

С.І. ЖАДЬКО

Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, м. Київ, 01601, Україна
ukrkiev55@mail.ru

АКТИВНІСТЬ ТІОРЕДОКСИНУ, ГІСТОН АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗИ І ДЕАЦЕТИЛАЗИ В ЛИСТКАХ ПОВІТРЯНО-ВОДНИХ І НАЗЕМНИХ РОСЛИН *SIUM LATIFOLIUM* ТА *ALISMA PLANTAGO-AQUATICA*

Жацько С.І. Активність тіоредоксину, гістон ацетилтрансферази і деацетилази в листках повітряно-водних і наземних рослин *Sium latifolium* та *Alisma plantago-aquatica*. — Укр. ботан. журн. — 2015. — 72(1): 74—78.

Досліджена активність тіоредоксину (ТР), гістон ацетилтрансферази (ГАТ) і гістон деацетилази (ГДА) у рослин *Sium latifolium* L. і *Alisma plantago-aquatica* L. З'ясовано, що в листках повітряно-водних рослин *S. latifolium*, які ростуть у воді, активність ТР, ГАТ і ГДА в середньому була нижча, ніж у наземних рослин цього ж виду в прибережній зоні. Виявлений взаємозв'язок між активністю ГДА та вмістом активних форм кисню (АФК) у листках повітряно-водних і наземних рослин *A. plantago-aquatica*. Припускається, що ГДА опосередковано бере участь у підтриманні в клітинах певного про-антиоксидантного рівня для контролю за накопиченням там токсичних продуктів АФК, особливо в умовах стресу.

К л ю ч о в і с л о в а: тіоредоксин, гістон ацетилтрансфераза, гістон деацетилаза, активні форми кислюроду, *Sium latifolium*, *Alisma plantago-aquatica*.

Вступ

Важливе значення в адаптації та стрес-реакції рослин належить тіоредоксину (ТР), а також процесам ацетилювання та деацетилювання ядерних гістонів за допомогою гістон ацетилтрансферази (ГАТ) і гістон деацетилази (ГДА) відповідно (Chen et al., 2010b; Meyer et al., 2012).

ТР (КФ 1.8.4.8) — це сімейство низькомолекулярних поліфункціональних редокс протеїнів, що мають у своїй структурі активну дитіол/дисульфідну ділянку і володіють оксидоредуктазною й антиоксидантною активністю.

ТР виявлені майже в усіх відомих організмів і є необхідними для клітинного метаболізму (Meyer et al., 2012; Couturier et al., 2013). Вважається, що ТР — одні з ключових білків у регуляції розвитку оксидативного стресу та стійкості рослин до різних впливів (Santos, Rey, 2006; Bigelow, Squier, 2011). Відомо, що ТР, H_2O_2 та пероксиредоксин (ПР) у стресовій ситуації можуть створювати в клітинах H_2O_2 — ПР — ТР — сенсорно-трансдукторну сигнальну систему (Dietz, 2008; Жацько, 2014).

ГАТ (Histone acetyltransferases, НАТ, КФ 2.3.1.48) — це ферменти, які ацетилюють залишки лізину в «хвостах» ядерних гістонів нуклеосом. У результаті цього змінюється структура хроматину, і «закрита» ДНК стає доступною для ферментів

транскрипції РНК, що зумовлює збільшення експресії генів (Chen, Tiana, 2007).

ГДА (Histone deacetylases, HDAC, К. Ф. 3.5.1.98) — ферменти, які, навпаки, відокремлюють ацетильні групи з ядерних гістонів, унаслідок чого збільшується упаковка ДНК і відповідно зменшується її доступність для транскрипційних факторів, що призводить до транскрипційної репресії (Chen, Tiana, 2007).

Ацетилювання та деацетилювання ядерних гістонів за допомогою ГАТ і ГДА створює в клітинах певні динамічні зміни з глобальною регуляцією експресії генів, яка відповідає різним фізіологічним станам рослин і контролює їхню стрес-реакцію (Chen, Tiana, 2007; Voyko, Kovalchuk, 2008; Chen et al., 2010a).

