

УДК 577.1+577.2

## ЗАГАЛЬНА РЕДУКУЮЧА СПРОМОЖНІСТЬ НОКАУТНИХ МУТАНТІВ *cat2cat3* *ARABIDOPSIS THALIANA* В УМОВАХ ТЕПЛООВОГО СТРЕСУ

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

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології  
 Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича  
 Україна, 58012, вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці  
 e-mail: i.panchuk@chnu.edu.ua

**Мета.** В роботі перевіряли, чи одночасна втрата активності двох ізоформ каталази CAT2 та CAT3 може бути компенсована зростанням вмісту низькомолекулярних антиоксидантів. Для цього було оцінено загальну редукуючу спроможність у рослин арабідопсису дикого типу та лінії *cat2cat3* — як за оптимальних умов зростання, так і за дії теплового стресу. **Методи.** Листки *Arabidopsis thaliana* дикого типу та нокаутного мутанту *cat2cat3* піддавали дії підвищених температур. Вміст водорозчинних низькомолекулярних антиоксидантних сполук оцінювали, визначаючи загальну редукуючу спроможність методом йодометрії. **Результати.** У інтактних рослин мутантної лінії *cat2cat3* відбувається зростання вмісту низькомолекулярних антиоксидантів в 1,7 разі порівняно з рослинами дикого типу. Підвищений вміст цих сполук у нокаутних рослин спостерігався також і за дії теплового стресу. Встановлено різний характер змін загальної редукуючої спроможності рослин дикого типу та нокаутної лінії. **Висновок.** Втрата активності ізоформ каталази CAT2 та CAT3 у нокаутних мутантах арабідопсису призводить до активації неферментної ланки антиоксидантного захисту. Зростання вмісту низькомолекулярних антиоксидантів є одним з механізмів, які забезпечують захист мутантних рослин від хронічного оксидативного стресу як за оптимальних умов культивування, так і за дії підвищених температур.

**Ключові слова:** мультигенні родини, тепловий шок, загальна редукуюча спроможність, нокаут-мутанти, *Arabidopsis thaliana*.

**Вступ.** Специфікою рослинних геномів є широка розповсюдженість мультигенних родин. Запропонована точка зору, що високоподібні гени/білки, які належать до однієї родини, потрібні для підвищення надійності роботи клітини. Рослини обмежені у своїх можливостях активно уникати шкідливих впливів довкілля. Тому протягом еволюції вони виробили численні захисні механізми, які працюють на субклітинному рівні та забезпечують зменшення ушкоджень та репарацію порушень, викликаних абіотичним стресом. Оскільки виживання рослинного організму залежить від роботи цих механізмів, підвищення надійності їх роботи шляхом дублювання функцій, а отже — виникнення мультигенних родин видається закономірним. Проте, молекулярно-біохімічні основи дублювання захисних функцій у рослинній клітині все ще вивчені недостатньо.

Температура є одним з важливих чинників навколишнього середовища [1]. Різке зростання температури понад оптимальну призводить до сповільнення росту, пошкодження окремих органів і загибелі організму в цілому. Це зумовлено тим, що надмірне підвищення температури викликає денатурацію багатьох білків та пошкодження клітинних мембран. Крім безпосередньої шкідливої дії, високі температури призводять до посиленого утворення активних форм кисню (АФК) у клітині, що в свою чергу викликає у рослинній клітині оксидативний стрес [2]. Для протидії АФК у рослин наявна захисна антиоксидантна система, яка складається із ферментів та низькомолекулярних антиоксидантів та функціонує у всіх субклітинних компартментах [3–5].

Одним із головних ферментів антиоксидантного захисту є каталаза (CAT), яка розщеплює пероксид водню ( $H_2O_2$ ). У *A. thaliana* CAT представлена трьома ізоформами CAT1, CAT2 та CAT3, що знаходяться у пероксисомах і, зокрема, забезпечують знешкодження  $H_2O_2$ , який утворюється у цій органелі внаслідок фотодихання. При цьому, найбільш експресованою у листках *A. thaliana* є ізоформа CAT2, на яку припадає приблизно 70 % від загальної ферментної активності [6–7].

