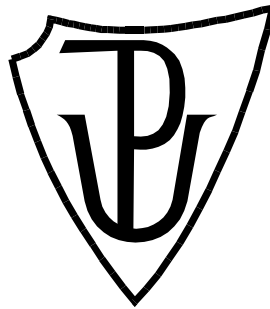


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Úloha histondeacetylas v odpovědích rostlin
na mikrobiální elicitory**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Martina Janků
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok:	2016

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 25. 4. 2016

Martina Janků

Ráda bych velmi poděkovala vedoucímu práce doc. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za odborné vedení, ochotu, cenné rady a konzultace při vypracování experimentální části, stejně jako za poskytnutí materiálů pro teoretickou i praktickou část této diplomové práce.

Rovněž bych moc ráda poděkovala Mgr. Lucii Činčalové, Ph.D., Mgr. Tereze Tiché a Mgr. Pavle Satkové, stejně jako ostatním z kolektivu Katedry biochemie, za všestranné rady, ochotu a vstřícný přístup při vypracovávání experimentální části diplomové práce.

Také děkuji za spolupráci Ing. Beátě Petrovké, Ph.D. z Ústavu experimentální botaniky při poskytování materiálu rostlinných jader.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Martina Janků
Název práce	Úloha histondeacetylas v odpovědích rostlin na mikrobiální elicitory
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Histondeacetylas (HDAC) jsou enzymy ze třídy hydrolas, které jsou zapojeny v několika biologických procesech. Jejich primárním substrátem jsou acetylované lysiny histonů, avšak prostřednictvím HDAC dochází k deacetylaci i nehistonových proteinů. Základní funkcí HDAC je tedy regulace transkripce genů. Pro specifickou rodinu rostlinných HDAC, HD-tuiny, bylo popsáno zapojení ve fyziologických procesech rostlin i v jejich odpovědi na stresové podmínky. HD-tuiny tabáku vystupují jako negativní regulátory při buněčné smrti vyvolané kryptoginem, elicitem sekretovaným oomycetami *Phytophthora cryptogea*, spouštějícím obrannou reakci tabáku.

Cíli experimentální části práce byla nejprve optimalizace metod pro stanovení aktivity HDAC typu 2 a jejich detekci v rostlinném materiálu pomocí Western blotu. Pro stanovení aktivity HDAC byla zavedena v závislosti na typu vzorku metoda fluorimetrická a spektrofotometrská. Metodou Western blot byly v jaderných extraktech tabáku detekovány potenciální tabákové HD-tuiny. Poté bylo zkoumáno zapojení HDAC v mechanismu buněčné smrti u buněčné kultury a listů tabáku po aplikaci kryptogeinu. Rovněž byla věnována pozornost funkci HDAC během regenerace protoplastů tabáku. U listů tabáku po aplikaci kryptogeinu bylo pozorováno snížení enzymové aktivity HDAC, u tabákových buněk po vztažení na jejich životnost během prvních 4 hodin od aplikace 5nM kryptogeinu byl sledován nárůst aktivity HDAC, po 24 hodinách pokles. Během regenerace protoplastů byly pozorovány změny aktivity HDAC a vliv trichostatinu A, inhibitoru HDAC, naznačující významnou roli HDAC během daného procesu. Předložená diplomová práce tak napomáhá k objasnění zapojení a významnosti této skupiny enzymů v mechanismech buněčné smrti a regeneračních procesů u rostlin.

Klíčová slova	Histondeacetylas, HD-tuiny, elicitory, kryptogein, <i>N. tabacum</i> cv. Xanthi, životnost buněk, protoplasty
Počet stran	125
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Martina Janků
Title	Role of histodeacetylases in plant responses to microbial elicitors
Type of thesis	Master
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2016

Abstract

Histone deacetylases (HDACs), enzymes from the class of hydrolases, are involved in many biological processes. Primary substrates of HDACs are acetylated lysines of histones, however HDACs also catalyze deacetylation of nonhistone proteins. The main function of HDACs is regulation of gene transcription. For HD-tuins, a specific family of plant HDACs, their involvement in plant's physiological processes and also in responses to stress conditions was demonstrated. HD-tuins are negative regulators of cryptogein-induced cell death. Cryptogein is elicitor secreted by the oomycete *Phytophthora cryptogea*, that triggers tobacco defence responses.

The aims of experimental part of this thesis included optimization of methods of HDAC activity measurement and their detection in plant's material by Western blot. Fluorimetric and spectrophotometric assays for HDAC activity were established depending on the type of samples. Potential tobacco HD-tuins were detected in nuclei extracts by Western blot analysis. Thereafter HDACs were tested during cell death mechanisms in tobacco cell suspensions and leaves after cryptogein treatments. Functions of HDACs during protoplast regenerations were also examined. Measurements of HDAC activities in tobacco leaves showed decreased HDAC activity after cryptogein treatment. HDAC activity in tobacco cells was increased during four hours after cryptogein treatment (5nM cryptogein), whereas detected HDAC activity after 24 hours was decreased. HDAC activity was also correlated to the viability of cells. During regeneration of protoplasts changes in HDAC activity were observed. Influence of trichostatin A, an inhibitor of HDACs, was also tested. Probable functions of HDAC during the process of regeneration have been highlighted. The results of this thesis contribute to explain involvement and important role of enzymes from HDAC family in the mechanisms of cell death and regeneration processes in plants.

Keywords	Histone deacetylases, HD-tuins, elicitors, cryptogein, <i>N. tabacum</i> cv. Xanthi, cell viability, protoplasts
Number of pages	125
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Posttranslační modifikace histonů	2
2.1.1 Acetylace a deacetylace histonů	3
2.1.2 Specifita HAT a HDAC aktivity	3
2.2 Histondeacetylasy typu HD-tuinů	4
2.2.1 Struktura HD-tuinů	5
2.2.1.1 N-terminální doména	6
2.2.1.2 Centrální doména	7
2.2.1.3 C-terminální doména	7
2.2.1.4 Posttranslační modifikace HD-tuinů	8
2.2.2 Lokalizace HD-tuinů	8
2.2.3 Fylogeneze HD-tuinů	9
2.2.3.1 HD2 u jednoděložných a dvouděložných rostlin	9
2.2.3.2 HD2 u huseníčku (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	10
2.2.3.3 HD2 u kukuřice (<i>Zea mays</i>)	12
2.2.3.4 HD2 u rýže (<i>Oryza sativa</i>)	14
2.2.3.5 HD2 u ječmene (<i>Hordeum vulgare</i>)	14
2.2.3.6 HD2 u tabáku (<i>Nicotiana tabacum</i>)	14
2.2.3.7 HD2 u rajčete a brambory (<i>Solanum spp.</i>)	15
2.2.3.8 HD2 u dalších rostlin	16
2.2.4 Exprese HD-tuinů	16
2.2.5 Biologické funkce rostlinných HDAC	17
2.2.5.1 HD-tuiny ve vývoji semen	19
2.2.5.2 HD-tuiny ve vývoji rostlin	21
2.2.5.3 HD-tuiny v odpovědích na stresové podmínky	22
2.2.5.4 HD-tuiny v odpovědích na abiotický stres	22
2.2.5.5 HD-tuiny v odpovědích na biotický stres	25
2.3 Rostlinné elicitory	26
2.3.1 Elicitiny	27
2.3.1.1 Kryptogein	28
2.3.2 Mechanismus indukce buněčné smrti vyvolané kryptogeinem	30
2.3.2.1 Úloha reaktivních forem kyslíku	30
2.3.2.2 Úloha oxidu dusnatého	31
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1 Materiál a přístroje	34
3.1.1 Chemikálie	34
3.1.2 Přístroje a experimentální vybavení	35
3.1.3 Rostlinný materiál	35
3.1.3.1 Pěstování rostlin	35
3.1.3.2 Kultivace tabákových buněk	36
3.2 Použité metody	36
3.2.1 Příprava rostlinného materiálu	36
3.2.1.1 Příprava extraktů z listů, rostlinných buněk, protoplastů a rostlinných jader	36
3.2.1.2 Aplikace kryptogeinu x24 do listů tabáku	38
3.2.1.3 Příprava protoplastů z tabákových buněk	38

3.2.1.4 Příprava mezofylových protoplastů z listů <i>Nicotiana tabacum</i> metodou „tape-sandwich“	39
3.2.1.5 Mikroskopické pozorování regenerace protoplastů	40
3.2.2 Stanovení aktivity HDAC	40
3.2.2.1 Fluorimetrické stanovení aktivity HDAC	40
3.2.2.2 Spektrofotometrické stanovení aktivity HDAC	41
3.2.2.3 Vliv látek uvolňujících NO na aktivitu HDAC	42
3.2.3 Příprava S-nitrosoglutathionu	43
3.2.4 Stanovení obsahu proteinů metodou Bradfordové	43
3.2.5 Stanovení životnosti tabákových buněk	44
3.2.5.1 Stanovení životnosti pomocí FDA	44
3.2.5.2 Stanovení životnosti pomocí resazurinu	44
3.2.5.3 Stanovení životnosti pomocí MTT	44
3.2.5.4 Stanovení životnosti pomocí neutrální červeně	45
3.2.5.6 Mikroskopické stanovení životnosti	46
3.2.6 SDS-PAGE	46
3.2.6.1 Barvení separovaných proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue	47
3.2.6.2 Barvení separovaných proteinů pomocí SYPRO® Ruby Protein Gel Stain	47
3.2.7 Western blot	48
3.2.8 Izolace jader metodou cell sorting	49
3.2.9 Purifikace jaderných proteinů	50
3.2.9.1 Purifikace proteinů z rostlinných jader s DNAsou I	50
3.2.9.2 Purifikace proteinů z rostlinných jader s benzonasou	50
3.2.10 Detekce S-nitrosylovaných proteinů metodou „biotin switch“	51
3.2.10.1 Analýza S-nitrosylovaných proteinů Western blotem	52
3.2.10.2 Afinitní purifikace S-nitrosylovaných proteinů	53

4 VÝSLEDKY 54

4.1 Optimalizace stanovení aktivity HDAC	55
4.1.1 Fluorimetrické stanovení aktivity HDAC	55
4.1.2 Fluorimetrické stanovení aktivity HDAC v rostlinných extraktech	57
4.1.3 Spektrofotometrické stanovení aktivity HDAC	61
4.2 Detekce HDAC pomocí Western blotu	62
4.3 Izolace rostlinných jader metodou cell sorting	63
4.3.1 Purifikace proteinů z rostlinných jader	63
4.3.1.1 Purifikace proteinů z rostlinných jader s použitím DNasy I	63
4.3.1.2 Purifikace proteinů z rostlinných jader s použitím benzonasy	64
4.3.2 Stanovení aktivity HDAC ve frakci jaderných proteinů	67
4.4 Vliv látek uvolňujících oxid dusnatý (NO) na aktivitu HDAC	68
4.5 Detekce S-nitrosylovaných proteinů	69
4.6 Stanovení životnosti tabákových buněk	70
4.6.1 Výběr metody pro stanovení životnosti tabákových buněk	70
4.6.1.1 Stanovení životnosti metodou s fluoresceindiacetátem	71
4.6.1.2 Stanovení životnosti metodou s resazurinem	71
4.6.1.3 Stanovení životnosti metodou s (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromidem (MTT)	72
4.6.1.4 Stanovení životnosti metodou s neutrální červení	73
4.6.2 Stanovení životnosti tabákových buněk – výběr podmínek pro stanovení	73
4.6.3 Mikroskopické stanovení životnosti tabákových buněk	74
4.7 Stanovení aktivity HDAC v rostlinných extraktech	76
4.7.1 Změny aktivity HDAC a životnosti buněk tabáku vlivem kryptogeinu	77

4.7.2 Změny aktivity HDAC v listech tabáku vlivem kryptogeinu	80
4.8 Změny aktivity HDAC při odstranění a regeneraci buněčné stěny	81
4.8.1 Příprava protoplastů z buněk <i>N. tabacum</i> cv. Xanti	81
4.8.2 Příprava protoplastů z listů <i>N. tabacum</i> cv. Xanti	83
4.9 Studium úlohy HDAC v regeneraci protoplastů	83
4.9.1 Sledování regenerace buněčné stěny pomocí Calcofluor White	83
4.9.1.1 Sledování regenerace buněčné stěny pomocí CW u protoplastů z tabákových buněk	84
4.9.1.2 Sledování regenerace buněčné stěny pomocí CW u protoplastů z listů tabáku	87
4.9.2 Sledování aktivity HDAC během regenerace protoplastů	90
4.9.2.1 Sledování aktivity HDAC během regenerace protoplastů z tabákových buněk	91
4.9.2.2 Sledování aktivity HDAC během regenerace protoplastů z listů	92
5 DISKUZE	93
5.1 Optimalizace stanovení aktivity HDAC	93
5.1.1 Fluorimetrické stanovení aktivity HDAC	94
5.1.2 Spektrofotometrické stanovení aktivity HDAC	94
5.2 Purifikace jaderných proteinů a detekce HDAC pomocí Western blotu	95
5.3 Vliv látek uvolňujících oxid dusnatý na aktivitu HDAC a detekce S-nitrosylovaných proteinů	96
5.4 Výběr metody pro stanovení životnosti tabákových buněk	97
5.5 Vliv kryptogeinu x24 na aktivitu HDAC	99
5.6 Funkce HDAC během regenerace protoplastů	101
6 ZÁVĚR	104
7 LITERATURA	106
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	115

CÍLE PRÁCE

V teoretické části předložené diplomové práce bylo cílem zpracovat literární rešerši

- shrnující obecný význam, vlastnosti a funkce histondeacetylas (HDAC)
- shrnující doposud známé poznatky o rostlinných HDAC typu HD-tuinů včetně jejich struktury, fylogeneze a exprese během vývoje rostlin a v odpovědích na abiotické i biotické stresové podmínky
- zabývající se elicitiny, elicitory proteinové povahy, se zaměřením na mechanismus buněčné smrti indukované kryptogeinem

V experimentální části bylo cíli práce

- optimalizace metody pro stanovení aktivity HDAC fluorimetrickými a spektrofotometrickými metodami a detekci HDAC v rostlinném materiálu metodou Western blot
- studium funkce HDAC v mechanismu buněčné smrti v modelových systémech buněčné kultury a listů tabáku po aplikaci kryptogeinu
- studium úlohy HDAC během mechanismu regenerace protoplastů tabáku

1 Úvod

Histondeacetylasy (HDAC) jsou skupinou enzymů, které jsou vzhledem k povaze svých substrátů, jimiž jsou primárně acetylované lysiny histonů, zapojeny do regulace transkripce genů. Konkrétně jsou funkce HDAC spojovány především s transkripčně umlčeným chromatinem (Allis *et al.*, 2007). Problematika HDAC je v posledních letech poměrně častým předmětem zkoumání. V případě živočišných HDAC jsou tyto enzymy hojně studovány v mechanismu buněčné smrti, kdy je pozornost věnována především jejich inhibitorům jako potenciálním protinádorovým farmakologickým přípravkům (Gallinari *et al.*, 2007). U rostlinných HDAC byla doposud detailně popsána jejich funkce především ve správném vývoji semen (Yano *et al.*, 2013) nebo v odpovědích na stresové podmínky jak abiotického (Han *et al.*, 2016), tak biotického původu (Bourque *et al.*, 2011). Pro HD-tuiny tabáku, specifickou rostlinnou rodinu HDAC (Pandey *et al.*, 2002), bylo popsáno, že vystupují jako negativní regulátory u kryptoginem vyvolané buněčné smrti (Bourque *et al.*, 2011). Zapojení HD-tuinů v systému rostlina-patogen bylo předmětem zkoumání i dalších studií (Ding *et al.*, 2012; Melmaiee *et al.*, 2015).

Kryptogein, asi nejznámější zástupce elicitinů, elictorů proteinové povahy, spouští u tabáku sled událostí vedoucích k hypersenzitivní reakci a nekróze (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Jednou z dílčích událostí nastávajících po aplikaci kryptogeinu je elicitorem indukovaná produkce oxidu dusnatého (NO). Ta je nejspíše regulována nejen prostřednictvím reaktivních forem kyslíku v mechanismu zapojujícím NADPHoxidasu NtRBOHD (Kulík *et al.*, 2015), ale částečně je i pod kontrolou histondeacetylasy typu HD-tuinů (Bourque *et al.*, 2011). Provázanost a přesný mechanismus zmíněné signální dráhy účinků kryptogeinu ale nebyly doposud podrobně prozkoumány. NO rovněž ovlivňuje funkce HDAC, a to prostřednictvím S-nitrosylace. Regulaci HDAC S-nitrosylací byla zatím věnována pozornost opět v případě živočišných enzymů (Nott *et al.*, 2008).

HDAC by také mohly být významně zapojeny v procesech regenerace protoplastů, vzhledem k rozsáhlé strukturální reorganizaci chromatinu, týkající se především dekondenzace heterochromatinu, která se při protoplastizaci odehrává (Ondřej *et al.*, 2009). Na působení HDAC během regeneračních procesů, bylo již také upozorněno ve studiích na živočišných modelech (He *et al.*, 2014).

2 Současný stav řešené problematiky

Ačkoli všechny buňky v organismu obsahují stejnou genetickou informaci zakódovanou v sekvenci DNA, tak se jednotlivé typy buněk a jejich funkce liší. Za to jsou zodpovědné kvalitativní i kvantitativní odlišnosti v expresi genů, která je základem diferenciací buněk. Vzory exprese genů, které charakterizují diferenciované buňky, jsou vytvářeny během vývoje organismu. Buňky tak mohou dědit i informaci, která není zakódována v nukleotidové sekvenci DNA, a tehdy hovoříme o tzv. epigenetické informaci. Geny eukaryotních organismů jsou tedy ovlivňovány i epigenetickými událostmi, mezi které patří methylace DNA anebo modulace struktury chromatinu, která má následně dopad na regulaci exprese genů (Allis *et al.*, 2007).

Obecně geny lokalizované v oblasti kondenzovaného heterochromatinu jsou umlčovány, zatímco geny lokalizované v oblasti rozvolněnějšího euchromatinu jsou přepisovány. Tyto trvalé či přechodné změny struktury chromatinu jsou uskutečňovány různými mechanismy včetně posttranslačních modifikací histonů, reorganizací jednotlivých histonových variant a ATP-dependentních remodelací chromatinu (Allis *et al.*, 2007).

2.1 Posttranslační modifikace histonů

Histony napomáhají nejen poskládání DNA v jádru, ale také pro ně bylo prokázáno, že jsou zapojeny v regulaci exprese genů (Grunstein, 1997). Jaderné histony jsou vysoce konzervované bazické proteiny s globulární doménou, kolem kterých je obtočena DNA. Relativně nestrukturované a flexibilní konce histonů vyčnívají z nukleosomů a jsou předmětem různých posttranslačních modifikací, které mění jejich náboj a následně i funkci (Allis *et al.*, 2007), z nichž nejlépe charakterizované jsou kovalentní modifikace methylace, acetylace a fosforylace. Další modifikace probíhající na histonech jsou ubikvitinylace, sumoylace, ADP ribosylace, deiminace (Thiagalingam *et al.*, 2003), a nekovalentní modifikace isomerace prolinů, která se odehrává na histonu H3 (Nelson *et al.*, 2006). Souhrn modifikací histonů je uchován v epigenetické paměti buňky ve formě tzv. „histonového kódu“, který determinuje strukturu chromatinu a následně i aktivitu genů (Jenuwein a Allis, 2001). V důsledku toho dochází k ovlivnění mnoha biologických procesů včetně již zmíněné buněčné diferenciací, dále vývojových

procesů jako kontroly délky kvetení nebo vývoje semen a reakcí organismů na světelné a teplotní podmínky. Zájem o HDAC stoupá během odpovědi rostlin na biotický a abiotický stres, kdy dochází k zaměření na změny ve struktuře chromatinu jako potencionálního prostředku pro regulaci přirozené imunity rostlin (Chen a Tian, 2007).

2.1.1 Acetylace a deacetylace histonů

Reversibilní posttranslační modifikace proteinů týkající se chemické vazby acetylové skupiny z acetyl-S-CoA k ϵ -aminoskupině lysinu byla poprvé popsána u histonů (Allfrey *et al.*, 1964). Za acetylaci jsou zodpovědné histonacetyltransferasy (HAT) (Gallwitz, 1971) a naopak odstranění acetylové skupiny katalyzují histondeacetylasy (HDAC). Vzhledem ke schopnosti působení i na nehistonové proteiny (např. transkripční faktory nebo koregulátory transkripce), jsou HAT a HDAC obecně označovány jako lysinacetyltransferasy a lysindeacetylasy (Chen a Tian, 2007).

Rané studie zabývající se problematikou těchto enzymů naznačovaly, že acetylace histonů pozitivně koreluje s transkripcí, jelikož se histony nacházejí ve stavu opačném k nižším hladinám acetylace spojovaným s transkripčně umlčeným chromatinem. Nyní se závěry některých studií přiklání k variantě, že aktivátory transkripce zapojují HAT za účelem acetylace nukleosomálních histonů, zatímco transkripční represory zapojují HDAC pro deacetylaci histonů (Liu *et al.*, 2014). Navíc HAT a HDAC jsou často součástí větších komplexů, anebo některé z koaktivátorových či korepresorových proteinů přímo vykazují enzymovou aktivitu těchto proteinů (Kouzarides, 2007).

Acetylace lysinových zbytků ruší jejich pozitivní náboj, čímž redukuje sílu vazby histonových konců k negativně nabitě DNA (Garcia-Ramirez *et al.*, 1995), dochází tak k rozvolnění struktury chromatinu, která se stává přístupnější pro transkripci. Acetylace lysinů na N-koncích histonů je tedy spojována s aktivací genů (Eberharter a Becker, 2002). Navíc acetylací lysinů dochází k vytváření dokovacích míst, mezi které patří např. bromodomény, pro transkripční koaktivátorové proteiny (Kanno *et al.*, 2004).

2.1.2 Specifita HAT a HDAC aktivity

Acetylace histonů je zapojena v řadě buněčných procesů, přičemž odlišné funkce nejspíše vyžadují selektivní acetylaci a deacetylaci specifických histonů a tím i specifických lysinových residuí na individuálních histonech (Turner, 2000). To je

podporováno skutečností, že histony H4 jsou acetylovány na lysinech 5 a 12, ale nikoli v pozici 16 (Chang *et al.*, 1997).

Kromě lysinů, které jsou součástí histonů, jsou potencionálními substráty HAT a HDAC *in vivo* např. chromosomální HMG (*high mobility group*) proteiny, které jsou posttranslačně acetylovány na specifických lysinech *in vivo* (Sterner *et al.*, 1981), nebo mikrotubulární protein α -tubulin acetylovaný na lysinu 40 (Schatten *et al.*, 1988). Pro purifikované HAT bylo identifikováno několik dalších nehistonových substrátů acetylovaných *in vitro*: např. β -podjednotka transkripčního faktoru TFIIE, obě podjednotky transkripčního faktoru TFIIIF (Imhof *et al.*, 1997) a také transkripční protein p53 (Gu a Roeder, 1997). Místně specifické protilátky prokázaly, že definovaná lysinová residua p53 jsou acetylována i *in vivo* (Liu *et al.*, 1999).

Pro rodinu enzymů acetyl-CoAsynthetas bylo prokázáno, že je regulována reversibilní acetylací (Shi a Tu, 2015). U acetylce lysinového residua v aktivním místě acetyl-CoAsynthetasy bylo pozorováno, že dochází k inhibici aktivity enzymu mechanismem zpětnovazebné inhibice v odpovědi na vysokou hladinu acetyl-CoA. Deacetylce těchto enzymů byla katalyzována sirtuiny (rodina HDAC), které obnovily jejich aktivitu (Hallows *et al.*, 2006).

2.2 Histondeacetylasý typu HD-tuinů

Histondeacetylasý (HDAC, EC 3.5.1.98) jsou mezi eukaryotními organismy široce rozšířeny. Jsou přítomny u kvasinek, rostlin i savců. Jedná se o vysoce konzervované proteiny, u kterých fylogenetické a sekvenční charakteristiky umožnily HDAC rozdělit do několika rodin. Savčí histondeacetylasové proteiny mohou být na základě homologie s kvasinkovými HDAC klasifikovány do tří základních rodin: RPD3 (Reduced Potassium Dependency 3), HDA1 a SIR2 (sirtuiny; Silent Information Regulator 2) rodiny (Thiagalingam *et al.*, 2003).

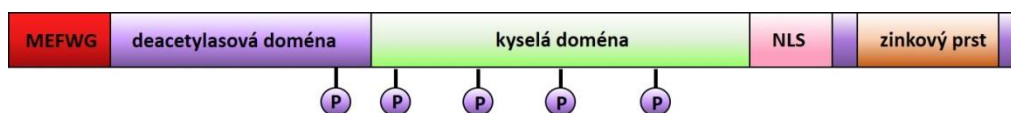
Rostlinné proteiny s předpokládanou histondeacetylasovou aktivitou byly poprvé charakterizovány u hrachu (Sendra *et al.*, 1988). Na základě sekvenční homologie s histondeacetylasami kvasinek jsou rostlinné HDAC, podobně jako savčí, klasifikovány do tří rodin – RPD3/HDA1, SIR2 a HD2 rodiny. Histondeacetylasý typu HD2, taktéž označovány jako HD-tuiny, jsou enzymy, jejichž přítomnost byla doposud popsána pouze u rostlin (Pandey *et al.*, 2002).

HD-tuiny byly poprvé detekovány (López-Rodas *et al.*, 1991) a purifikovány (Brosch *et al.*, 1996) z kukuřice (*Zea mays*) a byly charakterizovány jako kyselé jaderné fosfoproteiny, které mohou regulovat ribosomální strukturu chromatinu a jeho funkce (Lusser *et al.*, 1997). Podle výzkumů jsou tyto proteiny často spojovány s vývojem rostlin, např. vývojem semen (Wu *et al.*, 2000) a klíčením semen (Yano *et al.*, 2013), a s odpověďmi rostlin na stresové faktory (Sridha a Wu, 2006; Colville *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012; Bourque *et al.*, 2011). Pro rostliny specifická třída histondeacetylasy může tedy odrážet odlišnosti ve vývoji a v odpovědích rostlin na environmentální podmínky od kvasinek a savců (Pandey *et al.*, 2002).

2.2.1 Struktura HD-tuinů

HD-tuiny se ve své struktuře liší od rodin RPD3/HDA1 a SIR2, ale jejich sekvence je částečně homologní s peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerasami (PPIasami). Konkrétně vykazují podobnost s FKBP rodinou peptidyl-prolyl *cis-trans* isomeras hmyzu a kvasinek (Aravind a Koonin, 1998), a potom také s jaderným RNA-vazebným proteinem přítomným u *Trypanosomy brucei* (Dangl *et al.*, 2001). Ačkoliv míra konzervace celkové sekvence není příliš vysoká (např. 21 % mezi ZmHD2a kukuřice a FK506-vazebným proteinem 46 (FKBP46) hmyzu z rodu blýskavek (*Spodoptera*), tak tyto proteiny, vzhledem k jejich PPIasovým a RNA vazebným doménám, vykazují podobnost s N-terminálními a kyselými/bazickými doménami HD-tuinů. FKBP proteiny jsou na základě jejich primární struktury klasifikovány do 4 skupin (Himukai *et al.*, 1999), přičemž pouze zástupci skupiny A, kteří jsou převážně lokalizováni v jádře, vykazují homologii k domnělým katalytickým doménám HDAC typu HD2 (Alnemri *et al.*, 1994).

Srovnání aminokyselinových sekvencí HDAC proteinů z *Arabidopsis*, kukuřice a rýže ukázal, že HD-tuiny jsou poskládány ze 3 základních domén (obr. 1): N-terminální oblasti obsahující konzervovaný pentapeptidový motiv MEFWG následovaný doménou pro deacetylaseovou aktivitu; dále z centrální domény bohaté na kyselé aminokyseliny, která je zapojena v regulaci enzymové aktivity; a z variabilní C-terminální domény, která může obsahovat sekvenci jaderného lokalizačního signálu (NLS) (Dangl *et al.*, 2001). C-terminální doména u 6 z 8 analyzovaných HD2 proteinů, obsahovala motiv pro jeden zinkový prst, který je pravděpodobně zapojen do interakcí protein-protein nebo DNA-protein (Ma *et al.*, 2013).



Obr. 1 Schematické zobrazení konzervovaných domén u HDAC typu HD-tuinů. (P = předpokládaná fosforylační místa pro kaseinkinasu 2 α)(upraveno podle Grandperret *et al.*, 2014).

Podobně jako u RPD3 rodiny HDAC může být navázání Zn²⁺ předpokladem pro aktivitu HD-tuinů. Doposud sice nebyl předložen přímý důkaz jejich deacetylasové aktivity (Grandperret *et al.*, 2014), ale tato aktivita byla podložena několika nepřímými důkazy s mutacemi anebo inhibicemi HD-tuinů vyúsťujícími v akumulaci histonů a některých jaderných proteinů v hyperacetylované formě (Bourque *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2012).

2.2.1.1 N-terminální doména

HD-tuiny na svém N-konci obsahují pentapeptidový motiv MEFWG (Dangl *et al.*, 2001). Analýza proteinů tabákových buněk hmotnostní spektrometrií (MS) ukázala, že methionin z N-konce může být odstraněn (Bourque *et al.*, 2011). Významná je přítomnost druhé aminokyseliny tohoto motivu – kyseliny glutamové. Podle N-koncového pravidla (Gonda *et al.*, 1989) je přítomnost glutamové kyseliny na N-konci spojována s relativně krátkým poločasem života (half-life). HD-tuiny mohou tedy vykazovat krátký poločas života, který se pravděpodobně podílí na kontrole jejich biologických funkcí. To bylo potvrzeno u HD2 z *Nicotiana tabacum*, u nichž jsou poločasy života výrazně zkráceny v odpovědích na biotické stresy (Grandperret *et al.*, 2014).

Dále jsou v aminokyselinové sekvenci N-terminální oblasti přítomny dvě konzervovaná aminokyselinová residua, u kterých se předpokládá, že jsou kritickými pro katalytickou aktivitu HDAC. Jedná se o histidin v pozici 25, který je obklopen hydrofobními aminokyselinami, a aspartát (nebo glutamát u AtHD2c) v pozici 72 (Aravind a Koonin, 1998). Dále je pro deacetylasovou aktivitu důležitá kyselina glutamová v pozici 69 (Dangl *et al.*, 2001). Nové analýzy N-terminální deacetylasové domény HD2 u několika rostlinných genomů ukazují, že histidin v pozici 25 je součástí většího konzervovaného HxSQxxL motivu. Deacetylasová doména HD-tuinů se

výrazně neshoduje s doménami u zbylých rodin HDAC, což by mohlo poukazovat na skutečnost, že jednotlivé rodiny jsou cíleny na různé proteinové substráty (Ma *et al.*, 2013).

2.2.1.2 Centrální doména

Rozsáhlá centrální doména je bohatá na residua aspartátu. Tato kyselá doména dále obsahuje residua serinů nebo threoninů, pro něž se předpokládá, že jsou fosforylovány kaseinkinasou 2 α (CK2 α). CK2 α je jaderná kinasa, která kontroluje mnoho základních biologických procesů jako je buněčný cyklus, buněčná diferenciaci nebo apoptóza (Litchfield, 2003). U Zm-HD2a bylo prokázáno, že je skutečně substrátem pro CK2 *in vitro* (Lusser *et al.*, 1997).

Pozměněné uspořádání kyselých a bazických úseků má vliv na interakce s histony anebo DNA. Tyto interakce mohou být dále modulovány fosforylací specifických residuí. Porovnáním sekvencí u *Arabidopsis* a kukuřice byla demonstrována odlišnost týkající se rozsahu kyselých úseků a současně počtu a pozic možných fosforylačních míst pro CK2 (např. pozice 6 u AtHD2a a pozice 12 u AtHD2c), což nejspíše souvisí se skutečností, že jednotlivé HDAC mohou být s histony asociovány odlišně (Dangl *et al.*, 2001). Nabité domény jako tyto mohou být nalezeny i u dalších jaderných proteinů včetně nukleolinu, B23 nebo u vzdáleně příbuzného proteinu Nopp44/46 (Lapeyre *et al.*, 1987; Chang a Olson, 1990; Das *et al.*, 1998), což podporuje hypotézu o funkci proteinů s těmito doménami v jaderném cílení (Trimbur *et al.*, 1999). Pro centrální doménu HD-tuinů je také experimentálně prokázáno, že je zodpovědná za odlišnosti pozorované zdánlivé molekulové hmotnosti HD2 proteinů o předpovězené hmotnosti při polyakrylamidové elektroforéze (SDS-PAGE) (Bourque *et al.*, 2011).

2.2.1.3 C-terminální doména

Okolo 60 % doposud známých HD-tuinů obsahuje jako součást C-terminální domény motiv zinkového prstu, které patří mezi C2H2 typy Zn-prstů (Ciftci-Yilmaz a Mittler, 2008). Vzhledem k povaze a vzdálenosti residuí komplexujících Zn (CX2CX2-4FX5LX2HX3-5H) patří tyto motivy konkrétně do TFIIIA typu C2H2 zinkových prstů, které jsou ve většině případů součástí DNA-vazebných domén a jsou přímo zapojeny v rozpoznávání specifických sekvencí DNA (Takatsuji, 1998). Navázání ke specifické sekvenci DNA se uskutečňuje přes konzervovanou sekvenci QALGGH (Isernia *et al.*,

2003). Vzhledem k faktu, že analyzované HD2 proteiny postrádají tuto konzervovanou QALGGH sekvenci a nejspíše neobsahují žádný další sekvenční motiv potřebný pro navázání k DNA, jsou Zn-prsty pravděpodobně zapojeny v interakcích protein-protein, kdy jsou samotné zinkové prsty pro dané interakce dostatečné (Mackay a Crossley, 1998). To je v souladu s výsledky, které ukázaly, že ZmHD2a je součástí 400kDa komplexu *in vivo* (Brosch *et al.*, 1996), a také další zástupci HDAC jsou součástí některých regulačních komplexů (Johnson a Turner, 1999). Ačkoli tyto studie nebyly přímo zaměřeny na zapojení zinkových prstů v protein-proteinových interakcích, pro HD2c z *Arabidopsis* byla potvrzena interakce s HDA6 a vazba k histonu H3 při regulaci ABA-závislých genů (Luo *et al.*, 2012). Obdobně byla prokázána fyzická interakce DIHD2 z ovoce longan (*Dimocarpus longan*) s DIERF1–ethylen responzivním faktorem při regulaci senescence (Kuang *et al.*, 2012).

2.2.1.4 Posttranslační modifikace HD-tuinů

HDAC obsahují mnoho serinových a threoninových residuí, která mohou podléhat fosforylacím, což má následně dopad např. na jejich enzymovou aktivitu. Např. u HD1 z kukuřice bylo popsáno, že u fosforylované formy HD1 dochází ke změně substrátové specifity pro purifikované individuální histony: u fosforylované formy HD1 dochází ke zvýšení specifity pro histon H2A a naopak ke snížení specifity pro histon H3 ve srovnání s formou HD1, která byla vystavena působení alkalické fosfatasy (Brosch *et al.*, 1992). Taktéž u tabákových NtHD2a a NtHD2b se nacházejí sekvence s fosforylačními místy pro CK2, přičemž fosforylace obou isoform NtHD2 nastává v jádře během aktivace jaderné CK2 (Bourque *et al.*, 2011).

Fosforylace proteinů asociovaných s histony je také významná, jak bylo demonstrováno u retinoblastomového proteinu, což je transkripční korepresor, který zapojuje HDAC za účelem umlčení genů aktivních v S-fázi buněčného cyklu, a které jsou regulovány transkripčními faktory EF2 (Weinberg, 1995). U rostlin doposud situace s posttranslačními modifikacemi HD-tuinů není tolik zmapována jako u živočišných enzymů, pro které byly popsány taktéž fosforylace (Cai *et al.*, 2001), acetylace (Qiu *et al.*, 2006), ubikvitinylace (Hook *et al.*, 2002), sumoylace (David *et al.*, 2002) a S-nitrosylace (Nott *et al.*, 2008).

2.2.2 Lokalizace HD-tuinů

Histondeacetylasy jsou lokalizovány v jádře, cytoplasmě a mohou mezi těmito

kompartmenty přecházet. HDAC jsou také přítomny v organelách, jako jsou mitochondrie, chloroplasty nebo endoplasmatické retikulum (Ma *et al.*, 2013). Odlišná subcelulární lokalizace může být spojována s jejich různými buněčnými funkcemi. Obecně jsou HDAC primárně lokalizovány v jádře za účelem regulace jaderných histonů – jejich struktury a funkcí. HDAC mohou v jádře existovat jako rozpustné, navázané na chromatin anebo ve formě asociované s matrix, přičemž zastoupení každé formy může být odlišné. Např. během klíčení embrya u kukuřice existuje HD-1A převážně jako rozpustná forma a HD-2 navázána na chromosom, zatímco HD-1B existuje jako forma rozpustná i navázaná na chromosom v závislosti na stádiu klíčení (Grabher *et al.*, 1994).

Lokalizace HDAC v chloroplastech a mitochondriích odráží jejich role v centrálních metabolických drahách včetně fotosyntézy. HD2 proteiny, na rozdíl od RPD3/HDA1 proteinů, jsou specificky lokalizovány v jadérku a mohou být zapojeny v regulaci struktury a funkcí ribosomálního chromatinu (Lusser *et al.*, 1997). Vnitrobuněčné lokalizace HDAC jsou také variabilní v různých rostlinných pletivech (Ma *et al.*, 2013).

2.2.3 Fylogeneze HD-tuinů

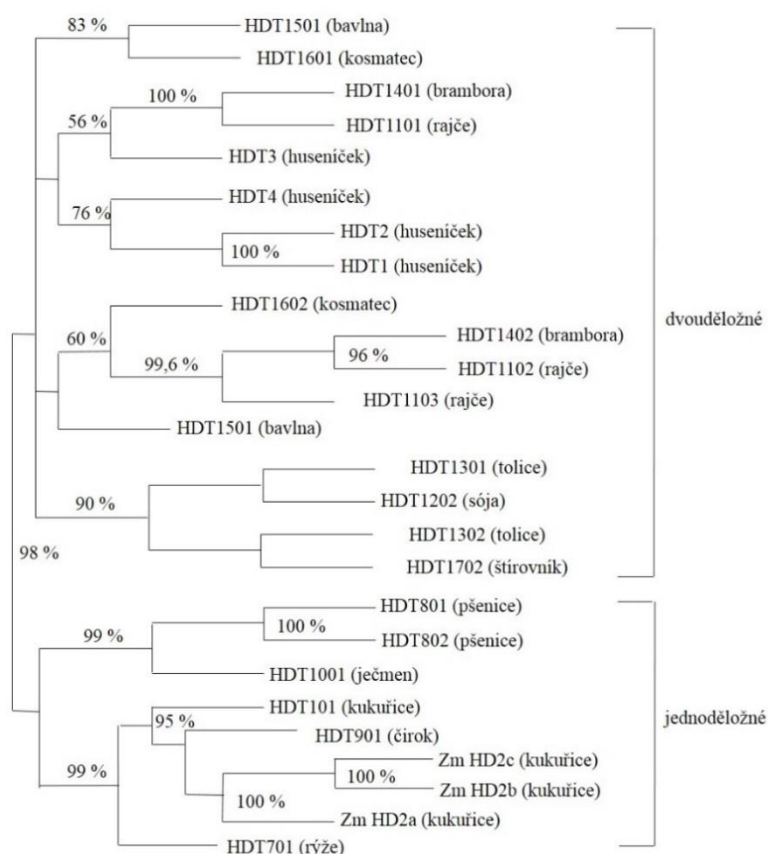
Podle porovnání doposud sekvenovaných genomů patří HD-tuiny do malých rodin genů, které jsou převážně složeny ze dvou (např. u rýže nebo révy vinné) nebo čtyř (u *Arabidopsis*) členů. Většina těchto HD-tuinů má podobnou strukturu s již zmíněnými konzervovanými doménami (Grandperret *et al.*, 2014).

Fylogenetická analýza HD-tuinů u *Arabidopsis*, kukuřice a rýže a dalších rostlinných genů pro HD2 umožnila sekvence pro jednoděložné a dvouděložné rostliny rozdělit na dvě skupiny HD2, což naznačuje, že jednoděložné a dvouděložné rostliny mohou mít různé předky anebo že HD-tuiny u jednoděložných rostlin mohou být vyvinuty a diverzifikovány z dvouděložných homologů (Pandey *et al.*, 2002).

2.2.3.1 HD2 u jednoděložných a dvouděložných rostlin

Byla provedena fylogenetická analýza nukleotidových sekvencí kódujících konzervované motivy uvnitř domén HDAC, která umožnila vytvořit fylogenetický strom (obr. 2). Analýza za použití proteinových sekvencí poskytla fylogenetický strom s podobnou topologií a stejnými hlavními znaky. Sekvence HD-tuinů jednoděložných a dvouděložných rostlin jsou odděleny do dvou odlišných větví, což je

silně podporováno statistickou analýzou. Z analýz vyplývá, že jediný gen kódující HD2 u předků jednoděložných a dvouděložných byl základem pro všechny HD2 proteiny v dané rodině. Dále analýzy naznačují, že znaky pro klasifikaci do skupiny dvouděložných jsou v souladu s předpokládanou duplikací genů, která nastala před diverzifikací dvouděložných rostlin během evoluce, ze které vznikly rodiny *Solanaceae*, *Malvaceae* a *Aizoaceae* (Pandey *et al.*, 2002).



Obr. 2 Fylogenetický strom HD-tuinů u jednoděložných a dvouděložných rostlin (upraveno podle Pandey *et al.*, 2002).

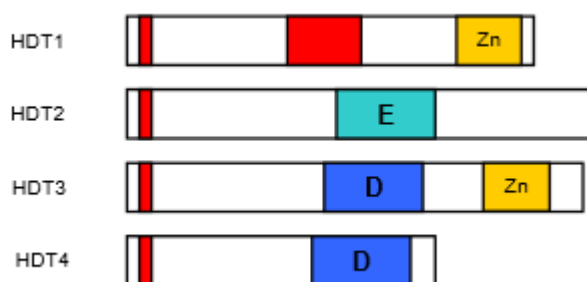
2.2.3.2 HD2 u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*)

Wu *et al.* v roce 2000 identifikovali dvě HDAC typu HD2: AtHD2a a AtHD2b, jejichž aminokyselinové sekvence mezi sebou vykazují 52% sekvenční shodu. AtHD2a dále vykazuje 44% homologii s kukuřičnou ZmHD2, zatímco AtHD2b s kukuřičnou ZmHD2 shodu 46 % (Wu *et al.*, 2000).

Konzervovaná katalytická doména na N-terminálním konci (Lusser *et al.*, 1997; Aravind a Koonin, 1998) byla identifikována u obou isoform AtHD2, u obou HDAC je také přítomna centrální kyselá doména, která vykazuje vysokou sekvenční homologii s jadernými proteiny jiných organismů. Motiv zinkového prstu v C-terminální doméně byl nalezen pouze u isoformy AtHD2a (Wu *et al.*, 2000).

Delece rozsáhlé kyselé domény a domény s předpokládanými katalytickými residui u AtHD2a vyústila ve ztrátu aktivity, která naznačuje, že obě oblasti jsou stěžejní pro enzymovou funkci AtHD2a (Wu *et al.*, 2000). Kyselá doména může být důležitá pro interakci deacetylasy s bazickými konci histonů (Lusser *et al.*, 1997). Delece C-terminální domény u AtHD2a neměla na enzymovou aktivitu proteinu dopad, což naznačuje, že tato doména pro funkci daného enzymu naopak není potřebná. Místo toho může být zapojována v interakcích protein-protein pro zprostředkování interakcí s potencionálními specifickými partnery (Wu *et al.*, 2000).

