

ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.1:582.683.2:58.032

РОЛЬ ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ *ARABIDOPSIS THALIANA* ПРИ ОСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

© 2016 г. С. И. Жадько

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

Методом ингибиторного анализа с использованием трихостатина А (ТСА) исследовали связь между активностью гистондеацетилазы (ГДА) и аскорбатпероксидазы (АП), каталазы (Кат), пероксиредоксина (ПР) и тиоредоксина (ТР) в каллусной культуре *Arabidopsis thaliana* при краткосрочном действии острого осмотического стресса. Установлено, что при трехчасовом действии стресса при ингибировании ГДА происходит увеличение активности исследуемых антиоксидантных ферментов. Предполагается, что данная регуляция осуществляется в основном за счет изменений в ацелировании ядерных гистонов, что приводит к соответствующим изменениям в структуре и функции хроматина и экспрессии генов, ответственных за антиоксидантную активность клеток.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, каллусная культура, гистондеацетилаза, трихостатин А, аскорбатпероксидаза, каталаза, пероксиредоксин, тиоредоксин, осмотический стресс

Острый осмотический стресс вызывает у растений увеличение активности гистонацетилазы (ГАТ) и гистондеацетилазы (ГДА) (Жадько, 2014). Изменения в ацелировании ядерных гистонов посредством ГАТ и ГДА приводят к соответствующим глобальным эпигенетическими изменениям в экспрессии генов и модификации метаболизма клеток в целом, особенно при стрессах (Chinnusamy, Zhu, 2009; Chen, Meng, 2010).

ГАТ ацелируют остатки лизинов в «хвостах» ядерных гистонов. При этом изменяется структура и функция хроматина и усиливается транскрипция ДНК. ГДА, наоборот, удаляют ацетильные группы с гистонов, в результате чего упаковка ДНК становится более компактной, что приводит соответственно к транскрипционной репрессии (Chen, Tian, 2007; Boyko, Kovalchuk, 2008; Zhang, 2008).

Адрес для корреспонденции: Жадько Сергей Иванович, Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, ул. Терещенковская, 2, Киев, 01601, Украина; e-mail: ukrkiev55@mail.ru

Изменения в ацелировании гистонов участвуют в регуляции развития оксидативного стресса у растений при различных воздействиях (Жадько, 2014). Установлено, что при ингибировании ГДА происходит последующее увеличение содержания активных форм кислорода (АФК) у растений (Jadko, 2015) и животных (Sun et al., 2014). Было высказано предположение, что процессы ацелирования и деацелирования ядерных гистонов посредством ГАТ и ГДА через эпигенетическую регуляцию экспрессии генов также могут участвовать в регуляции активности антиоксидантных ферментов (Jadko, 2015). Однако прямых исследований в данном направлении не проводилось.

Целью работы было изучение связи между ГДА и активностью аскорбатпероксидазы (АП), каталазы (Кат), пероксиредоксина и тиоредоксина (ТР) в каллусной культуре *Arabidopsis thaliana* при развитии острого осмотического стресса.

МЕТОДИКА

Исследовали 12-14 дневную каллусную культуру *A. thaliana*, экотип Columbia, находя-

щуюся на стационарной фазе роста, полученную из листьев растений в нашей лаборатории. Культуру выращивали на твердой агаризованной среде Мурасиге и Скуга в темноте при 24°C.

Острый осмотический стресс вызывали посредством помещения 1-1,5 г культуры в 25% раствор полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ). Через 3 ч воздействия ПЭГ определяли активность исследуемых ферментов. Все действия по определению активности ферментов проводили на холоде при температуре 2-4°C (Жадько и др. 2015).

Роль ГДА в регуляции активности антиоксидантных ферментов изучали посредством ингибиторного анализа с применением трихостатина А (ТСА). Для этого перед стрессом 1 г каллуса помещали в 5 мкМ раствор ТСА на 1 ч для ингибирования ГДА с последующим влиянием ПЭГ.

