



## Expression Patterns of Superoxide Dismutase Genes in the Stage-specific Seminiferous Tubules of Mice Excised by a Laser Capture Microdissection

Jung-Min Yon<sup>1#</sup>, A-Young Jung<sup>1#</sup>, Jung-Hoon Park<sup>1</sup>, Min Ki Hong<sup>1</sup>, Jae-Seung Kim<sup>1</sup>, Chunmei Lin<sup>1</sup>, Mi-Ra Kim<sup>1</sup>, In-Jeoung Baek<sup>2</sup>, Beom Jun Lee<sup>1</sup>, Young Won Yun<sup>1</sup> and Sang-Yoon Nam<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine & Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea  
<sup>2</sup>Laboratory of Mammalian Molecular Genetics, Department of Biochemistry, College of Science, Yonsei University, Seoul, Korea

Spermatogenesis is a particularly difficult process to study the unique multiple cellular associations within the seminiferous epithelium. Laser capture microdissection (LCM) is a recently developed technique that enables the isolation of individual cell populations from complex tissues. The superoxide dismutase (SOD) is the first and most important enzyme of antioxidant defense systems against superoxide anion. The aim of this study was to investigate the quantitative changes of SOD gene expression according to the spermatogenic cycle in mouse testes using LCM and real-time polymerase chain reaction (PCR) techniques. Frozen sections (10  $\mu$ m) were obtained from the testes of 8-weeks-old ICR mice. LCM was used to capture all cells in cross-sectioned seminiferous tubules which were grouped into stages I-V, VII-VIII, and IX-XI. The expression level of cytoplasmic Cu, Zn-SOD (SOD1) mRNA was remarkably higher than those of mitochondrial Mn-SOD (SOD2) and extracellular Cu, Zn-SOD (SOD3) mRNAs in mouse testes. During spermatogenesis, the expressions of SOD1 and SOD2 mRNAs were highest on stages I-V, began to decrease after stage VII, and showed a lowest level on stage IX-XI. However, the expression of SOD3 mRNA was highest on stages VII-VIII. These findings suggest that the subtypes of SOD are expressed differentially in mouse testes during spermatogenesis.

**Key words:** Superoxide dismutase, spermatogenesis, laser capture microdissection, real-time PCR

Received 14 May 2010; Revised version received 10 June 2010; Accepted 17 June 2010

정자발생(spermatogenesis)은 미성숙세 포로부터 정자가 형성되는 과정으로서 체세포분열이 신속하게 일어나는 정조세포(spermatogonium), 감수분열이 일어나는 정모세포(spermatid)와 난자와 수정할 수 있는 구조를 갖춘 정자세포(spermatozoa)로 고환의 정세관내에 구성되어 있다. 정자발생과정은 정세관의 가로단면에서 정자세포의 구성이 일정한 단계(stage)로 구분되는데, 마우스에서는 12단계로 구성되어 있다(Lonnie et al., 1990). 이러한 정자발생은 체세포분열 및 감수분열이 일어나는 복잡하고 정교한 과정에서 많은 유전자들이 관여하고 있다. 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)은 포유동물의 대사과정에서 정상적으로 생성되고 있으며, 적당한 양의 ROS는 정

자의 수정능 획득, 운동성, 난자와의 융합 등 정자발생과정에 필수적인 기능을 한다고 알려져 있다. 그러나, 과량의 ROS는 정자의 기능뿐만 아니라 정세관의 수축과 정조세포의 감소 등 정자발생에 악영향을 미쳐 불임의 원인이 되기도 한다(Huang et al., 2009; Venkatesh et al., 2009).

ROS에 대한 방어작용으로 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase, catalase 등 다양한 항산화효소가 알려져 있는데, 그 중 SOD는 세포의 에너지 대사과정에서 정상적으로 발생하는 활성산소를 감소시키는 효소로서 세포의 항산화 방어체계에서 중요한 역할을 하고 있다. 포유동물에서 SOD는 위치에 따라 세포내에 존재하는 cytoplasmic Cu, Zn-SOD (SOD1) 및 mitochondrial Mn-SOD (SOD2)와 함께 세포외액에서 관찰되는 extracellular Cu, Zn-SOD (SOD3)로 크게 3가지 subtypes이 알려져 있다(Zelko et al., 2002). SOD는 고환의 정세관 상피세포에서 발현한다고 알려져 있으며(Jow et al., 1993; Bauche et al., 1994; Gu et al., 1995; Gu and Hecht,

<sup>#</sup>These authors equally contributed to this study.