Pandey *et al.* roku 2002 charakterizovali v proteomu *Arabidopsis* další dvě HDAC typu HD2, identifikované již Danglem *et al.* roku 2001. Proteiny jsou složeny z konzervované N-terminální domény, centrální kyselé domény a variabilní C-terminální domény. Konzervovaný N-terminální konec těchto proteinů obsahoval typ HD2 domény HDAC o asi 100 aminokyselinách. Doposud byly tedy u *Arabidopsis* identifikovány čtyři HD-tuiny, které jsou označovány HDT1, HDT2, HDT3 a HDT4 (obr. 3). Histondeacetylasy HDT1 a HDT2 odpovídají AtHD2a a AtHD2b, které analyzovali Wu *et al.* (2000). Sekvenční porovnání HD-tuinů u *Arabidopsis* a kukuřice byl provedeno kolektivem Dangel *et al.* (2001).



Obr. 3 Organizace domén HD-tuinů u *Arabidopsis thaliana* (převzato z Hollender a Liu, 2008). Červené proužky v N-terminální oblasti reprezentují konzervovaný EFWG motiv potřebný pro enzymovou aktivitu. Červený box u HDT 1 reprezentuje kyselou oblast také potřebnou pro enzymovou funkci proteinu.

S výjimkou HDT4 jsou zbylé tři HD-tuiny poměrně dobře charakterizovány. Např. Wu *et al.* pomocí jimi navrhnutého expresního systému testovali, jestli proteiny typu HD-tuinů mohou potlačovat expresi některých genů. Analýzou produktů jejich zkonstruovaného systému ukázali, že HDT1 byla schopna *in vivo* potlačovat transkripci reportérového genu (Wu *et al.*, 2000). Pro HDT1, HDT2 a HDT3 bylo dále demonstrováno, že EFWG motiv v N-terminální oblasti a histidin v pozici 25 (potencionální katalytické residuum) jsou důležitými složkami jejich enzymové aktivity (Zhou *et al.*, 2004).

2.2.3.3 HD2 u kukuřice (*Zea mays*)

Po první detekci HD-tuinů v kukuřici byly charakterizovány dvě HDAC, HD1 a HD2, vykazující zcela odlišné vzory exprese (López-Rodas *et al.*, 1991). Zatímco aktivita HD1 je nižší v suchých embryích a vzrůstá během klíčení, HD2 je dominantním enzymem na začátku diferenciaci, ale její aktivita se téměř kompletně ztrácí během progresu klíčení. To indikuje specifickou funkci HD2 v suchém embryu během iniciační fáze klíčení (Georgieva *et al.*, 1991).

HD1 je přítomna během celého období klíčení s více či méně konstantní aktivitou, s výjimkou prvních 40 hodin, kdy pozorujeme přechodné zvýšení (Georgieva *et al.*, 1991). Tento přechodný nárůst může souviset s deacetylací nově poskládaného chromatinu, kdy je deacetylace histonů potřebná pro výstavbu nově syntetizovaného chromatinu za účelem uspořádání do struktur vyšší úrovně (Annunziato a Seale, 1983).

Dangl *et al.* roku 2001 charakterizovali u kukuřice celkem tři geny pro HDAC typu HD-tuinů, které vykazovaly vysokou sekvenční konzervovanost (obr. 4). Tyto HDAC byly pojmenovány ZmHD2a, ZmHD2b a ZmHD2c. Byli však schopni identifikovat pouze vysoce příbuzné HDAC, takže je možné, že se nejedná o jediné HD-tuiny kukuřice. Všechny homology ZmHD2a vykazovaly charakteristické domény: konzervovaný N-terminální konec, centrální část s dvěma kyselými úseky přerušeny oblastí bohatou na bazická residua, a další bazické domény přilehlé k druhému kyselému úseku, který pravděpodobně zahrnuje jaderný lokalizační signál (NLS). Celková konzervace sekvencí mezi analyzovanými proteiny se pohybovala v rozmezí 89 % u ZmHD2 a 31 % u AtHD2 (Dangl *et al.*, 2001).

2.2.3.4 HD2 u rýže (*Oryza sativa*)

Fylogenetická analýza genomu rýže poukázala na přítomnost dvou HDAC typu HD-tuinů: HDT701 a HDT702 (Fu *et al.*, 2007).

Overexprese HDT701 u transgenní rýže vedla ke snížení hladin acetylace histonu H4 a zvýšení obranyschopnosti rýže vůči patogenům *Magnaporthe oryzae* a *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*, zatímco umlčení HDT701 u transgenní rýže vyvolalo zvýšení hladiny acetylace histonu H4 a rostlinných PRR (*pattern recognition receptors*) receptorů. Také došlo ke zvýšené expresi genů spojených s obranou proti patogenům, což naznačuje, že HDT701 je deacetylase histonu H4 a působí jako negativní regulátor přirozené imunity rýže (Ding *et al.*, 2012).

Knockoutování HDT702 u rostlin rýže vyvolalo silně zúžené listy, což naznačuje, že tato HDAC může být také zapojena v buněčném dělení a růstu (Hu *et al.*, 2009).

2.2.3.5 HD2 u ječmene (*Hordeum vulgare*)

Porovnání sekvencí proteinů pro HD2 u několika kultivarů ječmene ukázal, že protein HvHDAC2-1 obsahuje všechny strukturální vlastnosti rostlině specifických HD2 proteinů (Demetriou *et al.*, 2009), přičemž ale HvHDAC2-2 vykazuje určité odlišnosti v těchto strukturálních motivech. N-terminální konzervovaný pentapeptid je přerušen inzercí čtyř aminokyselin (ENHR), druhá aminokyselina pentapeptidu, glutamát, je nahrazen threoninem a centrální kyselá doména je mnohem kratší v porovnání s ostatními HD-tuinu. Obě isoformy HDAC HvHDAC2-1 a HvHDAC2-2 obsahují na C-konci motiv zinkového prstu a na N-konci dvě konzervovaná residua (histidin a aspartát v pozicích 25 a 68) důležitá pro katalytickou aktivitu HD2 (Aravind a Koonin, 1998).

HvHDAC2-1 a HvHDAC2-2 mezi sebou sdílí 26% shodu v aminokyselinové sekvenci. HvHDAC2-1 vykazuje vyšší podobnost s pšeničnou TaHDAC2 (83 %) a rýžovou OsHDA2 (61 %), zatímco HvHDAC2-2 je více podobná s OsHD2b (32 %) a kukuřičnou ZmHDA106 (31 %)(Demetriou *et al.*, 2009).

2.2.3.6 HD2 u tabáku (*Nicotiana tabacum*)

Bourque *et al.* ve své práci z roku 2011 identifikovali dva HD-tuiny v tabáku: NtHD2a a NtHD2b, jako dvě redundantní isoformy pro rostliny specifických HDAC. Už dříve

byla pro tyto rostlinné proteiny zkoumána jejich možná funkce ve vývoji semen (Wu *et al.*, 2000) nebo v odpovědích na kyselinu abscisovou (Sridha a Wu, 2006), avšak poprvé v této práci bylo popsáno zapojení HD-tuinů v kontrole exprese genů účastnících se mechanismu buněčné smrti. Konkrétně bylo demonstrováno, že HD-tuiny vystupují jako negativní regulátory u kryptogemem indukované buněčné smrti tabáku, což naznačuje, že hypersenzitivní reakce je kontrolována posttranslačními modifikacemi včetně acetylace a deacetylace jaderných proteinů (Bourque *et al.*, 2011).

2.2.3.7 HD2 u rajčete a brambory (*Solanum spp.*)

U rajčete bylo identifikováno 15 HDAC, které jsou na základě fylogenetických analýz rozděleny do tří rodin. Deset členů spadá do rodiny RPD3/HDA1, která může být dále rozdělena do 4 podrodin (třída I-IV). Jeden zástupce patří do rodiny sirtuinů a zbývající tři HDAC jsou HD-tuiny. Vysoká podobnost v proteinové sekvenci a v konzervovaných doménách byla pozorována mezi rajčatovými SIHDAC a jejich homology u *Arabidopsis* (Zhao *et al.*, 2015). Dva členové HD2 rodiny SIHDT3 a SIHDT1 jsou silně exprimovány v kořenech a hypokotylech. Transkripty SIHDT2 a SIHDT1 jsou také akumulovány v květech. Většina SIHDAC byla exprimována ve všech testovaných pletivech s různou hladinou transkriptů. Zástupci HD2 rodiny spolu s některými členy zbývajících dvou rodin (SIHDA8, SIHDA1, SIHDA5 a SISRT1) byly lokalizovány v jádře, zatímco SIHDA3 a SIHDA4 byly lokalizovány jak v cytoplasmě, tak v jádře. Rozdíl mezi expresními vzory a subcelulární lokalizací SIHDAC nejspíše souvisí s jejich odlišnými rolemi (Zhao *et al.*, 2015). U SIHDT2 byla na C-terminální doméně přítomna oblast obsahující motiv zinkového prstu (Cigliano *et al.*, 2013).

Rajčatové HD-tuiny se zdají být blízké příbuzné s AtHDT3 *Arabidopsis*, pro které bylo prokázáno, že jsou zapojeny v odpovědi na kyselinu abscisovou (ABA) a v klíčení semen (Xu *et al.*, 2005). U rajčete jedlého byly fylogenetickou analýzou identifikovány tři isoformy HD-tuinů: HDT1101, HDT1102 a HDT1103 (Ma *et al.*, 2013).

U divoké brambory *Solanum chacoense* byl identifikován gen pro ScHD2a (Lagacé *et al.*, 2003). Podobně jako u *Arabidopsis* byl zapojen v reprodukčním vývoji. ScHD2a vykazuje výraznou akumulaci mRNA u semeníků a je preferenčně exprimována ve vyhraničených oblastech vajíčka (Lagacé *et al.*, 2003).

Fylogenetickou analýzou byly u lilku bramboru (*Solanum tuberosum*) identifikovány dvě isoformy HD-tuinů. Byly označeny jako HDT1401 a HDT1402 (Ma *et al.*, 2013).

2.2.3.8 HD2 u dalších rostlin

Pomocí fylogenetických analýz byly HD-tuiny identifikovány i u dalších rostlin, ačkoli jejich funkce zatím nebyly předmětem dalšího zájmu (Ma *et al.*, 2013).

U révy vinné (*Vitis vinifera*) bylo identifikováno 13 genů pro HDAC. Jeden z genů patří do HD2 rodiny a byl pojmenován HDT6901 (Aquea *et al.*, 2010). U tropického ovoce longan (*Dimocarpus longan*) byly identifikovány tři zástupci HD-tuinů: DIHD2, DIERF1 a DIERF2. Značná homologie byla identifikována mezi DIHD2 a HD2 z ostatních organismů (Kuang *et al.*, 2012). DIHD2 protein obsahuje všechny strukturální vlastnosti pro rostliny specifických proteinů typu HD2 (Aravind a Koonin, 1998). BLAST analýzou bylo zjištěno, že DIHD2 sdílí 55% homologii na úrovni proteinu s RcHD2a fazole a 53% shodu s NtHD2a tabáku. Fylogenetická analýza dále ukázala, že DIHD2 je blíže příbuzný s HD2 ze skočce obecného (Kuang *et al.*, 2012). Mezi další doposud detekované HD-tuiny patří např: HD2 skočce obecného (*Ricinus communis*) nebo RcHD2a fazole (Kuang *et al.*, 2012) a HDT uvedené v tabulce č. 1.

Tab. 1 HD-tuiny získané z fylogenetických analýz (sestaveno podle Ma *et al.*, 2013; Pandey *et al.*, 2002, Clemente *et al.*, 2001)

isoformy HD-tuinů	rostlina
HD1; HD2	hrách setý (<i>Pisum sativum</i>)
HDT801; HDT802	pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i>)
HDT901; HDT902; HDT903	topol černý (<i>Populus trichocarpa</i>)
HDT1202	sója luštinatá (<i>Glycine max</i>)
HDT1301; HDT1302	tolice pobřežní (<i>Medicago truncatula</i>)
HDT1501; HDT1502	bavlna (<i>Gossypium arboretum</i>)
HDT1601; HDT1602	kosmatec třpytivý (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>)
HDT1702	štírovník japonský (<i>Lotus japonicus</i>)
HDT1801; HDT1802	borovice kadidlová (<i>Pinus tadea</i>)

2.2.4 Exprese HD-tuinů

Podle dosavadních studií jsou HD-tuiny pravděpodobně exprimovány v celé rostlinné říši, od mechů po dvouděložné rostliny. K jejich expresi dochází téměř ve všech pletivech včetně kalusu, vegetativních pletiv, kořenů, květů a semen. U starších pletiv jsou HDAC exprimovány méně. Relativní exprese HD-tuinů se však liší podle

konkrétních isoform, a navíc se mění v závislosti na odpovědi na různé biotické a abiotické stresové faktory (Zhou *et al.*, 2004; Bourque *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2012).

Například Hollender a Liu (2008) prozkoumali expresní profily 16 genů pro HDAC u *Arabidopsis* v různých pletivech za použití mikročipových analýz. Zjistili, že HD2 geny jsou vysoce exprimovány v květenstvích, ale v nižších hladinách v pletivech vegetativních, v pylu, semenech a v pozdním stádiu květenství (Hollender a Liu, 2008).

Obecně platí, že blízké příbuzné HDAC vykazují velmi podobné expresní profily. Např. HD-tuiny *Arabidopsis* AtHDT1, AtHDT2 a AtHDT3 vykazují podobné hladiny exprese u vajíček, embryí, výhonků, apikálních meristémů a listů (Wu *et al.*, 2000). Navíc je jejich exprese silně indukována během procesu somatické embryogeneze (Zhou *et al.*, 2004). Naproti tomu byla u isoform AtHDT1 a AtHDT2 pozorována i odlišnost v jejich expresi: AtHDT1 byla silně exprimována pouze u květů a mladých šesulí, zatímco AtHDT2 se akumulovaly poměrně ve vysokých hladinách nejen v květech a mladých šesulích, ale také ve stoncích a v poněkud nižších hladinách i v listech (Wu *et al.*, 2000).

U rajčete preferenční exprese HDT nastává v raných stádiích vývoje plodů. Konkrétně SlHDT1 je silně exprimována v plodech velikosti 1 cm, SlHDT2 v plodech velikosti 1 i 3cm, zatímco SlHDT3 pouze v 3cm velkých plodech a ve zrajících zelených plodech. Tyto expresní profily naznačují roli jednotlivých rajčatových HDT ve vývoji plodů (Cigliano *et al.*, 2013).

HvHDAC2-1 i HvHDAC2-2, HD-tuiny ječmene, jsou preferenčně exprimovány v reprodukčních pletivech (převážně u nezralých květů) a v kořenech, zatímco nižší hladiny jejich transkriptů jsou přítomny v apikálním meristému, ve výhoncích a listech, jak bylo dokázáno u dvou testovaných kultivarů ječmene. Podobně jako u *Arabidopsis* a bramboru byla exprese HvHDAC2-1 spuštěna po fertilizaci a hladiny transkriptů byly navýšeny v semenech obou kultivarů (Demetriou *et al.*, 2009).

2.2.5 Biologické funkce rostlinných HDAC

V poslední dekádě se mnoho studií věnovalo zapojení HD-tuinů v kontrole biologických procesů, především v regulaci vývoje a fyziologie semen a v odpovědích rostlin na stresové podmínky biotického i abiotického původu.

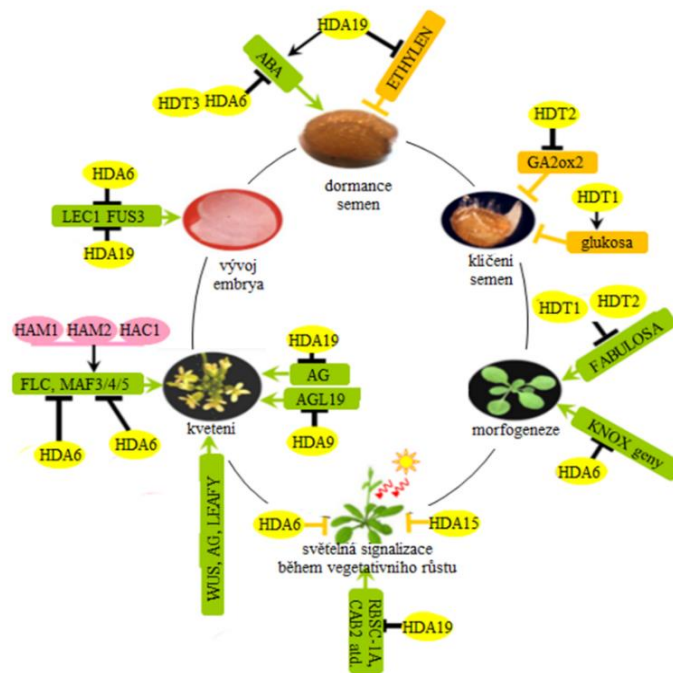
Počáteční zjištění, že ZmHD2 jsou lokalizovány v jádře a že vykazují homologii s ostatními jadernými proteiny, vedlo k hypotéze, že HD-tuiny mohou být zapojeny v regulaci ribosomálních RNA genů (Lusser *et al.*, 1997). Tato hypotéza byla podpořena některými dalšími studiemi. Např. bylo prokázáno, že HDT1 hraje roli v rRNA umlčování. Degradace mRNA HDT1, dosažená expresí transgenu kódujícího dvouvláknovou HDT1-rRNA, vyústila v rozvolnění umlčování rRNA u *Arabidopsis*, nárůst methylace histonu H3K4 a ztrátu methylace cytosinu na rDNA v *Arabidopsis suecica*, a v allotetraploidních hybridech *A. thaliana* a *A. arenosa* (Lawrence *et al.*, 2004). Již předtím Chen a Pikaard prokázali, že umlčené rRNA geny rostlin jsou po aplikaci HDAC inhibitorů znovu exprimovány a HDAC jsou tedy zapojeny v regulaci exprese rRNA genů (Chen a Pikaard, 1997).

Knockdown HDA6 (histondeacetylase z rodiny RPD3/HDA1) i HDT1, zprostředkovaný RNA interferencí (RNAi), je účinný v předcházení vývojově programované inaktivace a kondenzace organizátoru jádérka (NOR, *nucleolus organizer region*) u *A. thaliana*, což indikuje, že tyto modifikátory chromatinu zaujímají důležitou roli v postembryonálním vytváření dominance jádérka (Pontes *et al.*, 2007). HDT1 i HDA6 jsou lokalizovány v jádérku, kde se odehrává transkripce rRNA genů, což podporuje hypotézu, že rRNA geny by mohly být přímými cíli jejich působení (Lawrence *et al.*, 2004).

Kim *et al.* v roce 2014 demonstrovali, že ribosomální proteiny interagují s HDAC a váží se k promoterům rRNA genů. AtHD2b přímo interaguje s proteinem RPS6, který patří mezi složky ribosomální podjednotky 40S a vystupuje jako cíl pro serin/threonin proteinkinasu TOR. RPS6 a AtHD2b jsou lokalizovány v jádérku a jejich současná exprese vyvolává změnu v jejich lokalizaci. Protoplasty s overexpresí AtHD2b a zároveň RPS6 vykazují downregulaci syntézy pre-1S rRNA s doprovázejícím úbytkem transkripce genů některých ribosomálních proteinů, což naznačuje jejich přímou roli v biogenezi ribosomů a tedy i vývoji rostlin. Navrhli tak nový model kontroly transkripce DNA u rostlin, ve kterém TOR napomáhá kontrole mechanismu umlčování transkripce DNA prostřednictvím následující signalizační složky RPS6, tedy mechanismu, který zahrnuje interakci RPS6 s AtHD2b. Takováto interakce je základem přímého spojení mezi stresovými signály a regulací translace a transkripce (částečně i rDNA) za účelem kontroly růstu rostlin (Kim *et al.*, 2014).

2.2.5.1 HD-tuiny ve vývoji semen

První práce ukazující zapojení de/acetylace histonů v regulaci dormance semen pochází z roku 2005 (Tai *et al.*, 2005). Za použití farmakologických přístupů demonstrovali, že po ošetření semena *A. thaliana* inhibitorem HDAC trichostatinem A (TSA) bylo mnoho genů zapojených v klíčení semen deregulováno, včetně genu kódujícího LEA proteiny (*late embryogenesis abundant proteins*). Následně některé práce upozornily na zapojení HD2 v kontrole dormance a klíčení semen (obr. 5) (Sridha a Wu, 2006; Colville *et al.*, 2011).



Obr. 5 Schematické zobrazení zapojení HAT a HDAC včetně HD-tuinů v regulaci vývoje semen. GA2ox2 = giberelin-2- β -dioxigenasa 2; RBSC-1A (RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN 1) = lehký řetězec ribulosabisfosátkarxylasy; CAB2 (CHLOROPHYLL A/B-BINDING PROTEIN 2) = chlorofyl a/b vazebný protein 2; WUS (WUSCHEL) = gen potřebný pro vývoj výhonků a květů, AG (AGAMOUS) = transkripční faktor; LEAFY = gen zapojený ve vývoji květů; FLC (FLOWERING LOCUS C) = gen zodpovědný za jarovizaci; MAF3/4/5 (MADS AFFECTING FLOWERING) = represory kvetení, HAM1 = histonacetyltransferasa *Arabidopsis*; HAM2 = histonacetyltransferasa *Arabidopsis*; HAC1 = transkripční regulátor; AGL19 (AGAMOUS-LIKE 19) = transkripční faktor; LEC1 (*LEAFY COTYLEDON1*) = klíčový regulátor embryogeneze u *Arabidopsis*; FUS3 (*FUSCA3*) = transkripční faktor (upraveno podle Wang *et al.*, 2014).

Transkripty HD2 rodiny se během raných stádií vývoje semen selektivně akumulují v odpovědi na glukosu přes na hexokinase 1 (HXK1)-nezávislé signální transdukční dráze. Ukázalo se, že HD2a a HD2c mají u klíčení opačné funkce. HD2a-závislá dráha vede k potlačení klíčení, zatímco HD2c-závislá dráha vede k aktivaci klíčení. Tyto

dráhy mohou zaujímat funkci v regulaci klíčivosti semen, a to nezávisle na glukosa/HXK1/ABA signální transdukční dráze (Colville *et al.*, 2011). Podobné výsledky byly již dříve získány pro HD2c (Sridha a Wu, 2006).

Umlčení HD2a u *Arabidopsis* vede k nesprávnému vývoji semen. Fenotypově jsou semena mutantních rostlin značně menší v porovnání se zdravými semeny WT (Wu *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2003). Overexprese HD2a také způsobila represi genů spojených s vývojem embrya (Zhou *et al.*, 2004).

Yano *et al.*, 2013 ukázali, že podobně jako HD2a a HD2c, tak i HD2b může kontrolovat klíčení semen *Arabidopsis*. Za použití několika ekotypů *Arabidopsis* s různým stupněm dormance byla vytvořena mapa genomu a provedena analýza transkriptomu, přičemž autoři ukázali, že dormance semen je silně spojena s expresí AtHD2b.

Zpožděné klíčení semen HDT701 u overexprimovaných linií je spojována s úbytkem acetylce histonu H4 a s downregulací biosyntetických genů pro gibereliny. Overexprese HDT701 u rýže navíc zvyšuje rezistenci vůči salinitnímu a osmotickému stresu během vegetativního vývoje sazenic. Tyto nálezy naznačují, že HDT701 může mít důležitou roli nejen v regulaci klíčení semen, ale i v odpovědích na abiotický stres u rýže (Zhao *et al.*, 2014).

U bramboru (*Solanum chacoense*) je transkripce ScHD2a silně indukována po opylení pestíků. Transkripty ScHD2a jsou akumulovány zejména v mikropylární oblasti vajíček, což taktéž poukazuje na možnou roli ve vývoji semen (Lagacé *et al.*, 2003).

U ječmene bylo zapojení HD-tuinů v regulaci vývoje semen zkoumáno u dvou kultivarů – Ippolytos a Caresse. Bylo zjištěno, že k větší indukci HvHDAC2-1 ve všech stádiích vývoje dochází u semen menšího kultivaru Ippolytos. Rozdíly v hladinách exprese mohou naznačovat roli HvHDAC2-1 nejen ve vývoji semen, ale také v regulaci velikosti semen. Je možné, že vyšší exprese HvHDAC2-1 u menšího kultivaru může vést k silnějšímu potlačení cílových genů (Demetriou *et al.*, 2009). Jestliže se pak jedná o geny podporující tvorbu endospermu (*endosperm growth promoting genes*) (Gehring *et al.*, 2004), tak jejich umlčení může vést k redukci proliferace endospermu a tím menší velikosti semen (Demetriou *et al.*, 2009).

2.2.5.2 HD-tuiny ve vývoji rostlin

HD-tuiny nejspíše zaujímají roli také v determinaci polarity listů. Tato problematika byla zkoumána u HDT1 a HDT2 *Arabidopsis*. Bylo zjištěno, že obě isoformy nezávisle na sobě působí s tzv. asymmetric leaves 1 (AS1) a asymmetric leaves 2 (AS2) geny, které představují klíčové faktory pro vývoj polarity a tvar listů (Ueno *et al.*, 2007).

Dále Zhou *et al.* ukázali u overexprese AtHD2a, že tento protein může kontrolovat vývoj různých rostlinných orgánů. Rostliny, u kterých dochází k overexpresi AtHD2a jsou charakteristické abnormálními listy (fenotypy s větvicemi se nebo zúženými listy), a je pro ně typické zpožděné kvetení, aberantní květy a nesprávný vývoj semen (Zhou *et al.*, 2004).

U *A. thaliana* bylo také demonstrováno, že HD2 interagují s HDA6 (RPD3/HDA1 rodina) a váží se k histonu H3 za účelem regulace exprese ABI1 a ABI2, dvou ABA-závislých genů (Luo *et al.*, 2012). Za použití kvasinkového dvouhybridního systému a bimolekulárního fluorescenčního komplementárního přístupu (BiFC) Kuang *et al.*, 2012 ukázali, že DIHD2 fyzicky interaguje s DIERF1 – ethylen-odpovědným faktorem - při regulaci senescence ovoce u tropického ovoce longan (*Dimocarpus longan*).

U rýže exprese OsHDT701 vykazuje cirkadiánní rytmy a ovlivňuje její kvetení, přičemž transkripční regulace exprese OsHDT701 je jedním z hlavních regulačních procesů jejich biologické aktivity. Overexprese OsHDT1 u hybridní rýže vyústila v brzké kvetení. Pravděpodobně došlo k potlačení dominantní exprese klíčových represorů kvetení *heading date 1* (Hd1) a jejich aktivátorů (Li *et al.*, 2011). Downregulace rýžové HDT702 vede k produkci zúžených listů a stonků (Hu *et al.*, 2009).

Inaktivace HD1 (komplex AtHD1/HDA19) expresí antisense konstruktů indukovala pleiotropní vývoj abnormalit (Tian a Chen, 2001). Pro komplex AtHD1/HDA19 se dále prokázalo, že vytváří antagonistickou dvojici s histonacetyltransferasou GCN5 zapojenou v regulaci několika drah včetně fotomorfogenického vývoje semen (Benhamed *et al.*, 2006). Nedávné výsledky taky ukazují, že komplex AtHD1/HDA19 je zapojený v expresi genů v odpovědích na signalizační dráhy kyseliny jasmonové a ethylenu (Zhou *et al.*, 2005).

2.2.5.3 HD-tuiny v odpovědích na stresové podmínky

V posledních letech se studium rostlinných HDAC zaměřuje také na jejich zapojení v obranných odpovědích rostlin a částečně i hypersenzitivní odpovědi, jednomu z typů buněčné smrti. Identifikace histondeacetylasy typu 2 jako jaderných proteinů zapojených v odpovědi na elicitor kryptogein dokazuje, že de/acetylase jaderných proteinů může zaujímat určitou roli v regulaci exprese obranných genů rostlin (Bourque *et al.*, 2011).

Rostlinné hormony kyselina jasmonová (JA), kyselina abcisová (ABA), kyselina salicylová (SA) a ethylen zprostředkovávají regulaci exprese genů během adaptativních odpovědí rostlin na abiotické i biotické stresové faktory (Alazem a Lin, 2015). Například sledováním exprese HvHDAC2-1 a HvHDAC2-2 po působení JA, ABA a SA bylo zjištěno, že obě isoformy byly signifikantně indukovány po 6 a 24 hodinách po ošetření semen JA. HvHDAC2-1 dále vykazovala značnou indukci po 24 hodinách vlivem ABA, zatímco hladina transkriptů u HvHDAC2-2 po 6 hodinách klesla a po 24 hodinách nebyly pozorovány žádné signifikantní změny v porovnání s kontrolními rostlinami. Hladiny transkriptů u HvHDAC-2-1 byly působením SA po 24 hodinách navýšené ve srovnání s neošetřenými rostlinami. Pozorované změny exprese HvHDAC2-1/2 během působení rostlinných hormonů podporují hypotézu o zapojení těchto genů v epigenetické regulaci stresových odpovědí u ječmene (Demetriou *et al.*, 2009).

U rýže jsou dva HD2 homology také indukovány po působení JA, což naznačuje funkční podobnost pro HD2 geny mezi jednoděložnými rostlinami. Zatímco tyto dva HD2 homology byly reprimovány účinkem ABA (Fu *et al.*, 2007), u ječmene HvHDAC2-1 a HvHDAC2-2 vykazují odlišné odpovědi. Gen HD2c u *Arabidopsis* je také reprimován vlivem ABA (Sridha a Wu, 2006). Tyto odlišnosti mohou naznačovat funkční odlišnosti pro každého z členů HDAC rodin mezi dvouděložnými a jednoděložnými rostlinami, ale taktéž mezi jednotlivými jednoděložnými rostlinami (Demetriou *et al.*, 2009).

2.2.5.4 HD-tuiny v odpovědích na abiotický stres

Rychlost klíčení u různých AtHD2c mutantů (hd2c-1, hd2c-2 a hd2c-3) je silně ovlivněna vlivem ABA nebo NaCl (Luo *et al.*, 2012). Během odpovědi na tento abiotický stres dochází k interakci mezi HD2c a HDA6 – z rodiny RPD3. Za použití

mutantů *hda6* a *hda2-1* a dvojitého mutantu *hda6/hda2-1* byl identifikován histon H3 jako jeden ze substrátů komplexu HD2c/HDA6: hladina acetylovaného H3K9K14 vzrostla, zatímco hladina demetylovaného H3K9 klesla (Luo *et al.*, 2012). U *hd2c* mutantů byla během klíčení pozorována zvýšená citlivost k ABA a NaCl (Liu *et al.*, 2014) a snížení tolerance k salinitnímu stresu (Luo *et al.*, 2012). Navíc HD2c fyzicky interaguje s HDA6 a reprimuje expresi genů *ABI1* a *ABI2* zapojených v odpovědi rostlin na abiotický stres. Výsledky naznačují, že HD2c je funkčně asociována s HDA6 a reguluje tak expresi genů prostřednictvím modifikace histonů (Luo *et al.*, 2012). Už dříve bylo prokázáno, že HDT3 je zapojena v odpovědích na stres vyvolaný ABA (Sridha a Wu, 2006). Exprese HDT3 je potlačena ABA, při overexpresi HDT3 se transgenní rostliny staly necitlivými na ABA, nastala u nich snížená transpirace a zvýšila se tolerance k salinitě a suchu (Sridha a Wu, 2006). Exprese zbylých HD2 u *Arabidopsis* je v odpovědi na ABA signifikantně snížena (Luo *et al.*, 2012; Sridha a Wu, 2006).

Nedávno byla publikována práce zaměřená na studium HD2D, doposud nejméně prozkoumané HDAC typu HD-tuinů z *Arabidopsis thaliana*, která vykazuje se zbylými isoformami HD-tuinů *Arabidopsis* vzdálenější příbuznost. Overexprese HD2D vyústila v pozměněný vývoj rostliny, konkrétně ve změny v kořenovém systému. Dále bylo pozorováno zpožděné klíčení semen a kvetení, ale také vyšší odolnost vůči abiotickému stresu vyvolanému suchem, salinitou i chladem. Poprvé tak byla zvýrazněna role HD2D v regulaci růstu a vývoje rostlin, stejně jako v odpovědích rostlin na abiotické stresové podmínky (Han *et al.*, 2016).

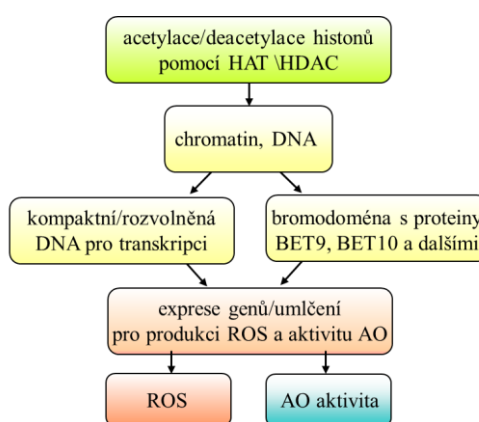
Výsledky mikročipových analýz získané u rýže vystavené účinkům soli, sucha a chladu ukázaly, že exprese většiny HDAC genů byla značně regulována salinitou a suchem, zatímco chladem byla ovlivněna méně (Hu *et al.*, 2009).

Možná role HDT701 v odpovědích na abiotický stres byla provedena kolektivem Zhao *et al.*, kteří porovnávali rychlost klíčení semen rostlin s overexpresí HDT701(HDT701OX)) a semen WT rostlin. Semena byla vystavena působení různým koncentracím ABA, NaCl a polyethylenglykolu (PEG) jako stresorů. Již za kontrolních podmínek byla pro HDT701 OX4 a OX7 semena po 60 hodinách detekována relativně nižší rychlost klíčení v porovnání s WT, což naznačuje, že overexprese HDT701 u rýže může zpožďovat klíčení semen. Navíc klíčení semen HDT701 OX4 a OX7 byla značně

opožďena v odpovědi na 5 a 10 μ M ABA ve srovnání s WT. Podobně klíčení HDT701 OX4 a OX7 semen byla také pomalejší než u WT po působení 100 a 150 mM NaCl. Po působení 15% PEG, byla rychlosti klíčení u semen HDT701 OX 4 a OX7 pozorovatelně nižší než u WT. HDT701 může tedy u klíčících semen rýže reprimovat expresi biosyntetických genů pro gibereliny snížením acetylačních hladin histonů H4 (Zhao *et al.*, 2014). Již dříve bylo pro HDT701 prokázáno, že je deacetylasou histonu H4, která modulací jeho acetylace negativně reguluje přirozenou imunitu rostlin (Ding *et al.*, 2012).

Fenotypy HDT701OX semenáčků byly dále zkoumány po jejich vystavení účinkům soli a osmotickému stresu. Dva týdny staré HDT701 OX semenáčky byly vystaveny 150mM NaCl nebo 20% PEG. Po 3 a 5 dnech působení NaCl nebo PEG byly HDT701 OX semenáčky oproti WT semenáčkům dehydratované méně. Také obsah chlorofylu byl signifikantně vyšší u HDT701 OX semenáčků oproti WT. Získané informace ukazují, že overexprese HDT701 u semen rýže může zvýšit její odolnost vůči salinitě a osmotickému stresu (Zhao *et al.*, 2014).

Reaktivní formy kyslíku (ROS), včetně peroxidu vodíku, jsou důležité signalizační komponenty během vývoje rostlinné rezistence na různé stresy (Mittler *et al.*, 2004), včetně osmotického stresu (Jadko, 2012). Procesy acetylace a deacetylace jsou u rostlin také zapojeny v regulaci vývoje oxidativního stresu (obr. 6). Je známo, že tvorba a využití ROS jsou regulovány rozsáhlou sítí genů (Mittler *et al.*, 2011). Bylo ukázáno, že inhibice HDAC prostřednictvím TSA vedla u zvířecích buněk ke zvýšení hladin ROS (Sun *et al.*, 2014).



Obr. 6 Hypotetické schéma zapojení HAT a HDAC v regulaci obsahu ROS a antioxidační aktivity rostlin odpovědi na osmotický stres (upraveno podle Jadko, 2015).

Během akutního hyperosmotického stresu ve tkáňových kulturách *Arabidopsis thaliana* byl pozorován rychlý nárůst H_2O_2 v závislosti na aktivitách HAT a HDAC (obr. 6). K těmto změnám primárně dochází se zvyšující se antioxidační aktivitou za účelem předcházení oxidativnímu stresu, ačkoli přímé studie role HDAC v regulaci obsahu ROS u rostlin zatím nebyly publikovány (Jadko, 2015).

2.2.5.5 HD-tuiny v odpovědích na biotický stres

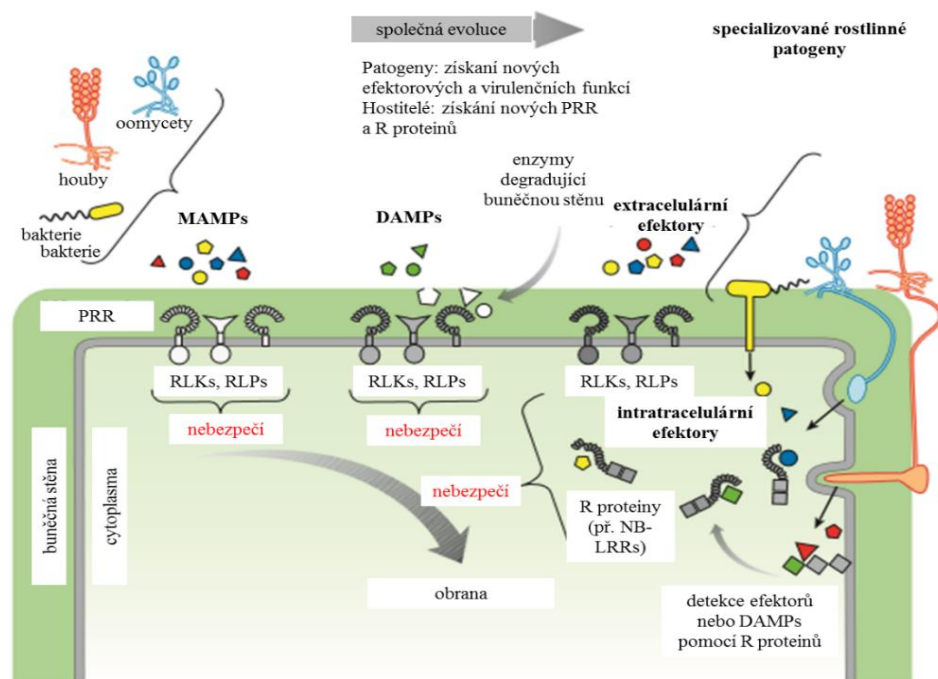
Podobně jako v případě abiotického stresu dosavadní výsledky studií naznačují, že HD-tuiny jsou zapojeny v regulaci odpovědi rostlin i na biotický stres. Expres OsHDT701 je upregulována v kompatibilní interakci rostlin rýže s *Magnaporthe oryzae*, ale downregulována v nekompatibilní interakci s *M. oryzae* (Ding *et al.*, 2012). Overexpres HDT701 vedla u transgenní rýže ke snížení acetylce histonu H4 a zvýšení náchylnosti vůči patogenu rýže *M. oryzae* a *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. Naopak umlčení HDT701 u transgenní rýže vyústila ve zvýšenou hladinu acetylce histonu H4 a zvýšila transkripci rostlinných proteinů PRR (*pattern recognition receptor*) a s obranou spojených genů. Po působení elicitorů typu PAMP (*pathogen associated-molecular pattern elicitors*) se zvýšila produkce reaktivních forem kyslíku, stejně tak došlo k navýšení rezistence vůči patogenům *M. oryzae* a *X. oryzae* (Ding *et al.*, 2012).

Pro HDAC patřící do RPD3-HDA1 rodiny bylo indikováno, že modifikace acetylačních hladin jaderných proteinů, částečně histonů, je zapojeno do kontroly rostlinných obranných odpovědí (Zhou *et al.*, 2005, Wu *et al.*, 2008). Bourque *et al.*, 2011 ukázali, že kryptogein, proteinový elicitor sekretovaný oomycetami *Phytophthora cryptogea*, indukuje rychlou fosforylaci dvou tabákových isoform HD2, NtHD2a a NtHD2b, které jsou blízce příbuzné s AtHDT1 a AtHDT3. Farmakologické studie prokázaly, že NtHD2 působí jako negativní regulátory hypersenzitivní reakce (HR) vyvolané kryptogeinem. Snížení jejich exprese pomocí RNAi umlčování vyústilo v silnější kryptogeinem indukovanou buněčnou smrt u daných linií buněčných suspenzí. U buněčných linií se stejnými umlčenými geny byly aplikovány ne-nekrotické elicitory, jako oligogalakturonidy, které však buněčnou smrt nespustily. Tato pozorování naznačují, že NtHD2a/b nekontrolují indukci dráhy buněčné smrti, ale spíše regulují její intenzitu (Bourque *et al.*, 2011).

2.3 Rostlinné elicitory

Rostliny využívají širokého spektra strategií, aby se ubránily útokům patogenů. Obrana vůči napadení patogenem je uskutečňována jednak konstitutivním, jednak indukovaným obranným systémem, přičemž úspěšná obranná reakce je založena na časném rozpoznání atakujícího patogenu a na následné rychlé aktivaci obranných systémů rostliny.

Obranný systém rostliny je tvořen dvěma hlavními složkami: imunitou aktivovanou tzv. molekulárními vzory asociovanými s patogeny (PTI, *PAMP-triggered immunity*; PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) a imunitou vyvolanou efektoru (ETI, *effector-triggered immunity*). Prvotním stupněm obrany rostlin je PTI, která je založena na rozpoznání molekulárních vzorů spojených s mikroby (MAMPs, *microbe-associated molecular patterns*) a molekulárních vzorů spojených s poškozením (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*). Tyto vzory jsou rozpoznávány skrze rostlinné receptory PRR (*pattern recognition receptors*), které jsou lokalizované na povrchu rostlinné buňky. Patogeny však vyvinuly schopnost překonat složky této části imunitního systému rostlin pomocí vnesení svých efektorů virulence dovnitř buněk hostitele. Tyto efektoru jsou zodpovědné za tzv. náchylnost vyvolanou efektoru (ETS, *effector-triggered susceptibility*). Další stupněm obrany rostlin je ETI, imunitní odpověď založená na vysoce specifické interakci mezi patogenními efektoru a produkty genů rezistence (*R* geny), které specificky přímo nebo nepřímo rozeznávající většinu patogenních faktorů avirulence (*Avr*). Přestože zmíněné složky imunitního systému rostlin zapojují odlišné receptory, tak dochází k aktivaci řady společných obranných mechanismů (obr. 7). Rozpoznání patogenu obecně vede k obranné reakci zvané hypersenzitivní reakce (HR), pro kterou je typická rychlá buněčná smrt ve formě apoptózy a lokální nekrózy. HR tak představuje důležitý krok bránící šíření biotrofního patogenu z místa infekce (Boller a Felix, 2009).



Obr. 7 Schéma imunitní odpovědi rostlin v interakci rostlina – patogen; RLKs = receptory spřažené s kinasou (receptor-like kinase), RLPs = receptorové proteiny (receptor-like protein), NB-LRRs = oblast vázající nukleotidy obsahující sekvenci bohatou na leucin (nucleotid binding site- leucine-rich repeat) (upraveno podle Boller a Felix, 2009).

Látky, které spouštějí obranné reakce v interakci rostlina – patogen u imunity typu PTI, označujeme jako elicitory. Vází se na specifické receptory, popř. vysokoafinitní místa, nacházející se většinou na povrchu buněčné membrány, čímž dochází ke spuštění vlastní obranné reakce rostliny. Jedná se o látky různé chemické povahy od peptidů přes proteiny až po oligosacharidy. Elicitem rovněž mohou být některé nízkomolekulární látky (Boller a Felix, 2009). Pokud elicitory pocházejí z patogenů, jsou označovány jako primární, zatímco v případě elicitorů uvolňovaných napadenou rostlinou o nich hovoříme jako o elicitorech sekundárních. Kromě původu můžeme elicitory dělit na základě jejich specifity: pokud je daný elicitor produkován řadou patogenů, je označován jako nespecifický. Naopak specifický elicitor je tvořen pouze konkrétním patogenem a je rozpoznáván jen úzkou skupinou hostitelů (Hahn, 1996).