Активность АП (Nakano, Asada, 1981), Кат (Aebi, 1984), ПР и ТР (Жадько и др. 2015) определяли спектрофотометрически и выражали в мкМ соответствующего субстрата/мг белка/мин.

Содержание белка определяли по методу Bradford (1976).

Эксперименты повторяли независимо 3-5 раз. Полученные данные обрабатывали статистически. На рисунках приведены средние значения и их стандартные отклонения. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Обсуждаются изменения, достоверные при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для контрольных вариантов исследуемой каллусной культуры в среднем были характерны следующие показатели: для АП 0,058-0,065 мкМ аскорбата/мг белка/мин; Кат 0,132-0,143 мкМ H₂O₂/мг белка/мин; ПР 0,021-0,027 мкМ H₂O₂/мг белка/мин и ТР 247-266 усл. ед. –SH групп/мг белка/мин.

В предварительных экспериментах была подобрана концентрация ингибитора ТСА для наиболее эффективного снижения активности ГДА. Из 1, 5 и 10 мкМ ТСА, оптимальной концентрацией оказалась 5 мкМ. При этом активность ГДА уже через 1 ч инкубации с ТСА снизилась на 47-53% с сохранением приблизительно такого уровня до 3 ч.

Действие только ТСА не вызывало достоверных изменений активности исследуемых антиоксидантных ферментов (рис. 1, 2).

При действии ПЭГ происходило увеличение активности АП, Кат, ПР и ТР. При предстрессовом ингибировании ГДА посредством ТСА и последующем действии ПЭГ (ТСА+ПЭГ) происходило более значительное увеличение активности этих ферментов (рис. 1, 2).

Полученные данные показывают, что при ингибировании ГДА посредством ТСА в каллусной культуре *A. thaliana* при стрессе происходит увеличение активности антиоксидантных ферментов АП, Кат, ПР и ТР (рис. 1, 2). Подтверждением такой связи также служат данные об одновременном раннем увеличении активности ГАТ и ГДА и активности антиоксидантных ферментов при стрессе (Жадько, 2014; Жадько и др. 2015). Заметим, что при ингибировании ГДА посредством ТСА происходит последующее увеличение активности ГАТ (Jadko, 2015), что также надо учитывать при анализе развития ответной реакции.

ГДА может регулировать антиоксидантную активность клеток опосредованно, через изменения в структуре и функции хроматина и, соответственно, изменения в экспрессии генов белков, ответственных за продукцию АФК и антиоксидантную активность. Ацетилирование и деацетилирование «хвостов» ядерных гистонов влияет на структуру и функцию хроматина путем изменения зарядов на гистоновых «хвостах» и способствует экспрессии или репрессии генов по типу т. н. эффекта «открытая/закрытая» ДНК для транскрипции (Chen, Tiana, 2007; Kim et al., 2008; 2015).

Кроме этого, ацетилированные хвосты гистонов являются специфическими сайтами для связывания белков, которые прямо или косвенно регулируют транскрипцию генов (Gutzat, Ortrun, 2012; Josling et al., 2012). Бромодомен-экстратерминал (ВЕТ) – содержащие протеины, ВЕТ9, ВЕТ10 у растений специфически связываются с ацетилированными остатками лизинов на гистонах и активируют транскрипционные факторы с дальнейшей соответствующей регуляцией экспрессии генов (Josling et al., 2012).

У растений *A. thaliana* имеется много изоформ ГДА и ГАТ, поэтому также надо учитывать, какие именно их этих изоформ участвуют в ацетилировании и деацетилировании определенных остатков лизина в ядерных гистонах, что определяет экспрессию или репрессию соответствующих генов (Chen, Tiana, 2007), в т. ч. и генов антиоксидантных ферментов.

