

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Histondeacetylasy – úloha v obraně rostlin
při napadení patogenem**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Martina Janků
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok:	2014

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské 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 15.5.2014

Martina Janků

Děkuji svému vedoucímu práce doc. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za odborné vedení, cenné rady, konzultace a poskytnutí literárních podkladů pro zpracování literární i experimentální části bakalářské práce.

Dále děkuji Mgr. Tereze Tiché za ochotu, všestrannou pomoc a rady při zpracovávání experimentální části.

Také bych ráda poděkovala kolektivu Katedry biochemie za jejich vstřícnost a cenné rady při experimentální části práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Martina Janků
Název práce	Histondeacetylasy – úloha v obraně rostlin při napadení patogenem
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2014

Abstrakt

Bakalářská práce je v teoretické části zaměřena na charakterizaci skupiny enzymů histondeacetylasy (HDAC), která je zapojena do několika klíčových procesů v buňce. V úvodu práce jsou nejprve zmíněny modifikace histonů mající vliv na epigenetickou regulaci. Následující kapitoly se zabývají živočišnými a rostlinnými HDAC. U rostlinných HDAC je navíc věnována pozornost úloze HDAC v odpovědi rostlin na stresové podmínky. V poslední části jsou shrnuty metody pro stanovení aktivity a množství HDAC v biologických systémech a pro stanovení jejich kovalentních modifikací.

V experimentální části práce byla zaváděna fluorimetrická analýza pro stanovení aktivity HDAC v rostlinných extraktech. Jako pozitivní kontrola sloužil rekombinantní protein lidské HDAC2. Modelovými rostlinami byly *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Columbia*, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun a *Solanum habrochaites*. Po optimalizaci podmínek metody byl sledován vliv stáří rostliny a působení NO na aktivitu histondeacetylasy. Pro detekci HDAC v rostlinných extraktech byly optimalizovány podmínky metody Western blot.

Klíčová slova	Histondeacetylasy, chromatin, epigenetika, HD-tuiny, sirtuiny, stanovení aktivity HDAC, S-nitrosylace
Počet stran	94
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Martina Janků
Title	Histone deacetylases – the role in plant defense to pathogen attack
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2014

Abstract

In the theoretical part, the thesis is focused on the characterization of a group of histone deacetylases enzymes (HDACs) which is involved in several critical processes in the cell. At the beginning of the work there are histone modifications mentioned, especially acetylation and deacetylation that influence epigenetic regulation. Next chapters deal with mammalian and plant HDACs. In the chapter about plant HDACs, roles of HDAC in plant responses to stress conditions are reviewed. The last part is focused on the methods of measuring HDAC amount and activity in biological systems and also their covalent modifications.

In the experimental part of the thesis, the fluorimetric assay for measurement of HDAC activity in plant extracts was introduced. The recombinant protein of human HDAC2 was used as a positive control. *Arabidopsis thaliana* ecotype *Columbia*, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun and *Solanum habrochaites* were utilised as plant models. After the optimization of the conditions of the method, the role of the plant age and the effects of NO on HDAC activity were tested. For the detection of HDAC protein in plant extracts, the conditions for the Western blot method were optimized.

Keywords	Histone deacetylases, chromatin, epigenetics, HD-tuins, sirtuins, HDAC activity assay, S-nitrosylation
Number of pages	94
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 Úvod	1
2 Současný stav řešené problematiky	2
2.1 Vliv modifikace chromatinu na přenos genetické informace	2
2.1.1 Struktura a modifikace chromatinu	2
2.1.2 Histony a jejich posttranslační modifikace	3
2.1.3 Histonový kód	4
2.1.4 Význam modifikace chromatinu u rostlin	4
2.1.4.1 Přenos epigenetické informace	4
2.2. Acetylace a deacetylace histonů	5
2.2.1 Histonacetyltransferasy	6
2.2.2 Histondeacetylasy	7
2.2.3 Acetylace, deacetylace a aktivita genů	7
2.3 Živočišné histondeacetylasy	8
2.3.1 Fylogeneze savčích histondeacetylasy	9
2.3.1.1 Histondeacetylasy rodiny RPD3/HDA1	9
2.3.1.2 Histondeacetylasy rodiny SIR2	10
2.3.2 Substráty a mechanismy reakce HDAC	12
2.3.2.1 Reakční mechanismus „klasických“ HDAC	12
2.3.2.2 Reakční mechanismus sirtuinů	13
2.3.2.3 Substráty HDAC	14
2.3.3 Regulace aktivity HDAC <i>in vivo</i>	14
2.3.3.1 NO a S-nitrosylace	15
2.3.4 Inhibice HDAC	16
2.4 Rostlinné HDAC	17
2.4.1 Fylogeneze rostlinných HDAC	17
2.4.1.1 Rodina RPD3/HDA1	18
2.4.1.2 HD-tuiny	19
2.4.1.3 Sirtuiny	20
2.4.2 Substráty rostlinných HDAC	20
2.4.3 Inhibitory rostlinných HDAC	22
2.4.3 Regulace aktivity rostlinných HDAC <i>in vivo</i>	22
2.3.4 Úloha HDAC v obraně rostlin	22
2.5 Přehled metodik pro stanovení aktivity histondeacetylasy	24
2.5.1 Radiografické metody	24
2.5.2 Spektrofotometrické metody	25
2.5.3 Fluorimetrické metody	26

2.5.5 Luminiscenční metody	28
2.5.4 Metoda Western Blot	29
2.5.6 HPLC	29
2.5.7 Stanovení posttranslačních modifikací	30
2.5.7.1 Stanovení fosforylace	30
2.5.7.2 Stanovení S-nitrosylace	30
3 Experimentální část	34
3.1 Materiál a přístroje	34
3.1.1 Chemikálie	34
3.1.2 Přístroje a experimentální vybavení	34
3.1.3 Rostlinný materiál	35
3.1.3.1 Pěstování rostlin ve skleníku	35
3.1.3.2 Pěstování rostlin <i>in vitro</i>	36
3.2 Použité metody	37
3.2.1 Fluorimetrické stanovení aktivity HDAC	37
3.2.1.1 Jednokroková metoda stanovení aktivity HDAC	38
3.2.2.2 Dvoukroková metoda stanovení aktivity HDAC	38
3.2.1.3 Měření aktivity komerční lidské HDAC-2	39
3.2.1.4 Měření aktivity HDAC v rostlinných extraktech	39
3.2.2 Vliv NO na aktivitu HDAC	40
3.2.3 Stanovení obsahu proteinů metodou Bradfordové	41
3.2.4 SDS-PAGE	41
3.2.5 Western blot	43
4 Výsledky a diskuse	46
4.1 Stanovení aktivity HDAC	46
4.1.1 Fluorimetrické stanovení aktivity HDAC jedнокrokovou metodou	46
4.1.2 Fluorimetrické stanovení aktivity dvoukrokovou metodou	47
4.1.3 Měření aktivity HDAC2 na destičce Take 3	50
4.1.4 Zhášení fluorescence	51
4.1.5 Měření aktivity rostlinných HDAC na Take 3 destičce	54
4.1.6 Vliv NO na HDAC	54
4.2 Analýza proteinů metodou SDS-PAGE	56
4.3 Detekce HDAC metodou Western blot	57
4.3.1 Optimalizace podmínek – výběr membrány, doby inkubace s primární protilátkou a výběr sekundární protilátky	57
4.3.2 Testování specifčnosti primární protilátky s extrakty listů <i>Solanum habrochaites</i>	61

4.3.3 Optimalizace podmínek pro detekci tabáku	64
4.3.4 Testování křížové reaktivity primárních protilátek proti lidské HDAC2 a HDT3 z <i>A. thaliana</i>	64
5 Závěr	67
6 Literatura	68
7 Seznam použitých zkratek	85

CÍLE PRÁCE

V teoretické části bylo cílem zpracovat literární rešerši:

- zabývající se vlastnostmi a funkcemi histondeacetylas (HDAC) v epigenetické regulaci
- shrnující známé poznatky o živočišných a rostlinných HDAC; u rostlinných se zaměřením na zapojení HDAC v obraně rostlin za stresových podmínek
- shrnující metody pro stanovení množství a aktivity HDAC včetně jejich kovalentních modifikací (fosforylace a S-nitrosylace).

V experimentální části bylo cílem:

- zavedení metody fluorimetrické analýzy pro stanovení aktivity HDAC v rostlinných extraktech a její aplikace na modelový systém
- optimalizace podmínek metody Western blot pro detekci HDAC v rostlinných extraktech.

1 Úvod

Histondeacetylasy (HDAC) jsou enzymy, které zprostředkovávají deacetylaci histonů. Jejich acetylace katalyzovaná histonacetyltransferasami (HAT) je tedy dynamický reversibilní proces. Dochází tak k regulaci acetylačního stavu chromatinu, který má dopad na jeho strukturu a následně i funkce. Jedná se především o regulaci transkripce genů. Acetylace histonů je obecně spojována s její aktivací (Allfrey *et al.*, 1964), deacetylace histonů naopak s její represí a umlčováním genů (Probst *et al.*, 2004). Tím dochází ke kontrole mnoha buněčných procesů. Studie zabývající se rostlinnými HDAC prokazují, že histondeacetylasy jsou zapojeny do regulace růstu rostlin, jejich vývoje (Wu *et al.*, 2008) a odpovědí na stresové podmínky (Bourque *et al.*, 2011).

HDAC se také účastní regulace buněčného cyklu (Zhang *et al.*, 2000). Z tohoto důvodu jsou častým předmětem studií zabývajících se např. lidským onemocněním, především rakovinou. Inhibitory HDAC jsou velmi intenzivně zkoumány jako možná antiproliferační léčiva (Martínez-Iglesias *et al.*, 2008).

U savčích buněk bylo mimo jiné popsáno ovlivnění HDAC prostřednictvím S-nitrosylace (Nott *et al.*, 2008). S-nitrosylace může obecně regulovat funkce proteinů více než jedním způsobem. Nitrosylace kritických cysteinových zbytků může např. ovlivnit jejich enzymovou aktivitu (Whalen *et al.*, 2007) nebo může indukovat konformační změny, které následně ovlivňují interakci nitrosylovaných proteinů s jejich vazebnými partnery. Příkladem je S-nitrosylace HDAC2 neuronů. Uskutečňuje se na Cys 262 a Cys 274, přičemž neafektuje deacetylaseovou aktivitu, ale indukuje rozvolnění struktury chromatinu, čímž narůstá acetylace histonů (Nott *et al.*, 2008).

S-nitrosylace je velmi zkoumanou modifikací také u rostlin. Oxid dusnatý, jako signální molekula, je klíčovým regulátorem zapojeným do několika zásadních procesů u rostlin, včetně odolnosti rostliny vůči onemocnění (Delledonne *et al.*, 1998). Studium S-nitrosylace u HDAC má tedy značný význam vzhledem k důležitosti samotných enzymů HDAC, stejně tak jako oxidu dusnatého, pro regulaci mnoha buněčných procesů u rostlin.

2 Současný stav řešené problematiky

Centrálním dogmatem molekulární biologie je skutečnost, že genetická informace zakódovaná jako sekvence nukleotidů v DNA je přenášena z generace na generaci procesy replikace, transkripce a translace. Kromě tohoto základního přenosu genetické informace a výjimky, kterou tvoří reversní transkriptasa (Temin a Mizutani, 1970; Baltimore, 1970), existuje epigenetický přenos genetické informace. Termín epigenetika poprvé použil Conrad Waddington pro studium „náhodných mechanismů“, kterými „geny genotypu umožňují projevy fenotypu“ (Allis *et al.*, 2007a).

Epigenetické změny jsou v posledních letech častým předmětem zkoumání z důvodu jejich zásadní role ve vývoji organismů a během jejich onemocnění. Současně je epigenetika definována jako "studium mitoticky a/nebo meioticky dědičných změn, jako je stav exprese genů, které nelze vysvětlit změnami v sekvenci DNA“ (Allis *et al.*, 2007b). Jedná se o změny v projevu fenotypu, které jsou spíše přepínány mezi jednotlivými stavy („on-off“), než o odstupňované reakce. Navíc daná změna musí být dědičná, i když původní podmínky, které přepnutí mezi danými stavy způsobily, zmizí (Allis *et al.*, 2007a).

2.1 Vliv modifikace chromatinu na přenos genetické informace

Většina somatických buněk mnohobuněčného organismu je geneticky identická, ale funkce a exprese jejich genů se tedy v důsledku epigenetických změn může výrazně lišit. Základem je přestavba chromatinu, která mění přístupnost DNA. Otevřený stav chromatinu umožňuje transkripci, zatímco pro kompaktní stav platí, že dostupnost DNA pro transkripční faktory a další proteiny je snižována (Fransz a de Jong, 2002).

2.1.1 Struktura a modifikace chromatinu

Chromatin je vysoce organizovaná struktura, skládající se z nukleosomů. V každém nukleosomu jsou čtyři jaderné histony, H2A, H2B, H3 a H4, které jsou uspořádány do oktamerů, které obsahují vždy po dvou kopiích těchto jaderných proteinů. Konkrétně tetramer H3-H4 a dva dimery H2A-H2B. Přibližně 146 párů bazí DNA je obtočeno kolem každého nukleosomu a dalších asi 80 párů bazí spojuje sousední nukleosomy spolu s pomocným internukleosomálním H1 histonem. Toto základní uspořádání

chromatinu, které společně tvoří strukturu někdy označovanou jako „korálky na šňůrce“, je dále organizováno do vyšších konformací (Allis *et al.*, 2007c).

Struktura chromatinu, mající dopad na další procesy, jako jsou například regulace transkripce a umlčování genů, může být měněna třemi způsoby. Prvním z nich jsou kovalentní modifikace histonů, které se primárně uskutečňují na aminokyselinách N-terminálních konců histonů (Allfrey *et al.*, 1964). Dále mohou být modifikace histonů, jak na koncových doménách, tak na globulární jaderné doméně (Cosgrove *et al.*, 2004), cíleny na ATP závislé remodelační komplexy. ATPasy účastníci se přestavby chromatinu využívají energii získanou z hydrolyzy ATP ke strukturálním a kompozičním změnám nukleosomu (Narlikar *et al.*, 2002). Mění se tak jeho kontakt s DNA, což má za následek opakování, kroucení a klouzání nukleosomů. Pro tento nekovalentní mechanismus bylo prokázáno, že je kriticky důležitý pro procesy spojené s regulací genů (Narlikar *et al.*, 2002). Třetím způsobem je methylace cytosinových bazí DNA mající dopad na vazbu některých dalších proteinů včetně transkripčních faktorů (Watt a Molloy, 1988).

2.1.2 Histony a jejich posttranslační modifikace

Histony jsou integrální a dynamické struktury podílející se nejen na regulaci transkripce genů, ale ovlivňují i další procesy spojené s DNA, jako jsou replikace, oprava DNA, rekombinace a segregace chromosomů. Navíc jsou objektem pro různé posttranslační modifikace - zahrnující acetylace a deacetylace, methylace, fosforylace a ubikvitinylace (Strahl a Allis, 2000).

Každý jaderný histon má dvě domény - sbalenou histonovou doménu, která je zapojena do interakcí histon-histon a umožňuje skládání DNA uvnitř nukleosomů (Luger *et al.*, 1997) a doménu vyčnívající ven z nukleosomu, kde může interagovat s dalšími regulačními proteiny. Ta tvoří asi 28 % hmoty jaderných histonů, je vysoce evolučně konzervovaná, ale z větší části strukturálně nedefinovaná (Luger a Richmond, 1998). Vykazuje srovnatelný stupeň konzervativních sekvencí od kvasinek až po člověka. Bývá lokalizována na N-terminální části všech čtyř jaderných histonů a na C-konci histonu H2A (Grunstein, 1997). Tato doména je citlivá k působení proteas a je extrémně bazická, což je důsledkem přítomnosti velkého počtu bazických aminokyselin – lysinu a argininu (Luger a Richmond, 1998).

Lysiny na N-terminálním konci jaderných histonů jsou dominantním místem pro acetylaci a metylaci. Regulační role těchto modifikací pro aktivaci, represi genů a transkripci byla navržena již v roce 1964 (Allfrey *et al.*, 1964).

2.1.3 Histonový kód

Specifická struktura chromatinu na některých N-koncích histonů H3 a H4 vytváří tzv. „histonový kód“. Hypotéza tohoto kódu předpokládá, že modifikace na koncích histonů vytváří značky, které mohou dále utvářet vazebná místa pro efektorové proteiny (Jenuwein a Allis, 2001). V souladu s tímto názorem bylo prokázáno, že jedna z proteinových domén – bromodoména - je schopná selektivní interakce s kovalentní značkou na N-konci histonu. Danou kovalentní značkou je právě acetylovaný lysin (Dhalluin *et al.*, 1999). Tento epigenetický systém značení představuje základní regulační mechanismus mající vliv na většinu, ne-li všechny, s chromatinem spojené procesy. Ty následně ovlivňují vývoj buněk jak za normálních, tak za patologických podmínek (Jenuwein a Allis, 2001).

Některé biochemické a genetické experimenty však ukazují, že náboj na N-konci histonu H4 má sice dramatický vliv na vazbu s DNA nebo na fenotyp. Ale bez ohledu na to, v jaké pozici se daný náboj nachází (Megee *et al.*, 1995).

2.1.4 Význam modifikace chromatinu u rostlin

Řada studií ukázala, že posttranslační modifikace DNA a histonů hrají klíčovou roli při expresi genů a vývoji rostliny za stresových podmínek. Většina z těchto změn vyvolaných stresem je po odeznění stresu navracena zpět do původního stavu, ale některé z těchto změn mohou být dlouhodobě stabilní. To znamená, že mohou být převedeny do „stresové paměti“ rostliny a mohou se dále dědit při buněčném dělení během mitózy nebo meiózy. Epigenetická stresová paměť tak může rostlině pomoci efektivněji se vypořádat s následně se opakujícím stresem (Jaskiewicz *et al.*, 2011).

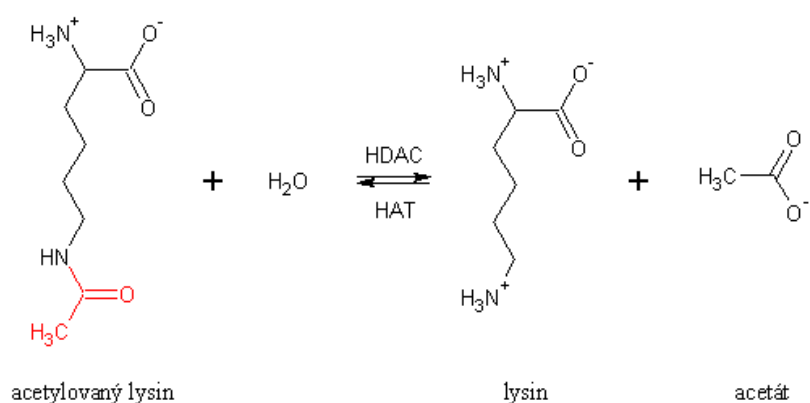
2.1.4.1 Přenos epigenetické informace

Replikace chromatinu zahrnuje jak syntézu DNA, tak sestavení nukleosomu, tedy dva procesy, které probíhají koordinovaně během S-fáze buněčného cyklu. Sestavení nukleosomu, označované jako modulace chromatinu spřažená s replikací, zahrnuje

prerozdělení histonů, které byly spojeny s původní DNA, a syntézu nových histonů. Zkoumání struktury nukleosomu ukázalo, že tetramer tvořený histony H3 a H4 může být teoreticky rozdělen na dva identické H3/H4 dimery. V souvislosti s modulací chromatinu spřaženou s replikací může rozdělení tetrameru histonů umožnit, aby byl původní dimer H3/H4 spojen s nově syntetizovaným dimerem H3/H4. Dceřinná DNA by tak obsahovala hybridní tetramer histonů a epigenetické informace obsažené v původních dimerech H3/H4 by sloužily jako templát pro přenos informací do nově syntetizovaných dimerů H3/H4. Původní nukleosom a s ním spojené modifikace by byly plně replikovány. Tento model sestavení chromatinu je v souladu s faktem, že histony H3/H4 jsou dimer a ne tetramer (Tagami *et al.*, 2004).

2.2. Acetylace a deacetylace histonů

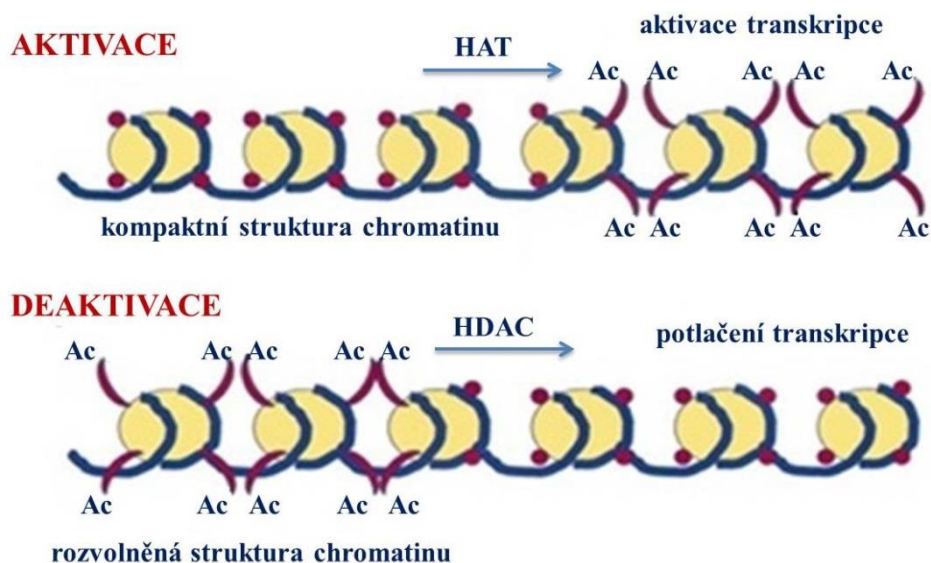
Acetylace histonů probíhá posttranslačně a reversibilně na ϵ -amino skupině lysinového residua na N-konci vyčnívajícího řetězce jaderného histonu (obr. 1). Acetylová skupina z acetylkoenzymu A je přenesena na ϵ -amino skupinu lysinu pomocí enzymu histonacetyltransferasy. Hyperacetylace histonů je spojována s oslabením kontaktu mezi DNA a histonem, a to v důsledku neutralizace pozitivního náboje na N-konci histonu a snížením jeho afinity k záporně nabitě DNA (Kuo a Allis, 1998).



Obr. 1 De/acetylace lysinu (upraveno podle Sun *et al.*, 2003).

Naopak deacetylační proces zahrnuje odstranění skupiny acetylu ze specifického lysinového residua jaderného histonu působením histondeacetylasy. Tím se obnoví pozitivní náboj na konci histonu, dojde k zesílení interakcí mezi DNA a histony a chromatin zaujme kompaktnější strukturu (obr. 2) (Kuo a Allis, 1998). Dále bylo

pro HDAC popsáno, že se mohou vázat na některé sekvenčně specifické transkripční represory vázajících se na DNA (Alland *et al.*, 1997).



Obr. 2 Vliv HAT a HDAC na strukturu chromatinu (upraveno podle de Ruijter *et al.*, 2003).

2.2.1 Histonacetyltransferasy

Histonacetyltransferasy (HAT) jsou enzymy spadající do skupiny transferas. Jejich přesné zařazení podle enzymové komise je EC 2.3.1.48.

HAT jsou klasifikovány do dvou skupin na základě jejich lokalizace v buňce (Brownell a Allis, 1996). Typ B-HAT jsou cytoplasmatické proteiny, které katalyzují acetylaci histonů v cytoplasmě, zejména lysiny K5 a K12 nově syntetizovaných histonů H4 před jejich začleněním do nově replikovaného chromatinu (Verreault *et al.*, 1998). To je odlišné od modifikací, které jsou spojovány s regulací transkripce (Chang *et al.*, 1997).

Typ A-HAT je zodpovědný za acetylaci jaderných histonů, a je tak přímo zapojen do regulace přístupnosti chromatinu a transkripce genů (Ogryzko *et al.*, 1996). HAT A-typu acetyluje všechny čtyři jaderné histony, ale modifikace na histonech H4 a jeho lysinech 8 a 16, a na histonech H3 a jeho lysinech 9 a 14 jsou nejčastější (Kuo *et al.*, 1996).

2.2.2 Histondeacetylasy

Histondeacetylasy spadají do skupiny hydrolas. Jejich přesné zařazení podle enzymové nomenklatury je EC 3.5.1.98.

Na základě schopnosti deacetylovat proteiny, které nejsou příbuzné s histony, ale jedná se například o transkripční faktory nebo další regulátory transkripce genů, mohou být histondeacetylasy obecně považovány za lysindeacetylasy (Bourque *et al.*, 2011).

Kyselá doména u histondeacetylasy může být důležitá pro jejich asociaci s bazickými terminálními N-konci histonů (Lusser *et al.*, 1997). Delece C-koncové domény *AtHD2A* u *Arabidopsis thaliana* neměla dopad na represi aktivity genů, což naznačuje, že tato doména není pro represi genů potřebná, ale může být zapojována v interakcích protein-protein za účelem zprostředkování interakcí s dalšími specifickými proteiny (Wu *et al.*, 2000).

2.2.3 Acetylace, deacetylace a aktivita genů

Acetylace jaderných histonů, která byla poprvé popsána roku 1964 (Allfrey *et al.*, 1964). Jedná se o reversibilní proces na lysinech N-koncových domén histonů, který může být u eukaryotických buněk zapojen do několika vitálních funkcí (Grunstein, 1997). Přibývá důkazů, že acetylace mohou napomáhat utváření vazebního povrchu pro aktivátory a represory transkripce (Suka *et al.*, 2001). To také umožňuje zaujetí otevřené nebo naopak uzavřené konformace chromatinu, a tím ovlivnění přístupu pro transkripční faktory k DNA (Mustkov *et al.*, 1998).

Acetylace je také důležitým dějem pro zprostředkování některých signálních procesů, které nezahrnují pouze histony, ale také nehistonové proteiny. Většinou se jedná o transkripční regulátory (Luo *et al.*, 2000).

Acetylované histony mohou být rozpoznávány jako charakteristický znak pro rozlišení euchromatinu od heterochromatinu. U heterochromatického regionu jsou acetylové skupiny odstraňovány po kompletní syntéze DNA (O'Neill a Turner, 1995). Zatímco u euchromatického regionu je histon H4 acetylován na lysinech K5, K8 a K12 a K16 (Clarke *et al.*, 1993).

Hypoacetylace je spojována s represí exprese genů (Hebbes *et al.*, 1988). Inhibice histondeacetylasy vede k hyperacetylaci jaderných histonů, čímž je dále ovlivněna diferenciace a růst buněk (Bradbury, 1992).

Acetylace histonů však není vždy spojována pouze s aktivací genů a naopak deacetylace nemusí nutně vést k jejich represí. Příkladem je kvasinkový protein Hos2p vykazující histondeacetylasyovou aktivitu, který je spíše spojován s aktivací genů než s jejich potlačováním (Wang *et al.*, 2002).

Deacetylace histonů může mít klíčovou roli při umlčování genů, které je rozšířeno mezi eukaryoty, včetně vyšších rostlin (Meyer a Saedler, 1996). Umlčování transkripce je tady v souladu s methylací cytosinů u umlčených promoterů a ztrátou exprese genů (Meyer *et al.*, 1994). Další studie také naznačují, že methylace DNA může mít dopad na strukturu chromatinu spolu s deacetylací histonů (Jones *et al.*, 1998).

