

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Karla Tolić

**Uspostava zigotne kontrole razvoja u viših
biljaka**

Završni rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Karla Tolić

**Maternal-to-zygotic transition in higher
plants**

Bachelor thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Prijediplomski studij molekularne biologije na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dunje Lejak-Levanić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Uspostava zigotne kontrole razvoja kod viših biljaka

Karla Tolić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Životni ciklus biljaka i životinja započinje oplodnjom jajne stanice kojom nastaje zigota. Kratko nakon oplodnje razvoj embrija temelji se na transkriptima naslijeđenim od jajne stanice. Postepeno kontrolu razvoja preuzima zigota/embrij tijekom tranzicijskog procesa (MZT). Uspostava zigotne/embrijske kontrole razvoja odvija se postepeno kroz razgradnju naslijeđenih majčinskih transkripata te aktivaciju zigotnog genoma (ZGA). Kod biljaka, za razliku od životinja, aktivacija zigotnog genoma započinje u stadiju zigote te rezultira prvom staničnom diobom. Geni koji se eksprimiraju u ranim stadijima razvoja biljaka uključeni su u uspostavu polarnosti zigote te apikalno-bazalne osi koja je temelj za nastavak embriogeneze. Mehanizmi degradacije naslijeđenih transkripata kod biljaka još nisu poznati. Dosadašnja istraživanja upućuju na postojanje razlika u procesu uspostave zigotne kontrole razvoja između jednosupnica i dvosupnica. Najnovija istraživanja provedena na životinjskim modelima ukazala su na važnost alternativnog prekrajanja u procesu MZT, međutim ovakva istraživanja tek je potrebno provesti na biljnim modelima. Perspektivu za proučavanje alternativnog prekrajanja u okviru uspostave zigotne kontrole razvoja kod uročnjaka predstavlja proteinska porodica MATH-BTB.

Ključne riječi: aktivacija zigotnog genoma (ZGA), alternativno prekrajanje, MATH-BTB proteini, embrionalni razvoj biljaka

(20 stranica, 4 slike, 79 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Maternal-to-zygotic transition in higher plants

Karla Tolić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The life cycle of plants and animals begins with the fertilization of the egg cell, which results in the formation of a zygote. Shortly after fertilization, the development of the embryo relies on transcripts inherited from the egg cell. Gradually, the zygote/embryo takes control of development during the maternal-to-zygotic transition (MZT). Maternal-to-zygotic transition occurs progressively through the degradation of inherited maternal transcripts and the activation of the zygotic genome (ZGA). Unlike animals, in plants zygotic genome activation begins at the zygote stage and it leads to the first cell division. Genes expressed during the early stages of plant development are involved in establishing the polarity of the zygote and the apical-basal axis, which is essential for further embryogenesis. The mechanisms which govern degradation of inherited transcripts in plants are still unknown. Previous studies suggest differences in the process of maternal-to-zygotic transition between monocots and dicots. Recent research on animal models has highlighted the importance of alternative splicing in the MZT process, but such studies are yet to be conducted on plant models. The MATH-BTB protein family presents a perspective for studying alternative splicing in the context of MZT process in Arabidopsis.

Keywords: zygotic genome activation (ZGA), alternative splicing, MATH-BTB proteins, plant embryo development

(20 pages, 4 figures, 79 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

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

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Uspostava zigotne kontrole razvoja kod životinja	1
3. Uspostava zigotne kontrole razvoja kod biljaka	4
3.1 Razvoj zigote i rana embriogeneza	4
3.2 Genetička kontrola razvoja zigote i ranih stadija embriogeneze.....	4
3.3. Mehanizmi uspostave zigotne kontrole razvoja u biljaka	7
4. Uloga alternativnog prekrajanja u uspostavi zigotne kontrole razvoja	11
5. Zaključak i perspektive	13
6. Literatura	14
7. Životopis.....	20

1. Uvod

Životni ciklusi biljaka i životinja započinju oplodnjom jajne stanice pri čemu nastaje zigota i započinje embrionalni razvoj. Embrionalni razvoj se u početku temelji na transkriptima i proteinima nasljeđenim iz jajne stanice, a kako vrijeme prolazi upravljanje razvojem preuzima razvijajući embrij što je ključno za daljnji nastavak embriogeneze (Schier, 2007; Tadros i Lipshitz, 2009). Proces koji uključuje razgradnju roditeljski nasljeđenih transkripata i proteina te postepenu aktivaciju zigotnog genoma (engl. *zygotic genome activation*; ZGA) naziva se uspostava zigotne kontrole razvoja (engl. *maternal-to-zygotic transition*; MZT) (Tadros i Lipshitz, 2009). Proces uspostave zigotne kontrole razvoja otkriven je u istraživanjima koja su uključivala životinjske modele. Prvotno je opisan u istraživanjima provedenim u vrstama *Mus musculus* (Braude i sur., 1979) i *Ceanorhabditis elegans* (Edgar i sur., 1994) u kojima su zigote tretirane α -amanitinom, inhibitorom RNA polimeraze II. Rezultati obaju eksperimenata pokazali su da se zigota u prisutnosti α -amanitina dijeli neometano. Takav je rezultat ukazao na ovisnost najranije embriogeneze životinja o nasljeđenim transkriptima. Unatoč tome, učinak α -amanitina na embriogenezu bio je vidljiv u dvostaničnom stadiju kod miša, odnosno 8-staničnom stadiju u vrste *C. elegans* kada je većina majčinskih transkripata razgrađena. Zaustavljanje embrionalnog razvoja djelovanjem α -amanitina označava uspostavu zigotne kontrole razvoja. Ova dva eksperimenta otvorila su vrata novim istraživanjima pa su ubrzo uslijedili eksperimenti na drugim životinjskim modelima poput vinske mušice (*Drosophila melanogaster*), zebrice (*Danio rerio*), žabe (*Xenopus sp.*). Tim je istraživanjima potvrđeno da rani embrionalni razvoj životinja ovisi o nasljeđenim faktorima te da je zigota transkripcijski inaktivna i nije u mogućnosti samostalno upravljati prvim diobama (Andéol, 1994).

