

ВПЛИВ САХАРОЗИ ТА ГЛЮКОЗИ НА ОКИСНУ МОДИФІКАЦІЮ БІЛКІВ ЗА ДІЇ ТЕПЛООВОГО СТРЕСУ У НОКАУТНОГО МУТАНТУ *CAT2CAT3 ARABIDOPSIS THALIANA*

І. М. БУЗДУГА, Т. С. ТКАЧУК, І. І. ПАНЧУК

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

Одним із факторів, що негативно впливає на рослини є підвищена температура. Зокрема, за дії теплового стресу у рослинній клітині зростає продукція активних форм кисню (АФК), що призводить до розвитку оксидативного стресу. Утворення карбонільних груп (КГ) у білках є маркером оксидативного пошкодження рослинної клітини. У рослин існує система захисту, до якої належать розчинні вуглеводи такі як сахароза та глюкоза та антиоксидантні ферменти, зокрема каталаза. Вуглеводи володіють протекторними механізмами захисту та здатні активувати різні сигнальні шляхи, що в свою чергу зумовлює зміни в експресії генів. Не зважаючи на наявні в літературі дані, відомостей щодо впливу сахарози та глюкози на процеси окисної модифікації білків за дії теплового стресу недостатньо. Метою нашої роботи було дослідження ролі розчинних вуглеводів (сахарози та глюкози) на вміст КГ у *cat2cat3* нокаутних рослин *A. thaliana* за дії теплового стресу.

Для дослідження використовували 7-тижневі рослини *Arabidopsis thaliana* дикого типу та нокаутної *cat2cat3* лінії, в якій відсутня експресія двох генів каталази - *cat2* та *cat3*. Рослини вирощували умовах 16-годинного світлового дня за температури +20°C та освітленості 2,5 кЛк. Теплову обробку проводили на водяній бані в скляних колбах, в які попередньо вносили по 15-20 листків та інкубували в 1 мМ калій-фосфатному буфері без вуглеводів та із вмістом сахарози і глюкози у кінцевій концентрації 1 % протягом 2 і 4 годин за температури +37°C та +44°C. Вміст КГ та загального білку визначали спектрофотометрично.

Показано, що інтактні нокаутні *cat2cat3* рослини характеризуються більшим вмістом КГ, що свідчить про хронічний оксидативний стрес. Додавання екзогенних сахарози або глюкози у інкубаційний буфер мало протекторну дію за 4-годинного стресу. Утворення КГ у ДТ знижувалось за дії +37°C та +44°C, в той час як у *cat2cat3* лінії лише за дії помірного (+37°C) теплового стресу. За +44°C у нокаутного мутанту відбувається виснаження альтернативних шляхів захисту.

Ключові слова: сахароза, глюкоза, карбонільні групи білків, *cat2cat3* нокаутні рослини, *Arabidopsis thaliana*, тепловий стрес.

Вступ. Висока температура є стресовим фактором абіотичної природи, який викликає різноманітні, і часто негативні зміни у рослин (Lohani et al., 2020). Зокрема, відомо, що тепловий стрес викликає підвищення проникності біомембран, зростання в'язкості цитоплазми, порушення процесів поглинання і транспорту води, гальмування процесу фотосинтезу (Hu et al., 2020) та інактивацію дихання. В результаті настає порушення цілісності мембран, що разом із активацією альтернативного шляху дихання посилює процеси деструкції в клітині (Niu and Xiang, 2018).

Тривала дія або дія дуже високої температури викликає значне зростання концентрації активних форм кисню (АФК) і як, наслідок, розвиток оксидативного стресу в клітині (Choudhury et al., 2017; Karoor et al., 2019). Дія АФК на залишки амінокислот викликає їх окисну модифікацію і призводить до утворення карбонільних груп (КГ) у їхніх бічних радикалах (Anjum et al., 2014; Møller et al., 2017). КГ з'являються вже на ранніх етапах стресу

свої відповіді та можуть слугувати ефективними маркерами оксидативного стресу (Aristizábal et al., 2019; Salas-Moreno et al., 2019).

У відповідь на підвищення рівня АФК активується антиоксидантна система клітинного захисту, яка представлена як ферментами, так і низькомолекулярними протекторними сполуками (Karoor et al., 2019; Nadarajah, 2020). До останніх належать розчинні вуглеводи, такі як сахароза та глюкоза (Huang et al., 2014).