2.3 Živočišné histondeacetylasy

První živočišné histondeacetylasy (HD1) byly identifikovány v roce 1996 v jaderných extraktech připravených z buněk hovězího thymu a z lidských Jurkat T buněk (Tauton *et al.*, 1996). Pro jejich izolaci byl použit trapoxin - ireversibilní HDAC inhibitor, který inhibuje deacetylaci histonů *in vivo* a u savčích buněk vyvolává zástavu buněčného cyklu (Furumai *et al.*, 2001). Ukázalo se, že HD1 sdílí značnou sekvenční homologii (přibližně 60% totožnost) s kvasinkovým Rpd3 proteinem, globálním transkripčním regulátorem s HDAC aktivitou (Rundlett *et al.*, 1996). Kromě toho bylo pro HDm, živočišnou HDAC drápatky vodní (*Xenopus laevis*), prokázáno, že vykazuje podobnost s některými dalšími proteiny. Příkladem jsou acetylpolymaminhydrolasy sinic a bakterií z rodu *Mycoplasma*, nebo některé proteiny archebakterií, což naznačuje, že HDAC mohou patřit do starobylé rodiny enzymů s podobnými funkcemi (Ladomery *et al.*, 1997).

U člověka bylo doposud identifikováno celkem 18 HDAC (Gray a Ekström, 2001), majících funkce v procesech jako jsou transkripce (Yang *et al.*, 1996), buněčný cyklus (Marzio *et al.*, 2000), umlčování genů (Bestor, 1998), replikace DNA (Iizuka a Stillman, 1999) a opravy poškozené DNA (Brochier *et al.*, 2013). Lidské HDAC mohou být rozděleny do následujících rodin - RPD3/HDA1 a SIR2. Tato klasifikace

je založena na homologii s proteiny, s histondeacetylasovou aktivitou, přítomnými u kvasinek (Gray a Ekström, 2001).

U živočišných buněk bylo demonstrováno, že HDAC mohou interagovat s několika nehistonovými cíli - známými transkripční regulátory jako je protein p53 (Luo *et al.*, 2000).

Práce zabývající se živočišnými HDAC ukazují, že v závislosti na fyziologickém kontextu není katalytická doména HDAC nutně zapojena do zprostředkování biologických odpovědí. Např. u T-lymfocytů bylo prokázáno, že pro chemotaxi lymfocytů není rozhodující deacetylasová aktivita HDAC6, ale její hladina. Butyrát sodný blokuje deacetylasovou aktivitu HDAC6 vůči tubulinu bez inhibice jejího zapojení v buněčné mobilitě, což ukazuje na klíčovou roli HDAC6 v pohyblivosti lymfocytů bez ohledu na její enzymatickou aktivitu (Cabrero *et al.*, 2006).

2.3.1 Fylogeneze savčích histondeacetylas

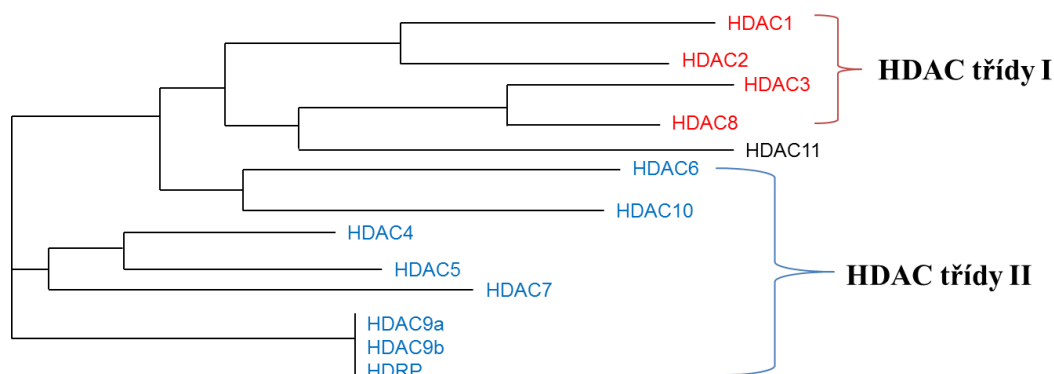
Jsou známy dvě rodiny proteinů s HDAC aktivitou: SIR2 rodina s NAD⁺-závislými histondeacetylasami a tzv. „klasická HDAC rodina“ (Bjerling *et al.*, 2002).

Klasické HDAC a sirtuiny se odlišují v mechanismu jejich katalýzy. Klasické HDAC jsou Zn²⁺ - závislé enzymy, se zinkovým kationtem v katalytické kapse, které mohou být inhibovány sloučeninami chelatujícími zinečnatý ion jako jsou hydroxamové kyseliny. Oproti tomu sirtuiny k těmto sloučeninám citlivé nejsou (Imai *et al.*, 2000), za to pro svoji aktivitu vyžadují NAD⁺ jako kofaktor (Frye, 2000).

2.3.1.1 Histondeacetylas rodiny RPD3/HDA1

Členové „klasické rodiny“ spadají do dvou různých fylogenetických tříd, a to třídy I a II. Třída I je příbuzná s RPD3 proteinem - transkripčním regulátorem *Saccharomyces cerevisiae*. Z lidských HDAC jsou do této třídy řazeny HDAC1, 2, 3 a 8 (obr. 3) (Fischle *et al.*, 1999). Třída II „klasické rodiny“, kam z lidských histondeacetylas patří HDAC4, 5, 6, 7, 9 a 10, sdílí určitou podobnost domény s dalším kvasinkovým proteinem - HDA1 (Bjerling *et al.*, 2002). U člověka byla roku 2002 identifikována HDAC11, která není zařazena ani do jedné z uvedených tříd „klasické

HDAC rodiny“, protože sdílí homologii konzervovaných residuí katalytické domény jak s residuí třídy I, tak třídy II (Gao *et al.*, 2002).



Obr. 3 Evoluční vztah lidských HDAC „klasické rodiny“ (upraveno podle de Ruijter *et al.* 2003).

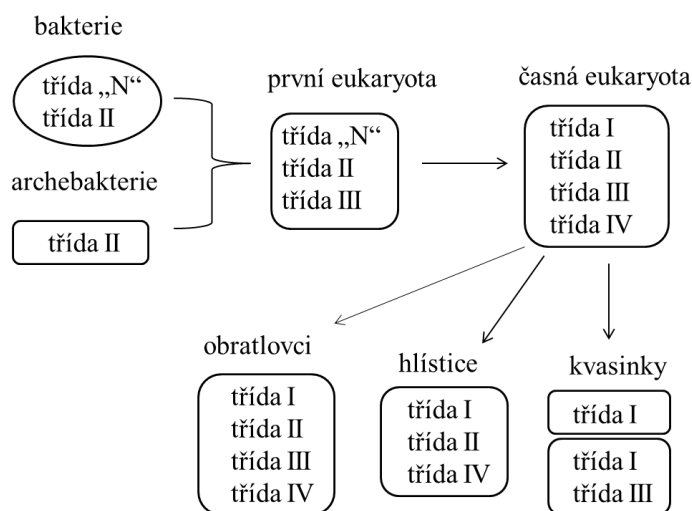
Histoneacetylasy ze třídy I jsou exprimovány ve většině buněčných typů, zatímco exprese genů z třídy II HDAC je potlačena. To naznačuje, že HDAC třídy II mohou být zapojeny do buněčné diferenciaci a procesů souvisejících s vývojem (Buggy *et al.*, 2000).

RPD3 histoneacetylasy zprostředkovávají u savčích buněk represí transkripce interakcí se specifickými proteiny vázajícími se na DNA, interakcí s asociovanými korepresory nebo promotery (Alland *et al.*, 1997). HDA1 a RPD3 jsou od sebe odlišné, ačkoli sdílí podobnou katalytickou doménu (Fischle *et al.*, 1999).

2.3.1.2 Histoneacetylasy rodiny SIR2

SIR2 proteiny, také označované jako sirtuiny, jsou NAD^+ -závislé histoneacetylasy. SIR2 histoneacetylasy nesdílí sekvenční nebo strukturní homologii s ostatními členy HDAC rodin a jejich enzymová aktivita není inaktivována trichostatinem A nebo butyrátem sodným. SIR2 jako HDAC jsou konzervované od bakterií po člověka (Brachmann *et al.*, 1995) a podílí se na kontrole základních buněčných procesů jako jsou změny struktury chromatinu (Fritze *et al.*, 1997), umlčování genů (Bryk *et al.*, 1997) či metabolismus a stárnutí (Imai *et al.*, 2000). Bakteriální, kvasinkové a savčí sirtuiny jsou schopné metabolizovat NAD^+ a pravděpodobně mohou působit jako mono-ADP-ribosyltransferasy (Brachmann *et al.*, 1995).

Sirtuiny můžeme rozdělit do čtyř tříd (I-IV), přičemž členové ze tříd sirtuinů I, II, a IV jsou nejspíše přítomny u všech mnohobuněčných organismů. Třída III sirtuinů je nejrozšířenější u prokaryot. Předpokládá se, že se jedná o evolučně velmi starou skupinu sirtuinů. HDAC třídy III se nachází především u gramnegativních bakterií a archeobakterií, avšak je nejasné, u které taxonomické skupiny je tento gen původní (obr. 4) (Frye, 2000).



Obr. 4 Hypotetický model pro evoluci a distribuci sirtuinů (upraveno podle Frye, 2000). Třída „N“ = neklasifikována.

Rodina genů pro lidské sirtuiny zahrnuje celkově 7 doposud známých členů. Každý z těchto sirtuinů obsahuje konzervovanou jadernou doménu, v některých případech je přítomna i N-koncová nebo C-koncová doména (Frye, 2000). Jedná se o tyto homology ke kvasinkovému SIR2 proteinu: jaderné proteiny SIRT1, SIRT2 a SIRT7, mitochondriální SIRT3, SIRT4 a SIRT5 a cytosolická SIRT2 (Houtkooper *et al.*, 2012).

Pro savčí sirtuiny ze třídy I byly popsány kromě deacetylasové aktivity další funkce. SIRT5 vykazuje navíc desukcinylasovou (Zhou *et al.*, 2012) a demalonylasovou aktivitu (Peng *et al.*, 2011), SIRT4 je schopen katalyzovat ADP-ribosylaci (Haigis *et al.*, 2006), zatímco SIRT6 může odstranit mastné kyseliny s dlouhým řetězcem z vybraných proteinových substrátů (Jiang *et al.*, 2013).

2.3.2 Substráty a mechanismy reakce HDAC

Histondeacetylasy potřebují být pro vykonávání svých funkcí lokalizovány v jádře, kde se nachází jejich nejdůležitější substráty - histony. Jaderná lokalizace HDAC je dosažena prostřednictvím jaderného lokalizačního signálu (NLS) nebo kolokalizací společně s dalšími proteiny. Většina HDAC obsahuje jaderný lokalizační signál, ale existují i cytosolické histondeacetylasy. Například členové třídy I RPD3/HDA1 se nacházejí téměř výlučně v jádře zatímco HDAC třídy II mohou přecházet mezi jádrem a cytosolem v důsledku odpovědi na některé buněčné signály (de Ruijter *et al.*, 2003).

2.3.2.1 Reakční mechanismus „klasických“ HDAC

Obecně HDAC enzymy působí na acetylované histony, ale jsou tu i případy odstranění acetylové skupiny z nehistonových substrátů, jako je protein p53, který je deacetylován HDAC1 (Luo *et al.*, 2000).

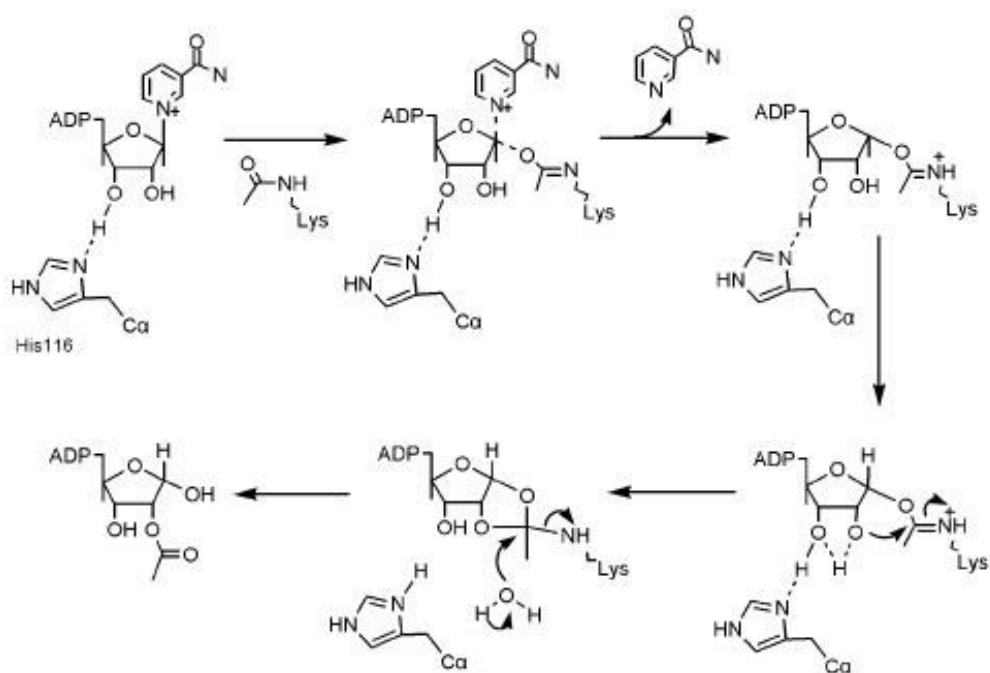
Katalytická doména histondeacetylasy je tvořena úsekem přibližně 390 konzervovaných aminokyselin. Aktivní místo se skládá z mírně zakřivené tubulární kapsy se širším dnem (Finnin *et al.*, 1999). Odstranění acetylu se děje skrze systém přenosu náboje, jehož se účastní dvě přilehlá histidinová residua, dvě aspartátová residua (lokalizovaná přibližně 30 AMK od histidinů a navzájem od sebe oddělené asi 6 AMK) a jednoho tyrosinového residua (lokalizován asi 123 AMK od aspartátových residuí) (Buggy *et al.*, 2000). Esenciálním prvkem pro systém přenosu náboje je přítomnost iontu Zn^{2+} , který se váže na vazebné místo zinku, nacházející se na dně kapsy. Je koordinčně vázán s Asp 168, His 170, Asp 258 a molekulou vody. Ligandy jsou v tetraedrickém uspořádání, který je nepravidelný díky tvorbě vodíkové vazby mezi molekulou vody a His 131 (Finnin *et al.*, 1999).

Je zřejmé, že histondeacetylasy zřídka působí samostatně. Mnoho proteinů s funkcemi jako iniciace, koreprese nebo remodelace chromatinu, jsou zapojeny v tvorbě komplexu, jehož důsledkem je represe transkripce (Jones *et al.*, 1998). Nejdůležitější signál zapojený v iniciačním procesu pro represi je přítomný přímo na samotné DNA. Skupiny methylů, navázané na DNA na cytosinových residuích v pozicích 5' od guaninu, v tzv. CpG ostrovech, se účastní zapojení komplexu HDAC

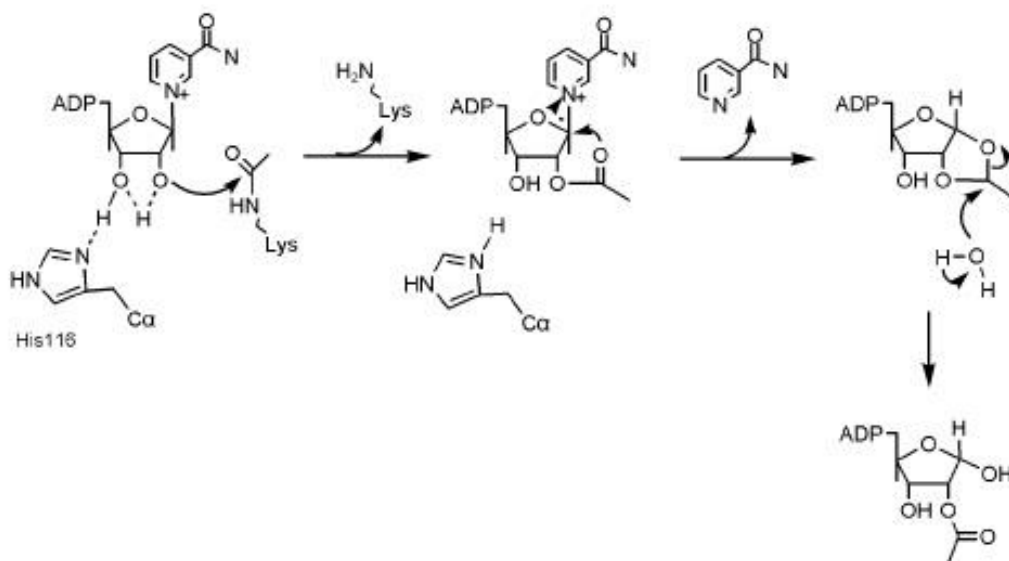
s proteiny - jako jsou metylované-CpG-vazebné proteiny a proteiny s methyl-CpG-vazebnou doménou, nebo prostřednictvím enzymů, které methylují CpG ostrůvky, tedy methyltransferasy (Nan *et al.*, 1998).

2.3.2.2 Reakční mechanismus sirtuinů

Při deacetylačních reakcích je NAD^+ štěpen ve dvou krocích na nikotinamid a O-acetyl-ADP-ribosu (OAcADPR). V prvním kroku je odštěpen NAD^+ a ADP-ribosa je kovalentně navázána na karbonylový kyslík acetylové skupiny substrátu (obr. 5a). Následně dochází k hydrolyze vazby acetyl-lysin za uvolnění OAcADPR. Navázání ADP-ribosy na substrát, se také může dít přes karbonylový uhlík acetylové skupiny substrátu (obr. 5b), konečným produktem je opět OAcADPR (Chang *et al.*, 2002). Nikotinamid může způsobovat inhibici enzymové reakce produktem a vysoké hladiny nikotinamidu v buňkách tak mohou aktivitu sirtuinů potlačovat (Anderson *et al.*, 2003).



Obr. 5a Předpokládaný mechanismus přenosu acetylové skupiny na NAD zprostředkovaný SIR2 za vzniku O-acetyl-ADP-ribosy (převzato z Chang *et al.*, 2002).



Obr. 5b Druhý předpokládaný mechanismus přenosu acetylové skupiny na NAD^+ zprostředkovaný SIR2 za vzniku O-acetyl-ADP-ribosy (převzato z Chang *et al.*, 2002).

2.3.2.3 Substráty HDAC

Všechny jaderné histony mohou být deacetylovány *in vivo*. Avšak modifikace probíhající na histonech H3 a H4 jsou ve srovnání s histony H2A a H2B charakterizovány lépe (Strahl a Allis, 2000).

Nejdůležitějšími cíli pro acetylaci a deacetylaci jsou lysiny K9 a K14 na histonech H3 a lysiny K5, K8, K12 a K16 na histonech H4 (Bjerling *et al.*, 2002). Ustálené hladiny acetylace na jaderných histonech jsou důsledkem rovnováhy mezi protichůdnými aktivitami histonacetyltransferas a histondeacetylasy (Katan-Khaykovich a Struhl, 2002).

Jak už bylo zmíněno, kromě histonů mohou být histondeacetylasy deacetylovány i další proteiny. Mimo protein p53 (Luo *et al.*, 2000) jsou jimi dále např. α -tubulin (Hubbert *et al.*, 2002) a MyoD (Sartorelli *et al.*, 1999). Tato skutečnost poukazuje na komplexní funkci pro HDAC v mnoha buněčných procesech.

2.3.3 Regulace aktivity HDAC *in vivo*

Některé HDAC – jako HDAC třídy I rodiny RPD3/HDA1 - jsou součástí velkých multiproteinových komplexů, které zprostředkovávají jejich kolokalizaci s DNA

a udělují jim tak cílenou specifitu (Hayakawa a Nakayama, 2010). Další mechanismy pro regulaci aktivity HDAC zahrnují některé posttranslační modifikace – fosforylaci (Cai *et al.*, 2001), S-nitrosylaci (Nott *et al.*, 2008), acetylaci (Qiu *et al.*, 2006), ubikvitinylaci (Hook *et al.*, 2002) a sumoylaci (David *et al.*, 2002), které mají následně dopad např. na HDAC enzymatickou aktivitu, jejich buněčnou lokalizaci a interakci s korepresory.

V roce 2001 byla dvěma výzkumnými skupinami prokázána fosforylace histondeacetylasy HDAC1. Bylo zjištěno, že C-terminální doména HDAC1 může být fosforylována kaseinkinase 2 (CK2, EC 2.7.11.1) a proteinkinase A (PKA, EC 2.7.11.11) (Cai *et al.*, 2001), přičemž fosforylace katalyzovaná CK2 probíhá na dvou serinových residuích C-terminální domény (Pflum *et al.*, 2001). V následujících letech, bylo identifikováno mnoho dalších kinas a fosforylačních míst pro téměř všechny HDAC (Brandl *et al.*, 2009). Mezi další kinasy, které mohou fosforylovat třídu I HDAC, patří proteinkinasa G a proteinkinasa závislá na vápníku/kalmodulinu. Fosforylace prostřednictvím proteinkinasy závislé na vápníku/kalmodulinu byla prokázána také u HDAC5 a HDAC7 (Brandl *et al.*, 2009).

Třída I HDAC také podléhá dalším posttranslačním modifikacím, jako jsou acetylace, ubikvitinylace a sumoylace. Acetylace HDAC1 byly prokázána u intaktních buněk po předchozí expozici dexamethasonu (Qiu *et al.*, 2006). Histonacetyltransferasa HAT P300 acetyluje HDAC1 uvnitř její katalytické domény a má za následek dramatickou inhibici enzymové aktivity HDAC1 (Qiu *et al.*, 2006).

2.3.3.1 NO a S-nitrosylace

NO vystupuje jako dynamický regulátor pro velký počet proteinů. Kromě toho, že se může vázat na proteiny, jejichž součástí jsou přechodné kovy, jako je tomu u guanylátcyklasy (Severina *et al.*, 2003) či hemoglobinu (Jia *et al.*, 1996), NO může kovalentně modifikovat cílené proteiny, a to indukcí nitrosylace cysteinů (S-nitrosylace) nebo nitrací tyrosinů (Tyr-nitrace) (Stamler *et al.*, 2001).

Zatímco nitrace tyrosinů je spojována především s oxidačním poškozením a degradací proteinů, S-nitrosylace je fyziologická posttranslační modifikace podobná fosforylaci (Stamler *et al.*, 1997). Ve většině případů je NO generován enzymatickou

reakcí, která je katalyzována syntasou oxidu dusnatého (NOSs; EC 1.14.13.39). Proteiny mohou být také nitrosylovány následně po výměně nitrosylové skupiny s dalším buněčným S-nitrosothiolem (SNOs) v procesu zvaném trans-nitrosylace (Marino a Gladyshev, 2010).

Navzdory expresi nejméně jedné isoformy NOS ve většině typů živočišných buněk, se S-nitrosylace zdá být vysoce specifickou modifikací. Specifita na cílené cysteiny závisí, alespoň částečně, na motivu acidobazického konsenzu. Přítomnost tohoto motivu, může záviset na terciární nebo kvartérní struktuře proteinu, jako je tomu u kaspasy-3 (Mitchell *et al.*, 2007) a hemoglobinu (Stamler *et al.*, 1997).

S-nitrosylace reguluje aktivitu proteinů ovlivněním jejich katalytické aktivity, interakcí protein-protein, a/nebo subcelulární lokalizací (Hess *et al.*, 2005). Závislá stimulace S-nitrosylace přímo reguluje aktivitu různých transkripčních faktorů zahrnujících zinkový prst, např. NF- κ B (Marshall a Stamler, 2001).

2.3.4 Inhibice HDAC

Většina inhibitorů HDAC blokuje přístup do aktivního místa histondeacetylasy. Mezi nejúčinnější inhibitory HDAC patří trichostatin A (TSA). Jedná se o fermentační produkt *Streptomyces*. Původně byl používán jako fungicid, ale později se zjistilo, že má silné inhibiční účinky na proliferaci rakovinných buněk. TSA patří do skupiny hydroxamových kyselin a *in vitro* je efektivní již v nanomolárních koncentracích (Yoshida *et al.*, 1990). Výjimkou pro inhibiční účinek TSA na HDAC je rodina sirtuinů, jejichž enzymová aktivita trichostatinem A potlačována není (Imai *et al.*, 2000).

Dále mezi inhibitory HDAC patří skupina mastných kyselin s krátkým řetězcem, jako je butyrát (Kruh, 1982) a valproová kyselina (Göttlicher *et al.*, 2001).

Třetí skupinou inhibující histondeacetylaseovou aktivitu jsou cyklická tetrapeptidová antibiotika. Většina z nich je produkována bakteriemi nebo houbami, např. apicidin (Darkin-Rattray *et al.*, 1996). Některé, jako depsipeptid, jsou ale syntetizovány (Narita *et al.*, 2009).

Většina inhibitorů HDAC způsobují reversibilní inhibici, výjimkou jsou např. trapoxin a depudesin, kteří inhibují enzym irreversibilně odlišným mechanismem - kovalentní vazbou k epoxyketo-skupině (Furumai *et al.*, 2001).

Inhibice HDAC může vyústit v hyperacetylaci histonů, která má za následek aktivaci transkripce některých genů skrze relaxaci konformace DNA (Suenaga *et al.*, 2002). Obecně platí, že inhibitory HDAC jsou schopny indukovat zástavu růstu, diferenciaci (Munster *et al.*, 2001) a apoptózu (Carducci *et al.*, 1996) rakovinných buněk *in vitro* a *in vivo*.

2.4 Rostlinné HDAC

Rostlinné proteiny s histondeacetylasovou aktivitou byly poprvé charakterizovány u hrachu (*Pisum sativum*) v roce 1988 (Sendra *et al.*, 1988). Na základě sekvenční homologie s kvasinkovými HDAC jsou rostlinné HDAC rozděleny do tří odlišných rodin RPD3/HDA1, SIR2 a HD2 (Pandey *et al.*, 2002).

U *Arabidopsis thaliana* bylo popsáno 16 HDAC. Z celkového počtu 16 histondeacetylas jich 10 patří do rodiny RPD3/HDA1 (označovány symbolem HDA), 4 patří do HD2 rodiny (označeny jako HDT) a 2 členové patří do SIR2 rodiny (označeny SRT) (Pandey *et al.*, 2002).

2.4.1 Fylogeneze rostlinných HDAC

RPD3/HDA1 jako rodina HDAC se nachází u všech eukaryotických organismů, členové rodiny RPD3/HDA1 jsou spojovány s kvasinkovými proteiny RPD3 a HDA1. K nim homologní proteiny, které mají schopnost utilizace acetátu a acetylpolyamin-aminovou hydrolasovou aktivitu, jsou přítomny u bakterií a archebakterií, tedy u organismů postrádajících histony (Kadosh a Struhl, 1998). HD2 proteiny, tzv. „HD-tuiny“, byly poprvé identifikovány u kukuřice (*Zea mays*) jako histondeacetylasy specifické pro rostliny, u živočichů ani kvasinek nalezeny nebyly (Lusser *et al.*, 1997). SIR2 rodina rostlinných HDAC se od ostatních skupin odlišuje strukturou a požadavkem na kofaktor NAD⁺, stejně jako je tomu u živočišných analog. Členové rostlinné SIR2 rodiny jsou opět homologní se SIR2 proteiny kvasinek (Imai *et al.*, 2000).

2.4.1.1 Rodina RPD3/HDA1

Sekvenční analýza odhalila, že většina z proteinů této třídy obsahuje velkou doménu homologní s kvasinkovým RPD3 proteinem (Reduced Potassium Deficiency 3), která pokrývá většinu N-konce a krátkou C-terminální oblast s variabilnější sekvencí (Khochbin a Wolffe, 1997).