Proces uspostave zigotne kontrole razvoja puno je bolje istražen na životinjskim modelima kod kojih je izolacija jajnih stanica i zigota puno jednostavnija, posebice kod onih s vanjskom oplodnjom. Glavno ograničenje prilikom istraživanja ranih razvojnih procesa viših biljaka je nedostupnost ženskog gametofita i zigote, a kasnije i embrija.

2. Uspostava zigotne kontrole razvoja kod životinja

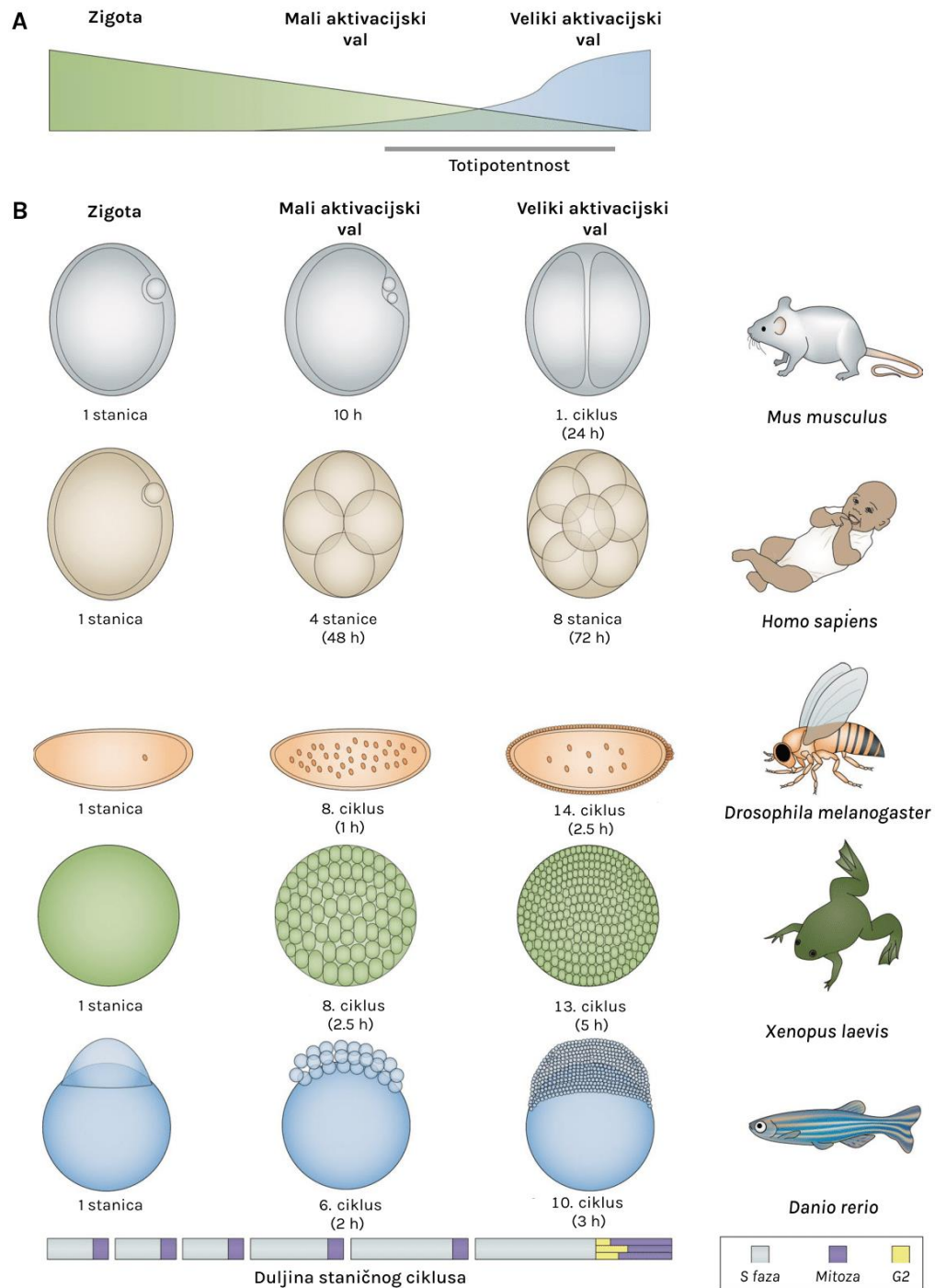
Tijekom prvih sati nakon oplodnje, genom se mora reprogramirati u totipotentno stanje kako bi se omogućio razvoj novog organizma. Utvrđeno je da se uspostava zigotne kontrole razvoja kod životinja sastoji od dva složena, međusobno koordinirana procesa: uklanjanje majčinskih transkripata i ZGA (Tadros i Lipshitz, 2009). Navedena dva procesa odvijaju se postepeno i istovremeno. Iz jajne stanice u zigotu se prenose brojni transkripti i proteini koji u početku upravljaju diferencijacijom, uspostavom polarnosti i morfološkim promjenama tijekom rane