Вуглеводи, крім того, що слугують транспортними, структурними та енергетичними молекулами також виконують роль сигнальних молекул за дії стресових чинників (Soares et al., 2018). Останнім часом стрес-протекторні функції розчинних вуглеводів пов'язують не лише з їх осморегуляторною і антиденатураційною дією, а й з яскраво вираженими антиоксидантними ефектами (Huang et al., 2014). Антиоксидантна дія вуглеводів може бути, як прямою, так і непрямою – пов'язана з

метаболічним регулюванням компонентів антиоксидантної системи (Soares et al., 2018).

Важливим представником ферментативної ланки захисту є каталаза (CAT), яка розщеплює пероксид водню до молекули води та кисню (Nadarajah, 2020). У більшості рослин CAT кодується невеликою родиною генів. Зокрема, відомо, що у рослин *A. thaliana* ідентифіковано три гени – *cat1*, *cat2*, *cat3*, що кодують три ізоформи CAT (Mhamdi et al., 2010). Найвища експресія генів *cat2* і *cat3* відбувається у листках, в той час як *cat1* експресується в коренях. Актуальним завданням сьогодення залишається дослідження ролі кожного гену *cat1* у розвитку клітинної відповіді рослин за дії теплового стресу. Зручним модельним об'єктом для виконання таких досліджень можуть слугувати нокаутні рослини. Відповідно, для досліджень ми обрали нокаутні рослини *A. thaliana* з відсутньою експресією двох генів каталази – *cat2* і *cat3*.

Відомо, що залежно від природи стресового фактору та тривалості його впливу, роль окремих компонентів антиоксидантної системи у клітинній відповіді може відрізнятись у різних видів рослин (Anjum et al., 2014; Soares et al., 2018). Тому, незважаючи на наявні дані про захисні властивості вуглеводів, все ще залишається до кінця недослідженим їх вплив на стійкість рослин в умовах теплового стресу. Метою нашої роботи було дослідження ролі сахарози та глюкози на вміст карбонільних груп у *cat2cat3* нокаутних рослин *A. thaliana* за дії теплового стресу.

Об'єкт та методи. Дослідження проводили на 7-тижневих рослинах *Arabidopsis thaliana* (L.) екотипу Columbia 0 (дикий тип, ДТ) та нокаутної *cat2cat3* мутантної лінії *Arabidopsis thaliana*. Нокаутна *cat2cat3* лінія містить інсерцію Т-ДНК у кодуючій ділянці генів каталази *Cat2* та *Cat3*, що призводить до повної втрати їх експресії. Вона була отримана шляхом схрещування ліній *cat2* (SALK 057998) та *cat3* (SALK 092911). Рослини вирощували в умовах 16-годинного світлового дня (у культивационній кімнаті, у ґрунті) за сталої температури + 20°C, вологості 70% та освітленості 2,5 кЛк.

Для проведення стресової обробки відбирали по 5-6 добре розвинених листків із середньої частини розетки; наймолодші та найстарші листки не використовували. Теплову обробку проводили на водяній бані в конічних скляних колбах об'ємом 100 мл, в які вносили по 15-20 листків та поміщали їх в інкубаційний буфер (1 мМ калій-фосфат; рН 6,0) або в інкубаційний буфер із додаванням сахарози або глюкози до кінцевої концентрації 1 %. Обробку здійснювали в темряві протягом 2 та 4 годин за температури + 37°C та + 44°C.

Контролем слугували рослини, листки яких інкубувалися у буфері без вуглеводів за температури + 20°C. Як додатковий контроль використовували інтактні листки, які заморожували безпосередньо після відокремлення від рослини. По завершенню стресової обробки рослинний матеріал заморожували у рідкому азоті та зберігали у морозильній камері за -70°C для досліджень.

Концентрацію карбонільних груп (КГ) визначали за методикою, що описана в літературі (Levine et al., 1994; Xia et al., 2016). Метод ґрунтується на вимірюванні оптичної щільності динітрофенілгідрозону, який утворюється в результаті взаємодії 2,4-ДНФГ з карбонільними групами білків.

