

УДК 581.1:582.683.2:58.032

**АКТИВНОСТЬ ГИСТОНАЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ,
ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗЫ, СОДЕРЖАНИЕ АФК И
АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КАЛЛЮСНОЙ
КУЛЬТУРЫ *ARABIDOPSIS THALIANA* НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ
ОСТРОГО ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА**

С.И. ЖАДЬКО

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного Национальной академии наук Украины
01004 Киев, ул. Терещенковская, 2
e-mail: ukrkiev55@mail.ru*

Исследовали активность гистонацетилтрансферазы (ГАТ), гистондеацетилазы (ГДА), содержание активных форм кислорода (АФК), антиоксидантную активность аскорбатпероксидазы (АП), каталазы (Кат) и тиоредоксинов (ТР) в клетках каллюсной культуры *A. thaliana* на начальных этапах острого осмотического стресса. Установлено, что при действии стресса повышались активности ГАТ, ГДА, содержание АФК, в частности H_2O_2 , активности АП, Кат и ТР. Полученные результаты обсуждаются в аспекте регуляции экспрессии генома и роли редокс-сигналинга при формировании стресс-реакции клеток растений.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, каллюсная культура, гистонацетилтрансфераза, гистондеацетилаза, активные формы кислорода, аскорбатпероксидаза, каталаза, тиоредоксин, осмотический стресс.

При различных стрессах у растений происходят изменения процессов ацетилирования и деацетилирования ядерных гистонов посредством гистонацетилтрансфераз и гистондеацетилаз, что приводит к значительным изменениям экспрессии генов [7, 9]. При этом изменяются также содержание активных форм кислорода и антиоксидантная активность клеток [1, 3, 17, 20].

ГАТ (КФ 2.3.1.48) — это ферменты, ацетилирующие остатки лизина в «хвостах» ядерных гистонов. В результате изменяется структура хроматина и так называемая «закрытая» до этого ДНК становится более доступной для ферментов транскрипции. Ацетилированные хвосты гистонов также активируют бромодоменсодержащие протеины, что сопровождается увеличением экспрессии генов [9, 13].

ГДА (КФ 3.5.1.98) — ферменты, которые, наоборот, удаляют ацетильные группы с гистонов, в результате чего упаковка ДНК становится более компактной, что приводит к транскрипционной репрессии [9].

АФК — супероксидные анион-радикалы, пероксид водорода (H_2O_2) и гидроксильные радикалы в клетках растений при повышенной концентрации могут вызывать оксидативную деструкцию, а H_2O_2 выполняет также сигнальную функцию. В обычных условиях АФК постоянно образуются в клетках в процессе нормального метаболизма и находятся под контролем антиоксидантной системы. Однако при стрессах резко

возрастает содержание АФК с последующей угрозой развития оксидативной деструкции. Поэтому в ответ на стрессорное повышение концентрации АФК активируется антиоксидантная система клетки, особенно быстро возрастает активность супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы, каталазы и др. [1, 11]. Особый интерес представляет изучение роли АП, Кат и ТР, так как эти ферменты определяют сигнальную роль H_2O_2 в механизме развития стресс-реакции и адаптации растений [11, 16, 19]. Однако роль и взаимосвязь ацетилирования/деацетилирования гистонов, АФК и антиоксидантных ферментов на начальных этапах развития ответной стресс-реакции растений остается малоизученной.

Целью настоящего исследования было изучение изменений активности ГАТ, ГДА, а также содержания АФК, активности АП, Кат и ТР в клетках каллюсной культуры *A. thaliana* при развитии острого осмотического стресса.

Методика

Исследовали 12–14-суточную каллюсную культуру *A. thaliana*, экотип Columbia, находящуюся в стационарной фазе роста, полученную из листьев растений в лаборатории нашего Института. Каллюс выращивали на твердой агаризованной среде Мурасиге—Скуга в темноте при 24 °С.

