

УДК 577.218 + 577.151.042:577.152.193

## **АКТИВНІСТЬ КАТАЛАЗИ ТА АСКОРБАТ ПЕРОКСИДАЗИ У CAT2 НОКАУТНОГО МУТАНТА ARABIDOPSIS THALIANA ЗА ДІЇ ІОНІВ КАДМІЮ**

І.М. ДОЛІБА, Р.А. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК

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

*Стресові білки рослин, як правило, представлені декількома ізоформами, які кодуються відповідними членами мультигенної родини. Досі часто залишається невідомо, у яких випадках ізоформи мають подібні або, навпаки, специфічні клітинні функції. Для перевірки припущення, що відсутність ізоформи каталази CAT2 у нокаутного мутанта по гену Cat2 рослин Arabidopsis thaliana може бути компенсована активацією інших ізоформ каталази або аскорбат пероксидази (APX), було оцінено активність цих ферментів за нормальних умов та за дії стресу, спричиненого іонами кадмію. Виявлено, що активність ізоформи CAT3 значно зростала у листках нокаутного мутанта по гену Cat2. Проте загальна активність каталази у мутантних рослин була знижена і становила 58 % від рівня активності у рослин дикого типу. На відміну від цього, активність APX лише незначно зростала у мутантів. Це свідчить про те, що в умовах експерименту APX не бере участі у компенсації відсутності CAT2 ізоформи. Обробка листків 5 мМ хлоридом кадмію призвела до інактивації APX. Цей ефект був краще виражений у мутантних рослин, вказуючи на те, що оксидативний стрес, зумовлений іонами кадмію, призводить до сильніших пошкоджень білків у мутантів із зниженою каталазою активністю порівняно з рослинами дикого типу.*

*Ключові слова: Arabidopsis thaliana, каталаза, аскорбат пероксидаза, пероксид водню, кадмій, оксидативний стрес, мультигенні родини, молекулярна надлишковість, нокаутні мутанти.*

**Вступ.** Характерною рисою еукаріотичних організмів є присутність у геномі більшості ділянок у вигляді кількох тандемно організованих або диспергованих копій, які разом складають мультигенну родину. Особливо широко мультигенні родини представлені у геномах рослин [1]. Існує думка, що високоподібні гени, які належать до однієї родини, можуть виконувати однакові функції і одночасно були присутніми у геномі лише для підвищення надійності роботи клітини, тобто є функціонально надлишковими. Проблема ускладнюється тим, що в багатьох випадках майже однакові метаболічні функції можуть виконувати білки, які кодуються різними мультигенними родиними.

Альтернативним поясненням існуючого поліморфізму білків є фізіологічна необхідність вибірково (диференційно) змінювати їхню експресію залежно від фази онтогенезу або змін, що відбуваються в навколишньому середовищі. Зручною моделлю для вивчення проблеми молекулярної надлишковості є гени, експресія яких змінюється за дії абіотичних стресових чинників, таких як підви-

© І.М. ДОЛІБА, Р.А. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК, 2011

щення або зниження температури, посуха, вплив високих концентрацій іонів ВМ тощо. До таких генів належать ті, що кодують білки антиоксидантних ферментів [2 – 5]. Ці гени у рослин належать до мультигенних родин. Проте роль окремих генів та кодованих ними білків, а також шляхи регуляції їхньої експресії в умовах стресу вивчені все ще недостатньо.

Аналіз інформації, наявної у науковій літературі, та результати попередніх власних досліджень дозволяють стверджувати, що важливу роль у стресовій відповіді рослин відіграє каталаза (CAT). Цей фермент задіяний у розщепленні пероксиду водню, який продукується у клітині за оптимальних умов вирощування і концентрація якого суттєво зростає за дії різноманітних стресових впливів, зокрема збільшення температури [6 – 9]. У *Arabidopsis thaliana* експресія трьох генів, які кодують ізоформи CAT залежить від стадії розвитку рослини. Серед ізоформ каталази найбільш експресованою є CAT2, на долю якої припадає 70 % загальної каталазної активності у тканинах мезофілу листків. Активність CAT3 виявляється тільки у васкулярних тканинах, а CAT1 експресується у листках лише під час старіння [2, 10, 11].

