

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Hana Marková**

Modifikace chromatinu v souvislosti s "priming" fenoménem u rostlin  
Chromatin modifications in association with priming phenomenon in plants

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Dana Holá, Ph.D.

Praha, 2015



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 5. 2015

.....

Hana Marková

Chtěla bych upřímně poděkovat vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Daně Holé, Ph.D. za trpělivost a ochotu, se kterou mi pomáhala a dávala cenné rady a zejména za čas, který mi při přípravě mé bakalářské práce věnovala.

## Abstrakt

Rostliny jsou v přirozeném prostředí vystaveny mnoha různým stresorům, kterým se musí dokázat přizpůsobit. Bylo zjištěno, že rostliny si mohou „zapamatovat“ předchozí stresovou odpověď a na následné vystavení stejnému stresoru zareagovat rychleji a ve větší míře. Jedním z předpokládaných mechanismů tohoto tzv. „primingu“ by mohly být změny na úrovni chromatinových modifikací. Modifikace chromatinu se zpravidla v průběhu stresové reakce dynamicky mění. Některé změny by však mohly zůstat trvalé, čímž by se vytvořila specifická, meioticky nebo mitoticky transmisibilní „stresová paměť“. V případě mitoticky transmisibilní „stresové paměti“ byl takový jev zatím pozorován u stresu v důsledku dehydratace, zasolení, mechanického poškození, kombinace různých stresorů a systémové rezistence na patogenní bakterie. Zatím se jedná jen o několik málo studií; už teď se ale ukazují rozdíly v reakci konkrétních genů, stejně jako závislost na délce stresového stimulu a délce period mezi prvním a druhým stresem. Velkým nedostatkem dosavadních studií je jejich zaměření pouze na histonové modifikace. Nicméně v rámci dosud studovaných chromatinových modifikací se zdá, že jako hlavní značka pro „priming“ by mohla sloužit převážně H3K4me3. Naproti tomu modifikace H3K27me3 zřejmě jako „paměťová značka“ neslouží. Na vyvození definitivního závěru ohledně role chromatinových modifikací v somatické/mitotické „stresové paměti“ rostlin je ale zatím příliš brzy.

**Klíčová slova:** „priming“, histony, metylace DNA, rostliny, stres, chromatinové modifikace

## **Abstract**

Plants are exposed to many stressors to which they must be able to adapt. It has been found that plants can memorize the respective stress response and may respond to a subsequent stress exposure faster and to a greater extent. The mechanism of this so-called priming could be associated with the changes in the levels of chromatin modifications. Chromatin modifications are usually dynamically changing during the stress reaction. Some of these changes could persist for some time, thus the specific stress memory, mitotically and meiotically transmissible, could be established. Such a phenomenon was observed for stress caused by dehydration, salinity, mechanical damage, a combination of various stressors and a systemic resistance to pathogenic bacteria. So far, only a few studies on this topic exist; but even now it is clear that there are differences in the response of specific genes as well as the dependence on the length of the stress stimulus and the duration of the period between the first and second stress. A major disadvantage of existing studies is that they focus solely on histone modifications. Regarding the chromatin modifications studied so far, H3K4me3 could serve as the main mark for such priming. On the other hand, H3K27me3 modification is apparently not used as a memory tag. However, it is still too early for making definitive conclusions about the role of chromatin modifications in plant somatic/mitotic stress memory.

**Key words:** priming, histones, DNA methylation, plants, stress, chromatin modifications

# Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	<b>v</b>
<b>Obsah</b> .....	<b>vii</b>
<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>viii</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Chromatinové modifikace</b> .....	<b>4</b>
2.1 Typy chromatinových modifikací .....	4
2.1.1 <i>Histonové modifikace</i> .....	4
2.1.2 <i>Histonové varianty</i> .....	5
2.1.3 <i>Methylace DNA</i> .....	6
2.2 Základní metody hodnocení chromatinových modifikací .....	7
2.2.1 <i>Metody pro stanovení modifikací histonů</i> .....	7
2.2.2 <i>Stanovení methylace DNA</i> .....	10
<b>3 Chromatinové modifikace v souvislosti s „mitotickou stresovou pamětí“ rostlin</b> . 12	
3.1 Dehydratace .....	12
3.2 Salinita.....	16
3.3 Mechanické poškození .....	17
3.4 Kombinovaný stres .....	19
3.5 Patogenní bakterie .....	22
<b>4 Závěr</b> .....	<b>24</b>
<b>5 Literatura</b> .....	<b>26</b>

## Seznam použitých zkratek

<i>AvrRpt2</i>	gen avirulence bakterie <i>Pseudomonas syringae</i>	gene of avirulence in bacteria <i>Pseudomonas syringae</i>
Avr-Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> nesoucí gen avirulence <i>AvrRpt2</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> carrying gene of avirulence <i>AvrRpt2</i>
BABA	kyselina $\beta$ -aminomáselná	$\beta$ -amino butyric acid
BTH	benzothiadiazol	benzothiadiazole
CMT3	chromometyláza 3	chromomethylase 3
<i>COR15A</i>	gen kódující protein účastní se stresových reakcí huseničky <i>Arabidopsis thaliana</i>	gene encoding protein participating in stress reactions of <i>A. thaliana</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina	deoxyribonucleic acid
DRM1	„domain rearranged“ metyltransferáza 1	domain rearranged methyltransferase 1
DRM2	„domain rearranged“ metyltransferáza 2	domain rearranged methyltransferase 2
<i>FLC</i>	gen kódující protein Flowering locus C	gene encoding protein Flowering locus C
<i>FLD</i>	gen kódující protein Flowering locus D	gene encoding protein Flowering locus D
<i>GH3.1</i>	gen kódující enzym účastní se syntézy auxinu a kyseliny jasmonové	gene encoding an enzyme participating in auxin and jasmonate acid synthesis
<i>GH3.3</i>	gen kódující enzym účastní se syntézy auxinu a kyseliny jasmonové	gene encoding an enzyme participating in auxin and jasmonate acid synthesis
GUS	$\beta$ -glukuronidáza	$\beta$ -glucuronidase
H1	histon 1	histone 1
H2A	histon 2A	histone 2A
H2A.Z	varianta Z histonu 2A	histone 2A variant Z
H3	histon 3	histone 3
H3.1	histon 3.1	histone 3.1
H3.3	histon 3.3	histone 3.3
H3ac	acetylace na histonu 3	acetylation of histone 3
H3K4ac	acetylace lysinu 4 na histonu 3	acetylation of lysine 4 on histone 3
H3K4me	metylace lysinu 4 na histonu 3	methylation of lysine 4 on histone 3
H3K4me2	dimetylace lysinu 4 na histonu 3	dimethylation of lysine 4 on histone 3
H3K4me3	trimetylace lysinu 4 na histonu 3	trimethylation of lysine 4 on histone 3
H3K9	lysín 9 na histonu 3	lysine 9 on histone 3
H3K9ac-K14ac	acetylace lysinu 9 a 14 na histonu 3	acetylation of lysine 9 and 14 on histone 3
H3K9me2	dimetylace lysinu 9 na histonu 3	dimethylation of lysine 9 on histone 3
H3K9me3	trimetylace lysinu 9 na histonu 3	trimethylation of lysine 9 on histone 3
H3K14ac	acetylace lysinu 14 na histonu 3	acetylation of lysine 14 on histone 3
H3K27me2	dimetylace lysinu 27 na histonu 3	dimethylation of lysine 27 on histone 3
H3K27me3	trimetylace lysinu 27 na histonu 3	trimethylation of lysine 27 on histone 3
H4ac	acetylace na histonu 4	acetylation on histone 3



HAC1	histonacetyláza 1	histone acetylase 1
hac1-1	linie mutantní v genu <i>HAC1</i>	line mutant in <i>HAC1</i> gene
HAT	histonacetyltransferáza	histone acetyltransferase
HDAC	histondeacetyláza	histone deacetylase
HDM	histondemetyláza	histone demethylase
HKMT	histon-lysin-metyltransferáza	histone lysine methyltransferase
<i>HKT1</i>	gen kódující Na <sup>+</sup> transportér	gene encoding Na <sup>+</sup> transporter
HMT	histonmetyltransferáza	histone methyltransferase
ChIP	chromatinová imunoprecipitace	chromatin immunoprecipitation
ChIP-chip	chromatinová imunoprecipitace následovaná DNA "microarray"	chromatin immunoprecipitation combined with DNA microarray
ChIP-SAGE	chromatinová imunoprecipitace následovaná sériovou analýzou genové exprese	chromatin immunoprecipitation combined with serial analysis of gene expression
ChIP-seq	chromatinová imunoprecipitace následovaná sekvenováním	chromatin immunoprecipitation combined with sequencing
MBD	5-methylcytosin vazebná doména	5-methylcytosine binding domain
meCIP	chromatinová imunoprecipitace pro analýzu metylace DNA	chromatine immunoprecipitation of DNA methylation analysis
meDIP	chromatinová imunoprecipitace pro analýzu metylace DNA	chromatine immunoprecipitation of DNA methylation analysis
MET1	methyltransferáza 1	methyltransferase 1
MIRA	analýza metylace DNA v CpG ostrůvcích	methylated-CpG island recovery assay
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina	messenger ribonucleic acid
MS	hmotnostní spektrometrie	mass spectrometry
MSB	menandionbisulfit sodný	menandione sodium bisulfite
<i>P. s.</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce	polymerase chain reaction
<i>P1P2E</i>	gen kódující akvaporin plasmatické membrány	gene encoding aquaporin of plasmatic membrane
PMF	„peptide mass fingerprinting“	peptide mass fingerprinting
PRMT	protein-arginin-metyltransferáza	protein arginine methyltransferase
<i>Psm</i>	<i>Pseudomonas syringae pv maculicola</i>	<i>Pseudomonas syringae pv maculicola</i>
R1-4	perioda zotavení 1-4	recovery period 1-4
<i>RAB18</i>	gen kódující stresový protein	gene encoding stress protein
<i>RD29A</i>	gen kódující stresový protein	gene encoding stress protein
<i>RD29B</i>	gen kódující stresový protein	gene encoding stress protein
RdDM	<i>de novo</i> metylace DNA řízená malými RNA	RNA directed DNA methylation
RE	restrikční endonukleáza	restriction endonuclease
ROS	reaktivní kyslíkové formy	reactive oxygenic species

RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi	reversed-phase high performance liquid chromatography
rsi1	linie mutantní v genu <i>rsi1</i>	line mutant in <i>rsi1</i> gene
RWC	relativní obsah vody	relative water content
S1-4	stresová perioda 1-4	stress period 1-4
siRNA	malá interferující ribonukleová kyselina	small interfering ribonucleic acid
SMRT	„single-molecule real-time“ sekvenování	single-molecule real-time sequencing
SUMO	malý protein podobný ubikvitinu	small ubiquitin-like protein
V4	čtyřlísté stádium <i>A. thaliana</i>	four leaf stadium of <i>A. thaliana</i>
<i>WRKY</i>	geny kódující transkripční faktory WRKY	gene encoding transcription factor WRKY
<i>WRKY6</i>	gen kódující transkripční faktor WRKY6	gene encoding transcription factor WRKY6
<i>WRKY29</i>	gen kódující transkripční faktor WRKY29	gene encoding transcription factor WRKY29
<i>WRKY53</i>	gen kódující transkripční faktor WRKY53	gene encoding transcription factor WRKY53

# 1 Úvod

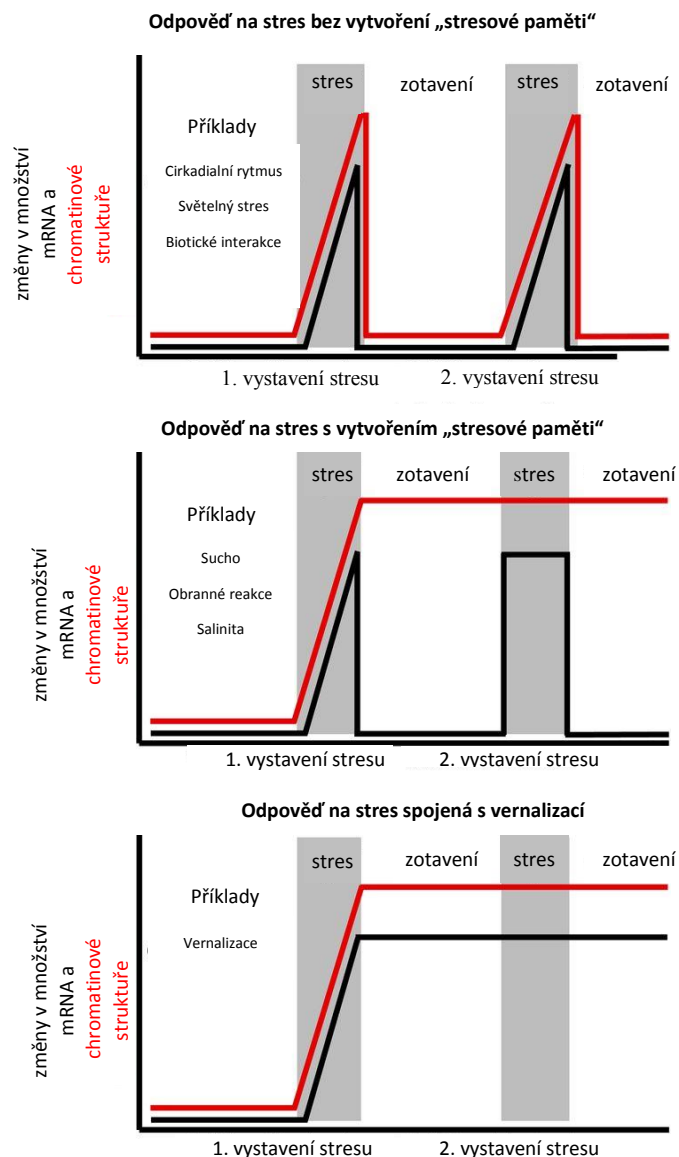
Rostliny jsou přisedlé organismy a na rozdíl od živočichů nemohou utéct před nebezpečím. Proto si musely vytvořit řadu jedinečných mechanismů, jak se před různými stresory bránit nebo se jim přizpůsobit. Jedním z takových mechanismů je tzv. „priming“ fenomén.