Острый осмотический стресс вызывали посредством помещения 1,0–1,5 г каллюса в раствор 25 %-го полиэтиленгликоля-6000 (ПЭГ). Через 1, 2 и 3 ч определяли активность ГАТ, ГДА, интенсивность спонтанной хемилюминесценции (СХЛ) как показателя уровня содержания АФК в живых, нативных клетках, содержание H_2O_2 , активность АП, Кат и ТР.

Для определения интенсивности СХЛ 1,0 г каллюса помещали в кювету камеры хемилюминометра ХЛМЦ-01. Через 10 мин, после «эффекта высвечивания» в темной камере, определяли интенсивность свечения в импульсах за секунду на 1 г сырого вещества каллюса [1].

Препарат получали согласно методике [2] и сразу в нем определяли активность исследуемых ферментов и содержание H_2O_2 . Все действия проводили при температуре 2–4 °С.

Активность ГАТ устанавливали согласно протоколу (Catalog # K332-100, НАТ Activity Colorimetric Assay Kit, Bio Vision, USA, <http://www.biovision.com>) с некоторой модификацией. Для этого брали 70 мкг протеина клеточного гомогената, инкубировали реакционную смесь в течение 5–6 ч, после чего к 108 мкл окрашенного образца добавляли 142 мкл воды до общего объема 250 мкл. Затем измеряли интенсивность абсорбции на спектрофотометре СФ-2000 при 440 нм. Активность ГАТ выражали в относительных единицах абсорбции на 1 мг протеина.

Активность ГДА определяли согласно протоколу (Catalog # K331-100, Colorimetric HDAC Activity Assay Kit, Bio Vision, USA, <http://www.biovision.com>) с некоторой модификацией: 250 мкг протеина клеточного гомогената инкубировали в течение 3 ч, после чего к 110 мкл окрашенного образца добавляли 140 мкл воды до общего объема 250 мкл и измеряли интенсивность абсорбции на СФ-2000 при 405 нм. Активность ГДА выражали в относительных единицах абсорбции на 1 мг протеина.

Содержание H_2O_2 определяли в соответствии с методикой Максимиак, Крупа [15] спектрофотометрически при 600 нм. Количество H_2O_2 вычисляли при коэффициенте экстинкции $19,8 \cdot 10^3 \text{ l}/(\text{M} \cdot \text{cm})$.

Активность АП определяли спектрофотометрически по Накано, Асада [18] и вычисляли по изменению оптической плотности в минутах на 1 мг протеина.

Активность Кат также определяли спектрофотометрически по изменению оптической плотности, вызванному уменьшением количества H_2O_2 , при 240 нм, в соответствии с работой [4].

Активность ТР определяли с помощью микрометода, основанного на восстановлении инсулина [2, 14]. Реакционная смесь содержала 0,26 М НЕРЕС (рН 7,6), 10 мМ ЭДТА, 2 мМ НАДФН, 1 мМ инсулина, 100 нМ ТР редуктазы, 100 мкл препарата или буфера. Реакцию запускали добавлением препарата. После инкубации при 37 °С в течение 20 мин реакцию останавливали добавлением смеси 0,5 мл 6 М гуанидин-НСl, 0,2 М *трис*-НСl (рН 8,0), 1 мМ DTND и измеряли оптическую плотность при 412 нм.

Содержание протеина определяли по методу Бредфорда [6]. Эксперименты повторяли независимо 3–5 раз. Полученные данные обработаны статистически. На рисунках представлены средние значения и их стандартные отклонения. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Обсуждаются изменения, достоверные при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

При действии ПЭГ происходило раннее и достоверное повышение активности ГАТ и ГДА (рис. 1). В этот период острый осмотический стресс также приводил к повышению интенсивности СХЛ, содержания H_2O_2 (рис. 2) и активности АП, Кат, ТР (рис. 3).

Полученные данные подтвердили, что при действии острого осмотического стресса в каллюсной культуре *A. thaliana* происходит раннее повышение активности ГАТ, ГДА, а также содержания АФК и активности исследуемых антиоксидантных ферментов АП, Кат и ТР (см. рис. 1–3).