U kvasinek jsou přítomny dva histondeacetylasové komplexy, vůči kterým je následně srovnávána rodina RPD3/HDA1. Jeden histondeacetylasový komplex zahrnuje RPD3 protein a druhá HDA1 (Rundlett *et al.*, 1996). Tyto dva proteiny se liší citlivostí k trichostatinu A, HDA1 je citlivější. Navíc komplex zahrnující RPD3 je specificky cílen na geny, které jsou regulovány transkripčním faktorem UME6, zatímco HDA1 tyto geny neovlivňuje (Rundlett *et al.*, 1998).

Kvasinkový RPD3 homolog byl u rostlin poprvé objeven u kukuřice (Rossi *et al.*, 1998). HD1A protein byl prvně purifikován z klíčícího embrya kukuřice, byl pojmenován ZmHda1 a je to nejlépe charakterizovaný HDA1 typ histondeacetylas. HD1A podléhá fosforylaci vyúsťující ve značnou aktivaci enzymové aktivity a změnu substrátové specifity (Brosch *et al.*, 1992).

RPD3/HDA1 jako rodina histondeacetylas pro svoji katalytickou aktivitu vyžaduje kation Zn^{2+} (Finnin *et al.*, 1999). Aktivní místo histondeacetylas RPD3/HDA1 se opět skládá ze zakřiveného tubulárního tvaru, s katalytickým místem pro Zn^{2+} ion, lokalizovaného ve spodní části kapsy. Zinečnatý ion a několik vedle sebe konzervovaných zbytků (včetně dvou vedle sebe histidinových zbytků, dvou aspartátových zbytků a jednoho tyrosinového zbytku) jsou nezbytné pro katalýzu odstranění acetylové skupiny (Finnin *et al.*, 1999).

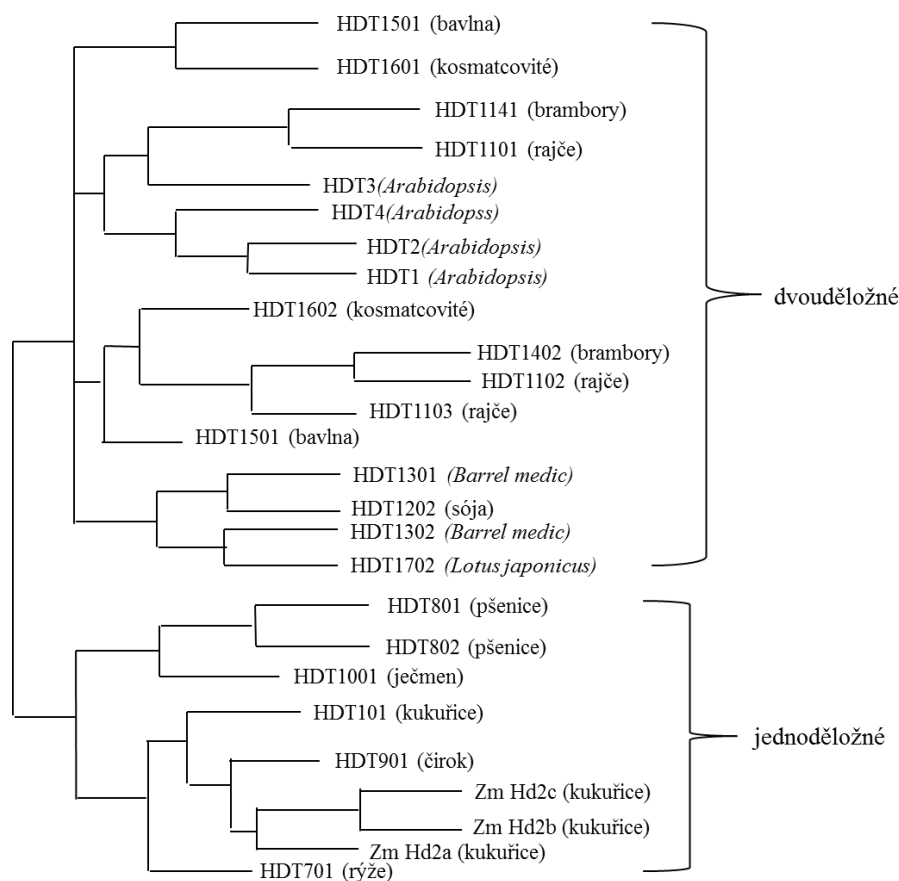
Na základě jejich sekvenční podobnosti, jsou RPD3/HDA1 děleny do tří tříd. Všichni členové mají charakteristickou HDAC doménu (Interpro: IPR003084) (Pandey *et al.*, 2002).

Existuje velká strukturální rozdílnost mezi jednotlivými HDAC této rodiny proteinů. Některé histondeacetylasy RPD3/HDA1 rodiny obsahují kromě konzervované HDAC domény např. oblast bohatou na poly-glycin ((HDA 6, 7, 9 a 17), nebo oblast bohatou na aspartát (HDA 6, 9, 10, 15 a 17) (Alinsug *et al.*, 2009). Součástí některých HDAC

této rodiny je sekvence kódující jaderný lokalizační signál (NLS) (HDA5, 6, 14, 15, 18 a 19). Naopak některé z HDAC (HDA2, 8, 15 a 18) obsahují aminosekvenci pro jaderný exportní signál (NES) (Alinsug *et al.*, 2009).

2.4.1.2 HD-tuiny

HD-tuiny se nachází pouze u rostlin (obr. 6). U kukuřice jsou lokalizovány v jádře v těsné vazbě na chromatin. Sdílí homologii s dalšími jadernými proteiny, což naznačuje, že HD2 mohou být zapojeny do regulace ribosomálních RNA genů (Lusser *et al.*, 1997). Tyto histondeacetylasy, někdy označované jako HD2, jsou vzdáleně spojovány se třídou peptidyl-prolyl *cis-trans* isomeras, které jsou přítomny u hmyzu a kvasinek (Aravind a Koonin, 1998).



Obr. 6 Fylogeneze rostlinně specifické rodiny HD-tuinů (upraveno podle Ma *et al.*, 2013).

Sekvenční analýza HD-tuinů u *Arabidopsis*, kukuřice a rýže ukázala, že se tyto proteiny skládají z N-terminální domény s konzervovaným pentapeptidovým motivem

MEFWG, kyselé centrální domény a variabilní C-terminální domény (Dangl *et al.*, 2001). U těchto analyzovaných proteinů byla na C-konci přítomna domnělá struktura zinkového prstu typu TFIIIA, který je u rostlin ve většině případů zapojován do rozpoznávání specifických sekvencí DNA. Analyzované proteiny však postrádaly konzervovanou sekvenci QALGGH typickou pro tento typ zinkového prstu. Proto se předpokládá, že samotný zinkový prst je zapojen do interakcí protein-protein (Dangl *et al.*, 2001).

U *Arabidopsis* byly identifikovány čtyři členové: HDT1, HDT2, HDT3 a HDT4 (Wu *et al.*, 2000). Ztráta rozsáhlé centrální domény, bohaté na glutamát a/nebo aspartát, a domény s předpokládanou katalytickou aktivitou vedlo u *AtHD2A* ke snížení exprese genů, což naznačuje, že obě tyto domény jsou esenciální pro funkce *AtHD2A* (Wu *et al.*, 2000). Centrální kyselá doména může být důležitá pro asociaci deacetylasy s bazickými konci histonů (Lusser *et al.*, 1997). Naopak ztráta C-terminální domény u *AtHD2A* neměla na aktivitu exprese genů dopad, což naznačuje, že není vyžadována pro represí genů. C-terminální doména je u jednotlivých členů HD2 rodiny konzervovaná méně a může být zapojována do interakcí protein-protein (Wu *et al.*, 2000).

2.4.1.3 Sirtuiny

Odlišení HDAC typu III (sirtuiny) je založeno na jejich sekvenční homologii s kvasinkovým Sir2 proteinem (Silent Information Regulator 2). Představují unikátní skupinu NAD⁺-závislých HDAC, které na rozdíl od Rpd3 a HD-tuinů nejsou inhibovány TSA (Imai *et al.*, 2000).

Rostliny ve srovnání s houbami a zvířaty mají redukovaný počet genů kódujících SIR2 proteiny. Např. kvasinky mají pět SIR2 genů, lidské buňky jich mají sedm, ale kukuřice má pouze jediný SIR2 gen. *Arabidopsis* má dva sirtuiny, SRT1 a SRT2, patřící do skupiny IV a II (Frye, 2000). Třídy SIR2 jako histondeacetylasy jsou podrobněji popsány v kapitole o živočišných HDAC (viz 2.3.1.2).

2.4.2 Substráty rostlinných HDAC

Všechny jaderné histony, H2A, H2B, H3 a H4, mohou být substráty rostlinných histondeacetylasy, ačkoli jednotlivé HDAC mají odlišnou specifitu pro různé histony.

Specifičnost HDAC byla podrobně popsána např. u kukuřičných HDAC (Kölle *et al.*, 1999).

- HD1A, HD1B a HD2 z klíčících kukuřičných embryí preferují histony H3.
- HD1A a HD1B deacetylují H2A a H4 s téměř stejnou specifitou, ale vůči histonům H2B jsou aktivní méně.
- HD2 deacetyluje histony H2A a H2B stejně aktivně, ale jeho enzymová aktivita k H4 je nižší.
- Kukuřičné HD-tuiny jsou také specifické k histonům v závislosti na stupni acetylačního stavu a na pozici acetylovaného lysinu (Kölle *et al.*, 1999).

Nejčastější se acetylace u rostlin uskutečňují na pěti lysinových zbytcích na histonech H4, konkrétně na lysinech K5, K8, K12, K16 a K20 (Waterborg, 1992). To je rozdílné od živočichů a kvasinek, kde lysin K20 na histonu H4 není acetylován, ale je methylován (Fang *et al.*, 2002; Edwards *et al.*, 2011).

Roku 1992 bylo poprvé Broschem *et al.* popsáno, že histondeacetylasy mohou být regulovány fosforylací, která vyvolá změnu jejich substrátové specifity. Po fosforylaci byla specifita kukuřičné HD1-A pro histony H2A dvojnásobně zvýšena, zatímco jejich specifita pro H3 byla snížena přibližně na 60% (Brosch *et al.*, 1992). Nativní kukuřičné HD1-A deacetylují tri- a tetraacetylované histony H4 pouze částečně, avšak defosforylované HD1-A deacetylují di-, tri- a tetraacetylované histony H4 kompletně (Kölle *et al.*, 1999).

Jak už bylo zmíněno, HDAC mají odlišnou specifitu pro lysiny na různých místech histonů. U hrachových histondeacetylasy HD1 deacetyluje na histonech H4 lysiny v polohách 5 a 16, přičemž preference je vyšší v případě lysinu K16. Preferovaná residua na histonech H3 jsou K4 >> K18 ~ K9. Histondeacetylasy HD2 na histonech H4 upřednostňuje lysinová residua v pořadí K8~K5 > K16, preferovanými cíli na histonech H3 jsou lysiny K4 a K18 (Clemente *et al.*, 2001).

Specifita HDACs pro různé histony může být spojována s jejich odlišnými funkcemi při transkripci, jak to bylo popsáno u kvasinek. Rpd3 deacetyluje všechny zkoumané lysiny u jaderných histonů H3, H4, H2A a H2B kromě lysinu v pozici 16 na histonu H4

(H4K16) (Suka *et al.*, 2001), zatímco Hos2 preferuje deacetylaci histonů H3 a H4 včetně H4K16 (Wang *et al.*, 2002).

2.4.3 Inhibitory rostlinných HDAC

Stejně jako v případě mechanismů působení rostlinných HDAC, tak i jejich inhibice je obdobná inhibici živočišných HDAC (viz kapitola 2.3.2.4). Je především založena na přemístění nebo vytěsnění iontu zinku z aktivního místa, což vyústí v deaktivaci HDAC katalytické aktivity (de Ruijter *et al.*, 2003).

2.4.3 Regulace aktivity rostlinných HDAC *in vivo*

Jedná se především o posttranslační modifikace, jako je fosforylace. Ta je běžným procesem např. pro aktivaci mitogenem aktivovaných proteinkinás (MAPK), která je jedním z prvních procesů odpovědi rostliny na napadení avirulentními patogeny (Zhang a Liu, 2001). Jak již bylo zmíněno v kapitole zabývající se substrátovou specifitou rostlinných HDAC (2.4.2), tak bylo popsáno, že histondeaceylasy mohou být regulovány právě fosforylací, která má za následek změnu v jejich substrátové specifitě. Domnělým substrátem proteinkinás je i ZmHD2, tedy kukuřičná jaderná HDAC z rodiny typu II. Pro ZmHD2 se ukázalo, že je fosforylována *in vitro* rekombinantní kaseinkinasou 2 (CK2), známou jadernou PK (Lusser *et al.*, 1997).

2.3.4 Úloha HDAC v obraně rostlin

Rostliny jsou ovlivňovány biotickými a abiotickými faktory v závislosti na jejich životním prostředí na několika úrovních. Kromě fyziologických změn a spuštění obranných mechanismů dochází i ke změnám rostlinného genomu. Příkladem je aktivace transpozonů v závislosti na životních podmínkách rostliny (Grandbastien *et al.*, 2005) nebo indukce mutací při působení některých chemických sloučenin (Kovalchuk *et al.*, 2000). Dále byla prokázána flexibilita genomu v odpovědi na napadení rostliny patogenem (Lucht *et al.*, 2002). Rostliny jsou schopny využívat systémů zodpovědných za rozpoznání patogenů s následnou aktivací drah vedoucích k obranným reakcím. S patogenem spojené molekulární vzory (PAMPs), obecněji elicitory (Zipfel a Felix, 2005), jsou rozpoznávány receptory, které jsou součástí vrozené imunity. Tyto interakce mezi PAMPs a jejich odpovídajícími receptory zahrnují dráhu specifické signální transdukce, která vede k systémové získané rezistenci (SAR) proti širokému spektru

patogenů. SAR může být zesílena indukcí hypersenzitivní reakce (HR), nebo lokalizované programované smrti (PCD). Ta je spojována s omezením patogenu v místě infekce (Ma a Berkowitz, 2007).

Rostliny si tedy vyvinuly několik obranných mechanismů, kterých využívají v závislosti na typu útočícího patogenu. Zásadní složkou obranných mechanismů rostlin jsou procesy, které jsou spojeny s reprogramováním transkripce. Jak se v poslední době prokázalo, tak modifikace chromatinu - včetně acetylace a deacetylace - jsou dalším stupněm regulace těchto obranných mechanismů (Choi *et al.*, 2012).

V práci S. Bourque *et al.* bylo popsáno, že specifické rostlinné HDAC typu 2 působí jako negativní regulátoři u elicitorem-indukované buněčné smrti u tabáku *N. tabacum*, což naznačuje, že HR je kontrolována posttranslačními modifikacemi včetně acetylace a deacetylace jaderných proteinů (Bourque *et al.*, 2011).

Pro podporu tvrzení o roli HDAC ve zprostředkování obranných reakcí bylo demonstrováno, že HDA19 z rodiny RPD3 *A. thaliana* se podílí na rezistenci vůči *Pseudomonas syringae*, a to interakcí s typem III transkripčních faktorů, WRKY38 a WRKY62 (Kim *et al.*, 2008). Dále se ukázalo, že HDAC mohou být zapojeny v kontrole buněčné smrti. Příkladem toho je knock-outování SIR2 HDAC u rýže, které vyvolalo právě buněčnou smrt (Huang *et al.*, 2007). Takovéto výsledky naznačují, že acetylace a deacetylace jaderných proteinů může mít důležitou roli v obraně rostlin vůči patogenům.

U kukuřice jsou HDAC potřebné pro toleranci vůči houbovému patogenu. Během vystavení patogenní houbě *C. carbonum* byla u citlivých linií kukuřice pozorována inhibice HDAC aktivity *in vitro* (Brosch *et al.*, 1995) i *in vivo* (Ransom a Walton, 1997). Houbový patogen *C. carbonum* produkuje HC-toxin, histondeacetylasový inhibitor, který potlačuje HDAC aktivitu u citlivých kukuřičných linií (hm/hm). Rezistentní kukuřičné linie (Hm/Hm) exprimují *Hm* gen, který kóduje NADPH závislou karbonylreduktasu, která detoxifikuje HC-toxin a chrání tak HDAC vůči této inhibici (Ransom a Walton, 1997).

Další příkladem zapojení HDAC do obranných reakcí rostlin vůči napadení patogenem je HDA19 z rodiny RPD3/HDA1. U *Arabidopsis* je HDA19 zapojena do potlačení obranné reakce zprostředkované kyselinou salicylovou (SA). Bylo

ukázáno, že ztráta HDA19 aktivity vedla ke snížení obsahu kyseliny salicylové a potlačení exprese skupiny genů potřebných pro akumulaci SA a s patogenezi spojených genů (PR). To vyústilo ve zvýšenou odolnost vůči *Pseudomonas syringae* (Choi *et al.*, 2012).

Rostliny musí čelit nejen biotickému stresu, vyvolanému patogeny, ale také abiotickému, který může být zapříčiněn například zvýšenou salinitou, suchem a teplem, nebo naopak chladem. U rostlinných HDAC bylo jejich zapojení do reakcí na abiotický stres popsáno např. u *Arabidopsis thaliana*. Bylo zjištěno, že *AtHDA6*, patřící do rodiny HDAC homologní s RPD3 proteinem, je zapojena v odpovědi spojené s kyselinou abscisovou (ABA), která je potřebná pro toleranci vůči stresu vyvolaného salinitou (Chen *et al.*, 2010). Zapojení v odpovědi na stres vyvolaný salinitou a spojený s ABA byl u *A.thaliana* popsán i pro HD-tuiny. Byl proveden pokus s rostlinami *A. thaliana*, které byly vystaveny 300mM koncentraci NaCl. Ukázalo se, že po 20. dnu působení NaCl přibližně 60 % listů u transgenních rostlin s overexpresí genu pro *AtHD2C* přežilo, zatímco u WT listů to bylo jen 5%. Snížená citlivost k NaCl byla u transgenních rostlin s overexpresí genu pro *AtHD2C* prokázána i v procesu klíčení. (Sridha a Wu, 2006). Pro *AtHD2C* bylo prokázáno, že se váže na histony H3 a interaguje s *AtHDA6* za účelem regulace exprese genů souvisejících s abiotickým stresem (Luo *et al.*, 2012). Obdobně byl pozorován vliv chladu na histondeacetylasy u kukuřice, které jím byly silně indukovány a docházelo k deacetylaci histonů H3 a H4 (Hu *et al.*, 2011).

2.5 Přehled metodik pro stanovení aktivity histondeacetylasy

2.5.1 Radiografické metody

Jedny z prvních metod používaných pro zkoumání a stanovení aktivity histondeacetylasy jsou založeny na použití radioaktivně značených substrátů.

Při přípravě radioaktivně značeného substrátu jsou dané buňky nejprve kultivovány na plastických discích s inhibitorem proteosyntézy – cykloheximidem, který je přidán přímo do kultivačního média. Cykloheximid zabraňuje inkorporaci radioaktivně značeného acetátu do nově syntetizovaných histonů. Po 30 minutové inkubaci s cykloheximidem jsou buňky promyty a následně 1 hodinu inkubovány při 37°C s čerstvým médiem obsahujícím [³H]acetát, butyrát sodný (nebo jiný inhibitor HDAC)

a cykloheximid. Z takto připravených buněk jsou poté izolovány radioaktivně značené histony (Sun *et al.*, 2003).

Testované vzorky jsou nejprve inkubovány s fosfátovým pufrem o pH = 7 a acetylovanými histony značenými tritiem ($[^3\text{H}]$ acetát). Jako kontrola je používána reakce identická té pro testované vzorky s výjimkou toho, že se vzorek před iniciací enzymové reakce nechá 5 minut povařit, aby se zničila jeho enzymová aktivita (Sun *et al.*, 2003). Po proběhnutí inkubace vzorku HDAC se značeným substrátem a reakčním pufrem, při 37°C po dobu 1 hodiny za stálého třepání, je enzymová reakce zastavena přidáním směsi kyseliny octové a chlorovodíkové. Uvolněný radioaktivně značený acetát je extrahován přidáním ethylacetátu. Po centrifugaci je část horní fáze přenesena do vialky obsahující scintilační tekutinu a množství uvolněného $[^3\text{H}]$ acetátu se stanoví kapalinovou scintilační spektrometrií. Enzymová HDAC aktivita je dpočítána následovně:

$$\text{HDAC aktivita} = \frac{\text{počet záblesků } ^3\text{H (vzorek)} (dpm) - \text{počet záblesků } ^3\text{H (kontrola)} (dpm)}{\text{čas (h)} / \text{objem vzorku (ml)}}$$

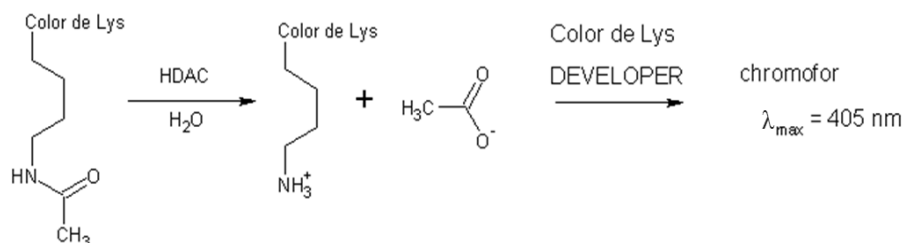
(převzato ze Sun *et al.*, 2003).

Další možností je stanovení HDAC aktivity po elektroforetickém rozdělení v polyakrylamidovém gelu za nenedaturujících podmínek nebo izoelektrické fokusace. Vyříznuté bandy s HDAC proteiny jsou ponořeny do reakčního pufru a inkubovány se substrátem zahrnujícím acetát – značený tritiem ^3H - po dobu 1 hodiny při 30°C za stálého třepání. Reakce je zastavena přidáním směsi kyseliny chlorovodíkové a octové a značený acetát je při pokojové teplotě opět extrahován přidáním ethylacetátu. Po následné centrifugaci je odebrána část horní fáze a je stanovena radioaktivita kapalinovou scintilační spektrometrií (Kölle *et al.*, 1998).

2.5.2 Spektrofotometrické metody

Aktivita HDAC může být také stanovena spektrofotometricky za použití kolorimetrických substrátů. Pro tato stanovení se využívají komerční kolorimetrické kity. Vzorek proteinu vykazující histondeacetylasovou aktivitu je nejprve inkubován se substrátem, který má na postranním řetězci navázaný acetylovaný lysin. Inkubace

probíhá alespoň 30 minut při 37°C (nebo jiné teplotě - podle typu vzorku). Poté je přidán „developer“ lysinu a inkubuje se dalších 10-15 minut při dané teplotě. Deacetylovaný lysin reaguje s „developerem“ lysinu, čímž se ze substrátu uvolní chromofor, jehož odezva se změří spektrofotometricky při 405 nm (obr. 7) (Enzo Life Sciences: Color-de-Lys[®] HDAC colorimetric activity assay kit).

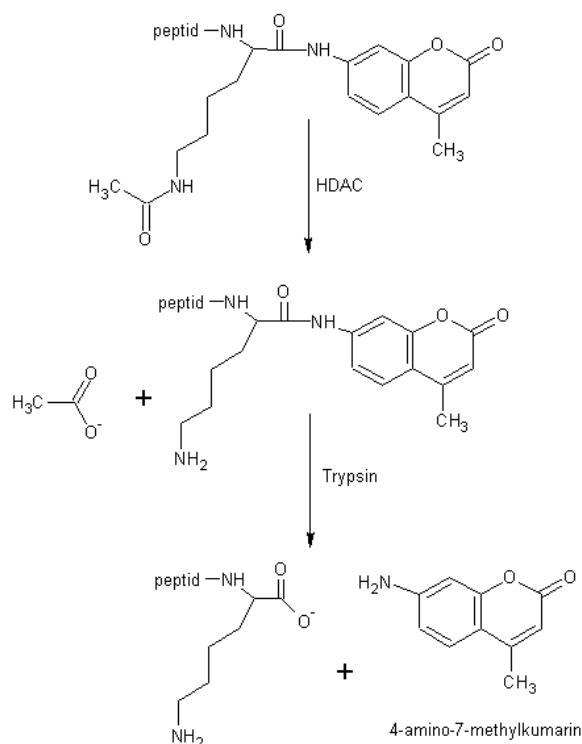


Obr. 7 Princip kolorimetrického stanovení aktivity HDAC (upraveno podle Enzo Life Sciences: Color-de-Lys[®] HDAC colorimetric activity assay kit).

Kolorimetrické kity pro stanovení HDAC aktivity nabízejí např. firmy BioVision a Enzo Life Sciences. Jejich výhodou je jednoduchý protokol, který nevyžaduje radioaktivní značení a dlouhé přípravy vzorků zahrnující např. chromatografii. Měření produktů při 405 nm je kompatibilní pro většinu mikrodestičkových readerů a je tak umožněna současná analýza velkého množství vzorků. Nevýhodou těchto kitů je, že nebývá uvedeno přesné chemické složení substrátu a ostatních reagentů (Enzo Life Sciences: Color-de-Lys[®] HDAC colorimetric activity assay kit).

2.5.3 Fluorimetrické metody

Základem analýzy je použití fluorogenního peptidového substrátu, obsahujícího acetylovaný lysin a navázaný 7-amino-4-methylkumarin na C-konci peptidu. Analýza zahrnuje dva kroky. V prvním kroku nejprve dochází k deacetylaci ϵ -acetylovaného lysinového residua peptidového substrátu. V druhém kroku nastává štěpení nechráněného deacetylovaného substrátu trypsinem s následným uvolněním fluoreskujícího 7-amino-4-methylkumarinu (obr. 8). Fluorescence je detekována při vlnových délkách excitace $\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$ a emise $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$. Nárůst fluorescence je přímo úměrný množství deacetylovaných molekul substrátu a tedy aktivitě HDAC. (Wegener *et al.*, 2003a).



Obr. 8 Princip stanovení enzymové aktivity HDAC (upraveno podle Wegener *et al.*, 2003a).

Nedostatkem uvedené metody je, že deacetylovaná forma substrátu je poměrně slabým substrátem pro trypsin ($K_m \geq 594 \mu M$), což vede ve druhém kroku reakce k vysokým spotřebám enzymu. Proto bylo navrženo vylepšení této metody za použití nového substrátu (Wegener, 2003b).

Publikovaná vylepšená verze metody zahrnuje substrát, Tos-Gly-Pro-Lys(Ac)MCA, který je dobře kompatibilní se štěpením trypsinu a je vhodný pro sledování aktivity široké škály enzymů, včetně HDAC a příbuzných enzymů přítomných u bakterií. Další výhodou této metody je její vysoká citlivost (Wegener *et al.*, 2003b).

Kromě substrátu bylo upraveno složení reakčního HDAC pufru a „stop roztoku“ (obsahujícího inhibitor HDAC) s trypsinem. V původním reakčním pufru byl 10% (v/v) glycerol nahrazen 0,1% (w/v) PEG8000, a na místo toho byl přidán o koncentraci 30 % (v/v) do „stop roztoku trypsinu“, kde byla koncentrace trypsinu z původní hodnoty 10 mg/ml snížena na 0,01 mg/ml. Tato koncentrace trypsinu pro substrát Tos-Gly-Pro-Lys-MCA byla dostatečná pro to, aby byl substrát zcela rozštěpen již během 1 minuty za daných podmínek metody (Wegener *et al.*, 2003b).