„Priming“ může mít v rostlinné biologii různé významy. Často je jako „priming“ označován jev, kdy rostliny, které byly ošetřeny určitou látkou před působením nějakého stresoru (ať už jako semena nebo již rostoucí rostliny), reagují na stres lépe než rostliny neošetřené. Například Jakab *et al.* (2005) prokázali, že rostliny huseníčku *Arabidopsis thaliana* (L.) ošetřené kyselinou  $\beta$ -aminomáselnou (BABA) vykazují vyšší toleranci vůči dehydratačnímu a hyperosmotickému stresu. Aplikace BABA také zvyšuje odolnost rostlin vůči různým parazitickým organismům. Ton a Mauch-Mani (2004) testovali účinnost ošetření *A. thaliana* BABA vůči stresu vyvolanému nekrotrofními patogeny *Alternaria brassicicola* (Schwein.) a *Plectosphaerella cucumerina* (Lindf.). V obou případech rostliny předem ošetřené vykazovaly výrazně vyšší odolnost než rostliny touto látkou neošetřené (Ton & Mauch-Mani 2004). Autoři Naffie a Mazen (2008) zase zkoumali využití benzothiadiazolu (BTH) jakožto induktoru zvýšené odolnosti sóji luštinaté (*Glycine max* (L.) Merrill) k houbě *Phialophora gregata* (L.). Zjistili, že ze semen ošetřených BTH vyrůstají rostliny výrazně odolnější k této chorobě než ze semen touto látkou neošetřených (Naffie & Mazen 2008). Rostliny je možné také senzitivizovat vůči stresu pomocí různých chemických induktorů již ve stádiu semen. Jiménez-Ariaz *et al.* (2015) v nedávné studii zkoumali vliv menadionbisulfidu sodného (MSB) na růst rostlin v hyperosmotických podmínkách. Zjistili, že rostliny, které vyrostly ze semen ošetřených touto látkou, rostou rychleji než rostliny neošetřené (Jiménez-Arias *et al.* 2015).

Jako „priming“ je ale také označován zvláštní fyziologický stav rostliny, kdy po vystavení primárnímu stresu může na následné stresové stimuly reagovat mnohem rychleji a silněji než rostlina, která primární stresovou periodou neprošla (Conrath 2011). Tento „priming“ více odpovídá přirozenému stavu a byl prokázán u rostlin vystavených biotickému i abiotickému stresu. Někdy bývá zahrnut také další jev, k němuž dochází při klíčení semen, kdy semeno před vyklíčením musí nejprve projít chladovou periodou – vernalizací, i když to vlastně pravý „priming“ není (Yaish *et al.* 2011). V této práci se zabývám pouze „primingem“ souvisejícím s opakovaným vystavením rostlin působení nějakého stresového faktoru.

V současnosti je navrženo hned několik různých mechanismů, kterými by mohl být tento typ „primingu“ způsoben. Baldwin a Schmelz (1996) například zjistili, že u rostlin tabáku *Nicotiana sylvestris* (Speg. & Comes) opakovaně ošetřených metyljasmonátem, který slouží jako signální molekula mechanického poškození, dochází k výraznému nárůstu obsahu nikotinu, který je využíván jako obranná molekula při odpovědi na následující mechanické poškození rostlin (Baldwin & Schmelz 1996). Také ukládání kalózy do buněčné stěny je velmi důležitý mechanismus při obraně proti napadení patogenem. Van der Ent *et al.* (2009) zjistili, že kolonizace kořenů nepatogenní kořenovou bakterií *Pseudomonas fluorescens* WCS417r (L.) může navodit systémovou odolnost celé rostliny vůči různým patogenům. Bylo objeveno, že při následné inokulaci patogenní bakterií dochází k výraznějšímu ukládání kalózy do buněčné stěny než u rostlin, které v symbióze nejsou (Van der Ent *et al.* 2009). Další možností je hromadění inaktivních signálních molekul nebo jejich mRNA. Bylo prokázáno, že po indukci stresové odpovědi pomocí BTH dochází k akumulaci některých inaktivních MAP kináz. To umožňuje rychlejší aktivaci stresových genů při sekundární indukci (Beckers *et al.* 2009). Velmi významnou roli v obraně rostliny při napadení patogenem mají také reaktivní kyslíkové formy (ROS). Rostliny mohou využívat ROS jako signální molekuly. Pastor *et al.* (2013) zjistili, že ROS signalizace se účastní také obranného „primingu“. Při svých experimentech na huseníčku *A. thaliana* a patogenní nekrotrofní houbě *P. cucumerina* objevili, že u předpřipravených rostlin dochází k významné akumulaci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, který je nezbytný pro zahájení reakce spojené s odolností. Vyšší hladina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pak umožní rychlejší reakci na opětovné napadení patogenem (Pastor *et al.* 2013).

V poslední době se začíná přikládat čím dál tím větší důraz na roli epigenetických modifikací v odpovědi rostlin na stres. Bylo již mnohokrát prokázáno, že epigenetické modifikace, jako DNA metylace, modifikace histonů nebo záměny jejich variant, hrají klíčovou roli v regulaci genové exprese při stresové reakci (Kim *et al.* 2015). Po ukončení stresové reakce se většina těchto modifikací vrátí do původního stavu. Některé modifikace však mohou zůstat stabilní a umožnit efektivnější aktivaci stresových genů při dalším vystavení rostlin stejnému stresoru (Obr 1). Opakováním konkrétního stimulu se tedy může vytvořit „stresová paměť“ založená na chromatinových modifikacích. Tyto změny v epigenetickém kódu mohou být děděny nejen mitoticky, ale i meioticky, a tudíž předávány do dalších generací (Luna *et al.* 2012). V této bakalářské práci se budu zabývat pouze epigenetickou „stresovou pamětí“ v rámci jedince, nikoliv transgenerační „stresovou pamětí“. Cílem je podat stručné shrnutí dosavadních experimentů v této oblasti a kriticky zhodnotit jejich výsledky a závěry z nich vyvozené.



**Obr. 1:** Grafy znázorňující možný průběh změn v genové expresi a struktuře chromatinu v průběhu opakovaného působení nějakého stresoru. První graf znázorňuje stresovou odpověď genů nevykazujících stresovou paměť. U těchto genů se úroveň genové exprese i struktura chromatinu v mezistresovém období navracejí do původního stavu. Na druhém grafu je ukázána genová odpověď typická pro „priming“. V tomto případě dochází k trvalým změnám ve struktuře chromatinu, které umožňují rychlejší nástup stresové odpovědi při druhé stresové periodě. Na třetím grafu je pak znázorněn proces vernalizace, kdy jsou změny po první stresové periodě jak v chromatinové struktuře, tak v genové expresi trvalé. Převzato a upraveno podle Eichten *et al.* (2014).

## 2 Chromatinové modifikace

V eukaryotických buňkách je aktivita genu určena nejen jeho sekvencí, ale také jeho pozicí v genomu a strukturou chromatinu. Aktivní geny jsou spojeny s rozvolněnou formou chromatinu, která umožňuje přístup transkripčního aparátu k DNA. Naopak geny umístěné v kondenzovaném chromatinu jsou většinou umlčeny. Změny v chromatinové struktuře odrážející se i v úrovni transkripce jsou řízeny pomocí přechodných značek, kterými jsou chromatinové modifikace. Tento epigenetický kód je velmi dynamický a umožňuje buňce pružně regulovat genovou expresi v závislosti na životních podmínkách. U rostlin mají chromatinové modifikace obzvlášť velký význam, neboť se výrazně podílejí na reakci na různé stresové faktory (Berr *et al.* 2012; Luo *et al.* 2012; Kim *et al.* 2015; Vriet *et al.* 2015).

### 2.1 Typy chromatinových modifikací

Chromatinové modifikace můžeme rozdělit na tři odlišné skupiny – histonové modifikace, výměnu běžných histonů za histonové varianty a metylaci DNA. Všechny tři se výrazně podílejí na regulaci genové exprese například při stresových reakcích. V následujících kapitolách je proto stručně charakterizují a nastíním jejich funkci. Podrobný popis současných znalostí o této problematice není mým cílem, v posledních letech však vyšlo několik výborných přehledových článků, kde jsou různé typy histonových modifikací (Pfluger & Wagner 2007; Liu *et al.* 2010; Luo *et al.* 2012; Feng & Shen 2014), histonových variant (Ingouff & Berger 2010; Deal & Henikoff 2011; Zhu *et al.* 2012; Volle & Dalal 2014) a různých mechanismů metylace a demethylace DNA (Ooi & Bestor 2008; Law & Jacobsen 2010; He *et al.* 2011) u rostlin rozebírány podrobněji. Z těchto článků vycházejí i některé níže uvedené informace obecnějšího charakteru. Čtenáře s větším zájmem o tuto tematiku tedy odkazuji na ně.

#### 2.1.1 Histonové modifikace

Histony jsou zcela zásadní struktury nutné pro sbalení DNA v eukaryotické buňce. Oktamery těchto bílkovin, okolo kterých se omotává vlákno DNA, tvoří nukleosomy, nazývané také základní jednotky chromatinu. Kompaktnost chromatinu ovlivňuje řadu dějů v buňce, jako například úroveň transkripce, DNA replikaci a reparaci. Toto uspořádání je přímo ovlivněné kovalentními modifikacemi na N-koncích histonových proteinů. Mezi histonové modifikace se řadí metylace, acetylace, fosforylace, sumoylace, ubikvitinace a některé další. Bylo prokázáno až 60 různých aminokyselinových zbytků na histonu, které mohou být takto modifikovány (Kouzarides 2007). Typ značky určuje úroveň transkripce

genů. Acetylace a některé typy metylace, fosforylace a ubikvitinace bývají spojovány s aktivací transkripce, zatímco sumoylace a některé typy metylace, ubikvitinace a fosforylace naopak transkripci obvykle reprimují (Zhang *et al.* 2007a).

Acetylace se týká lysinových zbytků a její úroveň je udržována pomocí enzymů histonacetyltransferáz (HAT) a histondeacetyláz (HDAC). Methylace histonů probíhá na zbytcích argininu a lysinu. Na rozdíl od acetylace je možná i násobná metylace, což rovněž ovlivňuje výsledný efekt na strukturu chromatinu. V případě lysinových zbytků může jít až o trimetylaci, v případě argininových zbytků o mono- nebo dimetylaci. Methylace je udržována pomocí enzymů histonmetyltransferáz (HMT; lze rozdělit na PRMT – protein-arginin-metyltransferázy a HKMT – histon-lysin-metyltransferázy) a histondemetyláz (HDM). Fosforylace probíhá na zbytcích serinu a treoninu. Tato značka je ustanovována pomocí enzymů z rodiny serin/threoninových kináz a odstraňována pomocí fosfatáz. Ubikvitin je malý protein přidávaný na zbytek lysinu pomocí enzymů ubikvitiláz. Jeho funkce v buňkách bývá často spojována s degradací různých proteinů. Může však působit také jako signál pro opravy DNA nebo aktivaci transkripce. Zatímco v případě označování proteinů pro degradaci se jedná o polyubikvitinaci, v případě epigenetické značky na histonech jde o monoubikvitinaci. Sumoylace je typ modifikace, kdy je na histon přidáván malý protein SUMO podobný ubikvitinu. Tato modifikace probíhá pomocí aktivačního, konjugačního a ligačního enzymu na zbytcích lysinu.

Různé histonové modifikace jsou v odborných textech označovány zkratkami vyjadřujícími druh histonu, který je modifikován, aminokyselinový zbytek, kterého se to týká a typ modifikace. Tedy například H3K4me3 značí trimetylaci čtvrtého lysinu na histonu H3.

### **2.1.2 Histonové varianty**

Histonové proteiny mohou být v buňkách kódovány i několika různými geny. Produkty těchto genů nazývané histonové varianty mají podobnou sekvenci a jejich exprese je specifická pro určitý stav buňky.

Nejznámější variantou je histon H2A.Z odvozený od histonu H2A. Tato varianta se často vyskytuje v promotorech některých genů, kde patrně zabraňuje metylaci DNA, čímž se podílí na regulaci genové exprese (Zilberman *et al.* 2008). Mezi další funkce H2A.Z patří vymezení hranic heterochromatinu a udržování integrity genomu. Podílí se i na odezvě na faktory prostředí (především teplotu) (Kumar & Wigge 2010). U rostlin existují i další varianty H2A, které jsou specificky spojeny s určitým typem stresu (Zhu *et al.* 2012).

