

УДК 577.152.193+577.218

ПІДВИЩЕНА АКТИВНІСТЬ АСКОРБАТ ПЕРОКСИДАЗИ У ПОДВІЙНОГО МУТАНТА *ARABIDOPSIS THALIANA* ЗА ГЕНАМИ *CAT 2* ТА *CAT 3*

І.М. ДОЛІБА, Т.О. РУСНАК, Р.А. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології,
Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
Україна, м. Чернівці, 58012, вул. Коцюбинського, 2
e-mail: irina.panchuk@gmail.com

Досліджено зміни активності аскорбат пероксидази (APX) за дії теплового шоку у рослин *Arabidopsis thaliana* (екотип *Columbia 0*) дикого типу та у нокаутного мутанта за генами *Cat2* та *Cat3* – *CAT2/3*, який має суттєво знижену активність каталази. За дії помірного теплового шоку (37 °C) та за кімнатної температури активність APX була від 30 до 60 % вище у мутантній лінії порівняно з *A. thaliana* дикого типу. Помірна теплова обробка не мала жодного впливу на активність APX, тоді як жорсткий тепловий шок (44 °C) призводив до інактивації ферменту. Отримані нами дані свідчать, що за кімнатної температури або за помірної теплової обробки активація APX може, принаймні частково, компенсувати втрату активності *CAT* у нокаутного мутанта *CAT2/3*. Проте через свою термолабільність APX не може замінити *CAT* в умовах жорсткого теплового шоку.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, каталаза, аскорбат пероксидаза, пероксид водню, тепловий шок, нокаут-мутанти.

Вступ. У вищих рослин активні форми кисню (АФК) утворюються в хлоропластах, мітохондріях, пероксисомах та плазматичній мембрані [1–4]. Однією із АФК є пероксид водню (H_2O_2), концентрація якого у рослинній клітині залежить від багатьох факторів, зокрема зростає за дії абіотичних стресових чинників [2, 5–7]. Це може призводити до окислення білків, нуклеїнових кислот і мембранних ліпідів. Відповідно, нормалізація рівня H_2O_2 є одним з елементів, суттєвих для виживання клітини за дії стресу [8, 9]. Було також доведено, що крім шкідливої дії H_2O_2 має функцію сигнальної молекули, яка є необхідною для активації сигнальних ланцюгів, задіяних у індукції захисної відповіді, а саме – для підвищення транскрипції стресових генів [4, 6, 10–13]. Зокрема у наших попередніх дослідженнях було продемонстровано зростання клітинного рівня H_2O_2 та участь цієї сполуки у активації стресової відповіді за дії теплового стресу на *Arabidopsis thaliana* [9]. Отже, з'ясування механізмів генерації та розщеплення H_2O_2 в умовах стресу є необхідним для розуміння механізмів шокгової відповіді та адаптації.

Рівень H_2O_2 у рослинній клітині контролюється ферментами-каталазами (*CAT*) та пероксидазами, зокрема – аскорбат пероксидазою (APX) [14–16]. *CAT* перетворює дві молекули H_2O_2 у дві молекули води та молекулу кисню. На відміну від цього, APX відновлює пероксид водню до води, використовуючи для цього як субстрат відновлений аскорбат [15, 17]. Обидві групи ферментів коду-

ються мультигенними родинами, до складу яких у модельної рослини *A. thaliana* входять 9 генів у випадку APX [15, 18] та 3 гени у випадку CAT [14]. Наявність декількох членів у складі цих мультигенних родин вказує на потенційну функціональну спеціалізацію кодованих ними ізоферментів. Зокрема встановлено, що індивідуальні ізоформи APX виконують свою функцію у різних клітинних компартментах [15, 17]. Також відомо, що у *A. thaliana* експресія генів, які кодують ізоформи APX та CAT залежить від стадії розвитку рослини [19, 20]. Серед ізоформ каталази найбільш експресованою є CAT 2, на частку якої припадає 70 % загальної каталазної активності у тканинах мезофілу листків. Активність CAT 3 виявляється тільки у васкулярних тканинах, а CAT 1 – під час старіння [14, 20]. Активність деяких ізоферментів APX та CAT та транскрипція відповідних генів порізному реагують на стресові впливи, зокрема – на тепловий шок [18, 21]. З іншого боку вважається, що деякі члени мультигенних родин можуть виконувати однакові функції (феномен генетичної надлишковості), що підвищує надійність роботи рослини клітини. Проте прямих доказів на користь таких уявлень зібрано все ще небагато. Зокрема фізіологічна роль окремих генів, що кодують APX залишається не до кінця зрозумілою.