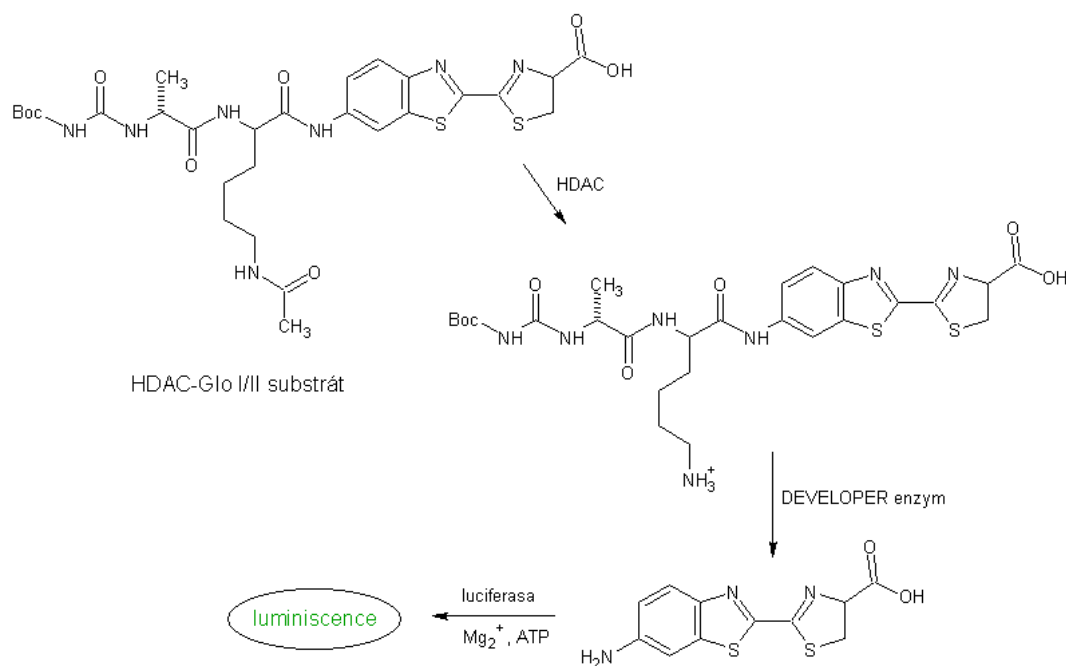
Fluorimetrická metoda byla také optimalizována pro přímé měření buněčné HDAC enzymové aktivity za použití substrátu Boc-Lys(Ac)-7-amino-4-methylkumarinu, který je schopen prostoupit do buněk. Po lýzi buněk je deacetylovaný produkt Boc-Lys-AMC štěpen trypsinem za uvolnění fluoroforu AMC, který je opět detekován (Ciossek *et al.*, 2008).

Pro fluorimetrická stanovení mohou být stejně jako u spektrofotometrických metod použity komerční kity. Nabízí je např. firmy Abnova, BioTek, Enzo Life Sciences, Sigma-Aldrich.

2.5.5 Luminiscenční metody

Existují i bioluminiscenční metody, které mohou být použity pro sledování HDAC aktivity histondeacetylas ze třídy I, II „klasické rodiny“ a sirtuinů (Halley *et al.*, 2011).

V případě metody HDAC-Glo I/II pro HDAC „klasické rodiny“ ze třídy I a II je používán luminogenní substrát zahrnující acetylovanou peptidovou sekvenci odvozenou od histonu H4, která je konjugovaná s aminoluciferinem. Deacetylace lysinového residua HDAC umožní specifické proteolytické štěpení luminogenního substrátu enzymem z „developerového“ reagentu. Štěpením vzniklý aminoluciferinový produkt je substrátem pro luciferasu. Množství vyprodukovaného světla, vzniklé reakcí katalyzované luciferasou, odpovídá HDAC aktivitě (obr. 9). Analogem je metoda SIRT-Glo pro sirtuiny využívající luminogenní substrát vhodný pro tuto rodinu histondeacetylas (Halley *et al.*, 2011).



Obr. 9 Princip bioluminiscenční metody pro stanovení HDAC třídy I a II (upraveno podle Halley *et al.*, 2011).

2.5.4 Metoda Western Blot

Další možností, jak sledovat aktivitu histondeacetylas, je z hlediska její inhibice. Metody pro testování HDAC aktivity přímo v buňkách, využívající kvantifikace účinnosti inhibitorů HDAC, jsou založeny např. na stanovení hyperacetylace jaderných histonů H3 a H4 metodou Western blot za použití specifické primární protilátky proti acetylovaným histonům (př. primární polyklonální králičí protilátka anti-(acetyl-histon H4) a k ní příslušné sekundární protilátky (Wegener *et al.*, 2008).

Western blot je také používán k detekci HDAC, jsou-li k dispozici specifické primární protilátky proti daným HDAC. Přenos proteinů s následnou imunodetekcí HDAC byl popsán jak na nitrocelulosové (Huber *et al.*, 2007), tak na PVDF membráně (Kim *et al.*, 2007).

2.5.6 HPLC

Pro stanovení aktivity HDAC pomocí HPLC byly vyvinuty především neisotopické metody za použití fluorescenčně značených substrátů HDAC, např. N-(4-methyl-7-

kumarinyl)-N- α (*terc.*butyloxykarbonyl)-N- λ -acetyllysinamid (MAL) (Heltweg a Jung, 2003).

V případě použití tohoto substrátu je produktem deacetylace derivát lysinu N-(4-methyl-7-kumarinyl)-N- α -(*terc.*butyloxy-karbonyl)lysinamid (ML), který má stejné spektroskopické vlastnosti jako původní sloučenina. Proto velmi záleží na postupu extrakce. Protonovaný amin ML je zachován v okyseleném vodném prostředí a zbývající amid MAL se extrahuje organickým rozpouštědlem. Takto vyextrahovaný MAL se poté kvantifikuje pomocí HPLC (Heltweg a Jung, 2003), pro kterou se jako mobilní fáze používá směs acetonitril:voda (40:60 (v/v)), elučním roztokem je acetonitril:voda s 0,01% TFA (55:45 (v/v)) a interní kontrolou je 7-hydroxykumarin. Měření je prováděno při vlnových délkách excitace $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$ a emise $\lambda_{\text{em}} = 395 \text{ nm}$ (Heltweg a Jung, 2002).

2.5.7 Stanovení posttranslačních modifikací

2.5.7.1 Stanovení fosforylace

Fosforylace je jednou z nejběžnějších posttranslačních modifikací, která má mimo jiné vliv na regulaci a ovlivnění substrátové specifity histondeacetylasy (Brosch *et al.*, 1992).

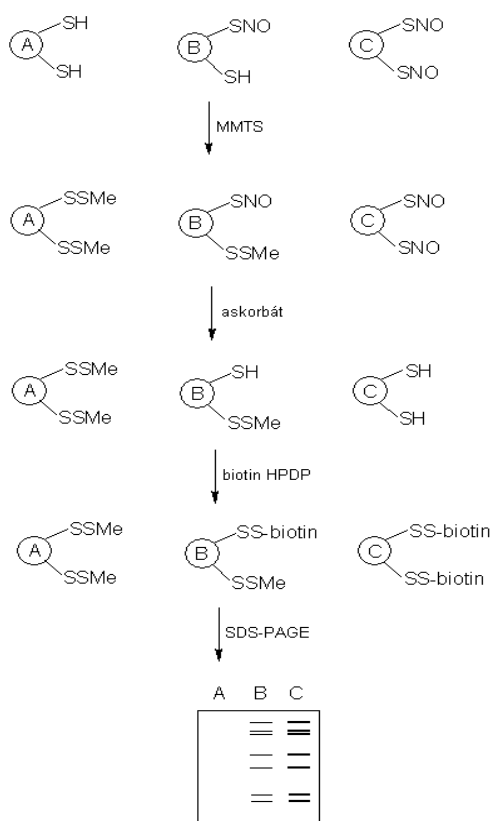
Pro stanovení fosforylace proteinů se využívá značení radioaktivním izotopem fosforu ^{32}P . V práci Stéphane Bourque *et al.*, zabývající se histondeacetylasy *NtHD2a* a *NtHD2b* u *Nicotiana tabacum*, bylo postupováno tak, že byla nejprve provedena *in vivo* fosforylace s $^{32}\text{P}\text{-H}_3\text{PO}_4$, kdy byly buňky tabáku po dobu 15 minut vystaveny působení $^{32}\text{P}\text{-H}_3\text{PO}_4$. Poté byly extrahovány jaderné proteiny a byla ověřena případná cytosolická kontaminace pomocí markeru glukosa-6-fosfátdehydrogenasy. Dále proběhla dvou-dimenzionální elektroforéza s lineárním pH gradientem v rozmezí 4-7 jednotek pH. Fosforylované proteiny byly detekovány autoradiografií (Bourque *et al.*, 2011).

2.5.7.2 Stanovení S-nitrosylace

Pro důkaz a stanovení S-nitrosylace proteinů se používají metody založené na rozkladu S-nitrosothiolu (RSNO) a následné detekci uvolněných produktů, které jsou buď

v podobě volného thiolu (např. u biotin switch techniky) (Jaffrey a Snyder, 2001) nebo oxidu dusnatého (např. u chemiluminiscence) (Archer, 1993).

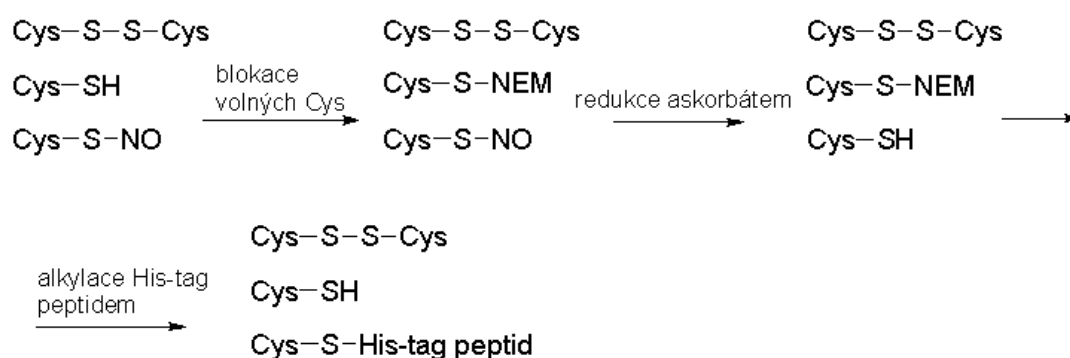
Biotin-switch metoda byla poprvé detailně popsána Jaffreym a Snyderem. Principem je specifické značení S-nitrosovaného proteinu biotinem (Jaffrey a Snyder, 2001). Přehled metody je zobrazen na obr. 10. Nejprve dochází k blokaci volných thiolových skupin proteinu inkubací s metylačním činidlem specifickým pro thioly. Inkubaci s methylačním činidlem předchází přidání dodecylsulfátu sodného (SDS), aby došlo k uvolnění skrytých SH-skupin cysteinových residuí. V dalším kroku dochází k redukci vazeb S–NO za vzniku volných –SH skupin, které následně reagují s biotynylačním činidlem specifickým pro sulfhydrylové skupiny. Takto značené proteiny jsou děleny SDS-PAGE za nepřítomnosti redukujících činidel a S-nitrosylace proteinů může být detekována imunoblotingem za použití protilátek specifických proti daným proteinům. Nebo mohou být biotinylované proteiny purifikovány afinitní chromatografií za použití avidinu (Forrester *et al.*, 2009).



Obr. 10 Princip metody biotin-switch (upraveno podle Forrester *et al.*, 2009).

Modifikací biotin-switch metody je značení S-nitrosylovaných proteinů fluorescenčním barvivem namísto biotinu. Optimalizovaná fluorescenční switch metoda eliminuje potřebu Western blotu a umožňuje přímou detekci značených S-nitrosylovaných proteinů přímo v gelu pomocí cyaninového fluorescenčního barviva a diferenční gelové elektroforézy (DIGE) (Kettenhofen *et al.*, 2008).

Další variantou je His-tag switch metoda. V tomto případě se na thiolovou skupinu cysteinového residua namísto biotinu irreversibilně navazuje His-tag. Volné thiolové skupiny jsou nejprve irreversibilně blokovány N-ethylmaleimidem a S-nitrosylovaná cysteinová residua jsou redukována askorbátem. Následuje jejich značení peptidy s His-tagem (obr. 11). His-tagem značené proteiny jsou dále purifikovány na kolonkách a po uvolnění trypsinem jsou následně analyzovány hmotnostní spektrometrií (Camerini *et al.*, 2007).



Obr. 11 Princip His-tag switch metody (upraveno podle Camerini *et al.*, 2007).

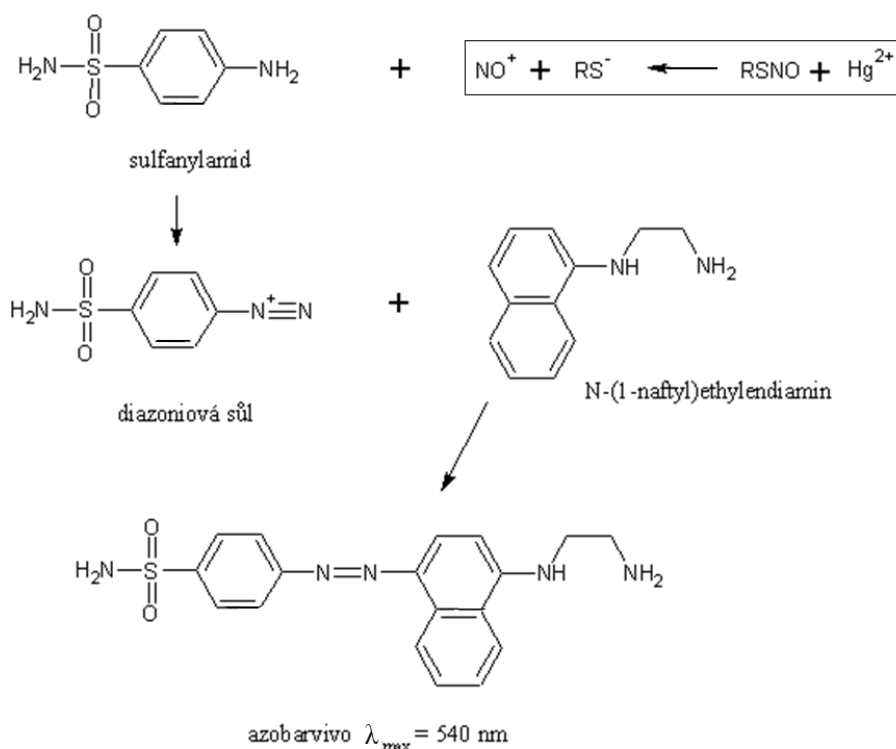
Přímá detekce S-nitrosylace hmotnostní spektrometrií je obtížná, a to z důvodu labilní povahy vazby S-NO. Například energie potřebná pro ionizaci peptidů pro MALDI-TOF MS je dostatečná na to, aby rozštěpila vazby S-NO. Za použití mírnějších podmínek v případě ESI-MS mohou být některé S-nitrosylované peptidy identifikovány (Lee *et al.*, 2007).

Jednou z dalších možností stanovení S-nitrosylace proteinů založených na detekci NO je chemiluminiscenční metoda. Existuje více možností, jak měřit generovanou luminiscenci, avšak detektory využívají stejného základního principu pro stanovení NO uvolněného z S-nitrosothiolů. NO reaguje s ozonem za tvorby NO_2^* , který se následně

rozkládá na NO_2 za současného uvolnění světla. Tato reakce probíhá v plynné fázi a je kriticky závislá na míchání NO s ozonem (Archer, 1993).

Pro stanovení nitrosylovaných proteinů mohou být také použity metody založené na fluorescenčním značení. Příkladem je diaminofluoresceinová (DAF-FM) fluorescenční metoda, kdy je z RSNO uvolněný NO^+ přenesen na DAF-FM za vzniku triazolového derivátu, který je stanoven pomocí HPLC s reverzní fází a fluorimetrickou detekcí (Itoh *et al.*, 2000).

Dále lze využít kolorimetrického způsobu a to tzv. Savillovu metodu zavedenou roku 1958 (Saville, 1958). Jejím principem je uvolnění NO^+ z S-nitrosothiolu působením HgCl_2 . Schéma reakce je uvedeno na obr. 12. Vzniká dusitan, který může být po tvorbě diazoniové soli a následné kopulaci s NED činidlem detekován jako azobarvivo (Saville, 1958).



Obr. 12 Princip Savillovy metody (upraveno podle Tarpey *et al.*, 2004).

3 Experimentální část

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Agrisera (Švédsko): primární 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 2-250 kDa.

Lachema (Česká republika): hydroxid draselný; methanol.

Lach-Ner (Česká republika): chlorid sodný.

Merck (Německo): Ponceau S.

MP Biomedicals (Francie): tris(hydroxymethyl)aminomethan, trypsin z hovězího pankreatu.

Serva (Německo): proteinový standard pro SDS-PAGE 16-215 kDa.

Sigma-Aldrich (Německo): akrylamid; agar; DTT; DMSO; dodecylsulfát sodný; EDTA Na⁺; glycin; hovězí sérový albumin; luminol Chemiluminiscent Peroxidase Substrate; merkaptoethanol; MS medium; MES hydrát; *N*-acetyl-Arg-Gly-Lys(K)-7-amido-4-methylkumarin trifluoroacetát sůl; NBT-BCIP; *N, N'*-metylenbisakrylamid; *N, N, N', N'*-tetramethylethylendiamin; persíran amonný; proteinový standard pro SDS-PAGE 8-220 kDa; His-tag značená rekombinantní lidská HDAC-2; sacharosa; sekundární kozí anti-králičí protilátka značená peroxidasou; sekundární kozí anti-králičí protilátka značená alkalickou fosfatasou; trichostatin A; Tween-20.

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); blotovací systém Trans-Blot Turbo (Bio-Rad); centrifuga Multi-Spin MSC-600 (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); elektroforetický

system Mini PROTEAN[®] Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); inkubační lázeň Dry Bath Incubator (Major Science, USA); kolonky NAP-5 (GE Healthcare, Velká Británie); minitřepačka 3-D (Biosan, Litva); mikrodestičky černé 96F (Eppendorf, Německo); mikrodestička Take 3TM Multi-Volume Plate (BioTech, Česká republika); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); mikrodestičkový reader Synergy HT (BioTech, Česká republika); nitroceluloseová membrána s póry 0,45 μm (Bio-Rad, USA); PVDF membrána Immobilon-FL s póry 0,45 μm (Millipore, USA); scanner C-Digit Blot (Li-COR, USA); termostat (Grant, UK); třepačka VXR basic (IKA, Německo); vortex V-1 plus (Biosan, Litva); zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA).

3.1.3 Rostlinný materiál

Listy rostlin *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia, *Nicotiana tabacum* var. Samsun a *Solanum* pěstovaných ve skleníku a listy rostlin *Arabidopsis thaliana* pěstovaných v *in vitro* podmínkách byly používány pro fluorimetrické stanovení enzymové aktivity HDAC, detekci HDAC metodou Western Blot a pro testování vlivu oxidu dusnatého (NO) na aktivitu histondeacetylasy.

3.1.3.1 Pěstování rostlin ve skleníku

Semínka tabáku a *Arabidopsis* byla zaseta do květináčů o průměru 12 cm se zahradnickým substrátem (rašelina s vyzrálým kůrovým humusem a s vysokým obsahem organických látek, pH= 5-7) a dále byla pěstována ve skleníku při 25°C (obr. 13). Po vyklíčení byly rostliny postupně protrhávány na celkový počet 2 rostlin na květináč u tabáku a 3 rostlin na květináč v případě *Arabidopsis*.

Listy z rostlin *A. thaliana* byly sklizeny od 20. dne od vysetí semen v týdenních intervalech, poslední sklizení bylo provedeno 41. den. Listy *N. tabacum* byly sklizeny v období mezi 7-20. týdnem od vysetí semen. Takto sklizené listy byly pro další práci uchovávány v mrazáku při - 50 °C.



Obr. 13 a) *Nicotiana tabacum*



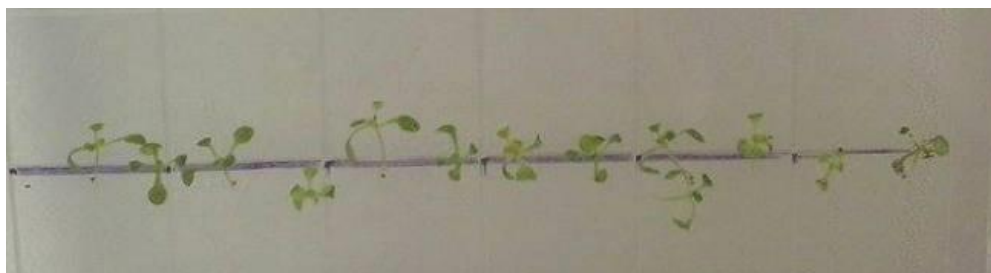
b) *Arabidopsis thaliana*

Zamrazené listy *S. habrochaites*, které byly uchovávány při -80°C , byly poskytnuty Mgr. Terezou Tichou. Listy rostlin *S. habrochaites* byly používány pro detekci HDAC metodou Western blot a pro fluorimetrické stanovení aktivity HDAC.

3.1.3.2 Pěstování rostlin *in vitro*

Semenáčky *A. thaliana*, byly pěstovány *in vitro* na MS agaru (0,23% MS sůl, 0,05% MES hydrát, 1% sacharosa, 0,8% agar; úprava pH pomocí KOH na 6,1).

Do sterilních Petriho misek bylo nalito 40 ml sterilního MS média s agarem a na ztuhlém médiu byla následně sázena vysterilizovaná semínka *A. thaliana*. Semínka byla sterilizována 70% roztokem ethanolu, ve kterém byla protřepávána po dobu 30 sekund, a poté byla 3x promyta sterilní vodou. Semínka byla sázena ve dvou řadách s rozstupem 0,5-1 cm (obr. 14). Petriho misky s vysetými semeny *A. thaliana* byly umístěny do fytotronu (12 h den, 12 h noc, 25°C). Sklizení nadzemní části rostlin bylo provedeno po 10 dnech a 20 dnech od vysetí semínek.

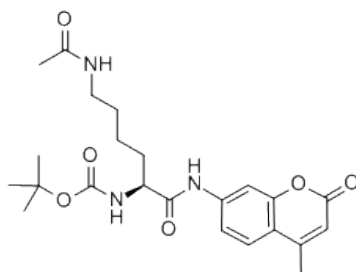


Obr. 14 Pěstování *Arabidopsis thaliana in vitro* na MS médiu

3.2 Použité metody

3.2.1 Fluorimetrické stanovení aktivity HDAC

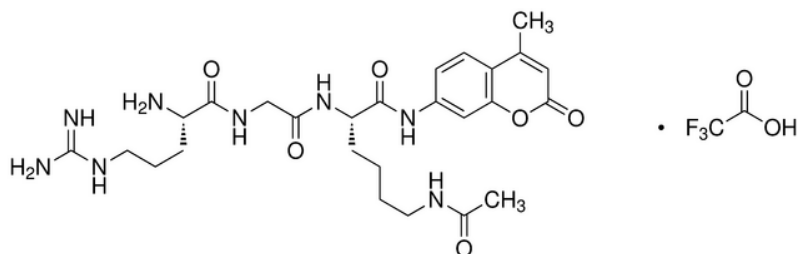
Fluorimetrická metoda pro stanovení aktivity HDAC je založena na deacetylaci substrátu Boc-Lys(Ac)-AMC (N-(4-Methyl-7-kumarinyl)-N- α -(t-butoxykarbonyl)-N ω -acetyllysinamidu) (obr. 15) histondeacetylase a na jeho následném štěpení trypsinem (EC 3.4.21.4). Trypsin štěpí peptidovou vazbu na karboxylové straně nechráněného lysinu. Vzniká tak Boc-Lys a fluoreskující 7-amino-4-methyl-kumarin (AMC), který je následně detekován při vlnových délkách excitace $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm a emise $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm. Uvolněné množství AMC je přímo úměrné aktivitě HDAC v analyzovaném vzorku.



Obr. 15 Boc-Lys(Ac)-AMC

(http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1311897.htm, 21.4.2014)

Jako substrát byl kromě Boc-Lys(Ac)-AMC používán také fluorogenní substrát N-acetyl-Arg-Gly-Lys(Ac)-7-amido-4-methylkumarin trifluoroacetát (obr. 16). Princip stanovení aktivity HDAC za použití tohoto substrátu je totožný jako v předchozím případě.



Obr. 16 N-acetyl-Arg-Gly-Lys(Ac)-7-amido-4-methylkumarin trifluoroacetát

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/05511?lang=en®ion=CZ>, 21.4.2014)

3.2.1.1 Jednokroková metoda stanovení aktivity HDAC

V případě jednokrokové metody probíhá inkubace substrátu s enzymem a trypsinem v jednom kroku.

Do jamky 96-jamkové destičky bylo pipetováno nejprve 50 μ l daného vzorku nebo standardu, poté se přidalo 50 μ l reakčního HDAC pufru s přídavkem trypsinu o koncentraci 2 mg/ml a směs se nechala 10 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Nakonec se přidalo 80 μ l pracovního roztoku substrátu o koncentraci 0,1 mM a měřila se změna fluorescence v čase při 30°C (u lidské HDAC2 při 37°C) po dobu 50 minut v 5 minutových intervalech při $\lambda_{\text{ex}} = 390$ nm a $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm. Měření bylo prováděno na readeru Synergy HT.

3.2.2.2 Dvoukroková metoda stanovení aktivity HDAC

U dvoukrokové metody nejprve probíhá inkubace s enzymem nebo vzorkem obsahujícím HDAC, kdy dojde o odštěpení acetylové skupiny z lysinu, a teprve poté se enzym nechá inkubovat s trypsinem. Ten je součástí „stop roztoku“, který dále obsahuje inhibitor HDAC trichostatin A (TSA).

Do 96-jamkové destičky bylo postupně napipetováno 60 μ l reakčního HDAC pufru, 10 μ l vzorku (v případě blanku je vzorek nahrazen reakčním pufrem) a 50 μ l pracovního roztoku substrátu o koncentraci 0,3 mM. Finální koncentrace substrátu v jamce byla 125 μ M. Následně se směs v jamce nechala inkubovat po dobu 30 minut při 30 nebo 37°C (v závislosti na typu vzorku) za stálého třepání. Po této inkubaci se do jamky přidalo 80 μ l „stop roztoku trypsin/TSA“ a nechala se opět proběhnout inkubace při 30°C po dobu 20 minut za stálého třepání. Po zreagování se změnila změna fluorescence při $\lambda_{\text{ex}} = 390$ nm a $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm. Měření bylo opět prováděno na readeru Synergy HT.

Kromě 96-ti jamkové destičky byla pro měření s komerční rekombinantní HDAC 2 používána také destička pro analýzu vzorků v mikrolitrových objemech (Take 3, Biotek). Vzorky pro měření se připravily následovně: v 0,5ml mikrozkuhavce bylo smícháno 10 μ l substrátu Boc-Lys(Ac)-AMC, x μ l enzymu HDAC 2 o c = 75 mM a (14-x) μ l reakčního HDAC pufru. Směs byla po promíchání inkubována 30 minut při 30/37°C v závislosti na původu vzorku. Poté bylo do mikrozkuhavky napipetováno

16 μ l „stop roztoku“ a směs byla inkubována dalších 20 minut, opět při 30°C. Následně byly 2 μ l této reakční směsi nanесeny na destičku Take 3 a byla změřena změna fluorescence při λ_{ex} = 360 nm a λ_{em} = 460 nm.

Množství vzniklého 7-amino-4-methyl-kumarinu bylo kvantifikováno na základě kalibrační přímky připravené s komerčním AMC. Jeho zásobní roztoku byl připraven rozpuštěním 7-amino-4-methyl-kumarinu v 1 mM DMSO. Pracovní roztoky byly připraveny ředěním zásobního roztoku v reakčním HDAC pufru.

