

УДК 577.218 + 577.151.042:577.152.193

## **РОЛЬ ІЗОФОРМИ КАТАЛАЗИ CAT2 У РАННІЙ ВІДПОВІДІ ARABIDOPSIS THALIANA НА ТЕПЛОВИЙ СТРЕС**

І.М. БУЗДУГА, Р.А. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК

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

**Мета.** Денатурація білків та посилене утворення активних форм кисню (АФК) спричиняють пошкодження клітин за дії підвищених температур. Метою дослідження було з'ясувати специфічну захисну роль ізоформи каталази CAT2 рослин *Arabidopsis thaliana* за дії помірного (37 °C) та жорсткого (44 °C) теплового стресу. **Методи.** Листки рослин дикого типу і нокаутної мутантної лінії за геном *Cat2* (KO-Cat2) були піддані тепловій обробці. Оцінювали зміни активності та ізоферментних спектрів каталази. **Результати.** Встановлено, що за оптимальних умов культивування загальна каталазна активність у листках рослин KO-Cat2 приблизно вдвічі нижча, ніж у рослин дикого типу. В листках дикого типу експресувались дві ізоформи, CAT2 та CAT3, в той час як у лінії KO-Cat2, виявлено не тільки ізоформу CAT3, але й CAT1. Активність CAT у листках дикого типу залишалася незмінною за всіх варіантів теплової обробки, тоді як у мутантів вона зростала за 2 год помірної теплової обробки та знижувалась через 1 і 4 год за дії помірної та жорсткої теплової обробки. Найнижчу активність CAT виявлено у фазі відновлення після жорсткого теплового стресу. **Висновки.** CAT2 є термостабільним ферментом, який необхідний для знешкодження пероксиду водню і обмеження окисного пошкодження в листках за дії теплового стресу. Відсутність цього ізоферменту в нокаут-мутанту призводить до активації CAT1, проте загальна каталазна активність залишається зниженою. Збільшення карбонілювання білків в умовах жорсткого теплового стресу і порушення, які виявлені у фазі відновлення у мутантів, показують, що втрата CAT2 не може бути компенсована шляхом активації ізоформи CAT1.

**Ключові слова:** *Arabidopsis thaliana*, каталаза, пероксид водню, тепловий стрес, нокаут-мутанти.

**Вступ.** Температура є важливим фактором навколишнього середовища, який впливає на рослини. Залежно від величини стресової температури та тривалості дії тепловий стрес може призводити до різноманітних фізіологічних та біологічних порушень [1]. На клітинному рівні за дії теплового стресу спостерігаються пошкодження органел і цитоскелету, денатурація багатьох білків, а також підвищення внутрішньоклітинної продукції активних форм кисню (АФК), зокрема пероксиду водню [2, 3].

За оптимальних умов культивування, АФК продукуються у рослинній клітині переважно в електронно-транспортних ланцюгах (ЕТЛ) хлоропластів і мітохондрій та у пероксисомах. За дії багатьох стресових чинників абіотичної природи генерація АФК в ЕТЛ різко зростає, що призводить до виникнення оксидативного стресу [4–6]. Незважаючи на те, що зі збільшенням концентрації АФК

© І.М. БУЗДУГА, Р.А. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК, 2014

пов'язують в основному негативні ефекти, вони можуть також виступати у ролі сигнальних молекул. Так, зростання концентрації пероксиду водню є сигналом для активації захисних систем організму, зокрема – індукції експресії генів, що кодують антистресові білки [7].

Для протидії АФК у рослин у всіх субклітинних компартментах присутні захисні системи, що складаються із низькомолекулярних антиоксидантів та ферментів [6, 8]. До останніх належать супероксиддисмутаза, каталаза, група пероксидаз та інші. Ключовим ферментом, який обмежує шкідливу дію пероксиду водню є каталаза, яка переважно локалізована в пероксисомах [9–10]. Каталаза представлена в рослинній клітині декількома ізоформами, які кодуються мультигенними родинками. Так, у *A. thaliana* виявлено три гени, що кодують три ізоформи каталази – CAT1, CAT2 і CAT3. Експресія цих генів є органоспецифічною. Показано, що найвища експресія генів *Cat2* і *Cat3* *A. thaliana* відбувається у листках та частково у квітах, тоді як *Cat1* переважно експресується в коренях рослини [11].

