

## ВПЛИВ ІОНІВ МІДІ НА АКТИВНІСТЬ АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗИ У НОКАУТНІЙ ПО КАТАЛАЗІ 2 ЛІНІЇ *ARABIDOPSIS THALIANA*

І. М. БУЗДУГА, І. І. ПАНЧУК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, вул. Коцюбинського 2, м. Чернівці, 58012  
e-mail: irina.panchuk@gmail.com

Накопичення іонів міді посилює утворення активних форм кисню (АФК) в рослин, що в результаті призводить до окисного пошкодження клітинних мембран і білків. Ряд ферментів, в тому числі каталаза й пероксидази, беруть участь у захисті клітини від АФК. Досі залишається до кінця не з'ясовано, яким чином різні ферменти можуть функціонально замінювати один одного. Для того, щоб перевірити можливість того, що відсутність ізоформи каталази CAT2 у нокаут-мутанта *Arabidopsis thaliana* KO-Cat2 може бути компенсована за рахунок активації аскорбатпероксидази (APX), було досліджено активність цього ферменту за нормальних умов та за обробки іонами міді. Було встановлено, що в листках 5-тижневих мутантних рослин активність APX була лише незначно вищою, ніж у рослин дикого типу, вказуючи на те, що APX не залучена у компенсації втрати ізоформи CAT2 за оптимальних умов вирощування. Проте, інактивація APX за дії індукованого міддю окисидативного стресу була менш виражена у KO-Cat2 нокаут-мутанта, ніж у рослин дикого типу. Дані свідчать, що за дії стресу, викликаного іонами міді APX може лише частково забезпечувати компенсацію втрати CAT2 ізоформи в мутантних рослин.

**Ключові слова:** аскорбатпероксидаза, каталаза, пероксид водню, мідь, окисидативний стрес, метаболічна компенсація, нокаут-мутанти, *Arabidopsis thaliana*.

**Вступ.** Останнім часом особливу увагу серед несприятливих стресових факторів доквілля привертають важкі метали (ВМ) (Cuypers et al., 2009; Keunen et al., 2011). Переважна більшість ВМ у підвищених концентраціях є токсичними для рослин. Однак, деякі із ВМ у низьких концентраціях є необхідними для нормального функціонування рослинної клітини. До таких ВМ належить мідь (Cu), яка є кофактором багатьох оксидоредуктаз та бере участь у роботі електронно-транспортних ланцюгів, гормональній передачі сигналів у рослин (Yruela, 2009; Cuypers et al., 2011). В рослинах цей елемент знаходиться в хлоропластах і тісно пов'язаний з процесами фотосинтезу, бере участь у синтезі таких органічних сполук, як антоціаніни, залізорпорфірин та хлорофіл, а також стабілізує та захищає молекули хлорофілу від пошкоджень (Verbruggen et al., 2009). Проте, при накопиченні в тканинах рослин вище оптимального рівня мідь може справляти негативні ефекти на рослини, зокрема, викликати пригнічення росту та розвитку, процесів фотосинтезу і дихання (Smeets et al., 2009; Yruela, 2009). Це зокрема пов'язано з тим, що мідь є перехідним металом і збільшення її рівня може призводити до збільшення в рослинній клітині концентрації активних форм кисню (АФК), що в свою чергу призводять до розвитку оксидативного стресу в клітині (Ahmad et al., 2008; Sharma et al., 2008; Gill, 2010).

Представником АФК є пероксид водню ( $H_2O_2$ ), який з однієї сторони, є токсичним агентом, а з іншої – виступає у ролі сигнальної молекули (Volkov et al., 2006; Ahmad et al., 2008; Galvez-Valdivieso et al., 2010; Cheeseman, 2011). Відповідно, регуляція його концентрації має важливе значення для захисту клітини та розвитку стресової реакції. В рослинній клітині детоксикацію надлишку пероксиду водню здійснюють ферменти – каталаза (CAT) та група пероксидаз, серед яких важливе місце посідає аскорбатпероксидаза (APX; E.C. 1.11.1.11) (Panchuk et al., 2002; Gill et al., 2010). У рослин CAT та APX кодуються мультигенними родинами (Frugoli, 1996; Jespersen et al., 1997; Panchuk et al., 2002). Зокрема, в *A. thaliana* розрізняють 8 генів, які кодують APX (Jespersen et al., 1997; Panchuk et al., 2002; Panchuk et al., 2005) та три гени, що кодують CAT (Frugoli et al., 1996).