2.3.1 Elicitiny

Elicitory proteinové povahy sekretované několika zástupci rodu *Phytophthora* a některými členy rodu *Pythium* (Huet *et al.*, 1995) jsou známy pod termínem elicitiny. Jsou to malé hydrofilní proteiny bohaté na cystein, které jsou strukturně podobné

proteinům se schopností přenášet lipidy v rostlinných buňkách (Mikes *et al.*, 1997). Výsledky z práce Mikes *et al.*, 1998 ukazují, že elicitiny mají jedno vazebné místo s poměrně silnou afinitou pro dehydroergosterol.

Elicitiny se sestávají obvykle z 98 AMK s podobnou strukturou, která zahrnuje pět α -helixů a jeden β -list poskládaný v unikátní strukturu s hydrofobní kapsou lokalizovanou v jádře proteinu a spojenou s proteinovým povrchem pomocí tunelu (Boissy *et al.*, 1999). Elicitiny mohou být na základě hodnot pI klasifikovány jako α -elicitiny (kyselé, pI < 7) nebo β -elicitiny (bazické, pI > 7), přičemž ty bazické mají větší nekrotizující aktivitu (Yu, 1995). Ačkoli α - a β -elicitiny vykazují odlišný nekrotizující účinek, který může být v korelaci s jejich strukturou, tak indukují podobně silnou úroveň rezistence (Ricci *et al.*, 1989).

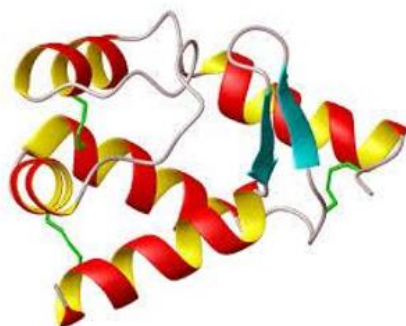
AMK sekvence různých elicitinů bývají porovnávány a korelovány s nekrotickými účinky (Pernollet *et al.*, 1993). Nejvíce konzistentní korelace s nekrotickou aktivitou byla popsána u AMK zbytku v pozici 13. β -elicitiny obsahují v této pozici bazický lysinový zbytek, zatímco α -elicitiny v této pozici mají hydrofobní valinový zbytek. Tyto skutečnosti společně s analýzou Lys13Val mutanta u β -elicitinu kryptogeinu, který indukuje HR u tabáku, ukazují, že lysin v pozici 13 je klíčovým prvkem pro nekrotickou aktivitu (O'donohue *et al.*, 1995).

U hostitelské buňky elicitiny indukují hypersenzitivní reakci, která zahrnuje expresi s patogenezi spojených proteinů (PR, *pathogenesis related proteins*), akumulaci fytoalexinů a nekrózu buněk. Také dochází k rozvoji systémové získané rezistence (SAR) vůči mnoha mikrobiálním fytopatogenům (Keller *et al.*, 1996; Kamoun *et al.*, 1993). Elicitory obranných reakcí rostlin oligogalakturonidy a kryptogein také indukují rychlou a přechodnou aktivaci dvou MAPK kinas u tabákových buněk (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998). Lebrun-Garcia *et al.* v roce 2001 ověřili, že tyto dvě MAPK kinasy odpovídají proteinkinase aktivované kyselinou salicylovou (SIPK) a proteinkinase aktivované poraněním (WIPK).

2.3.1.1 Kryptogein

Kryptogein je velmi účinný bazický elicitin vylučovaný oomycetami *Phytophthora cryptogea*. Je tvořen z 98 AMK (MW 10 323 Da) a ve své struktuře obsahuje tři disulfidické můstky (Ricci *et al.*, 1989). Krystalová struktura tohoto proteinu odhalila

přítomnost hydrofobní kapsy (Boissy *et al.*, 1996). Kryptogein nevykazuje žádnou proteasovou, beta-glukanasovou nebo fosfolipasovou aktivitu (Mikes *et al.*, 1997) a ani žádná jiná enzymová aktivita zatím nebyla popsána. Třírozměrná struktura se skládá z pěti α -helixů, jednoho β -listu a jedné ω -smyčky poskládané v unikátní strukturu (obr. 8) (Gooley *et al.*, 1998). Protein dále obsahuje dva solné můstky: mezi N-koncem a Asp v pozici 72 a mezi Asp21 a Lys62. Struktura kryptogeinu v roztoku je až na pár odlišností podobná jeho krystalové struktuře (O'Donohue *et al.*, 1995).



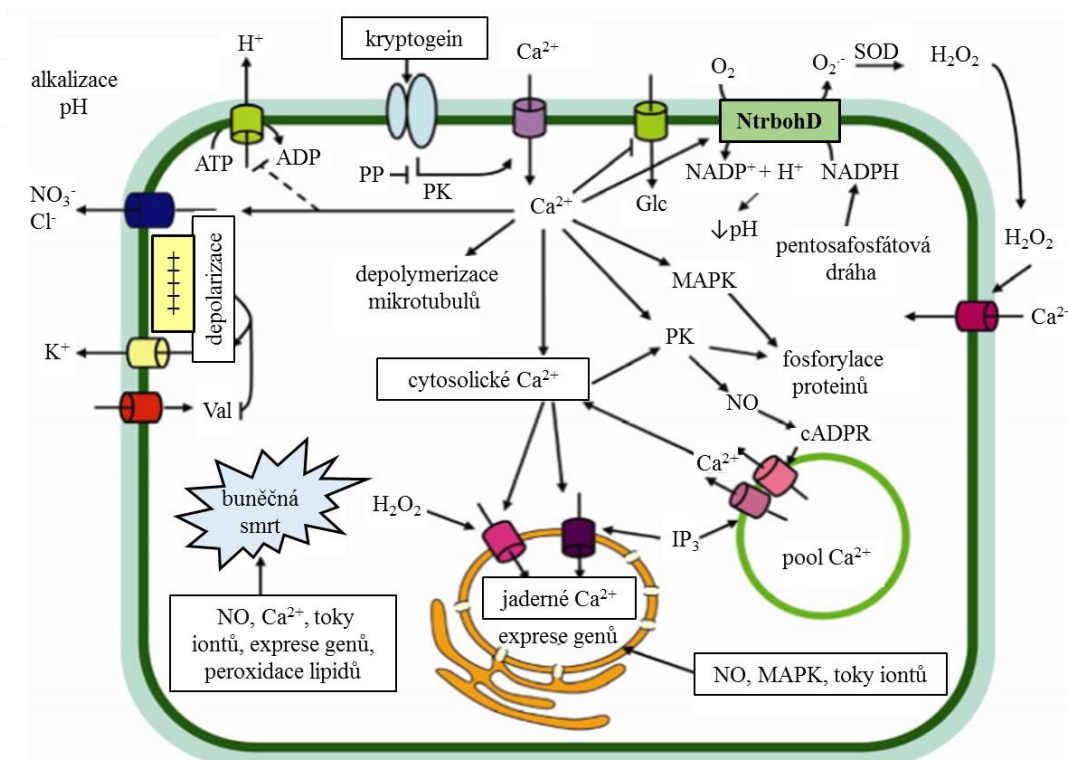
Obr. 8 Struktura kryptogeinu (převzato z Fefeu *et al.*, 1997)

ω -Smyčka přítomná u kryptogeinu je nejen vysoce konzervovaná, ale také velmi flexibilní, což vede k předpokladu, že může zaujímat významnou funkci v rozpoznání elicitinů rostlinným receptorem (Boissy *et al.*, 1999). Vazebné studie kryptogeinu prováděné na plasmatické membráně tabákových buněk umožnily charakterizaci jednoho vazebného místa s hodnotou $K_d = 2$ nM, které bylo charakterizováno jako glykosylovaný proteinový heterodimer (Bourque *et al.*, 1999).

Rozpoznávání kryptogeinu buňkou, které je následováno aktivací proteinkinasy nebo inhibicí fosfatasy, spouští produkci Ca^{2+} iontů, což obratem indukuje produkci ROS, aktivaci mitogenem aktivovaných proteinkinasy (MAPK), efflux Cl^- aniontů, depolarizaci membrány a inhibici importu glukosy, nebo tento sled událostí může vést až k inhibici H^+ -ATPasy (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Na základě výsledků s mutanty kryptogeinu bylo zjištěno, že konformační změny v ω -smyčce aktivují elicitiny, čímž jim umožňují efektivně se navázat k místům s vysokou vazebnou afinitou (Osman *et al.*, 2001). Lochman *et al.*, 2005 dále navrhli, že konformační změny ω -smyčky mohou být nezbytné ke spuštění rané obranné odpovědi, jako je syntéza ROS, ale ne pro aktivaci pozdní odpovědi jako je exprese PR proteinů a nekróza buněk.

2.3.2 Mechanismus indukce buněčné smrti vyvolané kryptogeinem

Po aplikaci kryptogeinu k buňkám tabáku dochází k několika událostem, jako jsou alkalizace extracelulárního média a efflux K^+ iontů, produkce ROS (Blein *et al.*, 1991), fosforylace proteinů (Viard *et al.*, 1994), změny ve složení lipidů (Tavernier *et al.*, 1995a), influx Ca^{2+} iontů (Tavernier *et al.*, 1995b), produkce kapsidiolu a ethylenu (Milat *et al.*, 1991) a následné změny v expresi genů (Suty *et al.*, 1995). Tyto výsledky vedly k závěru, že fosforylace proteinů následovaná influxem Ca^{2+} iontů je nejspíše nedílnou součástí iniciačních kroků u kryptogeinem indukované signální transdukce (obr. 9)(Tavernier *et al.*, 1995b).



Obr. 9 Signální dráhy aktivované kryptogeinem. NtrbohD = NADPHoxidasa plasmatické membrány tabáku, SOD = superoxididismutasa, cADPR = cyklická ADP-ribosa, IP_3 = inositoltrifosfát, PP = proteinfofosfátasa, PK = proteinkinasa, MAPK = mitogenem aktivovaná proteinkinasa (upraveno podle Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

2.3.2.1 Úloha reaktivních forem kyslíku

Rychlá a přechodná produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), včetně superoxidu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu, u buněčných suspenzí vystavených různým elicitorům je v současnosti již poměrně dobře zdokumentována. U rostlin bylo

potvrzeno zapojení ROS v obranných reakcích vyznačujících se peroxidací lipidů (Montillet *et al.*, 2005), oxidativním cross-linkingem proteinů buněčné stěny (Brisson *et al.*, 1994), peroxidativní polymerizací cinnamoylalkoholu vedoucí k lignifikaci buněčné stěny (Pugin *et al.*, 1997) a produkcí fytoalexinů (Devlin a Gustine, 1992). Bylo prokázáno, že peroxid vodíku spouští hypersenzitivní reakci některých buněk s následnou indukcí obranných genů kódujících enzymy zapojené v ochraně buněk (Levine *et al.*, 1994), nebo geny asociované se SAR (Baxter *et al.*, 2013).

2.3.2.2 Úloha oxidu dusnatého

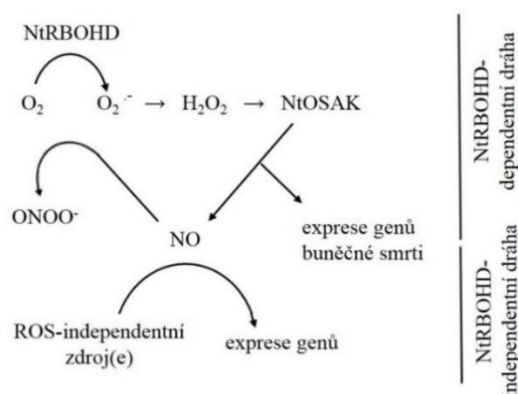
Oxid dusnatý (NO) má u rostlin mnoho funkcí. NO je endogenně produkován všudypřítomný volný plynný radikál, který hraje klíčovou roli v různých fyziologických procesech u rostlin jako je vývoj semen, kořenů, uzavírání průduchů, kvetení nebo hormonální signalizace (Besson-Bard *et al.*, 2008). NO je také předmětem intenzivního zájmu ve fytopatologii (Bellin *et al.*, 2013). NO je rapidně produkován u rostlinných buněk, které čelí útoku patogenu nebo jsou elicitovány prostřednictvím MAMP nebo DAMP (Jeandroz *et al.*, 2013). Skrze signální aktivitu NO zaujímá nezastupitelnou roli v jednotlivých stádiích obrany rostlin, např. přispívá k raným obranným odpovědím vedoucím k HR a SAR (Delledonne *et al.*, 2001; Song a Goodman, 2001). Ačkoli role NO v kontrole rezistence vůči onemocněním byla prokázána u několika patosystémů (Asai a Yoshioka, 2009; Perchepped *et al.*, 2010), tak tato funkce není doposud zcela prozkoumána.

Identifikace a funkční analýza genů indukovaných působením NO přispěla k částečnému pochopení jeho působení na molekulární úrovni (Palmieri *et al.*, 2008; Besson-Bard *et al.*, 2008). Tyto studie přispívají k prvním tvrzením (Delledonne *et al.*, 1998), že NO reguluje expresi obranných genů, jako jsou proteiny spojené se sekundárním metabolismem nebo PR proteiny. Některé výzkumy upozornily na existenci vzájemné interakce mezi NO a ROS včetně superoxidu a peroxidu vodíku, na jejichž produkci se podílí zejména aktivita NADPHoxidasy a superoxiddismutasy (SOD) (Mittler *et al.*, 2011). Tyto dva enzymy vykazují určitou podobnost: jejich produkce se odehrává simultánně a konstitutivně a představuje jednu z nejčasnějších rostlinných imunitních odpovědí (Delledonne *et al.*, 2001). Existují také důkazy, že ROS regulují syntézu NO (Srivastava *et al.*, 2009). NO i ROS odvozené od NADPHoxidasové aktivity přispívají ke spuštění HR, což se pravděpodobně

odehrává dvěma odlišnými procesy. H_2O_2 , ale ne O_2^- radikál, je klíčovou ROS efektorovou molekulou pro HR a zaujímá tak centrální roli v zapojení NO v dráze buněčné smrti (Delledonne *et al.*, 2001). Podle studií těchto vědců peroxydusitan není mediátorem HR jako je tomu v živočišných buňkách. Oproti tomu v sekundárních procesech peroxydusitan vystupuje jako esenciální intermediát buněčné smrti nejenom během HR, ale také během dalších fyziologických procesů (Serrano *et al.*, 2012).

Elicitem indukovaná produkce NO nastává simultánně s produkcí peroxidu vodíku a superoxidového radikálu, které jsou vyústěním aktivity NADPH oxidasy NtRBOHD z plasmatické membrány (Lherminier *et al.*, 2009). NO zřejmě působí jako složka mobilizující Ca^{2+} ionty, čímž přispívá k dalšímu zvýšení hladiny koncentrace volných Ca^{2+} iontů v cytosolu, primárně zprostředkované účinkem elicitoru. Pro zkoumání zapojení NO v Ca^{2+} signalizaci bylo demonstrováno, že kryptogein indukuje S-nitrosylaci kalmodulinu (CaM) (Jeandroz *et al.*, 2013). Mezi další proteiny podléhající rychlé S-nitrosylaci po působení kryptogeinu u tabákových buněk patří NtCDC 48 (protein zapojený v buněčném cyklu), člen AAA^+ ATPasové rodiny (ATPasy asociované s mnoha buněčnými procesy) vykazující chaperonovou aktivitu (Astier *et al.*, 2012).

Produkce NO indukovaná kryptogeinem je u tabákových buněk regulována přes ROS-dependentní dráhu zapojující NADPH oxidasu NtRBOHD a nejspíše je částečně i pod kontrolou působení histondeacetylasy typu 2 – jako negativních regulátorů buněčné smrti (Bourque *et al.*, 2011). Společné zapojení NO a ROS je také podporována skutečností, že kryptogein spouští produkci peroxydusitanu (ONOO^-) (obr. 10) (Kulík *et al.*, 2015).



Obr. 10 Společné zapojení NO a ROS odvozenými od aktivity NADPH oxidasy NtRBOHD v kryptogeinové signalizaci (upraveno podle Kulík *et al.*, 2015).

Dále bylo prokázáno, že ROS, ale ne NO, negativně regulují intenzitu aktivity kryptogeinem aktivované proteinkinasy NtOSAK. Navíc bylo identifikováno 15 genů časně indukovaných kryptogeinem přes signalizaci NO. Část těchto genů byla modulována i ROS a kódovala proteiny, které vykazovaly sekvenční homologii s ubikvitinligasami. Ukázalo se, že NO vyžaduje aktivitu NtRBOHD pro indukci buněčné smrti, což je v souladu s předchozí domněnkou, že ROS zapojuje NO v dráze buněčné smrti vyvolané kryptogeinem (Kulík *et al.*, 2015).

Možnost, že NO v rámci signalizace kryptogeinem interaguje s ROS, byla navržena už dříve (Foissner *et al.*, 2000). Kulík *et al.*, 2015 zatím prokázali, že ROS částečně kontrolují produkci NO, zatímco NO reguluje hladinu peroxidu vodíku. Další skutečnost podporující spojení mezi NO a ROS představuje rychlá syntéza peroxydusitanu, která byla detekována u elicitovaných tabákových buněk. Transkriptomová analýza vedla k identifikaci kryptogeinem aktivovaných genů běžně upregulovaných jak NO, tak ROS, ale downregulovaných peroxydusitanem. Tyto výsledky potvrzují, že NO a ROS, odvozené od NtRBOHD společně působí v zprostředkování kryptogeinové signalizace.

3 Experimentální část

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Agrisera (Švédsko): polyklonální králičí protilátka proti HDT3 z *Arabidopsis thaliana*.

AppliChem (Německo): sušené nízkotučné mléko.

Bachem (Švýcarsko): Boc-Lys(Ac)-4-amino-7-methylkumarin.

Bio-Rad (USA): Coomassie Brilliant Blue –R250; proteinový standard pro SDS-PAGE.

Duchefa Biochemie (Nizozemí): celulasa „Onozuka“ R10, macerozym „Onozuka“ R10, kinetin.

Fluka (Německo): 2,4-D, Ficoll PM 400, pefabloc.

Lachema (Česká republika): glukosa, hydroxid draselný; methanol.

Lach-Ner (Česká republika): chlorid draselný, chlorid sodný, D-mannitol, ethanol, glycerol, kyselina chlorovodíková.

LobaChemie (Indie): L-glutamin.

Merck (Německo): Ponceau S.

Millipore (USA): Luminata™ Classico Western HRP Substrate.

MP Biomedicals (Francie): tris(hydroxymethyl)aminomethan.

Penta (Česká republika): chlorid vápenatý.

Roche (Švýcarsko): cOmplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail.

Roth (Německo): HEPES, MTT.

Santa Cruz-Exbio (USA): Boc-L-Lys(Z)-pNA.

Serva (Německo): FDA.

Sigma-Aldrich (Německo): aceton; akrylamid; biotin; bromfenolová modř; Calcofluor White; deoxycholát Na⁺; DMSO; dodecylsulfát sodný; DTT; dusitan sodný, EDTA Na⁺; glutathion, glycin; hovězí sérový albumin; kyselina listová; kyselina octová; luminol Chemiluminiscent Peroxidase Substrate; merkaptoethanol; MES hydrát; močovina; NBT/BCIP; *N,N'*-methylenbisakrylamid; *N,N,N,N'*tetramethylethylendiamin; persíran amonný; His-tag značená rekombinantní lidská HDAC2; neocuproin, neutrální červeň, resazurin Na⁺; pantothenát vápenatý; primární monoklonální myši anti-biotin protilátka konjugovaná s alkalickou fosfátasou; sacharosa; sekundární kozí anti-králičí protilátka značená peroxidasou; sekundární kozí anti-králičí protilátka značená alkalickou fosfátasou; trichostatin A; SYPRO® Ruby Protein Gel Stain; trypsin; Tween-20,

uhličitán sodný.

Thermo Scientific (USA): biotin-HPDP; DNAsa I; neutravidinová matrice.

3.1.2 Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo); autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo); blotovací papír ALBET (ScienceLab, USA); blotovací systém Mini PROTEAN[®] Tetra Cell (Bio-Rad, USA); centrifuga Multi-Spin MSC-6000 (Biosan, Litva); centrifuga CL31R (Thermo Jouan, Francie); digitální pH metr InoLab pH level1 (Inolab, Německo); digitální předvážky (RADWAG, Polsko); dokumentační zařízení GelDoc[™] EZ Imager (Bio-Rad, USA); dokumentační systém C-DiGit (LI-COR, USA); elektroforetický systém Mini PROTEAN[®] Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); inkubátor Nüve (Nüve, Turecko); kolonky NAP-5 (GE Healthcare, Velká Británie); laminární box Biohazard Bioban 48 (Vetrotecnica, Itálie); minitřepačka 3-D (Biosan, Litva); mikrodestičky černé 96F (Eppendorf, Německo); mikrodestička Take 3[™] Multi-Volume Plate (BioTech, Česká republika); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); mikrodestičkový reader Synergy H1 (BioTech, Česká republika); mikrodestičkový reader Synergy HT (BioTech, Česká republika); mikrozkmavky Amicon[®] Ultra 0.5mL Filters (Millipore, USA); PVDF membrána Immobilon-FL s póry 0,45 μm (Millipore, USA); světelný a fluorescenční mikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko); termostat CH-100 (Biosan Litva); třepačka PST-60 HL (Biosan, Litva); třepačka s blokem Thermo Shaker TS-100 (Biosan, Litva); vortex V-1 plus (Biosan, Litva); zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA).

3.1.3 Rostlinný materiál

3.1.3.1 Pěstování rostlin

Semena *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi a *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia byla zaseta do květináčů se zahradnickým substrátem a byla umístěna do fytostronu s fotoperiodou 16/8h, kde byly rostliny pěstovány při 25°C. Listy z rostlin *A. thaliana* byly sklizeny 40 dní od vysetí, listy *N. tabacum* byly sklizeny vždy po 8 týdnech. Do listů části 8 týdenních rostlin tabáku byl injekčně vpravován kryptogein x24. Sklizené listy byly pro další práci uchovávány v mrazáku při – 80 °C.

3.1.3.2 Kultivace tabákových buněk

Buňky *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi byly kultivovány při 25°C při 160 rpm v inkubátoru s fotoperiodou 24/0h v kultivačním médiu dle Chandlera *et al.* (1972). Buněčná suspenze byla za sterilních podmínek pasážována 1x týdně (8 ml týdenní suspenze buněk do 100 ml kultivačního média). Hodnota pH média byla vždy upravena v rozmezí 5,5 - 5,7.

Pro experimenty byly používány čtyřdenní tabákové buňky nacházející se v exponenciální fázi růstu, ke kterým byl případně přidáván roztok kryptogeinu x24, ve výsledné koncentraci odpovídající 5 a 50 nM. Část experimentů s tabákovými buňkami byla uskutečňována v ekvilibračním médiu, jehož složení je uvedeno v tabulce 2. Při ekvilibraci tabákových buněk bylo postupováno tak, že buňky byly nejprve na Büchnerově nálevce odsáty z kultivačního média, poté byly zváženy a rozsuspendovány v ekvilibračním médiu o laboratorní teplotě v poměru 10 ml média na 1 g tabákových buněk. Takto připravená buněčná suspenze byla následně rozdělena do Erlenmeyerových baněk a před další prací se ještě ponechala ekvilibrovat po dobu 1 hodiny na třepačce při 25°C a 160 rpm.

Tab. 2 Složení ekvilibračního média pro tabákové buňky.

EKVILIBRAČNÍ MÉDIUM:	zásobní roztok (1 l) o pH = 5,8
mannitol	32 g
CaCl ₂	74 mg
K ₂ SO ₄	87 mg
MES-hydrát	390 mg

3.2 Použité metody

3.2.1 Příprava rostlinného materiálu

3.2.1.1 Příprava extraktů z listů, rostlinných buněk, protoplastů a rostlinných jader

Extrakty z listů rostlin byly připraveny homogenizací v třecí misce v tekutém dusíku. Po rozetření rostlinného materiálu byl ke vzorku přidán extrakční pufr v poměru 2 ml extrakčního pufru na 1 g rostlinného materiálu. Na každý 1 g rostlinného materiálu bylo

ještě přidáno 850 μ l 4M NaCl. Homogenát byl na 1 minutu umístěn do ultrazvukové lázně (za chlazení ledem, poté se nechal 30 minut extrahovat na ledu za občasného třepání, a nakonec byl zcentrifugován při 16 000 g a 4°C po dobu 20 minut.

Extrakty buněčných kultur byly připraveny homogenizací v mikrozkuhavce. Tabákové buňky byly odsáty z kultivačního média na Büchnerově nálevce, požadované množství bylo přeneseno do mikrozkuhavky, byl přidán extrakční pufr v poměru 2 ml pufru na 1 g materiálu a buňky byly mechanicky rozetřeny pomocí paliček. Na každý 1 g materiálu bylo dále přidáno 850 μ l 4M NaCl. Mikrozkuhavky s homogenátem byly následně umístěny do kádinky s ledem, která byla na 1 minutu dána do ultrazvukové lázně, a poté se nechala 30 minut extrahovat na ledu za občasného třepání. Nakonec byla reakční směs centrifugována (16 000 g, 4°C, 20 minut).

V případě protoplastů bylo postupováno podobně jako v případě tabákových buněk. Protoplasty byly nejprve centrifugovány po dobu 5 minut při 3 000 g, při laboratorní teplotě. Byl odsát supernatant, protoplasty byly v mikrozkuhavce zváženy, byl k nim přidán extrakční pufr v poměru 4 ml na 1 g materiálu a protoplasty byly mechanicky homogenizovány pomocí paliček. Následoval přidavek 4M NaCl (850 μ l na 1 g FW). Reakční směs byla 1 minutu sonikována v ultrazvukové lázni (v kádince s ledem), ponechána extrakci na ledu po dobu 30 minut, a nakonec byla centrifugována (16 000 g, 4°C, 20 minut).

U přípravy extraktů z rostlinných jader bylo používáno postupů purifikace jaderných proteinů postupy uvedenými v podkapitolách 3.2.8.1 a 3.2.8.2. Získaný pelet jaderných proteinů byl následně rozpuštěn v extrakčním pufru (50 μ l na výchozí suspenzi o obsahu 600 000 jader). Po centrifugaci byly rostlinné a buněčné extrakty přečišťovány od nízkomolekulárních látek, které by interferovaly především při fluorimetrickém stanovení aktivity HDAC. Toto přečišťování bylo provedeno gelovou chromatografií na kolonkách NAP-5 (GE Healthcare). Kolonky byly nejprve ekvilibrovány (3x 2,5 ml ekvilibračního pufru), poté byl nanesen vzorek (250 μ l extraktu). Po vsáknutí vzorku bylo na kolonku nanášeno postupně 2x 500 μ l elučního pufru a do mikrozkuhavky bylo jímáno 2x 500 μ l eluátu. Stanovení aktivity HDAC bylo provedeno pomocí dvoukrokové fluorimetrické, nebo spektrofotometrické, endpoint metody (viz. podkapitoly 3.2.1.1 a 3.2.1.2).

Použité roztoky:

Extrakční pufr: 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 10mM NaCl; 0,25mM EDTA Na⁺; 1mM DTT
4M NaCl pro extrakci

Ekvilibrační pufr:

varianta 1: 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 10mM NaCl; 0,25mM EDTA Na⁺; 1mM DTT

varianta 2: 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 10mM NaCl; 0,25mM EDTA Na⁺; 1mM DTT;
10% glycerol

Eluční pufr:

varianta 1: 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 10mM NaCl; 0,25mM EDTA Na⁺; 1mM DTT

varianta 2: 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 10mM NaCl; 0,25mM EDTA Na⁺; 1mM DTT; 4M
NaCl

3.2.1.2 Aplikace kryptogeinu x24 do listů tabáku

Do listů osmítýdenních rostlin byly nejprve jehlou na spodní straně listu opatrně vytvořeny otvory, do kterých byl následně pomocí plastové stříkačky bez jehly vpraven roztok kryptogeinu x24 v koncentracích 10, 50 a 100 nM. V případě kontrolních rostlin byla do listů aplikována deionizovaná voda. Listy byly po odběrech (0, 2, 4, 6 a 24 hod) ihned umístěny do tekutého dusíku a pro další práci následně uchovávány v mrazáku při -80°C.

3.2.1.3 Příprava protoplastů z tabákových buněk

Suspenze čtyřdenních buněk byla centrifugována při 500 g a 25°C po dobu 5 minut. Poté bylo odebráno kultivační médium a k centrifugovaným buňkám byl za účelem plazmolýzy přidán 0,4M mannitol (cca 10 ml k 45 ml výchozí buněčné suspenze). Po plazmolýze byly buňky inkubovány s lyzačním enzymovým pufrem (100 ml lyzačního pufru na 100 ml výchozí buněčné suspenze) za mírného třepání po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly protoplasty přefiltrovány přes uhelon s 99µm póry. Množství 5 ml přefiltrovaných protoplastů (varianta 1) bylo naneseno na 5 ml 6% Ficollu (popř. 9% nebo 12% Ficollu) v 15ml skleněné zkumavce. V případě varianty 2 bylo 8 ml suspenze protoplastů zakoncentrováno pomocí centrifugace a odebrání média na 1,5ml objem suspenze. Následovala centrifugace při laboratorní teplotě a 3000 g po dobu 30 minut. Protoplasty byly poté odebrány z mezivrstvy Ficollu a vody, a nakonec byly 2x promyty protoplastovým pufrem bez obsahu enzymů (5 ml

protoplastového pufru, 500 g, 3 minuty, laboratorní teplota). Následně byla suspenze protoplastů ošetřena přídatkem trichostatinu A (TSA). Byl přidán zásobní roztok o koncentraci 20 μM tak, aby výsledná koncentrace v reakční směsi byla 0,2 μM . V případě kontrolních suspenzí protoplastů byla přidána deionizovaná voda.

Použité roztoky:

Lyzační enzymový pufr: 42,5mM MES, pH = 5,5; 10mM CaCl_2 ; 0,3M mannitol; 2% celulasa, 0,2% macerozym

Protoplastový pufr: 25mM Tris-HCl, pH = 5,6; 25mM MES; 25mM CaCl_2 ; 0,3M mannitol

6%, 9% a 12% Ficoll v deionizované vodě

20 μM TSA v deionizované vodě

3.2.1.4 Příprava mezofylových protoplastů z listů *Nicotiana tabacum* metodou „tape-sandwich“

Na Petriho misku o průměru 6 cm byly položeny vybrané 2-3 zdravé nepoškozené listy z 8-10 týdenních rostlin *Nicotiana tabacum*. Horní epidermální vrstva listů byla přichycena k oboustranné lepicí pásce a na spodní epidermis byla přilepena lepicí páska Magic tape. Následně došlo opatrně k oddělení spodní epidermis a vrstvy s mezofylovými buňkami. Vrstva s mezofylovými buňkami na pásce byla následně přenesena do 10 ml enzymového roztoku. Proběhla 20 až 30 minutová inkubace na třepačce, přičemž bylo pozorováno uvolňování zelených protoplastů do média. Získaná suspenze protoplastů se nechala centrifugovat 3 minuty při 500 g a laboratorní teplotě. Protoplasty byly 2x promyty 10 ml ledově vychlazeného W5 roztoku s centrifugací opět po dobu 3 minut při 500 g a laboratorní teplotě. Následovala 30 minutová inkubace na ledové lázni. Nakonec byly protoplasty centrifugovány, bylo odsáto médium a protoplasty byly rozsuspendovány v 2 ml MMg média. Stejně jako v případě protoplastů z tabákových buněk byla suspenze protoplastů ošetřena TSA o výsledné koncentraci v reakční směsi 0,2 μM . V případě kontroly byla přidána deionizovaná voda.

Použité roztoky:

Enzymový roztok: 0,4M mannitol; 10mM CaCl_2 ; 20mM KCl; 0,1% BSA; 20 mM MES; pH 5,7 (úprava pH pomocí KOH); 1% celulasa Onozuka R10; 0,25% macerozym

Onozuka R10

W5 roztok: 154mM NaCl; 125mM CaCl₂; 5mM KCl; 5mM glukosa; 2mM MES; pH 5,7 (úprava pH pomocí KOH)

MMg roztok: 0,4M mannitol; 15mM MgCl₂; 4mM MES; pH 5,7

20μM TSA v deionizované vodě

3.2.1.5 Mikroskopické pozorování regenerace protoplastů

Ze suspenze protoplastů bylo odebráno 100 μl na podložní skličko, byl přidán zásobní roztok fluorescenční barvy Calcofluor White (CW) tak, aby výsledná koncentrace byla 10 μg/ml. Směs se nechala 10 minut inkubovat při laboratorní teplotě za tmy. Protoplasty byly poté pozorovány fluorescenční mikroskopií (excitace modrým světlem, hranol WU, světelný a fluorescenční mikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko), doba expozice: 1/25).

Použité roztoky:

Zásobní roztok Calcofluor White v deionizované vodě o c = 1 mg/ml

3.2.2 Stanovení aktivity HDAC

3.2.2.1 Fluorimetrické stanovení aktivity HDAC

Používaná fluorimetrická metoda pro stanovení enzymové aktivity HDAC je založena na deacetylaci fluorogenního substrátu Boc-Lys(Ac)-AMC (N-(4-Methyl-7-kumarinyl)-N-α-(t-butoxykarbonyl)-Nω-acetyllysinamidu) histondeacetylase a na následné reakci s trypsinem (EC 3.4.21.4) štěpícím peptidovou vazbu na karboxylové straně nechráněného lysinu. Dojde tak k uvolnění fluoreskujícího produktu 7-amino-4-methyl-kumarinu (AMC), který lze detekovat při vlnových délkách excitace $\lambda_{ex} = 354$ nm a emise $\lambda_{em} = 460$ nm. Stanovené množství AMC je přímo úměrné aktivitě HDAC v analyzovaném vzorku. Konkrétně bylo využíváno dvoukrokové endpoint metody: nejprve probíhá inkubace s HDAC (komerčním enzymem nebo připraveným extraktem), a poté se vzorek nechá inkubovat s trypsinem, který je součástí tzv. „stop roztoku“ dále obsahujícího inhibitor HDAC trichostatin A (TSA).

Do 96-jamkové destičky bylo pipetováno: 60 μl reakčního HDAC pufru, 10 μl (varianta 1) nebo 70 μl (varianta 2) vzorku a 50 μl pracovního roztoku substrátu o koncentraci 0,3 mM (finální koncentrace substrátu v jamce = 125 μM). V případě

blanku byl vzorek nahrazen reakčním pufrem. Následně se reakční směs vzorku a substrátu nechala inkubovat po dobu 30 minut při 30 °C za stálého třepání. Po inkubaci bylo do jamky přidáno 80 μ l „stop roztoku trypsin/TSA“ a proběhla další inkubace při 30°C po dobu 20 minut opět za stálého třepání. Poté byly měřena fluorescence při $\lambda_{ex} = 354$ nm a $\lambda_{em} = 460$ nm na mikrodestičkovém readeru Synergy H1 ($\lambda_{ex} = 360/40$ nm a $\lambda_{em} = 460/40$ nm na mikrodestičkovém readeru Synergy HT).

Pro měření s komerční rekombinantní HDAC 2 a u extraktů jaderných proteinů byla používána destička Take 3 (Biotek) pro analýzu vzorků v mikrolitrových objemech. Vzorky pro tato měření byly připraveny následovně: do 0,5ml mikrozkušavky bylo postupně pipetováno 10 μ l substrátu Boc-Lys(Ac)-AMC, zvolené množství enzymu HDAC 2 o $c = 0,75$ μ g/ml, popř. extraktu jaderných proteinů, a reakčního HDAC pufru. Směs byla promíchána a inkubována 30 minut při 37°C, popř. 30°C. Poté bylo do mikrozkušavky napipetováno 16 μ l „stop roztoku“ a směs byla inkubována dalších 20 minut při 30°C. Po této druhé inkubaci byly 2 μ l reakční směsi nanášeny na Take 3 destičku a byla změřena změna fluorescence při $\lambda_{ex} = 354$ nm a $\lambda_{em} = 460$ nm.

Charakteristika použitého komerčního vzorku enzymu HDAC2: purifikovaná lidská HDAC s C-terminální histidinovou kotvou, hodnota M_r 60 kDa. Jednotka aktivity HDAC je definována, jako množství enzymu schopné deacetylovat 1 pmol substrátu za 1 min při 37°C.

Použité roztoky:

Reakční pufr: 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 10mM NaCl; 0,25mM EDTA Na⁺; 1mM DTT
30mM zásobní roztok Boc-Lys(Ac)-AMC v DMSO

0,3mM pracovní roztok substrátu Boc-Lys(Ac)-AMC – ředěný zásobní roztok
v reakčním pufru

Stop roztok Trypsin/TSA pro *in vitro* aktivitu HDAC: 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 150mM NaCl; 2 μ M TSA; 2mg/ml trypsin; 30% (v/v) isopropanol

3.2.2.2 Spektrofotometrické stanovení aktivity HDAC

Kolorimetrické stanovení aktivity HDAC je v principu stejné jako fluorimetrické stanovení. Liší se konečnou detekcí vzniklého produktu – spektrofotometricky se stanovuje množství odštěpeného p-nitroanilinu (pNA) ze substrátu Boc-L-Lys(Z)-pNA

(N- α -t-butyloxykarbonyl-N- ϵ -benzyloxykarbonyl-L-lysin-4-nitroanilidu) s absorbním maximem $\lambda_{\max} = 405 \text{ nm}$.

Do 96-jamkové destičky bylo pipetováno 60 μl vzorku, jako blank byl použit reakční pufr) a 20 μl pracovního roztoku substrátu. Reakční směs byla inkubována 30 min při 30°C za stálého třepání. Poté bylo ke směsi přidáno 10 μl pracovního roztoku TSA a 10 μl „vyvolávacího“ roztoku trypsinu. Směs se ponechala inkubovat dalších 20 min při 30°C za třepání. Poté se měřil nárůst absorbance při 405 nm.

Použité roztoky:

200mM zásobní roztok Boc-L-Lys(Z)-pNA v DMSO (před použitím dále ředěn v DMSO na 20mM roztok)

1mM pracovní roztok substrátu Boc-L-Lys(Z)-pNA – ředěný zásobní roztok v reakčním pufru

Zásobní roztok 0,2 mM TSA v DMSO

Pracovní roztok 20 μM TSA - ředěný zásobní roztok v reakčním pufru

Reakční pufr: 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 150mM NaCl

„Vyvolávací“ roztok trypsinu: 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 150mM NaCl, 2 mg/ml trypsin

3.2.2.3 Vliv látek uvolňujících NO na aktivitu HDAC

Vzorek komerční lidské HDAC2 byl před fluorimetrickým stanovením aktivity HDAC inkubován s činidly uvolňujícími oxid dusnatý (NO). Testovanými činidly byly S-nitrosoglutathion (GSNO) a nitropussid sodný (SNP), jejichž výsledná koncentrace v reakční směsi se vzorkem obsahujícím HDAC byla 0,1 mM a 1 mM. Do 0,5ml mikrozkuhavky bylo napipetován reakční pufr, 2 μl komerčního enzymu, nebo extraktu, a činidlo uvolňujícího NO (množství 2mM zásobního roztoku GSNO nebo SNP, tak aby výsledná koncentrace v 14 μl reakční směsi byla 0,1 mM nebo 1 mM). Daná se roztok se ponechal 15 a 30 minut inkubovat při laboratorní teplotě, a dále se pokračovalo jako v případě stanovení aktivity HDAC v mikroobjemovém uspořádání s použitím Take 3 destičky (viz podkapitola 3.2.2.1).

Použité roztoky:

2mM GSNO v deionizované vodě

2mM SNP v deionizované vodě

Reakční pufr: 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 10mM NaCl; 0,25mM EDTA Na⁺; 1mM DTT

30mM zásobní roztok Boc-Lys(Ac)-AMC v DMSO

0,3mM pracovní roztok substrátu Boc-Lys(Ac)-AMC – ředěný zásobní roztok v reakčním pufru

Stop roztok Trypsin/TSA pro in vitro aktivitu: 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 150mM NaCl; 2 μ M TSA; 2mg/ml trypsin; 30% (v/v) isopropanol

3.2.3 Příprava S-nitrosoglutathionu

Redukovaná forma glutathionu (GSH, 614 mg) byla rozpuštěna v 3 ml 0,5M HCl na ledové lázni. Za stálého míchání bylo k roztoku GSH v HCl přidáno 138 mg NaNO₂ a reakční směs byla ponechána na ledové lázni po dobu 40 minut, během kterých se začala vytvářet červená sraženina. Sraženina byla odsáta na Büchnerově nálevce a postupně promyta 2x 10 ml ledově vychlazené deionizované vody, 2x 10 ml vychlazeného acetonu, 2x 10 ml ledově vychlazeného diethyletheru. Po promytí byla sraženina z filtračního papíru přenesena na alobal, ve kterém se po dobu 30 minut nechala dosušit v exsikátoru, a poté byla zamrazena v plastové mikrozkušavce rovněž obalené alobalem.

3.2.4 Stanovení obsahu proteinů metodou Bradfordové

Do jednotlivých jamek 96-jamkové mikroleštičky bylo pipetováno 45 μ l deionizované vody, 5 μ l vzorku nebo standardu BSA o dané koncentraci a 200 μ l pracovního roztoku činidla Bradfordové, které bylo připraveno ředěním zásobního roztoku činidla vodou v poměru 1:4. Následovala 5 minutová inkubace při laboratorní teplotě a poté byla na mikroleštičkovém readeru změřena absorbance při 595 nm. Pro stanovení kalibrační křivky byly použity roztoky BSA v koncentračním rozmezí 0,1 - 1,5 mg/ml.

Roztoky pro stanovení proteinů:

Zásobní roztok činidla Bradfordové: 50 mg Coomassie Brilliant Blue G250, 25 ml methanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné.

3.2.5 Stanovení životnosti tabákových buněk

3.2.5.1 Stanovení životnosti pomocí FDA

Metoda je založena na štěpení fluorescein diacetátu esterasami živých buněk za uvolnění fluoresceinu, který lze detekovat a kvantifikovat fluorimetricky, popř. pozorovat fluorescenční mikroskopii.

Do 96-jamkové destičky bylo pipetováno po 100 μ l buněčné suspenze a 5 μ l pracovního roztoku FDA. V případě blanku byla buněčná suspenze nahrazena kultivačním, popř. ekvilibračním, médiem. Fluorescence při $\lambda_{\text{ex}} = 486$ nm a $\lambda_{\text{em}} = 514$ nm byla měřena ihned po přidavku sondy FDA, poté následovala 15 minutová inkubace ve tmě při 25°C, opět byla změřena fluorescence a hodnoty RFU byly od sebe odečteny ($\text{RFU}_{15 \text{ min}} - \text{RFU}_{0 \text{ min}}$).

Použité roztoky:

Zásobní roztok FDA: 5 mg FDA rozpuštěno v 1 ml acetonu

3.2.5.2 Stanovení životnosti pomocí resazurinu

Metoda je založena na přeměně resazurinu (AlamarBlue, AB), modrého roztoku, životaschopnými buňkami na růžový resorufin, který fluoreskuje (Byth *et al.*, 2001). Do 1,5ml mikrozkušavek bylo odebíráno po 180 μ l buněčné suspenze, ke které bylo přidáno 20 μ l roztoku resazurinu a obsah mikrozkušavky se jemně promíchal. Směs byla inkubována po dobu 2 hodin za tmy při 25°C. Poté byly mikrozkušavky s reakční směsí na 5 minut umístěny do ultrazvukové lázně, po sonikaci následovala 10-minutová centrifugace při 15 000 g a 25°C. Supernatant (200 μ l) byl přepipetován na 96-jamkovou destičku a byla změřena fluorescence při $\lambda_{\text{ex}} = 560$ nm a $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm.