\*Corresponding author: Sang-Yoon Nam, Laboratory of Veterinary Anatomy, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea.

Tel.: +82-43-261-2596

Fax: +82-43-271-3246

E-mail: synam@cbu.ac.kr

1996 & 1997; Mruk et al., 1998; Mruk et al., 2002), 정자세포의 기능과 운동성에서도 중요한 역할을 하고 있다고 보고되었다(Ben Abdallah et al., 2009).

최근 개발된 방법 중 laser capture microdissection (LCM)은 복잡한 구조의 조직으로부터 세포형태를 관찰하면서 표적세포를 선택하여 채취할 수 있는 기술로서 세포 특이적으로 RNA, DNA와 단백질의 발현을 비교 분석할 수 있기 때문에 정상조직의 세포 종류에 따른 유전자 발현차이와 종양조직이나 병변이 있는 조직으로부터 세포 특이적인 유전자 발현변화를 비교 관찰할 수 있다 (Sluka et al., 2008; Agarwal et al., 2010; Wang et al., 2010).

정자발생과정동안 SOD의 발현은 *in situ* hybridization, immunohistochemistry 등을 이용하여 주로 형태학적으로 관찰되었지만(Gu and Hecht, 1996 & 1997; Mruk et al., 2002), 최근까지 정자발생단계(spermatogenic stage)에 따른 SOD 유전자발현에 대한 세포특이적 정량분석은 쉽지 않았다. 본 연구에서는 LCM기술을 이용하여 정상 마우스 정세관상피에서 발생단계별로 정자세포를 분리하여 total RNA를 추출한 후 항산화효소인 세가지 SOD isoforms에 대하여 유전자 발현 정도를 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

7주령(32~34 g)의 성숙한 수컷 ICR 마우스를 (주)샘타코로부터 구입하여 충북대학교 실험동물연구지원센터 내에서 1주일간 사육실 및 실험실 환경에 적응시켜 일반증상에 이상이 없음을 확인하고 실험에 사용하였다. 5마리를 polycarbonate cage에 수용하고 실험동물용 고품사료(Purina® pellet 사료)와 음료를 자유롭게 공급하였다. 사육 실험실 환경으로는 온도 23±2°C, 상대습도 50±10%, 환기횟수 10~12회/hr, 조명시간 12 hrs, 조도 150~300 lux로 조절하였다. 모든 실험은 충북대학교 동물실험윤리위원회 규정에 입각하여 실시하였다.

### 조직 채취 및 처리

에테르 마취 하에 경추탈구를 하고 고환을 적출하여 바로 액체질소에 동결시킨 후 total RNA 추출에 이용하였다. LCM을 위해서 OCT compound에 포매하여 10 µm 두께로 PEN membrane slides (MDS Analytical Technologies, Germany)를 이용하여 슬라이드를 제작하였고 사용 전까지 -80°C에 보관하였다. 동결된 고환이 부착된 슬라이드는 0°C에서 acetone에 1분간 고정하였으며, 95%와 75% 에탄올과 RNase가 제거된 3차 증류수에 처리하였으며, hematoxylin (Sigma, USA) 용액으로 핵을 염색한 후 3차 증류수에 수세한 후 75, 95, 100% 에탄올에 30초씩 탈