Серед ізоформ CAT у *A. thaliana* найбільш експресованою є CAT2, на частку якої припадає 70 % загальної каталазної активності у тканинах мезофілу листків. Активність CAT3 виявляється лише у васкулярних тканинах, а CAT1 – у листках під час старіння, коренях і проростаючому насінні [12]. Також показано, що всі три ізоформи CAT арабідопсису є високоспорідненими з ізоформами CAT інших рослин [10].

Встановлено, що активність CAT може змінюватись у відповідь на дію різноманітних стресових факторів абіотичної природи [13–15]. Проте можлива участь окремих ізоформ CAT у захисті рослинної клітини за дії теплового стресу все ще залишається не дослідженою. Відповідно, метою даного дослідження було вивчення специфіки впливу теплового стресу на ак-

тивність каталази у *A. thaliana* дикого типу та у нокаутних мутантів по гену *Cat2*.

### **Матеріали і методи**

Дослідження проводили на 7-тижневих рослинах *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. нокаутної мутантної лінії, *KO-Cat2* (SALK 057998), яку отримано з колекції NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, University of Nottingham, Великобританія). Ця нокаутна лінія містить інсерцію T-ДНК у кодуючій ділянці гена каталази *Cat2*, що призводить до повної втрати його експресії.

Рослини вирощували в ґрунті за сталої температури 20 °C і освітленні 2,5 кЛк в умовах 16-годинного світлового дня та відносній вологості повітря 60–70 %. Після 6,5 тижнів температуру вирощування збільшували до 28 °C та продовжували культивування рослин ще 48 год. У наших попередніх дослідженнях встановлено, що такий режим культивування підсилює клітинну відповідь арабідопсису на тепловий стрес [16].

Для стресової обробки відбирали лише по 5-6 добре розвинутих листків із середньої частини розетки; наймолодші та найстарші листки не використовували. Тепловою обробку проводили на термостатованій водяній бані в конічних скляних колбах об'ємом 100 мл, в які вносили по 25 мл інкубаційного буфера (1 мМ калій-фосфатний буфер, pH 6,0) та по 10–15 листків.

Тепловою обробку рослин проводили в темряві протягом 1, 2 та 4 год за температури 37 та 44 °C. Для вивчення процесів, що відбуваються у фазі постстресової репарації, через 1 або 2 год. після початку стресової обробки зразки переносили в камеру, де підтримували оптимальну для рослин температуру 20 °C і продовжували інкубацію протягом 1 або 2 год., відповідно. Контролем слугували зразки, які інкубувались протягом зазначеного часу у темряві за температури 20 °C.

Після завершення обробки рослинний матеріал заморожували в рідкому азоті та зберігали в морозильній камері за температури  $-70^{\circ}\text{C}$  для подальших досліджень. Як додатковий контроль використовували інтактні листки, які заморожували безпосередньо після відокремлення від рослини.

Для екстракції білків використовували буфер, що містив 0,1 М трис-НСІ (рН 6,8), 20 % гліцерин, 30 мМ дитіотрейтол та 0,1 % нерозчинний полівінілполіпіролідон. Гомогенізований в присутності рідкого азоту рослинний матеріал заливали екстракційним буфером та центрифугували 15 хв за 14 000 g та температури  $4^{\circ}\text{C}$ . Після центрифугування відбирали супернатант та зберігали його на льоду для подальших досліджень.

Визначення каталазоної активності проводили за методикою, описаною нами раніше [17]. Вміст білка в екстракті визначали спектрофотометрично за методом Бредфорда [18]. Активність ферменту виражали в мкм  $\text{H}_2\text{O}_2$ , що розкладався за 1 хв на 1 мг білка. Вимірювання проводились в трьох аналітичних паралелях та п'яти біо-

логічних повторностях. Статистичну достовірність отриманих даних оцінювали з використанням двовибіркового t-критерію для залежних вибірок [19].

Ізоферментний спектр каталази визначали у нативному 6,5 % поліакриламідному гелі [12]. Електрофорез проводили при напруженості 12 В/см протягом 6 годин. Для візуалізації ізоформ каталази після закінчення електрофорезу гель інкубували протягом 5 хв у 0,01 % розчині пероксиду водню, промивали дистильованою водою та вносили на 5 хв у суміш, що складалася з 1 %  $\text{FeCl}_3$  та 1 %  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ . У місцях локалізації ізоформ каталази на гелі спостерігали появу світлих смуг на темному фоні, що пов'язано із розщепленням пероксиду водню за дії ферменту. Реакцію зупиняли шляхом промивання гелю водою.