Серед трьох ізоформ каталази найбільш експресованою є CAT2, на долю якої припадає 70% загальної каталазної активності у тканинах мезофілу листків (Orendi, 2001).

В літературі існують чисельні дані, що підтверджують важливу роль APX та CAT у захисті рослинної клітини за дії теплового, сольового та світлового стресів (Mullineaux et al., 2000; Panchuk et al., 2002; Sofu et al., 2005). Проте, результати досліджень стосовно вивчення впливу міді на активність ферментів антиоксидантного захисту досить неоднозначні. З одного боку,

надлишок іонів  $\text{Cu}^{2+}$  спричиняє оксидативний стрес, що викликає зростання активності антиоксидантних ферментів. А з іншого – їх інгібування може бути пов'язане з негативним впливом надлишку міді на синтез білків (Smeets et al., 2009; Cuypers et al., 2011).

Здатність окремих білків або їх ізоформ замінювати один одного протягом розвитку стресової відповіді у рослин залишається дослідженою недостатньо. Зручною моделлю для вивчення такої функціональної спеціалізації та можливої взаємозамінності різних ферментів є мутантні форми із порушеною експресією певних генів. Відповідно, ми зосередили увагу на вивченні змін аскорбатпероксидазної активності у нокаутних КО-*Cat2* рослин *Arabidopsis thaliana* з відсутньою експресією ізоформи каталази CAT2 у відповідь на гострий стрес, викликаний швидким накопиченням порівняно високих концентрацій іонів міді у листках.

**Матеріали та методи.** Для дослідження впливу іонів міді використовували 4,5-5-тижневі рослини *A. thaliana* (L.) Heynh. гомозиготної лінії КО-*Cat2*, яка є нокаут мутантом по гену *Cat2* (At1g20620). Рослини вирощували в ґрунті в культивачній кімнаті за температури  $20^{\circ}\text{C}$ , освітлені  $2,5 \text{ кЛк}$  в умовах 16-годинного світлового дня.

Для дослідження первинних реакцій рослиної клітини у відповідь на дію підвищених концентрацій іонів  $\text{Cu}^{2+}$  обробку рослини проводили за умов, що забезпечують швидке надходження іонів міді до тканин листків. Відомо, що коренева система володіє бар'єрною функцією і перешкоджає надходженню іонів  $\text{VM}$  у пагони (Рогозинський та ін., 1998). Тому, для проведення стресової обробки надземну частину рослин відокремлювали від кореневої системи і місце зрізу занурювали в рідке поживне середовище Мурасіге-Скуга ( $0,5 \times \text{MS}$  – Murashige et al., 1962), що додатково містило хлорид міді у концентраціях  $0,1$ ;  $0,5$  та  $5 \text{ мМ}$ . Враховуючи, що за дії токсиканта може змінюватись кількість  $\text{H}_2\text{O}_2$ , який генерується під час транспорту електронів у хлоропластах та при фотодиханні, стресову обробку проводили у темряві за температури  $20^{\circ}\text{C}$  протягом 2 (короткотривалий стрес) та 12 (довготривалий стрес) годин. Як показує досвід нашої лабораторії, 2 години відповідають мінімальному часу, за якого слід очікувати накопичення токсиканта та розвитку стресової відповіді у листках.

Контрольні рослини інкубували на середовищі без додавання хлориду міді. Як додатковий контроль використовували інтактні рослини, які заморожували безпосередньо після зрізання.

Екстракцію нативних білків проводили в буфері, що містив  $50 \text{ мМ}$  фосфат натрію ( $\text{pH}=7,0$ ),  $0,25 \text{ мМ}$  EDTA,  $20\%$  гліцерол,  $0,5 \text{ мМ}$  аскорбат

та  $2\%$  полівінілпіролідон. Кількість білку в екстракті визначали спектрофотометрично за методом Бредфорда (Bradford, 1976).