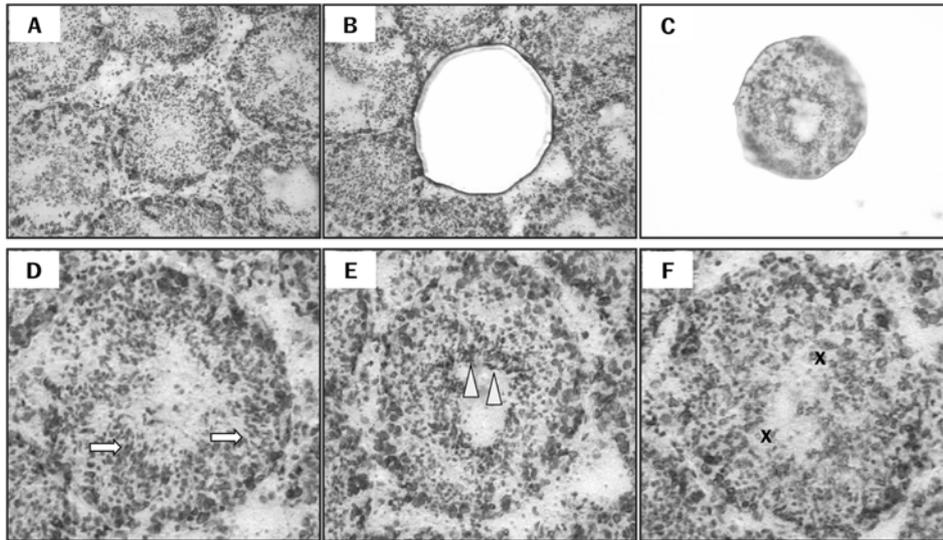
수과정을 거친 다음 후드에서 20분간 공기 중 건조시킨 후 LCM을 시행하였다.

### LCM과 total RNA 추출

정자발생시기의 구별은 hematoxylin에 의해 염색된 핵에 의해서 구별을 하였다. I-V 단계는 버팀세포(sertoli cell) 깊숙이 정세관의 길쭉정자세포(elongate spermatid)를 볼 수 있으며, VII-VIII 단계는 정자방출을 위해서 길쭉정자세포가 정세관 상피내강 표면에 배열되었다. IX-XI 단계의 정세관에는 길쭉정자세포가 존재하지 않으며, 정자세포의 핵 모양은 납작하며 뚜렷한 응축이 나타나지 않았다. 제VI단계와 XII단계 정자세포는 발달의 진행이 다양하므로 세포들의 모양을 근거로 시기를 결정할 수가 없었다(Sluka et al., 2008). 각 단계별 정자발생과정 시료는 real-time PCR을 위하여 각 단계별로 32개의 정세관이 포함되도록 LCM을 하였으며, 시료는 각기 다른 3개의 고환에 대하여 각각 3번 반복하여 채취하였다. LCM은 Arcturus XT Laser capture microdissection microscope (Molecular Devices, California, USA)를 이용하였고, 각 slide는 Prepstrip tissue preparation strip (Arcturus, USA)을 이용하여 잔존물을 제거한 후 사용하였다. 조직절편은 20배 검경렌즈를 사용하여 관찰하였으며, 30 µm 깊이의 laser를 사용하였고 power는 5 msec 간격으로 20-30 mW 범위에서 사용하였다. 세포는 CapSure LCM macro caps (Arcturus, USA)에 포획한 직후 PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus, USA)을 이용하여 시약설명서에 따라 total RNA를 추출하였다.

### Real-time PCR을 통한 정량분석

위의 방법으로부터 얻어진 total RNA 약 1 µg을 cDNA synthesis kit (BIO-RAD, USA)을 이용하여 cDNA를 합성한 후 real-time PCR을 실시하였다. TaqMan Universal PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems, USA)으로 총 25 µL를 맞춘 후 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) 기계를 이용하여 PCR을 실시하였다. SOD1 primers와 probe는 mouse 유전자 특이적으로 TIB Mol-Bio Synthesis labor (Berlin, Germany)로부터 제작 구입하였으며 forward primer는 5'-CTT CTC GTC TTC CTC TCT CTG G-3'였고 reverse primer는 5'-TCC TGT AAAT TTG TCC TGA CAA CAC-3'였으며 JOE가 표지된 TaqMan probe는 5'-ACT GGT TCA CCG CTT GCC TTC TGC의 염기서열이었다. Mouse SOD2에 대한 primers와 probe는 Applied Biosystems (USA)에서 판매되는 Assay on demand #Mm01313000를 사용하였다. Mouse SOD3 primers와 probe의 염기서열은 다음과 같다. Forward primer: 5'-GGA GAT CTG GAT GGA GCT AGG A-3'; reverse primer: 5'-CCC TGC AGA