### Результати та обговорення

Отримані результати показали (рис.1), що в листках 7-тижневих інтактних рослин лінії KO-Cat2, які культивувались за оптимальних умов вирощування, активність САТ є суттєво зниженою і складає лише 51 % від

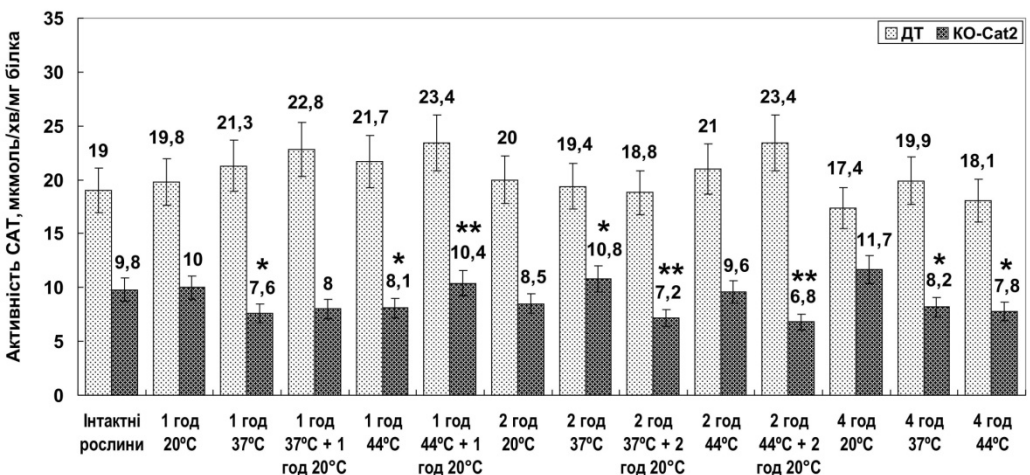


Рис. 1. Активність САТ у листках рослин *Arabidopsis thaliana* дикого типу (ДТ) та нокаутної мутантої лінії KO-Cat2 за дії помірного ( $37^{\circ}\text{C}$ ) та жорсткого ( $44^{\circ}\text{C}$ ) теплового стресу: \* – різниця між контрольними та стресованими рослинами достовірна; \*\* – різниця між стресованими рослинами та рослинами у фазі репарації достовірна ( $p < 0,05$ )

активності САТ у рослин дикого типу (ДТ). Це пов'язано із відсутністю ізоформи САТ2, що підтверджується аналізом ізоферментних спектрів (див. нижче). Раніше нами виявлено, що активність САТ у 5-тижневих рослин КО-Cat2 складала 58 % від активності САТ у рослин ДТ [20].

У контрольних зразках, що інкубувались за 20 °С як у ДТ, так і у лінії КО-Cat2 порівняно з інтактними рослинами статистично вірогідних змін активності САТ не спостерігали.

За дії помірного теплового стресу (37 °С) порівняно з обробкою за кімнатної температури у ДТ також не виявлено достовірних змін активності САТ. Проте для нокаутної лінії спостерігали іншу картину: в умовах 1-годинного стресу активність САТ знижувалась на 24 %. Збільшення часу обробки до 2 год. призводило до зростання каталазної активності у КО-Cat2 мутантів на 27 % порівняно з контрольними значеннями. Проте з продовженням тривалості обробки за 37 °С до 4 год. знову спостерігали зниження активності САТ на 30 % у мутантних КО-Cat2 рослин, порівняно з контролем.