Для вимірювання концентрації КГ до гомогенізованої в рідкому азоті наважки рослин (0,2-0,25 г) додавали 800 мкл екстракційного буферу, що містив 50 мМ калій-фосфат та 0,5 мМ ЕДТА. Зразки інкубували з буфером впродовж 10 хв за температури + 4°C, після інкубації зразки центрифугували 10 хвилин при 10 000 об/хв.

Для приготування досліджуваних проб, у чисті епандорфи відбирали по 400 мкл супернатанту та додавали 800 мкл 10 мМ динітрофенілгідрозину, розчиненого у 2Н концентрованої соляної кислоти. Контрольний зразок містив 400 мкл екстракту та 800 мкл 2Н соляної кислоти. Усі зразки інкубувалися впродовж однієї години в темряві за температури + 20°C.

Після проходження часу інкубації в усі зразки додавали по 800 мкл 40% ТХО та обережно перемішували. Проби центрифугували 15 хв при 10 000 об/хв. Отриманий осад промивали 1 мл суміші 96% етанол-етилацетат у співвідношенні 1:1 та центрифугували 10 хв при 11 000 об/хв. Останню дію проводили тричі. Очищений осад витримували 20 хв за температури + 20°C. До осаду додавали 1 мл 6М гуанідин-НСІ. Інкубацію зразків проводили в темряві впродовж 30 хв до повного розчинення осаду.

Вимірювання оптичної щільності зразків проводили на спектрофотометрі СФ-46 за довжини хвилі 370 нм. Вміст карбонільних груп перераховували на концентрацію білку та виражали у нмоль/мг білка.

Кількість білку визначали спектрофотометрично за методом Бредфорда (Bradford, 1986). Кількість білку в екстракті визначали за допомогою калібрувального графіка, побудованого зі стандартним розчином білку. Як стандарт, використовували бичачий сироватковий альбумін.

Кожний експеримент виконувався у чотирьох біологічних та трьох аналітичних повторностях. Статистичну обробку даних досліджень проводили у програмі *Microsoft Excel*. Порівняння середніх арифметичних даних і визначення достовірної

різниці між ними проводили з використанням двовибіркового t-критерію для залежних вибірок (Лакин, 1990).

Результати та їх обговорення. У результаті проведених досліджень було виявлено (рис. 1), що у інтактних *cat2cat3* рослин *Arabidopsis thaliana* вміст КГ був на 32% вищий, ніж у інтактних рослин ДТ. Такий ефект, може бути зумовлений відсутністю двох ізоформ САТ у нокаутних *cat2cat3* рослин та метаболічними перебудовами, що призводять до посилення процесів карбонілювання білків за нестресових умов. Раніше нами було

показано, що у *cat2cat3* активність САТ складає 17% від активності ферменту у ДТ (Буздуга та ін., 2018). Дія двогодинного теплового стресу за температури +37°C у нокаутних *cat2cat3* рослин *Arabidopsis thaliana* викликала зростання вмісту КГ на 17% у буфері без вуглеводів (рис. 1Б). Присутність в інкубаційному буфері 1% глюкози та сахарози зумовлювала протекторний ефект на рослинну клітину, значення КГ наближались до контрольних. У рослин ДТ двогодинний тепловий стрес, незалежно від складу інкубаційного буферу, не викликав окисної модифікації білків (рис. 1А).