CAT3 локалізована переважно у провідних тканинах, а CAT1 експресується в пилку та насінні, а в листках тільки на пізніх стадіях розвитку [6–8]. З літератури відомо, що CAT відіграє важливу роль у захисті рослинної клітини від багатьох стресових факторів [9–10].

До низькомолекулярних антиоксидантних сполук належать водорозчинні аскорбат (As), глутатіон (GSH), антоціаніни та жиророзчинні каротиноїди і токофероли [11–12]. As має надзвичайно широкий спектр антиоксидантних властивостей: він безпосередньо взаємодіє та знешкоджує АФК, а також відновлює  $\alpha$ -токоферольний радикал, повертаючи йому антиоксидантні властивості [13–14]. Антиоксидантні властивості GSH визначаються його безпосередньо неензиматичною взаємодією з АФК. Крім того, GSH є субстратом кількох ферментів антиоксидантного захисту. Показано, що дія різних стресових факторів призводить до зміни рівня GSH у клітині [15]. Специфічну групу водорозчинних вторинних метаболітів, що відіграють важливу роль у захисті організму від шкідливої дії АФК, представляють чисельні фенольні сполуки. Антиоксидантні властивості фенолів зумовлені їх здатністю виступати донором гідрогену або електронів, а також властивістю фенольного радикалу стабілізувати та делокалізувати неспарений електрон. Вміст фенолів може відрізнятись у різних органах рослин, а також може змінюватись за умов стресу [12, 16–18].

У наших попередніх дослідженнях було встановлено, що тепловий стрес викликає активацію ферментної ланки антиоксидантного захисту, зокрема — зростання експресії APX2 та/або активності каталази [19, 20]. Проте, роль ізоформ каталази CAT2 та CAT3 у клітинній відповіді на тепловий стрес остаточно не з'ясована. Існують дані про те, що у нокаутних рослин з відсутністю ізоформою CAT2 спостерігаються зміни внутрішньоклітинного редокс статусу, зокрема, відмічено підвищений вміст окисленого глутатіону [7]. Цей ефект може бути наслідком активації альтерна-

тивних шляхів знешкодження пероксиду водню без залучення каталази. Відповідно, можна було б очікувати, що у подвійного мутанту *cat2cat3* із одночасною втратою активності двох ізоформ каталази, CAT2 та CAT3, також мають спостерігатись зміни редокс статусу. Постає питання: чи можуть механізми дублювання функцій рослинної клітини забезпечити підтримку окисно-відновного балансу у мутанту *cat2cat3*, як за оптимальних умов зростання, так і за дії теплового стресу? Для відповіді на це питання нами в цій роботі для рослин арабідопсису дикого типу та лінії *cat2cat3*, що зазнали дії підвищених температур було оцінено загальну редукуючу спроможність, яка залежить від сумарного вмісту водорозчинних антиоксидантів.

### Матеріали і методи

Дослідження проводили на рослинах *Arabidopsis thaliana* екотипу Columbia 0 (дикий тип, ДТ) та нокаутної мутантної лінії *cat2cat3*. Ця нокаутна лінія містить інсерцію T-ДНК у кодуючій ділянці генів каталази *Cat2* та *Cat3*, що призводить до повної втрати їх експресії.

Рослини вирощували у ґрунті в культивацийній кімнаті при сталій температурі +20 °С, освітленні 2,5 кЛк в умовах 16-годинного світлового дня. Після 6,5 тижнів температуру вирощування збільшували до 28 °С та продовжували культивування рослин ще 48 год. Такий режим підсилює клітинну відповідь рослин *A. thaliana* на тепловий стрес як показано в наших попередніх дослідженнях [19].

