

Uloga proteina BPM1 u mehanizmu metilacije DNA de novo tijekom razvoja uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.)

Vuk, Tamara

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:895020>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Tamara Vuk

**ULOGA PROTEINA BPM1 U MEHANIZMU
METILACIJE DNA *de novo* TIJEKOM
RAZVOJA UROČNJAKA (*Arabidopsis
thaliana* L.)**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Tamara Vuk

**ULOGA PROTEINA BPM1 U MEHANIZMU
METILACIJE DNA *de novo* TIJEKOM
RAZVOJA UROČNJAKA (*Arabidopsis
thaliana* L.)**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
dr. sc. Dunja Leljak-Levanić, prof.

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Tamara Vuk

**THE ROLE OF BPM1 PROTEIN IN *de novo*
DNA METHYLATION MECHANISM DURING
DEVELOPMENT OF *Arabidopsis thaliana* L.**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. Dunja Leljak-Levanić, prof.

Zagreb, 2022

Ovaj je doktorski rad izrađen u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Dunje Lejnak-Levanić, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORU

Prof. dr. sc. Dunja Leļjak-Levanić diplomirala je 1993. godine molekularnu biologiju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nakon stjecanja diplome, zaposlila se na mjesto asistenta-znanstvenog novaka na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Magistrirala je u ožujku 1997. godine, nakon čega je upisala doktorski studij. Za vrijeme dokorskog studija boravila je 1,5 mjeseci na Zavodu za molekularnu biologiju Sveučilišta u Wageningenu, Nizozemska, u sklopu studijskog boravka u grupi voditelja prof. dr. sc. S. C. DeVriesa. U siječnju 2001. godine stekla je titulu doktora prirodnih znanosti iz područja biologije, smjer molekularna i stanična biologija. Od 2005. do 2014. godine bila je zaposlena na mjestu docenta, dok 2014. godine stječe zvanje izvanrednog profesora. Zvanje redovnog profesora stekla je 2021. godine.

Predmet primarnog znanstvenog interesa prof. dr. sc. Dunje Leļjak-Levanić su razvojni, epigenetički i genetički aspekti oplodnje i rane embriogeneze biljaka te korelacija reproduktivnog razvitka i odgovora biljaka na stres. Znanstvenu karijeru razvijala je kroz niz inozemnih znanstvenih usavršavanja u periodu od 2000. do 2009. godine, kao i sudjelovanjem na brojnim kongresima. Dobitnica je stipendije FEBS (2000.) i stipendije zaklade Alexander von Humboldt (2004. – 2005.). Kao aktivni istraživač sudjelovala je u brojnim projektima, a bila je i voditeljica međunarodnog projekta Zaklade Alexander Von Humboldt (2006. – 2012.), projekta Zaklade HAZU (2012. - 2013.), te voditeljica (2017. – 2021.) i konzultantica (2015. – 2018.) na projektima Hrvatske zaklade za znanost. Koautorica je 34 znanstvena rada i patenta za uklanjanje virusa i/ili fitoplazmi iz zaraženog sadnog materijala vinove loze.

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Dunji Leljak-Levanić na strpljenju i potpori tijekom izrade i pisanja doktorskog rada. Njezini vrijedni savjeti, ali i nezamjenjiv smisao za humor, svima su nam olakšali i najizazovnije trenutke.

Zahvaljujem se i izv. prof. dr. sc. Nataši Bauer koja me svojim vodstvom pri izradi diplomskog rada upoznala s brojnim metodama koje su mi uvelike olakšale i izradu doktorskog rada.

Zahvaljujem se Hrvatskoj zakladi za znanost koja je financirala izradu ovog doktorskog rada, kao i svim suradnicima s projekta. Posebno hvala dr.sc. Andreji Škiljaici na pripremi transgenih linija, dr.sc. Luciji Markulin na pomoći pri provedbi i analizi rezultata kromatinske imunoprecipitacije, te docentu Nenadu Malenici i Mateji Jagić na pomoći u analizi aktivnosti promotora.

Zahvaljujem se i svim kolegama sa Zavoda za molekularnu biologiju na suradnji, savjetima i kolegijalnosti. Posebno hvala dr. sc. Mariji Klasić koja me upoznala s metodom pirosekvenciranja, te kolegicama Mirti Tokić i Sandri Vitko. Uspješan završetak ovog doktorskog rada djelomice je i njihova zasluga.

I naposljetku, najveća hvala mojim roditeljima Zvezdanu i Dunji, sestri Nataši i Oliveru koji su me bodrili kroz protekle četiri godine. Bez njihove podrške ovaj rad ne bi nikad ugledao svjetlo dana.

**Uloga proteina BPM1 u mehanizmu metilacije DNA *de novo* tijekom razvoja uročnjaka
(*Arabidopsis thaliana* L.)**

TAMARA VUK

Zavod za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta,
Horvatovac 102 a, 10 000 Zagreb

Proteini BPM iz vrste *Arabidopsis thaliana* primarnu ulogu ostvaruju u putu proteasomalne razgradnje ovisne o ubikvitinu, u sklopu kojeg prepoznaju specifične supstrate za razgradnju. Prethodno je utvrđena interakcija proteina BPM1 s proteinima RDM1 i DMS3, komponentama metilacijskog mehanizma RdDM. Uloga proteina BPM1 u mehanizmu RdDM u ovom je radu ispitana primjenom kromatinske imunoprecipitacije u svrhu identifikacije novih ciljnih gena ovog mehanizma u čijoj regulaciji metilacije posreduje protein BPM1. Identificirani su geni *FBW2*, *RKP* i *AGL14*, a kao referentni odabran je gen *CML41*. Analizom metilacije ovih gena metodom bisulfitnog sekvenciranja i pirosekvenciranja u linijama s prekomjernom ekspresijom proteina od interesa (oeBPM1, oeDMS3), te linijama s narušenom funkcijom mehanizma RdDM (*dms3-1*, *nrpe1-10*), potvrđen je stimulativni učinak proteina BPM1 na aktivnost mehanizma, koji je najizraženiji tijekom embriogeneze, a sam mehanizam RdDM značajniji je za zigotnu nego za somatsku embriogenezu. Ovisno o poziciji, učinci metilacijskih događaja reflektiraju se na ekspresiju svih analiziranih gena.

(123 stranice / 46 slika / 8 tablica / 161 literaturni navod / jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: *Arabidopsis thaliana*, *BPM1*, *metilacija*, *RdDM*, *ChIP*, *pirosekvenciranje*

Mentor: dr. sc. Dunja Leljak-Levanić, prof.

Ocjenjivači: dr. sc. Mirjana Pavlica, prof.

dr. sc. Biljana Balen, prof.

dr. sc. Snježana Mihaljević, viši znanstveni suradnik

The role of BPM1 protein in *de novo* DNA methylation mechanism during development of *Arabidopsis thaliana* L.

TAMARA VUK

Division of Molecular Biology, Faculty of Science,
Horvatovac 102 a, 10 000 Zagreb

Proteins BPM of *Arabidopsis thaliana* have a primary role in the ubiquitin-dependent proteasomal degradation pathway, where they recognize specific substrates for degradation. The interaction of BPM1 protein with RDM1 and DMS3, components of RdDM methylation mechanism, has previously been established. Here, the role of BPM1 protein in RdDM was analyzed using chromatin immunoprecipitation for identification of new RdDM targets whose methylation is mediated by BPM1 protein. Genes *FBW2*, *RKP* and *AGL14* were identified as targets, and *CML41* was chosen as a reference gene. Methylation analysis of these genes was conducted using bisulfite sequencing and pyrosequencing in lines with overexpression of BPM1 (oeBPM1) or DMS3 (oeDMS3), and lines with impaired RdDM function (*dms3-1*, *nrpe1-10*). The results confirmed a stimulative role of BPM1 protein in RdDM. This mechanism proved to be more significant in zygotic than somatic embryogenesis. Depending on the position, methylation had a diverse effect on expression of analyzed genes.

(123 pages / 46 figures / 8 tables / 161 references / original in Croatian)

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, *BPM1*, *methylation*, *RdDM*, *ChIP*, *pyrosequencing*

Supervisor: Dr. Dunja Leljak-Levanić, Professor

Reviewers: Dr. Mirjana Pavlica, Professor

Dr. Biljana Balen, Professor

Dr. Snježana Mihaljević, Senior Research Associate

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	3
2.1. Životni ciklus cvjetnica.....	3
2.1.1. Zigotna embriogeneza uročnjaka.....	5
2.1.2. Somatska embriogeneza uročnjaka.....	7
2.2. Metilacija DNA.....	9
2.2.1. Mehanizmi metilacije DNA.....	10
2.2.2. Mehanizam metilacije DNA <i>de novo</i> u biljaka.....	12
2.2.3. Uloga metilacije u embriogenezi uročnjaka.....	15
2.3. Proteini porodice MATH-BTB.....	18
2.3.1. Razvojne uloge proteina MATH-BTB u animalnim organizmima.....	20
2.3.2. Razvojne uloge proteina MATH-BTB u biljaka.....	21
2.3.2.1. Proteini BPM 1-6 vrste <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
3. MATERIJALI I METODE.....	24
3.1. Materijali.....	24
3.1.1. Biljni materijal.....	24
3.1.2. Sojevi bakterija.....	25
3.1.3. Plazmidni vektori.....	25
3.1.4. Hranjive podloge i supstrati za uzgoj biljaka.....	25
3.1.4.1. Hranjiva podloga za uzgoj uročnjaka.....	25
3.1.4.2. Supstrat za uzgoj biljaka.....	26
3.1.5. Hranjive podloge za uzgoj bakterija.....	26
3.1.6. Pufferi i kompleti.....	27
3.1.7. Početnice.....	27
3.2. Metode.....	27
3.2.1. Uzgoj biljnog materijala.....	27
3.2.2. Indukcija somatske embriogeneze i razvoj embrija.....	28
3.2.3. Izolacija DNA.....	30
3.2.3.1. Izolacija genomske DNA.....	30
3.2.3.2. Izolacija plazmidne DNA.....	31
3.2.4. Agarozna gel elektroforeza.....	31
3.2.5. Izolacija fragmenata DNA iz gela.....	32

3.2.6. Kromatinska imunoprecipitacija.....	32
3.2.6.1. Unakrsno vezanje i ekstrakcija jezgri.....	33
3.2.6.2. Liza i sonikacija jezgri.....	33
3.2.6.3. Postsonikacijska kontrola.....	34
3.2.6.4. Imunoprecipitacija.....	35
3.2.6.5. Elucija DNA.....	36
3.2.6.6. Poništenje unakrsnog vezivanja.....	36
3.2.6.7. Ekstrakcija i sekvenciranje precipitirane DNA.....	36
3.2.7. Analiza metilacije DNA.....	36
3.2.7.1. Identifikacija metiliranih regija odabranih gena.....	36
3.2.7.2. Odabir početnica za umnažanje bisulfitno konvertirane DNA.....	37
3.2.7.3. Bisulfitna konverzija.....	37
3.2.7.4. Umnažanje bisulfitno konvertirane DNA lančanom reakcijom polimeraze.....	39
3.2.7.5. Pročišćavanje i ugradnja PCR produkata u sustavu pGEM-T Easy.....	39
3.2.7.6. Sekvenciranje, analiza sekvenci i utvrđivanje varijabilnih metilacijskih regija.....	40
3.2.7.7. Analiza varijabilnih metilacijskih regija pirosekvenciranjem.....	41
3.2.8. Analiza relativne ekspresije odabranih gena metodom qPCR.....	42
3.2.8.1. Izolacija RNA.....	42
3.2.8.2. Reverzna transkripcija.....	43
3.2.8.3. Analiza ekspresije metodom qPCR.....	43
3.2.9. Analiza aktivnosti promotora.....	44
3.2.9.1. Umnažanje promotora gena <i>FBW2</i>	44
3.2.9.2. Ugradnja promotora gena <i>FBW2</i> u GUS vektor reakcijom <i>In-Fusion</i>	44
3.2.9.3. Transformacija kompetentnih bakterijskih stanica.....	44
3.2.9.4. Transformacija uročnjaka metodom <i>floral dip</i>	46
3.2.9.5. Identifikacija transformanata s jednom insercijom i križanje.....	47
3.2.9.6. Genotipizacija T-DNA.....	47
3.2.9.7. Analiza aktivnosti promotora gena <i>FBW2</i>	48
4. REZULTATI.....	49
4.1. Zajedničke regije nakupljanja proteina BPM1 i DMS3 na genomu uročnjaka.....	49
4.2. Varijabilne metilacijske regije gena reguliranih združenim mehanizmom proteina BPM1 i DMS3.....	53

4.3. Razina i varijabilnost metilacije citozina u cvjetićima uročnjaka.....	55
4.3.1. Učinkovitost bisulfitne konverzije i umnažanje konvertirane DNA.....	55
4.3.2. Metilacijski obrasci regija potencijalno metiliranih združenim mehanizmom proteina BPM1 i DMS3 u cvjetićima divljeg tipa uročnjaka.....	57
4.3.3. Selekcija varijabilno metiliranih regija gena za analizu pirosekvenciranjem.....	60
4.4. Metilacijski obrasci gena <i>CML41</i> , <i>FBW2</i> , <i>RKP</i> i <i>AGL14</i> variraju tijekom razvoja i u ovisnosti o prisutnosti proteina BPM1.....	62
4.5. Metilacijski obrasci gena <i>CML41</i> , <i>FBW2</i> , <i>RKP</i> i <i>AGL14</i> različiti su u embrijima zigotnoga ili somatskoga porijekla.....	68
4.6. Relativna ekspresija gena <i>CML41</i> , <i>FBW2</i> , <i>RKP</i> i <i>AGL14</i> u zigotnim i somatskim embrijima.....	73
4.7. Aktivnost promotora gena <i>FBW2</i> najizraženija je u cvjetićima linije oeBPM1.....	76
5. RASPRAVA.....	77
5.1. Razine metilacije DNA variraju između različitih razvojnih stadija.....	81
5.2. Metilacija DNA je povišena u liniji s prekomjernom ekspresijom proteina BPM1.....	83
5.3. Izazovi u analizi metilacije biljne DNA.....	85
5.4. Učinak metilacije DNA na ekspresiju gena uvjetovan je njezinim položajem.....	87
5.5. Metilacija DNA posredovana proteinom BPM1 stimulira aktivnost promotora gena <i>FBW2</i>	89
6. ZAKLJUČCI.....	90
7. LITERATURA.....	92
8. PRILOZI.....	110
8.1. Pufferi i komercijalni kompleti.....	110
8.1.1. Sterilizacijska otopina.....	110
8.1.2. Pufferi za izolaciju genomske DNA metodom CTAB.....	110
8.1.3. Komplet za izolaciju DNA iz malih masa tkiva.....	111
8.1.4. Brza izolacija DNA u svrhu detekcije integrirane T-DNA.....	111
8.1.5. Komplet za izolaciju plazmida.....	111
8.1.6. Reagensi za agaroznu gel elektroforezu.....	111
8.1.7. Kompleti za purifikaciju PCR produkata.....	111
8.1.8. Reagensi za kromatinsku imunoprecipitaciju.....	112
8.1.9. Pufferi za kromatinsku imunoprecipitaciju.....	112

8.1.10. Komplet za bisulfitnu konverziju.....	115
8.1.11. Komplet za umnažanje DNA.....	115
8.1.12. Reagensi za kloniranje.....	115
8.1.13. Reagensi za pirosekvenciranje.....	115
8.1.14. Kompleti za izolaciju RNA.....	115
8.1.15. Reagensi za reverznu transkripciju.....	115
8.2. Literaturne baze podataka o metilaciji.....	116
8.3. Sekvence početnica i optimalni uvjeti reakcije PCR.....	116
8.4. Obrada rezultata kromatinske imunoprecipitacije.....	118
8.5. Metilacijski obrasci gena <i>CML11</i> , <i>FBW2</i> , <i>RKP</i> i <i>AGL14</i> u klijancima.....	119
8.6. Relativna ekspresija gena <i>CML11</i> , <i>FBW2</i> , <i>RKP</i> i <i>AGL14</i> u klijancima.....	119
9. ŽIVOTOPIS.....	122

1. UVOD

Proteini BPM iz vrste *Arabidopsis thaliana* pripadaju velikoj porodici proteina MATH-BTB zastupljenih u brojnim eukariotima, a čija je zajednička karakteristika posjedovanje domena MATH (engl. *Meprin and TRAF Homology*) i BTB (engl. *Bric-A-Brac, Tramtrack, Broad Complex*). Primarnu funkciju ovi proteini ostvaruju u mehanizmu ubikvitin-ovisne proteasomalne degradacije, u kojoj sudjeluju kao komponente odgovorne za specifično prepoznavanje proteinskog supstrata za degradaciju. Proteini MATH-BTB su aktivni u posljednjem koraku mehanizma, kad domenom BTB stupaju u interakciju s ligazama E3 ovisnim o kulinu 3, dok pomoću domene MATH vežu proteine ciljane za razgradnju (Xu i sur., 2003). Budući da je ubikvitin-ovisna proteasomalna degradacija glavni proteolitički put u eukariota, proteini MATH-BTB kroz interakcije s brojnim supstratima indirektno sudjeluju i reguliraju aktivnost niza različitih signalnih puteva. Unatoč tome što je u uročnjaku prisutno tek 6 članova ove obitelji (BPM1-6) (Weber i sur., 2005), kroz prethodno opisan način djelovanja proteini BPM utječu na funkciju brojnih proteina. Nedavnim istraživanjima proteinskih interakcija proteina BPM1 u uročnjaku, identificirane su nove, dosad neopisane interakcije (Jagić i sur., 2022). Utvrđeno je kako protein BPM1 stupa u interakciju s proteinima DMS3 i RDM1, komponentama kompleksa DDR uključenog u mehanizam metilacije DNA *de novo* posredovane malim molekulama RNA (engl. *RNA-directed DNA methylation*; RdDM) (Law i sur., 2010). Premda je inicijalna pretpostavka temeljena na ovim interakcijama bila da se radi o novim metama puta proteasomalne degradacije, dodatna istraživanja pokazala su kako se komponente kompleksa DDR kroz ovu interakciju ne usmjeravaju u razgradnju, te je donesena nova pretpostavka o potencijalnoj, o kulinu 3-neovisnoj funkciji proteina BPM1 (Jagić i sur., 2022). Budući da su opisane interakcije s komponentama uključenim u metilacijski mehanizam RdDM, pretpostavljena je dosad neopisana uloga proteina BPM1 u metilaciji DNA. Metilacija je glavna epigenetska modifikacija odgovorna za zaštitu genoma od ugradnje transpozona, ali i kontrolu ekspresije pojedinih gena koji kodiraju proteine. Osnova metilacije jednaka je u svim organizmima, a sastoji se od dodavanja metilne skupine na citozin, čime nastaje 5-metilcitozin. Za uspostavu metilacije odgovorne su metiltransferaze, a metilacija se uglavnom uspostavlja na citozinima iza kojih slijede gvanini (tzv. CpG otoci) (Moore i sur., 2013). Premda je ova modifikacija dosad dobro istražena u sisavcima, metilacija DNA u biljkama je složenija u odnosu na druge eukariote te nije u potpunosti razjašnjena. Razlog tome je postojanje biljno-specifičnih metiltransferaza koje omogućuju metilaciju citozina koji nisu dio okruženja CG, te su definirana dodatna citozinska okruženja, CHG i CHH (gdje H

predstavlja A, C ili T) (Matzke i Mosher, 2014). Na ovaj način je u biljkama omogućena metilacija većeg broja citozina, što rezultira nastankom složenijih metilacijskih obrazaca. Za inicijalnu uspostavu metilacije u biljkama zadužen je RdDM, biljno-specifični mehanizam metilacije DNA *de novo* posredovane malim molekulama RNA, a ovaj je mehanizam odgovoran i za održavanje metilacije okruženja CHH (He i sur., 2011). Metilacija mehanizmom RdDM ostvaruje se kontroliranom aktivnošću niza komponenata, između ostalog i prethodno spomenutog kompleksa DDR. Zbog uloge mehanizma RdDM u inicijalnoj uspostavi metilacije u svim citozinskim okruženjima, njegova je aktivnost očekivano najizraženija tijekom embrionalnog razvoja. Embriogeneza predstavlja razdoblje najdinamičnijih razvojnih promjena, temeljenih na brzim izmjenama ekspresija gena, za koje je neophodna ispravna funkcija mehanizma RdDM (Jullien i sur., 2012).

Cilj ovog rada bio je istražiti ulogu proteina BPM1 u mehanizmu RdDM, pri čemu je prvi korak bio identifikacija gena čija je metilacija pod kontrolom združenog djelovanja mehanizma RdDM i proteina BPM1. Ova identifikacija temeljena je na usporednoj detekciji mjesta vezanja kompleksa DDR, proteina DMS3 i proteina BPM1 na genom uročnjaka. Dobiveni rezultati su korelirani s ciljem identifikacije zajedničkih genomskih meta mehanizma RdDM i proteina BPM1. Drugi cilj bio je precizna identifikacija metiliranih regija selektiranih gena, te analiza metilacije odabranih regija na razini pojedinačnih citozina metodom pirosekvenciranja, u tkivima embrija, klijanaca i cvjetića divljeg tipa, te transgeničnih linija pojačano ekspimiranih za proteine DMS3 i BPM1, i linija s nefunkcionalnim mehanizmom RdDM. Budući da RdDM svoju primarnu ulogu ostvaruje u embriogenezi, fokus istraživanja bio je na modelu zigotne i somatske embriogeneze u ranom i kasnom razvojnom stadiju. Krajnji cilj bio je utvrditi učinke metilacijskih promjena na relativnu ekspresiju odabranih gena.

Na temelju prethodnih istraživanja i dosadašnjih saznanja iz literature, postavljene su polazne hipoteze. Pretpostavljena je nova uloga proteina BPM1, izvan procesa proteasomalne razgradnje, u metilacijskom mehanizmu RdDM. Budući da je ovaj mehanizam primarno aktivan u periodu embriogeneze, pretpostavljeno je kako će združeno djelovanje mehanizma RdDM i proteina BPM1 biti najizraženije upravo u ovoj fazi razvoja, te da će se razlike u metilaciji specifično odražavati na ekspresiju gena.

2. LITERATURNI PREGLED

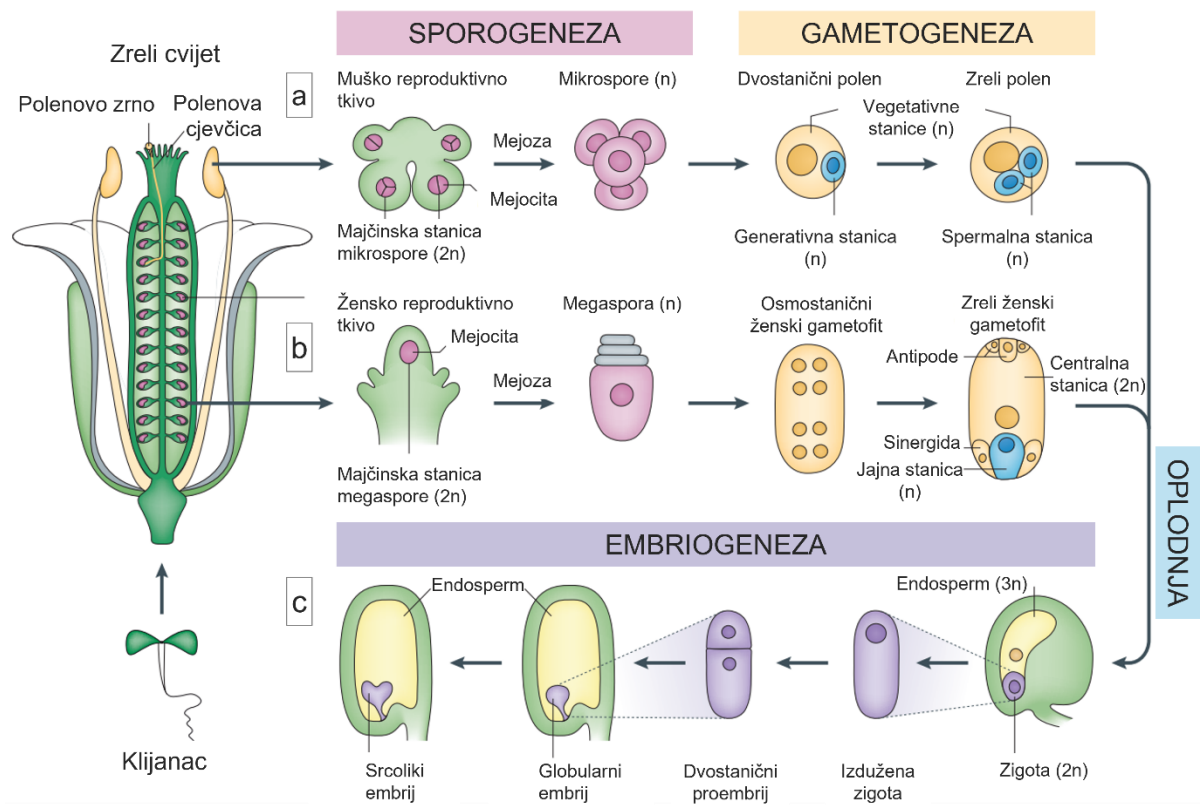
2.1. Životni ciklus cvjetnica

Razvoj biljaka i životinja, iako sličan u nekim aspektima, temeljen je na brojnim različitostima i specifičnim procesima. Dvije jedinstvene karakteristike koje odlikuju životni ciklus biljaka cvjetnica jesu izmjena generacija i dvostruka oplodnja. Izmjena generacija podrazumijeva postojanje dvije razvojne faze, diploidnog sporofita i haploidnog gametofita, koje se izmjenjuju tijekom životnog ciklusa, ispunjavajući potpuno različite uloge. Sporofit je diploidna struktura čiji se razvoj odvija kroz fazu embriogeneze, klijanja, juvenilne te odrasle faze koja završava cvjetanjem. Na staničnoj razini, sporofit je diploidna struktura koja mejozom proizvodi haploidne spore iz kojih se potom, kroz proces gametogeneze, razvijaju muški i ženski gametofit. Gametofit je haploidna struktura čija je suštinska uloga stvaranje gameta. Oba gametofita sastavljena su od tek nekoliko stanica, a prilikom oplodnje dvije spermalne stanice oplođuju dvije ženske gamete, jajnu i središnju stanicu čime nastaju zigota i endosperm te otpočinje embriogeneza (Walbot i Evans, 2003; slika 1).

Premda sporofit predstavlja dominantnu fazu životnog ciklusa, želja za boljim razumijevanjem strukture i razvoja gametofita temelj je mnogobrojnih istraživanja. Razvoj muškog i ženskog gametofita započinje u reproduktivnom tkivu u kasnom stadiju razvoja cvijeta. Prvi korak u razvoju muškog gametofita je specifikacija prekursora, mejocita (majčinske stanice mikrospore), iz somatskih stanica unutarnjeg sloja prašnice (dio prašnika) u razvoju (Berger i Twell, 2011; slika 1a). Slijedi mejoza kojom iz muške mejocite nastaju četiri haploidne mikrospore u procesu sporogeneze. Asimetričnom mitotskom diobom iz svake mikrospore nastaju vegetativna i generativna stanica (Twell, 2010). Generativna stanica još se jednom podijeli čime nastaju dvije spermalne stanice koje zajedno s vegetativnom stanicom tvore zreli muški gametofit (peludno zrno, mikrogametofit). Pri razvoju ženskog gametofita, iz mejocite mejozom nastaju četiri megaspore od kojih samo jedna ostaje funkcionalna dok ostale tri propadaju (slika 1b). Funkcionalna megaspore prolazi kroz tri uzastopne mitoze čime nastaje gametofit s osam jezgara (Berger i Twell, 2011). Nakon svakog ciklusa mitoze, novonastale jezgre migriraju i zauzimaju specifične pozicije unutar zajedničke citoplazme. Nakon treće mitoze, dvije jezgre sa svakog pola gametofita migriraju prema središtu gdje će fuzionirati u tzv. središnju jezgru (Yadegari i Drews, 2004). Citokinezom se jezgre razdvajaju te tvore zreli ženski gametofit koji se naziva embrionska vreća ili megagametofit, a sastoji se od četiri različita tipa stanica; haploidne jajne stanice, diploidne središnje stanice i pomoćnih stanica

antipoda na halazalnom kraju, te dviju sinergida koje okružuju jajnu stanicu na suprotnom mikropilarnom kraju (Kawashima i Berger, 2014).

Prilikom oplodnje, nepokretne spermalne stanice prenose se do ženskog gametofita kroz peludnu cjevčicu koja se razvija usmjerenom elongacijom vegetativne stanice (Kawashima i Berger, 2011). Dolazi do dvostruke oplodnje pri čemu jedna spermalna stanica oplođuje jajnu, a druga središnju stanicu ženskog gametofita. Oplodnjom jajne stanice nastaje zigota, dok iz središnje stanice nastaje triploidni endosperm koji će služiti kao izvor hranjivih tvari za razvoj zigote i mladog embrija tijekom rane embriogeneze (Li i Berger, 2012; slika 1c).



Slika 1. Izmjena generacija u životnom ciklusu vrste *Arabidopsis thaliana*. U zreloj fazi razvoja cvijeta, iz pojedinih somatskih stanica muških i ženskih reproduktivnih tkiva diferenciraju se mejozite odnosno majčinske stanice mikrospre i megaspore. (a) U procesu mikrosporogeneze, iz majčinske stanice mikrospre mejozom nastaju četiri funkcionalne mikrospre. Mikrospre prolaze kroz asimetričnu diobu kojom nastaju vegetativna i generativna stanica. Generativna stanica se još jednom podijeli i nastaju dvije spermalne stanice koje s vegetativnom stanicom tvore zreli muški gametofit (peludno zrno). (b) U procesu megasporogeneze, iz majčinske

stanice megaspore mejozom nastaju četiri megaspore od kojih je samo jedna funkcionalna. Megaspora prolazi kroz tri uzastopne diobe jezgre čime nastaje gametofit s osam jezgara. Zatim sa svakog pola gametofita migrira jedna jezgra prema središtu. Jezgre ovdje fuzioniraju u središnju jezgru. Slijedi citokineza kojom se jezgre razdvajaju i tvore zreli ženski gametofit s četiri različita tipa stanica (embrionska vreća). (c) Pri oplodnji, spermalne stanice se prenose do ženskog gametofita peludnom cjevčicom. Dvostrukom oplodnjom nastaje zigota okružena endospermom. Zigota se izduži prije prve asimetrične diobe kojom nastaje proembrij koji se dalje razvija kroz globularni i srcoliki stadij do zrelog stadija sposobnog za klijanje. Preuzeto i prilagođeno iz Kawashima i Berger, 2014.

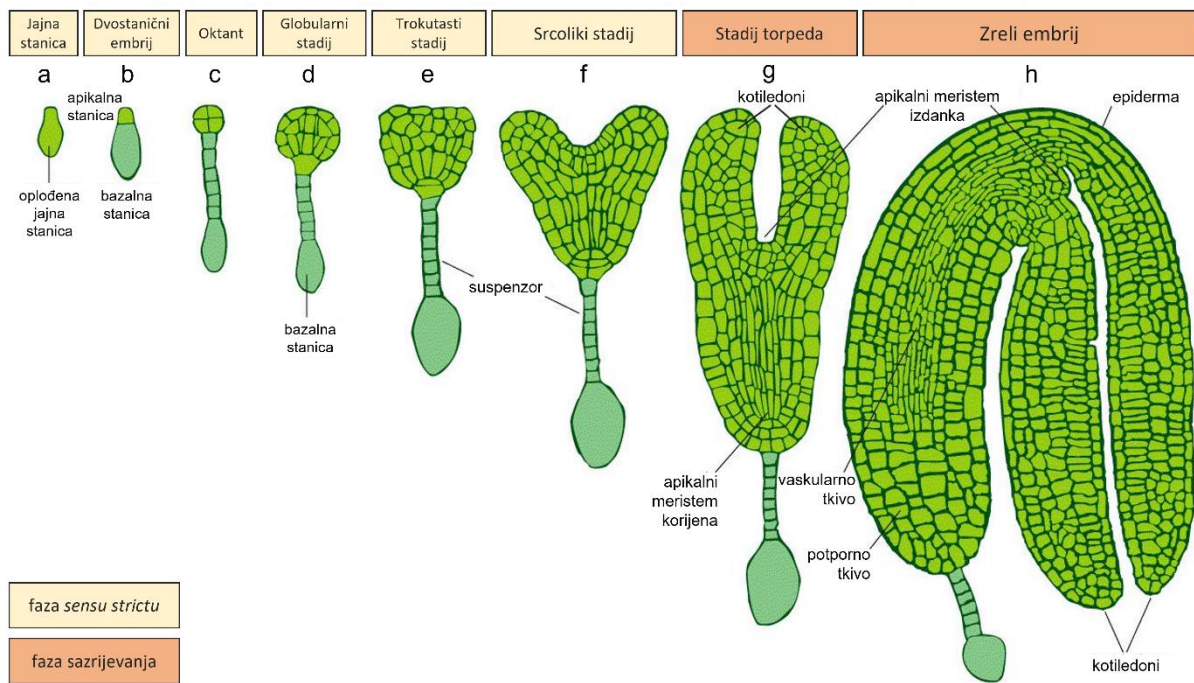
2.1.1. Zigotna embriogeneza uročnjaka

Zigotna embriogeneza (ZE) predstavlja dominantni tip embriogeneze u biljkama, a započinje prethodno opisanom dvostrukom oplodnjom. Proces zigotne embriogeneze može se podijeliti na embriogenezu *sensu strictu*, koja podrazumijeva morfogenezu embrija i endosperma, te fazu sazrijevanja embrija i sjemena, koja uključuje rast embrija, akumulaciju hranjivih tvari i sušenje sjemena (Winkelmann, 2016).

Prva faza, embriogeneza *sensu strictu*, započinje gubitkom polarosti jajne stanice, a završava srcolikim stadijem embrija (slika 2a-f). Do gubitka polarosti dolazi neposredno nakon oplodnje, nakon čega slijedi repolarizacija i elongacija zigote duž apikalno-bazalne osi (Wendrich i Weijers, 2013). Zigota se zatim asimetrično podijeli na apikalnu i bazalnu stanicu koje se razlikuju u strukturi i funkciji (slika 2b). Iz male, citoplazmom bogate apikalne stanice razviti će se embrij, dok će iz izdužene bazalne stanice s vakuolom nastati suspensor. U prvoj fazi embriogeneze, apikalna i bazalna stanica dijele se nizom uzastopnih dioba po definiranom obrascu; apikalna stanica podliježe dvjema vertikalnim i jednoj horizontaloj diobi, stvarajući osam proembrionalnih stanica, dok bazalna stanica podliježe nizu horizontalnih dioba. Navedenim diobenim ciklusima nastaje oktant, stadij kojeg tvore proembrij sastavljen od osam stanica raspoređenih u dva sloja, nastao iz apikalne stanice, te hipofiza i suspensor, nastali iz bazalne stanice (slika 2c). Suspensor je struktura koja pozicionira embrij unutar embrionalne vreće, provodi hranjive tvari do embrija u razvoju te služi kao izvor hormona potrebnih za uspostavu polarosti. Suspensor se tijekom embriogeneze kritosjemenjača uklanja programiranom staničnom smrću, u fazi između globularnog i torpedo stadija (Bozhkov i sur.,

2005). U sljedećem stadiju, dermatogenu (slika 2d), na apikalno-bazalnoj osi embrija jasno se razlikuju tri regije: apikalna, središnja i bazalna. Ove se regije međusobno razlikuju prema obrascu daljnjih dioba kao i po razvojnoj funkciji. Iz gornjeg sloja proembrionalnih stanica razviti će se apikalni dio embrija s kotiledonima i meristemom izdanka, dok će iz donjeg sloja nastati središnji, hipokotilni dio embrija. Iz bazalne zone razvija se korijen i proksimalni meristem korijena. Bazalna regija nastaje iz jedne stanice, hipofize, te će se iz nje razviti ostatak meristema korijena. Posljednji stadij *sensu strictu* embriogeneze jest sroliki. Sroliki stadij karakterizira prisutnost apikalnog meristema izdanka i korijena te ranih kotiledona (Jürgens, 2001; slika 2f).

Faza sazrijevanja embrija i sjemena može se podijeliti na ranu i kasnu (slika 2g-h). Rano sazrijevanje podrazumijeva rast embrija i akumulaciju hranjivih tvari, dok kasno sazrijevanje uključuje gubitak vode i uspostavu dormantnog stanja (O'Neill i sur., 2019). Nakon završetka embriogeneze, embrij se nalazi u stanju mirovanja u kojem ostaje do početka klijanja (Winkelmann, 2016).



Slika 2. Razvitak embrija vrste *Arabidopsis thaliana*. a) Zigotna embriogeneza započinje oplodnjom jajne stanice i nastankom zigote. b) Asimetričnom diobom zigote nastaju apikalna i bazalna stanica. c) Embrij nastao iz apikalne stanice sačinjavaju dva sloja od po četiri stanice.

Iz bazalne stanice formiraju se hipofiza i suspensor. d) Globularni stadij. e) Trokutasti stadij. f) Sroliki stadij. g) Stadij torpeda. Vidljivi su jasno definirani kotiledoni. h) Zreli embrij (savijeni kotiledonarni stadij). Preuzeto i prilagođeno s Multimedia portal, 2020.

2.1.2. Somatska embriogeneza uročnjaka

Somatska embriogeneza (SE) temelji se na totipotentnosti biljnih stanica, a podrazumijeva razvoj embrija neovisno o oplodnji, odnosno iz somatskih stanica (Fehér, 2005). Razlikujemo direktnu SE, kada se embrij razvija direktno iz eksplantata, i indirektnu SE, koja uključuje nastanak prijelazne faze kalusa. Fenomen SE je *in vivo* opisan tek kod nekoliko biljnih vrsti, primarno roda *Kalanchoe*, kod kojih je opisan razvoj embrija na urezima listova (Yarbrough, 1932). U kulturi tkiva, somatska embriogeneza je prvi put uočena u staničnoj suspenziji mrkve (Steward i sur., 1958; Reinert, 1959), a danas je dobro poznat proces u raznim biljnim vrstama. Proces somatske embriogeneze može se podijeliti na dvije faze, fazu indukcije (poticanja) i fazu sazrijevanja. Somatska embriogeneza može se potaknuti tretmanom početnog eksplantata auksinom, a najčešće se u ovu svrhu koristi sintetski auksin, 2,4-diklorofenoksiocetna kiselina (2,4-D) koji se dodaje u hranjivu podlogu. U fazi indukcije somatske stanice izložene optimalnoj koncentraciji auksina prolaze kroz procese dediferencijacije te uspostave kompetentnosti za embriogenezu (Fehér, 2005; Elhiti i sur., 2013).

Faza sazrijevanja započinje nakon premještanja eksplantata na podlogu bez auksina, kada dolazi do formiranja somatskih embrija i razvoja preglobularnog, globularnog, srolikog, torpednog i kotiledonarnog stadija (Joshi i sur., 2022).

Somatska embriogeneza danas se standardno koristi kao model za proučavanje embriogeneze budući da somatski embriji, unatoč različitim ishodišnim točkama, prolaze jednake stadije razvoja te uspostavljaju istovjetni razvojni mehanizam kao i oni nastali zigotnom embriogenezom (Kurczyńska i sur., 2007). Istraživanja usmjerena na funkcionalnu karakterizaciju gena specifično eksprimiranih tijekom SE identificirala su nekoliko dominantnih kategorija proteina: transkripcijske faktore, proteine povezane s receptorima progesterona, proteine povezane sa staničnim ciklusom, proteine povezane sa staničnim zidom i proteine uključene u signalizaciju (Yang i Zhang, 2010). Usporednom analizom ZE i SE u

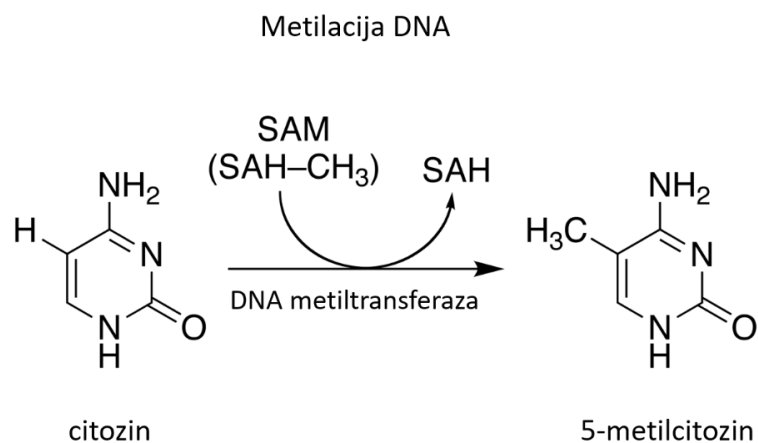
pamuku utvrđeno je kako se više od 50 % gena visoko eksprimiranih tijekom embrionalnog razvoja podudara između somatske i zigotne embriogeneze. Ovi geni obuhvaćaju gene uključene u odgovor na stres, regulaciju sudbine embrija, staničnu diobu, polarnost i definiranje obrazaca te metilaciju (Jin i sur., 2013).

Neka istraživanja ukazuju na odstupanja SE u odnosu na zigotnu embriogenezu. Primjerice, utvrđeno je kako prva dioba prilikom nastanka somatskih embrija iz različitih stanica u suspenziji mrkve može biti i simetrična i asimetrična (Toonen i sur., 1994), dok je prva asimetrična dioba ključna za pravilan razvoj zigotnih embrija. Također, suspensor čiji je nastanak uvjetovan prvom asimetričnom diobom, jasno se razvija kod somatskih embrija golosjemenjača, dok u somatskoj embriogenezi kritosjemenjača ova struktura uglavnom nije jasno diferencirana ili čak u potpunosti nedostaje (Dodeman i sur., 1997). Nadalje, razvoj somatskih embrija može odstupati od razvoja zigotnih zbog odsustva endosperma koji okružuje embrij prilikom zigotne embriogeneze i na taj način ograničava njegov rast, ali i kroz specifične interakcije sudjeluje u razvoju embrija. Ovakav slučaj zabilježen je u ciklami *Cyclamen persicum*, gdje somatski embriji imaju tri puta veće stanice i nepravilniju površinu od zigotnih (Hoenemann i sur., 2010). Također, istraživanjem somatske embriogeneze kukuruza utvrđene su malformacije u razvoju meristema izdanka kod direktne embriogeneze, dok je u slučaju indirektno embriogeneze utvrđen pravilan razvoj (Emons i Kieft., 1991). Na temelju ovakvih rezultata, pretpostavljena je nova uloga kalusa prilikom razvoja somatskih embrija, gdje kroz sintezu signalnih molekula utječe na razvoj embrija i tako preuzima ulogu endosperma (Matthys-Rochon, 2005), iako ulogu endosperma može preuzeti i izvanstanični matriks oslobođen u hranjivu podlogu (Leljak-Levanić i sur., 2015). Još jedan bitan zaključak proizašao iz brojnih komparativnih istraživanja somatske i zigotne embriogeneze jest da somatski embriji akumuliraju manje metabolita, što rezultira i preranim klijanjem (Winkelmann, 2016; Rodríguez i sur., 2005), iako prerano klijanje može biti i posljedica nepostojanja sekundarnog endosperma i sjemene lupine, te izostanka dormancije (Leljak-Levanić, osobna komunikacija). Unatoč navedenim izazovima s kojima se susrećemo pri somatskoj embriogenezi, ovaj modelni sustav je nezamjenjiv alat u fundamentalnim istraživanjima biljne embriogeneze.

Brze diobe stanica i podudarne promjene obrazaca razvoja i ekspresije gena u pozadini su i zigotne i somatske embriogeneze, a temelje se na brzim epigenetskim promjenama (Ji i sur., 2019). Glavni epigenetski mehanizam odgovoran za regulaciju oba tipa embriogeneze jest metilacija.

2.2. Metilacija DNA

Metilacija DNA je najčešća eukariotska epigenetska modifikacija otkrivena u sisavcima nedugo nakon otkrića same DNA kao genetičkog materijala. Unatoč tome, otkrivanje značaja i širine njezina djelovanja započelo je tek 1980-ih godina, kada je potvrđena uloga metilacije DNA u regulaciji ekspresije gena te posljedično, staničnoj diferencijaciji. Regulacija ekspresije ostvaruje se inhibicijom vezanja transkripcijskih faktora na DNA ili regrutacijom proteina odgovornih za represiju gena, pri čemu slijed nukleotida ostaje nepromijenjen. Metilacija se uspostavlja dodatkom metilne skupine na citozin čime nastaje 5-metilcitozin. Ovu reakciju katalizira obitelj metiltransferaza koje prenose metilnu skupinu sa S-adenozilmetionina na peti ugljikov atom citozina (Moore i sur., 2013; slika 3). Različite metiltransferaze aktivne su u različitim fazama razvoja te u metilaciji citozina ovisno o okruženju u kojem se nalazi. Kontekst ili citozinsko okruženje definira se na temelju nukleotida koji okružuju citozin, a razlikujemo simetrično i asimetrično okruženje. Simetrična metilacija DNA prisutna je na oba lanca i ostvaruje se u okruženju CG i CHG, dok se asimetrična metilacija uspostavlja samo na jednom lancu i to u citozinskom okruženju CHH, gdje H označava A, C ili T (Matzke i Mosher, 2014).



Slika 3. Metilacija DNA. Za uspostavu metilacije odgovorne su DNA metiltransferaze, a donor metilne skupine jest S-adenozilmetionin (SAM). Metilacija se ostvaruje prijenosom metilne skupine na poziciju C5 citozina čime nastaje 5-metilcitozin, dok se S-adenozilmetionin (SAM) konvertira u S-adenozilhomocistein (SAH). Preuzeto i prilagođeno iz Ciechomska i sur., 2019.