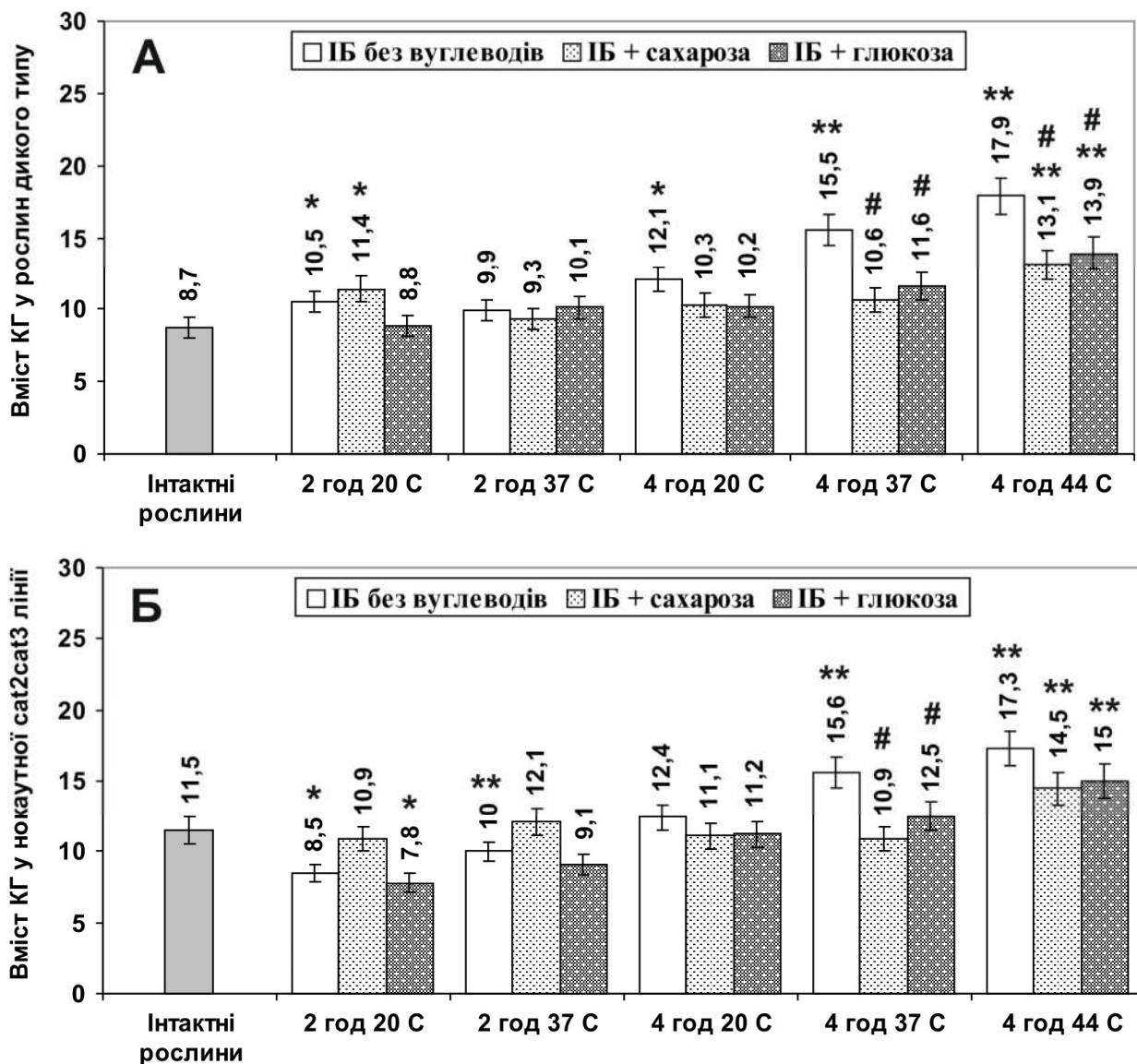


Рис. 1. Вміст КГ білків у листках рослин *Arabidopsis thaliana* в інкубаційному буфері різного складу за дії теплового стресу. А – у рослин ДТ; Б – нокаутної *cat2cat3* лінії.

Fig. 1. The content of carbonyl groups proteins in the leaves of *Arabidopsis thaliana* plants in incubation buffer of different composition upon heat stress. A - WT plants; B - knockout *cat2cat3* line.

Примітка. ІБ – інкубаційний буфер; * - різниця між інтактними та контрольними рослинами достовірна ($p < 0,05$); ** - різниця між контрольними та стресованими рослинами достовірна ($p < 0,05$); # - різниця між рослинами у інкубаційному буфері без вуглеводів та із додаванням сахарози або глюкози достовірна ($p < 0,05$).

Note. * - difference compared to intact plants is significant ($p < 0,05$); ** - difference compared to control plants is significant ($p < 0,05$); # - difference compared to incubation buffer without carbohydrates is significant ($p < 0,05$).