Стрессорное повышение активности ГАТ и ГДА с соответствующими изменениями ацетилирования и деацетилирования ядерных гистонов, а также экспрессии их генов выявлено у растений при различных

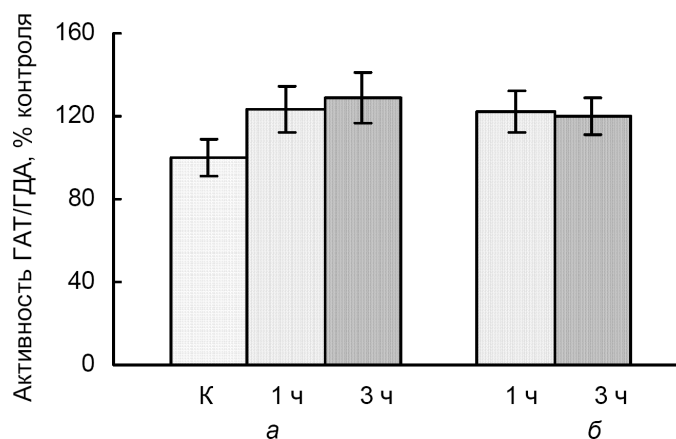


Рис. 1. Изменение активности гистонацетилтрансферазы (а) и гистондеацетилазы (б) в клетках каллюсной культуры *A. thaliana* при действии полиэтиленгликоля-6000 в течение 1 и 3 ч.

Здесь и на рис. 2, 3: К — контроль

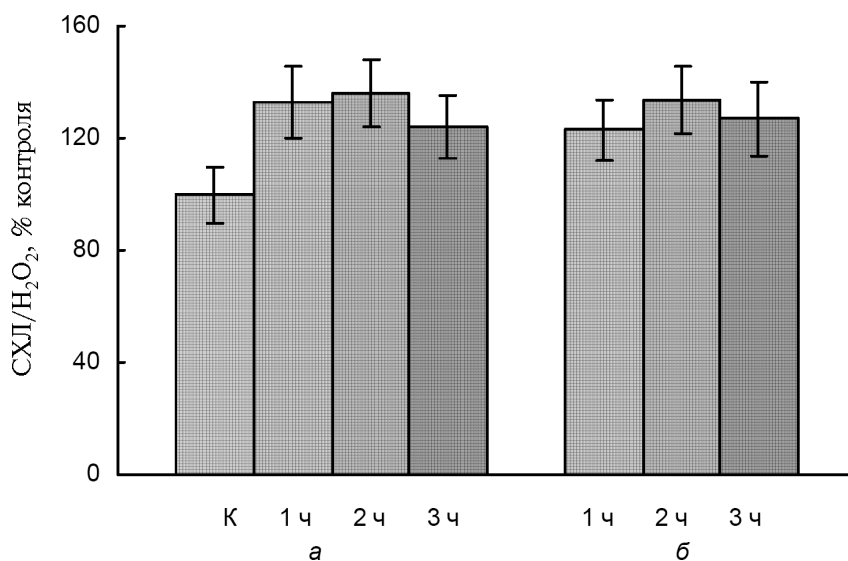


Рис. 2. Изменение интенсивности спонтанной хемилюминесценции (а) и содержания H₂O₂ (б) в клетках каллюсной культуры *A. thaliana* при действии полиэтиленгликоля-6000 в течение 1, 2 и 3 ч