Пероксид водню є не тільки шкідливою молекулою, яка спричиняє оксидативні пошкодження біополімерів та мембранних структур, але й месенджером, який регулює експресію багатьох генів [8, 9, 12, 13]. Відповідно, регуляція його концентрації має центральне значення для захисту клітини та розвитку стресової реакції. Рівень пероксиду водню у клітині контролюється кількома ферментними системами, кожна з яких кодується мультигенною родиною. Крім каталази, розщеплення пероксиду водню в *A. thaliana* забезпечують аскорбат пероксидази (APX; 8 генів) [4], гваякол пероксидази (70 генів) [3], а також деякі інші білки [5]. Функціональна спеціалізація та взаємодія між цими ферментними систе-

мами, особливо здатність окремих білків замінювати один одного протягом розвитку стресової реакції, все ще залишається дослідженою недостатньо.

Зручною моделлю для вивчення функціональної спеціалізації та взаємозамінності різних ферментів та їхніх окремих ізоформ є мутантні форми із порушеною функцією відповідних генів. Для перевірки припущення, що за дії абіотичного стресу активація CAT1, CAT3 та APX може компенсувати втрату активності ізоформи CAT2, ми зосередили увагу на вивченні змін активності CAT та APX у рослин *A. thaliana* дикого типу та у нокаутного (knock-out) мутанта з порушеною експресією гена *Cat2* у відповідь на гострий стрес, спричинений швидким накопиченням високих концентрацій іонів  $Cd^{2+}$  у тканинах листа, що призводить до порушення окисно-відновного балансу клітини та виникнення оксидативного стресу [14–17].

### Матеріали і методи

Для дослідження впливу кадмію використовували 4,5–5-тижневі рослини *A. thaliana* (L.) Heynh дикого типу (ДТ: еко-тип Columbia 0) та гомозиготну лінію *CO-Cat2*, яка є Т-ДНК нокаутним мутантом по гену *Cat2* (At1g20620). Насіння, лінії *CO-Cat2* було люб'язно надано нам др. Ульріке Центграф (Центр молекулярної біології рослин, м. Тюбінген, Німеччина).

Рослини вирощували в ґрунті в культивачній кімнаті за температури 20 °С, освітленні 2,5 кЛк в умовах 16-годинного світлового дня.

Для того, щоб отримати інформацію про ранню стадію стресової відповіді та з'ясувати первинні реакції рослинної клітини на дію підвищених концентрацій іонів  $Cd^{2+}$ , обробку рослини проводили за умов, що забезпечують швидке надходження іонів  $Cd^{2+}$  до тканин листків. Відомо, що коренева система має бар'єрну функцію і вибірково перешкоджає надходженню іонів

ВМ у пагони [18–20]. Тому для забезпечення швидкого надходження іонів  $Cd^{2+}$  у листки арабідопсису інкубували зрізану надземну частину рослин на рідкому середовищі 0,5x MS, що містило хлорид кадмію у концентраціях 0, 1; 0,5 та 5 мМ. Обробку проводили у темряві за температури 20 °С протягом 2-х (короткотривалий стрес) та 12-ти (довготривалий стрес) год. Як показує досвід нашої лабораторії, 2 години відповідають мінімальному часу, за якого слід очікувати накопичення токсиканту та розвитку стресової відповіді у листках. Контрольні рослини інкубували на середовищі без додавання хлориду кадмію. Як додатковий контроль використовували інтактні рослини, які заморозували безпосередньо після зрізання.

Екстракцію нативних білків проводили в буферах різного складу: для APX – 50 мМ фосфат натрію (pH=7,0), 0,25 мМ EDTA, 20 % гліцерин, 0,5 мМ аскорбат та 2 % полівінілпіролідон; для CAT – 0,1 М трис-HCl (pH=6,8), 20 % гліцерин, 30 мМ дитіотрейтол та 0,1 % нерозчинний полівінілполіпіролідон (ПВПП). Кількість білка в екстракті визначали спектрофотометрично за методом Бредфорда [21].

Активність APX визначали спектрофотометрично шляхом вимірювання зміни оптичної щільності проби за 290 нм [4]. Реакційна проба для APX містила 25 мкл білкового екстракту та 975 мкл реакційної суміші, що складалася з 25 мМ Na-фосфату (pH 7,0), 0,1 мМ EDTA, 2,5 мМ аскорбату та 1 мМ  $H_2O_2$ . Активність ферменту виражали в мкмоль аскорбату, окисленого за 1 хв у перерахунку на 1 мг білка.