Použité roztoky:

roztok resazurinu (sodná sůl 7-hydroxy-3H-fenoxazin-3-on-10-oxidu) v deionizované vodě o výsledné koncentraci 0,15 mg/ml

3.2.5.3 Stanovení životnosti pomocí MTT

Metoda je založena na redukcí MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu) mitochondriálními dehydrogenasami metabolicky

aktivních buněk na formazanové barvivo. Vzniklý formazan je rozpustný v isopropanolu a lze ho stanovit fotometricky při 570 nm (Königshofer *et al.*, 2008).

Z buněčné suspenze tabáku bylo do 1,5ml mikrozkušavek odebráno 180 µl a bylo přidáno 20 µl roztoku MTT. Směs byla opatrně promíchána a inkubována za tmy při 25°C po dobu 2 hodin. Po inkubaci bylo do každé mikrozkušavky přidáno 800 µl isopropanolu, směs byla promíchána na vortexu a ponechána stát při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Poté byla zcentrifugována (15 000 g, 25°C , 10 minut) a 200 µl supernatantu bylo přepipetováno na 96-jamkovou destičku s následným změřením absorbance při 570 nm.

Použité roztoky:

Zásobní roztok MTT: 5 mg MTT rozpuštěno v 1 ml deionizované vody

3.2.5.4 Stanovení životnosti pomocí neutrální červeně

Metoda je založena na akumulaci neutrální červeně ve vakuolách živých buněk, které jsou schopny udržovat pH gradient na tonoplastu (Repetto *et al.*, 2008). Do 1,5ml mikrozkušavek bylo odebíráno po 195 µl buněčné suspenze, bylo přidáno 5 µl roztoku neutrální červeně a směs se jemně promíchala. Následovala 5 minutová inkubace za tmy při 25°C. Poté se směs centrifugovala při 800 g při 25°C po dobu 3 minut. Z mikrozkušavek bylo odsáto médium obsahující nezpracovanou neutrální červeně a bylo přidáno 200 µl kultivačního média bez neutrální červeně. Směs se opět zcentrifugovala (800 g, 25°C, 3 minuty) a z mikrozkušavek se odsálo médium obsahující zbytkovou neutrální červeně. K buňkám bylo přidáno 200 µl extrakčního činidla, směs se vortexovala a centrifugovala při 15 000 g, 25°C po dobu 10 minut. 200 µl supernatantu bylo přepipetováno do jamky 96-jamkové destičky a změřila se absorbance při 540 nm.

Použité roztoky:

Extrakční činidlo: ethanol-ledová kyselina octová-deionizovaná voda v poměru 50:1:49

Zásobní roztok neutrální červeně: 4 mg neutrální červeně rozpuštěné v 1 ml deionizované vody

3.2.5.5 Příprava negativní a pozitivní kontroly pro stanovení životnosti buněk

U všech uvedených metod pro stanovení životnosti byla připravena pozitivní a negativní kontrola. V případně pozitivní kontroly se jednalo o pouhý alikvot buněčné suspenze, která nebyla nijak ovlivňována. U negativní kontroly bylo vždy odebráno po 180 μl buněčné suspenze (195 μl v případě NČ), ke kterým bylo přidáno 5 μl 20% Tritonu, buňky byly vortexovány, na 5 minut zahřáty na 95°C a po ochlazení ještě na 5 minut umístěny do ultrazvukové lázně.

3.2.5.6 Mikroskopické stanovení životnosti

Na podložní sklíčko bylo pipetováno 100 μl buněčné suspenze, v případě AB, NČ a MTT již s daným barvivem po společné inkubaci v mikrozkušavce (viz podkapitoly 3.2.5.2-3.2.5.4). V případě FDA bylo na podložní sklíčko pipetováno 100 μl buněčné suspenze, 5 μl pracovního roztoku FDA a směs se inkubovala 10 minut ve tmě. Vzorky s NČ a MTT byly následně pozorovány pod světelným mikroskopem, vzorky s AB a FDA pod fluorescenčním (vzorky s AB – excitace modrým světlem, hranol B; vzorky s FDA – excitace zeleným světlem, hranol G; světelný a fluorescenční mikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko)).

3.2.6 SDS-PAGE

Pro separaci proteinů metodou SDS-PAGE, elektroforetické metody v prostředí dodecylsírany sodného, byl používán 10% dělicí gel o pH 8,8 a 4% zaostřovací gel o pH 6,8. Dělení v zaostřovacím gelu probíhalo za konstantního napětí 120 V, pro separaci v dělicím gelu bylo zvýšeno na 180 V. Vzorky pro SDS-PAGE byly připraveny tak, že vzorek proteinu byl smíchán s Laemmliho vzorkovacím pufrům v poměru 1:1. Směs vzorku s pufrům byla vložena do termobloku vyhřátého na 95°C po dobu 10 minut, následovalo ochlazení na ledu a centrifugace při 1200 rpm po dobu 5 minut. Požadovaný objem takto připravených vzorků byl nanesen do jamky gelu již umístěného v elektroforetické komůrce. U standardů molekulové hmotnosti bylo nanášeno 5 μl bez předchozí inkubace v termobloku. Po SDS-PAGE byly separované proteiny v polyakrylamidových gelech detekovány barveny barvivem Coomassie Blue, popř. komerčním roztokem SYPRO[®] Ruby, nebo byly dále použity pro analýzu metodou Western blot.

V Tab. 3 je uvedeno složení roztoků pro přípravu dvou SDS-PAGE gelů pro skla o rozměrech 7,3 x 10 cm se spacery 0,75 mm.

Tab. 3 Složení dělicího a zaostřovacího gelu používaného pro SDS-PAGE (množství je uvedeno v ml).

typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	1,5M Tris- HCl pH = 8,8	0,5M Tris-HCl pH = 6,8	H ₂ O	10% SDS	TEMED	10% APS
dělicí 10%	3,3	2,5	-	4,1	0,1	0,01	0,1
zaostřovací 4%	0,65	-	1,25	3,05	0,05	0,01	0,1

Použité roztoky:

Elektrodový pufr: 0,025M Tris-HCl; 0,192M glycin; 0,1% SDS, pH 8,3

Laemmliho vzorkovací pufr: 0,125M Tris-HCl o pH = 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 5% merkaptoethanol; 0,02% bromfenolová modř

proteinový standard molekulové hmotnosti: komerční Precision Plus Protein Dual Xtra 2-250 kDa (BioRad)

3.2.6.1 Barvení separovaných proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue

Během barvení (bez předchozí fixace proteinů v gelu) byl gel inkubován v roztoku Coomassie Blue R250 při laboratorní teplotě přes noc. Druhého dne byl barvicí roztok slit a do krabičky s gelem byl přidán odbarvovací roztok. Odbarvování probíhalo 2 hodiny, opět při laboratorní teplotě. Proteiny byly detekovány pomocí dokumentačního zařízení GelDoc (Biorad).

Použité roztoky:

Coomassie Brilliant Blue R250

Odbarvovací roztok pro Coomassie Blue: 40% methanol, 10% kyselina octová

3.2.6.2 Barvení separovaných proteinů pomocí SYPRO® Ruby Protein Gel Stain

Barvení předcházela fixace proteinů gelu pomocí fixačního roztoku po dobu 30 minut. Po fixaci byl gel s proteiny inkubován v roztoku s barvicím roztokem SYPRO® Ruby Protein Gel Stain v plastové krabičce obalené alobalem za mírného třepání při

laboratorní teplotě a přes noc. Druhý den byl barvicí roztok slit a byl přidán odbarvovací roztok. Odbarvování probíhalo 30 minut při laboratorní teplotě. Proteiny byly detekovány pomocí dokumentačního zařízení GelDoc (Biorad).

Použité roztoky:

Fixační roztok: 10% methanol, 7% kyselina octová

SYPRO[®] Ruby Protein Gel Stain (Sigma Aldrich)

Odbarvovací roztok: 10% methanol, 7% kyselina octová

3.2.7 Western blot

Western blot, metoda pro detekci specifických proteinů ve vzorku, byl proveden v uspořádání „tank blotting“. Do blotovací komůrky s pufrem byla vkládána uzavřená kazeta, která se od černé strany kazety skládá v uspořádání porézní houbička, filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír, porézní houbička. Byla používána PVDF membrána, kterou bylo potřeba před použitím namočit na 15 sekund do methanolu. Poté byla společně s blotovacími papíry ještě na 10 minut namočena do blotovacího pufru. Transfer proteinů z polyakrylamidového gelu na membránu probíhal 2 hodiny při konstantním proudu nastaveném na 3,75 mA/cm². Úspěšnost transferu proteinů z gelu na PVDF membránu byla vždy ověřována reversibilním barvením proteinů roztokem Ponceau S. PVDF membrána s proteiny byla na 20 minut ponořena do daného barvicího roztoku, a poté byla opláchnuta deionizovanou vodou, aby došlo k jeho zpětnému vymytí.

Následovala blokace membrány s přenesenými proteiny. Byl používán postup blokace doporučený výrobcem protilátek firmou Agrisera. Blokace probíhala v 5% roztoku nízkotučného mléka v TTBS po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byla k PVDF membráně přidána primární protilátka proti histondeacetylase HDT3 z *Arabidopsis* (ředění 1:2500 v 2,5% mléce v TTBS), se kterou se nechala inkubovat přes noc v ledničce. Druhý den byla membrána nejprve 3x po 10 minutách promyta roztokem TTBS a poté následovala druhá blokace v 10% roztoku nízkotučného mléka v TTBS po dobu 10 minut. Pak byla přidána sekundární protilátka značená AP (ředění 1:5000) nebo HRP (ředění 1:10 000). V obou případech byla sekundární protilátka k membráně nanášena v 2,5% mléce v TTBS. Po inkubaci s protilátkou, která probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě, byla membrána promývána v roztoku TTBS (6x po dobu 10 minut). Nakonec se k membráně v případě sekundární Ab značené AP

na 10 minut přidalo 2,5 ml roztoku NBT/BCIP. Barvicí roztok se slil, membrána se opláchla deionizovanou vodou a vzniklé modrofialové zbarvení bylo detekováno dokumentačním systémem GelDoc (Biorad). V případě sekundární Ab značené HRP byly k membráně (o rozměrech 5x8 cm) přidány 4 ml komerčního roztoku luminolu (Luminata™ Classico Western HRP Substrate) a po 10 minutách byla membrána vložena do skenovacího zařízení C-DiGit (LI-COR, model 3600).

Roztoky použité pro metodu Western blot

Blotovací pufr: 0,025M Tris; 0,192M glycin; 20% (v/v) methanol; pH 8,3

Barvicí roztok NBT-BCIP: komerční roztok NBT-BCIP (Sigma)

Barvicí roztok Ponceau S : 0,2% Ponceau S; 10% (v/v) kyselina octová

Luminol: komerční roztok Luminata™ Classico Western HRP Substrate (Millipore)

Nízkotučné sušené mléko (2,5%; 5% a 10%) v TTBS

Pracovní pufr pro imunodetekci (TBS): 20mM Tris, 500mM NaCl, pH 7,5

Primární protilátka: komerční králičí primární protilátka proti HDT3 z *Arabidopsis* (1:2500 v 2,5% nízkotučném sušeném mléku v TTBS)

Sekundární protilátka: komerční sekundární kozí anti-králičí protilátka značená alkalickou fostatasou (1:5000 v 2,5% nízkotučném sušeném mléku v TTBS) Sekundární protilátka: komerční sekundární kozí anti-králičí protilátka značená křenovou peroxidasou (1:10 000 v 2,5% nízkotučném sušeném mléku v TTBS)

Tween v TBS (TTBS) : 1 ml Tween-20 do 1000 ml TBS

3.2.8 Izolace jader metodou cell sorting

Jádra z buněčných suspenzí *N. tabacum* cv. Xanthi byla tříděna ze čtyřdenních buněk metodou cell sorting Ing. Beátou Petrovskou, Ph.D. z Ústavu experimentální botaniky (ÚEB). Jádra byla tříděna pomocí sortovacího průtokového cytometru podle protokolu Petrovská *et al.*, 2014 s výjimkou homogenizace buněk. Ta byla pro dané buňky za účelem největšího výtěžku intaktních jader ještě optimalizována. Ke třídění bylo používáno 50 ml buněčné suspenze, ze které bylo po optimalizaci homogenizace buněk (sonikace: 35% output, 5 sekund) dosaženo výtěžku v rozmezí 700 000 - 1 000 000 jader.

3.2.9 Purifikace jaderných proteinů

3.2.9.1 Purifikace proteinů z rostlinných jader s DNAsou I

K peletu rostlinných jader byl přidán lyzační pufr pro jádra v poměru 50 μ l na cca 1 000 000 jader). Následovalo krátké vortexování a suspenze byla po dobu 10 minut sonikována při pokojové teplotě. Poté byl ke směsi přidán 1 μ l 10 U/ μ l DNAsy I a po promíchání byla směs inkubována po dobu 2 hodin při 37 °C za stálého třepání (900 rpm). Po inkubaci byl ke směsi přidán další 1 μ l DNAsy I a pokračovala inkubace za již uvedených podmínek, tentokrát přes noc. Následující den byl vzorek centrifugován po dobu 15 minut při 16 000 g. Proteiny přítomné v supernatantu byly překryty vychlazeným acetonem (-20°C, množství acetonu = 4x objem supernatantu) a vzorek byl umístěn do mrazáku s -20°C po dobu 24 hodin. Po precipitaci proteinů byla směs centrifugována při 16 000 g po dobu 15 min při 4°C a precipitát byl rozpuštěn v 50 μ l Laemmliho pufru, sonikován 10 minut a zahřát na 100°C po dobu 10 minut (vzorek: „precipitate fraction“). Pelet z kroku po druhém přidavku DNAsy I byl také rozpuštěn v Laemmliho pufru a bylo s ním dále postupováno stejně jako se vzorkem „precipitate fraction“. Tento vzorek obsahoval proteiny, které nebyly uvolněny přímo DNAsou I (vzorek: „pellet fraction“). Oba vzorky byly následně podrobeny analýze SDS-PAGE a Western Blotu.

Použité roztoky:

Lyzační pufr pro jádra: 25mM HEPES/NaOH, pH = 7,5; 150mM NaCl; 0,1% (w/v) sodná sůl deoxycholové kyseliny; 10mM MgCl₂; 10mM CaCl₂; 1mM DTT; 1mM pefabloc; 1x cOmplete EDTA free

3.2.9.2 Purifikace proteinů z rostlinných jader s benzonasou

K suspenzi rostlinných jader bylo přidáno 50 μ l reakčního pufru (na cca 1 000 000 jader) za účelem uvolnění formaldehydových cross-linků. Suspenze s pufrem byla po dobu 9 hodin za mírného třepání inkubována při 70°C. Následovalo štěpení DNA: ke směsi bylo přidáno 50 μ l „cleaving“ pufru a 5 μ l benzonasy a směs se nechala reagovat při 25°C za třepání po dobu 24 hodin. Poté byla směs překryta vychlazeným acetonem (-20°C, množství acetonu = 4x objem supernatantu) a vzorek byl umístěn do mrazáku s -20°C po dobu 24 hodin. Precipitát byl buď rozpuštěn v 25 μ l Laemmliho

puftru při 50°C po dobu 30 minut a proteiny byly analyzovány SDS PAGE a následným Western blotem, nebo byl rozpuštěn v 25 µl extrakčního puftru (bez zahřívání).

Použité roztoky:

„Cleaving“ pufr: 50mM Tris-HCl, pH = 8,0; 2mM MgCl₂; 8M močovina; 10mM DTT

Reakční pufr: 50mM Tris-HCl, pH = 8,0; 2mM MgCl₂

3.2.10 Detekce S-nitrosylovaných proteinů metodou „biotin switch“

Metoda tzv. „biotin switch“ (BST) slouží k detekci a identifikaci S-nitrosylovaných proteinů. Jedná se o tříkrokovou metodu, která byla navržena Jaffreyem a jeho kolegy v roce 2001 (Jaffrey a Snyder, 2001). Suspenze rostlinných jader (1 000 000 jader) byla na 10 minut umístěna do ultrazvukové lázně, centrifugována (12 000 g, 4°C, 15 minut) a supernatant byl ihned upraven pro metodu biotin switch. Komerční lidská HDAC2 (pozitivní kontrola) byla nejprve preinkubována s GSNO o výsledné koncentraci 250 µM a dále s ní bylo pracováno jako v případě extraktu tabákových jader.

Ke vzorkům byl přidán 1 ml čerstvě připraveného HENT puftru, reakční směs byla 1 minutu důkladně vortexována a homogenát byl po dobu 15 minut ponechán na ledu. Po inkubaci byly vzorky zcentrifugovány (12 000 g, 4 °C, 10 min), supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky a znovu centrifugován (12 000 g, 4 °C, 10 min). Supernatant byl opět přenesen mikrozkušavky, byla změřena jeho koncentrace proteinů metodou Bradfordové s následnou úpravou obsahu proteinů na koncentraci 0,1 µg/µl. Objem obsahující 10 µg proteinu byl napipetován do 1,5 ml mikrozkušavky a byl přidán čerstvě připravený HENS pufr v čtyřnásobném množství, tj. 40 µl. Ke vzorku bylo přidáno MMTS (0,2mM) s SDS (2%). Následovala inkubace při 50°C po 30 minut. Poté byl ke směsi 2x přidáno 1 ml vychlazeného acetonu (-20°C) s následovaným vortexováním. Po 30 minutové inkubaci při -20°C byly vzorky centrifugovány (12 000 g, 4 °C, 10 min). Supernatant byl odstraněn dekantací a ke zbytku byl přidán ještě 1 ml vychlazeného acetonu, opět následovala centrifugace (12 000 g, 4 °C, 10 min). Supernatant byl přepipetován do nové mikrozkušavky a pelet byl vysušen ve tmě v chladicí komoře po dobu 10 minut. K sedimentu vzorku proteinu byla přidána 1mM kyselina askorbová a ihned 4mM Biotin HPDP v DMF (Biotin – EZ-Link™ Biotin-HPDP; Thermo scientific; 21341). Následovala inkubace po dobu 1 hodiny, poté bylo ke vzorku přidáno 200 µl vychlazeného acetonu (-20°C) s inkubací přes noc -20°C. Následující den po inkubaci byly vzorky centrifugovány (12 000 g,

4 °C, 10 min), supernatant byl odstraněn dekantací a k peletu byl připipetován vychlazený aceton (1 ml). Stěny mikrozkuřavky a povrch peletu byly jemně vypláchnuty vychlazeným acetonem, aby došlo k odstranění zbytků biotin-HPDP. Následovala centrifugace (12 000 g, 4 °C, 5 min). Pelet byl použit pro následnou analýzu Western blotem a pro afinitní purifikaci.

Použité roztoky:

HENT pufr (zásobní): 100mM HEPES, pH = 7,4 (úprava pomocí 10M NaOH); 10mM EDTA; 0,1mM Neocuproin; 1% Triton-X

HENS pufr (zásobní): 225mM HEPES, pH na 7,2 (úprava pomocí 10M NaOH); 0,9mM EDTA; 0,1mM Neocuproin; 2,5% SDS

Complete mini-EDTA koktejl inhibitorů proteas: 1 tableta rozpuštěna v 10ml HENT pufru

3.2.10.1 Analýza S-nitrosylovaných proteinů Western blotem

Analýza S-nitrosylovaných proteinů Western blotem se částečně lišila od postupu při detekci HDAC popsané v kapitolách 3.2.5 a 3.2.6. Separace proteinů SDS-PAGE, jako dílčího kroku Western blotu, proběhla za neredukujících podmínek. Vzorek proteinu pro SDS-PAGE byl tedy smíchán s Laemmliho vzorkovacím pufrům bez β-merkptoethanolu a vzhledem k labilitě vazby proteinu s biotinem-HPDP nebyl zahříván v termobloku. Separace proteinů proběhla v 12% dělicím gelu o pH 8,8 (tab. 4) a 4% zaostřovacím gelu (tab. 3) o pH 6,8.

Tab. 4 Složení 12% dělicího gelu používaného pro SDS-PAGE pro přípravu dvou SDS-PAGE gelů pro skla o rozměrech 7,3 x 10 cm se spacersy 0,75 mm. (množství je uvedeno v ml).

typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	1,5M Tris-HCl pH = 8,8	H ₂ O	10% SDS	TEMED	10% APS
dělicí 12%	4	2,5	3,4	0,1	0,01	0,1

Po elektroforetické separaci byly proteiny z gelu přeneseny na povrch nitrocelulosové membrány pomocí zařízení pro rychlý transfer proteinů Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) s následujícím nastavením: 25 V, 2,5 A a dobou přenosu 10 minut. Po kontrole přenosu proteinů na membránu reversibilním barvením s Ponceau S následovala blokáce membrány 1% mlékem v TBST dále obsahujícím

1% BSA po dobu 2 hodin. Následovala inkubace s primární monoklonální anti-biotin protilátkou již konjugovanou s alkalickou fosfátasou (ředění 1:10 000) v 1% mléce v TBST, a to přes noc při 4 °C. Nakonec byla membrána promyta 3x 50ml TBST a proběhlo barvení pomocí NBT-BCIP, viz kapitola 3.2.6.

3.2.10.2 Afinitní purifikace S-nitrosylovaných proteinů

Afinitní purifikaci byla uskutečněna na neutravidinové matici, která byla nejprve promyta neutralizačním pufrem (2x 100 µl), přičemž objem neutravidinové matrice byl volen v závislosti na výchozím množství proteinů v doporučeném množství 35 µl matrice na 250 µg značených proteinů. Následovala centrifugace (200 g, 4°C, 2 minuty) a odstranění supernatantu. Poté byla matrice ekvilibrována přidavkem 100 µl neutralizačního pufru s následnou 30 minutovou inkubací na orbitální míchačce. Poté proběhla opět centrifugace při 200 g a k matici bylo přidáno 100 µl neutralizačního pufru, tentokrát společně se vzorky. Inkubace matrice se vzorky proběhla za tmy a laboratorní teploty po dobu 1 hodiny na orbitální míchačce. Následovala 1 minutová centrifugace při 200 g, při které byl odstraněn supernatant a matrice byla 4x promyta 350 µl promývacího pufru. K matici bylo přidáno 150 µl promývacího pufru a následovalo její přenesení do prázdných, uzavřených kolonek. Eluce navázaných proteinů byla uskutečněna přidavkem 100 µl elučního pufru se 100mM β-merkptoethanolem. Před použitím byl pufr zahřát na 95°C po dobu 5 minut. Purifikované proteiny byly precipitovány přes noc v acetonu při -20°C. Druhý den následovala centrifugace (14 000 g, 4°C, 30 minut), sediment byl promyt 1 ml vychlazeného acetonu a znovu centrifugován (14 000 g, 4°C, 30 minut). Poté byl sediment rozpuštěn v 20 µl HENS pufru. Proteiny po uvedené afinitní purifikaci byly elektroforeticky separovány za denaturujících podmínek bez obsahu SDS.

Použité roztoky:

Neutralizační pufr: 20mM HEPES-NaOH, pH 7,7; 100mM NaCl; 1mM EDTA; 5% (v/v) Triton-X 100

Promývací pufr: 20mM HEPES-NaOH, pH 7,7; 600mM NaCl; 1mM EDTA, 5% (v/v) Triton-X 100

Eluční pufr: 200mM HEPES-NaOH, pH7,7; 100 mMNaCl; 1mM EDTA; 100mM β-merkptoehanol

4 Výsledky

Cílem experimentální části diplomové práce bylo nejprve dokončit optimalizaci metod pro stanovení aktivity a hladiny HDAC v rostlinných extraktech, které byly zaváděny již v rámci práce bakalářské. Poté byla práce soustředěna na studium HDAC v mechanismu buněčné smrti u listů tabáku a suspenze tabákových buněk po aplikaci kryptogeinu x24 a na úlohu HDAC během regenerace protoplastů tabáku.

V rámci optimalizace metod bylo nejprve řešeno fluorimetrické stanovení aktivity HDAC – konkrétně detekce produktu 7-amino-4-methylkumarinu s následnou optimalizací metody pro stanovení enzymové aktivity HDAC v rostlinných extraktech. Vzhledem k tomu, že se nepodařilo zoptimalizovat podmínky fluorimetrického stanovení aktivity HDAC v extraktech z listů rostlin, byla pro měření aktivity HDAC u tohoto typu vzorku zaváděna metoda spektrofotometrická. Poté byla práce zaměřena na detekci HDAC v extraktech z rostlinných jader pomocí Western blotu. Extrakty připravené z vytríděných jader byly používány za účelem zakoncentrování žádaných jaderných proteinů. Pro purifikaci proteinů z jader byly testovány dva postupy, lišící se především použitým enzymem štěpicím DNA.

V další části se experimenty týkaly *in vitro* pokusů testování vlivu donorů NO na aktivitu HDAC a detekce jaderných proteinů metodou biotin switch (BST). V rámci BST byl pro konečnou detekci S-nitrosylovaných proteinů uskutečněn Western blot, celkové proteiny byly barveny pomocí stříbra a komerčního roztoku SYPRO[®] Ruby.

Před vlastními biologickými pokusy byly ještě testovány metody pro stanovení životnosti tabákových buněk. Konkrétně se jednalo o metody s fluorescein diacetátem, resazurinem, MTT a neutrální červení. Výběr nejvhodnější metody stanovení viability pro tabákové buňky kultivaru Xanthi umožnilo pozorování změn v jejich životnosti u následných experimentů s aplikací elicitinu kryptogeinu. Kryptogein byl aplikován i do listů tabáku a v obou případech byl u připravených extraktů sledován jeho vliv na aktivitu HDAC. Druhou částí biologických pokusů bylo sledování změn v aktivitě HDAC po odstranění buněčné stěny rostlinných buněk a následné regeneraci získaných protoplastů. Protoplasty byly připravovány z listů a buněčných suspenzí tabáku, přičemž podíl protoplastové suspenze byl ovlivněn přidávkem trichostatinu A.

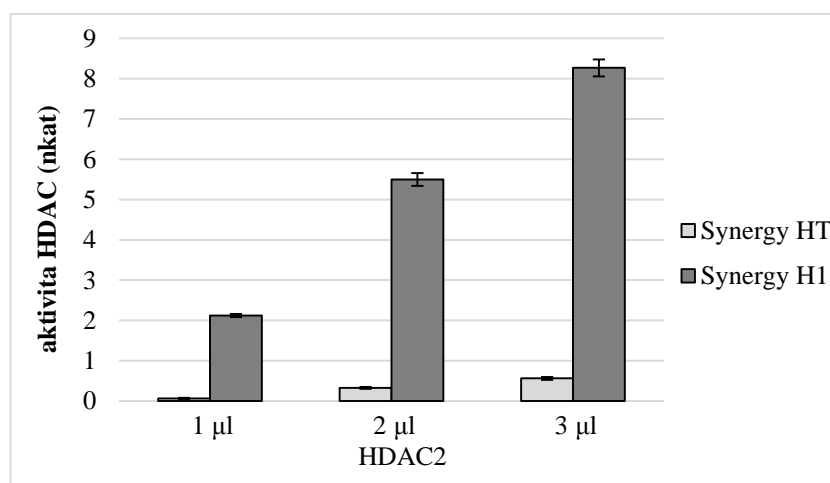
Používaným materiálem byly kromě rostlin a buněčné kultury tabáku ještě listy *Arabidopsis thaliana* ekotypu Columbia, jejichž extrakty sloužily jako pozitivní kontrola při detekci HDAC metodou Western blot.

4.1 Optimalizace stanovení aktivity HDAC

4.1.1 Fluorimetrické stanovení aktivity HDAC

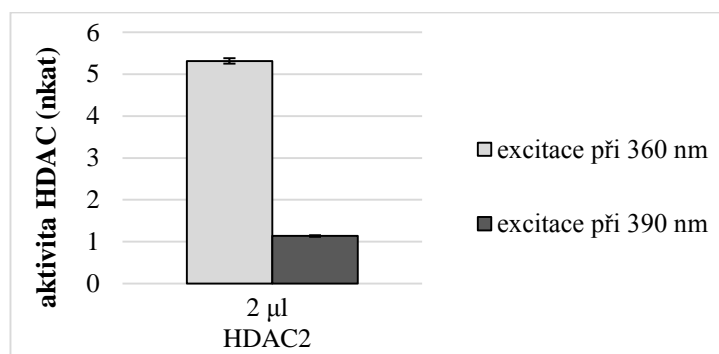
Fluorimetrická metoda stanovení aktivity HDAC využívá fluorogenního substrátu Boc-Lys(Ac)-AMC. V prvním kroku stanovení enzymové aktivity HDAC dochází k deacetylaci pomocí HDAC, ve druhém kroku dochází ke štěpení substrátu trypsinem na karboxylové straně již nechráněného lysinu za uvolnění 7-amino-4-methylkumarinu, který je detekován. Uvedená fluorimetrická endpoint metoda byla zaváděna již v rámci bakalářské práce podle dostupné literatury zabývající se studiem živočišných HDAC (Wegener *et al.*, 2003).

Bylo opakováno stanovení aktivity HDAC 2-krokovou endpoint metodou za účelem ověření metody a její další optimalizace. Stanovení bylo nejprve provedeno s komerčním rekombinantním enzymem lidské HDAC2 v uspořádání na destičce Take 3, která umožňuje analýzu vzorků v objemu jednotek mikrolitrů (obr. 11). Měření bylo uskutečněno na dvou mikrodestičkových readerech (Synergy HT a Synergy H1) s nastavením citlivosti fotonásobiče readeru pro detekci fluorescence produktu reakce v obou případech na hodnotu $S = 70$.



Obr.11 Stanovení aktivity HDAC fluorimetrickou dvoukrokovou endpoint metodou u komerčního enzymu lidské HDAC2. Měření provedeno na mikrodestičkových readerech Synergy HT (optické filtry, $\lambda_{ex} = 360 \pm 20$ nm) a Synergy H1 (monochromátory, $\lambda_{ex} = 360$ nm).

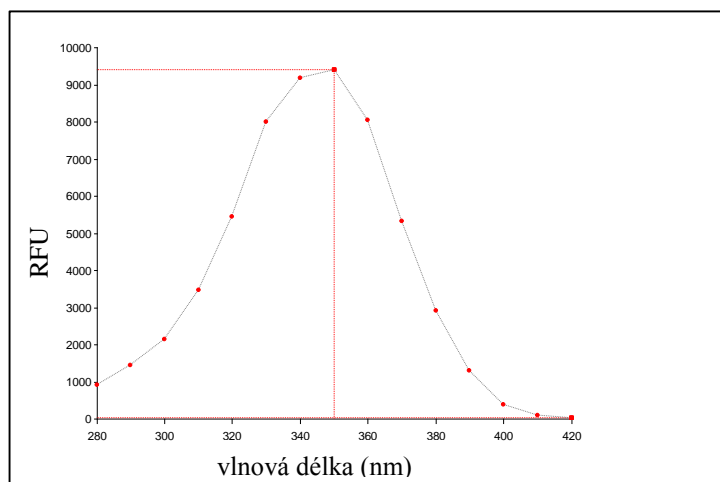
Bylo potvrzeno, že pro detekci 7-amino-4-methylkumarinu (AMC), jehož stanovení odpovídá aktivitě HDAC, je zásadní excitace o přesné vlnové délce. V případě Synergy HT bylo možné nastavit vlnové délky pro excitaci a emisi pouze pomocí optických filtrů (nastavení $\lambda_{\text{ex}} = 360 \pm 20$ nm a $\lambda_{\text{em}} 460 \pm 20$ nm). Mikrodestičkový reader Synergy H1 obsahuje monochromátory dovolující nastavení přesných vlnových délek excitace a emise s rozlišením 1nm. V tomto případě byly nejprve použity vlnové délky $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm a $\lambda_{\text{em}} 460$ nm podle měření uskutečněných na readeru Synergy HT (obr. 11), a pak bylo zopakováno stanovení aktivity HDAC při $\lambda_{\text{ex}} = 390$ nm a $\lambda_{\text{em}} 460$ nm (obr. 12), jak je uvedeno v protokolu publikovaném v práci Wegener *et al.*, 2003. Detekované hodnoty fluorescence přístrojem Synergy H1 při uvedených dvou rozdílných vlnových délkách excitace dosahují při stejném nastavení citlivosti fotonásobiče velmi odlišných intenzit (obr. 12).



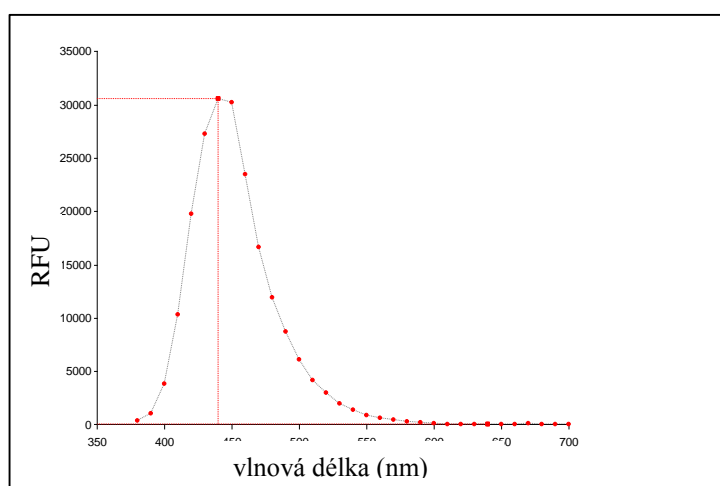
Obr. 12 Stanovení aktivity HDAC fluorimetrickou dvoukrokovou endpoint metodou u komerčního enzymu HDAC2 s odlišnou excitací (při 360 nm a 390 nm).

Na základě tohoto zjištění bylo proměřeno excitační spektrum 7-amino-4-methylkumarinu (AMC) (obr. 13). Ukázalo se, v prostředí použitého reakčního pufru pro stanovení aktivity HDAC je při nastavení emisní vlnové délky 460 nm hodnota excitačního maxima pro AMC 354 nm, což se shoduje s informacemi dohledanými v literatuře (informace o produktu AMC (CAS: 26093-31-2) uvedené výrobcem Sigma-Aldrich). Rovněž bylo proměřeno i emisní spektrum pro AMC (obr. 14). V případě stanovení aktivity HDAC při vlnové délce excitace 354 nm a v prostředí použitého reakčního pufru je hodnota emisního maxima pro AMC rovna 440 nm. Avšak při stanovení AMC s vlnovou délkou emise 460 nm detekované hodnoty fluorescence téměř dosahují uvedeného emisního maxima. Pro další práci bylo tedy využíváno

stanovení aktivity HDAC s detekcí AMC při kombinaci excitační vlnové délky 354 nm a emisní 460 nm.



Obr. 13 Excitační spektrum 7-amino-4-methylkumarinu (AMC).



Obr. 14 Emisní spektrum 7-amino-4-methylkumarinu (AMC).

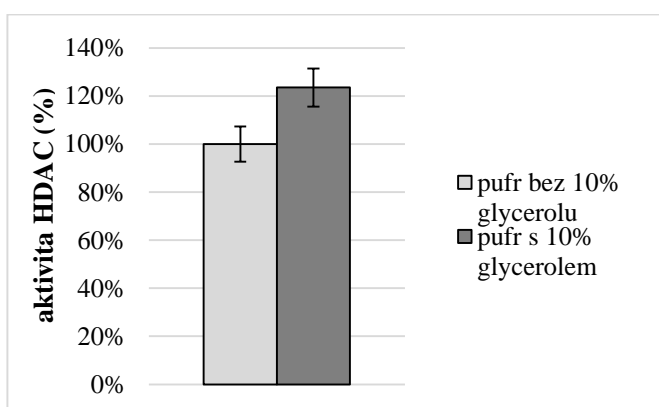
Aktivita HDAC 2 uvedená výrobcem (Sigma-Aldrich) je 0,01667 pkat (přeměna 1 pmol substrátu za 1 minutu při 37°C). Námi stanovená aktivita tohoto enzymu o c = 0,75 µg/ml HDAC2 odpovídala 2,122 nkat. Aktivita byla stanovena na základě kalibrační křivky s 7-amino-4-methylkumarinem.

4.1.2 Fluorimetrické stanovení aktivity HDAC v rostlinných extraktech

Po vyřešení problému s detekcí AMC za použití komerčního rekombinantního enzymu bylo přejito k optimalizaci stanovení aktivity HDAC v extraktech připravených ze suspenzí tabákových buněk a z listů tabáku.

Vzhledem ke zhášení fluorescence interferujícími látkami přítomnými v rostlinných extraktech, pozorovanému v rámci BP, je potřeba vzorky rostlinných extraktů přečišťovat na kolonkách gelovou chromatografií. Konkrétně byly používány kolonky NAP-5 s náplní Sephadex G-25.

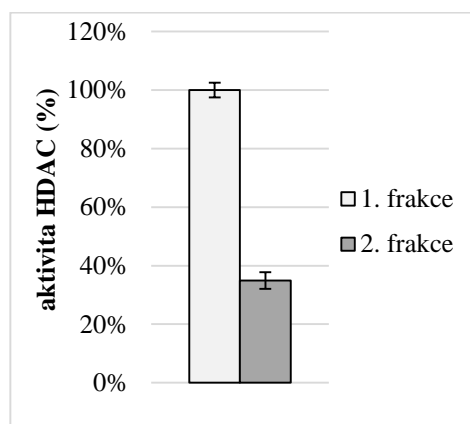
V rámci této práce bylo testováno, zda je pro ekvilibraci daných kolonek dostačující pouze TRIS pufr (50mM Tris-HCl, pH 8,0, 10mM NaCl, 0,25mM EDTA Na⁺, 1mM DTT), používaný rovněž pro extrakci HDAC, nebo zda bude pro následné stanovení aktivity HDAC v přečištěném extraktu vhodnější ekvilibrace uvedeným TRIS pufrem s přidavkem 10 % glycerolu. Dochází tak k vytvoření hydrofobnějšího prostředí, což může napomáhat stabilizaci HDAC. Aktivita HDAC stanovená v rostlinném extraktu po přečištění na kolonce ekvilibrované TRIS pufrem s 10% glycerolem byla ve srovnání s extraktem po přečištění na kolonce ekvilibrované pouze TRIS pufrem vyšší (obr. 15). Pro další práci byl proto používán ekvilibrační pufr s přidavkem glycerolu.



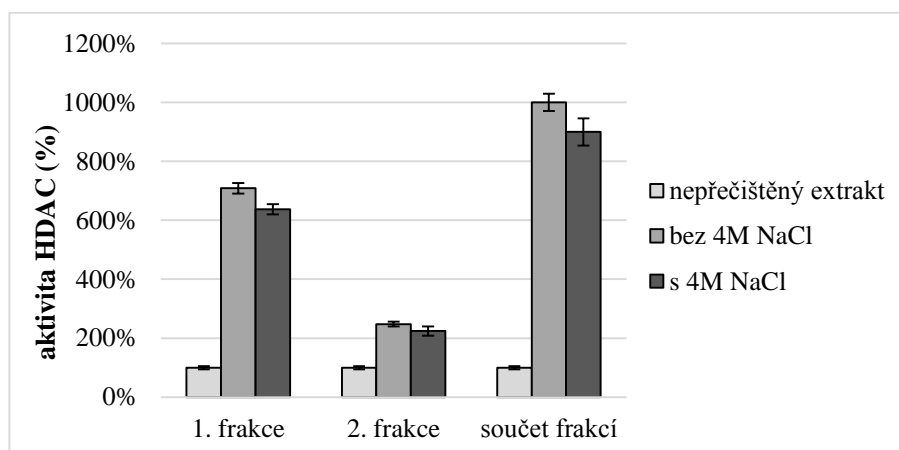
Obr. 15 Porovnání aktivity HDAC v rostlinném extraktu po přečištění gelovou chromatografií na kolonkách ekvilibrovaných pufrem obsahujícím 10% glycerol a pufrem bez glycerolu.

Pro stanovení aktivity HDAC v rostlinném extraktu byly při gelové chromatografii sbírány dvě eluované frakce (250 μ l vzorku eluováno 2x 500 μ l elučního pufru) a v těchto dvou frakcích byla stanovena aktivita HDAC (obr. 16), jejichž hodnoty se následně sčítaly. U elučního kroku byla také testována změna ve složení elučního pufru – konkrétně zvýšená iontová síla pomocí přidavku 4M NaCl (vzhledem k TRIS pufru v poměru jako je tomu při extrakci HDAC: 2 ml extrakčního pufru a 850 μ l 4M NaCl (obr. 17). Tento optimalizační krok ale neměl významný vliv na výtěžek proteinů

v přečištěných frakcích a k vyšší aktivitě HDAC. Proto byl pro eluci extraktu z kolonek pro další práci nadále používán eluční TRIS pufr pouze s přídavkem 10% glycerolu bez NaCl.

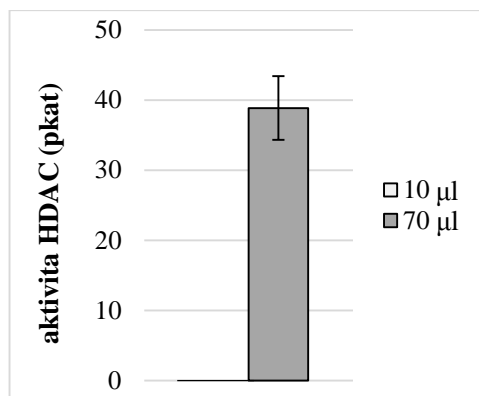


Obr. 16 Porovnání aktivity HDAC v 1. a 2. eluované frakci přečištěného rostlinného extraktu.



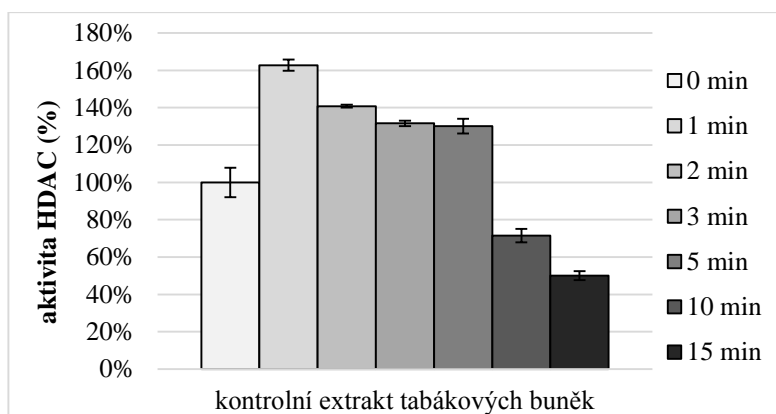
Obr. 17 Porovnání aktivity HDAC v rostlinném extraktu po přečištění gelovou chromatografií a eluci s a bez přídavku 4M NaCl. Uvedena aktivita HDAC v 1. eluované frakci, aktivita HDAC ve 2. eluované frakci a součet aktivit HDAC v obou frakcích – ve srovnání s nepřečištěným extraktem.

Dále byla optimalizováno stanovení aktivity HDAC mohlo navýšením množství extraktu nanášených do jamky mikrodestičky při zachování stejného celkového reakčního objemu v jamce (obr. 18). Tento krok by tak umožnil vyhnout se zdlouhavému zpětnému zahušťování naředěných extraktů po jejich přečištění na gelových kolonkách.



Obr. 18 Porovnání aktivity HDAC v tabákových buňkách po přečištění gelovou chromatografií u vzorků nanášených do reakční směsi v odlišném množství. Aktivita HDAC u vzorku o objemu 10 µl byla nulová.

Obdobně byla zkoušena možnost sonikace vzorků extraktů na ultrazvukové lázni pro zvýšení výtěžku extrahovaných proteinů po účinnějším rozbití jader. Testovala se vhodná délka působení ultrazvuku, tak aby bylo vyextrahováno co nejvíce proteinů, ale přitom nedošlo ke ztrátě enzymové aktivity HDAC (Obr. 19).