На підставі вищевикладеного ми припускаємо, що ТР, ГАТ і ГДА також мають важливе значення у процесах росту та розвитку повітряно-водних і наземних рослин одного й того самого виду, зростають в умовах різного водного забезпечення.

Метою досліджень було вивчення активності ТР, ГАТ і ГДА в листках повітряно-водних і наземних рослин *Sium latifolium* (Apiaceae), які зростали у відповідних природних умовах, а також з'ясування взаємозв'язку між активністю ГДА та вмістом активних форм кисню (АФК) у листках *Alisma plantago-aquatica* (Alismataceae) в нормі та за розвитку гострого ПЕГ-індукованого осмотичного стресу.

Об'єкти та методи досліджень

Досліджували листя повітряно-водних і наземних рослин *S. latifolium* та *A. plantago-aquatica*, які, відповідно, зростали у воді та прибережній зоні на р. Псел поблизу смт Велика Багачка Полтавської обл. Рослини викопували з ґрунтом і dopravляли в лабораторію для подальшого вивчення.

Осмотичний стрес спричинювали зануренням листя в 25 % розчин поліетиленгліколю -6000 (ПЕГ) на 3—5 год, після чого одразу визначали активність ТР, ГАТ і ГДА й інтенсивність спонтанної хемілюмінесценції (СХЛ) — як показника рівня вмісту АФК у живих, нативних, клітинах.

Для отримання супернатанту наважку листя швидко гомогенізували в охолоджених ступках з охолодженим розчином, що містив 50 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (рН 7,0), 0,8 % тритон X-100 і 1 % полівінілпіролідону. Відтак гомогенат центрифугували при 17 тис. g протягом 17 хв і в отриманому супернатанті одразу встановлювали активність ТР, ГАТ і ГДА. Всі операції проводили за температури +4° С.

Активність ТР визначали мікрометодом, заснованим на відновленні інсуліну (Kumar, Holmgren, 1999; Жадько, 2014).

Активність ГАТ встановлювали згідно з *протоколом набору для аналізу* (Catalog # K332-100, NAT Activity Colorimetric Assay Kit, BioVision, <http://www.biovision.com>) з певною модифікацією. При цьому використовували 90 мкг білка клітинного гомогенату й інкубували реакційну суміш протягом 5—6 год, після чого до 108 мкл пофарбованого зразка додавали 142 мкл води, щоб довести загальний об'єм до 250 мкл. Відтак вимірювали оптичну густину спектрофотометром СФ-2000 за 440 нм. Активність ГАТ визначали у відносних одиницях оптичної густини на мкг білка.

Активність ГДА встановлювали згідно з *протоколом набору для аналізу* (Catalog # K331-100, Colorimetric HDAC Activity Assay Kit, BioVision, <http://www.biovision.com>) також з певною модифікацією: використовували 270 мкг білка клітинного гомогенату; інкубували 3 год, відтак до 110 мкл пофарбованого зразка додавали 140 мкл води (разом 250 мкл) і вимірювали оптичну густину на СФ-2000 за 405 нм. Активність ГДА визначали у відносних одиницях оптичної густини на мкг білка.

Роль ГДА в регуляції вмісту АФК вивчали за допомогою інгібіторного аналізу із застосуванням трихостатину А (ТСА). Для цього 2000 мг листя за-

нурювали на 1 год в 5 мкмоль розчину ТСА. Після цього в одній частині листя (близько 1000 мг) одразу визначали активність ТР, ГАТ, ГДА й інтенсивність СХЛ. Іншу частину листя також одразу, в присутності ТСА, вмішували в 25 % розчин ПЕГ, надалі як ТСА + ПЕГ, і через 3—5 год встановлювали активність ТР, ГАТ і ГДА.

Інтенсивність СХЛ визначали на підставі дослідів (Жадько, 2012). Досліджувані нативні листки швидко відрізали від рослин і вмішували в кювету та спеціальну камеру до хемілюмінометра ХЛМЦ-01. За 20 хв, після «ефекту висвічування хлорофілу», вимірювали інтенсивність СХЛ, яку визначали в імпульс/сек/гр сирої ваги листя.

