

УДК 577.25:58

ТЕМПЕРАТУРОЗАЛЕЖНА АКТИВНІСТЬ ГВАЯКОЛПЕРОКСИДАЗИ У АРХ2 НОКАУТ- МУТАНТІВ АРАБІДОПСИСУ

Р.Ю. ПИРІЖОК, Р.А. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
Україна 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2
e-mail: volkovr@chv.ukrpack.net

Зміни активності гваяколпероксидази (POD) за дії теплового стресу було досліджено у рослин арабідопсису дикого типу та у двох ліній нокаут-мутантів по аскорбатпероксидазі 2 (Арх2). Після 2 годин дії помірного теплового стресу (37 °С) активність POD зростала на 27–36 %; при цьому різниця між рослинами дикого типу та нокаут-мутантами була недостовірною. Жорсткий тепловий стрес спричиняв більш суттєвий ефект: після 2 годин інкубації при 44 °С активність POD у двох ліній нокаут-мутантів була на 60 та 77 %, а у рослин дикого типу – лише на 16 % вище порівняно з контрольними пробами, які інкубували при кімнатній температурі. Отримані дані свідчать, що POD бере участь у відповіді на тепловий стрес і може функціонально компенсувати втрату активності АРХ.

Ключові слова: Arabidopsis thaliana, аскорбатпероксидаза, гваяколпероксидаза, тепловий стрес, нокаут-мутанти.

Вступ. Однією з активних форм кисню у рослинній клітині є пероксид водню, який за нормальних умов продукується у хлоропластах, мітохондріях, мікосоммах та плазматичній мембрані [1–4]. За дії стресових факторів біотичної та абіотичної природи концентрація пероксиду водню зростає [2, 5–7]. Крім пошкоджуючої дії на ДНК, білки та мембрани пероксид водню має функцію важливої сигнальної молекули, яка бере участь у активації декількох сигнальних ланцюгів, що призводить до активації транскрипції відповідних стресових генів [4, 6, 8, 9]. Зокрема, зростання клітинного рівня пероксиду водню та участь цієї сполуки у активації стресової відповіді були продемонстровані за дії теплового стресу [10–12].

Рівень пероксиду водню у рослинній клітині контролюється ферментами каталазами та пероксидазами [13–15]. На відміну від каталаз, пероксидази здатні розщеплювати пероксид водню при дуже низьких концентраціях, використовуючи при цьому різноманітні субстрати. Відпо-

відно до субстратної специфічності та амінокислотної послідовності рослинні пероксидази поділяють на дві основні групи: аскорбатпероксидази (APX) [14, 16], які використовують як субстрат відновлений аскорбат, та пероксидази гваяколового типу або "класичні" пероксидази (POD), які мають широку субстратну специфічність [14, 15, 17, 18]. Обидві групи ферментів кодуються мультигенними родинами, до складу яких у модельної рослини *Arabidopsis thaliana* входять 9 генів у випадку APX [14, 19] та 73 гени у випадку POD [18]. Наявність великої кількості членів у складі цих мультигенних родин вказує на потенційну функціональну спеціалізацію. Зокрема встановлено, що індивідуальні ізоформи пероксидаз виконують свою функцію у різних клітинних компартментах [14, 16, 18, 19] та для різних POD встановлено певну субстратну специфічність [18]. Крім того вважається, що деякі члени мультигенних родин можуть виконувати однакові функції (феномен генетичної надлишковості), що підвищує надійність роботи рослинної клітини. Проте прямих доказів на користь таких уявлень зібрано все ще небагато. Зокрема фізіологічна роль окремих генів, що кодують APX та POD залишається все ще не до кінця зрозумілою. Для перевірки гіпотези, що в умовах теплового стресу активація POD може компенсувати втрату активності окремих ізоформ APX ми дослідили зміни активності POD у рослин арабідопсису тикого типу та у двох ліній нокаут-(knock-out) мутантів з порушеною експресією гена *Apx2*.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження слугували рослини *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. дикого типу (Columbia 0) та дві лінії нокаут-мутантів загеном *Apx2* (At3g09640). Рос-

лини вирощували в стерильних умовах на середовищі Гамборга [20] та перліті за 22 °С в умовах 12-годинного світлового дня. Перед тепловою обробкою культивування продовжували при 28 °С протягом 3 днів [19].