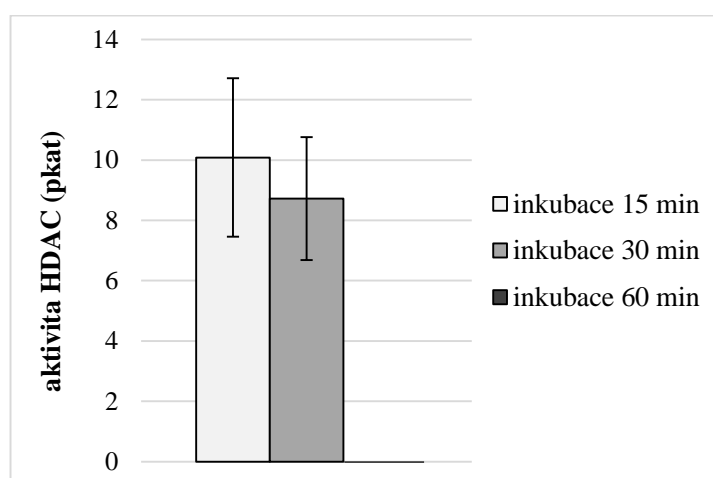


Obr. 19 Porovnání aktivity HDAC po vztahování na obsah proteinů (%) v tabákových buňkách po přečištění gelovou chromatografií, při přípravě extraktu použity různé intervaly působení ultrazvuku (0-15 min).

Porovnání stanovené aktivity HDAC vztahované na obsah proteinů u vzorků podrobených sonikaci během extrakce proteinů ukázalo, že nejvhodnější je působení ultrazvuku po dobu 1 minuty. Při déle trvající sonikaci vzorku již docházelo ke ztrátě enzymové aktivity HDAC (obr. 19).

U extraktů připravených z listů tabáku nebyla uvedena optimalizace metody fluorimetrického stanovení aktivity HDAC pro spolehlivé stanovení aktivity enzymu dostačující.

Posledním testovaným krokem pro optimalizaci fluorimetrického stanovení aktivity HDAC v extraktech listů tabáku byla pozměněná doba inkubace extraktu se substrátem Boc-Lys(Ac)-AMC. Na obr. 20 je uvedena enzymová aktivita HDAC v 1. eluované frakci, ve 2. frakci nebyla aktivita HDAC měřitelná. Ani tento krok tedy nebyl účinný, a proto byla pro stanovení enzymové aktivity HDAC u extraktů připravených z listů tabáku dále testována metoda spektrofotometrická.



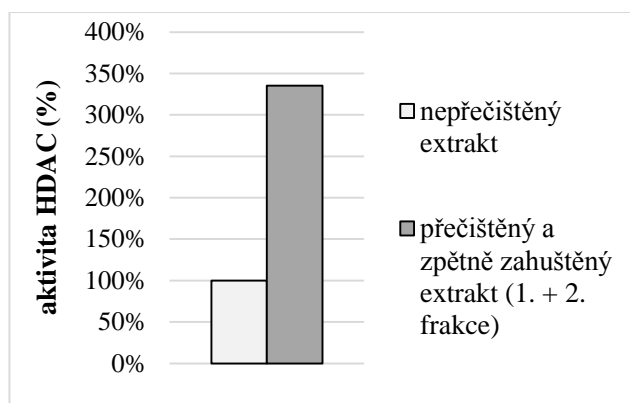
Obr. 20 Porovnání aktivity HDAC v extraktech z listů tabáku po přečištění gelovou chromatografií v 1. eluované frakci - testování odlišné doby inkubace extraktu se substrátem. Při inkubaci extraktu HDAC se substrátem trvajícím 60 minut nebyla aktivita HDAC měřitelná.

4.1.3 Spektrofotometrické stanovení aktivity HDAC

Pro stanovení aktivity HDAC v extraktech připravených z listů rostlin tabáku byla použita spektrofotometrická metoda s použitím chromogenního substrátu Boc-L-Lys(Z)-pNA, jehož produktem je p-nitroanilin (pNA) s $\lambda_{\max} = 405 \text{ nm}$.

Jako první bylo testováno kolorimetrické stanovení u extraktů připravených z listů tabáku bez následného přečišťování gelovou chromatografií. Získaný signál absorbance byl ale nízký, proto bylo následně zkoušeno stanovení enzymové aktivity HDAC po přečištění extraktu podobně jako u fluorimetrického stanovení, přičemž v jamce byl navýšen objem nanášeného vzorku opět náhradou reakčního pufru za rostlinný extrakt.

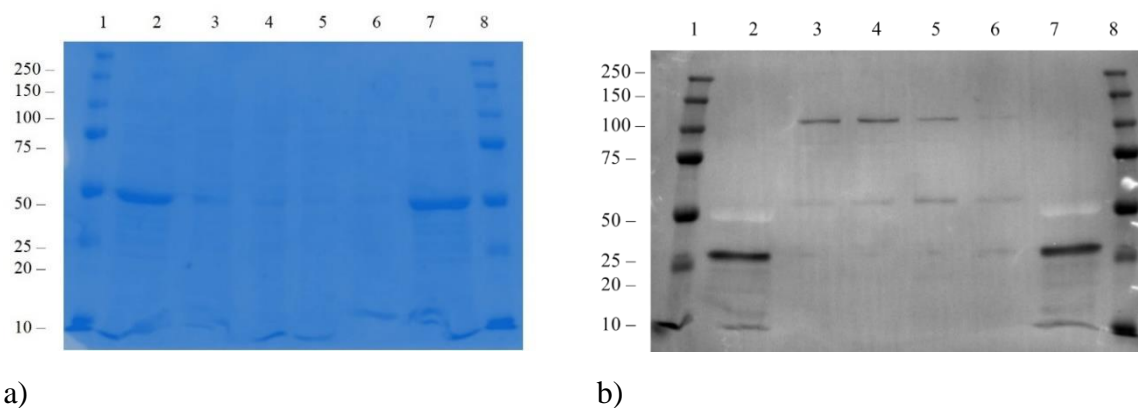
Naměřené hodnoty absorbance byly však opět nízké, proto bylo v dalším kroku přistoupeno ke zpětnému zahušťování proteinů v extraktech pomocí centrifugačních mikrozkuvek. Aktivita HDAC byla rovněž stanovována ve dvou frakcích získaných po gelové chromatografii a následně sčítána (obr. 21), jako tomu bylo u fluorimetrického stanovení aktivity HDAC u extraktů z buněčných suspenzí tabáku.



Obr. 21 Porovnání aktivity HDAC v extraktech z listů tabáku bez a s přečištěním gelovou chromatografií na kolonkách a po zpětném zahuštění proteinů v rostlinném extraktu.

4.2 Detekce HDAC pomocí Western blotu

Pro stanovení hladiny HDAC metodou Western blot byla nejprve testována specifita primární protilátky (Ab) připravené proti histondeacetylase HDT3 z *Arabidopsis thaliana* pro detekci proteinů extrahovaných z tabákových buněk *N. tabacum* cv. Xanthi. Již dříve bylo v rámci bakalářské práce ověřeno, že uvedená protilátka je schopna detekovat proteiny v extraktech z listů *N. tabacum* cv. Samsun. Pro analýzu vzorků byly použity extrakty tabákových buněk připravené s odlišným poměrem extrakčního pufru na 1 g FW (1-4 ml/1g FW), jako pozitivní kontrola byl použit extrakt listů *Arabidopsis* (obr. 22). Po imunodetekci s danou primární Ab proti HDT3 a sekundární Ab značenou alkalickou fosfatásoou (AP) byly u proteinů z tabákových buněk detekovány bandy, které by mohly odpovídat HDAC (obr. 22 b) (předpokládaná zdánlivá hodnota molekulové hmotnosti pro HDT3 z *A. thaliana* je 40 kDa dle firmy Agrisera), jejich identitu by bylo však potřeba ověřit například pomocí MS analýzy.



Obr. 22 a) Detekce celkových proteinů v extraktech buněk *N. tabacum* cv. Xanthi a z listů *A. thaliana* po separaci SDS PAGE - barveno Coomassie Blue, b) detekce HDAC v extraktech tabákových buněk s využitím primární Ab proti HDT3 z *A. thaliana*, sekundární Ab značená AP, barveno NBT/BCIP, pozitivní kontrola = proteiny extrahované z *A. thaliana*. 1– marker MW, 2– extrakt *Arabidopsis*, 3– extrakt z tabákových buněk, extrakce 1 ml/1 g FW, 4– extrakt z tabákových buněk, extrakce 2 ml/1 g FW, 5– extrakt z tabákových buněk, extrakce 3 ml/1 g FW, 6– extrakt z tabákových buněk, extrakce 4 ml/1 g FW, 7– extrakt *Arabidopsis*, 8– marker MW.

4.3 Izolace rostlinných jader metodou cell sorting

Vzhledem k tomu, že HDAC jsou převážně jadernými proteiny, tak byly dále Western blot analýzy za účelem stanovení hladiny HDAC v rostlinném materiálu opakovány s extrakty vyříděných jaderných frakcí, kdy by mělo dojít k zakoncentrování žádaných jaderných proteinů, včetně HDAC. Následně při imunodetekci by tak mohla být pozorována silnější odezva signálu.

Jádra z tabákových buněk a listů byly izolovány Ing. Beátou Petrovskou, Ph.D. z Ústavu experimentální botaniky (ÚEB).

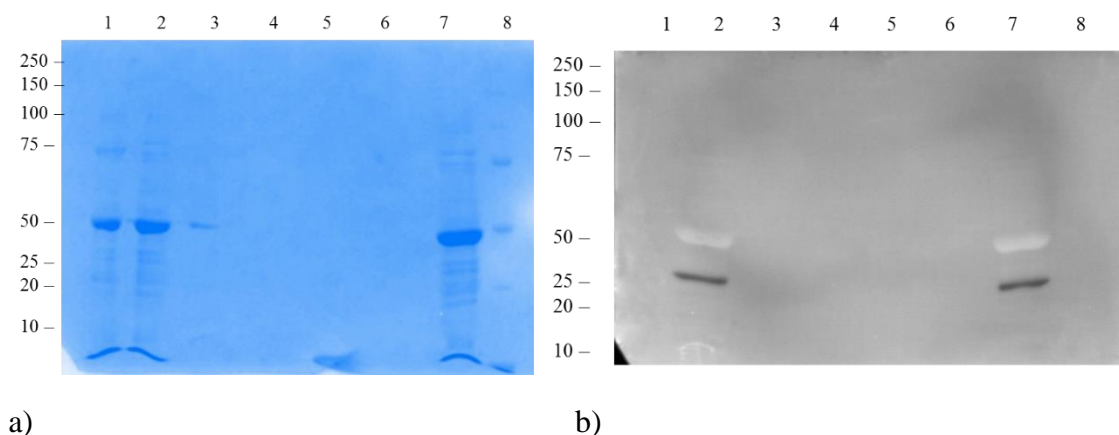
Byly testovány dva způsoby extrakce a purifikace jaderných proteinů, které se lišily především v použití enzymů štěpících DNA (DNAsa I a benzonasa).

4.3.1 Purifikace proteinů z rostlinných jader

4.3.1.1 Purifikace proteinů z rostlinných jader s použitím DNAsy I

Purifikace jaderných proteinů za použití DNAsy I nebyla úspěšná. To naznačil výsledek SDS PAGE analýzy, kde u extraktů připravených z jader listů tabáku nebyly detekovány žádné proteiny (obr. 23). V případě první jamky pro vzorek s jadernými proteiny došlo k přetečení vzorku pro extrakt z *Arabidopsis* při nanášení vzorků na gel.

Ani následně provedená analýza metodou Western Blot nepřinesla pozitivní výsledek (obr. 23 b).



Obr. 23 a) Detekce celkových proteinů v extraktech z jader listů *N. tabacum* cv. Xanthi a listů *A. thaliana* po separaci SDS PAGE - barveno Coomassie Blue. b) Následná imunodetekce s využitím primární Ab proti HDT3 z *A. thaliana*, sekundární Ab značená AP, barvení NBT/BCIP, pozitivní kontrola = proteiny extrahované z *A. thaliana*. 1- marker MW, 2- extrakt *Arabidopsis*, 3-6 extrakt z jader listů tabáku, 7- extrakt *Arabidopsis*, 8- marker MW.

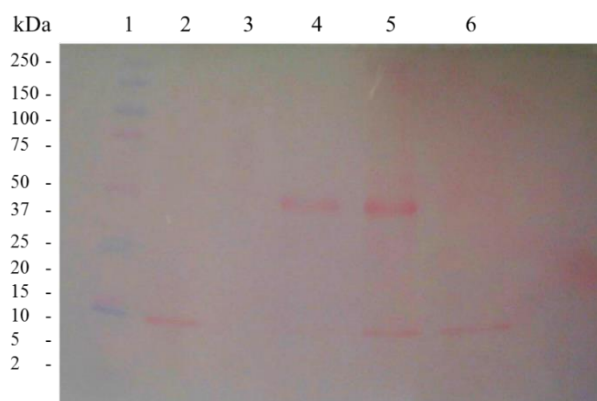
4.3.1.2 Purifikace proteinů z rostlinných jader s použitím benzonasy

Purifikace jaderných proteinů ze vzorku 70 000 jader za použití benzonasy byla opět neúspěšná, jak již naznačil přenos proteinů po SDS PAGE analýze na PVDF membránu – po reversibilním barvení s Ponceau S nebyly detekovány žádné proteiny. Kvůli nedostatku vzorku nebylo provedeno barvení Coomassie Blue, ale proteiny byly z gelu rovnou přeneseny na PVDF membránu. Imunodetekce nepřinesla pozitivní výsledek.

Experiment byl zopakován s použitím většího vzorku 700 000 jader. Jaderné proteiny byly po rozdělení SDS-PAGE opět přeneseny tank blottingem na PVDF membránu, ale imunodetekce s použitím sekundární protilátky značené AP přinesla opět negativní výsledek.

Experiment byl znovu opakován se vzorkem 600 000 jader. Bylo postupováno jako v předchozím případě s výjimkou toho, že pro imunodetekci byla použita sekundární protilátka značená křenovou peroxidasou (HRP). Jako kontrola byl použit extrakt připravený z listů *A. thaliana*. Jelikož optimalizování imunodetekce HDAC v rostlinných extraktech bylo v rámci bakalářské práce prováděno se sekundární protilátkou značenou AP, tak byly při tomto pokusu testovány i extrakty získané z listů

N. tabacum a buněk *N. tabacum* cv. Xanthi (obr. 24). Po reakci s luminolem byl detekován pouze band u vzorku s *A. thaliana* (obr. 25).

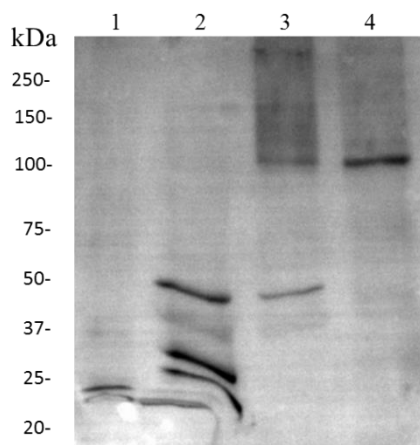


Obr. 24 Detekce celkových proteinů extrahovaných z jader buněk *N. tabacum* cv. Xanthi, listů *A. thaliana*, *N. tabacum* a z tabákových buněk po separaci SDS PAGE a přenosu na PVDF membránu - barveno Ponceau S. 1– marker MW, 2– extrakt z jader, 3– prázdná jamka, 4– extrakt *Arabidopsis*, 5– extrakt z listů tabáku, 6– extrakt z tabákových buněk.



Obr. 25 Detekce HDAC metodou Western blot v extraktu jader tabákových buněk, listů *A. thaliana*, *N. tabacum* a z tabákových buněk s využitím primární Ab proti HDT3 z *A. thaliana* a sekundární Ab značené HRP. 1– marker MW, 2– extrakt z jader, 3– extrakt *Arabidopsis*, 4– extrakt z listů tabáku, 5– extrakt z tabákových buněk.

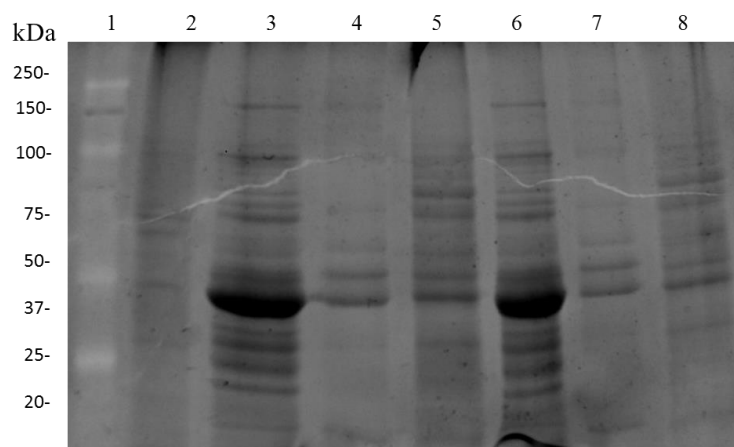
Při opakování purifikace jaderných proteinů z frakce obsahující 1 000 000 jader bylo při analýze vzorku Western blotem dosaženo již pozitivního výsledku (obr. 26). Band, který by měl odpovídat HDAC, nebyl detekován jen u extraktu z *Arabidopsis*, ale i u extraktu z jader, ačkoli detekovaný signál u vzorku jaderného extraktu dosahoval velmi nízké intenzity.



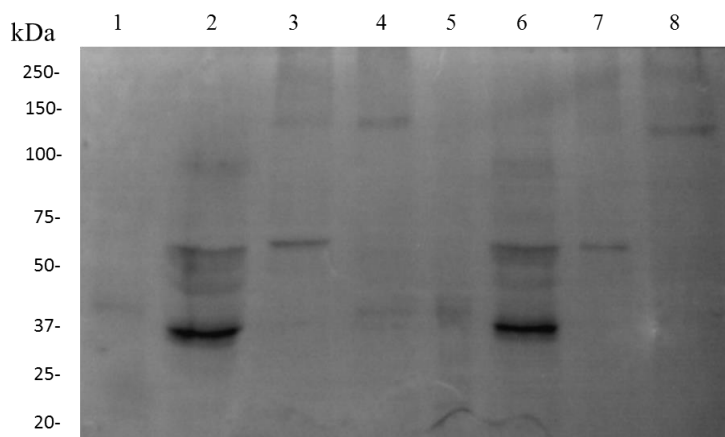
Obr. 26 Detekce HDAC metodou Western blot v extraktu jader tabákových buněk, listů *A. thaliana*, *N. tabacum* a z tabákových buněk s využitím primární Ab proti HDT3 z *A. thaliana* a sekundární protilátky značené AP. 1– extrakt z jader, 2– extrakt *Arabidopsis*, 3– extrakt z listů tabáku, 4– extrakt z tabákových buněk.

U těchto tří uvedených frakcí jaderných proteinů byl po jejich rozpuštění v extrakčním pufru stanoven obsah proteinů a rovněž byla u extraktů fluorimetricky stanovena aktivita HDAC (viz kapitola 4.3.2).

Jelikož u předešlé Western blot analýzy došlo k detekci možné HDAC tabáku, experiment byl pro potvrzení předchozího výsledku opakován, opět s extraktem připraveným z frakce obsahující 1 000 000 jader. Kromě extraktu jader byly analyzovány vzorky extraktů z listů a buněk tabáku, přičemž extrakty byly za účelem zakoncentrování proteinů zpětně zahuštěny pomocí centrifugačních mikrozkmavek. Protože tentokrát bylo k dispozici větší množství vzorků, taky byly separované proteiny po SDS-PAGE barveny pomocí fluorescenčního barviva SYPRO® Ruby (obr. 27). Toto barvivo bylo zvoleno vzhledem k vyšší citlivosti, srovnatelné s citlivostí dosažené při barvení proteinů stříbrem. Po imunodetekci byl opět u vzorku s jadernými proteiny detekován band, který by mohl odpovídat HDAC tabáku (obr. 28). Tento band byl detekován i u vzorku proteinů z tabákových buněk, i když jen u extraktu, u něhož byly proteiny zpětně zahušťovány.



Obr. 27 Detekce celkových proteinů extrahovaných z jader buněk *N. tabacum* cv. Xanthi, listů *A. thaliana*, *N. tabacum* a z tabákových buněk po separaci SDS – proteiny na PAGE gelech barveny pomocí SYPRO® Ruby. 1- marker MW, 2- extrakt z jader, 3- extrakt *Arabidopsis*, zpětně zahuštěný, 4- extrakt z listů tabáku, zpětně zahuštěný, 5- extrakt z tabákových buněk, zpětně zahuštěný, 6- extrakt *Arabidopsis*, 7- extrakt z listů tabáku, 8- extrakt z tabákových buněk.



Obr. 28 Detekce HDAC metodou Western blot v extraktu jader tabákových buněk, listů *A. thaliana*, *N. tabacum* a z tabákových buněk s využitím primární Ab proti HDT3 z *A. thaliana* a sekundární protilátky značené AP. 1- extrakt z jader, 2- extrakt *Arabidopsis*, zpětně zahuštěný, 3- extrakt z listů tabáku, zpětně zahuštěný, 4- extrakt z tabákových buněk, zpětně zahuštěný, 5- extrakt z jader, 6- extrakt *Arabidopsis*, 7- extrakt z listů tabáku, 8- extrakt z tabákových buněk.

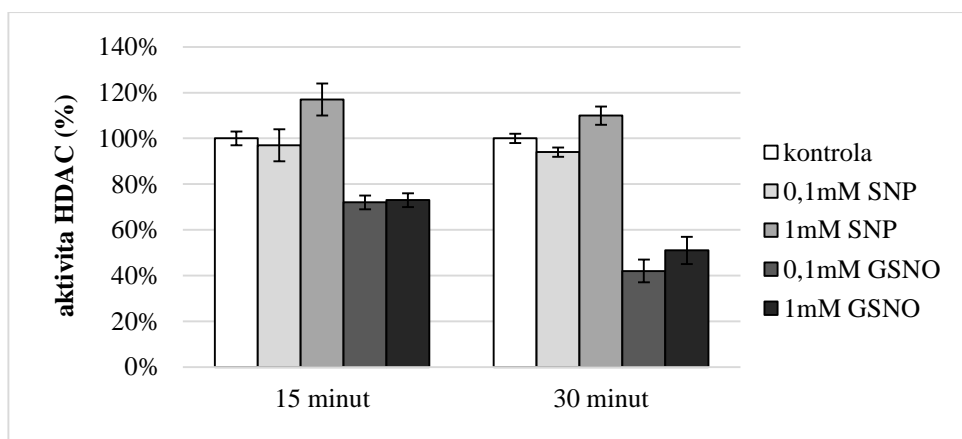
4.3.2 Stanovení aktivity HDAC ve frakci jaderných proteinů

U frakce jaderných proteinů (700 000 jader) byl po jejich rozpuštění v extrakčním HDAC pufru stanoven obsah proteinů, který odpovídal 0,138 mg/ml. U získaného extraktu jaderných proteinů byla také stanovena aktivita HDAC: 2,815 nkat/mg

proteinu. Ve frakci jaderných proteinů získaných při opakovaném pokusu vycházejícím ze vzorku 600 000 jader byl stanoven obsah proteinů 0,166 mg/ml a enzymová aktivita HDAC 1,699 nkat/1 mg proteinu, v případě frakce 1 000 000 jader připravený extrakt obsahoval 0,149 mg/ml s aktivitou HDAC dosahující hodnoty 1,563 nkat/mg proteinu.

4.4 Vliv látek uvolňujících oxid dusnatý (NO) na aktivitu HDAC

S-nitrosylace je posttranslační modifikace, během které dochází ke kovalentnímu navázání NO na cysteinová residua proteinů. Tato kovalentní modifikace byla u HDAC doposud zkoumána u živočichů, u kterých je například zapojena v regulaci HDAC2 neuronů (Nott *et al.*, 2008). V rámci této práce byl zjišťován pouze vliv látek uvolňujících NO na komerční lidskou HDAC2. Experiment byl proveden v mikroobjemovém uspořádání (enzym inkubován v prostředí reakčního HDAC pufru s látkou uvolňující NO o celkovém objemu reakční směsi 14 μ l, viz podkapitola 3.2.2.3) a aktivita HDAC byla poté stanovována měřením na destičce Take 3. Testovány byly dvě látky uvolňující NO: nitroprusid sodný (SNP) a S-nitrosoglutathion (GSNO) (obr. 29). Daná činidla byla k HDAC2 aplikována ve dvou různých koncentracích ($c = 0,1$ mM a 1 mM) a enzym byl s těmito látkami před stanovením enzymové aktivity inkubován 15 nebo 30 minut.



Obr. 29 Porovnání aktivity lidské komerční HDAC 2 po aplikaci látek uvolňujících NO (GSNO, SNP) při dvou různých časových inkubacích. Byl testován vliv SNP a GSNO o výsledných koncentracích 0,1 mM a 1 mM.

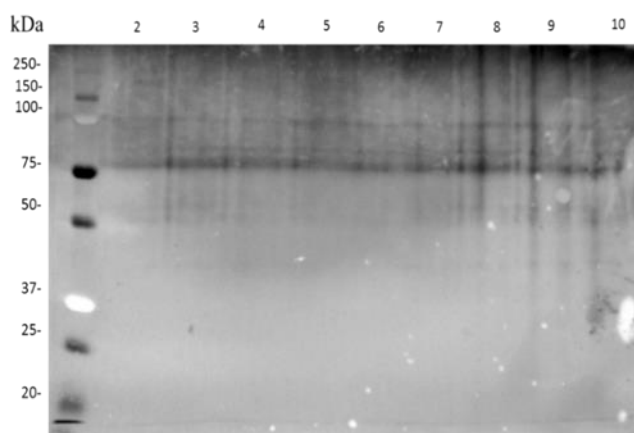
Z testovaných látek uvolňujících NO byl pozorován výraznější vliv na aktivitu HDAC v případě GSNO, u kterého již v 0,1mM koncentraci docházelo ke snížení aktivity enzymu. U SNP došlo k ovlivnění aktivity HDAC při 1mM koncentraci činidla,

přičemž bylo pozorováno mírné navýšení enzymové aktivity oproti kontrolnímu vzorku (Obr. 29).

4.5 Detekce S-nitrosylovaných proteinů

S-nitrosylované proteiny byly zkoumány v případě extraktů připravených z vytříděných jader tabákových buněk. Porovnáván byl kontrolní jaderný extrakt s extrakty jader, které byly preinkubovány s 0,25mM SNP a 0,25mM GSNO. Druhým typem vzorku byla lidská komerční HDAC2, opět kontrolní vzorek a vzorky HDAC2 preinkubované s 0,25mM SNP a 0,25mM GSNO. Pro detekci S-nitrosylovaných proteinů byla použita tříkroková metoda biotin switch.

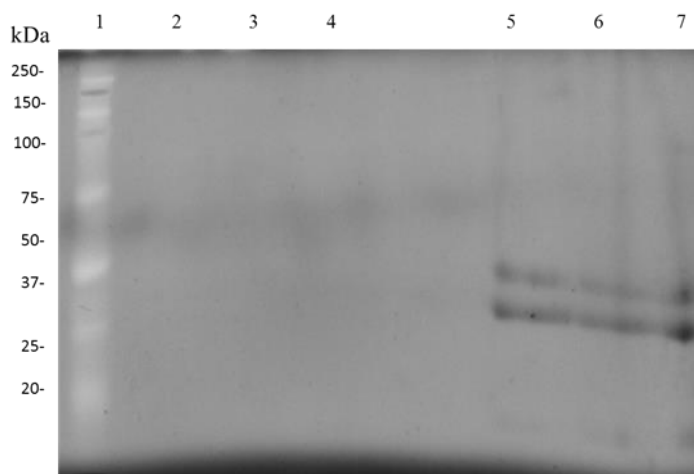
Po afinitní purifikaci na neutravidinové matrici byly vzorky analyzovány Western blotem. Pro imunodetekci S-nitrosylovaných proteinů bylo použito anti-biotin primární protilátka již konjugovaná se sekundární protilátkou značenou AP (obr. 30). Tato imunodetekce však u detekovaných bandů jednotlivých vzorků neodhalila nějaké signifikantní rozdíly. U vzorků byla rovněž provedena imunodetekce HDAC s primární Ab proti HDT3, tato analýza však nevedla k pozitivnímu výsledku.



Obr. 30 Detekce S-nitrosylovaných proteinů za použití anti-biotin primární Ab konjugované se sekundární Ab značenou AP, barveno NBT/BCIP. 1- marker MW, 2,3- kontrola jaderný extrakt, 4- jaderný extrakt + 0,25mM GSNO, 5- jaderný extrakt + 0,25mM SNP, 6,7 – kontrola HDAC2, 8- HDAC2 + 0,25mM GSNO, 9- HDAC2 + 0,25mM SNP, 10- MMTS.

Proteiny na PAGE gelech byly také detekovány pomocí metody využívající barvicí roztok SYPRO[®] Ruby, který je svou citlivostí detekce proteinů srovnatelný s citlivostí

dosažené metodou detekce pomocí stříbra. V tomto případě byly detekovány bandy pouze u vzorků extraktů z jader (obr. 31).



Obr. 31 Detekce celkových proteinů ve vzorku s komerční HDAC2 a extraktů jaderných proteinů barvením pomocí SYPRO[®] Ruby. 1- marker, 2- kontrola HDAC2, 3- HDAC2 + 0,25mM SNP, 4- HDAC2 + 0,25mM GSNO, 5- kontrola jaderný extrakt, 6- jaderný extrakt + 0,25mM SNP, 7- jaderný extrakt + 0,25mM GSNO.

4.6 Stanovení životnosti tabákových buněk

Za účelem testování vlivu kryptogeinu na aktivitu HDAC u tabákových buněk bylo nejprve potřeba vybrat vhodnou metodu pro porovnání se změnami v životnosti buněčné kultury tabáku vyvolaných právě aplikací tohoto elicitoru.

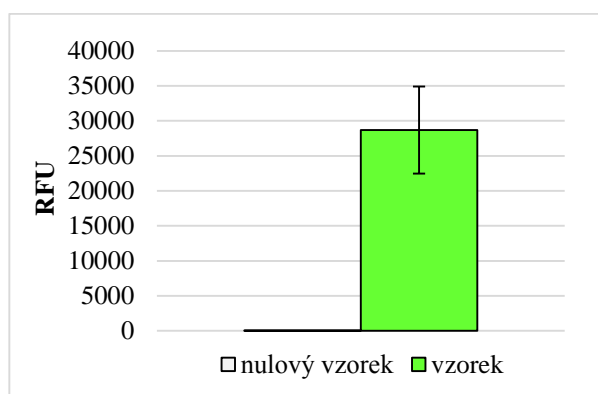
4.6.1 Výběr metody pro stanovení životnosti tabákových buněk

Pro stanovení životnosti tabákových buněk byly testovány celkem čtyři metody - dvě fluorimetrické a dvě spektrofotometrické. Kromě v naší laboratoři standardně používané metody s fluorescein diacetátem (FDA) byly zkoušeny další metody stanovení životnosti rostlinných buněk, které by mohly být dále uplatněny. Testování proběhlo za účelem, zda by některá z uvedených metod mohla být pro stanovení životnosti tabákových buněk kultivaru Xanthi vhodnější, než právě metoda s FDA. U této metody je při stanovení životnosti daných tabákových buněk pozorován značný rozptyl mezi naměřenými hodnotami fluorescence, který je nejspíše zapříčiněn značným shlukováním buněk. Jednotlivé analyzované alikvoty téže buněčné suspenze se tudíž liší obsahem buněk, což následně přispívá k rozdílům v naměřených hodnotách fluorescence.

Byla testována jedna z dalších fluorimetrických metod: metoda s resazurinem, jejíž výhodou je citlivost a skutečnost, že je vhodná i pro déle trvající experimenty. Ze spektrofotometrických metod byly testovány metody s MTT a neutrální červení, které patří mezi jedny z nejběžnějších metod využívaných ke stanovení životaschopnosti buněk. Pro testování metod byla vždy použita negativní kontrola, které byly připraveny přidávkem 20% Tritonu k buněčné suspenzi, následnou sonikací (5 min) a zahřátím na 90°C podobu 10 minut

4.6.1.1 Stanovení životnosti metodou s fluoresceindiacetátem

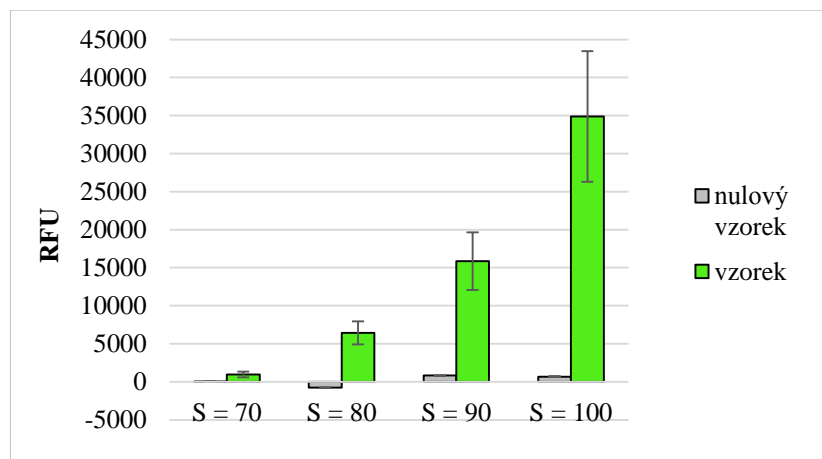
Stanovení životnosti metodou s fluoresceindiacetátem (FDA) bylo provedeno s nastavením citlivosti fotonásobiče readeru pro detekci fluorescence produktu reakce na $S = 70$ (obr. 32). Vzhledem k vysoké citlivosti metody a tvorbě shluků tabákových buněk je pozorován větší rozptyl naměřených hodnot odpovídající fluorescence.



Obr. 32 Porovnání změn v životnosti tabákových buněk metodou s FDA, hodnoty naměřené fluorescence (RFU) odpovídají míře životnosti buněk.

4.6.1.2 Stanovení životnosti metodou s resazurinem

Stanovení životnosti metodou s resazurinem (AB) bylo provedeno s nastavením citlivosti fotonásobiče readeru pro detekci fluorescence produktu reakce v rozpětí $S = 70-100$ (obr. 33). Do budoucna bylo vybráno měření s citlivostí fotonásobiče $S = 70 - 80$. Při hodnotě $S = 100$ se hodnoty blížily limitní hodnotě, kterou lze ještě číselně detekovat.

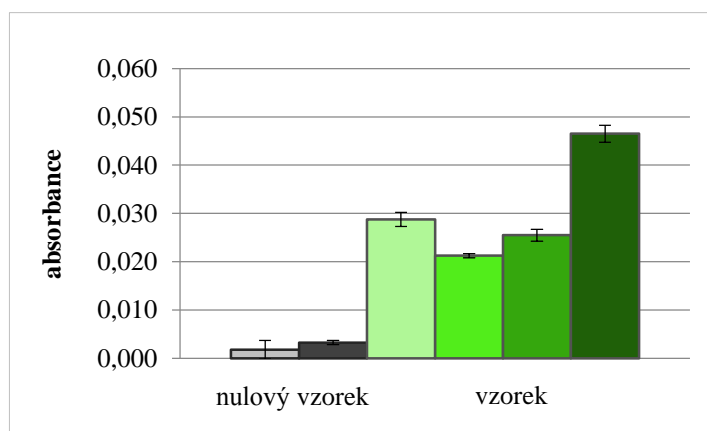


Obr. 33 Porovnání změn v životnosti tabákových buněk metodou s resazurinem, hodnoty naměřené fluorescence (RFU) odpovídají míře životnosti buněk.

Při stanovení životnosti tabákových buněk pomocí AB nulový vzorek odpovídal 0% životnosti, byl však pozorován rozptyl detekovaných hodnot RFU obdobně jako u FDA vzhledem k povaze metody a vzorku.

4.6.1.3 Stanovení životnosti metodou s (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromidem (MTT)

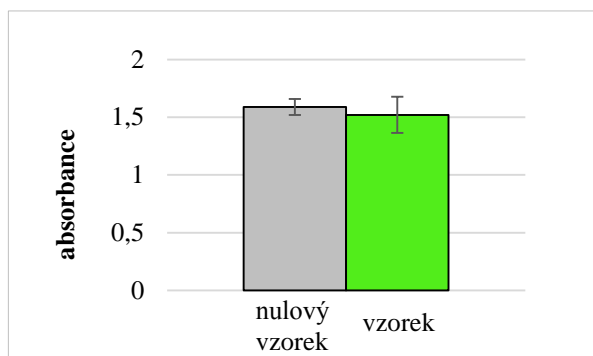
Stanovení životnosti buněk pomocí MTT je jednou ze spektrofotometrických metod. Hodnoty pro nulový vzorek odpovídaly 0% životnosti sodezvou hodnot absorbance v rozsahu 0,002 – 0,003. Hodnoty pro pozitivní kontrolu vykazovaly u jednotlivých frakcí buněčné suspenze poměrně malý rozptyl odezvy, avšak hodnoty absorbance dosahovaly nízkých hodnot (obr. 34).



Obr. 34 Porovnání změn v životnosti tabákových buněk metodou s MTT, hodnoty naměřené absorbance odpovídají míře životnosti buněk.

4.6.1.4 Stanovení životnosti metodou s neutrální červení

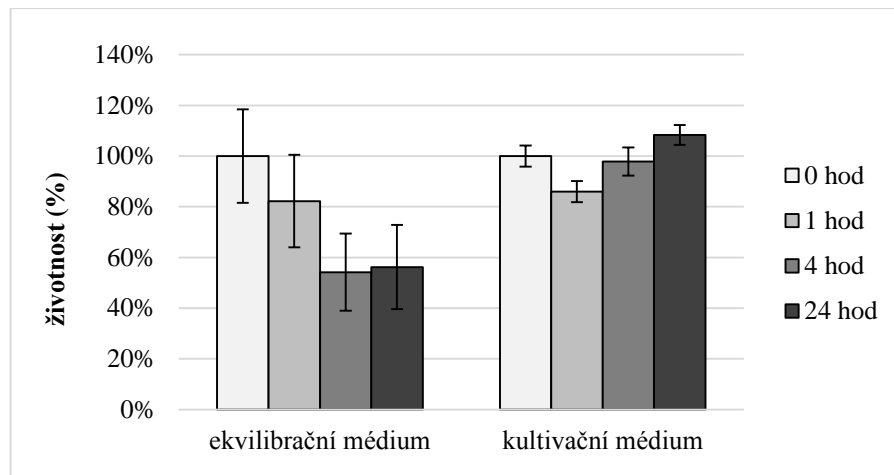
V případě stanovení životnosti buněk pomocí neutrální červeně (NČ), druhou ze zvolených spektrofotometrických metod, hodnoty pro nulový vzorek neodpovídaly 0% životnosti. Hodnoty pro pozitivní kontrolu vykazovaly poměrně malý rozptyl odezvy a ve srovnání s hodnotami absorbance u metody s MTT byly podstatně vyšší (obr. 35).



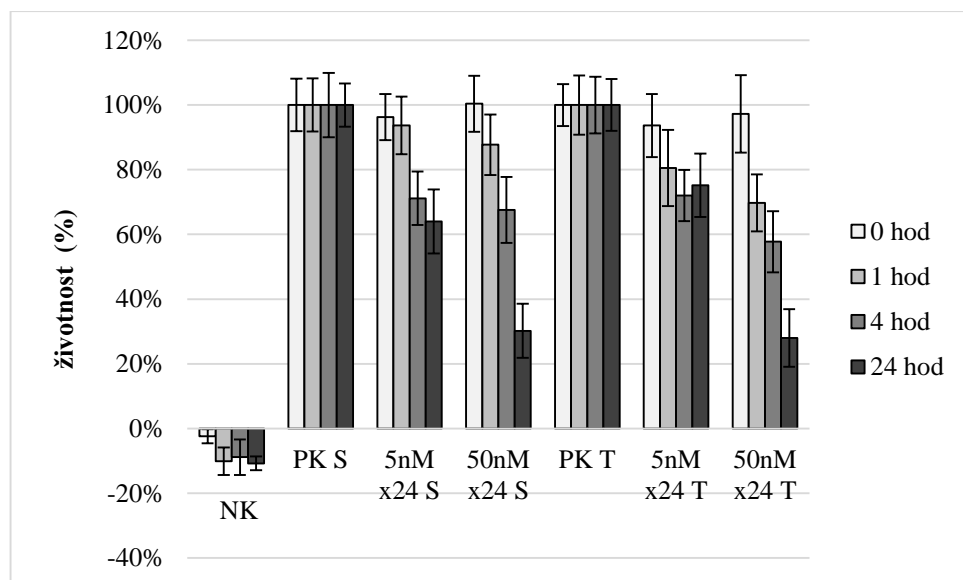
Obr. 35 Porovnání změn v životnosti tabákových buněk metodou s NČ, hodnoty naměřené absorbance odpovídají míře životnosti buněk.

4.6.2 Stanovení životnosti tabákových buněk – výběr podmínek pro stanovení

Další krok pro zvolení podmínek pro určení životnosti tabákových buněk se po výběru vyhovující metody pro stanovení životnosti týkala volby média (ekvilibrační nebo kultivační MS médium s vitamíny), které bude při uskutečňovaných experimentech stanovení viability buněk ve zvoleném časovém rozsahu vhodnější (obr. 36). Ekvilibrační médium bývá používáno při pokusech, kdy se stanovují reaktivní formy NO, protože při stanovení v kultivačním médiu dochází k interferenci. Kromě toho se ještě porovnávala viabilita tabákových buněk po aplikaci kryptogeinu x24 za podmínek světlo/tma (obr. 37).



Obr. 36 Změny životnosti tabákových buněk metodou s resazurinem - inkubovaných v kultivačním a ekvilibračním médiu během 24 hodin.

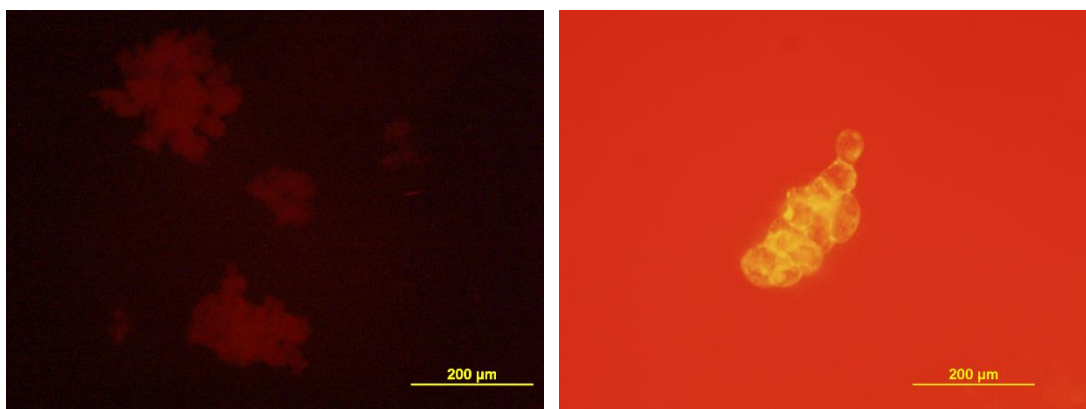


Obr. 37 Stanovení životnosti tabákových buněk pomocí resazurinu - porovnání životnosti buněk za podmínek světlo/tma během 24 hodin.