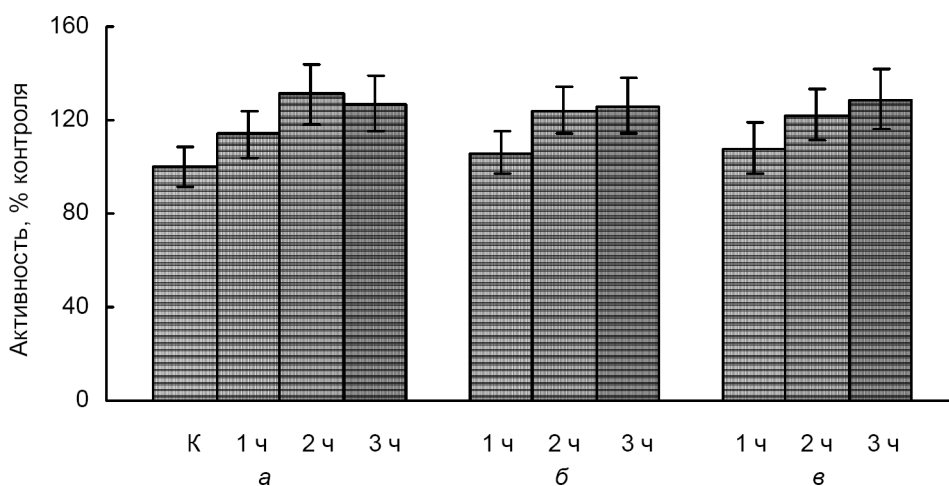


Рис. 3. Изменение активности аскорбатпероксидазы (а), каталазы (б) и тиоредоксина (в) в клетках каллюсной культуры *A. thaliana* при действии полиэтиленгликоля-6000 в течение 1, 2 и 3 ч

воздействиях. Однако эти изменения определяли на более поздних стадиях действия стрессов (через сутки и более) [7, 9].

Ацетилирование/деацетилирование хвостов ядерных гистонов посредством ГАТ и ГДА влияет на структуру хроматина и таким образом регулирует экспрессию или репрессию генов. При ацетилировании гистонов создается отрицательный заряд на их поверхности, что приводит к отталкиванию хвостов ядерных гистонов друг от друга, в результате чего меняется структура хроматина, и ДНК становится более доступной для ферментов транскрипции [9, 21]. Кроме того, ацетилированные ги-

стоны являются сайтами для связывания бромодоменсодержащих протеинов ВЕТ9, ВЕТ10 и других, которые также могут регулировать экспрессию генов непосредственно или через регуляцию транскрипционных факторов [13].

Одновременное повышение активностей ГАТ и ГДА (см. рис. 1) можно объяснить глобальными стрессорными изменениями метаболизма клеток, сопровождающимися разнообразными изменениями, связанными как с возрастанием экспрессии, так и с репрессией различных генов. При этом также надо учитывать, какие именно молекулярные формы ферментов могут принимать участие в стресс-реакции, так как каждая из изоформ ГАТ и ГДА участвует в ацетилировании и деацетилировании конкретных остатков лизина в ядерных гистонах, что определяет экспрессию или реессию соответствующих генов [9, 10]. В частности, у *A. thaliana* выявлено 8 изоформ ГАТ и 12 изоформ ГДА [12].

Важная роль в регуляции экспрессии генов принадлежит так называемым эпигенетическим переключателям — метилированию ДНК, посттрансляционной модификации ядерных гистонов, малым интерферирующим РНК [8]. При этом большое значение имеют процессы ацетилирования и деацетилирования гистонов. Считается, что многие факторы среды способны непосредственно регулировать экспрессию генов посредством эпигенетических переключателей. Кроме того, эпигенетические переключатели также могут формировать так называемую память клеток, особенно при стрессах [5]. У растений этот механизм более сложный и значимый для стресс-реакции, так как они ведут прикрепленный образ жизни и должны быстро адаптироваться к резким изменениям условий окружающей среды [5, 8].

С учетом того, что одновременно с повышением активности ГАТ и ГДА повышаются содержание АФК и активность АП, Кат, ТР (см. рис. 2, 3), можно предположить, что стрессорное возрастание активности ГАТ и ГДА также приводит к изменению экспрессии генов ферментов, ответственных за продукцию АФК и антиоксидантную активность клеток. Сохранение определенного динамического равновесия ацетилирования и деацетилирования гистонов важно для метаболизма клеток растений [9]. Эти процессы также должны участвовать в поддержании соответствующего проантиоксидантного уровня с привлечением АФК и антиоксидантных ферментов, особенно в стрессовой ситуации.