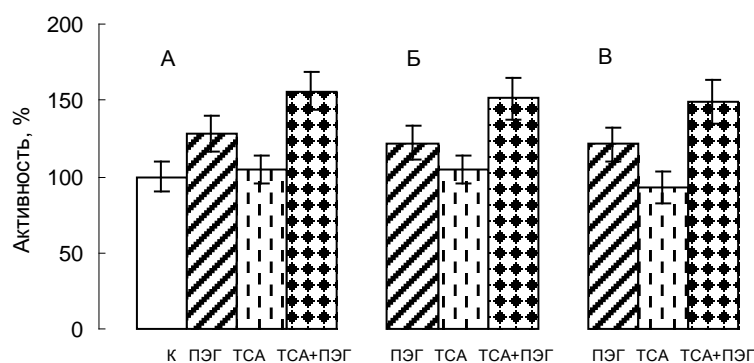


Рис. 1. Изменение активности аскорбатпероксидазы (А), каталазы (Б) и пероксиредоксина (В) (% к контролю) в каллусной культуре *A. thaliana* при действии 25% ПЭГ 6000, ТСА и комбинации факторов в течение 3 ч.

К – контроль. Подробно условия обработки каллусной культуры изложены в разделе «Методика».

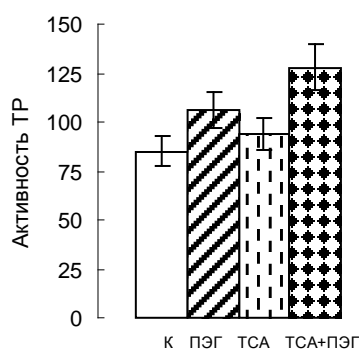


Рис. 2. Изменение активности тиоредоксина (ТР) (усл. ед. –SH групп/мг белка/мин) в каллусной культуре *A. thaliana* при действии 25% ПЭГ 6000, ТСА и комбинации факторов в течение 3 ч.

К – контроль. Подробно условия обработки каллусной культуры изложены в разделе «Методика».

Сохранение определенного динамического состояния в ацетилировании и деацетилировании ядерных гистонов посредством ГАТ и ГДА с глобальной регуляцией экспрессии генов важно для метаболизма клеток (Chen, Tiana, 2007; Кордюм, 2012) и эти процессы также должны участвовать в поддержании определенного про-/антиоксидантного состояния посредством эпигенетической регуляции экспрессии генов продукции АФК и антиоксидантных ферментов (Jadko, 2015). АФК сигналинг и антиоксидантная активность клеток также важны для метаболизма растений, особенно при стрессах (Колупаев, Карпец, 2010).

ТСА является антигрибковым антибиотиком, который способен очень эффективно ингибировать ГДА путем вытеснения иона цинка из активного центра класса 1 и 2 семей-

ства энзимов, к которым относятся и ГДА растений. Поэтому ТСА вызывает наиболее сильный эффект из известных ингибиторов ГДА для растений, в том числе и для каллусной культуры *A. thaliana* (Jadko, 2015).

Ранее нами было установлено, что у растений при ингибировании ГДА посредством ТСА происходит увеличение содержания АФК (Jadko, 2015), поэтому иногда бывает трудно однозначно определить, от чего именно и в какой степени зависит увеличение активность исследуемых антиоксидантных ферментов (рис. 1, 2), от эпигенетических изменений в экспрессии генов или от АФК как вторичных мессенджеров. Известно, что АП, Кат, ПР и ТР также имеют АФК-зависимую активность (Колупаев, Карпец, 2014; Жадько и др. 2015). В наших

