 853–857
- [98] Sandstrom J., Nilsson P., Karlsson K., Marklund S.L.: Ten-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 19163–19166
- [99] Sorsa T., Saari H., Kontinen Y.T., Suomalainen K., Lindy S., Uitto V.J.: Nonproteolytic activation of latent human neutrophil collagenase and its role in matrix destruction in periodontal diseases. *Int. J. Tissue React.*, 1989; 11: 153–159
- [100] StClair D.K., Holland J.C.: Complementary DNA encoding human colon cancer manganese superoxide dismutase and the expression of its gene in human cells. *Cancer Res*, 1991; 51: 939–943
- [101] Stralin P., Karlsson K., Johansson B.O., Marklund S.L.: The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1995; 15: 2032–2036
- [102] Stralin P., Marklund S.L.: Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 2000; 151: 433–441
- [103] Stralin P., Marklund S.L.: Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2001; 281: H1621–H1629
- [104] Strehlow K., Rotter S., Wassmann S., Adam O., Grohe C., Laufs K., Böhm M., Nickenig G.: Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ. Res.*, 2003; 93: 170–177
- [105] Stromqvist M., Holgersson J., Samuelsson B.: Glycosylation of extracellular superoxide dismutase studied by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 1991; 548: 293–301
- [106] Stromqvist M., Houdebine M., Andersson J.O., Edlund A., Johansson T., Viglietta C., Puissant C., Hansson L.: Recombinant human extracellular superoxide dismutase produced in milk of transgenic rabbits. *Transgenic Res.*, 1997; 6: 271–278
- [107] Su W.Y., Folz R., Chen J.S., Crapo J.D., Chang L.Y.: Extracellular superoxide dismutase mRNA expressions in the human lung by in situ hybridization. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1997; 16: 162–170
- [108] Suliman H.B., Ryan L.K., Bishop L., Folz R.J.: Prevention of influenza-induced lung injury in mice overexpressing extracellular superoxide dismutase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2001; 280: L69–L78
- [109] Taniguchi N.: Superoxide dismutases: significances in aging, diabetes, ischemia and cancer. *Rinsho Byori*, 1990; 38: 876–881
- [110] Tibell L., Aasa R., Marklund S.L.: Spectral and physical properties of human extracellular superoxide dismutase: a com-parison with Cu,Zn superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Bio-phys.*, 1993; 304: 429–433
- [111] Tibell L., Hjalmarsson K., Edlund T., Skogman G., Engstrom A., Marklund S.L.: Expression of human extracellular superoxide dismutase in chinese hamster ovary cells and characterization of the product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 6634–6638
- [112] Tibell L.A., Sethson I., Buevich A.V.: Characterization of the heparin-binding domain of human extracellular superoxide dismutase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997; 1340: 21–32
- [113] Vilar R.E., Ghael D., Li M., Bhagat D.D., Arrigo L.M., Cowman M.K., Dweck H.S., Rosenfeld L.: Nitric oxide degradation of heparin and heparan sulphate. *Biochem. J.*, 1997; 324: 473–479
- [114] Visner G.A., Dougall W.C., Wilson J.M., Burr I.A., Nick H.H.: Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem*, 1990; 265: 2856–2864
- [115] Wan X.S., Devalaraja M.N., StClair D.K.: Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol*, 1994; 13: 1127–1136
- [116] Wang X.L., Adachi T., Sim A.S., Wilcken D.E.: Plasma extracellular superoxide dismutase levels in an Australian population with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1998; 18: 1915–1921
- [117] Williams K., Frayne J., McLaughlin E.A., Hall L.: Expression of extracellular superoxide dismutase in the human male reproductive tract, detected using antisera raised against a recombinant protein. *Mol. Hum. Reprod.*, 1998; 4: 235–242
- [118] Wilson J.X.: Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol.*, 1997; 75: 1149–1163
- [119] Yamada H., Yamada Y., Adachi T., Fukatsu A., Sakuma M., Futenma A., Kakumu S.: Protective role of extracellular superoxide dismutase in hemodialysis patients. *Nephron*, 2000; 84: 218–223
- [120] Yamada H., Yamada Y., Adachi T., Goto H., Ogasawara N., Futenma A., Kitano M., Miyai H., Fukatsu A., Hirano K., Kakumu S.: Polymorphism of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) gene: relation to the mutation responsible for high EC-SOD level in serum. *Jpn. J. Hum. Genet.*, 1997; 42: 353–356
- [121] Yamamoto M., Hara H., Adachi T.: Nitric oxide and its decomposed derivatives decrease the binding of extracellular superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett.*, 2001; 505: 296–300
- [122] Yim M.B., Chock P.B., Stadtman E.R.: Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. *J Biol Chem.*, 1993; 268: 4099–4105
- [123] Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J.: Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the Cu,ZnSOD (sod1), Mn-SOD (sod2), and EC-SOD (sod3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 33: 337–349
- [124] Zhang Y., Zhao W., Zhang H.J., Domann F.E., Oberley L.W.: Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. *Cancer Res.*, 2002; 62: 1205–1212
- [125] Zheng X.M.: Extracellular Superoxide Dismutase. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003; 77: 222