3.2.1.3 Měření aktivity komerční lidské HDAC-2

Charakteristika enzymu: Lidská HDAC2 s C-terminální histidinovou kotvou, M_r = 60 kDa, aktivita: 1 jednotka = množství enzymu schopné deacetylovat 1 pmol substrátu za 1 min při 37°C.

Měření bylo provedeno oběma metodami, jak bylo popsáno v kapitolách 3.2.1.1 a 3.2.1.2 s inkubacemi a měřením kinetiky při 37°C.

Použité roztoky:

Reakční pufr: 50mM Tris-HCl, pH 8,0, 10mM NaCl, 0,25mM EDTA (sodná sůl), 1mM DTT

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

3.2.1.4 Měření aktivity HDAC v rostlinných extraktech

Extrakty byly připravovány homogenizací v třecí misce s mořským pískem při chlazení ledem. Po rozetření vzorku byl přidán extrakční pufr v poměru 4 ml extrakčního pufru na 1 g rostlinného materiálu. V následujícím kroku se na každý 1 g rostlinného materiálu přidalo 850 μ l 4M NaCl. Směs se nechala extrahovat 30 minut na ledu za občasného třepání a následně se centrifugovala při 16 000 g a 4°C po dobu 20 minut.

Přečišťování rostlinných extraktů od nízkomolekulárních látek bylo po centrifugaci provedeno gelovou chromatografií na kolonkách NAP-5 (GE Healthcare). Kolonky byly nejprve ekvilibrovány ekvilibračním pufrem (3x 2,5 ml), poté byl nanесen vzorek

(500 μ l). Po jeho vsáknutí byl přidán 1 ml elučního pufru a do mikrozkuhavky byl jímán 1 ml eluátu.

Měření bylo provedeno oběma metodami (viz. uvedeno v kapitolách 3.2.1.1 a 3.2.1.2)

Použité roztoky:

Ekvilibrační a eluční pufr: 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM NaCl, 0,25mM EDTA (sodná sůl), 1mM DTT

Extrakční pufr: 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM NaCl, 0,25mM EDTA (sodná sůl), 1mM DTT

4M NaCl pro extrakci

Reakční pufr: 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM NaCl, 0,25mM EDTA (sodná sůl), 1mM DTT

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

3.2.2 Vliv NO na aktivitu HDAC

Pro tento pokus byly vždy připraveny 2 vzorky. Jeden kontrolní a jeden vzorek pro samotné testování vlivu oxidu dusnatého na aktivitu HDAC za použití rozkladu dusitanu v kyselém prostředí.

Do mikrozkuhavky bylo napipetováno 500 μ l rostlinného extraktu, 500 μ l 40mM HCl s 1mM EDTA Na⁺ a 10 μ l 50mM NaNO₂. V kontrolním vzorku bylo 10 μ l 50mM NaNO₂ nahrazeno 10 μ l destilované vody. V případě rekombinantního enzymu bylo smícháno 25 μ l HDAC 2 s 25 μ l pufru a bylo přidáno 0,5 μ l 50mM NaNO₂ nebo vody. Daná směs byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Následovně byla standardním způsobem změřena aktivita 2-krokovou endpoint metodou při vlnových délkách excitace $\lambda_{ex} = 360$ nm a emise $\lambda_{em} = 460$ nm.

Použité roztoky:

Reakční pufr: 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM NaCl, 0,25mM EDTA (sodná sůl), 1mM DTT

Roztok pro reakci s NO: 40mM HCl, 1mM EDTA Na⁺, 50mM NaNO₂.

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

3.2.3 Stanovení obsahu proteinů metodou Bradfordové

Pro stanovení celkového obsahu proteinů ve vzorku byla používána metoda Bradfordové. Do jednotlivých jamek 96-jamkových mikrodestiček bylo postupně pipetováno 45 μ l deionizované vody, 5 μ l vzorku nebo standardu BSA o dané koncentraci a 200 μ l pracovního roztoku činidla Bradfordové. Po 5 minutové inkubaci byla na readeru změřena absorbance při 595 nm. Kalibrační standardy BSA měly hodnoty koncentrací v 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.

Pracovní roztok činidla Bradfordové: zásobní roztok Coomassie Brilliant Blue ředěný destilovanou vodou v poměru 1:4.

3.2.4 SDS-PAGE

Metoda SDS-PAGE umožňuje rozdělení proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Využívá schopnosti proteinů vázat dodecylsulfát sodný (SDS), který způsobuje, že náboje na postranních zbytcích aminokyselin jsou vůči náboji sulfátových skupin zanedbatelné, proteiny tak získávají uniformní náboj a jejich migrace v elektrickém poli od katody k anodě je závislá pouze na velikosti molekuly.

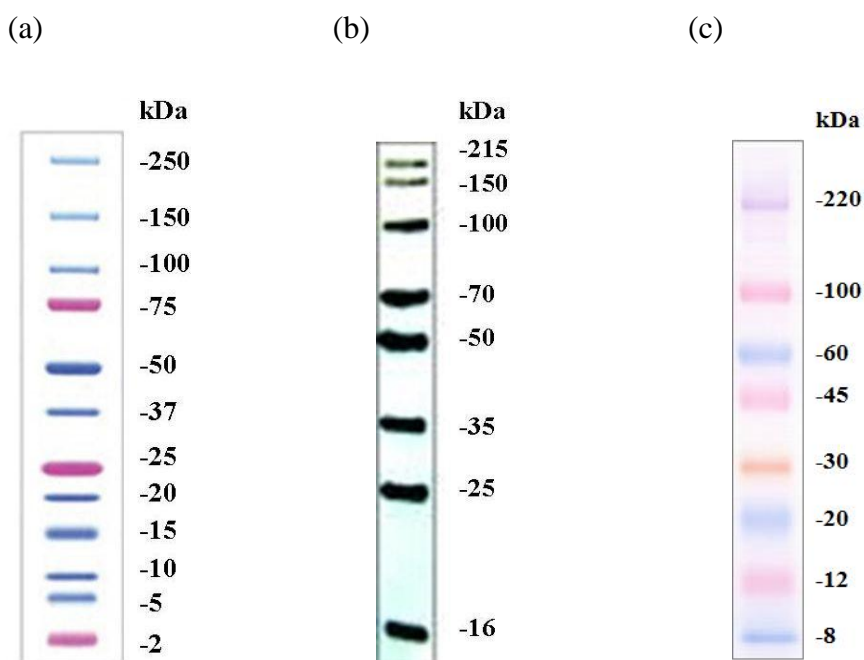
Přítomnost SDS a redukčního činidla β -merkaptoethanolu, který se používá při přípravě vzorků, vede k rozrušení kvarterní struktury proteinů. Proto lze po separaci složených proteinů pozorovat pouze jejich podjednotky.

Pro separaci proteinů metodou SDS-PAGE byl vždy připraven 10% dělicí gel o pH 8,8 a 4% zaostřovací gel o pH 6,8. Dělení v zaostřovacím gelu probíhalo při konstantním napětí 120 V, pro separaci v dělicím gelu bylo zvýšeno na 180 V.

Příprava vzorků pro SDS-PAGE probíhala tak, že vzorek proteinu byl smíchán s Laemmliho vzorkovacím pufrům v poměru 3:1. Laemmliho vzorkovací pufr byl

připraven ze zásobního Laemmliho pufru, ke kterému se v poměru 9:1 přidal β -merkaptoethanol. Směs vzorku s pufrům byla na 10 minut vložena do termobloku vyhřátého na 95°C. Po ochlazení na ledu byly takto připravené vzorky centrifugovány při laboratorní teplotě 1200 rpm, 5 minut) a odpovídající objem vzorku byl nanesen do jamky gelu umístěného v elektroforetické komůrce. U standardů molekulové hmotnosti (BioRad a Serva) bylo nanášeno 5 μ l bez předchozí inkubace v termobloku.

Jako standard molekulové hmotnosti byl použit komerční Precision Plus Protein Dual Xtra 2-250 kDa (BioRad, obr. 17a). Jedná se o směs dvanácti purifikovaných rekombinantních proteinů, z nichž je 9 obarveno modře. Tři proteiny o molekulové hmotnosti 2, 25 a 75 kDa jsou obarveny růžově a slouží jako referenční indikátory. Dále byl použit komerční Western Blot Protein Standard 16-215 kDa (Serva, obr. 17b), který se skládá ze směsi osmi purifikovaných rekombinantních proteinů, a komerční ColorBurst™ Electrophoresis Marker 8-220 kDa (Sigma-Aldrich, obr. 17c) skládající se z 8 polypeptidů konjugovaných s barvivem.



Obr. 17 Používané molekulové markery

Polyakrylamidový gel po separaci proteinů byl dále používán pro metodu Western blot nebo byl barven barvivem Coomassie Blue za účelem detekce proteinů. Při barvení

byl gel namočen do roztoku Coomassie Blue R250, ve kterém byl při laboratorní teplotě ponechán 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.

Použité roztoky:

Coomassie Brilliant Blue R250

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

Laemmliho pufr: 0,125M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 0,2% bromfenolová modř

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

V Tab. 1 je uvedeno složení roztoků pro přípravu 2 gelů pro skla se spacery 0,75 mm.

Tab. 1 Složení dělicího a zaostřovacího gelu (množství je uvedeno v ml).

typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	1,5 M Tris- HCl, pH = 8,8	0,5 M 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

3.2.5 Western blot

Metoda Western blot používaná k detekci specifického proteinu se skládá ze 3 kroků: separace proteinů pomocí SDS-PAGE, transfer proteinů z polyakrylamidového gelu na membránu (nitrocelulosa, PVDF) a imunochemická detekce pomocí specifické protilátky.

Western blot byl proveden v uspořádání „tank blotting“ nebo v blotovacím zařízení Trans-Blot Turbo, který slouží pro rychlý transfer proteinů. Při „tank blotingu“ byla do blotovací komůrky s pufrům vkládána uzavřená kazeta, která je od černé strany kazety skládána v uspořádání: porézní houbička, filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír, porézní houbička. Pro přenos, který probíhal přes noc, byl nastaven proud 0,8 mA/cm², pro dvouhodinový transfer byl proud zvýšen na 3,75 mA/cm². Při použití zařízení Trans-Blot Turbo bylo napětí nastaveno na 25 V a 2,5 A a doba přenosu trvala 7 minut v uspořádání ze strany od katody: blotovací papír, gel, membrána a blotovací papír. Membrány s blotovacími papíry byly před použitím

10 minut namočený v blotovacím pufru. PVDF membránu bylo nutno před použitím namočit na 15 sekund do methanolu.

Úspěšnost transferu proteinů z gelu na membránu byla ověřena barvením proteinů roztokem Ponceau S. Membrány byly do tohoto barvicího roztoku ponořeny po dobu 30 minut, a poté byly opláchnuty destilovanou vodou, aby došlo k vymytí barviva. Následovala blokáce membrány s přenesenými proteiny.

Nejprve byl zkoušen postup s nitroceluloseovou membránou se standardní blokáci, kdy byla membrána inkubována 2 hodiny v 5% nízkotučném mléce v TTBS za laboratorní teploty. Po této blokáci byla membrána s proteiny ponořena do 5% mléka s primární polyklonální králičí protilátkou proti histodeacetylase HDT3 z *A. thaliana* (ředění 1:2500 v 5% mléce v TTBS). Inkubovalo se přes noc v ledničce. Druhý den byla membrána 3x promyta v 5% mléce v TTBS a poté byla přidána sekundární kozí anti-králičí protilátka značená křenovou peroxidase (HRP, ředění 1:10000) nebo alkalickou fosfatase (AP, ředění 1:5000) v 5% nízkotučném mléce v TTBS. Inkubace trvala 1 hodinu při laboratorní teplotě, po 3x 10 minutovém promytí v TTBS následovala detekce.

Druhý způsob blokáce byl testován podle postupu doporučeného výrobcem protilátek firmou Agrisera. Blokáce probíhala v 5% roztoku nízkotučného mléka v TTBS po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byla k membráně přidána primární protilátka proti *A. thaliana* (ředění 1:2500 v 2,5% mléce v TTBS), nebo primární Ab proti lidské HDAC2 (ředění 1:1000 v 2,5% mléce v TTBS), se kterou se nechala inkubovat přes noc v ledničce. Druhý den byla membrána 3x promyta roztokem TTBS, vždy po 10 minutách. Následovala druhá blokáce v 10% roztoku nízkotučného mléka po dobu 10 minut. Pak byla přidána sekundární protilátka značená HRP (ředění 1:10000) nebo AP (ředění 1:5000). Obě sekundární protilátky byly k membráně nanášeny v 2,5% mléce v TTBS. Inkubace trvala 1 hodinu při laboratorní teplotě. Nakonec se membrána 6x promyla v roztoku TTBS, vždy po dobu 10 minut.

K membráně značené HRP se přidaly 3 ml roztoku komerčního luminolu (reakční pufr a reagent v poměru 2:1). Po 5 minutové inkubaci byla membrána skenována dokumentačním systémem C-digit (Li-Cor) při vysoké citlivosti po dobu 12 minut. V případě značení AP se k membráně na 10 minut přidalo 2,5 ml roztoku NBT/BCIP.

Barvicí roztok se slil, membrána se opláchla destilovanou vodou a byla vzniklé zbarvení bylo detekováno dokumentačním systémem GelDoc (Biorad).

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

Komerční luminol (Sigma): reakční pufr a reagent v poměru 2:1

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

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

Primární protilátka:

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

(b) komerční králičí primární protilátka proti lidské HDAC2 (1:1000 v 2,5% nízkotučném sušeném mléku v TTBS)

Sekundární protilátka:

(a) komerční sekundární kozí anti-králičí protilátka značená křenovou peroxidasou (1:10000 v 2,5% nízkotučném sušeném mléku v TTBS)

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

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

4 Výsledky a diskuse

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo především zavedení metody fluorimetrické analýzy aktivity HDAC v rostlinných extraktech s její následnou aplikací na modelový rostlinný systém. Dále byly optimalizovány podmínky pro detekci rostlinných HDAC prostřednictvím Western blotu.

4.1 Stanovení aktivity HDAC

Pro fluorimetrické stanovení aktivity byla vybrána jednokroková kinetická a dvoukroková endpoint metoda, jejichž princip byl publikován v literatuře (Wegener *et al.*, 2003a, 2003b).

4.1.1 Fluorimetrické stanovení aktivity HDAC jednokrokovou metodou

Při zavádění metody bylo nejprve měření provedeno s komerční rekombinantní lidskou HDAC2, která v dalších měřeních s vzorky připravenými z rostlinných extraktů sloužila jako pozitivní kontrola. Nejprve bylo testováno rozmezí hodnot pro nastavení citlivosti fotonásobiče readeru pro detekci fluorescence produktu reakce.

Enzymová reakce byla sledována po dobu 10 minut. Bylo testováno nastavení citlivosti v hodnotách $S = 25, 70$ a 80 . Jako vhodné se prokázalo měření při citlivosti $S = 70$, hodnota $S = 80$ už byla pro měření rekombinantního enzymu příliš vysoká. Při citlivosti 25 byla detekce aktivity HDAC také možná, ale jednalo se o dolní limit a pro reálné vzorky s nižší aktivitou HDAC by její detekce už nebyla možná (viz. tab. 2).

Pro komerční lidskou HDAC2 je jednotka aktivity definována jako množství enzymu schopné deacetylovat 1 pmol substrátu za 1 min při 37°C (Sigma-Aldrich).

Tab. 2 Testování vhodné citlivosti readeru Synergy HT pro detekci 7-amino-4-methylkumarinu AMC při $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm a $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm; $t = 10$ min, $t = 37^\circ\text{C}$, $c_{(\text{HDAC}2)} = 40$ $\mu\text{g/ml}$.

citlivost S	relativní aktivita enzymu		
	25	70	80
HDAC2	1	$46 \cdot 10^3$	> detekční limit přístroje

Při opakování měření blanku se vyskytl problém vysokého rozptylu hodnot, některé z naměřených hodnot byly dokonce vyšší než stanovené hodnoty pro samotné vzorky, včetně rekombinantního proteinu. Detekovaný signál, v případě vzorku obsahujícího HDAC, by měl v čase narůstat, dokud je štěpen deacetylovaný substrát trypsinem. V blanku by ke štěpení substrátu a nárůstu fluorescence nemělo docházet, zdůvodň absence HDAC. Substrát by tedy neměl být trypsinem štěpen za uvolnění AMC, protože lysin, na jehož karboxylové straně trypsin štěpí peptidovou vazbu, je nadále chráněn (Wegener *et al.*, 2003a). Z tohoto důvodu byly následující experimenty zaměřeny na testování fluorimetrické dvoukrokové endpoint metody s oddělenými inkubacemi substrátu s HDAC a trypsinem. Výhodou tohoto experimentálního uspořádání je 5-násobně menší spotřeba vzorku než v případě jednokrokové kinetické metody.

4.1.2 Fluorimetrické stanovení aktivity dvoukrokovou metodou

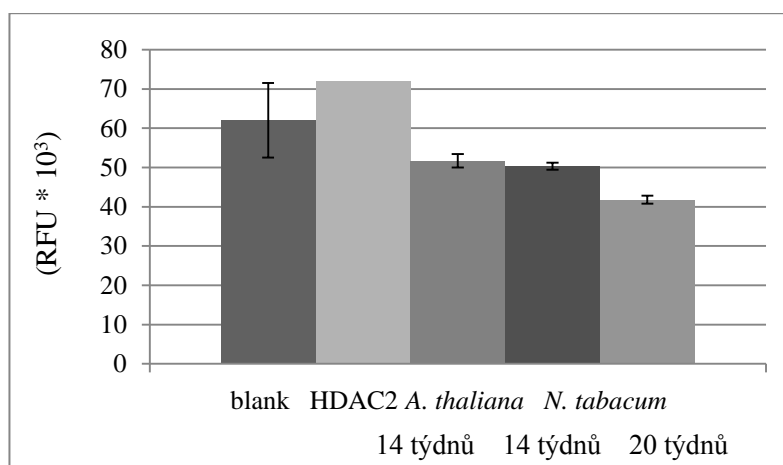
U dvoukrokové endpoint metody nejprve probíhá inkubace substrátu s enzymem a až poté s trypsinem. Kromě toho je enzymová reakce katalyzována HDAC ve druhém kroku potlačována přidávkem reversibilního inhibitoru HDAC – trichostatinu A (TSA) (Wegener *et al.*, 2003a).

Z důvodu vysoké odezvy pro blank v případě jednokrokové kinetické metody byl původně používaný substrát Boc-Lys(Ac)-AMC porovnáván s dalším fluorogenním substrátem N-acetyl-Arg-Gly-Lys(acetyl)-7-amido-4-methylkumarinem. Měření bylo uskutečněno s rekombinantní lidskou HDAC2. V případě použití N-acetyl-Arg-Gly-Lys(acetyl)-7-amido-4-methylkumarinu jako substrátu byla naměřená fluorescence odpovídající blanku dokonce vyšší než fluorescence pro vzorek HDAC2 a dané měření se muselo zopakovat při nižší citlivosti readeru $S = 60$ (tab. 3). Citlivost $S = 70$ byla pro blank tohoto substrátu natolik vysoká, že odpovídající hodnota fluorescence nebyla detekovatelná (tab. 3). Signál odpovídající aktivitě enzymu ve vzorku v případě použití obou substrátů byl srovnatelný (tab. 3). Pro další měření byl použit substrát Boc-Lys(Ac)-AMC.

Tab. 3 Porovnání substrátů Boc-Lys(Ac)-AMC a N-acetyl-Arg-Gly-Lys(acetyl)-7-amido-4-methylkumarinu. Inkubace při 37°C, fluorescence (RFU) měřena při $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm; $c_{\text{HDAC2}} = 55$ $\mu\text{g/ml}$.

vzorek	Boc-Lys(Ac)-AMC		N-acetyl-Arg-Gly-Lys(Ac)-7-amido-4methylkumarin trifluoroacetát	
	S = 70	S = 60	S = 70	S = 60
blank	63960	20605	> 99999	36802
HDAC2	81366	26419	79259	25884

Dvoukroková metoda byla použita pro porovnávání aktivity rekombinantní lidské HDAC2 s aktivitou HDAC v rostlinných extraktech *Arabidopsis* a tabáku. Z důvodu malého množství rekombinantní HDAC2, která byla k dispozici, bylo měření pro lidskou HDAC2 provedeno pouze pro jednu jamku s daným vzorkem (obr. 18).



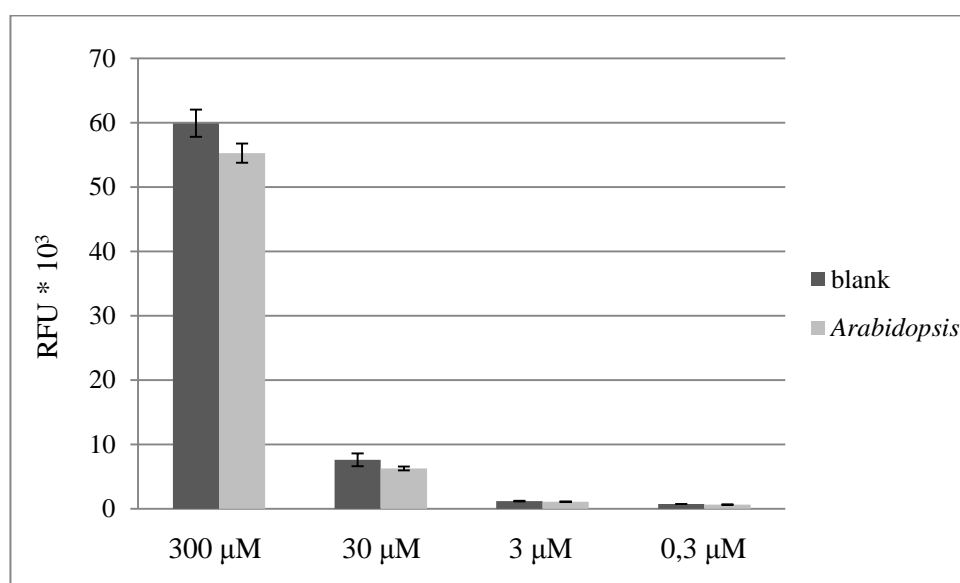
Obr. 18 Porovnání fluorescenčního signálu odpovídajícího aktivitě rekombinantního enzymu HDAC2 a aktivitě HDAC v rostlinných extraktech. Inkubace HDAC2 při 37°C, inkubace HDAC rostlinných extraktů při 30°C. $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm; S = 60. Měření s HDAC2 provedeno bez technického replikátu, $c_{\text{HDAC2}} = 0,040$ mg/ml.

Dané výsledky mimo jiné naznačují, že by na aktivitu rostlinné HDAC mohl mít vliv stáří rostliny. V případě vzorků ze zamražených listů (14 týdnů starých rostlin *Arabidopsis* a tabáku) byly naměřeny hodnoty vyšší než u vzorku připraveného z čerstvých listů 20 denních rostlin tabáku.

Z důvodů vysoké odezvy blanku byla stanovena fluorescence samotného blanku bez inkubace: po 1. kroku dané enzymové reakce (reakční HDAC pufr + enzym, který je nahrazen v případě blanku HDAC reakčním pufrem) a následně i po 2. kroku reakce

(po přidavku „stop roztoku“ s trypsinem a TSA). Hodnoty fluorescence pro blank po 1. kroku dané reakce byly proti očekávání vysoké, naopak po přidavku „stop roztoku“ došlo k jejich částečnému snížení.

Pro dvoukrokovou metodu byla testována závislost intenzity fluorescence na koncentraci substrátu. Z důvodu, že nebyla k dispozici rekombinantní HDAC2, bylo měření provedeno pouze s rostlinným extraktem z *A. thaliana*. Byl pozorován nárůst hodnoty reakční rychlosti (aktivity) s nárůstem koncentrace substrátu, k tomuto trendu však docházelo i v případě blanku (obr 19). Ve všech případech byla odezva pro blank opět vyšší než pro vzorek připravený z rostlinného extraktu.



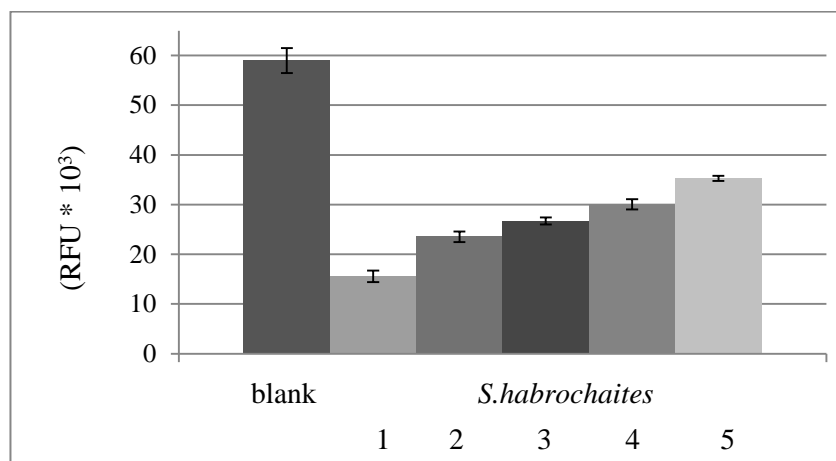
Obr. 19 Závislost intenzity fluorescence (RFU) na měnící se koncentrací substrátu. Výchozí 300μM substrát byl postupně naředěn 10-1000x, inkubace při 30°C. $\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$, $S = 70$.

Pro další optimalizaci podmínek byl testován vliv objemu použitého extrakčního pufru obsahujícího 4M NaCl. Rostlinné extrakty byly připraveny podle tabulky 4.

Tab. 4 Poměry extrakčních činidel pro extrakci HDAC na 1 g listů rostlinného materiálu.

Vzorek	extrakční pufr (ml/g rostl. materiálu)	4M-NaCl (μl/g rostl. materiálu)
1	0,5	106
2	1	213
3	2	425
4	3	638
5	4	850

I v tomto případě byly zaznamenány problémy s vysokou odezvou blanku (obr. 20). Nejvyšších hodnot fluorescence bylo dosaženo při extrakci 4 ml extrakčního pufru s 850 μ l 4M NaCl na 1 g rostlinného materiálu. Získané výsledky poukazují na možnost zhášení fluorescence vlivem látek přítomných v rostlinných extraktech (obr. 20).



Obr. 20 Vliv přípravy extraktů na hodnoty detekované fluorescence (RFU). Inkubace při 30°C; $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm; S = 70. (1 –0,5 ml extrakčního pufru/1 g FW; 2 –1 ml extrakčního pufru/1 g FW; 3 –2 ml extrakčního pufru/1 g FW; 4 –3 ml extrakčního pufru/1 g FW; 5 – *S. habrochaites*: 4 ml extrakčního pufru/1 g FW).