Зручним інструментом для вивчення функціональної спеціалізації та взаємозамінності різних ферментів та їх окремих ізоформ є мутантні форми із порушеною функцією відповідних генів. Для перевірки припущення, що в умовах теплового стресу APX може компенсувати втрату активності окремих ізоформ CAT ми дослідили зміни активності APX у рослин *A. thaliana* дикої типу та у подвійного нокаут (knock-out) мутанта з порушеною експресією генів *Cat2* та *Cat3*.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження слугували рослини *A. thaliana* (L.) Heynh. дикої типу (екотип Columbia 0) та гомозиготна лінія CAT2/3, яка є подвійним нокаут-мутантом за генами *Cat2* (At1g20620) та *Cat3* (At4g35090). Лінію CAT2/3 було отримано схрещуванням двох нокаутних ліній, кожна з яких несе вставку T-ДНК у одному з екзонів генів *Cat2* або *Cat3*, відповідно. Насіння мутантної лінії CAT2/3 було люб'язно надано нам Др. Ульріке Центграф (Центр молекулярної біології рослин, м. Тюбінген, Німеччина).

Рослини вирощували у ґрунті в культивацийній кімнаті при сталій температурі +20 °C, освітленні 2,5 κЛк в умовах 16-годинного світлового дня.

Для експериментів застосовували рослини 7-тижневого віку (фаза 10–12 листків). Для кожного варіанта досліду використовували 12–15 листків середньої частини розетки. Відокремлені від рослин листки поміщали у 1 мМ К-фосфатний буфер (pH 6,0) та піддавали тепловому шоку. Обробку проводили у темряві протягом 1, 2 та 4 год за 22, 37 та 44 °C. Для вивчення процесів, що відбуваються у фазі постшокової репарації через 1 або 2 год після початку шокової обробки зразки переносили в камеру, де підтримували температуру 22 °C, і продовжували інкубацію протягом 1 або 2 год, відповідно. Після завершення обробки рослини заморожували в рідкому азоті та зберігали в морозильній камері за температури –70 °C для подальших досліджень. Як додатковий контроль використовували інтактні листки, які заморожували безпосередньо після відокремлення від рослини.

Екстракцію білків проводили у буфері, що містив 50 мМ фосфат натрію (pH=7,0), 0,25 мМ ЕДТА, 20 % гліцерин, 0,5 мМ аскорбат та 2 % полівінілпіролідон. Кількість білка в екстракті визначали за методом Бредфорда [22]. Активність APX вимірю-

вали за загальноприйнятим методом [18, 23]. Активність ферменту виражали в мкмоль аскорбату, окисленого за 1 хв у перерахунку на 1 мг білка. Вимірювання проводились в трьох паралелях та шести біологічних повторностях. Статистичну обробку даних проводили за критерієм Ст'юдента [24].

Ізоферментний спектр APX визначали методом електрофорезу у 12 % ПААГ [25]. Електрофорез проводили при напруженості електричного поля 10 В/см протягом 3–4 год. Для візуалізації ізоформ APX гель спочатку інкубували у розчині 50 мМ натрій-фосфатного буфера (рН 7,0), що містив 4 мМ аскорбат, а потім у такому ж розчині, який додатково містив пероксид водню у кінцевій концентрації 2 мМ. Забарвлення гелю проводили у буфері такого складу: 50 мМ натрій-фосфат (рН 7,8), 28 мМ ТЕМЕД, 2,45 мМ нітросиній тетразолій (NBT). Після появи білих смуг на фіолетовому фоні гель переносили у дистильовану воду для зупинки реакції.

Результати та обговорення

У попередніх дослідженнях нами було встановлено, що рівень активності САТ у листках рослин нокаутної лінії САТ2/3 становить лише 24 % від активності САТ у дикого типу. Дослідження ізоферментного спектра САТ показало, що ця активність зумовлена ізоформою САТ 1, тоді як ізоформи САТ 2 та САТ 3 у нокаутної лінії повністю відсутні (данні не наводяться). З літератури відомо, що САТ 1 експресується у листках рослин дикого типу лише у віці 9,5 тижнів [20]. Отже, її появу у семитижневих рослин слід розглядати як часткову компенсацію втрати активності САТ 2 та САТ 3.