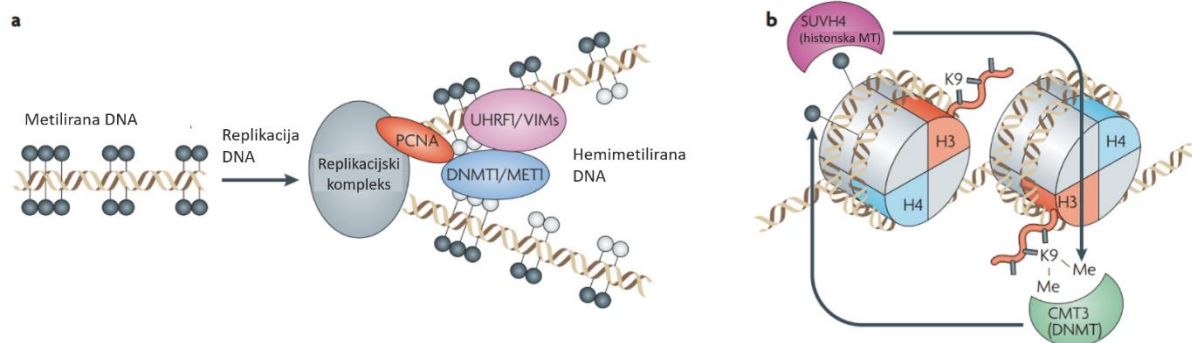
2.2.1. Mehanizmi metilacije DNA

Metilacija DNA je dinamična modifikacija čiji se status mijenja kroz demetilaciju i ponovnu uspostavu kroz različite faze životnog ciklusa. U eukariota, specifični metilacijski obrasci uklanjaju se tijekom gametogeneze te ponovo uspostavljaju u embriogenezi (Saitou i sur., 2012). Kako bi metilacijski status s jedne strane mogao biti stabilna osobina stanične funkcije, a s druge strane uspostavljan svaki put iznova, postoje dva mehanizma metilacije; jedan odgovoran za održavanje i nasljeđivanje uspostavljenog stanja te drugi odgovoran za metilaciju DNA *de novo*. Održavanje metilacijskog statusa podrazumijeva očuvanje postojećih metilacijskih obrazaca kroz metilaciju novog lanca hemi-metilirane DNA nakon svakog ciklusa replikacije, dok metilacija *de novo* podrazumijeva metilaciju prethodno nemetilirane sekvence te je odgovorna za ponovnu uspostavu metilacijskih obrazaca tijekom razvoja. Kao i u slučaju funkcioniranja specifičnih metiltransferaza u različitim metilacijskim okruženjima, funkcija metiltransferaza definira se i prema tome jesu li zadužene za održavanje postojećeg obrasca metilacije ili pak uspostavu novih obrazaca. Također, različite vrste eukariota razlikuju se u tipu metiltransferaza koje posjeduju, te je opisan niz metiltransferaza specifičnih za pojedine vrste (Matzke i Mosher, 2014).

Kod sisavaca, metilacija se ostvaruje gotovo isključivo modifikacijom citozina iza kojeg slijedi gvanin, odnosno u okruženju CG. Tri su aktivne metiltransferaze kod sisavaca: DNMT1, DNMT3A i DNMT3B. Metiltransferaza DNMT1 (engl. *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1*) je zadužena za održavanje metilacije zajedno s kofaktorom UHRF1 (engl. *ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1*) i proteinom PCNA (engl. *proliferating cell nuclear antigen*), komponentom replikacijskog kompleksa. Protein UHRF1 posjeduje domenu SRA (engl. *SET and RING-associated*) kojom prepoznaje hemimetilirana mjesta CG te regrutira DNMT1, koja zatim održava metilacijski obrazac metilacijom novosintetiziranog lanca DNA (Bostick i sur., 2007; slika 4a). Za inicijalnu ili metilaciju *de novo* u sisavaca su zadužene metiltransferaze DNMT3A (engl. *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha*) i DNMT3B (engl. *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta*). Opisan je i treći član porodice DNMT3, protein DNMT3L (engl. *DNMT3-like*), čija je funkcija regrutacija i regulacija aktivnosti metiltransferaza DNMT3A i DNMT3B (He i sur., 2011). Protein DNMT3L svojom amino-terminalnom domenom stupa u interakciju s nemetiliranim histonom H3K4 te dovodi metiltransferazu DNMT3A na specifična mjesta na genomu. Za uspostavu metilacije

odgovoran je tetramerni kompleks sastavljen od dva proteina DNMT3A omeđena s dva proteina DNMT3L (Law i Jacobsen, 2010).

Kod biljaka, uspostava i održavanje metilacijskih obrazaca nešto su složeniji. Metilacija je ovdje prisutna u sva tri okruženja te su opisane tri biljne DNA metiltransferaze. Za održavanje metilacije CG zadužena je metiltransferaza MET1 (engl. *methyltransferase 1*), homolog proteina DNMT1 iz sisavaca, zajedno s kofaktorima DDM1 (engl. *decrease in DNA methylation 1*) (Vongs i sur., 1993), te VIM (engl. *variant in methylation*), koji je homolog proteina UHRF1 (Woo i sur., 2008). Mehanizam održavanja metilacije u okruženju CG podudara se s onim u sisavaca (slika 4a). Druga metiltransferaza CMT3 (engl. *chromomethylase 3*), homolog DNMT3, prisutna je isključivo u biljkama i zadužena je za održavanje metilacije u okruženju CHG zajedno s histonskom metiltransferazom SUVH4 (engl. *SU(VAR)3-9 homolog 4*), kroz petlju koja uključuje metilaciju histona i DNA (Johnson i sur., 2007; Lindroth i sur., 2004; slika 4b).



Slika 4. Mehanizmi održanja metilacije u okruženju CG i CHG. a) Za održavanje metilacije u okruženju CG u sisavaca zaduženi su metiltransferaza DNMT1 i kofaktor UHRF1, dok u biljkama ovu ulogu obavljaju njihovi homolozi, metiltransferaza MET1 i kofaktor VIM. Kofaktori UHRF1/VIM prepoznaju hemimetiliranu DNA te regrutiraju metiltransferaze DNMT1 odnosno MET1, koje metiliraju novonastali lanac DNA. b) Metilaciju u okruženju CHG u biljkama održavaju metiltransferaze CMT3 i SUVH4. Histonska metiltransferaza SUVH4 pomoću domene SRA prepoznaje i veže CHG metilaciju te katalizira dimetilaciju lizina na histonu H3 (H3K9me2). Metiltransferaza CMT3 se pomoću kromodomene veže na metilirani histon H3 i uspostavlja metilaciju citozina u okruženju CHG. Preuzeto i prilagođeno iz Law i Jacobsen, 2010.

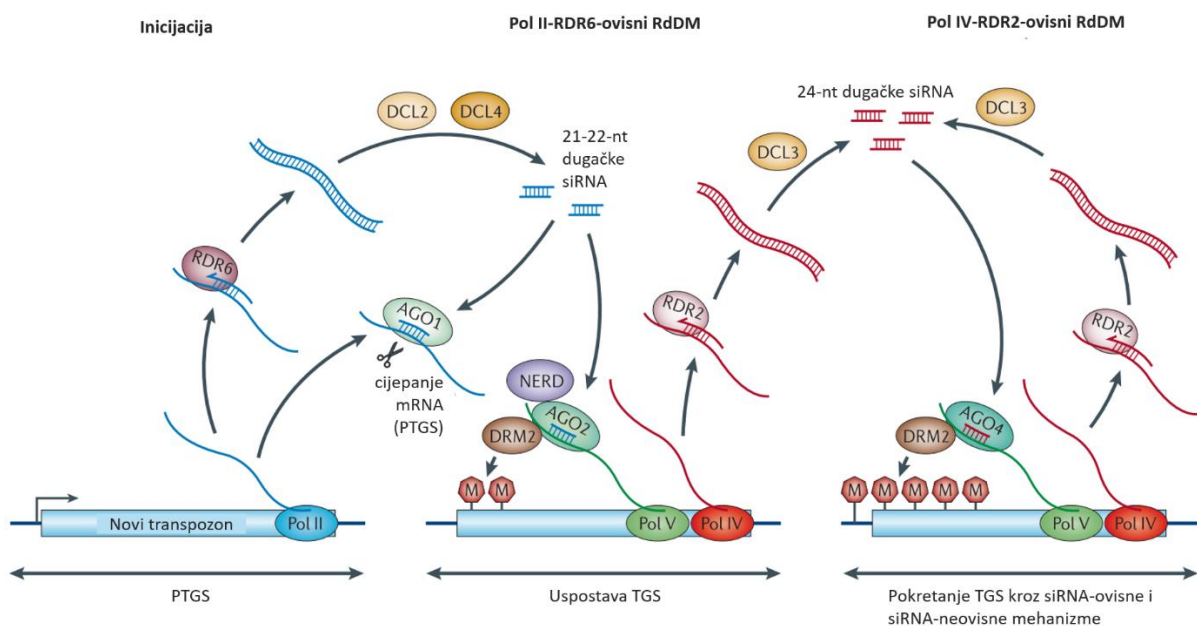
Treća opisana metiltransferaza u biljaka, DRM2 (engl. *domains rearranged methyltransferase 2*), je primarna metiltransferaza odgovorna za okruženje CHH, ali i za uspostavu *de novo* metilacije u sva tri okruženja (He i sur., 2011). Dok se metilacija u simetričnim okruženjima nasljeđuje nakon replikacije DNA i može se održavati pasivno, održavanje metilacije asimetričnog okruženja CHH je kompleksnije te zahtjeva aktivni signal. Ovaj signal u biljkama prenose male interferirajuće molekule RNA (engl. *small interfering RNA*; siRNA) koje metiltransferazu DRM2 usmjeravaju na ciljno mjesto, a svoju funkciju obavljaju u sklopu mehanizma metilacije DNA posredovane malim molekulama RNA (RdDM).

2.2.2. Mehanizam metilacije DNA *de novo* u biljaka

Premda je već opisana uloga malih molekula RNA u posttranskripcijskom utišavanju gena, otkriće uloge molekula RNA dugačkih 24 nukleotida u sklopu mehanizma metilacije DNA posredovanjem malih molekula RNA i transkripcijskom utišavanju dovelo je do potpunijeg razjašnjenja mehanizma uspostave i održavanja metilacijskih obrazaca u biljaka. Mehanizam RdDM glavni je epigenetski mehanizam u biljaka, a inicijalno je otkriven u biljkama zaraženim RNA patogenima (Wassenegger i sur., 1994; Jones i sur., 1998). Uz obranu od patogena, primarna uloga ovog mehanizma jest kontrola transpozona, a uključen je i u odgovor na stresne uvjete, reprodukciju te uspostavu genomskog utiska tijekom embriogeneze (Matzke i Mosher, 2014).

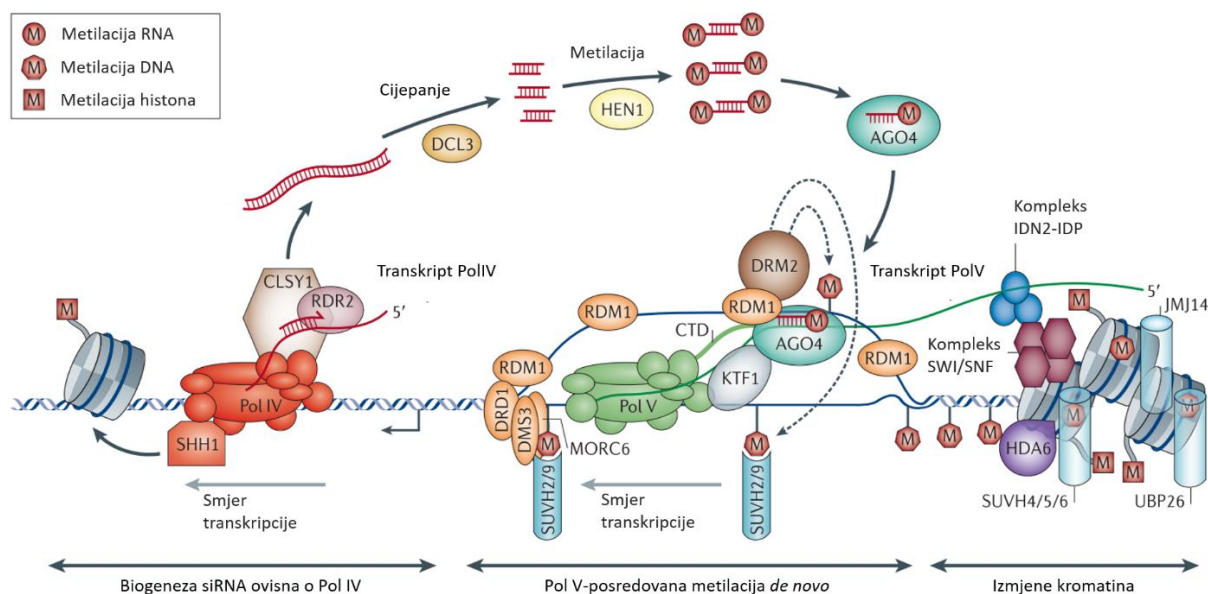
Na temelju uloge i komponenata koje sudjeluju u mehanizmu RdDM, razlikujemo kanonski i nekanonski mehanizam. Ova dva mehanizma međusobno su povezana. Premda slabije istražen, poznato je kako nekanonski mehanizam prethodi kanonskom na način da utišava ekspresiju novo-ugrađenih transpozona te uspostavlja uvjete potrebne za inicijaciju kanonskog mehanizma. Zabilježeno je više različitih varijanti nekanonskog mehanizma, kojima je zajedničko da glavne funkcije izvode RNA polimeraza II (Pol II), RNA-ovisna RNA polimeraza 6 (RDR6) i molekule siRNA dugačke 21-22 nukleotida. Prvi korak u kontroli aktivnosti novougrađenog transpozona jest posttranskripcijsko utišavanje (slika 5). Neposredno nakon ugradnje, transpozon je aktivan i transkribira se djelovanjem enzima Pol II. Dio transkripata veže polimeraza RDR6 i pretvara ih u dvolančane molekule RNA (diRNA) koje potom proteini DCL2 (engl. *dicer-like 2*) i DCL4 (engl. *dicer-like 4*) procesiraju u molekule

siRNA dugačke 21-22 nukleotida. Ove siRNA tvore kompleks s proteinom AGO1 (engl. *argonaute 1*) te na ovaj način upravljaju cijepanjem transkripata transpozona (Matzke i Mosher, 2014). Međutim, neke od molekula siRNA mogu stupiti u interakciju s proteinima AGO2 (engl. *argonaute 2*), metiltransferazom DRM2, RNA polimerazom V (Pol V) i proteinom NERD (engl. *needed for RDR2-independent DNA methylation*; Pontier i sur., 2012) te dovesti do uspostave niske razine metilacije, što rezultira transkripcijskim utišavanjem gena. *De novo* metilacija uspostavljena na ovaj način služi kao signal za regrutaciju enzima Pol IV, čime započinje kanonski put (Nuthikattu i sur., 2013).



Slika 5. Nekanonski mehanizam RdDM. Nekanonski mehanizam predstavlja sponu između posttranskripcijske (engl. *post-transcriptional gene silencing*; PTGS) i transkripcijske (engl. *transcriptional gene silencing*; TGS) razine utišavanja gena. Novo-ugrađeni transpozoni u početku se prepisuju djelovanjem enzima Pol II. Neke od ovih transkripata veže polimeraza RDR6 te proizvodi dvolančane produkte DNA koje zatim proteini DCL2 i DCL4 cijepaju u siRNA dugačke 21-22 nukleotida (nt). Ove siRNA tvore kompleks s proteinom AGO1 i kroz ovu interakciju upravljaju cijepanjem transpozonskih mRNA. Neke od siRNA mogu stupiti u interakciju s proteinom AGO2 te pomoću proteina DRM2, Pol V i NERD uspostaviti inicijalnu *de novo* metilaciju. Ova metilacija regrutira Pol IV čime započinje kanonski mehanizam RdDM. Preuzeto i prilagođeno iz Matzke i Mosher, 2014.

Kanonski mehanizam RdDM ostvaruje se djelovanjem dviju biljno-specifičnih RNA polimeraza, Pol IV i Pol V, i njihovih pomoćnih faktora. Na temelju aktivnosti dviju glavnih komponenata, mehanizam se može podijeliti u dva dijela: Pol IV-ovisnu biogenezu siRNA i Pol V-posredovanu *de novo* metilaciju (slika 6). Put započinje regrutacijom polimeraze Pol IV na ciljna mjesta na genomu, prvenstveno transpozone i ostala ponavljanja. U regrutaciji sudjeluje protein SHH1 (engl. *sawadee homeodomain homologue 1*) koji prepoznaje metilaciju histona H3K9me (Law i sur., 2013). Polimeraza Pol IV prvo proizvodi jednolančanu P4-RNA (engl. *Pol IV-dependent RNA*), pri čemu joj pomaže kromatin-remodelirajući faktor CLSY1 (engl. *classy 1*; Law i sur., 2011). Jednolančana RNA potom se konvertira u dugačku dlRNA djelovanjem RNA-ovisne RNA polimeraze 2 (RDR2). Dvolančana RNA procesira se u male interferirajuće RNA dugačke 24 nukleotida djelovanjem proteina DCL3 (engl. *dicer-like 3*). Male RNA potom se metiliraju na 3' kraju djelovanjem proteina HEN1 (engl. *hua enhancer 1*; Ji i Chen, 2012) te prenose u citoplazmu gdje se ugrađuju u protein AGO4 (engl. *argonaute 4*), koji ih ponovo vraća u jezgru u kojoj se odvija drugi dio mehanizma. Drugi dio mehanizma započinje aktivnošću polimeraze V koja proizvodi duge nekodirajuće RNA na ciljnom lokusu. Za regrutaciju polimeraze V na kromatin zaduženi su proteini SUVH2 i SUVH9 (engl. *SU(VAR)3-9 homolog 2*; *SU(VAR)3-9 homolog 9*), koji pomoću domene SRA prepoznaju i vežu metilcitozine (Liu i sur., 2014), te kompleks DDR sastavljen od proteina RDM1 (engl. *RNA-directed DNA methylation 1*), DMS3 (engl. *defective in meristem silencing 3*) i DRD1 (engl. *defective in RNA-directed DNA methylation 1*) (Zhong i sur., 2012). Protein DRD1 pomoću svoje kromatin-remodelirajuće aktivnosti olakšava aktivnost Pol V te stabilizira kompleks (Wongpalee i sur., 2019), dok protein DMS3 sudjeluje u regrutaciji Pol V kroz interakciju s proteinima SUVH2 i SUVH9 (Liu i sur., 2014). Polimeraza V regrutira AGO4 pomoću C-terminalne domene svoje najveće podjedinice NRPE1 (engl. *nuclear RNA polymerase E1*). Transkript polimeraze V se na temelju komplementarnosti sparuje s molekulama siRNA u kompleksu s proteinom AGO4. Protein RDM1 povezuje AGO4 s metiltransferazom DRM2 koja potom katalizira metilaciju DNA *de novo* (Matzke i Mosher, 2014; slika 6).



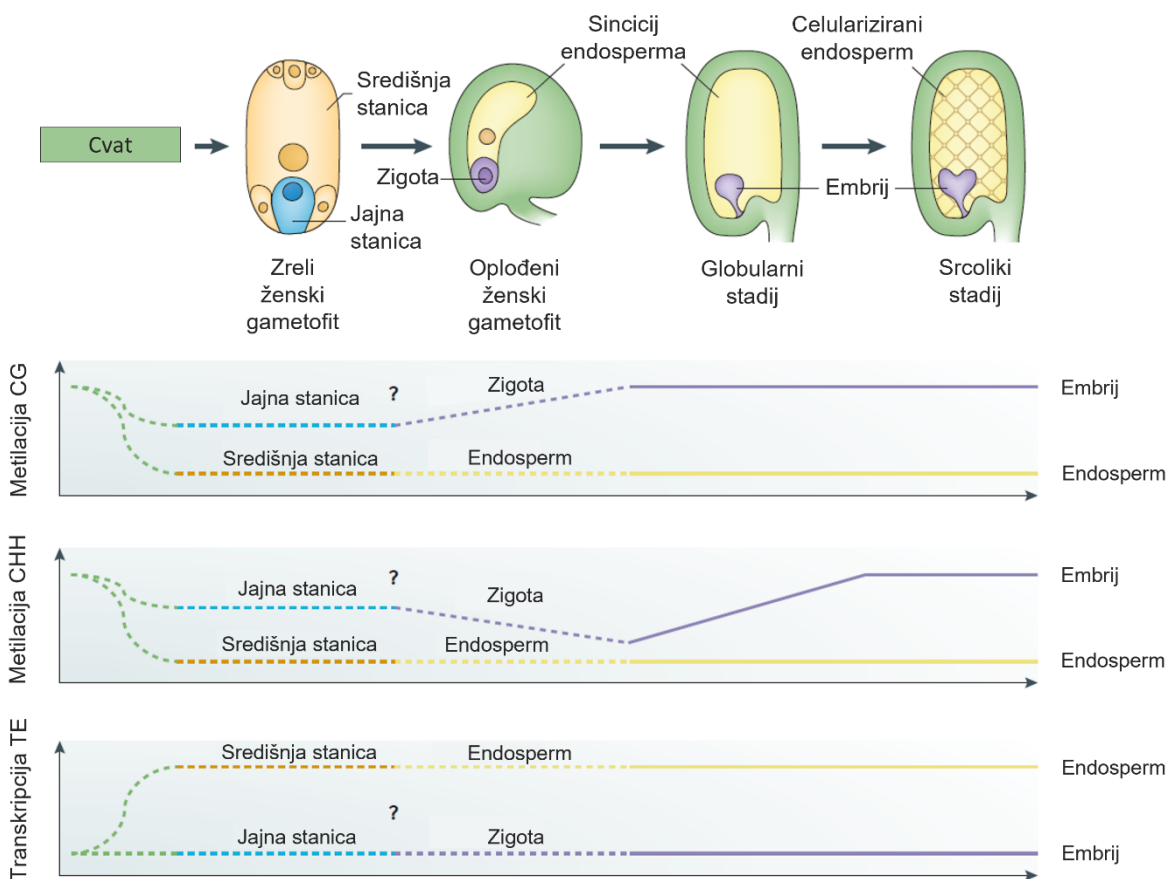
Slika 6. Kanonski mehanizam RdDM. Prvi dio mehanizma posredovan je aktivnošću polimeraze Pol IV. Protein SHH1 pomoć faktora CLSY1 proizvodi jednolančanu P4-RNA. Jednolančana RNA konvertira se u dugačku dvolančanu RNA djelovanjem RDR2. Dvolančana RNA se djelovanjem proteina DCL3 procesira u siRNA dugačku 24 nukleotida koja se zatim metilira na 3' kraju djelovanjem proteina HEN1 te prenosi u citoplazmu gdje tvori kompleks s proteinom AGO4. Drugi dio mehanizma započinje regrutacijom Pol V, za što su zaduženi proteini SUVH2 i SUVH9, koji vežu metilcitozine, te kompleks DDR. Pol V proizvodi dugačku nekodirajuću RNA koja se sparuje sa siRNA u kompleksu s AGO4. Protein RDM1 iz kompleksa DDR povezuje AGO4 s DRM2 koja katalizira metilaciju DNA *de novo*, nakon čega slijede modifikacije histona. Preuzeto i prilagođeno iz Matzke i Mosher, 2014.

2.2.3. Uloga metilacije u embriogenezi uročnjaka

Embriogeneza je period intenzivnog razvoja u svih eukariota. Procesi diferencijacije i dediferencijacije koji se pritom odvijaju temelje se na epigenetskim promjenama koje omogućuju brze promjene ekspresije gena. U slučaju indukcije somatske embriogeneze, ove su promjene potaknute egzogenim auksinom (Gaj, 2004). Istraživanjima je utvrđeno kako prilikom indukcije SE u uročnjaka dolazi do hipermetilacije DNA, što je rezultat povećane ekspresije metiltransferaza (Grzybkowska i sur., 2018). U uročnjaku, tijekom indukcije SE dominira aktivnost metiltransferaza MET1 i CMT3, čiju ekspresiju potiče egzogeno dodani auksin. Period indukcije obilježen je i smanjenjem ekspresije demetilaza, dok u fazi maturacije

značajno raste aktivnost metiltransferaze DRM2 (Grzybkowska i sur., 2018). Osim u somatskoj embriogenezi, utvrđeno je kako je metilacija DNA temeljna epigenetska modifikacija koja upravlja i zigotnom embriogenezom (Xiao i sur., 2006). Opširne epigenetske modifikacije koje su temelj biljnog razvoja objedinjene su pod pojmom epigenetsko reprogramiranje.

Epigenetsko reprogramiranje podrazumijeva dinamične promjene globalne metilacije DNA i histonskih modifikacija koje se odvijaju između različitih razvojnih stadija. Premda u biljkama ove promjene nisu opsežne kao kod ostalih eukariota, utvrđeno je da do reprogramiranja ipak dolazi, i to u dva razvojna stadija; gametogenezi i embriogenezi. Tijekom gametogeneze dolazi do smanjenja metilacije DNA za što su odgovorne biljno-specifične demetilaze DME (engl. *demeter*)/ROS1 (engl. *repressor of silencing 1*) te niska ekspresija metiltransferaza odgovornih za održavanje metilacije (Gehring i sur., 2006; Gong i sur., 2002). Nakon završetka gametogeneze, u jajnoj stanici je dokazana visoka ekspresija metiltransferaza DRM odgovornih za metilaciju *de novo*, ali i ostalih komponenata mehanizma RdDM, što upućuje na njegovu ključnu ulogu u gametogenezi (Jullien i sur., 2012). Oplodnja jajne stanice obilježava početak embrionalnog razvoja te djeluje kao okidač ekspresije gena koji kodiraju i ostale biljno-specifične metiltransferaze, MET1 i CMT3. Visoka razina ekspresije ostaje prisutna tijekom rane embriogeneze, što rezultira porastom metilacije tijekom razvoja embrija. Porast metilacije najizraženiji je u kontekstu CHH i doseže vrhunac u zrelim embrijima, u kojim velik broj mjesta CHH dostiže zasićenje (Bouyer i sur., 2017; slika 7). Uspostava metilacije *de novo* tijekom razvoja embrija vjerojatno ima ulogu u očuvanju integriteta genoma embrija od štetnog djelovanja transpozona (Kawashima i Berger, 2014). Međutim, oplodnja središnje stanice kojom započinje razvoj endosperma ima suprotan učinak. U ranom endospermu dolazi do hipometilacije, koja je osobito izražena u okruženju CHH koje pokazuje hipermetilaciju u embriju (Gehring, 2013). Ovaj je fenomen inicijalno objašnjen time da hipometilacija u endospermu omogućuje proizvodnju molekula siRNA koje potom putuju u embrij gdje upravljaju metilacijom odgovarajućih regija (Bauer i Fischer, 2011; Lafon-Placette i Kohler, 2014). Kasnijim istraživanjima na modelu somatske embriogeneze utvrđeno je kako i somatski embriji pokazuju hipermetilaciju ovih mjesta unatoč nedostatku endosperma (Ji i sur., 2019), čime je prethodna hipoteza opovrgnuta. Danas se pretpostavlja kako je metilacija embrija sasvim autonomna (Chakraborty i sur., 2021).



Slika 7. Epigenetsko reprogramiranje tijekom četiri razvojna stadija zigotne embriogeneze. U zreom gametofitu dolazi do smanjenja metilacije u okruženjima CG i CHH. Nakon oplodnje metilacija citozina raste u okruženju CG te se stabilizira na samom početku embriogeneze. U okruženju CHH, metilacija citozina opada neposredno nakon oplodnje te počinje rasti u embriogenezi i doseže najvišu razinu u zreim embrijima. Metilacija središnje stanice endosperma ostaje niska tokom cijelog embrionalnog razvoja, čime je omogućena transkripcija transpozona (TE). Preuzeto i prilagođeno iz Kawashima i Berger, 2014.

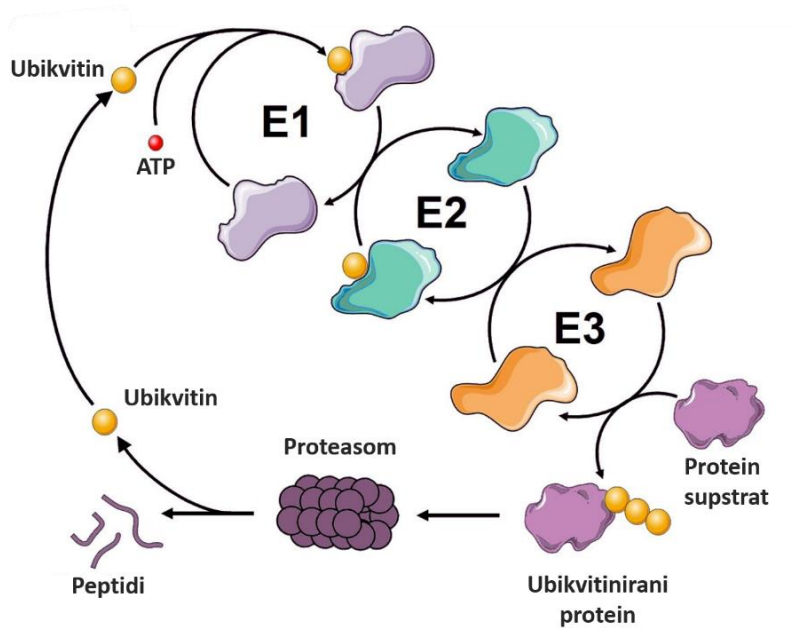
Premda proces epigenetskog reprogramiranja tijekom biljne embriogeneze još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, jasno je kako upravo brze promjene DNA metilacije stoje iza ovih dinamičnih razvojnih procesa. Istraživanja su pokazala kako je aktivnost mehanizma RdDM najviša upravo tijekom embriogeneze, što upućuje na zaključak da upravo tada ovaj mehanizam ostvaruje svoju primarnu ulogu. Iako postoji velik broj komponenata ovog puta čije su uloge detaljno istražene (Gallego-Bartolomé i sur., 2019), dodatnim istraživanjima utvrđene su interakcije ovih komponenata s nizom proteina uključenih u stanične procese sa značajnom

aktivnosti i nakon perioda embriogeneze, odnosno tijekom cijelog životnog ciklusa biljke (Han i sur., 2019). Jedan od tih proteina je i BPM1 iz *A. thaliana*, koji pripada potporodici MATH-BTB proteina.

2.3. Proteini porodice MATH-BTB

Proteini MATH-BTB dio su velike porodice proteina BTB. Proteini BTB dobili su ime prema domeni koju posjeduju, izvorno opisanoj kao konzervirani motiv prisutan u transkripcijskim represorima „*Bric-A-Brac*“, „*Tramtrack*“, „*Broad Complex*“ vrste *Drosophila melanogaster*, prema kojima je domena i dobila ime (Zollman i sur., 1994). Ova domena identificirana je i u brojnim „*zinc finger*” proteinima Pox virusa zbog čega se često naziva i POZ domenom (Bardwell i Treisman, 1994). Uz domenu BTB, proteini porodice BTB uglavnom posjeduju i sekundarnu domenu, na temelju koje je definirano nekoliko potporodica uključujući potporodicu MATH-BTB (Stogios i sur., 2005). Otkriće uloge proteina MATH-BTB u putu ubikvitin-ovisne proteasomalne degradacije popraćeno je nizom istraživanja njihove funkcije, zbog čega je danas uloga upravo ove potporodice proteina BTB najbolje opisana.

Ubikvitin-ovisna proteasomalna degradacija je primarni proteolitički put u eukariota (Smalle i Vierstra, 2004), a temelji se na aktivaciji i prijenosu ubikvitina na ciljni protein. Ubikvitin je mali, visoko konzervirani protein čije vezanje na ciljni protein predstavlja signal za prepoznavanje i posljedičnu degradaciju istog od strane proteasoma 26S. Ovakva modifikacija ciljnog proteina naziva se ubikvitinacija, a većinom se ostvaruje vezanjem poliubikvitinskog lanca na lizinsku podjedinicu proteina. Ubikvitinacija je reverzibilan proces kataliziran enzimskom kaskadom u tri koraka (slika 8). Prvi korak jest ATP-ovisna aktivacija ubikvitina djelovanjem ubikvitin-aktivirajućeg enzima (E1). Nakon aktivacije slijedi reakcija konjugacije pri čemu se ubikvitin prenosi s E1 na ubikvitin-konjugirajući E2 enzim. Posljednji korak je ligacija, gdje se ubikvitin prenosi na konačnog primatelja, odnosno protein koji se usmjerava u degradaciju (Dang i sur., 2021). U ovom koraku često posreduju ligaze E3 koje igraju ulogu u prepoznavanju ciljnog proteina odnosno supstrata za razgradnju. Kao posljednje, ali i najbrojnije i najraznolikije komponente kaskade, ligaze osiguravaju specifičnost reakcije.



Slika 8. Proces ubikvitinacije proteina. Na temelju aktivnosti uključenih enzima, proces se može podijeliti na tri koraka: aktivaciju, konjugaciju i ligaciju. Tijekom koraka aktivacije, enzim E1 aktivira ubikvitin uz potrošnju ATP-a, zatim se ubikvitin prenosi s E1 na E2 enzim u koraku konjugacije, dok posljednji ligacijski korak podrazumijeva prijenos ubikvitina na supstrat uz pomoć E3 enzima. Preuzeto i prilagođeno iz Zerr, 2022.

Proteini MATH-BTB sudjeluju upravo u posljednjem koraku ubikvitinacije, kao dio kompleksa kulin 3-ovisnih E3 ligaza. Njihova je uloga prvo opisana u obliku *Caenorhabditis elegans* kroz identifikaciju kompleksa uključenog u degradaciju proteina MEI-1 prilikom tranzicije iz mejoze u mitozu (Pintard i sur., 2003). Strukturna analiza pokazala je da osim kulina 3 koji tvori okosnicu ligaze E3, kompleks sačinjavaju protein RBX1 te protein MEL-26 (engl. *maternal effect lethal-26*). Detaljnom strukturnom analizom proteina MEL-26 utvrđeno je kako se radi o proteinu MATH-BTB (Pintard i sur., 2003). Na temelju ovog istraživanja, donesena je hipoteza o ulozi proteina MATH-BTB kao supstrat-specifičnih adaptera ključnih za prepoznavanje supstrata u kompleksu ligaza ovisnih o kulinu 3. Istraživanja u drugim vrstama potvrdila su ovu hipotezu (Ingham i McMahon, 2001; Zhuang i sur., 2009; Juranić i sur., 2012; Chen i sur., 2013).

Uloga proteina porodice MATH-BTB u sklopu mehanizama proteinske razgradnje različitih regulatornih proteina funkcionalno je razjašnjena tek u nekoliko organizama. Zajedničko obilježje mehanizama jest da svi proteini MATH-BTB svojom BTB domenom vežu

protein CUL-3, dok MATH domenom vežu specifične supstrate i upućuju ih u proteasomalnu razgradnju (Xu i sur., 2003). Noviji radovi ukazuju i na sudjelovanje proteina MATH-BTB u kulin neovisnim mehanizmima te jednom proteinu pripisuju više uloga.

2.3.1. Razvojne uloge proteina MATH-BTB u animalnim organizmima

Prethodno spomenuti protein MEL-26 iz vrste *C. elegans* jedan je od najbolje istraženih pripadnika potporodice MATH-BTB. Protein MEL-26 je postmejotski negativni regulator proteina MEI-1. Protein MEI-1 (engl. *meiosis-1*) pripada obitelji ATP-aza (Clark-Maguire i Mains, 1994) te je uključen u uspostavu mejotskog vretena kroz degradaciju mikrotubula čime olakšava ekstruziju polarnih tijela (Srayko i sur., 2000). Budući da se mejotsko i mitotsko diobeno vreteno morfološki razlikuju, uklanjanje proteina MEI-1 prilikom tranzicije iz mejoze u mitozu nužno je za uspostavu funkcionalnog mitotskog vretena. Za ovu ulogu odgovoran je protein MEL-26 koji kroz interakciju s proteinom CUL-3 prepoznaje i usmjerava regulator mikrotubula MEI-1 u degradaciju. Osim uloge supstrat-specifičnog adaptera, protein MEL-26 i sam je supstrat koji se usmjerava u degradaciju putem kompleksa CUL-3 (Pintard i sur., 2003). Uz prethodno opisanu ulogu adaptera, utvrđena je i dodatna funkcija ovog proteina neovisna o kompleksu s proteinom CUL3. Do ovog zaključka dovela je identifikacija nove interakcije proteina MEL-26, s aktin-vezujućim proteinom POD-1 (engl. *polarity and osmotic sensitivity defective*). Premda se ova interakcija ostvaruje putem MATH domene, dokazano je kako svrha ove interakcije nije proteasomalna degradacija. Protein POD-1 regruitira MEL-26 te zajedno tvore kompleks koji je potreban za normalno formiranje i održavanje diobene brazde u citokinezi. Prema tome, protein MEL-26 ima dvostruku ulogu u ranoj embriogenezi: kao supstrat-specifični adapter CUL-3 kompleksa, te kao aktivator citokineze u kompleksu s proteinom POD-1 mehanizmom neovisnim o proteasomalnoj razgradnji (Luke-Glaser i sur., 2005).

Jedini dosad opisani protein MATH-BTB u vrsti *D. melanogaster* jest HIB (engl. *Hedgehog-induced MATH and BTB domain containing protein*). Protein HIB je negativni regulator signalnog puta Hedgehog bitnog u mnogim razvojnim procesima, a kojim upravljaju transkripcijski faktori Ci/Gli (Ingham i McMahon, 2001). Kao dio kompleksa CUL-3 ovisnih E3 ligaza, protein HIB veže transkripcijski faktor Ci, te ga usmjerava u ubikvitinaciju i degradaciju. Opisana regulacija ključna je u normalnom razvoju oka (Zhang i sur., 2006).

Homolog proteina HIB u sisavaca je protein SPOP (engl. *speckle-type POZ protein*) koji također ima ulogu adaptera u procesu ubikvitinacije te regulira niz signalnih puteva. Supstrati ovog proteina imaju konzerviranu domenu SBC (engl. *SPOP Binding Consensus*). Neki od supstrata proteina SPOP su transkripcijski regulator Ci, fosfataza Puc (engl. *Puckered*) te protein DAXX (engl. *death-associated protein 6*) uključen u transkripciju, regulaciju staničnog ciklusa i apoptozu (Zhuang i sur., 2009; Mani, 2014). Uz primarnu ulogu u procesu ubikvitinacije, utvrđene su i dodatne specijalizirane funkcije ovog proteina koje nisu posredovane procesom proteasomalne razgradnje. Primjerice, opisana je uloga proteina SPOP u regulaciji vezanja histona MacroH2A1 prilikom inaktivacije X kromosoma. Vezanje MacroH2A1 na X kromosom predstavlja jedan od mehanizama epigenetske represije odgovornih za stabilizaciju utišanog stanja (Hernández-Muñoz i sur., 2005).

Humani protein SPOP (HsSPOP) također posjeduje niz supstrata te kroz njihovu regulaciju sudjeluje u hormonskoj signalizaciji, regulaciji staničnog ciklusa te epigenetskoj kontroli. Među supstrate spadaju hormonski receptori, ali i transkripcijski faktori poput PDX1 s ulogom u dijabetesu (Claiborn i sur., 2010), te proteini BET i BRMS1, s ulogom u razvoju raka. Proteini BET djeluju kao transkripcijski koaktivatori onkogenih faktora AR i ERG uključenih u razvoj raka prostate. Porodici BET proteina pripadaju proteini BRD2, BRD3 i BRD4, za koje je utvrđeno da su supstrati proteina HsSPOP (Dai i sur., 2017). Još jedan supstrat proteina HsSPOP, protein BRMS1, je transkripcijski regulator s ulogom u supresiji metastaziranja u raku dojke (Kim i sur., 2011). Kroz regulaciju ovih transkripcijskih faktora, HsSPOP može indirektno djelovati kao tumorski supresor, ali i kao onkogen (Cuneo i Mittag, 2019).

2.3.2. Razvojne uloge proteina MATH-BTB u biljaka

U biljkama je opisan homolog proteina MEL-26. Riječ je o proteinu ZmMAB1 iz kukuruza, eksprimiranom isključivo u muškom i ženskom gametofitu te zigoti (Juranić i sur., 2012). Opisana je funkcija ovog proteina u organizaciji mikrotubula diobenog vretena, kao i pozicioniranju i određivanju identiteta jezgri tijekom mejoze II i prve mitotske diobe u obje spolne linije biljaka. Protein ZmMAB1 može stvarati homodimere te interagira s proteinom CUL3a, što upućuje na njegovu ulogu u kompleksu kulin 3-ovisnih E3 ligaza i interakciju sa supstratima poput AAA-ATPaza p60 i kompleksa katanin. Ove interakcije upućuju na

zaključak kako je funkcija ZmMAB1 homologna onoj proteina MEL26 iz *C. elegans* (Juranić i sur., 2012).

U pšenici je opisan protein TaMAB2 koji je eksprimiran isključivo tijekom rane embriogeneze, točnije u zigoti i proembriju (Leljak-Levanić i sur., 2013). Dokazana je direktna interakcija proteina TaMAB2 s proteinom CUL3, što upućuje na to kako i ovaj protein može vršiti ulogu adaptera opisanu za većinu proteina MATH-BTB. Kao potencijalni interaktori i supstrati za degradaciju, identificirani su citoskeletni proteini aktin i tubulin, kao i eukariotski faktori inicijacije translacije eIF3 i eIF4. Ove interakcije upućuju na ulogu proteina TaMAB2 u inicijaciji translacije u ranoj embriogenezi (Bauer i sur., 2019). Međutim, iako je pokazana interakcija proteina TaMAB2 s proteinom CUL3, niti CUL3A niti CUL3B nisu detektirani u kompleksu s proteinom TaMAB2 metodom tandemske afinitetne purifikacije. Ovakvi rezultati sugeriraju da TaMAB2 možda preferentno djeluje putem kulin 3-neovisnog mehanizma.

2.3.2.1. Proteini BPM 1-6 vrste *Arabidopsis thaliana*

Genom uročnjaka sadrži šest MATH-BTB gena imenovanih *AtBPM1* do *AtBPM6*. Iako ovu porodicu u uročnjaku tvori samo 6 članova, dobro je poznata njihova uloga i značaj kao supstrat-specifičnih adaptera CUL3-ovisnih E3 ligaza. Domenom BTB smještenom u C-terminalnoj regiji interagiraju s CUL3, dok preko MATH domene smještene na N-terminusu vežu supstrate (Chen i sur., 2013). Kao njihovi ciljni proteini identificirani su brojni transkripcijski faktori koji pripadaju različitim porodicama. Primjerice, utvrđena je interakcija s dva pripadnika porodice HD-ZIP (engl. *homeodomain leucine zipper*): protein ATHB6, koji je uključen u regulaciju odgovora na abscizinsku kiselinu (Himmelbach i sur., 2002), interagira sa svih šest proteina BPM, dok ATHB16, koji sudjeluje u regulaciji odgovora na svjetlost (Wang i sur., 2003), interagira s BPM3 (Lechner i sur., 2011). Također, dokazana je negativna regulacija transkripcijskih faktora porodice ERF/AP2 (engl. *ethylene response factor/Apetala2*). Protein BPM1 ostvaruje interakciju sa sljedećim članovima ove obitelji: ERF1 (engl. *ethylene response factor 1*), ERF4 (engl. *ethylene response factor 4*), RAV1 (engl. *related to abi3/vp1*), WRI1 (engl. *wrinkled 1*) (Chen i sur., 2013) i DREB2a (engl. *dre-binding protein 2a*) (Morimoto i sur., 2017). Dobro je opisana interakcija s transkripcijskim faktorom WRI1. Protein WRI1 se pomoću domene AP2 veže na molekulu DNA i olakšava transkripciju gena uključenih u sintezu masnih kiselina. Kulin 3 kompleks veže WRI1 dok je vezan na ciljna

mjesta na DNA, a ova interakcija posredovana je proteinima BPM (Chen i sur., 2013). Treća obitelj transkripcijskih faktora koja je pod kontrolom proteina BPM jest R2R3-MYB, a najpoznatiji predstavnik ove obitelji jest MYB56 (engl. *myb domain protein 56*) uključen u regulaciju cvjetanja (Chen i sur., 2015). Premda sastavljena od tek šest članova, obitelj proteina BPM kroz interakcije s navedenim transkripcijskim faktorima indirektno regulira niz staničnih procesa.

Širina djelovanja i brojnost interakcija proteina BPM i danas su pokretači mnogih istraživanja. U najnovijem od njih, kolokalizacijskim i interakcijskim metodama utvrđeno je da protein BPM1, osim s navedenim transkripcijskim faktorima, interagira i s komponentama uključenim u metilaciju DNA, proteinima DMS3 i RDM1 (Jagić i sur., 2022). Navedeni proteini dio su kompleksa DDR uključenog u mehanizam metilacije DNA posredovan malim molekulama RNA ukazujući na potpuno novu ulogu porodice MATH-BTB pri regulaciji metilacije DNA. Također, utvrđene interakcije nisu posredovane isključivo domenom MATH, upućujući na zaključak kako se proteini DMS3 i RDM1 ne usmjeravaju u proteasomalnu razgradnju već se radi o CUL-3-neovisnom mehanizmu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijal

U svim eksperimentima koristila sam divlji tip (wt) uročnjaka (*A. thaliana* L.), ekotip Columbia (Col-0) kao kontrolu.

Za provedbu kromatinske imunoprecipitacije, koristila sam uročnjak genetičke pozadine *cul3^{hyp}* s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*cul3^{hyp} oeEGFP-BPM1*; neobjavljeno), odnosno gena *DMS3* (*cul3^{hyp} oeEGFP-DMS3*; Jagić i sur., 2022) fuzioniranog sa zelenim fluorescentnim proteinom (engl. *Green Fluorescent Protein*; GFP). Ove linije korištene su zbog toga što je u genetičkoj pozadini *cul3^{hyp}* smanjena funkcionalnost kulina 3A (CUL3A) (Thomann i sur., 2009), te sam očekivala smanjenu stopu razgradnje proteina BPM1 za koji je poznato da podliježe razgradnji sustavom proteasomalne razgradnje posredovanim CUL3 (Leljak-Levanić i sur., 2012).

