

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

**ÉPIGENETICKÁ KONTROLA ORGANIZACE  
CHROMATINU A JEJÍ VLIV NA REGULACI GENOVÉ  
EXPRESE ROSTLIN**

Habilitační práce

**Mgr. habil. Aleš Pečinka, Ph.D.**

Olomouc 2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto habilitační práci zpracoval samostatně s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne: 28. 01. 2022

Mgr. habil Aleš Pečinka, Ph.D.

# Obsah

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Přehled zkratk</b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>1. ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA JADERNÉHO GENOMU ROSTLIN</b> .....                      | <b>5</b>  |
| <b>2. HLAVNÍ OBLASTI JADERNÉHO GENOMU</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>2.1 Tandemové repetice – opomíjená, ale nepostradatelná součást genomu</b> .....    | <b>7</b>  |
| <b>2.2 Transponovatelné elementy – genomičtí parazité mnoha funkcí</b> .....           | <b>9</b>  |
| <b>3. ORGANIZACE EUCHROMATINU A HETEROCHROMATINU V BUNĚČNÝCH JÁDRECH ROSTLIN</b> ..... | <b>12</b> |
| <b>3.1 Epigenetický základ euchromatinu a heterochromatinu</b> .....                   | <b>15</b> |
| 3.1.1 DNA metylace jako klíčová epigenetická modifikace rostlin .....                  | 15        |
| 3.1.2 Mechanismus de novo metylace dosud nemetylovaných oblastí .....                  | 18        |
| 3.1.3 Udržovací DNA metylační dráha zajišťuje stabilní hladinu DNA metylace.....       | 20        |
| 3.1.4 Aktivní DNA demethylace u rostlinných pomocí bázově excizních oprav DNA.....     | 24        |
| 3.1.5 Histonové varianty a modifikace .....  | 25        |
| <b>3.2 Molekulární analýzy vymezují čtyři základní typy chromatinu rostlin</b> .....   | <b>27</b> |
| <b>4. VLIV ABIOTICKÉHO STRESU NA HETEROCHROMATIN ROSTLIN</b> .....                     | <b>30</b> |
| <b>4.1 Vliv stresu na strukturu a funkci heterochromatinu rostlin</b> .....            | <b>30</b> |
| <b>4.2 Může stres způsobit aktivaci a množení rostlinných transpozonů?</b> .....       | <b>31</b> |
| <b>5. JAKÁ JE BUDOUCNOST STUDIA CHROMATINU ROSTLIN?</b> .....                          | <b>36</b> |
| <b>6. LITERATURA</b> .....   | <b>40</b> |
| <b>7. PODĚKOVÁNÍ</b> .....   | <b>51</b> |
| <b>8. SEZNAM PRACÍ TVOŘÍCÍCH HABILITAČNÍ SPIS</b> .....                                | <b>52</b> |
| <b>PŘÍLOHA: PUBLIKACE TVOŘÍCÍ HABILITAČNÍ SPIS</b> .....                               | <b>54</b> |

## Přehled zkratk

### Všeobecné:

|       |   |
|-------|---|
| 5mC   | 5-metylcytosin  |
| 6mA   | N6-metyladenin  |
| bp    | Bázové páry (délková jednotka DNA)  |
| C     | C-hodnota charakterizuje počet kopií genomu v buněčném jádře, 1C odpovídá obsahu DNA v jádře v haploidním nereplikovaném stavu. |
| DNA   | Deoxyribonukleová kyselina  |
| dsRNA | Dvouřetězcová RNA   |
| Gbp   | Giga bázové páry ( $10^9$ )   |
| GBM   | DNA metylace genů (angl. Gene body methylation)   |
| H     | Souhrné označení pro báze adenin, thymin a cytosin  |
| HRE   | Teplotně responsivní element (podle anglického Heat responsive element)   |
| kbp   | Tisíce bázových párů ( $10^3$ )   |
| LTR   | Dlouhé terminální repetice (podle anglického Long terminal repeat)  |
| Mbp   | Miliony bázových párů ( $10^6$ )  |
| NOR   | Oblast organizátorů jadérka (podle anglického Nucleolar organizer region)   |
| nt    | Nukleotidy (délková jednotka RNA)   |
| RdDM  | RNA řízená DNA metylace (podle anglického RNA-directed DNA Methylation)   |
| rDNA  | Ribozomální DNA locus   |
| RNA   | Ribonukleová kyselina   |
| siRNA | Malá interferenční RNA (podle anglického small interfering RNA)   |
| TE    | Transponovatelný element  |
| TIR   | Terminální invertovaná repetice   |
| TSD   | Duplikace cílového místa (podle anglického Target site duplication)   |
| WGD   | Celogenomová duplikace (podle anglického Whole-genome duplication)  |

### Jména genů, proteinů a komplexů

|                     |  |
|---------------------|--|
| <i>AGO</i>          | <i>ARGONAUTE</i> , podjednotka RNA Induced Silencing Complex (RISC)                        |
| <i>APEIL</i>        | DNA-(apurinic or apyrimidinic site) 1 lyáza  |
| <i>CENH3</i>        | <i>CENTROMERIC HISTONE H3</i>  |
| <i>CENP-A</i>       | <i>CENTROMERIC PROTEIN-A</i> , viz. <i>CENH3</i>   |
| <i>CMT (2 or 3)</i> | <i>CHROMOMETHYLASE (2 or 3)</i> , DNA metyltransferáza                                     |
| <i>DCL</i>          | <i>DICER-LIKE</i> , RNáza H  |
| <i>DDM1</i>         | <i>DECREASED IN DNA METHYLATION 1</i> , chromatinový remodeler                             |
| <i>DME</i>          | <i>DEMETER</i> , DNA glykosyláza   |
| <i>DML1</i>         | <i>DEMETER-LIKE 1</i> , DNA glykosyláza, syn. <i>ROS1</i>                                  |
| <i>DRD1</i>         | <i>DEFECTIVE IN RNA DIRECTED DNA METHYLATION 1</i> , chromatinový remodeler                |
| <i>DRM (1 or 2)</i> | <i>DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE (1 or 2)</i> , <i>de novo</i> DNA metyltransferáza |
| <i>HEN1</i>         | <i>HUA ENHANCER 1</i> , RNA metyltransferáza   |
| <i>HOG1</i>         | <i>S-ADENOSYL HOMOCYSTEINE HYDROLASE GENE 1</i>  |
| <i>HSFA2</i>        | <i>HEAT SHOCK FACTOR A 2</i> , teplotně responsivní transkripční faktor                    |
| <i>HSP70</i>        | <i>HEAT SHOCK PROTEIN 70</i>   |
| <i>KYP</i>          | <i>KRYPTONITE</i> , histon H3 lysin 9 di-metyltransferáza                                  |

|                     |  |
|---------------------|--|
| <i>LIG1</i>         | <i>DNA LIGASE 1</i> , ligáza jednořetězcových zlomů DNA        |
| <i>MET1</i>         | <i>DNA METHYLTRANSFERASE 1</i> , CG DNA metyltransferáza       |
| <i>MTHFD1</i>       | <i>METHYLENETETRAHYDROFOLATE DEHYDROGENASE 1</i>               |
| <i>NRPD1</i>        | <i>NUCLEAR RNA POLYMERASE D 1</i> , největší podjednotka PolIV |
| PolII               | DNA dependent RNA polymerase II                                |
| PolIII              | DNA dependent RNA polymerase III                               |
| PolIV               | DNA dependent RNA polymerase IV                                |
| PolV                | DNA dependent RNA polymerase V                                 |
| PRC (1 or 2)        | Polycomb repressive complex (1 or 2)                           |
| <i>RDR (2 or 6)</i> | <i>RNA DEPENDENT RNA POLYMERASE (2 or 6)</i>                   |
| RISC                | RNA-induced silencing complex                                  |
| <i>ROS1</i>         | <i>REPRESSOR OF SILENCING 1</i> ; viz. <i>DML</i>              |
| <i>VIM</i>          | <i>VARIANT IN METHYLATION</i>                                  |
| <i>ZDP</i>          | DNA fosfatáza  |

# 1. ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA JADERNÉHO GENOMU ROSTLIN

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je hlavním nositelem dědičné informace u všech živých organismů a některých virů (Craig et al., 2014). DNA je tvořena dvěma komplementárními řetězci, které vytváří dvoušroubicovou strukturu (Watson and Crick, 1953). Každý z řetězců je pak tvořen nukleotidy, které sestávají z nukleobáze - adeninu (A), guaninu (G), cytosinu (C) nebo thyminu (T), deoxyribosového cukru a fosfátové skupiny. Nukleotidové řetězce mohou být velmi dlouhé. Například délka 5,1 Giga párů bází (Gbp) jaderného genomu ječmene setého je rozdělena do sedmi DNA molekul – chromosomů – jejichž délka v rozvinutém stavu odpovídá přibližně 170 cm DNA (Mascher et al., 2017). Oba DNA řetězce drží pohromadě díky vodíkovým můstkům mezi komplementárními bázemi. Báze A a T mají dva vodíkové můstky, zatímco báze C a G mají můstky tři. Dvoušroubovice DNA se otáčí okolo své vlastní osy a vytváří jednu otáčku přibližně každých 10,4 bp. Replikací je DNA je přepisována do nových molekul DNA a transkripce do ribonukleových kyselin (RNA), které pak slouží k translaci do proteinů, nebo mohou mít regulační funkci.

Celková DNA organismu – genom – je organizována do chromozomů (Kellogg and Bennetzen, 2004; Craig et al., 2014). Chromozomy prokaryot (baktérie a archaea) jsou kruhové a jsou uloženy přímo v cytoplazmě. Převážná část genetické informace eukaryot (protisté, rostliny, houby a živočichové) je lineární a je uložena v buněčném jádře, jehož obsah je oddělen od cytoplazmy jadernou membránou (Thanbichler and Shapiro, 2006). Malá část dědičné informace (prokaryotického původu a charakteru) je přítomna v mitochondriích všech eukaryot, a také v chloroplastech zelených rostlin. Počet chromozomů v buněčném jádře se může výrazně lišit. U rostlin je to od čtyř ( $2n = 4$ ) u australské hvězdicovité rostliny *Brachyscome dichromosomatica*, až po několik set u určitých stromů či primitivních kapradin (Khandelwal, 1990; Leach et al., 1995). Dále byl u rostlin zjištěn největší rozsah ve velikosti jaderného genomu ze všech eukaryontních skupin, a to od 63.6 Mbp/1C u bublinatky *Genlisea aurea*, až po 149 000 Mbp/1C u vraního oka *Paris japonica*, což odpovídá přibližně 2 365-násobnému rozdílu (Pellicer et al., 2014). Hodnota 1C je množství DNA organismu v haploidním nereplikovaném jádře. Jak velikost genomu tak i počet chromozomů jsou plastické znaky, které se mohou během evoluce poměrně rychle měnit (Johnston et al., 2005; Paterson et al., 2005; **Vu et al., 2015 - v této práci jsem se podílel na analýze rozdílných velikostí genomů u příbuzných druhů rodu *Genlisea***). Hlavním mechanismem vedoucím ke skokové změně v množství jaderné DNA jsou duplikace celého genomu (anglicky whole genome duplication, WGD). Celogenomové duplikace jsou časté u rostlin a v některých skupin živočichů. K WGD dochází buď zdvojnásobením chromozomů v rámci jednoho druhu

(autopolyploidizace), nebo hybridizací a splynutím genomů dvou druhů (alopolyploidizace). Semenné rostliny prodělaly během své evoluční historie nejméně jednu, častěji však více WGD událostí (Li et al., 2015b). WGD mají enormní vliv na evoluci genomu. Další kopie genomu snižují riziko negativního efektu v případě mutace jedné z kopií. WGD jsou považovány za urychlovače evoluce, které vedou k novým fenotypovým i ekologickým vlastnostem (Comai, 2005). Evoluční historie čeledí *Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae* nebo *Poaceae* ukazují, že změny spojené s polyploidizací pravděpodobně usnadňují vznik evolučních inovací a rychlou speciaci (Schranz et al., 2012). Evoluční význam polyploidizace je pravděpodobně zvýrazněn selekčním tlakem prostředí (Fawcett et al., 2009; De Smet et al., 2013). Po celogenomové duplikaci obvykle následuje postupná restrukturalizace genomu v řádu miliónů let, která zahrnuje přeskupení chromozomů řadou inverzí a translokací, postupnou ztrátu redundantních sekvencí a funkční diploidizaci (Lysak et al., 2006; Mandáková et al., 2010; De Smet et al., 2013). Tento cyklus se pak může opakovat v měřítku geologických dob.

Obrovské rozpětí velikostí rostlinných genomů je v ostrém kontrastu s relativně malou variabilitou v počtu protein kódujících genů. Například, huseníček rolní ( $2n = 2x = 10$ ) s genomem  $1C = 119$  Mbp má přibližně 27 000 genů, zatímco 142-krát větší genom hexaploidní pšenice seté ( $2n = 6x = 42$ ,  $1C = 17$  Gbp) jich obsahuje „jen“ asi čtyřnásobek, tj. 108000 (Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Appels et al., 2018). Navíc, po odečtení vlivu polyploidie má pšenice 36000 genů na subgenom, což je jen 1,33-krát více než huseníček.

Tento jev je nazýván paradoxem C-hodnoty (angl. C-value paradox) (Thomas, 1971). Na základě analýzy různých eukaryotických genomů je paradox C-hodnoty vysvětlován přítomností variabilního množství opakujících se (repetitivních) DNA sekvencí (Gregory, 2005; Tenaillon et al., 2010). Faktory určující množství repetitivní DNA nebo obecně velikost genomu zůstávají u mnoha druhů nejasné a nazývá se záhadou C-hodnoty (angl. C-value enigma) (Gregory, 2005).

## 2. HLAVNÍ OBLASTI JADERNÉHO GENOMU

Geny, mezigenové oblasti a repetitivní DNA představují hlavní oblasti jaderného genomu. Geny jsou základními funkčními jednotkami genomu. Zatímco počet chromosomů i struktura genomu se v čase mohou měnit, některé geny zůstávají obdivuhodně stabilní a jejich původ lze vysledovat již do doby před rozdělením hlavních eukaryotických skupin. Primárním produktem genu je RNA transkript, který slouží jako návod pro tvorbu specifického proteinu nebo může mít regulační funkci (van Driel et al., 2003). Geny jsou řízeny cis-regulačními elementy, které jsou v rostlinných genomch umístěny obvykle v mezigenovém prostoru před místem aktivace transkripce, vzácněji také v intronech či za místem transkripční terminace. Mezigenové prostory tedy hrají důležitou roli nejen ve fyzické separaci jednotlivých genů, ale také v jejich regulaci. U huseníčku rolního představují genové oblasti (včetně exonů a intronů) 50,4% jaderného a repetitivní DNA 19,1% (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Pro srovnání, u velkého a repetitivně bohatého genomu ječmene setého tvoří geny 2% a repetitivní DNA 80% genomu (Wicker et al., 2017). Zatímco funkce genů a jejich regulačních oblastí je zřejmá, u repetitivní DNA je tomu naopak. Repetice byly dlouho považovány za jakousi zbytnou část genomu bez zjevného užítu. Přestože toto bezpochyby platí pro mnoho kopií různých repetit, existuje dostatek důkazů o tom, že repetitivní DNA je nutná pro správnou funkci rostlinných genomů (Lisch, 2013). Repetitivní DNA lze rozdělit na dvě hlavních skupiny – tandemové a roztroušené repetice.

### 2.1 Tandemové repetice – opomíjená, ale nepostradatelná součást genomu

Tandemové repetice (nazývané také jako satelitní DNA) jsou uspořádány do dlouhých řad sestávajících z několika až tisíců kopií s velmi podobnou nebo identickou nukleotidovou sekvencí. Mezi tandemové repetice patří také základní strukturní oblasti eukaryotického chromosomu, kterými jsou centromerické, telomerické a ribozomální DNA (rDNA) oblasti.

Centromera je přítomna prakticky u všech eukaryotických chromozomů a je nutná pro správné dělení sesterských chromatid do dceřiných buněk (Przewloka and Glover, 2009). Oblast centromerických repetit tvoří obvykle několik Mbp dlouhé pole kratších (<500 bp) tandemových repetit, které se rychle vyvíjejí, a jsou často druhově specifické (Melters et al., 2013). Funkční centromera je pak definována v rámci tohoto pole repeticemi, které nesou centromerickou variantu histonu H3 nazývanou CENP-A nebo CENH3 (Lermontova et al., 2014). Tato oblast slouží jako platforma pro vazbu kinetochoru.

Telomerické repetice obvykle vytvářejí kratší (<100 kbp) pole na koncích chromozomů a mají obecně konzervovanější sekvenci než centromery. Telomery obratlovců a některých



roślin se skládají z opakující se sekvence TTAGGG. U většiny rostlin (včetně huseníčku rolního nebo obilovin) jsou však telomery tvořeny sekvencí TTTAGGG (Richards and Ausubel, 1988; Watson and Riha, 2010). Několik málo rostlinných skupin obsahuje jiné typy telomerických repetitiv, jako je např. CTCGGTTATGGG u rodu *Allium* (Fajkus et al., 2016). Jak se tyto neobvyklé telomery vyvinuly, zůstává nejasné. Funkcí telomer je chránit konce chromosomu před degradací, a to vytvořením dlouhého jednořetězcového přesahu DNA, který vytváří oblouk, tzv. T-loop, a vmezeřuje se do telomerické dvouřetězcové DNA a vytváří menší, tzv. D-loop (Riha et al., 2006). Některé konce telomer, však mohou být ukončeny přímo dvouřetězcovým DNA zlomem a jejich ochrana před degradací je zprostředkována přítomností proteinového komplexu Ku70/Ku80 (Kazda et al., 2012). Telomery jsou prodlužovány enzymem telomerázou za pomoci specifické RNA molekuly, přičemž u rostlin byla tato RNA podjednotka telomerázy nalezena teprve v nedávno (Fajkus et al., 2019).

Třetí obligátní tandemové repetice zahrnují ribozomální DNA (rDNA), které kódují sekvence nezbytné pro sestavení RNA podjednotek ribozomů. rDNA se u rostlin vyskytují ve dvou hlavních typech 5S a 45S rDNA. Monomer 5S rDNA má délku 120 bp a je organizován do úseků dlouhých 100 až 200 kbp, obsahujících přibližně 800 až 1500 repetitiv. Struktura 45S rDNA jednotek je složitější. Každá jednotka (~9 kbp) má tři podjednotky 18S, 5.8S a 28S, které jsou odděleny interními transkribovanými spacery a vně pak 5' a 3' externími transkribovanými spacery. Referenční genom huseníčku rolního Col-0 obsahuje dvě sady 45S rDNA, každou přibližně se 375 kopiemi, které se nachází v subtelomerických oblastech krátkých ramének chromozomů 2 a 4 (Copenhaver and Pikaard, 1996). Počet 45S a 5S rDNA kopií a lokusů se může lišit i mezi populacemi stejného druhu (Roa and Guerra, 2012; Long et al., 2013). Aktivní kopie 45S rDNA produkují obrovské množství rRNA a spoluvytváří jádérko, které je po aplikaci barviv vázících se na DNA mikroskopicky pozorovatelné jako slabě obarvená oblast. Proto je 45S rDNA také označována jako oblast organizátorů jádérka (NOR).

Dále obsahují rostlinné genomy řadu roztroušených tandemových repetitiv o různé délce a počtu kopií. Evoluce těchto repetitiv, jejich funkce a regulace zůstávají poměrně málo známé. Zdá se, že rychle vznikají a pravděpodobně i zanikají. U několika druhů bylo zjištěno velké množství kopií určitých repetitiv roztroušeně po celém genomu. Příkladem mohou být řebčíky (rod *Fritillaria*), řepa (rod *Beta*) nebo některé brukvovité (Ambrožová et al., 2011; Zakrzewski et al., 2014; **Finke et al., 2019 - zde jsme našli specifickou tandemovou repetitiv, která tvoří více než 10% genomu u Australské brukvovité rostliny *Ballantinia antipoda*. Tato repetitiv je DNA hypometylovaná a výrazně ovlivňuje strukturu genomu**). U všech těchto případů je pozoruhodné, že abundatní tandemové repetitiv jsou sekvencně velmi bohaté na A a T báze (až 80%). To naznačuje, že AT-bohaté repetitiv jsou hostitelským genomem obtížně

odstranitelné nebo epigeneticky kontrolovatelné. Zda existuje příčinná souvislost mezi A-T bohatostí, počtem kopií a jejich epigenetickou kontrolou tandemových repetic je však nejasné.