Каталазну активність визначали за методом, описаним нами раніше [22]. Метод ґрунтується на здатності молібдату амонію утворювати з пероксидом водню комплекси жовтого забарвлення, інтенсивність якого вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі  $\lambda=410$  нм на Photometer 1101M (Eppendorf Geraetebau, Німеччи-

на). Активність ферменту розраховували, порівнюючи вміст пероксиду водню у пробі на початку реакції та після її припинення, та виражали в мкмоль  $H_2O_2$ , що розщеплювався за 1 хв у перерахунку на 1 мкг білка.

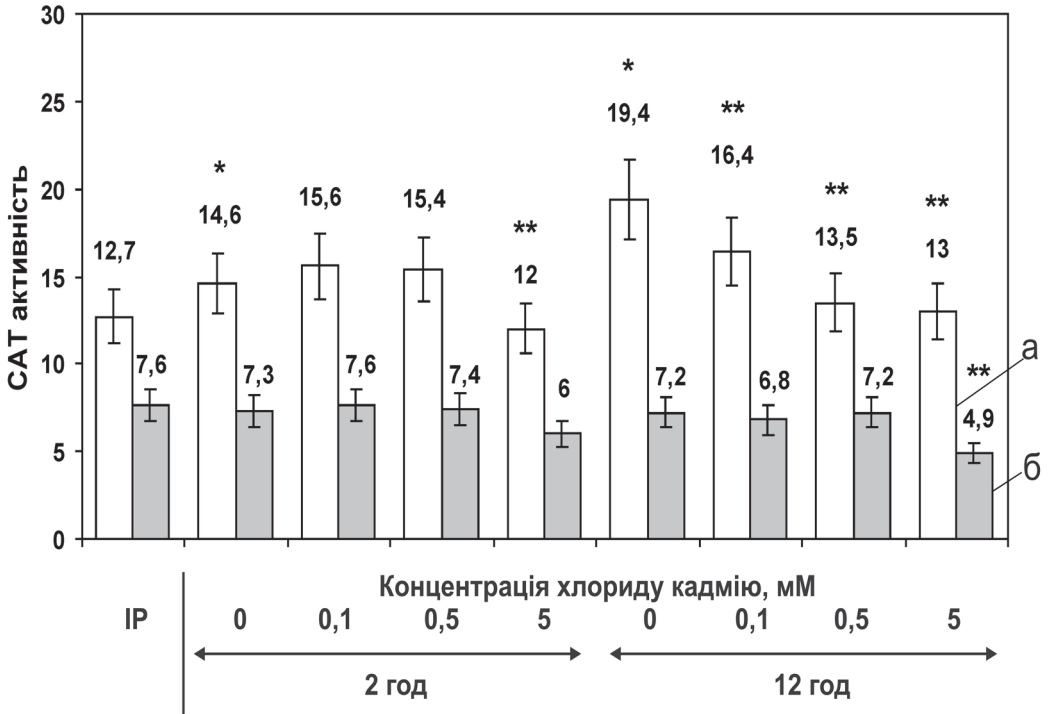
Експеримент виконували у п'яти біологічних та трьох аналітичних повторностях. Статистичну достовірність отриманих даних оцінювали з використанням критерію Ст'юдента [23].

Ізоферментний спектр каталази визначали методом електрофорезу у 7,5 % поліакриламідному гелі (ПААГ) у нативних умовах [11]. Електрофорез проводили при напруженості електричного поля 12 В/см протягом 6 год. Для візуалізації ізоформ каталази гель інкубували протягом 5 хв у 0,01 % розчині пероксиду водню, після чого гель промивали дистильованою водою та переносили на 5 хв у суміш, що складалася з 1 %  $FeCl_3$  та 1 %  $K_3Fe(CN)_6$ . У місцях локалізації ізоформ каталази на гелі спостерігали появу світлих смуг на темному фоні, що пов'язано із розщепленням пероксиду водню під дією ферменту.

### Результати та обговорення

Для кращого розуміння фізіологічної ролі окремих ізоформ каталази, зокрема CAT2, та регуляції їхньої активності в умовах оксидативного стресу, спричиненого високими концентраціями  $Cd^{2+}$ , досліджено нокаутний мутант *A. thaliana* KO-Cat2 порівняно з рослинами дикого типу (ДТ). На першому етапі роботи визначено активність та порівняно ізоферментні спектри CAT. Отримані результати показали, що активність CAT у KO-Cat2 складає 58 % від активності CAT у рослин ДТ (рис. 1).