Рослини 3-4 тижневого віку (фаза 6-7 листків) піддавали тепловому стресу. Теплову обробку проводили в інкубаційному буфері, що містив 1 мМ К-фосфатний буфер (рН 6,0) та 1 % цукрозу. Обробку здійснювали в темряві протягом 1, 2 та 4 год за 22, 37 та 44 °С. Для вивчення процесів, що відбуваються у фазі постстресової репарації через 1 або 2 год після початку стресової обробки зразки переносили в камеру, де підтримували температуру 22 °С, і продовжували інкубацію протягом 1 або 2 год, відповідно.

Для екстракції білків використовували буфер, що містив 50 мМ Na-фосфатний буфер (рН 7,0), 10 % гліцерол, 1 мМ аскорбат. Для цього до 200 мкл охолодженого екстракційного буфера додавали 100 мг замороженого рослинного матеріалу, центрифугували 10 хв за 15 000 g та температури +4 °С, відбирали супернатант та зберігали на льоду до визначення активності POD.

Загальну активність POD визначали спектрофотометрично вимірюванням зміни оптичної густини проби при 470 нм. Реакційна проба містила 25 мкл білкового екстракту та 1 мл реакційного буфера, що містив 25 мМ Na-ацетатний буфер (рН 5,0), 8 мМ гваякол та 9 мМ H₂O₂. Активність ферменту виражали як зміну оптичної густини на 1 мг білка в пробі за 1 хв. Кількість білка у супернатанті визначали за методом Бредфорда [21]. Отримані дані опрацьовували статистично [22].

Результати та обговорення

У наших експериментах були використані дві лінії нокаут-мутантів за

Arx2, які були раніше відібрані у нашій лабораторії на основі насіння, отриманого з колекції NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, University of Nottingham, Великобританія). Ці дві лінії, КО-24 та КО-25, містять вставку Т-ДНК у кодуючій частині гена *Arx2*, що унеможлиблює утворення нормальної мРНК. Дослідження нокаут-мутантів саме за *Arx2* було актуальним тому, що згідно з нашими даними *Arx2* є типовим стресовим геном, який не транскрибується за нормальних умов культивування арабідопсису, але різко індукується за дії теплового стресу [11, 19].

Отримані результати показують, що в листках досліджуваних рослин активність POD достовірно зростає за дії помірного теплового стресу при 37 °С порівняно з контрольними зразками, які інкубувались при кімнатній температурі (рис.). Максимальне зростання – на 27–36 % – спостерігали після інкубації протягом 2 годин, тоді як після 4 годин приріст активності становив лише 8–13 %. Слід зазначити, що після інкубації при 37 °С протягом 1 години збільшення активності POD не відбувалось. У фазі післястресової репарації (комбінована обробка зразків: спочатку інкубація при підвищеній, а після цього – при кімнатній температурі) активність POD знижувалась до рівня контролю. В жодному з варіантів обробки при 37 °С не було виявлено різниці між нокаут-мутантами за *Arx2* та диким типом.

В цілому отримані нами дані узгоджуються з існуючими уявленнями про те, що перші дві години дії підвищеної температури відповідають ранній фазі відповіді рослинної клітини на тепловий стрес, на початку якої зростає рівень перексиду водню, відбувається денатурація термочутливих білків та

порушення цілісності мембранних структур [5, 11, 19]. Все це призводить до метаболічного дисбалансу у клітині та спричиняє активацію транскрипції генів білків теплового шоку, які необхідні для репарації порушень [23]. Раніше нами було показано, що незважаючи на зростання внутрішньоклітинного рівня перексиду водню активність АРХ залишається без змін в умовах помірного теплового стресу [19]. Отже, зростання активності POD за цих умов може бути необхідним для розщеплення надлишку перексиду водню. Відомо, що експресія стресових генів досягає максимуму наприкінці ранньої фази [19, 24]. При подальшому впливі підвищеної температури настає пізня фаза стресової відповіді, у якій починається адаптація рослини та нормалізація метаболічних реакцій (зокрема рівень перексиду водню знижується до контрольних значень [11]), що супроводжується поступовим зменшенням експресії стресових генів та активності стресових білків. Саме таку картину ми спостерігали у наших експериментах щодо активності POD через чотири години стресової обробки при 37 °С. Отже, отримані данні вказують на те, що POD бере участь у ранній фазі відповіді арабідопсису на помірний тепловий стрес.