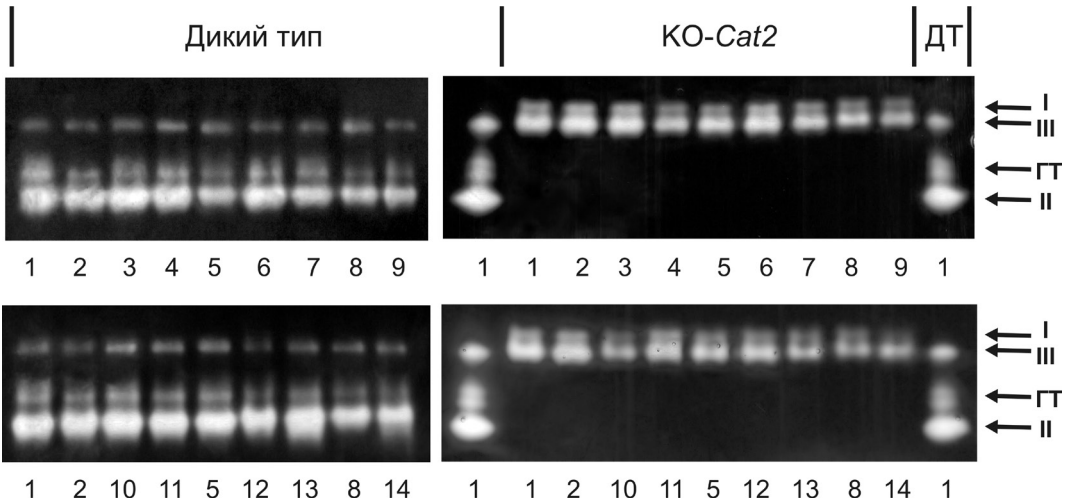
Характер змін каталазної активності за дії жорсткого (44 °С) теплового стресу в цілому був подібний до такого за дії помірного стресу. У ДТ так само, як і в умовах помірного стресу не спостерігали змін активності, незалежно від часу обробки. У КО-Cat2 після 1-годинної обробки за 44 °С виявлено зниження активності САТ на 19 %, тоді як при збільшенні часу дії теплового стресу до 2 год. виявлено тенденцію ( $0,05 < p < 0,1$ ) до зростання активності САТ на 13 %. Із подальшим продовженням тривалості стресу до 4 год. відбувалось зменшення каталазної активності на 34 % порівняно з контролем. Імовірним поясненням зниження активності САТ може бути інактивація ферменту в умовах теплового стресу за відсутності достатнього компенсаторного синтезу нових молекул.

У фазі 1 і 2-годинного відновлення після стресової обробки за 37 та 44 °С активність САТ у рослин ДТ достовірно не змінювалась, порівняно із рослинами, що зазнавали дії стресу. У лінії КО-Cat2 після 2-годинного відновлення після обробки за 37 °С (2 год. 37 °С + 2 год. 20 °С) спостерігали зниження активності на 33 %. Інша картина мала місце після жорсткого теплового стресу. Так, через 1 год. відновлення відбувається підвищення активності САТ на 28 %, а через 2 год., навпаки, зниження на 30 %. В останньому випадку було зафіксовано найнижчий рівень активності САТ, який спостерігали у наших експериментах.

На загал у всіх випадках каталазна активність у рослин нокаутної лінії виявилась нижчою, ніж у ДТ. При цьому найбільшу різницю спостерігали у фазі двохгодинного відновлення після жорсткого теплового стресу (2 год. 44 °С + 2 год. 20 °С). У цій точці активність САТ у КО-Cat2 становила лише 29 % від активності у ДТ. Останнє пов'язане як з тенденцією до зростання активності у рослин ДТ, так і її падінням у мутантів.

Аналіз ізоферментних спектрів САТ показав, що у ДТ на гелі виявляються ізоформи каталази САТ2 та САТ3, а у мутантної лінії КО-Cat2 – ізоформи САТ3 та САТ1 (рис. 2). Як було встановлено раніше, у рослин ДТ САТ1 експресується переважно у коренях, а у листках з'являється лише при старінні [12]. Порівняння інтенсивності смуг у гелі, що відповідають різним ізоформам ферменту, показує, що активність САТ3 у рослин ДТ становить приблизно 20–30 % від загальної каталазної активності. Проте активність САТ у рослин КО-Cat2 становить близько 50 % порівняно з ДТ (див. рис. 1). Отже, у цих рослин відбувається додаткова експресія ізоформи САТ1, що частково компенсує втрату активності САТ2.