Збільшення тривалості помірного теплового стресу до 4 години призводило до зростання вмісту КГ (Рис. 1А, Б) у листках обох досліджуваних ліній рослин, що інкубувались у калій-фосфатному буфері без вуглеводів. У рослин ДТ спостерігалось збільшення КГ на 28%, у нокаутних *cat2cat3* мутантів – на 26%, порівняно з контролем. Присутність сахарози та глюкози в інкубаційному буфері у обох досліджуваних лініях сприяло зниженню вмісту КГ, значення наближались до контрольних. Відповідно, можна припустити, що наявність вуглеводів в інкубаційному буфері підвищує протекторні можливості рослин за даних умов помірної теплової стресової обробки.

Проведення жорсткої теплової обробки за +44°C протягом 4 години в інкубаційному буфері без сахарози та глюкози викликало зростання концентрації КГ у листках обох ліній рослин арабідопсису на 48% у ДТ і 40% у *cat2cat3*. Додавання вуглеводів до інкубаційного буферу призводило до менш істотного зростання вмісту КГ – у ДТ на 27% та -36%, у мутантної лінії на 30% та 32%, порівняно з контролем. При цьому захисний ефект екзогенних вуглеводів був сильніший для рослин ДТ: різниця між інкубаційним буфером без вуглеводів та з сахарозою і глюкозою складала 27 та 21%, відповідно. Для мутантної лінії різниця становила 17%. Аналізуючи дані, можна припустити, що за жорстких стресових умов у *cat2cat3* відбувається виснаження резервів системи антиоксидантного захисту, тому рослина зазнає сильних окисних пошкоджень.

Необхідно відмітити, що культивування листків контрольної групи рослин ДТ у інкубаційному буфері різного складу за нестресової температури (+20°C) протягом 2 годин призводило до різних змін вмісту КГ, порівняно з листками інтактних рослин. Так, при інкубуванні листків рослин ДТ у буфері без вуглеводів та із сахарозою виявлено зростання вмісту КГ на 21% та 31%, відповідно. При додаванні 1% глюкози до буферу у листках рослин арабідопсису не було виявлено достовірних змін вмісту КГ, порівняно з листками інтактних рослин. Таке посилення окисної модифікації білків за кімнатної температури може бути пов'язано із тим, що обрізання листків та поміщення їх у буфер є стресовою ситуацією для рослинної клітини. Проте додавання глюкози справляло захисну дію, що може свідчити про те, що за даних умов глюкоза підтримує у нормі окисно-відновний баланс у клітині рослин ДТ.

У листках нокаутних *cat2cat3* рослин *A. thaliana* контрольної групи за умов 2-годинного інкубування за нестресової температури (+20°C) спостерігався інший характер змін. В цьому випадку, навпаки, виявлено зниження вмісту КГ на 27% та 32%, у інкубаційному буфері та у буфері із глюкозою,

відповідно, порівняно з інтактними рослинами. Таке зменшення карбонілування білків, а отже «покращення» ситуації у клітині можна пояснити тим, що у нокаутних рослин можуть бути активовані альтернативні шляхи захисту від оксидативного стресу. Ці альтернативні механізми включаються одразу при найменших порушеннях окисно-відновного балансу клітини.

Аналіз отриманих даних свідчить про те, що різниця між нокаутною лінією та рослинами ДТ, яка спостерігалась у інтактних рослин, у стресових умовах вирівнюється. Раніше нами була досліджена інша нокаутна *cat2*, у якої відсутня експресія лише однієї ізоформи каталази САТ2. (Руснак та ін., 2013). Для *cat2* спостерігалась аналогічна картина: у інтактних рослин вищий вміст КГ порівняно з ДТ, а в умовах стресу – однаковий. Такі ефекти можуть бути результатом того, що у нокаутних рослин на ранніх етапах дії стресового фактору вже працюють захисні механізми, оскільки в них відсутній антиоксидантний фермент. Ці механізми можуть відрізнятися від тих, що вмикаються у рослин ДТ.

В цілому у обох досліджуваних лініях рослин, як у рослин ДТ, так і у *cat2cat3*, при збільшенні часу та жорсткості стресової обробки відбувається зростання рівня КГ, що свідчить про інтенсифікацію оксидативних пошкоджень в клітині та поступове виснаження антиоксидантної системи за дії теплового стресу. Як було показано раніше (Буздуга та ін., 2018; Aristizábal et al., 2019; Sgobba et al., 2014) за дії жорсткого теплового стресу знижується експресія стресових генів (Panchuk et al., 2002) та активність антиоксидантних ферментів.