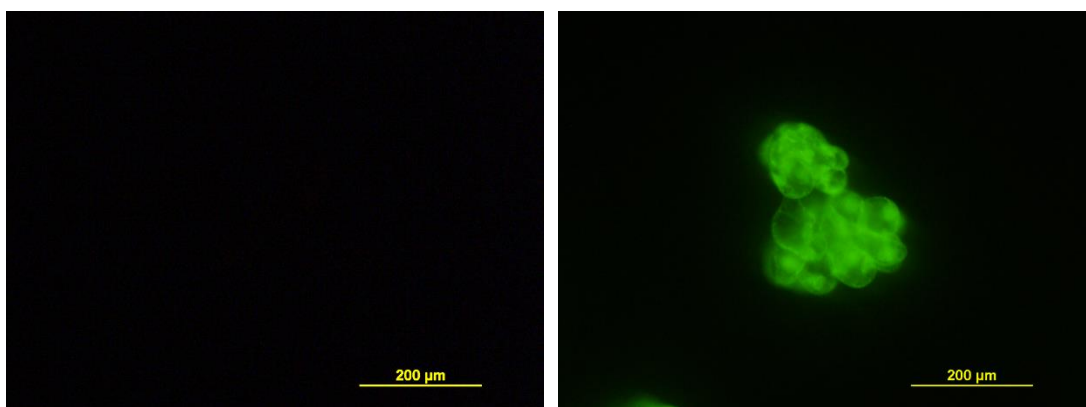
4.6.3 Mikroskopické stanovení životnosti tabákových buněk

Stanovení životnosti uvedenými fluorimetrickými a spektrofotometrickými bylo srovnáno s výsledky získanými s použitím mikroskopické metody s použitím FDA nebo resazurinu. Nevýhodou použití této metody u kultury tabákových buněk, že buňky *N. tabacum* cv. Xanthi vytváří řetízky a shlukují se, takže je velmi obtížné pozorovat jednotlivé buňky. Výsledky z fluorescenční mikroskopie pro metodu s resazurinem jsou zobrazeny na obr. 38 a pro metodu s FDA na obr. 39. V obou případech lze pozorovat

značný rozdíl mezi vzorky a negativní kontrolou, kde byly buňky vystaveny působení 20% Tritonu, 5 minutové sonikaci a zahřátí na 90°C. U negativních kontrol není pozorována fluorescence, pouze případný šum.

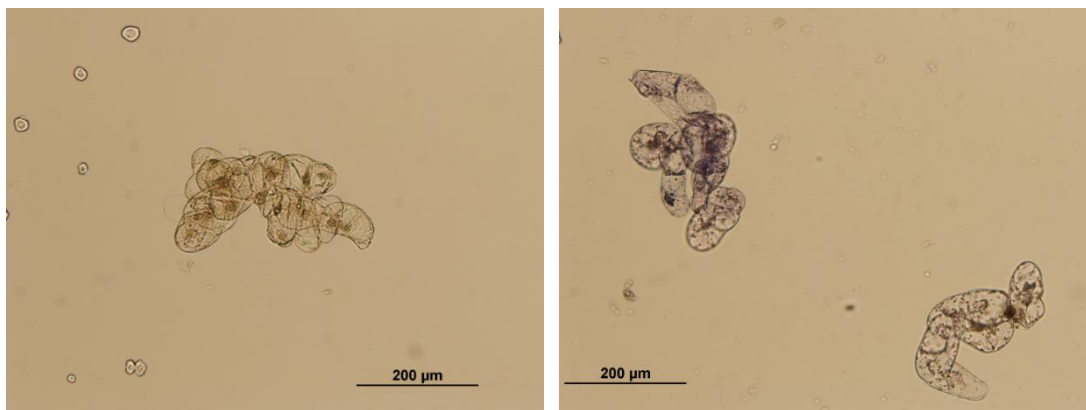


Obr. 38 Mikroskopické stanovení životnosti buněk metodou s resazurinem, a – negativní kontrola, zvětšení 100x, b – vzorek buněčné kultury, zvětšení 100x.

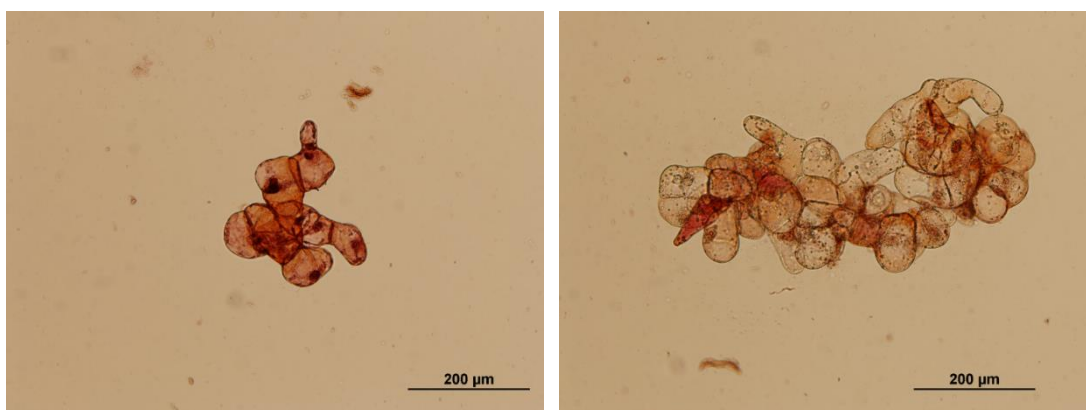


Obr. 39 Mikroskopické stanovení životnosti buněk metodou s FDA, a – negativní kontrola, zvětšení 100x, b – vzorek buněčné kultury, zvětšení 100x.

Výsledky ze světelné mikroskopie pro MTT metodu jsou zobrazeny na obr. 40 a pro metodu s neutrální červení na obr. 41. V případě snímků pro MTT lze pozorovat rozdíl mezi vzorky pro pozitivní a negativní kontrolu. U vzorků s živými buňkami lze pozorovat barevnou změnu – životaschopné buňky byly schopné přeměnit MTT na formazanové barvivo (obr. 40 b). V případě metody s neutrální červení bylo pozorováno, že barvivo NČ je zadržováno nejen ve vakuolách živých buněk, ale nebylo vymyto ani z buněk mrtvých (obr. 41 a).



Obr. 40 Mikroskopické stanovení životnosti buněk metodou s MTT, a – negativní kontrola, zvětšení 100x, b – vzorek buněčné kontroly, zvětšení 100x.



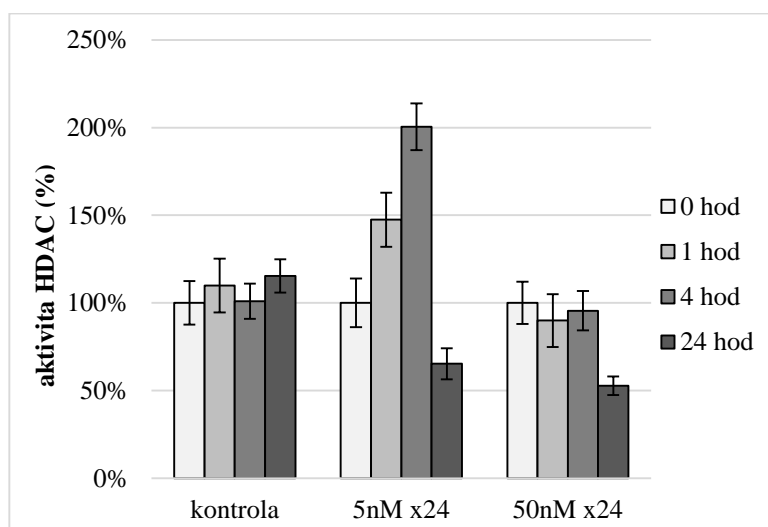
Obr. 41 Mikroskopické stanovení životnosti buněk metodou s NČ, a – negativní kontrola, zvětšení 100x, b – vzorek buněčné kontroly, zvětšení 100x.

4.7 Stanovení aktivity HDAC v rostlinných extraktech

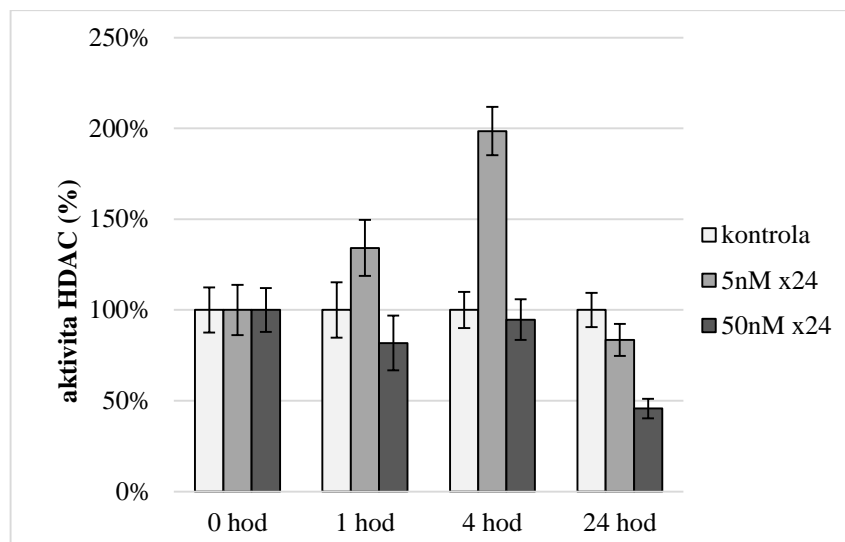
Po optimalizaci podmínek fluorimetrického i spektrofotometrického stanovení enzymové aktivity HDAC v rostlinných extraktech bylo přistoupeno ke stanovení aktivity HDAC u vzorků vystavených působení elicitinu kryptogeinu. Výběr vhodné metody pro porovnání změn v životnosti tabákových buněk navíc umožnil stanovenou aktivitu HDAC u extraktů tabákových buněk porovnat se změnami v jejich životnosti po aplikaci daného elicitinu.

4.7.1 Změny aktivity HDAC a životnosti buněk tabáku vlivem kryptogeinu

U suspenzí tabákových buněk *N. tabacum* cv. Xanthi byla měřena aktivita HDAC po aplikaci kryptogeinu v časových intervalech 0, 1 4 a 24 hodin (obr. 42). Použité koncentrace kryptogeinu byly 5 a 50 nM. Měření bylo provedeno ve třech biologických replikátech. Na obr. 42 a jsou porovnávány změny v aktivitě HDAC v rámci daného vzorku během 24 hodin. Obr. 42 b zobrazuje změny aktivity HDAC u buněk vystavených kryptogeinu v daných časových intervalech vztažených ve srovnání s výsledky kontrolních buněk. U kontrolních buněk v daném časovém intervalu nebyly pozorovány signifikantní změny aktivity HDAC. Po aplikaci 5nM kryptogeinu došlo již po první hodině ke zvýšení enzymové aktivity. Po 4 hodinách od aplikace elicitoru byla stanovená aktivita HDAC u tohoto vzorku téměř dvojnásobná ve srovnání s kontrolou. V případě aplikace 50nM kryptogeinu během prvních 4 hodin po jeho aplikaci nebyly změny v enzymové aktivitě HDAC pozorovány, po 24 hodinách od aplikace elicitoru byla stanovená aktivita HDAC u tohoto vzorku vzhledem ke kontrole přibližně poloviční.



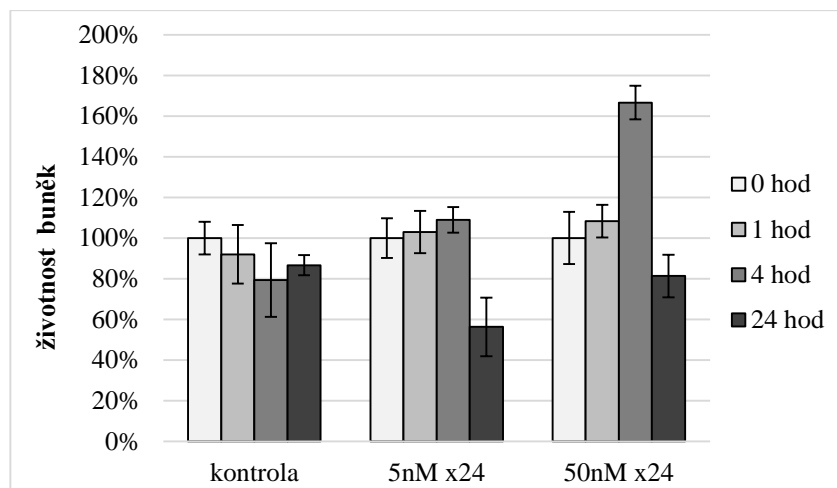
a)



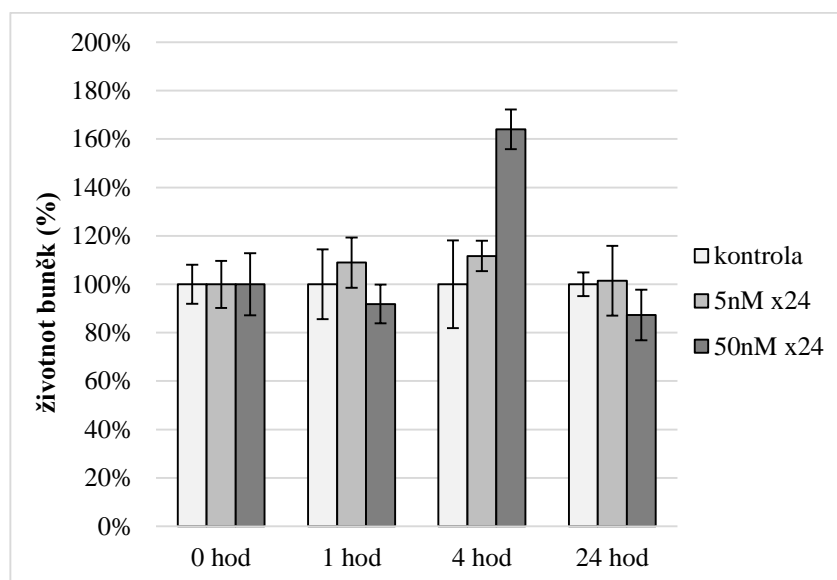
b)

Obr. 42 Porovnání aktivity HDAC v tabákových buňkách po aplikaci kryptogeinu x24 o c = 5nM a 50 nM, frakce buněčné suspenze odebrány v časech 0, 1, 4 a 24 hodin po aplikaci x24, a) změny aktivity HDAC v rámci daného vzorku, b) porovnání aktivity HDAC ve vztahení ke kontrole.

V případě stanovení aktivity HDAC v tabákových buňkách byly rovněž sledovány změny v míře životnosti buněk v daných časových intervalech (obr. 43). Míra životnosti buněk byla stanovena metodou s resazurinem. U kontrolní buněčné suspenze nebyly během 24 hodin pozorovány signifikantní rozdíly změn životnosti buněk. U buněčné suspenze s aplikací 5nM kryptogeinu byly pozorovány změny až po 24 hodinách od aplikace elicitinu, kdy byl oproti výchozí stanovené míře životnosti v čase 0 hod před přidavkem elicitinu sledován pokles. Po aplikaci 50nM kryptogeinu bylo po 4 hodinách od aplikace elicitinu dosaženo navýšení životnosti vůči kontrole i stanovené životnosti v čase 0 hod. Po 24 hodinách byl podobně jako v případě buněčné suspenze s 5nM kryptogeinem sledován pokles vůči životnosti stanovené v čase 0 hodin.



a)



b)

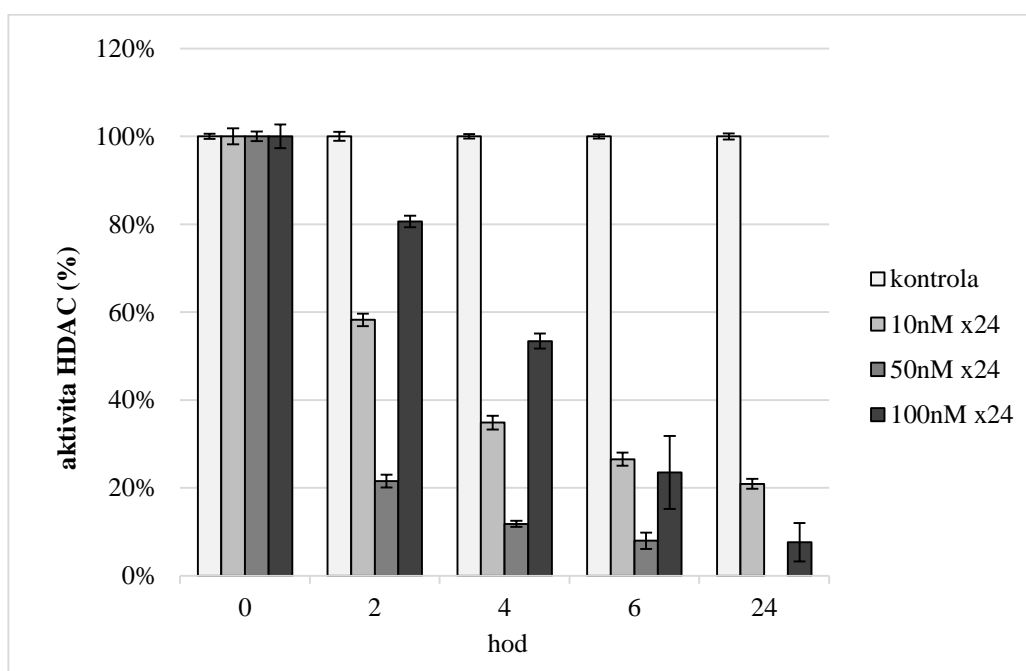
Obr. 43 Změny životnosti tabákových buněk po působení 5 a 50nM kryptogeinu, frakce buněčné suspenze odebírány v časech 0, 1, 4 a 24 hodin po aplikaci x24, stanoveno pomocí AB, a) vztahování k nulové hodině v rámci daného vzorku, b) vztahování ke kontrole.

U kontrolních buněk se aktivita HDAC, ani míra jejich životnosti, významně nemění. U buněčných suspenzí po aplikaci 5nM kryptogeinu během prvních 4 hodin po aplikaci elicitinu sice nedochází k výraznému ovlivnění životaschopnosti buněk, ale je pozorován nárůst aktivity HDAC. U změn sledované míry životnosti buněk a enzymové aktivity HDAC po 24 hodinách od aplikace elicitinu lze pozorovat podobný trend – buňky v dané buněčné suspenzi umírají a životnost dané buněčné suspenze se tedy snižuje, a zároveň dochází ke snížení enzymové aktivity HDAC. Toto snížení

aktivity HDAC se však přiblížilo jen počáteční hodnotě v čase 0 hod před aplikací elicitoru. U buněčné suspenze po aplikaci 50nM kryptogeinu během prvních 4 hodin od aplikace elicitoru sice nebyla pozorována změna v enzymové aktivitě HDAC, ale byl sledován nárůst životnosti buněk ve vztahu ke kontrole, tudíž po korelaci těchto dvou parametrů bylo ve výsledném zhodnocení pozorováno snížení aktivity HDAC, jak oproti výchozí enzymové aktivitě v čase 0 hod, tak oproti kontrole ve všech sledovaných časových intervalech.

4.7.2 Změny aktivity HDAC v listech tabáku vlivem kryptogeinu

Enzymová aktivita HDAC byla stanovována spektrofotometrickou metodou u listů *N. tabacum* cv. Xanthi po aplikaci kryptogeinu x24 (obr. 44). Byl testován vliv aplikace 10nM, 50nM a 100 nM kryptogeinu v časech 0, 2, 4, 6 a 24 hodin po infiltraci elicitoru do listů. V případě kontroly byla do listů injekčně vpravena stejný objem deionizované vody. Stanovení bylo rovněž provedeno ve třech biologických replikátech. Obr. 44 zobrazuje změny aktivity HDAC v extraktech z listů tabáku ovlivněných x24 v daných časových intervalech ve vztahu ke kontrole (ta odpovídá 100% aktivitě).



Obr. 44 Porovnání aktivity HDAC v extraktech tabákových listů po aplikaci kryptogeinu x24 o c = 10 nM a 100 nM v časech 2, 4, 6 a 24 hodin, a kryptogeinu x24 o c = 50 nM v časech 0, 2, 4, 6 a 24 hod - vztah ke kontrole.

V případě stanovené enzymové aktivity HDAC v extraktech připravených z listů tabáku u kontrolních rostlin ke změnám aktivity daného enzymu podobně jako u tabákových buněk nedocházelo. U listů s aplikací kryptogeinu o všech testovaných koncentracích docházelo k postupnému snižování aktivity HDAC, přičemž k největšímu snížení aktivity enzymu došlo po aplikaci 50nM kryptogeinu. U aplikace 10nM kryptogeinu bylo pozorováno pozvolnější snížení aktivity HDAC a po 24 hodinách byla aktivita enzymu vůči ostatním vzorkům po ošetření kryptogeinem o koncentraci 50 a 100 nM nejvyšší. U listů s aplikací 100nM kryptogeinu bylo stanoveno rovněž mírnější snížení enzymové aktivity HDAC, přičemž v čase 2 hodiny od aplikace elicitinu byla u vzorků ošetřených kryptogeinem naměřena aktivita nejvyšší právě u extraktu z listů po aplikaci 100nM kryptogeinu.

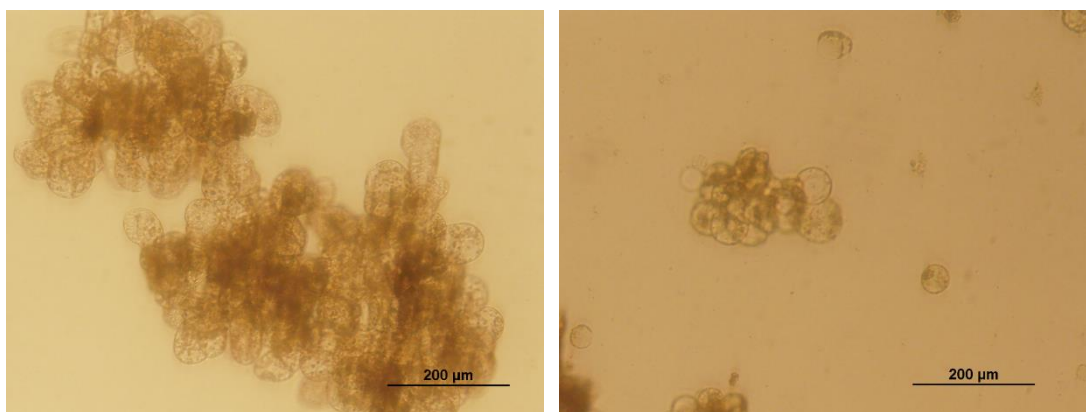
4.8 Změny aktivity HDAC při odstranění a regeneraci buněčné stěny

U protoplastů rostlinných buněk dochází během jejich regenerace k protoplastizaci, pro kterou je typická rozsáhlá dekondenzace chromatinu. Tato strukturální změna v poskládání chromatinu je nejspíše spojena s potřebou změny exprese genů, které byly potřebné pro specifické funkce diferenciované buňky, na expresi genů potřebných pro vstup do buněčného cyklu, proliferaci buněk a jejich rediferenciaci, popř. buněčnou smrt (Ondřej *et al.*, 2009). Jedním ze způsobů, jak může být struktura chromatinu měněna, jsou právě posttranslační modifikace, včetně acetylace a deacetylace histonů (Allis *et al.*, 2007).

4.8.1 Příprava protoplastů z buněk *N. tabacum* cv. Xanthi

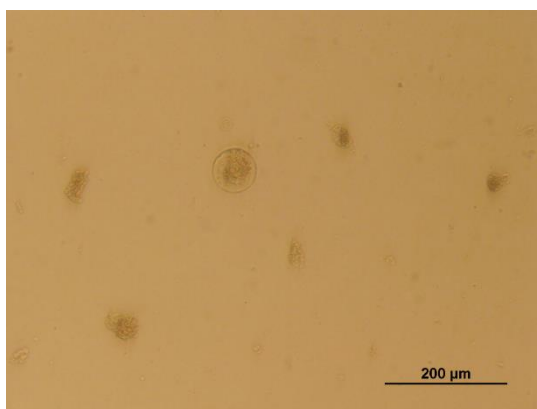
Protoplasty byly připravovány z buněčné suspenze a listů *N. tabacum* cv. Xanthi podle protokolů publikovaných v pracích Schoupe *et al.*, 2011 a Wu *et al.*, 2009.

Jednotlivé kroky přípravy protoplastů buněk *N. tabacum* cv. Xanthi byly pozorovány mikroskopicky. Jak ukazují snímky ze světelného mikroskopu, příprava probíhala dle předpokladu, jen bylo potřeba optimalizovat finální krok izolace protoplastů mezi vrstvami Ficollu a vodné fáze (obr. 45).

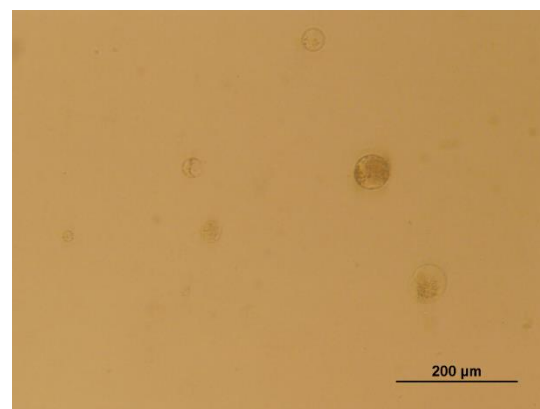


a)

b)



c)



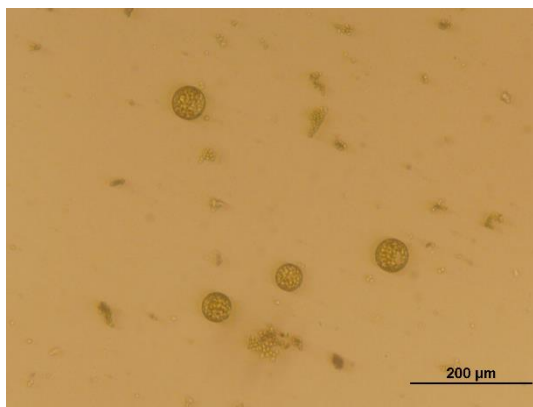
d)

Obr. 45 Jednotlivé kroky izolace protoplastů z tabákových buněk sledované pomocí světelného mikroskopu, zvětšení 100x. a) buňky *N. tabacum* cv. Xanthi, b) buňky po plazmolýze a natrávení celulasou a macerozým, c) protoplasty po filtraci přes uhelon, d) protoplasty po odebrání z mezivrstvy Ficollu a vody.

Po nanesení 5 ml suspenze protoplastů na 5 ml 6% Ficollu nedošlo k vytvoření zahuštění obsahujícího zakoncentrované protoplasty, ale protoplasty se nacházely rozptýleny v roztoku Ficollu. Proto bylo při další přípravě protoplastů testováno nanesení suspenze protoplastů na 9% a 12% Ficoll. Opět ale nedošlo k výraznému zahuštění protoplastů. V dalším postupu bylo zkoušeno zakoncentrování suspenze protoplastů z 5 ml na 2 ml (centrifugace při 500 g po dobu 5 minut při 25°C a následné odebrání média bez protoplastů). Po nanesení na 12% Ficoll již došlo alespoň k rozdělení fází. Proto bylo ještě testováno větší zakoncentrování suspenze protoplastů (8 - 9 ml suspenze bylo po centrifugaci zahuštěno na 1,5 – 2 ml), které bylo opět navrstveno na 12% Ficoll. Tento krok již umožnil utvoření mezivrstvy protoplasty, kterou bylo možné odebrat pro další práci.

4.8.2 Příprava protoplastů z listů *N. tabacum* cv. Xanthi

Příprava protoplastů z listů tabáku (8 – 9 týdenních rostlin) rychlou „Tape-sandwich“ metodou za nesterilních podmínek opět probíhala bez značných komplikací. Vyizolované protoplasty nebyly purifikovány centrifugací na gradientu, ale byly pouze promývány pomocí W5 roztoku, tudíž se v získané suspenzi protoplastů nachází natrávené zbytky buněčné stěny (obr. 46).



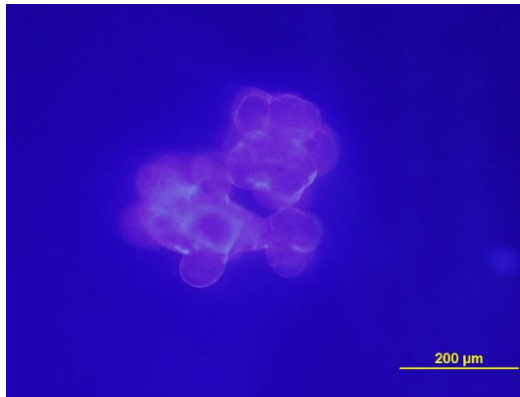
Obr. 46 Protoplasty z listů *N. tabacum* cv. Xanthi po promytí ve W5 roztoku, zvětšení 100x.

4.9 Studium úlohy HDAC v regeneraci protoplastů

Regenerace protoplastů, připravených jak z tabákových buněk, tak z listů tabáku, byla pozorována v časových intervalech 0, 2, 4 a 24 hodin, a to po aplikaci 0,020 μM Trichostatinu A (TSA) a bez jeho aplikace. Protoplasty byly sledovány mikroskopicky – světelnou mikroskopií a fluorescenční mikroskopií po barvení s Calcofluor White (CW) a byla u nich stanovována aktivita HDAC.

4.9.1 Sledování regenerace buněčné stěny pomocí Calcofluor White

Regenerace buněčné stěny u připravených protoplastů, jak z tabákových buněk, tak mezofylových protoplastů z listů tabáku, byla sledována mikroskopicky. Pro fluorescenční mikroskopii regenerujících protoplastů bylo k suspenzím protoplastů přidáváno fluorescenční barvivo Calcofluor White (CW). CW detekuje celulosu buněčné stěny (obr. 47). Lze tak sledovat její obnovu u regenerujících se protoplastů.

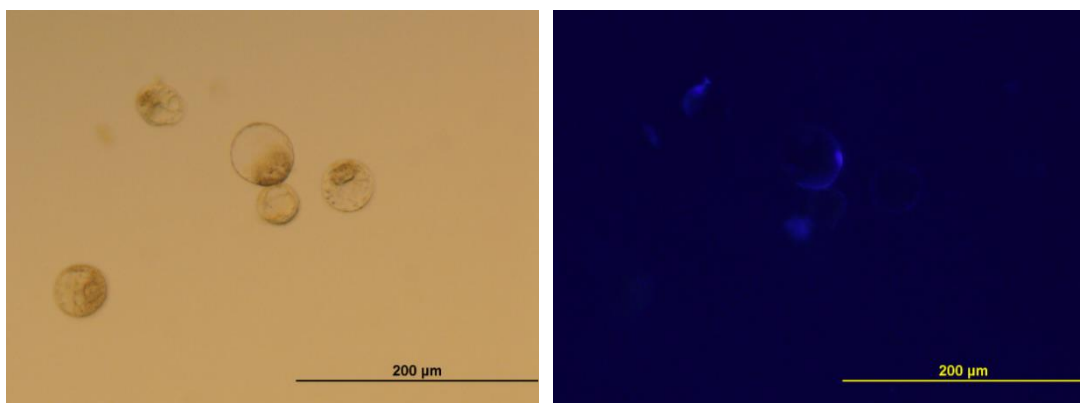


Obr. 47 Buňky *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White (CW) detekující celulosu buněčné stěny, zvětšení 100x.

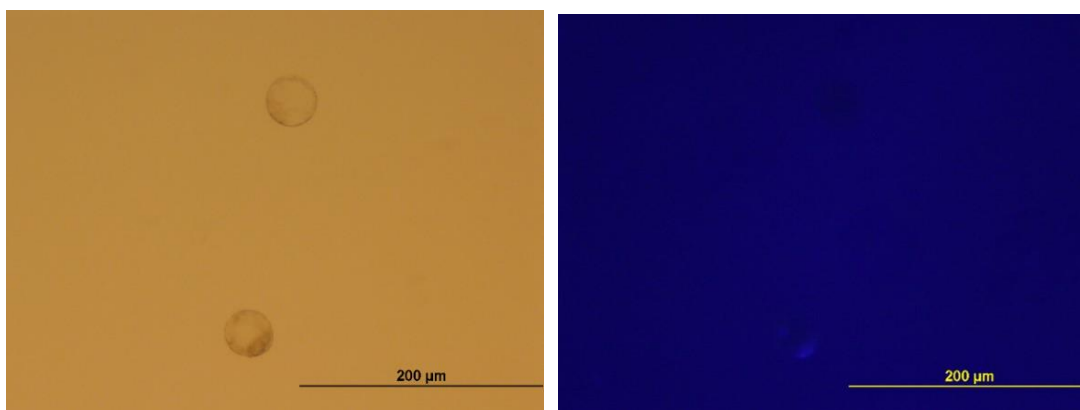
4.9.1.1 Sledování regenerace buněčné stěny pomocí CW u protoplastů z tabákových buněk

Snímky pořízené z mikroskopie dokumentující regeneraci buněčné stěny u připravených protoplastů po barvení s Calcofluor White ukazují, že její postupná obnova je již pozorovatelná od 2 hodin od přípravy protoplastů (obr. 50). Po 24 hodinách je možné pozorovat protoplasty s téměř obnovenou buněčnou stěnou (obr. 54). Obr. 48, 50, 52 a 54 ukazují průběh regenerace u kontrolního vzorku protoplastů.

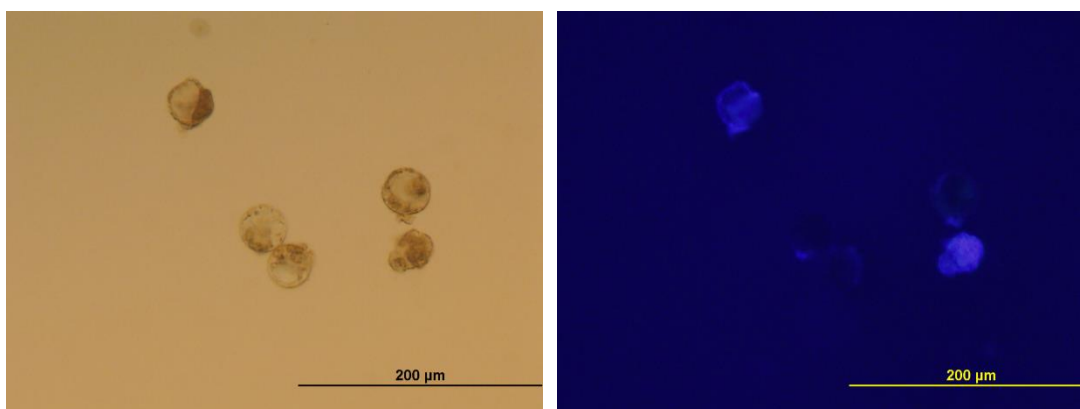
V případě protoplastů po aplikaci trichostatinu A (TSA) dochází k obnově buněčné stěny připravených protoplastů pomaleji. Regenerovaná buněčná stěna je pozorovatelná spíše až od 4 hodiny po přípravě protoplastů na rozdíl od kontroly (obr. 53). Průběh regenerace protoplastů připravených z buněčné suspenze tabáku ovlivněných TSA je zaznamenán na obr. 49, 51, 53 a 55 .



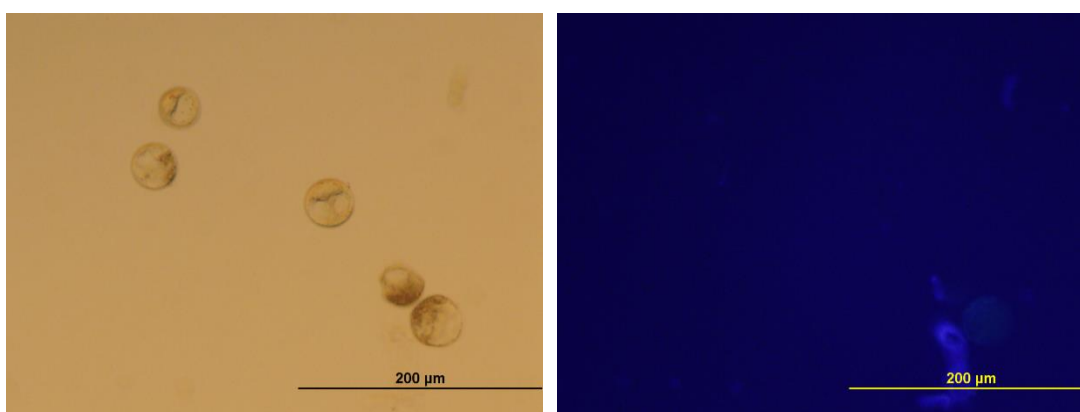
Obr. 48 protoplasty z buněčné suspenze *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White – kontrola – 0 hodin, zvětšení 200x.



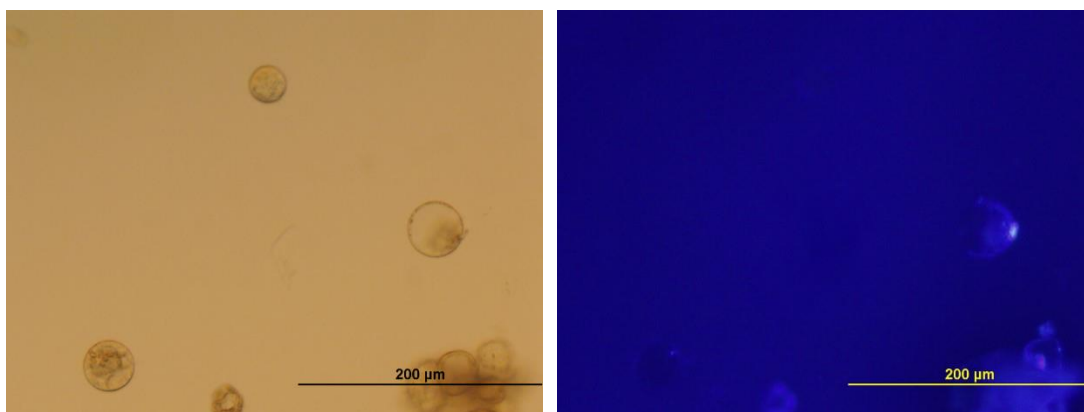
Obr. 49 protoplasty z buněčné suspenze *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White – protoplasty + 0,020μM TSA – 0 hodin, zvětšení 200x.



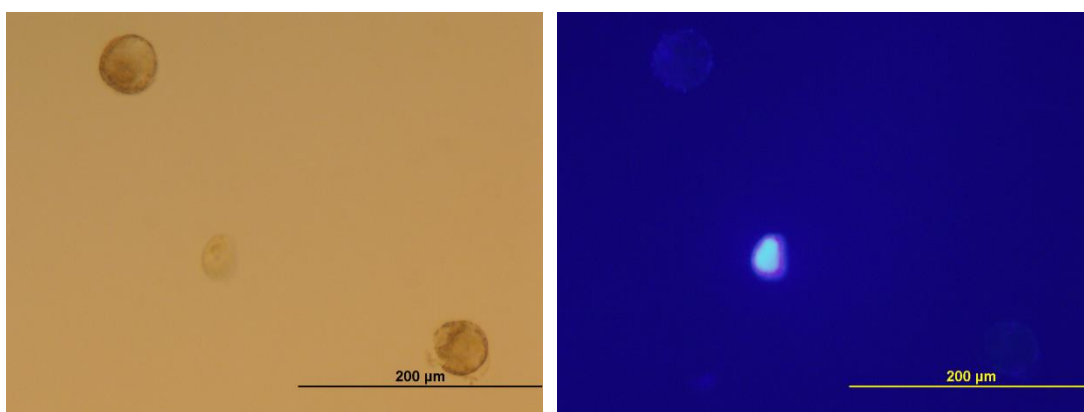
Obr. 50 protoplasty z buněčné suspenze *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White – kontrola – 2 hodiny, zvětšení 200x.



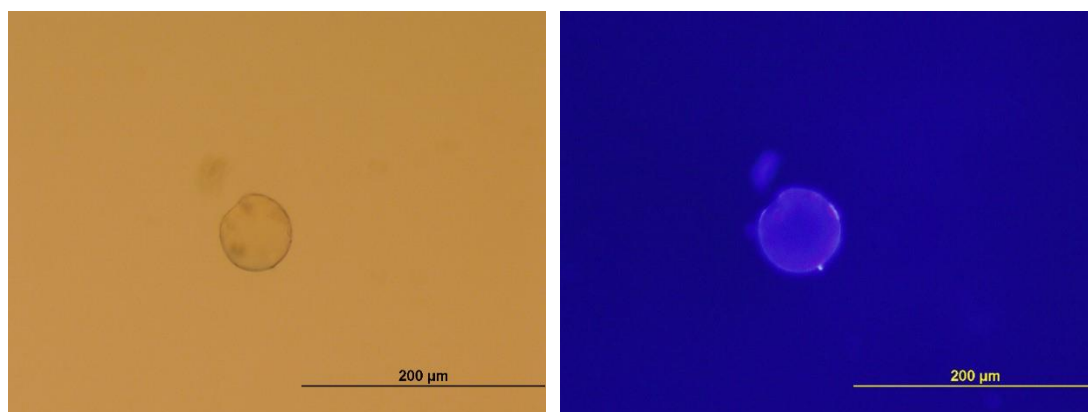
Obr. 51 protoplasty z buněčné suspenze *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White – protoplasty + 0,020μM TSA, 2 hodiny, zvětšení 200x.



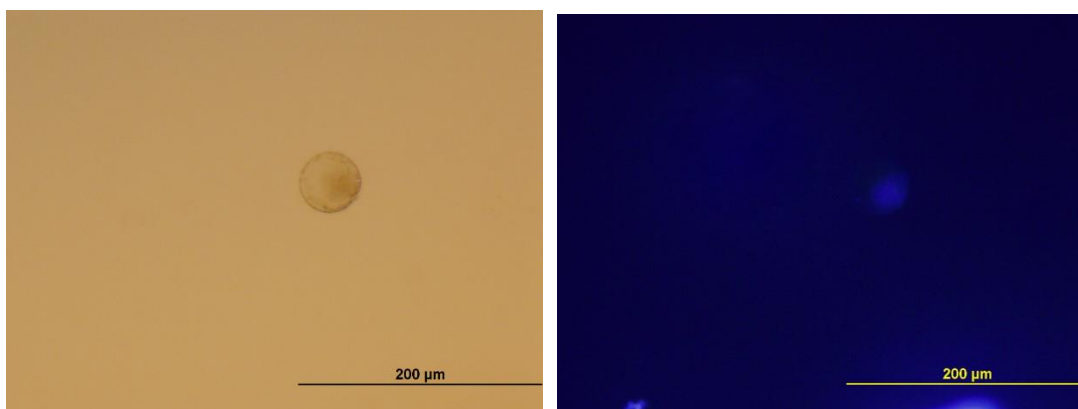
Obr. 52 protoplasty z buněčné suspenze *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White – kontrola – 4 hodiny, zvětšení 200x



Obr. 53 protoplasty z buněčné suspenze *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White – protoplasty + 0,020µM TSA, 4 hodiny, zvětšení 200x.



Obr. 54 protoplasty z buněčné suspenze *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White – kontrola – 24 hodin, zvětšení 200x.

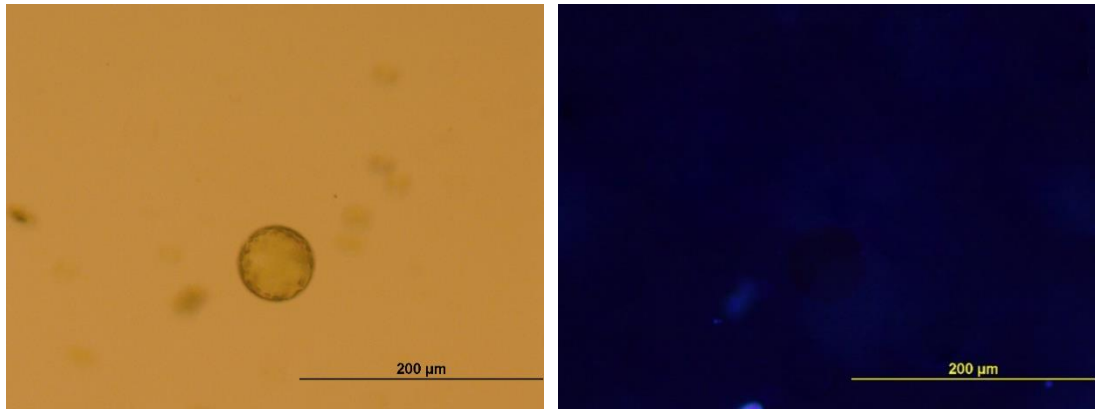


Obr. 55 protoplasty z buněčné suspenze *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White – protoplasty + 0,020μM TSA, 24 hodin, zvětšení 200x.