U analizi metilacije i ekspresije, koristila sam transgene linije *oeBPM1-GFP* (Škiljaica i sur., 2019) i *oeDMS3-GFP* (neobjavljeno) s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1*, odnosno *DMS3* fuzioniranih sa proteinom GFP.

Uz gore navedene linije, koristila sam i transgenu liniju *dms3-1* s nefunkcionalnim proteinom DMS3 (Kanno i sur., 2008) te transgenu liniju *nrpe1-10* s nefunkcionalnim proteinom NRPE1, koji čini najveću podjedinicu RNA-polimeraze V (Eun i sur., 2012). Ove linije služile su kao kontrola djelovanja mehanizma RdDM u odabranim regijama.

U svrhu analize aktivnosti promotora gena *FBW2*, konstruirala sam transgenu liniju *pFBW2:GUS*. Ova linija je dobivena transformacijom uročnjaka (*A. thaliana* L., ekotip Col-0) metodom *floral dip*, a sadrži reporterski gen za β -glukuronidazu pod kontrolom promotora gena *FBW2*.

3.1.2. Sojevi bakterija

Za umnažanje generiranih plazmidnih konstrukata koristila sam kemijski kompetentne stanice bakterije *Escherichia coli* XL10-Gold® (Stratagene, kat.br.: 200314) s rezistencijom na tetraciklin i kloramfenikol, te Stellar™ HST04 (Clontech, kat.br.: 636763).

Za transformaciju uročnjaka metodom *floral dip*, koristila sam elektrokompetente stanice *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) (Gold Biotechnology®). Soj GV3101 ima kromosomsku pozadinu soja C58 s rezistencijom na rifampicin te sadrži plazmid pMP90 (pTiC58DT-DNA) s rezistencijom na gentamicin (Koncz i Schell, 1986).

3.1.3. Plazmidni vektori

Vektor pGEM®-T Easy (3015 pb) koristila sam za ugradnju produkata lančane reakcije polimeraze (PCR) za sekvenciranje te transformaciju kompetentnih stanica XL10-Gold®. Ovaj vektor nosi gen za rezistenciju na ampicilin te gen *lacZ* za β-galaktozidazu, što omogućuje plavo-bijelu selekciju transformanata.

Vektor pHGWFS7 (13124 pb) koristila sam u reakciji *In-Fusion* ugradnje promotora gena *FBW2* i za transformacije kompetentnih stanica Stellar™ (HST04). Vektor posjeduje gen za rezistenciju na spektinomycin za selekciju bakterijskih transformanata, te gen za rezistenciju na higromicin za selekciju transformanata u biljkama.

3.1.4. Hranjive podloge i supstrati za uzgoj biljaka

3.1.4.1. Hranjiva podloga za uzgoj uročnjaka

Za isključavanje sjemenki uročnjaka koristila sam krutu MS podlogu s dodatkom agara (8 g/L, pH 5,8; Murashige i Skoog, 1962) i odgovarajuće selekcijske komponente ovisno o liniji, dok sam za uzgoj klijanaca koristila tekuću podlogu MSØ, s dodatkom MES-K soli (0,583 g/L) (Sigma-Aldrich®) koja služi za stabilizaciju pH vrijednosti podloge, te saharoze (20 g/L).

Za indukciju somatske embriogeneze koristila sam hranjivu podlogu E5 (Gaj, 2011), pH vrijednosti 5,8, s dodatkom 2,4-diklorofenoksiotene kiseline (E5 + 2,4-D), dok je za sazrijevanje somatskih embrija korištena ista podloga bez dodatka auksina (E5Ø).

Sve podloge bile su autoklavirane 18 min na temperaturi od 121 °C, pri tlaku od 1,5 bara. Komponente za selekciju pojedinih transgenih linija bile su filter-sterilizirane i dodane u već autoklaviranu podlogu, a ovisile su o prisutnom selekcijskom markeru (tablica 1).

Tablica 1. Vrsta i konačna koncentracija selekcijskih komponenata korištenih pri uzgoju transgenih biljnih linija.

Linija	Selekcijski marker	Koncentracija [$\mu\text{g/mL}$]
oeBPM1-GFP	glufosinat-amonijum	30
oeDMS3-GFP	glufosinat-amonijum	30
<i>nrpe1-10</i>	higromicin	50
<i>dms3-1</i>	higromicin	50

3.1.4.2. Supstrat za uzgoj biljaka

Klijance i odrasle biljke uročnjaka uzgajala sam na supstratu Steckmedium KLASMANN, Klasmann-Deilmann GmbH.

3.1.5. Hranjive podloge za uzgoj bakterija

Za oporavak kompetentnih bakterijskih stanica nakon toplinskog šoka, priredila sam tekuću SOC podlogu (20 g/L tripton; 5 g/L ekstrakt kvasca; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM glukoza) ili komercijalnu podlogu *SOC Outgrowth Medium* (New England Biolabs, kat.br.: B9020).

Za uzgoj bakterija nakon transformacije koristila sam podlogu LB (10 g/L tripton; 5 g/L ekstrakt kvasca; 10 g/L NaCl) pH vrijednosti 7,0, sa i bez dodatka agara (15 g/L). Za selekciju transformiranih bakterija XL10-Gold®, koristila sam podlogu s dodatkom ampicilina (konačna koncentracija 100 ng/mL) kako bih osigurala rast samo bakterija koje su primile pGEM®-T Easy vektor, uz dodatak IPTG (izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid, konačna koncentracija 0,5 mM) i X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid, konačna koncentracija 80 $\mu\text{g/mL}$). Za selekciju transformiranih bakterijskih stanica Stellar™, koristila sam podlogu s dodatkom spektinomomicina (konačna koncentracija 50 ng/mL) kako bi narasle samo bakterije

koje su uspješno transformirane vektorom pHGWFS7, uz dodatak IPTG (konačna koncentracija 0,5 mM) i X-Gal (konačna koncentracija 32 µg/mL).

Pripremljene podloge su autoklavirane na način opisan za podloge za uzgoj biljaka.

3.1.6. Puferi i kompleti

Sastav svih pufera te korišteni komercijalni kompleti dodatno su navedeni u prilogu rada (Prilog 8.1.).

3.1.7. Početnice

Za proizvodnju svih korištenih početnica koristila sam servis MacroGen (*MacroGen Europe | NGS and Sanger Sequencing Service Provider*). Početnice sam otopila u ultračistoj Milli-Q vodi prema uputama proizvođača te čuvala na -20 °C. Radna koncentracija početnica iznosila je 10 µM, osim u slučaju reverzne biotinizirane početnice, kada sam koristila 5 µM.

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj biljnog materijala

U svrhu dobivanja biljnog materijala za provedbu kromatinske imunoprecipitacije te analize metilacije i ekspresije, sjemenke prethodno navedenih linija sterilizirala sam prije nasađivanja na hranjivu podlogu. Postupak sterilizacije sjemenki sastojao se od ispiranja u 1 mL 70 %-tnog etanola 1 min, 10 min inkubacije u 1 mL sterilizacijske otopine (1 % Izosan® G (Pliva) i 0,1 % Mukazol (Sigma-Aldrich®)) uz miješanje, nakon čega sam sjemenke pet puta ispirala sterilnom destiliranom vodom (5 x 1 mL) te ostavila u 500 µL sterilne vode do nasađivanja.

Sterilizirane sjemenke nasađivala sam na krute podloge MSØ u sterilnim uvjetima laminara. Za selekciju transgenih biljaka, u podlogu MSØ dodavala sam odgovarajuću selekcijsku komponentu nakon prohlađivanja do temperature ~50-55 °C (kako bi se izbjegla degradacija selekcijskih komponenti). Izlijevala sam po 25 mL podloge u svaku petrijevu ploču (ø90 mm). Nakon što su se hranjive podloge polimerizirale, nasađivala sam približno 100 sjemenki po petrijevoj ploči. Za uzgoj klijanaca, po 2 mg sjemenki svake linije nasađivala sam

u 1 mL tekuće podloge MSØ s dodatkom MES-K soli i saharoze u malim petrijevim pločama (ø60 mm). Petrijeve ploče s nasađenim sjemenkama omotala sam parafilmom kako bi se spriječilo isušivanje hranjive podloge i stavila na stratifikaciju u tami 72 h na 4 °C. Nakon stratifikacije, ploče s nasađenim sjemenkama preselila sam u uzgoj u uvjete dugog dana (16 h svjetlo/8 h tama, 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) na 24 °C. Petog i devetog dana uzgoja, klijancima je dodano po 1,5 mL tekuće podloge kako bi se nadoknadio potrošeni volumen. Jedanaest dana stare klijance sakupljala sam pincetom, osušila na papirnatom ručniku, smrzavala u tekućem dušiku te pohranjivala na -80 °C. Za potrebe izolacije DNA skupljala sam približno 100 mg tkiva, dok sam za izolaciju RNA uzorkovala po 10 klijanaca.

Za potrebe kromatinske imunoprecipitacije, jedanaestog dana uzgoja, klijance linija *cul3^{hyp} oeBPM1* i *cul3^{hyp} oeDMS3* uzgojene na krutim podlogama premjestila sam na 37 °C u uvjete konstantnog svjetla (120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) tijekom 24 h, kako bi se stabilizirao protein BPM1 (Škiljaica i sur., 2019) te ih sakupljala na gore opisan način. Za svaku navedenu liniju sakupila sam tri biološke replike sa po 2 g klijanaca u svakoj.

Za poticanje daljnjeg razvoja biljaka uročnjaka, dvanaest dana stare klijance presađivala sam na zemljani supstrat, nakon čega sam ih 7 dana uzgajala u uvjetima kratkog dana (8 h svjetlo/16 h tama, 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Biljčice sam naposljetku stavila u uvjete dugog dana, na 50 % relativne vlažnosti i 24 °C, u kojima su rasle do cvatnje. Tkivo cvjetića (~50 ng) sam pincetom uzorkovala u mikroeprovete od 1,5 mL (Eppendorf), smrzavala u tekućem dušiku te pohranjivala na -80 °C do izolacije DNA.

Komuške razvijene na zrelih biljčicama koristila sam za izolaciju embrija korištenih za indukciju somatske embriogeneze.

3.2.2. Indukcija somatske embriogeneze i razvoj embrija

Kao eksplantat za indukciju somatskih embrija koristila sam kotiledonarni stadij zigotnog embrija. Sa stapki linija odabranih za analizu (wt, *oeBPM1-GFP*, *oeDMS3-GFP*, *dms3-1*, *nrpe1-10*) pincetom sam uzorkovala komuške intenzivne zelene boje, duljine oko 1 cm, koje sadrže embrije u ovom stadiju razvoja (Gaj, 2011). Komuške sam sakupila u mikroeprovete od 1,5 mL te sterilizirala prema protokolu opisanom za sjemenke.

Nekoliko sterilnih komuški stavila sam na petrijevu ploču (ø90 mm) te dodala par kapi sterilne destilirane vode radi lakše manipulacije. Svaku komušku sam potom pomoću

inzulinskih iglica otvorila duž septuma te nježno sastrugala sjemene zametke u vodu. Ostatke komuške sam uklonila. Na sjemene zametke sam položila pokrovnicu te ju nekoliko puta lagano pritisnula iglicom kako bi se embriji oslobodili. Iglicom sam odignula i maknula pokrovnicu, pod lupom uzorkovala izolirane kotiledonarne embrije te ih pomoću iglice nasađivala na podlogu za indukciju somatske embriogeneze (E5 + 2,4-D). Nasađivala sam 30 embrija po petrijevoj ploči (ø90 mm), a za svaku liniju sam nasadila po dvije petrijeve ploče kako bih osigurala dovoljnu masu uspješno induciranih embrija. Ploče s nasađenim embrijima omotala sam parafilmom kako bi se spriječilo isušivanje te uzgajala u uvjetima dugog dana (16 h svjetlo/8 h tama, $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) na $24 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom pet dana.

Uz embrije koje sam koristila za indukciju somatske embriogeneze, uzorkovala sam i kotiledonarne embrije koji će mi služiti za analizu zigotne embriogeneze. Embrije sam sakupljala u sterilnu destiliranu vodu u mikroeprevetama od 1,5 mL koje sam tijekom izolacije držala na ledu. Kako bih dobila dovoljnu masu tkiva za uspješnu izolaciju DNA, sakupljala sam 120 kotiledonarnih embrija po uzorku, nakon čega sam pomoću inzulinske šprice uklonila vodu iz uzoraka i smrznula ih uranjanjem u tekući dušik. Uzorke sam čuvala na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do korištenja. Cijeli postupak provodila sam u sterilnim uvjetima laminara.

Nakon pet dana uzgoja na indukcijskoj podlozi, pregledala sam embrije pomoću lupe kako bih identificirala one na kojima je potaknuta somatska embriogeneza. Oni se prepoznaju po razvoju embriogenog kalusa vidljivog kao sitne nakupine bijele boje na bazi kotiledona zigotnog embrija (Wójcikowska i Gaj, 2016).

Dio induciranih embrija sam uzorkovala u laminaru, pomoću inzulinske iglice prenijela u mikroeprevete od 1,5 mL te smrznula u tekućem dušiku i pohranila na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do izolacije DNA i RNA. Ostatak sam sterilnom inzulinskom iglicom prenijela na prethodno priređene podloge za sazrijevanje embrija bez auksina 2,4-D (E5Ø). Petrijeve ploče sam omotala parafilmom te uzgajala u uvjetima dugog dana na $24 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom deset dana. Kotiledonarne embrije sam uzorkovala i pohranila kako je prethodno opisano.

3.2.3. Izolacija DNA

3.2.3.1. Izolacija genomske DNA

Za izolaciju DNA iz uzoraka cvjetića, klijanaca i embrija, koristila sam modificiranu metodu s deterdžentom cetil trimetilamonijevim bromidom (CTAB). Uzorke tkiva pohranjene na -80 °C sam izvadila i držala u tekućem dušiku do samog početka izolacije. Izolaciju DNA iz uzorkovanih tkiva započela sam homogenizacijom tkiva pomoću staklenih kuglica (SiLibeads Typ S 1,00 – 1,30 mm) i uređaja Silamat (Silver Mix 90 Mixer Machine, GC EUROPE). Svaki sam uzorak homogenizirala dva puta po 8 s pri frekvenciji od 4300 oscilacija po minuti. Homogeniziranom tkivu dodala sam ekstrakcijski pufer (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 1,4 M NaCl; 20 mM etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) pH 8,0; 2 % CTAB; 20 mM 2-merkaptotanol) zagrijan na 65 °C i inkubirala 30 min na 65 °C. Nakon inkubacije, uzorke sam centrifugirala 5 min na 16000 x g na sobnoj temperaturi. Dobiveni supernatant prebacila sam u nove mikroeprevete od 1,5 mL te mu dodala isti volumen smjese kloroform:izoamil (24:1). Uzorke sam zatim inkubirala 10 min nakon čega sam ih 10 min centrifugirala na 14000 x g. Nakon centrifugiranja gornju/vodenu fazu prebacila sam u nove mikroeprevete (1,5 mL), dodala isti volumen kloroform:izoamila (24:1) te ponovila postupak inkubacije i centrifugiranja. Vodenu fazu ponovno sam prenijela u novu mikroeprevetu (1,5 mL), dodala joj dvostruki volumen pufera za precipitaciju (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA pH 8,0; 1 % CTAB) te inkubirala 60 min na sobnoj temperaturi kako bi se precipitirala DNA. Nakon inkubacije, uzorke sam centrifugirala 10 min na 14000 x g. Uklonila sam supernatant, a dobiveni talog resuspendirala u 600 µL RNaznog pufera (1,5 M NaCl; 10 ng/mL RNaza A (Invitrogen™ PureLink™ RNase A, kat.br.: 10618703)) i inkubirala 30 min na 55 °C. Uzorke sam nakon inkubacije prebacila u mikroeprevete od 2 mL, dodala 1200 µL hladnog 96 %-tnog etanola te ostavila precipitirati na sobnoj temperaturi preko noći.

Sljedeći dan sam centrifugirala uzorke 10 min na 14000 x g, uklonila supernatant pipetom, a talog resuspendirala u 500 µL hladnog 70 %-tnog etanola. Uzorke sam zatim centrifugirala 5 min na 7000 x g, supernatant bacila, a talog osušila na 37 °C i otopila u 100 µL Milli-Q vode. Koncentracije izolirane DNA izmjerila sam spektrofotometrom Nanodrop™ 1000 (Thermo Scientific).

Za izolaciju DNA iz vrlo malih masa tkiva (zigotnih i induciranih embrija), koristila sam komercijalni paket *Dynabeads DNA DIRECT Universal kit* (Invitrogen, kat.br.: 63006), prema protokolu proizvođača.

U svrhu detekcije integrirane T-DNA, izolirala sam DNA brzom metodom. Sa svake biljke uzorkovala sam po jedan listić i smrzнула ga u tekućem dušiku. Smrznuto tkivo sam pomoću staklenih kuglica homogenizirala 16 s na Silamatu pri frekvenciji od 4300 oscilacija po minuti. Homogeniziranom tkivu dodala sam 100 μ L DNA ekstrakcijskog pufera (200 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8,0; 0,5 % natrijev dodecil sulfat (SDS)), uzorke sam vorteksirala te centrifugirala 5 min na 16100 x g na sobnoj temperaturi. Supernatant sam prebacila u novu mikroeprijetu te dodala dvostruki volumen etanola (96 %). Uzorke sam vorteksirala i centrifugirala 10 min na 16100 x g. Supernatant sam uklonila, talog posušila 20 min na sobnoj temperaturi te otopila u puferu TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0). Izoliranu DNA pohranila sam na 4 °C do uporabe.

3.2.3.2. Izolacija plazmidne DNA

Za izolaciju plazmida iz prekonocnih bakterijskih kultura, koristila sam komercijalni paket *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, kat.br.: A1340). Plazmidnu DNA izolirala sam iz 2 mL prekonocnih kultura prema uputama proizvođača, uz minimalne izmjene. U svrhu dobivanja boljeg prinosa, produljila sam korak inkubacije na 37 °C koji prethodi eluciji DNA na 15 min. Umjesto elucije s 50 μ L vode slobodne od nukleaza (engl. *nuclease-free*) u jednom koraku, eluciju DNA s kolone provodila sam dva puta sa po 25 μ L vode u svakom koraku. Koncentraciju izoliranih plazmidnih DNA izmjerila sam spektrofotometrom Nanodrop™ 1000.

3.2.4. Agarozna gel elektroforeza

Za elektroforezu DNA koristila sam 1 % i 2 % TAE gel priređen s 1 g, odnosno 2 g agaroze (BioReagent, kat.br.: A9539-250G) i 100 mL 1xTAE pufera (40 mM Tris-acetat; 1 mM EDTA pH 8,0), te biljeg od 100 pb (*GeneRuler 100 pb DNA Ladder*, Thermo Fisher Scientific, kat.br.: SM0241) ili 1 kb (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, Thermo Fisher Scientific, kat.br.: SM0312) priređen s bojom *6X DNA Gel Loading Dye* (Thermo Scientific, kat.br.: R0611). Elektroforezu sam izvodila pomoću uređaja *RunOne™ Electrophoresis Unit* (Embi Tec). Signal sam detektirala pod UV svjetlosti fotoaparatom (Kodak EDAS 290) nakon bojanja etidij bromidom (10 mg/L).

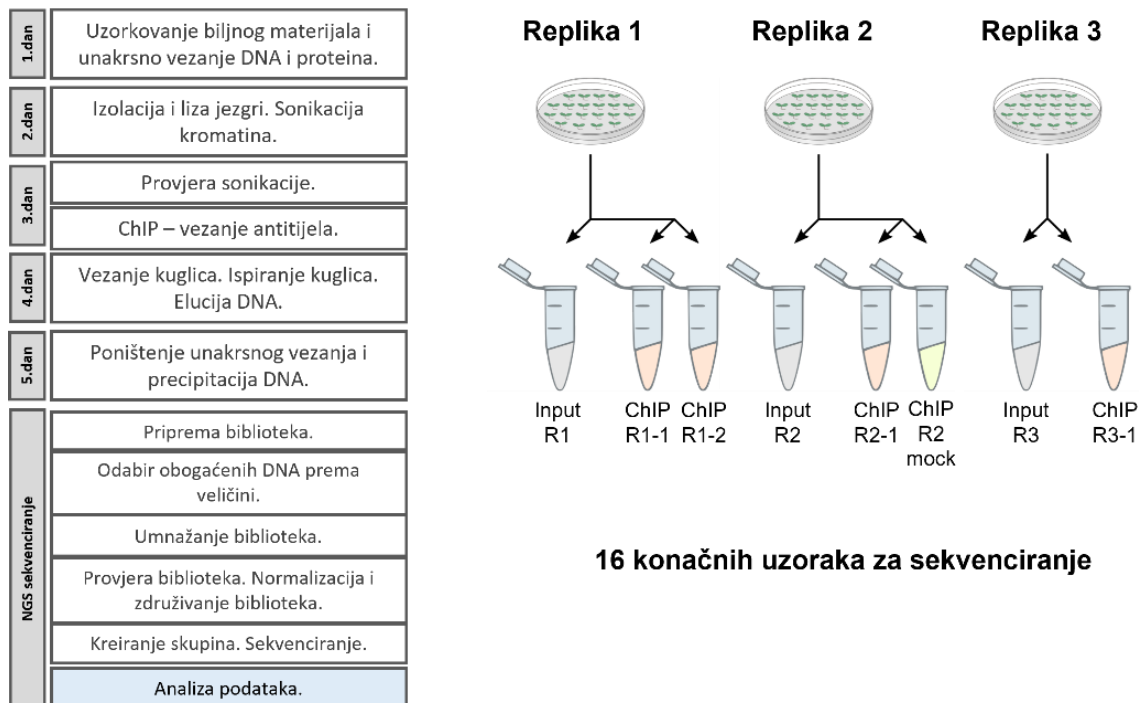
3.2.5. Izolacija fragmenata DNA iz gela

Ciljane fragmente DNA, razdvojene agaroznom gel elektroforezom, iz gela sam izrezivala i pročišćavala upotrebom komercijalnih paketa *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, kat.br.: A9282) i *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel, kat.br.: 740609.50), prema protokolima proizvođača.

3.2.6. Kromatinska imunoprecipitacija

Kromatinska imunoprecipitacija (engl. *chromatin immunoprecipitation*; ChIP) provedena je na klijancima pozadine *cul3^{hyp}* s prekomjernom ekspresijom proteina BPM1 i DMS3. Uzorkovala sam klijance stare 12 dana budući da je prethodno utvrđeno kako nakon dvanaestog dana uzgoja količina proteina BPM1 počinje opadati (Škiljaica i sur., 2019). Za svaku navedenu liniju sakupila sam tri biološke replike sa po 2 g klijanaca u svakoj. Protokol uzgoja i uzorkovanja opisan je u poglavlju 3.2.1.

Plan provedbe eksperimenta ChIP prikazan je na slici 9 te opisan u sljedećim potpoglavljima.



Slika 9. Shematski prikaz eksperimenta kromatinske imunoprecipitacije sa 16 konačnih uzoraka za sekvenciranje (8 uzoraka za BPM1 i 8 za DMS3).

3.2.6.1. Unakrsno vezanje i ekstrakcija jezgri

U prvom koraku kromatinske imunoprecipitacije, napravila sam unakrsno povezivanje DNA i DNA-vezujućih proteina. Tkivo sam stavila u staklenu tikvicu, dodala 25 mL 1 %-tnog formaldehida u puferu PBS (Sigma-Aldrich®, kat.br.: F8775) i spojila na vakuumsku cijev. Uključila sam vakuum kako bi tekućina ušla u tkivo te u vakuumu inkubirala tkivo 15 min. Reakciju unakrsnog vezivanja zaustavila sam dodatkom 1,66 mL glicina (2 M) do konačne koncentracije od 0,125 M i u uvjetima vakuuma inkubirala dodatnih 5 min. Uklonila sam otopinu formaldehida te isprala tkivo tri puta s puferom PBS (1x). Tkivo sam zatim posušila papirnatim ručnikom, prenijela u epruvete od 50 mL (Falcon), smrznula u tekućem dušiku i pohranila na -80 °C do ekstrakcije jezgara. Ekstrakciju sam započela tako da sam u svaku epruvetu dodala 5 keramičkih kuglica za homogenizaciju. Uzorke sam zatim vorteksirala 4 puta po 30 s, pri čemu sam ih između svakog vorteksiranja uranjala u tekući dušik kako se tkivo ne bi otopilo. Nakon posljednjeg vorteksiranja, uzorcima sam dodala po 10 mL pufera M1 (10 mM fosfatni pufer pH 7,0; 100 mM NaCl; 10 mM 2-merkaptioetanol; 1x *cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail* (Roche); 1 M heksilen glikol) i promiješala laganim lupkanjem po epruveti. Dodala sam dodatnih 5 mL pufera M1 kako bih dobila ukupan volumen od 15 mL. Na čiste epruvete od 50 mL stavila sam dva sloja filtera *Mira cloth* (Merck, kat.br.: 475855) te profiltrirala homogenat. Materijal *Mira cloth* sam dva puta isprala s 5 mL pufera M1 te stisnula kako bih sav volumen profiltrirala u epruvetu. Uzorke sam centrifugirala 5 min na 2000 x g na 4 °C. Dobiveni supernatant sam uklonila, a talog resuspendirala s 10 mL pufera M2 (10 mM fosfatni pufer pH 7,0; 100 mM NaCl; 10 mM 2-merkaptioetanol; 1x *cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail*; 1 M heksilen glikol; 10 mM MgCl; 0,5 % Triton-X-100). Korak centrifugiranja i ispiranja puferom M2 ponovila sam još tri puta. Izolirane jezgre resuspendirala sam u 2 mL pufera M3 (10 mM fosfatni pufer pH 7,0; 100 mM NaCl; 10 mM 2-merkaptioetanol; 1x *cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail*) te centrifugirala 5 min na 2000 x g na 4 °C. Supernatant sam odlila, dok sam talog još jednom centrifugirala pri istim uvjetima i pomoću mikropipete uklonila sav preostali pufer M3. Izolirane jezgre držala sam na ledu.

3.2.6.2. Liza i sonikacija jezgri

Talogu s jezgrama, pažljivo sam dodala 5 mL pufera *Covaris Shearing* (0,1 % SDS; 1 mM EDTA pH 8,0; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 25x *cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail*), bez resuspendiranja, i centrifugirala 1 min na 2000 x g na 4 °C. Supernatant sam uklonila te još jednom ponovila korak ispiranja. Nakon centrifugiranja, talogu sam dodala 900 µL pufera *Covaris Shearing* i dobro resuspendirala pipetiranjem. Uzorak sam potom prebacila u

mikroeprevetu od 1,5 mL, a 20 μ L izdvojila i pomiješala s 20 μ L pufera *Sample loading* (5x; ABP Biosciences, kat.br.: P013). Ovaj uzorak služio je kao presonikacijska kontrola. Ostatak uzorka sam dalje sonicirala pomoću uređaja Diagenode Bioruptor (30 ciklusa; 30 s ON/30 s OFF na 4 °C). Nakon sonikacije, uzorak sam centrifugirala 5 min na maksimalnoj brzini (16000 x g) na 4 °C. Dobiveni supernatant prebacila sam u čistu mikroeprevetu od 1,5 mL i centrifugirala 5 min na maksimalnoj brzini na 4 °C. Novi supernatant prebacila sam u čistu eprevetu od 15 mL. Odvojila sam po 10 μ L u čistu mikroeprevetu od 1,5 mL i dodala 490 μ L elucijskog pufera (1 % SDS; 0,1 M NaHCO₃) te 51 μ L pufera za reverziju unakrsnog vezanja (0,2 M NaCl; 0,01 M EDTA pH 8,0; 0,04 M Tris-HCl pH 8,0; proteinaza K (EO0491)); ovi uzorci služili su kao postsonikacijska kontrola. Uzorke sam inkubirala 3 h na 45 °C te preko noći na 65 °C na termobloku (Eppendorf). Ostatku supernatanta (oko 900 μ L) dodala sam 2,6 mL ChIP dilucijskog pufera (0,01 % SDS; 1,10 % Triton-X-100; 1,2 mM EDTA pH 8,0; 16,7 mM Tris-HCl pH 8,0; 167 mM NaCl), do ukupnog volumena od 3,5 mL i pohranila na 4 °C.

3.2.6.3. Postsonikacijska kontrola

Nakon prekononoćne inkubacije na 65 °C s ciljem poništenja unakrsnog vezivanja, kontrolnim uzorcima dodala sam 1 μ L (10 μ g) RNaze A (Thermo Scientific, EN0531) te inkubirala 30 min na sobnoj temperaturi. Zatim sam dodala po 500 μ L mješavine fenol-kloroform-izoamilnog alkohola u omjeru 25:24:1 (Sigma-Aldrich®, kat.br.:P3803), snažno promiješala te vorteksirala. Uzorke sam centrifugirala 10 min na maksimalnoj brzini (16000 x g) pri sobnoj temperaturi. Gornju fazu sam odpipetirala i raspodijelila u jednakim volumenima u dvije mikroeprevete.

U svaku mikroeprevetu dodala sam po 1 μ L glikogena (Thermo Scientific, kat.br.: R0561), zatim 1/10 volumena natrijevog acetata (3 M, pH 5,2), te 2,5 volumena etanola (100 %). Uzorke sam inkubirala 4 h na -20 °C i nakon toga centrifugirala 20 min na maksimalnoj brzini na 4 °C. Supernatant sam uklonila, a na talog dodala po 400 μ L etanola (70 %) i lagano promiješala bez uznemiravanja taloga. Ponovno sam centrifugirala na maksimalnoj brzini (16000 x g) 2 min na 4 °C. Uklonila sam supernatant, te svaki talog resuspendirala u 5 μ L vode. Dva uzorka iste linije ponovno sam objedinila u jedan uzorak ukupnog volumena 10 μ L. Uzorke sam provjerila agaroznom gel elektroforezom na 2,5 %-tnom gelu na način opisan u poglavlju 3.2.4.

3.2.6.4. Imunoprecipitacija

Po 200 μL magnetskih kuglica *Pierce™ ChIP-grade Protein A/G Magnetic Beads* (Thermo Scientific™, kat.br.: 26162) stavila sam na magnetski stalak i uklonila tekućinu. Kuglice sam zatim isprala dva puta sa po 1 mL ChIP pufera za razrjeđivanje i naposljetku resuspendirala u 400 μL ChIP pufera. Po 200 μL kuglica dodala sam uzorcima kromatina koje sam prethodno pohranila na 4 °C i zatim inkubirala na rotoru 1 h na 4 °C. U svrhu obrade na magnetskom stalku, uzorke sam iz epruvete od 5 mL preraspodijelila u tri mikroeprovete od 1,5 mL. Mikroeprovete sam stavila na magnetski stalak te nakon vezanja kuglica prebacila supernatante u tri nove mikroeprovete od 1,5 mL. Supernatante sam centrifugirala 10 min na maksimalnoj brzini (16000 x g) na 4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant sam prebacila u čiste epruvete od 15 mL. U ovom koraku, odvojila sam po 200 μL uzoraka i označila ih kao *input* DNA (BPM1-R1-input i DMS3-R1-input) te pohranila na -20 °C. Ostatak uzoraka raspodijelila sam u epruvete *LoBind* (Eppendorf, kat.br.: 022431021) na način prikazan na slici 9. Ostatak replike 1 (po 1,5 mL) raspodijelila sam u dvije epruvete kako bih dobila dvije tehničke replike za svaki gen (BPM1-R1-T1, BPM1-R1-T2, DMS3-R1-T1, DMS3-R1-T2), dok sam repliku dva raspodijelila u dvije epruvete, od kojih će mi jedna služiti kao *mock* kontrola. Za repliku 3 analizirana je jedna tehnička replika. Svakoj replici dodala sam po 5 μL , odnosno 10 μg anti-GFP antitijela (Invitrogen, kat.br.: A11122) te inkubirala na rotoru preko noći na 4 °C.

Ponovila sam korak pripreme magnetskih kuglica (200 μL) ispiranjem s ChIP puferom za razrjeđivanje na magnetskom stalku kako je prethodno opisano. Kuglice sam resuspendirala u 200 μL ChIP pufera za razrjeđivanje, te svakoj od replika dodala po 50 μL suspenzije kuglica. Uzorke sam zatim inkubirala 3 h na 4 °C. Nakon inkubacije, uzorke sam ponovno stavila na magnetski stalak te nakon vezanja kuglica uklonila supernatant. Supernatante sam odvojila u nove mikroeprovete i pohranila za kasniju provjeru pomoću elektroforeze na poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE) (nevezana frakcija). Istaložene kuglice sam isprala dva puta sa po 1 mL pufera za ispiranje *Low Salt* (0,1 % SDS; 1 % Triton-X-100; 2 mM EDTA pH 8,0; 20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl) 5 min na 4 °C uz rotaciju. Kuglice sam potom isprala pri istim uvjetima sa po 1 mL pufera za ispiranje *High Salt* (0,1% SDS; 1 % Triton-X-100; 2 mM EDTA pH 8,0; 20 mM Tris-HCl; 500 mM NaCl), zatim s 1 mL pufera za ispiranje LiCl (0,25 M LiCl; 1 % IGEPAL CA630 (oktil-fenoksi-polietoksi-etanol); 1 % deoksikolna kiselina; 1 mM EDTA pH 8,0; 10 mM Tris-HCl pH 8,0) i

naposljetku dva puta s 1 mL pufera TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0). Nakon posljednjeg ispiranja, uzorke sam prebacila u nove epruvete.

3.2.6.5. Elucija DNA

Kuglice sam resuspendirala s 250 µL svježeg pufera za eluciju (1 % SDS; 0,1 M NaHCO₃) te inkubirala na termobloku 15 min na 65 °C pri 700 rpm. Uzorke sam prenijela na magnetski stalak kako bih istaložila kuglice i odvojila tekućinu u nove mikroepuvete. Kuglice sam ponovno resuspendirala s 250 µL pufera za eluciju te ponovila korak inkubacije. Istaložila sam kuglice na magnetskom stalku, a elucijsku tekućinu odpipetirala i sjedinila s prethodnom.

3.2.6.6. Poništenje unakrsnog vezivanja

Kako bih poništila unakrsno vezanje, svakom uzorku (konačni i *input* uzorci) dodala sam po 51 µL pufera *Reverse Crosslinking*. Uzorke sam inkubirala 3 h na 45 °C kako bih omogućila aktivnost proteinaze K (0,04 mg/mL, kat.br.: EO0491), a zatim preko noći na 65 °C kako bi se uklonile unakrsne veze.

3.2.6.7. Ekstrakcija i sekvenciranje precipitirane DNA

Nakon prekononočne inkubacije, uzorcima sam dodala 10 µg RNaze A i inkubirala 30 min na sobnoj temperaturi. Uslijedila je ekstrakcija DNA pomoću fenol-kloroforma te precipitacije etanolom, prema protokolu prethodno opisanom za postsonikacijsku kontrolu (poglavlje 3.2.6.3). Uzorci su pohranjeni na -20 °C.

Sekvenciranje uzoraka DNA provedeno je na platformi Illumina HiSeqV4, a analizu rezultata napravila je dr.sc. Lucija Markulin primjenom platforme Galaxy. Proveden postupak i rezultati analize opisani su u prilogu 8.4. Za daljnju analizu odabrani su geni u čijoj su blizini detektirana obogaćenja u obje linije (s prekomjernom ekspresijom proteina BPM1 i DMS3) te zanimljivi metilacijski obrasci (preferentno u promotorskoj regiji), na temelju literaturnih podataka o metilaciji navedenih u prilogu (Tablica P1).

3.2.7. Analiza metilacije DNA

3.2.7.1. Identifikacija metiliranih regija odabranih gena

Dijelove sekvenci gena čija će se metilacija analizirati odabrala sam na temelju podataka o metilaciji dostupnih u literaturi (NCBI GeoDataSets, Tablica P1). Kako bih što jasnije

definirala regije od interesa, analizirala sam dostupne metilacijske podatke za sva tri citozinska okruženja u različitim biljnim tkivima (klijanci, rozeta, cvjetići). Metilacijske podatke za različita tkiva i linije usporedila sam korištenjem programa *Integrative Genomics Viewer* (iGV) te definirala metilacijske regije za daljnju analizu. Prilikom odabira regija, koristila sam sljedeće kriterije:

- regije smještene u promotoru odnosno do 1000 pb uzvodno od mjesta početka transkripcije gena (u radu Gallego-Bartolomé i sur. 2019 dokazano je kako metilacija u ovoj regiji ima direktan utjecaj na transkripciju gena);
- regije omeđene potpuno nemetiliranim područjima pogodnim za dizajn početnica, preferentno sa što manje citozina (ovakvim dizajnom početnica osigurava se umnažanje isključivo konvertirane DNA);
- regije ne prelaze duljinu od 500 pb (osigurava se uspješno umnažanje reakcijom lančane polimeraze, budući da je DNA nakon konverzije jednolančana, a stoga i lako lomljiva).

3.2.7.2. Odabir početnica za umnažanje bisulfitno konvertirane DNA

Početnice sam osmislila prema uputama Mikeska i sur. (2011). Budući da nakon bisulfitnog tretmana lanci DNA više nisu komplementarni, početnice sam osmislila tako da hibridiziraju s lancem s kojeg se odabrani gen prepisuje. Za umnažanje odabranih metiliranih regija koje prelaze duljinu od 500 pb, osmislila sam po dva seta početnica u slučaju kad je sekvenca DNA to omogućavala. Sekvence osmišljenih početnica, kao i duljine amplikona, navedene su u prilogu (Tablica P2).

Za kontrolu učinkovitosti bisulfitne konverzije, odabrala sam nemetilirani mitohondrijski gen *ATP1*. Za umnažanje ovog gena koristila sam početnice Atp1.fw (TGAGTAAAGATGTGTTGAAGTGAAAGTT) i Atp1.rev (ACTACCTACACCTATCTAATCCAATCA) preuzete iz Beyrne i sur. (2019).

3.2.7.3. Bisulfitna konverzija

Za konverziju DNA koristila sam komercijalni paket *EZ DNA Methylation-Gold kit* (Zymo, kat.br.: D5006). Konverzije sam radila prema protokolu uz minimalne modifikacije. Svaku konverzijsku reakciju radila sam sa 500 ng izolirane DNA. Prije početka svake

konverzije, izračunala sam volumen DNA koji odgovara masi od 500 ng za taj uzorak. U PCR mikroepreveti (200 μ L) pomiješala sam prethodno priređen konverzijski reagens (130 μ L), određeni volumen DNA i vodu do ukupnog volumena od 150 μ L. Nakon inkubacije u uređaju za PCR (98 °C 10 min; 64 °C 2 h 30 min; 4 °C ∞), konverzijske reakcije sam prebacila na kolonice za purifikaciju, smještene u kolekcijским tubicama. Na uzorke sam zatim dodala pufer za vezanje te kolonice začepila i promiješala okretanjem nekoliko puta. Uzorke sam centrifugirala 30 s na 16100 x g i bacila tekućinu koja je prošla kroz membranu. Na membranu sam dodala 100 μ L pufera za ispiranje i ponovno centrifugirala 30 s na 16100 x g. Nakon centrifuge, dodala sam 200 μ L desulfonacijskog pufera te inkubirala 15 min na sobnoj temperaturi. Inkubaciju sam zaustavila centrifugiranjem 30 s na 16100 x g. Na membranu sam ponovno dodala 100 μ L pufera za ispiranje te ponovila centrifugiranje. Ovaj korak ispiranja membrane ponovljen je još jednom, nakon čega sam odlila tekućinu iz kolekcijских tubica i još jednom centrifugirala uzorke na suho (1 min na 16100 x g) kako bih se riješila zaostalog pufera za ispiranje koji bi mogao kontaminirati DNA prilikom elucije. U posljednjem koraku, dodala sam 10 μ L elucijskog pufera na membranu te centrifugirala kako bih eluirala DNA. Konvertiranoj DNA odredila sam koncentraciju na uređaju Nanodrop™ 1000. Budući da je DNA nakon konverzije jednolančana, prilikom mjerenja koncentracije koristila sam postavke za jednolančanu DNA.

Nakon bisulfitne konverzije, definirala sam dva koraka u daljnoj analizi. Prvi korak podrazumijevao je umnažanje konvertirane DNA reakcijom PCR, transformaciju kompetentnih bakterijskih stanica, sekvenciranje i analizu dobivenih sekvenci (Beyrne i sur., 2019), što je opisano u poglavljima 3.2.7.4. do 3.2.7.6. Svrha ovog dijela analize bila je utvrđivanje regije pojedinog gena za analizu pirosekvenciranjem. Ovakva analiza provedena je na DNA izoliranoj iz cvjetića divljeg tipa, a za umnažanje prethodno spomenutog kalupa korištene su nemodificirane početnice (Tablica P2).

Drugi korak analize podrazumijevao je umnažanje i pirosekvenciranje regija selektiranih u prethodnom koraku. Za umnažanje odabranih fragmenata reakcijom PCR korištene su modificirane nizvodne početnice s biotinom na 5' kraju, kako bi se dobili biotinizirani produkti koji će se potom analizirati metodom pirosekvenciranja. Sa svakim uzorkom bisulfitno konvertirane DNA napravljene su dvije jednake PCR reakcije kako bi se dobile dvije tehničke replike (n=2) (poglavlja 3.2.7.4. i 3.2.7.7.).

3.2.7.4. Umnažanje bisulfitno konvertirane DNA lančanom reakcijom polimeraze

Bisulfitno konvertiranu DNA koristila sam kao kalup u reakciji PCR. Za reakciju umnažanja konvertirane DNA, koristila sam komercijalni paket *Pyromark PCR kit* (Qiagen, kat.br.: 978703). Na temelju koncentracije konvertirane DNA, izračunala sam potreban volumen kalupa. Svaku PCR reakciju radila sam s 12 ng kalupa i dodatkom odgovarajuće koncentracije $MgCl_2$, u ukupnom volumenu od 25 μL . Sve početnice koristila sam u konačnoj koncentraciji od 0,2 μM , osim nizvodnih biotiniliranih početnica koje sam koristila u koncentraciji 0,1 μM . DNA kalup i početnice sam u svaku reakciju dodavala nakon inicijalne aktivacije polimeraze (*Hot Start*, 15 min na 95 °C) kako bih izbjegla dodatnu degradaciju jednolančanog kalupa. Nakon inicijalne denaturacije, uslijedili su ciklusi denaturacije (30 s na 94°C), prijanjanja (30 s) i elongacije, te završna elongacija (10 min). Broj ciklusa, temperatura prijanjanja i uvjeti elongacije razlikovali su se između setova početnica. Utvrđeni optimalni sastav i uvjeti PCR reakcije za svaki pojedini set početnica navedeni su u prilogu (Tablica P3).

3.2.7.5. Pročišćavanje i ugradnja PCR produkata u sustavu *pGEM-T Easy*

Nakon umnažanja, rezultate reakcije PCR provjerila sam gel elektroforezom kako je opisano u poglavlju 3.2.4.

Nakon detekcije signala ciljane fragmente izrezivala sam iz gela postupkom opisanim u poglavlju 3.2.5. Pročišćenim fragmentima izmjerila sam koncentraciju pomoću uređaja Nanodrop™ 1000 (postavke za dvolančanu DNA).

Na temelju dobivenih koncentracija, izračunala sam volumen uzorka potreban za ligacijsku smjesu koja će sadržavati plazmid i insert u odgovarajućim omjerima. Reakciju TA kloniranja provodila sam neposredno nakon reakcije PCR i pročišćavanja upotrebom komercijalnog paketa *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega, kat.br.: A1360), a omjer inserta i vektora (25 ng) bio je 5:1. Ligacija je rađena preko noći na 4 °C. Ligacijskom smjesom sam transformirala kompetentne stanice XL10-Gold®. Bakterijske stanice čuvane su na -80 °C te su prije korištenja odmrznute na ledu. Po 50 μL bakterija prebacila sam u epruvete za toplinski šok (*Falcon® 14 mL round bottom polystyrene test tube*, kat.br.: 352057), dodala ligacijsku otopinu (3 μL) i inkubirala na ledu 30 min. Toplinski šok napravila sam uranjanjem epruvete 30 s u vodenu kupelj zagrijanu na 42 °C. Nakon šoka, bakterije sam ponovno inkubirala na ledu 2 min, te potom dodala SOC podlogu zagrijanu na 37 °C. Bakterije sam

zatim inkubirala sat vremena na 37 °C uz miješanje (250 rpm). Nakon inkubacije, razmazala sam tekuću bakterijsku kulturu na prethodno pripremljene LB/IPTG/X-Gal ploče s dodatkom ampicilina i inkubirala na 37 °C preko noći. Sljedeći dan sam označila kolonije bijele boje koje sadrže plazmid s uspješno ugrađenim insertom. Pojedinačne bijele kolonije sam prenijela u zasebne tekuće kulture (3 mL podloge LB/Amp) te ponovno inkubirala na 37 °C preko noći uz miješanje (250 rpm). Prisutnost željenog inserta u prekonoćnim kulturama provjerila sam reakcijom PCR korištenjem komercijalnog kompleta *EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix* (Takara, kat.br.: RR320A) i agarozne gel elektroforeze na način opisan u poglavlju 3.2.4. Pipetom sam izdvojila po 100 µL od svake prekonoćne bakterijske kulture u mikroeprevetu od 1,5 mL, centrifugirala 2 min na 16000 x g, supernatant (podlogu) bacila, a talog resuspendirala u 100 µL Milli-Q vode. Uzorak sam inkubirala 5 min na 95 °C na termobloku kako bi se oslobodila plazmidna DNA, ohladila na ledu te 2 µL uzorka koristila kao kalup u reakciji PCR. Koristila sam početnice i uvjete navedene u prilogu (Tablica P2 i P3).