**Figure 1.** Isolation of the specific seminiferous tubules using a laser capture microdissection (LCM) and classifications of the spermatogenic stages. Micrograph of intact testes section viewed by light microscopy prior to LCM (A), isolated tubule cross-section on the LCM cap following LCM (B), and remaining tissue section (C). Seminiferous tubules at the following stages of spermatogenesis were grouped: Arrows indicate compact elongated spermatid heads embedded within the seminiferous epithelium on stages I-V (D). Arrowheads indicate elongated spermatids adjacent to the tubule lumen prior to spermiation on stages VII-VIII (E). X indicates absence of elongate spermatids on stages IX-XI (F). Magnification: X100 (A-C) and X200 (D-F).

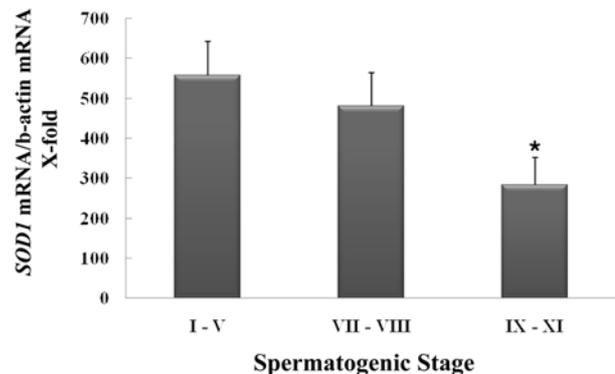
TTG CAT GCA T-3'; FAM이 표지된 Taqman probe: 5'-AGG TGG ATGCTG CCG-3'.  $\beta$ -actin (Assay on demand #4352933E, Applied Biosystems, USA)은 내부 표지인자로서 사용하였다. 각 데이터(n=3)는 3회 반복하여 실험하였으며 comparative Ct method로 mRNA의 발현을 측정하였다.

**통계처리**

결과의 통계분석은 표본수가 많지 않으므로(n=3) 유의수준  $P < 0.05$ 에서 비모수적 평균분석법인 Kruskal-Wallis법을 이용하였다. 또한, 각 유전자의 발현정도는 각 단계별로 상관관계가 있는지를 편상관분석을 통해 검증하였다( $P < 0.05$ ).

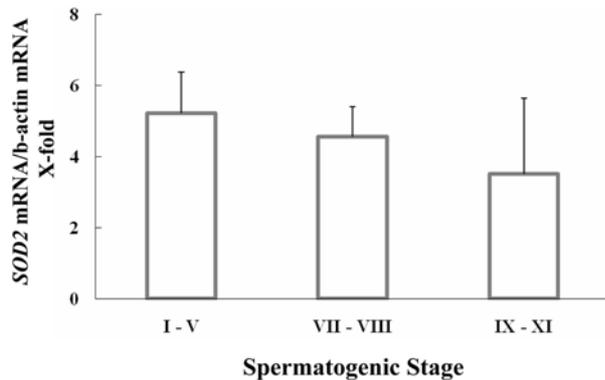
**결 과**

정자발생단계는 길쭉정자세포의 모양과 위치를 중심으로 마우스 정자발생 12단계 중 VI과 XII단계 외에 10단계에 대하여 I-V, VII-VIII와 IX-XI의 3분류로 나누어 구별하였으며, LCM을 이용하여 각 3분류별 정세관을 채취하여 SOD1, SOD2, SOD3에 대한 mRNA유전자 발현양상을 비교하였다(Figure 1). 세가지 SOD subtypes mRNA는 정자발생동안 관찰된 모든 단계의 정세관내에서 발현되었으며 내부 표지유전자  $\beta$ -actin에 대한 comparative Ct 값으로 표현되었다. 정자발생과정 중 SOD1 mRNA의 발현이 가장 높게 관찰되었으며(282~556-fold), SOD2