## 2.2 Transponovatelné elementy – genomiční parazité mnoha funkcí

Roztroušené repetice jsou heterogenní skupinou, která zahrnuje všechny opakovaně se vyskytující nekódující sekvence. Nejlépe popsányi roztroušenými repeticemi jsou transponovatelné elementy (transposony, TE). Na rozdíl od protein kódujících genů a tandemových repetic mohou transpozony aktivně měnit svou pozici v hostitelském genomu. Transpozice do genu může vyvolat ztrátu nebo získání funkce genu a tím fenotypovou změnu. Klasickým příkladem jsou transpozicí vyvolané změny v pigmentaci osemení kukuřice, které vedly k popsání transpozonů jako „skáčících genů“ Barbarou McClintock ve 40. letech 20. století (McClintock, 1950). Za tento revoluční objev jí byla v roce 1983 udělena Nobelova cena za fyziologii nebo medicínu (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1983/summary/>). Transpozony jsou tradičně rozděleny do dvou hlavních tříd. Třída I obsahuje retrotranspozony, které „skáčí“ pomocí RNA meziprojektu mechanismem „zkopíruj se a vlož se“ (angl. copy-and-paste). Třída II pak obsahuje transpozony, které se transponují bez RNA meziprojektu mechanismem „vystříhni se a vlož se“ (angl. cut-and-paste). Transpozony nesoucí všechny části nutné pro transpozici se nazývají autonomní, zatímco ty, které využívají molekulární komponenty odvozené od jiných elementů jsou neautonomní.

Retrotranspozony zahrnují nejméně šest podtříd, které se liší svou strukturou a organizací protein kódující části: *LONG TERMINAL REPEAT (LTR)*, *DICTYOSTELIUM INTERMEDIATE REPEAT (DIR)*, *PENELOPE-LIKE ELEMENTS (PLEs)*, *LONG INTERSPERSED ELEMENTS (LINEs)*, *SHORT INTERSPERSED ELEMENTS (SINEs)* a *SADHU* (Rangwala et al., 2006; Wicker et al., 2007). *DIR* nebyly u rostlin nalezeny a *PLEs* jsou vzácné (Arkhipova, 2006). Naopak elementy všech ostatních skupin jsou u rostlin časté. *COPIA* a *Gypsy LTR* retrotranspozony dokonce tvoří podstatnou část mnoha rostlinných genomů (Feschotte et al., 2002; Wicker et al., 2017; Appels et al., 2018). Kódující část úplných *LTR* retrotranspozonů je na obou stranách ohraničena *LTR* oblastmi, které slouží jako *cis*-regulační oblasti transpozonu (Casacuberta and Santiago, 2003). *LTR* na 5' konci přímo navazuje na tzv. vazebné místo primeru (primer binding site), kde je zahájena reverzní transkripce. Kódující úsek retrotranspozonu pak končí polypurinovým traktem, jehož úkolem je zabránit štěpení transkriptu RNázou H, a také slouží k zahájení syntézy druhého řetězce (Havecker et al., 2004). Kódující oblast retrotranspozonu zahrnuje: částice podobné viru (virus-like particles), Reverzní transkriptázu, Integrázu, Aspartovou proteázu a RNázu H. Další početnou skupinou autonomních elementů jsou *LINE*, které však postrádají *LTR*. Oproti

tomu, *SINE* a *SADHU* jsou malé neautonomní transpozony, které se mobilizují pomocí proteinů produkovaných *LINE* elementy (Rangwala and Richards, 2010).

Transpozony třídy II reprezentují podtřídy DNA transpozon, *HELITRON* a *MAVERIC*. Nukleáza DNA transpozonů indukuje během inserce dvouřetězcový zlom cílové sekvence, zatímco nukleázy podtříd *HELITRON* a *MAVERIC* indukují pouze jednořetězcový zlom. DNA transpozony se pak dále dělí na dvě hlavní skupiny: *TERMINAL INVERTED REPEAT (TIR)* transpozony a pro houby specifickou skupinu *CRYPTON*. V místě inserce *TIR* elementu vzniká typická stopa tzv. target site duplication (TSD). Všechny devět rodin *TIR* elementů pak lze rozlišit na základě jejich specifických *TIR* a *TSD* sekvencí. U podtřídy *HELITRON* se vyvinul zvláštní druh amplifikace, který je založen na tzv. „rolling-circle“ replikačním mechanismu (Yang and Bennetzen, 2009). *HELITRONy* jsou běžné v mnoha rostlinných genomech (Xiong et al., 2014).

Primární aktivitou transpozonů je jejich vlastní množení v hostitelském genomu. Rostliny a jiné organismy však vyvinuly specifické mechanismy, které vedou k potlačení jak transkripční tak transpoziční aktivity transpozonů. Tyto mechanismy jsou podrobně popsány v následujících kapitolách. U řady transpozonů naopak došlo k jakési „domestikaci“ v rámci daného genomu, kdy se daný transpozon stává funkčním elementem zapojeným do např.: (i) regulace genové transkripce, (ii) duplikování protein kódujících genů nebo (iii) tvorbě genetické variability.

Geny v blízkosti transpozonů jsou obvykle transkribovány slaběji (Hollister et al., 2011) a transpozony mohou dokonce představovat hlavní *cis*-regulační element genu (Kinoshita et al., 2007; Butelli et al., 2012; **Pietzenuk et al., 2016 - v rámci této práce jsme ukázali, že inserce teplotně responzivního transpozonu do blízkosti genu způsobila jeho aktivovatelnost teplotním stresem**). Transpozony a další repetitivní sekvence hrají nepostradatelnou roli ve vytváření sekvenční a strukturní variability v rámci rostlinných genomů (Springer et al., 2016; **Pecinka et al., 2013 - v této přehledné práci jsme shrnuli vliv různých transpozonů na regulaci genové exprese a základní funkce genomu**; Lisch, 2013). Méně známo je, že transpozony mohou vytvářet duplikace genů mechanismem retropozice. Tento proces zahrnuje reverzní transkripci genové mRNA pomocí retrotranspozonové (obvykle *LINE*) reverzní transkriptázy a její integraci do hostitelského genomu (Kaessmann et al., 2009). Výsledná duplikovaná kopie pak obvykle neobsahuje introny a může postrádat funkční promotor. Na rozdíl od duplikací genů na bázi DNA má retropozice vysoký potenciál generovat evoluční inovace ve velmi krátké době, např. expresí retrokopií v novém vývojovém kontextu, generováním chimérických genů s novými kombinacemi domén nebo v rámci horizontálního přenosu genů (Wang et al., 2006a; Yoshida et al., 2010; Sakai et al., 2011). Přibližně 1% všech genů v rámci rostlinných genomů vzniklo retropozicí (Zhang et al., 2005; Wang et al., 2006a,

2006b; Abdelsamad and Pecinka, 2014 - zde jsme identifikovali dosud nejvyšší známý počet retrogenů v genomu huseníčku rolního a ukázali, že řada retrogenů je transkripčně aktivována v pylových zrnech).

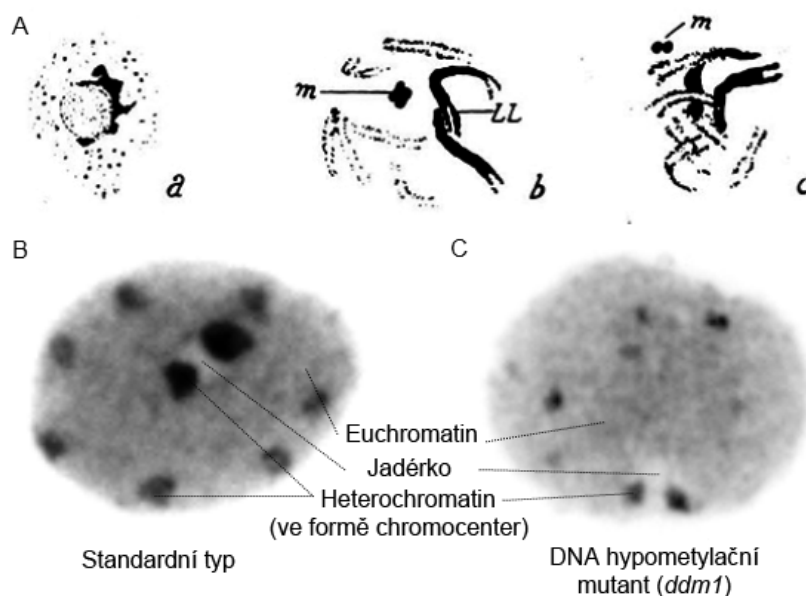
### 3. ORGANIZACE EUCHROMATINU A HETEROCHROMATINU V BUNĚČNÝCH JÁDRECH ROSTLIN

DNA je v buněčném jádře uložena ve formě chromatinu, tj. komplexu DNA a s ní asociovaných proteinů (Li et al., 2007). Mezi hlavní funkce chromatinu patří: (i) úsporné a přitom funkční uložení DNA v omezeném prostoru buněčného jádra, (ii) příprava chromozomů k buněčnému dělení, (iii) potlačení aktivity transpozonů a virů a tím ochrana stability DNA a (iv) kontrola transkripce a replikace (Kouzarides, 2007; Alabert and Groth, 2012; Jeppsson et al., 2014; Chen et al., 2021).

Nejčastějšími chromatinovými proteiny jsou histony. Tyto vysoce alkalické proteiny mají silnou vazebnou afinitu k DNA. Komplex osmi histonových molekul, tj. dvě molekuly každého z histonů H2A, H2B, H3 a H4, asociovaných k DNA vytváří základní jednotku chromatinu – nukleosom. Během tvorby nukleosomu se nejprve vytvoří dva dimery H3 a H4, které se spojí v tetramer. Následně se přidají dva H2A-H2B dimery za vzniku histonového oktameru, okolo kterého se omotá přibližně 147 bp (1,67 otočky) DNA. U některých nukleosomů poté ještě dojde k zafixování pomocí linkerových histonů H1 nebo H5. Navinutí DNA okolo histonového oktameru výrazně napomáhá kompaktnímu uložení DNA v buněčném jádře, ale zároveň nechává DNA relativně přístupnou pro další procesy. To je klíčové s ohledem na množství dědičné informace. Například jádro lidské buňky o průměru pouhých 6  $\mu\text{m}$  obsahuje přibližně 2 metry DNA. To odpovídá asi 40 km vlákna smotaného do tenisového míčku (Alberts, 2002). Podobné poměry lze očekávat také pro rostlinná jádra. Řetězec nukleosomů na DNA tvoří chromatinové vlákno o průměru asi 10 nm a představuje relativně otevřenou, transkripčně permisivní, strukturu. Naproti tomu nahloučené nukleosomy vytvářejí kompaktní a transkripčně represivní chromatin.

Detailní analýza struktury a funkce chromatinu byla umožněna od 80. letech 20. století nástupem řady nových metod genetiky, molekulární biologie a biochemie, jako jsou např. genetické screeny, PCR, fluorescenční *in situ* hybridizace, imunolokalizace, fluorescenční mikroskopie, blotovací techniky, analýzy methylace DNA, chromatinová imunoprecipitace apod. V posledních dvou desetiletích byla analýza chromatinu a transkripce rozšířena na celý genom s využitím různých typů mikročipů (microarrays) a vysoce výkonných metod hlubokého sekvenování (Redman et al., 2004; Rehrauer et al., 2010; Reuter et al., 2015), které představují skutečnou revoluci v přístupu ke studiu organizace jádra a regulace genové exprese. Nově se pak přidaly metody analýzy jednotlivých buněk (angl. single cell genomics), které umožňují mnohem přesnější analýzu s ohledem na přítomnost či absenci určitých chromatinových modifikací, otevřenost chromatinu apod. (Dorrity et al., 2021; Chanou and Hamperl, 2021).

Různé formy chromatinu byly poprvé popsány německo-švýcarským botanikem a genetikem Emilem Heitzem ve 20. letech 20. století u játrovky *Pellia epiphylla*. Heitz pozoroval slabě a silně nabarvené oblasti chromatinu na mitotických chromosomech a dokonce i v interfázních jádrech (Heitz, 1928). Tyto domény následně pojmenoval jako „euchromatin“ a „heterochromatin“ (**Obrázek č. 1**). Oba termíny se staly populárními, protože dobře vystihují dva hlavním chromatinové stavy existující v eukaryotických jádrech: euchromatin je rozvolněný, bohatý na geny a obvykle transkripčně aktivní. Naopak, heterochromatin je kondenzovaný, obvykle transkripčně neaktivní a s vysokým podílem repetitivních sekvencí (Bártová et al., 2008). Struktura a distribuce euchromatinu a heterochromatinu v genomu závisí na mnoha faktorech jako jsou např. taxonomická skupina, množství a rozložení repetitivní DNA na chromosomech nebo typ buněk (Ernst et al., 2011; Tiang et al., 2012). Struktura chromatinu se dále výrazně mění v průběhu buněčného cyklu. Zatímco v interfázních jádrech má chromatin poměrně otevřenou strukturu, tak na počátku buněčného dělení dochází k jeho shlukování do kompaktních struktur vyšších řádů, které vytvářejí mitotické a meiotické chromozomy s mikroskopicky pozorovatelnými sesterskými chromatidami. Na konci buněčného dělení dochází opět k rozvolnění.



**Obrázek č. 1. Euchromatin a heterochromatin.** (A) Nákresy interfázního jádra (a) a mitotických chromosomů (b,c) játrovky *Pellia epiphylla*. Převzato z (Heitz, 1928). Oblasti heterochromatinu jsou černě a euchromatinu světle. (B,C) Interfázní jádra z listů huseníčku rolního – divokého typu (B) a DNA hypo-metylačního mutantu *ddm1* (C). Euchromatin se jeví šedě a heterochromatin vytváří tmavá chromocentra, která lokalizují po obvodu jádra nebo sousedí s jadérkem (slabě barvená oblast). Množství heterochromatinu je epigeneticky kontrolovaný proces. Příkladem může být mutace v genu chromatin remodelačního faktoru *DDMI*, která způsobuje výraznou redukci množství heterochromatinu a chromocenter.

Přestože je rozložení euchromatinu a heterochromatinu v rostlinném jádře často druhově specifické, lze vysledovat minimálně jeden obecný trend a to lokalizaci heterochromatinu na periférii jádra. U obratlovců, kde se jednotlivé chromozomy výrazně liší co do množství transponů a obsahu heterochromatinu, vykazují celé chromozomy preferenčně centrální nebo periferní lokalizaci. Tato organizace je pak velmi výrazná u ptáků, jejichž četné malé a na geny bohaté chromosomy leží v centru jádra, zatímco velké genově chudé chromozomy vytvářejí „vrstvu heterochromatinu“ na vnějším obvodu jádra (Habermann et al., 2001). Podobně striktní radiální organizace dosud nebyla u rostlin pozorována, což je pravděpodobně způsobeno relativně vysokou mírou uniformity mezi chromosomy v rámci jednoho genomu co do poměru AT a CG bazí a rodin repetitivních elementů. Rostliny s malými genomy (<1 Gbp) a nízkým obsahem repetitivní DNA mají obvykle heterochromatin nahloučený v poměrně malé části chromosomu, která tvoří během interfáze tzv. chromocentra (**Obrázek 1B**). Chromocentra jsou lokalizována na jaderné periférii a z nich vystupují chromosomová ramena vytvářející tzv. chromosomová teritoria (Pecinka et al., 2004). U huseníčku rolního a písečného (*Arabidopsis thaliana* a *A. arenosa*) jsou jednotlivé chromosomy rozmístěny v jádře náhodně, výjimku však tvoří chromosomy nesoucí 45S rDNA, které jsou v častém kontaktu s jadérkem i sebou navzájem (Berr et al., 2006; Pecinka et al., 2004). U rostlin s velkými genomy jako je ječmen setý nebo pšenice setá zaujímají interfázni chromozomy tzv. Rabl-orientaci, kdy centromery a telomery vytváří shluky na protilehlých pólech jádra (Jasencakova et al., 2001; Doğan and Liu, 2018). Z toho vyvozujeme, že chromosomy v Rabl konfiguraci zaujímají „tvar písmene V“. Tato organizace odráží uspořádání chromozomů na konci buněčného dělení a zároveň může sloužit jako příprava pro další dělení. Hranice mezi euchromatinem a heterochromatinem je u druhů s velkými genomy méně ostrá, ale lze rozlišit heterochromatický a euchromatický pól buněčného jádra (Fuchs et al., 2006). To je dáno tím, že euchromatické protein kódující geny jsou nahloučeny na koncích chromosomů a v Rabl organizaci tak dochází ke koncentraci euchromatinu na telomerovém pólu jádra. Zda je Rabl organizace čistě výsledkem množství jaderné DNA, mitotické aktivity buněk, jejich kombinací, či jiných faktorů dosud není známo. Je třeba zdůraznit, že mnoho druhů vykazuje přechodné stavy mezi non-Rabl a Rabl chromozomovou organizací.

Důvody pro umístění heterochromatinových oblastí na periférii buněčného jádra zůstávají relativně neznámé, a proto uvádím několik, vzájemně se nevylučujících, možností týkající se možných benefitů této organizace. (i) Vazba centromerických repetitivních elementů na jadernou membránu může zjednodušovat vazbu mikrotubulů na kinetochory. (ii) Periferní oblasti jádra mohou být častěji vystaveny škodlivým faktorům jako jsou reaktivními formy kyslíku nebo UV-B záření. Heterochromatin by tak mohl sloužit jako jakýsi ochranný „štít“ s nízkou hustotou

protein kódujících genů. (iii) Akumulace mutací v repetitivní DNA (ad ii) by dokonce mohla napomáhat inaktivaci transpozonů a očistě genomu od těchto genomických parazitů (**Willing et al., 2016 - v této studii jsme vystavovali huseníček rolní působení simulovaného slunečního záření a ukázali jsme, že mutace vznikají především v pozici metylovaných cytosinů v repetitivních oblastech genomu**). (iv) Fyzická separace heterochromatinu jednotlivých chromosomů může bránit mechanismu homologní rekombinace mezi sekvenčně téměř identickými avšak nehomologními úseky chromosomů a tím snižovat riziko vzniku dicentrických nebo acentrických chromozomů (Chiolo et al., 2011). Tento model však nemusí platit pro druhy s Rabl organizací, kde jsou centromery nahloučeny relativně blízko u sebe, resp. by vyžadoval jejich relokizaci směrem do euchromatické části jádra.

### **3.1 Epigenetický základ euchromatinu a heterochromatinu**

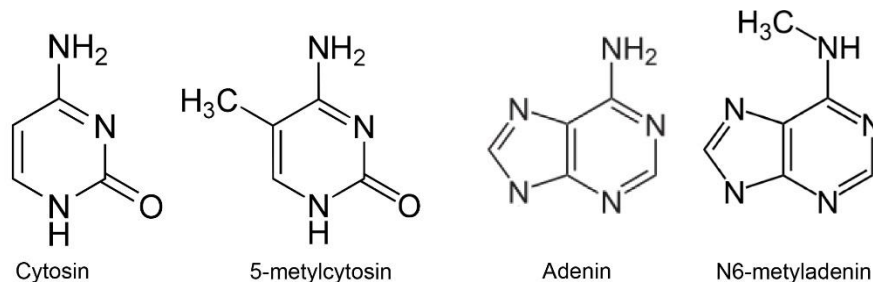
Na molekulární úrovni jsou euchromatin a heterochromatin definovány epigeneticky. Termín „epigenetika“ (latinsky *epi* = nad) zavedl v roce 1942 britský biolog Conrad Hall Waddington, aby popsal diferenciaci lidských kmenových buněk (Waddington, 1942). Od devadesátých let 20. století se termín epigenetika používá k popisu „stabilně dědičného fenotypu vyplývajícího ze změn v chromatinu, které však nejsou změnami DNA sekvence“ (Berger et al., 2009). V současnosti je termín epigenetika v literatuře často používán v širším významu, který zahrnuje téměř jakékoliv (včetně krátkodobých) změn. Tyto změny, které nejsou přenášeny mitotickým dělením je dle mého názoru lepší popisovat jako dynamiku a funkce chromatinu a nikoliv jako epigenetické jevy *sensu stricto* (**Pecinka and Mittelsten Scheid, 2012 - v tomto přehledném článku jsme shrnuli aktuální znalosti ohledně transkripční regulace genové exprese u rostlin a navrhli standardy pro posuzování výsledků epigenetických experimentů, především s ohledem na stresem indukované a mezigenerační efekty**).

