

УДК 577.25+577.112.4

ОКИСНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ У *ARABIDOPSIS THALIANA* ДИКОГО ТИПУ ТА МУТАНТНОЇ ЛІНІЇ КО-CAT2 ЗА ДІЇ ТЕПЛОВОГО СТРЕСУ

Т. О. РУСНАК, 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 і збільшення утворення активних форм кисню (АФК) викликають пошкодження рослинних клітин при тепловому стресі. Метою дослідження було з'ясування можливої захисної ролі ізоформи каталази CAT2 у *Arabidopsis thaliana* при підвищених температурах. **Методи.** Листки рослин арабідопсису дикого типу та нокаутного мутанта КО- Cat2 піддавалися тепловій обробці. За розвитком реакції на тепловий стрес спостерігали, порівнюючи інтенсивність карбонілювання білків під дією АФК. **Результати.** Встановлено, що втрата ізоформи CAT2 у нокаут-мутанта викликає хронічний оксидативний стрес навіть у рослин, вирощених за оптимальних умов. Зокрема, було виявлено посилення карбонілювання білків у інтактних листках мутантних рослин у порівнянні з рослинами дикого типу. Антиоксидантні захисні механізми, які активуються у відповідь на хронічний оксидативний стрес, ефективні в обмеженні перекисного окислення ліпідів, але не ефективні у запобіганні карбонілювання білків. Ця конститутивна активація захисних механізмів забезпечує короткостроковий (1 год) захист мутантних рослин при тепловому стресі. Однак при тривалій жорсткій тепловій обробці (44 °С, 4 год) захисні механізми у мутантних рослин переважно зазнають виснаження, що призводить до посилення карбонілювання білків. **Висновки.** CAT2 бере участь у захисті рослинної клітини від термооксидативного стресу і є особливо важливою для обмеження карбонілювання білків.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, тепловий шок, карбонільні групи білків, нокаут-мутанти.

Вступ. Температура є одним із важливих факторів, який впливає на фізіолого-біохімічні процеси рослинної клітини. Підвищення температури викликає денатурацію багатьох білків, пошкодження клітинних мембран [1] та зростання рівня активних форм кисню (АФК), що супроводжується синтезом специфічних захисних стресових білків та активацією антиоксидантної системи [2, 3]. АФК здатні виконувати подвійну функцію в рослинній клітині, з однієї сторони – це токсичні сполуки, які порушують численні біохімічні процеси, а з іншої – виступають у ролі сигнальних молекул [2, 4]. Відомо, що за дії АФК нуклеїнові кислоти, ліпіди та білки зазнають окисних пошкоджень [5]. Пряма дія АФК на залишки певних амінокислот – лізину, аргініну, проліну та треоніну – призводить до утворення карбонільних груп (КГ) у їхніх бічних радикалах та перешкоджає нормальному функціонуванню білків [6]. У таких окисно модифікованих білків змінюється функціональна активність, вони зазнають прискореної протеолітичної деградації, а також можуть слугувати джерелом вільних радикалів [7]. У

© Т. О. РУСНАК, Р. А. ВОЛКОВ, І. І. ПАНЧУК, 2013

рослин вміст модифікованих білків може також змінюватися протягом онтогенезу. Так, показано зростання вмісту карбонільних груп у проростаючому насінні *Arabidopsis thaliana* [8] та різке зниження рівня окислення білків перед цвітінням та протягом розвитку квітки [7].

За дії абіотичних стресових факторів (напр., водний дефіцит [9], дія іонів кадмію [10]) вміст КГ у рослинній клітині зростає [5, 11]. Проте зміни вмісту КГ в умовах теплового стресу вивчені недостатньо. Відомо, що КГ утворюються вже на ранніх стадіях стресової відповіді та є відносно стабільними. Саме ця властивість робить їх зручним маркером оксидативного стресу [11, 12].

Рівень АФК у рослинній клітині контролюється антиоксидантною системою, до якої належать ферменти та низькомолекулярні антиоксиданти [13]. Одним із 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 містяться у пероксисомах і, зокрема, забезпечують знешкодження H_2O_2 , який утворюється у цій органелі внаслідок фотодихання. У листках *A. thaliana* переважно присутні ізоформи CAT2 та CAT3, з яких на CAT2 припадає приблизно 70 % загальної активності ферменту. CAT1 експресується у коренях, а в листках виявляється тільки на пізніх стадіях розвитку [14, 15]. Доведено, що CAT відіграє важливу роль у захисті рослинної клітини від багатьох стресових факторів [15–17]. Зокрема, було встановлено зростання активності цього ферменту за дії високотемпературного стресу [17]. Проте роль окремих ізоформ CAT у відповіді рослин на тепловий стрес все ще залишається не до кінця зрозумілою.