Обнаруженное стрессорное повышение содержания АФК (см. рис. 2) в исследуемой каллюсной культуре характерно для многих растений при различных воздействиях. В результате вслед за повышением уровня АФК происходит АФК-индуцируемое возрастание активности антиоксидантных ферментов [1, 3]. Особый интерес представляют антиоксидантные ферменты АП, Кат, ТР, связанные с метаболизмом H_2O_2 . При этом, если супероксиддисмутаза, АП, Кат и другие ферменты могут выполнять только антиоксидантную функцию, связанную с восстановлением АФК до нейтральных молекул, то ТР кроме этого выступают еще и в роли акцепторов и трансдукторов стрессорных редокс-сигналов [2, 19].

ТР — это протеины, содержащие в своей структуре сульфгидрильные группы, способные обратимо окисляться до дисульфидов. Поэтому ТР выполняют антиоксидантную функцию и могут восстанавливать дисульфидные группы других белков с изменением их структуры и функ-

ций [19]. Окисленные ТР восстанавливаются в НАДФН-зависимых реакциях с участием тиоредоксинредуктаз [16]. ТР в комплексе с перокси-редоксинами и H_2O_2 способны формировать редокс-сигналы, особенно при стрессах растений [2, 11].

Известно, что при различных стрессах у растений повышаются экспрессия генов и активности АП, Кат [1, 15, 17]. Зарегистрированное раннее стрессорное активирование АП и Кат (см. рис. 3, а, б) также может происходить за счет увеличения их активности в результате взаимодействия с ТР, так как АП и Кат являются мишенями ТР [19]. В пользу предположения о таком механизме свидетельствуют данные работ [1, 2].

Таким образом, при краткосрочном действии острого осмотического стресса в клетках каллюсной культуры *A. thaliana* повышаются активности ГАТ, ГДА, антиоксидантных ферментов АП, Кат, ТР, а также содержание АФК. Активирование ГАТ и ГДА связано с перестройкой метаболизма клеток вследствие эпигенетических изменений в экспрессии генов. Одновременное повышение активностей ГАТ и ГДА может быть связано как с активацией экспрессии генов, так и с их репрессией. При этом следует учитывать, какие именно молекулярные формы ферментов ГАТ и ГДА могут принимать участие в стресс-реакции. Изменения активностей ГАТ и ГДА приводят к соответствующим изменениям экспрессии генов. Мы считаем, что зарегистрированное нами раннее увеличение активностей ГАТ и ГДА также связано с эпигенетической регуляцией образования АФК и антиоксидантных ферментов. Стрессорное повышение уровня АФК приводит к АФК-индуцируемому активированию исследуемых нами антиоксидантных ферментов АП, Кат, ТР. При этом важную роль играют ТР, которые с участием H_2O_2 и перокси-редоксинов способны формировать стрессорные редокс-сигналы. ТР также могут регулировать активности АП и Кат посредством белок-белкового взаимодействия.

1. Жадько С.И. Раннее увеличение содержания активных форм кислорода и активности аскорбатпероксидазы и каталазы в листьях растений *Arabidopsis thaliana* при осмотическом и оксидативном стрессах // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2012. — 3, № 27. — С. 58–64.
2. Жадько С. Ранне збільшення вмісту H_2O_2 і активності пероксиредоксину й тиоредоксину в культурі тканини *Arabidopsis thaliana* при осмотичному стресі різної інтенсивності // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біологічна. — 2014. — 64. — С. 287–292.
3. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений // Ukr. Biochem. J. — 2014. — 86, N 4. — С. 18–35.
4. Aebi H. Catalase in vitro // Methods in Enzymol. — 1984. — 105. — P. 121–126.
5. Boyko A., Kovalchuk I. Epigenetic control of plant stress response // Environ. Mol. Mutagen. — 2008. — 49. — P. 61–72.
6. 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. — 72. — P. 248–254.
7. Chen L.T., Luo M., Wang Y.Y., Wu K. Involvement of Arabidopsis histone deacetylase HDA6 in ABA and salt stress response // J. Exp. Bot. — 2010. — 61, N 12. — P. 3345–3353.
8. Chen M., Lv S., Meng Y. Epigenetic performers in plants // Dev. Growth Differ. — 2010. — 52, N 6. — P. 555–566.
9. Chen Z.J., Tiana L. Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy // Biochim. Biophys. Acta. — 2007. — 1769. — P. 295–307.
10. Chinnusamy V., Zhu J.-K. Epigenetic regulation of stress responses in plants // Curr. Opin. Plant Biol. — 2009. — 12. — P. 1–7.
11. Dietz K.-J. Redox signal integration: from stimulus to networks and genes // Physiol. Plant. — 2008. — 133. — P. 459–468.
12. Hollender C., Zhongchi L.Z. Histone deacetylase genes in Arabidopsis development // J. Int. Plant Biol. — 2008. — 50. — P. 875–885.