Активність APX визначали спектрофотометрично шляхом вимірювання зміни оптичної густини проби за  $290 \text{ нм}$  (Amako et al., 1994; Panchuk et al., 2002). Реакційна проба містила  $25 \text{ мкл}$  білкового екстракту та  $975 \text{ мкл}$  реакційної суміші, що складалася з  $25 \text{ мМ}$  Na-фосфату ( $\text{pH} 7,0$ ),  $0,1 \text{ мМ}$  EDTA,  $2,5 \text{ мМ}$  аскорбату та  $1 \text{ мМ}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Активність ферменту виражали в мкмоль аскорбату, окисленого за  $1 \text{ хв}$  у перерахунку на  $1 \text{ мг}$  білка.

Експеримент виконували у п'яти біологічних та трьох хімічних повторностях. Статистичну достовірність отриманих даних оцінювали з використанням двовибіркового t-критерію для залежних вибірок (Лакин, 1990).

**Результати та обговорення.** Для перевірки припущення про можливу функціональну взаємозамінність CAT та APX в умовах стресу, викликаного іонами міді, було визначено активність APX у нокаутних рослин арабідопсису лінії КО-*Cat2*. У наших попередніх дослідженнях було встановлено, що у листках рослин цієї лінії каталазна активність становить лише  $58 \%$  від активності CAT у рослин дикого типу (Долиба та ін., 2011). Проте, за оптимальних умов культивування ці рослини не мають жодних візуальних порушень, які могли б свідчити про хронічний оксидативний стрес. Це вказує на активацію альтернативних метаболічних шляхів, що дозволяє компенсувати втрату активності ізоформи каталази CAT2.

В результаті проведених досліджень було виявлено (Рис. 1), що активність APX у інтактних 5 тижневих рослин КО-*Cat2* практично не відрізняється від такої у досліджених нами раніше рослин ДТ (Долиба та ін., 2012). Отже, за оптимальних умов культивування втрата активності CAT2 у нокаутних рослин не компенсується активацією APX. Імовірно, в цьому випадку метаболічна компенсація дефіциту CAT2 досягається іншим шляхом.

Подальші дослідження показали, що накопичення іонів  $\text{Cu}^{2+}$  у тканинах листків нокаутних рослин протягом 2 годин не викликало достовірних змін активності APX при використанні для обробки хлориду міді у концентрації  $0,1 \text{ мМ}$  та  $0,5 \text{ мМ}$  (див. рис. 1.). В той же час збільшення концентрації хлориду міді до  $5 \text{ мМ}$  призводило до зниження активності APX на  $49 \%$  порівняно з контролем. Раніше в нашій лабораторії було виявлено, що у рослин ДТ спостерігалось достовірне зниження активності APX за обробки хлоридом міді у концентрації  $0,5 \text{ мМ}$  та  $5 \text{ мМ}$ , відповідно, на  $24$  та  $64\%$  порівняно з контрольними зна-