Для проведення теплової обробки обрізали листя середньої частини розетки та поміщали їх в конічні скляні колби об'ємом 100 мл з 1 мМ К-фосфатним буфером (рН 6,0). Обробку на термостатованій водяній бані здійснювали в темряві протягом 1, 2 та 4 годин за 20, 37 та 44 °С. Для вивчення процесів, що відбуваються у фазі пост-стресової репарації за 1, 2 години після початку стресової обробки зразки переносили в умови кімнатної температури і продовжували інкубацію протягом ще 1 або 2 годин, відповідно. Контролем слугували рослини, листки яких інкубувались за 20 °С. Після завершення обробки листки заморожували в рідкому азоті та зберігали в морозильній камері за температури –70 °С для подальших досліджень. В якості додаткового контролю використовували інтактні листки, які заморожували безпосередньо після відокремлення від рослини.

Сумарний вміст низькомолекулярних гідрофільних антиоксидантів оцінювали, вимірюючи

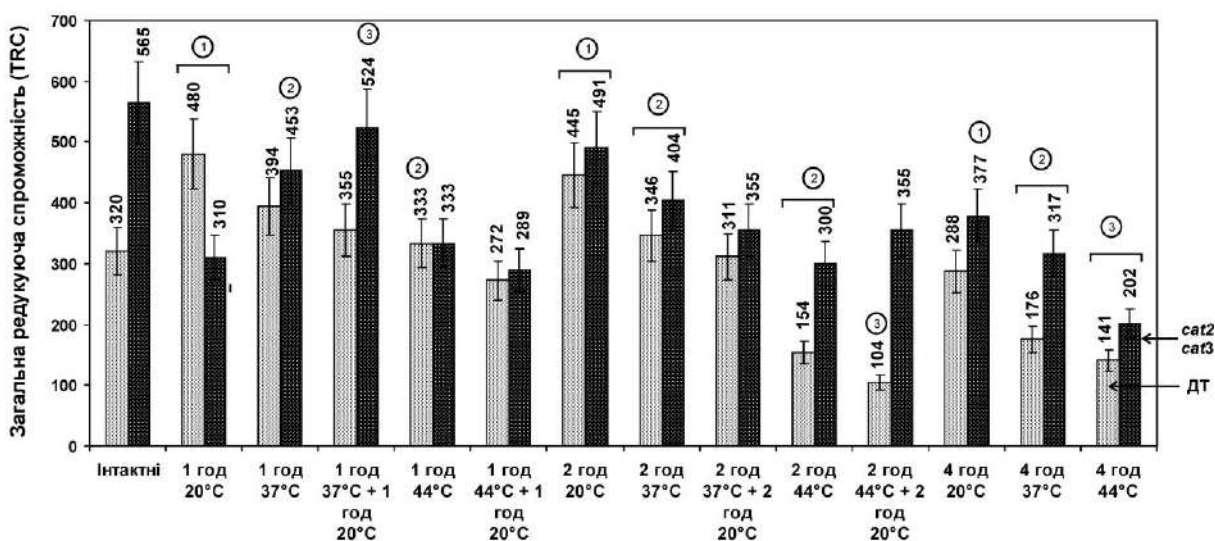
загальну редууючу спроможність (total reducing capacity — TRC) екстракту листків, який було отримано з використанням 0,25 М розчину сульфосаліцилової кислоти (SSA). Визначення TRC шляхом йодатометричного титрування здійснювали за методом Петта в модифікації Прокошева [21]. До 300 мг гомогенізованого рослинного матеріалу додавали 3 мл 0,25 М розчину SSA та центрифугували за 10000 г протягом 10 хв. Отриманий супернатант переносили в чисту мікропробірку і використовували для визначення TRC. Для цього в колбочку вносили 1 мл центрифугату, додавали 2 мл H<sub>2</sub>O, 1 мл 0,25 М SSA, 1 мл 4 % KJ та 50 мкл 1 % свіжо приготованого розчину водорозчинного крохмалю. Отриману суміш титрували розчином 100 мкМ йодату калію до появи стійкого блакитного забарвлення. Паралельно готували контрольну пробу, в яку замість центрифугату вносили 0,25 М SSA. TRC виражали в умовних одиницях як кількість мікромоль йодату калію, що пішов на титрування, у перерахунку на 1 кг сирого матеріалу. Всі експерименти проводили у п'яти біологічних та трьох аналітичних повторностях. Статистичну вірогідність отриманих даних оцінювали з використанням двовибіркового t-критерію для залежних вибірок [22].