Подальші експерименти показали, що у листках інтактних рослин нокаутної лінії САТ2/3 активність APX є на 28 % вищою, ніж в листках рослин дикого типу (рис. 1). Цей ефект слід також розглядати як клітинну реакцію, спрямовану на подальшу компенсацію низької активності САТ у мутанта. Проте залишається незрозумілим, активація яких саме ізоформ відповідає за зрос-

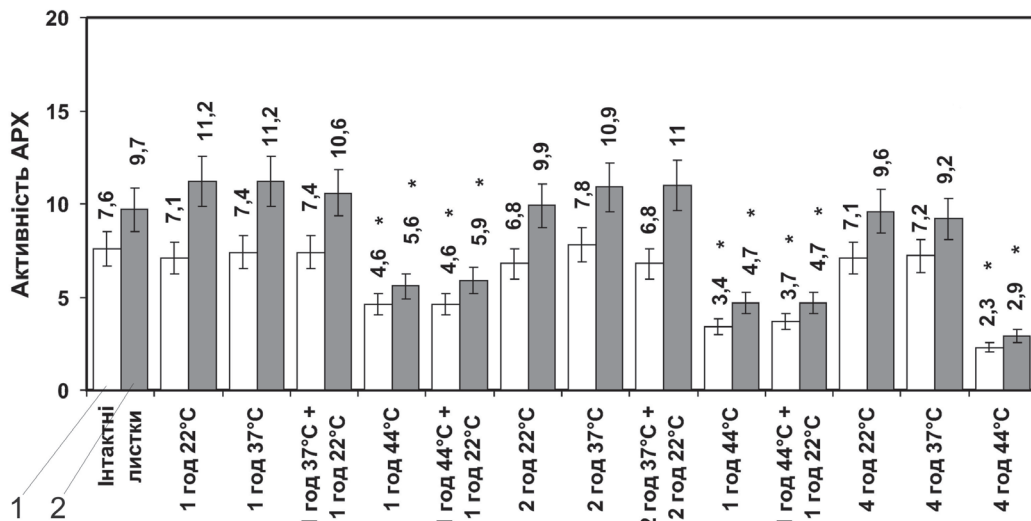


Рис. 1. Активність APX (мкмоль/мг білка/хв) у листках рослин *Arabidopsis thaliana* дикого типу (ДТ) та нокаут-мутантної лінії САТ2/3 (КО-САТ2/3) за дії помірного (37 °С) та жорсткого (44 °С) теплового стресу: 1 – ДТ; 2 – КО-САТ2/3; зірочкою (*) позначено стовпчики із статистично достовірною різницею між контролем і дослідною точкою; різниця між рослинами дикого типу та мутантом достовірна в усіх експериментальних точках (p<0,05).

тання загальної активності АРХ у мутантної лінії і на якому рівні – транскрипційному чи посттранскрипційному – забезпечується це зростання. Це питання потребує подальшого вивчення, наприклад, шляхом визначення рівня експресії окремих генів АРХ на рівні мРНК.

Визначення активності АРХ у листках *A. thaliana*, які зазнали дії помірного теплового шоку (37 °С) або інкубувались за кімнатної температури показало, що ця активність знаходилась у межах від 6,8 до 7,8 мкмоль/мг білка/хв у рослин дикого типу та від 9,2 до 11,2 у мутантів. Отже, залежно від варіанта досліджу, активність АРХ у мутантних рослин була на 30–60 % вищою, ніж у рослин дикого типу. Втім, як у рослин дикого типу, так і у мутантів статистично достовірної різниці між листками, які зазнавали стресової обробки та відповідними контрольними зразками знайдено не було. Це останнє спостереження цілком узгоджується із нашими попередніми даними, отриманими при вивченні дії теплового шоку на рослини *A. thaliana* екотипу С24 [18].

За дії жорсткого теплового шоку (44 °С) активність АРХ у обох досліджених форм рослин достовірно знижувалась порівняно з контрольними зразками, які інкубувались при кімнатній температурі (рис. 1). При цьому спостерігали пряму залежність між зниженням активності АРХ та часом обробки. Так, максимальне зменшення активності – на 68 % у дикого типу та на 70 % у лінії CAT2/3 – спостерігали після інкубації протягом 4 год. Обробка за 44 °С призвела до падіння активності АРХ у дикого типу та у нокаутної лінії відповідно на 35 % і 50 % після інкубації протягом 1 год та на 50 % і 53 % після інкубації протягом 2 год. Отже, у рослин дикого типу та мутантів виявлено майже однаковий характер інактивації АРХ після інкубації за 44 °С протягом 2 та 4 год, тоді як після 1 год відносно зниження активності АРХ було сильнішим у

лінії CAT2/3. Враховуючи, що ізоформи АРХ у *A. thaliana* відрізняються за термо-стабільністю [18], отримані данні свідчать, що підвищена активність АРХ у лінії CAT2/3 пов'язана із експресією відносно термостабільних ізоформ.