Для з'ясування можливої участі ізоформи CAT2 у захисті рослинної клітини від дії підвищених температур ми вивчали динаміку накопичення КГ у рослин *A. thaliana*

дикого типу та в нокаутній лінії з відсутньою експресією CAT2.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на рослинах *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. екотипу Columbia 0 (дикий тип, ДТ) та нокаутної мутантної лінії, KO-Cat2 (SALK 057998), яка була отримана 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 у ґрунті в культивачній кімнаті при сталій температурі +20 °C, освітленні 2,5 кЛк в умовах 16-годинного світлового дня. Після 6,5 тижнів температуру вирощування збільшували до 28 °C та продовжували культивування рослин ще 48 год. Такий режим культивування підсилює клітинну відповідь рослин *A. thaliana* на тепловий стрес, як показано в наших попередніх дослідженнях [18].

Для проведення теплової обробки обрізали листя середньої частини розетки та вміщували їх у 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 год за 20, 37 або 44 °C. Для вивчення процесів, що відбуваються у фазі пост-стресової репарації, через 1 або 2 год після початку стресової обробки зразки переносили в умови кімнатної температури (20 °C) і продовжували інкубацію протягом ще 1 або 2 год, відповідно. Контролем слугували рослини, листки яких інкубувалися за 20 °C. Після завершення обробки листки 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.

Визначення концентрації КГ білків здійснювали за методом, описаним в літературі [19]. 200 мг замороженого рослинного матеріалу гомогенізували в присутності рідкого азоту, додавали 750 мкл 50 мМ калій-фосфатного буфера (рН 7,0) та центрифугували при 4 °С за 13000 г протягом 10 хв. Після центрифугування 350 мкл супернатанту переносили в чисту мікропробірку та додавали 750 мкл 10 мМ 2,4-динітрофенілгідразину, розчиненого у 2Н НСІ. Паралельно готували контрольну пробу, в яку замість розчину 2,4-динітрофенілгідразину додавали 2Н НСІ. Проби інкубували за кімнатної температури у темряві протягом 1 год. Після інкубування додавали 750 мкл 40 % ТХО та центрифугували за 13000 г протягом 20 хв. Після центрифугування супернатант зливали, а осад, що утворився, тричі промивали 1 мл суміші, що містила етанол та етилацетат у співвідношенні 1:1, та центрифугували 10 хв за 13000 г. Чистий осад розчиняли в 1 мл 6М гуанідинхлориду протягом 30 хв у темряві. Вміст КГ білків визначали на спектрофото-

метрі СФ-46 за довжини хвилі 370 нм, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання 22000 М⁻¹ см⁻¹. Вміст білка в пробі визначали спектрофотометрично за методом Бредфорда [20].

Всі експерименти повторено для п'яти незалежно вирощених партій рослин. Кожне вимірювання проводили у 3 паралельних пробах. Статистичну вірогідність отриманих даних оцінювали з використанням двовибіркового t-критерію для залежних вибірок [21].

Результати та обговорення

Отримані нами результати показують, що концентрація КГ у листках інтактних рослин нокаутної лінії KO-Cat2 на 29 % вища, порівняно з рослинами дикого типу (рисунок). У наших попередніх дослідженнях встановлено, що у лінії KO-Cat2 дійсно повністю відсутня активність ізоформи CAT2, але ця втрата частково компенсується додатковою активацією ізоформи CAT3 [22]. Тим не менш, загальна каталазна активність у листках 7-тижневих нокаутних