## Результати та обговорення

З наших попередніх результатів відомо, що нокаутна лінія *cat2cat3* характеризується зниженою каталазою активністю. Так, загальна активність каталази у *cat2cat3* мутантів, що вирощувались за оптимальних умов складає 20 % від активності каталази рослин ДТ [23].

Отримані дані показали, що інтактні рослини ДТ та досліджуваної нокаутної лінії *cat2cat3* відрізняються за своїм потенціалом до відновлення оксидантів: за оптимальних умов культивування TRC у мутантних рослин виявилась у 1,8 разів вище, ніж у ДТ (рис. 1). Отже, вміст низькомолекулярних антиоксидантів у нокаутів зростає, що можна вважати частиною механізмів, які компенсують знижену каталазну активність.

Проте, навіть у контрольних зразках, що інкубувались у темряві за кімнатної температури ситуація суттєво змінювалась. За 1 годинної обробки TRC у ДТ зростала порівняно з інтактними рослинами у 1,5 рази, залишалась майже незмінною протягом другої години та знижувалась за 4 годинної інкубації нижче рівня інтактних рослин. Для нокаутних рослин було відмічено протилежний ефект — за 1 годину TRC суттєво зменшувалась і складала 65 % від TRC у ДТ. При подальшому інкубуванні протягом 2 годин рівень TRC у нокаутних рослин ставав несуттєво вищим, а через 4 години — на 30 % вищим, ніж у ДТ.



**Рисунок 1.** Загальна редууюча спроможність у *A. thaliana* ДТ та нокаутної лінії *cat2cat3* за дії помірного (37 °C) та жорсткого (44 °C) теплового стресу. *Примітка:* різниця достовірна між контрольними та інтактними рослинами (1), між стресованими та контрольними рослинами (2), між стресованими рослинами та рослинами у фазі постстресового відновлення (3)

Для пояснення цих ефектів слід нагадати, що при перебуванні рослин на світлі у хлоропластах відбувається як генерація «відновної сили» у вигляді НАДФ-Н та світлозалежний синтез антиоксидантів, так і продукція АФК. Крім того,  $H_2O_2$  генерується внаслідок фотодихання в пероксиосомах. При перенесенні у темряву (умови експерименту) ці процеси припиняються, проте відбувається активація гліколізу та транспорту електронів у мітохондріях. При цьому підтримка окисно-відновної рівноваги пов'язана із утворенням НАД-Н. Підвищений рівень TRC у листках мутантної лінії при вирощуванні за оптимальних умов освітлення та падіння TRC нижче рівня у ДТ після перенесення у темряву вказують на те, що підсилений синтез низькомолекулярних водорозчинних антиоксидантів у мутантів є світлозалежним процесом. Проте, збільшення часу інкубування зразків у темряві за кімнатної температури до двох годин супроводжується зникненням різниці у TRC між ДТ та мутантними лініями. Отже, складається враження, що за відсутності освітлення у досліджуваних мутантів додатково активуються певні компенсаторні процеси, які здатні стабілізувати рівень TRC і за відсутності транспорту електронів у хлоропластах.

В умовах помірного теплового стресу у ДТ спостерігалось залежне від часу зниження рівня TRC порівняно з контрольними зразками, що інкубувались за кімнатної температури на 18 % через 1 годину, на 23 % за 2 години та 39 % за 4 години. Інший характер змін спостерігався у лінії *cat2cat3*. В цьому випадку відбувалось зростання TRC на 46 % за 1 годинного стресу та падіння на 16 % за 4 годинного стресу.

У фазі відновлення після помірного стресу TRC у ДТ залишалась без змін. В той же час, у лінії *cat2cat3* у фазі відновлення після короткотривалого стресу (1 година 37 °C + 1 година 20 °C) TRC зростала в 1,2 рази порівняно з рослинами, які зазнавали дії стресу, що може бути свідченням активних репаративних процесів, спрямованих на відтворення окисно-відновної рівноваги у клітині. Проте, після 2 годинного стресу достовірних змін TRC у цієї лінії не виявлено.