#### ***3.1.1 DNA metylace jako klíčová epigenetická modifikace rostlin***

Metyl skupina (-CH<sub>3</sub>) představuje důležitou epigenetickou značku (Ratel et al., 2006; Nabel et al., 2012). U DNA rostlin je nalézána ve formě 5-metylcytosinu (5mC) nebo N6-metyladeninu (6mA; **Obrázek 2**). 6mA byl sice detekován u řady organismů, u rostlin však představuje pouze asi 0,5% všech adeninů, což naznačuje, že se jedná o relativně vzácnou modifikaci (Vanyushin et al., 1988; Fu et al., 2015; Luo et al., 2015). 6mA se pravděpodobně podílí na polohování nukleosomů a regulaci transkripce (Fu et al., 2015).



Obrázek č. 2. Chemická struktura metylovaných nukleobází.

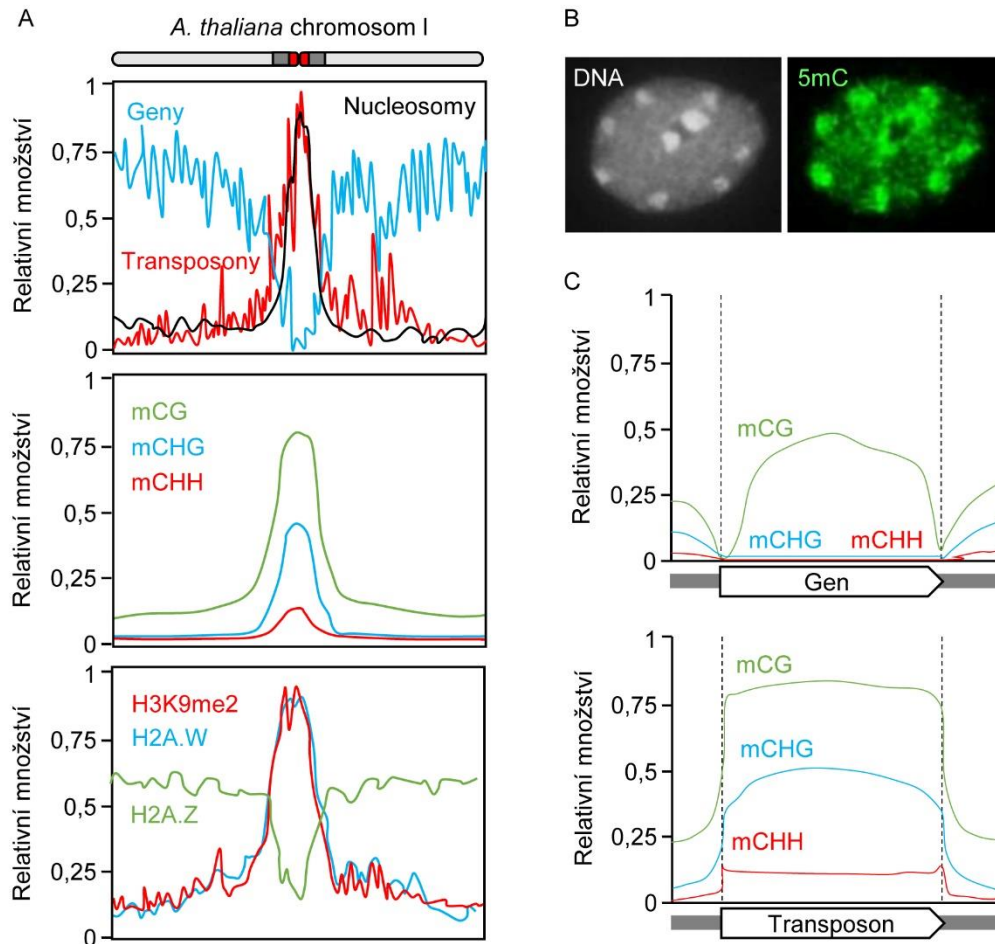


Nejčastěji studovanou modifikací DNA je 5mC (dále jen jako DNA methylace). Přítomnost a význam 5mC se liší v závislosti na fylogenetické skupině. DNA methylace je vzácná u hmyzu a mnoha hub, je však častá u savců a rostlin (Feng et al., 2010; Takayama et al., 2014). U savců dochází k metylaci DNA *de novo* během raného embryonálního vývoje a pouze cytosiny následované guaniny (CG kontext) zůstávají metylovány v somatických buňkách. Rostliny mají komplexní systém, kdy dochází k DNA metylaci ve třech funkčně odlišných sekvenčních kontextech: CG, CHG a CHH (kde H je C, A nebo T) a tato methylace přetrvává relativně stabilně v průběhu celého vývoje. DNA methylace vykazuje specifické rozmístění v rostlinných genomech. Je obohacena v heterochromatických a redukována v euchromatických oblastech (**Obrázek 3A, B**).

Celogenomové studie u huseníčku rolního odhalily, že přibližně 20% genů nese DNA metylaci také v genech (anglicky tzv. gene body methylation, GBM). Oproti repetitivním sekvencím, které mají metylované cytosiny ve všech sekvenčních kontextech, se GBM vyskytuje výhradně v CG kontextu (**Obrázek 3C**) (Zilberman et al., 2008). Přítomnost GBM je charakteristickým znakem především dlouhých, evolučně konzervovaných a stabilně prepisovaných genů (Coleman-Derr and Zilberman, 2012a; Takuno and Gaut, 2012). V současné době je stále diskutována funkce této methylace např. při prevenci transkripce z kryptických promotorů anebo zprostředkovávání alternativního sestřihu (Takuno and Gaut, 2012). Analýza DNA metylačních profilů u více než 1 000 přírodních linií huseníčku rolního z různých geografických oblastí severní polokoule potvrdila pozitivní korelaci mezi GBM a vysokou transkripcí, a navíc ukázala, že je tato methylace nižší v regionech s teplejším podnebím (Kawakatsu et al., 2016). Nově bylo zjištěno, že GBM zcela chybí u několika druhů z čeledi brukvovitých (Bewick et al., 2017; Bewick and Schmitz, 2017). To naznačuje, že tato methylace může mít regulační funkci, ale není pro genom rostlin esenciální.

Nejasná role CG methylace genů kontrastuje s rozhodující úlohou DNA methylace pro stanovení konstitutivního heterochromatinu u rostlin. V heterochromatinu jsou cytosiny metylovány ve třech kontextech CG, CHG a CHH (**Obrázek 3C**). Tato akumulace methylace vede k potlačení transkripce prostřednictvím řady kroků, které zahrnují instalaci represivních

chromatinových značek, odstranění permisivních značek a zahuštění chromatinu (Law and Jacobsen, 2010; Fultz et al., 2015). Ztráta schopnosti založit a udržet heterochromatinovou strukturu určitých částí genomu vede u rostlin k vývojovým poruchám, silně snížené kondici a fertilitě, či dokonce k letalitě (Miura et al., 2001; Mathieu et al., 2007; Mirouze et al., 2009). Proto bude epigenetická kontrola heterochromatické metylace DNA podrobně popsána v následujících kapitolách.



**Obrázek č. 3. Rozmístění DNA metylace u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*).** (A) Shora dolů: Schematické zobrazení chromosomu 1 (ca. 30 Mbp). Centromera je vyznačena červeně, pericentromerický heterochromatin tmavě šedě a euchromatická chromozomová ramena světle šedě. x-osa grafů odpovídá chromosomu 1 a y-osa pak ukazuje relativní frekvenci. Horní graf ukazuje pozitivní korelaci mezi přítomností transpozónů (TE) a hustotou nukleosomů a negativní korelaci s distribucí genů. Střední graf shrnuje rozmístění DNA metylace v jednotlivých sekvenčních kontextech. Spodní graf pak shrnuje rozmístění heterochromatické modifikace H3K9me2 a varianty H2A.W a dále euchromatické varianty H2A.Z. Chromatinové profily byly převzaty z citovaných prací a upraveny (Bernatavichute et al., 2008; Chodavarapu et al., 2010; Coleman-Derr and Zilberman, 2012a; Yelagandula et al., 2014). (B) Interfázní jádro obarvené DAPI (vlevo) a protilátkou proti 5mC (vpravo), které výrazně barví oblasti heterochromatických chromocenter (na obrázku vpravo se jeví jako nejsvětější oblasti jádra). (C) Relativní frekvence DNA methylace v různých sekvenčních kontextech v genech a transpozonech. Převzato a upraveno z (Coleman-Derr and Zilberman, 2012a).

### 3.1.2 *Mechanismus de novo metylace dosud nemetylovaných oblastí*

Strukturované rozmístění DNA metylace v jaderném genomu naznačuje, že toto rozmístění není náhodné (Chan et al., 2005; Pecinka et al., 2013 - v tomto přehledném článku jsem shrnul aktuální znalosti týkající se DNA metylace u rostlin a typické vlastnosti DNA metylovaných lokusů). Přestože dosud nejsou podmínky, které vedou k DNA metylaci konkrétního lokusu zcela známy, bylo prokázáno, že ve zvýšené míře korelují s:

- (i) tandemovými i roztroušenými repeticemi
- (ii) obrácenými repeticemi, které mohou vytvářet tzv. vlásenkovou strukturu
- (iii) lokusy produkujícími nestandardní transkripty (anti-sense, nedokonale terminované apod.)
- (iv) geny řízenými silnými (často virovými) promotory
- (v) sekvenční homologii s již metylovanými lokusy.

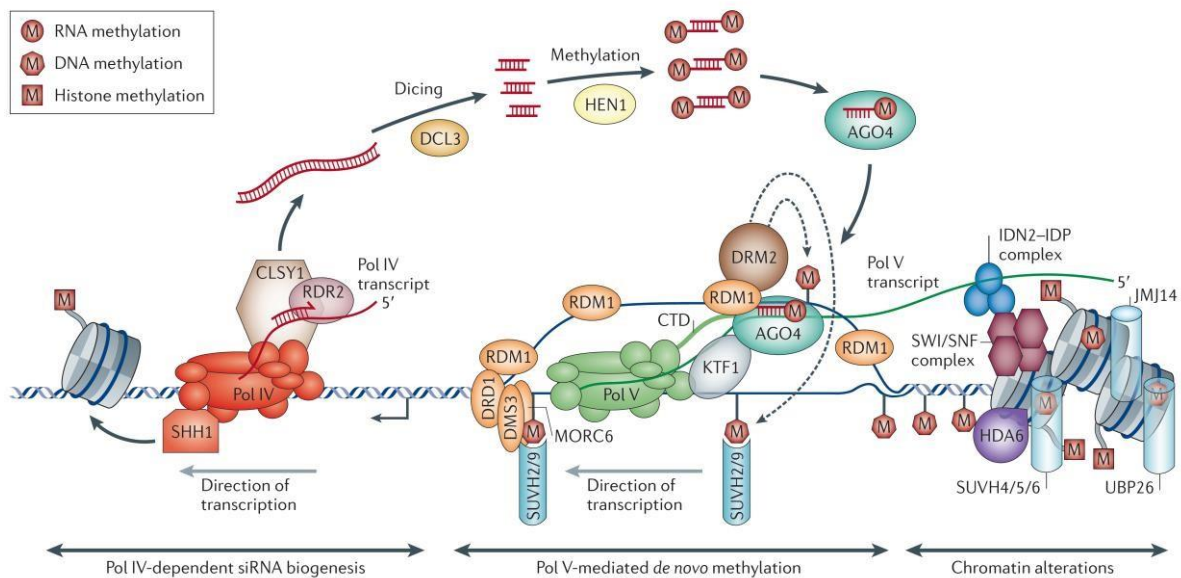
DNA sekvence nově vkládané do genomu (např. během DNA transformace) jsou bez DNA methylace. V určitých případech je však rostlina metyluje *de novo*. V některých případech tak dochází k umlčení transgenních konstruktů vkládaných do rostlinné DNA a absenci požadované vlastnosti či dokonce vypnutí dalších konstruktů nesoucích homologní sekvence (Daxinger et al., 2008). Přestože se jedná o komplikaci v procesu produkce transgenních rostlin, byly tyto fenotypy klíčové pro mechanistické pochopení procesu instalace a udržení DNA metylace u rostlin. Tento proces je rozdělen do několika drah. Standardní *de novo* DNA metylační dráha je závislá na produkci malých interferenčních RNA molekul (angl. short interfering RNA, siRNA) s úplnou homologií k cílové sekvenci, která je následně metylována. Proto se tato dráha často nazývá jako RNA-řízená DNA metylace (RdDM) (**Obrázek 4**) (Matzke and Mosher, 2014; Fultz et al., 2015). Během RdDM je cílový lokus nejprve transkribován DNA-dependentními RNA polymerázami II a IV (PolII a PolIV), přičemž druhá zmíněná polymeráza se vyskytuje pouze u cévnatých rostlin a je specifická právě pro RdDM dráhu. Tyto transkripty musí vytvořit dvoukládkovou vlásenkovou strukturu, a to buď jednoduchým přeložením (v případě přirozených obrácených repetit) nebo pomocí RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2 (RDR2), která je schopná dosyntetizovat chybějící řetězec. RNA vlásenka je poté štěpena pomocí endoribonukleázy DICER-LIKE 3 (DCL3) na 24 bp dlouhé siRNA úseky. Tyto krátké dvouřetězcové RNA molekuly jsou stabilizovány methylovací 3' konců pomocí RNA metyltransferázy HUA ENHANCER 1 (HEN1). Jeden řetězec siRNA pak tvoří RNA-indukovaný umlčovací komplex (RNA-induced silencing complex, RISC) s proteinem

ARGONAUTE 4 (AGO4). Následně se RISC spojí s komplexem RNA-dependentní polymerázy V (PolV), který zajišťuje DNA *de novo* metylační reakci. V tomto procesu je soustředěna řada enzymů a strukturních proteinů, z nichž uvádím pouze některé. DECREASED RNA-DEPENDENT DNA METHYLATION 1 (DRD1) je chromatinový remodeler specifický pro RdDM, který s největší pravděpodobností odemkne specifické nukleosomy a umožní tak přístup *de novo* DNA metyltransferázám z rodiny DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE (DRM) k cílovým sekvencím.

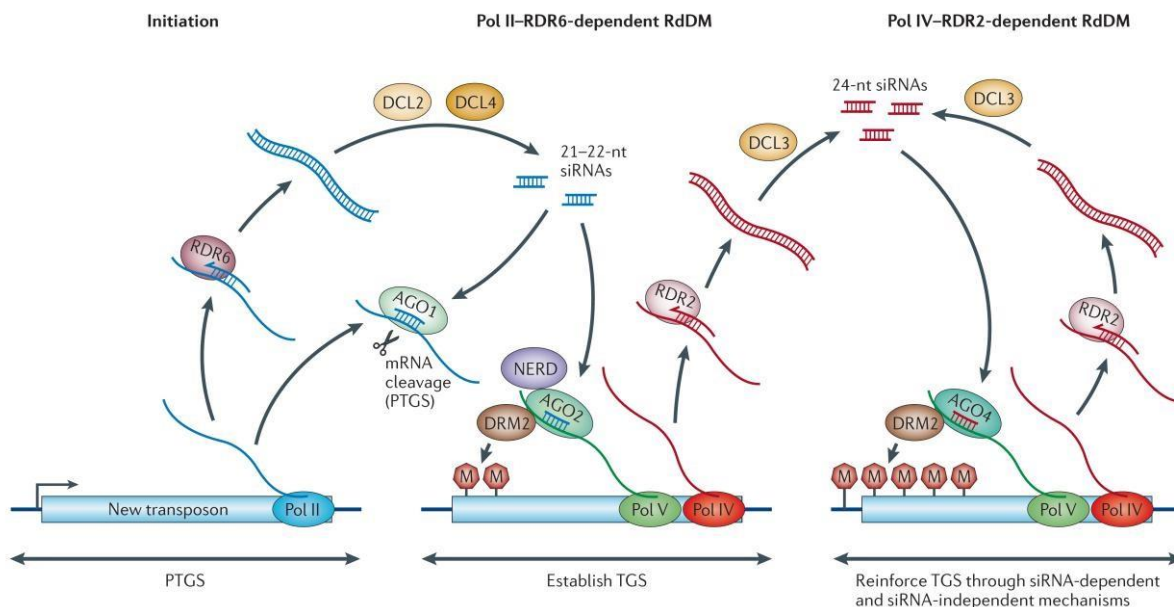
Vedle kanonické *de novo* DNA metylace existuje také alternativní dráha, která je někdy nazývána jako post-transkripční genové vypínání (podle anglického Post-transcriptional gene silencing, PTGS) (**Obrázek 5**). V rámci této dráhy jsou jednořetězcové mRNA generované DNA-dependentní Polymerázou II převedeny na dvouřetězcové pomocí RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 6 (RDR6), naštěpeny DICER-LIKE 2 (DCL2) nebo DICER-LIKE 4 (DCL4) na 21 až 22 bp dlouhé dsRNA, jejichž jeden řetězec je navázán do ARGONAUTE 1 (AGO1) a vzniklý komplex štěpí mRNA nebo může (v omezené míře) vést k *de novo* methylaci DNA (Matzke and Mosher, 2014). RdDM je velmi účinný mechanismus, který metyluje nově vložené repetitivní sekvence, transpozony nebo cizí sekvence a to v některých případech již v první generaci (Marí-ordóñez et al., 2013). Tento jev byl poprvé mechanisticky popsán u tzv. kosuprese, kdy transformace petúnií transgenem, který měl způsobit výraznější zbarvení okvěti, vedla naopak úplné ztrátě exprese a bílým květům (Van Blokland et al., 1994).

RdDM aktivita může být pozorována takřka v přímém přenosu během fenoménu nazývaného paramutace. U tohoto epigenetického jevu, přenáší epigeneticky umlčená alela svůj reprimovaný expresní status na geneticky identickou, avšak exprimovanou alelu a způsobí její vypnutí. Reprimovaná epialela je tedy dominantní a tuto vlastnost přenáší také na původně aktivní epialely, které tímto umlčuje (Chandler and Stam, 2004; Chandler and Alleman, 2008; Pílu, 2015). K vypnutí dochází pomocí *de novo* DNA metylace, která je naváděna k naivní exprimované epialele pomocí *trans* aktivních siRNA molekul produkovaných reprimovanou alelou. Paramutace se výrazně uplatňuje v epigenetické regulaci u některých druhů rostlin a typickým příkladem je kukuřice, kde byla popsána řada klasických případů (Arteaga-Vazquez and Chandler, 2010)

Přes svou složitost a zapojení velkého množství faktorů má vyřazení RdDM aktivity ve standardních podmínkách překvapivě malý vliv na fenotyp (u huseníčku obvykle pouze mírně opožděné kvetení). Množství DNA metylace zůstává téměř beze změny a rostliny vykazují relativně malé změny v expresi genů a transpozonů (Huettel et al., 2006; Stroud et al., 2012a; Zemach et al., 2013). To naznačuje, že RdDM funguje alespoň částečně redundantně s jinou molekulární drahou.



**Obrázek 4. Model standardní *de novo* RNA-dependenční DNA metylační dráhy (převzato z Matzke and Mosher, 2014).** Jednotlivé kroky v rámci této dráhy jsou popsány v textu.