Iz ostatka provjerenih tekućih kultura izolirala sam plazmide na način opisan u poglavlju 3.2.3.2. Plazmidi su sekvencirani pomoću komercijalne početnice M13F (GTAAAACGACGGCCAGT) u servisu Macrogen.

3.2.7.6. Sekvenciranje, analiza sekvenci i utvrđivanje varijabilnih metilacijskih regija

Za svaki gen sekvencirano je 12 produkata kloniranja odabranih na temelju potvrđene prisutnosti inserta u vektoru. Sekvenciranje je provedeno u servisu Macrogen metodom sekvenciranja po Sangeru. Dobivene sekvence analizirala sam programom CyMATE (Cymate.org). Ovaj program zahtjeva unos referentne sekvence (originalna DNA sekvenca) te sekvenci DNA nakon konverzije, nakon čega svaki citozin u amplikonu uspoređuje s referentnom pozicijom. Ovakvom analizom, za svaki pojedini citozin odredila sam citozinsko okruženje (CG, CHG ili CHH) kao i status metilacije (metiliran ili nemetiliran). Na temelju rezultata programa CyMATE, izračunala sam postotak metilacije za svako metilacijsko mjesto. Postotak metilacije za svako pojedino mjesto izračunala sam tako da sam broj metiliranih citozina na toj poziciji podijelila s brojem analiziranih sekvenci (12). Dobivene rezultate prikazala sam grafički radi lakšeg utvrđivanja varijabilno metiliranih regija. Pri odabiru varijabilnih regija za daljnje analize, usredotočila sam se na područja bogata metilacijom u okruženju CHH, okružena područjima koja omogućavaju dizajn početnica za pirosekvenciranje.

3.2.7.7. Analiza varijabilnih metilacijskih regija pirosekvenciranjem

Prilikom dizajna početnica za pirosekvenciranje, koristila sam rezultate programa CyMATE što je opisano u prethodnom poglavlju. Početnice za pirosekvenciranje dizajnirala sam tako da hibridiziraju s područjem koje prethodi odabranoj varijabilno metiliranoj regiji, u kojem nema citozina, a nalazi se neposredno do prvog citozina čija će se metilacija analizirati. Sekvence dizajniranih početnica navedene su u prilogu (Tablica P4).

Neposredno prije analize, u operativnom sustavu Q24 Pyromark dizajnirala sam program prema kojem će se specifično analizirati svaki pojedini gen. U program sam unijela originalnu sekvencu gena (slijed nukleotida iza mjesta vezanja početnice) te odabrala CpN način koji omogućuje analizu metilacije citozina u svim okruženjima. Odabrala sam do 15 citozina koji će biti obuhvaćeni analizom za pojedini fragment. Nakon pohranjivanja programa, za svaki pojedini eksperiment sam unijela željeni raspored uzoraka na pločici te odabrala program za gen koji ću analizirati.

Za analizu uzoraka pirosekvenciranjem koristila sam uređaj Pyromark Q24 (Qiagen) i *Pyromark Q24 Advanced Reagents* (Qiagen, kat.br.: 970922). Uređaj sam uključila 30 min prije korištenja, a reagense sam izvadila s 4 °C kako bi dosegli sobnu temperaturu. Enzim i supstrat sam otopila u 660 µL Milli-Q vode te držala u mraku do upotrebe. U bazenčiče radne stanice *Pyromark Q24 Vacuum Workstation* (Qiagen) postavila sam plastične kadice te u svaku ulila odgovarajuću otopinu: 70 % etanol, denaturacijsku otopinu (*PyroMark Denaturation Solution*, Qiagen, kat.br.: 979301), 1x pufer za ispiranje (*PyroMark Wash Buffer*, Qiagen, kat.br.: 979008) i Milli-Q vodu. Vakuumsku glavu (Iggy) sonicirala sam 3 min u ultrazvučnoj kupelji te testirala uvlači li svaki vakuumski nastavak Milli-Q vodu, nakon čega sam ju odložila na odgovarajuće mjesto na radnoj stanici. Prema izračunu programa, na nosač sam odpipetirala određeni volumen enzima, supstrata i pojedinačnih otopina nukleotida. Nosač s reagensima odmah sam postavila u uređaj kako enzim i supstrat ne bi bili izloženi svjetlu. Pripremila sam otopinu sefaroze (*Streptavidin Sepharose® High Performance*, Cytiva, kat.br.: 17-5113-01), pufera za vezanje i Milli-Q vode te u svaku jažicu na PCR pločici (Sigma Aldrich®, kat.br.: e1403-0100) odpipetirala po 60 µL priređene otopine. Prema prethodno definiranom rasporedu analize uzoraka, u jažice sam odpipetirala po 20 µL odgovarajućeg PCR uzorka. Jažice na pločici sam zatvorila i pločicu vorteksirala na tresilici 10 min na 1300 rpm, do početka rada na radnoj stanici (kako se kuglice sefaroze ne bi istaložile na dno jažica). Za to vrijeme, priredila sam otopinu početnica za pirosekvenciranje i pufera za prijanjanje, te raspodijelila 20 µL po jažici na pločici PSQ (Qiagen, kat.br.: 979201). Nakon što je završilo vorteksiranje uzoraka,

pločicu za PCR sam odmah prenijela na radnu stanicu. Uključila sam vakuum, postavila nastavke vakuumske glave u jažice te ih tako ostavila 15 s. Pri isteku 15 s, vakuumsku glavu sam pažljivo izvadila iz jažica te potom uronila u 70 % etanol (5 s), denaturacijsku otopinu (5 s) i pufer za ispiranje (10 s). Nakon toga, vakuumsku glavu sam postavila u okomit položaj na 10 s kako bi se sva suvišna tekućina ocijedila. Potom sam isključila vakuum, odspojila vakuumsku glavu s cijevi te uronila nastavke vakuumske glave u odgovarajuće jažice na PSQ pločici. Kako bi se kuglice sefaroze s vezanim PCR produktima što uspješnije otpustile u otopinu početnica u jažicama, vakuumsku glavu sam 2 min držala uronjenu u jažice uz lagano protresanje. Pločicu s uzorcima sam potom prenijela na termoblok i inkubirala 2 min na 80 °C. Nakon inkubacije, pločicu sam postavila na postolje u uređaju te pokrenula analizu prema prethodno kreiranom programu.

Za pojedine uzorke, zbog uzastopnih citozina čija je prisutnost važna za epigenetičke mehanizme, program Pyromark Q24 nije mogao obraditi signale zabilježene pirosekvenciranjem te dati konačne postotke metilacije. Za ove sam uzorke napravila ručni izračun postotaka metilacije. Vrijednosti metilacije za pojedino mjesto računala sam kao omjer signala (relativnih intenziteta svjetlosti) zabilježenih za timin i citozin ($C/(C+T)$), te pomnožila sa 100 kako bih dobila postotak. U slučaju većeg broja uzastopnih citozina i citozina okruženih većim brojem timina, za izračun sam koristila prilagođene formule prema How-Kit i sur. (2015). Točnost ovakvog računa provjerila sam primjenom ove metode izračuna na pozicije čija je metilacija uspješno izračunata programom, te usporedbom ovih dviju vrijednosti, čime su ustanovljena minimalna odstupanja.

3.2.8. Analiza relativne ekspresije odabranih gena metodom qPCR

3.2.8.1. Izolacija RNA

Izolacija RNA napravljena je iz embrija i klijanaca uzorkovanih na način opisan u poglavljima 3.2.1. i 3.2.2. Zbog manjih masa tkiva, za izolaciju RNA iz embrija koristila sam komercijalni komplet *Dynabeads™ mRNA DIRECT™ Micro Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, kat. br.: 61021). Izolacija RNA iz embrija napravljena je iz 120 zigotnih kotiledonarnih embrija (4-6 mg tkiva), te oko 30 somatskih embrija u fazi indukcije (11-14 mg tkiva) i u fazi sazrijevanja. Izolaciju RNA iz klijanaca radila sam pomoću kompleta *MagMAX™ Plant RNA Isolation Kit* (Thermo Fisher Scientific, kat.br.: A33899), iz 10 klijanaca (~50 mg tkiva). U oba slučaja, izolacije su provedene prema uputama proizvođača. Izoliranu RNA

kvantificirala sam na uređaju Nanodrop™ 1000 u svrhu određivanja volumena potrebnog za reverznu transkripciju.

3.2.8.2. Reverzna transkripcija

Reakciju reverzne transkripcije radila sam s 1 µg izolirane RNA pomoću paketa *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific, kat.br.: EP0451; 200 U/µL). Reakcija se sastojala se od inkubacije reakcijske smjese RT1 ukupnog volumena 10 µL (9,2 µL otopine RNA; 0,4 µL oligo(dT) 18 Primer, 0,4 µL dNTP (Thermo Fisher Scientific)) 5 min na 65 °C, nakon čega je smjesa ohlađena 2 min na 4 °C te su dodana 4 µL reakcijske smjese RT2 (2,8 µL *Reaction buffer*, 0,5 µL *RiboLock RNase Inhibitor*, 0,2µL *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase*, 0,5µL *RNase Free H₂O*; Thermo Fisher Scientific). Reakcijsku smjesu sam zatim inkubirala 1 h na 42 °C, dok je završni korak inaktivacije reverzne transkriptaze trajao 10 min na 70 °C. Nakon završetka reakcije, uzorke cDNA razrijedila sam 5x u Milli-Q vodi i pohranila na 4 °C do analize kvantitativnom reakcijom PCR (engl. *quantitative polymerase chain reaction*; qPCR).

3.2.8.3. Analiza ekspresije metodom qPCR

Za analizu relativne ekspresije odabranih gena koristila sam metodu qPCR na uređaju *Magnetic Induction Cycler (Mic) PCR Machine* (Bio Molecular Systems). Reakcijska smjesa sastojala se od 5 µl 2x GoTaq® qPCR MasterMix (Promega), 0,2 µl uzvodne početnice za određeni gen (10 µM), 0,2 µl nizvodne početnice (10 µM), 1 µl kalupa cDNA i vode Milli-Q do ukupnog reakcijskog volumena od 10 µl. Za svaki uzorak napravljene su dvije tehničke replike (n=2). Program reakcije sastojao se od početne denaturacije 5 min na 95 °C, nakon čega su uslijedili ciklusi (40 ciklusa u slučaju analize RNA izolirane iz embrija, odnosno 50 u slučaju klijanaca) denaturacije od 5 s na 95 °C, te prijanjanja početnica i elongacije 10 s na 60 °C. Kao endogene kontrole koristila sam gene *RHIP1* i *TIP41* u slučaju embrija, odnosno *OGIO* i *PUX7* u slučaju klijanaca, odabrane prema Škiljaica i sur. (2022). Sekvence svih početnica navedene su u prilogu (Tablica P5). Za analizu ekspresije koristila sam Δ Ct vrijednosti.

3.2.9. Analiza aktivnosti promotora

3.2.9.1. Umnažanje promotora gena *FBW2*

U svrhu analize aktivnosti promotora gena *FBW2*, izolirana je DNA iz klijanaca divljeg tipa metodom CTAB opisanom u poglavlju 3.2.3.1. Osmišljen je set početnica pHG-FBW2-up (CCTTGCTCACCATCCACAACCAACAACAAGAACA) i pHG-FBW2-dn (GGGGATCCTCTAGAGTAATCCCTGATTAATTTTTGTATAA) za umnažanje sekvence od 1000 pb uzvodno od mjesta početka transkripcije u reakciji PCR pomoću DNA polimeraze CloneAmp™. Inicijalni korak denaturacije odvijao se 3 min na 98 °C, nakon čega je uslijedilo 35 ciklusa denaturacije od 10 s na 98 °C, prijanjanja 10 s na 55 °C i elongacije 5 s na 72 °C, te posljednji korak elongacije 2 min na 72 °C. Gateway vektor pHGWS7 lineariziran je pomoću pHGWS7-Hyg-up (CTCTAGAGGATCCCCGGGTACC) i pHGWS7-Hyg-dn (GGATGGTGAGCAAGGGCG) seta početnica te Q5 *Hot Start High-Fidelity* DNA polimeraze, pri čemu je uklonjen gen za rezistenciju na kloramfenikol i gen *ccdB* za bakterijski toksin. Inicijalni korak denaturacije odvijao se 30 s na 98 °C, nakon čega je uslijedilo 25 ciklusa denaturacije od 10 s na 98 °C, prijanjanja 30 s na 68 °C, elongacije 5 min 40 s na 72 °C, te završna elongacija 2 min na 72 °C.

3.2.9.2. Ugradnja promotora gena *FBW2* u *GUS* vektor reakcijom *In-Fusion*

Umnoženi produkti pročišćeni su na način opisan u poglavlju 3.2.5. i korišteni u reakciji *In-Fusion*. Korišten je komercijalni komplet *In-Fusion® HD Cloning kit* (Takara, kat.br.: 639650). Reakcija je napravljena s približno 20 ng inserta i 50 ng lineariziranog vektora, prema uputama proizvođača.

Kao negativnu kontrolu, koristila sam recirkularizirani linearizirani vektor pHGWS7, dok je kalup uklonjen KLD reakcijom (New England Biolabs, kat.br.: M0554S).

3.2.9.3. Transformacija kompetentnih bakterijskih stanica

Smjesom *In-Fusion* transformirala sam kompetentne stanice Stellar™ (HST04). Bakterijske stanice čuvane su na -80 °C te su prije korištenja odmrznute na ledu. Po 50 µL bakterija prebacila sam u epruvete za toplinski šok (Falcon), dodala transformacijsku otopinu (3 µL) i inkubirala na ledu 30 min. Toplinski šok napravila sam uranjanjem epruvete 45 s u vodenu kupelj zagrijanu na 42 °C. Nakon šoka, bakterije sam ponovno inkubirala na ledu 2

min, te potom dodala SOC podlogu zagrijanu na 37 °C. Bakterije sam zatim inkubirala 50 min na 37 °C uz miješanje (250 rpm). Nakon inkubacije, razmazala sam tekuću bakterijsku kulturu na prethodno pripremljene LB/IPTG/X-Gal ploče s dodatkom spektinomocina (50 ng/mL) i inkubirala na 37 °C preko noći. Sljedeći dan sam pregledala ploče kako bih utvrdila jesu li narasle transformirane bakterije. Pojedinačne kolonije prenijela sam u zasebne tekuće kulture (3 mL podloge LB/spektinomocin) te ponovno inkubirala na 37 °C preko noći uz miješanje (250 rpm). Prisutnost željenog inserta u prekonoćnim kulturama provjerila sam reakcijom PCR i agaroznom gel elektroforezom. Kalup za PCR priređen je na način prethodno opisan u poglavlju 3.2.7.5. te sam koristila početnice GUSup2 (AACGTATCCACGCCGTATTC) i GUSdn (GCCAAAAGCCAGACAGAGTC). Inicijalni korak denaturacije odvijao se 3 min na 98 °C, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa denaturacije od 10 s na 98 °C, prijanjanja na 54 °C kroz 30 s i elongacije na 72 °C za 1 min/kb, te posljednji korak elongacije 7 min na 72 °C. PCR uzorke sam provjerila agaroznom gel elektroforezom kako je opisano u poglavlju 3.2.4. kako bih utvrdila da li se željeni fragment uspješno umnožio. Ciljane produkte PCR reakcije pročišćavala sam na način opisan u poglavlju 3.2.5.

Iz ostatka provjerenih tekućih kultura izolirala sam plazmide na način opisan u poglavlju 3.2.3.2. Plazmidi su sekvencirani pomoću komercijalne početnice EGFP-NR (CGTCGCCGTCCAGCTC) u servisu Macrogen.

Elektrokompetentne stanice *A. tumefaciens*, soj GV3101 (pMP90), otopila sam na ledu te dodala 100-200 ng plazmidne DNA. Cijeli volumen suspenzije stanica stavila sam u prethodno ohlađenu elektroporacijsku kivetu koju sam zatim umetnula u elektroporator MicroPulser™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Elektroporacija je provedena pri snazi pulsa od 2.1 – 2.3 kV u trajanju od 5 ms. Neposredno nakon elektroporacije, dodala sam 450 µL SOC podloge te cijeli volumen suspenzije prebacila natrag u mikroeprijetu od 1,5 mL. Uzorke sam inkubirala 2 h na 28 °C uz miješanje (350 rpm). Nakon inkubacije, nasadila sam bakterijsku suspenziju na krute LB podloge s dodatkom antibiotika rifampicina (50 ng/mL) i gentamicina (50 ng/mL) (čime se osigurava rast samo korištenog soja agrobakterija) te kanamicina (50 ng/mL) (osigurava rast samo transformiranih agrobakterija koje su elektroporacijom primile plazmid). Ploče s nasadenim agrobakterijama inkubirala sam dva dana na 28 °C. Pojedinačne kolonije *A. tumefaciens* prebacila sam u 5 mL tekuće podloge LB s dodatkom odgovarajućih

antibiotika i inkubirala preko noći na 28 °C. Za provjeru transformanata, izdvojila sam po 100 µL od svake prekonoćne bakterijske kulture u mikroepruvetu od 1,5 mL, centrifugirala 2 min na 16000 x g, supernatant (podlogu) bacila, a talog resuspendirala u 100 µL Milli-Q vode. Uzorak sam inkubirala 5 min na 95 °C na termobloku kako bi se oslobodila plazmidna DNA, ohladila na ledu te 2 µL uzorka koristila kao kalup u PCR reakciji.

3.2.9.4. Transformacija uročnjaka metodom *floral dip*

U svrhu analize aktivnosti promotora, stanice *A. tumefaciens* GV3101 transformirane su vektorom pHGWS7 s ugrađenim konstruktom pFBW2::*GUS* metodom elektroporacije. Kao pozitivnu kontrolu, koristila sam originalni pCambia vektor s genom GUS pod kontrolom CaMV 35S promotora, dok je negativna kontrola bila pCambia1301:Δ35S bez 35S promotora. Prekonoćne kulture (5 mL) zasebnih agrobakterijskih transformanata pripremila sam kako je prethodno opisano te provjerila PCR reakcijom. Po 1 mL svake provjerene agrobakterijske prekonoćne kulture dodala sam u 200 mL svježje LB podloge s odgovarajućim antibioticima te inkubirala preko noći na 28 °C. Prekonoćne kulture volumena 200 ml ponovno sam provjerila PCR reakcijom, a ostatak centrifugirala 15 min na 5000 rpm u centrifugi DuPont Sorvall RC-5B (Sorvall Instruments, Thermo Fisher Scientific). Agrobakterijski talog resuspendirala sam u 200 mL otopine s 5 % saharoze i 0,03 % Silwet L-77 (OSi Specialties, Inc., Danbury, CT, USA). Silwet L-77 je surfaktant koji značajno povećava stopu transformacije (Clough i Bent, 1998).

Agrobakterijama koje nose jedan od navedenih vektora transformirala sam biljke *A. thaliana*, ekotip Col-0, u stadiju u kojem sadrže nezrele cvjetne pupove i tek nekoliko komuški. Za transformaciju sam koristila metodu *floral dip* opisanu u Clough i Bent (1998). Biljke sam na 3 min uronila u bakterijsku suspenziju tako da su cvatovi skroz potopljeni. Nakon što sam ih izvadila iz suspenzije, biljke sam omotala plastičnim vrećicama kako bi se zadržala vlaga te ih ostavila polegnute u mraku preko noći. Sljedeći dan sam ih stavila u komoru u standardne uvjete rasta. Na ovaj način sam biljke transformirala dva puta unutar tjedan dana te uzgajala dok se komuške nisu osušile, nakon čega sam sakupila sjeme.

Sakupljene sjemenke selektirala sam na krutoj MS podlozi s dodatkom higromicina B (30 ng/mL). Prije nasađivanja, sjemenke sam sterilizirala prema standardnom protokolu opisanom u poglavlju 3.2.1. Selekcija je provedena korištenjem brze metode prema Harrison i sur. (2006). Nasađene sjemenke su prvo stratificirane na 7 °C dva dana, potom prebačene u

uvjete svjetla 4-6 h, u mrak na 48 h te 24 h na svjetlo. Transformanti prve generacije (T1) su imali duge hipokotile (0,8 – 1 cm), dok su nerezistentni klijanci imali kraće (0,2 – 0,4 cm). Transformante sam presadila u supstrat i uzgajala do zrelosti. Transformanti T1 generacije imenovani su linijama pFBW2:GUS.

3.2.9.5. Identifikacija transformanata s jednom insercijom i križanje

Broj T-DNA insercija u pFBW2:GUS linijama određen je indirektnim praćenjem omjera higromicin-rezistentnih i higromicin-osjetljivih biljaka dobivenih samooplođnjom T1 generacije. Za daljnje analize, odabrala sam dvije pFBW2:GUS linije koje su imale omjer monohibridnog nasljeđivanja 3:1.

Kako bih odredila učinak proteina BPM1 i DMS3 na aktivnost promotora gena *FBW2*, linije oeBPM1-EGFP, oeEGFP-DMS3 i *dms3-1* križala sam s obje selektirane pFBW2:GUS linije. Kao kontrolu, liniju pFBW2:GUS križala sam s biljkama divljeg tipa. Budući da su transgena svojstva reporterskih linija oeBPM1-EGFP, oeEGFP-DMS3, te pFBW2:GUS dominantna, usporedba ekspresije GUS gena bila je moguća već u F1 generaciji (reporter geni su hemizigotni, sadržavaju samo jedan transgeni alel). Prema tome, i odgovarajuće kontrolne linije (WT x pFBW2:GUS) bile su hemizigotne za pFBW2:GUS reporter. Nasuprot tome, *dms3-1* je recesivna linija, pa su generirane homozigotne linije (i za *dms3-1* mutantni lokus i za pFBW2:GUS lokus) i uspoređene s homozigotnim kontrolnim linijama pFBW2:GUS.

3.2.9.6. Genotipizacija T-DNA

Kako bih ispitala uspješnost insercije T-DNA u higromicin-rezistentnim pFBW2:GUS biljkama nakon transformacije metodom *floral dip*, napravila sam brzu izolaciju DNA metodom opisanom u poglavlju 3.2.3.1. Po 1 µL izolirane DNA koristila sam kao kalup za PCR genotipizaciju. Reakciju PCR napravila sam korištenjem GUSup2 i GUSdn seta početnica te komercijalnog paketa *EmeraldAmp*® (Takara Bio, Inc). Inicijalni denaturacijski korak proveden je 3 min na 98 °C, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa denaturacije 10 s na 98 °C, prijanjanja 30 s na 54 °C i elongacije na 72 °C od 1 min/kb, te završna elongacija 7 min na 72 °C. Kao kontrolu izolirane DNA, kalup sam umnožila i sa Act3-fw (GGCATCATACTTTCTACAATG) i Act3-rev (CACCACTGAGCACAAT) setom početnica za aktin, uz temperaturu prijanjanja od 60 °C. Dodatno, produkte križanja *dms3-1* i

pFBW2:GUS testirala sam za prisutnost gena za rezistenciju na kanamicin korištenjem seta početnica Kan_FW (ATGGGGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGG) i Kan_REV (TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCG), uz temperaturu prijanjanja od 55 °C, čime je indirektno potvrđena prisutnost mutantnog alela *dms3-1*. Produkte PCR reakcije analizirala sam na agaroznom gelu.

3.2.9.7. Analiza aktivnosti promotora gena FBW2

Aktivnost promotora gena *FBW2* u pFBW2:GUS križanim linijama ispitala sam korištenjem GUS testa. Ovaj test podrazumijeva analizu ekspresije gena za β -glukuronidazu u različitim tkivima pomoću metode histokemijskog bojanja koja koristi X-Gluc kao supstrat za β -glukuronidazu (GUS). Tkiva s najboljom ekspresijom odabrala sam za usporedbu ekspresijskih obrazaca između različitih linija. Za provedbu GUS testa koristila sam pločice za staničnu kulturu s 24 jažice (jedan uzorak po jažici). Otopina X-Gluc pripremljena je u konačnoj koncentraciji od 0,5 mM u reakcijskom puferu GUS (50 nM kalijev ferocijanid; 0,1 M natrijev fosfatni pufer (pH 7); 0,5 EDTA pH 8,0; 10 % Triton X). Otopinu sam pomoću vakuuma infiltrirala u tkivo (5 min pri tlaku od 27 mmHg). Pločice sam zatvorila parafilmom te inkubirala uzorke preko noći na 37 °C. Obojana tkiva sam zatim inkubirala u nizu serijskih razrjeđenja alkoholnih otopina (15 min u 20 % metanolu, zatim 0,25 M HCl, 15 min u 60 % etanolu, 7 % NaOH te 5-minutni intervali u 40 %, 20 % i 10 % etanolu). Svrha ovih inkubacija jest uklanjanje klorofila koji ometa vizualizaciju plave boje. Tkiva sam naposljetku fiksirala u otopini 5 %-tnog etanola i 25 %-tnog glicerola preko noći. Za provedbu testa GUS koristila sam lupu i svjetlosni mikroskop (Olympus BX51 s Olympus DP70 kamerom).

4. REZULTATI

4.1. Zajedničke regije nakupljanja proteina BPM1 i DMS3 na genomu uročnjaka

Metodom kromatinske imunoprecipitacije utvrđene su pozicije na genomu na koje se vežu proteini BPM1 (tablica 2) i DMS3 (tablica 3). Dobiveni rezultati ukazali su na značajno nakupljanje proteina BPM1 u regijama genoma bliskim sekvencama 15 gena i pet transpozonskih elemenata. Nakupljanje proteina DMS3 zabilježeno je u blizini 6 gena i jednog transpozonskog elementa. Gene za koje sam utvrdila nakupljanje oba proteina, i BPM1 i DMS3, odabrala sam za daljnje analize uz pretpostavku da je njihova metilacija potencijalno pod zajedničkim utjecajem proteina BPM1 i mehanizma RdDM. Sljedeći preduvjet odabira bilo je postojanje potencijalno metiliranih regija u njihovim promotorima ili samim genima.

Tablica 2. Geni utvrđeni kao mete proteina BPM1 na temelju rezultata kromatinske imunoprecipitacije za protein BPM1. Za svaki gen, naveden je kromosom na kojem se nalazi, pozicija na samom kromosomu (početak – kraj), pristupni broj i funkcija gena utvrđena pregledom literature, te pozicija na kojoj je utvrđeno vezanje proteina BPM1 u odnosu na gen.

Kromosom	Početak	Kraj	Rezultat	Pristupni broj	Naziv	Pozicija	Opis
4	5757466	5758287	923	AT4G08980	FBW2	promotor, 5' UTR*	Kodira protein s F-box motivom (F-BOX WITH WD-40 2) koji djeluje kao negativni regulator razine proteina AGO1 i potencijalno sudjeluje u signalizaciji abscizinske kiseline. Kao podjedinica kompleksa SCF E3 ubikvitinske ligaze sudjeluje u degradaciji proteina 14-3-3.
5	24990203	24991056	766	AT5G62220	GT18	promotor	Kodira glikoziltransferazu 18 smještenu u Golgijevu tijelu.
1	4973353	4974580	747	AT1G14530 AT1G14540	THH1 PER4	promotor uzvodno od gena	TOM THREE HOMOLOG 1, homolog proteina TOM1 uključenog u umnažanje tobamovirusa. Peroksidaza 4
2	9369015	9369829	728	AT2G22010 AT2TE39780	RKP TE	promotor, 5' UTR* nizvodno od TE†	RELATED TO KPC1, protein koji je dio kompleksa RING E3 ubikvitinske ligaze. Transpozonski element
4	7141107	7143144	709	AT4G11880	AGL14	promotor	AGAMOUS-LIKE 14, protein s DNA-vezujućom MAD5 domenom eksprimiran u korijenu.
3	7911785	7912785	667	AT3TE33175 AT3G22380	TE TIC	uzvodno od TE† promotor	Transpozonski element TIME FOR COFFEE, kodira regulator cirkadijanog ritma aktivan u jezgri.
3	9212605	9213905	504	AT3G25400	Nepoznat	promotor, 5' UTR*	<i>dCTP pyrophosphatase-like protein</i>
4	14884416	14885613	476	AT4TE70650	TE	TE†	Transpozonski element
5	24938911	24939830	471	AT5G62090	SLK2	promotor, 5' UTR*	<i>SEUSS-like 2</i>
1	26382425	26383290	428	AT1G09133 AT1G70060	ncRNA SNL4	ncRNA promotor	Nepoznati protein SIN3-LIKE 4, kodira homolog transkripcijskog represora SIN3.
5	20090158	20090853	402	AT5G49520	WRKY48	promotor, 5' UTR*	Kodira WRKY48, član obitelji WRKY transkripcijskih faktora. Protein WRKY48 je transkripcijski aktivator induciran stresom i patogenima.
5	22150824	22151582	397	AT5TE79730	TE	TE†	Transpozonski element
2	17489257	17490011	392	AT2TE78950 AT2G41900.1	TE OXS2	TE† OXS2	Transpozonski element Protein OXS2 ima ulogu u odgovoru na solni stres.
2	11859944	11860819	372	AT2G27830	Nepoznat	5' UTR*, egzon	Nepoznati protein
4	843196	844404	357	AT4G01940	NFU1	promotor	Kodira protein koji sadrži domenu NFU i potencijalno je uključen u formiranje nakupina željeza i sumpora.
2	14252923	14255273	319	AT2G33700	PP2CG1	promotor, 5' UTR*	Protein fosfataza 2C grupa 1, uključena u toleranciju na solni stres.

* 5' UTR – 5' netranslatirana regija

† TE – transpozonski element

Tablica 3. Geni utvrđeni kao mete proteina DMS3 na temelju rezultata kromatinske imunoprecipitacije za protein DMS3. Za svaki gen, naveden je kromosom na kojem se nalazi, pozicija na samom kromosomu (početak – kraj), pristupni broj i funkcija gena utvrđena pregledom literature, te pozicija na kojoj je utvrđeno vezanje proteina DMS3 u odnosu na gen.

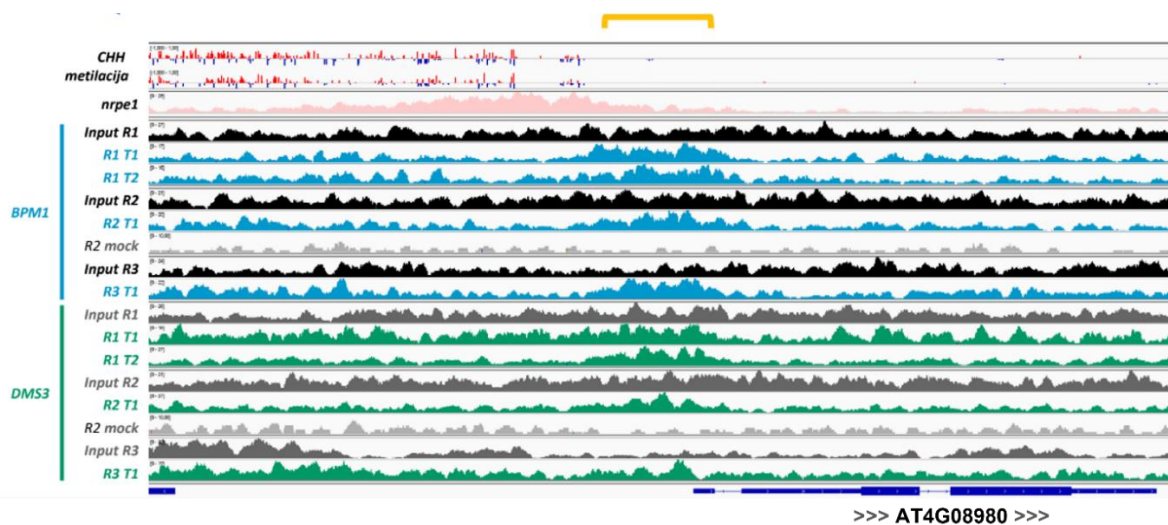
Kromosom	Početak	Kraj	Rezultat	Pristupni broj	Naziv	Pozicija	Opis
5	24990308	24991018	762	AT5G62220	GT18	promotor	Kodira glikoziltransferazu 18 smještenu u Golgijevu tijelu.
4	5757443	5758227	649	AT4G08980	FBW2	promotor	Kodira protein s F-box motivom (F-BOX WITH WD-40 2) koji djeluje kao negativni regulator razine proteina AGO1 i potencijalno sudjeluje u signalizaciji abscizinske kiseline. Kao podjedinica kompleksa SCF E3 ubikvitinske ligaze sudjeluje u degradaciji proteina 14-3-3.
2	9369094	9369708	407	AT2TE39780 AT2G22010	RKP TE	promotor, 5' UTR* nizvodno od TE†	RELATED TO KPC1, protein koji je dio kompleksa RING E3 ubikvitinske ligaze. Transpozonski element
1	4973569	4974129	373	AT1G14530 AT1G14540	THH1 PER4	promotor uzvodno od gena	TOM THREE HOMOLOG 1, homolog proteina TOM1 uključenog u umnažanje tobamovirusa. Peroksidaza 4
3	9212737	9213301	285	AT3G25400	Nepoznat	5' UTR*	<i>dCTP pyrophosphatase-like protein</i>

* 5' UTR – 5' netranslatirana regija

† TE – transpozonski element

Pregledom literaturnih podataka o metilaciji gena kandidata (Yang i sur., 2016), za daljnju analizu su odabrana tri gena: *FBW2* (AT4G08980) (slika 10), *RKP* (AT2G22010) (slika 11) i *AGL14* (AT4G11880) (slika 12).

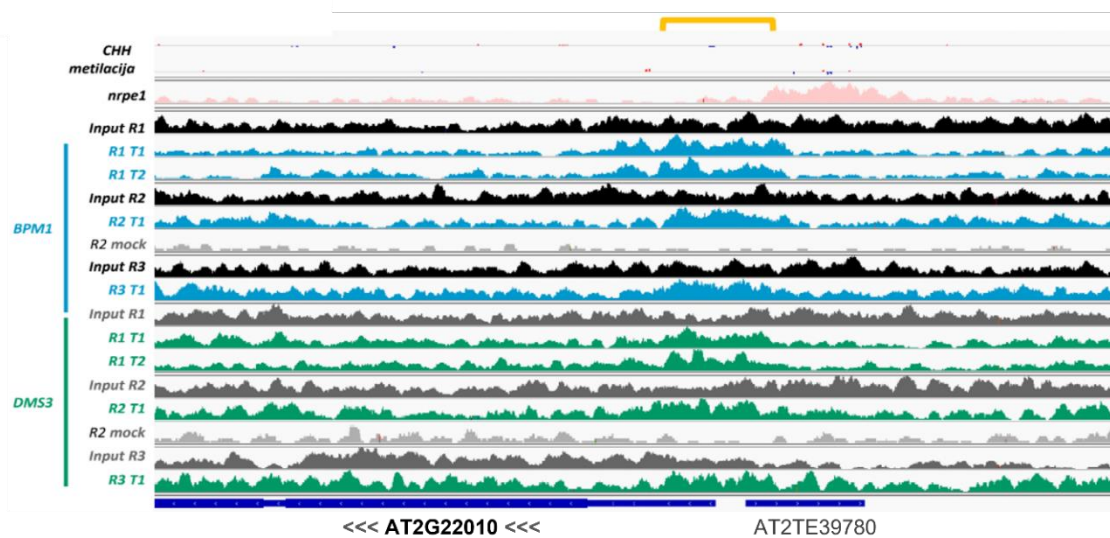
Gen naziva *F-BOX WITH WD-40 2* (*FBW2*), identificiran je na temelju zajedničke vezne regije proteina BPM1 i DMS3 u području promotora, gdje je utvrđena i prisutnost metilacije okruženja CHH (slika 10). Gen *FBW2* kodira protein koji je visoko očuvan među cvatućim biljkama, a dio je kompleksa SCF (engl. *Skp1-Cullin-F-box protein*) E3 ligaza, te je njegova uloga povezana s procesima proteasomalne razgradnje (Yang i sur., 2005).



Slika 10. Nakupljanje proteina BPM1 i DMS3 u promotorskoj regiji gena *FBW2* utvrđeno kromatinskom imunoprecipitacijom te na temelju podataka o metilaciji okruženja CHH (Yang

i sur., 2016) i mjestu vezanja podjedinice NRPE1 polimeraze V (Liu i sur., 2018). Plavi signali označavaju mjesta obogaćenja proteinom BPM1, a zeleni proteinom DMS3. Zajednička vezna regija ovih dvaju proteina obilježena je žutom linijom iznad slike. Slovom R (R1, R2 i R3) označene su biološke, a slovom T (T1 i T2) tehničke replike. *Input* i *mock* predstavljaju kontrole koje služe kako bi se isključio utjecaj nejednolike sonikacije različitih dijelova genoma, odnosno nespecifičnog vezanja antitijela.

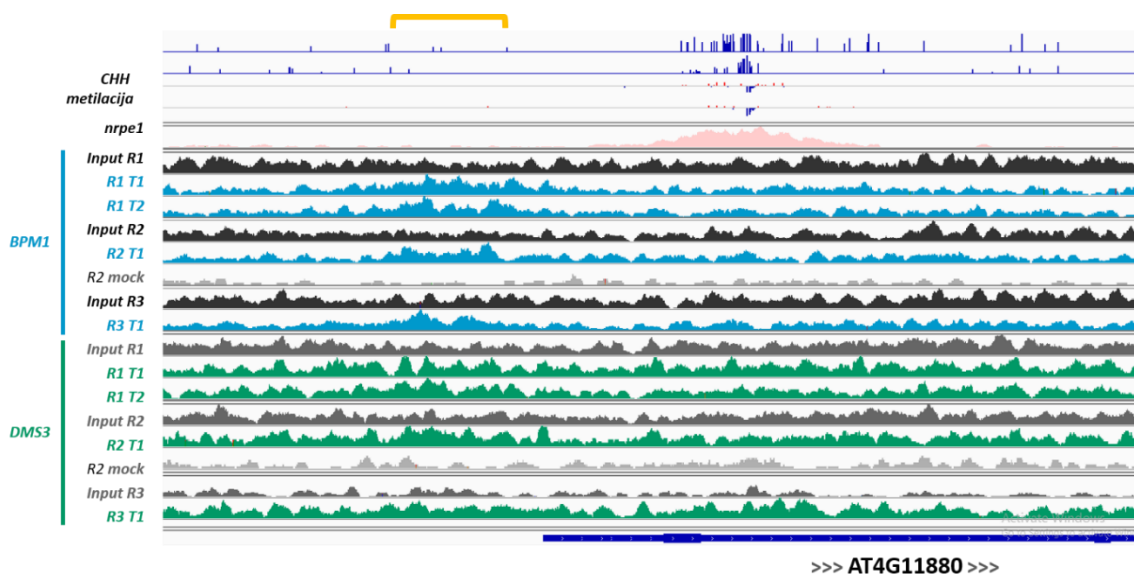
Sljedeći odabrani gen kodira za protein RELATED TO KPC 1 (RKP) koji je dio kompleksa RING (engl. *Really Interesting New Gene*) E3 ubikvitinskih ligaza te je kao i prethodni kandidat uključen u procese proteasomalne degradacije (Ren i sur., 2008). Za gen *RKP*, regija obogaćenja proteinima BPM1 i DMS3 detektirana je u promotoru i početnom dijelu prvoga egzona, dok je na temelju literature utvrđena prisutnost CHH metilacije u području distalnog promotora (slika 11).



Slika 11. Nakupljanje proteina BPM1 i DMS3 u promotorskoj regiji gena *RKP* utvrđeno kromatinskom imunoprecipitacijom te na temelju podataka o metilaciji okruženja CHH (Yang i sur., 2016) i mjestu vezanja podjedinice NRPE1 polimeraze V (Liu i sur., 2018). Plavi signali označavaju mjesta obogaćenja proteinom BPM1, a zeleni proteinom DMS3. Zajednička vezna regija ovih dvaju proteina obilježena je žutom linijom iznad slike. Slovom R (R1, R2 i R3) označene su biološke, a slovom T (T1 i T2) tehničke replike. *Input* i *mock* predstavljaju kontrole koje služe kako bi se isključio utjecaj nejednolike sonikacije različitih dijelova genoma, odnosno nespecifičnog vezanja antitijela.

Gen naziva *AGAMOUS-LIKE14/XAANTAL 2 (AGL14/XAL2)*, spada u skupinu gena koji kodiraju transkripcijske faktore s domenom MADS, a koji su uključeni u mnoge aspekte biljnog razvoja i morfogeneze, uključujući embriogenezu i homeostazu auskina.

Ovaj gen odabran je na temelju jasno vidljivog obogaćenja proteinima BPM1 i DMS3 u području promotora, dok je pregledom literature identificirana metilacija okruženja CHH u području introna (slika 12).



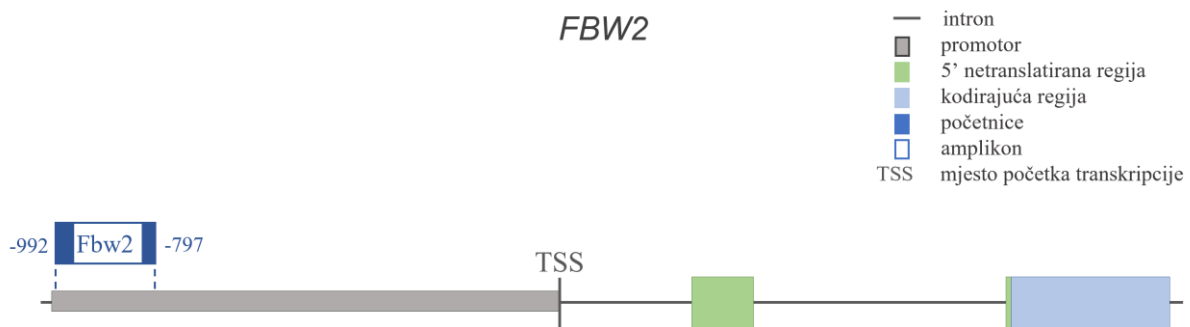
Slika 12. Nakupljanje proteina BPM1 i DMS3 u promotorskoj regiji gena *AGL14* utvrđeno kromatinskom imunoprecipitacijom te na temelju podataka o metilaciji okruženja CHH (Yang i sur., 2016) i mjestu vezanja podjedinice NRPE1 polimeraze V (Liu i sur., 2018). Plavi signali označavaju mjesta obogaćenja proteinom BPM1, a zeleni proteinom DMS3. Zajednička vezna regija ovih dvaju proteina obilježena je žutom linijom iznad slike. Slovom R (R1, R2 i R3) označene su biološke, a slovom T (T1 i T2) tehničke replike. *Input* i *mock* predstavljaju kontrole koje služe kako bi se isključio utjecaj nejednolike sonikacije različitih dijelova genoma, odnosno nespecifičnog vezanja antitijela.

Gen *CML41 (AT3G50770)* odabrala sam na temelju istraživanja kojim je utvrđeno kako je metilacija njegova promotora pod kontrolom mehanizma RdDM (Baev i sur., 2010) te je u ovom istraživanju korišten kao kontrola funkcioniranja provedenih metoda.

4.2. Varijabilne metilacijske regije gena reguliranih združenim mehanizmom proteina BPM1 i DMS3

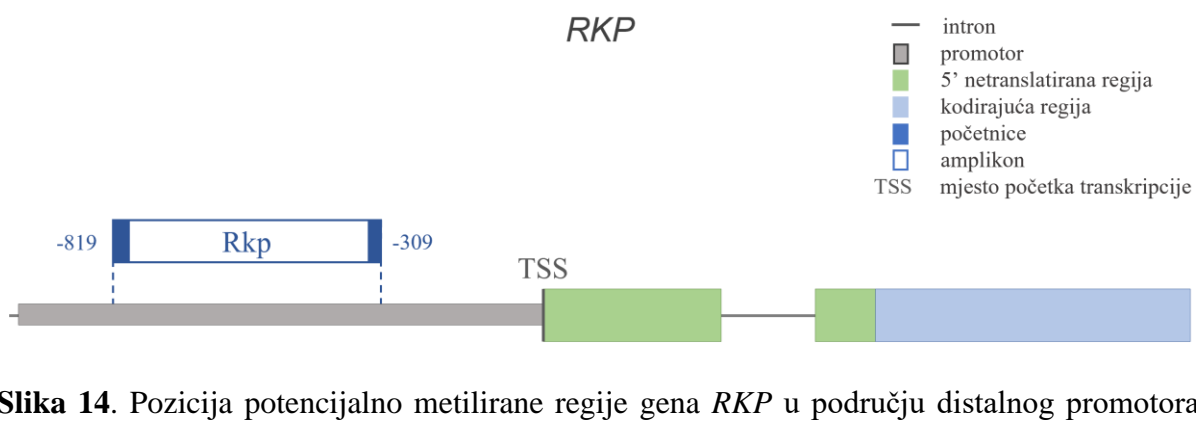
U blizini sva četiri odabrana gena postoje mjesta podložna metilaciji (slike 10 – 12) koja sam odabrala za daljnje analize temeljene na bisulfitnoj konverziji cjelokupne DNA ciljnoga tkiva, u kombinaciji sa umnažanjem konvertirane DNA, pripremom za sekvenciranje i analizom sekvenci (Beyrne i sur., 2019), ili u kombinaciji s pirosekvenciranjem.

U genu *FBW2* odabrala sam kratku regiju u području distalnog promotora koja je bogata citozinima i udaljena 797 pb od mjesta početka transkripcije (TSS) (slika 13). Početnice koje sam osmislila s ciljem umnažanja ove regije su Fbw2.fw i Fbw2.rev (tablica P2).