embriogeneze. Za to je vrijeme ekspresija zigotnog genoma inhibirana majčinskim faktorima (Tadros i Lipshitz, 2009).

Uklanjanje majčinskih transkripata počinje odmah nakon oplodnje kada njime upravljaju nasljeđeni faktori, a kasnije se u taj proces postupno uključuju i produkti zigotnog genoma. Kod vinske mušice se oko 25% majčinskih transkripata uklanja mehanizmima kojima upravljaju isključivo nasljeđeni faktori, oko 35% transkripata degradira se pomoću zigotnih produkata, a ostatak mehanizmima koji uključuje i majčinske i zigotne faktore (Tadros i sur., 2007; Thomsen i sur., 2010). Utišavanje majčinskog transkriptoma odvija se pomoću RNA-vezujućih proteina koji deadeniliraju mRNA ili uklanjaju 5'-kapu čime mRNA postaje podložnija razgradnji (Yartseva i Giraldez, 2015). Dodatno, proteini koji modificiraju mRNA uvođenjem, primjerice, N⁶-metiladenozina mogu usmjeriti majčinsku mRNA na razgradnju (Zhao i sur., 2017). Male nekodirajuće RNA također imaju ulogu u uklanjanju nasljeđenih transkripata kod zebrice (Bazzini i sur., 2012), vinske mušice (Bushati i sur., 2008) i žabe (Lund i sur., 2009). Degradacija majčinskog transkriptoma nužna je kako bi se uklonili represori koji inhibiraju zigotnu transkripciju.

Tijekom aktivacije zigotnog genoma kromatin, koji potječe iz jajne stanice i spermija, se mora remodelirati kako bi postao dostupan transkripcijskoj mašineriji. U procesu remodeliranja kromatina sudjeluje više mehanizama poput metilacije DNA, histonskih modifikacija i varijanti te pozicioniranje nukleosoma (Schulz i Harrison, 2019). Metilacija DNA uključuje metilaciju citozina u 5-metilcitozin. Kod miša i čovjeka genom prolazi kroz globalnu demetilaciju prije ZGA (Guo i sur., 2014; Shen i sur., 2014) dok je kod žabe i zebrice utvrđen visok stupanj metilacije genoma tijekom ZGA. Stoga, funkcija metilacije DNA u procesu ZGA vjerojatno nije konzervirana već ovisi o vrsti. Posttranslacijske modifikacije histona također su jedan od načina epigenetičke regulacije genske ekspresije. Generalno, acetilacija histonskih repova potiče gensku ekspresiju tijekom ZGA, dok metilacija može imati represivni ili aktivacijski učinak, ovisno o poziciji na kojoj se nalazi (Schulz i Harrison, 2019). Sastav i pozicioniranje nukleosoma utječe na otvorenost kromatina i na taj način sudjeluje u regulaciji rane genske ekspresije (Pérez-Montero i sur., 2013). Kod vinske mušice utvrđeno je da se embrionalna varijanta histona H1 tijekom ZGA izmjenjuje za somatsku varijantu. Preuranjena transkripcija i zaustavljen embrionalni razvoj zabilježena je kod vinskih mušica bez embrionalne varijante histona H1 (Pérez-Montero i sur., 2013). Aktivacija zigotnog genoma životinja događa se kontinuirano, no zabilježena su dva vala tijekom kojih se aktivira veći broj gena – veliki i mali aktivacijski val. Vremenski period u kojem se odvijaju veliki i mali val ZGA ovisi o vrsti. Primjerice, kod miša se mali val događa 10 h, a kod čovjeka 48 h

nakon oplodnje, dok je veliki val zabilježen 24 h nakon oplodnje kod miša i 72 h nakon oplodnje kod čovjeka (Schulz i Harrison, 2019) (Slika 1).



Slika 1. Uspostava zigotne kontrole razvoja kod različitih životinjskih modela. A. Veliki i mali val aktivacije zigotnog genoma. Siva linija označava totipotentno stanje. B. Ključne vremenske točke u aktivaciji ZGA kod različitih životinjskih modela. Vrijeme je izraženo u satima nakon oplodnje. Duljina trajanja staničnog ciklusa pojedinih faza prikazana je na dnu slike. Preuzeto i prilagođeno prema Shultz i Harrison (2019)

3. Uspostava zigotne kontrole razvoja kod biljaka

Nakon oplodnje jajna stanica mora proći kroz brojne fiziološke, strukturne i molekularne promjene kako bi uspostavila zigotni potencijal razvoja novog biljnog organizma (Peng i sur., 2018). Procesi vezani uz gametofit okončavaju se razgradnjom majčinskih transkripata i proteina, a aktivacija zigotnog genoma omogućava uspostavu metabolizma novog mladog sporofita. Uspostava zigotne ekspresije gena omogućava aktivaciju zigote i programirane stanične diobe koje dovode do razvoja embrija (Li i sur., 2021).