За дії жорсткого теплового стресу (44 °C), так само як за помірного (37 °C) у ДТ відбувалось зниження TRC у порівнянні з контролем на 31-64 % залежно від часу обробки. Падіння TRC виявлено і у нокаутної лінії, але цей ефект проявлявся, починаючи лише з другої години тепло-

вої обробки і складав 39 та 47 % через 2 та 4 години, відповідно.

Отже, в цілому у обох досліджених ліній при збільшенні часу та жорсткості стресової обробки відбувається падіння TRC, що свідчить про поступове виснаження антиоксидантної системи за дії теплового стресу.

Після жорсткого теплового стресу та наступного 1- та 2-годинного відновлення у ДТ спостерігалось зменшення TRC на 19 та 33 %, відповідно, тоді як у нокаутної лінії змін TRC порівняно зі стресованими зразками не відбувалось.

Раніше нами були отримані дані стосовно вмісту карбонільних груп у білках та перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) для досліджуваних ліній в умовах теплового стресу [23]. Порівнюючи всі отримані дані, можна зазначити, що в цілому підсилення оксидативних пошкоджень внаслідок теплового стресу корелює із падінням TRC (виснаження пулу антиоксидантів). Найбільш очевидним це є при порівнянні концентрації карбонільних груп та TRC у інтактних рослинах та після 4-годинного жорсткого стресу [23]. Втім, в окремих випадках спостерігається і зворотна ситуація. Напр., у фазі відновлення після жорсткого стресу у рослин ДТ TRC падає, і водночас знижується рівень ПОЛ, що свідчить про проходження репаративних процесів. Проте, у *cat2cat3* у фазі відновлення рівень ПОЛ не змінюється або навіть зростає при збереженні TRC на більш високому, ніж у ДТ рівні. Це спостереження можна пояснити тим, що рослини ДТ швидше та ефективніше використовують антиоксиданти для репарації, тоді як у мутантів відповідні механізми не функціонують.

## Висновки

Отримані дані показали, що втрата активності ізоформ каталази CAT2 та CAT3 у нокаутних мутантів арабідопсису призводить до активації компенсаторних механізмів, які включають неферментну ланку антиоксидантного захисту, про що свідчить суттєве зростання вмісту низькомолекулярних антиоксидантів. Ці перебудови антиоксидантної системи забезпечують захист мутантних рослин від хронічного оксидативного стресу як за оптимальних умов культивування, так і за дії підвищених температур.

## Перелік літератури

1. Bita C. E., Gerats T. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops // Front. Plant Sci. — 2013. — Vol. 4. — P. 1–18.