Podobný význam jako H2A.Z má varianta H3.3, která se liší od histonu H3 jen ve 3-4 aminokyselinách. Vyskytuje se v nedělicích se buňkách a histon H3 nahrazuje v průběhu transkripce, čímž označuje již transkribované geny. Naopak varianta histonu H3 zvaná H3.1 je zase spojována s transkripčně neaktivním chromatinem (Stroud *et al.* 2012).

Rovněž v případě spojovacího histonu H1 existují u rostlin jeho různé varianty. Některé z nich jsou indukovány stresovými faktory, např. suchem (Ascenzi & Gantt 1997; Ascenzi & Gantt 1999; Scippa *et al.* 2004).

### 2.1.3 Metylace DNA

Další důležitou součástí epigenetického systému buňky je metylace DNA. Tato modifikace probíhá na pátém uhlíku cytosinu za vzniku 5-metylcytosinu. Hlavními funkcemi metylace DNA je ochrana genomu rostliny před mobilními genetickými elementy a regulace transkripce (Zilberman *et al.* 2007). U rostlin k metylaci dochází jak v symetrických CG a CHG (H = A, C nebo T) sekvencích, tak v asymetrických CHH sekvencích.

Metylace je zajišťována pomocí DNA metyltransferáz a může být udržovací nebo *de novo*. U rostlin je metylace v CG sekvencích udržována pomocí enzymů patřících do rodiny metyltransferázy 1 (MET1) a v CHG sekvencích hlavně pomocí chromometyltransferázy 3 (CMT3). Asymetrické sekvence jsou metylovány především *de novo*, a to enzymy z rodiny „domains-rearranged methyltransferase“ 1 a 2 (DRM1, DRM2) (Cao & Jacobsen 2002). Nicméně uvedené rozdělení je pouze přibližné a různé DNA metyltransferázy mohou být při *de novo* i udržovacích metylacích vzájemně zastupitelné.

*De novo* metylace je u rostlin také spojená s RNA interferencí, kdy cílová sekvence je rozpoznávána specifickými typy siRNA. Tato metylace DNA bývá označována jako RdDM („RNA directed DNA methylation“) a jedná se o mechanismus typický pro rostliny (Wassenegger *et al.* 1994).

Metylace DNA je také silně provázána s modifikací histonů. Byla prokázána zpětnovazebná smyčka, kdy udržovací metyltransferázy metylují v sekvencích CHG a CHH podle metylace H3K9. Zároveň jedna rodina histonových metyltransferáz rozeznává metylaci v těchto sekvencích a podle nich modifikuje příslušné histony (Bernatavichute *et al.* 2008).

Metylace DNA je převážně stabilní epigenetická značka. K její ztrátě může docházet pasivně při replikaci DNA nebo aktivně pomocí specifických enzymů. U rostlin to jsou enzymy z rodiny DNA glykosyláz. Aktivní demetylace je založena na mechanismu opravy DNA pomocí vystřížení metylované báze. Rostlinné glykosylázy rozeznávají metylovaný



cytosin, který odštěpí od cyrkfosfátové kostry DNA. Chybějící báze je pak nahrazena normálním cytosinem opravnými mechanismy podle komplementárního vlákna.

## 2.2 Základní metody hodnocení chromatinových modifikací

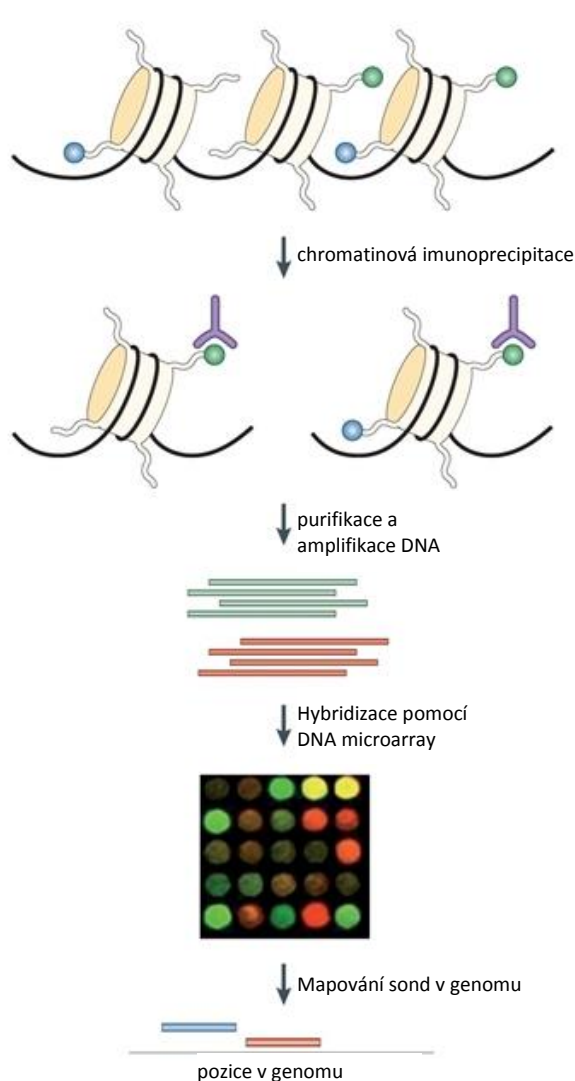
Přístupů, používaných při analýze chromatinových modifikací, je více. Zejména s nástupem "omického" věku byla vyvinuta celá řada metod, které umožňují hodnotit chromatinové modifikace v celogenomovém měřítku. Tyto metody lze rozdělit do dvou hlavních kategorií: metody používané pro stanovení modifikací histonů a metody používané pro stanovení metylace DNA.

### 2.2.1 Metody pro stanovení modifikací histonů

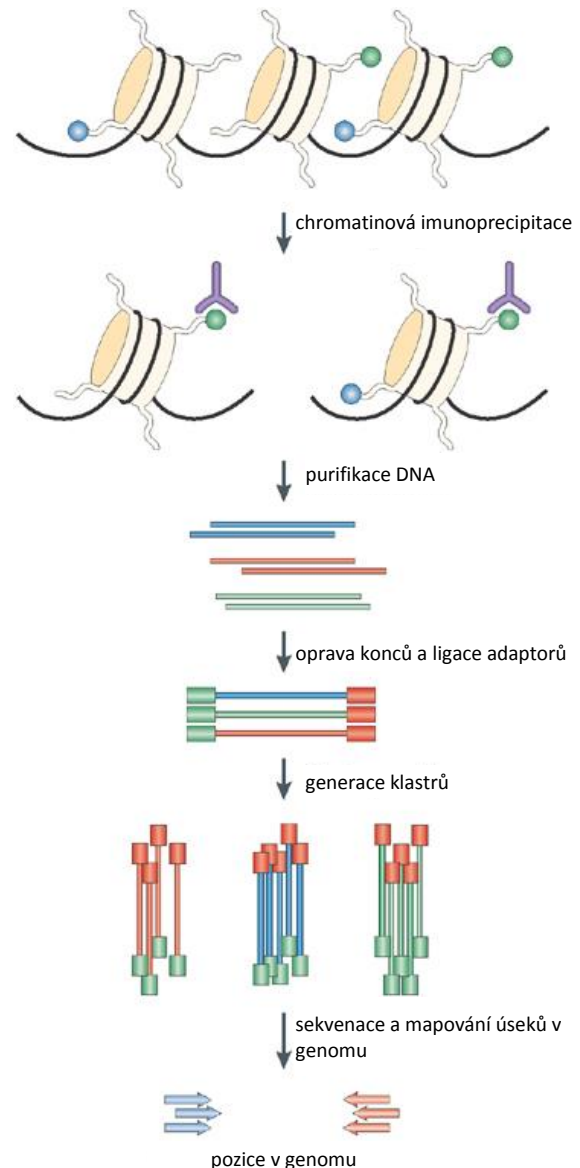
V současnosti nejrozšířenější metodou pro analýzu chromatinových modifikací, resp. identifikaci oblastí, kde k nim dochází, je chromatinová imunoprecipitace (ChIP). Tato metoda umožňuje zachycení chromatinových oblastí, kde došlo k histonovým modifikacím, pomocí protilátek specifických pro konkrétní histonovou epigenetickou značku. DNA je nejprve kovalentními vazbami propojena s histony (tzv. „crosslinking“) pomocí formaldehydu nebo jiného činidla. Poté je chromatin rozštěpen na menší úseky (např. sonikací) a přidána příslušná primární protilátka, která umožní specifické zachycení hledaných oblastí. Nakonec je protilátka odstraněna, „crosslinky“ mezi histony a DNA zrušeny a získaná čistá DNA z takto zachycených míst je pak amplifikována pomocí PCR a je s ní dále pracováno (Orlando *et al.* 1997).

ChIP lze využít v kombinaci s dalšími technikami i ke stanovení chromatinových modifikací v celogenomovém měřítku. Jednou z takových kombinací je tzv. ChIP-chip analýza (Obr. 2). Je to v podstatě ChIP následovaná „DNA microarray“, což je hybridizace DNA získané ChIP s DNA sondami (reprezentujícími celý genom nebo jenom jeho část) prováděná na mikročipech. U této metody však hrozí nebezpečí falešné negativy v důsledku špatného nasednutí DNA na sondu. Nejběžnější dnes používanou metodou je tzv. ChIP-seq analýza, kdy po ChIP následuje hromadná paralelní sekvenace DNA (Obr. 3). Tato metoda je například v porovnání s ChIP-chip mnohem citlivější a má vyšší rozlišení (Kaufmann *et al.* 2010). Další možností je kombinace ChIP se sériovou analýzou genové exprese, tzv. ChIP-SAGE metoda (Obr. 4). Při této metodě jsou na DNA získanou pomocí ChIP nejprve připojeny „linkerové“ sekvence s navázaným biotinem, přes který jsou příslušné oblasti DNA přichyceny na streptavidinové kuličky. Poté dojde k jejich rozštěpení specifickou restrikcí endonukleázou (RE), navázání dalších „linkerů“ a vytvoření 21-22 bp dlouhých sekvenčních

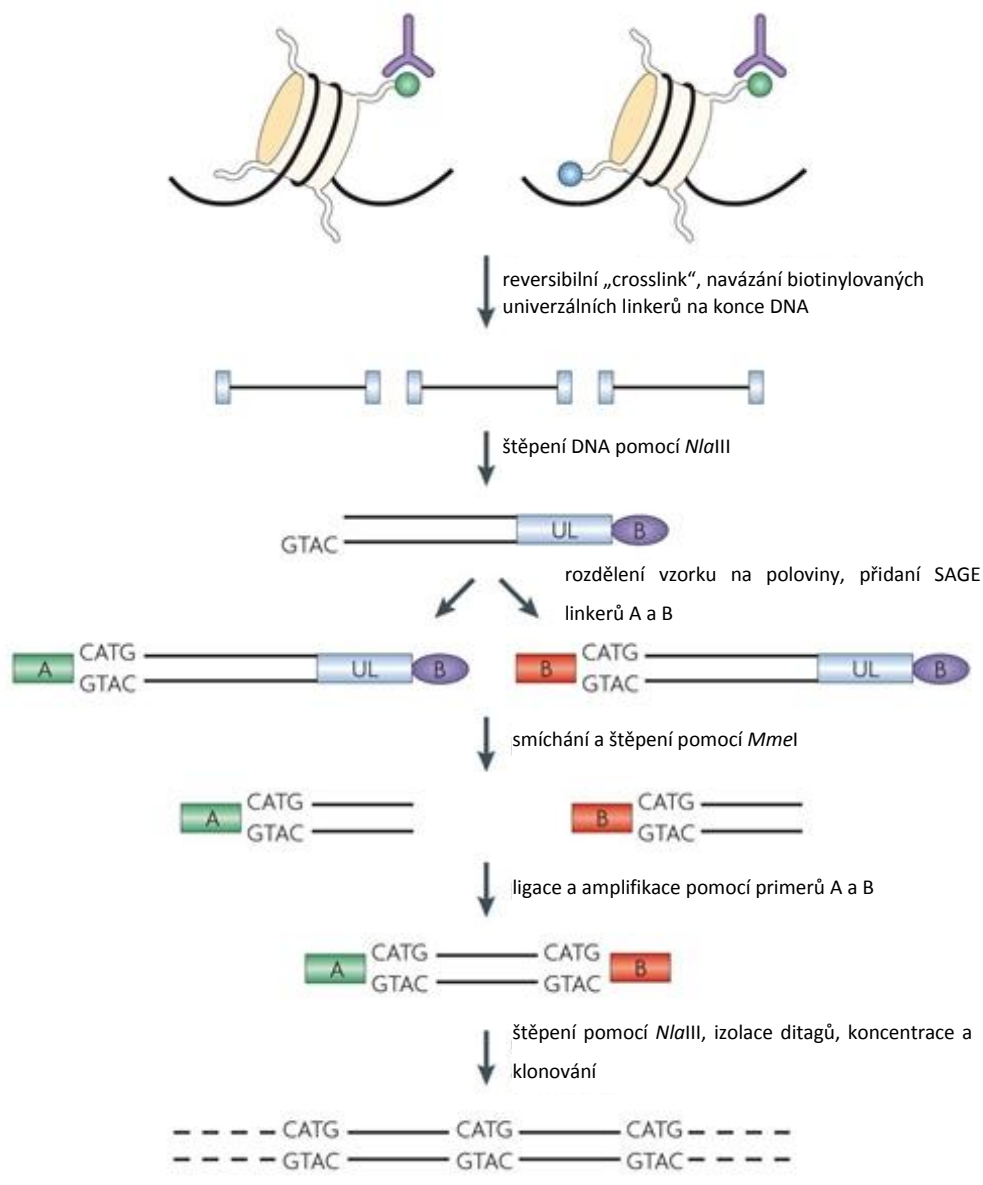
značek („tagů“) pomocí další RE. Tyto značky jsou pak osekvenovány a mohou sloužit k identifikaci těch oblastí genomu, kde k histonovým modifikacím došlo (Roh *et al.* 2004). ChIP může být použita také ke kvantifikaci histonových modifikací, bez toho, aby byly identifikovány konkrétní oblasti, kde k těmto modifikacím došlo. V tomto případě po ChIP následuje kvantitativní real-time PCR (Haring *et al.* 2007).