**Obrázek 5. Model alternativní *de novo* DNA metylační dráhy (převzato z Matzke and Mosher, 2014).** Jednotlivé kroky této dráhy jsou popsány v textu.

### 3.1.3 Udržovací DNA metylační dráha zajišťuje stabilní hladinu DNA metylace

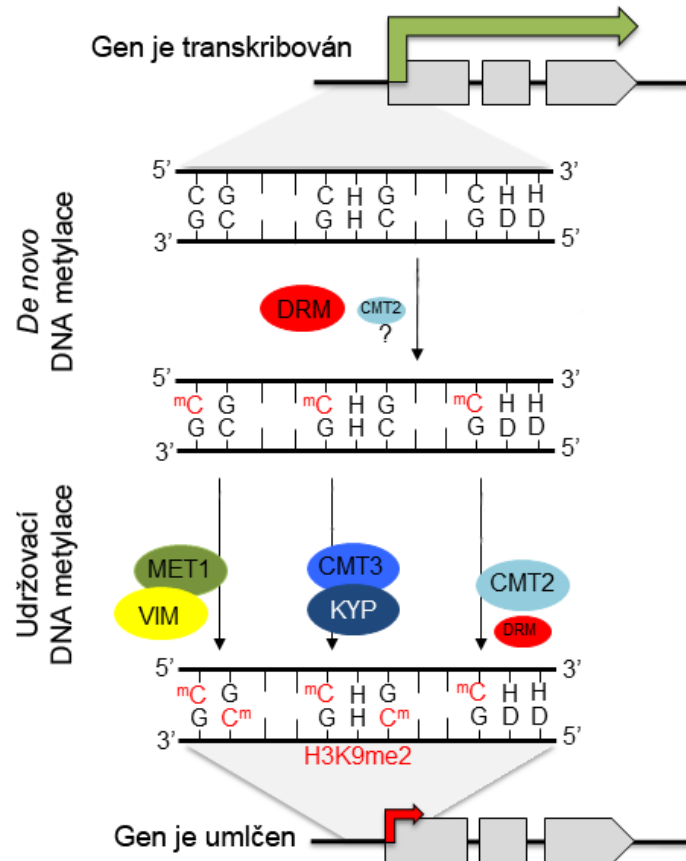
U huseníčku rolního byla provedena řada dopředných genetických screenů zaměřených na identifikaci klíčových genů pro kontrolu DNA metylace a transkripční represi repetitivní DNA.

Tyto screeny odhalily skupinu mutantů charakterizovaných obvykle výrazným snížením DNA metylace a masivním navýšením transkripční a transpoziční aktivity transpozonů.

První skupina genů ovlivňovala DNA metylaci ve všech sekvenčních kontextech a obsahovala primárně enzymy nutné pro syntézu S-adenosyl methioninu, který je používán různými typy metyltransferáz jako donor metyl skupiny. Dva nejlépe charakterizované enzymy z této skupiny jsou ETHYLENETETRAHYDROFOLATE DEHYDROGENASE/METHENYLTETRAHYDROFOLATE CYCLOHYDROLASE (MTHFD1), který se podílí na folátovém cyklu a S-ADENOSYL HOMOCYSTEINE HYDROLASE GENE 1 (HOG1), který je nutný pro zdárný průběh metioninového cyklu (Rocha et al., 2005; **Baubec et al., 2010 – v rámci této publikace jsme identifikovali a charakterizovali novou mutantní alelu genu *HOG1***, Groth et al., 2016). Silné mutantní alely MTHFD1 a HOG1 jsou letální. Nicméně částečná ztráta funkce těchto genů má za následek globálně sníženou metylaci DNA i histonů, výrazně zhoršený růst rostlin a ztrátu umlčení transpozonů (**Baubec et al., 2010**, Groth et al., 2016). Předpokládá se, že hydrofolátový cyklus je pojítkem mezi výživou a úrovní DNA metylace u rostlin (Groth et al., 2016). Tento příklad upomíná na systém *Agouti* u myši (*Mus musculus*), kde strava bohatá na hydrofoláty vede k normální metylaci DNA a nízké expresi genu *Agouti*, což se projevuje tmavou srstí (Waterland and Jirtle, 2003). Na hydrofoláty chudá strava pak vede k nižší úrovni DNA metylace, expresi genu *Agouti* a následně nažloutlé srsti. Významným hráčem v globální metylaci DNA je faktor remodelace chromatinu DECREASED IN DNA METHYLATION 1 (DDM1). Předpokládalo se, že DDM1 řídí metylaci DNA tím, že umožňuje přístup DNA metyltransferáz k nukleosomální DNA uzamčené histonem H1 v heterochromatinových oblastech (Zemach et al., 2013). Nicméně, nejnovější výzkum ukazuje, že DDM1 je spíše zodpovědný za instalaci heterochromaticky specifické histonové varianty H2A.Z (Osakabe et al., 2021), jejíž přítomnost by pak vedla k reprimaci chromatinu a instalaci DNA metylace.

Dále bylo nalezeno několik faktorů ovlivňujících DNA metylaci v sekvenčně specifickém kontextu (**Obrázek 6**). V CG kontextu je metylace DNA udržována komplexem DNA METHYLTRANSFERASE 1 (MET1) a rodinou částečně redundantních proteinů obsahujících SRA a SET domény, které byly u huseníčku rolního popsány jako VARIANT IN METHYLATION (VIM) (Mathieu et al., 2007; Woo et al., 2007; Hashimoto et al., 2008; Woo et al., 2008). CG metylace se vyskytuje jak v kódujících oblastech genů, tak v transpozonech a je s největší pravděpodobností kopírována z metylovaného řetězce DNA na nově nasyntetizovaný řetězec během replikace DNA. Během tohoto procesu se VIM proteiny nejprve váží na molekulu DNA, invadují její centrální část a vytáčejí cytosiny v místě CG dinukleotidů tak, aby mohla proběhnout metylace pomocí MET1 (Hashimoto et al., 2008). Ztráta aktivity

MET1 vede k závažným vývojovým defektům a podobně jako u *ddm1* mutantů také k mobilizaci transpozonů (Finnegan et al., 1996; Mathieu et al., 2007; Mirouze et al., 2009).



**Obrázek 6. Přehled DNA metylačních drah u huseníčku rolního.** Transkripčně aktivní gen (zelená šipka) může být *de novo* DNA metylován v CG, CHG and CHH kontextu pomocí kanonické nebo alternativní RNA-řízené DNA Metylační (RdDM) dráhy. V procesu *de novo* DNA metylace jsou klíčové DRM DNA metyltransferázy (viz. **Obrázky 4 a 5** pro detailní informace) a potenciálně také CMT2. Tato první vlna DNA metylace slouží jako templát pro replikačně vázanou udržovací DNA metylaci. V CG kontextu je tato metylace instalována MET1 – VIM komplexem. V CHG kontextu je to CMT3, která interaguje s histonovou metyltransferázou KYP, což je podtrženo kolokalizací CHG DNA metylace a H3K9me2 metylace. CHH metylace na okrajích dlouhých transpozonů je udržována díky aktivitě CMT2 (a pravděpodobně RdDM jako záložní dráhy). Hypermetylace DNA ve všech třech funkčních kontextech vede k transkripčnímu vypnutí genu.

Kromě evolučně konzervované CG methylační dráhy mají rostliny také unikátní rodinu DNA methyltransferáz obsahujících chromodoménou tzv. CHROMOMETHYLÁZ (Bartee et al., 2001). První funkčně charakterizovaný enzym této rodiny byl CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3), který metyluje specificky v CHG kontextu. CMT3 interaguje, prostřednictvím svých chromo- a „bromo adjacent homology“ (BAH) domén, s histonovou methyltransferázou KRYPTONITE (KYP; syn. SET DOMAIN PROTEIN 33; syn. SU(VAR) 3-9 HOMOLOG 4), která di-metyluje histon H3 v pozici lysinu 9 (H3K9me2) a tak dále přispívá k tvorbě

heterochromatinu (Bartee et al., 2001; Bernatavichute et al., 2008; Du et al., 2012). Nedávno bylo zjištěno, že jiný protein této rodiny CHROMOMETHYLASE 2 (CMT2) zprostředkovává CHH DNA metylaci na okrajích dlouhých transpozonů (Zemach et al., 2013). Tím se liší od *de novo* DNA metyltransferázy DRM2, která metyluje primárně kratší transpozony nebo deleční zbytky dlouhých transpozonů, jako jsou například tzv. soloLTR (solitérní dlouhé terminální repetice LTR transpozonů) (Huettel et al., 2006). Faktory řídící odlišnou lokalizaci CMT2 a DRM2, zůstávají neznámé, ale je možné, že CMT2 je také naváděna určitými histonovými modifikacemi.

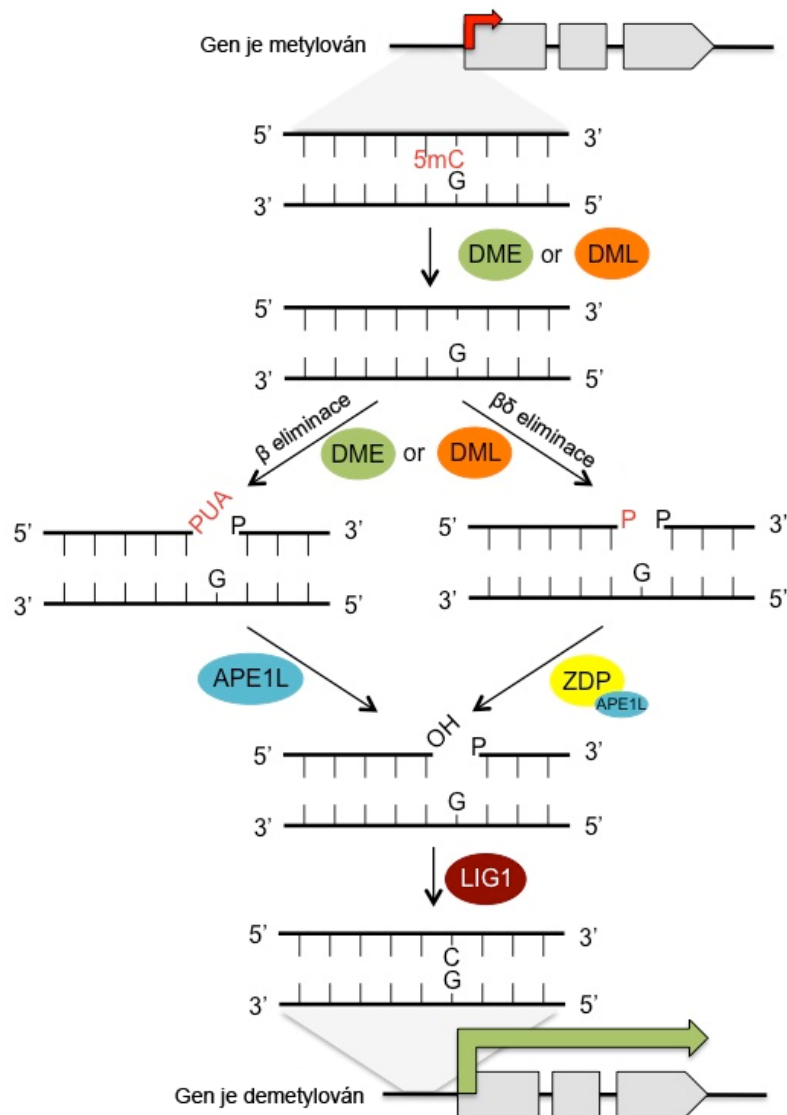
Ztráta asi 30% heterochromatinu, která byla pozorována u mutantů v *DDMI* nebo *MET1*, vede k mnoha pleiotropním fenotypům včetně mobilizace transpozonů, deregulaci stovek genů, nestabilitě genomu, vývojovým problémům a snížené fertilitě (Jeddeloh et al., 1999; Miura et al., 2001; Shaked et al., 2006; Mathieu et al., 2007; Mirouze et al., 2009; **Baubec et al., 2010 - v rámci této práce jsme izolovali a popsali fenotypy několika mutantních alel *DDMI***). Mobilizace transpozonů a jejich inserce do protein kódujících genů je vážnou hrozbou, protože přímo ovlivňuje funkčnost genů a je nejpravděpodobnějším faktorem způsobujícím redukci životnosti v rámci generací *ddm1* a *met1* mutantů (Miura et al., 2001; Mathieu et al., 2007; Mirouze et al., 2009). Ztráta DNA methylace navíc v některých případech vede k transkripci z normálně umlčených nebo vývojově regulovaných genů. Některé z genů objevených tímto způsobem byly důležité pro pochopení epigenetického základu specifických biologických procesů, jako je např. genový imprinting (Köhler et al., 2012; Batista and Köhler, 2020). Mutanti v genu *DDMI* také vykazují zvýšenou nestabilitu genomu a vyšší frekvenci meiotických rekombinací (Shaked et al., 2006; Melamed-Bessudo et al., 2005). To je s největší pravděpodobností způsobeno rozvolněnou strukturou chromatinu a/nebo stříháním DNA transpozonovými nukleázami. To poukazuje na důležitost represe transpozonů a tvorby heterochromatinu pro kontrolu genové transkripce a stability genomu rostlin.

V souhrnu, tato kapitola ilustruje složitost a také částečnou redundanci mechanismů methylace DNA u rostlin (**Obrázek 6**). Systém paralelních a záložních drah umožňuje přesnou regulaci genové exprese a především funkční ochranu rostlinného jaderného genomu před genomickými parazity typu transpozonů nebo virů. Dále je třeba zdůraznit, že v rostlinách stále existuje několik dalších necharakterizovaných DNA metyltransferáz.



### 3.1.4 Aktivní DNA demetylace u rostlinných pomocí báze excizních oprav DNA

Přestože je heterochromatická DNA metylace považována za jednu z nejstabilnějších epigenetických značek, existují buňky či oblasti genomu, kde mohou být metylované báze cíleně odstraňovány (**Obrázek 7**). U rostlin je tento proces aktivní DNA demetylace prováděn rodinou DEMETER (DME) a DEMETER-LIKE (DML1, DML2 and DML3) bifunkčních DNA glykosyláz/lyáz, které odstraňují 5-metylcytosin v rámci dvouřetězcové DNA na principu báze excizních oprav DNA (Penterman et al., 2007; Hsieh et al., 2009; Zhu, 2009).



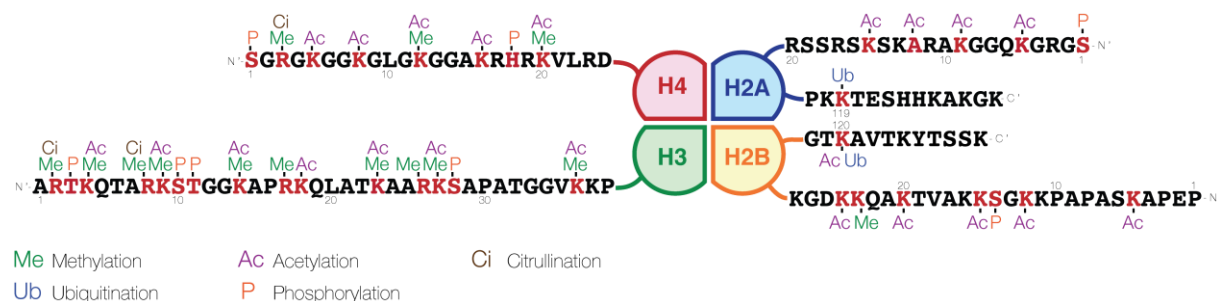
**Obrázek 7. Aktivní demetylace DNA.** Odstranění metylovaných bází z regulační oblasti genu může vést k jeho aktivaci. Molekulární funkce jednotlivých enzymů je popsána v textu. Obrázek byl převzat z (Li et al., 2015a) a upraven.

Tyto enzymy narušují DNA kostru v abazickém místě pomocí beta- nebo beta/delta-eliminace (Choi et al., 2002; Gong et al., 2002). To vytváří jednořetězcové poškození DNA charakterizované buď fosfo-a,b-nesaturovaným aldehydem (PUA) nebo fosfátovou skupinou na 3' konci, které musí být odstraněny DNA lyásou APE1L nebo DNA fosfatázou ZDP (Martínez-Macías et al., 2012; Lee et al., 2014; Li et al., 2015a). V konečném kroku dojde k uzavření léze nemetylovaným cytosinem pomocí DNA LIGÁZY 1 (LIG1) (Li et al., 2015a).

DNA demetylázy DME a DMLs fungují jako pozitivní regulátory genové transkripce, kdy např. odstraňují DNA metylaci z promotorů specifických genů a tak je mohou aktivovat. Nicméně způsob jakým jsou demetylázy naváděny na místa určení zůstává v současnosti neznámý. Zatímco DML1/ROS1 je aktivní především během somatického vývoje, tak DME je specializován na demetylaci v samičím gametofytu před oplozením.

### 3.1.5 Histonové varianty a modifikace

Histony jsou velmi důležitým nositelem epigenetické informace a jedním ze základních „kamenů“ chromatinu. Jsou tvořeny C-terminální globulární doménou, která je situována ve středu nukleosomu, a nestruturovanou N-terminální částí, která vystupuje z nukleosomu do prostoru a slouží jako substrát pro posttranslační modifikace jakými jsou např. metylace (Me), acetylace (Ac), fosforylace (P), ubiquitinace (Ub) a citrulinace (Cit) (**Obrázek 8**).



**Obrázek 8. Posttranslační modifikace histonových N-terminálních konců.** (Zdroj: Wikipedia).

V rámci této práce budou diskutovány pouze histonové metylace a acetylce, protože tyto modifikace slouží velmi dobře jako diagnostické značky euchromatinu a heterochromatinu. Metylovány mohou být lysiny (K) a arginy (R), a oproti jiným modifikacím se metylace může vyskytovat jako mono-, di- nebo trimetylce, přičemž každá modifikace má specifickou signální či regulační funkci. Například histon H3 lysin 9 di-metylce (H3K9me2) je transkripčně repressivní heterochromatinová modifikace, zatímco H3K9me3 funguje u rostlin jako transkripčně permissivní euchromatinová modifikace (Roudier et al., 2011). Metylce histonů je katalyzována rodinou histonových metyltransferáz, které jsou charakterizovány

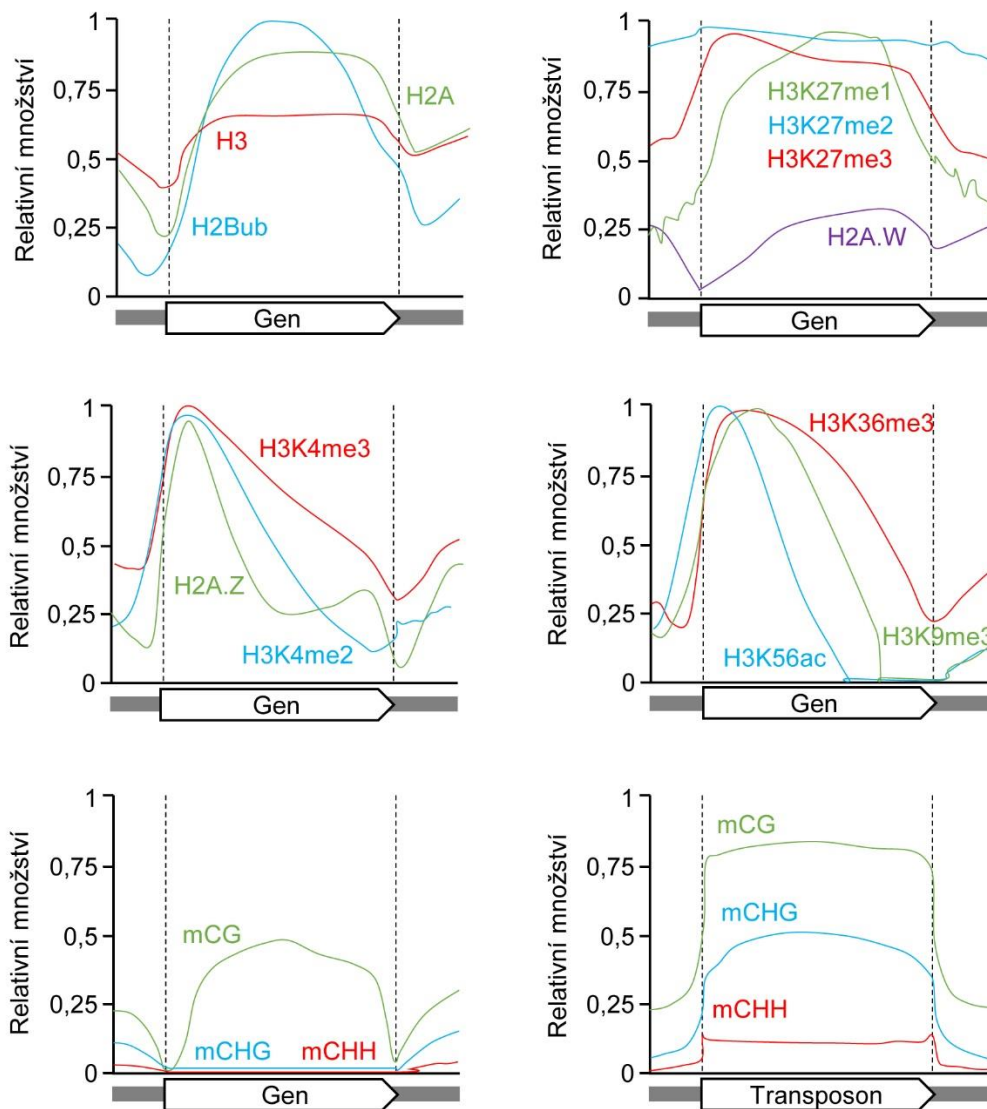
přítomností SET domény. Tato rodina je poměrně rozsáhlá a např. u huseníčku rolního je tvořena více než 35 geny. To naznačuje, že metylace histonů představuje poměrně komplexní systém, kdy jednotlivé geny mohou být jak pozičně tak pletivově specifické. Methylace histonů může být také odstraněna a tuto funkci zprostředkovávají histon demethylázy, které obsahují Jumonji C (JmJc) doménu a u rostlin stále zůstávají poměrně málo prozkoumanou skupinou enzymů (Liu et al., 2010; Qian et al., 2019). Podobně jako v případě histonové metylace, existují také enzymy, které zprostředkovávají acetylaci histonů tzv. histon acetyltransferázy, resp. jejich deacetylaci, která je zajišťována histon deacetylázami. Acetylace histonů má obecně transkripčně permisivní funkci a obohacena v euchromatinu, zatímco deacetylace histonů transkripci tlumí.