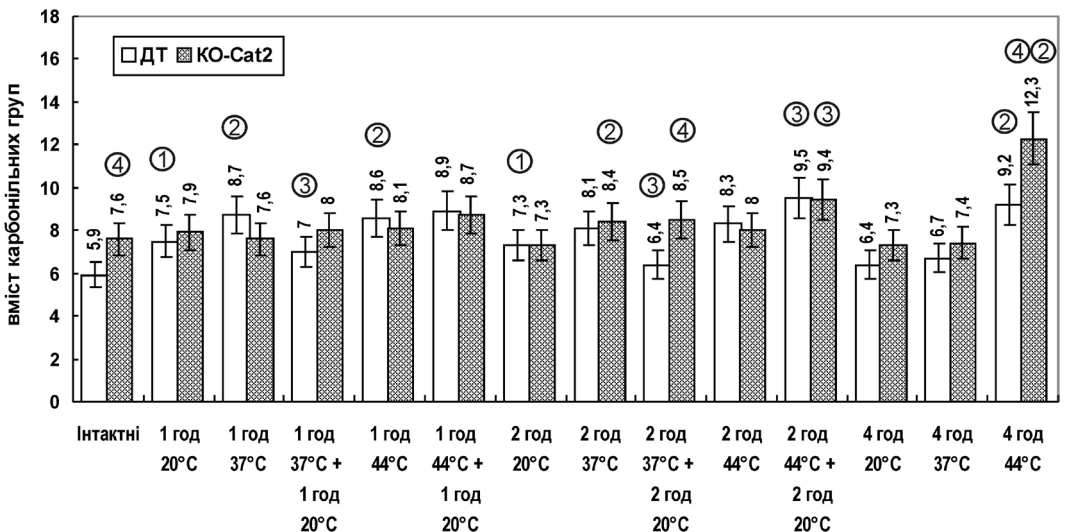


Рисунок. Вміст карбонільних груп (нмоль/мг білка) у листках рослин *A. thaliana* дикого типу (ДТ) та нокаутної лінії KO-Cat2 в умовах теплового стресу. Різниця достовірна ($p < 0,05$) між контрольними та інтактними рослинами (1), між стресованими та контрольними рослинами (2), між рослинами за умов стресу та постстресового відновлення (3), між рослинами ДТ та KO-Cat2 (4)

рослин є зниженою майже в 3 рази порівняно із рослинами ДТ.

Виявлений підвищений вміст КГ свідчить, що за відсутності ізоформи CAT2 у клітинах мутанта відбувається зростання рівня АФК та розвивається хронічне оксидативне пошкодження білків. У наших попередніх дослідженнях встановлено, що інший показник оксидативного стресу – рівень перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) – у листках інтактних рослин KO-Cat2 не вищий, а навіть нижчий, ніж у рослин ДТ. Це дозволило висунути припущення, що у мутантної лінії KO-Cat2 відбувається активація альтернативних захисних механізмів [1]. Порівняння наших нових та попередніх результатів свідчить, що ці альтернативні захисні механізми є ефективними стосовно обмеження ПОЛ, але недостатньо ефективними для обмеження карбонілювання білків.

У зразках рослин ДТ, що інкубувались у темряві за кімнатної температури протягом 1 та 2 год, спостерігали підвищення вмісту КГ на 27 %, що свідчить про зростання рівня АФК у цих умовах. Останнє можна пояснити тим, що генерація «відновного потенціалу» у вигляді НАДФ-Н та синтез низькомолекулярних антиоксидантів у рослинній клітині значною мірою залежать від фотосинтетичного транспорту електронів. Зокрема, останній етап синтезу аскорбату є світлозалежним [23]. Відповідно, за інкубації листків у темряві ці процеси мають інгібуватися, що й призводить до зростання рівня КГ. Проте із продовженням часу інкубації до 4 годин рівень КГ знижувався та наближався до рівня інтактних рослин. Це може свідчити про додаткову активацію захисних механізмів, які здатні обмежувати оксидативне пошкодження білків за умов досліду.

У KO-Cat2 на відміну від ДТ за кімнатної температури за інкубації протягом 1 та 2 год концентрація КГ практично не змінювалася та залишалася на рівні інтактних рослин. Відповідно, різниця між ДТ та нокаут-

ними рослинами, яку спостерігали в інтактних листках, зникла за рахунок зростання рівня КГ у листках ДТ. За інкубації протягом 4 год спостерігали тенденцію ($0,05 < p < 0,1$) до більш високого вмісту КГ у листках лінії KO-Cat2, що пояснюється зниженням цього параметра у листках рослин ДТ. Отже, рівень КГ у нокаутного мутанта є підвищеним, але більш стабільним і, зокрема, нечутливим до інкубації зразків у темряві. Це можна пояснити тим, що додаткові захисні механізми, які конститутивно активовані у мутантних рослин навіть за оптимальних умов культивування, також здатні стримувати підсилення оксидативного пошкодження білків при перенесенні дослідних зразків у темряву. Інакше кажучи, на відміну від ДТ, мутантні рослини виявилися преадаптованими до умов експериментальної обробки за кімнатної температури.