**Obr. 2: Schéma chromatinové imunoprecipitace zkombinované s DNA „microarray“ (ChIP-chip).** Nejprve je provedena ChIP, kdy jsou modifikované úseky označeny specifickými protilátkami. Poté jsou tyto úseky amplifikovány pomocí PCR. Nakonec je takto připravená DNA hybridizována spolu s kontrolní DNA značenou jinou fluorescenční značkou se sondami v DNA „microarray“. Tyto sondy jsou pak zamapovány do genomu. Převzato a upraveno podle Schones & Zhao (2008)



**Obr. 3: Schéma chromatinové imunoprecipitace zkombinované se sekvenačními technikami.** Nejprve jsou pomocí ChIP označeny modifikované úseky. Konce DNA jsou upraveny ligací adaptorů a získané úseky jsou amplifikovány pomocí PCR. Následně jsou tyto sekvenovány pomocí DNA syntézy. Výsledné sekvence jsou zamapovány do genomu. Převzato a upraveno podle Schones & Zhao (2008)



**Obr. 4: Schéma chromatinové imunoprecipitace následované sériovou analýzou genové exprese (ChIP-SAGE).** Nejprve je provedena ChIP pro zachycení modifikovaných úseků. Následně jsou na konce DNA připojeny univerzální linkery značené biotinem a takto upravená DNA je navázána na streptavidinové kuličky. Vzorek je poté naštěpen pomocí *NlaIII* a na konce takto získaných úseků jsou připojeny další linkery obsahující sekvenci rozpoznávanou *MmeI*. Štěpením touto restriční endonukleázou vznikají úseky 21-22 bp dlouhé. Tyto krátké sekvence jsou použity jako tzv. sekvenační tagy, naklonovány a následně zamapovány do genomu. Převzato a upraveno podle Schones & Zhao (2008)

Další metodou používanou pro stanovení histonových modifikací je hmotnostní spektrometrie (MS). Tato metoda je založená na rozdělování ionizovaných molekul podle poměru hmotnosti a náboje pomocí elektromagnetického pole. V různých modifikacích umožňuje charakterizaci histonových modifikací, histonových variant a dokonce objevení

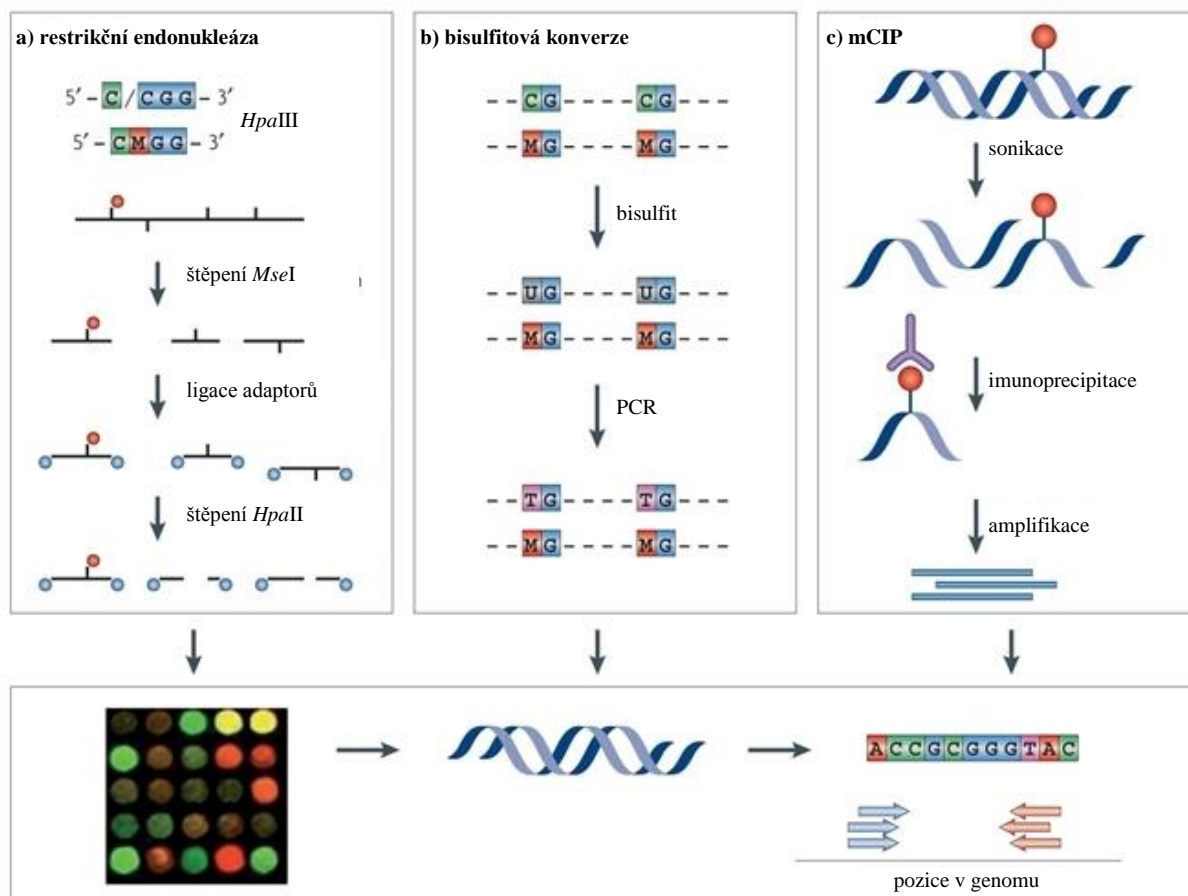
nových modifikačních míst. Histony mohou být z buněk vyizolovány např. pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) a poté podrobeny buď elektrosprejové ionizační tandemové MS (tuto metodu např. využili Banks *et al.* (2001) pro sledování fosforylace na histonu H1) nebo tzv. „peptide mass fingerprinting“ (PMF) (tato metoda umožňuje efektivní zkoumání histonových modifikací bez nutnosti proteinového sekvenování a např. autoři Zhang *et al.* (2003) ji využili pro odhalení nových modifikačních míst na histonech H3 a H4).

### 2.2.2 Stanovení metylace DNA

Bisulfitová konverze je jednou ze základních metod pro stanovení metylace DNA (Obr. 5b). Tato metoda využívá chemické reakce, kdy je nemetylovaný cytosin za přítomnosti bisulfitu sodného konvertován na uracil, zatímco 5-metylcytosin se nemění (Hayatsu *et al.* 1970). Po konverzi zpravidla následuje „microarray“ analýza nebo sekvenace a porovnání konvertované sekvence s tou původní. Tím je možné identifikovat místo, kde k metylaci DNA došlo. Využití propojení bisulfitové konverze se sekvenačními metodami umožňuje analýzu metylace i ve vysoce repetitivních sekvencích, což by bylo velice obtížné při použití „microarray“ analýzy, a zároveň je tato metoda mnohem citlivější (Cokus *et al.* 2008).

Původnější metodou používanou pro analýzu metylace DNA je mapování pomocí RE (Obr. 5a). Některé RE mohou být inhibovány metylovanými sekvencemi. Nejčastěji se využívá dvojice RE štěpících stejnou sekvenci, které jsou citlivé k různým sekvenčním typům metylace. Produkty štěpení se pak dají porovnat pomocí elektroforézy (Kaput & Sneider 1979), „microarray“ analýzy (Tompa *et al.* 2002) nebo sekvenačních technik (Oda *et al.* 2009).

Jinou možností pro zkoumání metylace DNA je afinitní purifikace. Jednou z metod využívajících afinitní purifikaci je například tzv. MIRA, kdy se k rozpoznávání metylovaných sekvencí využívají proteiny s metyl-CpG vazebnou doménou (MBD). Tato metoda je přibližně stejně citlivá jako bisulfitové sekvenování, nevýhodou však může být fakt, že nerozeznává metylace v ostatních sekvencích (Rauch & Pfeifer 2005). Sekvenčně nespecifickou metodou afinitní purifikace je chromatinová imunoprecipitace využívající protilátky specificky vážící 5-metylcytidin (meDIP, mCIP) (Obr. 5c). Tato metoda v kombinaci s DNA „microarray“ analýzou nebo sekvenováním je vysoce efektivní a je vhodná pro rozsáhlé celogenomové analýzy (Weber *et al.* 2005).



**Obr. 5: Schéma základních metod používaných pro hodnocení metylace DNA:** a) analýza pomocí specifických restrikčních endonukleáz; b) bisulfitové sekvenování; c) využití chromatinové imunoprecipitace (mCIP); všechny metody mohou být zkombinovány např. s DNA „microarray“ nebo sekvenačními technikami. Obrázek převzat a upraven podle Schones & Zhao (2008).

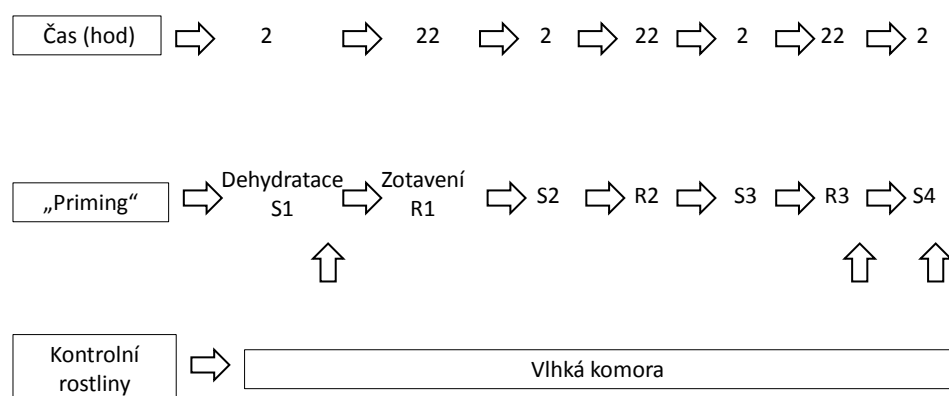
S rozvojem sekvenačních technik byly vytvořeny metody umožňující přímou detekci metylované DNA. Jednou z těchto metod je tzv. „single-molecule real-time“ (SMRT) sekvenování. Při této metodě přidává enzym DNA polymeráza fluorescenčně značené nukleotidy ke komplementárnímu vlákně. V průběhu inkorporování nukleotidu dojde k vyzáření fluorescenčního pulsu, který je charakteristický svou délkou a vlnovou délkou pro jednotlivé nukleotidy. Autoři Flusberg *et al.* (2010) prokázali, že přítomnost metylované báze v templátu může ovlivnit délku mezidobí mezi jednotlivými pulsy. Provedli několik experimentů s DNA metylovanou na adeninu a cytosinu a zjistili, že mezidobí po inkorporaci báze naproti metylované bázi je až pětikrát delší než u báze nemetylované (Flusberg *et al.* 2010).

### 3 Chromatinové modifikace v souvislosti s „mitotickou stresovou pamětí“ rostlin

Prací zabývajících se modifikacemi chromatinu v kontextu „stresové paměti“ rostlin dosud není příliš mnoho, a to jak v případě „somatické/mitotické paměti“, tak v případě „transgenerační/meiotické paměti“ (kterou se zde nezabývám). Stresové faktory, které byly v souvislosti s touto problematikou sledovány, jsou jak abiotického, tak biotického charakteru.

#### 3.1 Dehydratace

První studií zaměřenou na to, k jakým změnám chromatinových modifikací dochází při „primingu“ navozeném opakovanou dehydratací, byla práce autorů Ding *et al.* (2012) na modelové rostlině *A. thaliana*. Dehydratační stres navodili tak, že rostliny vyjmuli z půdy, opláchli je a poté sušili na vzduchu po dobu dvou hodin. Tuto fázi nazvali stresová perioda 1 (S1). Rostliny tak dosáhly přibližně 65% relativního obsahu vody (RWC), což je stav, který ještě umožňoval zotavení rostliny po rehydrataci. Po této fázi následovala první perioda zotavení (R1). Rostliny byly uloženy do vlhké komory po dobu 22 hodin. Tyto fáze byly opakovány až do S4. Některé rostliny byly po vynětí z půdy vloženy přímo do vlhké komory, aby později mohly sloužit jako kontrola (Obr. 6).