Вміст білка встановлювали за методом Бредфорда (Bradford, 1976). Повторюваність експериментів — три—п'ятиразова. Отримані дані опрацьовували статистично (Плохинский, 1970). На рисунках наведені середні значення та їхні стандартні похибки/відхилення. Достовірність відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Дані обробляли за допомогою програми «Microsoft Excel». Обговорюються ефекти, достовірні за $P \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

У нормі в листках повітряно-водних рослин *S. latifolium*, що зростали у воді, активність ТР, ГАТ і ГДА в середньому була такою: 225—235 пікомоль/мг білка, 12—17 і 22—26 ум. од./мкг білка відповідно. Тоді як у листках наземних рослин, які росли в прибережній зоні, активність ТР, ГАТ і ГДА виявилася достовірно вищою в середньому на 19—24 % (рисунки 1—3).

У наступній серії експериментів ми досліджували роль ГДА в регуляції вмісту АФК у листках повітряно-водних і наземних рослин *A. plantago-aquatica* в нормі та за розвитку гострого осмотичного стресу. Під впливом інгібітора ТСА в нормі у повітряно-водних і наземних рослин певною мірою збільшувалась інтенсивність СХЛ стосовно контролю (рис. 4). Більш виражене підвищення СХЛ спостерігалось, коли в цих рослин перед дією ПЕГ активність ГДА інгібували за допомогою ТСА (рис. 4).

Отримані дані свідчать, що в листках повітряно-водних рослин *S. latifolium*, які зростають у воді, активність ТР, ГАТ і ГДА в середньому була нижчою, ніж у наземних рослин у прибережній зоні. Встановлено також, що ГДА прямо або опосередковано бере участь у регуляції вмісту АФК у нормі

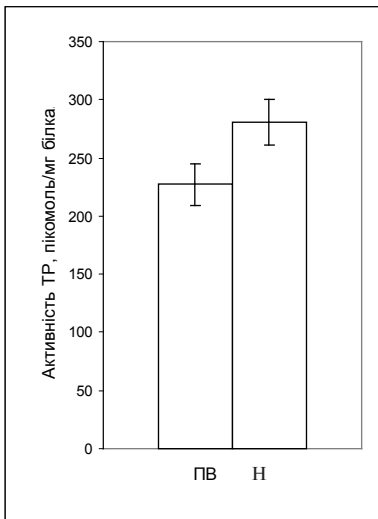


Рис. 1. Зміни активності тіоредоксину (ТР) у листках повітряно-водних (ПВ) і наземних (Н) рослин *Sium latifolium*

Fig. 1. Changes of the thiorredoxin (TR) activity in leaves of aerial-aquatic (AA) and terrestrial (T) plants of *Sium latifolium*

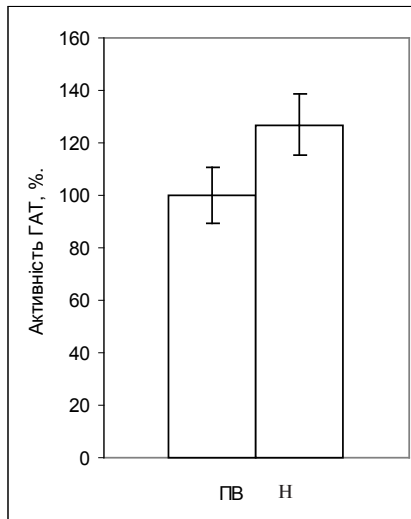


Рис. 2. Зміни активності гістон ацетильтрансферази (ГАТ) (% до контролю) у листках повітряно-водних (ПВ) і наземних (Н) рослин *Sium latifolium*

Fig. 2. Changes of the histone acetyltransferase (HAT) activity (% to control) in leaves of aerial-aquatic (AA) and terrestrial (T) plants of *Sium latifolium*