За дії 1- та 2-годинного помірного теплового стресу (37°C) у рослин ДТ спостерігали підвищення концентрація КГ на 16 ($p < 0,05$) та 11 % ($0,05 < p < 0,1$), відповідно. При збільшенні часу інкубування до 4 год рівень КГ повертається до рівня контрольних зразків, що свідчить про поступову адаптацію рослин до стресових умов. У нокаутної лінії KO-Cat2 зростання рівня КГ спостерігали лише за 2-годинного стресу, тобто реакція на стрес наставала пізніше, що можна розглядати як ще один прояв преадаптації мутантів. Із продовженням стресу до 4 годин рівень КГ у KO-Cat2, як і у випадку ДТ, повертався до контрольного.

Аналіз вмісту КГ у фазі постстресової репарації виявив різний характер реакції у ДТ та нокаутній лінії. Для ДТ після 1-годинного помірного теплового стресу у фазі репарації (1 год 37°C + 1 год 20°C) спостерігали зниження вмісту КГ нижче рівня, зафіксованого для рослин, що інкубувалися за кімнатної температури. Такий же ефект спостерігався і після 2-годинного стресу. На противагу цьому у KO-Cat2 у фазі репарації рівень окисно модифікованих білків

залишався без змін порівняно з рослинами, що зазнавали дії стресу, що свідчить про затримку у постстресовому відновленні нормального фізіологічного стану у мутантних рослин. Аналогічний ефект – зниження рівня ПОЛ протягом постстресового відновлення у ДТ та відсутність такого зниження у КО-Cat2 – спостерігався нами раніше [24]. Це може свідчити про загальне виснаження захисних механізмів у мутантних рослин за умов теплового стресу.

За дії жорсткого теплового стресу (44 °С) протягом 1 год у ДТ, спостерігали підвищення вмісту КГ на 15 %. Збільшення тривалості теплової обробки до 2 годин не призводило до подальшого зростання, але за дії 4-годинного стресу рівень КГ підвищувався на 44 % порівняно з контролем, що інкубувався за кімнатної температури. У нокаутної лінії відмічена дещо інша картина: 1-та 2-годинні стресові обробки не викликали жодних змін у концентрації КГ, що ще раз вказує на преадаптацію КО-Cat2 до стресу. Проте 4-годинний стрес призводив до значно більшого, ніж у ДТ, зростання рівня КГ – на 66 %, що свідчить про виснаження захисних механізмів у мутантних рослин. Різке зростання вмісту КГ в цих умовах може пояснюватись інактивацією таких антиоксидантних ферментів, як гваякол та аскорбат пероксидази, POD та APX [18, 25].

У фазі постстресової репарації після 1-годинного жорсткого теплового стресу вміст КГ у клітинах ДТ та КО-Cat2 лінії залишався практично без змін. Проте після 2-годинного жорсткого стресу концентрація КГ у фазі репарації продовжувала зростати порівняно зі стресованими рослинами. Отже, в цьому випадку, на відміну від помірному стресу, рослинна клітина не здатна відновлювати білки після жорсткої теплової обробки, однією з причин чого може бути згадана вище інактивация POD та APX.

У наших ранніх дослідженнях було продемонстровано, що за дії жорсткого теп-

лового стресу в листках арабідопсису відбувається майже повне пригнічення індукції транскрипції стресових генів, яку спостерігали за дії помірного стресу [18, 26]. Як свідчать наші нові дані, така відсутність стресової відповіді призводить, зокрема, до підсиленого оксидативного ушкодження білків.

Таким чином, у рослин лінії КО-Cat2 через втрату активності ізоформи CAT2 відбувається зростання концентрації АФК і, як наслідок, спостерігається підвищений вміст карбонільованих білків.