Отримані дані в цілому узгоджуються із нашими попередніми результатами [18] про інактивацію АРХ за дії жорсткого теплового шоку на рослини *A. thaliana* екотипу С24. Проте у С24 спостерігали більш суттєве падіння активності АРХ – на 89 % після обробки протягом 4 год проти 68 % у *Colombia 0*. Отже, екотипи *A. thaliana* можуть відрізнятися за термостабільністю АРХ.

У фазі постшокової репарації (комбінована обробка зразків: спочатку інкубація при підвищеній, а після цього – при кімнатній температурі) не відбувалось змін у активності АРХ порівняно із відповідною стресовою обробкою.

Для перевірки можливості, що тепловий шок може по-різному впливати на активність окремих ізоформ АРХ, досліджено зміни у ізоферментних спектрах за дії помірного та жорсткого теплового шоку. Проте існуючий метод визначення відносної активності окремих ізоформ АРХ після електрофоретичного розділення в гелі дозволяє впевнено ідентифікувати лише цитоплазматичну АРХ 1 [18, 25]. Вважається, що це пов'язано з інактивацією інших ізоформ протягом експерименту.

У результаті електрофоретичного аналізу ізоферментних спектрів було встановлено, що інтенсивність ізоформи АРХ 1 практично не відрізнялась для зразків, які інкубувались за 22 та 37 °С (рис. 2). У той же час у зразків, які зазнали дії жорсткого теплового стресу за 44 °С інтенсивність ізоформи АРХ 1 була меншою, причому зниження інтенсивності смуги корелювало із часом обробки. Для рослин дикого типу та CAT2/3 отримано однакову картину. Ці результати добре узгоджуються із даними вимірювання загальної активності АРХ

(рис. 1) і вказують на те, що зниження активності APX 1 вносить вклад у загальне зниження активності цього ферменту за дії жорсткого теплового стресу.

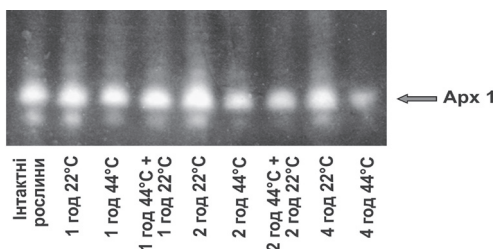


Рис. 2. Ізоферментні спектри APX у листках рослин *Arabidopsis thaliana* дикого типу за дії жорсткого (44°C) теплового шоку

Раніше нами було встановлено, що зростання активності CAT 2 і CAT 3 є компонентом стресової відповіді клітин листків *A. thaliana* на помірний та жорсткий тепловий шок [21]. Зокрема, суттєве зростання активності CAT – майже в 3 рази порівняно з контролем – виявлено за дії жорсткого шоку протягом 2 год. Відповідно, можна було очікувати, що втрата активності CAT 2 і CAT 3 у мутанта має супроводжуватись додатковим зростанням активності APX саме за дії жорсткого теплового шоку. Проте отримані результати не підтверджують таку думку. Це можна пояснити тим, що APX є термолабільним ферментом, отже, зростання її активності за умов жорсткого теплового стресу неможливо.

Висновки

У цілому отримані результати свідчать, що у мутантній лінії *A. thaliana* спостерігали підвищення базової активності APX, яке може частково компенсувати інактивацію генів *Cat 2* та *Cat 3* за нормальних умов вирощування та за дії помірного теплового шоку. Проте внаслідок термолабільності APX не може функціонально замінювати CAT за умов жорсткого теплового шоку.