3.1 Razvoj zigote i rana embriogeneza

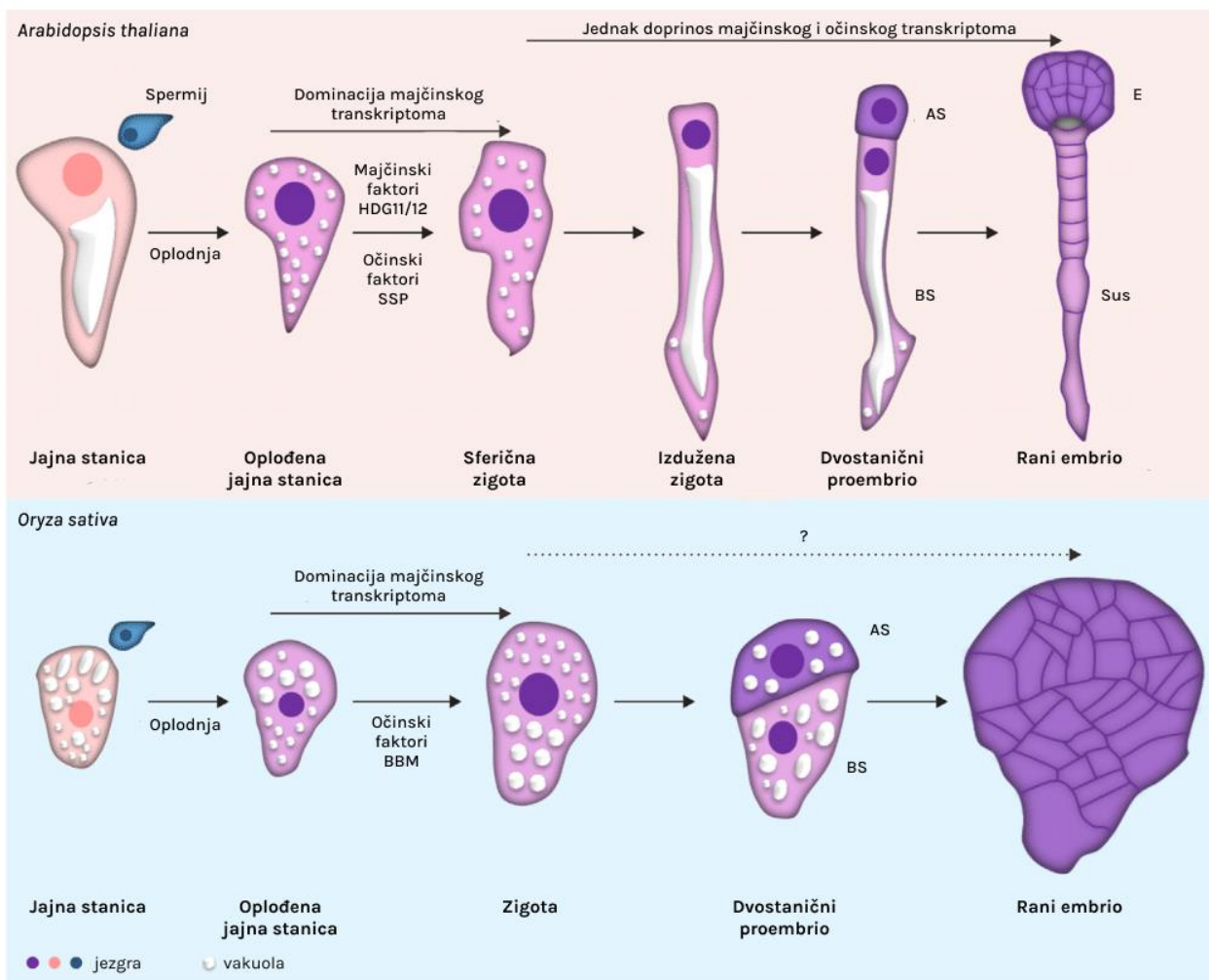
Jajna stanica je polarna struktura koja ima jezgru na apikalnom, a veliku vakuolu na svom bazalnom kraju (Mansfield i Briarty, 1991). Nakon oplodnje u zigoti uročnjaka odvija se depolarizacija tako da se jezgra pomakne prema središtu, a velika vakuola raspadne na više manjih (Faure i sur., 2002). Zatim slijedi repolarizacija tijekom koje se ponovno uspostavlja polarnost zigote koja je različita od polarnosti koju je imala jajna stanica. Kod uročnjaka se tijekom repolarizacije jezgra pomiče prema halazalnom polu, a na mikropilarnom se polu formira velika vakuola (Ueda i sur., 2011). Repolarizirana zigota uročnjaka gotovo je tri puta dulja nego na početku i ima izmijenjenu polarnost u odnosu na jajnu stanicu (Ueda i sur., 2011). Pomicanje jezgre za sada je zabilježeno samo kod uročnjaka. Asimetričnom diobom nastaje bazalna stanica s velikom vakuolom i manja apikalna stanica s gustom citoplazmom (Slika 2). Iz apikalne stanice diobama će nastati embrio, a iz bazalne stanice suspensor koji ima ulogu u prehranjivanju embrija.