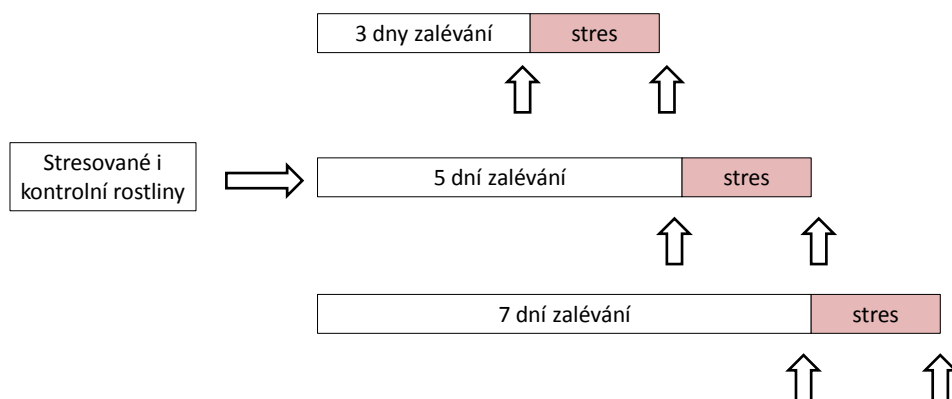


**Obr. 6:** Schéma experimentu autorů Ding *et al.* (2012): dehydratační periody o délce 2 hod byly střídány zotavovacími periodami dlouhými 22 hod, svíslé šipky ukazují dobu odběrů vzorků pro analýzu chromatinových modifikací. Autoři pro toto měření použili CHIP následovanou „real-time“ PCR.

Pro analýzu změn chromatinových modifikací si autoři vybrali 2 geny vykazující zvýšenou transkripční odpověď na sekundární stres, *RD29B* a *RAB18*, a 2 geny nevykazující zvýšenou odpověď, *RD29A* a *COR15A*, jejichž expresi pak mezi sebou porovnávali. *RD29B* a *RAB18* jsou geny regulované kyselinou abscisovou, které se účastní různých stresových odpovědí včetně dehydratace. *RD29A* a *COR15A* jsou pak chladem nebo kyselinou abscisovou regulované geny, které rovněž mají funkci v odpovědi na různé stresové faktory. U první dvojice genů byla ve stresové periodě S4 naměřena dokonce až třikrát větší úroveň transkripce oproti periodě S1. Ovšem v průběhu zotavovací periody se vždy obnovila bazální úroveň transkripce, jakou jednotlivé geny vykazovaly před primární stresovou periodou.

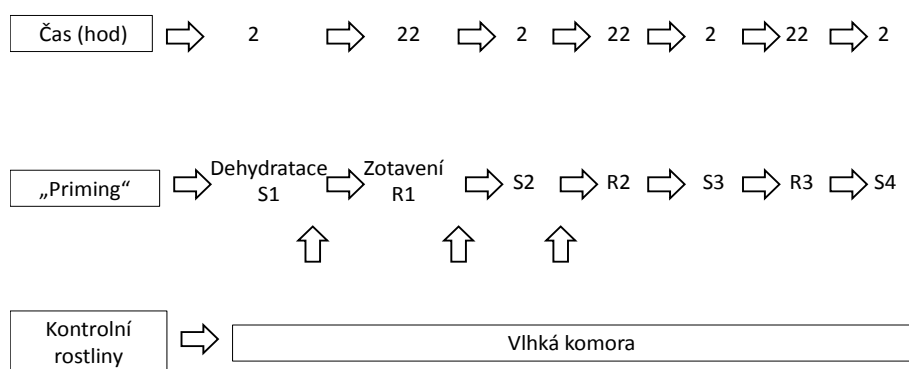
Pro potvrzení hypotézy, zda se chromatinové modifikace podílejí na „primingu“ genů, byla měřena úroveň H3K4me3, což je histonová modifikace, která bývá spojována s aktivací transkripce. Autoři měřili hladiny této modifikace pomocí ChIP následované „real-time“ PCR. U genů *RD29A* a *COR15A* bylo zjištěno, že při každé stresové periodě dochází k nárůstu H3K4me3 a po ukončení stresové periody se míra metylace vrací zpět na bazální úroveň jako u nestresovaných rostlin. U genů *RD29B* a *RAB18* tomu však bylo jinak. Opět docházelo k nárůstu H3K4me3 při indukci stresem, ovšem opakovaně stresované rostliny vykazovaly mnohem vyšší úroveň metylace než kontrolní rostliny stresované pouze jednou (S1). V průběhu zotavovací periody R3 byla přitom u opakovaně stresovaných rostlin naměřena stejná míra metylace jako v periodě S1. To dokazuje, že u genů nevykazujících zvýšenou odpověď na stres slouží H3K4me3 jako reverzibilní značka, která se dynamicky mění spolu s úrovní transkripce. Naproti tomu u genů, které zvýšenou odpověď vykazovaly, může být H3K4me3 ustanovena trvale a sloužit jako epigenetická značka pro „stresovou paměť“.

Ding *et al.* (2012) dále zjišťovali, jak dlouho tato paměť vydrží, pokud již rostliny nejsou dále stresovány. Proto rostliny zasadili zpět do půdy a zalévali je po dobu 3, 5 nebo 7 dnů. Poté následovala další stresová perioda (Obr. 7). Měřena byla úroveň transkripce výše zmíněných genů, a to vždy před a po vystavení rostliny stresu. U genů, které si zachovaly zvýšenou úroveň H3K4me3 i během mezistresových period, byla zaznamenána nadměrná transkripce po zotavovací fázi dlouhé 3 a 5 dní, ovšem po sedmidenním zotavení byla úroveň transkripce již na stejné úrovni jako u nestresovaných rostlin. Proto došli k závěru, že tento typ paměti je zachován po dobu 3 a 5 dnů, ovšem po 7 dnech zotavování je již ztracen (Ding *et al.* 2012).



**Obr. 7: Schéma experimentu autorů Ding *et al.* (2012) zkoumajícího délku „stresové paměti“:** stresované i kontrolní rostliny byly opět zasazeny a zalévány po dobu 3, 5 a 7 dní a poté znovu vystaveny dehydratačnímu stresu; svislé šipky označují dobu odebrání vzorků pro měření úrovně transkripce a chromatinových modifikací. Pro analýzu chromatinových modifikací byla použita CHIP následovaná „real-time“ PCR.

Podobný experiment provedli také Liu *et al.* (2014a). Tito autoři použili tři týdny staré rostlinky *A. thaliana*. Sazeničky vyjmuli z půdy a vložili je přes noc do vlhké komory, aby se mohla zahojit případná poškození kořenů. Poté je vystavili první stresové periodě (S1) v podobě sušení na vzduchu o délce trvání 2 hodin. Pak následovala 22 hodin dlouhá zotavovací fáze (R1) ve vlhké komoře. Druhá stresová perioda (S2) byla provedena stejně jako první s tím rozdílem, že rostlinky byly po vyjmutí z vlhké komory nejprve položeny na filtrační papír, aby se odstranila přebytečná voda. Stejný postup byl i pro následující periody až do S4 (Obr. 8).



**Obr. 8: Schéma experimentu Liu *et al.* (2014a,b):** Tito autoři použili stejné rozvržení experimentu jako Ding *et al.* (2012), ovšem odběry vzorků pro analýzu histonových modifikací byly provedeny jak u stresovaných rostlin, tak u kontrol, v jiných periodách (na obr. označeno svislými šipkami) než ve zmíněné studii. V obou studiích pro hodnocení chromatinových modifikací byla použita CHIP následovaná „real-time“ PCR.



Tito autoři sledovali transkripci různých genů, rozdělených podle Ding *et al.* (2013) do 6 různých genových tříd na základě jejich transkripce v první a druhé stresové periodě. Z toho 4 skupiny byly označeny jako paměťové geny. První skupina (tzv. [+/+] geny) vykazovala v S1 periodě vyšší úroveň transkripce než před stresem a zároveň se vyznačovala výrazně vyšší superindukovanou transkripcí v S2 periodě. Druhou skupinu tvořily tzv. [+/-] geny, u kterých byla úroveň transkripce v S2 periodě výrazně nižší (podobná jako před stresem) než v S1. Dalšími skupinami paměťových genů byly tzv. [-/-] a [-/+ ] geny (Ding *et al.* 2013).

Liu *et al.* (2014a) mimo jiné pomocí ChIP následované „real-time“ PCR zkoumali, zda se regulace exprese [+/-] paměťových genů účastní H3K4me3 a H3K27me3 jako paměťové značky. Zjistili, že H3K4me3 se ve velkém množství objevuje v těchto genech v S1 periodě, ovšem před stresem a v R1 a S2 periodách byla hladina této značky nízká. To odpovídalo naměřené transkripční úrovni v těchto periodách, neboť H3K4me3 bývá spojována s transkripčně aktivním chromatinem. Z tohoto výsledku vyvodili závěr, že při regulaci [+/-] genů slouží H3K4me3 jako dynamický regulátor transkripce, nikoliv jako paměťová značka pro „priming“. Dále byly studovány hladiny H3K27me3, u které se předpokládá, že slouží jako jeden z hlavních mechanismů umlčování genů (Zhang *et al.* 2007b). Liu *et al.* (2014a) předpokládali, že by tato modifikace mohla sloužit jako paměťová značka pro nízkou transkripci genů v R1 a S2. Ovšem žádné výrazné změny v míře této modifikace nebyly nalezeny (Liu *et al.* 2014a).

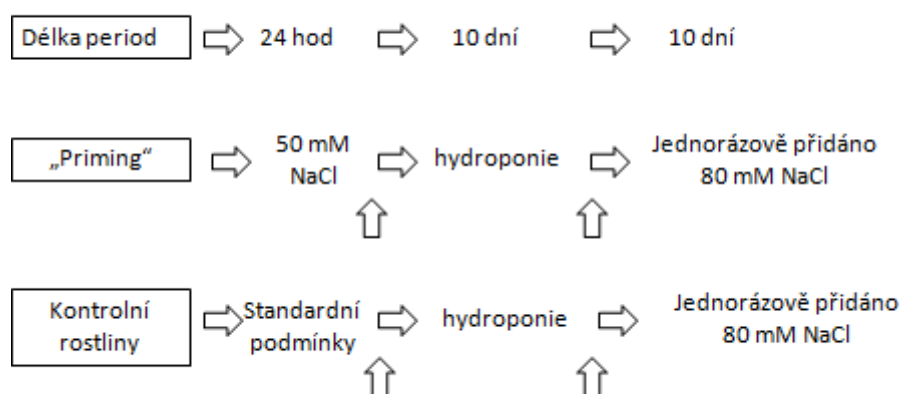
V následující práci pak Liu *et al.* (2014b) publikovali výsledky experimentů, kdy zjišťovali roli H3K27me3 a H3K4me3 v „primingu“ [+/+] paměťových genů. Pro přípravu rostlin použili stejný postup jako Ding *et al.* (2012). Nejprve zjišťovali, zda H3K27me3 slouží jako paměťová značka pro nízkou transkripci v R1 periodě. Z analýzy pomocí ChIP a následné „real-time“ PCR vyplynulo, že se míra této značky v průběhu různých period stresového cyklu nijak dramaticky nemění, což potvrdilo předchozí výsledky této skupiny, že H3K27me3 se „primingu“ paměťových genů při dehydratačním stresu neúčastní (viz výše).

V této práci se autoři zaměřili znovu i na změny hladin H3K4me3. Pro svoji analýzu použili sledování 5 genů, které vykazovaly transkripční aktivitu paměťových [+/+] genů. Tyto geny rozdělili na dvě skupiny podle jejich transkripční aktivity. Tři z těchto pěti genů vykazovaly i v R1 fázi zvýšenou úroveň transkripce. U zbylých dvou genů byla zaznamenána pouze bazální úroveň transkripce. Bylo zjištěno, že u všech zkoumaných genů po první stresové periodě došlo k nárůstu H3K4me3 na 5'-konci genu. V R1 periodě se však míra této metylace u prvních genů znatelně zvýšila a jejich transkripce probíhala nadále. Tím se odlišovaly od druhých dvou genů, u nichž došlo ke snížení transkripce, i když úroveň

metylace H3K4me3 zůstala téměř stejná. V S2 fázi pak došlo u všech genů k výraznému nárůstu jak této metylace, tak jejich transkripce. Na základě těchto výsledků Liu *et al.* (2014b) předpokládají, že ve skupině [+/+] genů existují dvě podskupiny s odlišným transkripčním chováním v R1 fázi stresového cyklu a s odlišným regulačním mechanismem. U první skupiny genů H3K4me3 jako paměťová značka neslouží a její nárůst v S2 fázi oproti S1 fázi je pouze důsledkem jejich superindukované transkripce (Liu *et al.* 2014b).