У результаті електрофоретичного розділення для рослин ДТ на гелі виявлено ізоформи каталази високої, середньої та низької рухливості (рис. 2). Відомо, що в геномі *A. thaliana* присутні три гени, що кодують ізоформи каталази, які по-різному експресуються у рослинних тканинах. На

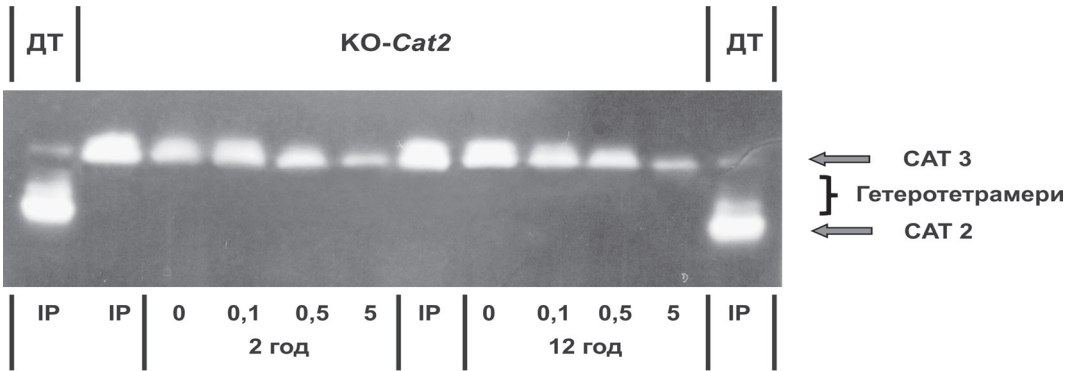


**Рис. 1.** Каталазна активність (мкмоль на мг білка за 1 хв) у листках *Arabidopsis thaliana* за дії 0, 0,1; 0,5 та 5 мМ хлориду кадмію протягом 2 та 12 годин: а – ДТ – рослини дикого типу (*Columbia 0*), б – *KO-Cat2* – мутантні рослини, IP – інтактні рослини; \* – різниця порівняно з інтактними рослинами достовірна; \*\* – різниця порівняно з контрольними рослинами (інкубація на середовищі без хлориду кадмію) достовірна ( $p < 0,05$ )

ранніх стадіях розвитку у листках *A. thaliana* експресуються лише гени *Cat2* та *Cat3*, причому основна каталазна активність припадає на *CAT2*. Експресія *Cat1* спостерігається лише на 9,5–10,5 тижнях розвитку, коли рослини входять у фазу старіння (сенесценсу) [10]. У наших експериментах використовували 5-тижневі рослини. Відповідно, виявлені ізоформи мають бути продуктами експресії генів *Cat2* і *Cat3*. Згідно з літературними даними, найбільшу рухливість має *CAT2*, а найнижчу – *CAT3*. Із середньою швидкістю рухаються гетеротетрамери каталази, що складаються з комбінації мономерів *CAT2* та *CAT3*. Така інтерпретація підтверджується тим, що для рослин *KO-Cat2* на електрофореграми

виявлено лише одну ізоформу *CAT3*, інтенсивність якої була суттєво більшою за інтенсивність смуги *CAT3* у рослин ДТ. Отже, у листках *KO-Cat2* за відсутності ізоформи *CAT2* з високим рівнем експресії відбувається активація *CAT3*, яка, імовірно, частково переймає її функції. Тим не менш, загальна каталазна активність залишається помітно зниженою.

На наступному етапі досліджень оцінено зміни активності *CAT* за умов швидкого надходження іонів  $Cd^{2+}$  до пагонів. Встановлено, що активність *CAT* у *KO-Cat2* у всіх досліджуваних точках була нижчою та становила 36–56 % від каталазної активності у рослин ДТ (рис. 1). Після обробки протягом 2 год за дії 5 мМ іонів  $Cd^{2+}$  актив-



**Рис. 2.** Ізоферментні спектри каталази у листках *Arabidopsis thaliana* за дії 0, 1; 0,5 та 5 мМ хлориду кадмію протягом 2 та 12 годин: ДТ – рослини дикого типу (*Columbia 0*), КО-*Cat2* – мутантні рослини, ІР – інтактні рослини

ність САТ знижувалася на 18 % як у рослин ДТ, так і у КО-*Cat2* порівняно із контрольними зразками, які інкубувались у середовищі без додавання хлориду кадмію.