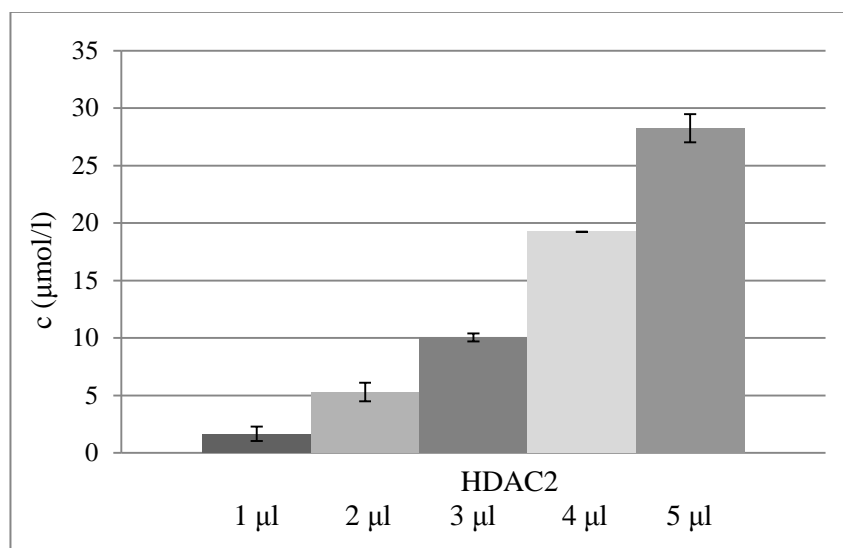
Ukázalo se, že se snižujícím se objemem extrakčních činidel dochází ke snižování detekovaného fluorescenčního signálu, který by měl odpovídat aktivitě HDAC. Příčinou nižších hodnot detekované fluorescence ve vzorcích po extrakci menšími objemy extrakčního pufru může být zhášení látkami obsaženými v rostlinných extraktech. Problematika možného zhášení fluorescence byla proto následně řešena v dalších krocích práce (viz 4.1.4).

4.1.3 Měření aktivity HDAC2 na destičce Take 3

Z důvodů malého množství komerčního HDAC2 enzymu, který byl pro testování k dispozici, bylo další měření realizováno za použití Take 3 destičky. Její výhodou je, že dovoluje měření velmi malých vzorků v objemu jednotek mikrolitrů.

Jako první byla testována závislost fluorescence na odpovídajícím množství enzymu v reakční směsi. Byla potvrzena přímá úměra mezi intenzitou fluorescence a množstvím

enzymu a na základě kalibrační křivky pro 7-amino-4-methylkumarin (AMC) byla dopočítána odpovídající aktivita HDAC (obr. 21). Enzymová reakce katalyzovaná HDAC probíhala 30 minut, poté byla inhibována přidavkem TSA. Kalibrační křivka AMC byla vytvořena v rozmezí koncentrací 100 nmol/l – 10 μ mol/l. Odpovídající hodnoty fluorescence byly získány při $\lambda_{ex} = 360$ nm, $\lambda_{em} = 460$ nm, S = 70.

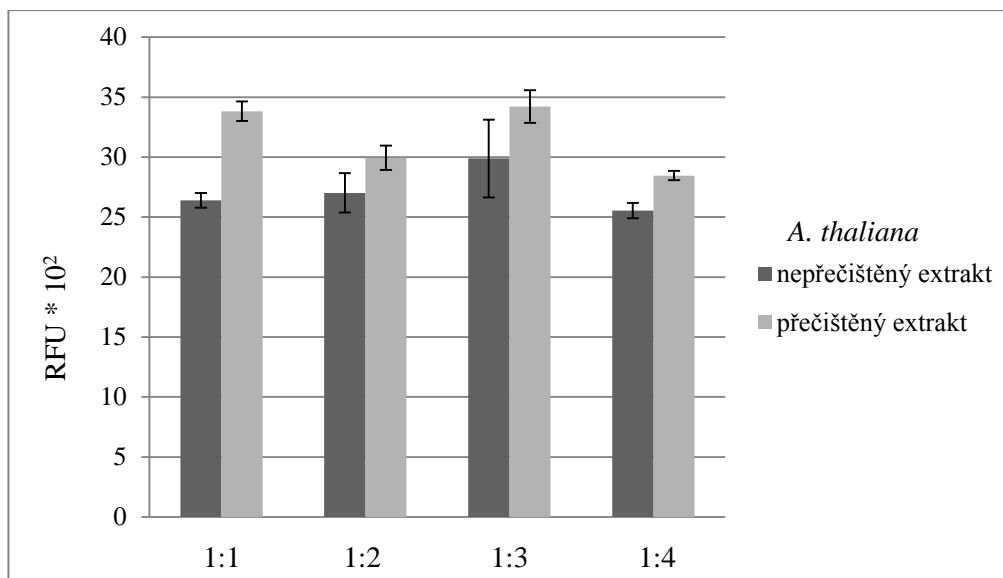


Obr. 21 Lineární závislost koncentrace HDAC2 (μ mol/l) na jejím zvyšujícím se přidavku do reakční směsi. V 1 μ l dané reakční směsi je obsaženo $1,875 \cdot 10^{-3}$ μ g HDAC2.

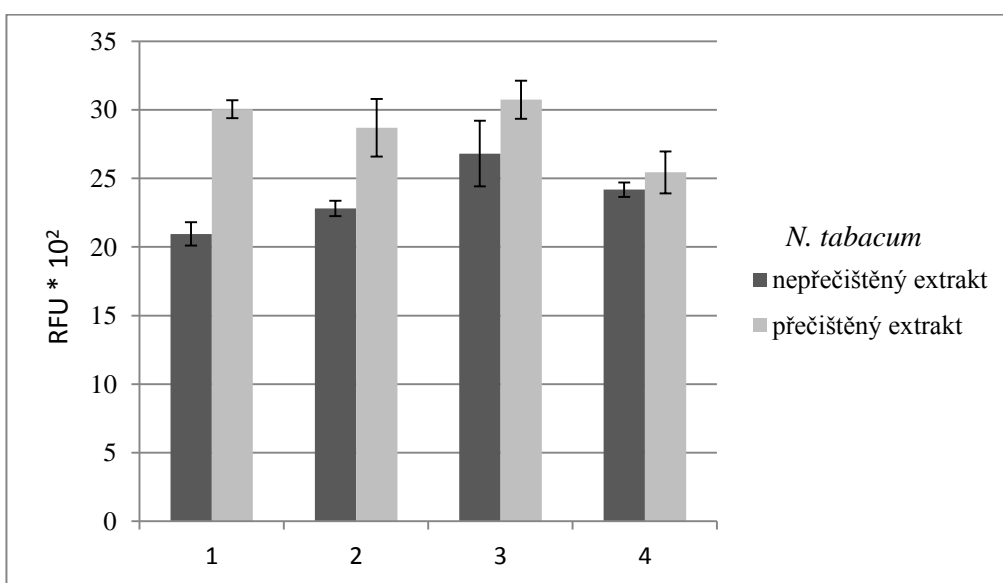
4.1.4 Zhášení fluorescence

Při měření aktivity HDAC v rostlinných extraktech bylo zjištěno, že se snižujícím se objemem extrakčních činidel dochází ke snižování aktivity HDAC, což je v rozporu s předpokladem, že s narůstajícím množstvím HDAC narůstá i odpovídající fluorescence vznikajícího produktu reakce. Příčinou tohoto jevu by mohlo být zhášení fluorescence látkami přítomnými v extraktech rostlinného materiálu. Proto byly rostlinné extrakty přečišťovány gelovou chromatografií na kolonkách pro odstranění nízkomolekulárních látek.

V experimentu byly porovnávány hodnoty fluorescence získané ze vzorků připravených z přečištěných a nepřečištěných rostlinných extraktů *A. thaliana* a *N. tabacum*. Výsledky ukazují, že ke zhášení fluorescence látkami z rostlinného materiálu skutečně docházelo (obr. 22 a 23).



Obr. 22 Vliv přečištění rostlinného extraktu *A. thaliana* (odstranění nízkomolekulárních látek) na fluorescenci při stanovení aktivity HDAC. Inkubace při 30°C; $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$; $S = 70$. (1:1 –1 ml extrakčního pufru/1 g FW; 1:2 –2 ml extrakčního pufru/1 g FW; 1:3 –3 ml extrakčního pufru/1 g FW; 1:4 –4 ml extrakčního pufru/1 g FW).



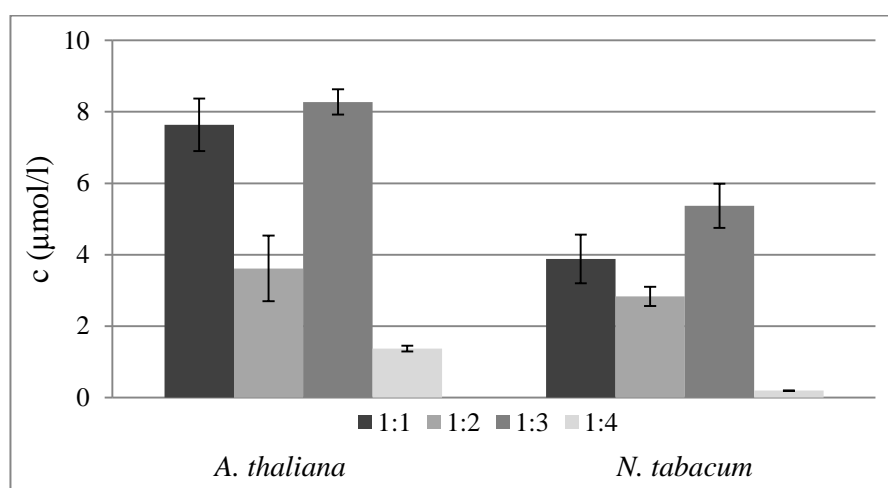
Obr. 23 Vliv přečištění rostlinného extraktu *N. tabacum* (odstranění nízkomolekulárních látek) na fluorescenci při stanovení aktivity HDAC. Inkubace při 30°C; $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$; $S = 70$. (1:1 –1 ml extrakčního pufru/1 g FW; 1:2 –2 ml extrakčního pufru/1 g FW; 1:3 –3 ml extrakčního pufru/1 g FW; 1:4 –4 ml extrakčního pufru/1 g FW).

Srovnatelné výsledky byly získány v experimentech realizovaných s extrakty připravenými z *A. thaliana* i z *N. tabacum*. Při extrakci 1 ml extrakčního pufru

na 1 g FW docházelo k největšímu zhášení fluorescence. Zhášení fluorescence se u jednotlivých vzorků postupně snižovalo se zvyšujícím se ředěním extraktu. Výjimkou byl vzorek *A. thaliana*, pro který byly použity 2 ml extrakčního pufru na 1 g FW. Příčinou by mohl být nedokonale přečištěný příslušný extrakt *A. thaliana*. Rostlinné vzorky je tedy po extrakci nutné zbavit nízkomolekulárních látek přečištěním na kolonce gelovou chromatografií.

Dalo by se očekávat, že největší fluorescence bude naměřena u vzorku po extrakci 1 ml extrakčního pufru na 1 g FW, jelikož se jedná o vzorek nejkonzentrovanejší. Nejvyšších hodnot fluorescence bylo ale získáno při extrakci 3 ml extrakčního pufru s odpovídajícím množstvím 4M NaCl (637,5 μ l) na 1 g rostlinného materiálu. Při vyšším objemu extrakčních činidel byly získány předpokládané nižší hodnoty fluorescence vlivem naředění daného vzorku. Skutečnost, že při extrakci HDAC nižšími objemy extrakčních činidel nebyla odezva nižší než v případě 3 ml/1 g FW, lze vysvětlit dvěma způsoby. První možností je, že odpovídající extrakty obsahující vyšší koncentrace interferujících látek, jejichž vlivem docházelo ke zhášení fluorescence. Další možné vysvětlení je, že použitý objem extrakčních činidel byl pro extrakci většího množství HDAC nedostačující.

Vzorky HDAC z přečištěných rostlinných extraktů tedy vykazovaly vyšší fluorescenci než blank, jejich hodnoty byly zkorigovány a množství HDAC bylo na základě kalibrační křivky AMC (obr. 24).

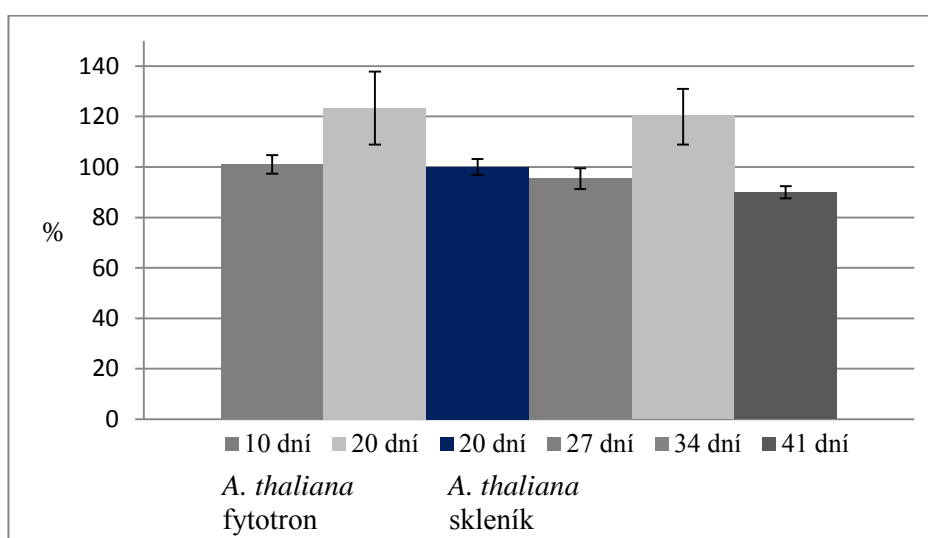


Obr. 24 Koncentrace rostlinných HDAC ve vzorcích připravených z *A. thaliana* a *N. tabacum* v závislosti na objemu extrakčního pufru použitého pro extrakci. Kvantifikováno na základě

kalibrační křivky AMC. (1:1 – 1 ml extrakčního pufru/1 g FW; 1:2 – 2 ml extrakčního pufru/1 g FW; 1:3 – 3 ml extrakčního pufru/1 g FW; 1:4 – 4 ml extrakčního pufru/1 g FW).

4.1.5 Měření aktivity rostlinných HDAC na *Take 3* destičce

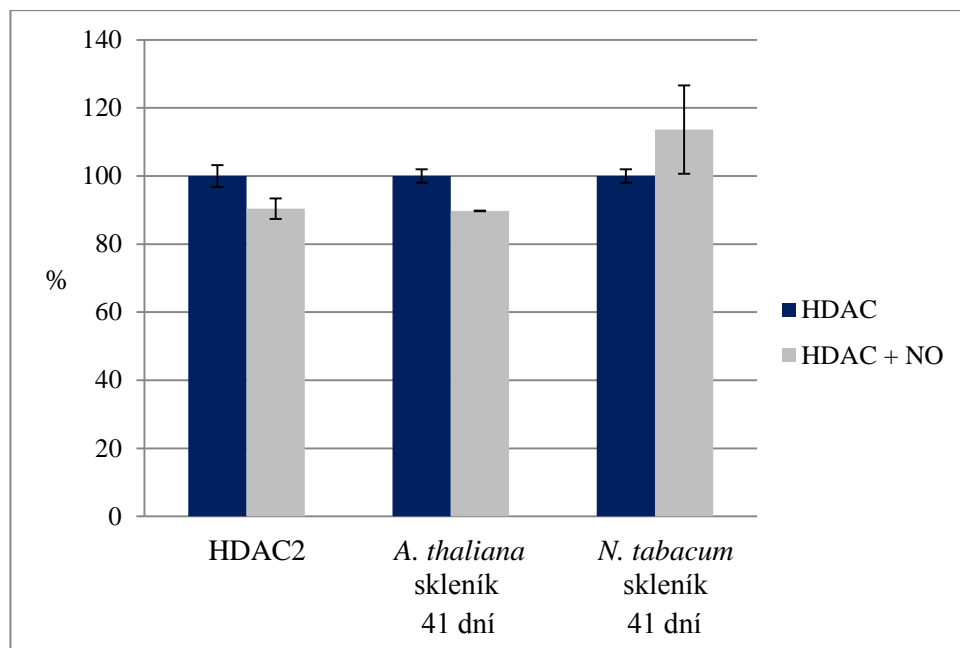
S využitím dvoukrokové metody stanovení aktivity HDAC na *Take 3* destičce byl testován vliv stáří rostliny, vliv podmínek při pěstování rostlin (skleník, fytotron - *in vitro* podmínky na MS médiu) na aktivitu HDAC *A. thaliana* (obr. 25). Získané výsledky z pilotních experimentů poukazují na vliv stáří rostliny a rovněž vliv prostředí na aktivitu HDAC.



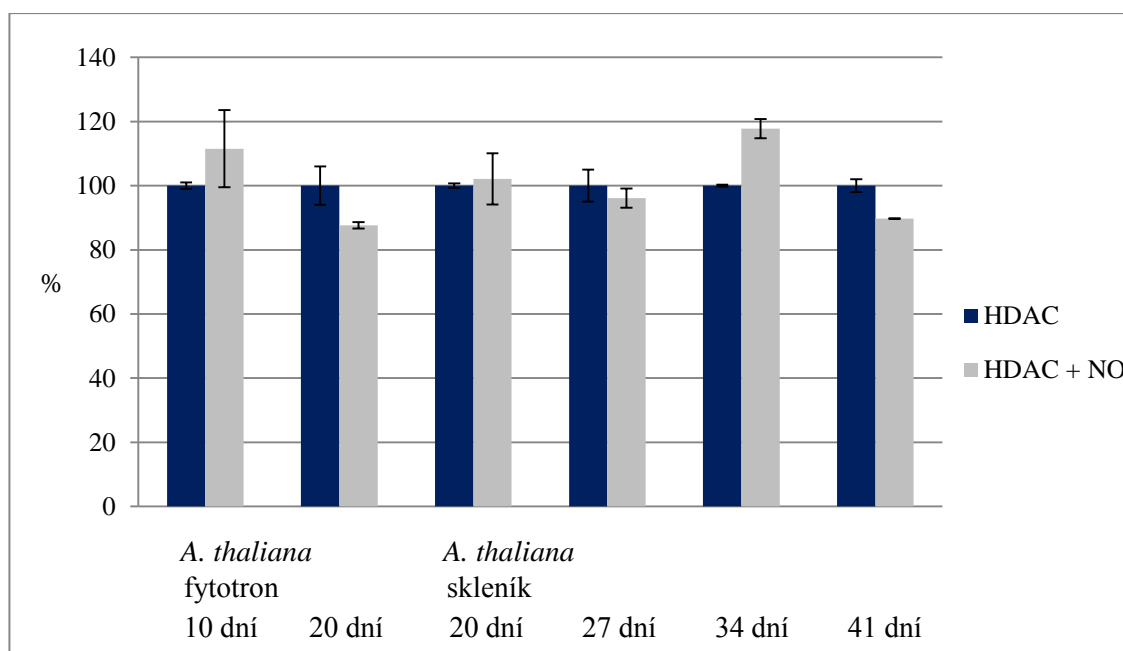
Obr. 25 Porovnání vlivu stáří rostliny a způsobu jejího pěstování na aktivitu HDAC. Uvedeno v relativních jednotkách, porovnáváno vůči *A. thaliana* – 20 dnů, skleník.

4.1.6 Vliv NO na HDAC

U živočišných HDAC byl popsán v literatuře vliv S-nitrosylace na vlastnosti enzymu (Nott *et al.*, 2008). V předložené práci byl pilotně testován vliv dusitanu sodného v kyselém prostředí (donor NO) na aktivitu rostlinné HDAC. U rekombinantního proteinu byl zaznamenán pokles aktivity HDAC. Pro rostlinné vzorky nebyly výsledky jednoznačné (obr. 26-27). Možnost vlivu NO na aktivitu rostlinných HDAC je nutné v následujících experimentech potvrdit.



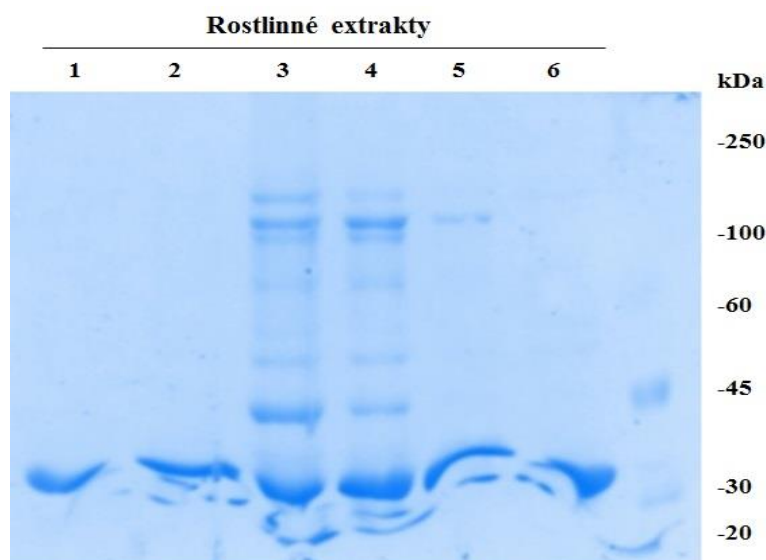
Obr. 26 Vliv NO na HDAC. Aktivita enzymu vyjádřena relativně. HDAC – daný vzorek bez aplikace dusitanu (aktivita = 100%); HDAC + NO – daný vzorek po aplikaci dusitanu.



Obr. 27 Vliv NO na rostlinné HDAC. Aktivita enzymu vyjádřena relativně. HDAC – daný vzorek bez aplikace dusitanu (aktivita = 100%); HDAC + NO – daný vzorek po aplikaci dusitanu.

4.2 Analýza proteinů metodou SDS-PAGE

Metoda SDS-PAGE je dílčím krokem při realizaci metody Western blot. Po barvení gelu na proteiny bylo možné porovnat obsah proteinů v extraktech *N. tabacum* v závislosti na způsobu extrakce (obr. 28).



Obr. 28 Separované proteiny z extraktů *A. thaliana* a *N. tabacum* na polyakrylamidovém gelu po barvení Coomassie Brilliant Blue. (1- *A. thaliana*- 4 ml extrakčního pufru/1 g FW; 2-6 – *N. tabacum*: 2 – 0,5 ml extrakčního pufru/1 g FW; 3 – 1 ml extrakčního pufru/1 g FW; 4 – 2 ml extrakčního pufru/1 g FW; 5 – 3 ml extrakčního pufru/1 g FW; 6 – 4 ml extrakčního pufru/1 g FW), vzorky byly na polyakrylamidový gel nanášeny o objemu 25 μ l.

Jak lze na polyakrylamidovém gelu po barvení Coomassie Brilliant Blue vidět, tak nejvýraznější bandy byly získány u vzorku *N. tabacum* s extrakcí: 1 ml extrakčního HDAC pufru na 1 g FW. Koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovena metodou Bradfordové (tab. 5). Použití pouze 0,5 ml extrakčního pufru/1 g FW je pro extrakci nedostatečné. Jako optimální se jeví použití 1-2 ml extrakčního pufru/1 g FW.

Tab. 5 Celkový obsah proteinů v rostlinných extraktech *A. thaliana* a *N. tabacum* získaný metodou Bradfordové.

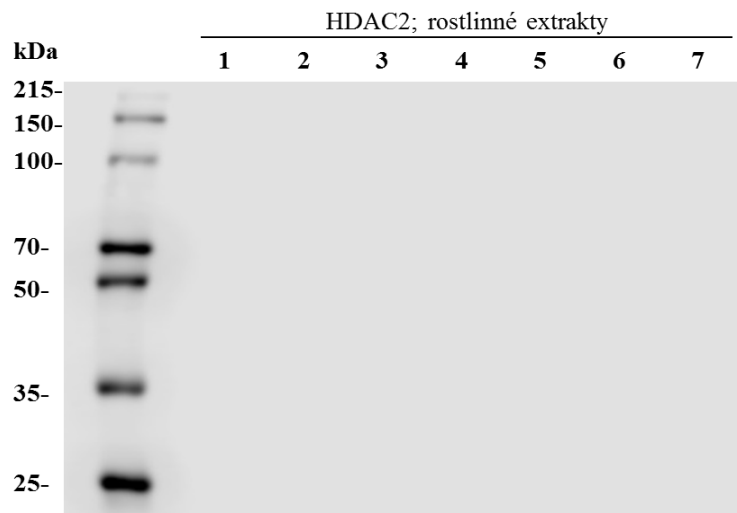
vzorek	rostlina	extrakční pufr (ml) + 4M NaCl (ml)/1g FW	c (mg/ml)
1	<i>A. thaliana</i>	4 + 0,8500	1,443
2	<i>N. tabacum</i>	0,5 + 0,1063	1,335
3	<i>N. tabacum</i>	1 + 0,2125	3,585
4	<i>N. tabacum</i>	2 + 0,4250	3,245
5	<i>N. tabacum</i>	3 + 0,6375	0,912
6	<i>N. tabacum</i>	4 + 0,8500	0,652

4.3 Detekce HDAC metodou Western blot

4.3.1 Optimalizace podmínek – výběr membrány, doby inkubace s primární protilátkou a výběr sekundární protilátky

Podmínky metody Western blot pro detekci HDAC bylo nejprve potřeba optimalizovat, zejména kroky následujících po separaci proteinů pomocí SDS-PAGE. V publikovaných článcích zabývajících se problematikou histondeacetylasy, byl přenos proteinů z polyakrylamidového gelu popsán jak na nitrocelulosovou (Huber *et al.*, 2007), tak na PVDF membránu (Kim *et al.*, 2007).

Jako první byl testován transfer proteinů na nitrocelulosovou membránu v uspořádání „tank blotting“ po dobu 12 hodin. Jako vzorky byly pro analýzu použity extrakty připravené z listů tabáku a *Arabidopsis*. Pro následnou blokaci volných vazebných míst na membráně byl použit 5% roztok nízkotučného mléka v TTBS. Pro imunodetekci byla použita sekundární protilátka značená křenovou peroxidasou (HRP). Po vizualizaci chemiluminiscence dokumentačním systémem nebyl na membráně detekován žádný signál (obr. 29).



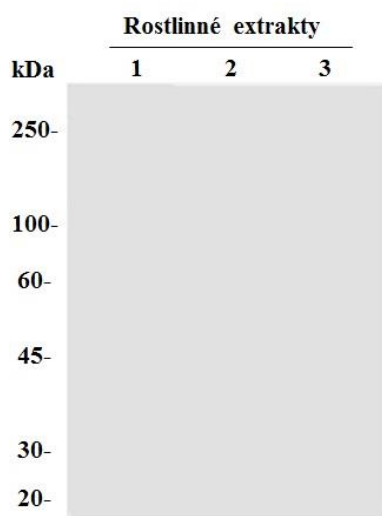
Obr. 29 Detekce HDAC na nitrocelulosově membráně. Pro imunodetekci byla použita králičí primární protilátka proti HDT3 z *Arabidopsis* HDT3 (ředění 1:2500) a sekundární Ab konjugovaná s HRP (ředění 1:10000). (1 – rekombinantní HDAC2 (10 μ l); 2 – extrakt *N. tabacum* (5 μ l); 3 – extrakt *N. tabacum* (10 μ l); 4 - extrakt *N. tabacum* (15 μ l); 5 – extrakt *A. thaliana* (5 μ l); 6 – extrakt *A. thaliana* (10 μ l); 7 – extrakt *A. thaliana* (15 μ l)).

V dalších experimentech byla realizována na PVDF i nitrocelulosové membráně metoda imunodetekce dle protokolu doporučeného výrobcem primární protilátky (firma Agrisera), tj. způsob blokování a promývání membrány. Imunodetekce HDAC proteinů byla úspěšná pouze po transportu proteinů na PVDF membránu (obr. 30, 31).