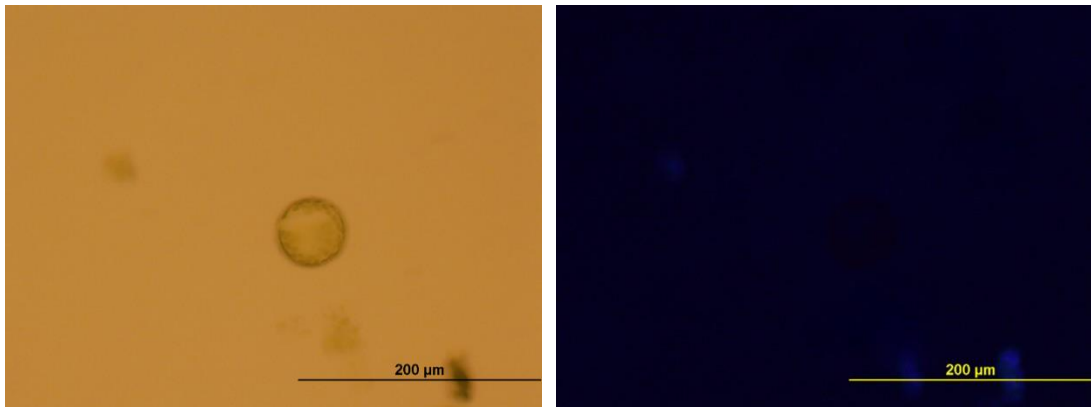
4.9.1.2 Sledování regenerace buněčné stěny pomocí CW u protoplastů z listů tabáku

Podobně jako v případě protoplastů připravených z buněčných suspenzí tabáku, tak u mezofylových protoplastů izolovaných z listů tabáku byla mikroskopicky pozorována obnova buněčné stěny regenerujících se protoplastů v časových intervalech 0, 2, 4 a 24 hodin.

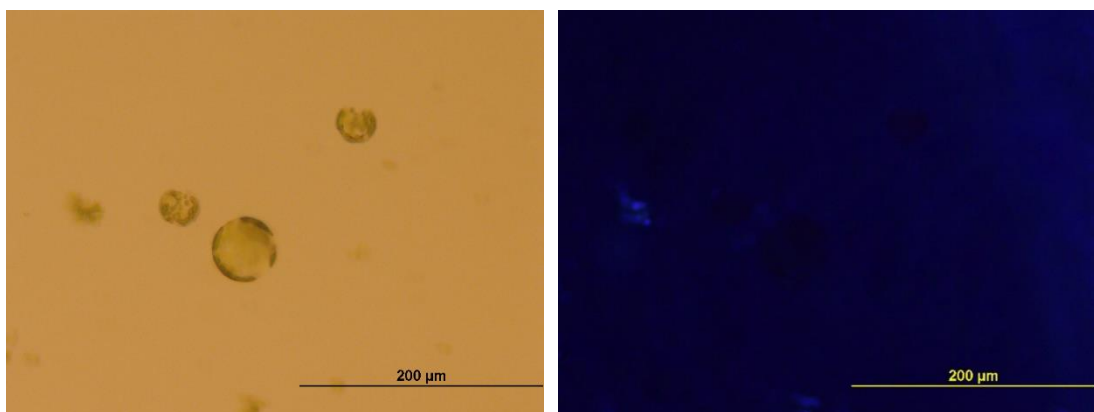
K pozorovatelné regeneraci buněčné stěny u kontrolních protoplastů docházelo podobně jako u protoplastů připravených z buněčné suspenze tabáku již po 2. hodině od jejich přípravy (obr. 58). V případě protoplastů ovlivněných TSA tomu bylo rovněž po 4. hodině jako v případě u protoplastů z buněčných suspenzí (obr. 61). Obrázky 56, 58, 60 a 62 ukazují průběh obnovy buněčné stěny u kontrolní suspenze protoplastů, zatímco obrázky 57, 59, 61 a 63 dokumentují regenerující se protoplasty ovlivněné TSA.



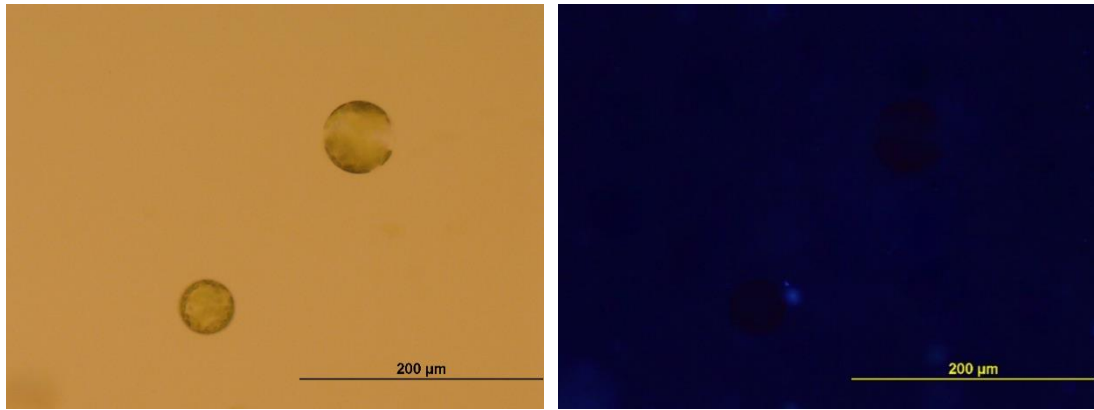
Obr. 56 protoplasty z listů *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White – protoplasty - kontrola, 0 hodin, zvětšení 200x.



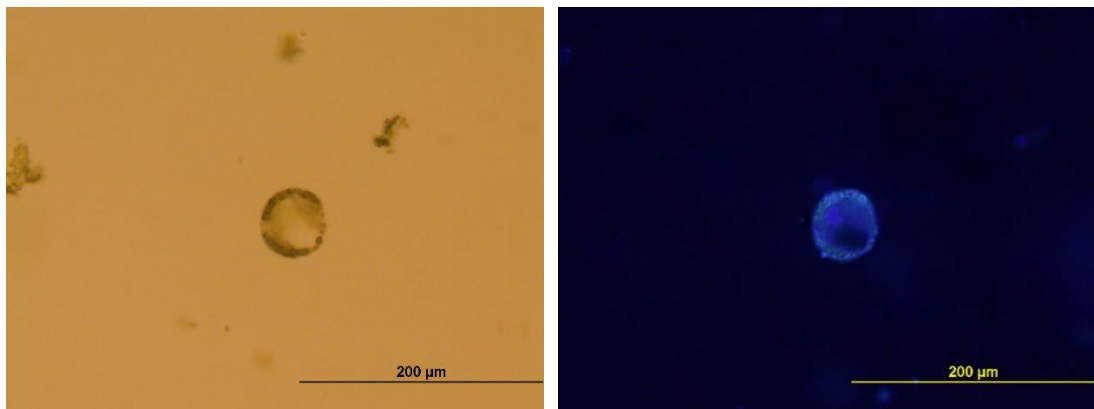
Obr. 57 protoplasty z listů *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White – protoplasty + 0,020µM TSA, 0 hodin, zvětšení 200x.



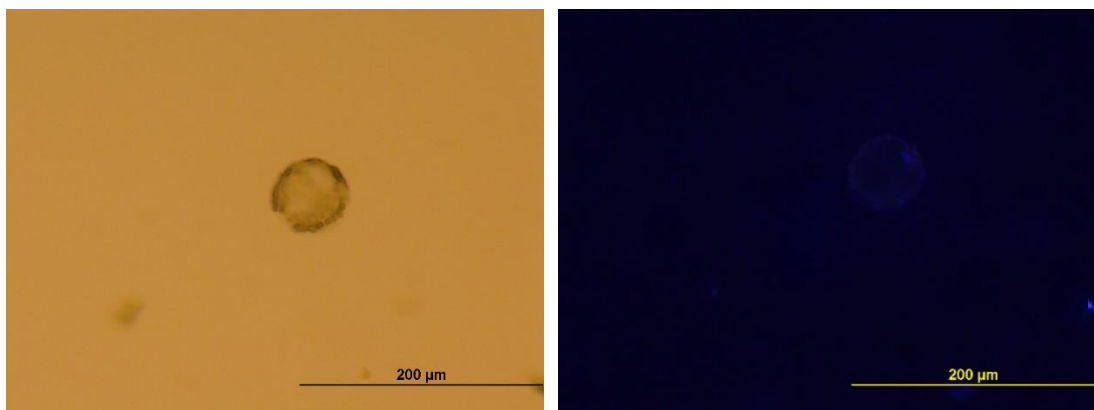
Obr. 58 protoplasty z listů *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White – protoplasty - kontrola, 2 hodiny, zvětšení 200x.



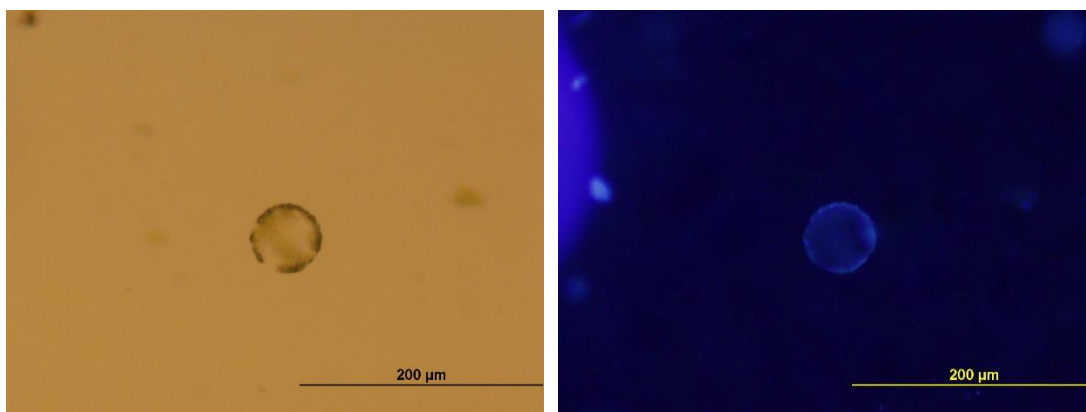
Obr. 59 protoplasty z listů *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White – protoplasty + 0,020µM TSA, 2 hodiny, zvětšení 200x.



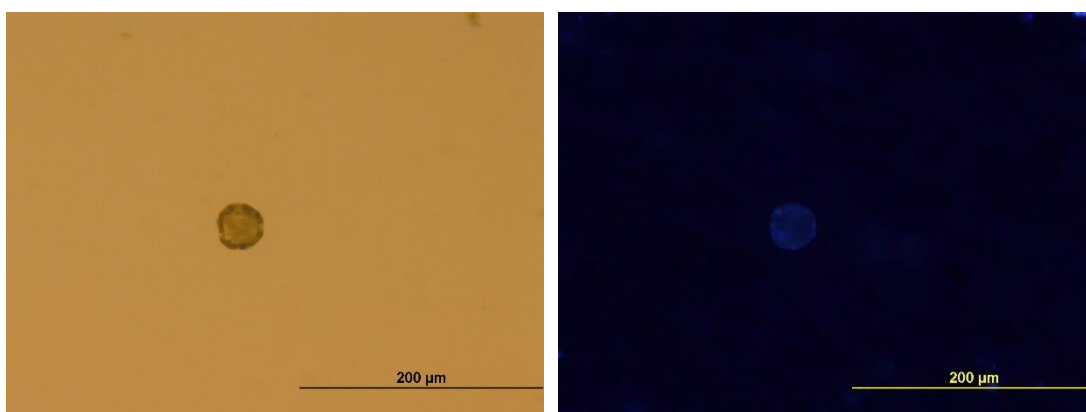
Obr. 60 protoplasty z listů *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White – protoplasty - kontrola, 4 hodiny, zvětšení 200x.



Obr. 61 protoplasty z listů *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White – protoplasty + 0,020µM TSA, 4 hodiny, zvětšení 200x.



Obr. 62 protoplasty z listů *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White – protoplasty - kontrola, 24 hodin, zvětšení 200x.



Obr. 63 protoplasty z listů *N. tabacum* cv. Xanthi po barvení s Calcofluor White – protoplasty + 0,020µM TSA, 24 hodin, zvětšení 200x.

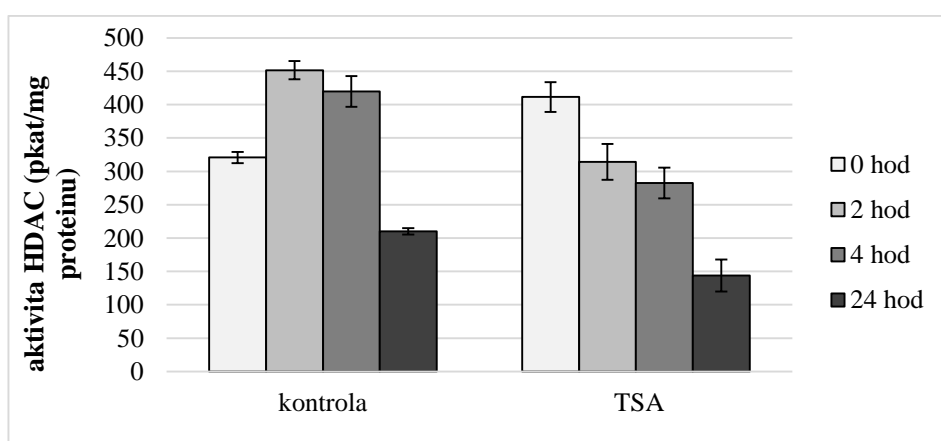
4.9.2 Sledování aktivity HDAC během regenerace protoplastů

U regenerujících se protoplastů byly kromě pozorování obnovy buněčné stěny po aplikaci a bez aplikace TSA pozorovány změny v enzymové aktivitě HDAC. Aktivita HDAC byla stanovena fluorimetricky dvoukrokovou endpoint metodou. Stanovení bylo uskutečněno u vzorků odebíraných v časových intervalech 0 (vzorek zpracován ihned po přidavku TSA), 2, 4 a 24 hodin stejně jako tomu bylo u vzorků pro mikroskopického pozorování obnovy buněčné stěny.

4.9.2.1 Sledování aktivity HDAC během regenerace protoplastů z tabákových buněk

Enzymová aktivita HDAC stanovená u protoplastů připravených z buněčné suspenze tabáku se v průběhu regenerace protoplastů pozorovatelně měnila, jak v případě extraktů z kontrolních suspenzí, tak v případě extraktů připravených ze suspenze protoplastů ovlivněné přidavkem TSA.

V případě kontrolních protoplastů byla stanovená aktivita HDAC ve 2. hodině od jejich přípravy vůči aktivitě tohoto enzymu v čase 0 zvýšená. Od 4. hodiny od přípravy protoplastů docházelo k postupnému snižování, přičemž aktivita enzymu stanovená po 24 hodinách od izolace protoplastů byla ve srovnání s nultou hodinou nižší (obr. 64). U suspenzí protoplastů ošetřených TSA byla stanovená aktivita HDAC v čase 0 hod oproti aktivitě enzymu kontrolní suspenze navýšena. Od 2. hodiny od přípravy protoplastů bylo pozorováno postupné snižování aktivity HDAC, přičemž stanovená enzymová aktivita HDAC po 24 hodinách od přípravy protoplastů byla ve srovnání s aktivitou u nulté hodiny u extraktu z kontrolních protoplastů nižší, jako tomu bylo v případě kontroly (obr. 64). Navíc porovnání enzymové aktivity HDAC u kontrolní a ošetřené suspenze protoplastů v časech 2, 4 a 24 hodin od jejich přípravy ukazuje, že aktivita HDAC je u extraktů připravených z protoplastů po aplikaci TSA oproti kontrole snížena. Což je v souladu se skutečností, že trichostatin A je inhibítoem HDAC.



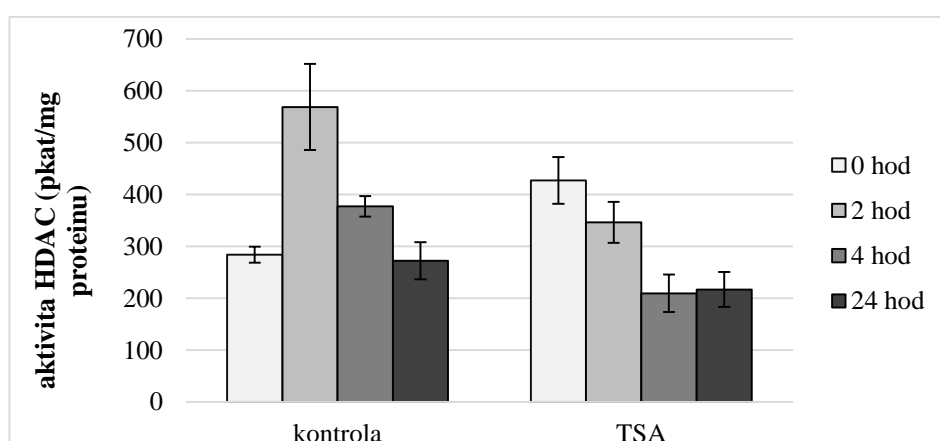
Obr. 64 Změny aktivity HDAC během regenerace protoplastů tabákových buněk v časové intervalu 0-24 hod – porovnání kontrolních protoplastů a protoplastů ošetřených TSA o výsledné koncentraci 0,020 μM .

4.9.2.2 Sledování aktivity HDAC během regenerace protoplastů z listů

Enzymová aktivita HDAC se v průběhu regenerace mezofylových protoplastů připravených z listů tabáku opět měnila (obr. 65), přičemž byl pozorován podobný trend změn aktivity HDAC jako v případě stanovení aktivity enzymu u protoplastů připravených z buněčné suspenze tabáku.

U kontroly byl opět po 2. hodině pozorován nárůst aktivity HDAC, po 4. hodině již bylo pozorováno postupné snižování aktivity enzymu. Po 24 hodinách enzymová aktivita HDAC dosáhla hodnoty, která byla stanovena v čase 0.

U protoplastů ovlivněných TSA byl v nulté hodině opět sledován nárůst aktivity HDAC oproti kontrole, a poté docházelo k postupnému snižování aktivity HDAC. Porovnání aktivity HDAC u kontrolních a ošetřených protoplastů v časech 2, 4 a 24 od jejich izolace opět ukazuje nižší aktivitu HDAC v případě protoplastů s TSA.



Obr. 65 Změny aktivity HDAC během regenerace protoplastů tabákových buněk v časové intervalu 0-24 hod – porovnání kontrolních protoplastů a protoplastů ošetřených TSA o výsledné koncentraci 0,020 μM .

5 Diskuze

5.1 Optimalizace stanovení aktivity HDAC

Aby mohly být sledovány změny v aktivitě a hladině HDAC a potažmo jejich funkce u zvolených biologických pokusů, bylo potřeba zabývat se nejprve problematikou stanovení a detekce HDAC v používaném biologickém materiálu. Dosavadní studium HDAC během biologických procesů bylo zaměřeno hlavně na sledování hladin jejich exprese za určitých fyziologických či stresových podmínek. Změny aktivity HDAC byly doposud zkoumány především u živočišných enzymů, u kterých byl testován vliv inhibitorů HDAC jako potenciálních protinádorových farmakologických přípravků (Gallinari *et al.*, 2007). U rostlinných HDAC byla zatím sledovány spíše změny v hladinách exprese HDAC během určitého vývojového stádia rostliny (např. Wu *et al.*, 2003) či v reakci na stresové podmínky (Sridha a Wu, 2006; Bourque *et al.*, 2011). Dále byly funkce rostlinných HDAC zkoumány pomocí molekulárně biologických přístupů a pozorováním změn ve fenotypu rostlin, např. vzhled listů tabáku po aplikaci kryptogeinu a inhibitorů HDAC (Bourque *et al.*, 2011).

Stanovení enzymové aktivity HDAC v rostlinném materiálu bylo tedy potřeba zoptimalizovat vzhledem k zastoupení abundantních proteinů v pletivech rostlin, které sledování a stanovení aktivity HDAC značně komplikují. Navíc u živočišných HDAC při sledování vlivu inhibitorů HDAC jsou často používány komerční kity optimalizované pro konkrétní typy živočišných tkání, zahrnující metody od kolorimetrických, přes fluorescenční až po bioluminiscenční.

U rostlin bylo konkrétně poměrně nedávno popsáno použití kolorimetrické metody stanovení aktivity HDAC (<http://www.bio-protocol.org/e1778>, 16. 4. 2016, Melmaiee *et al.*, 2015). Byly například optimalizovány podmínky stanovení s využitím komerčního kitu, který byl původně vyvinut pro stanovení aktivity HDAC v jaderných proteinech purifikovaných ze živočišných buněk (Melmaiee *et al.*, 2015). Podobně jako u živočišných HDAC byl rovněž sledován vliv inhibitorů HDAC na jejich aktivitu, přičemž bylo opět potřeba modifikovat stanovení aktivity enzymu pro testování inhibitorů HDAC rostlinného původu vzhledem k primárním a sekundárním metabolitům, pravděpodobně interferujícím při daném stanovení (Krasteva *et al.*, 2011).

5.1.1 Fluorimetrické stanovení aktivity HDAC

Pro fluorimetrické stanovení aktivity HDAC byl v této práci používán komerční substrát, produktem jehož přeměny v reakci katalyzované HDAC je 7-amino-4-methylkumarin (AMC). Pro fluorogenní substráty založené na AMC bylo již dříve popsáno, že se jedná o citlivé substráty vhodné ke stanovení aktivity některých proteas, včetně trypsinu (Zimmerman *et al.*, 1977). Při stanovení enzymové aktivity HDAC v extraktech připravených z rostlinného materiálu bylo extrakty nutné přečišťovat, jinak docházelo ke značnému zhášení fluorescence interferujícími látkami přítomnými v rostlinných extraktech a aktivita HDAC nebyla téměř měřitelná (obr. 17). Přečištění extraktů gelovou chromatografií bylo dostačující u extraktů připravených z buněčných suspenzí tabáku, ale ne v případě extraktů z listů. Důvodem je nejspíše poměrně vyšší obsah interferujících látek v zelených listech rostlin, které se nepodařilo dostatečně danou metodou odseparovat. Možným řešením by byla separace až konečného produktu reakce metodou HPLC s fluorimetrickou detekcí, což by ovšem vedlo k výraznému navýšení časové i finanční náročnosti analýzy. Další možností je vhodné naředění vzorku, ale tento krok v případě minoritních enzymů jako HDAC s relativně nízkou aktivitou není použitelný.

Aktivita HDAC byla stanovována ve 2 eluovaných frakcích přečištěného extraktu (obr. 17), přičemž větší podíl aktivity HDAC byl naměřen v první frakci. Ve druhé frakci eluátu byl naměřený příspěvek aktivity HDAC menší. V této frakci již může být zastoupen nižší obsah proteinové frakce, ale také to může být zapříčiněno skutečností, že již dochází k eluci interferujících nízkomolekulárních látek, od kterých byl extrakt původně přečišťován. To je také důvodem, proč byly frakce sbírány postupně ve dvou alikvotech. Ty nebyly před měřením aktivity HDAC spojeny, což by dané stanovení mohlo opět negativně ovlivnit, ale namísto toho byla stanovená enzymová aktivita HDAC v obou frakcích sčítána.

5.1.2 Spektrofotometrické stanovení aktivity HDAC

Jelikož největším problémem znemožňujícím fluorimetrické stanovení aktivity HDAC bylo právě zhášení fluorescence, které se nepovedlo dostatečně omezit, tak se u extraktů z listů tabáku přešlo ke stanovení spektrofotometrickému. Nevýhodou je sice poměrně

nižší citlivost oproti stanovení fluorimetrickému, ale metoda umožnila aktivitu HDAC stanovit.

Vzhledem ke zmíněné nižší citlivosti detekce produktu u spektrofotometrických metod a vzorku, který byl přečišťován a tudíž u něj došlo ke snížení celkového obsahu proteinů (vzorek 2x naředěn), bylo nutné extrakty zpětně zahušťovat (obr. 21). Pouhé navýšení množství extraktu nanášených do jamky mikrodestičky při zachování stejného celkového reakčního objemu v jamce, jako tomu bylo v případě fluorimetrického stanovení aktivity HDAC u extraktů z buněčné suspenze (obr. 18), k dosažení potřebné citlivosti nestačilo.

5.2 Purifikace jaderných proteinů a detekce HDAC pomocí Western blotu

HDAC jsou vzhledem ke svým primárním substrátům histonům lokalizovány převážně v jádře (Ma *et al.*, 2013). Proto byla za účelem zakoncentrování vzorku o tyto cílové proteiny s využitím třídícího průtokového cytometru tříděna jádra, ze kterých byly následně extrahovány jaderné proteiny. Pro purifikaci proteinů z jader vytříděných z buněčné kultury tabáku se více osvědčil postup s použitím benzonasy. Benzonasa (EC 3.1.30.2) je endonukleasa produkovaná *Serratia marcescens*, která degraduje všechny formy DNA a RNA (Liao *et al.*, 2007). Pro tuto endonukleasu bylo prokázáno, že je účinnou při štěpení DNA právě za účelem přístupu k chromatinu, jehož základní jednotkou jsou kromě DNA oktamery histonů. Její použití je také vhodné například u vzorků s vyšší hladinou detergentů nebo DTT (Grøntved *et al.*, 2012). Pro barvení celkových proteinů na PAGE gelech se pro vzorky extraktů jaderných proteinů osvědčilo barvení pomocí komerčního roztoku SYPRO® Ruby (Sigma-Aldrich) (obr. 27), jehož citlivost je srovnatelná s barvením proteinů pomocí stříbra. Při barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue (obr. 23 a) nebyly proteiny u extraktů z jader detekovány.

Pro detekci HDAC a jejich hladin v rostlinném materiálu při Western blot analýze byla používána primární protilátka proti histondeacetylase HDT3 z *Arabidopsis thaliana*. Primární protilátky proti HDAC tabáku nejsou zatím dostupné, ale vzhledem k vysoké konzervovanosti HDAC (Pandey *et al.*, 2002) se předpokládá schopnost dané primární protilátky HDAC tabáku detekovat. V rámci bakalářské práce byla již testována reakce

primární Ab s proteiny extraktu z listů *N. tabacum* cv. Samsun, přičemž se ukázalo, že protilátka pro detekci HDAC v extraktech z tabáku vykazuje nízkou specifitu. V rámci diplomové práce se testovala schopnost reakce primární Ab proti HDT3 vůči proteinům extraktu z buněčné kultury tabáku s obdobným výsledkem. Vzhledem k tomu, že histondeacetylasy tabáku, NtHD2a a NtHD2b, byly identifikovány jako dvě redundantní isoformy HDAC nacházející se v jádře (Bourque *et al.*, 2011), tak byly tyto experimenty opakovány s jadernými frakcemi. V případě extraktu připraveného z 1 000 000 jader tabáku byly detekovány bandy o slabé intenzitě, které by mohly odpovídat HDAC tabáku (obr. 28), avšak jejich identitu by bylo potřeba ověřit například pomocí MS analýzy.

Dalším způsobem, jak by bylo možné sledovat působení HDAC u rostlinného materiálu pomocí Western blotu, ačkoli nepřímo, by mohla být detekce acetylovaných jaderných proteinů. Takto byla například sledována funkce HDAC tabáku po aplikaci kryptogeinu za použití primární protilátky proti acetylovaným lysinům (Bourque *et al.*, 2011).

5.3 Vliv látek uvolňujících oxid dusnatý na aktivitu HDAC a detekce S-nitrosylovaných proteinů

Vliv donorů NO na funkci HDAC byl doposud zkoumán opět pouze v případě živočišných HDAC. Nott *et al.* v práci z roku 2008 popsali inhibiční vliv S-nitrosylace na aktivitu HDAC2 a na změny hladin acetylace histonů u neuronů. Přišli se závěrem, že NO je klíčovým regulátorem lidské HDAC2. Ovlivnění HDAC2 S-nitrosylací byla rovněž popsáno u svalových buněk (Colussi *et al.*, 2008).

Při testování SNP a GSNO, jako látek uvolňujících NO, byly u stanovené aktivity komerční lidské HDAC2 pozorovány odlišné změny (obr. 29). SNP ovlivnilo enzymovou aktivitu HDAC až při vyšší koncentraci (1 mM). Po inkubaci trvající 30 minut došlo k mírnému nárůstu deacetylasové aktivity o 10 %. V případě GSNO došlo již po 15 minutové inkubaci s enzymem ke snížení aktivity HDAC a dostačující koncentrace GSNO byla 0,1 mM, při které byla enzymová aktivita snížena o 28%. Aktivita HDAC po 30 minutové inkubaci s 1mM GSNO byla snížena až o 58%. Změny ve stanovené aktivitě HDAC po aplikaci GSNO jsou v souladu s publikovanými

studiemi (Feng *et al.*, 2011; Tatemichi *et al.*, 2011). Pro SNP bylo popsáno, že k ovlivnění aktivity HDAC2 nedochází (Feng *et al.*, 2011).

Při detekci S-nitrosylovaných proteinů metodou biotin switch byla porovnávána lidská komerční HDAC2 s extraktem připraveným z jader tabákových buněk (po inkubaci se SNP i GSNO). Po imunodetekci nitrosylovaných proteinů však nebyly detekovány žádné prokazatelné proteiny (obr. 30), což sice neodpovídá výsledkům z dosavadních publikací. Navíc v případě GSNO nemusí probíhat jen trans-nitrosylace, ale také může docházet k S-glutathionylaci. Ta představuje další typ posttranslační modifikace, která u rostlin není doposud rovněž dostatečně prozkoumána. Pro průkaznější zhodnocení získaných výsledků by bylo potřeba experimenty zopakovat např. s donory NO o větší koncentraci, popř. s delší inkubací, a poté provést denzitometrické vyhodnocení. Použití metody biotin switch pro analýzy S-nitrosylovaných jaderných proteinů, včetně rostlinných HDAC, bylo popsáno ve studii Chaki *et al.*, 2015, kteří v extraktu jaderných proteinů inkubovaných s GSNO identifikovali S-nitrosylované histondeacetylasy HDT2 a HDT3 *Arabidopsis*. Dále zkoumali S-nitrosylaci rekombinantně připravených HD-tuinů. Jako donory NO použili GSNO a SNAP (S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin), přičemž k výraznější S-nitrosylaci došlo při aplikaci SNAP. Je tedy možné, že SNP a GSNO nejsou pro S-nitrosylaci rostlinných HDAC nejvhodnějšími donory NO.

5.4 Výběr metody pro stanovení životnosti tabákových buněk

Pro porovnávání změn v životnosti buněčných kultur tabáku po aplikaci elicitinu kryptogeinu byla vybrána metoda s resazurinem v mikrodestičkovém uspořádání. Všechny z testovaných metod sloužily pro detekci živých buněk. Mikroskopické pozorování počtu živých buněk jakoukoli z testovaných metod nebylo zvoleno. Důvodem je velmi obtížné pozorování jednotlivých buněk *N. tabacum* cv. Xanti, vzhledem k tomu že dochází k jejich shlukování (obr. 38-41). Kdyby bylo možné pozorovat jednotlivé buňky, z uvedených metod by byly vhodné metody s MTT, FDA a AB. V případě neutrální červeně bylo barvivo zadržováno i mrtvými buňkami (obr. 41), což je v nesouladu s předpokladem, že NČ by měla být zadržována pouze v lysozomech živých buněk (Repetto *et al.*, 2008).

V případě srovnávání změn v životnosti tabákových buněk spektrofotometrickým nebo fluorimetrickým stanovením na mikrodestičce byly více vyhovující metody

fluorimetrické. U kolorimetrického stanovení pomocí NČ bylo barvivo opět zadržováno i mrtvými buňkami (obr. 35). Falešná pozitivita u nulového vzorku mohla být způsobena průnikem NČ přes porušené membrány mrtvých buněk a následným nedostatečným promývacím krokem. Opakované promývání by však mohlo mít negativní vliv na živé buňky. U druhé z kolorimetrických metod, metody s MTT, dosahovaly naměřené hodnoty absorbance, odpovídající míře životnosti buněk, nízkých hodnot (obr. 34) a pro pozorování malých rozdílů v životnosti buněk by tedy nebyla nejvhodnější. Jedná se však o jednu z nejpoužívanějších metod stanovení životnosti, využívané i pro stanovení míry životnosti u tabákových buněk (Königshofer *et al.*, 2008). Z fluorimetrických metod, které byly vzhledem k citlivosti detekce produktu vhodnější, byla vybrána metoda s resazurinem (obr. 33). Nefluoreskující modrý resazurin (AB) je přeměňován reduktasami živých buněk na růžový resorufin, který fluoreskuje. Jeho výhodou je, že negativně neovlivňuje dýchací řetězec živých buněk, jako např. MTT, protože je akceptorem elektronů až z cytochromu c, tedy před finální redukcí kyslíku (Perrot *et al.*, 2003). Metoda byla optimalizována i pro porovnávání ve změnách životnosti u buněk rostlinných (Byth *et al.*, 2001). U obou z testovaných fluorimetrických metod stanovení míry životnosti byl pozorován rozptyl získaných hodnot fluorescence, který by mohl být vzhledem k citlivosti metod důsledkem již zmíněného shlukování buněk. Při opakování měření však resazurin poskytoval reprodukovatelnější výsledky.

Dalším voleným parametrem při stanovení životnosti tabákových buněk pro porovnávání kontrolní a ovlivněné buněčné suspenze byla volba média (obr. 36). Konkrétně se porovnávaly změny životnosti buněk během 24 hodin u buněčné kultury v kultivačním (MS) a ekvilibračním médiu. Ekvilibrační médium je používáno při experimentech, během kterých se současně stanovují reaktivní formy dusíku, protože při jejich stanovení v kultivačním médiu dochází k interferenci. Vzhledem k délce prováděných experimentů nebylo vhodné, docházelo totiž k postupnému umírání buněk (obr. 36), kterým chyběly některé ze složek obsažených v kultivačním médiu. Pro další experimenty bylo tedy zvoleno kultivační médium.

Při testování vlivu kryptogeinu na životnost buněk byla také porovnávána aplikace kryptogeinu k buněčné suspenzi za podmínek světlo a tma (obr. 37). Nedávno bylo totiž u tabáku popsáno, že kryptogeinem vyvolaná hypersenzitivní reakce je závislá na světle (Hoeberichts *et al.*, 2013). Už dříve bylo demonstrováno, že infiltrace kryptogeinu

značně indukuje dráhu 9-lipoxygenasy (LOX). Po aplikaci kryptogeinu dochází ke společnému nárůstu aktivity 9-LOX a zvýšené expresi lipidové acylhydrolasy patatinu s následnou produkcí hydroperoxidů mastných kyselin, které podněcují HR (Cacas *et al.*, 2005). Hoeberichts *et al.* ukázali, že symptomy HR se za světelných podmínek objevují později, což je nejspíše důsledkem toho, že za světla se peroxidace lipidů uskutečňuje přímým působením ROS namísto enzymovou aktivitou 9-LOX za tmy (Cacas *et al.*, 2005; Montillet *et al.*, 2005). Při sledování změn v životnosti tabákových buněk po aplikaci kryptogeinu za podmínek světlo/tma (obr. 37) však nebyly pozorovány výrazné rozdíly, a proto byly experimenty s kryptogeinem nadále uskutečňovány za světla.

5.5 Vliv kryptogeinu x24 na aktivitu HDAC

Experimenty byly uskutečňovány s kryptogeinem x24, což je rekombinantní protein připravený expresí genu pro kryptogein v kvasince *Pichia pastoris*. Od nativní formy kryptogeinu sekretovaného z *Phytophthora cryptogea* se liší přítomností sekvence EAEA na N-konci proteinu, která se při sekreci x24 neodštěpuje a lehce snižuje jeho biologickou aktivitu. Zajišťuje však transport proteinu do extracelulárního prostoru.

Kryptogein je již poměrně dobře prozkoumaným elicitinem. Testoval se jeho vliv jak na životnost buněk, tak na změny vlastností některých enzymů. Vliv kryptogeinu u tabákových buněk cv. Xanthi byl zkoumán např. ve studiích Garcia-Brugger *et al.*, 2006 či Mazars *et al.*, 2010. Kryptogein u *Nicotiana tabacum* spouští obranné reakce skrze signální kaskádu, která mimo jiné zahrnuje produkci ROS prostřednictvím NADPHoxidasy NtRBOHD (Kulík *et al.*, 2015). Při elicitaci dochází rovněž k elicitorem indukované produkci NO, která nastává simultánně s produkcí peroxidu vodíku a superoxidového radikálu, které jsou vyústěním aktivity již zmíněné NADPHoxidasy NtRBOHD lokalizované v plasmatické membráně (Lherminier *et al.*, 2009). Navíc produkce NO indukovaná kryptogeinem je u tabáku nejspíše regulována nejen přes ROS-dependentní dráhu zapojující NtRBOHD, ale částečně je i pod kontrolou působení histonacetylasy typu HD-tuinů, které jsou ovlivňovány jejich fosforylačním stavem (Bourque *et al.*, 2011). Objevují se tedy zmínky, že posttranslační modifikace jaderných proteinů pravděpodobně zaujímají důležitou roli v kontrole buněčné smrti. Bourque *et al.* konkrétně zvýraznili roli acetylce a fosforylace jaderných proteinů ve vývoji obrany rostlin (Bourque *et al.*, 2011). Zaměřili se

na kontrolu exprese genů spojených s buněčnou smrtí po ošetření kryptogeinem, především se zabývali posttranslačními modifikacemi acetylací a fosforylací. Zjistili, že kryptogein indukuje aktivaci dvou jaderných proteinkinás, SIPK a MAPK. Mezi jejich substráty patří i NtHD2a a NtHD2b, redundantní isoformy HD-tuinů tabáku. Dahan *et al.* následně vytvořili dva modely, jak by ke kontrole buněčné smrti za daných podmínek mohlo docházet (Dahan *et al.*, 2011).

Jako jednu z variant navrhli dráhu vedoucí přes neznámý mechanismus k aktivitě SIPK v jádře, detekovatelné již během několika minut po ošetření kryptogeinem. Sice nebyli schopni předpovědět, jestli v tomto navrženém modelu je SIPK aktivována v jádře fosforylací jadernou MAPK kinasou, nebo jestli jsou již aktivované SIPK translokovány do jádra z cytoplasmy. SIPK poté fosforyluje transkripční faktory zodpovědné za expresi sady genů spouštějících buněčnou smrt (tzv. „cell death genes“). Simultánně dochází k fosforylaci NtHD2a/b neznámou proteinkinásou. Jak je tato proteinkinasa aktivována, není doposud známo. Fosforylované NtHD2a/b jsou poté translokovány z jádra do cytosolu a následně degradovány v proteasomu a acetylované formy jaderných proteinů, původně deacetylovaných působením NtHD2a/b před ošetřením kryptogeinem, se akumulují v jádře. Mezi tyto proteiny patří také transkripční regulátory zapojené v expresi dalších genů spouštějících buněčnou smrt. Jako druhou variantu navrhli, že v odpovědi na kryptogein dráha závislá na NtHD2a/b snižuje expresi sady genů, jejichž produkty brání expresi genů spouštějících buněčnou smrt (Dahan *et al.*, 2011).

Vliv patogena na aktivitu HDAC byl také zkoumán kolektivem Melmaiee *et al.*, 2015, kteří sledovali změny v aktivitě HDAC fazole po ošetření fungálním patogenem. Po 12 hodinách od ošetření pozorovali snížení celkové aktivity HDAC, což naznačilo, že by mohla být vyžadována nižší deacetylační aktivita za účelem přechodu DNA do rozvolněnějšího stavu, a tím pádem její přístupnosti pro indukovanou transkripci genů spojených se stresem (Melmaiee *et al.*, 2015).

Po aplikaci kryptogeinu k buněčné suspenzi tabáku bylo v případě aplikace 5nM kryptogeinu pozorován nárůst aktivity HDAC během prvních 4 hodin od aplikace elicitoru, po 24 hodinách byla však enzymová aktivita HDAC snížena (obr. 42). Po ošetření buněčné suspenze 50nM kryptogeinem bylo po vztažení aktivity HDAC na životnost buněk pozorováno její snížení. Výsledky získané pro první 4 hodiny

po aplikaci 5nM elicitinu a po korelaci na změny v životnosti buněk však neodpovídají předpokladům, které byl uvedeny ve studiích Dahan *et al.*, 2011 a Melmaiee *et al.*, 2015. Dahan *et al.* předložili svoji hypotézu na základě práce publikované Bourque *et al.*, 2011, kteří pro experimenty používali kryptogein o výsledné koncentraci 100 nM. Melmaiee *et al.*, 2015 studovali konkrétně ovlivnění HDAC u rostlin fazole po inokulaci s patogenem *Uromyces appendiculatus*. Podle těchto tvrzení by mělo docházet ke snížení aktivity HDAC, které však bylo v našem případě pozorováno až po 24 hodinách od aplikace elicitoru. Přesný mechanismus odehrávajících se událostí ale nebyl doposud prozkoumán.

V případě listů po infiltraci kryptogeinem o všech jeho testovaných koncentracích docházelo k postupnému snižování aktivity HDAC (obr. 44). Nejvýraznější vliv na snížení aktivity HDAC měl kryptogein o koncentraci 50 nM, zatímco nejméně byla aktivita enzymu ovlivněna aplikací 10nM kryptogeinu. U extraktů z listů po aplikaci 100nM kryptogeinu bylo pozorováno snížení enzymové aktivity HDAC v menším rozsahu, než jako tomu bylo v případě 50 nM kryptogeinu (obr. 44). Tyto sledované změny v aktivitě HDAC po aplikaci elicitoru u listů tabáku jsou v souladu s prací Melmaiee *et al.*, 2015, kteří u rostliny fazole, napadené fungálním patogenem, také pozorovali snížení enzymové aktivity HDAC. Výsledky by tedy mohly podporovat hypotézu, že snížení aktivity HDAC vede ke zvýšení acetylace histony, a tím pádem přístupnější DNA pro transkripční regulátory za účelem transkripce genů spojených se stresem. Pro potvrzení, resp. vyvrácení, zmíněného předpokladu však bude potřeba objasnit daný mechanismus na molekulární úrovni.

5.6 Funkce HDAC během regenerace protoplastů

Protoplastizace rostlinných buněk je procesem dediferenciace buněk, kdy původně diferenciované buňky přecházejí do přechodného stavu, s vlastnostmi podobajícími se těm u kmenových buněk živočichů, a znovu vstupují do buněčného cyklu (Grafi *et al.*, 2011). Během protoplastizace dochází k rozsáhlé dekonduzaci chromatinu, nejspíše za účelem exprese genů potřebných pro vstup do buněčného cyklu, proliferaci a rediferenciaci buněk, nebo genů pro spuštění buněčné smrti. Přestavba struktury chromatinu se odehrává především dekonduzací heterochromatinu, včetně repetitivních sekvencí genomu. Nový heterochromatinový stav je pak potřebný v době, kdy buňky, odvozené od protoplastů, znovu vstupují do buněčného cyklu (Ondřej *et al.*, 2009).

Jedním ze způsobů regulace změn struktury chromatinu jsou kovalentní modifikace zahrnující kromě methylace DNA rovněž acetylaci a deacetylaci histonů (Allis *et al.*, 2007).

Během protoplastizace diferencující se tabákové mezofylové buňky procházejí dvěma fázemi dekondezace chromatinu. První z nich nastává během izolace protoplastů, kdy dochází k enzymové degradaci buněčné stěny. Následuje přechodná fáze, která je nezbytná pro aktivaci genů, jejichž produkty rozhodnou o osudu buňky (vstup do buněčného cyklu nebo zahájení buněčné smrti). Druhá fáze dekondezace chromatinu nastává poté, co jsou regenerující se protoplasty indukovány podnětem, např. aplikací fytohormonů, ke znovu vstoupení do buněčného cyklu (Zhao *et al.*, 2001). Dediferenciace tabákových buněk je také doprovázena náhlým nárůstem exprese ubikvitinu, který je potřebný pro selektivní destrukci proteinů zapojených v zprostředkování předešlých funkcí buňky a následnou aktivaci proteinů, které jsou esenciální pro proliferaci buněk (Papadakis *et al.*, 2002). V nepřítomnosti fytohormonů protoplasty podléhají cyklům kondenzace-dekondezace chromatinu a následně umírají (Zhao *et al.*, 2001).