Збільшення часу стресової обробки до 12 годин призводило до помітнішої інактивації САТ в листках рослин ДТ. За дії іонів  $Cd^{2+}$  у трьох використаних нами концентраціях відбувалося статистично достовірне зниження активності САТ відповідно на 16, 30 та 33 % порівняно з контрольними зразками. На відміну від цього, у КО-*Cat2* активність ферменту знижувалася на 30 % лише у випадку найвищої використаної нами концентрації.

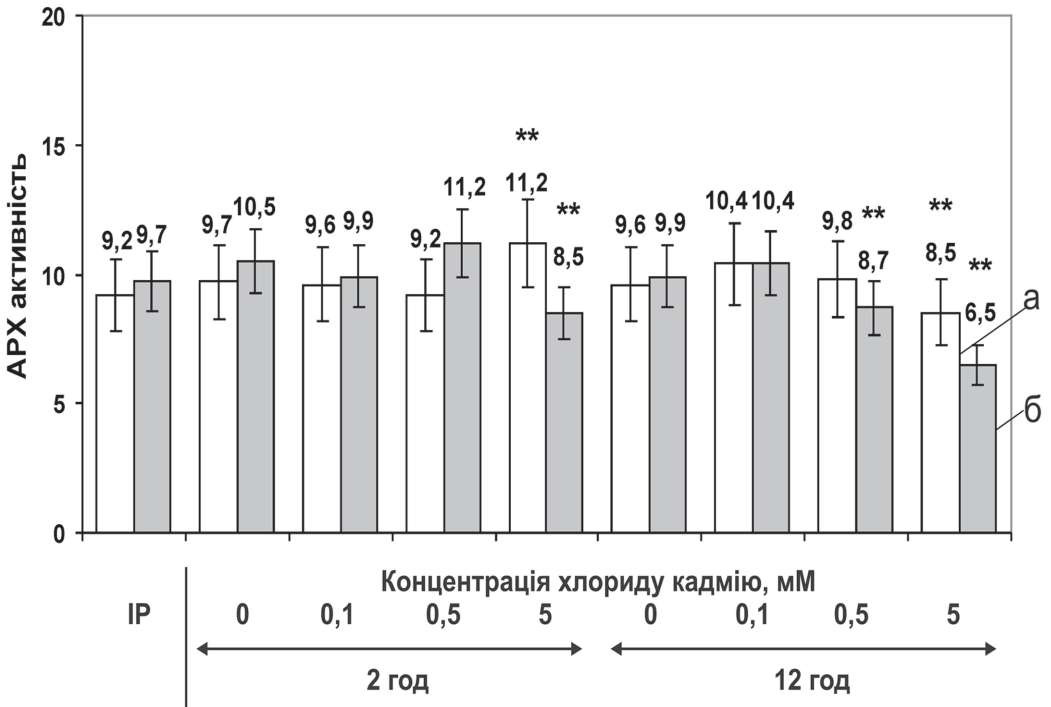
Цікаво, що інкубування рослин ДТ на середовищі 0,5 x MS без додавання хлориду кадмію (контрольні зразки) протягом 12 год спричиняло статистично достовірне підвищення активності каталази на 53 % порівняно з інтактними рослинами (рис. 1). У КО-*Cat2* такого ефекту не спостерігали. Останнє спостереження можна пояснити тим, що у листках інтактних рослин КО-*Cat2* вже відбулася максимально можлива активація САТ3 спрямована на компенсацію втрати САТ2, внаслідок чого подальша активація САТ3 в умовах стресу стає неможливою.

Отже, в умовах швидкого надходження у рослину іони  $Cd^{2+}$  спричиняють змен-

шення каталазної активності у листках арабідопсису. Цей ефект більше виражений у рослин ДТ порівняно з КО-*Cat2*. Імовірним механізмом інактивації каталази може бути оксидативне пошкодження молекул ферменту в умовах порушення окисно-відновного балансу у клітині, як це було продемонстровано раніше при вивченні впливу  $Cd^{2+}$  на каталазу соняшника [24].