За дії жорсткого теплового стресу при 44 °С було також виявлено зростання активності POD (рис.). Максимальний ефект спостерігали після 2 годин стресової обробки. Порівняно з контрольними зразками, які інкубувались при кімнатній температурі зростання активності POD становило 16 % для рослин дикого типу та 60 і 77 % для нокаут ліній КО-24 та КО-25. Як і за дії помірного теплового стресу, підвищену активність POD спостерігали при стресовій обробці протягом 4 годин, а

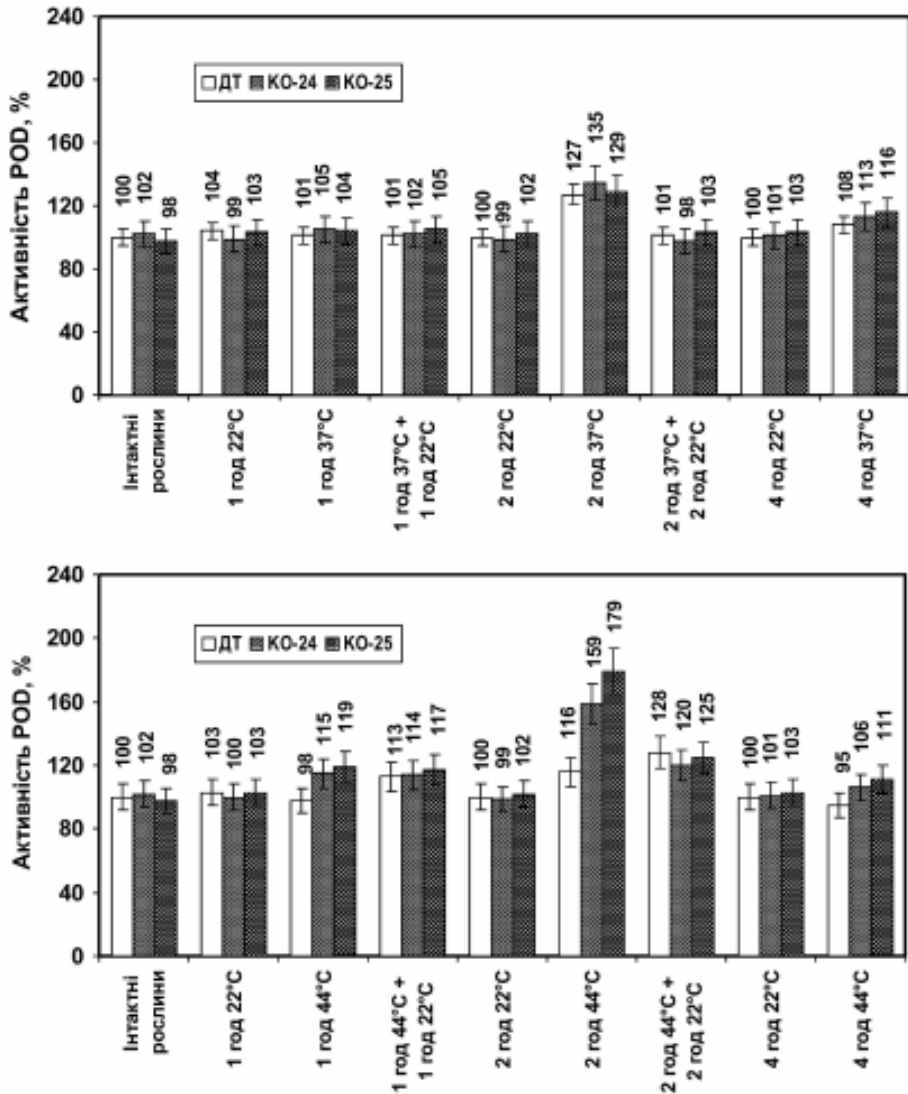


Рисунок. Відносна активність POD у рослинах *Arabidopsis thaliana* дикого типу (ДТ) та нокаут-мутантів за *Arx2* (KO-24 та KO-25) за дії помірного(37 °С) та жорсткого (44 °С) теплового стресу

також, на відміну від помірного теплового стресу, і після 1 години. У фазі післястресової репарації активність POD знижувалась, але залишалась підвищеною порівняно з контролем.