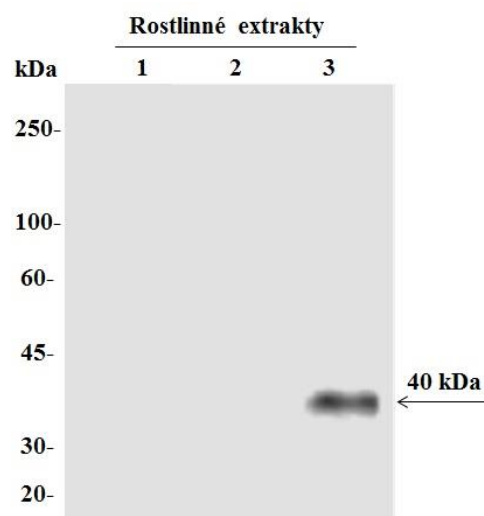
Pro detekci rostlinné HDAC byla k dispozici komerční primární protilátka připravena proti histondeacetylase HDT3 z *Arabidopsis*. Experimenty byly realizovány s extrakty z listů *A. thaliana*. Pro detekci HDAC proteinů byla použita sekundární protilátka značená křenovou peroxidasou (obr. 30) a sekundární Ab značená alkalickou fosfatasou (AP) (obr. 31). Výsledky ukazují, že v tomto experimentálním uspořádání je pro detekci HDAC citlivější použití sekundární protilátky konjugované s AP, jak lze vidět na obr. 31. Chemiluminiscenční metodou byla detekována HDAC pouze u čerstvě připravených extraktů na PVDF membráně. V případě použití sekundární protilátky značené AP byl protein HDAC detekován také v případě zamražených extraktů, u nichž často může docházet k postupné degradaci proteinů. Z pohledu specifity je vhodnější použití sekundární Ab značené HRP. Identitu HDAC by však bylo v navazujících experimentech potřeba potvrdit dalšími metodami např. hmotnostní spektrometrií.

Jak lze vidět na obr. 30b a 31b, tak na obou typech membrán byly kromě bandů odpovídajících HDAC (předpokládaná zdánlivá hodnota pro HDT3 z *A. thaliana* $M_r = 40$ kDa podle firmy Agrisera) zdetekovány bandy o molekulové hmotnosti přibližně 55 kDa, ty by mohly odpovídat větší podjednotce Rubisca. Slabý band o MW 55 kDa byl detekován i na nitrocelulosové membráně (viz. obr. 31a).

(a) nitrocelulosová membrána

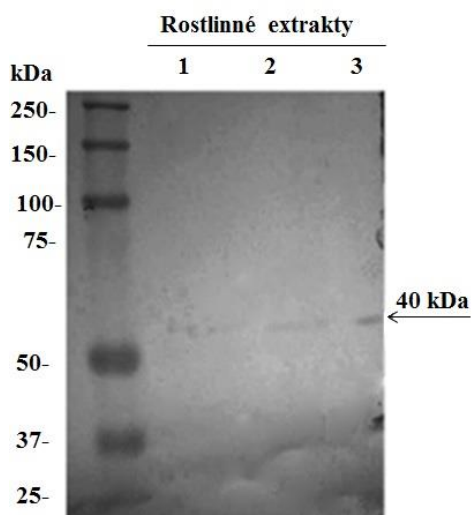


(b) PVDF membrána

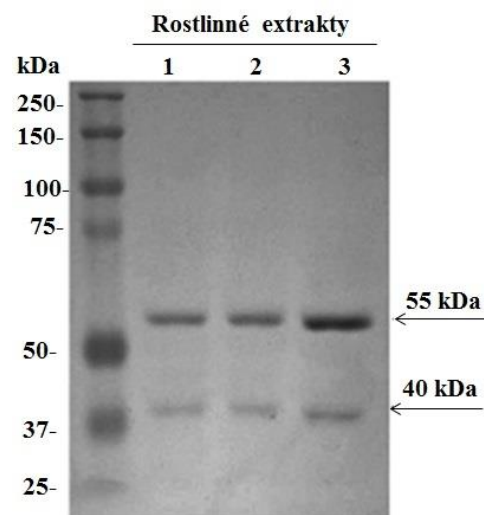


Obr. 30 Detekce HDAC z *A. thaliana* na nitrocelulosové a PVDF membráně s chemiluminiscenční detekcí. Primární Ab proti HDT3 z *Arabidopsis* HDT3 (ředění 1:2500), značení sekundární Ab konjugovanou s HRP (ředění 1:5000). 1- zmražený extrakt *A. thaliana*; 2 - opakovaně rozmražený extrakt *A. thaliana*; 3 - čerstvý extrakt *A. thaliana*). Do jamek gelu bylo naneseno vždy 15 μ l příslušného vzorku.

(a) nitrocelulosová membrána



(b) PVDF mebrána



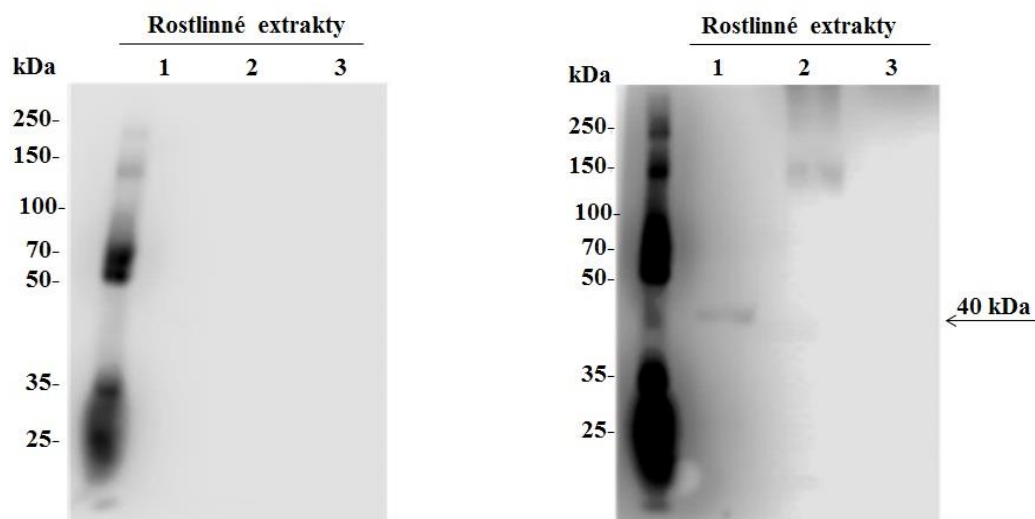
Obr. 31 Detekce HDAC z *A. thaliana* na nitrocelulosové a PVDF membráně s chromogenní detekcí. Primární Ab anti-*Arabidopsis* proti HDT3 z *Arabidopsis* HDT3 HDT3 (ředění 1:2500), značení sekundární Ab konjugovanou s AP (ředění 1:10000). (1- zmražený extrakt *A. thaliana*; 2 - opakovaně rozmražený extrakt *A. thaliana*; 3 - čerstvý extrakt *A. thaliana*). Do jamek gelu bylo naneseno vždy 15 μ l příslušného vzorku.

Důvodem, proč byla nitroceluloseová membrána neúčinná pro přenos a následnou detekci HDAC nebyla účinná, jsou její hydrofilní vlastnosti. Histondeacetylasy jsou obecně velmi konzervovanými hydrofobními proteiny. Dá se tedy předpokládat, že se z tohoto důvodu lépe navázaly na PVDF membránu, která je na rozdíl od nitrocelulosity hydrofobní.

Metoda Western blot pro detekci HDAC byla v dalším kroku optimalizována z hlediska délky inkubace proteinů přenesených na PVDF membránu s primární protilátkou proti HDT3 z *A. thaliana*. Bylo testováno, zda by celková doba analýzy mohla být zkrácena, pokud by byla dostačující pouze 2 hodinová inkubace s primární protilátkou místo původní 12 hodinové inkubace. Výsledky ukazují, že je třeba provést inkubaci proteinů přenesených na PVDF membráně s primární Ab přes noc (obr 32; 33). Opět byla provedena imunodetekce s oběma sekundárními protilátkami.

(a) 2 hodinová inkubace s primární Ab

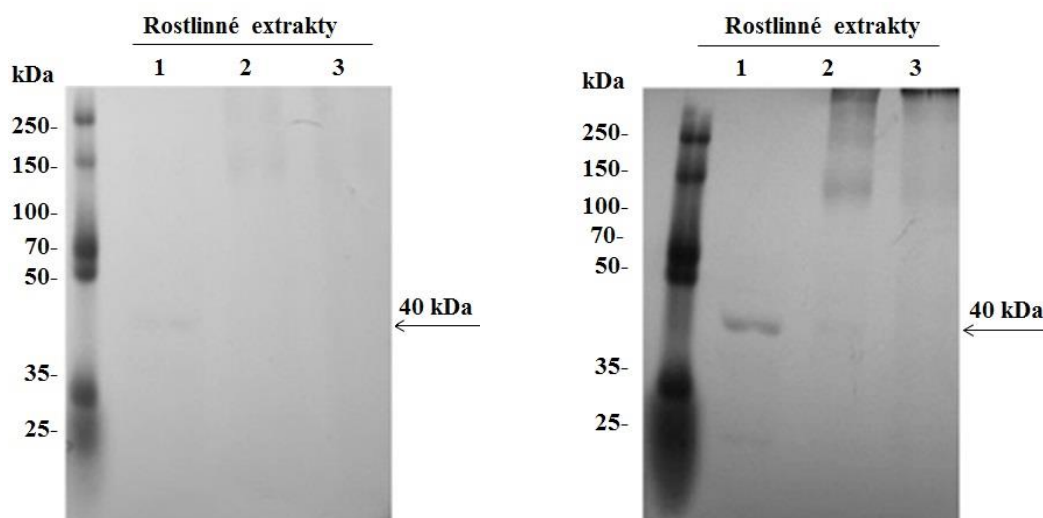
(b) 12 hodinová inkubace s primární Ab



Obr. 32 Testování délky inkubace PVDF membrány s primární protilátkou proti HDT3 z *Arabidopsis* HDT3. Chemiluminiscenční detekce s použitím sekundární Ab konjugované s HRP (ředění 1:5000). 1 - extrakt ze zamraženého listu *A. thaliana*; 2 - extrakt z čerstvého listu *N. tabacum*; 3 - extrakt ze zamraženého listu *N. tabacum*. Do jamek gelu bylo naneseno 15 μ l extraktu.

(a) 2 hodinová inkubace s primární Ab

(b) 12 hodinová inkubace s primární Ab



Obr. 33 Testování délky inkubace PVDF membrány s primární protilátkou proti HDT3 z *Arabidopsis* HDT3. Chromogenní detekce s použitím sekundární Ab konjugované s AP (ředění 1:10000). 1 - extrakt ze zamraženého listu *A. thaliana*; 2 - extrakt z čerstvého listu *N. tabacum*; 3 - extrakt ze zamraženého listu *N. tabacum*. Do jamek gelu byly nanесeny vzorky o objemu 15 μ l.

V daném experimentu byla současně testována možnost použití primární protilátky proti histodeacetylase HDT3 z *Arabidopsis* pro detekci tabákové HDAC. Výsledky analýzy ukazují, že použití dostupné primární protilátky za těchto podmínek pro detekci HDAC z *N. tabacum* není vyhovující (obr 33). Na obr. 33b je po barvení NBT-BCIP na PVDF detekovaný pouze velmi slabý band, který by mohl odpovídat HDAC z tabáku.

4.3.2 Testování specifičnosti primární protilátky s extrakty listů *Solanum habrochaites*

Optimalizovaný postup detekce HDAC metodou Western blot byl použit detekci HDAC v extraktech *S. habrochaites*, s cílem ověřit, zda komerční protilátka proti HDT3 z *A. thaliana* je vhodná také pro detekci HDAC v rostlinách rodu *Solanum*. Dle údajů výrobce protilátky je předpokládána reaktivita protilátky s HDAC z bramboru (*Solanum tuberosum*). Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek extraktu z listů *Arabidopsis*.

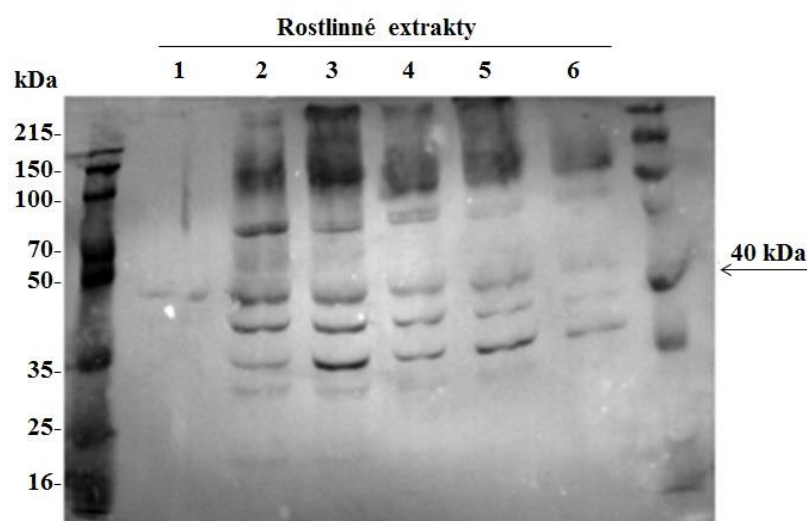
Vzorky rajčat byly připraveny ze zamražených listů. Celkově bylo připraveno 5 vzorků za použití rozdílného objemu extrakčního pufru (tab. 6). Vzorek

pro *Arabidopsis* byl extrahován 4 ml extrakčního pufru a 850 μ l 4M NaCl na 1 g rostlinného materiálu.

Tab. 6 Poměry extrakčních činidel pro extrakci HDAC na 1 g rostlinného materiálu

Vzorek	extrakční pufr (ml/g rostl. materiálu)	4M NaCl (μ l/g rostl. materiálu)
1	0,5	106
2	1	213
3	2	425
4	3	638
5	4	850

Jak ukazují výsledky po detekci s využitím sekundárních protilátek značených AP (obr. 34) nebo HRP (obr. 35), tak komerční protilátka proti HDT3 z *A. thaliana* vykazuje pro extrakty z listů rajčat nízkou specifitu.

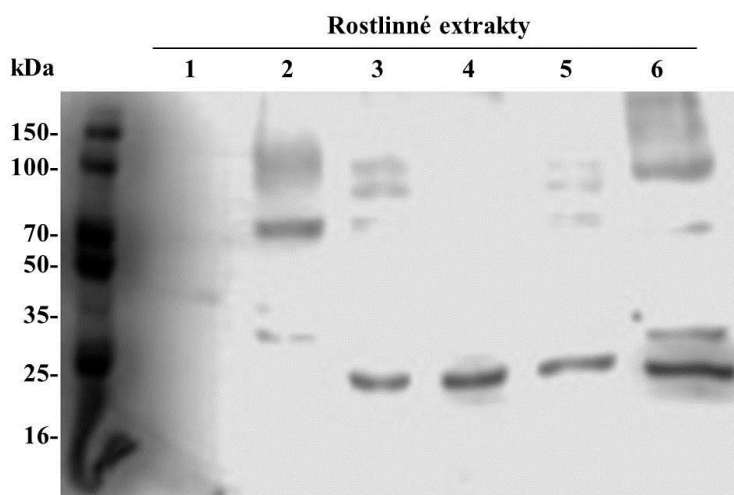


Obr. 34 Testování specifity primární Ab proti HDT3 z *Arabidopsis* HDT3 (ředění 1:2500) vůči extraktu z listu *Solanum habrochaites*. Byla použita sekundární Ab konjugovaná s AP (ředění 1:5000). 1 - extrakt *A. thaliana*; 2 -6 - extrakty *S. habrochaites*, připravené podle tab. 6., Do jamek gelu byly nanášeny extrakty o objemu 25 μ l).

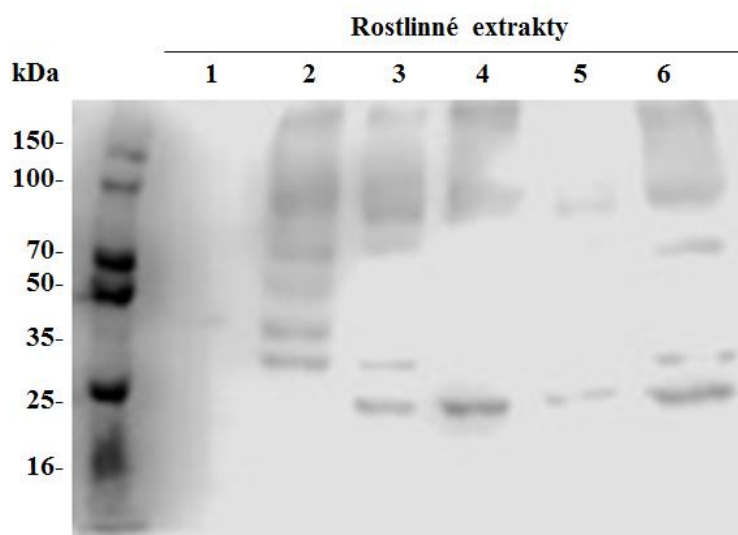
Získané výsledky potvrzují, že i v případě extrakce HDAC z rajčete je nevhodnější použít pro extrakci 1 ml extrakčního pufru a 425 μ l 4M NaCl na 1 g rostlinného materiálu detekci HDAC. Výsledky korelují s výše uvedenými experimenty detekce HDAC v extraktech z *A. thaliana*.

Kromě testování specifčnosti primární protilátky pro extrakty z rajčete bylo v rámci tohoto pokusu porovnáno blotování v uspořádání „tank-bloting“ a „turbo-bloting“ (obr. 35). Po imunodetekci byly výraznější bandy získány v uspořádání „tank-bloting“ (obr. 35a). Pro další pokusy byl používán nadále přenos „tank-blotingem“ jako v předchozích pokusech.

(a) „tank bloting“



(b) „turbo blot“

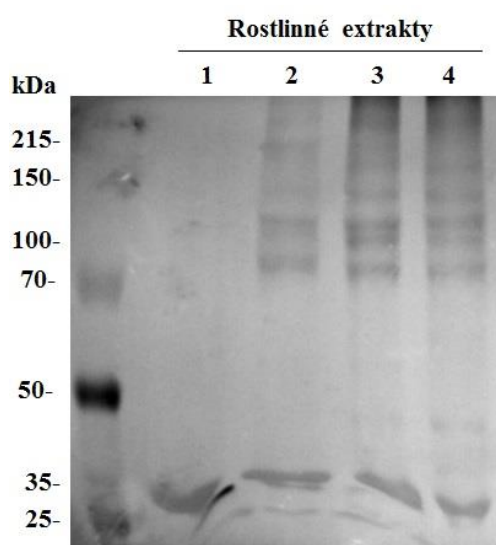


Obr. 35 Porovnání přenosu proteinů technikou „tank blotting“ (a) a „turbo blot“ (b). Byla použita primární protilátka proti HDT3 z *Arabidopsis* HDT3 (ředění 1:2500), a sekundární Ab konjugovaná s HRP (ředění 1:10000). 1 - extrakt *A. thaliana*; 2 -6 - extrakty *S. habrochaites*, připravené podle tab. 1. Do jamek gelu byly nanášeny vzorky extraktů o objemu 25 μ l.

4.3.3 Optimalizace podmínek pro detekci tabáku

Po vyhodnocení výsledků Western blotu u vzorků rajčat, pro různé objemy extrakčních činidel používaných při přípravě vzorků, byl znovu proveden pokus s extrakty připravenými z listů tabáku. Při přípravě vzorků bylo postupováno stejně jako u extraktů z rajčat (viz tab. 6).

Podobně jako u rajčat se ukázalo, že primární protilátka proti HDT3 z *Arabidopsis* vykazuje nízkou specifitu pro detekci HDAC2 v extraktech z *N. tabacum* (obr. 36).



Obr. 36 Testování specifity primární Ab proti HDT3 z *Arabidopsis* HDT3 (ředění 1:2500) vůči extraktu z listů *N. tabacum*. Byla použita sekundární Ab konjugovaná s AP (ředění 1:5000). 1 - extrakt *A. thaliana*; 2-4 - extrakty *N. tabacum*: (2 – 0,5 ml extrakčního pufru/1 g FW; 3 – 1 ml extrakčního pufru/1 g FW; 4 – 2 ml extrakčního pufru/1 g FW), vzorky byly na polyakrylamidový gel nanášeny o objemu 25 μ l.

4.3.4 Testování křížové reaktivity primárních protilátek proti lidské HDAC2 a HDT3 z *A. thaliana*

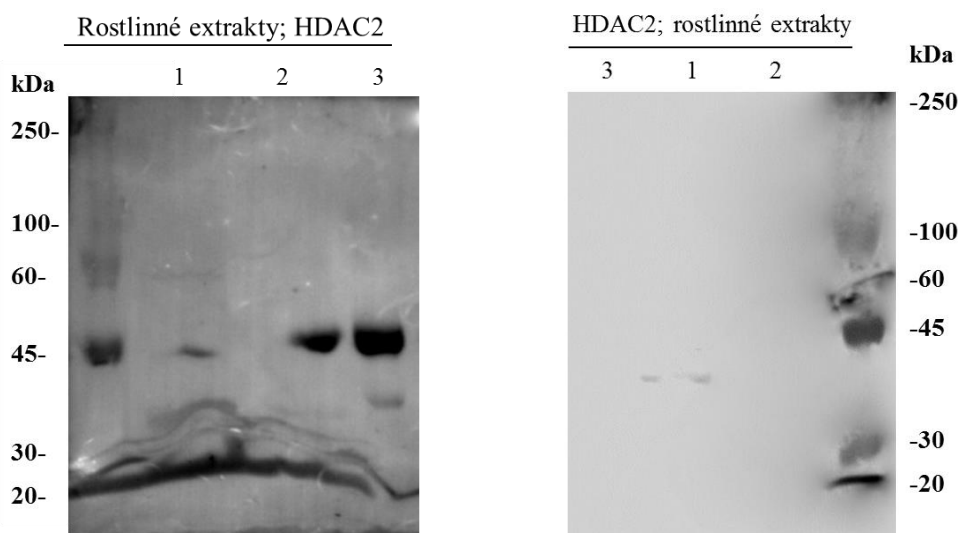
Metodou Western blot byla testována specifita komerční primární protilátky proti HDT3 z *Arabidopsis* (Agrisera) a komerční primární protilátky proti lidské HDAC2 (Sigma-Aldrich) ke komerčnímu rekombinantnímu enzymu lidské HDAC2 a extraktům připraveným z listů *A. thaliana* a *N. tabacum*. Jako sekundární protilátka byla použita Ab značená AP. Jak ukazují výsledky na obr. 37a primární protilátka proti lidské

HDAC2 reagovala jak s rekombinantní lidskou HDAC, tak i s proteiny v rostlinném extraktu *Arabidopsis*. U jamky pro extrakt *N. tabacum* nelze vyloučit, že nedošlo při nanášení vzorku HDAC2 k jeho přetečení do vedlejší jamky. Lidské HDAC2 odpovídá band o Mr 55kDa, identitu bandů o odpovídající Mr v rostlinných extraktech bude nutno ověřit v dalších experimentech. Band s nižší Mr (34 kDa) je výsledkem nespecifické reakce dané protilátky s těžkým řetězcem IgG (obr. 38).

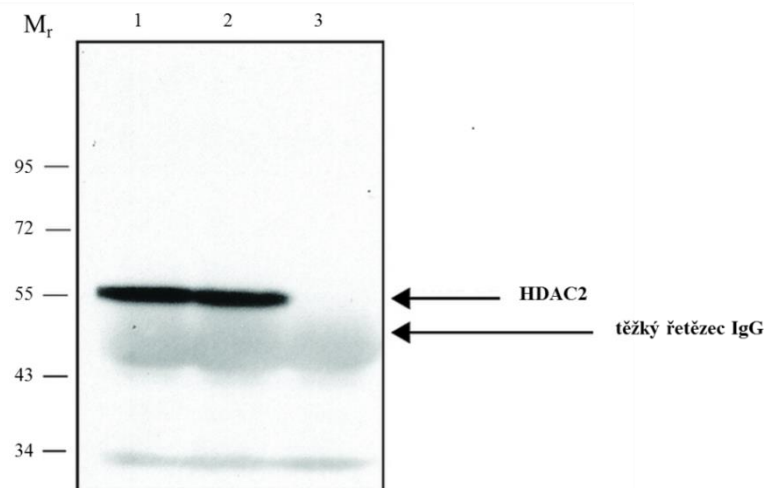
Pokus se stejnými vzorky byl uskutečněn i za použití primární protilátky proti HDT3 z *Arabidopsis* (obr. 37b). V tomto případě primární Ab reagovala pouze s extrakty z *A.thaliana*, kde byl při použití protilátky značené AP detekován pouze jeden band.

(a) primární Ab proti hHDAC2

(b) primární Ab proti HDT3



Obr. 37 Testování specifčnosti primární Ab proti lidské HDAC2 (a) a HDT3 z *A. thaliana* (b). Byla použita ředění primární Ab proti lidské HDAC2 1:1000 a ředění primární Ab proti HDT3 z *A. thaliana* 1:2500. Byla použita PVDF membrána a sekundární Ab konjugovaná s AP (ředění 1:5000 v nízkotučném mléce v TTBS). 1 - extrakt *A. thaliana* (15 µl); 2 - extrakt *N. tabacum* (15 µl); 3 - rekombinantní HDAC2 (10 µl).



Obr. 38 Výsledky testu komerční primární protilátky proti lidské HDAC2 poskytnuté výrobcem protilátky (Sigma-Aldrich). Králičí protilátka proti lidské HDAC2, byla použita pro imunoprecipitaci HDAC2 z extraktu HeLa buněk. (1 - 5 ul protilátky; 2 - 10 ul protilátky; 3 - negativní kontrola).

Vysvětlením, proč primární Ab anti-HDAC2 zreagovala s proteiny s rostlinných extraktů, by mohla být skutečnost, že HDAC jsou obecně velmi konzervovanými enzymy (de Ruijter *et al.*, 2003). Je tedy pravděpodobné, že anti-HDAC2 má jistou homologii se sekvencí přítomnou u rostlinných HDAC, a proto došlo k dané reakci.

5 Závěr

Fluorimetrická analýzy aktivity HDAC:

- Pro extrakci HDAC z rostlinného materiálu je vhodné použití 1 ml extrakčního pufru a 213 μ l 4M NaCl na 1 g FW.
- Je vyžadováno přečištění rostlinných extraktů pomocí gelové chromatografie na příslušných kolonkách za účelem odstranění nízkomolekulárních látek, které způsobují zhášení fluorescence.
- Vhodným substrátem je Boc-Lys(Ac)-AMC o koncentraci 0,3 mM.

Detekce HDAC metodou Western blot:

- Pro detekci rostlinných HDAC je vhodnější použití PVDF membrány.
- Optimální podmínky provedení Western blotu vyžadují 12 hodinovou inkubaci s primární protilátkou.
- Primární protilátka proti HDT3 z *Arabidopsis* je vůči proteinům *S. habrochaites* a *N. tabacum* nespecifická.
- Pro detekci HDAC je citlivější sekundární protilátka značená alkalickou fosfátasou.

6 Literatura

- Alinsug M. V., Yu C. W., Wu K. (2009): Phylogenetic analysis, subcellular localization, and expression patterns of RPD3/HDA1 family histone deacetylases in plants. *BMC Plant Biology*, **9**, 37.
- Alland L., Muhle R., Hou H. Jr., Potes J., Chin L., Schreiber-Agus N., DePinho R. A. (1997): Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature*, **387**, 49-55.
- Allfrey V. G., Faulkner R., Mirsky A. E. (1964): Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthetis. *Biochemistry*, **51**, 786-794.
- Allis C. D., Jenuwein T., Reinberg D. (2007a): Chapter 1: *Epigenetics: From Phenome to field*. (Gottschling D. E.). In: *Epigenetics*. Cold Spring Harbor, New York, USA, 1-8.
- Allis C. D., Jenuwein T., Reinberg D. (2007b): Chapter 2: *A brief history of epigenetics* (Felsefeld G.). In: *Epigenetics*. Cold Spring Harbor, New York, USA, 16-18.
- Allis C. D., Jenuwein T., Reinberg D. (2007c): Chapter 3, *Overview and concepts* (Allis C. D., Jenuwein T., Reinberg D.). In: *Epigenetics*. Cold Spring Harbor, New York, USA, 25-40.
- Anderson R. M., Bitterman K. J., Wood J. G., Medvedik O., Sonclair D. A. (2003): Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **423**, 181-185.
- Aravond L., Kooni E. V. (1998): Second family of histone deacetylases. *Science*, **280**, 1167a.
- Archer S. (1993): Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB Journal*, **7**, 349-360.
- Baltimore D. (1970): Viral RNA-dependent DNA polymerase. *Nature*, **226**, 1209-1211.
- Bestor T. H. (1998): Methylation meets acetylation. *Nature*, **393**, 311-312.