3.2 Genetička kontrola razvoja zigote i ranih stadija embriogeneze

Zhao i sur. (2019) utvrdili su da za pravilnu uspostavu polarnosti i prvu asimetričnu diobu uročnjaka potrebna aktivacija zigotnog transkriptoma. Nakon oplodnje, a prije elongacije, dok je zigota uročnjaka još uvijek depolarizirana, dominiraju majčinski transkripti, dok su u zigoti koja je prošla proces elongacije utvrđeni i *de novo* transkripti (Slika 2). Osim toga, oplodene jajne stanice uročnjaka tretirane α -amanitinom, inhibitorom transkripcije, ne izdužuju se te je daljnji embrionalni razvoj zakočen (Zhao i sur., 2019). U drugim recentnim istraživanjima provedenim na uročnjaku praćeno je prisustvo RNA polimeraze II fosforilirane na C-terminalnom kraju te histona H3K36me3, koji su markeri aktivne transkripcije (Kao i Nodine, 2019). Prisustvo oba markera utvrđeno je u zigotama nakon oplodnje i prije prve diobe što potvrđuje transkripcijsku aktivnost zigote. Ipak, u eksperimentima koji su uključivali imunohistokemijsko bojenje tkiva, detektirane su niske razine RNA polimeraze II što upućuje

na to da je transkripcija u zigotama odmah nakon oplodnje prisutna, ali ograničena na mali broj lokusa (Autran i sur., 2011).

Rezultati istraživanja provedenog na duhanu (*Nicotiana tabaccum*) pokazali su da zaustavljanjem transkripcije u zigoti korištenjem transkripcijskih inhibitora zigota ne može ući u prvu diobu (Zhao i sur., 2011). Osim kod uročnjaka i duhana, *de novo* transkripcija utvrđena je nakon oplodnje i prije prve stanične diobe u zigotama riže (*Oryza sativa*) (Anderson i sur. 2017), kukuruza (*Zea mays*) (Chen i sur., 2017), pšenice (*Triticum aestivum*) (Sprunck i sur., 2005) i zumbula (*Hyachintus orientalis*) (Niedojadło i sur., 2012).



Slika 2. Tijek rane embriogeneze uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) i riže (*Oryza sativa*). Kratice: AS – apikalna stanica, BS – bazalna stanica, E – embrio, Sus – suspensor. Preuzeto i prilagođeno iz Zhao i sur. (2022)

Polarizacija zigote i formiranje embrija regulirana su transkripcijskim faktorima WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 8 (WOX8) i WOX9 (Breuninger i sur., 2008; Ueda i sur., 2017). Kao što je prikazano na Slici 3, za transkripcijsku aktivaciju gena *WOX8* nužna je integracija dvaju naslijeđenih faktora – očinskog faktora SHORT SUSPENSOR (SSP) te

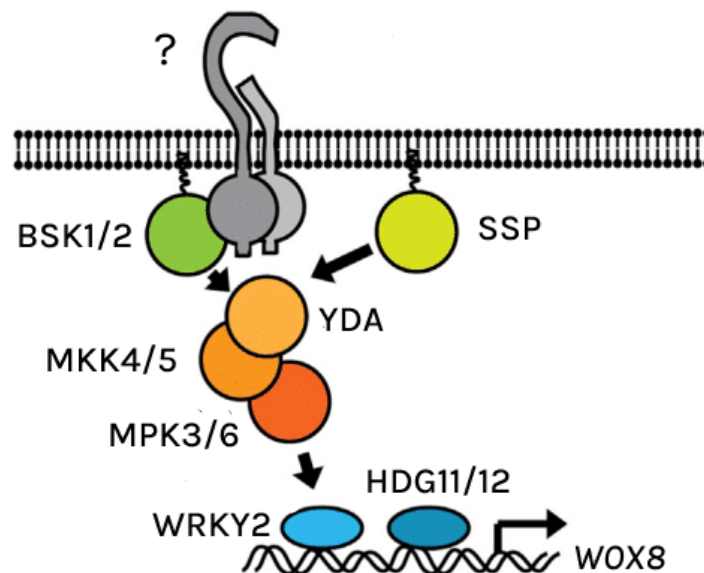
majčinskih faktora HOMEODOMAIN GLABROUS 11 (HDG11) i HDG12 (Ueda i sur., 2017). Gen *SSP* kodira za membransku receptorsku kinazu i dio je obitelji signalnih kinaza BRASSINOSTEROID SIGNALING KINASE (BSK) (Neu i sur., 2019). Transkripti *SSP* nagomilavaju se u spermijima te se prenose u zigotu gdje se transliraju i izvršavaju svoju funkciju (Bayer i sur., 2009). Istraživanje koje su proveli (Armenta-Medina i sur., 2017) ukazala su na potencijalnu ulogu miRNA u translacijskoj represiji *SSP* mRNA u spermijima uročnjaka. Receptorska kinaza *SSP* regulira aktivnost kinaze YODA (YDA) koja je dio MAPK kaskade (eng. *mitogen-activated protein kinase*) u koju još spadaju kinaze MKK4/5 i MPK3/6 (Lukowitz i sur., 2004; Zhang i sur., 2017). Glavni cilj kaskade MAPK koju pokreće *SPP* je fosforilacija transkripcijskog faktora WRKY2 (Ueda i sur., 2017). WRKY2 u kombinaciji s transkripcijskim faktorom HDG11/12, koji se nasljeđuje od majke, potom aktivira transkripciju *WOX8* (Ueda i sur., 2017). Na ovaj način transkripcijski faktori naslijeđeni od majke i oca aktiviraju ranu ekspresiju gena u zigoti uročnjaka. *WOX8* je transkripcijski faktor koji, zajedno sa svojim homologom *WOX9*, upravlja polarizacijom zigote, međutim geni na koje djeluju još nisu poznati (Ueda i sur., 2017, 2011). Osim transkripcijskog faktora *SPP*, smatra se da i drugi proteini iz porodice BSK, kojoj pripada i *SSP*, imaju ulogu u aktivaciji kinaze YODA, međutim ona je manje značajna (Neu i sur., 2019). *SSP* i BSK su proteini specifični za porodicu krstašica (*Brassicaceae*), kojoj pripada i uročnjak, pa je tek potrebno utvrditi proteine koji sudjeluju u aktivaciji genoma ostalih skupina biljaka.