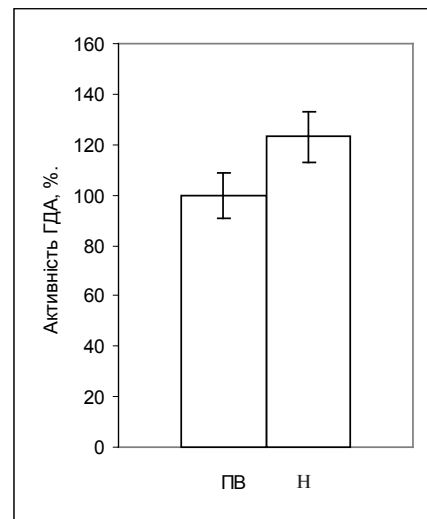


Рис. 3. Зміни активності гістон деацетилази (ГДА) (% до контролю) у листках повітряно-водних (ПВ) і наземних (Н) рослин *Sium latifolium*

Fig. 3. Changes of the histone deacetylase (HDAC) activity (% to control) in leaves of aerial-aquatic (AA) and terrestrial (T) plants of *Sium latifolium*

й особливо за розвитку гострого осмотичного стресу в листках повітряно-водних і наземних рослин *A. plantago-aquatica* (рисунки 1—4).

Нижчий рівень активності ТР, ГАТ і ГДА в листках повітряно-водних рослин *S. latifolium* насамперед можна пояснити особливістю їхнього метаболізму, фізіологічним станом і різними умовами водозабезпечення (рисунки 1—3). Відомо, що рівень активності ТР (Meyer et al., 2012), ГАТ і ГДА (Chen,

Tіana, 2007; Zhang, 2008) відповідає певному фізіологічному стану рослин і має органно-, тканинно- і видоспецифічність.

Виявлений взаємозв'язок між активністю ГДА і вмістом АФК у листках повітряно-водних і наземних рослин *A. plantago-aquatica* характерний і для клітин тварин. Зокрема, S. Sun зі співавторами (Sun et al., 2014) за допомогою інгібіторного аналізу з використанням ТСА показали взаємозв'язок

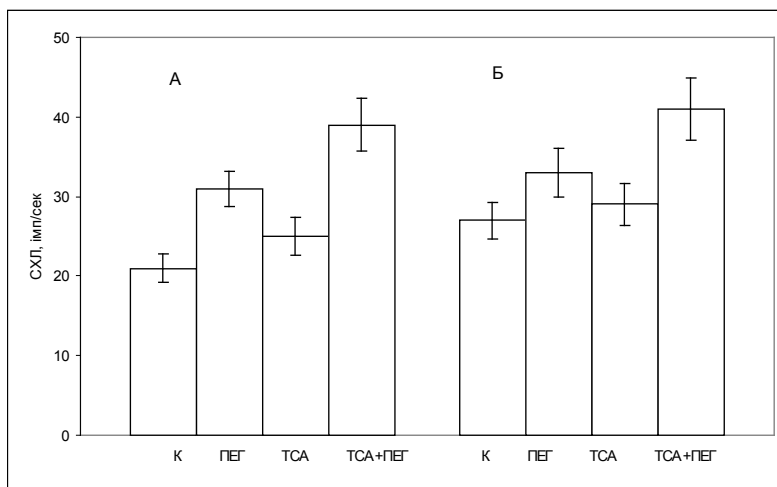


Рис. 4. Інтенсивність спонтанної хемілюмінесценції (СХЛ) (імпульс/сек/гр сирової ваги) листя повітряно-водних (А) і наземних (Б) рослин *Alisma plantago-aquatica* за дії ПЕГ, ТСА, ТСА + ПЕГ. К — контроль

Fig. 4. Spontaneous chemiluminescence (SChL) intensity (impulse/sec/gram raw weight) in leaves of aerial-aquatic (A) and terrestrial (B) plants of *Alisma plantago-aquatica* under polyethylene glycol (PEG), trichostatin A (TSA) and TSA+PEG. C — control

між ГДА і вмістом АФК, але дослідники не обговорювали механізм такої взаємодії.

Пряма участь ГДА в регуляції вмісту АФК навряд чи можлива, оскільки ГДА не володіє відновним потенціалом, характерним для антиоксидантних ферментів. Однак ГДА може брати активну участь у регуляції опосередковано, через зміни в деацетилюванні гістонів із відповідними змінами в експресії генів, які відповідають за зниження продукції АФК і збільшення антиоксидантної активності. При цьому ГДА може брати участь у підтриманні певного про-антиоксидантного рівня, щоб запобігти надмірному накопиченню в клітинах токсичних продуктів АФК і блокувати розвиток оксидативної деструкції, особливо в разі стресів.