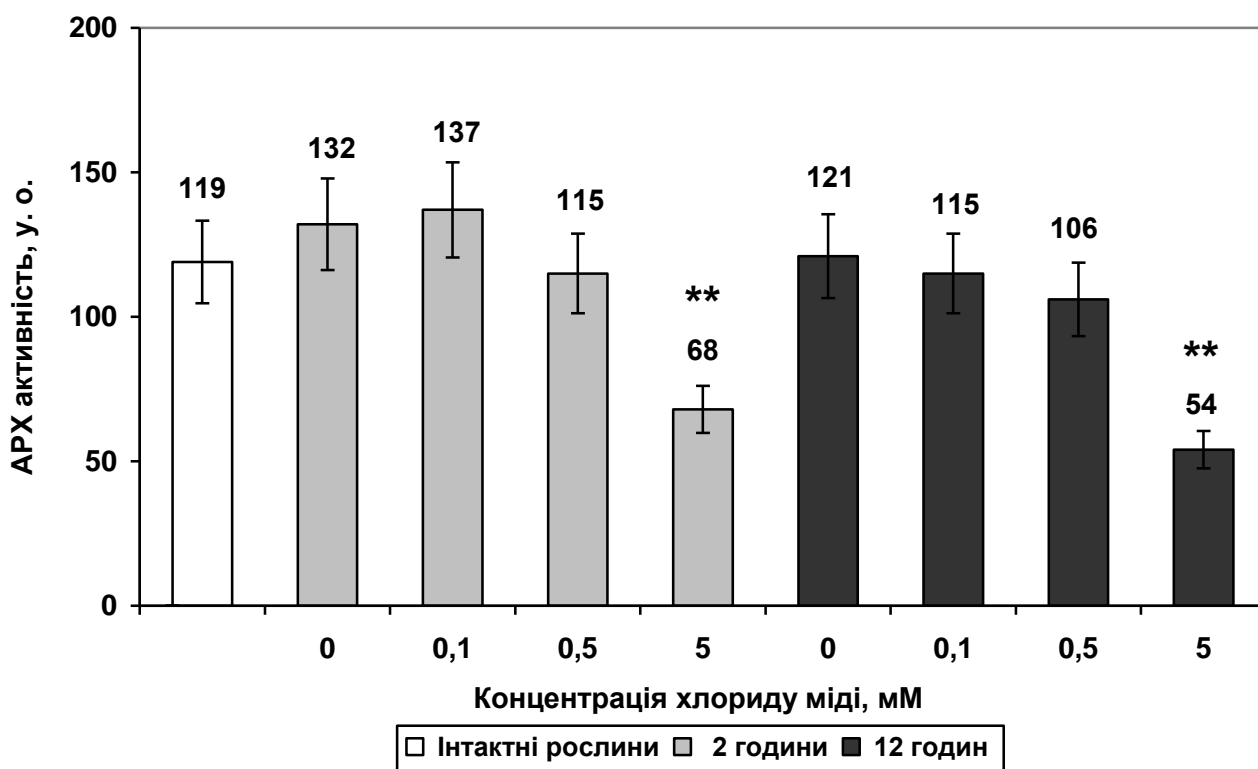
ченнями (Доліба та ін., 2012). Отже, однакові концентрації токсиканта призводять до меншого зниження активності АРХ у нокаутних рослин.

При збільшенні тривалості стресової обробки до 12 годин (як і у випадку 2 годинного стресу) лише за дії найвищої концентрації 5 мМ у мутантній лінії *KO-Cat2* спостерігалось зниження активності АРХ на 56%. Більш низькі концентрації – 0,1 та 0,5 мМ не призводили до статистично достовірних змін. На відміну від мутантної лінії у рослин ДТ зниження активності ферменту на 33 % порівняно з рослинами контрольної групи спостерігалось вже за дії 0,5 мМ  $\text{Cu}^{2+}$  протягом 12 годин (Доліба та ін., 2012). За впливу 5 мМ іонів  $\text{Cu}^{2+}$  активність АРХ у ДТ знижувалась на 56%.

Наші попередні дослідження показали, що за дії хлориду міді у рослин ДТ та лінії *KO-Cat2* відбувається суттєве зростання вмісту тіобарбітуратактивних продуктів (ТБКАП), що є показником посилення процесів перекисного окислення ліпідів (Доліба та ін., 2012). Найбільший вміст ТБКАП у листках спостерігався за використання

найвищої концентрації хлориду міді у 5 мМ. При цьому рівень ПОЛ у нокаутних рослин виявився нижче, ніж у ДТ, що дозволило нам висунути гіпотезу про активацію у мутанта альтернативних захисних механізмів. Наші нові дані стосовно підвищеної активності АРХ у нокаутного мутанта свідчать, що за умов стресу, викликаного іонами  $\text{Cu}^{2+}$  активація цього ферменту частково компенсує втрату ізоформи CAT2 у нокаутних рослин і, відповідно, є частиною згаданих вище альтернативних захисних механізмів.

Відмітимо також, що культивування рослини арабідопсису ДТ протягом 24 годин в присутності 2 та 5 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  призводить до зниження активності АРХ у коренях приблизно в 2-2,5 рази. В той же час, у листках рослин *A. thaliana* активність АРХ зростала на 30-50% залежно від концентрації металу у середовищі (Cuipers et al., 2011). Порівняння цих спостережень із нашими даними показує, що для повного розвитку захисної реакції, зокрема для активації АРХ в умовах стресу потрібен час більший, ніж 12 годин.



**Рис. 1.** Аскорбат пероксидазна активність (в умовних одиницях, у.о.) у листках нокаутних *KO-Cat2* рослин *Arabidopsis thaliana* за дії 0,1; 0,5 та 5 мМ хлориду міді протягом 2 та 12 годин.