Zigote uročnjaka s mutiranim genom za kinazu YDA ne prolaze kroz proces elongacije što rezultira simetričnom diobom. Stanice kćeri koje nastanu poprimaju obrasce razvoja embrija, a razvoj suspenzora izostaje. S druge strane, konstitutivna ekspresija kinaze YDA dovodi do nastanka stanica koje poprimaju razvojni obrazac suspenzora (Lukowitz i sur., 2004). Stoga, kinazna kaskada YDA promovira elongaciju zigote i suprimira razvoj embrija iz bazalne stanice (Musielak i Bayer, 2014). Mutante *wrky2* također imaju simetričnu prvu diobu, no ne i narušene druge procese razvoja kao *yda* mutante što upućuje na to da postoje i druge mete kinazne kaskade YDA (Ueda i sur., 2011).

Kod drugih biljaka, posebice jednosupnica, mehanizam uspostave polarnosti i rane embriogeneze slabije je istražen. Ortoloji mnogih gena koji sudjeluju u ranoj embriogenezi uročnjaka pronađeni su kod jednosupnica poput riže i kukuruza, međutim njihovu je funkciju tek potrebno utvrditi (Itoh i sur., 2016; P. Zhao i sur., 2017). U kukuruza (*Zea mays*) *ZmWOX9a* i *ZmWO9b*, ortoloji *WOX8* i *WOX9* uročnjaka, detektirani su u zigotama nedugo nakon oplodnje. Osim toga, *ZmWOX2*, koji je ortolog *WOX2* uročnjaka, detektiran je tek u kasnijim fazama embrionalnog razvoja kukuruza za razliku od uročnjaka kod kojeg su

transkripti *WOX2* prisutni već u zigoti (Chen i sur., 2017; Nardmann i sur., 2007). Ovo upućuje na razlike u regulaciji i uspostavljanju apikalno-bazalne osi kod uročnjaka i kukuruza.

Geni koji se aktiviraju među prvima tijekom aktivacije zigotnog genoma su geni vezani za uspostavu plana građe embrija te apikalno-bazalne osi (Nodine i Bartel, 2012; Ueda i sur., 2011). Aktivacija zigotnog genoma ne samo da je nužna za prvu staničnu diobu, već određuje i sudbine stanica kćeri – apikalne i bazalne stanice dvostaničnog proembrija. (Haecker i sur., 2004) utvrdili su da su geni *WOX2* i *WOX8* koeksprimirani u zigoti uročnjaka, dok je nakon prve diobe *WOX2* eksprimiran samo u apikalnoj, a *WOX8* samo u bazalnoj stanici. *WOX2* usmjerava daljnji razvoj apikalne stanice iz koje se kasnije razvija embrio i svi biljni organi (Jürgens, 1995). Iz bazalne stanice se razvija mirujući centar korijena te suspensor koji ima ulogu u prehranjivanju embrija (Jürgens, 1995; Scheres i sur., 1994).



Slika 3. Molekularni mehanizam aktivacije gena *WOX8* kod uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*). Kratice: BSK1/2 – BRASSINOSTEROID SIGNALING KINASE, SSP - SHORT SUSPENSOR, YDA-MKK4/5-MPK3/6 – kinazna kaskada YODA, WRKY2 – transkripcijski faktor WRKY2, HDG11/12 – transkripcijski faktor HOMEODOMAIN GLABROUS 11/12, *WOX8* – WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 8; ? – nepoznati receptor s kojim interagira BSK1/2. Preuzeto i prilagođeno iz (Wang i sur., 2020)

3.3. Mehanizmi uspostave zigotne kontrole razvoja u biljaka

Razvojni proces koji omogućava tranziciju oplođene jajne stanice u zigotu je uspostava zigotne kontrole razvoja tijekom procesa MZT. Kao i kod životinja, MZT se i kod biljaka odvija preklapajućim mehanizmima degradacije naslijeđenih produkata i aktivacije zigotnog genoma (Baroux i sur., 2008)