### 3.2 Salinita

Dalším typem abiotického stresu je stres zasolením nebo také hyperosmotický stres. Sani *et al.* (2013) zaměřili své zkoumání na změny chromatinových modifikací při opakovaném hyperosmotickém stresu a zároveň chtěli prokázat existenci dlouhodobé somatické paměti. Tito autoři nejprve vystavili rostliny *A. thaliana* pěstované na miskách s agarem ve stádiu V4 primárnímu mírnému stresu ve formě 50 mM roztoku NaCl aplikovaného na kořeny. Po 24 hodinách byly všechny rostliny přeneseny do standardní hydroponie, kde byly ponechány v optimálních a kontrolovaných podmínkách po dobu 10 dní. Poté následovalo druhé vystavení rostlin stresu, kdy byl do hydroponické kultury přidán 80 mM roztok NaCl, kterému byly vystaveny všechny rostliny včetně kontrol (Obr. 9). Bohužel, po tomto druhém období stresu již byla hodnocena pouze morfologie rostlin, koncentrace Na<sup>+</sup> a transkripce vybraných 4 genů a nikoliv modifikace chromatinu.



**Obr. 9:** Schéma experimentu Sani *et al.* (2013): vertikální šipky ukazují dobu odběrů vzorků pro celogenomové analýzy chromatinových modifikací. Autoři pro tato měření použili ChIP spojenou se sekvenováním nebo „real-time“ PCR.

Zkoumal se rozdíl v H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2 a H3K27me3 mezi kontrolou a stresovanými rostlinami, a to pomocí celogenomové analýzy založené na ChIP-sekvenování a ChIP-kvantitativní PCR. Při této analýze byl u stresovaných rostlin po prvním období stresu

objeven výrazný nárůst počtu ostrůvků bohatých na H3K27me3 oproti kontrolním rostlinám. Ovšem celková hladina této značky u rostlin vystavených primárnímu stresu poklesla, a to o necelá 3 %. Po detailnějším zkoumání autoři zjistili, že dochází k rozdělování ostrůvků na menší, a proto jejich počet narůstá i přes snížení celkové úrovně H3K27me3. U ostatních modifikací nebyly naměřeny žádné výrazné změny v počtu ostrůvků, protože nedocházelo k jejich fragmentaci.

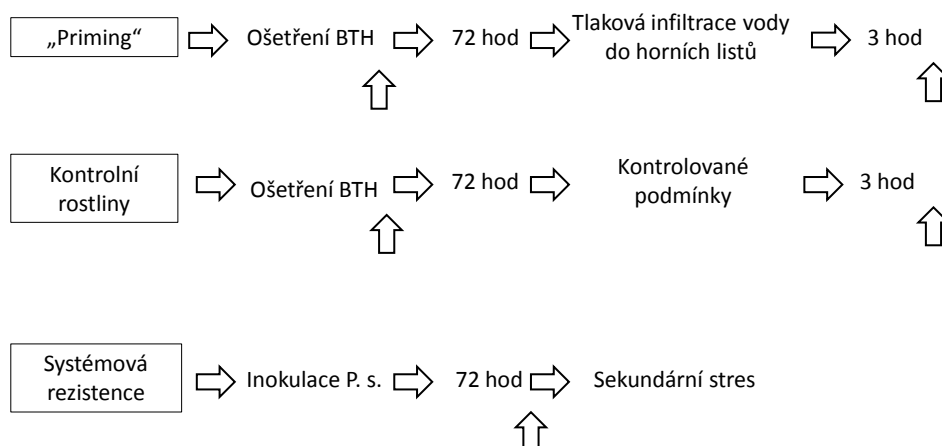
Dále autoři provedli analýzu, která vyhledávala konkrétní rozdíly v úrovni jednotlivých histonových modifikací mezi stresovanými a kontrolními rostlinami po primárním stresu. Největší rozdíl byl naměřen u H3K27me3, kdy byl až dvojnásobný. U H3K4me2 a H3K4me3 byl pak rozdíl vyšší než 1,2. Naopak u H3K9me3 nedošlo k téměř žádným změnám a proto tato modifikace nebyla dále v této studii zkoumána. Autoři poté usoudili, že hyperosmotický „priming“ navozuje spíše než rozsáhlé celogenomové změny v metylaci histonů změny menší a specifické. Důležité je, že tyto změny byly měřitelné i po 10 dnech od vystavení primárnímu stresu, což by mohlo způsobovat zvýšenou úroveň transkripce genů indukovaných hyperosmotickým stresem ve druhé stresové periodě.

Autoři se pak blíže zaměřili na pokles metylace histonů u genu *HKT1*. Tento gen kóduje kořenově specifický Na<sup>+</sup> transportér, který vycytává sodné ionty z transpiračního toku. Předpokládá se, že hraje významnou roli ve zvýšené toleranci na hyperosmotický stres. I po 10 dnech od vystavení primárnímu stresu zde byly naměřeny nižší hladiny H3K27me3, nicméně tyto změny byly udržovány převážně v parenchymatických buňkách xylému. Tento výsledek naznačil, že některé změny v chromatinových modifikacích mohou být i buněčně specifické. V průběhu druhé stresové periody pak byla zaznamenána nižší koncentrace Na<sup>+</sup> v listech než u rostlin kontrolních. Tento jev byl způsoben zvýšenou expresí genu *HKT1* v parenchymatických buňkách kořene. Autoři opět předpokládali, že toto zvýšení exprese ve druhé stresové periodě je způsobeno nižší hladinou H3K27me3 v genu *HKT1*. Zvýšená exprese po druhé periodě stresu byla pozorována také u genu *PIP2E* kódujícího akvaporin plasmatické membrány a byla opět spojena s nižší úrovní H3K27me3. Naopak u dalších dvou genů (*GH3.1* a *GH3.3*), které kódují enzymy účastníci se syntézy auxinu a kyseliny jasmonové, byla situace opačná (Sani *et al.* 2013).

### 3.3 Mechanické poškození

Jaskiewicz *et al.* (2011) se zaměřili na změny chromatinových modifikací ve *WRKY* genech u *A. thaliana*. *WRKY* geny kódují transkripční faktory, které se účastní mnoha regulačních procesů v rostlině včetně obranných mechanismů vůči patogenům (Encinas-

Villarejo *et al.* 2009). Tito autoři otestovali jedenáct z těchto genů, zda vykazují odpověď na sekundární stres typickou pro „priming“ po aplikaci induktoru BTH. Tato látka v buňkách navozuje podobné podmínky a odpovědi, jaké vznikají při mechanickém poranění rostliny. U třech z těchto genů (*WRKY6*, *WRKY29* a *WRKY53*) byl tento typ odpovědi skutečně zaznamenán. Při následném stresu navozeném tlakovou infiltrací vody do listu byla zjištěna výrazně vyšší indukovaná transkripce než u kontrolních rostlin (Obr. 10).



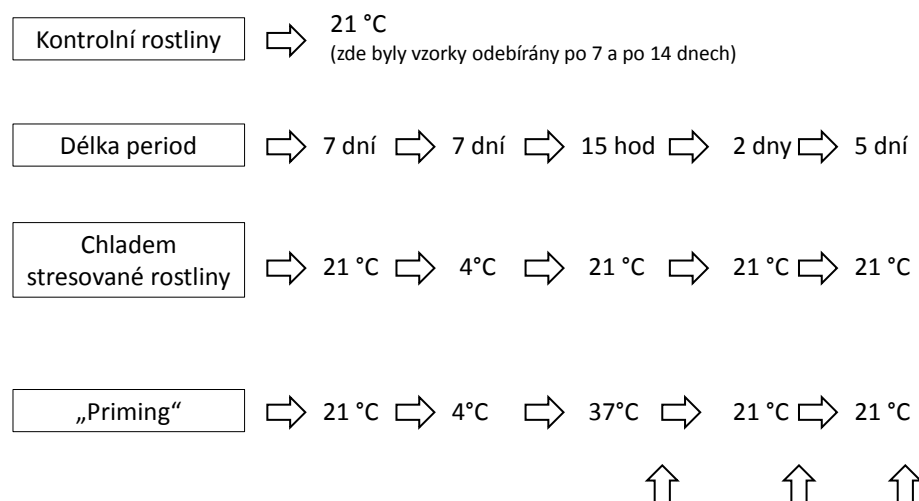
**Obr. 10: Schéma experimentu autorů Jaskiewicz *et al.* (2011):** Tito autoři nejprve ošetřili všechny rostliny induktorem BTH. Po 72 hod mezidobí pak polovinu rostlin stresovali tlakovou infiltrací vody do listu. Spodní řádek znázorňuje experiment zkoumající roli histonových modifikací v systémové rezistenci (kap. 3.6). Tyto rostliny byly inokulovány bakterií *Pseudomonas syringae* (P. s.) do tří spodních listů. Po 72 hod byly měřeny hodnoty chromatinové modifikace v horních listech listové růžice. Svislé šipky označují dobu odběru vzorků pro měření chromatinových modifikací. Pro tuto analýzu autoři použili ChIP spojenou s „real-time“ PCR.

U těchto tří vybraných genů byly dále měřeny hladiny H3K4me, H3ac a H4ac v jejich promotorech pomocí ChIP následované kvantitativní PCR. U genu *WRKY29* se po aplikaci BTH zvýšila úroveň H3K4me2, H3K4me3 i H3K4ac, aniž by došlo k aktivaci transkripce tohoto genu. U zbylých dvou genů došlo k výraznému navýšení pouze v případě H3K4me3. Naměřená úroveň byla srovnatelná s plně aktivními geny. Ve druhé stresové periodě došlo u příslušných genů k dalšímu navýšení úrovně těchto modifikací. Všechny tyto výsledky naznačují, že zvýšení příslušných chromatinových modifikací by mohlo usnadňovat aktivaci genů při následném stresu (Jaskiewicz *et al.* 2011).

### 3.4 Kombinovaný stres

Zvýšená odolnost vůči sekundárnímu stresu se nemusí týkat pouze opakované aplikace stejného stresového faktoru. Bylo zjištěno, že konkrétní typ stresového faktoru může navodit zvýšenou odolnost i k jinému typu stresového faktoru, který je aplikován po něm. Autoři Tittel-Elmer *et al.* (2010) studovali rozvolnění umlčeného chromatinu indukované teplem, kterému předcházela delší chladová perioda. Pro experiment použili transgenní linii *A. thaliana* L5, která ve svém genomu obsahovala několik kopií genu kódujícího  $\beta$ -glukuronidázu (GUS). Promotor tohoto genu byl epigeneticky umlčen. Aktivace tohoto genu se stala indikátorem úspěšného rozvolnění chromatinu. Jednotýdenní rostliny byly nejprve vystaveny chladu 4 °C po dobu 7 dní. Poté byly rostliny ihned přesunuty do prostředí o teplotě 37 °C. Kontrolní rostliny byly rozděleny do dvou skupin, kdy první skupina nebyla vystavena žádnému stresu a druhá skupina prošla pouze primární chladovou periodou (Obr. 11).

Poté autoři zjišťovali, zda v jednotlivých skupinách dochází k uvolnění umlčovaného chromatinu pomocí biochemické reakce zjišťující přítomnost GUS. Bylo zjištěno, že k tomuto jevu dochází pouze u rostlin vystavených stresu zvýšenou teplotou. Ovšem transkripty tohoto genu byly již po 2 dnech od vystavení rostlin 37 °C téměř nedetekovatelné. To naznačuje, že aktivované geny jsou po odeznění stresu opět rychle umlčovány. Pro kontrolu byla prozkoumána transkripční aktivita jiných netransgenních umlčovaných lokusů. Výsledek byl stejný jako v případě GUS.



**Obr. 11: Schéma experimentu autorů Tittel-Elmer *et al.* (2010):** Tito autoři nejprve rostliny vystavili dlouhé chladové periodě, po níž u části rostlin následoval okamžitý teplotní skok do 37 °C. Změny v chromatinových modifikacích byly měřeny v dobách vyznačených svislými šipkami a byly měřeny pomocí ChIP následované „real-time“ PCR.

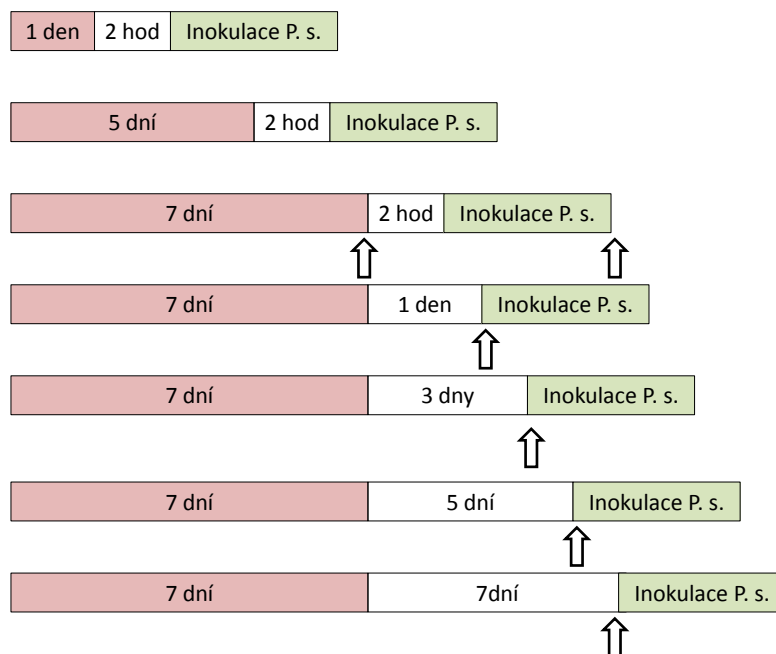
Dále se autoři zaměřili na to, zda pozorované rozvolnění chromatinu indukované stresem souvisí s epigenetickými modifikacemi. Nejprve pomocí specifických RE zkoumali hladiny metylace DNA, která je považována za hlavní umlčovací mechanismus v eukaryotických buňkách. Tyto experimenty odhalily, že teplotní posun nemá vliv na hladinu této modifikace v žádném ze sledovaných lokusů. Proto se autoři rozhodli sledovat také hladiny různých histonových modifikací (H3K9me2, H3K27me2, H3K27me3, H3K4me3 a H3K9ac-K14ac). Metodou, kterou použili, byla opět ChIP následovaná kvantitativní PCR. Kromě H3K9ac-K14ac nedošlo v hladinách žádné z ostatních sledovaných modifikací k výrazným změnám. I u acetylace to byl pouze mírný nárůst, který se po odeznění stresového faktoru rychle vrátil na původní úroveň. Tyto výsledky naznačují, že pravděpodobně existuje nějaký jiný mechanismus, který rozvolnění umlčovaného chromatinu umožňuje (Tittel-Elmer *et al.* 2010).