Раніше нами було досліджено зміни активності аскорбат та гваякол пероксидаз



**Рис. 2.** Ізоферментні спектри каталази у листках рослин *Arabidopsis thaliana* дикого типу (ДТ) та нокаутної мутантної лінії КО-Cat2 за дії помірного (37 °С) та жорсткого (44 °С) теплового стресу. Ізоформи каталази: I – CAT1; II – CAT2; III – CAT3; ГТ – гетеротетрамери. Умови стресової обробки: 1 – необроблені інтактні рослини; 2 – 1 год. 20 °С; 3 – 1 год. 37 °С; 4 – 1 год. 37 °С + 1 год. 20 °С; 5 – 2 год. 20 °С; 6 – 2 год. 37 °С; 7 – 2 год. 37 °С + 2 год. 20 °С; 8 – 4 год. 20 °С; 9 – 4 год. 37 °С; 10 – 1 год. 44 °С; 11 – 1 год. 44 °С + 1 год. 20 °С; 12 – 2 год. 44 °С; 13 – 2 год. 44 °С + 2 год. 20 °С; 14 – 4 год. 44 °С

(АРХ та POD – інших ферментів, які забезпечують розщеплення  $H_2O_2$ ) за дії теплового стресу. Встановлено, що ці два ферменти є, відповідно, високо та відносно термолабільними, що проявляється у зниженні їхньої активності за дії жорсткого теплового стресу [16, 21]. Як показують наші нові дані, у *A. thaliana* каталаза, на відміну від пероксидаз, є термостабільною, а, отже, має грати важливу роль в обмеженні клітинного рівня  $H_2O_2$ , генерація якого у мітохондріях за умов теплового стресу зростає [7, 22]. Проте у листках рослин ДТ за дії короткотривалого (до 4 год.) теплового стресу не спостерігали додаткової активації САТ. Отже, базової активності САТ у ДТ достатньо для забезпечення фізіологічної функції за умов стресу. На відміну від цього, у лінії КО-Cat2 за дії 2-годинного теплового стресу виявлено зростання каталазної активності за рахунок ізоформ САТ1 та САТ3, що має компенсувати відсутність ізоформи САТ2.

Попередньо нами для лінії КО-Cat2 було також досліджено вплив теплового стресу на такі параметри, як рівень перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та вміст карбонільних груп у білках, які є маркером оксидативного стресу [23, 24]. Рівень ПОЛ оцінювали, вимірюючи вміст тіобарбітурат активних продуктів (ТБКАП). Встановлено, що втрата ізоформи САТ2 у нокаут-мутанта спричиняє хронічний оксидативний стрес навіть у рослин, вирощених за оптимальних умов. Зокрема, виявлено посилення карбонілювання білків у інтактних листках мутантних рослин порівняно з рослинами дикого типу. Одночасно у мутанта у відповідь на хронічний оксидативний стрес активуються антиоксидантні захисні механізми, завдяки чому рівень ПОЛ у мутанта – як за кімнатної температури, так і за дії стресу – не вище або навіть нижче, ніж у ДТ. Єдиним виключенням є 2-годинне відновлення після жорсткого теплового стресу (2 год. 44 °С + 2 год. 20 °С): у цьому випадку рівень ТБКАП у мутанта помітно зростає, а

у ДТ – падав. У результаті рівень ТБКАП у КО-*Cat2* ставав вище, ніж у ДТ [23]. Нагадаємо (рис. 1), що в цій експериментальній точці для ДТ виявлено найвищу, а для КО-*Cat2* – найнижчу активність каталази, що може бути причиною суттєвого зростання ПОЛ у мутанта. Отже, порівняння цих результатів вказує на важливе значення ізоформи CAT2 для постстресового відновлення та на порушення цих процесів у КО-*Cat2*.

Що ж стосується рівня карбонілювання білків, то найсуттєвіше зростання цього параметра у нокаутній лінії порівняно із ДТ спостерігали за 4 год. дії жорсткого теплового стресу [24]. Імовірно причиною цього можна вважати низьку активність САТ на фоні термічної інактивації АРХ та POD [16, 21], що має сприяти розвитку оксидативного стресу.

### **Висновки**

У результаті проведених досліджень можна зробити висновок, що ізоформа каталази CAT2 *A. thaliana* бере участь в обмеженні рівня пероксиду водню та оксидативного ушкодження у клітинах листків за дії теплового стресу. Втрата активності цієї ізоформи призводить до підсилення карбонілювання білків за дії жорсткого ТС та до порушень у фазі післястресового відновлення. Активація ізоформи CAT1, як виявлено у листках нокаутного мутанта КО-*Cat2* не призводить до повної метаболічної компенсації втрати активності CAT2.