РОЛЬ ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ

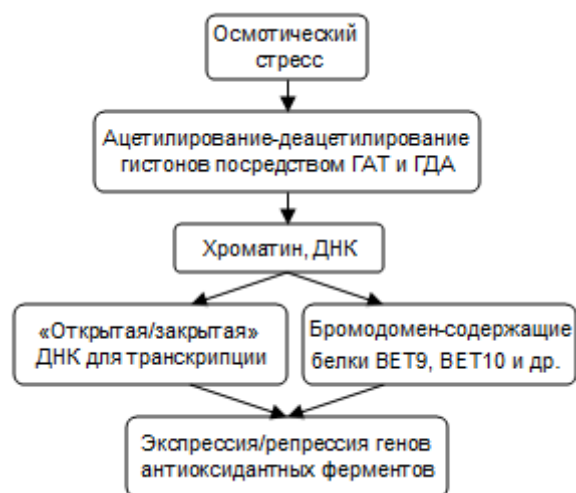


Рис. 3. Гипотетическая схема участия гистонацетилазы (ГАТ) и гистондеацетилазы (ГДА) в регуляции экспрессии генов антиоксидантных ферментов у растений при развитии осмотического стресса.

экспериментах с одновременным применением ТСА и аскорбата, как ингибитора развития ранней стрессорной оксидативной вспышки, был установлен преобладающий эффект эпигенетической активации исследуемых антиоксидантных ферментов в каллусной культуре при развитии острого осмотического стресса (данные в печати). Поэтому начальные стрессорные изменения в активности ГАТ и ГДА через экспрессию генов также могут контролировать активность антиоксидантных ферментов, включая АП, Кат, ПР и ТР, так как эти ферменты увеличивают свою активность на ранних стадиях развития осмотического стресса одновременно с увеличением активности ГАТ и ГДА (Жадько, 2014; Жадько и др. 2015).

Данные изменения прежде всего направлены на увеличение антиоксидантной активности и снижение накопления в клетках токсичных продуктов АФК при развитии оксидативной деструкции, вызванной острым осмотическим стрессом (рис. 1-3).

Таким образом, при помощи ингибиторного анализа с использованием ТСА показано участие ГДА в регуляции активности антиоксидантных ферментов АП, Кат, ПР и ТР в клетках каллусной культуры *A. thaliana* при стрессе. Данная регуляция может осуществляется в основном за счет изменений в ацетилировании ядерных гистонов, что приводит к соответствующим изменениям в структуре и функции хроматина и экспрессии генов, ответственных за антиоксидантную активность клеток (рис. 3). Однако, это предположение требует дальнейшей экспериментальной проверки.

ЛИТЕРАТУРА

- Жадько С.И. H_2O_2 -зависимое увеличение активности гистон ацетилазы и деацетилазы в культуре ткани *Arabidopsis thaliana* при осмотическом стрессе // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2014. – Вип. 3 (33). – С. 15-20.
- Жадько С.И., Воробьева Т.В., Сиваш А.А. Активные формы кислорода, активность пероксиредоксина и тиоредоксина в культуре ткани *Arabidopsis thaliana* при развитии осмотического и оксидативного стресса // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2015. – Вип. 2 (35). – С. 43-49.
- Колунаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. – Киев: Основа, 2010. – 350 с.
- Колунаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений // Укр. Biochem. J. – 2014. – V. 86, № 4. – С. 18-35.
- Кордюм Є.Л. Фенотипічна пластичність і епігенетика // Укр. ботан. журн. – 2012. – Т. 69, № 2. – С. 163-177.
- Aebi H. Catalase in vitro // Methods Enzymol. – 1984. – V. 105. – P. 121-126.
- Boyo A., Kovalchuk I. Epigenetic control of plant stress response // Environ. Mol. Mutagenesis. – 2008. – V. 49. – P. 61-72.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248-254.
- Chen M., Lv S., Meng Y. Epigenetic performers in plants // Develop. Growth Differ. – 2010. – 52. – P. 555-566.
- Chen Z.J., Tiana L. Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – V. 1769. – P. 295-307.