Vyšší odolnost vůči konkrétnímu stresovému faktoru může být navozena i zdánlivě zcela odlišným typem stresu. Autoři Singh *et al.* (2014a) zjistili, že rostliny vystavené různým typům abiotického stresu mohou být více odolné vůči napadení patogenními bakteriemi. Pro své experimenty použili rostliny *A. thaliana*, které opakovaně vystavili třem různým typům stresu – vysoké teplotě, chladu a zasolení. Teplem stresované rostliny byly vystaveny 38 °C po dobu 1,5 hodiny. Tato stresová perioda byla opakována jednou denně po dobu 1, 5 až 7 dní. Následná inokulace bakterií *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 proběhla dvě hodiny po posledním vystavení rostliny stresu (Obr. 12). V případě vysoké teploty bylo zjištěno, že je třeba rostliny vystavit teplotnímu stresu minimálně sedmkrát, než se vytvoří zvýšená odolnost vůči této bakterii. Jiné rostliny byly vystaveny opakovanému chladu (4 °C po dobu 1,5 hodiny denně) a zasolení (aplikace 5 mM roztoku NaCl denně). U těchto rostlin bylo opět nutné sedmkrát opakované vystavení stresu, než vznikla zvýšená rezistence.

Autoři také chtěli zjistit, jak dlouho vzniklá rezistence vydrží. Proto rostliny inokulovali bakterií v různých časových odstupech od posledního vystavení rostlin abiotickému stresu. Bylo zjištěno, že po sedmidenní zotavovací periodě již rostliny zvýšenou rezistencí nevykazovaly.

Autoři dále provedli analýzu pomocí ChIP a „real-time“ PCR oblastí promotorů, prvních exonů a 3'-nepřekládaných oblastí u několika genů spojených s odpovědí na napadení patogenem, aby zjistili možnou provázanost pozorované zvýšené rezistence s chromatinovými modifikacemi. V promotorech genů a prvních exonech naměřili po sedminásobném teplotním stresu až čtyřnásobné navýšení v H3K9K14ac, H3K4me2 a H3K4me3, což jsou značky spojované s aktivním chromatinem. V nepřekládaných oblastech nebyly žádné výrazné změny naměřeny. Podobný výsledek byl zjištěn i po sedminásobném vystavení chladu a zasolení.

U rostlin vystavených stresu pouze jednou nebyly tyto změny naměřeny v žádné ze sledovaných oblastí. To dokazuje, že pro navození zvýšené rezistence vůči patogenním bakteriím je třeba rostlinu vystavit abiotickému stresu vícekrát.



**Obr 12: Schéma experimentu autorů Singh *et al.* (2014a);** červená políčka značí periodu, kdy byly rostliny vyslaveny opakovanému abiotickému stresu (trvajícím vždy 1,5 hod. denně), bílá políčka pak označují zotavovací periodu po posledním vystavení rostliny stresu, svislé šipky ukazují dobu odebrání vzorků pro analýzu historických modifikací pomocí ChIP spojené s „real-time“ PCR. P. s. – *Pseudomonas syringae*

Další analýza H3K9K14ac byla provedena po sedmidenním zotavení, kdy rostliny již nevykazovaly zvýšenou rezistenci. V žádné ze sledovaných oblastí nebylo navýšení úrovně této modifikace naměřeno. Autoři ještě pro úplnost výsledků provedli stejné měření po pět dní dlouhé zotavovací periodě, kdy zvýšená rezistence byla ještě pozorovatelná. Jak v promotorech, tak v prvních exonech bylo stále znatelné až trojnásobné navýšení v H3K9K14ac.

Autoři dále také zkoumali, zda je pro tento „priming“ nezbytný enzym histonacetyltransferáza 1 (HAC1). Pro tento experiment použili mutantní linii *A. thaliana hac1-1*, která má tento enzym neaktivní. Rostliny opět vystavili několikanásobnému stresu teplem, chladem a zasolením. U sledovaných genů nebyly v porovnání s nemutantní linií zaznamenány žádné změny v acetylaci histonů. To dokazuje, že je HAC1 pro „priming“ těchto genů nezbytná.

Souhrnně všechny tyto výsledky naznačily, že opakované vystavení abiotickému stresu skutečně může zvýšit rezistenci rostliny k patogenním bakteriím a že chromatinové modifikace hrají v tomto jevu významnou roli (Singh *et al.* 2014a).

### 3.5 Patogenní bakterie

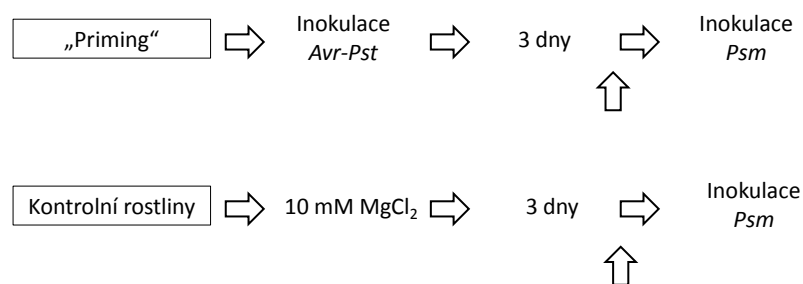
Změny chromatinových modifikací při somatickém „primingu“ byly také studovány v případě čistě biotického stresu. První významnou studii na toto téma publikovali Jaskiewicz *et al.* (2011). Tito autoři se rozhodli zjistit, zda změny v chromatinových modifikacích mohou být měřitelné i v listech, které jsou vzdálené od místa napadení patogenem. Pro tento experiment použili bakterii *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, kterou infiltrovali do tří spodních lístků listové růžice *A. thaliana* (Obr. 7). Měření po následném stresu prokázala, že tato lokalizovaná infekce indukovala „priming“ promotorů *WRKY* genů i ve vzdálenějších listech, neboť naměřená úroveň transkripce byla srovnatelná s úrovní transkripce po indukci pomocí BTH. Stejně tak změny v chromatinových modifikacích (H3K4me, H3ac, H4ac) v porovnání s kontrolou byly srovnatelné se změnami indukovanými BTH a popsány výše (kap. 3.3). Tento výsledek potvrdil hypotézu, že lokalizovaná infekce patogenem vyvolá jeden nebo více systémových signálů, které indukují změny v chromatinových modifikacích i ve vzdálených listech rostliny (Jaskiewicz *et al.* 2011).

V jiné studii Singh *et al.* (2014b) zkoumali roli genu *Flowering locus D (FLD)* při vzniku systémové rezistence vůči následné infekci patogenem u *A. thaliana*. Předpokládali, že produkt tohoto genu ovlivňuje histonové modifikace v promotorech *WRKY* genů. Ve svém experimentu využili mutantní genovou linii *rsi1*, která obsahuje nefunkční gen *FLD*, a porovnávali ji s kontrolní linií bez této mutace. Nejprve inokulovali tři spodní listy rostliny bakterií *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 nesoucí gen avirulence *AvrRpt2*, aby navodili primární infekci. Kontrolní rostliny byly inokulovány pouze 10 mM roztokem  $MgCl_2$ . Po třech dnech provedli u všech rostlin druhou inokulaci virulentním kmenem *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Psm). Po čtyřech hodinách od inokulace Psm pak měřili aktivitu exprese dvou *WRKY* genů (*WRKY6* a *WRKY29*), u kterých předpokládali, že jsou regulované pomocí *FLD*. Ukázalo se, že *rsi1* rostliny nevykazovaly na rozdíl od kontrolních rostlin zvýšenou expresi sledovaných *WRKY* genů typickou pro „priming“. Tento výsledek potvrdil, že funkční produkt *FLD* je potřeba pro získání systémové odolnosti vůči následnému napadení patogenem.

Dále autoři zkoumali, zda se této systémové rezistence účastní také chromatinové modifikace a zda jsou jejich změny spojené s aktivitou *FLD*. Již dříve bylo dokázáno, že



produkt genu *FLD* má vlastní demetylační aktivitu (Liu *et al.* 2007), která se uplatňuje při regulaci počátku kvetení, a zároveň je také nutný pro aktivitu histondeacetylázy 6, která se rovněž účastní regulace kvetení (Yu *et al.* 2011). Singh *et al.* (2014b) proto sledovali změny H3K4me2 a H3K14ac v promotorech *WRKY* genů *WRKY6* a *WRKY29*. Rostliny byly inokulovány do spodních lístků bakterií *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000. Pro kontrolu byla provedena ještě falešná inokulace 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Obr. 13). Hladiny chromatinových modifikací byly měřeny pomocí ChIP a kvantitativní PCR po třech dnech v listech vzdálených od místa inokulace. *Rsi1* rostliny i falešně inokulované rostliny vykazovaly v případě obou genů nižší hladinu metylace histonu 3 než kontrolní linie. Ovšem u H3K14ac tomu bylo jinak. V promotoru genu *WRKY6* byla hladina této modifikace nižší než u kontrolní linie, ale v promotoru genu *WRKY29* byla úroveň acetylace srovnatelná s kontrolou. Autoři ještě provedli měření obou modifikací v promotoru genu *FLC* jako pozitivní kontrolu. Podle očekávání byly u *rsi1* rostlin hladiny obou modifikací v promotoru *FLC* výrazně vyšší než v kontrolních rostlinách. Na základě těchto výsledků autoři předpokládají, že *FLD* je nezbytný pro zvýšení množství metylace histonů v promotorech genů *WRKY6* a *WRKY29*. Mohl by v průběhu systémové resistance sloužit jako represor exprese dosud neznámé histondemetylázy, která by jinak snižovala hladinu metylace v promotorech *WRKY* genů (Singh *et al.* 2014b).



**Obr. 13: Schéma experimentu autorů Singh *et al.* (2014b);** Autoři nejprve provedli u obou použitých genových linií (kontrolní a *rsi1*) inokulaci bakterií *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (*Avr-Pst*). Po třech dnech pak rostliny inokulovali znovu, tentokrát však kmenem *Pseudomonas syringae* pv *maculicola* (*Psm*). Nicméně vzorky (listy vzdálené od místa první inokulace) pro měření chromatinových modifikací byly odebrány před druhou inokulací (vyznačeno svislými šipkami). Hladiny histonových modifikací byly měřeny pomocí ChIP následované real-time PCR.

## 4 Závěr

Tato práce je přehledem studií zabývajících se chromatinovými modifikacemi ve fenoménu „primingu“ při opakovaném stresu rostlin. „Priming“ je stav, který umožňuje rostlině reagovat na následující stresovou periodu rychleji a ve větší míře než při primárním stresu. V dnešní době, kdy dochází ke stále častějším klimatickým výkyvům, může být porozumění tomuto jevu zvláště u zemědělských plodin klíčové pro získání rostlin odolných ke stresu. Studie, které experimentálně propojily tento jev se změnami v chromatinových modifikacích, se začaly objevovat až v posledních 5 letech a je jich dosud velmi málo.

Je všeobecně známo, že chromatinové modifikace, jako jsou modifikace histonů, histonové varianty nebo metylace DNA, mají vliv na strukturu chromatinu a mohou tak ovlivňovat aktivitu genů. Bylo zjištěno, že při stresové reakci se hladiny těchto modifikací u určitých stresových genů dynamicky mění, což ovlivňuje transkripci různých genů. I když se většinou po odeznění stresového stimulu chromatinové modifikace navracejí do původních hodnot, v některých případech mohou být po delší dobu nadále udržovány na změněné úrovni a poté při nástupu opakovaného stresu vést k rychlejší indukci transkripce genů. Tento jev byl skutečně zaznamenán v případě dehydratace, zasolení, mechanického poškození, kombinace různých stresorů a systémové rezistence na patogenní bakterie.

U všech těchto stresových faktorů ovšem bude třeba provést další studie, abychom tomuto mechanismu „primingu“ plně porozuměli. Už teď se totiž ukazují rozdíly v reakci konkrétních genů, stejně jako závislost na délce stresového stimulu a délce period mezi prvním a druhým stresem. Stejně tak chybí studie zkoumající změny chromatinových modifikací v případě opakovaného stresu způsobeného dalšími biotickými či abiotickými faktory. Všechny dosud existující práce navíc byly provedeny pouze na modelové rostlině *A. thaliana*. To ovšem neznamená, že u ostatních rostlinných druhů probíhají příslušné stresové reakce stejně.