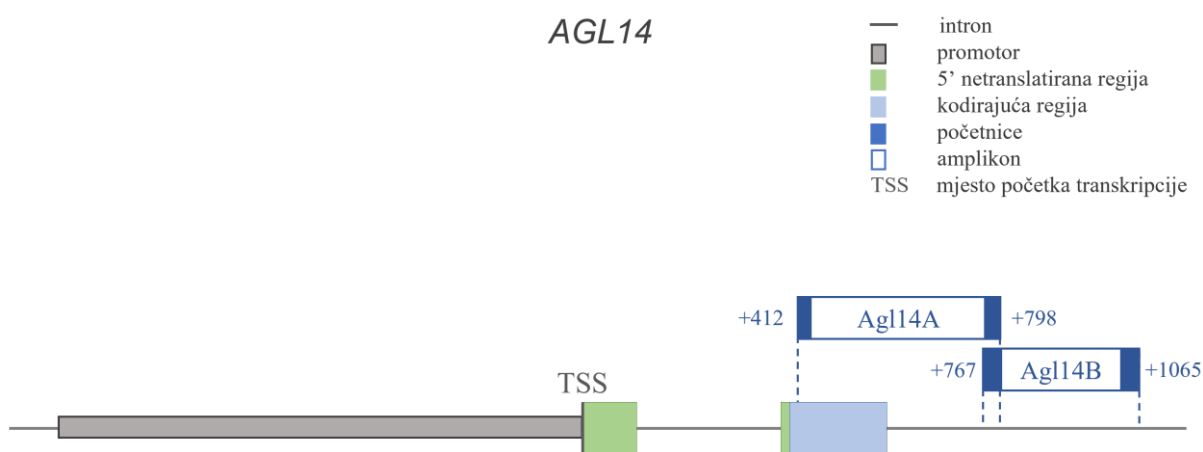
Slika 13. Pozicija potencijalno metilirane regije gena *FBW2* u području distalnog promotora, duljine 196 pb. Duljina i položaj amplikona u promotoru naznačen je tamnoplavim okvirom. Tamnoplavi pravokutnici na krajevima amplikona označavaju mjesta vezanja početnica.

U genu *RKP* sam također odabrala metiliranu regiju u području distalnog promotora, smještenu 309 pb uzvodno od mjesta početka transkripcije i dugu 511 pb (slika 14). Slijedovi duljine veće od 500 pb problematični su za umnažanje zbog nestabilnosti bisulfitno konvertirane DNA te njihova analiza uglavnom zahtjeva dizajn i umnažanje s više setova početnica. U slučaju gena *RKP*, odabrana sekvenca zbog velike zastupljenosti citozina nije omogućavala dizajn dodatnog seta početnica, pa je korišten jedan set početnica, Rkp.fw i Rkp.rev (tablica P2).



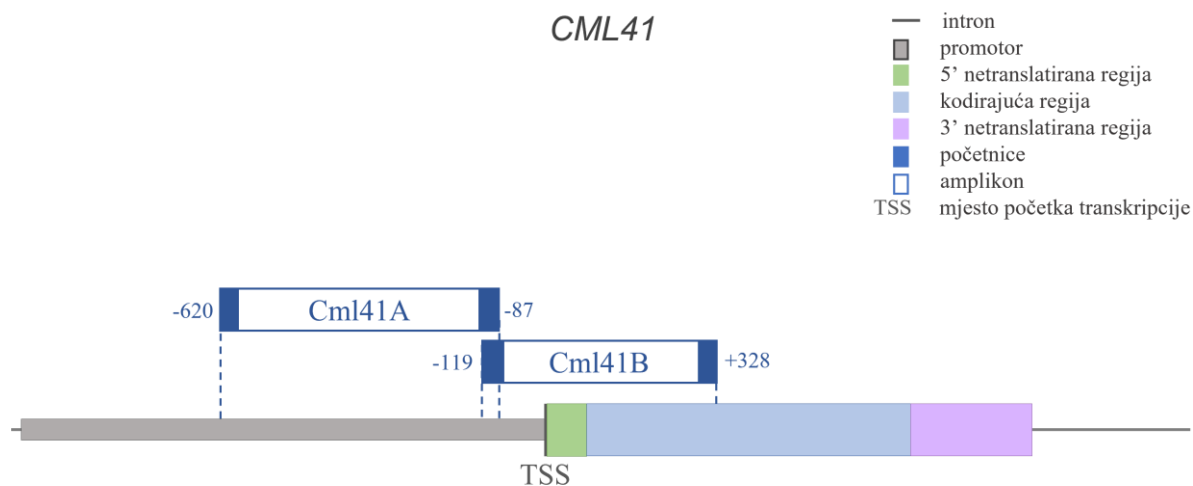
Slika 14. Pozicija potencijalno metilirane regije gena *RKP* u području distalnog promotora, duljine 511 pb. Duljina i položaj amplikona u promotoru naznačen je tamnoplavim okvirom. Tamnoplavi pravokutnici na krajevima amplikona označavaju mjesta vezanja početnica.

Za gen *AGL14*, kao regiju s najzanimljivijim obrascem metilacije odabrala sam područje prvog egzona i drugog introna, gdje je prisutan velik broj metiliranih citozina u okruženju CHH. Kako bih analizom obuhvatila cijelu potencijalno metiliranu regiju dugu skoro 700 pb, dizajnirala sam dva seta početnica. Set početnica *Agl14A.fw* i *Agl14A.rev* koristila sam za umnažanje fragmenta A, dok sam početnicama *Agl14B.fw* i *Agl14B.rev* umnožila fragment B (tablica P2). Pozicije početnica i fragmenata shematski su prikazane na slici 15.



Slika 15. Pozicija potencijalno metilirane regije gena *AGL14* u području prvog egzona i drugog introna. Analizirana su dva fragmenta; *Agl14A* duljine 387 pb koji obuhvaća područje egzona i introna, te *Agl14B* duljine 299 pb koji obuhvaća samo intron. Duljina i položaji amplikona u genu naznačeni su tamnoplavim okvirima. Tamno plavi pravokutnici na krajevima amplikona označavaju mjesta vezanja početnica.

Za gen *CML41*, osmislila sam početnice na jednak način. Na temelju podataka iz literature, i za ovaj gen sam identificirala regiju bogatu citozinima i potencijalno podložnu metilaciji. Radi se o promotoru i egzonu gena (slika 16). Kako bih analizom obuhvatila cijelo područje, osmislila sam dva seta početnica (tablica P2).



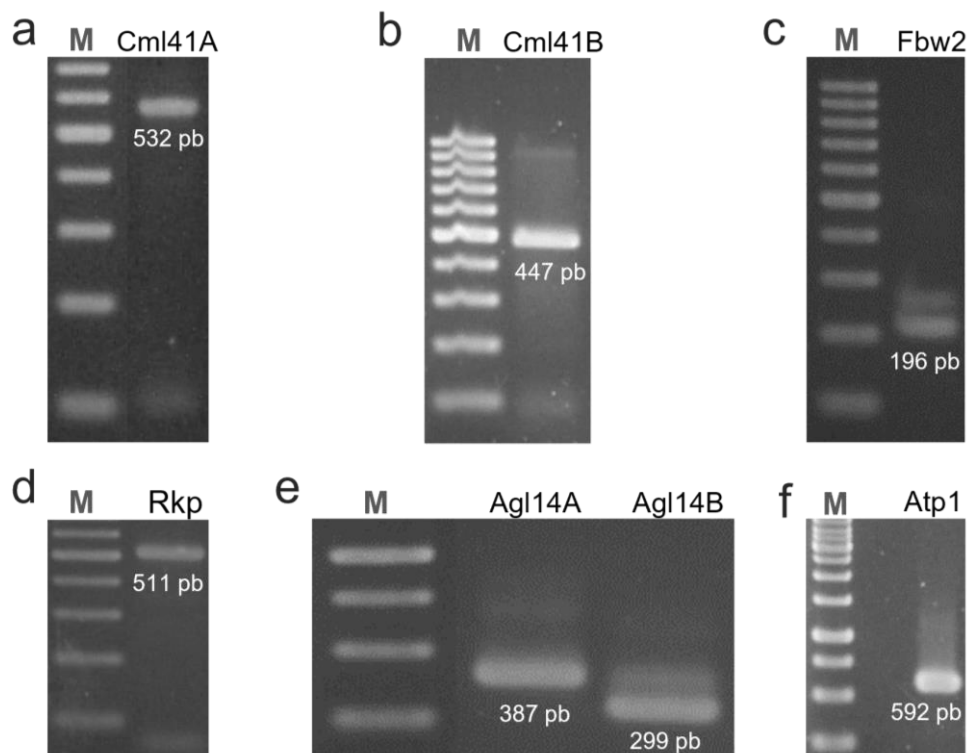
Slika 16. Pozicija potencijalno metilirane regije gena *CML41* u području promotora i egzona. Analizirana su dva fragmenta; Cml41A duljine 532 pb smješten u promotoru, te Cml41B duljine 447 pb koji obuhvaća dio proksimalnog promotora i egzona. Duljina i položaji amplikona u genu naznačeni su tamno plavim okvirima. Tamno plavi pravokutnici na krajevima amplikona označavaju mjesta vezanja početnica.

4.3. Razina i varijabilnost metilacije citozina u cvjetićima uročnjaka

4.3.1. Učinkovitost bisulfitne konverzije i umnažanje konvertirane DNA

Koncentracija DNA koja se dobiva nakon procesa bisulfitne konverzije bila je vrlo niska (5-10 ng/ μ L). Kako bih osigurala dovoljnu količinu kalupa za dobivanje dviju tehničkih replika (12 ng po replici), za svaki pojedini gen i set početnica napravila sam veći broj reakcija umnažanja u svrhu utvrđivanja optimalnih uvjeta pri kojima se dobiva najveća količina specifičnog produkta. Odabrani uvjeti za svaki set početnica navedeni su u tablici P3 u prilogu, dok je kvaliteta dobivenih produkata reakcije PCR prikazana na slici 17. Za gen *CML41*, umnožena su dva amplikona nakon reakcije PCR s dva seta početnica; amplikon Cml41A duljine 532 pb i amplikon Cml41B duljine 447 pb (slika 17a i 17b). Za gen *FBW2*, umnožen je

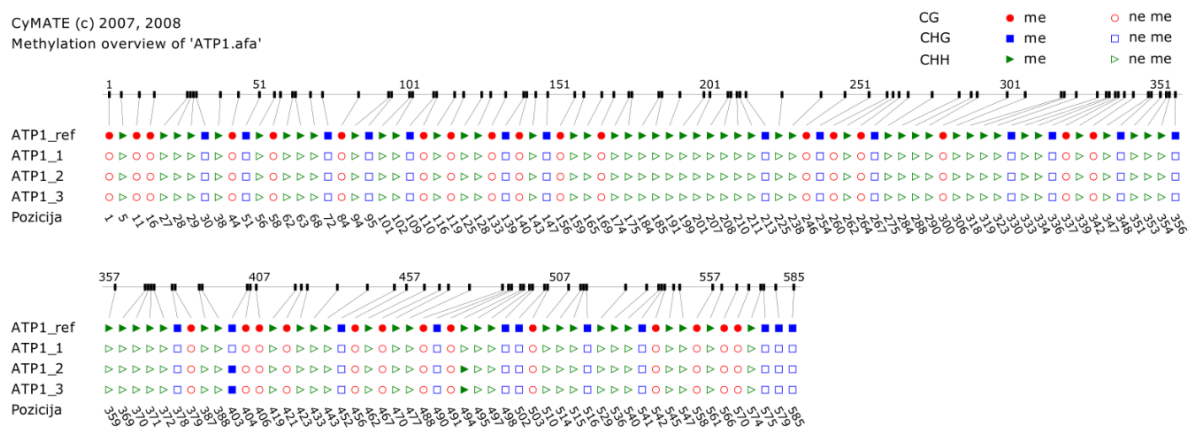
amplikon duljine 196 pb (slika 17c). Za gen *RKP*, reakcijom PCR dobiven je produkt duljine 511 pb (slika 17d). Za gen *AGL14*, dobivena su dva amplikona. Korištenjem prvog seta početnica, umnožen je amplikon Agl14A duljine 387 pb, dok je drugim setom početnica umnožen amplikon Agl14B duljine 299 pb (slika 17e). Za gen *ATP1*, koji predstavlja negativnu kontrolu, dobiven je produkt duljine 592 pb (slika 17f), a početnice su preuzete od Beyrne i sur. (2019).



Slika 17. Amplikoni dobiveni umnažanjem reakcijom PCR vizualizirani na agaroznom gelu. Iznad slike je navedeno ime gena, dok M označava biljeg (*GeneRuler 1kb DNA Ladder* za slike e, f, odnosno *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* za slike a-d). Ispod svakog amplikona navedena je njegova duljina.

Prije obrade podataka koji daju uvid o stopi metilacije svakog pojedinog citozina u regijama pokrivenim provedenim umnažanjima metodom PCR, učinkovitost bisulfitne konverzije odredila sam na temelju analize sekvenci triju amplikona kontrolnog gena *ATP1*. Amplikone sam pročistila, ugradila u vektor, umnožila na prethodno opisan način i sekvencirala uslugom servisa Macrogen. Budući da bi gen *ATP1* trebao biti u potpunosti nemetiliran (Wang i sur., 2011), bilo je očekivano kako će svi citozini u sekvenci biti podložni konverziji te nakon

umnažanja reakcijom PCR prevedeni u timine. U tom slučaju, CyMATE prikaz rezultata trebali bi sačinjavati isključivo prazni simboli koji predstavljaju nemetilirane citozine. Na temelju dobivenih rezultata, za svaku od tri sekvence zbrojila sam broj nemetiliranih citozina (prazni simboli) i podijelila s ukupnim brojem citozina u ampliconu. Izračunala sam srednju vrijednost svih triju sekvenci te dobila učinkovitost konverzije od 98,98 % (Slika 18).



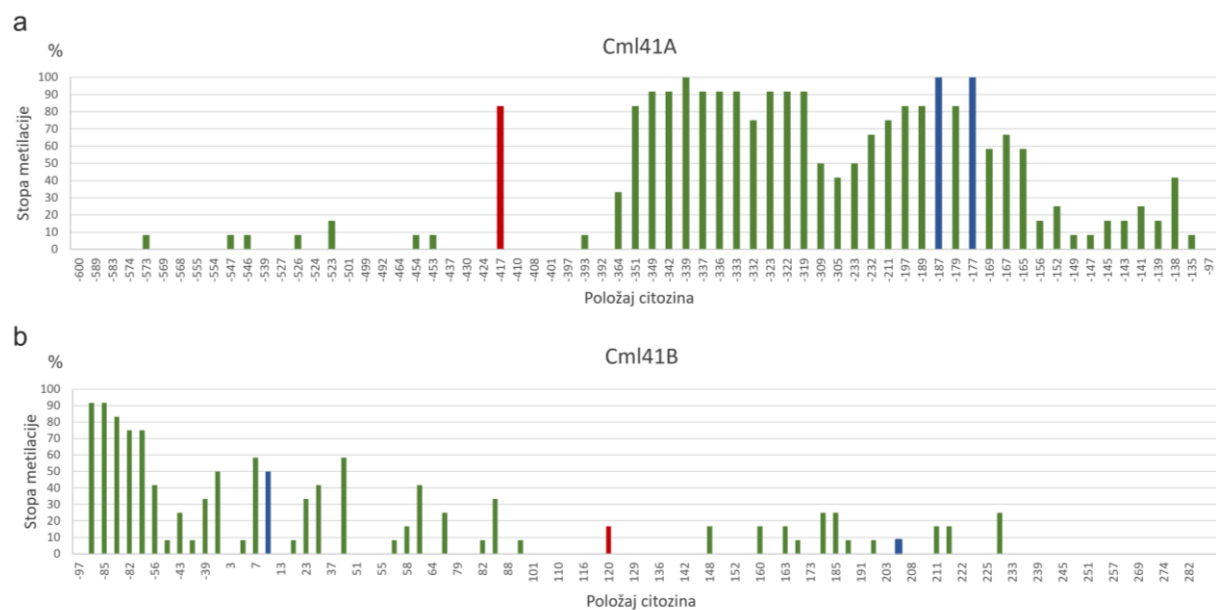
Slika 18. Metilacijski profil kontrolnog gena *ATP1* generiran programom CyMATE, nakon bisulfitne konverzije DNA, umnažanja ciljne regije reakcijom PCR, ugradnje u vektor te sekvenciranja. Prikazan je rezultat analize triju sekvenci. Položaji citozina u ampliconu prikazani su na liniji iznad, te brojčano ispod sekvenci. Prva linija simbola predstavlja referentnu sekvencu, odnosno sekvencu DNA prije konverzije. Preostale tri linije prikazuju sekvence konvertirane DNA. Svaki simbol označava zaseban citozin. Različiti simboli i boje označavaju različita citozinska okruženja i status metilacije. Crveni kružići označavaju okruženje CG, plavi kvadrati okruženje CHG, dok zeleni trokutići označavaju okruženje CHH. Ispunjeni simboli označavaju metilirane (me), dok prazni simboli predstavljaju nemetilirane citozine (ne me). Na temelju utvrđene metilacije izračunata je učinkovitost konverzije od 98,98%.

4.3.2. Metilacijski obrasci regija potencijalno metiliranih združenim mehanizmom proteina *BPM1* i *DMS3* u cvjetićima divljeg tipa uročnjaka

Na isti način kao i za *ATP1*, amplicone dobivene na kalupu konvertirane DNA za svaki gen ugrađivala sam u plazmidne vektore, umnažala ih u kompetentim bakterijskim stanicama,

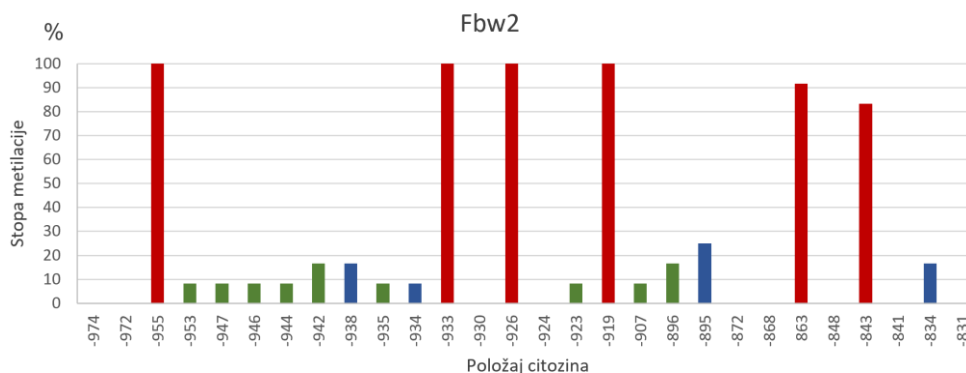
izolirala te sekvencirala uslugom servisa Macrogen. Za svaki gen analizirano je po 12 sekvenci amplikona korištenjem programa CyMATE, te sam za svaki analizirani amplikon i gen generirala individualni metilacijski profil istovjetan onome prikazanom za *ATP1* (slika 18). Ovakav prikaz pruža detaljne kvalitativne i kvantitativne rezultate na temelju kojih sam izračunala stope metilacije za svako metilacijsko mjesto, koje sam zatim prikazala grafički (slike 19, 20, 21). Na ovaj način utvrdila sam metilacijski najvarijabilnije regije unutar amplikona pogodne za detaljnu analizu metilacije pirosekvenciranjem.

Analizom sekvenci amplikona gena *CML41* na prethodno opisan način, u oba sam fragmenta identificirala metilirane citozine u sva tri okruženja (slika 19). Identificirala sam velik broj učestalo metiliranih pozicija u okruženju CHH, osobito u fragmentu Cml41A, gdje su prisutna i dva snažno metilirana citozina u CHG te jedan u okruženju CG (slika 19a).



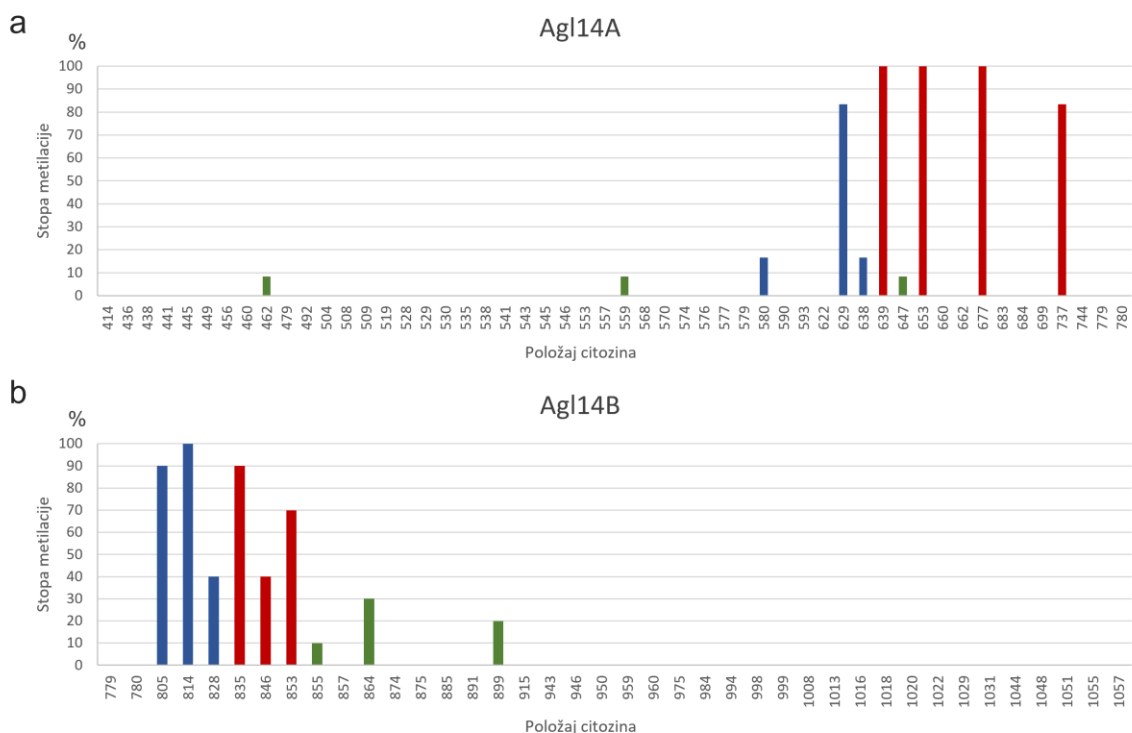
Slika 19. Stopa metilacije pojedinačnih citozina izražena u postotku metiliranog stanja u ukupnom broju sekvenciranih slijedova, dobivena obradom rezultata programa CyMATE za fragment A (a) i fragment B (b) gena *CML41*. Na apscisi je označen položaj svakog citozina u promotoru i tijelu gena, dok je na ordinati prikazana stopa metilacije. Postotci metilacije izračunati su na temelju 12 sekvenci. Različite boje stupaca označavaju različita citozinska okruženja: crvena – CG, plava – CHG, zelena – CHH.

Analizom sekvenci gena *FBW2*, identificirala sam 6 snažno metiliranih pozicija u okruženju CG, četiri slabije metilirana citozina u okruženju CHG i devet u okruženju CHH (slika 20).



Slika 20. Stopa metilacije pojedinačnih citozina izražena u postotku metiliranog stanja u ukupnom broju sekvenciranih slijedova, dobivena obradom rezultata programa CyMATE za gen *FBW2*. Na apscisi je označen položaj svakog citozina u promotoru gena, dok je na ordinati prikazana stopa metilacije. Postotci metilacije izračunati su na temelju 12 sekvenci. Različite boje stupaca označavaju različita citozinska okruženja: crvena – CG, plava – CHG, zelena – CHH.

Rezultate sekvenciranja za dva fragmenta gena *AGL14* prikazala sam odvojeno na dva grafa (slika 21a, b). U fragmentu AG114A identificirala sam četiri snažno metilirana citozina u okruženju CG, te tri citozina u okruženju CHG od kojih je jedan imao visoku, a druga dva nisku razinu metilacije. Najniže razine metilacije identificirala sam na tri pozicije CHH (slika 21a). U fragmentu Agl14B, najviša metilacija bila je prisutna na dvije CG i dvije pozicije CHG. Identificirana je još po jedna CG i jedna CHG pozicija s nižom metilacijom, te tri nisko metilirane CHH pozicije (slika 21b).



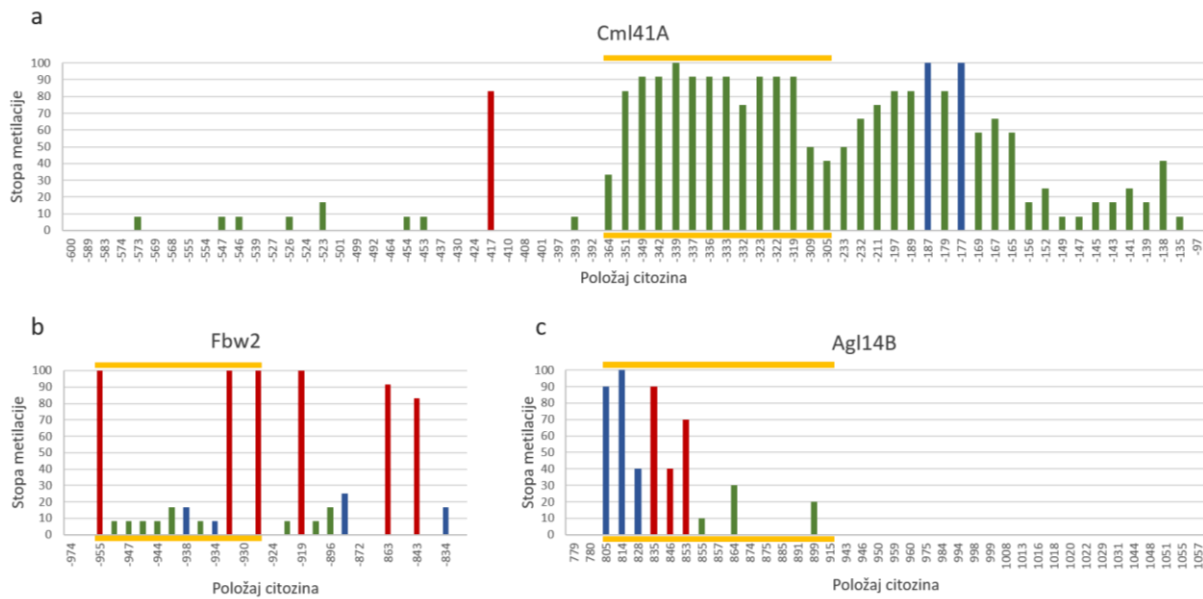
Slika 21. Stopa metilacije pojedinačnih citozina izražena u postotku metiliranog stanja u ukupnom broju sekvenciranih slijedova, dobivena obradom rezultata programa CyMATE za fragment A (a) i fragment B (b) gena *AGL14*. Na apscisi je označen položaj svakog citozina u egzonu i drugom intronu genu, dok je na ordinati prikazana stopa metilacije. Postotci metilacije izračunati su na temelju 12 sekvenci. Različite boje stupaca označavaju različita citozinska okruženja: crvena – CG, plava – CHG, zelena – CHH.

Za gen *RKP*, zbog problema prilikom kloniranja nije bila moguća analiza programom CyMATE u svrhu utvrđivanja regije od interesa.

4.3.3 Selekcija varijabilno metiliranih regija gena za analizu pirosekvenciranjem

Za daljnju analizu metilacije DNA u različitim tkivima, na temelju rezultata prethodne analize za svaki sam gen odabrala po jednu metiliranu regiju. Za gen *CML41* odabrala sam regiju u ampliconu Cml41A koja obuhvaća područje promotora nizvodno od citozina -364 (slika 22a). Iako i amplicon Cml41B sadrži potencijalno snažno metilirane citozine u okruženju CHH, u ovom ampliconu nije postojala mogućnost stvaranja početnice pogodne za pirosekvenciranje zbog velike zastupljenosti citozina u okolnim regijama. Za gen *FBW2*

odabrala sam regiju distalnog promotora nizvodno od citozina -955 (slika 22b). Za gen *AGL14* odabrala sam regiju u fragmentu *Agl14B* koji obuhvaća drugi intron gena (slika 22c).



Slika 22. Metilirane regije odabrane za analizu pirosekvenciranjem u promotorima gena *CML141* (a) i *FBW2* (b), odnosno u intronu gena *AGL14* (c). Odabrane regije su naznačene žutom linijom u sklopu prikaza metilacijskih obrazaca.

Za gen *RKP* odabrala sam regiju prema mogućnosti stvaranja početnica za pirosekvenciranje te broju prisutnih citozina u okruženju CHH. Regija je smještena u distalnom promotoru, nizvodno od citozina na poziciji -698 (slika 23).

-698 -682 -681 -665 -649
ATAAGATATTATTAAGGACTTAAAAAAATAATT**CG**GAGAGAAATTATTTA**CAA**AAGTGATATATA**CTT**AAA
-639 -634 -620 -609 -597 -596 -594 -581 -572 -570
TTT**CAT**TT**CTT**TTAGATTAAT**CAT**AATTATAT**CAT**ATTTTAGAT**CCA**CTTAAATAAAATA**CAG**TAAATA**CGCTA**

Slika 23. Dio sekvence promotora gena *RKP* odabran za analizu pirosekvenciranjem. Žutom bojom je osjenčano mjesto vezanja početnice odabrane za pirosekvenciranje. Iznad svakog analiziranog citozina navedena je njegova pozicija u promotoru gena, dok je citozinsko okruženje naznačeno različitim bojama teksta: crvena – CG, plava – CHG, zelena – CHH.

4.4. Metilacijski obrasci gena *CML41*, *FBW2*, *RKP* i *AGL14* variraju tijekom razvoja i u ovisnosti o prisutnosti proteina BPM1

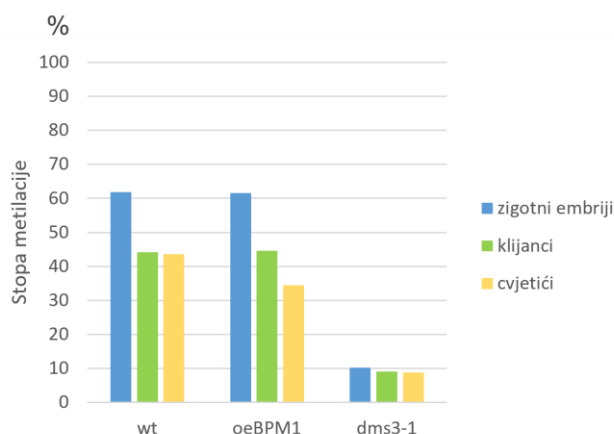
Kako bih ispitala postoje li razlike u metilaciji između različitih razvojnih stadija uročnjaka, za svaki sam gen usporedila vrijednosti temeljene na srednjoj vrijednosti metilacije svih analiziranih citozina u zigotnim embrijima, klijancima i cvjetićima dobivene pirosekvenciranjem. Ovi stadiji reprezentativni su jer pokrivaju embriogenezu te tranziciju s embriogeneze u vegetativnu fazu koja otpočinje klijanjem, te ponovnu razvojnu tranziciju iz vegetativne u reproduktivnu fazu, koju obilježava cvjetanje. Prikazani su rezultati analize napravljene u divljem tipu, liniji s prekomjernom ekspresijom proteina BPM1 (oeBPM1) te liniji s narušenom funkcijom mehanizma RdDM (*dms3-1*).

Pirosekvenciranjem je u genu *CML41* analizirana regija koja sadrži samo citozine u okruženju CHH, smještene u proksimalnom promotoru. Analizirano je ukupno 14 citozina između krajnjih položaja -364 i -305 (slike 19a, 24). Osim najvećeg broj citozina u okruženju CHH unutar jednog fragmenta, zabilježene su i izrazito visoke razine metilacije. Analizom rezultata, uočila sam jasne razlike u ukupnoj metilaciji između analiziranih transgenh linija, ali i među različitim stadijima razvoja (slika 25). Najviša razina ukupne metilacije utvrđena je u zigotnim embrijima divljeg tipa, dok je u embrijima linije oeBPM1 tek neznatno niža. Metilacija u klijancima ovih dviju linija također je bila podjednaka (slike 25, P1a), dok je u cvjetićima divljeg tipa viša u odnosu na liniju oeBPM1. Linija *dms3-1* imala je očekivane, vrlo niske razine metilacije u sva tri analizirana tkiva pa su i odstupanja u vrijednostima između tkiva slabije izražena, a ukazuju isključivo na metilacijske događaje posredovane drugim metilacijskim mehanizmima. Treba napomenuti kako ova linija nema funkcionalan mehanizam RdDM koji je odgovoran za metilaciju citozina u okruženju CHH, te je u ovom radu korištena kao kontrola za razlikovanje metilacije DNA posredovane mehanizmom RdDM od one posredovane drugim mehanizmima. Ovaj rezultat, stoga nedvojbeno ukazuje na značaj mehanizma RdDM na metilaciju u navedenim tkivima.

Cml41A

-364	-351	-349	-342	-339	-337	-336	-333	-332	-323	-322	-319	-309	-305
------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

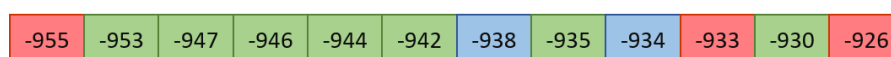
Slika 24. Pozicije citozina obuhvaćenih pirosekvenciranjem u promotoru gena *CML41*. Svaki kvadratić predstavlja jedan citozin, dok broj označava poziciju citozina u odnosu na TSS koji je nulta pozicija. Zelena boja kvadratića označava kako se radi o citozinima u okruženju CHH.



Slika 25. Prosječna stopa metilacije 14 analiziranih citozina promotora gena *CML41* (izražena kao srednja vrijednost pojedinačnih postotaka metilacije) u zrelih zigotnim embrijima, klijancima i cvjetićima divljeg tipa (wt) te transgenim linijama oeBPM1 i *dms3-1*.

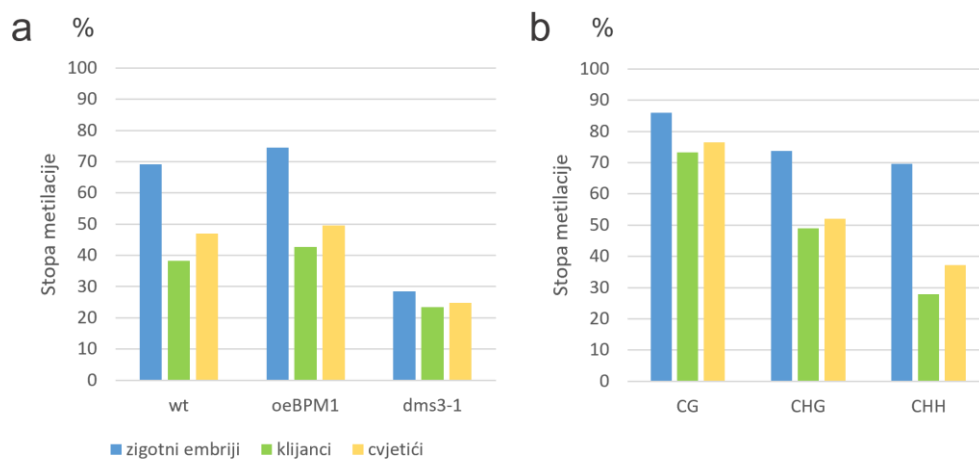
Ukupna metilacija odabrane promotorske regije gena *FBW2* podrazumijeva metilaciju u sva tri okruženja. Pirosekvenciranjem je bilo obuhvaćeno 12 citozina u području distalnog promotora: tri u okruženju CG (-955, -933, -926), dva u okruženju CHG (-938, -934) i sedam u okruženju CHH (-953, -947, -946, -944, -942, -935, -930) (slika 20, 26). Kao i u genu *CML41*, i ovdje su vidljive jasne razlike u stopama metilacije između tkiva (slika 27a). Najviša razina metilacije bila je u zigotnim embrijima linije oeBPM1, dok je u embrijima divljeg tipa malo niža. Linija oeBPM1 imala je povišenu metilaciju u odnosu na divlji tip i u cvjetićima i klijancima (slike 27, P1b) koji su bili najmanje metilirani od sva tri tkiva. Linija *dms3-1* i ovdje ima nisku razinu metilacije s manjim odstupanjima između tkiva, što je rezultat koji i ovdje ukazuje na značaj mehanizma RdDM, pogotovo u embrijima.

Fbw2



Slika 26. Pozicije citozina obuhvaćenih pirosekvenciranjem u promotoru gena *FBW2*. Svaki kvadratić predstavlja jedan citozin, dok broj označava poziciju citozina u promotoru gena u odnosu na TSS koji je nulta pozicija. Boja kvadratića označava okruženje citozina: crvena – CG, plava – CHG, zelena – CHH.

Kako bih nedvojbeno utvrdila koje metilacijsko okruženje najviše doprinosi razini metilacije, usporedila sam zasebne stope metilacije pojedinih okruženja između tkiva (slika 27b). Najvarijabilnija, iako ne i udjelom najviša metilacija, bila je u okruženju CHH. Ovo metilacijsko okruženje pokazalo se najvarijabilnijim u svim analiziranim linijama, ali sam za prikaz odabrala rezultate linije oeBPM1 u kojoj su utvrđene najviše razine metilacije pa su i razlike najuočljivije.



Slika 27. Metilacija citozina odabrane regije promotora gena *FBW2*. (a) Prosječna stopa metilacije 12 analiziranih citozina promotora gena *FBW2* (izražena kao srednja vrijednost pojedinačnih postotaka metilacije) u zrelih zigotnim embrijima, klijancima i cvjetićima divljeg tipa (wt) te transgenim linijama *oeBPM1* i *dms3-1*. (b) Prosječna stopa metilacije citozina u pojedinim citozinskim okruženjima u zrelih zigotnim embrijima, klijancima i cvjetićima transgene linije *oeBPM1*.

Za gen *RKP* pirosekvenciranjem je analizirano ukupno 15 citozina distalnog promotora gena, 11 u okruženju CHH (-698, -665, -649, -639, -634, -620, -609, -597, -596, -594, -570), dva u okruženju CG (-681, -572) i dva u okruženju CHG (-682, -581) (slika 28). Stope ukupne metilacije ovog gena bile su niže od onih u prethodnih kandidata što može biti posljedica visokog udjela općenito nisko metiliranog citozinskog okruženja CHH. Najviša ukupna metilacija analizirane regije ovoga gena utvrđena je u zigotnim embrijima, gdje su i najočitije razlike između linija (slika 29a). Značajno povišena metilacija u linijama *oeBPM1* i wt u odnosu na *dms3-1* ukazuje na uključenost RdDM-a u regulaciji metilacije u embriogenezi.

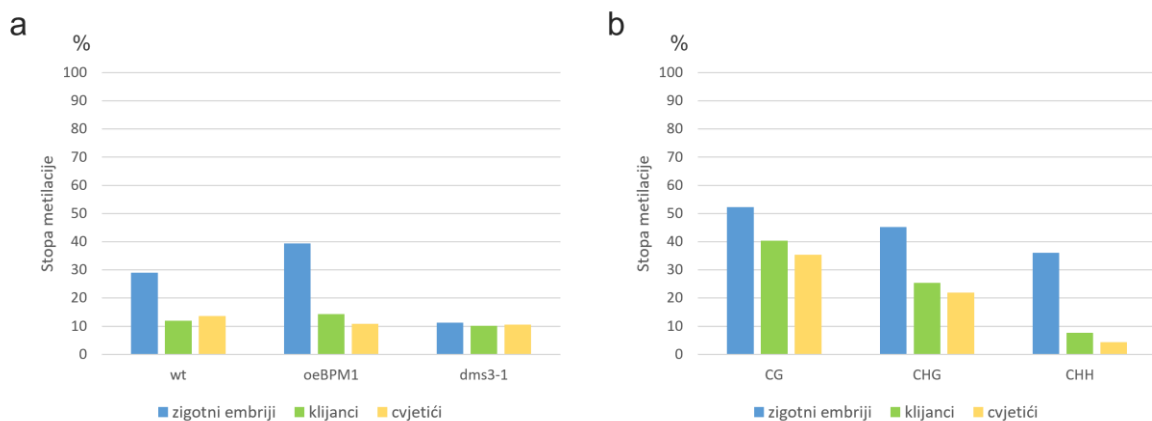
Niske i podjednake razine metilacije u klijancima i cvjetićima u sve tri linije, uključujući i liniju *dms3-1*, ukazuju da RdDM nije značajan metilacijski mehanizam u ova dva tipa tkiva.

Rkp



Slika 28. Pozicije citozina obuhvaćenih pirosekvenciranjem u promotoru gena *RKP*. Svaki kvadratić predstavlja jedan citozin, dok broj označava poziciju citozina u promotoru gena u odnosu na TSS koji je nulta pozicija. Boja kvadratića označava okruženje citozina: crvena – CG, plava – CHG, zelena – CHH.

Usporedbom metilacije pojedinačnih citozinskih okruženja utvrdila sam kako su najveće razlike između razvojnih stadija prisutne u okruženju CHH (slika 29b), što je u skladu sa prethodno istaknutim značajem mehanizma RdDM u embriogenezi.



Slika 29. Metilacija citozina odabrane regije promotora gena *RKP*. (a) Prosječna stopa metilacije 15 analiziranih citozina promotora gena *RKP* (izražena kao srednja vrijednost pojedinačnih postotaka metilacije) u zrelih zigotnim embrijima, klijancima i cvjetićima divljeg tipa (wt) te transgenim linijama *oeBPM1* i *dms3-1*. (b) Prosječna stopa metilacije citozina u pojedinim citozinskim okruženjima u zrelih zigotnim embrijima, klijancima i cvjetićima transgene linije *oeBPM1*.

U genu *AGL14* pirosekvenciranjem je analizirano 15 citozina smještenih u drugom intronu. Analizom su obuhvaćeni citozini u sva tri citozinska okruženja: tri u CHG (805, 814, 828), tri u CG (835, 846, 853) i devet u okruženju CHH (855, 857, 864, 874, 875, 885, 891, 899, 915) (Slike 21b, 30).

Agl14B

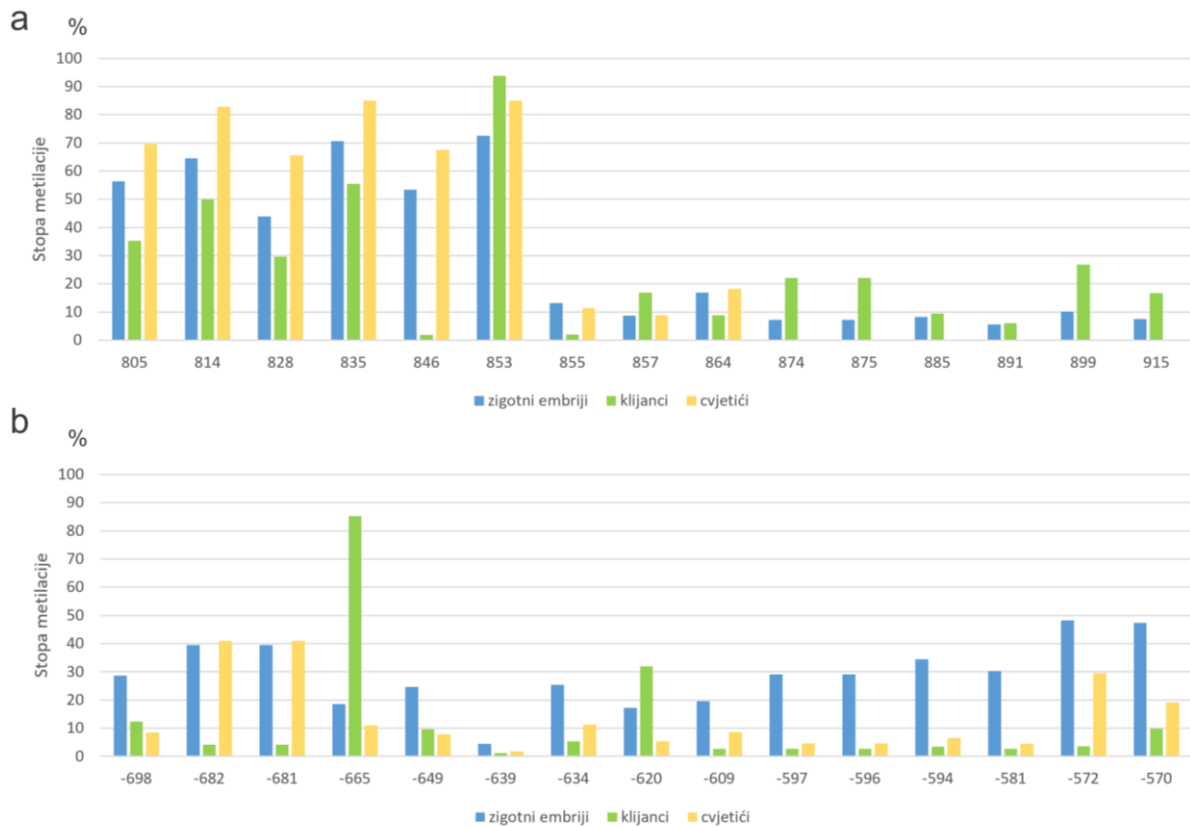
805	814	828	835	846	853	855	857	864	874	875	885	891	899	915
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Slika 30. Pozicije citozina obuhvaćenih pirosekvenciranjem u drugom intronu gena *AGL14*. Svaki kvadratić predstavlja jedan citozin, dok broj označava poziciju citozina u intronu gena u odnosu na TSS koji je nulta pozicija. Boja kvadratića označava okruženje citozina: crvena – CG, plava – CHG, zelena – CHH.

Analizom gena *AGL14*, u svim tkivima su izmjerene vrlo niske razine metilacije citozina u okruženju CHH, dok su metilacije citozina u okruženju CG i CHG relativno visoke i stabilnije između analiziranih linija. Niske vrijednosti metilacije citozina u okruženju CHH otežale su usporedbu metilacije između linija (nije prikazano), ali sam uočila jasne razlike metilacijskih obrazaca (svaki citozin odvojeno) između različitih tkiva divljeg tipa (slika 31a). Specifičan obrazac metilacije u klijancima divljeg tipa odstupa od svih ostalih linija i tkiva. Promjena obrasca temelji se na promjenama metilacije u sva tri okruženja, pa je tako uočen pad metilacije citozina u okruženju CHG (pozicije citozina 805, 814, 828), ali i porast metilacije citozina u okruženju CHH (pozicije citozina 857, 874, 875, 885, 891, 899, 915), u odnosu na embrije. Ipak, najuočljivija je razlika u okruženju CG gdje je metilacija bila smanjena na poziciji 846 na vrijednost manju od 10 %, te povišena na poziciji 853. U cvjetićima su dobivene najviše vrijednosti metilacije u CG i CHG okruženju, ali zbog nepotpune analize ovih uzoraka (citozini u okruženju CHH na pozicijama između 874 i 915 nisu analizirani zbog greške uređaja PyroMark Q24) pouzdanost ovih rezultata je upitna.