Kromě histonových modifikací přispívají k diverzitě a komplexitě histonového kódu také histonové varianty. Jedná se o samostatné histonové geny, které se od kanonické varianty liší některými aminokyselinami, což má vliv na jejich lokalizaci a funkci. U rostlin je nejlépe popsáným případem rodina variant histonu H2A, která zahrnuje H2A.Z, H2A.W a H2A.X (Amiard et al., 2010; Coleman-Derr and Zilberman, 2012b; Yelagandula et al., 2014). Kanonický histon H2A obvykle značí nukleosomy v rámci otevřeného a aktivního chromatinu a v exprimovaných genech. V 5' koncových oblastech stabilně exprimovaných genů a ve stresem či vývojově regulovaných genech pak bývá H2A nahrazován variantou H2A.Z (Coleman-Derr and Zilberman, 2012b; Yelagandula et al., 2014). Funkce H2A.Z není zcela jasná, ale předpokládá se, že reguluje transkripci a blokuje umístění DNA metylace. V heterochromatinových oblastech je dominantní variantou nedávno popsána varianta H2A.W, která přispívá ke kondenzaci, opravám DNA a transkripční represi transpozonů (Yelagandula et al., 2014; Lorković et al., 2017; Osakabe et al., 2021). Poslední známou specializovanou variantou je H2A.X, jejíž fosforylovaná varianta značí místa poškození DNA (Amiard et al., 2010). Podobně jsou diverzifikovány také varianty histonů H3 a H1. Varianty H1.1 and H1.2 jsou u huseníčku rolního exprimovány během celého vývoje, zatímco H1.3 se exprimuje pouze ve specifických buňkách a je indukována vlivem stresových podmínek, kdy napomáhá regulaci genové exprese (Rutowicz et al., 2015). Rodina histon H3 genů zahrnuje u huseníčku rolního celkem 14 kopií, a to jednu kopii CENH3, pět kopií H3.1, tři kopie H3.3 a pět kopií H3.3-like (Okada et al., 2005). Centromerická histonová varianta CENH3 (známá také jako CENP-A) definuje funkční centromeru v rámci řady centromerických repetitiv a je charakteristická tím, že se vkládá do nukleosomu v průběhu G2 fáze buněčného cyklu (Lermontova et al., 2011; Ravi et al., 2011). Mutanti v CENH3 genu mají nerovnoměrnou segregaci chromosomů a sníženou fertilitu. Kanonický histon H3.1 je vkládán do nukleosomu histonovým chaperonem Chromatin Assembly Factor – 1 v průběhu DNA replikace. H3.1 je lokalizován po celém genomu, ale jeho

hustota je obecně vyšší v heterochromatiiových oblastech (Stroud et al., 2012b). Mutanti s chybějícím funkčním komplexem Chromatin Assembly Factor – 1 mají pleiotropické fenotypy, včetně redukce heterochromatinu, částečné aktivace transpozonů a snížené stability genomu (Elmayan et al., 2005; Endo et al., 2006; Kirik et al., 2006; Mozgova and Hennig, 2015). Varianta H3.3 je naproti tomu exprimována během celého buněčného cyklu a nachází se především v transkripčně aktivních genech (Stroud et al., 2012b).

### **3.2 Molekulární analýzy vymezují čtyři základní typy chromatinu rostlin**

Jak bylo popsáno výše, tak je v současnosti známo několik kontextů DNA metylace a celá řada histonových variant a modifikací. Bylo provedeno několik studií s cílem zhodnotit typy chromatinu na základě rozmístění a asociací různých modifikací a poskytnout určité diagnostické modifikace pro jednotlivé typy chromatinu. Analýzy u huseníčku rolního ukázaly, že lze rozlišit čtyři až devět hlavních typů chromatinu (Roudier et al., 2011; Sequeira-Mendes et al., 2014). Pro jednoduchost zde budou popsány pouze čtyři základní typy, které zahrnují: (i) aktivní geny, (ii) vývojově regulované geny, (iii) transpozony a (iv) mezigenové oblasti (**Tabulka 1**). Transkribované geny reprezentují typický euchromatin a obsahují množství transkripčně permisivních chromatinových modifikací: H3K4me<sub>2</sub>; H3K4me<sub>3</sub>; H3K9me<sub>3</sub>; H3K36me<sub>3</sub>; H3K56ac; H2Bub a CG DNA methylaci (**Obrázky 3C a 9**). Vývojově řízené geny nesou vysoký podíl transkripčně represivních modifikací H3K27me<sub>2</sub> a H3K27me<sub>3</sub> (**Obrázek 9**). Tyto geny obvykle alternují mezi reprimovanou a aktivovanou formou v průběhu vývoje rostliny.



**Obrázek 9. Schématické rozmištění vybraných histonových variant a modifikací v genech.** X osa ukazuje gen, kde vertikální přerušované čáry značí počátek a konec transkribované oblasti. Y osa ukazuje relativní hustotu od 0 (chybí) do 1 (vysoce obohacen). Profily byly převzaty z publikací (Roudier et al., 2011; Coleman-Derr and Zilberman, 2012b; Yelagandula et al., 2014) s modifikacemi.

Oproti tomu transpozony, jiné repetitivní sekvence a malá část umlčených genů tvoří konstitutivní heterochromatin, který je reprimován stabilně pomocí transkripčního genového vypínání a RdDM a je obohacen především o represivní modifikace včetně H3K9me2, H4K20me1 a DNA metylací ve všech sekvenčních kontextech. Poslední, poměrně nevyhraněný typ chromatinu pak tvoří mezigenové oblasti.

**Tabulka 1:** Základní typy chromatinu u huseníčku rolního (Roudier et al., 2011). Diagnostické modifikace jsou vyznačeny tučně.

| Typ                        | Charakteristické modifikace   | Chromatin                     |
|----------------------------|---|-------------------------------|
| Aktivní geny               | <b>H2Bub</b> ; <b>H3K4me2</b> ; H3K4me3; <b>H3K9me3</b> ; <b>H3K36me3</b> ; H3K56ac; CG DNA methylace       | Euchromatin                   |
| Vývojově kontrolované geny | <b>H3K27me3</b> ; H3K27me2; H3K4me2   | Facultativní heterochromatin  |
| Transpozony                | <b>CHG and CHH DNA methylace</b> ; <b>H2AW</b> ; H3.1; <b>H3K9me2</b> ; H3K27me1; H3K27me2; <b>H4K20me1</b> | Konstitutivní heterochromatin |
| Mezigenové oblasti         | Absence výše popsaných.   | Euchromatin                   |

Tato klasifikace je velmi užitečná s ohledem na diagnostiku nebo pochopení regulace genové exprese v různých oblastech genomu, za různých podmínek prostředí či v mutantních pozadích.

## 4. VLIV ABIOTICKÉHO STRESU NA HETEROCHROMATIN ROSTLIN

Jako přisedlé organismy musí rostliny reagovat na různé environmentální podmínky bez možnosti úniku do příhodnějšího prostředí. Rostliny si proto vyvinuly řadu adaptací a strategií, které jim umožňují přežít i na velmi nehostinných místech a snášet extrémní abiotické podmínky včetně náhlých změn teploty či vysokých dávek UV záření. Klimatické modely navíc předpovídají, že zemědělství bude čelit stále extrémnějším výkyvům počasí, což může mít výrazné dopady na produkci potravin. Zatímco fyziologické a molekulární odpovědi rostlin vůči stresu jsou studovány v detailu, relativně málo je známo jak stress ovlivňuje rostlinný chromatin a epigenom. Toto téma se nicméně začíná dostávat do pořadí zájmu a to jak u modelových druhů, tak i zemědělsky významných plodin (Gutzat and Mittelsten Scheid, 2012; **Pecinka and Mittelsten Scheid, 2012 - v této přehledné publikaci jsme shrnuli pohled na transgenerační epigenetické jevy a specifikovali pravidla pro jejich kritickou analýzu**; Bäurle, 2016; **Pecinka et al., 2020 - v této přehledné publikaci jsme shrnuli roli epigenomu ve vývoji a stresových odpovědích rostlin**).

### 4.1 Vliv stresu na strukturu a funkci heterochromatinu rostlin

Toto téma je v současnosti předmětem intenzivního studia. Nejlépe jsou pak prostudovány vlivy teplotního a světelného stresu. Změny teploty mají výrazný dopad na rostlinný chromatin. Nízké teploty vedou především ke kompakci, zatímco vysoké způsobují spíše rozvolnění. Dlouhodobé vystavení semenáčků huseníčku rolního vysoké teplotě (37°C po dobu 24 až 30 h) způsobilo dekonduzaci heterochromatinových chromocenter v jádrech diferencovaných listových pletiv (**Pecinka et al., 2010 - v této práci jsme provedli detailní analýzu vlivu teplotního stresu na schopnost huseníčku kontrolovat transkripční represi transpozonů a heterochromatických chromocenter**). Tato dekonduzace byla stabilní a k obnovení původního stavu nedošlo ani po návratu do nestresových podmínek. Další neočekávaný fenotyp byla absence dekonduzace chromocenter v jádrech vrcholového apikálního meristému (**Pecinka et al., 2010**). To může souviset s faktem, že chromatinové proteiny jsou obecně více exprimovány v apikálních meristémeh, což je pravděpodobně spojeno s vyšším stupněm organizace a stabilitou chromatinu v meristematičkých buňkách (Yadav et al., 2009; **Baubec et al., 2014 - v této studii jsme poukázali na funkci RdDM jako opravného mechanismu transkripční represe transpozonů a na zvýšnou expresi chromatinových genů v meristematičkých pletivech**). Na úrovni nukleosomů může vysoká teplota způsobit změny

v lokalizaci nebo četnosti, ale v současnosti není známo, zda je tento proces řízen enzymaticky nebo jen nižší vazebnou silou mezi histony a DNA v podmínkách vyšší teploty. Změny v chromatinové struktuře indukované vysokou teplotou mají vliv také na transkripci genů, nicméně toto pravidlo není univerzální (Kumar and Wigge, 2010; **Pecinka et al., 2010 - v rámci této publikace jsme dále ukázali, že zatímco u některých genů je transkripční aktivace doprovázena snížením nukleosomálního signálu, tak u jiných tomu tak není**). Zajímavým příkladem pozitivní regulace genové exprese pomocí nukleosomů je gen *HEAT SHOCK PROTEIN (HSP70)* u huseníčku rolního (Kumar and Wigge, 2010). Nukleosom pokrývající počátek transkripce *HSP70* obsahuje variantu H2A.Z a tak tlumí jeho transkripci. Zvyšování teploty pak koreluje se snižujícím se množstvím H2A.Z a rostoucím množstvím transkriptu. Z tohoto důvodu pojmenovali autoři teplotně senzitivní regulaci genové exprese u *HSP70* jako „rostlinný termostat“.

#### **4.2 Může stres způsobit aktivaci a množení rostlinných transpozonů?**

Přestože jsou transpozony reprimovány několika paralelními epigenetickými drahami, tak existují příklady recentních transpozicičních událostí (Hu et al., 2011; Seymour et al., 2014; Willing et al., 2015). To naznačuje, že transpozony mohou alespoň občas uniknout epigenetické kontrole a množit se v hostitelském genomu. Námi objevený rozsah změn v organizaci heterochromatinu během teplotního stresu (**Pecinka et al., 2010 - v rámci této práce jsme ukázali dekonduzaci několika heterochromatických chromocenter vlivem teplotního stresu**) vedl k otázce, zda má tato změna vliv na efektivitu represe heterochromatinu. Myšlenka možného oslabení represivních vlastností repetitivní DNA během stresu je založena na pozorováních u několika druhů rostlin jako jsou např. hledík větší (*Antirrhinum majus*) nebo pomerančovník (*Citrus × sinensis*) (Hashida et al., 2015; Butelli et al., 2012). Gen *NIVEA*, který je u hledíku zodpovědný za barvu okvěti, obsahuje v promotorové oblasti retrotranspozon *Tam3*, který reguluje jeho expresi v závislosti na teplotě prostředí. Podobná situace pak panuje u tzv. „krvavých pomerančů“, tj. odrůd pomerančovníků, jejichž dužina se barví červeně. Aby však došlo k červenému zbarvení dužiny, je nutné vystavit plody chladové periodě, během které dojde ke snížení represe specifického transpozonu v *cis*-regulatoční oblasti genu *RUBY*, který se aktivuje a způsobí akumulaci červeného pigmentu. U huseníčku byl testován vliv řady stresových faktorů na možnou aktivaci epigeneticky transkripčně vypnutého repetitivně organizovaného lokusu známého jako L5 nebo také TsGUS (Morel et al., 2000; Elmayan et al., 2005). V tomto případě však chlad, UV záření, osmotický stres, oxidativní stress ani indukce DNA zlomů bleomycinem nevedly k významnější aktivaci (A. Pečinka a O. Mittelsten Scheid,



nepublikovaná data). Jako nejúčinnější typ stresu, který vedl k poměrně silné aktivaci TsGUS lokusu se ukázal teplotní stres (24 až 30 h při 37°C) (Pecinka et al., 2010; Tittel-Elmer et al., 2010). TsGUS je uměle vloženou sekvencí, která nemusí dostatečně reprezentovat jiné repetitivní sekvence huseníčku, proto byla provedena celogenomová transkripční analýza za účelem zjistit zda teplotní stres aktivuje také endogenní repetitivní sekvence. Analýza pomocí expresních mikročipů odhalila, že asi 1% transpozonů huseníčku rolního vykazuje teplotně indukovanou transkripci. Podobná frekvence pak byla zjištěna také u příbuzného druhu *Arabidopsis lyrata* (Pietzenuk et al., 2016 - v rámci této práce jsme analyzovali spektrum teplotně aktivovaných transpozonů u huseníčku písečného), jehož genom obsahuje třikrát více repetit (Hu et al., 2011; Rawat et al., 2015 - zde jsme provedli de novo anotaci genů a transpozonů v rámci genomu huseníčku písečného). To naznačuje, že teplotní stres nezpůsobuje kompletní ztrátu epigenetické kontroly heterochromatinu, nicméně část transpozonů je teplotním stresem skutečně transkripčně aktivována. Většinu teplotně responsivních repetit tvořily LTR retrotranspozony a především rodina *COPIA78* (Pecinka et al., 2010; Tittel-Elmer et al., 2010; Pietzenuk et al., 2016). Tuto rodinu tvoří v referenčním genotypu *A. thaliana* Columbia celkem osm kopií, které jsou více než 1000-násobně transkripčně aktivovány teplotním stresem (Pecinka et al., 2010; Tittel-Elmer et al., 2010). *COPIA78* transkript byl detekovatelný dokonce ještě týden po skončení stresu, kdy byly ostatní teplotně indukované transpozony opět umlčeny. Na základě těchto vlastností byly *COPIA78* elementy pojmenovány jako *ONSEN*, což znamená japonsky „horké prameny“ (Ito et al., 2011). Je zajímavé, že ztráta funkce udržovacích a *de novo* DNA metylačních drah nevedla k aktivaci transkripce z *ONSEN* elementů. Nicméně vystavení těchto mutantů teplotnímu stresu mělo aditivní efekt, který se projevoval více než 10000-násobnou aktivací. To naznačuje, že *ONSEN* elementy jsou řízeny či kontrolovány nejenom epigeneticky, ale i některou z teplotně responsivních regulačních drah. Toto zvláštní pozorování se následně podařilo vysvětlit zjištěním, že *LTR* úseky *ONSEN* elementů obsahují teplotně responsivní elementy (heat-responsive elements - HREs), na které se váže HEAT SHOCK FACTOR A 2 (HSFA2) (Cavrak et al., 2014). Funkční HRE se skládají ze shluku alespoň tří nGAAn sekvenčních motivů, které slouží jako vazebné místo nejméně tří molekul HSFA2. HSFA2 trimer pak tvoří komplex aktivního transkripčního faktoru. Výkon teplotně responsivního promotoru je určován jak počtem, tak i vzdáleností jednotlivých nGAAn motivů (Sakurai and Enoki, 2010):

- 4P HRE – obsahuje čtyři velmi blízko a pravidelně (2-4 bp) rozmístěné HRE motivy a podle navržených modelů může vázat až šest HSFA2 molekul. Promotory nesoucí 4P HRE vykazují nejvyšší stupeň aktivace po teplotním stresu.
- 3P HRE – obsahuje tři blízce a pravidelně rozmístěné motivy, váže tři HSFA2 molekuly.

- Gap HRE – obsahuje tři motivy, z nichž jeden je vzdálen až 7 bp od ostatních.
- Step HRE – obsahuje tři motivy, které jsou od sebe 7 bp a jsou jejich rozmístění je nepravidelné. Promotory obsahující tento typ motivu jsou nejslabší.

*ONSEN* retrotranspozony obsahují čtyři blízko a pravidelně rozmístěné nGAAn motivy (nGAAnnTTCnnnnGAAnnTTCn), což odpovídá 4P typu HRE. Přítomnost této klasické teplotně regulační sekvence je nejpravděpodobnějším důvodem, proč není *ONSEN/COPIA78* aktivován na pozadí epigenetických mutantů ve standardních, ale pouze v teplotně stresových podmínkách (Pecinka et al., 2010; Ito et al., 2011). Poněkud překvapivé bylo, že ani masivní navýšení transkriptu a dokonce přítomnost *ONSEN* cDNA nebyla dostatečná pro úspěšnou transpozici *ONSEN* elementů jak u standardních rostlin, tak u většiny RdDM mutantů (Ito et al., 2011). Jedinou výjimku tvořily rostliny mutované v genu *NUCLEAR RNA POLYMERASE D 1 (NRPDI)*, který kóduje největší podjednotku DNA dependentní RNA polymerázy IV (PolIV), která zahajuje proces RdDM. Bez funkční PolIV nejsou *ONSEN* transkripty pravděpodobně rozeznávány jako transpozonové a nejsou tak zpracovány dalšími enzymy RdDM dráhy. Analýza potomstva *nrdp1* rostlin ukázala, že k integraci nových kopií dochází v apikálním meristému před diferenciací v samičí a samčí pohlavní orgány.