За дії 4-годинної теплової обробки при температурі +37°C сахароза і глюкоза справляли протекторний вплив на рослини обох ліній та зумовлювали підтримку окисно-відновного балансу в клітині. Протекторна роль сахарози та глюкози проявлялась також і за дії жорсткого (+44°C). В цьому випадку хоча і спостерігалось зростання вмісту КГ порівняно з контрольними рослинами, проте воно було менше ніж у рослин, що стресувались в інкубаційному буфері без вуглеводів. Раніше було показано, що екзогенна глюкоза регулює накопичення АФК та знижує процеси переокисного окислення ліпідів та підвищує експресію генів Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, САТ, GR. (Huang et al., 2014). Очевидно, що в нашому випадку за дії жорсткого стресу глюкоза та сахароза можуть зменшувати утворення АФК, що і призводить до зменшення окисної модифікації білків.

Висновки. Показано, що інтактні нокаутні *cat2cat3* рослини характеризуються більшим вмістом КГ, що свідчить про хронічний оксидативний стрес. За різних режимів стресової обробки не спостерігалось різниці між нокаутною лінією та рос-

линами ДТ. Додавання екзогенних сахарози або глюкози у інкубаційний буфер мало протекторну дію за 4-годинного стресу. Утворення КГ у ДТ знижувалось за дії +37 °C та +44°C, в той час як у *cat2cat3* лінії лише за дії помірного (+37°C) теплового стресу. За +44°C у нокаутного мутанту відбувається виснаження альтернативних шляхів захисту.

Список літератури:

1. Буздуга І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Метаболічна компенсація у мутантів *Arabidopsis thaliana* із втраченою активністю каталази // Цитология и генетика. – 2018. – Т. 52, № 1. – С. 41–51. doi:10.3103/s0095452718010036
2. Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. – М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
3. 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 Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2013. – Т. 11, № 2. – С. 260–266.
4. Anjum N.A., Sofo A., Scopa A., Roychoudhury A., Gill S.S., Iqbal M., Ahmad I. Lipids and proteins – major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants // Environ. Sci. Pollut. Research. – 2014. – Vol. 22, N. 6. – P. 4099–4121. doi:10.1007/s11356-014-3917-1
5. Aristizábal D., Rivas V., Cassab G.I., Lledías F. Heat stress reveals high molecular mass proteasomes in *Arabidopsis thaliana* suspension cells cultures // Plant Physiol. and Biochem. – 2019. – Vol. 140. – P. 78–87. doi: 10.1016/j.plaphy.2019.04.034
6. 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.
7. Choudhury F. K., Rivero R. M., Blumwald E., Mittler R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination // Plant J. – 2017. – Vol. 90, N. 5. – P. 856–867. doi: 10.1111/tpj.13299
8. Hu S., Ding Y., Zhu C. Sensitivity and responses of chloroplasts to heat stress in plants // Front. Plant Sci. – 2020. – Vol. 11. – P. 1–11. doi:10.3389/fpls.2020.00375
9. Huang Y.-W., Zhou Z.-Q., Yang H.-X., Wei C.-X., Wan Y.-Y., Wang X.-J., Bai J.-G. Glucose application protects chloroplast ultrastructure in heat-stressed cucumber leaves through modifying antioxidant enzyme activity // Biol. Plantarum. – 2014. – Vol. 59, N. 1. – P. 131–138. doi:10.1007/s10535-014-0470-1
10. Kapoor D., Singh S., Kumar V., Romero R., Prasad R., Singh J. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) // Plant Gene. – 2019. – Vol. 19. – P. 1–13. doi:10.1016/j.plgene.2019.100182
11. Levine R.L., Williams J., Stadtman E.R., Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. // Methods Enzymol. – 1994. – Vol. 233. – P. 346–357.
12. Lohani N., Singh M.B., Bhalla P.L. High temperature susceptibility of sexual reproduction in crop plants // J. Exp. Botany. – 2020. – Vol. 71, N. 2. – P. 555–568. doi:10.1093/jxb/erz426
13. 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, N. 15. – P. 4197–4220. doi: 10.1093/jxb/erq282
14. Møller I.M., Havelund J.F., Rogowska-Wrzesinska A. Protein carbonylation in plants. In: Protein carbonylation: principles, analysis, and biological implications, 1st ed. by Ros J. – John Wiley & Sons, Inc., 2017. – P. 321–339.
15. Nadarajah K.K. ROS Homeostasis in abiotic stress tolerance in plants // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – Vol. 21, N. 15. – P. 1–29. doi:10.3390/ijms21155208
16. Niu Y., Xiang Y. An overview of biomembrane functions in plant responses to high-temperature stress // Front. Plant Sci. – 2018. – Vol. 9. – P. 1–12. doi:10.3389/fpls.2018.00915
17. Panchuk I.I., Volkov R.A., Schöffl F. Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of APX in *Arabidopsis* // Plant Physiol. – 2002. – Vol. 129. – P. 838–853. doi: 10.1104/pp.001362
18. Salas-Moreno M., Contreras-Puentes N., Rodríguez-Cavallero E., Jorrín-Novo J., Marrugo-Negrete J., Méndez-Cuadro D. Protein carbonylation as a biomarker of heavy metal, Cd and Pb, damage in *Paspalum fasciculatum* Willd. ex Flüggé // Plants. – 2019. – Vol. 8. – P. 1–17. doi:10.3390/plants8110513
19. Sgobba A., Paradiso A., Dipierro S., De Gara L., de Pinto M.C. Changes in antioxidants are critical in determining cell responses to short- and long-term heat stress // Physiol. Plantarum. – 2014. – Vol. 153, N 1. – P. 68–78. doi:10.1111/ppl.12220
20. Soares C., Carvalho M.E.A., Azevedo R.A., Fidalgo F. Plants facing oxidative challenges - a little help from the antioxidant networks // Environ. Exp. Botany. – 2018. – Vol. 161. – P. 4–25. doi:10.1016/j.envexpbot.2018.12.009
21. Xia Q., El-Maarouf-Bouteau H., Bailly C., Meimoun P. Determination of protein carbonylation and proteasome activity in seeds // Plant Proteostasis. – 2016. – Vol. 1450. – P. 205–212. doi:10.1007/978-1-4939-3759-2_16