Sličan rezultat dobiven je usporedbom postotaka metilacije pojedinačnih citozina u genu *RKP*. Iako su najveće razine metilacije utvrđene u zigotnim embrijima, kao i za gen *AGL14* i ovdje sam utvrdila različite obrasce metilacije među tkivima divljeg tipa (slika 31b). U usporedbi s embrijima, u klijancima divljeg tipa dolazi do pada metilacije u svim citozinskim

okruženjima, te specifičnog povećanja metilacije na pozicijama -665 i -620 u okruženju CHH. U cvjetićima divljeg tipa, kao i svim analiziranim tkivima drugih linija, prisutan je obrazac metilacije sličan onom u embrijima (niske razine metilacije na pozicijama -665 i -620), uz različite globalne razine metilacije (niža metilacija okruženja CHH, ali viša u odnosu na klijance).



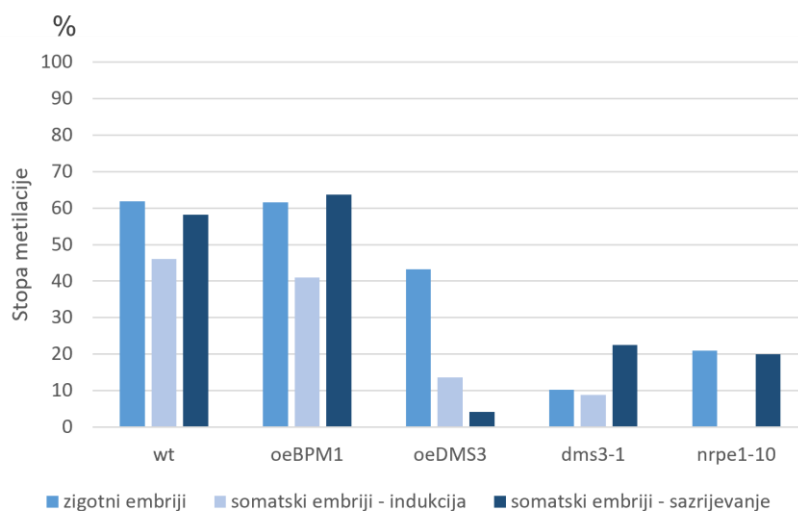
Slika 31. Metilacijski obrasci odabranih regija introna gena *AGL14* (a) i promotora gena *RKP* (b) u zigotnim embrijima, klijancima i cvjetićima divljeg tipa temeljeni na postotku metilacije svakog pojedinačnog citozina. Na apscisi su navedeni položaji pojedinačnih citozina u odnosu na TSS, dok je na ordinati prikazan njihov postotak metilacije.

Na temelju objedinjenih rezultata, utvrdila sam postojanje jasnih razlika u metilaciji DNA između različitih linija i razvojnih stadija uročnjaka. Najviše ukupne razine metilacije u svim genima utvrđene su u zigotnim embrijima, a razlike u metilaciji između razvojnih stadija temeljene su na promjenama metilacije okruženja CHH. Usporedbom metilacije DNA između linija, utvrdila sam više razine metilacije u liniji oeBPM1 u odnosu na divlji tip, te niže razine u liniji *dms3-1* što ukazuje na značaj mehanizma RdDM. Iznimka je gen *AGL14* u kojem je ovakva usporedba bila onemogućena zbog nepotpune analize metilacije cvjetića.

4.5. Metilacijski obrasci gena *CML41*, *FBW2*, *RKP* i *AGL14* različiti su u embrijima zigotnoga ili somatskoga porijekla

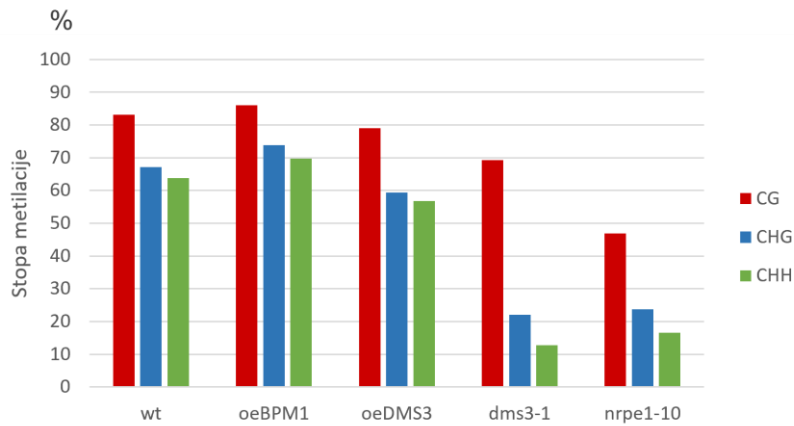
Za sva četiri odabrana gena analizirala sam metilaciju tijekom embriogeneze. Metilacija je analizirana u kotiledonarnim zigotnim embrijima koji su ujedno korišteni kao eksplantati za poticanje somatske embriogeneze, te u nezrelim, tek induciranim, i zrelim somatskim embrijima kotiledonarnog stadija, s ciljem utvrđivanja razlika u metilaciji između dva tipa embriogeneze. Prikazani su rezultati analize napravljene u divljem tipu, linijama s prekomjernom ekspresijom proteina BPM1 (oeBPM1) i DMS3 (oeDMS3), te linijama s narušenom funkcijom mehanizma RdDM (*dms3-1*, *nrpe1-10*).

Razlike metilacije okruženja CHH između zigotne i somatske embriogeneze u različitim linijama najlakše se uočavaju na primjeru referentnog gena *CML41* (slika 32). Najviša razina metilacije citozina bila je u kotiledonarnim embrijima, i zigotne i somatske embriogeneze, u divljem tipu i liniji oeBPM1. U fazi indukcije somatske embriogeneze (rani stadiji embrija), metilacija je u divljem tipu i liniji oeBPM1 bila niža u odnosu na fazu sazrijevanja somatskih embrija, kao i u odnosu na kotiledonarne zigotne embrije na kojima je indukcija potaknuta. Somatski embriji u fazi sazrijevanja u ovim linijama imali su neznatno sniženu ili povišenu metilaciju u odnosu na zrele zigotne embrije. Ovaj rezultat je očekivan budući da su zigotni embriji korišteni u istraživanju u zreлом kotiledonarnom stadiju kao i somatski embriji u fazi sazrijevanja. Kotiledonarni zigotni embriji nadekspresorske linije oeDMS3 imali su nižu metilaciju od embrija divljeg tipa u ovoj fazi. Neočekivano, zreli somatski embriji ove linije značajno su manje metilirani od zigotnih embrija, ukazujući na eventualnu razliku značajnosti mehanizma RdDM u dva tipa embriogeneze. Opadanje razine metilacije bilo je intenzivno već u indukcijskoj fazi u kojoj je metilacija gotovo trostruko niža u odnosu na eksplantat, odnosno kotiledonarni zigotni embrij. Samo je u ovoj liniji metilacija u zrelim embrijima bila niža nego u fazi indukcije. Razine metilacije citozina u okruženju CHH u linijama *dms3-1* i *nrpe1-10* bilo su znatno niže u odnosu na wt i oeBPM1, što je u skladu s izostankom funkcionalnog mehanizma RdDM u tim linijama, te dodatno potvrđuje njegovu ulogu u regulaciji embriogeneze. U mutantnoj liniji *dms3-1* metilacija u fazi sazrijevanja somatskih embrija znatno je viša u odnosu na vrijednosti zigotnih embrija, ukazujući na uključenost drugih mehanizama neovisnih o proteinu DMS3.



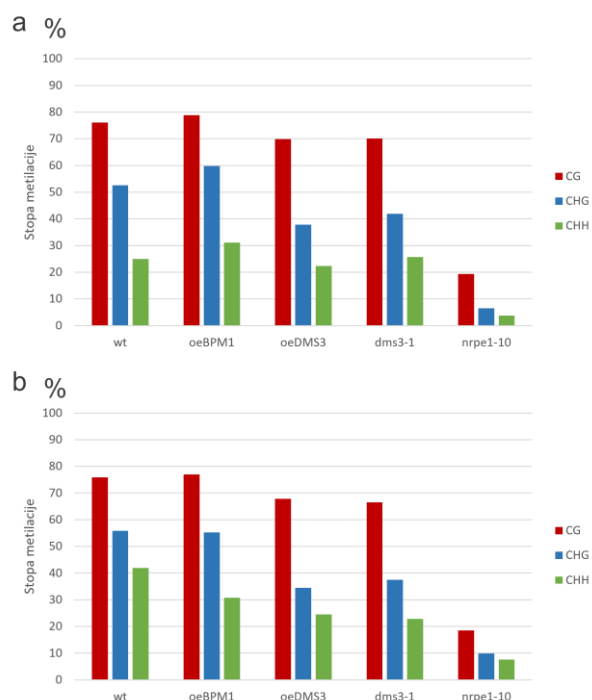
Slika 32. Prosječna stopa metilacije 14 analiziranih citozina promotora gena *CML41* (izražena kao srednja vrijednost pojedinačnih postotaka metilacije) u zrelim zigotnim embrijima te induciranim i zrelim somatskim embrijima divljeg tipa (wt) i transgenih linija oeBPM1, oeDMS3, *dms3-1* i *nrpe1-10*.

Rezultati dobiveni analizom promotora gena *FBW2* u embrijima omogućili su usporedbu metilacije citozina u sva tri citozinska okruženja u embriogenezi. Usporedbom pojedinih citozinskih okruženja u zigotnim embrijima, utvrdila sam kako je u svim linijama najviša razina metilacije okruženja CG (slika 33) dok je, slično kao i u genu *CML41*, najniža bila razina metilacije okruženja CHH. Unatoč tome, zanimljivo je kako je razina ipak vrlo bliska razinama metilacije u okruženjima CG i CHG koja predstavljaju najučestalija mjesta metilacije biljnog genoma. Najveće razlike između linija uočene su upravo u okruženju CHH. Uz nižu razinu metilacije citozina u okruženju CHH u linijama *dms3-1* i *nrpe1-10*, uočena je i snižena metilacija u liniji oeDMS3, što se podudara s rezultatima dobivenim za gen *CML41* (slika 32), premda je ovakav rezultat neočekivan s obzirom na ulogu proteina DMS3 u mehanizmu RdDM.



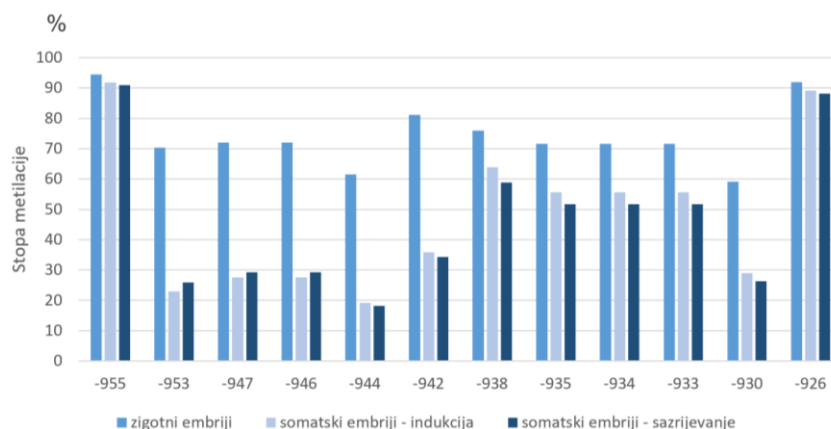
Slika 33. Prosječna stopa metilacije citozina u pojedinim citozinskim okruženjima promotora gena *FBW2* u zrelih zigotnim embrijima divljeg tipa te transgenih linija *oeBPM1*, *oeDMS3*, *dms3-1* i *nrpe1-10*.

Značajno manje razlike u metilaciji citozina između linija uočila sam analizom promotora gena *FBW2* u fazi indukcije i sazrijevanja somatskih embrija (slika 34). Posebno su zanimljive vrijednosti metilacije u okruženju CHH. Iako sam na temelju rezultata ostvarenih na zigotnim embrijima utvrdila kako su upravo u ovom okruženju prisutne najveće varijacije (slika 33), u somatskoj embriogenezi metilacija u ovom okruženju značajno manje varira (slika 34), što ponovno ukazuje na povećan značaj mehanizma RdDM za zigotnu embriogenezu. Glavni razlog umanjene varijabilnosti u somatskoj embriogenezi je sveukupno niža razina metilacije u okruženju CHH u divljem tipu te linijama *oeBPM1*, *oeDMS3* i *nrpe1-10* u somatskim embrijima. Iznimka je jedino linija *dms3-1* u kojoj je metilacija u okruženju CHH viša u somatskoj (slika 34) u odnosu na zigotnu embriogenezu (slika 33), što je odnos vrijednosti jednak onome kakav je prethodno zabilježen i u promotoru gena *CML41* (slika 32). Ovakav rezultat dodatno podupire ideju da somatskom embriogenezom upravljaju i drugi metilacijski mehanizmi, a ne isključivo RdDM.



Slika 34. Prosječna stopa metilacije citozina u pojedinim citozinskim okruženjima promotora gena *FBW2* tijekom indukcije somatske embriogeneze (a) i u zrelim somatskim embrijima (b) divljeg tipa te transgenih linija *oeBPM1*, *oeDMS3*, *dms3-1* i *nrpe1-10*.

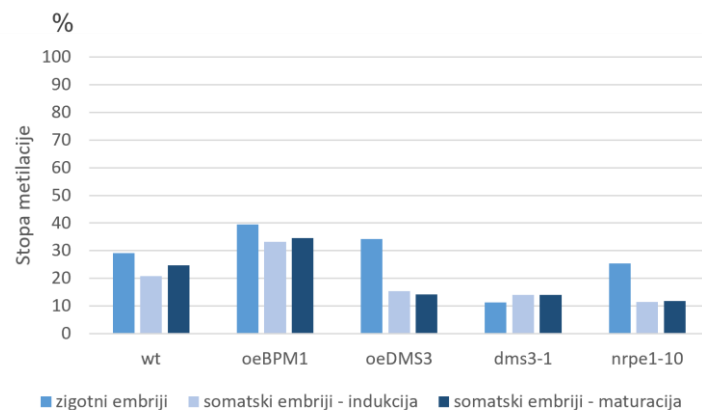
Razlika metilacije citozina između zigotnih i somatskih embrija temelji se prvenstveno na metilaciji okruženja CHH, i bila je najizraženija na šest citozina na položajima -953, -947, -946, -944, -942 i -930. Ovakav obrazac metilacije uočila sam u svim analiziranim linijama, ali sam za prikaz odabrala liniju *oeBPM1* u kojoj su ove razlike najlakše vidljive (slika 35).



Slika 35. Metilacijski obrasci odabrane regije promotora gena *FBW2* u zigotnim embrijima linije *oeBPM1*, tijekom indukcije somatske embriogeneze te u zrelim somatskim embrijima,

temeljeni na postotku metilacije svakog pojedinačnog citozina. Na apscisi su navedeni položaji pojedinačnih citozina u odnosu na TSS, dok je na ordinati prikazan njihov postotak metilacije.

Premda su analizom metilacije gena *RKP* u embrijima zabilježene značajno niže razine metilacije u sva tri citozinska okruženja, relativni odnosi su se većinom podudarali s onima za gen *FBW2*. Najviše razine metilacije u zigotnoj embriogenezi utvrđene su u liniji *oeBPM1* u sva tri okruženja, a najniže u liniji *dms3-1* (slika 36). U fazi indukcije somatske embriogeneze, metilacija je bila niža u usporedbi sa kotiledonarnim zigotnim embrijima u svim linijama osim u *dms3-1*, u kojoj je bila blago povišena. U fazi sazrijevanja somatskih embrija, metilacija je bila viša u odnosu na fazu indukcije somatske embriogeneze u divljem tipu i liniji *oeBPM1*, dok je samo u liniji *oeDMS3* bila malo snižena. Niža metilacija u somatskim embrijima ovih linija u odnosu na zigotne temeljena je prvenstveno na nižoj metilaciji citozina u okruženju CHH, te pozicije -581 u okruženju CHG. Zbog vrlo niskih vrijednosti i malih razlika, na temelju dobivenih rezultata nisam mogla donijeti pouzdane zaključke o metilaciji tijekom somatske embriogeneze u linijama *dms3-1* i *nrpe1-10*, osim zaključka o važnoj, iako ne isključivoj ulozi mehanizma RdDM u procesu embriogeneze.



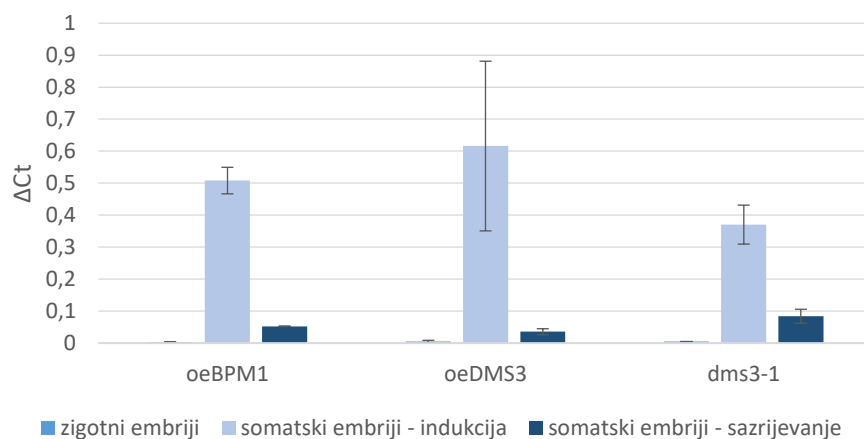
Slika 36. Prosječna stopa metilacije 15 analiziranih citozina promotora gena *RKP* (izražena kao srednja vrijednost pojedinačnih postotaka metilacije) u zrelim zigotnim embrijima, tijekom indukcije somatske embriogeneze te u zrelim somatskim embrijima divljeg tipa (wt) i transgenih linija *oeBPM1*, *oeDMS3*, *dms3-1* i *nrpe1-10*.

Niska razina metilacije u svim okruženjima u prvom intronu gena *AGL14* otežala je usporedbu rezultata i pouzdano utvrđivanje razlika između zigotne i somatske embriogeneze u ovom genu (nije prikazano).

4.6. Relativna ekspresija gena *CML41*, *FBW2*, *RKP* i *AGL14* u zigotnim i somatskim embrijima

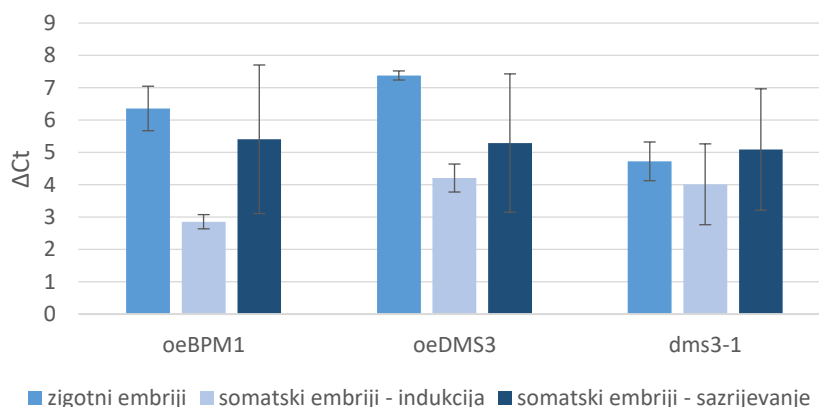
U svrhu analize učinka promjene metilacije na ekspresiju gena, analizirala sam relativnu ekspresiju gena metodom qPCR. Analiza je napravljena u zigotnim i somatskim embrijima te klijancima (Prilog 8.6.), budući da su u ovim razvojnim fazama prethodno utvrđene najdinamičnije promjene metilacije. Ekspresija je analizirana u linijama *oeBPM1*, *oeDMS3* i *dms3-1*, te u divljem tipu (Prilog 8.6.).

Za gen *CML41* prethodnim je istraživanjima utvrđeno kako je pod kontrolom mehanizma RdDM, te kako ekspresija opada s porastom metilacije (Baev i sur., 2010; Naydenov i sur., 2015). Analiza ekspresije u zigotnim embrijima ukazala je na vrlo slabu ekspresiju u svim transgenim linijama biljaka (slika 37). Ovakav rezultat odgovara supresivnom učinku metilacije budući da su u kotiledonarnim zigotnim embrijima zabilježene najviše razine metilacije. U fazi indukcije SE, u odnosu na fazu sazrijevanja SE i kotiledonarne zigotne embrije, ekspresija gena bila je povišena u svim ispitanim linijama što je posljedica utvrđenih niskih razina metilacije. U fazi sazrijevanja embrija ekspresija je bila značajno niža u odnosu na ekspresiju tijekom indukcije somatske embriogeneze u svim linijama (slika 37).



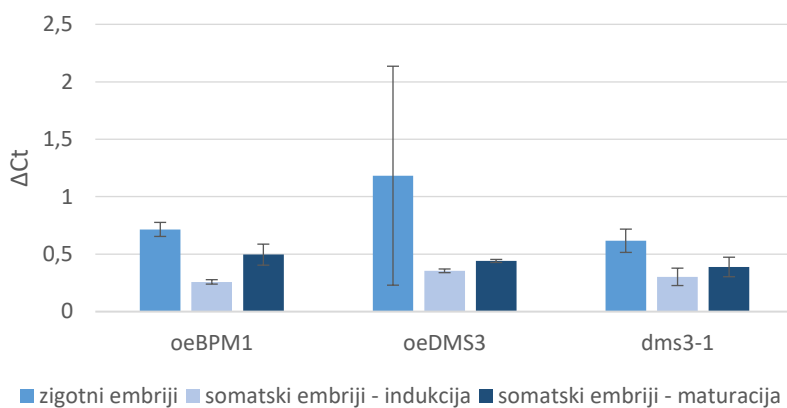
Slika 37. Relativne razine ekspresije gena *CML41* u kotiledonarnim zigotnim embrijima te u somatskoj embriogenezi tijekom indukcije i sazrijevanja (kotiledonarni stadij) u linijama *oeBPM1*, *oeDMS3* i *dms3-1*. Prikazana je srednja vrijednost dviju tehničkih replika (n=2).

Analizom ekspresije gena *FBW2* u zigotnim embrijima utvrđene su najviše razine ekspresije u nadekspresorskim linijama, oeDMS3 te oeBPM1, dok je linija *dms3-1* imala nižu razinu ekspresije (slika 38). Odnos ekspresija između ovih linija podudara se s odnosom metilacija; u nadekspresorskim linijama koje imaju visoke razine metilacije utvrđene su i visoke ekspresije, dok linija *dms3-1* ima niske razine metilacije i ekspresije. Usporedbom dviju faza somatske embriogeneze, više razine ekspresije utvrdila sam u fazi sazrijevanja u svim linijama. Ove su vrijednosti ipak niže od onih kod zigotnih embrija u linijama oeBPM1 i oeDMS3, dok je u liniji *dms3-1* ekspresija u zigotnim embrijima i fazi sazrijevanja somatskih embrija podjednaka. Premda je zbog velikih standardnih pogrešaka između tehničkih replika teško donijeti pouzdani zaključak o učinku metilacije u selektiranoj regiji distalnog promotora, pretpostavljena je njena uloga u aktivaciji ekspresije gena *FBW2*.



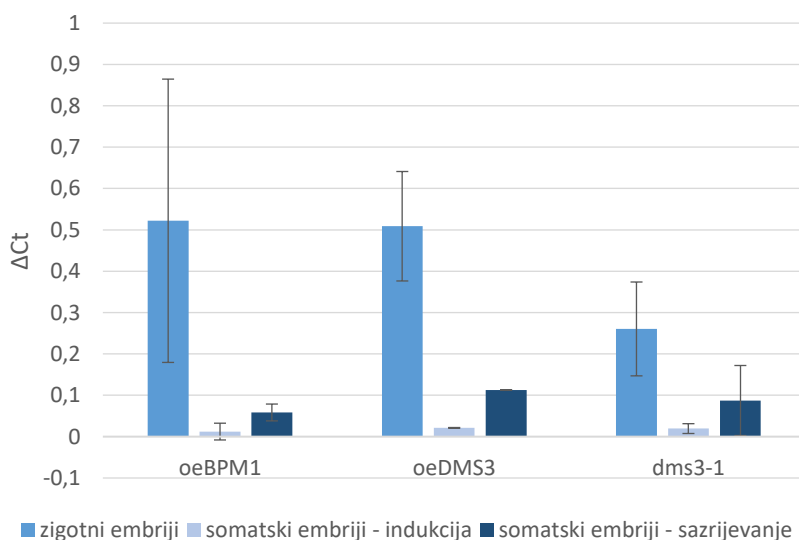
Slika 38. Relativne razine ekspresije gena *FBW2* u kotiledonarnim zigotnim embrijima te u somatskoj embriogenezi tijekom indukcije i sazrijevanja (kotiledonarni stadij) u linijama oeBPM1, oeDMS3 i *dms3-1*. Prikazana je srednja vrijednost dviju tehničkih replika (n=2).

Kao i u slučaju ekspresije gena *FBW2*, najviše razine ekspresije gena *RKP* zabilježene su u zigotnim embrijima (slika 39). U somatskoj embriogenezi, ekspresija je niža i u fazi indukcije i u fazi sazrijevanja. Iako je zbog velikih standardnih pogrešaka i niskih vrijednosti otežana usporedba razina ekspresije između linija te dvaju stadija somatske embriogeneze, i ovdje sam uočila sličan trend kao i na primjeru gena *FBW2*, odnosno za oba gena viša razina metilacije u regiji distalnog promotora je povezana s višom ekspresijom gena.



Slika 39. Relativne razine ekspresije gena *RKP* u kotiledonarnim zigotnim embrijima te u somatskoj embriogenezi tijekom indukcije i sazrijevanja (kotiledonarni stadij) u linijama oeBPM1, oeDMS3 i *dms3-1*. Prikazana je srednja vrijednost dviju tehničkih replika (n=2).

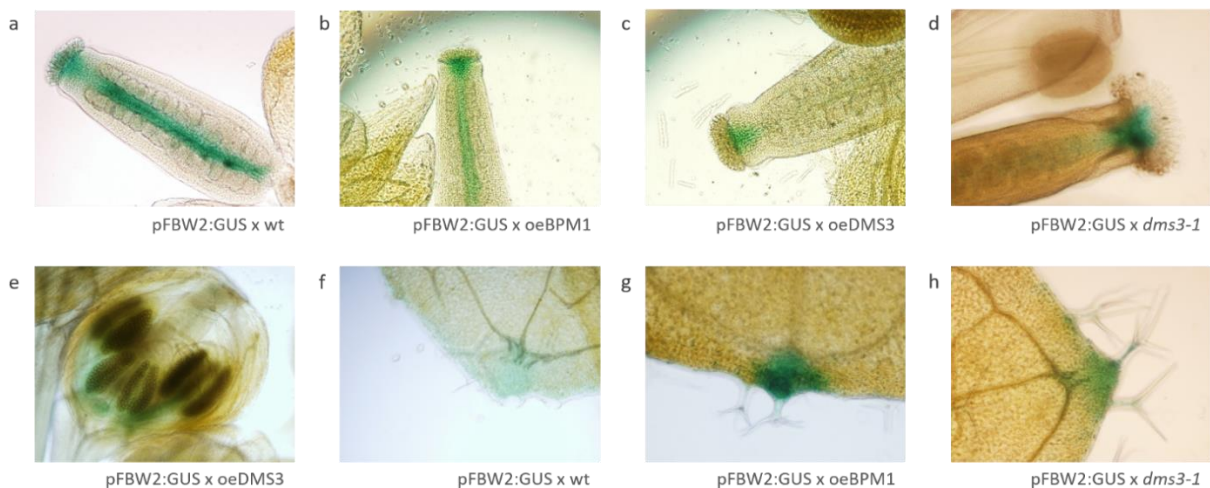
U genu *AGL14*, najviše razine ekspresije ponovno su zabilježene u zigotnim embrijima, dok je u somatskoj embriogenezi ekspresija gena bila niža, osobito u fazi indukcije (slika 40). Ovakav obrazac je prisutan u svim linijama. Zbog niskih izmjenjenih vrijednosti, ne može se donijeti jasan zaključak o odnosu metilacije i ekspresije za ovaj gen.



Slika 40. Relativne razine ekspresije gena *AGL14* u kotiledonarnim zigotnim embrijima te u somatskoj embriogenezi tijekom indukcije i sazrijevanja (kotiledonarni stadij) u linijama oeBPM1, oeDMS3 i *dms3-1*. Prikazana je srednja vrijednost dviju tehničkih replika (n=2).

4.7. Aktivnost promotora gena *FBW2* najizraženija je u cvjetićima linije *oeBPM1*

Za analizu aktivnosti promotora odabrala sam gen *FBW2*, budući da su za ovaj gen prethodno dobiveni najpotpuniji rezultati za sva tkiva i linije, kako u analizi metilacije, tako i ekspresije. Aktivnost promotora gena *FBW2* je histokemijskim bojenjem analizirana u različitim tkivima, te je u svrhu usporedbe aktivnosti promotora između različitih linija odabrano tkivo u kojem je uočeno najintenzivnije obojenje. Linija *pFBW2:GUS* križana je s odabranim transgenim linijama, a za prikaz su odabrani najreprezentativniji rezultati (slika 41). Najviša razina ekspresije gena za β -glukuronidazu utvrđena je u cvjetićima, točnije u tučku i filamentima prašnika. Najintenzivnije obojenje tkiva tučka bilo je u divljem tipu i liniji *oeBPM1*, gdje je plavo obojenje prisutno duž transmisijskog kanala i u području njuške tučka (slika 41a, b). U linijama *oeDMS3* i *dms3-1* intenzitet obojenja bio je značajno slabiji, te je signal uglavnom bio lokaliziran na njuški tučka (slika 41c-e). Dodatno, plavo obojenje zabilježeno je i u stanicama trihoma (slika 41f-h), što upućuje na ekspresiju gena *FBW2* i u ovom području. Sumarno, rezultat ukazuje na veću aktivnost promotora u divljem tipu i liniji *oeBPM1*, u odnosu na linije s promijenjenom funkcijom proteina DMS3, *oeDMS3* i *dms3-1*. Korelacija ovih rezultata s prethodno utvrđenim podacima o metilaciji, dodatno potkrepljuje ideju o stimulativnom utjecaju metilacije distalnog promotora gena *FBW2* na njegovu aktivnost, pri čemu ulogu u metilaciji ima protein BPM1.



Slika 41. Aktivnost promotora gena *FBW2* vizualizirana plavim obojenjem nakon histokemijskog bojenja u linijama dobivenim križanjem linija koje ekspimiraju transgen *pFBW2:GUS* s divljim tipom (a, f), te linijama *oeBPM1* (b, g), *oeDMS3* (c, e) i *dms3-1* (d, h). Plavo obojenje najintenzivnije je u vratu i transmisijskom kanalu tučka (a, b), filamentima prašnika (e) i trihomima listova (f, g, h).

5. RASPRAVA

Odmah po otkriću metilacije DNA, ova je modifikacija privukla interes brojnih znanstvenika, a s daljnjim istraživanjima i spoznajom širine njezina djelovanja, taj je interes samo rastao. Premda je 5-metilcitozin prvo otkriven u bakterijama (Johnson i Coghill, 1925), tek je njegovim otkrićem u sisavcima (Avery i sur., 1979; McCarty i Avery, 1946), kod kojih je utvrđeno kako distribucija 5-metilcitozina nije nasumična, stvorena ideja o mogućoj biološkoj funkciji metilacije DNA. Otkriće metilacije DNA u sisavcima potaknulo je brojna istraživanja mehanizama uspostave, ali i učinka metilacije DNA i u brojnim drugim eukariotima. Ova su istraživanja rezultirala utvrđivanjem univerzalnih karakteristika metilacijskih mehanizama, kao što je identifikacija S-adenozilmetionina kao donora metilne skupine, ali i specifičnosti metilacije DNA u pojedinim vrstama. Jedna od temeljnih karakteristika metilacije DNA na kojoj počiva njezina raznolikost je postojanje različitih citozinskih okruženja. Dok se u sisavcima metilacija uspostavlja samo na citozinima iza kojih slijedi gvanin (tzv. CpG otoci), otkriveno je kako se u biljkama metilacija može uspostaviti na bilo kojem citozinu (Guseinov i Vanyushin, 1975). Prema tome su definirana dodatna dva citozinska okruženja, CHG i CHH (gdje H predstavlja A, C ili T). Unatoč mogućnosti metilacije citozina u različitim okruženjima, metilacija se u biljkama i dalje primarno odvija u okruženju CG, te je dokazano kako 55 % svih metilcitozina u uročnjaku otpada na citozine u okruženju CG, dok se ostatak podjednako dijeli na CHG i CHH (Cokus i sur., 2008; Lister i sur., 2008). Uz razlike u okruženju citozina koji podliježu metilaciji, utvrđene su i razlike u nukleotidnim slijedovima koji se metiliraju. Dok su u sisavcima podjednako metilirani i geni i transpozoni (Law i Jacobsen, 2010), kod biljaka su meta metilacijskog aparata prvenstveno transpozoni, te je metilirano tek 20-30 % gena (Zhang i sur., 2006; Zilberman i sur., 2006). Tako je u transpozonomima biljaka metilirana većina citozina, bez obzira na to u kojem se okruženju nalaze, dok su tek pojedini geni metilirani, i to uglavnom isključivo u okruženju CG. Iako najrjeđa, metilacija citozina u okruženju CHH fokus je brojnih istraživanja. Razlog tome je razvojno-specifična varijabilnost i dinamika metilacijskih promjena ovog citozinskog okruženja (Bouyer i sur., 2017). Dok je metilacija u okruženju CG relativno stabilna i ne varira značajno kroz embrionalni i vegetativni razvoj, metilacija okruženja CHH je vrlo dinamična, osobito u embriogenezi i ranom vegetativnom razvoju, kada je precizna kontrola ove modifikacije od ključne važnosti (Kawashima i Berger, 2014). Upravo zbog toga je otkriće biljno-specifičnog mehanizma RdDM, odgovornog za uspostavu metilacije citozina u okruženju CHH izazvalo golem interes u području biljne biologije. Unatoč razjašnjenju osnova mehanizma, kao i otkriću

komponentata zaduženih za njegovo ispravno funkcioniranje, i dalje postoje brojne nepoznanice. Još uvijek se otkrivaju nove interakcije i dodatne funkcije komponenata ovog mehanizma, što upućuje na njegovu potencijalno još širu i značajniju ulogu nego što je dosad utvrđeno.

U svrhu boljeg razumijevanja uloga i razvojnih faza u kojima su aktivni pojedini metilacijski mehanizmi, u istraživanjima se danas često koriste metilacijske mutante vrste *Arabidopsis thaliana*. Narušene funkcije pojedinih komponenata metilacijskih mehanizama rezultiraju odstupanjima u razvoju koja su posebno uočljiva tijekom rane embriogeneze. Mutacija metiltransferaze u mutanti *met1* rezultira nastankom uočljivih fenotipova koji su posljedica poremećaja u diobi stanica (Xiao i sur., 2006). Gubitak funkcije MET1 utječe na transkripciju gena koji reguliraju stanični identitet tijekom rane embriogeneze; smanjuje se ekspresija gena *WOX2* i *WOX8*, dolazi do porasta ekspresije gena *YDA* te promjene obrasca ekspresije gena *PIN1* koji kodira transporter auksina, što rezultira njegovom jednolikom distribucijom u embriju. Ovakva distribucija transportera PIN1 uzrokuje jednoliku distribuciju auksina te izostanak formiranja maksimuma auksina u apikalnoj regiji.

Gubitak funkcije kromometilaze 3 zadužene za održavanje ne-CG metilacije rezultira poremećajima u kasnijim stadijima embriogeneze, gdje se gubi granica između embrija i suspensora zbog longitudinalnih dioba u suspensoru. Embriji dvostrukih mutanata *met1 cmt3* imaju jednake poremećaje u razvoju koji ovdje imaju još izraženiji utjecaj na razvoj embrija, klijavost sjemena i razvoj biljke (Xiao i sur., 2006). Mutacija *de novo* metiltransferaze DRM2 rezultira općim gubitkom majčinskog metiloma CHH u jajnoj stanici, što ima za posljedicu promjene obrazaca dioba u ranom embrionalnom razvoju. Trostruki mutant *ddc*, s narušenom funkcijom metiltransferaza DRM1, DRM2 i CMT3, posjeduje brojne fenotipske poremećaje koji su posljedica narušenog transporta auksina (Forgione i sur., 2019). Tijekom rane embriogeneze razvija se suspensor sa smanjenim brojem stanica. Poremećaj u razvoju suspensora nastavlja se u globularnom stadiju kad se zaustavlja proliferacija stanica suspensora što rezultira nastankom skraćenog suspensora, dok u srcolikom stadiju dolazi do proliferacije stanica i elongacije suspensora. U ovom stadiju dolazi do akumulacije auksina u bazalnom dijelu, suprotno normalnom auksinskom maksimumu koji se formira u apikalnoj regiji kotiledona. Poremećaji obuhvaćaju i razvoj endosperma u kojem dolazi do narušene histološke organizacije, dok je u listu mutanta *ddc* utvrđena povišena ekspresija gena uključenih u biosintezu auksina kao posljedica demetilacije (Forgione i sur., 2019). Premda su dodatna istraživanja nužna za bolje razumijevanje ovih procesa, ovi rezultati ukazuju na postojanje jasne

veze između metilacije DNA *de novo* i uloge auksina u embrionalnom razvoju. Budući da je uloga mehanizma RdDM tijekom embrionalnog razvoja nedvojbeno, dok je u kasnijim stadijima životnog ciklusa njegovo djelovanje ograničeno na meristeme (Baubec i sur., 2014), jasnije razumijevanje ovog mehanizma dovesti će do boljeg razumijevanja ovog najdinamičnijeg razvojnog stadija.

U ovom radu primjenom kromatinske imunoprecipitacije identificiran je set gena čija je metilacija posredovana zajedničkim djelovanjem mehanizma RdDM i proteina BPM1, obzirom na interakcije koje BPM1 ostvaruje s komponentama mehanizma RdDM, proteinima DMS3 i RDM1 (Jagić i sur., 2022). Iako je bilo očekivano da će set zajedničkih genskih meta proteina DMS3 i RDM1 biti povezan uglavnom s metabolizmom i distribucijom auksina, ili s poznatim metama PolV (Liu i sur., 2018; Markulin i sur., 2021), rezultati kromatinske imunoprecipitacije ukazali su na nove mete mehanizma RdDM, od kojih su zbog najvećeg obogaćenja proteinima BPM1 i DMS3 za daljnje analize izdvojeni *AGL14*, *FBW2* i *RKP*.

Jedini čija se uloga povezuje s metabolizmom auksina je gen *AGAMOUS-LIKE14/XAANTAL 2 (AGL14/XAL2)*, koji spada u skupinu gena koji kodiraju transkripcijske faktore s domenom MADS, a uključeni su u mnoge aspekte biljnog razvoja i morfogeneze, uključujući embriogenezu i homeostazu auksina. Konkretno, *AGL14* je uključen u uspostavu apikalnog meristema izdanka tijekom embriogeneze. Protein *AGL14* se veže na regulatorne regije gena *PIN1* i *PIN4*, koji kodiraju membranske transportere auksina, te pozitivno regulira njihovu ekspresiju. Također, utvrđeno je kako auksin pozitivno utječe na ekspresiju *AGL14*, što upućuje na zaključak kako je *AGL14* dio mehanizma pozitivne povratne sprege (Garay-Arroyo i sur., 2013). Kao ključna komponenta u regulaciji transporta auksina, *AGL14* je preferentno eksprimiran u korijenu uročnjaka (Gan i sur., 2005).

Funkcije ostala dva selektirana gena nisu direktno povezane niti s auksinom niti s embriogenim razvitkom iako je njihova uloga tijekom embriogeneze potencijalno indirektna i posredovana globalnim mehanizmima regulacije proteasomalne razgradnje ili transkripcijskog i posttranskripcijskog utišavanja gena.

Gen *FBW2* kodira za protein koji je visoko očuvan među cvatućim biljkama, a dio je kompleksa SCF E3 ligaza. U sklopu ovog kompleksa, protein *FBW2* ima ulogu u prepoznavanju supstrata za degradaciju (Yang i sur., 2005). Jedan od supstrata koji *FBW2* prepoznaje je *AGO1* (Earley i sur., 2010). Protein *AGO1* igra središnju ulogu u posttranskripcijskom utišavanju aktivnosti gena posredovanom malim interferirajućim

molekulama RNA (siRNA) i mikroRNA (miRNA) (Mi i sur., 2008). Mehanizam utišavanja upravljan molekula RNA je konzerviran unutar eukariota, a ima ulogu u razvoju i obrani od patogena. Kroz svoju opisanu ulogu, AGO1 sudjeluje prvenstveno u odgovoru na abiotički stres; zabilježena je uloga u odgovoru na hladnoću i solni stres (Dolata i sur., 2016; Liu i sur., 2018). U slučaju kada protein AGO1 ne tvori kompleks s malim molekulama RNA, usmjerava se u degradaciju kroz interakciju s FBW2. Osim negativne regulacije AGO1, utvrđeno je i sudjelovanje proteina FBW2 u signalizaciji abscizinske kiseline (Earley i sur., 2010). Premda njegova uloga u ovom putu još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, poznato je kako abscizinska kiselina sudjeluje u odgovoru na sušu i osmotski stres (Fujita i sur., 2005), ali i integraciji signala iz okoliša (Tuteja, 2007). Kroz opisane interakcije, FBW2 indirektno sudjeluje u kontroli utišavanja gena i odgovoru na abiotički stres.

Posljednji kandidat, RKP, dio je kompleksa RING E3 ubikvitinskih ligaza. Kroz ulogu u ovom kompleksu, protein RKP regulira stabilnost kinaznog inhibitora ovisnog o ciklinu, KRP1, uključenog u G1-S tranziciju u staničnom ciklusu (Ren i sur., 2008). Usmjeravajući KRP1 u degradaciju, RKP indirektno sudjeluje u staničnom ciklusu. Poznata je uloga proteina KRP1 tijekom reproduktivnog razvitka, prilikom diferencijacije generativnih i reproduktivnih staničnih linija muškog i ženskog gametofita (Cao i sur., 2018). Visoka razina ekspresije gena *RKP* zabilježena je tijekom embrionalnog razvoja, ali i u senescentnom lišću, što upućuje na njegovu ulogu tijekom cijelog životnog ciklusa (Schmid i sur., 2005). Uloga proteina KRP u svim ovim procesima svakako je povezana s izlaskom iz staničnog ciklusa, odnosno nastavkom diobene aktivnosti.

Premda je mehanizam RdDM prvenstveno zadužen za kontrolu aktivnosti transpozona, njegova je uloga mnogo šira te doseže i kontrolu ekspresije gena i samog razvoja biljke. Dobar primjer ovakvog djelovanja jest gen *CML41*, koji u području proksimalnog promotora posjeduje inserciju transpozona čija je metilacija kontrolirana mehanizmom RdDM (Baev i sur., 2010). Utvrđeno je kako ova metilacija ima direktan učinak na transkripciju gena te da porast metilacije u ovom regiji rezultira smanjenjem ekspresije gena.

Budući da je kontrola gena *CML41* mehanizmom RdDM dosad najbolje opisana, ovaj je gen odabran kao referentni za ovo istraživanje.

5.1. Razine metilacije DNA variraju između različitih razvojnih stadija

Za analizu razine metilacije DNA u regijama odabranih gena, odabrala sam tri vrste tkiva - embrije, klijance i cvjetice, kako bih obuhvatila promjene u metilaciji DNA koje se zbivaju tijekom reproduktivne faze razvoja, tranzicije s embriogeneze u vegetativnu fazu klijanja, te ponovo pri uspostavi reproduktivnog razvitka koji započinje cvjetanjem. Rezultati pirosekvenciranja potvrdili su postojanje jasnih razlika u metilaciji između različitih biljnih tkiva. Od tri analizirana tkiva, najviše razine ukupne metilacije citozina zabilježene su u embrijima. Ovakav rezultat je pouzdano utvrđen u slučaju referentnog gena *CML41*, kod kojeg je analizirana metilacija citozina isključivo u okruženju CHH, ali i na primjeru gena *FBW2* i *RKP* kod kojih je metilacija prisutna u sva tri citozinska okruženja. Za sva tri gena jasno je utvrđeno kako je opadanje metilacije nakon embriogeneze posljedica upravo promjena metilacije u okruženju CHH, koja je najviše vrijednosti dosegala u kotiledonarnim embrijima, dok je u klijancima i cvjeticama bila značajno niža. Najviša razina metilacije okruženja CHH u kotiledonarnom embriju u skladu je s prethodnim istraživanjima kojima je utvrđeno da metilacija u ovom okruženju doseže najvišu razinu upravo u zrelim embrijima (Bouyer i sur., 2017). Metodom sekvenciranja cjelokupnog genoma provedenoj na bisulfitno-tretiranoj DNA (engl. *Whole Genome Bisulfite Sequencing*) izoliranoj iz zrelih embrija uročnjaka utvrđeno je kako u ovom razvojnom stadiju metilacija citozina u okruženju CHH čini preko 44 % metiliranih citozina, dok je u drugim tkivima taj postotak značajno manji (ispod 27 % u klijancima). Visokoj razini CHH metilacije u zrelim embrijima doprinosi i velik broj citozina čija metilacija doseže 100 % u ovom okruženju, te je identificirano čak 28300 ovakvih pozicija (Bouyer i sur., 2017). Da je za hipermetilaciju ovih pozicija odgovoran mehanizam RdDM upućuje i činjenica da je ekspresija gena uključenih u ovaj mehanizam (*AGO4*, *DMS3*, *DRM2*) najviša upravo u zrelim embrijima (Belmonte i sur., 2013).

