



<http://dx.doi.org/10.15407/dopovidi2016.09.118>

УДК 581.1:582.683.2:58.032

С. И. Жадько

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев

E-mail: ukrkiev55@mail.ru

Ацетилирование гистонов и активность антиоксидантных ферментов в клетках каллусной культуры *Arabidopsis thaliana*

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Е. Л. Кордюм)

Исследовано участие гистон деацетилазы (ГДА) в регуляции активности антиоксидантных ферментов в каллусной культуре *Arabidopsis thaliana* в норме. Установлено, что при снижении активности ГДА посредством ингибитора трихостатина А происходит увеличение активности аскорбат пероксидазы, каталазы и тиоредоксина. Обсуждаются возможные механизмы участия ГДА и гистон ацетилтрансферазы в эпигенетической регуляции активности исследуемых ферментов.

Ключевые слова: каллусная культура *Arabidopsis thaliana*, гистон деацетилаза, гистон ацетилтрансфераза, трихостатин А, аскорбат пероксидаза, каталаза, тиоредоксин.

Процессы ацетилирования и деацетилирования ядерных гистонов посредством гистон ацетилтрансфераз (ГАТ) и гистон деацетилаз (ГДА) принимают активное участие в эпигенетической регуляции экспрессии генов как в норме, так и при стрессах [1–3]. Установлено, что при действии гиперосмотического стресса у растений происходит раннее и H_2O_2 -зависимое увеличение активности ГАТ и ГДА. Было высказано предположение, что данные изменения также направлены на повышение антиоксидантной активности клеток для предотвращения развития стрессорной оксидативной деструкции [3, 4].

ГАТ (КФ 2.3.1.48) – это ферменты, которые ацетилируют ядерные гистоны, что приводит к активации транскрипции ДНК и увеличению экспрессии генов. ГДА (К.Ф. 3.5.1.98),

наоборот, удаляют ацетильные группы, в результате чего уменьшается доступность транскрипционных факторов к ДНК, что приводит, соответственно, к снижению экспрессии генов [1, 2, 5]. Предполагается, что ГАТ и ГДА также участвуют в регуляции активности антиоксидантных ферментов [3, 4]. Однако прямых исследований в данном направлении не проводилось.

Целью исследований было изучение взаимосвязи между активностью ГАТ, ГДА и активностью аскорбат пероксидазы (АП), каталазы (Кат) и тиоредоксина (ТР) посредством ингибиторного анализа с применением трихостатина А (ТСА).

Исследовали 12–14- дневную каллусную культуру *Arabidopsis thaliana*, экотип Columbia, находящуюся на стационарной фазе роста, полученную из листьев растений в нашей лаборатории. Культуру выращивали на твердой агаризованной среде Мурасиге и Скуга в темноте при 24 °С.

Супернатант получали согласно [4] и сразу в нем определяли активность исследуемых ферментов. Все действия проводили на холоде при 2–4 °С.

Активность ГАТ определяли спектрофотометрически при 440 нм согласно протоколу кита (Catalog # K332-100, НАТ Activity Colorimetric Assay Kit, BioVision, USA, <http://www.biovision.com>) с некоторой модификацией [4]. Активность ГАТ выражали в относительных единицах абсорбции на 1 мг протеина.

Активность ГДА определяли спектрофотометрически при 405 нм согласно протоколу кита (Catalog # K331-100, Colorimetric HDAC Activity Assay Kit, BioVision, USA, <http://www.biovision.com>) также с некоторой модификацией [4]. Активность ГДА выражали в относительных единицах абсорбции на 1 мг протеина.

Роль ГДА в регуляции активности антиоксидантных ферментов изучали посредством ингибиторного анализа с применением трихостатина А (ТСА). Для этого 1000 мг каллуса помещали в 5 мкМ раствор ТСА на 1 ч [4]. Для ингибирования АФК-зависимого увеличения активности антиоксидантных ферментов каллусную культуру погружали в раствор 10 мМ аскорбата (А) на 30 мин [3].

Активность АП определяли спектрофотометрически по Накано и Асада [6] и вычисляли по изменениям оптической плотности за 1 мин на 1 мг протеина.

Активность Кат также определяли спектрофотометрически по изменению оптической плотности, вызванной снижением H_2O_2 при 240 нм, в соответствии с Аиби [7].

Активность ТР оценивали спектрофотометрически при 412 нм при помощи микрометода, основанного на восстановлении инсулина [8].

Содержание протеина определяли по методу Бредфорда [9].

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 $p \leq 0,05$.