Слід зазначити, що зростання активності POD за дії жорсткого теплового стресу було сильнішим, ніж за дії помірного стресу. Це можна пояснити

тим, що, як було показано нами раніше, при 44° С відбувається інактивація APX [19], тоді як POD є значно термостабільнішим ферментом [15, 17], що дозволяє йому ефективно розщеплювати пероксид водню в умовах жорсткого теплового стресу. Інакше кажучи, зростання активності POD має компенсувати втрату активності APX. Раніше

нами було продемонстровано зростання загальної активності та індукцію окремих ізоформ POD у кукурудзи за дії жорсткого теплового стресу [25]. Отже, складається враження, що цей механізм є універсальним як для дводольних, так і для однодольних рослин.

Знайдена нами різниця в індукції активності POD між рослинами дикого типу та нокаут-мутантами наводить на думку, що у рослин дикого типу *Арх2* не є повністю інактивованою при 44 °C та може брати участь у розщепленні надлишку перексиду водню. Відповідно, додаткове зростання активності POD, яке спостерігається у досліджених нокаут-мутантів, має компенсувати повну втрату активності *Арх2*.

Висновки

За дії підвищених температур (37 та 44 °C) активність POD у листках *A. thaliana* зростає, що вказує на участь цього ферменту у контролі рівня перексиду водню в умовах помірного та жорсткого теплового стресу. Зростання активності POD може функціонально компенсувати втрату активності *АРХ* в умовах жорсткого теплового стресу.

Перелік літератури

1. Asada K., Takahashi M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis / Kyle, D.J., Osmond, C.B., Arntzen, C.J. (eds.) Photoinhibition. – Amsterdam: Elsevier, 1987. – P. 227–287.
2. Desikan R., Hancock J.T., Coffey M.J., Neill S.J. Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme // FEBS Lett. – 1996. – Vol. 382, № 1 – P. 213–217.
3. Moller I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species // Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. – 2001. – Vol. 52. – P. 561–591.
4. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // Annu. Rev. Plant. Biol. – 2004. – Vol. 55. – P. 373–399.
5. Panchuk I., Pyrizhok R., Volkov R. Engineering of new plants cultivars with improved abiotic stress tolerance // Ann. Suceava Univ. – 2007. – Vol. 6, № 1 – P. 25–35.
6. Karpinski S., Reynolds B., Karpinska B., Wingsle G., Creissen G., Mullineaux P. The role of hydrogen peroxide and antioxidants in systemic acclimation to photooxidative stress in *Arabidopsis* / Smallwood M.F., Calvert C.M., Bowles D.J. (eds.) Plant Responses to Environmental Stress. – Oxford: Bios Scientific Publishers, 1999. – P. 25–32.
7. O’Kane D., Gill V., Boyd P., Burdon R. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus // Planta. – 1996. – Vol. 198, № 1. – P. 371–377.
8. Dat J., Vandenbeeke S., Vranova E., Van Montag, M., Inze D., Van Breusegem F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses // Cell. Mol. Life Sci. – 2000. – Vol. 57. – P. 779–795.
9. Neil S., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants // J. Exp. Bot. – 2002. – Vol. 53. – P. 1237–1247.
10. Dat J.F., Foyer C.H., Scott I.M. Changes in salicylic acid and antioxidants during induction of thermotolerance in mustard seedlings // Plant Physiol. – 1998. – Vol. 118. – P. 1455–1461.
11. Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux F.M., Schuffl F. Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* // Plant. Mol. Biol. – 2006. – Vol. 61, № 4–5. – P. 733–746.
12. Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stress: A delicate balance between signaling and destruction // Physiologia Plantarum. – 2006. – Vol. 126, № 1. – P. 45–51.