У наших попередніх дослідженнях встановлено, що у листках рослин ДТ обидві ізоформи САТ2 і САТ3 зазнають інактивації внаслідок дії іонів  $Cd^{2+}$  [25]. Електрофоретичний аналіз ізоформ каталази у лінії КО-*Cat2* показав, що в усіх досліджених варіантах обробки на гелі виявлялася лише смуга, яка відповідає ізоформі САТ3. Інтенсивність цієї ізоформи зменшувалася із зростанням концентрації іонів кадмію як за дії 2- так і 12-годинного стресу. Найбільшу інактивацію ізоформи САТ3 спостерігали за 12-годинної дії 5 мМ іонів  $Cd^{2+}$  (рис. 2). В цілому, інтенсивність забарвлення смуг на електрофореграмах узгоджувалася з результатами калориметричних вимірювань каталазної активності (див. рис. 1).

У рослин розщеплення пероксиду водню крім каталази здійснюють також інші ферменти, зокрема АРХ. Тому можна припустити, що АРХ може функціонально замінювати САТ та знешкоджувати  $H_2O_2$  в си-



**Рис. 3.** Аскорбат пероксидазна активність (мкмоль на мг білка за 1 хв) у листках *Arabidopsis thaliana* за дії 0,1; 0,5 та 5 мМ хлориду кадмію протягом 2 та 12 годин: а – ДТ – рослини дикого типу (*Columbia 0*), б – КО-*Cat2* – мутантні рослини, ІР – інтактні рослини; \*\* – різниця порівняно з контрольними рослинами (інкубація на середовищі без хлориду кадмію) достовірна ( $p < 0,05$ )

туації, коли активність САТ знижена. Для перевірки припущення про функціональну взаємозамінність САТ та АРХ було визначено активність АРХ у ДТ та КО-*Cat2*. Отримані дані показали, що активність АРХ у інтактних рослин КО-*Cat2* є лише незначно (приблизно на 5 %) вищою, ніж ДТ. Отже, за нормальних умов культивування рослин втрата активності САТ2 у мутантів не компенсується активацією АРХ.

Подальші дослідження показали, що накопичення іонів  $Cd^{2+}$  у тканинах листа по-різному впливає на активність АРХ у ДТ та КО-*Cat2*. Зокрема, за дії найвищої концентрації  $Cd^{2+}$  (5 мМ) протягом 2 год активність АРХ у ДТ зростала на 15 % порівняно з контрольною групою рослин, в той час як у КО-*Cat2*, навпаки, знижувалася на

19 %. При застосуванні для обробки рослин хлориду кадмію у концентрації 0,1 та 0,5 мМ статистично достовірних змін активності АРХ не спостерігали (рис. 3).

В умовах 12-годинного стресу зміни активності АРХ у рослин ДТ також виявлено лише за дії 5 мМ хлориду кадмію, який зумовлював зниження активності АРХ на 11 %. У рослин КО-*Cat2* зниження активності АРХ на 12 % виявляли вже за дії 0,5 мМ хлориду кадмію, а при використанні концентрації 5 мМ вона знижується на 34 %.

Отже, за швидкого надходження у рослину іони  $Cd^{2+}$  у високій концентрації викликають у рослин ДТ зростання активності АРХ через 2 год після початку стресової обробки та зменшення її активності при



збільшенні часу обробки до 12 год. У КО-*Cat2* падиння активності спостерігається вже за дії 2-годинного стресу і посилюється із збільшенням тривалості обробки.

Встановлено, що у багатьох рослин за дії іонів  $Cd^{2+}$  активність АРХ спочатку зростає, але при подальшому збільшенні концентрації токсиканту та часу обробки падає [20, 26–28]. Отримані нами дані щодо впливу іонів  $Cd^{2+}$  на рослини ДТ цілком узгоджуються з такою картиною.

Інактивацію АРХ можна пояснити тим, що іони  $Cd^{2+}$  можуть безпосередньо взаємодіяти з білками та спричиняти їхню денатурацію. Крім того, в присутності іонів  $Cd^{2+}$  у клітині зростає рівень АФК, які в свою чергу спричиняють оксидативне пошкодження білків [14, 16, 26]. Відповідно, сильнішу інактивацію АРХ у рослин-мутантів слід розглядати як вказівку на те, що порушення окисно-відновного балансу за дії іонів  $Cd^{2+}$  у КО-*Cat2* є сильнішими, ніж ДТ.