Для каллусной культуры в среднем были характерны следующие показатели: 3–5; 9–11 и 34–38 усл. ед./мг белка для АП, Кат и ТР соответственно. На гистограммах изменения активности исследуемых ферментов представлены в процентах к соответствующим контролям. При действии ингибитора ТСА в течение 1 ч происходило значительное снижение активности ГДА и, наоборот, увеличение ГАТ (рис. 1), что приводило к повышению

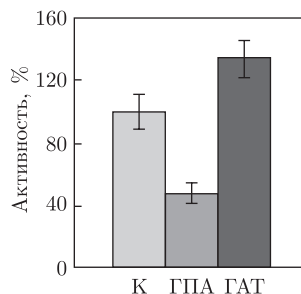


Рис. 1. Изменение активности ГДА и ГАТ (% к контролю) в клетках каллусной культуры *A. thaliana* при действии ингибитора ТСА в норме. Здесь и на рис. 2–4 К – контроль

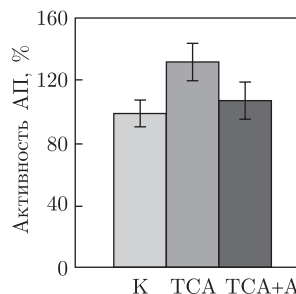


Рис. 2. Изменение активности АП (% к контролю) в клетках каллусной культуры *A. thaliana* при действии ТСА и ТСА+А в норме

активности АП, Кат и ТР. При ингибировании АФК-зависимого увеличения активности исследуемых антиоксидантных ферментов значительных изменений в уровне их активности не происходило (рис. 2–4).

Полученные данные свидетельствуют о взаимодействии между ГДА, ГАТ и активностью АП, Кат и ТР (см. рис. 1–4) в норме. Подтверждением такой взаимосвязи также служат данные об одновременном раннем увеличении активности ГАТ и ГДА [3] и активности антиоксидантных ферментов при осмотическом стрессе у растений [8].

ГАТ и ГДА могут влиять на активность антиоксидантных ферментов за счет эпигенетической регуляции экспрессии их генов. Ацетилирование и деацетилирование хвостов ядерных гистонов воздействует на структуру хроматина путем изменения зарядов на гистоновых хвостах и способствует экспрессии или репрессии генов по типу так называемого эффекта “открытая/закрытая” ДНК для транскрипции [1, 2], в том числе и антиоксидантных ферментов [8].

Кроме этого, ацетилированные хвосты гистонов являются специфическими сайтами для связывания протеинов, которые прямо или косвенно регулируют транскрипцию генов [10]. Бромодомен-экстратерминал (ВЕТ)-содержащие протеины, ВЕТ9, ВЕТ10 у растений, специфически связываются с ацетилированными остатками лизинов на гистонах и активизируют транскрипционные факторы с дальнейшей соответствующей регуляцией экспрессии генов [10].

Поэтому изменения в активности ГАТ и ГДА также могут регулировать активность антиоксидантных ферментов, таких как АП, Кат, пероксиредоксин и ТР, так как их активность возрастает на ранних стадиях развития острого осмотического стресса одновременно с увеличением активности ГАТ и ГДА [8] (см. рис. 1–4).

Сохранение определенного динамического состояния в ацетилировании и деацетилировании гистонов посредством ГАТ и ГДА с глобальной регуляцией экспрессии генов важно для метаболизма клеток [2, 11, 12], и эти процессы также должны участвовать в поддержании определенного про-антиоксидантного уровня, с регуляцией содержания активных форм кислорода (АФК) и активности антиоксидантных ферментов за счет эпигенетической регуляции экспрессии генов продукции АФК и антиоксидантных ферментов [3, 4].

Ранее нами было установлено, что и у растений при ингибировании ГДА посредством ТСА тоже происходит увеличение содержания АФК [4], которые также могут индуцировать

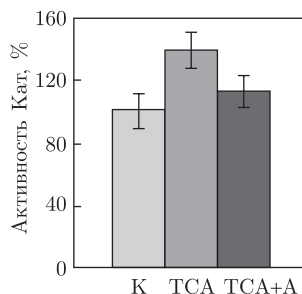


Рис. 3. Изменение активности Кат (% к контролю) в клетках каллусной культуры *A. thaliana* при действии ТСА и ТСА+А в норме

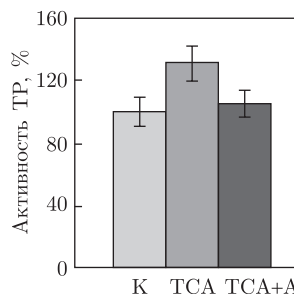


Рис. 4. Изменение активности ТР (% к контролю) в клетках каллусной культуры *A. thaliana* при действии ТСА и ТСА+А в норме

активность антиоксидантных ферментов [3, 8]. Однако в наших экспериментах с одновременным применением ТСА и аскорбата (А) был снят этот эффект, особенно для Кат и ТР (см. рис. 3, 4).

У растений *A. thaliana* имеется много изоформ ГАТ и ГДА, поэтому также надо учитывать, какие именно из этих изоформ участвуют в ацетилировании и деацетилировании определенных остатков лизинов в гистонах, что определяет экспрессию или репрессию соответствующих генов [13, 14].

Таким образом, с помощью ингибиторного анализа с использованием ТСА установлена взаимосвязь между ГДА и ГАТ и активностью антиоксидантных ферментов АП, Кат и ТР в клетках каллусной культуры *A. thaliana* в норме. Данные изменения могут осуществляться в основном за счет эпигенетической регуляции в экспрессии генов, обусловленной изменениями в активности ГАТ и ГДА. Однако это предположение требует дальнейшей экспериментальной проверки.