Примітка: за 100 у.о. приймали активність АРХ у листках інтактних рослин дикого типу; \*\* - різниця у порівнянні з контрольними рослинами достовірна ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 1.** Ascorbate peroxidase activity (relative units, r.u.) in leaves of *KO-Cat2* knock-out mutant *Arabidopsis thaliana* after 0,1; 0,5 та 5 мМ copper chloride exposure during 2 and 12 hours.

Note: APX activity of wild type intact leaves was taken as 100 r.u. \*\* - significant difference with control plants.

Наші попередні дослідження впливу іонів  $Cd^{2+}$  на рослини *KO-Cat2* (Доліба та ін., 2011) також показали, що за дії низьких концентрацій (0,1 та 0,5 мМ) хлориду кадмію активність АРХ у нокаутів *KO-Cat2* та ДТ не змінювалась та наближалась до контрольних значень. Найвища з використаних концентрацій – 5 мМ викликала, аналогічно до дії іонів міді, інактивацію АРХ у листках. Проте, на відміну від іонів міді, достовірне зниження активності спостерігалось лише у нокаутної лінії. Слід зазначити, що зниження активності АРХ за дії 5 мМ  $Cd^{2+}$  було не таким істотним (22 %), як під впливом іонів  $Cu^{2+}$  за даної концентрації. Таким чином, хлорид міді сильніше пригнічує активність АРХ у *A. thaliana*, ніж хлорид кадмію. Ймовірним поясненням цього може бути здатність іонів міді каталізувати утворення високо токсичних гідроксил радикалів ( $OH^{\cdot}$ ) у реакціях Haber-Weiss, які пошкоджують білки, ліпіди та ДНК (Ahmad et al., 2008; Cuypers et al., 2009; Yruela, 2009; Keunen et al., 2011).

**Висновки.** В цілому отримані результати свідчать, що за оптимальних умов культивування у тканинах листків 5 тижневих нокаутних рослин арабідопсису із втраченою активністю ізоформи каталази CAT2 активність АРХ не відрізняється від такої у рослин ДТ. Проте, в умовах гострого стресу, викликаного швидким зростанням концентрації іонів  $Cu^{2+}$  у листках інактивація АРХ у нокаутної лінії є менш вираженою, ніж у рослин ДТ. Відповідно, за нормальних фізіологічних умов АРХ не відіграє суттєвої ролі у компенсації дефіциту CAT2 у мутантів, але може частково компенсувати її втрату за дії стресу, викликаного іонами міді.

**Подяки.** Автори висловлюють щирі подяки Др. Ульріке Центграф (Центр молекулярної біології рослин, м. Тюбінген, Німеччина) за надане нам насіння лінії *KO-Cat2*; а також проф. Р. А. Волкову (Чернівецький національний університет) за участь у обговоренні отриманих результатів.

### Список літератури:

1. Доліба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Активність каталази та аскорбат пероксидази у *Cat2* нокаутного мутанта *Arabidopsis thaliana* за дії іонів кадмію // Вісник Укр. товариства генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т. 9, № 2. – С. 200-208.
2. Доліба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Вплив іонів міді на активність каталази та аскорбатпероксидази в *Arabidopsis thaliana* // Физиол. биохим. культ. растений. – 2012. – Т. 44, № 2. – С. 153-161.
3. Доліба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Вплив іонів міді на перекисне окислення ліпідів у *Cat2* нокаутного мутанта *Arabidopsis thaliana* // Вісник Укр. товариства генетиків і селекціонерів. – 2012. – Т. 10, № 1. – С. 13-19.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. узов. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
5. Рогозинский М.С., Костышин С.С., Волков Р.А. Влияние ионов тяжелых металлов на синтез РНК в изолированных клеточных ядрах растений // Физиол. биохим. культ. растений. – 1998 – Т. 30, №3. – С. 209-214.
6. Ahmad P., Sarwat M., Sharma S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants // J. Plant Biol. – 2008. – Vol. 51, № 3. – P 167-173.
7. Amako K., Chen G., Asada K. Separate assays for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants // Plant Cell Physiol. – 1994. – Vol. 35. – P. 497-504.
8. 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.
9. Cheeseman J. M. Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship // Plant Stress. – 2007. – Vol. 1. – P. 4-15.
10. Cuypers A, Smeets K, Vangronsveld J. Heavy metal stress in plants. In: Hirt H, editor. Plant stress biology: from Genomics to Systems Biology. - Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2009. – P. 161-178.
11. Cuypers A., Smeets K., Ruytinx J., Opdenakker K., Keunen E., Remans T., Horemans N., Vanhoudt N., van Sanden S., van Belleghem F. The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings // J. Plant Physiol. – 2011. – Vol. 168. – P. 309-316.
12. 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 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Plant Physiol. – 1996. – Vol. 112. – P. 327-336.
13. Galvez-Valdivieso G., Mullineaux P.M. The role of reactive oxygen species in signaling from chloroplasts to the nucleus // Physiol. Plant. – 2010. – Vol. 138. – P. 430-439.
14. Gill, S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. Biochem. – 2010. – Vol. 48. – P. 909-930.
15. Jespersen M., Kjaergard I.V.H., Ostergaard L. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase // Biochem. J. – 1997. – Vol. 326. – P. 305-310.
16. Keunen E., Remans T., Bohler S., Vangronsveld J., Cuypers A. Metal-induced oxidative stress and plant mitochondria // Int. J. Mol. Sci. – 2011. – Vol. 12. – P. 6894-6918.
17. Mullineaux P., Ball L., Escobar C. Are diverse signaling pathways integrated in the regulation of Arabidopsis antioxidant defense gene expression in response to excess excitation energy // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 2000. – Vol. 29, № 355. – P. 1531-1538.
18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.