Nasuport relativno visokim razinama metilacije utvrđenim u promotorima gena *CML41*, *FBW2* i *RKP*, u genu *AGL14* detektirala sam vrlo niske razine metilacije okruženja CHH u svim analiziranim tkivima i linijama. Zbog ograničenja metode pirosekvenciranja koja ima limit detekcije metilacije od 5 % te ne može pouzdano mjeriti jako niske razine metilacije (Mikeska i sur., 2011), dobivene niske vrijednosti nisu bile usporedive te na temelju njih nije bilo moguće donositi pouzdane zaključke o metilacijskom statusu ovog gena u različitim tkivima. Međutim, u genu *AGL14*, unatoč niskoj metilaciji DNA, utvrdila sam postojanje jasnih razlika u metilacijskim obrascima između razvojnih stadija. Usporedbom razina metilacije pojedinačnih citozina, identificirala sam dva obrasca; jedan prisutan u embrijima i cvjeticama, a drugi u

klijancima. U klijancima divljeg tipa zabilježila sam pad metilacije okruženja CHG te porast metilacije okruženja CHH u odnosu na embrije. U okruženju CG, u klijancima, bila je smanjena metilacija na poziciji 846 na vrijednost manju od 10 %. Ovaj citozin bio je snažno metiliran u embrijima. Ovakva varijabilnost metilacijskih obrazaca, koja se nužno ne reflektira na globalnu razinu metilacije, utvrđena je i u genu *RKP*, premda manje izraženo. U klijancima divljeg tipa bio je utvrđen pad metilacije na pozicijama svih metilacijskih okruženja, te porast metilacije okruženja CHH specifično na pozicijama -665 i -620. Ovakav rezultat, iako neočekivan, nije dosad nezabilježen. Analizom metilacije cjelokupnog genoma vrste *Arabidopsis thaliana* prethodno je utvrđeno kako unatoč razlici u globalnoj razini metilacije, embriji posjeduju jednak obrazac metilacije kao i nadzemna tkiva odrasle biljke (Hsieh i sur., 2009). Nekoliko je mogućih objašnjenja za ovu pojavu. Bouyer i sur. (2017) su analizom metilacije transpozona utvrdili postojanje razlike u obrascu metilacije između ranih i zrelih embrija, konkretno na hipermetiliranim pozicijama okruženja CHH. Utvrdili su kako se pozicije s metilacijom od 100 % u okruženju CHH razlikuju između ova dva razvojna stadija; dok su u ranom embriju ove pozicije raspoređene cijelom dužinom transpozona, u zrelim embrijima su uglavnom smještene na krajevima. Nadalje, razlike obrazaca metilacije pojedinačnih citozina mogu biti temeljene i na dominaciji različitih mehanizama metilacije. Tako je obrazac metilacije specifičan za rane stadije razvoja embrija podudaran s obrascem u klijancima kod kojih je za uspostavu metilacije CHH odgovorna metiltransferaza CMT2. S druge strane, hipermetilacija na krajevima transpozona zabilježena u zrelim embrijima posredovana je mehanizmom RdDM (Stroud i sur., 2013). Na temelju ovih opažanja, Bouyer i sur. (2017) donijeli su pretpostavku o djelovanju dva mehanizma pri uspostavi metilacije okruženja CHH u embriogenezi, metiltransferaze CMT2 i mehanizma RdDM, koji posjeduju različite mete i djeluju u različitim vremenskim točkama. Dodatno, razlika obrazaca mogla bi se objasniti i aktivnošću alternativnog *nekanonskog* mehanizma RdDM. Premda slabije istražen, poznato je kako je ovaj mehanizam, osim za CHH, odgovoran i za uspostavu metilacije *de novo* u sva tri okruženja tijekom embrionalnog razvoja, te kako se ciljna mjesta ovog mehanizma razlikuju od onih na koja djeluje kanonski RdDM (Bouyer i sur., 2017).

5.2. Metilacija DNA je povišena u liniji s prekomjernom ekspresijom proteina BPM1

Osim između razvojnih stadija, uočene su i razlike u razini metilacije DNA između različitih transgenih linija. Najniže ukupne razine metilacije DNA u svim analiziranim genima uočene su u liniji *dms3-1*. Ovakav rezultat je u skladu s očekivanjima budući da se radi o liniji s nefunkcionalnim proteinom DMS3 (Kanno i sur., 2008), čime je narušena normalna aktivnost mehanizma RdDM. Također, u embrijima je analizirana dodatna linija s nefunkcionalnom komponentom mehanizma RdDM, proteinom NRPE1 (Eun i sur., 2012), u kojoj su također zabilježene značajno niže razine metilacije DNA. Ove su linije služile kao negativne kontrole kako bih bila sigurna da su odabrane metilirane regije zaista pod kontrolom mehanizma RdDM. Dok su ovakvi rezultati u spomenutim linijama očekivani, niža razina metilacije analiziranih gena u odnosu na divlji tip utvrđena je i u nadekspresorskoj liniji *oeDMS3*. Ovakav rezultat suprotan je očekivanjima, budući da se protein DMS3, kao komponenta kompleksa DDR ključna za regrutaciju Pol V (Liu i sur., 2014), uglavnom povezuje s aktivnošću mehanizma RdDM. Prema tome, u slučaju prisutnosti veće količine proteina DMS3 očekivana bi bila i uspostava više razine metilacije DNA. Umanjena metilacija u biljkama s nadekspresijom gena *DMS3* iako neočekivana, može se objasniti činjenicom kako povišena ekspresija gena *DMS3*, koja za posljedicu ima pretjeranu akumulaciju proteina, rezultira narušenom aktivnošću mehanizma RdDM te smanjenom regrutacijom Pol V, što naposljetku rezultira uspostavom niže razine metilacije DNA (Zhong i sur., 2019). Smanjena regrutacija Pol V vjerojatno je posljedica narušenog omjera komponenti kompleksa DDR koji je nužan za njegovu pravilnu formaciju. Sklapanje funkcionalnog kompleksa DDR započinje sa stvaranjem dimera proteina RDM1, koji će tvoriti stabilnu jezgru kompleksa (Wongpalee i sur., 2019). Ova jezgra služi kao površina za vezanje preostalih komponenata, budući da RDM1 nije sposoban za regrutaciju Pol V u odsutnosti DMS3 i DRD1 (Gallego-Bartolomé i sur., 2019). Protein DMS3 tvori homodimere koji se vežu na suprotne strane RDM1 jezgre, tvoreći intermedijarni kompleks (Wongpalee i sur., 2019). Premda stabilan, ovaj kompleks nije aktivan bez treće komponente, proteina DRD1. Vezanje ovog proteina uzrokuje konformacijsku promjenu kompleksa koja dovodi do njegove aktivacije. Prema tome, očuvanje stehiometrijske ravnoteže komponenata DMS3, RDM1 i DRD1 u omjeru 4:2:1 nužno je za ispravnu funkciju kompleksa DDR (Wongpalee i sur., 2019). Kontrola koncentracije svake komponente iznimno je važna za održanje ove ravnoteže, a ostvaruje se kroz različite mehanizme. Proteini RDM1 i DRD1 sudjeluju i u formiranju drugih kompleksa osim DDR; RDM1 ostvaruje interakciju s Pol II (Gao i sur., 2010), a DRD1 s Pol V (Law i sur., 2010). Kroz ove interakcije, ostvaruje se i kontrola koncentracije ovih proteina, pa

i potencijalne promjene u njihovoj ravnoteži nisu toliko uočljive. S druge strane, protein DMS3 sudjeluje isključivo u formiranju kompleksa DDR, te je utvrđeno kako njegova količina ima utjecaj na interakciju RDM1 i DRD1. Regulacijom koncentracije proteina DMS3 indirektno se osigurava i formiranje funkcionalnog kompleksa DDR, a ova regulacija se ostvaruje djelovanjem kompleksa APC/C (Zhong i sur., 2019). Kompleks APC/C (engl. *anaphase-promoting complex/cyclosome*) je E3 ubikvitin ligaza koja djeluje kao regulator staničnog ciklusa prepoznajući i usmjeravajući određene supstrate u degradaciju na proteasomu (Chang i sur., 2014). Na isti način, ovaj kompleks sudjeluje u održanju optimalne koncentracije proteina DMS3 no njegova funkcionalnost u slučaju nadekspresijske mutante korištene u ovom radu nije bila dostatna.

U drugoj analiziranoj liniji s prekomjernom ekspresijom, oeBPM1, utvrđena je viša razina metilacije u odnosu na divlji tip u genima *CML41* i *FBW2*, u kojima je ovakva usporedba bila moguća. Povišena razina metilacije DNA u ovoj liniji upućuje na ulogu proteina BPM1 u mehanizmu RdDM koja je inicijalno pretpostavljena na temelju interakcija ovog proteina s komponentama DMS3 i RDM1 (Jagić i sur., 2022). Dobiveni rezultati sugeriraju kako protein BPM1 ima stimulativnu ulogu u mehanizmu RdDM, a ovaj zaključak dodatno potkrepljuje činjenica da je porast metilacije DNA najizraženiji u zrelim embrijima, gdje aktivnost mehanizma RdDM doseže vrhunac (Bouyer i sur., 2017). Kako bi se dodatno istražila uloga proteina BPM1 u mehanizmu RdDM, planirana je bila i analiza metilacije u transgennoj liniji *amiR-bpm* (Lechner i sur., 2011). Međutim, analizama ekspresije gena *BPM1-6* u ovoj liniji nije utvrđena očekivana snižena razina ekspresije proteina BPM1 koju navode Lechner i sur. (2011), te ova linija nije uključena u istraživanje.

Budući da je poznata uloga mehanizma RdDM tijekom embriogeneze, analizu metilacije provela sam na kotiledonarnim zigotnim embrijima te u dvije faze somatske embriogeneze (indukcija embriogeneze i kotiledonarni somatski embriji). Kotiledonarni zigotni embriji ujedno su bili i eksplantati za poticanje SE, te ovakav dizajn ukazuje na promjene metilacije tijekom tranzicije kotiledonarnog zigotnog embrija u izvor ranih somatskih embrija kao i tijekom njihova sazrijevanja, te omogućava usporedbu oba tipa kotiledonarnih embrija. Budući da se somatska embriogeneza često koristi kao eksperimentalni model za proučavanje biljne embriogeneze (Kurczyńska i sur., 2007), usporedba metilacije DNA između zigotne i somatske embriogeneze omogućuje otkrivanje potencijalnih razlika u udjelima pojedinih metilacijskih mehanizama u dva tipa embriogeneze (*in vivo* i *in vitro*). Usporedbom somatskih i zigotnih kotiledonarnih embrija u linijama s funkcionalnim mehanizmom RdDM, divljem tipu

i liniji oeBPM1, utvrdila sam nešto niže razine metilacije DNA u somatskim embrijima, premda vrijednosti nisu značajno odstupale. Ove su razlike prvenstveno proizlazile iz razlika u metilaciji okruženja CHH, što se najbolje vidi na primjeru gena *FBW2* (slike 33, 34). Usporedbom metilacije analiziranih gena u zrelih somatskim i zigotnim embrijima linija s nefunkcionalnim RdDM-om, uočila sam postojanje razlika koje nisu povezane s funkcioniranjem mehanizma RdDM. Ove razlike su najuočljivije u liniji *dms3-1*, u kojoj je metilacija promotora gena *CML41* u somatskim kotiledonarnim embrijima bila znatno viša u odnosu na zigotne (slika 32). Navedeno upućuje na aktivnost drugih metilacijskih mehanizama, osim RdDM-a, u somatskoj embriogenezi. Ideja o aktivnosti drugih metilacijskih mehanizama dodatno je poduprijeta i analizom metilacije u svakoj zasebnoj fazi somatske embriogeneze (indukciji i sazrijevanju), pri čemu su uočene znatno manje razlike u razinama metilacije između analiziranih linija s promijenjenom funkcijom mehanizma RdDM. S druge strane, usporedba induksijske i faze sazrijevanja tijekom SE upućuje i na važnost funkcionalnog mehanizma RdDM u somatskoj embriogenezi. Dok je metilacija u fazi indukcije niža u usporedbi s metilacijom zrelih somatskih embrija u divljem tipu i liniji oeBPM1, u linijama s promijenjenom funkcijom RdDM-a ovaj je odnos suprotan. Ova je razlika najuočljivija u liniji oeDMS3 na primjeru metilacije promotora gena *CML41* (slika 32), u kojoj je metilacija okruženja CHH niža u fazi sazrijevanja u odnosu na indukciju, a za koju smo prethodno utvrdili kako ima narušenu funkciju mehanizma RdDM. Rezultati upućuju na zaključak o važnoj ulozi mehanizma RdDM u oba tipa embriogeneze, ali i na uključenost drugih metilacijskih mehanizama u somatskoj embriogenezi.

5.3. Izazovi u analizi metilacije biljne DNA

S porastom razumijevanja uloge metilacije DNA u brojnim procesima, razvijale su se i metode za njezinu što precizniju analizu. Danas je dostupan niz metoda koje omogućavaju analizu metilacije kako cijelog genoma, tako i ciljanih lokusa. Uzevši u obzir sve ključne faktore (preciznost rezultata, duljina trajanja analize, utrošak resursa), za analizu zasebnih regija čija je metilacija potencijalno pod kontrolom puta RdDM i proteina BPM1, odabrala sam metodu bisulfitnog pirosekvenciranja. Prva ključna točka takve analize jest uspješna bisulfitna konverzija. Bisulfitnom konverzijom, nemetilirani citozini se deaminiraju i nakon PCR reakcije detektiraju kao timini, dok metilirani citozini ostaju nepromijenjeni. Na ovaj se način omogućuje razlikovanje metiliranih od nemetiliranih pozicija u sekvenci. Premda se za bisulfitnu konverziju danas koriste komercijalni paketi čiji proizvođači garantiraju visok prinos

konvertirane DNA, kao i efikasnu konverziju svih citozina, u praksi uspješnost ovog tretmana ovisi o nizu faktora. Jedan od glavnih preduvjeta uspješne konverzije jest visoka koncentracija i čistoća izolirane DNA koja se koristi kao kalup. Nadalje, iako je prema protokolu za uspješnu konverziju dovoljno samo 100 ng ishodišne DNA, ustanovila sam kako je za dobivanje dovoljne koncentracije konvertiranog uzorka za daljnje manipulacije potrebno barem 500 ng DNA. Glavni razlog tome jest degradacija i veliki gubitci DNA tijekom konverzije (>90 %). Dodatno, budući da proces konverzije uključuje denaturaciju DNA te rezultira nastankom lanaca koji više nisu komplementarni, produkt konverzije je vrlo nestabilan. Korištenje ovakvog kalupa u reakciji PCR otežava dobivanje dovoljne količine produkta koja će dati jasne i pouzdane signale tijekom pirosekvenciranja. U ovom je istraživanju ovaj problem riješen prilagođavanjem uvjeta metode PCR dodavanjem bisulfitno konvertiranog kalupa nakon inicijalne denaturacije, kao i snižavanjem temperature elongacije prema uputama Shen i sur. (2007). Unatoč nadilaženju problema pri dobivanju produkta za analizu, najveći izazov javlja se prilikom samog pirosekvenciranja produkata, točnije pri analizi rezultata. Za razliku od eksperimentalnog dijela metode koji podrazumijeva jednostavnu pripremu uzoraka za analizu, kao i analizu više gena i većeg broja uzoraka istovremeno, sam proces obrade rezultata ima brojne nedostatke. Oni se javljaju prvenstveno zbog toga što je program prilagođen analizi metilacije sisavaca, odnosno analizi metilacije DNA u samo jednom okruženju, CG. Iako je program uređaja ažuriran više puta od početka korištenja u svrhu analize metilacije, i dalje postoje ograničenja, osobito prilikom analize metilacije biljne DNA. Premda je princip analize metilacije, koji se temelji na izračunu omjera ugrađenih timina i citozina, sam po sebi jasan i jednostavan, program i dalje nailazi na poteškoće prilikom analize specifičnih pozicija. U slučaju uzastopnih citozina, program za njih bilježi samo jedan signal te izračunava prosječnu vrijednost metilacije ovih pozicija (How-Kit i sur., 2015). Budući da u biljkama postoje tri citozinska okruženja, što znači i veći broj potencijalno metiliranih pozicija, ovakvi su primjeri bili česti. Drugi problem nastaje pri analizi metilacije citozina okruženog većim brojem timina u polaznoj sekvenci DNA, gdje je nemoguće razlučiti je li zabilježen signal posljedica ugradnje timina nastalog uslijed konverzije nemetiliranih citozina ili timina koji je dio originalne DNA sekvence. Nažalost, prisutnost samo jednog ovakvog slijeda često je dovoljna za neuspješnu analizu metilacije čitavog fragmenta, pri čemu program detektira grešku te ne procesira zabilježene signale. U ovom je slučaju potrebna „ručna“ analiza signala koja podrazumijeva izračun metilacije za svaki pojedini citozin na temelju vrijednosti zabilježenih signala (engl. *peak heights*). Ova metoda izračuna rezultata pokazala se pouzdanom. Usporedbom postotaka metilacije za pojedinu poziciju dobivenih ručnim izračunom s onima koje je utvrdio program uređaja,

dokazano je kako ove vrijednosti minimalno odstupaju (How-Kit i sur., 2015). Ovakav je račun, zbog prisutnosti prethodno spomenutih sljedova, bio potreban za gene *RKP* i *AGLI4*. Premda izračunate vrijednosti za ove gene djeluju smisleno u okviru cjelokupnih rezultata, treba imati na umu da su one temeljene na izračunu koji nije generirao sam uređaj.

5.4. Učinak metilacije DNA na ekspresiju gena uvjetovan je njezinim položajem

Iako se metilacija DNA često definira kao modifikacija koja inhibira ekspresiju gena, u stvarnosti je njezin utjecaj na ekspresiju gena raznolik te ovisi o nizu faktora. Jedan od faktora koji predodređuje učinak metilacije jest njezina pozicija u genu. Opća ideja o negativnom djelovanju metilacije DNA odnosi se prvenstveno na metilaciju u promotoru gena, gdje ona onemogućava vezanje transkripcijskih faktora ili pak regrutira proteine uključene u represiju transkripcije (Moore i sur., 2013). Međutim, prisutnost metilacije u promotoru ne mora nužno rezultirati smanjenjem ekspresije gena, te je prethodnim istraživanjima utvrđeno kako njezino djelovanje ovisi i o položaju unutar promotora (Zhong i sur., 2012). Izazov u ovim istraživanjima predstavljalo je i samo definiranje promotora gena budući da ne postoji jednoznačna definicija ove regije. U istraživanjima u kojima je analiziran učinak metilacije DNA, promotor je uglavnom definiran kao regija od 1000 pb uzvodno od mjesta početka transkripcije (Gallego-Bartolomé i sur., 2019). Dodatno, definirana je i podjela na proksimalni promotor, koji se odnosi na 250 pb neposredno do mjesta početka transkripcije, te distalni promotor koji obuhvaća preostalih 750 pb uzvodno (Zhong i sur., 2012). Učinak represije uglavnom nastaje kao rezultat metilacije DNA prisutne u proksimalnom promotoru, budući da je prethodnim istraživanjima utvrđeno kako metilacija prisutna u ovom području ima direktan učinak na ekspresiju gena (Gallego-Bartolomé i sur., 2019). Učinak metilacije u distalnom promotoru može biti raznolik.

Gen *CML41* odabrala sam kao referentni upravo zbog toga što je prethodnim istraživanjima analizirana pozicija i učinak RdDM-ovisne metilacije promotora na ekspresiju (Naydenov i sur., 2015). U skladu s ovim istraživanjima, analizom ekspresije u embrijima i klijancima utvrdila sam kako metilacija u promotoru ima negativan učinak na ekspresiju gena. Negativno djelovanje metilacije DNA na ekspresiju najbolje se uočavalo korelacijom rezultata u zigotnim embrijima, u kojima su zabilježene najviše razine metilacije, a najniža ekspresija. U svim linijama biljaka, zabilježena je niska metilacija DNA i visoka ekspresija u fazi somatske indukcije, što odgovara represivnom učinku metilacije. U fazi sazrijevanja somatskih embrija,

dolazi do porasta metilacije DNA, što prati pad ekspresije. Iznimka je linija oeDMS3 koja uz sniženu razinu ekspresije ima i nižu metilaciju DNA u ovoj fazi. Budući da se radi o liniji s narušenom funkcijom mehanizma RdDM kao posljedicom prekomjerne ekspresije proteina DMS3, te su prisutne vrlo niske razine metilacije DNA u obje faze somatske embriogeneze, teško je dati jasno objašnjenje za ovakav rezultat. Međutim, jedna od mogućnosti jest da se učinak metilacije DNA zabilježen u fazi indukcije somatske embriogeneze očituje u promjeni ekspresije s određenim vremenskim odmakom, odnosno u ovom slučaju u fazi sazrijevanja. Rezultati ekspresije gena *FBW2* u embrijima podupiru ovu tezu. Za razliku od referentnog gena, u genu *FBW2* sam detektirala metilaciju DNA u distalnom dijelu promotora. Utvrdila sam kako ova metilacija ima stimulativan učinak na ekspresiju gena, što se očituje visokom ekspresijom u zigotnim embrijima u kojima su prisutne najviše razine metilacije. Iako se razine metilacije DNA ne razlikuju značajno između faza indukcije i sazrijevanja u somatskoj embriogenezi, u fazi sazrijevanja je zabilježen značajan porast ekspresije. Ovaj fenomen se najbolje može objasniti na način da metilacija uspostavljena tijekom indukcije ima vidljiv učinak na ekspresiju tek u fazi sazrijevanja, kao što je slučaj i kod gena *CML41*. U slučaju gena *RKP*, kao i gena *FBW2*, analizirana je metilirana regija u distalnom promotoru te je utvrđen stimulativan učinak na ekspresiju, premda su zbog općenito niskih vrijednosti ovi rezultati manje pouzdani. Korelacijom rezultata metilacije DNA i ekspresije u klijancima, dodatno su potvrđeni prethodni zaključci; metilacija u proksimalnom promotoru gena *CML41* ima represivan učinak, dok metilacija distalnog promotora u genima *FBW2* i *RKP* potiče ekspresiju gena. Ovakav je odnos metilacije i ekspresije bio stabilan u svim linijama. Međutim, prethodno opisane razlike u metilaciji DNA između različitih linija, praćene su i razlikama u ekspresiji. Primjerice, u genu *CML41* u skladu s utvrđenim represivnim učinkom metilacije DNA na ekspresiju, povišena razina metilacije u liniji oeBPM1 rezultirala je nižom ekspresijom, dok su linije sa nižom metilacijom kao posljedicom narušenog mehanizma RdDM (*dms3-1* i *nrpe1*), imale veću ekspresiju. U genima *FBW2* i *RKP*, u kojima je metilacija imala stimulativan učinak na ekspresiju, situacija je bila obrnuta. Prema tome, analizom ekspresije dodatno je potvrđena uloga proteina BPM1 u mehanizmu RdDM. Na temelju rezultata za gen *AGL14*, zbog niskih zabilježenih vrijednosti nije bilo moguće donijeti jasan zaključak o utjecaju metilacije DNA na ekspresiju. Analizirana metilacijska regija smještena je u intronu gena *AGL14*, te sam pregledom istraživanja dostupnih u literaturi utvrdila kako metilacija prisutna u ovoj regiji ne mora nužno imati jednoznačan (stimulativan ili represivan) učinak na ekspresiju gena. Metilacija u intronu gena često se povezuje sa zaštitom gena od insercije transpozona (Liu i sur., 2009), ali i sprječavanjem alternativnog prekrajanja (Regulski i sur., 2013).

5.5. Metilacija DNA posredovana proteinom BPM1 stimulira aktivnost promotora gena *FBW2*

Nakon analize metilacije DNA i ekspresije, uloga proteina BPM1 u mehanizmu RdDM dodatno je potvrđena analizom aktivnosti promotora gena *FBW2*. Korištena je histokemijska metoda detekcije aktivnosti, u kojoj je pod promotor gena *FBW2* stavljen gen za β -glukuronidazu (*GUS*). Razgradnjom supstrata X-Gluc djelovanjem β -glukuronidaze nastalo je plavo obojenje, na temelju kojeg je detektirana aktivnost promotora u pojedinim tkivima. Najintenzivnije obojenje bilo je utvrđeno u cvjetićima i trihomima listova, upućujući na zaključak kako je ovdje lokalizirana najjača ekspresija gena *FBW2*. Pregledom podataka o ekspresiji gena (*ePlant*), uočila sam kako je gen *FBW2* snažno eksprimiran u cijeloj biljci, ali su najviše razine ekspresije ipak prisutne u cvjetićima. Premda je funkcija proteina *FBW2* dosad slabo opisana, poznato je kako ima ulogu u procesima proteasomalne razgradnje proteina AGO1 (Earley i sur., 2010). Fenotipska analiza mutanata *AGO1* pokazala je poremećaj u razvoju cvjetova i pojavu sterilnosti, te u razvoju listova, gdje dolazi do poremećaja uspostave adaksijalno/abaksijalnog obrasca listova i razvoja trihoma (Bohmert i sur., 1998). Daljnjim istraživanjima potvrđena je uloga AGO1 u kontroli razvoja trihoma i listova (Wang i sur., 2015), te cvjetova (Fernández-Nohales i sur., 2014), što je dovelo do zaključka o ulozi AGO1 u tranziciji iz juvenilne u odraslu fazu, te vegetativne u reproduktivnu fazu razvoja. Budući da je *FBW2* povezan s proteinom AGO1 negativnom regulacijom, ne iznenađuje kako sam najveću aktivnost promotora ovog gena detektirala upravo u tučku i prašnicima cvjetova te trihomima listova. Usporedbom signala zabilježenog u različitim transgenim linijama, detektirana je najjača aktivnost promotora u liniji p*FBW2*:*GUS* x oe*BPM1*, dok su linije dobivene križanjem s linijama koje imaju narušenu funkciju mehanizma RdDM imale znatno slabiji intenzitet obojenja, upućujući na slabiju aktivnost promotora. U konačnici ovakav rezultat ukazuje na značajnu ulogu proteina BPM1 u regulaciji metilacije te posljedične aktivnosti promotora i ekspresije gena, na primjerima analiziranim u novom radu. Rezultati tako otvaraju novo područje istraživanja funkcije proteina porodice MATH-BTB kao regulatora epigenetičke razine kontrole razvoja biljaka.

6. ZAKLJUČCI

Analizom metilacije i ekspresije gena koji su selektirani kromatinskom imunoprecipitacijom za proteine BPM1 i DMS3, donijela sam sljedeće zaključke:

- Protein BPM1 ima stimulativnu ulogu u sklopu mehanizma RdDM.
- Uz ranije poznati gen reguliran mehanizmom RdDM, *CML41*, geni *FBW2*, *RKP* i *AGL14* su nove, do sada neidentificirane mete metilacijskog mehanizma RdDM. Regije ovih gena u genomu uročnjaka dodatno su i mete proteina BPM1, koji ulazi u sastav proteinskog kompleksa odgovornog za pozicioniranje metiltransferaze u sklopu mehanizma RdDM (Jagić i sur., 2022).
- Razine metilacije gena *CML41*, *FBW2*, *RKP* i *AGL14* povišene su u transgenoj liniji s prekomjernom ekspresijom proteina BPM1, što upućuje na njegovu stimulativnu ulogu u procesu metilacije. Time je opovrgnuta ideja o ulozi proteina BPM1 u usmjeravanju komponenata mehanizma RdDM, proteina RDM1 i DMS3, u proteasomalnu razgradnju.
- Metilacija DNA gena *CML41*, *FBW2*, *RKP* i *AGL14* varira u različitim tkivima i razvojnim stadijima uročnjaka.
- Najviša razina metilacije karakteristika je embriogenog tkiva. Razlike u razinama metilacije među tkivima temelje se na različitosti u razini metilacije okruženja CHH, koje je isključivo metilirano mehanizmom RdDM.
- Tijekom somatske embriogeneze razina metilacije posredovane mehanizmom RdDM opada tijekom njene indukcije i zatim ponovno raste, te u somatskim kotiledonarnim embrijima doseže razine nešto niže od onih u zigotnim kotiledonarnim embrijima. Analize metilacije citozina u različitim okruženjima ukazuju na veći značaj RdDM-a u zigotnim embrijima, dok su mehanizmi metilacije posredovani metiltransferazama MET1 i CMT3 važniji u somatskoj embriogenezi.
- Utjecaj metilacije DNA na ekspresiju gena određen je njezinim položajem. Učinak metilacije u citozinskom okruženju CHH u promotorskoj regiji razlikuje se između proksimalnog i distalnog promotora; metilacija u proksimalnom promotoru gena *CML41* imala je represivan učinak, dok je metilacija u distalnom promotoru gena *FBW2* i *RKP* djelovala stimulatивно na ekspresiju gena. Metilacija u intronu gena nema direktan učinak na ekspresiju, kao što je utvrđeno analizom gena *AGL14*.

- Viša razina metilacije djeluje stimulatивно na aktivnost promotora gena *FBW2*. Najveća aktivnost promotora gena *FBW2* karakteristika je linije oeBPM1 koju karakterizira najviša razina metilacije u sva tri citozinska okruženja. Ovaj rezultat podudara se sa zaključkom o stimulativnom učinku metilacije distalnog promotora na ekspresiju gena.

7. LITERATURA

- Avery, O. T., MacLeod, C. M., & McCarty, M. (1979). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *Journal of Experimental Medicine*, *149*(2), 297–326. <https://doi.org/10.1084/jem.149.2.297>
- Baev, V., Naydenov, M., Apostolova, E., Ivanova, D., Doncheva, S., Minkov, I., & Yahubyan, G. (2010). Identification of RNA-dependent DNA-methylation regulated promoters in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(6), 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.03.013>
- Bardwell, V. J., & Treisman, R. (1994). The POZ domain: A conserved protein-protein interaction motif. *Genes & Development*, *8*(14), 1664–1677. <https://doi.org/10.1101/gad.8.14.1664>
- Baubec, T., Finke, A., Mittelsten Scheid, O., & Pecinka, A. (2014). Meristem-specific expression of epigenetic regulators safeguards transposon silencing in Arabidopsis. *EMBO Reports*, *15*(4), 446–452. <https://doi.org/10.1002/embr.201337915>
- Bauer, M. J., & Fischer, R. L. (2011). Genome demethylation and imprinting in the endosperm. *Current Opinion in Plant Biology*, *14*(2), 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.02.006>
- Bauer, N., Škiljaica, A., Malenica, N., Razdorov, G., Klasić, M., Juranić, M., Močibob, M., Sprunck, S., Dresselhaus, T., & Leljak Levanić, D. (2019). The MATH-BTB protein TaMAB2 accumulates in ubiquitin-containing foci and interacts with the translation initiation machinery in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1469. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01469>
- Belmonte, M. F., Kirkbride, R. C., Stone, S. L., Pelletier, J. M., Bui, A. Q., Yeung, E. C., Hashimoto, M., Fei, J., Harada, C. M., Munoz, M. D., Le, B. H., Drews, G. N., Brady, S. M., Goldberg, R. B., & Harada, J. J. (2013). Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the Arabidopsis seed. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.1222061110>
- Berger, F., & Twell, D. (2011). Germline specification and function in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *62*(1), 461–484. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103824>

- Beyrne, C. C., González, R. M., & Iusem, N. D. (2019). Strategy for the analysis of tissue-specific methylation changes without physical isolation. *Epigenetics*, *14*(1), 41–51. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1565589>
- Bohmert, K. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *The EMBO Journal*, *17*(1), 170–180. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.1.170>
- Bostick, M., Kim, J. K., Estève, P. O., Clark, A., Pradhan, S., & Jacobsen, S. E. (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*, *317*(5845), 1760–1764. <https://doi.org/10.1126/science.1147939>
- Bouyer, D., Kramdi, A., Kassam, M., Heese, M., Schnittger, A., Roudier, F., & Colot, V. (2017). DNA methylation dynamics during early plant life. *Genome Biology*, *18*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1313-0>
- Bozhkov, P. V., Suarez, M. F., Filonova, L. H., Daniel, G., Zamyatnin, A. A., Rodriguez-Nieto, S., Zhivotovsky, B., & Smertenko, A. (2005). Cysteine protease mcII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(40), 14463–14468. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506948102>
- Cao, L., Wang, S., Venglat, P., Zhao, L., Cheng, Y., Ye, S., Qin, Y., Datla, R., Zhou, Y., & Wang, H. (2018). Arabidopsis ICK/KRP cyclin-dependent kinase inhibitors function to ensure the formation of one megaspore mother cell and one functional megaspore per ovule. *PLOS Genetics*, *14*(3), e1007230. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007230>
- Chakraborty, T., Kendall, T., Grover, J. W., & Mosher, R. A. (2021). Embryo CHH hypermethylation is mediated by RdDM and is autonomously directed in Brassica rapa. *Genome Biology*, *22*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02358-3>
- Chang, L., Zhang, Z., Yang, J., McLaughlin, S. H., & Barford, D. (2014). Molecular architecture and mechanism of the anaphase-promoting complex. *Nature*, *513*(7518), 388–393. <https://doi.org/10.1038/nature13543>
- Chen, L., Bernhardt, A., Lee, J., & Hellmann, H. (2015). Identification of Arabidopsis MYB56 as a novel substrate for CRL3 BPM E3 ligases. *Molecular Plant*, *8*(2), 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.10.004>
- Chen, L., Lee, J. H., Weber, H., Tohge, T., Witt, S., Roje, S., Fernie, A. R., & Hellmann, H. (2013). Arabidopsis BPM proteins function as substrate adaptors to a CULLIN3-based E3

ligase to affect fatty acid metabolism in plants. *The Plant Cell*, 25(6), 2253–2264. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.107292>

Ciechomska, M., Roszkowski, L., & Maslinski, W. (2019). DNA methylation as a future therapeutic and diagnostic target in rheumatoid arthritis. *Cells*, 8(9), 953. <https://doi.org/10.3390/cells8090953>

Claiborn, K. C., Sachdeva, M. M., Cannon, C. E., Groff, D. N., Singer, J. D., & Stoffers, D. A. (2010). Pcif1 modulates Pdx1 protein stability and pancreatic β cell function and survival in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120(10), 3713–3721. <https://doi.org/10.1172/jci40440>

Clark-Maguire, S., & Mains, P. E. (1994). mei-1, a gene required for meiotic spindle formation in *Caenorhabditis elegans*, is a member of a family of ATPases. *Genetics*, 136(2), 533–546. <https://doi.org/10.1093/genetics/136.2.533>

Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>

Cokus, S. J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C. D., Pradhan, S., Nelson, S. F., Pellegrini, M., & Jacobsen, S. E. (2008). Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, 452(7184), 215–219. <https://doi.org/10.1038/nature06745>

Cuneo, M. J., & Mittag, T. (2019). The ubiquitin ligase adaptor SPOP in cancer. *The FEBS Journal*, 286(20), 3946–3958. <https://doi.org/10.1111/febs.15056>

Cymate.org. <https://www.cymate.org/>

Dai, X., Gan, W., Li, X., Wang, S., Zhang, W., Huang, L., Liu, S., Zhong, Q., Guo, J., Zhang, J., Chen, T., Shimizu, K., Beca, F., Blattner, M., Vasudevan, D., Buckley, D. L., Qi, J., Buser, L., Liu, P., Inuzuka, H., Beck, A. H., Wang, L., Wild, P. J., Garraway, L. A., Rubin, M. A., Barbieri, C. E., Wong, K. K., Muthuswamy, S. K., Huang, J., Chen, Y., Bradner, J. E., Wei, W. (2017). Prostate cancer-associated SPOP mutations confer resistance to BET inhibitors through stabilization of BRD4. *Nature Medicine*, 23(9), 1063–1071. <https://doi.org/10.1038/nm.4378>

Dang, F., Nie, L., & Wei, W. (2020). Ubiquitin signaling in cell cycle control and tumorigenesis. *Cell Death & Differentiation*, 28(2), 427–438. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00648-0>

Dodeman, V. L., Ducreux, G., & Kreis, M. (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48(8), 1493–1509. <https://doi.org/10.1093/jxb/48.8.1493>

Dolata, J., Bajczyk, M., Bielewicz, D., Niedojadlo, K., Niedojadlo, J., Pietrykowska, H., Walczak, W., Szweykowska-Kulinska, Z., & Jarmolowski, A. (2016). Salt stress reveals a new role for ARGONAUTE1 in miRNA biogenesis at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Plant Physiology*, 172(1), 297–312. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00830>

Earley, K., Smith, M., Weber, R., Gregory, B., & Poethig, R. (2010). An endogenous F-box protein regulates ARGONAUTE1 in *Arabidopsis thaliana*. *Silence*, 1(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1758-907x-1-15>

Elhiti, M., Stasolla, C., & Wang, A. (2013). Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49(6), 631–642. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9547-3>

Emons, A., & Kieft, H. (1991). Histological comparison of single somatic embryos of maize from suspension culture with somatic embryos attached to callus cells. *Plant Cell Reports*, 10(10), 485-488. <https://doi.org/10.1007/bf00234578>

ePlant. (n.d.). <https://bar.utoronto.ca/eplant/>

Eun, C., Lorkovic, Z. J., Sasaki, T., Naumann, U., Matzke, A. J. M., & Matzke, M. (2012). Use of forward genetic screens to identify genes required for RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 77(0), 195–204. <https://doi.org/10.1101/sqb.2012.77.015099>

Fehér, A. (2005). Why somatic plant cells start to form embryos?. U: Mujib, A., Šamaj, J. (eds) *Somatic embryogenesis. Plant cell monographs*, 2. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/7089_019

Fernández-Nohales, P., Domenech, M. J., Martínez de Alba, A. E., Micol, J. L., Ponce, M. R., & Madueño, F. (2014). AGO1 controls arabidopsis inflorescence architecture possibly by regulating TFL1 expression. *Annals of Botany*, 114(7), 1471–1481. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu132>

Forgione, I., Wołoszyńska, M., Pacenza, M., Chiappetta, A., Greco, M., Araniti, F., Abenavoli, M. R., Van Lijsebettens, M., Bitonti, M. B., & Bruno, L. (2019). Hypomethylated *drm1* *drm2*

cmt3 mutant phenotype of *Arabidopsis thaliana* is related to auxin pathway impairment. *Plant Science*, 280, 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.12.029>

Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M. M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005). AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(12), 3470–3488. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035659>

Gaj, M.D. (2011). Somatic embryogenesis and plant regeneration in the culture of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Immature zygotic embryos. U: Thorpe, T., Yeung, E. (eds) *Plant embryo culture. Methods in molecular biology*, 710. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8_18

Gaj, M.D. (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant growth regulation* 43, 27–47. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000038275.29262.fb>

Galaxy. (n.d.). <https://usegalaxy.org>

Gallego-Bartolomé, J., Liu, W., Kuo, P. H., Feng, S., Ghoshal, B., Gardiner, J., Zhao, J. M. C., Park, S. Y., Chory, J., & Jacobsen, S. E. (2019). Co-targeting RNA polymerases IV and V promotes efficient de novo DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*, 176(5), 1068-1082. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.029>

Gan, Y., Filleur, S., Rahman, A., Gotensparre, S., & Forde, B. G. (2005). Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 222(4), 730–742. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0020-3>

Gao, Z., Liu, H. L., Daxinger, L., Pontes, O., He, X., Qian, W., Lin, H., Xie, M., Lorkovic, Z. J., Zhang, S., Miki, D., Zhan, X., Pontier, D., Lagrange, T., Jin, H., Matzke, A. J. M., Matzke, M., Pikaard, C. S., & Zhu, J. K. (2010). An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 465(7294), 106–109. <https://doi.org/10.1038/nature09025>

Garay-Arroyo, A., Ortiz-Moreno, E., de la Paz Sánchez, M., Murphy, A. S., García-Ponce, B., Marsch-Martínez, N., de Folter, S., Corvera-Poiré, A., Jaimes-Miranda, F., Pacheco-Escobedo, M. A., Dubrovsky, J. G., Pelaz, S., & Álvarez-Buylla, E. R. (2013). The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during *Arabidopsis* root development by

regulating PIN expression. *The EMBO Journal*, 32(21), 2884–2895. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.216>

Gehring, M. (2013). Genomic imprinting: Insights from plants. *Annual Review of Genetics*, 47(1), 187–208. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155527>

Gehring, M., Huh, J. H., Hsieh, T. F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J. J., Goldberg, R. B., & Fischer, R. L. (2006). DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA Polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell*, 124(3), 495–506. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.034>

Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R. R., Roldán-Arjona, T., David, L., & Zhu, J. K. (2002). ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell*, 111(6), 803–814. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01133-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01133-9)

Grzybkowska, D., Morończyk, J., Wójcikowska, B., & Gaj, M. D. (2018). Azacitidine (5-AzaC)-treatment and mutations in DNA methylase genes affect embryogenic response and expression of the genes that are involved in somatic embryogenesis in Arabidopsis. *Plant Growth Regulation*, 85(2), 243–256. <https://doi.org/10.1007/s10725-018-0389-1>

Guseinov, V., & Vanyushin, B. (1975). Content and localisation of 5-methylcytosine in DNA of healthy and wilt-infected cotton plants. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 395(3), 229–238. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(75\)90193-8](https://doi.org/10.1016/0005-2787(75)90193-8)

Han, Q., Bartels, A., Cheng, X., Meyer, A., An, Y. Q. C., Hsieh, T. F., & Xiao, W. (2019). Epigenetics regulates reproductive development in plants. *Plants*, 8(12), 564. <https://doi.org/10.3390/plants8120564>

Harrison, S. J., Mott, E. K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J. C., & Cottage, A. (2006). A rapid and robust method of identifying transformed Arabidopsis thaliana seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods*, 2(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-2-19>

He, S., Wang, F., Yang, L., Guo, C., Wan, R., Ke, A., Xu, L., Hu, G., Xu, X., Shen, J., & Wang, X. (2011). Expression of DNMT1 and DNMT3a are regulated by GLI1 in human pancreatic cancer. *PLOS ONE*, 6(11), e27684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027684>

Hernández-Muñoz, I., Lund, A. H., van der Stoop, P., Boutsma, E., Muijters, I., Verhoeven, E., Nusinow, D. A., Panning, B., Marahrens, Y., & van Lohuizen, M. (2005). Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone

MACROH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), 7635–7640. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408918102>

Himmelbach, A. (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 21(12), 3029–3038. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf316>

Hoemann, C., Richardt, S., Krüger, K., Zimmer, A. D., Hohe, A., & Rensing, S. A. (2010). Large impact of the apoplast on somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum* offers possibilities for improved developmental control in vitro. *BMC Plant Biology*, 10(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-77>

How-Kit, A., Daunay, A., Mazaleyrat, N., Busato, F., Daviaud, C., Teyssier, E., Deleuze, J. F., Gallusci, P., & Tost, J. (2015). Accurate CpG and non-CpG cytosine methylation analysis by high-throughput locus-specific pyrosequencing in plants. *Plant Molecular Biology*, 88(4–5), 471–485. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0336-8>

Hsieh, T. F., Ibarra, C. A., Silva, P., Zemach, A., Eshed-Williams, L., Fischer, R. L., & Zilberman, D. (2009). Genome-wide demethylation of Arabidopsis endosperm. *Science*, 324(5933), 1451–1454. <https://doi.org/10.1126/science.1172417>

Ingham, P. W., & McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Development*, 15(23), 3059–3087. <https://doi.org/10.1101/gad.938601>

Jagić, M., Vuk, T., Škiljaica, A., Markulin, L., Vičić Bočkor, V., Tokić, M., Miškec, K., Razdorov, G., Habazin, S., Šoštar, M., Weber, I., Bauer, N., & Leljak Levanić, D. (2022). BPM1 regulates RdDM-mediated DNA methylation via a cullin 3 independent mechanism. *Plant Cell Reports*, 41(11), 2139–2157. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02911-9>

Ji, L., & Chen, X. (2012). Regulation of small RNA stability: methylation and beyond. *Cell Research*, 22(4), 624–636. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.36>

Ji, L., Mathioni, S. M., Johnson, S., Tucker, D., Bewick, A. J., Do Kim, K., Daron, J., Slotkin, R. K., Jackson, S. A., Parrott, W. A., Meyers, B. C., & Schmitz, R. J. (2019). Genome-wide reinforcement of DNA methylation occurs during somatic embryogenesis in soybean. *The Plant Cell*, 31(10), 2315–2331. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00255>

- Jin, F., Hu, L., Yuan, D., Xu, J., Gao, W., He, L., Yang, X., & Zhang, X. (2013). Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. *Plant Biotechnology Journal*, *12*(2), 161–173. <https://doi.org/10.1111/pbi.12123>
- Johnson, L. M., Bostick, M., Zhang, X., Kraft, E., Henderson, I., Callis, J., & Jacobsen, S. E. (2007). The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone methylation. *Current Biology*, *17*(4), 379–384. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.009>
- Johnson, T. B., & Coghill, R. D. (1925). Researches on pyrimidines. C111. The discovery of 5-methyl-cytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus1. *Journal of the American Chemical Society*, *47*(11), 2838–2844. <https://doi.org/10.1021/ja01688a030>
- Jones, A., Thomas, C. L., & Maule, A. J. (1998). De novomethylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. *The EMBO Journal*, *17*(21), 6385–6393. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.21.6385>
- Joshi, S., Paul, P., Hartman, J. M., & Perry, S. E. (2022). AGL15 promotion of somatic embryogenesis: Role and molecular mechanism. *Frontiers in Plant Science*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.861556>
- Jullien, P., Susaki, D., Yelagandula, R., Higashiyama, T., & Berger, F. (2012). DNA methylation dynamics during sexual reproduction in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, *22*(19), 1825–1830. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.061>
- Juranić, M., Srilunchang, K. O., Krohn, N. G., Leljak-Levanić, D., Sprunck, S., & Dresselhaus, T. (2012). Germline-specific MATH-BTB substrate adaptor MAB1 regulates spindle length and nuclei identity in maize. *The Plant Cell*, *24*(12), 4974–4991. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.107169>
- Jürgens, G. (2001). Apical-basal pattern formation in *Arabidopsis* embryogenesis. *The EMBO Journal*, *20*(14), 3609–3616. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3609>
- Kanno, T., Bucher, E., Daxinger, L., Huettel, B., Böhmendorfer, G., Gregor, W., Kreil, D. P., Matzke, M., & Matzke, A. J. M. (2008). A structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation. *Nature Genetics*, *40*(5), 670–675. <https://doi.org/10.1038/ng.119>