Висновки

Отримані нами нові дані та порівняння їх із попередніми результатами свідчать, що втрата ізоформи CAT2 у нокаутних мутантів арабідопсису викликає хронічний оксидативний стрес навіть при культивуванні рослин за оптимальних умов, що, зокрема, проявляється як підсилення карбонілювання білків. Наслідком хронічного оксидативного стресу є активація захисних механізмів, які ефективні в обмеженні ПОЛ, але недостатньо ефективні у запобіганні карбонілювання білків. Тим не менш, конститутивна дерев'яна захисних механізмів здатна забезпечити короткотривалу (1 год) преадаптацію мутантних рослин до дії теплового стресу. Проте при підсиленні стресового впливу (44 °С, 4 год) захисні механізми у мутантних рослин зазнають переважного виснаження, що призводить до підсиленого зростання карбонілювання білків. Отже, CAT2 є компонентом захисту рослинної клітини за дії теплового стресу, повністю компенсувати втрату якого клітина не спроможна.

Перелік літератури

1. Доліба І.М., Руснак Т.О., Волков Р.А., Панчук І.І. Перекисне окислення ліпідів у *Arabidopsis thaliana* дикого типу та мутантної лінії КО-Cat2 за умов теплового стресу // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2012. – Т. 10, № 2. – С. 195–201.
2. Volkov R.A., Panchuk I.I., Schoeffl F. Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* // Plant Mol. Biol. – 2006. – Vol. 61. – P. 733–746.

3. 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.
4. 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.
5. Moller I.M., Rogowska-Wrzęsinska A., Rao R.S.P. Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective // *J. Proteomics.* – 2011. – Vol. 74. – P. 2228–2242.
6. Dunlop R.A., Rodgers K.J., Dean R.T. Recent development in the intracellular degradation of oxidized proteins // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – Vol. 33. – P. 894–906.
7. Johansson E., Olsson O., Nystrom T. Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 21. – P. 22204–22208.
8. Job C., Rajjou L., Lovigny Y., Belghazi M., Job D. Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination // *Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 138. – P. 790–802.
9. Pyngrope S., Bhoomika K., Dubey R.S. Oxidative stress, protein carbonylation, proteolysis and antioxidative defense system as a model for depicting water deficit tolerance in *Indica* rice seedlings // *Plant Growth Regulation.* – 2013. – Vol. 69, № 2. – P. 149–165.
10. Romero-Puertas M.C., Palma J.M., Gomez M., Del Rio L.A., Sandalio L.M. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants // *Plant, Cell and Environment.* – 2002. – Vol. 25. – P. 677–686.
11. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress // *Clinica Chimica Acta.* – 2003. – Vol. 329. – P. 23–38.
12. Bechtold U., Rabbani N., Mullineaux P. M., Thornalley P. J. Quantitative measurement of specific biomarkers for protein oxidation, nitration and glycation in *Arabidopsis* leaves // *Plant J.* – 2009. – Vol. 59. – P. 661–671.
13. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants // *Trends Plant Sci.* – 2004. – Vol. 9, № 10. – P. 490–498.
14. 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.
15. Orendi G. Expression von Katalasen waehrend der Blattseneszens und unter verschiedenen Stressbedingungen in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // *Dissertation Verlag Grauer.* – 2001. – 135 s.
16. 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.
17. Доліба 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 // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 211–217.
18. Panchuk I., Volkov R., Schaeff 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. Lushchak V.I. Semchishyn H.M., Lushchak O.V. The classic methods to measure oxidative damage: lipid peroxides, thiobarbituric-acid reactive substances, and protein carbonyls // In: *Oxidative stress in aquatic ecosystems* (eds D. Abele, J. P. Vázquez-Medina and T. Zenteno-Savín), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. – 2011 – P. 426–430.
20. 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.
21. Лакін Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.
22. Доліба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Активність каталази та аскорбат пероксидази у Cat2 нокаутного мутанта *Arabidopsis thaliana* за дії іонів кадмію // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* – 2011. – Т. 9, № 2. – С. 200–208.
23. Smirnov N. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* – 2000. – Vol. 355. – P. 1455–1464.
24. Доліба І.М., Руснак Т.О., Волков Р.А., Панчук І.І. Перекисне окислення ліпідів у *Arabidopsis thaliana* дикого типу та мутантної лінії KO-Cat2 за умов теплового стресу // *Вісник УТГІС.* – 2012. – Т. 10, № 2. – С. 193–201.
25. Руснак Т.О., Доліба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Активність гваяколпероксидази у нокаутної лінії KO-Cat2 *Arabidopsis thaliana* за умов теплового стресу // *Физиология и биохимия культ. растений.* – 2013. – Т. 45, № 3. – С. 246–253.
26. Volkov R.A., Panchuk I.I., Schaeff F. Heat-stress dependent and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR // *J. Experiment. Bot.* – 2003 – Vol. 54 – P. 2343–2349.