### **Перелік літератури**

1. Qu A., Ding Y.F., Jiang Q., Zhu C. Molecular mechanisms of the plant heat stress response // *Biochem. Biophys. Research Comm.* – 2013. – Vol. 432, № 2. – P. 203–207.
2. Hasanuzzaman M., Nahar K., Alam M., Roychowdhury R., Fujita M. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 9643–9684.

3. Baxter A., Mittler R., Suzuki N. ROS as key players in plant stress signaling // *J. Exp. Bot.* – 2014. – Vol. 65, № 5. – P. 1229–1240.
4. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiol. Biochem.* – 2010. – Vol. 48. – P. 909–930.
5. Foyer C.H., Shigeoka S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. – *Plant Physiol.* – 2011. – Vol. 155. – P. 93–100.
6. Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions // *J. Bot.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–26.
7. Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux F.M., Schöffl F. Heat stress-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* // *Plant Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 61, № 4–5. – P. 733–746.
8. Jaleel C.A., Riadh K., Gopi R., Manivannan P., Ines J., Al-Juburi H. J., Chang-Xing Z., Hong-Bo S., Panneerselvam R. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints // *Acta Physiol. Plantarum.* – 2009. – Vol. 31, № 3. – P. 427–436.
9. Vlasits J., Jakopitsch C., Bernroither M., Zamočky M., Furtmüller P.G., Obinger C. Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2010. – Vol. 500. – P. 74–81.
10. 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.
11. Frugoli J.A., Zhong H.H., Nuccio M.L., McCourt P.M., McPeck A., Thomas T.L., McClung C.R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh // *Plant Physiol.* – 1996. – Vol. 112. – P. 327–336.
12. Orendi G. Expression von Katalasen waehrend der Blattseneszens und unter verschiedenen Stressbedingungen in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. / *Dissertation Verlag Grauer.* – 2001. – 135 s.
13. Moussa R., Abdel-Aziz S.M. Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress // *Aust. J. Crop Sci.* – 2008. – Vol. 1, № 1. – P. 31–36.
14. Guan Z., Chai T., Zhang Y., J. Xu, Wei W. Enhancement of Cd tolerance in transgenic

- tobacco plants overexpressing a Cd-induced catalase cDNA // *Chemosphere*. – 2009. – Vol. 76, № 5. – P. 623–630.
15. Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Breusegem F.V., Noctor G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models // *J. Exp. Bot.* – 2010. – Vol. 61, № 15. – P. 4197–4220.
  16. Panchuk I.I., Volkov R.A., Schöffl F. Heat stress and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in Arabidopsis // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 129. – P. 838–853.
  17. Долиба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Метод визначення каталазоної активності у рослинному матеріалі // *Физиол. биохим. культ. растений*. – 2010. – Т. 42, № 6 – С. 497–503.
  18. 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.
  19. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
  20. Долиба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Активність каталази та аскорбат пероксидази у *Cat2* нокаутного мутанта *Arabidopsis thaliana* за дії іонів кадмію // *Вісник УТГіС*. – 2011. – Т. 9, № 2. – С. 200–208.
  21. Руснак Т.О., Долиба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Активність гваякол пероксидази у нокаутної лінії *KO-Cat2 Arabidopsis thaliana* за умов теплового стресу // *Физиол. биохим. культ. растений*. – 2013. – Т. 45, № 3. – С. 246–253.
  22. Rikhvanov E.G., Gamburg K.Z., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Fedoseeva I.V., Tauson E.L., Stupnikova I.V., Stepanov A.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in Arabidopsis cell culture // *Plant J.* – 2007. – Vol. 52, № 4. – P.63–78
  23. Долиба І.М., Руснак Т.О., Волков Р.А., Панчук І.І. Перекисне окислення ліпідів у *Arabidopsis thaliana* дикого типу та *KO-Cat2* мутантної лінії за дії теплового стресу // *Вісник УТГіС*. – 2012. – Т. 10, № 2. – С. 195–201.
  24. Руснак Т.О., Волков Р.А., Панчук І.І. Окисна модифікація білків у *Arabidopsis thaliana* дикого типу та мутантної лінії *KO-Cat2* за дії теплового стресу // *Вісник УТГіС*. – 2013. – Т. 11, № 2. – С. 260–266.