- Kawashima, T., & Berger, F. (2014). Epigenetic reprogramming in plant sexual reproduction. *Nature Reviews Genetics*, *15*(9), 613–624. <https://doi.org/10.1038/nrg3685>
- Kawashima, T., & Berger, F. (2011). Green love talks; cell–cell communication during double fertilization in flowering plants. *AoB PLANTS*, 2011. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plr015>
- Kim, B., Nam, H. J., Pyo, K. E., Jang, M. J., Kim, I. S., Kim, D., Boo, K., Lee, S. H., Yoon, J. B., Baek, S. H., & Kim, J. H. (2011). Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) is destabilized by the Cul3–SPOP E3 ubiquitin ligase complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *415*(4), 720–726. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.154>
- Kim, J. S., Lim, J. Y., Shin, H., Kim, B. G., Yoo, S. D., Kim, W. T., & Huh, J. H. (2019). ROS1-dependent DNA demethylation is required for ABA-inducible NIC3 expression. *Plant Physiology*, *179*(4), 1810–1821. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01471>
- Koncz, C., & Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics MGG*, *204*(3), 383–396. <https://doi.org/10.1007/bf00331014>
- Kurczyńska, E. U., Gaj, M. D., Ujczak, A., & Mazur, E. (2007). Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, *226*(3), 619–628. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0510-6>
- Lafon-Placette, C., & Köhler, C. (2014). Embryo and endosperm, partners in seed development. *Current Opinion in Plant Biology*, *17*, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.11.008>
- Law, J. A., Ausin, I., Johnson, L. M., Vashisht, A. A., Zhu, J. K., Wohlschlegel, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). A protein complex required for polymerase V transcripts and RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Current Biology*, *20*(10), 951–956. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.062>
- Law, J. A., Du, J., Hale, C. J., Feng, S., Krajewski, K., Palanca, A. M. S., Strahl, B. D., Patel, D. J., & Jacobsen, S. E. (2013). Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1. *Nature*, *498*(7454), 385–389. <https://doi.org/10.1038/nature12178>
- Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, *11*(3), 204–220. <https://doi.org/10.1038/nrg2719>

- Law, J. A., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., & Jacobsen, S. E. (2011). SHH1, a homeodomain protein required for DNA methylation, as well as RDR2, RDM4, and chromatin remodeling factors, associate with RNA polymerase IV. *PLOS Genetics*, 7(7), e1002195. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002195>
- Lechner, E., Leonhardt, N., Eisler, H., Parmentier, Y., Alioua, M., Jacquet, H., Leung, J., & Genschik, P. (2011). MATH/BTB CRL3 receptors target the homeodomain-leucine zipper ATHB6 to modulate abscisic acid signaling. *Developmental Cell*, 21(6), 1116–1128. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.018>
- Lei, M., La, H., Lu, K., Wang, P., Miki, D., Ren, Z., Duan, C. G., Wang, X., Tang, K., Zeng, L., Yang, L., Zhang, H., Nie, W., Liu, P., Zhou, J., Liu, R., Zhong, Y., Liu, D., & Zhu, J. K. (2013). Arabidopsis EDM2 promotes IBM1 distal polyadenylation and regulates genome DNA methylation patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 527–532. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320106110>
- Leljak-Levanić, D., Horvat, T., Martinčić, J., & Bauer, N. (2012). A novel bipartite nuclear localization signal guides BPM1 protein to nucleolus suggesting its Cullin3 independent function. *PLOS ONE*, 7(12), e51184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051184>
- Leljak-Levanić, D., Juranić, M., & Sprunck, S. (2013). De novo zygotic transcription in wheat (*Triticum aestivum* L.) includes genes encoding small putative secreted peptides and a protein involved in proteasomal degradation. *Plant Reproduction*, 26(3), 267–285. <https://doi.org/10.1007/s00497-013-0229-4>
- Leljak-Levanić, D., Mihaljević, S., & Bauer, N. (2015). Somatic and zygotic embryos share common developmental features at the onset of plant embryogenesis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(7), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1875-y>
- Li, J., & Berger, F. (2012). Endosperm: food for humankind and fodder for scientific discoveries. *New Phytologist*, 195(2), 290–305. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04182.x>
- Lindroth, A. M., Shultis, D., Jasencakova, Z., Fuchs, J., Johnson, L., Schubert, D., Patnaik, D., Pradhan, S., Goodrich, J., Schubert, I., Jenuwein, T., Khorasanizadeh, S., & Jacobsen, S. E. (2004). Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with CHROMOMETHYLASE3. *The EMBO Journal*, 23(21), 4146–4155. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600430>

- Lister, R., O'Malley, R. C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B. D., Berry, C. C., Millar, A. H., & Ecker, J. R. (2008). Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. *Cell*, *133*(3), 523–536. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.029>
- Liu, S., Yeh, C. T., Ji, T., Ying, K., Wu, H., Tang, H. M., Fu, Y., Nettleton, D., & Schnable, P. S. (2009). Mu transposon insertion sites and meiotic recombination events co-localize with epigenetic marks for open chromatin across the maize genome. *PLOS Genetics*, *5*(11), e1000733. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000733>
- Liu, W., Duttke, S. H., Hetzel, J., Groth, M., Feng, S., Gallego-Bartolome, J., Zhong, Z., Kuo, H. Y., Wang, Z., Zhai, J., Chory, J., & Jacobsen, S. E. (2018). RNA-directed DNA methylation involves co-transcriptional small-RNA-guided slicing of polymerase V transcripts in *Arabidopsis*. *Nature Plants*, *4*(3), 181–188. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0100-y>
- Liu, Z. W., Shao, C. R., Zhang, C. J., Zhou, J. X., Zhang, S. W., Li, L., Chen, S., Huang, H. W., Cai, T., & He, X. J. (2014). The SET domain proteins SUVH2 and SUVH9 are required for Pol V occupancy at RNA-directed DNA methylation loci. *PLOS Genetics*, *10*(1), e1003948. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003948>
- Luke-Glaser, S., Pintard, L., Lu, C., Mains, P. E., & Peter, M. (2005). The BTB protein MEL-26 promotes cytokinesis in *C. elegans* by a CUL-3-independent mechanism. *Current Biology*, *15*(18), 1605–1615. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.068>
- Macrogen Europe | NGS and Sanger sequencing service provider. (n.d.). <https://www.macrogen-europe.com/>
- Mani, R. S. (2014). The emerging role of speckle-type POZ protein (SPOP) in cancer development. *Drug Discovery Today*, *19*(9), 1498–1502. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.07.009>
- Markulin, L., Škiljaica, A., Tokić, M., Jagić, M., Vuk, T., Bauer, N., & Leljak Levanić, D. (2021). Taking the wheel – De novo DNA methylation as a driving force of plant embryonic development. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 764999. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.764999>
- Matthys-Rochon, E. (2005). Secreted molecules and their role in embryo formation in plants: a min-review. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* *47*(1), 23–29. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00188834>

Matzke, M. A., & Mosher, R. A. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics*, *15*(6), 394–408. <https://doi.org/10.1038/nrg3683>

McCarty, M., & Avery, O. T. (1946). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: II. Effect of desoxyribonuclease on the biological activity of the transforming substance. *The Journal of Experimental Medicine* *83*(2): 89–96. <https://doi.org/10.1084/jem.83.2.97>

Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G. J., & Qi, Y. (2008). Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, *133*(1), 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.034>

Mikeska, T., Felsberg, J., Hewitt, C.A., Dobrovic, A. (2011). Analysing DNA methylation using bisulphite pyrosequencing. U: Tollefsbol, T. (eds) *Epigenetics protocols. Methods in molecular biology*, 791. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-316-5_4

Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, *38*(1), 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>

Morimoto, K., Ohama, N., Kidokoro, S., Mizoi, J., Takahashi, F., Todaka, D., Mogami, J., Sato, H., Qin, F., Kim, J. S., Fukao, Y., Fujiwara, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). BPM-CUL3 E3 ligase modulates thermotolerance by facilitating negative regulatory domain-mediated degradation of DREB2A in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(40), E8528-E8536. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704189114>

Multimedia Portal. (2020). Uonbi.ac.ke. <https://learning.uonbi.ac.ke>

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, *15*(3): 473-497.

Naydenov, M., Baev, V., Apostolova, E., Gospodinova, N., Sablok, G., Gozmanova, M., & Yahubyan, G. (2015). High-temperature effect on genes engaged in DNA methylation and affected by DNA methylation in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, *87*, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.12.022>

Nuthikattu, S., McCue, A. D., Panda, K., Fultz, D., DeFraia, C., Thomas, E. N., & Slotkin, R. K. (2013). The initiation of epigenetic silencing of active transposable elements is triggered by

RDR6 and 21-22 nucleotide small interfering RNAs. *Plant Physiology*, 162(1), 116–131. <https://doi.org/10.1104/pp.113.216481>

O'Neill, J. P., Colon, K. T., & Jenik, P. D. (2019). The onset of embryo maturation in Arabidopsis is determined by its developmental stage and does not depend on endosperm cellularization. *The Plant Journal*, 99(2), 286-301. <https://doi.org/10.1111/tpj.14324>

Pintard, L., Willis, J. H., Willems, A., Johnson, J. L. F., Srayko, M., Kurz, T., Glaser, S., Mains, P. E., Tyers, M., Bowerman, B., & Peter, M. (2003). The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature*, 425(6955), 311–316. <https://doi.org/10.1038/nature01959>

Pontier, D., Picart, C., Roudier, F., Garcia, D., Lahmy, S., Azevedo, J., Alart, E., Laudié, M., Karlowski, W., Cooke, R., Colot, V., Voinnet, O., & Lagrange, T. (2012). NERD, a plant-specific GW protein, defines an additional RNAi-dependent chromatin-based pathway in Arabidopsis. *Molecular Cell*, 48(1), 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.027>

Regulski, M., Lu, Z., Kendall, J., Donoghue, M. T., Reinders, J., Llaca, V., Deschamps, S., Smith, A., Levy, D., McCombie, W. R., Tingey, S., Rafalski, A., Hicks, J., Ware, D., & Martienssen, R. A. (2013). The maize methylome influences mRNA splice sites and reveals widespread paramutation-like switches guided by small RNA. *Genome Research*, 23(10), 1651–1662. <https://doi.org/10.1101/gr.153510.112>

Reinert, J. (1959). Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta*, 53(4), 318–333. <https://doi.org/10.1007/bf01881795>

Ren, H., Santner, A., Pozo, J. C. D., Murray, J. A. H., & Estelle, M. (2008). Degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor KRP1 is regulated by two different ubiquitin E3 ligases. *The Plant Journal*, 53(5), 705–716. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2007.03370.x>

Rodríguez, M. J. P., Suárez, M. F., Heredia, R., Ávila, C., Breton, D., Trontin, J., Filonova, L., Bozhkov, P., Von Arnold, S., Harvengt, L., & Cánovas, F. M. (2005). Expression patterns of two glutamine synthetase genes in zygotic and somatic pine embryos support specific roles in nitrogen metabolism during embryogenesis. *New Phytologist*, 169(1), 35–44. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01551.x>

Saitou, M., Kagiwada, S., & Kurimoto, K. (2012). Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development*, *139*(1), 15–31. <https://doi.org/10.1242/dev.050849>

Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, B., Weigel, D., & Lohmann, J. U. (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics*, *37*(5), 501–506. <https://doi.org/10.1038/ng1543>

Shen, L., Guo, Y., Chen, X., Ahmed, S., & Issa, J. P. J. (2007). Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis. *BioTechniques*, *42*(1), 48–58. <https://doi.org/10.2144/000112312>

Smalle, J., & Vierstra, R. D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology*, *55*(1), 555–590. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141801>

Srayko, M., Buster, D. W., Bazirgan, O. A., McNally, F. J., & Mains, P. E. (2000). MEI-1/MEI-2 katanin-like microtubule severing activity is required for *Caenorhabditis elegans* meiosis. *Genes & Development*, *14*(9), 1072–1084. <https://doi.org/10.1101/gad.14.9.1072>

Steward, F. C., Mapes, M. O., & Smith, J. (1958). Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 693–703.

Stogios, P. J., Downs, G. S., Jauhal, J. J., Nandra, S. K., & Privé, G. G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome biology*, *6*(10), 1–18. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-10-r82>

Stroud, H., Do, T., Du, J., Zhong, X., Feng, S., Johnson, L., Patel, D. J., & Jacobsen, S. E. (2013). Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in *Arabidopsis*. *Nature Structural & Molecular Biology*, *21*(1), 64–72. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2735>

Škiljaica, A., Jagić, M., Vuk, T., Leljak Levanić, D., Bauer, N., & Markulin, L. (2022). Evaluation of reference genes for RT-qPCR gene expression analysis in *Arabidopsis thaliana* exposed to elevated temperatures. *Plant Biology*, *24*(2), 367–379. <https://doi.org/10.1111/plb.13382>

Škiljaica, A., Lechner, E., Jagić, M., Majsec, K., Malenica, N., Genschik, P., & Bauer, N. (2019). The protein turnover of *Arabidopsis* BPM1 is involved in regulation of flowering time

and abiotic stress response. *Plant Molecular Biology*, 102(4–5), 359–372. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00947-2>

TAIR - Home Page. (n.d.). <https://www.arabidopsis.org>

Thomann, A., Lechner, E., Hansen, M., Dumbliauskas, E., Parmentier, Y., Kieber, J., Scheres, B., & Genschik, P. (2009). Arabidopsis CULLIN3 genes regulate primary root growth and patterning by ethylene-dependent and -independent mechanisms. *PLOS Genetics*, 5(1), e1000328. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000328>

Toonen, M. A. J., Hendriks, T., Schmidt, E. D. L., Verhoeven, H. A., van Kammen, A., & de Vries, S. C. (1994). Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta*, 194(4), 565–572. <https://doi.org/10.1007/bf00714471>

Tuteja, N. (2007). Abscisic Acid and Abiotic Stress Signaling. *Plant Signaling & Amp; Behavior*, 2(3), 135–138. <https://doi.org/10.4161/psb.2.3.4156>

Twell, D. (2010). Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. *Sexual Plant Reproduction*, 24(2), 149–160. <https://doi.org/10.1007/s00497-010-0157-5>

Vongs, A., Kakutani, T., Martienssen, R. A., & Richards, E. J. (1993). Arabidopsis thaliana DNA Methylation Mutants. *Science*, 260(5116), 1926–1928. <https://doi.org/10.1126/science.8316832>

Walbot, V., & Evans, M. M. S. (2003). Unique features of the plant life cycle and their consequences. *Nature Reviews Genetics*, 4(5), 369–379. <https://doi.org/10.1038/nrg1064>

Wang, J., Wang, C., Long, Y., Hopkins, C., Kurup, S., Liu, K., King, G. J., & Meng, J. (2011). Universal endogenous gene controls for bisulphite conversion in analysis of plant DNA methylation. *Plant Methods*, 7(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-39>

Wang, T., Li, R., Wen, L., Fu, D., Zhu, B., Luo, Y., & Zhu, H. (2015). Functional analysis and RNA sequencing indicate the regulatory role of Argonaute1 in tomato compound leaf development. *PLOS ONE*, 10(10), e0140756. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140756>

Wang, Y., Henriksson, E., Söderman, E., Henriksson, K. N., Sundberg, E., & Engström, P. (2003). The arabidopsis homeobox gene, ATHB16, regulates leaf development and the sensitivity to photoperiod in Arabidopsis. *Developmental Biology*, 264(1), 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.07.017>

- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L., & Sanger, H. L. (1994). RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, 76(3), 567–576. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90119-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90119-8)
- Weber, H., Bernhardt, A., Dieterle, M., Hano, P., Mutlu, A., Estelle, M., Genschik, P., & Hellmann, H. (2005). Arabidopsis AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Physiology*, 137(1), 83–93. <https://doi.org/10.1104/pp.104.052654>
- Weijers, D., & Wagner, D. (2016). Transcriptional responses to the auxin hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 67(1), 539–574. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112122>
- Wendrich, J. R., & Weijers, D. (2013). The Arabidopsis embryo as a miniature morphogenesis model. *New Phytologist*, 199(1), 14–25. <https://doi.org/10.1111/nph.12267>
- Winkelmann, T. (2016). Somatic versus zygotic embryogenesis: Learning from seeds. U: Germana, M., Lambardi, M. (eds) *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology*, 1359. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_2
- Wójcikowska, B., Gaj, M.D. (2017). Expression profiling of AUXIN RESPONSE FACTOR genes during somatic embryogenesis induction in Arabidopsis. *Plant Cell Reports* 36(6), 843–858. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2114-3>
- Wójcikowska, B., Gaj, M.D. (2016). Somatic embryogenesis in Arabidopsis. U: Loyola-Vargas, V., Ochoa-Alejo, N. (eds) *Somatic embryogenesis: Fundamental aspects and applications*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_11
- Wongpalee, S. P., Liu, S., Gallego-Bartolomé, J., Leitner, A., Aebersold, R., Liu, W., Yen, L., Nohales, M. A., Kuo, P. H., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., Feng, S., Kay, S. A., Zhou, Z. H., & Jacobsen, S. E. (2019). CryoEM structures of arabidopsis DDR complexes involved in RNA-directed DNA methylation. *Nature Communications*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11759-9>
- Woo, H. R., Dittmer, T. A., & Richards, E. J. (2008). Three SRA-domain methylcytosine-binding proteins cooperate to maintain global CpG methylation and epigenetic silencing in Arabidopsis. *PLOS Genetics*, 4(8), e1000156. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000156>

- Xiao, W., Custard, K. D., Brown, R. C., Lemmon, B. E., Harada, J. J., Goldberg, R. B., & Fischer, R. L. (2006). DNA methylation is critical for Arabidopsis embryogenesis and seed viability. *The Plant Cell*, *18*(4), 805–814. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038836>
- Xu, L., Wei, Y., Reboul, J., Vaglio, P., Shin, T. H., Vidal, M., Elledge, S. J., & Harper, J. W. (2003). BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature*, *425*(6955), 316–321. <https://doi.org/10.1038/nature01985>
- Yadegari, R., & Drews, G. N. (2004). Female gametophyte development. *The Plant Cell*, *16*(suppl_1), S133-S141. <https://doi.org/10.1105/tpc.018192>
- Yang, C. S., Yu, C., Chuang, H. C., Chang, C. W., Chang, G. D., Yao, T. P., & Chen, H. (2005). FBW2 Targets GCMa to the ubiquitin-proteasome degradation system. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(11), 10083–10090. <https://doi.org/10.1074/jbc.m413986200>
- Yang, D. L., Zhang, G., Tang, K., Li, J., Yang, L., Huang, H., Zhang, H., & Zhu, J. K. (2016). Dicer-independent RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Cell Research*, *26*(1), 66–82. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.145>
- Yang, R., Zheng, Z., Chen, Q., Yang, L., Huang, H., Miki, D., Wu, W., Zeng, L., Liu, J., Zhou, J. X., Ogas, J., Zhu, J. K., He, X. J., & Zhang, H. (2017). The developmental regulator PKL is required to maintain correct DNA methylation patterns at RNA-directed DNA methylation loci. *Genome Biology*, *18*(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1226-y>
- Yang, X., & Zhang, X. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *29*(1), 36–57. <https://doi.org/10.1080/07352680903436291>
- Yarbrough, J. A. (1932). Anatomical and developmental studies of the foliar embryos of *Bryophyllum calycinum*. *American Journal of Botany* *19*(6): 443-453. <https://doi.org/10.2307/2436069>
- Zerr, M. (2022). Ubiquitin-proteasome system. LifeSensors. <https://lifesensors.com/ubiquitinproteasomesystem/>.
- Zhai, J., Bischof, S., Wang, H., Feng, S., Lee, T. F., Teng, C., Chen, X., Park, S., Liu, L., Gallego-Bartolome, J., Liu, W., Henderson, I., Meyers, B., Ausin, I., & Jacobsen, S. (2015). A one precursor one siRNA model for Pol IV-dependent siRNA biogenesis. *Cell*, *163*(2), 445–455. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.032>

- Zhang, Q., Shi, Q., Chen, Y., Yue, T., Li, S., Wang, B., & Jiang, J. (2009). Multiple Ser/Thr-rich degrons mediate the degradation of Ci/Gli by the Cul3-HIB/SPOP E3 ubiquitin ligase. *Proceedings of the national academy of sciences*, 106(50), 21191-21196. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912008106>
- Zhang, Q., Zhang, L., Wang, B., Ou, C. Y., Chien, C. T., & Jiang, J. (2006). A Hedgehog-induced BTB protein modulates Hedgehog signaling by degrading Ci/Gli transcription factor. *Developmental Cell*, 10(6), 719–729. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.05.004>
- Zhong, S., Xu, Y., Yu, C., Zhang, X., Li, L., Ge, H., Ren, G., Wang, Y., Ma, J., Zheng, Y., Zheng, B. (2019). Anaphase-promoting complex/cyclosome regulates RdDM activity by degrading DMS3 in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(9), 3899-3908. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816652116>
- Zhong, X., Hale, C. J., Law, J. A., Johnson, L. M., Feng, S., Tu, A., & Jacobsen, S. E. (2012). DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(9), 870–875. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2354>
- Zhuang, M., Calabrese, M. F., Liu, J., Waddell, M. B., Nourse, A., Hammel, M., Miller, D. J., Walden, H., Duda, D. M., Seyedin, S. N., Hoggard, T., Harper, J. W., White, K. P., & Schulman, B. A. (2009). Structures of SPOP-substrate complexes: Insights into molecular architectures of BTB-Cul3 ubiquitin ligases. *Molecular Cell*, 36(1), 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.022>
- Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R. K., Ballinger, T., & Henikoff, S. (2006). Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics*, 39(1), 61–69. <https://doi.org/10.1038/ng1929>
- Zollman, S., Godt, D., Privé, G. G., Couderc, J. L., & Laski, F. A. (1994). The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22), 10717–10721. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10717>

8. PRILOZI

8.1. Pufferi i komercijalni kompleti

8.1.1. Sterilizacijska otopina

1 % Izosan® G (Pliva)
0,1 % Mukazol (Sigma-Aldrich®)
destilirana voda

8.1.2. Pufferi za izolaciju genomske DNA metodom CTAB

Ekstrakcijski puffer

Tris-HCl, pH 7,5 (100 mM)
NaCl (1,4 M)
EDTA pH 8,0 (20 mM)
CTAB (2 %)
2-Merkaptoetanol (20 mM)
destilirana voda

Precipitacijski puffer

Tris-HCl, pH 7,5 (50 mM)
EDTA pH 8,0 (10 mM)
CTAB (1 %)
destilirana voda

RNazni puffer

NaCl (1,5 M)
RNaza A (10 ng/mL) (Invitrogen™ PureLink™ RNase A, kat.br.: 10618703)
destilirana voda

Kloroform-Izoamil (24:1)

8.1.3. Komplet za izolaciju DNA iz malih masa tkiva

Dynabeads DNA DIRECT Universal kit (Invitrogen, kat. br.: 63006)

8.1.4. Brza izolacija DNA u svrhu detekcije integrirane T-DNA

Ekstrakcijski pufer

Tris-HCl, pH 7,5 (200 mM)

NaCl (250 mM)

EDTA pH 8,0 (25 mM)

SDS (0,5 %)

TE pufer

Tris-HCl, pH 7,5 (10 mM)

EDTA pH 8,0 (1 mM)

8.1.5. Komplet za izolaciju plazmida

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, kat.br.: A1340)

8.1.6. Reagensi za agaroznu gel elektroforezu

Agaroz (BioReagent, for molecular biology, low EEO, kat.br.: A9539-250G)

1x TAE pufer (40 mM Tris-acetat, 1mM EDTA, pH 8,0)

DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Scientific, kat.br.: R0611)

GeneRuler 100 pb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, kat.br.: SM0241)

GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, kat.br.: SM0312)

Etidij bromid (10 mg/L)

8.1.7. Kompleti za purifikaciju PCR produkata

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, kat.br.: A9282)

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, kat.br.: 740609.50)

8.1.8. Reagensi za kromatinsku imunoprecipitaciju

Formaldehid (Sigma-Aldrich®, kat.br.: F8775)

PBS pufer (1x)

Glicin (2 M) (0,15 g u 1mL vode)

SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5X)(ABP Biosciences, kat.br.: P013)

RNaza A (Thermo Fisher Scientific™, kat.br.: EN0531)

Glikogen (Thermo Fisher Scientific™, kat.br.: R0561)

Fenol:Kloroform:Izoamil (25:24:1) (Sigma-Aldrich®, kat.br.: P3803)

Natrijev acetat pH 5,2 (3 M)

Etanol (70 %)

Proteinaza K (0,04 mg/mL) (EO0491)

Pierce ChIP-grade Protein A/G Magnetic Beads (Thermo Fisher Scientific™, kat.br.:26162)

Anti-GFP antitijelo (Invitrogen, kat.br.: A11122)

8.1.9. Puferi za kromatinsku imunoprecipitaciju

Pufer M1

Fosfatni pufer pH 7,0 (10 mM)

NaCl (100 mM)

β-merkaptioetanol (10 mM)

cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (1x) (2 tablete)

Heksilen glikol (1 M)

voda

Pufer M2

Fosfatni pufer pH 7,0 (10 mM)

NaCl (100 mM)

β-merkaptioetanol (10 mM)

cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (1x) (5 tableta)

Heksilen glikol (1 M)

MgCl (10 mM)

Triton-X-100 (0,5 %)

voda

Pufer M3

Fosfatni pufer pH 7,0 (10 mM)

NaCl (100 mM)

β -merkaptoetanol (10 mM)

*cOmplete*TM *Protease Inhibitor Cocktail* (1x) (1 tableta)

voda

Covaris Shearing pufer

SDS (0,1 %)

EDTA pH 8,0 (1 mM)

Tris-HCl, pH 8,0 (10 mM)

*cOmplete*TM *Protease Inhibitor Cocktail* (25x)

voda

Elucijski pufer

SDS (1 %)

NaHCO₃ (0,1 M)

voda

Reverse Crosslink pufer

NaCl (0,2 M)

EDTA pH 8,0 (0,01 M)

Tris-HCl, pH 8,0 (0,04 M)

proteinaza K (0,04 mg/mL)(EO0491)

voda

ChIP Dilution pufer

SDS (0,01 %)

Triton-X-100 (1,10 %)

EDTA pH 8,0 (1,2 mM)

Tris-HCl, pH 8,0 (16,7 mM)

NaCl (167 mM)

voda

Low Salt pufer za ispiranje

SDS (0,1 %)

Triton-X-100 (1 %)

EDTA pH 8,0 (2 mM)

Tris-HCl (20 mM)

NaCl (150 mM)

voda

High Salt pufer za ispiranje

SDS (0,1 %)

Triton-X-100 (1 %)

EDTA pH 8,0 (2 mM)

Tris-HCl (20 mM)

NaCl (500 mM)

voda

LiCl pufer za ispiranje

LiCl (0,25 M)

IGEPAL CA630 (1 %)

Deoksikolna kiselina (1 %)

EDTA pH 8,0 (1 mM)

Tris-HCl, pH 8,0 (10 mM)

voda

TE pufer

Tris-HCl, pH 8,0 (10 mM)

EDTA pH 8,0 (1 mM)

voda

8.1.10. Komplet za bisulfitnu konverziju

EZ-DNA Methylation Gold kit (Zymo, kat.br.: D5006)

8.1.11. Kompleti za umnažanje DNA

Pyromark PCR kit (Qiagen, kat.br.: 978703)

EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix (TaKaRa, kat.br.: RR320A)

CloneAmp™ HiFi PCR Premix (TaKaRa, kat.br.: 639298)

8.1.12. Reagensi za kloniranje

pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, kat.br.: A1360)

In-Fusion® HD Cloning kit (Takara, kat.br.: 639650)

KLD Enzyme Mix (New England Biolabs, kat.br.: M0554S)

8.1.13. Reagensi za pirosekvenciranje

PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents (4x24) (Enzyme mixture, Substrate mixture, PyroMark Q24 Advanced Annealing Buffer, PyroMark Binding Buffer, Nucleotides for CpG and long-read sequencing runs) (Qiagen, kat.br.: 970922)

8.1.14. Kompleti za izolaciju RNA

Dynabeads™ mRNA DIRECT™ Micro Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, kat. br.: 61021)

MagMAX™ Plant RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, kat.br.: A33899)

8.1.15. Reagensi za reverznu transkripciju

RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, kat.br.: EP0451)

oligo(dT) 18 Primer, dNTP, Reaction buffer, RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific)

8.2. Literaturne baze podataka o metilaciji

Tablica P1. Pristupni brojevi i literaturni izvori metilacijskih baza podataka korištenih pri selekciji metiliranih regija za analizu.

Pristupni broj	Literaturni izvor
GSM980986 GSM980987 GSM981010 GSM981014 GSM981015 GSM981016 GSM981034 GSM981040 GSM981042 GSM981044	Stroud i sur., 2013
GSM2590474 GSM2590476 GSM2590484	Yang i sur., 2017
GSM1574493	Kim i sur., 2019
GSM1848703	Zhai i sur., 2015
GSM1252084	Lei i sur., 2013
GSM1821772	Yang i sur., 2016

8.3. Sekvence početnica i optimalni uvjeti reakcije PCR

Tablica P2. Sekvence početnica osmišljenih za umnažanje bisulfitno konvertirane DNA i duljine amplikona za svaki set početnica.

Naziv početnice	Sekvenca (5' – 3')	Duljina početnice [nt]	Veličina amplikona [pb]
Agl14A.fw	GATAGAGATGAAGAGGATAGAGAATG	26	387
Agl14A.rev	CTTCTCTCTAAAATTAATAATCTTTCTTAAC	32	
Agl14B.fw	GTTAAGAAAGATTTTAATTTAGAGAGAAAG	32	299
Agl14B.rev	CCTAATTTAAATAAAAAAATACTACTCAAACTT	33	
Cml41A.fw	CGCGGATCCGAATATGTTTGGATAAGTATTTTTGG	37	532
Cml41A.rev	CGCGGATCCTCTCATAAAAATTTCTCACAATTAATAAAT	40	
Cml41B.fw	CGCGGATCCATTTTTTAATTTGTGAGAAATTTTTATGAGATA	42	447
Cml41B.rev	CGCGGATCCACCTCATAAATATATACTACCAAC	35	
Fbw2.fw	GATTAATTTTGTATAATTTTGTATTTTTTGTAGG	37	196
Fbw2.rev	CATTTTTCCACTTTTCTATTTTACTC	26	

Tablica P2 – nastavak

Rkp.fw	GTGAAATTTGTTATGATTATAGAATTTATAAAT	33	511
Rkp.rev	CACCACTAACTAAAAAAAAAATCAC	25	

Tablica P3. Koncentracija MgCl₂ i optimalni uvjeti reakcije PCR utvrđeni za svaki set početnica.

Set početnica	Koncentracija MgCl ₂ [mM]	Broj ciklusa	Temperatura prijanjanja početnica [°C]	Temperatura elongacije [°C]	Duljina elongacije [s]
Agl14A	0	50	56	72	45
Agl14B	3,0	50	58	68	20
Cml41A	2,0	50	56	68	25
Cml41B	0	50	56	72	45
Fbw2	0	45	58	68	15
Rkp	2,0	50	60	68	25

Tablica P4. Uzvodne početnice osmišljene za analizu biotiniziranih produkata metodom pirosekvenciranja.

Naziv početnice	Sekvenca (5' – 3')	Duljina početnice [nt]
Agl14B-piro.fw	TAGAGAGAAAGAAAAAT	17
Cml41A-piro.fw	TAGATAATGTATATTTTA	18
Fbw2-piro.fw	TGATTTTTTTTGTTAGG	16
Rkp-piro.fw	TAAGATATTATTAAGGA	17

Tablica P5. Sekvence i mjesta vezanja početnica osmišljenih za analizu ekspresije gena metodom qPCR.

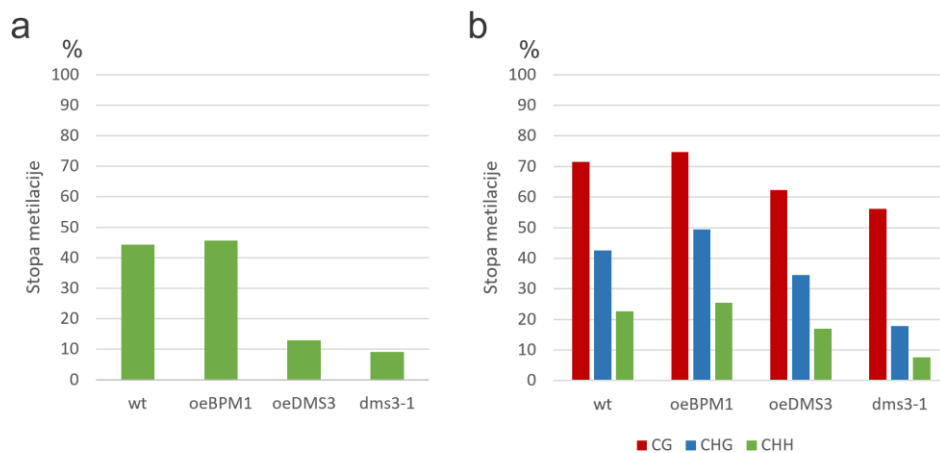
Naziv početnice	Sekvenca (5' – 3')	Duljina početnice [nt]	Mjesto vezanja početnice
qAgl14.fw	GATGGAGAAGTGTGAGATGC	20	spoj egzona 6 i 7
qAgl14.rev	AGGTCCAATGAACAAATCAGTC	22	egzon 7
qCml41.fw	CTCAGACATTACTTCGGCTC	20	egzon
qCml41.rev	GTCATCAATCCAACAAAGTCCT	22	egzon
qFbw2.fw	GATGCTTGAGATGTTGATCCC	21	egzon 1
qFbw2.rev	TTAAGTGAACCAGCATGTTGTG	22	spoj egzona 1 i 2
qRKP.fw	GGAATATAATTGGGACGGTTGTG	23	spoj egzona 9 i 10
qRKP.rev	GTGTTGTCTTCTATATCTGTCGTG	24	egzon 10

8.4. Obrada rezultata kromatinske imunoprecipitacije

Prvi korak u analizi podataka dobivenih nakon sekvenciranja uzoraka kromatinske imunoprecipitacije bio je analiza kvalitete. U ovu svrhu korišten je *FastQC*, alat za kontrolu kvalitete sekvenci. Sljedeći korak bio je mapiranje očitavanja (eng. *reads*) na referentni genom pomoću alata *Map with BWA*. Kao referentni genom korišten je genom *A. thaliana* dostupan na TAIR10 (*TAIR – Home Page*, n.d.). Verzija TAIR10 genoma *A. thaliana* preuzeta je s *iGenomes* (illumina). Fasta format genoma normaliziran je s *Normalize Fasta* (LINE_LENGTH = 80). Uparena očitavanja (engl. *pair-end reads*) mapirana su pomoću algoritma BWA sa zadanim parametrima te su duplicirana očitavanja uklonjena pomoću programa *MarkDuplicates*, a preostala očitavanja filtrirana koristeći parametre $MAPQ \geq 40$ (kako bi se eliminirala nespecifična očitavanja mapirana na više lokacija) te XM (broj pogrešno sparenih nukleotida engl. *mismatch*) ≤ 2 . Broj očitavanja u *input*-u normaliziran je na broj očitavanja u ChIP uzorcima (10^6 za BPM1 te 13×10^6) pomoću *SAMtools* (skup uslužnih programa). Posljednji korak u analizi podataka bio je identifikacija genomskih regija koje su obogaćene očitanjima, tzv. *peak calling*, pomoću alata MACS2. Rezultati analize vizualizirani su pomoću programa iGV te korelirani s podacima o CHH metilaciji dostupnim u literaturi. Na temelju dobivene vizualizacije, za daljnju analizu su odabrani geni u čijoj su blizini detektirana obogaćenja te zanimljivi metilacijski obrasci (preferentno u promotorskoj regiji).

8.5. Metilacijski obrasci gena *CML41*, *FBW2*, *RKP* i *AGL14* u klijancima

Za analizu metilacije nakon završetka embriogeneze i neposredno nakon tranzicije u vegetativnu fazu razvoja koristila sam klijance stare 12 dana. Kao i u rezultatima dobivenim za embrije, i u klijancima je najviša razina metilacije DNA utvrđena u liniji oeBPM1. Ova je linija imala najvišu metilaciju i u promotoru gena *CML41*, u kojem je prisutna metilacija samo u okruženju CHH (slike 25, P1a), kao i u promotoru gena *FBW2*, u kojem je ova linija imala najvišu metilaciju u sva tri okruženja (slike 27, P1b). U oba je gena utvrđena niža metilacija DNA u linijama s promijenjenom funkcijom komponenata mehanizma RdDM, oeDMS3 i *dms3-1*. Metilaciju između različitih linija usporedila sam i prikazala na primjeru ova dva gena, budući da je u genima *RKP* i *AGL14* zbog nižih vrijednosti, ali i specifičnih metilacijskih obrazaca u divljem tipu (Slika 31), usporedba globalne metilacije bila otežana.

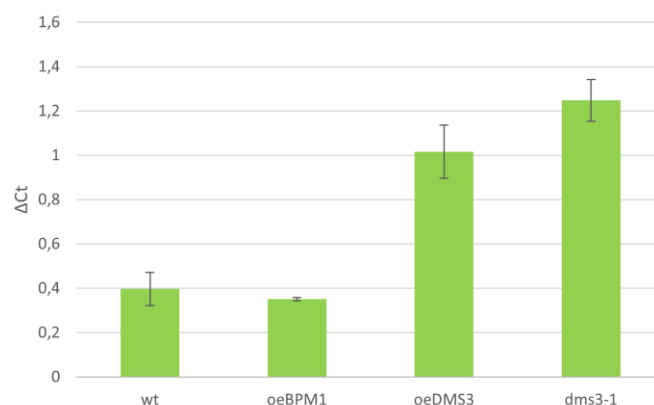


Slika P1. Metilacija citozina u promotorima gena *CML41* i *FBW2* u klijancima divljeg tipa te linija oeBPM1, oeDMS3 i *dms3-1*. (a) Usporedba prosječnih stopa metilacije okruženja CHH u odabranoj regiji promotora gena *CML41*. (b) Usporedba prosječnih stopa metilacije pojedinih okruženja u odabranoj regiji promotora gena *FBW2*.

8.6. Relativna ekspresija gena *CML41*, *FBW2*, *RKP* i *AGL14* u klijancima

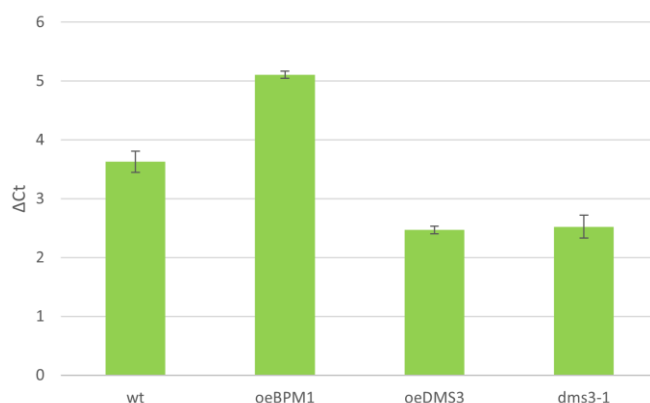
U genu *CML41*, i u klijancima je utvrđen rezultat koji ukazuje na represivan učinak metilacije na ekspresiju. U liniji oeBPM1, u kojoj je zabilježena malo povišena metilacija u odnosu na divlji tip (slika 25), ekspresija je malo niža, dok je u linijama s promijenjenom

funkcijom proteina DMS3, oeDMS3 i *dms3-1*, ekspresija povišena u odnosu na divlji tip (slika P2). Ovakav rezultat je u skladu s očekivanjima, budući da je u ovim linijama metilacija značajno snižena (slika P1a).



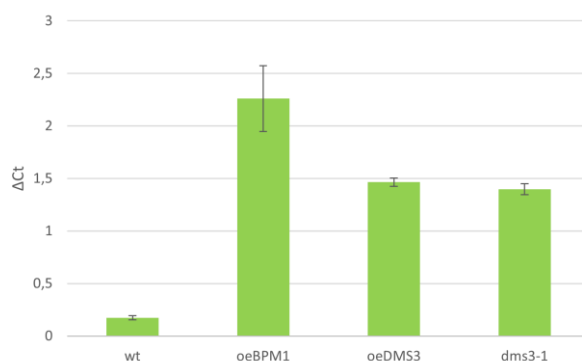
Slika P2. Relativne razine ekspresije gena *CML41* u klijancima divljeg tipa, te linija oeBPM1, oeDMS3 i *dms3-1*. Prikazana je srednja vrijednost dviju tehničkih replika (n=2).

Rezultati analize ekspresije gena *FBW2* u klijancima potvrdili su pretpostavku o stimulativnom učinku metilacije donesenu na temelju analize embrija. Linija s najvišom razinom metilacije u klijancima, oeBPM1, imala je povišenu ekspresiju u odnosu na divlji tip, dok su u linijama oeDMS3 i *dms3-1* metilacija i ekspresija bile niže (slika P3).



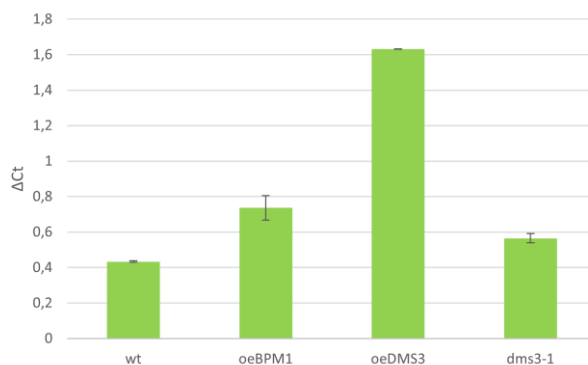
Slika P3. Relativne razine ekspresije gena *FBW2* u klijancima divljeg tipa, te linija oeBPM1, oeDMS3 i *dms3-1*. Prikazana je srednja vrijednost dviju tehničkih replika (n=2).

Prilikom interpretacije rezultata ekspresije gena *RKP* u klijancima, treba uzeti u obzir promjenu u obrascu metilacije utvrđenu u divljem tipu u odnosu na ostale linije. U usporedbi s divljim tipom, u svim su linijama zabilježene više razine ekspresije. Najviša razina ekspresije bila je u liniji oeBPM1, dok je u linijama oeDMS3 i *dms3-1* bila nešto niža (slika P4). Ovakav obrazac utvrđen je prethodno i za metilaciju regije ovog gena (slika 29), što potvrđuje proporcionalan odnos ovih dviju vrijednosti i stimulatívni učinak metilacije na ekspresiju gena *RKP*.



Slika P4. Relativne razine ekspresije gena *RKP* u klijancima divljeg tipa, te linija oeBPM1, oeDMS3 i *dms3-1*. Prikazana je srednja vrijednost dviju tehničkih replika (n=2).

Na isti način prikazani su rezultati analize ekspresije gena *AGL14* (slika P5). Zbog prethodno utvrđene promjene metilacijskog obrasca u klijancima divljeg tipa (slika 31), ali i niskih razlika u metilaciji i ekspresiji između linija, teško je donijeti konkretan zaključak o učinku metilacije na ekspresiju gena *AGL14*.



Slika P5. Relativne razine ekspresije gena *AGL14* u klijancima divljeg tipa, te linija oeBPM1, oeDMS3 i *dms3-1*. Prikazana je srednja vrijednost dviju tehničkih replika (n=2).

9. ŽIVOTOPIS

Tamara Vuk rođena je 4. siječnja 1993. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu i prirodoslovno-matematičku gimnaziju. Godine 2011. upisala je preddiplomski, a 2015. diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Drugu godinu diplomskog studija pohađala je u sklopu programa Bioindustrijskih tehnika (TBI) koji organizira Sveučilište u Zagrebu u suradnji sa Sveučilištem u Orleansu, Francuska. U sklopu programa TBI diplomirala je u lipnju 2017. godine s temom „Overexpression of indole-3-acetic acid-amido synthetases GH3 in *Arabidopsis thaliana*“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Nataše Bauer. Nakon diplome, godinu dana je radila kao mlađi suradnik u farmakovigilanciji, nakon čega se u listopadu 2018. godine zaposlila na mjesto asistenta u Laboratoriju za kulturu biljnog tkiva na Zavodu za molekularnu biologiju te upisala doktorski studij biologije.

Doktorski rad izradila je u sklopu projekta „MATH-BTB proteini kao regulatori transkripcije i RNA posredovane metilacije DNA u biljnom razvitku“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost. Za vrijeme doktorskog studija sudjelovala je na brojnim međunarodnim simpozijima, kao i u organizaciji manifestacije Noć biologije. Koautorica je tri znanstvena rada objavljena u časopisima s međunarodnom recenzijom.

Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta „MATH-BTB proteini kao regulatori transkripcije i RNA posredovane metilacije DNA u biljnom razvitku“ (IP-2016-06-6229) koji je financirala Hrvatska zaklada za znanost, u okviru programa razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti (DOK-2018-01-2144).