## Висновки

У цілому отримані результати свідчать, що у дослідженої мутантної лінії *A. thaliana* відсутність ізоформи CAT2 за нормальних умов культивування рослин частково компенсується активацією ізоформи CAT3. На противагу цьому АРХ не відіграє суттєвої ролі у компенсації відсутності CAT2 як за нормальних умов, так і за дії іонів  $Cd^{2+}$ . У КО-*Cat2* порівняно з рослинами ДТ інактивацію АРХ за дії  $Cd^{2+}$  спостерігають при нижчих дозах токсиканту, і вона є більш вираженою.

## Перелік літератури

1. *The Arabidopsis Genome Initiative*. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* // Nature. – 2008. Vol. 408. – P. 796–815.
2. Frugoli J.A., Zhong H.H., Nuccio M.L., McCourt P., McPeck M. A., Thomas T.L., McClung C.R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidop-*

- sis thaliana* (L.) Heynh. // Plant Physiol. – 1996. – Vol. 112. – P. 327–336.
3. Tongolli M., Penel C., Greppin H., Simon P. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana* // Gene. – 2002. – Vol. 288. – P. 129 – 138.
4. Panchuk I., Volkov R., 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.
5. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. Reactive oxygen gene network of plants // Trends Plant Sci. – 2004. – Vol. 9. – P. 490–498.
6. Luna C., Pastori G. Drought controls on  $H_2O_2$  accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat // J. Exp. Bot. – 2005. – Vol. 56. – P. 417–423.
7. Scandalios J. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses // Braz. J. Med. Biol. Research – 2005. – Vol. 38. – P. 995–1014.
8. Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux F.M., Schöffl F. Heat stress-induced  $H_2O_2$  is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* // Plant. Mol. Biol. – 2006. – Vol. 61. – P. 733–746.
9. Panchuk I., Pyrizhok R., Volkov R. Engineering of new plants cultivars with improved abiotic stress tolerance // Ann. Suceava Univ. – 2007. – Vol. 6, – P. 25–35.
10. Orendi G. Expression von Katalasen waehrend der Blattseneszens und unter verschiedenen Stressbedingungen in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Dissertation Verlag Grauer. – 2001. – 135 S.
11. Zimmermann P, Heinlein C, Orendi G, Zentgraf U. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh // Plant Cell Environ. – 2006. – Vol. 29. – P. 1049–1060.
12. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // Annu. Rev. Plant. Biol. – 2004. – Vol. 55. – P. 373–399.
13. Walley J.W., Dehesh K. Molecular mechanisms regulating rapid stress signaling networks in *Arabidopsis* // J. Integrat. Plant Biol. – 2010. – Vol. 52. – P.354–359.
14. Cho U., Seo N. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation // Plant Sci. – 2004. – Vol. 168. – P. 113–120.
15. Benavides M.P., Gallego S.M., Tomaro M.L. Cadmium toxicity in plants // Plant Physiol. – 2005. – Vol. 17. – P. 21–34.
16. Romero-Puertas M.C., Palma J.M., Gomez M., Sandalio L.M. Cadmium causes the oxidative

- modification of proteins in pea plants // Plant, Cell Environ. – 2002. – Vol. 25. – P. 677–686.
17. Romero-Puertas M.C., Palma J.M., Gomez M., Sandalio L.M. Cadmium-induced subcellular accumulation of  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  in pea leaves // Plant, Cell Environ. – 2004. – Vol. 27. – P. 1122–1134.
  18. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях – М.: Мир, 1989. – 439 с.
  19. Рогозинский М.С., Шелифост А.Е., Костышин С.С., Волков Р.А. Действие ионов тяжелых металлов на растения в культуре *in vitro* // Физиол. биохим. культ. растений – 1998. – Т. 30. – С. 465–471.
  20. Dixit V., Pandey V., Shyam R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) // J. Exp. Bot. – 2001. – Vol. 52. – P. 1101–1109.
  21. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analyt. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
  22. Долиба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Метод визначення каталазної активності у рослинному матеріалі // Физиол. биохим. культ. растений. – 2010. – Vol. 42. – С. 497–503.
  23. Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. узов. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
  24. Azpilicueta C.E., Pena L.B., Tomaro M.L., Gallego S.M. Modifications in catalase activity and expression in developing sunflower seedlings under cadmium stress // Redox Report. – 2008. – Vol. 13. – P. 40–46.
  25. Долиба І.М., Кузь І.В., Панчук І.І. Вплив іонів кадмію на активність каталази *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh // Біол. системи – 2010. – Т. 2. – С. 22–26.
  26. Schuetzenduebel A., Schwanz P., Teichmann T., Gross K. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots Pine roots // Plant Physiol. – 2001. – Vol. 127. – P. 887–898.
  27. Paradiso A., Berardino R., de Pinto M.C., di Toppi L.S., Storelli M.M., Tommasi F., De Gara L. Increase in ascorbate–glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants // Plant Cell Physiol. – 2008. – Vol. 49. – P. 362–374.
  28. Shi G., Liu C., Cai Q., Liu Q., Hou C. Cadmium accumulation and tolerance of two safflower cultivars in relation to photosynthesis and antioxidative enzyme // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 2010. – Vol. 85. – P.256–263.