У рослин є чимало різних ізоформ ГДА і ГАТ, отож слід враховувати, які саме з цих ізоформ можуть бути задіяні в стрес-реакції. Адже кожна з них бере участь у деацетилюванні й ацетилюванні певних залишків лізину в гістонах, що визначає експресію або репресію конкретних генів (Chen, Tiana, 2007; Chinnusamy, Zhu, 2009).

Відомо, що поряд з інгібуванням ГДА за допомогою ТСА з часом також відбувається гіперацетилювання гістонів. Це слід враховувати в інтерпретації даних у випадках застосування інгібітору ТСА.

Слід зазначити більш виражену реакцію СХЛ у повітряно-водних рослин *A. plantago-aquatica* під дією ПЕГ і ТСА + ПЕГ (рис. 4). Повітряно-водні рослини, що зростають у воді, можуть бути менш адаптованими до дегідратації (Кордюм и др., 2003) і тому вони гостріше реагують на дію осмотика, виявляючи більш виражену ранню реакцію в змінах про-антиоксидантного стану. Наземні рослини, які пристосованіші до дефіциту вологи та коливань її показників у зовнішньому середовищі, меншою мірою відповідають змінами інтенсивності СХЛ, особливо на вплив осмотиків, зокрема ПЕГ. Раніше ми встановили, що в листках повітряно-водних рослин *A. plantago-aquatica*, які мають нижчий рівень антиоксидантної активності, більше зростають вміст H_2O_2 й активність антиоксидантних ферментів аскорбат пероксидази і каталази, ніж у наземних під впливом ПЕГ (Жадько и др., 2011). Відомо, що рослини з вищим рівнем антиоксидантної активності можуть відповідати на один і той самий стрес меншою амплітудою пероксидації (Колупаев, Карпец, 2010). Також показано, що рослини *A. plantago-aquatica*, які зростають у воді

(повітряно-водні), і на суходолі (наземні), мають різні рівні антиоксидантної активності, інтенсивності пероксидації та водного потенціалу (Жадько и др., 2011).

Висновки

1. У листках повітряно-водних рослин *S. latifolium*, що зростають у воді, активність ТР, ГАТ і ГДА в середньому нижча, ніж у наземних рослин у прибережній зоні. Це можна пояснити особливістю їхнього метаболізму, фізіологічним станом і різними умовами водозабезпечення.

2. Виявлено взаємозв'язок між активністю ГДА і вмістом АФК у листках повітряно-водних і наземних рослин *A. plantago-aquatica*. З цього випливає, що ГДА бере участь у підтриманні в клітинах певного про-антиоксидантного рівня для контролю за накопиченням там токсичних продуктів АФК, щоб запобігти розвитку оксидативної деструкції, особливо в разі стресу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Жадько С.И., Воробьева Т.В., Сиваш А.А., Климчук Д.А. Про-антиоксидантний статус листків рослин *Alisma plantago-aquatica* L. при осмотическом стрессе // Наук. зап. Тернопільського. нац. пед. ун-ту. Сер. біол. — 2011. — 4 (49). — С. 99 — 103.
- 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. нац. аграрн. ун-ту. Сер. біол. — 2012. — Вип. 3 (27). — С. 58—64.
- Жадько С. Ранне збільшення вмісту H_2O_2 і активності пероксиредоксину й тіоредоксину в культурі тканини *Arabidopsis thaliana* при осмотичному стресі різної інтенсивності // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. — 2014. — Вип. 64. — С. 287—292.
- Жолупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. — Киев: Основа, 2010. — 350 с.
- Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В. и др. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. — Киев: Наук. думка, 2003. — 277 с.
- Плохинский Н.А. Биометрия. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1970. — 367 с.
- Bigelow D. J., Squier T. C. Thioredoxin-dependent redox regulation of cellular signaling and stress response through reversible oxidation of methionines // Mol. Biosyst. — 2011. — 7(7). — P. 2101—2109.
- Boyko A., Kovalchuk I. Epigenetic control of plant stress response // Environ. and Molecular Mutagenesis. — 2008. — 49(1). — 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. — **72**. — P. 248–254.
- Chen L.T., Luo M., Wang Y.Y., Wu K. Involvement of *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 in ABA and salt stress response // *J. Experimental Botany.* — 2010a. — **61**(12). — P. 3345–3353.
- Chen M., Lv S., Meng Y. Epigenetic performers in plants // *Develop. Growth Differ.* — 2010b. — **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. — **1769**. — P. 295–307.
- Chinnusamy V., Zhu J.-K. Epigenetic regulation of stress responses in plants // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 2009. — **12**. — P. 1–7.
- Couturier J., Chibani K., Jacquot J. P., Rouhier N. Cysteine-based redox regulation and signaling in plants // *Front. Plant Sci.* — 2013. — **4**(105). — P. 1–7.
- Dietz K.-J. Redox signal integration: from stimulus to networks and genes // *Physiol. Plantarum.* — 2008. — **133**. — P. 459–468.
- 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**(9). — P. 1761–1767.
- Meyer Y., Belin C., Delorme-Hinoux V., Reichheld J. P., Riondet C. Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance // *Antioxid. Redox Signal.* — 2012. — **17**(8). — P. 1124–1160.
- Santos C.V.D., Rey P. Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response // *Trends in Plant Science.* — 2006. — **11**(7). — P. 329–334.
- 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. — **9**(3). — P. 1–9.
- Zhang X. The epigenetic landscape of plants // *Science.* — 2008. — **320**. — P. 489–492.