Absence nových kopií *ONSENu* v potomstvu teplotně stresovaných standardních rostlin vede k otázce, zda je zjištěná aktivace relevantní v přirozených podmínkách, a zda skutečně může vést k vyššímu počtu kopií daného transpozonu. Toto nelze v současnosti jednoznačně posoudit, protože provedené experimenty mají určitá omezení. Prvním je nízký počet (desítky) laboratorně testovaných rostlin, který nemohl podchytit méně častou (v řádu jednotek procent a nižší) frekvenci transpozice, která však může být potenciálně významná v podmínkách přirozené populace huseníčku čítající obrovské množství rostlin. Dále je pravděpodobné, že i v divoké populaci dochází vzácně k mutacím vedoucím ke ztrátě funkce některého z klíčových transkripčně represivních genů jako je *DDMI* or *NRPDI*. Přestože mutanti těchto genů nebudou v přírodních podmínkách dlouhodobě životaschopní, jejich příležitostný vznik (a pravděpodobně i relativně rychlý zánik) však může být u samosprašného druhu dostatečný pro namnožení transpozonů. Ty pak mohou občasným křížením mateřské rostliny s okolními rostlinami pronikat dále do populace. Za třetí, dlouhodobý teplotní stres aplikovaný v laboratoři neodpovídá přirozeným podmínkám, nicméně v přírodě lze očekávat kombinace teplotního stresu s dalšími faktory jako je sucho, zvýšené množství UV-B záření apod. Kombinace těchto faktorů na epigenetickou kontrolu transpozonů není známa, ale může mít pro rostlinu potenciálně oslabující efekt. Za čtvrté, srovnáním *LTR* úseků *ONSEN* elementů různých zástupců čeledi brukvovitých bylo zjištěno, že popsáný typ 4P HRE je starý nejméně 10 milionů let a vyskytuje se nejen u eurasijských, ale i severoamerických a australských zástupců čeledi

(Pietzenuk et al., 2016). To naznačuje, že přítomnost HRE může být pro *ONSEN* elementy evolučně výhodná. Na druhou stranu, existují také výjimky, kdy u severoamerického druhu *Boechera stricta* došlo ke ztrátě funkčního 4P teplotně responzivního elementu a žádné *ONSEN/COPIA78* elementy nebyly zjištěny u eurasijského rodu *Capsella* (kokoška).

Naše recentní studie ukázala, že aktivace transpozonů teplotním stresem je poměrně častá mezi rodinami *COPIA* elementů. Kromě *COPIA78* (*ONSEN*) také u *COPIA37*, *TEMPERATURE RESPONSIVE TRANSPOSON* (*TERESTRA*) a *ROMANIAT5*. Fylogenetické analýzy dokazují, že tento znak vznikl opakovaně (Pietzenuk et al., 2016). Dále existují data naznačující, že podobný typ adaptace existuje i vůči jiným typům stresu. U vojtěšky seté (*Medicago sativa*) byl nalezen *MEDICAGO COLD-INDUCIBLE REPETITIVE ELEMENT* (*MCIRE*), jehož *LTR* obsahují chladově responzivní element (Ivashuta et al., 2002). Tento element má konzervovanou sekvenci CCGAC typickou pro C-repeat (CRT)/dehydratačně responzivní elementy (DRE), které jsou rozeznávány chladově specifickými transkripčními faktory (Nakashima et al., 2009). To naznačuje, že uchování stresově specifických *cis*-regulačních elementů může být poměrně častou strategií, kterou uplatňují transpozony k přežití v rámci hostitelského genomu. Přítomnost stresově responzivních transpozonů by navíc mohla být evolučně výhodná také pro hostitelský genom. Při relativně nízké frekvenci transpozice (neohrožující stabilitu a funkce genomu) mohou stresově responzivní transpozony „rozsévat“ své kopie, a s nimi i *cis*-regulační sekvence, které se mohou za určitých podmínek podílet na regulaci genů.

Zjištění, že některé transpozony využívají kanonické transkripční drahy zodpovědné za reakce vůči stresu vede k provokativní otázce. Podařilo se transpozonům připojit také na regulační dráhy řídící vývoj rostlin? Napojení na vrcholové meristemy a reprodukční orgány by umožnilo množení přímo v pletivech vedoucích ke tvorbě příští generace bez nutnosti stresu. Tato hypotéza se zdá být podpořena nejméně dvěma pozorováními. Zaprvé, v *ddm1* mutantním pozadí je přibližně 1000 transpozonů transkripčně aktivováno bez indukovaného stresu (Zemach et al., 2013). Jejich aktivace tedy není vázána na stresové transkripční faktory (Miura et al., 2001; Mirouze et al., 2009; Tsukahara et al., 2009). Zadruhé, analýza vazebných míst květního transkripčního faktoru *SEPALLATA3* pomocí metody ChIP-seq odhalila, že se kromě standardních genů váže také na řadu transpozonů obsahující jeho typické vazebné motivy (Muiño et al., 2011). Tato pozorování by v konečném důsledku mohla znamenat, že transpozony vážící stresově specifické transkripční faktory využívají méně efektivní strategii než ty parazitující na vývojových drahách.

Lze tedy úspěch transpozonových rodin aktivovaných stresem měřit počtem jejich kopií? Na tuto otázku není snadné zodpovědět, z důvodu několika obtížně měřitelných faktorů

jako např. dynamika eliminace transpozonů. V situaci, kdy bude úroveň transpozice i eliminace poměrně nízká, může transpozonová rodina vykazovat poměrně stabilní počet kopií. Naopak, pokud bude docházet k rychlé amplifikaci, ale ještě rychlejší eliminaci, se bude počet kopií snižovat. Zde může posloužit jako vodítko podobnost LTR sekvencí na obou koncích LTR retrotranspozonů, protože tyto sekvence jsou ve chvíli inserce identické a časem nezávisle akumulují mutace. Všechny dosud známé teplotně responzivní transpozonové rodiny mají poměrně malý počet kopií (<100 kompletních kopií/genom) a na základě jejich LTR sekvencí se jeví jako evolučně mladé (>90% identita) (Cavrak et al., 2014; Pietzenuk et al., 2016). To naznačuje, že teplotně responzivní rodiny transpozonů mají relativně rychlou obměnu kopií v genomu.

V souhrnu, recentní výzkum odpovědí transpozonů na stres poskytl řadu nových poznatků o vztazích mezi těmito genomickými parazity a jejich hostitelskými genomy. Velkým překvapením bylo, jak je tato mapa vztahů barvitá a plastická. Současně v této oblasti zůstává řada neznámých, které jsou předmětem aktivního výzkumu.

## 5. JAKÁ JE BUDOUCNOST STUDIA CHROMATINU ROSTLIN?

Závěrem své práce si dovolím nastínit možné směry výzkumu rostlinného (hetero)chromatinu a regulace genové exprese. V současnosti, 93 let po publikaci objevu euchromatinu a heterochromatinu německým biologem Emilem Heitzem (Heitz, 1928), známe základní biochemickou povahu chromatinu, poměrně velké množství proteinů chromatinu a také řadu drah, které jsou zodpovědné za instalaci či odstraňování určitých post translačních modifikací. Zvláště během posledních dvaceti let došlo k úžasnému pokroku. To bylo umožněno kombinací řady příznivých faktorů včetně vytvoření referenčních sekvencí genomů hlavních modelových rostlin, veřejných sbírek mutantů a mnoha různých technik analýzy genové exprese a detekce chromatinových modifikací. Lze říci, že se momentálně nacházíme ve zlaté éře studia chromatinu, kdy jsme pochopili základní principy řady epigenetických drah, nicméně detailní poznání a následně aplikace výsledků do biotechnologické či zemědělské praxe je stále před námi.

Mezi stálíce epigenetického výzkumu patří identifikace nových chromatinových značek a následně jejich funkční analýza. I v současnosti se počet známých modifikací stále rozšiřuje a lze předpokládat, že toto zůstane jedním z pilířů tohoto oboru. Mezi nové kandidáty patří např. metylace N6-adeninu, specifické histonové varianty z okruhu histonu H2A nebo H1. Dosud málo prozkoumány jsou konformační modifikace DNA - A-, B- a Z-varianty, G-kvadruplex nebo i-motivy. Další téměř nedotčenou skupinou jsou modifikace RNA, které budou hrát velmi důležitou roli v řadě epigenetických procesů. Detailní studium těchto modifikací bude vyžadovat kombinaci existujících přístupů (genetické skríny, proteomické a biochemické analýzy, vývoj protilátek, celogenomové analýzy apod.), jakož i vývoj nových metod.

O stupeň výše bude nutné propojovat znalosti o rozmístění, dynamice a funkcích jednotlivých značek do charakteristických chromatinových stavů. Na základě existujících studií lze předpokládat, že tato část výzkumu bude poměrně složitá. Rozsáhlé studie často kombinují materiály a chromatinové profily generované v různých experimentálních podmínkách (včetně kontrolních), na různých pletivech a někdy i genotypch. To vede nutně k větší heterogenitě mezi vzorky a může se projevit na nižší citlivosti experimentů. U rostlin se k tomuto tradičně přidává heterogeneita pletiv, takže výsledný signál je pak jakýmsi průměrem daného vzorku.

Používání mixu buněk z různých pletiv je dáno strukturou rostlinných orgánů, nemožností kultivace jednotlivých buněčných typů jako u živočichů a také množstvím materiálu nutného pro řadu epigenetických experimentů (obvykle stovky miligramů až gramy). Tento problém je nyní alespoň částečně eliminován novými protokoly pro analýzu jednotlivých buněk (single cell). Příklady jsou studie komplexních pletiv jako je kořen či endosperm, kde

analýza založená na sekvenování molekul z jednotlivých buněk či jader odhalila nové expresní programy či skupiny buněk s dosud neznámými funkcemi (Dorrity et al., 2021; Picard et al., 2021).

Co bylo dříve, slepice nebo vejce? Varianty této otázky si klade řada epigenetiků a určení posloupnosti dějů zůstává jedním z klasických problémů epigenetických studií. Přítomnost řady chromatinových modifikací je silně korelována, což znesnadňuje identifikaci těch, které tvoří základ určitých chromatinových stavů. Indukuje navázání transkripčního faktoru změnu z heterochromatinu na euchromatin nebo musí nejdříve dojít ke změně a teprve poté může dojít k navázání transkripčního faktoru? Postupným detailním studiem jednotlivých drah se však daří osvětlovat i tyto problémy. Fascinujícím příkladem zůstává dosud probíhající diskuse zda je transkripční vypínání genů indukováno dříve DNA nebo histony, resp. jejich modifikacemi (Osakabe et al., 2021).

Většina našich znalostí týkajících se organizace, povahy a funkce rostlinného chromatinu je založena na studiích provedených u huseníčku rolního. Huseníček je výborný modelový systém, který má rozsáhlé genetické, molekulární a genomické zdroje velmi vysoké kvality. Na druhou stranu je genom huseníčku rolního do jisté míry atypický svou malou velikostí (okolo 150 Mbp; referenční sekvence má 119 Mbp, ale neobsahuje některé tandemově repetitivních oblastí, především centromery a ribozomální DNA), nízkým obsahem repetitivních sekvencí a malým množstvím heterochromatinu nahlučeným do pericentromerických oblastí. Jedním z perspektivních směrů rostlinné epigenetiky je jistě analýza chromatinu u jiných druhů. Dlouhodobě jsou známy rozdíly v globální organizaci buněčného jádra. Zde jsou protipólem huseníčku druhy s tzv. Rabl organizací. Molekulární metody však začínají odhalovat zcela novou vrstvu variability. Příkladem může být analýza genové metylace u různých druhů čeledi brukvovitých (Bewick and Schmitz, 2017). Zatímco u huseníčku rolního nese CG DNA metylaci přibližně 20% genů, tak tato metylace zcela chybí u některých jiných druhů a zdá se, že koreluje s absencí funkční CMT3. To je velmi zvláštní pozorování, protože CMT3 zajišťuje u huseníčku rolního CHG metylaci a nikoliv CG metylaci. Lze předpokládat, že takovýchto rozdílů existuje celá řada, ale dosud nejsou známy. Dále víme poměrně málo, kdy se epigenetické mechanismy podílí na regulaci hospodářsky významných znaků. Mezi dosud známé příklady patří epigenetická kontrola pohlaví melounů, vývoje plodu palmy olejnaté, pigmentace dužiny „krvavých pomerančů“ nebo kontrola vernalizace u obilovin (Martin et al., 2009; Oliver et al., 2009; Butelli et al., 2012; Ong-abdullah et al., 2015). Tyto znaky jistě představují pouhou špičku ledovce epigenetické variability a regulace přítomné v plodinách a do budoucna by je bylo možné použít pro potřeby šlechtění.

Trvalou výzvou zůstává analýza chromatinu u druhů s velkým genomem jako je kukuřice (2.5 Gb) nebo ječmen (5.1 Gb) a ještě o řád obtížnější je pak u polyploidů jako je pšenice setá (17 Gb). I zde však dochází k vývoji dostupných zdrojů (Concia et al., 2020), což je umožněno především vyšší účinností sekvenovacích technik nové generace a stále se zlepšujícími programy pro zpracování dat. Nicméně celogenomová analýza rozmístění určitých chromatinových modifikací u druhů s velkým genomem je stále velmi drahou záležitostí. Pro srovnání, 40-ti násobné sekvenování metylomu huseníčku lze pořídit za cenu okolo 5000 Kč. V případě ječmene se jedná již o přibližně 200 000 Kč a u pšenice o 650 000 Kč. To značí, že řadu experimentů je nutno zacílit na určitou část genomu a nadále vyvíjet nové levnější metody sekvenování DNA.

Jeden z přehlížených aspektů rostlinné chromatinové biologie je, jak chromatin přispívá se stabilitě genomu. Stále větší množství studií naznačuje, že určité typy chromatinu mohou být více či méně náchylné k akumulaci poškození DNA a mutací. Heterochromatin obecně vykazuje nižší míru oprav DNA a ztráta některých faktorů upravujících strukturu a funkci heterochromatinu vede ke zvýšené citlivosti k DNA poškozujícím látkám (Shaked et al., 2006; Jacob et al., 2009; Rosa and Shaw, 2013; Donà and Scheid, 2015; **Liu et al., 2015 - v této práci jsme ukázali, že cytidinový analog zebularin indukuje nejen DNA demetylaci, ale také dosud neznámé poškození DNA; Willing et al., 2016 - zde jsme sekvenovali genomy několika genotypů huseníčku vystavených dlouhodobému působení simulovaného slunečního záření a tím jsme odhalili predominantní typy mutací vznikající v podmínkách standardních a fotoreparačně defektních rostlin**). Lokalizace DNA zlomů pro homologní rekombinaci se zdá být také určena epigeneticky (Choi et al., 2013). Interakce chromatinových a DNA reparačních superdrah je proto jedním z budoucích velmi zajímavých témat kterými se bude výzkum buněčného jádra také ubírat a této oblasti se aktivně věnuje také moje výzkumná skupina. Především s ohledem na roli Strukturálního komplexu údržby chromosomů 5/6 (Structural maintenance of chromosomes 5/6; SMC5/6) v opravách určitých poškození DNA a transgenerační stabilitě genomu rostlin (**Liu et al., 2015; Diaz et al., 2019 - v této práci jsme funkčně charakterizovali NSE4 jako podjednotku SMC5/6 komplexu u huseníčku rolního; Yang et al., 2021**).

Kritická analýza a interpretace výsledků je zásadní v jakémkoliv vědním oboru a epigenetický výzkum není výjimkou. Někteří výzkumníci mají tendence vnímat chromatin jako téměř magickou substanci, která má (v nadsázce) schopnost pamatovat si minulost a vidět do budoucnosti (**Pecinka and Mittelsten Scheid, 2012 - v tomto přehledném článku jsme kriticky posuzovali možnosti epigenetické mezigenerační paměti**). Přestože některé epigenetické procesy vykazují určitou stochasticitu, obecně se jedná o přesně regulované

biochemické reakce, které probíhají s vysokou předvídatelností. Míra toho co se v určité chvíli jeví náhodným pak dále klesá s postupným odkrýváním molekulárních mechanismů epigenetických procesů.

Na základě tohoto výčtu jsem přesvědčen, že studium buněčného jádra, heterochromatinu a regulace genové exprese má vysoký potenciál generovat nové zásadní poznatky u modelových i hospodářsky významných druhů rostlin. Postupem času lze také očekávat čím dále větší aplikaci výsledků studia chromatinu pro rostlinné biotechnologie a šlechtění rostlin.



## 6. LITERATURA

- Abdelsamad, A. and Pecinka, A.** (2014). Pollen-specific activation of Arabidopsis retrogenes is associated with global transcriptional reprogramming. *Plant Cell* **26**: 3299–3313.
- Alabert, C. and Groth, A.** (2012). Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**: 153–167.
- Alberts, B.** (2002). Chromosomal DNA and its packaging in the chromatin fiber. In *Molecular Biology of the Cell*, B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, eds (Garland science: New York).
- Ambrožová, K., Mandáková, T., Bureš, P., Neumann, P., Leitch, I.J., Koblížková, A., Macas, J., and Lysak, M.A.** (2011). Diverse retrotransposon families and an AT-rich satellite DNA revealed in giant genomes of Fritillaria lilies. *Ann. Bot.* **107**: 255–268.
- Amiard, S., Charbonnel, C., Allain, E., Depeiges, A., White, C.I., and Gallego, M.E.** (2010). Distinct roles of the ATR kinase and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex in the maintenance of chromosomal stability in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 3020–3033.
- Appels, R. et al.** (2018). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* (80-. ). **361**: eaar7191.
- Arabidopsis Genome Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* **408**: 796–815.
- Arkhipova, I.R.** (2006). Distribution and phylogeny of Penelope-like elements in eukaryotes. *Syst. Biol* **55**: 875–885.
- Arteaga-Vazquez, M.A. and Chandler, V.L.** (2010). Paramutation in maize: RNA mediated trans-generational gene silencing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**: 156–163.
- Bartee, L., Malagnac, F., Bender, J., Bartee, L., Malagnac, F., and Bender, J.** (2001). Arabidopsis cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes Dev.* **15**: 1753–1758.
- Bártová, E., Krej, J., Harni, A., Galiová, G., and Kozubek, S.** (2008). Histone Modifications and Nuclear Architecture : A Review. **56**: 711–721.
- Batista, R.A. and Köhler, C.** (2020). Genomic imprinting in plants—revisiting existing models. *Genes Dev.* **34**: 24–36.
- Baubec, T., Dinh, H.Q., Pecinka, A., Rakic, B., Rozhon, W., Wohlrab, B., von Haeseler, A., and Mittelsten Scheid, O.** (2010). Cooperation of multiple chromatin modifications can generate unanticipated stability of epigenetic states in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 34–47.
- Baubec, T., Finke, A., Mittelsten Scheid, O., and Pecinka, A.** (2014). Meristem-specific expression of epigenetic regulators safeguards transposon silencing in Arabidopsis. *EMBO Rep.* **15**: 446–452.
- Bäurle, I.** (2016). Plant Heat Adaptation: Priming in response to heat stress. *F1000Research* **5**: 1–5.
- Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhatar, R., and Shilatifard, A.** (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* **23**: 781–783.
- Bernatavichute, Y. V., Zhang, X., Cokus, S., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E.** (2008). Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* **3**.
- Berr, A., Pecinka, A., Meister, A., Kreth, G., Fuchs, J., Blattner, F.R., Lysak, M.A., and**