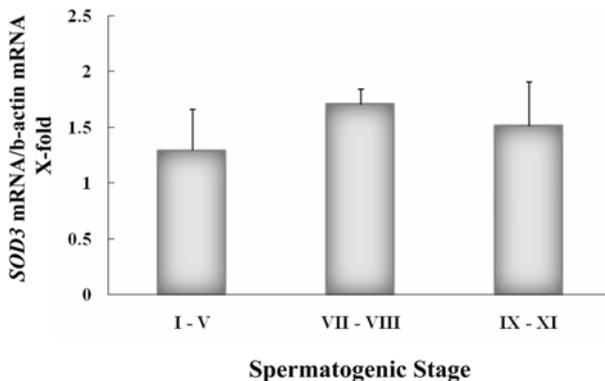


**Figure 2.** Stage-specific expression of cytoplasmic Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1) mRNA during spermatogenesis. Gene expression for SOD1 in cross-sectioned seminiferous tubules defining the spermatogenic stages (I-V, VII-VIII and IX-XI) excised by a laser capture microdissection was assessed by real-time PCR (n=3). \*Significantly different from stage I-V at  $P < 0.05$ .

mRNA는 3.5~5.2-fold, SOD3 mRNA는 1.28~1.70-fold로 가장 낮게 발현되었다(Figures 2-4). SOD1 mRNA는 정자발생의 IV단계에서 가장 높게 관찰되었고(556-fold), VII-VIII단계에서는 480-fold, IX-XI단계는 282-fold로 정자가 성숙한 형태로 발달할수록 발현이 감소하였으며 유의적인 차이를 보였다( $P < 0.05$ ; Figure 2). SOD2 mRNA는 I-V단계에서 5.2-fold였고, VII-VIII단계에서는 4.5-fold, IX-XI단계는 3.5-fold로 발생단계가 지날수록 감소하여 SOD1과 유사한 발현양상을 보였지만 유의적인 차이를 보이지



**Figure 3.** Stage-specific expression of mitochondrial *Mn-superoxide dismutase (SOD2)* mRNA during spermatogenesis. Gene expression for *SOD2* in cross-sectioned seminiferous tubules defining the spermatogenic stages (I-V, VII-VIII and IX-XI) excised by a laser capture microdissection was assessed by real-time PCR (n=3).



**Figure 4.** Stage-specific expression of extracellular superoxide dismutase (*SOD3*) genes during spermatogenesis. Gene expression for *SOD3* in cross-sectioned seminiferous tubules defining the spermatogenic stages (I-V, VII-VIII and IX-XI) excised by a laser capture microdissection was assessed by real-time PCR (n=3).

않았다(Figure 3). 그러나, *SOD3* mRNA는 정자발생 VII-VIII단계에서 1.7-fold로 가장 높게 발현되었으나, IX-XI단계는 1.5-fold, I-V단계에서는 1.28-fold의 순서로 감소되는 양상을 나타내었고 유의적인 차이는 보이지 않았다(Figure 4).

## 고 찰

Chromium, benzoflpyrene, delta-9-tetrahydrocannabinol, cypermethrin, 방사선 등 다양한 산화스트레스는 정세관에 손상을 주어 정자발생에 영향을 미치어 SOD의 활성이나 유전자 발현 정도를 감소시킨다고 하였다(Nonogaki et al., 1992; Arafa et al., 2009; Mandal and Das, 2009; Wang et al., 2009; Chandra et al., 2010). 이와 같이, 고환에서 산화스트레스에 대한 SOD의 발현변화와

역할에 대한 보고는 다양하게 이루어지고 있지만, 정상적인 마우스 정자발생단계에서 SOD의 각 subtypes별 발현 변화에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다.