References:

1. Buzduga IM, Volkov RA, Panchuk II. Metabolic compensation in *Arabidopsis thaliana* catalase-deficient mutants. *Cytology and genetics*. 2018; 52(1): 41–51. doi: 10.3103/s0095452718010036
2. Lakyn GF. Biometrics: textbook for biol. special. Moscow: Vysshaya shkola; 1990.
3. Rusnak TO, Volkov RA, Panchuk II. Oxidative modification of proteins in *Arabidopsis thaliana* wild type and *KO-CAT2* knock-out mutant upon heat stress. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*. 2013; 11(2): 260–266.
4. Anjum NA, Sofo A, Scopa A et al. Lipids and proteins – major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. *Environ. Sci. Pollut. Research*. 2014; 22(6): 4099–4121. doi:10.1007/s11356-014-3917-1
5. Aristizábal D, Rivas V, Cassab GI, Lledías F. Heat stress reveals high molecular mass proteasomes in *Arabidopsis thaliana* suspension cells cultures. *Plant Physiol. and Biochem*. 2019; 140: 78–87. doi: 10.1016/j.plaphy.2019.04.034

6. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 1976; 72: 248–254.
7. Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J.* 2017; 90(5): 856–867. doi: 10.1111/tpj.13299
8. Hu S, Ding Y, Zhu C. Sensitivity and responses of chloroplasts to heat stress in plants. *Front. Plant Sci.* 2020; 11: 1–11. doi:10.3389/fpls.2020.00375
9. Huang YW, Zhou ZQ, Yang HX et al. Glucose application protects chloroplast ultrastructure in heat-stressed cucumber leaves through modifying antioxidant enzyme activity. *Biol. Plantarum.* 2014; 59(1): 131–138. doi:10.1007/s10535-014-0470-1
10. Kapoor D, Singh S, Kumar V et al. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene.* 2019; 19: 1–13. doi:10.1016/j.plgene.2019.100182
11. Levine RL, Williams J, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994; 233: 346–357.
12. Lohani N, Singh MB, Bhalla PL. High temperature susceptibility of sexual reproduction in crop plants. *J. Exp. Botany.* 2020; 71(2): 555–568. doi:10.1093/jxb/erz426
13. Mhamdi A, Queval G, Chaouch S. et al. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J. Exp. Bot.* 2010; 61(15): 4197–4220. doi: 10.1093/jxb/erq282
14. Møller IM, Havelund JF, Rogowska-Wrzesinska A. Protein carbonylation in plants. In: *Protein carbonylation: principles, analysis, and biological implications*, 1st ed. by Ros J.: John Wiley & Sons; 2017: 321–339.
15. Nadarajah KK. ROS Homeostasis in abiotic stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(15): 1–29. doi:10.3390/ijms21155208
16. Niu Y, Xiang Y. An overview of biomembrane functions in plant responses to high-temperature stress. *Front. Plant Sci.* 2018; 9: 1–12. doi:10.3389/fpls.2018.00915
17. Panchuk II, Volkov RA, Schöfl F. Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of APX in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2002; 129: 838–853. doi: 10.1104/pp.001362
18. Salas-Moreno M, Contreras-Puentes N, Rodríguez-Cavallo E. et al. Protein carbonylation as a biomarker of heavy metal, Cd and Pb, damage in *Paspalum fasciculatum* Willd. ex Flügge. *Plants.* 2019; 8: 1–17. doi:10.3390/plants8110513