3.3.1. Razgradnja naslijeđenih transkripata i proteina

Razgradnja naslijeđenih faktora esencijalna je za uspostavljanje zigotne kontrole razvoja. Mehanizmi koji upravljaju procesima degradacije relativno su dobro poznati iz istraživanja na životinjskim modelima. Kao što je navedeno u prethodnom poglavlju proces razgradnje naslijeđenih transkripata kod životinja odvija se mehanizmima koji uključuju male nekodirajuće RNA, RNA-vezujuće proteine i modifikacije baza u RNA (Despic i Neugebauer, 2018; Vastenhouw i sur., 2019). Međutim, vrlo se malo istraživanja bavi proučavanjem mehanizama koji se upravljaju razgradnjom majčinskih transkripata kod biljaka.

Do sada provedena istraživanja uspješno su identificirala neke od transkripata u kojima se jajna stanica i zigota razlikuju. Primjerice, utvrđeno je da se kod uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) transkripti gena *EGG CELL-SPECIFIC1 (ECS1)* i *ECS2*, koji su prisutni u jajnoj stanici i čiji produkti imaju ulogu u odbijanju višestrukih polenovih cjevčica, razgrađuju odmah nakon oplodnje (Yu i sur., 2021). Slično tomu, kod duhana (*Nicotiana tabacum*) nakon oplodnje uočena je postepena degradacija mRNA i proteina karakterističnih za metabolizam jajne stanice (Zhao i sur., 2011).

Proteini koji inhibiraju metabolizam jajne stanice također moraju biti degradirani nakon oplodnje kako bi se potaknuo metabolizam zigote. U istraživanju provedenom na zigotama uročnjaka pokazano je da je razgradnja ciklina B1, koji se u zigotu nasljedi iz jajne stanice, nužna za prvu diobu (Guo i sur., 2016). U degradaciji ciklina B1 u zigoti sudjeluje ciklosom APC11 (*anaphase-promoting complex 11*). APC11 ubikvitinira ciklin B1 i time ga usmjerava na proteosomalnu razgradnju. Mutanti zigote-arrest 1 (*zyg1*) nemaju funkcionalan ciklosom APC11 zbog čega se ciklin B1 akumulira što je naposljetku za zigotu letalno (Guo i sur., 2016). Analizom proteinske sekvence APC11 uročnjaka uvrđena je visoka sličnost s APC11 proteinima riže (*OsAPC11*) i kukuruza (*ZmAPC11*) (Guo i sur., 2016), no ulogu APC11 u uspostavi zigotne kontrole razvoja riže i kukuruza još je potrebno utvrditi.

Točni mehanizmi kojima se kod biljaka razgrađuju naslijeđeni faktori nisu poznati, no u ranim embrijima pšenice (*Triticum aestivum*) utvrđena je aktivnost gena koji kodira za protein TaMAB2 koji spada u proteinsku porodicu MATH-BTB. Protein TaMAB2 eksprimiran je isključivo u stadiju zigote i dvostaničnog proembrija što ukazuje na njegovu vrlo specifičnu funkciju (Leljak-Levanić i sur., 2013). Proteini porodice MATH-BTB najbolje su proučeni u kontekstu ubikvitinom-usmjerene proteosomalne degradacije što upućuje i na potencijalnu ulogu ovog mehanizma u uspostavi zigotne kontrole razvoja. Dosadašnja istraživanja porodice MATH-BTB kod jednosupnica otkrila su njihove vrlo specifične uloge, a osim toga zabilježen

je velik broj MATH-BTB gena što ukazuje na njihovu funkcionalnu raznolikost (Juranić i Dresselhaus, 2014).

U istraživanju koje su na riži (*Oryza sativa*) proveli (Anderson i sur., 2017) nije pronađen dokaz za postojanje aktivnog mehanizma uklanjanja naslijeđenih transkripata. Autori predlažu da se naslijeđeni transkripti, zbog brzih dioba i rasta stanica, razrjeđuju i zamjenjuju novim zigotnim transkriptima (Anderson i sur., 2017).

3.3.2. Aktivacija zigotnog genoma

Proces aktivacije zigotnog genoma (ZGA) najvažniji je tijekom aktivacije zigote i osigurava nastavak embriogeneze. Trenutak u kojem počinje aktivacija zigotnog genoma jedna je od najznačajnijih razlika između životinjskog i biljnog procesa MZT. Za razliku od zigota životinja, koje su transkripcijski inaktivne prvih nekoliko dioba, kod biljnih je zigota *de novo* transkripcija nužna za pravilan početni razvoj (Zhao i sur., 2019).

U regulaciji aktivacije zigotnog genoma ulogu imaju i epigenetičke promjene poput metilacije DNA. Metilacija DNA kod biljaka se provodi putem tri glavne metiltransferaze - CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3), METHYLTRANSFERASE 1 (MET1) i DOMAINS REARRANGED METHYLASE (DRM1 i DRM2) (Matzke i Mosher, 2014). Embriji uročnjaka kojima su inaktivirani enzimi CMT3 i MET1 pokazuju nepravilan razvoj te je kod embrija mutante uročnjaka *met1* utvrđena nepravilna ekspresija gena uključenih u određivanje staničnog identiteta (Xiao i sur., 2006). Ekspresija metiltransferaze MET1 utvrđena je u zigotama riže (Abiko i sur., 2013). Zanimljivo je da je u jajnim stanicama riže ekspresija MET1 inhibirana te se ponovno uspostavlja nakon oplodnje (Jullien i sur., 2012).