- Chinnusamy V., Zhu J.K.* Epigenetic regulation of stress responses in plants // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2009. – V. 12. – P. 1-7.
- Gutzat R., Ortrun M., S.* Epigenetic responses to stress: triple defense? // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2012. – V. 15. – P. 568-573.
- Jadko S.I.* Histone deacetylase activity and reactive oxygen species content in the tissue culture of *Arabidopsis thaliana* under normal conditions and development of acute osmotic stress // *Ukr. Biochem. J.* – 2015. – V. 87, № 3. – P. 57-62.
- Josling G.A., Selvarajah S.A., Petter M., Duffy M.F.* The role of bromodomain proteins in regulating gene expression // *Genes.* – 2012. – V. 3. – P. 320-343.
- Kim J. M., Kim T.T., Ishida J., Morosawa T., Kawashima M., Matsui A., Toyoda T., Kimura H., Shinozaki K., Seki M.* Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-Tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiol.* – 2008. – V. 49. – P. 1580 – 1588.
- Kim J.M., Sasaki T., Ueda M., Sako K., Seki M.* Chromatin changes in response to drought, salinity, heat, and cold stresses in plants // *Plant Genet. Genomics.* – 2015. – V. 6. – P. 1-12.
- Nakano Y., Asada K.* Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // *Plant Cell Physiol.* – 1981. – V. 22. – P. 867 – 880.
- Sun S., Han Y., Liu J., Fang Y., Tian Y., Zhou J., Ma D., Wu P.* Trichostatin A targets the mitochondrial respiratory chain, increasing mitochondrial reactive oxygen species production to trigger apoptosis in human breast cancer cells // *PLOS ONE.* – 2014. – V. 9 (3). – P. 1-9.
- Zhang X.* The epigenetic landscape of plants // *Science* – 2008. – V. 320. – P. 489-492.

Поступила в редакцію
14.03.2016 з.

ROLE OF HISTONE DEACETYLASE IN REGULATION OF ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITIES IN CALLUS CULTURE OF *ARABIDOPSIS THALIANA* UNDER OSMOTIC STRESS

S. I. Jadko

*M.G. Kholodny Institute of Botany
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)
e-mail: ukrkiev55@mail.ru*

By using trichostatin A (TCA) for inhibition analysis the relationship between histone deacetylase (HDA) and the activity of ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxiredoxin (PRX) and thioredoxin (TRX) in the callus culture of *Arabidopsis thaliana* under short-term acute osmotic stress have been investigated. It was found that under the stress and inhibition of HDA during 3 hours an increase in activity of the investigated enzymes took place. We suppose, that the regulation can be carried out mainly due to changes in acetylation of nuclear histones, which results in corresponding changes in the structure and function of chromatin and gene expression which responsible for antioxidant activity of the cells.

Key words: *Arabidopsis thaliana, callus culture, histone deacetylase, trichostatin A, ascorbate peroxidase, catalase, peroxiredoxin, thioredoxin, osmotic stress*

РОЛЬ ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ

РОЛЬ ГІСТОНДЕАЦЕТИЛАЗИ В РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ КАЛУСНОЇ КУЛЬТУРИ *ARABIDOPSIS THALIANA* ЗА ДІЇ ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ

С. І. Жадько

*Институт ботаники ім. М.Г. Холодного
Національної академії наук України
(Київ, Україна)
e-mail: ukrkiev55@mail.ru*

Методом інгібиторного аналізу з використанням трихостатину А (ТСА) досліджували зв'язок між активністю гістондеацетилази (ГДА) та активністю аскорбатпероксидази (АП), каталази (Кат), пероксиредоксину (ПР) та тіоредоксину (ТР) в калусній культурі *Arabidopsis thaliana* при короткочасній дії гострого осмотичного стресу. Встановлено, що за дії гіперосмотичного стресу при інгібуванні ГДА відбувається збільшення активності досліджуваних антиоксидантних ферментів. Висловлено припущення, що дана регуляція здійснюється в основному за рахунок змін в ацетилюванні ядерних гістонів, що призводить до відповідних змін в структурі і функції хроматину та експресії генів, відповідальних за антиоксидантну активність клітин.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, калусна культура, гістондеацетилаза, трихостатин А, аскорбатпероксидаза, каталаза, пероксиредоксін, тіоредоксін, осмотичний стрес