2. 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.
3. Foyer C. H., Noctor G. Redox signaling in plants // *Antioxidants redox signaling.* — 2013. — Vol. 18, № 16. — P. 2087–2090.
4. Das K., Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants // *Front. Environm. Sci.* — 2014. — Vol. 2. — P. 1–13.
5. Choudhury F. K., Rivero R. M., Blumwald E., Mittler R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination // *Plant J.* — 2016. — SI Abiotic Stress. — P. 1–12.
6. Anjum N. A., Sharma P., Gill S. S., Hasanuzzaman M., Khan E. A., Kachhap K., Sofo A. Catalase and ascorbate peroxidase — representative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifying heme enzymes in plants // *Environm. Sci. Pollution Res.* — 2016. — Vol. 23, № 19. — P. 19002–19029.
7. 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.
8. Zimmermann P., Heinlein C., Orendi G., Zentgraf U. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // *Plant Cell Environm.* — 2006. — Vol. 29, № 6. — P. 1049–1060.
9. Sofo A., Scopa A., Nuzzaci M., Vitti A. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses // *Internat. J. Mol. Sci.* — 2015. — Vol. 16, № 6. — P. 13561–13578.
10. Scandalios J. G., Acevedo A., Ruzsa S. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize // *Plant Sci.* — 2000. — Vol. 156. — P. 103–110.
11. Foyer C. H., Noctor G. Redox signaling in plants // *Antioxidants Redox Signal.* — 2013. — Vol. 18, No 16. — P. 2087–2090.
12. 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. — P. 1–26.
13. Szarka A., Tomasskovics B., Bánhegyi G. The ascorbate-glutathione- $\alpha$ -tocopherol triad in abiotic stress response // *Internat. J. Mol. Sci.* — 2012. — Vol. 13, № 4. — P. 4458–4483.
14. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life // *Plant Physiol.* — 2006. — Vol. 141, № 2. — P. 312–322.
15. Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y. I., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Foyer C. H. Glutathione in plants: an integrated overview // *Plant Cell Environm.* — 2012. — Vol. 35, № 2. — P. 454–484.
16. Рогозинский М. С., Шелифост А. Е., Костышин С. С., Волков Р. А. Действие ионов тяжелых металлов на растения в культуре *in vitro* // *Физиол. биохим. культурных растений.* — 1998. — Т. 30, № 6. — С. 465–471.
17. Mehr Z., Khajeh H., Bahabadi S., Sabbagh S. Changes on proline, phenolic compounds and activity of antioxidant enzymes in *Anethum graveolens* L. under salt stress // *Int. J. Agron. Plant Production.* — 2012. — Vol. 3. — P. 710–715.
18. Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress // *Polish J. Env. Stud.* — 2006. — Vol. 15, No 4. — P. 523.
19. Panchuk I. I., Volkov R. A., Schoeffl 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.
20. Дוליба І. М., Волков Р. А., Панчук І. І. Метод визначення каталазної активності у рослинному матеріалі // *Физиол. биохим. культурных растений.* — 2010. — Т. 42, № 6. — С. 497–503.
21. Третьяков Н. Н. Практикум по физиологии растений. — М.: Колос, 2003. — 288 с.
22. Буджак В. В. Біометрія. — Чернівці: Рута, 2013. — 326 с.
23. Панчук І. І. Закономірності експресії генів антиоксидантної системи та білків-шаперонів рослин в онтогенезі та за дії стресу: Автореф. дис. ... докт. біол. наук — К., 2015. — 45 с.

Представлено Б. В. Моргуном  
Надійшла 11.05.2017

### TOTAL REDUCING CAPACITY IN *ARABIDOPSIS THALIANA cat2cat3* KNOCKOUT MUTANTS UNDER HEAT STRESS

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

Dept. of Molecular Genetics and Biotechnology  
Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi  
Ukraine, 58012, Kotsubynski str. 2, Chernivtsi  
e-mail: i.panchuk@chnu.edu.ua

**Aim.** It was investigated whether the simultaneous loss of the two catalase isoforms CAT2 and CAT3 can be compensated by the increase in content of low-molecular weight antioxidants. To clarify this question, the total reducing capacity in *Arabidopsis* wild type and *cat2cat3* knockout mutants was evaluated under optimal growth conditions and after heat stress. **Methods.** Leaves of *Arabidopsis thaliana* wild type and *cat2cat3* knockout mutants were exposed to high temperatures. The content of water-soluble low molecular weight antioxidants was evaluated by determining the total reducing capacity using iodometry. **Results.** In intact *cat2cat3* mutants there is an 1.7 times increase in the content of low-molecular weight antioxidants compared to wild type plants. A high content of these compounds in knockout plants was also observed upon heat stress. Patterns of changes in total reducing capacity differ between wild type and knockout lines. **Conclusion.** The loss of activity of the catalase isoforms CAT2 and CAT3 in knock-out mutants of *Arabidopsis* results in activation of non-enzymatic antioxidant defenses. The increase of the content of low-molecular weight antioxidants is one of the mechanisms that provide protection of mutant plants from chronic oxidative stress, both under optimal cultivation conditions and under the influence of elevated temperatures.

**Keywords:** multigenic family, heat shock, total reducing capacity, knockout mutants, *Arabidopsis thaliana*.