19. Sgobba A, Paradiso A, Dipierro S. et al. Changes in antioxidants are critical in determining cell responses to short- and long-term heat stress. *Physiol. Plantarum.* 2014; 153(1): 68–78. doi:10.1111/ppl.12220
20. Soares C, Carvalho MEA, Azevedo RA, Fidalgo F. Plants facing oxidative challenges - a little help from the antioxidant networks. *Environ. Exp. Botany.* 2018; 161: 4–25. doi:10.1016/j.envexpbot.2018.12.009
21. Xia Q, El-Maarouf-Bouteau H, Bailly C, Meimoun P. Determination of protein carbonylation and proteasome activity in seeds. *Plant Proteostasis.* 2016; 1450: 205–212. doi:10.1007/978-1-4939-3759-2_16

EFFECT OF SUCROSE AND GLUCOSE ON OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS UPON HEAT STRESS IN *ARABIDOPSIS THALIANA* CAT2CAT3 KNOCKOUT MUTANT

I. M. Buzduga, T. S. Tkachuk, I. I. Panchuk

High temperature negatively affects the plants. In particular, under the heat stress the production of reactive oxygen species increases in the plant cell. It leads to the development of oxidative stress. The formation of carbonyl groups in proteins is a marker of oxidative damage of plant cells. Plants have a defense system that consists of soluble carbohydrates such as sucrose and glucose and antioxidant enzymes, including catalase. Carbohydrates have protective mechanisms and can activate different signaling pathways with following changes in gene expression. Despite the data available, information on the effects of sucrose and glucose on the oxidative modification of proteins under heat stress is insufficient. The aim of our work was to study the role of sucrose and glucose for the carbonyl groups content in cat2cat3 knockout plants of A. thaliana under heat stress. We used 7-week-old Arabidopsis thaliana plants of wild-type and knockout cat2cat3 line, which lacks the expression of two catalase genes – cat2 and cat3. Plants were grown under 16-hour light day at a temperature of + 20°C and an illumination of 2.5 kL. Heat treatment was performed on a water bath in glass flasks with 15–20 leaves which were incubated in 1 mm potassium phosphate buffer without carbohydrates and with addition of sucrose or glucose (1% final concentration) during 2 and 4 hours at the +37°C and +44°C. The content of carbonyl groups and total protein was determined photometrically. It has been shown that intact knockout cat2cat3 plants have a higher content of carbonyl groups, which indicates chronic oxidative stress. Addition of exogenous sucrose or glucose to the incubation buffer had a protective effect during 4 hours of stress. Carbonyl groups formation in wild type decreased under the +37°C and +44°C, while in the cat2cat3 line only under the moderate (+37°C) heat stress. In the knockout mutant alternative ways of defense are exhausted under +44°C.

Keywords: sucrose, glucose, carbonyl groups of proteins, cat2cat3 knockout plants, Arabidopsis thaliana, heat stress.

Отримано редколегією 12.08.2020