Представлено А.В. Семеніхінім
Надійшла 6. 11. 2013

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ
У *ARABIDOPSIS THALIANA* ДИКОГО ТИПА
И МУТАНТНОЙ ЛИНИИ КО-CAT2 ПОД
ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТЕПЛООВОГО СТРЕССА

Т.А. Руснак, Р.А. Волков, И.И. Панчук

Кафедра молекулярной генетики и биотехноло-
гии

Черновицкий национальный университет имени
Юрия Федьковича

Украина, 58012, Черновцы, ул. Коцюбинского, 2
e-mail: irina.panchuk@gmail.com

Цель. Денатурация белков и увеличение образования активных форм кислорода (АФК) вызывают повреждения клеток растений при тепловом стрессе. Целью исследования было прояснение предполагаемой защитной роли изоформы каталазы CAT2 у *Arabidopsis thaliana* при повышенных температурах. **Методы.** Листья растений арабидопсиса дикого типа и нокаутного мутанта КО-Cat2 подвергались тепловой обработке. За развитием реакции на тепловой стресс наблюдали, сравнивая интенсивность карбонилирования белков под действием АФК. **Результаты.** Установлено, что утрата изоформы CAT2 у нокаут-мутанта вызывает хронический оксидативный стресс даже у растений, выращенных при оптимальных условиях. В частности, было выявлено усиление карбонилирования белков в интактных листьях мутантных растений по сравнению с растениями дикого типа. Антиоксидантные защитные механизмы, которые активируются в ответ на хронический оксидативный стресс, эффективны в ограничении перекисного окисления липидов, но не эффективны в предотвращении карбонилирования белков. Эта конститутивная активация защитных механизмов обеспечивает краткосрочную (1 ч) защиту мутантных растений при тепловом стрессе. Однако при длительной жесткой тепловой обработке (44 °С, 4 ч) защитные механизмы у мутантных растений подвергаются преимущественному истощению, что приводит к усилению карбонилирования белков. **Выводы.** CAT2 участвует в защите растительной клетки от термооксидативного стресса и является особенно важной для ограничения карбонилирования белков.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, тепловой шок, карбонильные группы белков, нокаут-мутанты.

OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS
IN *ARABIDOPSIS THALIANA* WILD TYPE AND
KO-CAT2 KNOCK-OUT MUTANT UPON HEAT
STRESS

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

Department of Molecular Genetics and
Biotechnology

Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynski str. 2

e-mail: irina.panchuk@gmail.com

Aim. Denaturation of proteins and increased generation of reactive oxygen species (ROS) result in plant cell damage upon heat stress. The aim of the study was to elucidate the presumptive protecting role of catalase isoform CAT2 of *Arabidopsis thaliana* upon increased temperatures. **Methods.** Leaves of wild type and KO-Cat2 knock-out mutant plants were subjected to heat treatment. Development of heat stress reaction was monitored comparing the intensities of protein carbonylation induced by ROS. **Results.** It was found that the loss of CAT2 isoform in knock-out mutant causes chronic oxidative stress even in plants cultivated upon optimal grow conditions. Especially, enhanced carbonylation of proteins in intact leaves of mutant plants compared to wild type was demonstrated. The antioxidative defence mechanisms, which are activated in response to the chronic oxidative stress appear to be effective in limiting of lipid peroxidation, but not effective in preventing of protein carbonylation. The constitutive activation of defence mechanisms provides short-term (1 h) protection of the mutant plants upon heat stress. However, upon prolonged severe heat treatment (44 °C, 4 h) the defence mechanisms in mutant plants undergo preferential depletion resulting in enhanced carbonylation of proteins. **Conclusions.** CAT2 is involved in plant cell protection against thermooxidative stress and appears to be especially important for limiting of protein carbonylation.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, heat stress, carbonyl groups of proteins, knock-out mutants.