Dalším nedostatkem dosavadních studií je jejich zaměření pouze na histonové modifikace. V případě metylace DNA (až na jednu výjimku) a změn histonových variant nebyly žádné studie provedeny. I v případě histonových modifikací existuje určité metodické omezení a pro získání objektivnějších výsledků by bylo vhodné použít i jiné metody než pouze ChIP následovanou „real-time“ PCR. Nicméně, v rámci dosud studovaných chromatinových modifikací se zdá, že jako hlavní značka pro „priming“ by mohla sloužit převážně H3K4me3. Zvýšená úroveň této modifikace byla opakovaně pozorována v několika různých studiích. Naproti tomu modifikace H3K27me3 zřejmě jako „paměťová značka“ neslouží. Tato modifikace byla rovněž sledována opakovaně a žádné trvalé změny v její úrovni nebyly

zjištěny. U ostatních typů histonových modifikací byly prozatím studovány pouze jednotlivé případy, a proto o nich nelze vyvodit žádné konkrétní závěry.

I když se tedy zdá, že změny chromatinových modifikací skutečně při „primingu“ rostlin na stres hrají roli, na vyvození definitivního závěru ohledně role chromatinových modifikací v somatické/mitotické „stresové paměti“ rostlin je v každém případě ještě příliš brzy.

## 5 Literatura

Ascenzi, R., Gantt, J.S., (1997): A drought-stress-inducible histone gene in *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct class of plant linker histone variants. *Plant Molecular Biology*, 34: 629-641.

Ascenzi, R., Gantt, J.S., (1999): Subnuclear distribution of the entire complement of linker histone variants in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma*, 108: 345–355.

Baldwin, I.T., Schmelz, E.A., (1996): Immunological “memory” in the induced accumulation of nicotine in wild tobacco. *Ecology*, 77: 236–246.

Banks, G.C., Deterding, L.J., Tomer, K.B., Archer, T.K., (2001): Hormone-mediated dephosphorylation of specific histone H1 isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 36467–36473.

Beckers, G.J.M., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W.R., He, S.Y., Zhang, S., Conrath, U., (2009): Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 21: 944–953.

Bernatavichute, Y.V., Zhang, X., Cokus, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., (2008): Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 3(9): e3156.

Berr, A., Ménard, R., Heitz, T., Shen, W.-H., (2012): Chromatin modification and remodelling: a regulatory landscape for the control of *Arabidopsis* defence responses upon pathogen attack. *Cellular Microbiology*, 14: 829–839.

Cao, X., Jacobsen, S.E., (2002): Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in *de novo* DNA methylation and gene silencing. *Current Biology*, 12: 1138–1144.

Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C.D., Pradhan, S., Nelson, S.F., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., (2008): Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, 452: 215–219.

Conrath, U., (2011): Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science*, 16: 524–531.

Deal, R.B., Heinkoff, S., (2011): Histone variants and modifications in plant gene regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 14: 116–122.

Ding, Y., Fromm, M., Avramova, Z., (2012): Multiple exposures to drought “train” transcriptional responses in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 3: 740.

Ding, Y., Liu, N., Virlouvet, L., Riethoven, J.J., Fromm, M., Avramova, Z., (2013): Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 13: 229.

Eichten, S.R., Schmitz, R.J., Springer, M., (2014): Epigenetics: Beyond chromatin modifications and complex genetic regulation. *Plant Physiology*, 165: 933–947.

Encias-Villarejo, S., Maldonado, A.M., Amil-Ruiz, F., de los Santos, B., Romero, F., Pliego-Alfaro, F., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J.L., (2009): Evidence for a positive regulatory role of strawberry (*Fragaria × ananassa*) Fa WRKY1 and *Arabidopsis* WRKY75 proteins in resistance. *Journal of Experimental Botany*, 60: 3043–3065.

Feng, J., Shen, W.-H., (2014): Dynamic regulation and function of histone monoubiquitination in plants. *Frontiers in Plant Science*, 5: 83.

Flusberg, B.A., Webster, D.R., Lee, J.H., Travers, K.J., Olivares, E.C., Clark, T.A., Korlach, J., Turner, S.W., (2010): Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nature Methods*, 7: 461–465.

Haring, M., Offermann, S., Danker, T., Horst, I., Peterhansel, C., Stam, M., (2007): Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods*, 3: 11.

Hayatsu, H., Wataya, Y., Kai, K., Iida, S., (1970): Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives. *Biochemistry*, 9: 2858–2865.

He, X.-J., Chen, T., Zhu, J.-K., (2011): Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Research*, 21: 442–465.

Ingouff, M., Berger, F., (2010): Histone 3 variants in plants. *Chromosoma*, 119: 27–33.

Jakab, G., Ton, J., Flors, V., Zimmeli, L., Métraux, J.-P., Mauch-Mani, B., (2005): Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiology*, 139: 267–274.

Jaskiewicz, M., Conrath, U., Peterhänsel, C., (2011): Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Reports*, 12: 50–55.

Jiménez-Arias, D., Pérez, J.A., Luis, J.C., Martín-Rodríguez, V., Valdés-González, F., Borges, A.A., (2015): Treating seeds in menadione sodium bisulphite primes salt tolerance in *Arabidopsis* by inducing an earlier plant adaptation. *Environmental and Experimental Botany*, 109: 23–30.

Kaput, J., Sneider, T.W., (1979): Methylation of somatic vs germ cell DNAs analyzed by restriction endonuclease digestions. *Nucleic Acids Research*, 7: 2303–2322.

Kaufmann, K., Muiño, J.M., Østerås, M., Farinelli, L., Krajewski, P., Angenent, G., (2010): Chromatin immunoprecipitation (ChIP) of plant transcription factors followed by sequencing (ChIP-SEQ) or hybridization to whole genome arrays (ChIP-CHIP). *Nature Protocols*, 5: 457–472.

Kim, J.-M., Sasaki, T., Ueda, M., Sako, K., Seki, M., (2015): Chromatin changes in response to drought, salinity, heat, and cold stresses in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6: 114.

Kouzarides, T., (2007): Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128: 693–705.

Kumar, S.V., Wigge, P.A., (2010): H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell*, 140: 136–147.

Law, J.A., Jacobsen, S.E., (2010): Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews. Genetics*, 11: 204–220.

Liu, C., Lu, F., Cui, X., Cao, X., (2010): Histone methylation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 395–420.

Liu, F., Quesada, V., Crevillén, P., Bäurle, I., Swiezewski, S., Dean, C., (2007): The *Arabidopsis* RNA-binding protein FCA requires a lysine-specific demethylase 1 homolog to downregulate FLC. *Molecular Cell*, 28: 398–407.

Liu, N., Ding, Y., Fromm, M., Avramova, Z., (2014a): Different gene-specific mechanisms determine the “revised-response” memory transcription patterns of a subset of *A. thaliana* dehydration stress responding genes. *Nucleic Acids Research*, 42: 5556–5566.

Liu, N., Fromm, M., Avramova, Z., (2014b): H3K27me3 and H3K4me3 chromatin environment at super-induced dehydration stress memory genes of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 7: 502–513.

Luna, E., Bruce, T.J.A., Roberts, M.R., Flors, V., Ton, J., (2012): Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiology*, 158: 844–853.

Luo, M., Liu, X., Singh, P., Cui, Y., Zimmerli, L., Wu, K., (2012): Chromatin modifications and remodeling in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms*, 1819: 129–136.

Nafie, E., Mazen, M.M., (2008): Chemical – induced resistance against brown stem rot in soybean: The effect of benzothiadiazole. *Journal of Applied Sciences*, 4: 2046–2064.

Oda, M., Glass, J.L., Thompson, R.F., Mo, Y., Olivier, E.N., Figueroa, M.E., Selzer, R.R., Richmond, R.F., Zhang, X., Danneberg, L., Green, R.D., Melnick, A., Hatchwell, E., Bouhassira, E.E., Verma, A., Suzuki, M., Grealley, M., (2009): High-resolution genome-wide cytosine methylation profiling with simultaneous copy number analysis and optimization for limited cell numbers. *Nucleic Acids Research*, 37: 3829–3839.

Ooi, S.K.T., Bestor, T.H., (2008): The colorful history of active DNA demethylation. *Cell*, 133: 1145–1148.

Orlando, V., Strutt, H., Paro, R., (1997): Analysis of chromatin structure *in vivo* by formaldehyde crosslinking. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 11: 205–214.

Pastor, V., Luna, E., Ton, J., Cerezo, M., García-Agustín, P., Flors, V., (2013): Fine tuning of reactive oxygen species homeostasis regulates primed immune responses in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26: 1334–1344.

Pfluger, J., Wagner, D., (2007): Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 645–652.

Rauch, T., Pfeifer, G.P., (2005): Methylated-CpG island recovery assay: a new technique for the rapid detection of methylated-CpG islands in cancer. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology*, 85: 1172–1180.

Roh, T.-Y., Ngau, W.C., Cui, K., Landsman, D., Zhao, K., (2004): High-resolution genome-wide mapping of histone modifications. *Nature Biotechnology*, 22: 1013–1016.

Sani, E., Herzyk, P., Perrela, G., Colot, V., Amtmann, A., (2013): Hyperosmotic priming of *Arabidopsis* seedlings establishes a long-term somatic memory accompanied by specific changes of the epigenome. *Genome Biology*, 14: R59.

Scippa, G.S., di Michele, M., Onelli, E., Patrignani, G., Chiatante, D., Bray, E.A., (2004): The histone-like protein H1-S and the response of tomato leaves to water deficit. *Journal of Experimental Botany*, 55: 99–109.

Schones, D.E., Zhao, K., (2008): Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nature Reviews. Genetics*, 9: 179–191.

Singh, P., Yekondi, S., Chen, P.-W., Tsai, C.-H., Yu, C.-W., Wu, K., Zimmerli, L., (2014a): Environmental history modulates *Arabidopsis* pattern-triggered immunity in a HISTONE ACETYLTRANSFERASE1-dependent manner. *The Plant Cell*, 26: 2676–2688.

Singh, V., Roy, S., Singh, D., Nandi, K., (2014b): *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS D influences systemic-acquired-resistance-induced expression and histone modifications of WRKY genes. *Journal of Biosciences*, 39: 119–126.

Stroud, H., Otero, S., Desvoyes, B., Ramírez-Parra, E., Jasobsen, S.E., Gutierrez, C., (2012): Genome-wide analysis of histone H3.1 and H3.3 variants in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 109: 5370-5375.

Tittel-Elmer, M., Bucher, E., Broger, L., Mathieu, O., Paszkowski, J., Vailant, I., (2010): Stress-induced activation of heterochromatic transcription. *PLoS Genetics*, 6: 1001175.

Tompa, R., McCallum, C.M., Delrow, J., Heinkoff, J.G., van Steensel, B., Henkoff, S., (2002): Genome-wide profiling of DNA methylation reveals transposon targets of CHROMOMETHYLASE3. *Current Biology*, 12: 65–68.

Ton, J., Mauch.Mani, B., (2004):  $\beta$ -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal*, 38: 119–130.

Van der Ent, S., van Hulten, M., Pozo, M.J., Czechowski, T., Udvardi, M.K., Pieterse, C.M.J., Ton, J., (2009) Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and  $\beta$ -aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *New Phytologist*, 183: 419–431.

Volle, C., Dalal, Y., (2014): Histone variants: The tricksters of the chromatin world. *Current Opinion in Genetics and Development*, 25: 8–14.

Vriet, C., Henning, L. Laloi, C., (2015): Stress-induced chromatin changes in plants: of memories, metabolites and crop improvement. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72: 1261–1273.

Wassenegger, M., Helmes, S., Riedel, L., Sanger, H.L., (1994): RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, 76: 567–576.

Weber, M., Davies, J.J., Wittig, D., Oakeley, E.J., Haase, M., Lam, W.I., Schübeler, D., (2005): Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature Genetics*, 37: 853–862.

Yaish, M.W., Colasanti, J., Rothstein, S.J., (2011): The role of epigenetic processes in controlling flowering time in plants exposed to stress. *Journal of Experimental Botany*, 62: 3727–3735.

Yu, C.-W., Liu, X., Luo, M., Chen, C., Lin, X., Tian, G., Lu, Q., Cui, Y., Wu, K., (2011): HISTONE DEACETYLASE6 interacts with FLOWERING LOCUS D and regulates flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 156: 173–184.

Zhang, K., Sridhar, V.V., Zhu, J., Kapoor, A., Zhu, J.-K., (2007a): Distinctive core histone post-translational modification patterns in *Arabidopsis thaliana*. *PloS ONE*, 2: e1210.

Zhang, L., Eugeni, E.E., Parthurn, M.R., Fretas, M.A., (2003): Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting. *Chromosoma*, 112: 77–86.

Zhang, Y., Clarez, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y.V., Pellegrini, M., Goodrich, J., Jacobsen, S.E., (2007b): Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in *Arabidopsis*. *PLoS Biology*, 5: 1026–1035.

Zhu, Y., Dong, A., Shen, W.-H., (2012): Histone variants and chromatin assembly in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms*, 1819: 343–348.

Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R.K., Ballinger, T., Heinkoff, S., (2007): Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics*, 39: 61–69.

Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., Heinkoff, S., (2008): Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature*, 456: 125–129.