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 // *Annu. 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. Alscher R.G., Donahue J.L., Cramer C.L. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells // *Physiol. Plantarum*. – 1997. – Vol. 100. – P. 224–233.
9. Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux F.M., Schöffl 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.
10. Desikan R., Cheung M-K., Bright J., Henson D., Hancock J.T., Neill S.J. ABA, hydrogen and nitric oxide signalling in stomatal guard cells // *J. Exp. Bot.* – 2004. – Vol. 55, № 395. – P. 205–212.
11. Hung S.-H., Yu C.-W., Lin C.H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants // *Bot. Bull. Acad. Sin.* – 2005. – Vol. 46. – P. 1–10.
12. Dat J., Vandenbeeke S., Vranova E., Van Montag, M., Inzé D., Van Breusegem F. Dual action of the active oxygen species during plant stress re-

- sponses // Cell. Mol. Life Sci. – 2000. – Vol. 57. – P. 779–795.
13. 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.
 14. 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.
 15. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants // Trends Plant Sci. – 2004. – Vol. 9, № 10. – P. 490–498.
 16. Газарян І.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биолог. химии. – 2006. – Т. 46. – С. 303–322.
 17. Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes // J. Exp. Bot. – 2002. – Vol. 53, № 372. – P. 1305–1319.
 18. Panchuk I., Volkov R., Schöffl 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.
 19. Panchuk I.I., Zentgraf U., Volkov R.A. Differential expression of APX genes during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* // Planta. – 2005. – Vol. 222. – P. 926–932.
 20. Orendi G. Expression von Katalasen während der Blattseneszens und unter verschiedenen Stressbedingungen in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. – Dissertation Verlag Grauer. – 2001. – 135 s.
 21. Долиба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Зміни активності каталази у *Arabidopsis thaliana* дикого типу та у нокаутного мутанта по гену *арх2* за дії теплового шоку // Вісник УТГіС. – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 211–217.
 22. 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.
 23. Amako K., Chen G., Asada K. Separate assays for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants // Plant Cell Physiol. – 1994. – Vol. 35. – P. 497–504.
 24. Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. узов. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.
 25. Mittler R., Zilinskas B. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium // Anal. Biochem. – 1993. – Vol. 212. – P. 540–546.

Представлено В.А. Кунахом
Надійшла 21.03.2011

ПОВЫШЕННАЯ АКТИВНОСТЬ АСКОРБАТ ПЕРОКСИДАЗЫ У ДВОЙНОГО МУТАНТА *ARABIDOPSIS THALIANA* ПО ГЕНАМ *CAT 2* И *CAT 3*

И.Н. Долиба, Т.О. Руснак, Р.А. Волков,
И.И. Панчук

Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича
Украина, 58012, Черновцы, ул. Коцюбинского 2
e-mail: irina.panchuk@gmail.com

Были оценены изменения активности аскорбат пероксидазы (АРХ) под воздействием теплового шока у растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа (экотип Columbia 0) и у нокаутного мутанта по генам *Cat2* и *Cat3* – CAT2/3, который имеет существенно пониженную активность каталазы. При умеренном тепловом шоке (37 °С) и при комнатной температуре активность АРХ была от 30 до 60 % выше у мутантной линии по сравнению с диким типом *A. thaliana*. Умеренная тепловая обработка не влияла на активность АРХ, тогда как жесткий тепловой шок (44 °С) приводил к инактивации фермента. Полученные нами данные показывают, что при комнатной температуре или при умеренной тепловой обработке активация АРХ может, по крайней мере частично, компенсировать отсутствие активности CAT у нокаутного мутанта CAT2/3. Однако, из-за своей термолабильности АРХ не может заменить CAT при жестком тепловом шоке.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, каталаза, аскорбат пероксидаза, перекись водорода, тепловой шок, нокаут-мутанты.

**INCREASED ACTIVITY OF ASCORBATE
PEROXIDASE IN *CAT 2* AND *CAT 3* DOUBLE
KNOCK-OUT MUTANT OF *ARABIDOPSIS*
*THALIANA***

I.M. Doliba, T.O. Rusnak, R.A. Volkov, I.I. Panchuk

Department of Molecular Genetics and
Biotechnology

Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsubynski str. 2
e-mail: irina.panchuk@gmail.com

Changes in ascorbate peroxidase (APX) activity upon heat shock were evaluated in wild type plants of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia 0) and in catalase 2 and 3 (*Cat2*, *Cat3*) knock-out mutant *CAT2/3*, which demonstrates

significantly reduced catalase activity. Upon moderate heat shock (37 °C) and at room temperature activity of APX was from 30 to 60 % higher in the mutant than in wild type *A. thaliana*. The moderate heat treatment does not affect the APX activity whereas severe heat shock (44 °C) resulted in enzyme inactivation. Taking together our data show that at room temperature or upon moderate heat treatment activation of APX can at least partially compensate the lack of CAT activity in the *CAT2/3* knock-out mutant. However, due to thermolability APX can not substitute CAT upon severe heat shock.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, catalase, ascorbate peroxidase, hydrogen peroxide, heat shock, knock-out mutants.