Представлено О.М. Тищенко  
Надійшла 17.04.2014

## РОЛЬ ИЗОФОРМЫ КАТАЛАЗЫ CAT2 В РАННЕМ ОТВЕТЕ *ARABIDOPSIS THALIANA* НА ТЕПЛОВΟΥ СТРЕСС

И.И. Буздуга, Р.А. Волков, И.И. Панчук

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

**Цель.** Денатурация белков и усиленное образование активных форм кислорода (АФК) вызывают повреждение клеток при воздействии повышенных температур. Целью исследования было выяснить специфическую защитную роль изоформы каталазы CAT2 растений *Arabidopsis thaliana* под воздействием умеренного (37 °C) и жесткого (44 °C) теплового стресса. **Методы.** Листья растений дикого типа и нокаутной мутантной линии по гену *Cat2* (*KO-Cat2*) были подвергнуты тепловой обработке. Оценивались изменения активности и изоферментных спектров каталазы. **Результаты.** Установлено, что в условиях оптимального культивирования общая каталазная активность в листьях растений *KO-Cat2* была примерно в два раза ниже, чем у растений дикого типа. В листьях растений дикого типа экспрессировались два изофермента, CAT2 и CAT3, в то время как у линии *KO-Cat2* был обнаружен не только изофермент CAT3, но и CAT1. Активность CAT в листьях дикого типа оставалась неизменной при всех вариантах теплового стресса, тогда как у мутантов она увеличивалась после 2-часовой умеренной тепловой обработки и снижалась через 1 и 4 часа умеренной и жесткой тепловой обработки. Самая низкая активность CAT была обнаружена в фазе восстановления после жесткого теплового стресса. **Выводы.** CAT2 является термостабильным ферментом, который необходим для обезвреживания перекиси водорода и ограничения окислительного повреждения в листьях при действии теплового стресса. Отсутствие этого изофермента у нокаут-мутанта приводит

к активации CAT1. Тем не менее, общая CAT активность остается сниженной. Увеличение карбонилирования белков в условиях жесткого теплового стресса и нарушения, обнаруженные у мутантов в фазе восстановления показывают, что потеря CAT2 не может быть компенсирована путем активации изоформы CAT1.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*, каталаза, перекись водорода, тепловой стресс, нокаут-мутанты.

#### THE ROLE OF CAT2 ISOENZYME DURING EARLY HEAT STRESS RESPONSE OF ARABIDOPSIS THALIANA

*I.M. Buzduga, R.A. Volkov, I.I. Panchuk*

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

**Aim.** Denaturation of proteins and enhanced generation of reactive oxygen species (ROS) cause cellular injury upon increased temperatures. The aim of the study was to clarify the specific protecting role of the catalase isoform CAT2 of *Arabidopsis thaliana* upon moderate (37 °C) and severe (44 °C) heat stress. **Methods.** Leaves of wild type and KO-*Cat2* knock-out mutant plants were subjected to heat treatment.

Changes in catalase activity and isoenzyme patterns were evaluated. **Results.** It was found that upon optimal cultivation conditions the total CAT activity is about two times lower in leaves of KO-*Cat2* knock-out mutant comparing to wild type plants. Two isoenzymes, CAT2 and CAT3, are expressed in leaves of wild type plants, whereas in KO-*Cat2* plants not only CAT3, but also CAT1 isoenzyme was detected. During heat treatment, CAT activity remained stable in wild type leaves, whereas in the mutant it was increased after 2 hours of moderate heat treatment and decreased after 1 and 4 hours of moderate and severe heat treatment. The lowest level of CAT activity was found during recovery after severe heat stress. **Conclusions.** CAT2 is a thermostable enzyme that is essential for hydrogen peroxide scavenging and limitation of oxidative damage in leaves upon heat stress. The lack of this isoenzyme in the knock-out mutant results in activation of CAT1. Nevertheless, the total CAT activity remains decreased. Increased protein carbonylation upon severe heat stress and defects during post-stress recovery detected in the mutant demonstrate that the loss of CAT2 can not be compensated by the activation of CAT1.

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