- Schubert, I.** (2006). Chromosome arrangement and nuclear architecture but not centromeric sequences are conserved between *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis lyrata*. *Plant J.* **48**: 771–783.
- Bewick, A.J., Niederhuth, C.E., Ji, L., Rohr, N.A., Griffin, P.T., Leebens-Mack, J., and Schmitz, R.J.** (2017). The evolution of CHROMOMETHYLASES and gene body DNA methylation in plants. *Genome Biol.* **18**: 65.
- Bewick, A.J. and Schmitz, R.J.** (2017). Gene body DNA methylation in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **36**: 103–110.
- Van Blokland, R., Van der Geest, N., Mol, J.N.M., and Kooter, J.M.** (1994). Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J.* **6**: 861–877.
- Butelli, E., Licciardello, C., Zhang, Y., Liu, J., Mackay, S., Bailey, P., Reforgiato-recupero, G., and Martin, C.** (2012). Retrotransposons Control Fruit-Specific , Cold-Dependent Accumulation of Anthocyanins in Blood Oranges.
- Casacuberta, J.M. and Santiago, N.** (2003). Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes. *Gene* **311**: 1–11.
- Cavrak, V. V, Lettner, N., Jamge, S., Kosarewicz, A., Bayer, L.M., and Mittelsten Scheid, O.** (2014). How a Retrotransposon Exploits the Plant’s Heat Stress Response for Its Activation. *PLOS Genet.* **10**: e1004115.
- Chan, S.W.L., Henderson, I.R., and Jacobsen, S.E.** (2005). Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Rev. Genet.* **6**: 351–360.
- Chandler, V. and Alleman, M.** (2008). Anecdotal , Historical and Critical Commentaries on Genetics. **1844**: 1839–1844.
- Chandler, V.L. and Stam, M.** (2004). Chromatin conversations: Mechanisms and implications of paramutation. *Nat. Rev. Genet.* **5**: 532–544.
- Chanou, A. and Hamperl, S.** (2021). Single-Molecule Techniques to Study Chromatin. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**: 1596.
- Chen, H., He, C., Wang, C., Wang, X., Ruan, F., Yan, J., Yin, P., Wang, Y., and Yan, S.** (2021). RAD51 supports DMC1 by inhibiting the SMC5/6 complex during meiosis. *Plant Cell*.
- Chiolo, I., Minoda, A., Colmenares, S.U., Polyzos, A., Costes, S. V, and Karpen, G.H.** (2011). Double-Strand Breaks in Heterochromatin Move Outside of a Dynamic HP1a Domain to Complete Recombinational Repair. *Cell* **144**: 732–744.
- Chodavarapu, R.K. et al.** (2010). Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature* **466**: 388–392.
- Choi, K., Zhao, X., Kelly, K.A., Venn, O., Higgins, J.D., Yelina, N.E., Hardcastle, T.J., Ziolkowski, P.A., Copenhaver, G.P., Franklin, F.C.H., Mcvean, G., and Henderson, I.R.** (2013). *Arabidopsis* meiotic crossover hot spots overlap with H2A.Z nucleosomes at gene promoters. *Nat. Genet.* **45**: 1327–1338.
- Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Jacobsen, S.E., and Fischer, R.L.** (2002). DEMETER , a DNA Glycosylase Domain Protein , Is Required for Endosperm Gene Imprinting and Seed Viability in *Arabidopsis*. **110**: 33–42.
- Coleman-Derr, D. and Zilberman, D.** (2012a). Deposition of histone variant H2A.Z within gene bodies regulates responsive genes. *PLoS Genet* **8**: e1002988.
- Coleman-Derr, D. and Zilberman, D.** (2012b). Deposition of Histone Variant H2A.Z within Gene Bodies Regulates Responsive Genes. *PLoS Genet.* **8**.

- Comai, L.** (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* **6**: 836–846.
- Concia, L. et al.** (2020). Wheat chromatin architecture is organized in genome territories and transcription factories. *Genome Biol.* **21**: 104.
- Copenhaver, G.P. and Pikaard, C.S.** (1996). RFLP and physical mapping with an rDNA-specific endonuclease reveals that nucleolus organizer regions of *Arabidopsis thaliana* adjoin the telomeres on chromosomes 2 and 4. *Plant J* **9**: 259–272.
- Craig, N.L., Green, R., Greider, C., Storz, G., Wolberger, C., and Orna, C.-F.** (2014). *Molecular biology: Principles of genome function 2nd ed.* (Glasgow).
- Daxinger, L., Hunter, B., Sheikh, M., Jauvion, V., Gascioli, V., Vaucheret, H., Matzke, M., and Furner, I.** (2008). Unexpected silencing effects from T-DNA tags in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **13**: 4–6.
- Diaz, M., Pecinkova, P., Nowicka, A., Baroux, C., Sakamoto, T., Yuliani Gandha, P., Jeřábková, H., Matsunaga, S., Grossniklaus, U., and Pecinka, A.** (2019). SMC5/6 complex subunit NSE4A is involved in DNA damage repair and seed development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **31**: 1579–1597.
- Doğan, E.S. and Liu, C.** (2018). Three-dimensional chromatin packing and positioning of plant genomes. *Nat. Plants* **4**: 521–529.
- Donà, M. and Scheid, O.M.** (2015). Update on DNA Damage Repair DNA Damage Repair in the Context of Plant Chromatin 1. **168**: 1206–1218.
- Dorrity, M.W., Alexandre, C.M., Hamm, M.O., Vigil, A.-L., Fields, S., Queitsch, C., and Cuperus, J.T.** (2021). The regulatory landscape of *Arabidopsis thaliana* roots at single-cell resolution. *Nat. Commun.* **12**: 3334.
- van Driel, R., Fransz, P.F., and Verschure, P.J.** (2003). The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J Cell Sci* **116**: 4067–4075.
- Du, J. et al.** (2012). Dual binding of chromomethylase domains to H3K9me2-containing nucleosomes directs DNA methylation in plants. *Cell* **151**: 167–180.
- Elmayan, T., Proux, F., and Vaucheret, H.** (2005). *Arabidopsis* RPA2: A genetic link among transcriptional gene silencing, DNA repair, and DNA replication. *Curr. Biol.* **15**: 1919–1925.
- Endo, M., Ishikawa, Y., Osakabe, K., Nakayama, S., Kaya, H., Araki, T., Shibahara, K.I., Abe, K., Ichikawa, H., Valentine, L., Hohn, B., and Toki, S.** (2006). Increased frequency of homologous recombination and T-DNA integration in *Arabidopsis* CAF-1 mutants. *EMBO J.* **25**: 5579–5590.
- Ernst, J. et al.** (2011). Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* **473**: 43–49.
- Fajkus, P. et al.** (2019). Telomerase RNAs in land plants. *Nucleic Acids Res.* **47**: 9842–9856.
- Fajkus, P., Peška, V., Sitová, Z., Fulnečková, J., Dvořáčková, M., Gogela, R., Sýkorová, E., Hapala, J., and Fajkus, J.** (2016). *Allium* telomeres unmasked: the unusual telomeric sequence (CTCGGTTATGGG)<sub>n</sub> is synthesized by telomerase. *Plant J* **85**: 337–347.
- Fawcett, J.A., Maere, S., and Van De Peer, Y.** (2009). Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 5737–5742.
- Feng, S., Jacobsen, S.E., and Reik, W.** (2010). Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* **330**: 622–627.

- Feschotte, C., Jiang, N., and Wessler, S.R.** (2002). Plant transposable elements: Where genetics meets genomics. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 329–341.
- Finke, A., Mandáková, T., Nawaz, K., Vu, G.T.H., Novák, P., Macas, J., Lysak, M.A., and Pecinka, A.** (2019). Genome invasion by a hypomethylated satellite repeat in Australian crucifer *Ballantinia antipoda*. *Plant J.* **99**: 1066–1079.
- Finnegan, E.J., Peacock, W.J., and Dennis, E.S.** (1996). Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 8449–8454.
- Fu, Y. et al.** (2015). N6-methyldeoxyadenosine marks active transcription start sites in *Chlamydomonas*. *Cell* **161**: 879–892.
- Fuchs, J., Demidov, D., Houben, A., and Schubert, I.** (2006). Chromosomal histone modification patterns - from conservation to diversity. *Trends Plant Sci.* **11**: 199–208.
- Fultz, D., Choudury, S.G., and Slotkin, R.K.** (2015). Silencing of active transposable elements in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **27**: 67–76.
- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldán-Arjona, T., David, L., and Zhu, J.K.** (2002). ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* **111**: 803–814.
- Gregory, T.R.** (2005). The C-value Enigma in Plants and Animals : A Review of Parallels and an Appeal for Partnership.: 133–146.
- Groth, M. et al.** (2016). MTHFD1 controls DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* **7**.
- Gutzat, R. and Mittelsten Scheid, O.** (2012). Epigenetic responses to stress: Triple defense? *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**: 568–573.
- Habermann, F.A., Cremer, M., Walter, J., Kreth, G., von Hase, J., Bauer, K., Wienberg, J., Cremer, C., Cremer, T., and Solovei, I.** (2001). Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells. *Chromosom. Res* **9**: 569–584.
- Hashida, S., Kitamura, K., Mikami, T., and Kishima, Y.** (2015). Temperature Shift Coordinately Changes the Activity and the Methylation State of Transposon Tam3 in *Antirrhinum majus*.: 1207–1216.
- Hashimoto, H., Horton, J.R., Zhang, X., Bostick, M., Jacobsen, S.E., and Cheng, X.** (2008). The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nature* **455**: 826–829.
- Havecker, E.R., Gao, X., and Voytas, D.F.** (2004). The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biol* **5**: 1–6.
- Heitz, E.** (1928). Das Heterochromatin der Moose. *Jahrbücher für wissenschaftliche Bot.* **69**: 762 – 818.
- Hollister, J.D., Smith, L.M., Guo, Y.L., Ott, F., Weigel, D., and Gaut, B.S.** (2011). Transposable elements and small RNAs contribute to gene expression divergence between *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis lyrata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 2322–2327.
- Hsieh, T., Ibarra, C.A., Silva, P., Zemach, A., Eshed-Williams, L., Fischer, R.L., and Zilberman, D.** (2009). Genome-Wide Demethylation of *Arabidopsis* Endosperm. *Science* (80-. ). **324**: 1451–1454.
- Hu, T.T. et al.** (2011). The *Arabidopsis lyrata* genome sequence and the basis of rapid genome size change. *Nat. Genet.* **43**: 476–483.

- Huettel, B., Kanno, T., Daxinger, L., Aufsatz, W., Matzke, A.J.M., and Matzke, M.** (2006). Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in Arabidopsis. *EMBO J.* **25**: 2828–2836.
- Ito, H., Gaubert, H., Bucher, E., Mirouze, M., Vaillant, I., and Paszkowski, J.** (2011). An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature* **472**: 115–120.
- Ivashuta, S., Naumkina, M., Gau, M., Uchiyama, K., Isobe, S., Mizukami, Y., and Shimamoto, Y.** (2002). Genotype-dependent transcriptional activation of novel repetitive elements during cold acclimation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant J. cell Mol. Biol.* **31**: 615–627.
- Jacob, Y., Feng, S., LeBlanc, C.A., Bernatavichute, Y. V., Stroud, H., Cokus, S., Johnson, L.M., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., and Michaels, S.D.** (2009). ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**: 763–768.
- Jasencakova, Z., Meister, A., and Schubert, I.** (2001). Chromatin organization and its relation to replication and histone acetylation during the cell cycle in barley. *Chromosoma* **110**: 83–92.
- Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L., and Richards, E.J.** (1999). Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat. Genet.* **22**: 94–97.
- Jeppsson, K., Kanno, T., Shirahige, K., and Sjögren, C.** (2014). The maintenance of chromosome structure: Positioning and functioning of SMC complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**: 601–614.
- Johnston, J.S., Pepper, A.E., Hall, A.E., Chen, Z.J., Hodnett, G., Drabek, J., Lopez, R., and Price, H.J.** (2005). Evolution of genome size in Brassicaceae. *Ann Bot* **95**: 229–235.
- Kaessmann, H., Vinckenbosch, N., and Long, M.** (2009). RNA-based gene duplication: Mechanistic and evolutionary insights. *Nat. Rev. Genet.* **10**: 19–31.
- Kwakatsu, T. et al.** (2016). Epigenomic Diversity in a Global Collection of Arabidopsis thaliana Accessions. *Cell* **166**: 492–505.
- Kazda, A., Zellinger, B., Rössler, M., Derboven, E., Kusenda, B., and Riha, K.** (2012). Chromosome end protection by blunt-ended telomeres. *Genes Dev* **26**: 1703–1713.
- Kellogg, E.A. and Bennetzen, J.L.** (2004). The evolution of nuclear genome structure in seed plants. *Am J Bot* **91**: 1709–1725.
- Khandelwal, S.** (1990). Chromosome evolution in the genus *Ophioglossum* L. *Bot J Linn Soc* **102**: 205–217.
- Kinoshita, Y., Saze, H., Kinoshita, T., Miura, A., Soppe, W.J.J., Koornneef, M., and Kakutani, T.** (2007). Control of FWA gene silencing in Arabidopsis thaliana by SINE-related direct repeats. *Plant J* **49**: 38–45.
- Kirik, A., Pecinka, A., Wendeler, E., and Reiss, B.** (2006). The chromatin assembly factor subunit FASCIATA1 is involved in homologous recombination in plants. *Plant Cell* **18**: 2431–2442.
- Köhler, C., Wolff, P., and Spillane, C.** (2012). Epigenetic mechanisms underlying genomic imprinting in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **63**: 331–352.
- Kouzarides, T.** (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **128**: 693–705.
- Kumar, S.V. and Wigge, P.A.** (2010). H2A.Z-Containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in Arabidopsis. *Cell* **140**: 136–147.

- Law, J.A. and Jacobsen, S.E.** (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 204–220.
- Leach, C.R., Donald, T.M., Franks, T.K., Spiniello, S.S., Hanrahan, C.F., and Timmis, J.N.** (1995). Organisation and origin of a B chromosome centromeric sequence from *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma* **103**: 708–714.
- Lee, J., Jang, H., Shin, H., Choi, W.L., Mok, Y.G., and Huh, J.H.** (2014). AP endonucleases process 5-methylcytosine excision intermediates during active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* **42**: 11408–11418.
- Lermontova, I., Koroleva, O., Rutten, T., Fuchs, J., Schubert, V., Moraes, I., Koszegi, D., and Schubert, I.** (2011). Knockdown of CENH3 in *Arabidopsis* reduces mitotic divisions and causes sterility by disturbed meiotic chromosome segregation. *Plant J.* **68**: 40–50.
- Lermontova, I., Sandmann, M., and Demidov, D.** (2014). Centromeres and kinetochores of Brassicaceae.: 135–152.
- Li, B., Carey, M., and Workman, J.L.** (2007). The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* **128**: 707–719.
- Li, Y., Duan, C.-G., Zhu, X., Qian, W., and Zhu, J.-K.** (2015a). A DNA ligase required for active DNA demethylation and genomic imprinting in *Arabidopsis*. *Cell Res.* **25**: 757–760.
- Li, Z., Baniaga, A.E., Sessa, E.B., Scascitelli, M., Graham, S.W., Rieseberg, L.H., and Barker, M.S.** (2015b). Early genome duplications in conifers and other seed plants. *Sci. Adv.* **1**: 1–8.
- Lisch, D.** (2013). How important are transposons for plant evolution? *Nat. Rev. Genet.* **14**: 49–61.
- Liu, C., Lu, F., Cui, X., and Cao, X.** (2010). Histone Methylation in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 395–420.
- Liu, C.H., Finke, A., Díaz, M., Rozhon, W., Poppenberger, B., Baubec, T., and Pecinka, A.** (2015). Repair of DNA damage induced by the cytidine analog zebularine requires ATR and ATM in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **27**: 1788–1800.
- Long, Q. et al.** (2013). Massive genomic variation and strong selection in *Arabidopsis thaliana* lines from Sweden. *Nat. Genet.* **45**: 884–890.
- Lorković, Z.J., Park, C., Goiser, M., Jiang, D., Kurzbauer, M.T., Schlögelhofer, P., and Berger, F.** (2017). Compartmentalization of DNA Damage Response between Heterochromatin and Euchromatin Is Mediated by Distinct H2A Histone Variants. *Curr. Biol.* **27**: 1192–1199.
- Luo, G.Z., Blanco, M.A., Greer, E.L., He, C., and Shi, Y.** (2015). DNA N6-methyladenine: A new epigenetic mark in eukaryotes? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**: 705–710.
- Lysak, M.A., Berr, A., Pecinka, A., Schmidt, R., McBreen, K., and Schubert, I.** (2006). Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 5224–5229.
- Mandáková, T., Joly, S., Krzywinski, M., Mummenhoff, K., and Lysaka, M.A.** (2010). Fast diploidization in close mesopolyploid relatives of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**: 2277–2290.
- Marí-ordóñez, A., Marchais, A., Etcheverry, M., Martin, A., Colot, V., and Voinnet, O.** (2013). Reconstructing de novo silencing of an active plant retrotransposon.
- Martin, A., Troadec, C., Boualem, A., Rajab, M., Fernandez, R., Morin, H., Pitrat, M., Dogimont, C., and Bendahmane, A.** (2009). A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature* **461**: 1135–1138.