Studiem HDAC protoplastů tabáku se zabýval kolektiv Li *et al.*, kteří zkoumali vliv HDAC při regeneraci protoplastů po aplikaci rostlinného hormonu podněcujícího vstup do buněčného cyklu. Navrhli, že deacetylace histonů může být potřebná pro separaci chromatid a progresi skrze anafázi (Li *et al.*, 2005). Zapojení HDAC v regeneračních procesech bylo rovněž popsáno u obratlovců, ačkoli přesná funkce za *in vivo* podmínek není ještě zcela pochopena (He *et al.*, 2014).

Trichostatin A, inhibitor HDAC, může také ovlivňovat proces regenerace buněčné stěny. Vlivem TSA dochází k up-regulaci genů kódujících proteiny zapojené v degradaci buněčné stěny (xyloglukanendotransglukosylasy (XET) a xyloglukanhydrolasy), v depolymerizaci pektinu a hydrolýze celulosy. Rovněž byla popsána up-regulace malého počtu genů zapojených v buněčném cyklu (Li *et al.*, 2014).

Při sledování změn v enzymové aktivitě HDAC u protoplastů připravených jak z buněčné kultury tabáku, tak listů, byl pozorován podobný trend. Po přípravě protoplastů byla u kontrolních suspenzí stanovená aktivita HDAC nižší (obr. 64 a 65). Po 2. hodině od izolace byl pozorován její nárůst, od 4. hodiny aktivita enzymu klesala. Toto pozorování by mohlo být v souladu s potřebou kondenzovaného

a dekonzenzovaného stavu chromatinu. Kondenzovaný stav chromatinu je spojován s deacetylovanými histony, kdy lysiny s pozitivním nábojem na ϵ -aminoskupině jsou přitahovány k záporně nabitě DNA, zatímco dekonzenzovaný stav s acetylovanými lysiny je spojován s rozvolněnou strukturou chromatinu. První dekonzenzace nastává během izolace protoplastů, kdy dochází k degradaci buněčné stěny (Zhao *et al.*, 2001), tudíž aktivita HDAC by měla být nižší. Snížená aktivita HDAC stanovená po izolaci protoplastů skutečně pozorována byla (obr. 64 a 65). Druhá dekonzenzace se odehrává během opětovného vstoupení do buněčného cyklu (Zhao *et al.*, 2001). Proto je možné, že se od 4. hodiny u regenerujících se protoplastů začala aktivita HDAC opět postupně snižovat, aby po vhodném stimulačním podnětu byla buňka odvozená od protoplastu schopna do buněčného cyklu vstoupit. V případě suspenzí protoplastů ovlivněných TSA byla stanovená aktivita HDAC s výjimkou nulté hodiny oproti kontrole nižší, což je nejspíše důsledkem inhibice enzymu TSA, účinným inhibitorem HDAC (Yoshida *et al.*, 1990) s výjimkou sirtuinů, jejichž aktivita účinkem TSA potlačována není (Imai *et al.*, 2000).

Při mikroskopickém pozorování obnovující se buněčné stěny regenerujících se protoplastů pomocí Calcofluor White (obr. 48-63) byla u suspenzí protoplastů ošetřených TSA pozorována pomalejší obnova. Tato skutečnost jednak může podporovat nezbytnou funkci histondeacetylasy pro modifikaci histonů během regenerace protoplastů, jednak se může jednat o důsledek zvýšené exprese genů, kódujících enzymy degradující buněčnou stěnu, indukované TSA.

6 Závěr

V rámci experimentální část diplomové práce byla provedena optimalizace podmínek pro stanovení aktivity HDAC:

- U stanovení aktivity HDAC je nutné rostlinné extrakty přečišťovat gelovou chromatografií od přítomných interferujících látek. Stanovení aktivity HDAC bez přečištění extraktů je možné u extraktů z protoplastů a z rostlinných jader.
- Citlivé fluorimetrické stanovení aktivity HDAC je možno využít v případě extraktů z buněčných suspenzí.
- Spektrofotometrické stanovení aktivity HDAC je využitelné v případě extraktů listů z tabáku, které jsou po přečištění gelovou chromatografií zpětně zahušťovány.
- Enzymovou aktivitu je vhodně oběma metodami stanovovat odděleně ve dvou frakcích eluovaných při gelové chromatografii a získané hodnoty aktivity následně sčítat.
- Aktivity a hladina HDAC je ovlivňována v závislosti na požitém donoru NO.

S využitím primární protilátky na protein HDT z *A. thaliana* byla testována detekce HDAC metodou Western blot v buněčných extraktech i frakcích jaderných proteinů tabáku:

- Pro dosažení dostatečné citlivosti detekce HDAC tabáku je potřebné použití extraktů se zakoncentrovanými jadernými proteiny, které jsou purifikovány z rostlinných jader.
- Pro detekci celkových proteinů ve vzorcích jaderných extraktů separovaných v polyakrylamidových gelech je vhodnější barvení pomocí komerčního roztoku SYPRO® Ruby (Sigma-Aldrich).

Studium S-nitrosylovaných jaderných proteinů:

- Po aplikaci SNP byl u komerční lidské HDAC2 pozorován mírný nárůst enzymové aktivity HDAC.
- Po aplikaci GSNO bylo u HDAC2 naopak pozorováno výraznější snížení aktivity enzymu.
- Analýza metodou biotin switch bohužel nevedla k detekci žádných prokazatelných proteinů.

Dále byla v experimentální studii studována funkce HDAC v mechanismu buněčné smrti tabáku indukované kryptogeinem:

- U buněčných kultur byl nejprve pozorován nárůst aktivity HDAC, po 24 hodinách od aplikace elicitanu byla enzymová aktivita snížena.
- U listů tabáku byl vlivem kryptogeinu pozorován pokles aktivity HDAC. Nejvýraznější účinek byl pozorován po aplikaci kryptogeinu o koncentraci 50 nM.

V třetí části experimentální práce byla studována funkce HDAC v mechanismu regenerace protoplastů:

- Po izolaci protoplastů byla pozorována snížená aktivita HDAC. Po 2. hodině od izolace byl pozorován nárůst aktivity enzymu, která se poté postupně snižovala.
- Při aplikaci trichostatinu A, inhibitoru HDAC, probíhala regenerace protoplastů pomaleji.

V této diplomové práci byly tedy nejprve upravovány podmínky metod pro stanovení aktivity HDAC a jejich detekci v rostlinném materiálu, rovněž byla vybírána vhodná metoda pro stanovení míry životnosti buněk. Poté bylo přistoupeno k biologickým pokusům zaměřeným na sledování funkce HDAC v mechanismech buněčné smrti a regeneračních procesů, do jejichž regulace jsou dané enzymy nejspíše významně zapojeny. Avšak je potřeba dalších studií, podobně jako této, které by se danou problematiku pokusily objasnit.

7 Literatura

- Alazem M., Lin N.-S. (2015): Roles of plants hormones in the regulation of host-virus interaction. *Molecular Plant Pathology* **16**, 529-540.
- Allfrey V. G., Faulkner R., Mirsky A. E. (1964): Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Biochemistry* **51**, 786-794.
- Allis C. D., Jenuwein T., Reinberg D. (2007): Chapter 3, *Overview and concepts* (Allis C. D., Jenuwein T., Reinberg D.). In: *Epigenetics*. Cold Spring Harbor, New York, USA, 25-40.
- Alnemri E. S., Fernandes-Alnemri T., Pomeroy K., Robertson N. M., Dudley K., DuBois G. C., Litwack G. (1994): FKBP46, a novel Sf9 insect cell nuclear immunophilin that forms a protein-kinase complex. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 30828-30834.
- Annunziato A. T., Seale R. L. (1983): Histone deacetylation is required for the maturation of newly replicated chromatin. *The Journal of Biological Chemistry* **258**, 12675-12684.
- Aquea F., Timmermann T., Arce-Johnson P. (2010): Analysis of histone acetyltransferase and deacetylase families of *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 194-199.
- Aravind L., Koonin E. V. (1998): Second family of histone deacetylases. *Science* **280**, 1167
- Asai S., Yoshioka H. (2009): Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **22**, 619-629.
- Astier J., Besson-Bard A., Lamotte O., Bertoldo J., Bourque S., Terenzi H., Wendehenne D. (2012): Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA⁺ ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation in cryptogein signalling in tobacco cells. *Biochemistry Journal* **447**, 249-260.
- Baxter A., Mittler R., Suzuki N. (2013): ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1129-1240.
- Bellin D., Asai S., Delledonne M., Yoshioka H. (2013): Nitric oxide as a mediator for a defense responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **26**, 271-277.
- Benhamed M., Bertrand C., Servet C., Zhou D. X. (2006): *Arabidopsis* GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. *Plant Cell* **18**, 2893-2903.
- Besson-Bard A., Pugin A., Wendehenne D. (2008): New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 21-39.
- Blein J. P., Milat M. L., Ricci P. (1991): Responses of cultured tobacco cells to cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*: Possible plasmalemma involvement. *Plant Physiology* **95**, 486-491.
- Boissy G., de La Fortelle E., Kahn R., Huet J.-C., Bricogne G., Pernollet J.-C., Brunie S. (1996): Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure* **4**, 1429-1439.
- Boissy G., O'Donohue M., Gaudemer O., Perez V., Pernollet J. C., Brunie S. (1999): The 2.1 angstrom structure of an interaction of cryptogein mutants with tobacco elicitor-ergosterol complex: A recent addition to the sterol carrier protein family, *Protein Science* **8**, 1191-1199.
- Boller T., Felix G. (2009): A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 379-406.
- Bourque S., Binet M.-N., Ponchet M., Pugin A., Lebrun-Garcia A. (1999): Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 34699-34705.
- Bourque S., Dutartre A., Hammoudi V., Blanc S., Dahan J., Jeandroz S., Pichereux C., Rossignol M., Wendehenne D. (2011): Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants. *New Phytologist* **192**, 127-139.
- Brisson L. F., Tenhaken R., Lamb C. (1994): Finction ox oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *The Plant Cell* **6**, 1703-1712.

- Brosch G., Georgieva E. I., López-Rodas G., Lindner H., Loidl P. (1992): Specificity of *Zea mays* histone deacetylase is regulated by phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 20561-20564.
- Brosch G., Goralik-Schramel M., Loidl P. (1996): Purification of histone deacetylase HD1-A of germinating maize embryos. *FEBS Letters* **393**, 287-291.
- Byth H.-A., Mchunu B. I., Dubery I. A., Bornman L. (2001): Assessment of a simple, non-toxic Alamar Blue cell survival assay to monitor tomato cell viability. *Phytochemical Analysis* **12**, 340-356.
- Cacas J.-L., Vailleau F., Davoine C., Ennar N., Agnel J.-P., Tronchet M., Ponchet M., Blein J.-P., Rony D., Triantaphylides C., Montillet J.-L. (2005): The combined action of 9 lipoxygenase and galactolipase sufficient to bring about programmed cell death during tobacco hypersensitive response. *Plant, Cell and Environment* **28**, 1367-1378.
- Cai R., Kwon P., Yan-Neale Y., Sambuccetti L., Fischer D., Cohen D. (2001): Mammalian histone deacetylase 1 protein is posttranslationally modified by phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **283**, 445-453.
- Chaki M., Shekariesfahlan A., Ageeva A., Mengel A., von Toerne C., Durner J., Lindermayr C. (2015): Identification of nuclear target proteins for S-nitrosylation in pathogen-treated *Arabidopsis thaliana* cell cultures. *Plant Science* **238**, 115-126.
- Chandler M. T., Tandeau de Marsac N., De Kouchkovsky, Y. (1972): Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspension. *Canadian Journal of Botany* **50**, 2265-2270.
- Chang J.-H., Olson M. O. J. (1990): Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 18227-18233.
- Chang L., Loranger S. S., Mizzen C., Ernst S. G., Allis C. D., Annunziato A. T. (1997): Histone in transit: Cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells. *Biochemistry* **36**, 469-480.
- Chen Z. J., Pickard C. S. (1997): Epigenetics silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes & Development* **11**, 2124-2136.
- Chen Z. J., Tian L. (2007): Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy. *Biochimica et Biophysica Acta* **1769**, 295-307.
- Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. (2008): The zinc finger network of plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 1150-1160.
- Cigliano R. A., Sanseverino W., Cremona G., Ercolano M. R., Conicella C., Consiglio F. M. (2013): Genome-wide analysis of histone modifiers in tomato: gaining an insight into their developmental roles. *BMC Genomics* **14**:57.
- Clemente S., Franco L., López-Rodas G. (2001): Distinct site specificity of two pea histone deacetylase complexes. *Biochemistry* **40**, 10671-10676.
- Colussi C., Mozzetta C., Gurtner A., Illi B., Rosati J., Straino S., Ragone G., Pescatori M., Zaccagnini G., Antonini A., Minetti G., Martelli F., Piaggio G., Gallinari P., Steinkuhler C., Clementi E., Dell'Aversana C., Altucci L., Mai A., Capogrossi M. C., Puri P. L., Gaetano C. (2008): HDAC2 blockade by nitric oxide and histone deacetylase inhibitors reveals a common target in Duchenne muscular dystrophy treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 19183-19187.
- Colville A., Alhattab R., Hu M., Labbé H., Xing T., Miki B. (2011): Role of HD2 genes in seed germination and early seedling growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* **30**, 1969-1979.
- Dahan J., Hammoudi V., Wendehenne D., Bourque S. (2011): Type 2 histone deacetylases play a major role in the control of elicitor-induced cell death in tobacco. *Plant, Signalling & Behavior* **6**, 1865-1867.
- Dangl M., Brosch G., Haas H., Loidl P., Lusser A. (2001): Comparative analysis of HD2 type histone deacetylases in higher plants. *Planta* **213**, 280-285.
- Das A., Park J. H., Hagen C. B. (1998): Distinct domains of a nucleolar protein mediate protein kinase binding, interaction with nucleic acids and nucleolar localization. *Journal of Cell Science* **111**, 2615-2623.

- David G., Neptune M. A., DePinho R. A. (2002): SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC) modulates its biological activities. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 23658-23663.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R. A., Lamb C. (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **39**, 585-589.
- Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb, C. (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 13454–13459.
- Demetriou K., Kapazoglou A., Tondelli A., Francia E., Stanca M. A., Bladenopoulos K., Tsafaris A. S. (2009): Epigenetic chromatin modifiers in barley: I. Cloning, mapping and expression analysis of the plant specific HD2, family of histone deacetylases from barley, during seed development and after hormonal treatment. *Physiologia Plantarum* **136**, 358-368.
- Devlin W. S., Gustine D. L. (1992): Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. *Plant Physiology* **3**, 1189-1195.
- Ding B., Bellizzi M. del R., Ning Y., Meyer B. C., Wang G. L. (2012): HDT701, a histone H4 deacetylase, negatively regulates plant innate immunity by modulating histone H4 acetylation of defense-related genes in rice. *The Plant Cell* **24**, 3783-3794.
- Eberharter A., Becker P. B. (2002): Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO Reports* **3**, 224-229.
- Fefeu S., Bouaziz S., Huet J.-C., Pernolet J.-C., Guittet E. (1997): Three-dimensional solution structure of β cryptogein, a β elicitor secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. *Protein Science* **6**, 2279-2284.
- Feng J., Jing F., Fang H., Gu L., Xu W. (2011): Expression, purification, and S-nitrosylation of recombinant deacetylase 8 in *Escherichia coli*. *BioScience Trends* **5**, 17-22.
- Foissner I., Wendehenne D., Langebartels C., Durner J. (2000): *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *The Plant Journal* **23**, 817–824.
- Fu W., Wu K., Duan J. (2007): Sequence and expression analysis of histone deacetylases in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **356**, 843-850.
- Gallinari P., Di Marco S., Jones P., Pallaoro M., Steinkühler C. (2007): HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Research* **17**, 195-211.
- Gallwitz D. (1971): Organ specificity of histone acetyltransferases. *FEBS LETTERS*, **13**, 306-308.
- Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A. (2006): Early signaling events induced by elicitors of plant defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 711-724.
- Garcia-Ramirez M., Rocchini C., Ausio J. (1995): Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 17923-17928.
- Gehring M., Choi Y., Fischer R. L. (2004): Imprinting and seed development. *Plant Cell* **16**, S203-S213.
- Georgieva E. I., López-Rodas G., Sendra R., Gröbner P., Loidl P. (1991): Histone Acetylation in *Zea mays* II: Biological significance of post-translational histone acetylation during embryo germination. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 18751-18760.
- Gonda D. K., Bachmair A., Wüning I., Tobias J.W., Lane W. S., Varshavsky A. (1989): Universality and structure of the N-end rule. *The Journal of Biological Chemistry* **264**, 16700-16712.
- Gooley P. R., Keizer D. W., Gayler K. R., Grant B. R. (1997): The solution structure of beta-cryptogein by NMR spectroscopy. *Plant Physiology* **114**, 1138-1138.
- Gooley P. R., Keniry M. A., Dimitrov R. A., Marsh D. E., Keizer D. W., Gayler K. R., Grant B. R. (1998): The NMR solution structure and characterization of pH dependent chemical shifts of the β -elicitor, cryptogein. *Journal of Biomolecular NMR* **12**, 523–534.
- Grabher A., Brosch G., Sendra R., Lechner T., Eberharter A., Georgieva E. I., López-Rodas G., Franco L., Dietrich H., Loidl P. (1994): Subcellular localization of enzymes involved in core histone acetylation. *Biochemistry* **33**, 14887-14895.

- Grafi G., Chalifa-Caspi V., Nagar T., Plaschkes I., Barak S., Ransbotyn V. (2011): Plant response to stress meets dedifferentiation. *Planta* **233**, 433–438.
- Grandperret V., Nicolas-Francès V., Wendehenne D., Bourque S. (2014): Type-II histone deacetylases: elusive plant nuclear signal transducers. *Plant, Cell and Environment* **37**, 1259 - 1269.
- Grøntved L., Bandle R., John S., Baek S., Chung H.-J., Liu Y., Aguilera G., Oberholtzer C., Hager G. L., Levens D. (2007): Rapid genome-scale mapping of chromatin accessibility in tissue. *Epigenetics & Chromatin* **5**:10.
- Grunstein M. (1997): Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-352.
- Gu W., Roeder R. G. (1997): Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595-606.
- Hahn M. G. (1996): Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 387-412.
- Hallows W. C., Lee S., Denu J. M. (2006): Sirtuins deacetylase and activate mammalian acetyl CoA synthetases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 10230-10235.
- Han Z., Yu H., Zhao Z., Hunter D., Luo X., Duan J., Tian L. (2016): AtHD2D gene plays a role in plant growth, development, and response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **7**, 310-310.
- He Y., Cai C., Tang D., Sun S., Li H. (2014): Effect of histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid on hair cell regeneration in zebrafish lateral line neuromasts. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **8**, UNSP 382.
- Himukai R., Kuzuhara T., Horikoshi M. (1999): Relationship between the subcellular localization and structures of catalytic domains of FKBP-type PPLases. *Journal of Biochemistry* **126**, 879-888.
- Hoerberichts F. A., Davoine C., Vandorpe M., Morsa S., Ksas B., Stassen C., Triantaphylidès, Breusegem F. V. (2013): Cryptogein-induced transcriptional reprogramming in tobacco is light dependent. *Plant Physiology* **163**, 263-275.
- Hollender C., Liu Z. (2008): Histone deacetylase genes in *Arabidopsis* development. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 875-885.
- Hook S. S., Orian A., Cowley S. M., Eisenman R. N. (2002): Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* **99**, 13425-13430.
- Hu Y., Qin F., Huang L., Sun Q., Li C., Zhao Y., Zhou D. X. (2009): Rice histone deacetylase genes display specific expression patterns and developmental functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **388**, 266-271.
- Huet J.-C., Le Caer J.-P., Nespoulous C., Pernollet J.-C. (1995): The relationships between the toxicity and the primary and secondary structures of elicitorlike protein elicitors secreted by the phytopathogenic fungus *Pythium vexans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**, 302-310.
- Imai A. I., Armstrong C. M., Kaeberlein M., Guarente L. (2000): Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795-800.
- Imhof A., Yang X.-J., Ogryzko V. V., Nakatani Y., Wolffe A. P., Ge H. (1997): Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Current Biology* **7**, 689-692.
- Isernia C., Bucci E., Leone M., Zaccaro L., Di Lello P., Digilio G., Esposito S., Saviano M., Di Blasio B., Pedone C., Pedone P. V., Fattorusso R. (2003): NMR structure of the single QALGGH zinc finger domain from the *Arabidopsis thaliana* SUPERMAN protein. *ChemBioChem* **4**, 171-180.
- Jadko S. I. (2012): Early increasing in content of reactive oxygen species and ascorbat peroxidase and catalase activities in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants under osmotic and oxidative stresses. *The Bulletin of kharkiv National agrarian University, Series Biology* **27**, 8-64.
- Jadko S. I. (2015): Histone deacetylase activity and reactive oxygen species content in the tissue culture of *Arabidopsis thaliana* under normal conditions and development of acute osmotic stress. *The Ukrainian Biochemical Journal* **87**, 57-62.

- Jaffrey S. R., Snyder S. H. (2001): The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **12**, PL1.
- Jeandroz S., Lamotte O., Astier J., Rasul S., Trapet P., Besson-Bard A., Bourque S., Nicolas-Frances V., Ma W., Berkowitz G. A., Wendehenne D. (2013): There's more to the picture than meets the eye: Nitric oxide cross talk with Ca²⁺ Signalling. *Plant Physiology* **163**, 459-470.
- Jenuwein T., Allis D. (2001): Translating the histone code. *EPIGENETICS* **293**, 1074-1078.
- Johnson C. A., Turner B. M. (1999): Histone deacetylases: complex transducers of nuclear signals. *Cell & Developmental Biology* **10**, 179-188.
- Kamoun S., Young M., Glascock C. B., Tyler B. M. (1993): Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: Host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**, 15-25.
- Kanno T., Kanno Y., Siegel R., Jang M. K., Lenardo M. J., Ozato K. (2004): Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Molecular Cell* **13**, 33-43.
- Keller H., Blein J.-P., Bonnet P., Ricci P. (1996): Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiology* **110**, 365-376.
- Kim Y. K., Kim S., Shin Y. J., Hur Y. S., Kim W. Y., Lee M. S., Cheon C., Verma D. P. S. (2014): Ribosomal protein S6, a target of rapamycin, is involved in the regulation of rRNA genes by possible epigenetic changes in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry* **289**, 3901-3912.
- Königshofer H., Tromballa H.-W., Löppert H.-G. (2008): Early events in signalling high-temperature stress in tobacco BY2 cells involve alternations in membrane fluidity and enhanced hydrogen peroxide production. *Plant, Cell and Environment* **31**, 1771-1780.
- Kouzarides (2007): Chromatin modification and their function. *Cell* **128**, 693-705.
- Krasteva S., Heiss E., Krenn L. (2011): Optimization and application of a fluorimetric assay for the identification of histone deacetylase inhibitors from plant origin. *Pharmaceutical Biology* **49**, 658-668.
- Kuang J., Chen J., Luo M., Wu K., Sun W., Jiang Y., Lu W. (2012): Histone deacetylase HD2 interacts with ERF1 and is involved in longan fruit senescence. *Journal of Experimental Botany* **63**, 441-454.
- Kulík A., Noirot E., Grandperret V., Bourque S., Fromentin J., Salloignon P., Truntzer C., Dobrowolska G., Simon-Plas F., Wendehenne D. (2015): Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogin signalling. *Plant, Cell & Environment* **38**, 331-348.
- Lagacé M., Chantha S. C., Major G., Matton D. P. (2003): Fertilization induces strong accumulation of a histone deacetylase (HD2) and of other chromatin-remodelling proteins in restricted areas of the ovules. *Plant Molecular Biology* **53**, 759-769.
- Lapeyre B., Bourbon H., Amalric F. (1987): Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: An unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* **84**, 1472-1476.
- Lawrence R. J., Earley K., Pontes O., Silva M., Chen Z. J., Neves N., Viegas W., Pickard C. S. (2004): A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Molecular Cell* **13**, 599-609.
- Lebrun-Garcia A., Ouaked F., Chiltz A., Pugin A. (1998): Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *The Plant Journal*, **15**, 773-781.
- Lebrun-Garcia A., Chiltz A., Gout E., Bligny R., Pugin A. (2001): Questioning the role of salicylic acid and cytosolic acidification in mitogen-activated protein kinase activation induced by cryptogin in tobacco cells. *Planta* **214**, 792-797.
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C. (1994): H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583-593.
- Lherminier J., Elmayan T., Fromentin J., Elaraqui K. T., Vesa S., Morel J., Verrier J. L., Cailleteau B., Blein J. P., Simon-Plas F. (2009): NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production: subcellular localization and reassessment of its role in plant defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 868-881.
- Li Y., Butenko Y., Grafi G. (2005): Histone deacetylation is required for progression through mitosis in tobacco cells. *The Plant Journal* **41**, 346-352.

- Li C., Huang L., Xu C., Zhao Y., Zhou D.-X. (2011): Altered levels of histone deacetylase OsHDT1 affect differential gene expression patterns in hybrid rice. *PLOS ONE* **6**, e21789.
- Li H., Soriano M., Cordewener J., Muiño J. M., Riksen T., Fukuoka H., Angenent G. C., Boutilier K. (2014): The histone deacetylase inhibitor trichostatin A promotes totipotency in the male gametophyte. *Plant Cell* **26**, 195-209.
- Liao Q., Chiu N. H. L., Shen C., Chen Y., Vouros P. (2007): Investigation of enzymatic behavior of benzonase/alkaline phosphatase in the digestion of oligonucleotides and DNA by ESI-LS/MS. *Analytical Chemistry* **79**, 1907-1917.
- Litchfield D. W. (2003): Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochemical Journal* **369**, 1-15.
- Liu L., Scolnick D. M., Trievel R. C., Zhang H.B., Marmorstein R., Halazonetis T. D., Berger S. L. (1999): p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 1202-1209.
- Liu X., Yang S., Zhao M., Luo M., Yu C. Y., Tai R., Wu K. (2014): Transcriptional repression by histone deacetylases in plants. *Molecular Plant* **7**, 764-772.
- Lochman J., Kašparovský T., Osman H., Marais A., Chaloupková R., Ponchet M., Blein J.-P., Mikeš V. (2005): Construction of cryptogein mutants, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora*, with altered abilities to induce a defense reaction in tobacco cells. *Biochemistry* **44**, 6565-6572.
- López-Rodas G., Georgieva E. I., Sendra R., Loidl P. (1991): Histone acetylation in *Zea mays* I: Activities of histone acetyltransferases and histone deacetylases. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 18745-18750.
- Luo M., Wang Y. Y., Liu X., Yang S., Lu Q., Cui Y., Wu K. (2012): HD2C interacts with HDA6 and is involved in ABA and salt stress response in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3297-3306.
- Lusser A., Brosch G., Loidl A., Haas H., Loidl P. (1997): Identification of maize histone deacetylase HD2 as an acidic nucleolar phosphoprotein. *Science* **277**, 88-91.
- Ma X., Lv S., Zhang C., Yang C. (2013): Histone deacetylases and their functions in plants. *Plant Cell Reports* **32**, 465-478.
- Mackay J. P., Crossley M. (1998): Zinc fingers are sticking together. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 1-4.
- Melmaiee K., Kalavacharla V. K., Brown A., Todd A., Thurston Y., Elavarthi S. (2015): Quantification and gene expression analysis of histone deacetylases in common bean during rust fungal inoculation. *International Journal of Genomics* **2015**:153243.
- Mengel A., Chaki M., Shekariesfahlan A., Lindermayr C. (2013): Effect of nitric oxide on gene transcription – S-nitrosylation of nuclear proteins. *Frontiers in Plant Science* **4**:293.
- Mikes V., Milat M.-L., Ponchet M., Picci P., Bein J.-P. (1997): The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Letters* **416**, 190-192.
- Mikes V., Milat M.-L., Ponchet M., Panabières F., Ricci P., Blein J.-P. (1998): Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol Carrar proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **245**, 133-139.
- Milat, M. L., Ricci, P., Bonnet, P., Blein, J.- P. (1991) Capsidiol and ethylene production by tobacco cells in response to cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*, *Phytochemistry* **30**, 2171-2173.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F. V. (2004): Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**, 490-498.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V. B., Vandepoele, Gollery M., Shulaev V., Breusegem F. V. (2011): ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* **16**, 300-309.
- Montillet J.-L., Chamnongpol S., Rustérucchi C., Dat J., van de Cotte B., Agnel J.-P., Battesti C., Inzé F., Breusegem F. V., Triantaphylidès C. (2005): Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology* **138**, 1516-1526.
- Nelson C. J., Santos-Rosa H., Kouzarides T. (2006): Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell* **126**, 905-916.

- Nott A., Watson P. M., Robinson J. D., Crepaldi L., Riccio A. (2008): S-nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons. *Nature* **455**, 411-416.
- O'donohue M. J., Gousseau H., Huet J. C., Tepfer D., Pernollet J. C. (1995): Chemical synthesis, expression and mutagenesis of a gene encoding beta-cryptogein, an elicitor produced by *Phytophthora cryptogea*, *Plant Molecular Biology* **27**, 577-586.
- Ondřej V., Kitner M., Doležalová I., Nadvorník P., Navrátilová B., Lebeda A. (2009): Chromatin structural rearrangement during dedifferentiation of protoplasts of *Cucumis sativus* L.. *Molecules and Cells* **27**, 443-447.
- Osman H., Mikes V., Milat V. L., Ponchet M., Marion D., Prangé T., Maume B. F., Vauthrin S., Blein J.-P. (2001) Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols. *FEBS letters* **489**, 55-58.
- Palmieri M. C., Sell S., Huang X., Scherf M., Werner T., Durner J., Lindermayr C. (2008): Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach. *Journal of Experimental Botany* **59**, 177-186.
- Pandey R., Müller A., Napoli C. A., Selinger D. A., Pikaard C. S., Richards E. J., Bender J., Mount D. W., Jorgensen R. A. (2002): Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Research* **30**, 5036-5055.
- Papadakis A. K., Roubelakis-Angelakis K. A. (2002): Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplasts. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 549-559.
- Perchepped L., Balagué C., Riou C., Claudel-Renard C., Rivière N., Grezes-Besset B., Roby D. (2010): Nitric oxide participates in the complex interplay of defense-related signalling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 846-870.
- Pernollet J. C., Sallantin M., Salle-Tourne M., Huet J. C. (1993): Elicitor isoforms from seven *Phytophthora* species: comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **42**, 53-67.
- Perrot S., Dutertre-Catella H., Martin C., Rat P., Warnet J.-M. (2003): Resazurin metabolism assay is a new sensitive alternative test in isolated pig cornea. *Toxicological Sciences* **72**, 122-129.
- Petrovská B., Jeřábková H., Chamrád I., Vrána J., Lenobel R., Uřínovská J., Šebela M., Doležel J. (2014): Proteomic analysis of barley cell nuclei purified by flow sorting. *Cytogenetic and Genome Research* **143**, 78-86.
- Pontes O., Lawrence R. J., Silva M., Preuss S., Costa-Nunes P., Earley K., Neves N., Viegas W., Pikaard C. S. (2007): Postembryonic establishment of megabase-scale gene silencing in nucleolar dominance. *PLOS ONE* **11**, e1157.
- Pugin A., Frachisse J.-M., Tavernier E., Bligny R., Gout E., Douce R., Guern J. (1997): Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: Involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *The Plant Cell* **9**, 2077-2091.
- Qiu Y., Zhao Y., Becker M., John S., Parekh B. S., Huang S., Hendarwanto A., Martinez E. D., Chen Y., Lu H., Adkins N. L., Stavreva D. A., Wiench M., Georgel P. T., Schiltz R. L., Hager G. L. (2006): HDAC1 acetylation is linked to progressive modulation of steroid receptor-induced gene transcription. *Molecular Cell* **22**, 669-679.
- Repetto G., del Peso A., Zurita J. L. (2008): Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* **3**, 1125-1131.
- Ricci P., Bonnet P., Huet J.-C., Sallantin M., Beauvais - Cante F., Bruneteau M., Billard V., Michel G., Pernollet J.-C. (1989): Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *European Journal of Biochemistry* **183**, 55-583.
- Schatten G., Simerly C., Asai D. J., Szöke E., Cooke P., Schatten H. (1988): Acetylated alpha-tubulin in microtubules during mouse fertilization and early development. *Developmental Biology* **130**, 74-86.
- Schoupe D., Ghesquière B., Menschaert G., De Vos W. H., Bourque S., Trooskens G., Proost P., Gevaert K., Van Damme E. J. M. (2011): Interaction of the tobacco lectin with histone proteins. *Plant Physiology* **155**, 1091-1102.

- Sendra R., Rodrigo I., Salvador M. L., Franco L. (1988): Characterization of pea histone deacetylases. *Plant Molecular Biology* **11**, 857-866.
- Serrano I., Romero-Puertas M. C., Serrano M. R., Sandalio L. M., Olmedilla A. (2012): Role of peroxynitrite in programmed cell death induced in self-incompatible pollen. *Plant, Signalling & Behavior* **7**, 779-781.
- Shi L., Tu B. P. (2015): Acetyl-CoA and regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Current Opinion in Cell Biology* **33**, 125-131.
- Song F., Goodman R. M. (2001): Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 1458-1462.
- Sridha S., Wu K. (2006): Identification of *AtHD2C* as a novel regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **46**, 124-133.
- Srivastava N., Gonugunta V. K., Puli M. R., Raghavendra A. S. (2009): Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *Planta* **229**, 757-765.
- Sturner R., Vidali G., Allfrey V. G. (1981): Studies of acetylation and deacetylation in high mobility group proteins: Identification of sites of acetylation in HMG-1. *The Journal of Biological Chemistry* **254**, 11577-11583.
- Sun S., Han Y., Liu J., Fang Y., Tian Y., Zhou J., Ma D., Wu P. (2014): Trichostatin A targets the mitochondrial respiratory chain, increasing mitochondrial reactive oxygen species production to trigger apoptosis in human breast cancer cells. *PLOS ONE* **9**, e91610.
- Suty, L., Blein, J. P., Ricci, P., Pugin, A. (1995) Early changes in gene expression in tobacco cells elicited with cryptogein, *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**, 644-651.
- Tai H. H., Tai G. C. C., Beardmore T. (2005): Dynamic histone acetylation of late embryonic genes during seed germination. *Plant Molecular Biology* **59**, 909-925.
- Takatsuji H. (1998): Zinc-finger transcription factors in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**, 582-596.
- Tatemichi M., Hata H., Nakadate T. (2011): Ectopic expression of activation-induced cytidine deaminase caused by epigenetic modification. *Oncology Reports* **25**, 153-158.
- Tavernier E., Stallaert V., Blein J.-P., Pugin A. (1995a): Changes in lipid composition in tobacco cells treated with cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Plant Science* **104**, 117-125.
- Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J.-P., Pugin, A. (1995b): Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells, *Plant Physiology*, **109** 1025-1031.
- Thiagalingam S., Cheng K.-H., Lee H. J., Mineva N., Thiagalingam A., Ponte J. F. (2003): Histone deacetylases: Unique players in shaping the epigenetic histone code. *Annals of the New York Academy of Sciences* **983**, 84-100.
- Tian L., Chen Z. J. (2001): Blocking histone deacetylation in *Arabidopsis* induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 201-205.
- Trimbur G. M., Goeckeler J. L., Brodsky J. L., Walsh C. J. (1999): Cloning, sequencing, and nucleolar targeting of the basal-body-binding nucleolar protein BN46/51. *Journal of Cell Science* **112**, 1159-1168.
- Turner B. M. (2000): Histone acetylation and epigenetic code. *BioEssays* **22**, 836-845.
- Ueno Y., Ishikawa T., Watanabe K., Terakura S., Iwakawa H., Okada K., Machida C., Machida Y. (2007): Histone deacetylases and ASYMMETRIC LEAVES2 are involved in the establishment of polarity in leaves of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 445-457.
- Viard, M. P., Martin, F., Pugin, A., Ricci, P., Blein, J.-P. (1994): Protein-phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein, *Plant Physiology* **104**, 1245-1249.
- Wang Z., Cao H., Chen F., Liu Y. (2014): The roles of histone acetylation in seed performance and plant development. *Plant Physiology and Biochemistry* **84**, 125-133.
- Weinberg R. A. (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.

- Wegener D., Hildmann C., Riester D., Schwienhorst A. (2003): Improved fluorogenic histone deacetylase assay for high-throughput-screening applications. *Analytical Biochemistry* **321**, 202-208.
- Wu K., Tian L., Malik K., Brown D., Miki B. (2000): Functional analysis of a HD2 histone deacetylase homologue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **22**, 19-27.
- Wu K., Tian L., Zhou C., Brown D., Miki B. (2003): Repression of gene expression by *Arabidopsis* HD2 histone deacetylases. *The Plant Journal* **34**, 241-247.
- Wu K., Zhang L., Zhou C., Yu C. W., Chaikam V. (2008): HDA6 is required for jasmonate response, senescence and flowering in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **59**, 225-234.
- Wu F.-H., Shen S.-C., Lee L.-Y., Lee S.-H., Chan M.-T., Lin C.-S. (2009): Tape –*Arabidopsis* Sandwich – a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. *Plant Methods* **5**:16.
- Xu C. R., Liu C., Wang Y. L., Li L. C., Chen W. Q., Xu Z. H., Bai S. N. (2005): Histone acetylation affects expression of cellular patterning genes in the *Arabidopsis* root epidermis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 14469-14474.
- Yano R., Takebayashi Y., Nambara E., Kamiya Y., Seo M. (2013): Combining association mapping and transcriptomics identify HD2B histone deacetylase as a genetic factor associated with seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **74**, 815-828.
- Yoshida M., Kijima M., Akita M., Beppu T. (1990): Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 17174-17179.
- Yu L. M. (1995): Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* **92**, 4088–4094.
- Zhao J., Morozova N., Williams L., Libs L., Avivi Y., Graft G. (2001): Two phases of chromatin decondensation during dedifferentiation of plant cells. Distinction between competence for cell fate switch and a commitment for S phase. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 22772–22778.
- Zhao J., Zhang J., Zhang W., Wu K., Zheng F., Tian L., Liu X., Duan J. (2014): Expression and functional analysis of the plant-specific histone deacetylase HDT701 in rice. *Frontiers in Plant Science* **5**:764.
- Zhao L., Lu J., Zhang J., Wu P. Y., Yang S., Wu K. (2015): Identification and characterization of histone deacetylases in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Frontiers in Plant Science* **5**, 1-9.
- Zhou C., Labbe H., Sridha S., Wang L., Tian L., Latoszek-Green M., Yang Z., Brown D., Miki B., Wu K. (2004): Expression and function of HD2-type histone deacetylases in *Arabidopsis* development. *The Plant Journal* **38**, 715-724.
- Zhou C., Zhang L., Duan J., Miki B., Wu K. (2005): HISTONE DEACETYLASE19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**, 1196-1204.
- Zimmerman M., Ashe B., Yurewicz E. C., Patel G. (1977): Sensitive assays for trypsin, elastase, and chymotrypsin using new fluorogenic substrates. *Analytical Biochemistry* **78**, 47-51.

8 Seznam použitých zkratk

2,4 D	kyselina dichlorfenoxyoctová
AA/BIS	akrylamid- <i>N,N</i> -bisakrylamid
Ab	protilátka
AB	AlamarBlue, resazurin
ABI1, ABI2	ABA-závislé geny
ABA	kyselina abscisová
AG	AGAMOUS; transkripční faktor
AGL19	AGAMOUS-LIKE 19; transkripční faktor
AMC	7-amino-4-methylkumarin
AP	alkalická fosfatasa
APS	persíran amonný
AS1, AS2	„asymmetric leaves“ geny
Avr	faktor avirulence
B23	jaderný protein
BiFC	bimolekulární fluorescenční komplementární přístup
biotin-HPDP	(3a <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,6a <i>R</i>)-hexahydro-2-oxo- <i>N</i> -[6-[1-oxo-3-(2-pyridinyldithio propyl)]amino]hexyl]-1 <i>H</i> -thieno[3,4 <i>d</i>]imidazole-4-pentanamid
BSA	hovězí sérový albumin
CAB2	chlorofyl A/B-vazebný protein 2
cADPR	cyklická ADP-ribosa
CK2 α	kaseinkinasa 2 α
CW	Calcofluor White
DAMP	molekulární vzory spojené s poškozením
DIERF1	ethylen-odpovědný faktor
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
EF2	transkripční faktor
EPF	transkripční faktor
ETI	imunita vyvolaná efektory
FDA	fluorescein diacetát
FKBP46	zástupce peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerasy
FLC	„flowering locus C“; gen zodpovědný za jarovizaci
FUS3	FUSCA3; transkripční faktor
Ga2ox2	giberelin-2- β -dioxxygenasa
GCN5	zástupce histonacetyltransferasy
GSH	glutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
HAC1	transkripční regulátor
HAM1,2	zástupci histonacetyltransferas

HAT	histonacetyltransferasa
Hd1	„heading date 1“ represory
HD2	histondeacetylasa typu HD-tuinů
HDAC	histondeacetylasa
HMG	„high mobility group“ proteiny
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HR	hypersenzitivní reakce
HRP	křenová peroxidasa
HXK1	hexokinasa 1
IP ₃	inositoltrifosfát
JA	jasmonová kyselina
LEA	„late embryogenesis abundant“ proteiny
LEC1	LEAFY COTYLEDON1, regulátor embryogeneze
MAF3/4/5	MADS AFFECTING FLOWERING; represory kvetení
MAMP	molekulární vzory spojené s mikroby
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa
MMTS	methylmethanthiosulfonát
MS	hmotnostní spektrometrie
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NB-LRRs	oblast vázající nukleotidy obsahující sekvenci bohatou na leucin
NBT/BCIP	nitroterazolium Blue chlorid ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátem
NČ	neutrální červeň
NLS	jaderný lokalizační signál
Nopp44/46	jaderný protein
NOR	organizátor jadérka
NtCDC 48	protein zapojený v buněčném cyklu
NtOSAK	proteinkinasa tabáku
NtRBOHD	NADPHoxidasa
p53	transkripční faktor
PAMP	molekulární vzory asociované s patogeny
PEG	polyethylenglykol
PK	proteinkinasa
pNA	p-nitroanilin
PP	proteinfosfatasa
PPIasa	peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerasa
PR	s patogenezi spojené proteiny
PRR	rostlinné receptory „pattern recognition receptors“
PTI	imunita aktivovaná tzv. molekulár. vzory asociovanými s patogeny
PVDF	polyvinylidenfluorid

RBSC-1A	lehký řetězec ribulosabisfosátkarboxylasy
RFU	relativní jednotka fluorescence
RLKs	receptory spřažené s kinasou
RLPs	receptorové proteiny
RNAi	RNA interference
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPD3	rodina histondeacetylas (Reduced Potassium Dependency 3)
RPS6	protein ribosomální podjednotky 40S
SA	salicylová kyselina
SAR	systemově získaná resistance
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS
SIPK	proteinkinasa aktivovaná kyselinou salicylovou
SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin
SNP	nitroprussid sodný
SIR2	sirtuiny (Silent Information Regulator 2)
SOD	superoxiddismutasa
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethylendiamin
TFIIIA	typ zinkového prstu
TFIIE, TFIIF	transkripční faktory
TOR	serin/threonin proteinkinasa
TSA	trichostatin A
WIPK	proteinkinasa aktivovaná poraněním
WT	wild type
WUS	WUSCHEL; gen potřebný pro vývoj výhonků a květů