19. Orendi G. Expression von Katalasen während der Blattseneszens und unter verschiedenen Stressbedingungen in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. - Dissertation Verlag Grauer. – 2001. – 135 S.
20. Panchuk I.I., Volkov R.A., Schöffl F. Heat stress-and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // Plant Physiology. – 2002. – Vol. 129. – P. 838-853.
21. Panchuk I.I., Zentgraf U., Volkov R.A. Expression of the Apx gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana* // Planta. – 2005. – Vol. 222. – P. 926-932.
22. Sharma, S.S., Dietz, K.J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance // Trends Plant Sci. – 2008. – Vol. 14. – P. 43-50.
23. Smeets K., Opdenakker K., Remans T., Van Sanden S., Van Belleghem F., Semane B., et al. Oxidative stress related responses at transcriptional and enzymatic level after exposure to Cd or Cu and in a multipollution context // J. Plant Physiol. – 2009. – Vol. 166. – P. 1982-1992.
24. Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C. Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes // Funct. Plant Biol. – 2005. – Vol. 32. – P. 45-53.
25. Verbruggen N., Hermans C., Schat H. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants // New Phytol. – 2009. – Vol. 181. – P. 759-776.
26. Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux F.M., Schöffl F. Heat stress-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* // Plant. Mol. Biol. – 2006. – Vol. 61, № 4-5. – P. 733-746.
27. Yruela I. Copper in plan: acquisition, transport and unteractions // Funct. Plant Biol. – 2009. – Vol.36. – P. 409-430.

## **EFFECT OF COPPER ON ASCORBATE PEROXIDASE ACTIVITY IN *CAT2* KNOCK-OUT MUTANT OF *ARABIDOPSIS THALIANA***

**I. M. Buzduga, I. I. Panchuk**

*Accumulation of copper enhances generation of reactive oxygen species (ROS) in plants and results in oxidative damage of cellular membranes and proteins. Several enzymes including catalases and peroxidases are involved in protection against ROS. So far, it remains often not clear if different enzymes can functionally substitute each other. 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 ascorbate peroxidase (APX), activity of this enzymes was evaluated at normal conditions and after copper treatment. It was found that in leaves of 5-week-old plants activity of APX is only slightly increased in the mutant comparing to the wild type indicating that APX is not involved in compensation of CAT2 deficiency upon optimal cultivation conditions. However, inactivation of APX upon copper-induced oxidative stress was less pronounced in KO-Cat2 knock-out mutant than in wild type plants. The data indicate that upon copper stress APX can provide partial compensation of CAT2 deficiency in the mutant.*

*Key words: ascorbate peroxidase, catalase, hydrogen peroxide, copper, oxidative stress, metabolic compensation, knock-out mutants, Arabidopsis thaliana.*

*Одержано редколегією 05.12.2013*