

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 доправляли 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) відразу 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

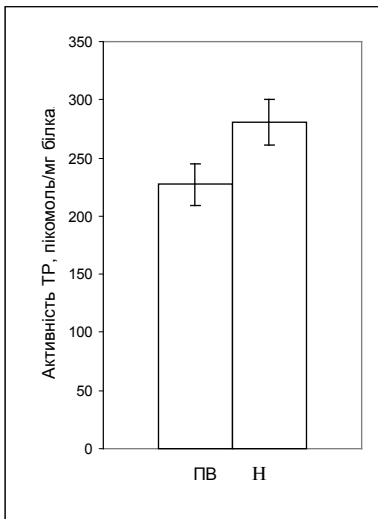


Рис. 1. Зміни активності тіоредоксину (ТР) у листках повітряно-водних (ПВ) і наземних (Н) рослин *Sium latifolium*

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

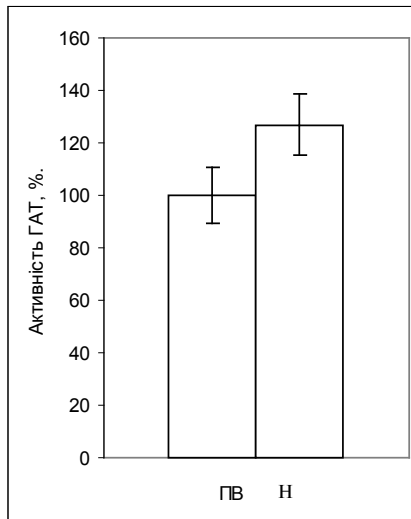


Рис. 2. Зміни активності гістон ацетильтрансферази (ГАТ) (% до контролю) у листках повітряно-водних (ПВ) і наземних (Н) рослин *Sium latifolium*

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

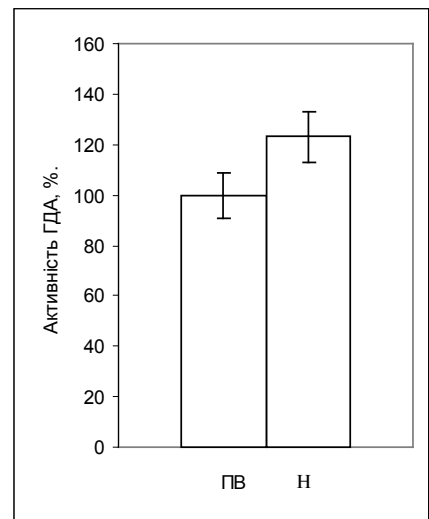


Рис. 3. Зміни активності гістон деацетилази (ГДА) (% до контролю) у листках повітряно-водних (ПВ) і наземних (Н) рослин *Sium latifolium*

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

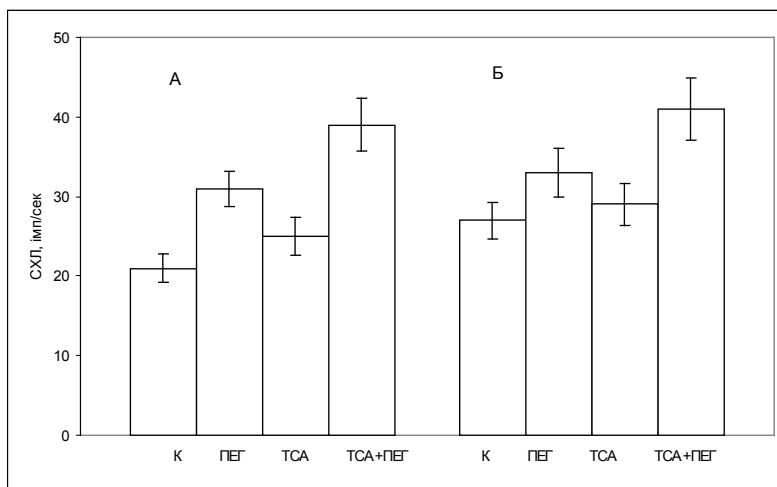


Рис. 4. Інтенсивність спонтанної хемілюмінесценції (СХЛ) (імпульс/сек/гр сирої ваги) листя повітряно-водних (А) і наземних (Б) рослин *Alisma plantago-aquatica* за дії ПЕГ, ТСА, ТСА + ПЕГ. К — контроль

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-вогнєвнх та суходольних рослин *Sium latifolium* та *Alisma plantago-aquatica*.** — Укр. ботан. журн. — 2015. — **72**(1): 74–78.

Інститут ботаніки імені Н.Г. Холодного НАН України, г. Київ

Ісследована активність тиоредоксина (ТР), гистон ацетилтрансферази (ГАТ) та гистон деацетилази (ГДА) у рослин *Sium latifolium* та *Alisma plantago-aquatica*. Установлено, що в листях водно-вогнєвнх рослин *S. latifolium*, рослинних в 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 кислорода (АФК) в листях водно-вогнєвнх та суходольних рослин *A. plantago-aquatica*. Предполагається, що ГДА опосередковано участвує в підтриманні в клітках визначеного про-антиоксидантного рівня для контролю за накопленням там токсических продуктів АФК, особливо при стрессах.

*Ключевые слова:* тиоредоксин, гистон ацетилтрансфераза, гистон деацетилаза, активные формы кислорода, *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

Thioredoxin (TR), histone acetyltransferase (HAT), and histone deacetylase (HDAC) activities in plants of *Sium latifolium* and *Alisma plantago-aquatica* have been investigated. It is established that in the leaves of aerial-aquatic plants of *S. latifolium* growing in water, the TR, HAT and HDAC activities were lower than in terrestrial plants of the same species growing in the coastal zone. Relationship between the HDAC activity and reactive oxygen species (ROS) content in leaves of aerial-aquatic and terrestrial plants of *A. plantago-aquatica* was discovered. It is supposed that the HDAC is indirectly involved in maintaining of some pro-antioxidant level in cells to control accumulation of toxic ROS, especially under stress conditions.

*Keywords:* thioredoxin, histone acetyltransferase, histone deacetylase, reactive oxygen species, *Sium latifolium*, *Alisma plantago-aquatica*.