Bjerling P., Silverstein R. A., Thon G., Caudy A., Grewal S., Ekwall K. (2002): Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and *in vivo* specificity. *Molecular Biology of the Cell*, **22**, 2170-2181.

Bourque S., Dutartre A., Hammoudi V., Blanc S., Dahan J., Jeandroz S., Pichereaux 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.

Brachmann C. B., Sherman J. M., Devine S. E., Cameron E. E., Pillus L., Boeke J. D. (1995): The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes & Development*, **9**, 2888-2902.

Bradbury E. M. (1992): Reversible histone modifications and the chromosome cell-cycle. *BIOESSAYS*, **14**, 9-16.

Brandl A., Heinzl T., Krämer O. H. (2009): Histone deacetylases: salesman and customers in the post-translational modification market. *Biology of the Cell*, **101**, 193-205.

Brochier C., Dennis G., Riviaccio M. A., McLaughlin K., Coppola G., Ratan R. R., Langley B. (2013): Specific acetylation of p53 by HDAC inhibition prevents DNA damage-induced apoptosis in neurons. *The Journal of Neuroscience*, **33**, 8621-8632.

Brosch G., Georgieva E.I., López-Rods 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., Ransom R., Lechner T., Walton J. D., Loidl P. (1995): Inhibition of maize histone deacetylase by HC toxin, the host-selective toxin of *Cochliobolus carbonum*. *The Plant Cell*, **7**, 1941-1950.

- Brownell J. E., Allis C. D. (1996): Special HATs for special occasions: Linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Current Opinion in Genetics & Development*, **6**, 176-184.
- Bryk M., Banerjee M., Murphy M, Knudsen K. E., Garfinkel D. J., Curcio M. J. (1997): Transcriptional silencing of Ty1 elements in the RDN1 locus of yeast. *Genes & Development*, **11**, 255-269.
- Buggy J. J., Sideris M. L., Mak P., Lorimer D. D., McIntosh B., Clark J. M. (2000): Cloning and characterization of novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochemical Journal*, **350**, 199-205.
- Cabrero J. R., Serrador J. M., Barreiro O., Mittlebrunn M., Naranjo-Suárez S., Martín-Cófreces N., Vicente-Manzanares M., Mazitschek R., Bradner J. E., Ávila J., Valenzuela-Fernández A., Sánchez-Madrid F. (2006): Lymphocyte chemotaxis is regulated by histone deacetylase 6, independently of its deacetylase activity. *Molecular Biology of the Cell*, **17**, 3435-3445.
- 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.
- Camerini S., Polci M. L., Restuccia U., Usuelli V., Malgaroli A., Bachi A. (2007): A novel approach to identify proteins modified by nitric oxide: the HIS-TAG switch method. *Journal of Proteome Research*, **6**, 3224-3231.
- Carducci M. A., Nelson J. B., Chan-Tack K. M., Ayyagari S. R., Sweatt W. H., Campbell P. A., Nelson W. G., Simons J. W. (1996): Phenylbutyrate induces apoptosis in human prostate cancer and is more potent than phenylacetate. *Clinical Cancer Research*, **2**, 379-387.
- Chang J. H., Kim H. C., Hwang K. Y., Lee J. W., Jackson S. P., Bell S. D., Co Y. (2002): Structural basis for the NAD-dependent deacetylase mechanism of Sir2. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 34489-34498.

- Chang L., Loranger S. S., Mizzen C., Ernst S. G., Allis C. D., Annunziato A. T. (1997): Histones in transit: Cytosolic histone complexes and deacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells. *Biochemistry*, **36**, 469-480.
- Chen L. T., Luo M., Wang Y. Y., Wu K. (2010): Involvement of *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 in ABA and salt stress response. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 3345-3353.
- Choi S. M., Song H. R., Han S. K., Han M., Kim C. Y., Park J., Lee Y. H., Jeon J. S., Noh Y. S., Noh B. (2012): HDA19 is required for the repression of salicylic acid biosynthesis and salicylic acid-mediated defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **71**, 135-146.
- Ciossek T., Julius H., Wieland H., Maier T., Beckers T. (2008): A homogeneous cellular histone deacetylase assay suitable for compound profiling and robotic screening. *Analytical Biochemistry*, **372**, 72-81.
- Clarke D. J., O'Neill L. P., Turner B. M. (1993): Selective use of H4 acetylation sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, **294**, 557-561.
- Clemente S., Franco L., López-Rodas G. (2001): Distinct site specificity of two pea histone deacetylase complexes. *Biochemistry*, **40**, 10671-10676.
- Cosgrove M. S., Boeke J. D., Wolberger C. (2004): Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nature Structural & Molecular Biology*, **11**, 1037-1043.
- 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.
- Darkin-Rattray S. J., Gurnett A. M., Myers R. W., Dulski P. M., Crumley T. M., Allocco J. J., Cannova C., Meinke P. T., Colletti S. L., Bednarek M. A., Singh S. B., Goetz M. A., Dombrowski A. W., Polishook J. D., Schmatz D. M. (1996): Apicidin: A novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, **93**, 13143-13147.

- David G., Neptune M. A., DePinho R. A. (2002): SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities. *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*, **394**, 585-588.
- de Ruijter A. J. M., van Gennip A. H., Caron H. N., Kemp S., van Kuilenburg A. B. P. (2003): Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal*, **370**, 737-749.
- Dhalluin C., Carlson J. E., Zeng L., He C., Aggarwal A. K., Zhou M. M (1999): Structure and ligand of histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**, 491-496.
- Edwards C. R., Dang W., Berger S. L. (2011): Histone H4 lysine 20 of *Saccharomyces cerevisiae* is monomethylated and functions in subtelomeric silencing. *Biochemistry*, **50**, 10473-10483.
- Fang J., Feng Q., Ketel C.S., Wang H., Cao R., Xia L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Simon J.A., Zhang Y. (2002): Purification and functional characterization of SET8, a nucleosomal histone H4- lysine 20-specific methyltransferase. *Current Biology*, **12**, 1086-1099.
- Finnin M. S., Donigian J. R., Cohen A., Richon V. M., Rifkind R. A., Marks P. A., Breslow R., Pavletich N. P. (1999): Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, **401**, 188-193.
- Fischle W., Emiliani S., Hendzel M. J., Nagase T., Nomura N., Voelter W., Verdin E. (1999): A new family of human histone deacetylases related to *Saccharomyces cerevisiae* HDA1p. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 11713-11720.
- Forrester M. T., Foster M. W., Benhar M., Stamler J. S. (2009): Detection of protein S-nitrosylation with biotin-switch technique. *Free Radical Biology & Medicine*, **46**, 119-126.
- Fransz P., de Jong J. H. (2002): Chromatin dynamics in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 560-567.

- Fritze C. E., Verschueren K., Strich R., Esposito R. E. (1997): Direct evidence for SIR2 modulation of chromatin structure in yeast rDNA. *The EMBO Journal*, **16**, 6495-6509.
- Frye R. A. (2000): Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **273**, 793-798.
- Furumai R., Komatsu Y., Nishino N., Khochbin S., Yoshida M., Horinouchi S. (2001): Potent histone deacetylase inhibitors bulit from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, **98**, 87-92.
- Gao L., Cueto M. A, Asselbergs F., Atadja P. (2002): Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 25748-25755.
- Göttlicher M., Minucci S., Zhu P., Krämer O. H., Schimpf A., Giavara S., Sleeman J. P., Coco F. L., Nervi C., Pelicci P. G., Heinzl T. (2001): Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differetiation of transformed cells. *The EMBO Journal*, **20**, 6969-6978.
- Grandbastien M., Audeon C., Bonnivard E., Casacuberta J. M., Chalhoub B., Costa A. P. P., Le Q. H., Melayah D., Petit M., Poncet C., Tam S. M., Van Sluys M. A., Mhiri C. (2005): Stress activation and genomic impact of Tnt1 retrotransposons in *Solanaceae*, **110**, 229-241.
- Gray S. G., Ekström T. J. (2001): The human histone deacetylase family. *Experimental Cell Research*, **262**, 75-83.
- Grunstein M. (1997): Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, **389**, 349-352.
- Haigis M. C., Mostoslavsky R., Haigis K. M., Fahie K., Christodoulou D. C., Murphy A. J., Valenzuela D. M., Yancopoulos G. D., Karow M., Blander G., Wolberger C., Prolla T. A., Weindruch R., Alt F. W., Guarente L. (2006): SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell*, **126**, 941-954.

- Halley F., Reinshagen J., Ellinger B., Wolf M., Niles A. L., Evans N. J., Kirkland T. A., Wagner J. M., Jung M., Gribbon P., Gul S. (2011): A bioluminogenic HDAC activity assay: Validation and screening. *Journal of Biomolecular Screening*, **16**, 1227-1235.
- Hayakawa T., Nakayama J. I. (2010): Physiological roles of class I HDAC complex and histone demethylase. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2011**, 129383.
- Hebbes T. R., Thorne A. W., Crane-Robinson C. (1988): A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *The EMBO Journal*, **7**, 1395-1402.
- Heltweg B., Jung M. (2002): A homogeneous nonisotopic histone deacetylase activity assay. *Journal of Biomolecular Screening*, **8**, 89-95.
- Heltweg B., Jung M. (2003): A microplate reader-based nonisotopic histone deacetylase activity assay. *Analytical Biochemistry*, **302**, 175-183.
- Hess D. T., Matsumoto A., Kim S. O., Marshall H. E., Stamler J. S. (2005): Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **6**, 150-166.
- 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.
- Houtkooper R. H., Pirinen E., Auwerx J. (2012): Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **13**, 225-238.
- Hu Y., Zhang L., Li J., He S., Zhou K., Yang F., Huang M., Jiang L., Li L. (2011): Trichostatin A selectively suppresses the cold-induced transcription of the *ZmDREB1* gene in maize. *PLOS ONE*, **6**, e22132.
- Huang L., Sun Q., Qin F., Li C., Zhao Y., Zhou D. X. (2007): Down-regulation of a SILENT INFORMATION REGULATOR2-related histone deacetylase gene, *OsSRT1*, induces DNA fragmentation and cell death in rice. *Plant Physiology*, **144**, 1508-1519.

- Hubbert C., Guardiola A., Shao R., Kawaguchi Y., Ito A., Nixon A., Yoshida M., Wang X. F., Yao T. P. (2002): HDAC6 is mikrotubule-associated deacetylase. *Nature*, **417**, 455-458.
- Huber L. C., Brock M., Hemmatazad H., Giger O. T., Moritz F., Trenkmann M., Distler J. H. W., Gay R. E., Kolling C., Moch H., Michel B. A., Gay S., Distler O., Jüngel A. (2007): Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Arthritis & Rheumatism*, **56**, 1087-1093.
- Iizuka M., Stillman B. (1999): Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 23027-23034.
- 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.
- Itoh Y., Ma F. H., Hoshi H., Oka M., Noda K., Ukai Y., Kojima H., Nagano T., Toda N. (2000): Determination and bioimaging method for nitric oxide in biological specimens by diaminofluorescein fluorometry. *Analytical Biochemistry*, **287**, 203-209.
- Jaskiewicz M., Conrath U., Peterhänsel C. (2011): Chromatin modification act as a memory for systemic acquired resistance in plant stress response. *EMBO REPORTS*, **12**, 50-55.
- 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*, **2001**, p11.
- Jenuwein T., Allis C. D. (2001): Translating the histone code. *Epigenetics*, **293**, 1074-1080.
- Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J. S. (1996): S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*, **380**, 221-226.

- Jiang H., Khan S., Wang Y., Charrin G., He B., Sebastian C., Du J., Kim R., Ge E., Mostoslavsky R., Hang H. C., Hao Q., Lin H. (2013): SIRT6 regulates TNF- α secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature*, **496**, 110-113.
- Jones P. L., Veenstra G. J. C., Wade P. A., Vermaak D., Kass S. U, Landsberger N., Strouboulis J., Wolffe A. P. (1998): Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics*, **19**, 187-191.
- Kadosh D., Struhl K. (1998): Histone deacetylase activity of Rpd3 is important for transcriptional repression *in vivo*. *Genes & Development*, **12**, 797-805.
- Katan-Khaykovich Y., Struhl K. (2002): Dynamics of global histone acetylation and deacetylation *in vivo*: rapid restoration of normal histone acetylation upon removal of activators and repressors. *Genes & Development*, **16**, 743-752.
- Kettenhofen N. J., Wang X., Gladwin M. T, Hogg N. (2008): In-gel detection of S-nitrosated proteins using fluorescence methods. *Methods in Enzymology*, **441**, 53-71.
- Khochbin S., Wolffe A. P. (1997): The origin and utility of histone deacetylases. *FEBS Letters*, **419**, 157-160.
- Kim K. C., Lai Z., Fan B., Chen Z. (2008): *Arabidopsis* WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. *The Plant Cell*, **20**, 2357-2371.
- Kim Y. S., Song Y. M., Kwon H. J. (2007): Functional analysis of a histone deacetylase-like protein of *Thermus caldophilus* GK24 in mammalian cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **362**, 996-1000.
- Kölle D., Brosch G., Lechner T., Lusser A., Loidl P. (1998): Biochemical methods for analysis of histone deacetylases. *Methods*, **15**, 323-331.
- Kölle D., Brosch G., Lechner T., Pipal A., Helliger W., Taplick J., Loidl P. (1999): Different types of maize histone deacetylases are distinguished by a highly complex substrate and site specificity. *Biochemistry*, **38**, 6769-6773.

Kovalchuk I., Kovalchuk O., Hohn B. (2000): Genome-wide variation of the somatic mutation frequency in transgenic plants. *EMBO JOURNAL*, **19**, 4431-4438.

Kruh J. (1982): Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **42**, 65-82.

Kuo M. H., Allis C. D. (1998): Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BIOESSAYS*, **20**, 615-626.

Kuo M. H., Brownell J. E., Sobel R. E., Ranalli T. A., Cook R. G., Edmondson D. G., Roth S. Y., Allis C. D. (1996): Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histone H3 and H4 at specific lysines. *Nature*, **383**, 269-272.

Ladomery M., Lyons S., Sommerville J. (1997): *Xenopus* HDm, a maternally expressed histone deacetylase, belongs to an ancient family of acetyl-metabolizing enzymes. *Gene*, **198**, 275-280.

Lee S. J., Lee J. R., Kim Y. H., Park Y. S., Park S. I., Park H. S., Kim K. P. (2007): Investigation of tyrosine nitration and nitrosylation of angiotensin II and bovine serum albumin with electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **21**, 2797-2804.

Lucht J. M., Mauch-Mani B., Steiner H. Y., Metraux J. P., Ryals J., Hohn B. (2002): Pathogen stress increases somatic recombination frequency in *Arabidopsis*. *Nature Genetics*, **30**, 211-314.

Luger K., Rechsteiner T. J., Flaus A. J., Wayne M. M. Y., Richmond T. J. (1997): Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in *Bacteria*. *Journal of Molecular Biology*, **272**, 301-311.

Luger K., Richmond T. J. (1998): The histone tails of the nucleosome. *Current Opinion in Genetics & Development*, **8**, 140-146.

Luo J. Y., Su F., Chen D. L., Sholoh A., Gu W. (2000): Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature*, **408**, 377-381.

- 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 W., Berkowitz G. A. (2007): The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity. *Cellular Microbiology*, **9**, 2571-2585.
- Ma X., Lv S., Zhang C., Yang C. (2013): Histone deacetylases and their functions in plants. *Plant Cell Reports*, **32**, 465-478.
- Marino M., Gladyshev V. N. (2010): Structural analysis of cysteine S-nitrosylation: a modified acid-based motif and the emerging role of trans-nitrosylation. *Journal of Molecular Biology*, **395**, 844-859.
- Marshall H. E., Stamler J. S. (2001): Inhibition of NK- κ B by S-nitrosylation. *Biochemistry*, **40**, 1688-1693.
- Martínez-Iglesias O., Ruiz-Llorente L., Sánchez-Martínez R., García L., Zambrano A., Aranda A. (2008): Histone deacetylase inhibitors: mechanism of action and therapeutic use in cancer. *Clinical and Translational Oncology*, **10**, 395-398.
- Marzio G., Wagener C., Gutierrez M. I., Cartwright P., Helin K., Giacca M. (2000): E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 10887-10892.
- Megee P. C., Morgan B. A., Smith S. S. (1995): Histone H4 and the maintenance of genome integrity. *Genes & Development*, **9**, 1716-1727.
- Meyer P., Niedenhof I., ten Lohuis M. (1994): Evidence for cytosine methylation of non-symmetrical sequences in transgenic *Petunia hybrida*. *The EMBO Journal*, **13**, 2084-2088.
- Meyer P., Saedler H. (1996): Homology-dependent gene silencing in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**, 23-48.

- Mitchell D. A., Morton S. U., Fernhoff N. B., Marletta M. A. (2007): Thioredoxin is required for S-nitrosylation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 11609-11614.
- Munster P. N., Troso-Sandoval T., Rosen N., Rifkind R., Marks P. A., Richon V. M. (2001): The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Research*, **61**, 8492-8497.
- Mustkov V., Gerber D., Angelov D., Ausio J., Workamn J., Dimitrov S. (1998): Persistent Interactions of core histone tails with nucleosomal DNA following acetylation and transcription factor binding. *Molecular and Cellular Biology*, **18**, 6293-6304.
- Nan X., Ng H. H., Johnson C. A., Laherty C. D., Turner B. M., Eisenman R. N., Bird A. (1998): Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, **393**, 386-389.
- Narita K., Kikuchi T., Watanabe K., Takizawa T., Oguchi T., Kudo K., Matsuhara K., Abe H., Yamori T., Yoshida M, Katoh T. (2009): Total synthesis of the bicyclic depsipeptide HDAC inhibitors spiruchostatin A and B, 5''-*epi*-Spiruchostatin B, FK228 (FR901228) and preliminary evaluation of their biological activity. *Chemistry -A European Journal*, **15**, 11174-11186.
- Narlikar G. J., Fan H. Y., Kingston R. E. (2002): Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, **108**, 475-487.
- 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**, 412-416.
- Ogryzko V. V., Schiltz R. L., Russanova V., Howard B. H., Nakatani Y. (1996): The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, **87**, 953-959.

- O'Neill L. P., Turner B. M. (1995): Histone H4 acetylation distinguishes coding regions of the human genome from heterochromatin in differentiation-dependent but transcription-independent manner. *The EMBO Journal*, **14**, 3946-3957.
- 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 Acid Research*, **30**, 5036-5055.
- Peng L., Yuan Z., Ling H., Fuukasawa K., Robertson K., Olashaw N., Koomen J., Chen J., Lane W. S., Seto E. (2011): SIRT1 deacetylates the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein and alters its activities. *Molecular and Cellular Biology*, **31**, 4720-4734.
- Pflum M. K. H., Tong J. K., Lane W. S., Schreiber S. L. (2001): Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 47733-47741.
- Probst A. V., Fagard M., Proux F., Mourrain P., Boutet S., Earley K., Lawrence R. J., Pikaard C. S., Murfett J., Furner I., Vaucheret H., Scheid O. M. (2004): *Arabidopsis* Histone deacetylase HDA6 is required for maintenance of transcriptional gene silencing and determines nuclear organization of rDNA repeats. *The Plant Cell*, **16**, 1021-1034.
- 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., Stavrera 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.
- Ransom R. F., Walton J. D. (1997): Histone hyperacetylation in maize in response to treatment with HC-toxin or infection by the filamentous fungus *Cochliobolus carbonum*. *Plant Physiology*, **115**, 1021-1027.
- Rossi V., Hartings H., Motto M. (1998): Identification and characterisation of an RPD3 homologue from maize (*Zea mays L.*) that is able to complement an *rdp3* null mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*, **258**, 288-296.

- Rundlett S. E., Carmen A. A., Kobayashi R., Bavykin S., Turner B. M., Grunstein M. (1996): HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Biochemistry*, **93**, 14503-14508.
- Rundlett S. E., Carmen A. A., Suka N., Turner B. M., Grunstein M. (1998): Transcriptional repression by UME6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by RPD3. *Nature*, **392**, 831-835.
- Sartorelli V., Puri P. L., Hamamori Y., Ogryzko V., Chung G., Nakatani Y., Wang J. Y. J., Kedes L. (1999): Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. *Molecular Cell*, **4**, 725-734.
- Saville B. (1958): A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst*, **83**, 670-672.
- Sendra R., Rodrigo I., Salvador M. L., Franco L. (1988): Characterization of pea histone deacetylases. *Plant Molecular Biology*, **11**, 857-866.
- Severina I. S., Bussygina O. G., Pyatakova N. V., Malenkova I. V., Vanin A. F. (2003): Activation of soluble guanylate cyclase by NO donors - S-nitrosothiols, and dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide – Biology and Chemistry*, **8**, 155-163.
- Sridha S., Wu K. (2006): Identification of *AtHD2C* as a novel regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **46**, 124-133.
- Stamler J. S., Lamas S., Fang F. C. (2001): Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*, **106**, 675-683.
- Stamler J. S., Toone E. J., Lipton S. A., Sucher N. J. (1997): S(NO) signals: Translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron*, **18**, 691-696.
- Strahl B. D., Allis C. D. (2000): The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.
- Suenaga M., Soda H., Oka M., Yamaguchi A., Nakatomi K., Shiozawa K., Kawabata S., Kasai T., Yamada Y., Kamihira S., Tei C., Kohno S. (2002): Histone deacetylase

inhibitors suppress telomerase reverse transcriptase mRNA expression in prostate cancer cells. *International Journal of Cancer*, **97**, 621-625.

Suka N., Suka Y., Carmen A. A., Wu J., Grunstein M. (2001): Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Molecular Cell*, **8**, 473-479.

Sun J. M., Spencer V. A., Chen H. Y., Li L., Davie J. R. (2003): Measurement of histone acetyltransferase and histone deacetylase activities and kinetics of histone acetylation. *Methods*, **31**, 12-23.

Tagami H., Ray-Gallet D., Almouzni G., Nakatani Y. (2004): Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell*, **116**, 51-61.

Tarpey M. M., Wink D. A., Grisham M. B. (2004): Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **286**, R431-R444.

Tauton J., Hassig C. A., Schreiber S. L. (1996): A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3d. *Science*, **272**, 408-411.

Temin H. M., Mizutani S. (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, **226**, 1211-1213.

Verreault A., Kaufman P. D., Kobayashi R., Stillman B. (1998): Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Current Biology*, **8**, 96-108.

Wang A., Kurdistani S. K., Grunstein M. (2002): Requirement of Hos2 histone deacetylase for gene activity in yeast. *Science*, **298**, 1412-1414.

Waterborg J. H. (1992): Identification of five sites of acetylation in alpha histone H4. *Biochemistry*, **31**, 6211-6219.

Watt F., Molloy P. L. (1988): Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes & Development*, **2**, 1136-1143.

Wegener D., Hildmann C., Riester D., Schober A., Meyer-Almes F. J., Deubzer H. E., Oehme I., Witt O., Lang S., Jaensch M., Makarov V., Lange C., Busse B., Schwienhorst A. (2008): Identification of novel small-molecule histone deacetylase inhibitors by medium-throughput screening using a fluorogenic assay. *Biochemical Journal*, **413**, 143-150.

Wegener D., Wirsching F., Riester D., Schwienhorst A. (2003a): A fluorogenic histone deacetylase assay well suited for high-throughput activity screening. *Chemistry & Biology*, **10**, 61-68.

Wegener D., Hildmann C., Riester D., Schwienhorst A. (2003b): Improved fluorogenic histone deacetylase assay for high-throughput-screening applications. *Analytical Biochemistry*, **321**, 202-208.

Whalen E. J., Foster M. W., Matsumoto A., Ozawa K., Violin J. D., Que L. Q., Nelson C. D., Benhar M., Keys J. R., Rockman H. A., Koch W. J., Daaka Y., Lefkowitz R. J., Stamlor J. S. (2007): Regulation of β -adrenergic receptor signaling by S-nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2 *Cell*, **129**, 511-522.

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., 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.

Yang W. M., Inouye C., Zeng Y., Bearss D., Seto E. (1996): Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homologue of the yeast global regulator RPD3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 12845-12850.

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*, **285**, 17174-17179.

Zhang H. S., Gavin M., Dahiya A., Postigo A. A., Ma D., Luo R. X., Harbour J. W., Dean D. C. (2000): Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWi-SNF. *Cell*, **101**, 79-89.

Zhang S., Liu Y. (2001): Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. *The Plant Cell*, **13**, 1877-1889.

Zhou Y., Zhang H., He B., Du J., Lin H., Cerione R. A., Hao Q. (2012): The bicyclic intermediate structure provides insights into the desuccinylation mechanism of human sirtuin 5 (SIRT5). *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 28307-28314.

Zipfel C., Felix G. (2005): Plants and animals: a different taste for microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 353-360.

7 Seznam použitých zkratek

AA/BIS	Akrylamid- <i>N,N'</i> -bisakrylamid
Ab	Protilátka
ABA	Kyselina abscisová
AMC	7-amino-4-methylkumarin
AP	Alkalická fosfatasa
APS	Persíran amonný
Boc-Lys(Ac)-AMC	Boc-Lys(Ac)-AMC (N-(4-Methyl-7-kumarinyl)-N- α -(<i>t</i> -butoxykarbonyl)-N ω -acetyllysinamidu)
BSA	Hovězí sérový albumin
CK2	Kaseinkinasa 2
DAF-FM	Diaminofluoresceinová fluorescenční metoda
DIGE	Diferenční gelová elektroforéza
DTT	Dithiotreitol
GSNO	S-nitrosoglutathion
HAT	Histonacetyltransferasa
HDAC	Histondeacetylasa
Hos2p	Kvasinkový protein
JA	Jasmonová kyselina
HRP	Křenová peroxidasa
K_m	Michaelisova konstanta
MAL	N-(4-methyl-7-kumarinyl)-N- α -(<i>tert</i> .butyloxykarbonyl)-N- λ -acetyllysinamid
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkinasa
MALDI-TOF	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpční ionizací s pomocí matrice a průletovým analyzátozem
ML	N-(4-methyl-7-kumarinyl)-N- α -(<i>tert</i> -butyloxykarbonyl)lysinamid
MyoD	Protein ze skupiny myogenních regulačních faktorů
NBT-BCIP	Nitrotetrazoliová modř ve spojení s 5-bromo-4-chloro 3-indolyl-fosfátem
NES	Jaderný exportní signál

NF-κB	Transkripční faktor
NLS	Jaderný lokalizační signál
OAcADPR	O-acetyl-ADP-ribosa
p53	Transkripční faktor
PK2	Proteinkinasa 2
PAMPs	S patogenem spojené molekulární vzory
PCD	Programovaná buněčná smrt
RPD3	Protein Reduced Potassium Dependency 3
PR	S patogenezí spojené geny
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RSNO	S-nitrosothiol
RFU	Relativní jednotka fluorescence
SA	Kyselina salicylová
SAR	Systémově získaná rezistence
SDS	Dodecylsulfát sodný
SIR	Sirtuiny
SIR2	Protein Silent Information Regulator 2
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> - tetramethyldiamin
TSA	Trichostatin A
TFA	Trifluoroctová kyselina
UME6	Protein z <i>S. cerevisiae</i>
WRKY	Transkripční faktor
WT	Wild type