- Martínez-Macías, M.I., Qian, W., Miki, D., Pontes, O., Liu, Y., Tang, K., Liu, R., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldán-Arjona, T., and Zhu, J.-K.** (2012). A DNA 3' Phosphatase Functions in Active DNA Demethylation in Arabidopsis. *Mol. Cell* **45**: 357–370.
- Mascher, M. et al.** (2017). A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature* **544**: 427–433.
- Mathieu, O., Reinders, J., Čaikovski, M., Smathajitt, C., and Paszkowski, J.** (2007). Transgenerational stability of the Arabidopsis epigenome is coordinated by CG methylation. *Cell* **130**: 851–862.
- Matzke, M.A. and Moshier, R.A.** (2014). RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.* **15**: 394–408.
- McClintock, B.** (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **36**: 344–355.
- Melamed-Bessudo, C., Yehuda, E., Stuitje, A.R., and Levy, A.A.** (2005). A new seed-based assay for meiotic recombination in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **43**: 458–466.
- Melters, D.P. et al.** (2013). Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution. *Genome Biol.* **14**: R10.
- Mirouze, M., Reinders, J., Bucher, E., Nishimura, T., Schneeberger, K., Ossowski, S., Cao, J., Weigel, D., Paszkowski, J., and Mathieu, O.** (2009). Selective epigenetic control of retrotransposition in Arabidopsis. *Nature* **461**: 427–430.
- Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H., and Kakutani, T.** (2001). Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in Arabidopsis. *Nature* **411**: 212–214.
- Morel, J.B., Mourrain, P., Béclin, C., and Vaucheret, H.** (2000). DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **10**: 1591–1594.
- Mozgova, I. and Hennig, L.** (2015). The Polycomb Group Protein Regulatory Network. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**: 269–296.
- Muiño, J.M., Kaufmann, K., van Ham, R.C.H.J., Angenent, G.C., and Krajewski, P.** (2011). ChIP-seq Analysis in R (CSAR): An R package for the statistical detection of protein-bound genomic regions. *Plant Methods* **7**: 11.
- Nabel, C.S., Manning, S.A., and Kohli, R.M.** (2012). The curious chemical biology of cytosine: Deamination, methylation, and oxidation as modulators of genomic potential. *ACS Chem Biol* **7**: 20–30.
- Nakashima, K., Ito, Y., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant Physiol.* **149**: 88–95.
- Okada, T., Endo, M., Singh, M.B., and Bhalla, P.L.** (2005). Analysis of the histone H3 gene family in Arabidopsis and identification of the male-gamete-specific variant AtMGH3. *Plant J.* **44**: 557–568.
- Oliver, S.N., Finnegan, E.J., Dennis, E.S., Peacock, W.J., and Trevaskis, B.** (2009). Vernalization-induced flowering in cereals is associated with changes in histone methylation at the VERNALIZATION1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 8386–8391.
- Ong-abdullah, M. et al.** (2015). the mantled somaclonal variant of oil palm.
- Osakabe, A., Jamge, B., Axelsson, E., Montgomery, S.A., Akimcheva, S., Kuehn, A.L.,**

- Pisupati, R., Lorković, Z.J., Yelagandula, R., Kakutani, T., and Berger, F.** (2021). The chromatin remodeler DDM1 prevents transposon mobility through deposition of histone variant H2A.W. *Nat. Cell Biol.* **23**: 391–400.
- Paterson, A.H., Freeling, M., and Sasaki, T.** (2005). Grains of knowledge: Genomics of model cereals. *Genome Res* **15**: 1643–1650.
- Pecinka, A., Abdelsamad, A., and Vu, G.T.H.** (2013). Hidden genetic nature of epigenetic natural variation in plants. *Trends Plant Sci.* **18**: 625–632.
- Pecinka, A., Chevalier, C., Colas, I., Kalantidis, K., Varotto, S., Krugman, T., Michailidis, C., Vallés, M.-P., Muñoz, A., and Pradillo, M.** (2020). Chromatin dynamics during interphase and cell division: similarities and differences between model and crop plants. *J Exp Bot* **71**: 5205–5222.
- Pecinka, A., Dinh, H.Q., Baubec, T., Rosa, M., Lettner, N., and Mittelsten Scheid, O.** (2010). Epigenetic regulation of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**: 3118–3129.
- Pecinka, A. and Mittelsten Scheid, O.** (2012). Stress-induced chromatin changes: a critical view on their heritability. *Plant Cell Physiol.* **53**: 801–808.
- Pecinka, A., Rosa, M., Schikora, A., Berlinger, M., Hirt, H., Luschnig, C., and Scheid, O.M.** (2009). Transgenerational stress memory is not a general response in *Arabidopsis*. *PLoS One* **4**.
- Pecinka, A., Schubert, V., Meister, A., Kreth, G., Klatte, M., Lysak, M.A., Fuchs, J., and Schubert, I.** (2004). Chromosome territory arrangement and homologous pairing in nuclei of *Arabidopsis thaliana* are predominantly random except for NOR-bearing chromosomes. *Chromosoma* **113**: 258–269.
- Pellicer, J., Kelly, L.J., Leitch, I.J., Zomlefer, W.B., and Fay, M.F.** (2014). A universe of dwarfs and giants: genome size and chromosome evolution in the monocot family Melanthiaceae. *New Phytol* **201**: 1484–1497.
- Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J.H., Ballinger, T., Henikoff, S., and Fischer, R.L.** (2007). DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 6752–6757.
- Picard, C.L., Povilus, R.A., Williams, B.P., and Gehring, M.** (2021). Transcriptional and imprinting complexity in *Arabidopsis* seeds at single-nucleus resolution. *Nat. Plants* **7**: 730–738.
- Pietzenuk, B., Markus, C., Gaubert, H., Bagwan, N., Merotto, A., Bucher, E., and Pecinka, A.** (2016). Recurrent evolution of heat-responsiveness in Brassicaceae COPIA elements. *Genome Biol.* **17**: 1–15.
- Pilu, R.** (2015). Paramutation phenomena in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* **44**: 2–10.
- Przewlaka, M.R. and Glover, D.M.** (2009). The Kinetochore and the Centromere: A Working Long Distance Relationship. *Annu. Rev. Genet.* **43**: 439–465.
- Qian, Y., Chen, C., Jiang, L., Zhang, J., and Ren, Q.** (2019). Genome-wide identification, classification and expression analysis of the JmjC domain-containing histone demethylase gene family in maize. *BMC Genomics* **20**: 256.
- Rangwala, S.H., Elumalai, R., Vanier, C., Ozkan, H., Galbraith, D.W., and Richards, E.J.** (2006). Meiotically stable natural epialleles of Sadhu, a novel *Arabidopsis* retroposon. *PLoS Genet* **2**: e36.
- Rangwala, S.H. and Richards, E.J.** (2010). The structure, organization and radiation of Sadhu non-long terminal repeat retroelements in *Arabidopsis* species. *Mob. DNA* **1**: 1–13.



- Ratel, D., Ravanat, J.-L., Berger, F., and Wion, D.** (2006). N6-methyladenine: the other methylated base of DNA. *Bioessays* **28**: 309–315.
- Ravi, M., Shibata, F., Ramahi, J.S., Nagaki, K., Chen, C., and Chan, S.W.L.** (2011). Meiosis-Specific Loading of the Centromere-Specific Histone CENH3 in *Arabidopsis thaliana*. **7**.
- Rawat, V., Abdelsamad, A., Pietzenuk, B., Seymour, D.K., Koenig, D., Weigel, D., Pecinka, A., and Schneeberger, K.** (2015). Improving the annotation of *Arabidopsis lyrata* using RNA-Seq data. *PLoS One* **10**: 1–12.
- Redman, J.C., Haas, B.J., Tanimoto, G., and Town, C.D.** (2004). Development and evaluation of an *Arabidopsis* whole genome Affymetrix probe array. *Plant J.* **38**: 545–561.
- Rehrauer, H. et al.** (2010). AGRONOMICS1: A new resource for *Arabidopsis* transcriptome profiling. *Plant Physiol* **152**: 487–499.
- Reuter, J.A., Spacek, D. V, and Snyder, M.P.** (2015). High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell* **58**: 586–597.
- Richards, E.J. and Ausubel, F.M.** (1988). Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **53**: 127–136.
- Riha, K., Heacock, M.L., and Shippen, D.E.** (2006). The Role of the Nonhomologous End-Joining DNA Double-Strand Break Repair Pathway in Telomere Biology. *Annu. Rev. Genet.* **40**: 237–277.
- Roa, F. and Guerra, M.** (2012). Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *BMC Evol. Biol.* **12**: 1–13.
- Rosa, S. and Shaw, P.** (2013). Insights into chromatin structure and dynamics in plants. *Biology (Basel)*. **2**: 1378–1410.
- Roudier, F. et al.** (2011). Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **30**: 1928–1938.
- Rutowicz, K. et al.** (2015). A specialized histone H1 variant is required for adaptive responses to complex abiotic stress and related DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **169**: 2080–2101.
- Sakai, H., Mizuno, H., Kawahara, Y., Wakimoto, H., Ikawa, H., Kawahigashi, H., Kanamori, H., Matsumoto, T., Itoh, T., and Gaut, B.S.** (2011). Retrogenes in rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) exhibit correlated expression with their source genes. *Genome Biol. Evol.* **3**: 1357–1368.
- Sakurai, H. and Enoki, Y.** (2010). Novel aspects of heat shock factors: DNA recognition, chromatin modulation and gene expression. *FEBS J.* **277**: 4140–4149.
- Schranz, E.M., Mohammadin, S., and Edger, P.P.** (2012). Ancient whole genome duplications, novelty and diversification: The WGD Radiation Lag-Time Model. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**: 147–153.
- Sequeira-Mendes, J., Aragüez, I., Peiró, R., Mendez-Giraldez, R., Zhang, X., Jacobsen, S.E., Bastolla, U., and Gutierrez, C.** (2014). The functional topography of the *Arabidopsis* genome is organized in a reduced number of linear motifs of chromatin states. *Plant Cell* **26**: 2351–2366.
- Seymour, D.K., Koenig, D., Haggmann, J., Becker, C., and Weigel, D.** (2014). Evolution of DNA Methylation Patterns in the Brassicaceae is Driven by Differences in Genome Organization. *PLoS Genet.* **10**.
- Shaked, H., Avivi-Ragolsky, N., and Levy, A.A.** (2006). Involvement of the *arabidopsis* SWI2/SNF2 chromatin remodeling gene family in DNA damage response and

- recombination. *Genetics* **173**: 985–994.
- De Smet, R., Adams, K.L., Vandepoele, K., Van Montagu, M.C.E., Maere, S., and Van de Peer, Y.** (2013). Convergent gene loss following gene and genome duplications creates single-copy families in flowering plants. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **110**: 2898–2903.
- Springer, N.M., Li, Q., and Lisch, D.** (2016). Creating order from chaos: epigenome dynamics in plants with complex genomes. *Plant Cell* **28**: 314–325.
- Stroud, H., Greenberg, M.V.C., Feng, S., Bernatavichute, Y. V, and Jacobsen, S.E.** (2012a). Resource comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the Arabidopsis methylome. *Cell* **152**: 352–364.
- Stroud, H., Hale, C.J., Feng, S., Caro, E., Jacob, Y., Michaels, S.D., and Jacobsen, S.E.** (2012b). DNA methyltransferases are required to induce heterochromatic re-replication in arabidopsis. *PLoS Genet.* **8**: 1–7.
- Takayama, S., Dhabhi, J., Roberts, A., Mao, G., Heo, S.-J., Pachter, L., Martin, D., and Boffelli, D.** (2014). Genome methylation in *D. melanogaster* is found at specific short motifs and is independent of DNMT2 activity. *Genome Res.*
- Takuno, S. and Gaut, B.S.** (2012). Recent Retrotransposon Insertions Are Methylated and Phylogenetically Clustered in Japonica Rice (*Oryza sativa* spp . japonica ). **29**: 3193–3203.
- Tenaillon, M.I., Hollister, J.D., and Gaut, B.S.** (2010). A triptych of the evolution of plant transposable elements. *Trends Plant Sci* **15**: 471–478.
- Thanbichler, M. and Shapiro, L.** (2006). Chromosome organization and segregation in bacteria. *J. Struct. Biol.* **156**: 292–303.
- Thomas, C.A.J.** (1971). The genetic organization of chromosomes. *Annu Rev Genet* **5**: 237–256.
- Tiang, C., He, Y., and Pawlowski, W.P.** (2012). Chromosome Organization and Dynamics during Interphase , Mitosis , and Meiosis in Plants 1. **158**: 26–34.
- Tittel-Elmer, M., Bucher, E., Broger, L., Mathieu, O., Paszkowski, J., and Vaillant, I.** (2010). Stress-induced activation of heterochromatic transcription. *PLoS Genet.* **6**: 1–11.
- Tsukahara, S., Kobayashi, A., Kawabe, A., Mathieu, O., Miura, A., and Kakutani, T.** (2009). Bursts of retrotransposition reproduced in Arabidopsis. *Nature* **461**: 423–426.
- Vanyushin, B.F., Alexandrushkina, N.I., and Kirnos, M.D.** (1988). N6-Methyladenine in mitochondrial DNA of higher plants. *FEBS Lett.* **233**: 397–399.
- Vu, G.T.H. et al.** (2015). Comparative genome analysis reveals divergent genome size evolution in a carnivorous plant genus. *Plant Genome* **8**: doi:10.3835/plantgenome2015.04.0021.
- Waddington, C.H.** (1942). The epigenotype. *Endeavour*: 18–20.
- Wang, W. et al.** (2006a). High rate of chimeric gene origination by retroposition in plant genomes. *Plant Cell* **18**: 1791–1802.
- Wang, W. et al.** (2006b). High Rate of Chimeric Gene Origination by Retroposition in Plant Genomes. **18**: 1791–1802.
- Waterland, R.A. and Jirtle, R.L.** (2003). Transposable Elements: Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 5293–5300.
- Watson, J.D. and Crick, F.H.C.** (1953). Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**: 737–738.

- Watson, J.M. and Riha, K.** (2010). Comparative biology of telomeres: Where plants stand. *FEBS Lett.* **584**: 3752–3759.
- Wicker, T. et al.** (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* **8**: 973–982.
- Wicker, T. et al.** (2017). The repetitive landscape of the 5100 Mbp barley genome. *Mob. DNA* **8**: 22.
- Willing, E.M. et al.** (2015). Genome expansion of *Arabis alpina* linked with retrotransposition and reduced symmetric DNA methylation. *Nat. Plants* **1**: 1–7.
- Willing, E.M., Piofczyk, T., Albert, A., Winkler, J.B., Schneeberger, K., and Pecinka, A.** (2016). UVR2 ensures transgenerational genome stability under simulated natural UV-B in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Commun.* **7**: 1–9.
- Woo, H.R., Dittmer, T.A., and Richards, E.J.** (2008). Three SRA-domain methylcytosine-binding proteins cooperate to maintain global CpG methylation and epigenetic silencing in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **4**.
- Woo, H.R., Pontes, O., Pikaard, C.S., and Richards, E.J.** (2007). protein required for centromeric heterochromatinization. **1**: 267–277.
- Xiong, W., He, L., Lai, J., Dooner, H.K., and Du, C.** (2014). HelitronScanner uncovers a large overlooked cache of Helitron transposons in many plant genomes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **111**: 10263–10268.
- Yadav, R.K., Girke, T., Pasala, S., Xie, M., and Reddy, G.V.** (2009). Gene expression map of the *Arabidopsis* shoot apical meristem stem cell niche. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 4941 LP – 4946.
- Yang, F., Fernández-Jiménez, N., Tučková, M., Vrána, J., Cápál, P., Díaz, M., Pradillo, M., and Pecinka, A.** (2021). Defects in meiotic chromosome segregation lead to unreduced male gametes in *Arabidopsis* SMC5/6 complex mutants. *Plant Cell*.
- Yang, L. and Bennetzen, J.L.** (2009). Structure-based discovery and description of plant and animal Helitrons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 12832–12837.
- Yelagandula, R. et al.** (2014). The histone variant H2A.W defines heterochromatin and promotes chromatin condensation in *Arabidopsis*. *Cell* **158**: 98–109.
- Yoshida, S., Maruyama, S., Nozaki, H., and Shirasu, K.** (2010). Horizontal Gene Transfer by the Parasitic Plant *Striga hermonthica*. *Science* (80-. ). **328**: 1128.
- Zakrzewski, F., Schubert, V., Viehoveer, P., Minoche, A.E., Dohm, J.C., Himmelbauer, H., Weisshaar, B., and Schmidt, T.** (2014). The CHH motif in sugar beet satellite DNA: A modulator for cytosine methylation. *Plant J.* **78**: 937–950.
- Zemach, A., Kim, M.Y., Hsieh, P.H., Coleman-Derr, D., Eshed-Williams, L., Thao, K., Harmer, S.L., and Zilberman, D.** (2013). The *Arabidopsis* nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell* **153**: 193–205.
- Zhang, Y., Wu, Y., Liu, Y., and Han, B.** (2005). Computational identification of 69 retroposons in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **138**: 935–948.
- Zhu, J.-K.** (2009). Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases. *Annu. Rev. Genet.* **43**: 143–166.
- Zilberman, D., Coleman-derr, D., Ballinger, T., and Henikoff, S.** (2008). Histone H2A . Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* **456**: 125–130.

## 7. PODĚKOVÁNÍ

Tato práce by nevznikla bez dlouhodobé podpory, inspirace a vedení mých mentorů, kterými jsou prof. Dr. Ingo Schubert (IPK Gatersleben), PD Dr. Ortrun Mittelsten Scheid (GMI Vienna), prof. Dr. Maarten Koornneef (MPIPZ Cologne) a prof. Ing. Jaroslav Doležel (ÚEB Olomouc). Za pomoc v laboratoři, experimentální práci, péči o rostliny a obecně stimulační prostředí a výborné podmínky pro výzkum bych rád poděkoval kolegům, studentům a technickému personálu z IPK, GMI, MPIPZ a ÚEB. Dále bych chtěl poděkovat za nesčetné diskuse a spolupráce blízkým kolegům prof. Dr. Martinovi Lysákovi, Dr. Alexandre Berr, Dr. Sabině Klatte, prof. Dr. Tuncay Baubec, PD Dr. Celia Baroux, Dr. Korbinian Schneeberger, PD Dr. Wim Soppe, Dr. Martina Hödl-Baumgartner, Dr. Evě Dvořák Tomašíkové a Dr. Janu Šafářovi. Tímto se omlouvám mnoha dalším kolegyním a kolegům, kteří mi mnohokrát pomohli, ale nemohu je všechny jmenovat.

Toto je má druhá habilitační práce. První byla obhájena v roce 2017 na Ruhr Universität Bochum, Bochum, SRN, za nezištné podpory Prof. Dr. Ute Krämer, která mi umožnila výuku na katedře Rostlinné fyziologie téže univerzity. Tímto jí ještě jednou děkuji. Po návratu do ČR jsem navázal výukou na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, která je vedena prof. RNDr. Zdeňkem Dvořákem, DrSc. et Ph.D. Zde jsem měl tu čest zpočátku alternovat ve výuce předmětu Epigenetika ustaveného a vedeného prof. RNDr. Borisem Vyskotem, DrSc.

Za každodenní podporu a trpělivost, bych chtěl poděkovat své rodině, především pak své ženě Petře.

## 8. SEZNAM PRACÍ TVOŘÍCÍCH HABILITAČNÍ SPIS

1. **Pecinka A.**, Chevalier C., Colas I., Kalantidis K., Varotto S., Krugman T., Michailidis C., Vallés M.-P., Muñoz A., Pradillo M. (2020): Chromatin dynamics during interphase and cell division: similarities and differences between model and crop plants. *J Exp Bot* 71: 5205–5222.
2. Nowicka A., Tokarz B., Zwyrtková J., Dvořák Tomaščíková E., Procházková K., Ercan U., Finke A., Rozhon W., Poppenberger B., Otmar M., Niezgodzki I., Krečmerová M., Schubert I., **Pecinka A.\*** (2020): Comparative analysis of epigenetic inhibitors reveals different degrees of interference with transcriptional gene silencing and induction of DNA damage. *Plant J* 102:68-84.
3. Díaz M., Pecinkova P., Nowicka A., Baroux C., Sakamoto T., Gandha P.Y., Jeřábková H., Matsunaga S., Grossniklaus U., **\*Pecinka A.** (2019): SMC5/6 complex subunit NSE4A is involved in DNA damage repair and seed development in Arabidopsis. *Plant Cell* 31:1579-1597.
4. Finke A., Mandáková T., Nawaz K., Vu G.T.H., Novák P., Macas J., Lysak M.A., **Pecinka A.** (2019): Genome invasion by a hypomethylated satellite repeat in Australian crucifer *Ballantinia antipoda*. *Plant J* 99:1066-1079.
5. Willing E-M, Piofczyk T, Albert A, Winkler JB, Schneeberger K, **Pecinka A** (2016): UVR2 ensures trans-generational genome stability under simulated natural UV-B in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Communications*, 7: e13522.
6. Pietzenuk B., Markus C., Gaubert H., Bagwan N., Abdelsamad A., Merotto A., Bucher E., **Pecinka A.** (2016): Recurrent evolution of heat-responsiveness in *Brassicaceae* *COPIA* elements. *Genome Biology*, 17: e209.
7. Liu C.-H., Finke A., Díaz A., Rozhon W., Poppenberger B., Baubec T., **Pecinka A.** (2015): ATR and ATM are required for repair of zebularine-induced DNA damage in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 27: 1788-1800.
8. Abdelsamad A, **Pecinka A** (2014): Pollen-specific activation of Arabidopsis retrogenes is associated with global transcriptional reprogramming. *Plant Cell* 26: 3299-313.
9. Baubec T, Finke A, Mittelsten Scheid O, **\*Pecinka A** (2014): Meristem-specific expression of epigenetic regulators safeguards transposon silencing in Arabidopsis. *EMBO Rep* 15: 446-452.
10. **Pecinka A**, Mittelsten Scheid O (2012): Stress-induced chromatin changes: A critical view on their heritability. *Plant Cell Physiol* 53: 801–808.
11. Baubec T, Dinh HQ, **Pecinka A**, Rakic B, Rozhon W, Wohlrab B, von Haeseler A, Mittelsten Scheid O (2010): Cooperation of Multiple Chromatin Modifications Can Generate Unanticipated Stability of Epigenetic States in Arabidopsis. *Plant Cell* 22: 34-47.
12. **Pecinka A**, Dinh HQ, Rosa M, Baubec T, Lettner N, Mittelsten Scheid O (2010): Epigenetic control of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in Arabidopsis. *Plant Cell* 22: 3118–3129.

13. Baubec T, **Pecinka A**, Rozhon W, Mittelsten Scheid O (2009): Effective, homogeneous and transient interference with cytosine methylation in plant genomic DNA by zebularine. *Plant J* 57:542-554.

**PŘÍLOHA: PUBLIKACE TVOŘÍCÍ HABILITAČNÍ SPIS**