이번 연구에서는 마우스 정자발생단계에서 ROS에 대한 첫째 방어작용으로서 매우 중요하다고 알려진 SOD의 발현양상을 LCM과 real-time PCR을 이용하여 각 단계별 발현 정도를 비교하였다. 정자발생과정에서 LCM을 이용하여 단계별 정세관의 total RNA를 추출하여 real-time PCR을 통하여 3가지의 SOD유전자에 대한 발현양상을 관찰한 결과, *SOD1* mRNA가 가장 높은 발현을 나타냈으며, *SOD3* mRNA의 발현이 가장 낮게 관찰되었다. *SOD1*은 전체 SODs 발현양 중 가장 많은 양을 차지하고 있었고, *SOD2*는 다음 정도의 발현양상을 나타냈으며, *SOD3*는 가장 적은 양을 차지하고 있었다. 이것은 정자의 발생과정 중 SOD는 정자발생세포의 세포질내에 포함된 *SOD1*이 외부 및 내부요인의 산화스트레스에 대해서 주로 작용한다는 것을 시사한다.

*SOD1*은 I-V단계에서 가장 높은 발현을 보였으며, IX-XI단계에서 발현이 감소하여 발생단계가 지날수록 mRNA의 발현이 감소되었다. *SOD1* mRNA는 주로 원형정자세포(round spermatids)와 길쭉정자세포에서 관찰되었으며(Gu and Hecht, 1997), *In situ* hybridization 후 간접적으로 laser densitometer를 이용하여 측정한 Jow 등(1993)의 보고에 따르면 랫드의 정자발생과정에서 *SOD1* mRNA의 발현은 정자배출(spermiation; stages VI-VIII)전에 정세관내에서 가장 높게 발현되었고, LCM을 이용한 본 실험결과와 매우 유사하여 *SOD1*은 정자발생과정에서 발생할 수 있는 ROS로부터 정자발생세포를 직접적으로 보호한다는 것을 알 수 있다.

*SOD2*의 발현양상도 *SOD1*과 유사하게 I-V단계에서 가장 높은 발현을 보였으며, IX-XI단계에서 발현이 감소하여 발생단계가 지날수록 mRNA의 발현이 감소되었지만 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이전 연구에 따르면 *SOD2*는 원형정자세포에서 높은 mRNA 발현을 나타냈지만, 길쭉정자세포에서의 발현은 거의 관찰되지 않았다(Gu and Hecht, 1996). 이러한 결과로부터 *SOD2*는 길쭉정자세포가 포함된 IX-XI단계에서 가장 낮은 발현을 보인 것으로 보이며 미토콘드리아의 활성이 관찰되는 원형정자세포에서 주로 관찰되는 것으로 사료된다.

*SOD3* mRNA는 다른 장기에 비하여 고환에서 높은 발현을 보였으며, 비탐세포와 정조세포에서 발현이 관찰되었다는 보고는 있지만(Mruk et al., 1998), 정자발생단계에서의 연구는 이루어지지 않았다. 본 연구결과 비록 발현정도는 낮았지만, *SOD3*는 정자의 형태학적 변화와 정자방출이 관찰되는 VII-VIII단계에서 가장 높은 발현을 보였다. 이것은 *SOD3*가 정자의 형태학적 변화를 겪으며 방출되는 시기에 나타날 수 있는 산화스트레스에 대하여

중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.

본 연구결과로부터 정자발생과정에서 SOD의 subtypes 별 발현이 서로 다르게 조절되고 있음을 알 수 있으며, 본 연구결과가 정자발생단계에서 SOD의 역할을 연구하는 데 있어서 기본적인 자료로 사용될 수 있다고 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2008년 충북대학교 학술연구비로 수행하였습니다.