13. Scandalios J.G., Guan L., Polidoros A.N. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression / Scandalios J.G. (ed.) Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses. – Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. – P. 343–406.
14. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants // Trends Plant Sci. – 2004. – Vol. 9, № 10. – P. 490–498.
15. Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биол. химии. – 2006. – Т. 46. – С. 303–322.
16. Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes // J. Experim. Bot. – 2002. – Vol. 53, № 372. – P. 1305–1319.
17. Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. A large family of class III plant peroxidases // Plant Cell Physiol. – 2001. – Vol. 42, № 5. – P. 462–468.
18. Tognolli M., Penel C., Greppin H., Simon P. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana* // Gene. – 2002. – Vol. 288, № 1. – P. 129–138.
19. Panchuk I., Volkov R., Schoffl F. Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // Plant Physiol. – 2002. – Vol. 129, № 6. – P. 838–853.
20. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell Res. – 1968. – Vol. 50, № 1. – P. 151.
21. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analyt. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
22. Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. узов. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.
23. Vierling E. The roles of heat shock proteins in plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. – 1991 – Vol. 42. – P. 579–620.
24. Панчук І.І., Пиріжок Р.Ю., Волков Р.А. Диференційна регуляція генів теплового стресу у *Arabidopsis thaliana* / Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: збірник наукових праць. – Т.1 – Київ: Логос, 2007. – С. 158–161.
25. Пиріжок Р.Ю., Волков Р.А., Панчук І.І. Активність пероксидази проростків кукурудзи в умовах теплового стресу // Физиол. биохим. культурн. растен. – 2008 – Т. 40 (у друці).

Представлено В.А. Кунахом
Надійшла 10.11.2008

ТЕМПЕРАТУРОЗАВИСИМАЯ АКТИВНОСТЬ ГВЯЯКОЛПЕРОКСИДАЗЫ У АРХ2 НОКАУТ-МУТАНТОВ АРАБИДОПСИСА

Р.Ю. Пырижок, Р.А. Волков, И.И. Панчук
Черновицкий национальный университет
имени Юрия Федьковича
Украина, 58012, Черновцы, ул. Коцюбин-
ского, 2
e-mail: volkovr@chv.ukrpack.net

Изменения активности гваяколпероксидазы (POD) под воздействием теплового стресса было изучено у растений арабидопсиса дикого типа и у двух линий нокаут-мутантов по аскорбатпероксидазе 2 (Арх2). После 2 часов воздействия умеренного теплового стресса (37 °С) активность POD возросла на 27–36%; при этом разница между растениями дикого типа и нокаут-мутантами была недостаточной. Жесткий тепловой стресс вызывал более существенный эффект: после 2 часов инкубации при 44 °С активность POD у двух нокаут-мутантов была на 60 и 77%, а у растений дикого типа – только на 16% выше по сравнению с контрольными пробами, которые инкубировали при комнатной температуре. Полученные данные свидетельствуют, что POD принимает участие в ответе на тепловой стресс и может функционально компенсировать утрату активности АРХ.

Ключевые слова: аскорбатпероксидаза, гваяколпероксидаза, тепловой стресс, нокаут-мутанты, Arabidopsis thaliana.

HEAT-DEPENDENT ACTIVITY OF GUAIACOL PEROXIDASE IN *APX2* KNOCK-OUT MUTANTS OF *ARABIDOPSIS*

*R. Yu. Pyrizhok, R. A. Volkov, I. I. Panchuk
Fedkovich National University of Chernivtsy
Ukraine, 58012, Chernivtsy, Kotsubynskogo
str. 2*

e-mail: volkovr@chv.ukrpack.net

Changes in guaiacol peroxidase (POD) activity upon heat shock were tested wild type plants of *Arabidopsis* and in two lineages of ascorbate peroxidase 2 (*Arx2*) knock-out mutants. After 2

hours of moderate heat treatment (37 °C) 27–36% increase of POD activity was found; no significant difference between the wild type plants and knock-out mutants was observed. Upon severe heat shock the effect was better pronounced: after 2 hours treatment at 44 °C POD activity was 60 and 77% higher in two lineages of knock-out mutants but only 16% higher in wild type plants comparing to the control probes incubated at room temperature. The data indicate that POD appears to be involved in the heat stress response and can functionally compensate the loss of APX activity.

Key words: ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, heat shock, knock-out mutants, Arabidopsis thaliana.