13. *Josling G.A., Selvarajah S.A., Petter M., Duffy M.F.* The role of bromodomain proteins in regulating gene expression // *Genes*. — 2012. — **3**. — P. 320–343.
14. *Kumar S., Holmgren A.* Induction of thioredoxin, thioredoxin reductase and glutaredoxin activity in mouse skin by TPA, a calcium ionophore and other tumor promoters // *Carcinogenesis*. — 1999. — **20**, N 9. — P. 1761–1767.
15. *Maksymiec W., Krupa Z.* The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana* // *Environ. and Experim. Bot.* — 2006. — **57**. — P. 187–194.
16. *Meyer Y., Belin C., Delorme-Hinoux V. et al.* Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance // *Antioxid. Redox Signal.* — 2012. — **17**. — P. 1124–1160.
17. *Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N. et al.* ROS signaling: the new wave? // *Trends Plant Sci.* — 2011. — **16**. — P. 300–309.
18. *Nakano Y., Asada K.* Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // *Plant Cell Physiol.* — 1981. — **22**. — P. 867–880.
19. *Santos C.V., Rey P.* Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response // *Trends Plant Sci.* — 2006. — **11**, N 7. — P. 329–334.
20. *Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G.* ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress // *Plant Cell Environ.* — 2012. — **35**. — P. 259–270.
21. *Zhang X.* The epigenetic landscape of plants // *Science*. — 2008. — **320**. — P. 489–492.

Получено 30.07.2015

АКТИВНІСТЬ ГІСТОНАЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗИ, ГІСТОНДЕАЦЕТИЛАЗИ, ВМІСТ АФК ТА АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ КЛІТИН КАЛЮСНОЇ КУЛЬТУРИ *ARABIDOPSIS THALIANA* НА ПОЧАТКОВИХ ЕТАПАХ ГОСТРОГО ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ

С.І. Жадько

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України, Київ

Досліджували активність гістонацети́лтрансферази (ГАТ), гістондеацети́лази (ГДА), вміст активних форм кисню (АФК), антиоксидантну активність аскорбатпероксидази (АП), каталази (Кат) і тиоредоксину (ТР) у клітинах калюсної культури *A. thaliana* на початкових етапах гострого осмотичного стресу. Встановлено, що за дії стресу підвищувались активності ГАТ, ГДА, вміст АФК, зокрема H₂O₂, активності АП, Кат і ТР. Отримані результати обговорюються в аспекті регуляції експресії геному і ролі редокс-сигналі́нгу при формуванні стрес-реакції клітин рослин.

ACTIVITY OF THE HISTONE ACETYLTRANSFERASE, HISTONE DEACETYLASE, ROS CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN THE CELLS OF CALLUS CULTURE OF *ARABIDOPSIS THALIANA* AT THE INITIAL STAGES OF ACUTE OSMOTIC STRESS

S.I. Jadko

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine
2 Tereshchenkivska St., Kyiv, 01004, Ukraine

The activity of histone acetyltransferase (HAT), histone deacetylase (HDA), content of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant activity of ascorbate peroxidase (AP), catalase (CAT) and thioredoxin (TP) in the callus culture of *A. thaliana* at the early stages of acute osmotic stress have been investigated. It is established that under the stress took place an increase in HAT, HDA activities and the ROS content, especially H₂O₂, and the activity of AP, Cat and TR. The data obtained are discussed in aspect of genome expression regulation and role of redox signaling in generation of plant cells stress response.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, callus culture, histone acetyltransferase, histone deacetylase, reactive oxygen species, ascorbate peroxidase, catalase, thioredoxin, osmotic stress.