## 참고 문헌

- Agarwal, N., Lippmann, E.S. and Shusta, E.V. (2010) Identification and expression profiling of blood-brain barrier membrane proteins. *J. Neurochem.* 112(3), 625-635.
- Arafa, H.M., Aly, H.A., Abd-Allah, M.F. and El-Refaey, H.M. (2009) Hesperidin attenuates benzo[alpha] pyrene-induced testicular toxicity in rats via regulation of oxidant/antioxidant balance. *Toxicol. Ind. Health.* 25(6), 417-427.
- Bauche, F., Fouchard, M.H. and Jegou, B. (1994) Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett.* 349(3), 392-396.
- Ben Abdallah, F., Dammak, I., Attia, H., Hentati, B. and Ammar-Keskes, L. (2009) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in infertile men: correlation with semen parameter. *J. Clin. Lab. Anal.* 23(2), 99-104.
- Chandra, A.K., Chatterjee, A., Ghosh, R. and Sarkar, M. (2010) Vitamin E-supplementation protects chromium (VI)-induced spermatogenic and steroidogenic disorders in testicular tissues of rats. *Food Chem. Toxicol.* 48(3), 972-979.
- Gu, W., Morales, C. and Hecht, N.B. (1995) In male mouse germ cell, copper-zinc superoxide dismutase utilizes alternative promoters that produce multiple transcripts with different with different translation potential. *J. Biol. Chem.* 270(1), 236-243.
- Gu, W. and Hecht, N.B. (1996) Developmental expression of glutathione peroxidase, catalase, and manganese superoxide dismutase mRNAs during spermatogenesis in the mouse. *J. Androl.* 17(3), 256-262.
- Gu, W. and Hecht, N.B. (1997) The enzymatic activity of Cu/Zn superoxide dismutase does not fluctuate in mouse spermatogenic cells despite mRNA changes. *Exp. Cell Res.* 232(2), 371-375.
- Huang, F., Ning, H., Xin, Q.Q., Huang, Y., Wang, H., Zhang, Z.H., Xu, D.X., Ichihara, G. and Ye, D.Q. (2009) Melatonin pretreatment attenuates 2-bromopropane-induced testicular toxicity in rats. *Toxicology* 256(1-2), 75-82.
- Jow, W.W., Schlegel, P.N., Cichon, Z., Phillips, D., Goldstein, M. and Bardin, C.W. (1993) Identification and localization of copper-zinc superoxide dismutase gene expression in rat testicular development. *J. Androl.* 14(6), 439-447.
- Lonnie, D.R., Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A.P. and Clegg, E.D. (1990) *Histological and histopathological evaluation of the testis.* pp. 4-47, Cache River Press, USA.
- Mandal, T.K. and Das, N.S. (2009) Effect of delta-9-tetrahydrocannabinol on altered antioxidative enzyme defense mechanisms and lipid peroxidation in mice testes. *Eur. J. Pharmacol.* 607(1-3), 178-187.
- Mruk, D., Cheng, C.H., Cheng, Y.H., Mo, M.Y., Grima, J., Silvestrini, B., Lee, W.M. and Cheng, C.Y. (1998) Rat testicular extracellular superoxide dismutase: its purification, cellular distribution, and regulation. *Biol. Reprod.* 59(2), 298-308.
- Mruk, D.D., Silvestrini, B., Mo, M.Y. and Cheng, C.Y. (2002) Antioxidant superoxide dismutase-a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception* 65(4), 305-311.
- Nonogaki, T., Noda, Y., Narimoto, K., Shiotani, M., Mori, T., Matsuda, T. and Yoshida, O. (1992) Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. *Hum. Reprod.* 7(1), 81-85.
- Sluka, P., O'Donnell, L., McLachlan, R.I. and Stanton, P.G. (2008) Application of laser-capture microdissection to analysis of gene expression in the testis. *Prog. Histochem. Cytochem.* 42(4), 173-201.
- Venkatesh, S., Deecaraman, M., Kumar, R., Shamsi, M.B. and Dada, R. (2009) Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility. *Indian J. Med. Res.* 129(2), 127-137.
- Wang, X.Z., Liu, S.S., Sun, Y., Wu, J.Y., Zhou, Y.L. and Zhang, J.H. (2009) Beta-cypermethrin impairs reproductive function in male mice by inducing oxidative stress. *Theriogenology* 72(5), 599-611.
- Wang, S., Wang, L., Zhu, T., Gao, X., Li, J., Wu, Y. and Zhu, H. (2010) Improvement of tissue preparation for laser capture microdissection: application for cell type-specific miRNA expression profiling in colorectal tumors. *BMC Genomics* 11, 163.
- Zelko, I.N., Mariani, T.J. and Folz, R.J. (2002) Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the Cu/Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33(3), 337-349.