Представлено О.М. Тищенко  
Надійшла 17. 10.2011

АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ И АСКОРБАТ ПЕРОКСИДАЗЫ У *CAT2* НОКАУТНОГО МУТАНТА *ARABIDOPSIS THALIANA* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ КАДМИЯ

И.Н. Долиба, Р.А. Волков, И.И. Панчук

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

Стрессовые белки растений, как правило, представлены несколькими изоформами, которые кодируются соответствующими членами мультигенного семейства. До сих пор часто остается неизвестным, в каких случаях изоформы обладают подобными или, наоборот, специфическими клеточными функциями. Для проверки предположения, что отсутствие изоформы каталазы *CAT2* у нокаутного мутанта по гену *Cat2* растений *Arabidopsis thaliana* может быть компенсировано активацией других изоформ каталазы или аскорбат пероксидазы (APX), была оценена активность этих ферментов при нормальных условиях и под воздействием стресса, вызванного ионами кадмия. Было установлено, что активность изоформы *CAT3* значительно возростала в листьях нокаутного мутанта по гену *Cat2*. Тем не менее, общая активность каталазы у мутантных растений была снижена и составляла 58 % от уровня активности у растений дикого типа. В отличие от этого, активность APX лишь незначительно возростала у мутантов. Это свидетельствует о том, что в условиях эксперимента APX не участвует в компенсации отсутствия изоформы *CAT2*. Обработка листьев 5 мМ хлоридом кадмия приводила к инактивации APX. Этот эффект был лучше выражен у мутантных растений, указывая на то, что оксидативный стресс, индуцированный кадмием, приводит к более сильным повреждениям белков у мутантов с пониженной каталазной активностью по сравнению с растениями дикого типа.

*Ключевые слова:* *Arabidopsis thaliana*, каталаза, аскорбат пероксидаза, перекись водорода, кадмий, оксидативный стресс, мультигенные семейства, молекулярная избыточность, нокаутные мутанты.



ACTIVITY OF CATALASE AND ASCORBATE PEROXIDASE IN *CAT2* KNOCK-OUT MUTANT OF *ARABIDOPSIS THALIANA* UPON CADMIUM STRESS

I.M. Doliba, 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

Stress plant proteins are commonly represented by several isoforms encoded by respective members of a multigene family. To date it often remains unclear if the isoforms have similar or, alternatively, specific cellular functions. In order to check the possibility that the lack of catalase isoenzyme *CAT2* in *Cat2* knock-out mutant of *Arabidopsis thaliana* can be compensated by activation of other isoenzymes of *CAT* or ascorbate peroxidase (*APX*), activities of these

enzymes were evaluated in normal conditions and upon cadmium stress. *CAT3* isoform was found to increase significantly in leaves of *Cat2* knock-out mutant. However, the total activity of *CAT* in the mutant appeared to be diminished amounting to 58% of the activity level in wild type plants. In contrast, activity of *APX* increased only slightly in the mutant thus indicating that *APX* is not involved in compensation of *CAT2* deficiency upon conditions tested. Treatment of leaves with 5 mM cadmium chloride led to *APX* inactivation. This effect was better pronounced in the mutant plants indicating that the cadmium-mediated oxidative stress results in stronger damage of proteins in the mutants showing lesser activity as compared with wild type plants.

*Key words:* *Arabidopsis thaliana*, catalase, ascorbate peroxidase, hydrogen peroxide, cadmium, oxidative stress, multigene families, molecular redundancy, knock-out mutants.