Рекомендує до друку
І.В. Косаківська

Надійшла 18.12.2014 р.

Жадько С.І. Активність тиоредоксина, гистон ацетилтрансферази та деацетилази в листях водно-повітряних та суходольних рослин *Sium latifolium* та *Alisma plantago-aquatica*. — *Укр. ботан. журн.* — 2015. — **72**(1): 74–78.

Інститут ботаники імені Н.Г. Холодного НАН України, м. Київ

Вивчено активність тиоредоксина (ТР), гистон ацетилтрансферази (ГАТ) та гистон деацетилази (ГДА) у рослин *Sium latifolium* та *Alisma plantago-aquatica*. Встановлено, що в листях водно-повітряних рослин *S. latifolium*, що ростуть у воді, активність ТР, ГАТ та ГДА була в середньому нижче, ніж у суходольних рослин цього ж виду в прибережній зоні. Виявлена взаємозв'язок між активністю ГДА та вмістом активних форм кисню (АФК) в листях водно-повітряних та суходольних рослин *A. plantago-aquatica*. Припускається, що ГДА опосередковано бере участь у підтриманні в клітках певного про-антиоксидантного рівня для контролю за накопленням токсичних продуктів АФК, особливо при стресі.

Ключові слова: тиоредоксин, гистон ацетилтрансфераза, гистон деацетилаза, активні форми кисню, *Sium latifolium*, *Alisma plantago-aquatica*.

Jadko S.I. Thioredoxin, histone acetyltransferase, and deacetylase activities in the leaves of aerial-aquatic and terrestrial plants of Sium latifolium and Alisma plantago-aquatica. — *Ukr. Bot. J.* — 2015. — **72**(1): 74–78.

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

Тиоредоксин (ТР), гистон ацетилтрансфераза (ГАТ) та гистон деацетилаза (ГДА) активності в рослин *Sium latifolium* та *Alisma plantago-aquatica* були вивчені. Встановлено, що в листях водно-повітряних рослин *S. latifolium*, що ростуть у воді, ТР, ГАТ та ГДА активності були нижчими, ніж у суходольних рослин цього ж виду в прибережній зоні. Встановлено зв'язок між активністю ГДА та вмістом реактивних форм кисню (АФК) в листях водно-повітряних та суходольних рослин *A. plantago-aquatica*. Припускається, що ГДА опосередковано бере участь у підтриманні певного про-антиоксидантного рівня в клітках для контролю за накопленням токсичних АФК, особливо при стресі.

Ключові слова: тиоредоксин, гистон ацетилтрансфераза, гистон деацетилаза, реактивні форми кисню, *Sium latifolium*, *Alisma plantago-aquatica*.