Цитированная литература

1. Chen M., Lv S., Meng Y. Epigenetic performers in plants // *Develop. Growth Differ.* – 2010. – **52**, No 6. – P. 555–566.
2. 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.
3. Жадько С.И. H₂O₂-зависимое увеличение активности гистон ацетилтрансферазы и деацетилазы в культуре ткани *Arabidopsis thaliana* при осмотическом стрессе // *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія.* – 2014. – Вип. 3. – С. 15–20.
4. 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. – **87**, No 3. – P. 57–62.
5. Chinnusamy V., Zhu J.-K. Epigenetic regulation of stress responses in plants // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2009. – **12**. – P. 1–7.
6. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // *Plant Cell Physiol.* – 1981. – **22**. – P. 867–880.
7. Aebi H. Catalase *in vitro* // *Methods Enzymol.* – 1984. – **105**. – P. 121–126.
8. Жадько С.И., Воробьева Т.В., Сивахи 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. – С. 43–49.

9. 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.
10. Josling G.A., Selvarajah S.A., Petter M., Duffly M.F. The role of bromodomain proteins in regulating gene expression // *Genes*. – 2012. – **3**. – P. 320–343.
11. Boyko A., Kovalchuk I. Epigenetic control of plant stress response // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2008. – **49**. – P. 61–72.
12. Hollender C., Zhongchi L.Z. Histone deacetylase genes in *Arabidopsis* development // *J. Int. Plant Biol.* – 2008. – **50**. – P. 875–885.
13. Zhang X. The epigenetic landscape of plants // *Science*. – 2008. – **320**. – P. 489–492.
14. 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**, No 12. – P. 3345–3353.

References

1. Chen M., Lv S., Meng Y. *Develop. Growth Differ.*, 2010, **52**, No 6: 555–566.
2. Chen Z.J., Tiana L. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2007, **1769**: 295–307.
3. Jadko S.I. *Visnik Charkiv National agrarian Univ. Ser. Biology*, 2014, Iss. 3: 15–20 (in Russian).
4. Jadko S.I. *Ukr. Biochem. J.*, 2015, **87**, No 3: 57–62.
5. Chinnusamy V., Zhu J.-K. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2009, **12**: 1–7.
6. Nakano Y., Asada K. *Plant Cell Physiol.*, 1981, **22**: 867–880.
7. Aebi H. *Methods Enzymol.*, 1984, **105**: 121–126.
8. Jadko S.I., Vorobyova T.V., Syvash A.A. *Visnik Charkiv National agrarian Univ. Ser. Biology*, 2015, Iss. 2 : 43–49 (in Russian).
9. Bradford M.M. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**: 248–254.
10. Josling G.A., Selvarajah S.A., Petter M., Duffly M.F. *Genes*, 2012, **3**: 320–343.
11. Boyko A., Kovalchuk I. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2008, **49**: 61–72.
12. Hollender C., Zhongchi L.Z. *J. Int. Plant Biol.*, 2008, **50**: 875–885.
13. Zhang X. *Science*, 2008, **320**: 489–492.
14. Chen L.T., Luo M., Wang Y.Y., Wu K. *J. Exp. Bot.*, 2010, **61**, No 12: 3345–3353.

Поступило в редакцію 03.03.2016

С.І. Жадько

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ

E-mail: ukrkiev55@mail.ru

Ацетилювання гістонів та активність антиоксидантних ферментів у клітинах калусної культури *Arabidopsis thaliana*

Досліджували участь гістон деацетилази (ГДА) в регуляції активності антиоксидантних ферментів у калусної культури Arabidopsis thaliana в нормі. Встановлено, що зі зниженням активності ГДА за допомогою інгібітора трихостатину А відбувається збільшення активності аскорбат пероксидази, каталази і тіоредоксину. Обговорюються можливі механізми участі ГДА і гістон ацетилтрансферази в епігенетичній регуляції активності досліджуваних ферментів.

Ключові слова: калусна культура *Arabidopsis thaliana*, гістон деацетилаза, гістон ацетилтрансфераза, трихостатин А, аскорбат пероксидаза, каталаза, тіоредоксин.

S. I. Jadko

M. G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: ukrkiev55@mail.ru

Acetylation of histones and activity of antioxidant enzymes in cells of the callus culture of *Arabidopsis thaliana*

Participation of histone deacetylase (HDA) in the regulation of the activity of antioxidant enzymes in callus culture of Arabidopsis thaliana under normal conditions is investigated. It is found that reducing the activity of HDA by inhibitor TCA increases the activities of ascorbate peroxidase (Apx), catalase (CAT), and thioredoxin (Trx). Possible mechanisms of the participation of HDA and histone acetyltransferase (HAT) in the epigenetic regulation of the activity of the investigated enzymes are discussed.

Keywords: callus culture of *Arabidopsis thaliana*, histone deacetylase, histone acetyltransferase, trichostatin A, ascorbate peroxidase, catalase, thioredoxin.