Neka od istraživanja pokazala su dominantnu ekspresiju majčinskih alela odmah nakon oplodnje, dok su očinski aleli neko vrijeme reprimirani (Anderson i sur., 2017; Autran i sur., 2011; Del Toro-De León i sur., 2014). Smatra se da bi mehanizam RNA-usmjerene metilacije DNA (engl. *RNA-directed DNA methylation; RdDM*) posredovan aktivnošću metilaze DRM2, mogao imati ulogu u represiji očinskih alela tijekom ranog razvoja *A. thaliana*. Istraživanje koje su proveli (Autran i sur., 2011) pokazalo je da u embrijima, koji su defektni u mehanizmu RdDM i mutirani alel su naslijedili od majke, dolazi do preuranjene ekspresije očinskih alela u odnosu na divlji tip. Transkripti koji potječu s očinskih alela u zigotama su uročanjaka zabilježeni 14 sati nakon oplodnje, no njihov se broj potom smanjuje 24 sata nakon oplodnje (Zhao i sur., 2019).

Kromatin muških gameta visoko je kondenziran u odnosu na kromatin jajne stanice. Nakon kariogamije potrebne su strukturne promjene kromatina kako bi se omogućila

transkripcija očinskih gena u zigoti. Istraživanja provedena na zigotama miševa pokazala su da se očinski i majčinski kromatin topološki razlikuju čak i nakon nekoliko dioba (Mayer i sur., 2000). Kod uročnjaka se restrukturiranje kromatina počinje odmah nakon kariogamije (Ingouff i sur., 2007). Varijante histona H3 koje se nalaze na majčinskom ili očinskom genomu se uklanjaju i zamjenjuju novim histonom H3 koji se *de novo* sintetizira u zigoti (Ingouff i sur., 2010). Ulogu u restrukturiranju kromatina ima histonski šaperon CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR1 (CAF1) koji potiče aktivaciju očinskih alela. Biljke uročnjaka koje su imale mutiran gen za CAF1 naslijeđen od majke, imale su odgođenu aktivaciju očinskih alela na više lokusa (Ramirez-Parra i Gutierrez, 2007). Baroux i Grossniklaus (2015) predložili su model koji objašnjava epigenetičku regulaciju ZGA kod uročnjaka. Prema njihovom se modelu početnim brzim restrukturiranjem kromatina osigurava transkripcija s odabranih lokusa. Majčinske siRNA uzrokuju transkripcijsko utišavanje dijelova genoma, a nakon nekog vremena utišavanje se smanjuje i ZGA završava remodeliranjem koje provodi CAF1 (Baroux i Grossniklaus, 2015).

Proteini eksprimirani u zigoti razlikuju se od proteina eksprimiranih u jajnoj stanici i odražavaju specifične biološke funkcije tih stanica. U jajnoj su stanici eksprimirani proteini uključeni u procese poput diferencijacije gameta, fuzije gameta, aktivacije jajne stanice nakon oplodnje te proteine uključene aktivaciju zigote (Okamoto, 2017; Zhang i sur., 2021). Okamoto i sur. (2004) su izolirali najzastupljenije proteine iz jajnih stanica kukuruza te su utvrdili da pripadaju proteinima uključenim u procese glikolize i dobivanja energije. Također, izoliran je protein aneksin p53 koji sudjeluje u egzocitozi komponenata stanične stijenke pa se smatra da se prenosi u zigotu i omogućava ranu sintezu stijenke (Clark i sur., 2001; Okamoto i sur., 2004). Aneksin p53 pronađen je i u jajnim stanicama duhana (Ning i sur., 2006). U jajnim su stanicama riže u većoj mjeri zastupljeni proteinski šaperoni HEAT SHOCK PROTEIN70 (HSP70) i HSP90 (Uchiumi i sur., 2007) te vjerojatno imaju ulogu u stabilizaciji proteina prilikom oplodnje i konverzije jajne stanice u zigotu (Abiko i sur., 2013). Transkripcijski faktori MADS-box eksprimirani su u jajnim stanicama riže i kukuruza (Abiko i sur., 2013; Heuer i sur., 2001) te se pretpostavlja da se prenose u zigotu i sudjeluju u regulaciji ranog razvoja, no uloga im je za sad nepoznata (Abiko i sur., 2013).

Tijekom ZGA u zigoti se *de novo* eksprimiraju brojni proteini uključeni u regulaciju staničnog ciklusa i transkripcijski faktori koji upravljaju uspostavljanjem polarnosti te asimetričnom diobom. Usporedbom profila genske ekspresije jajne stanice i zigote riže utvrđeno je da su u zigotama aktivni geni uključeni u sintezu komponenata stanične stijenke te geni odgovorni za metabolizam auksina (Abiko i sur., 2013). U zigotama riže eksprimirani su i geni za kinaze uključene u prijenosu signala, poput kinaze GLE4 (Abiko i sur., 2013; Ishimoto

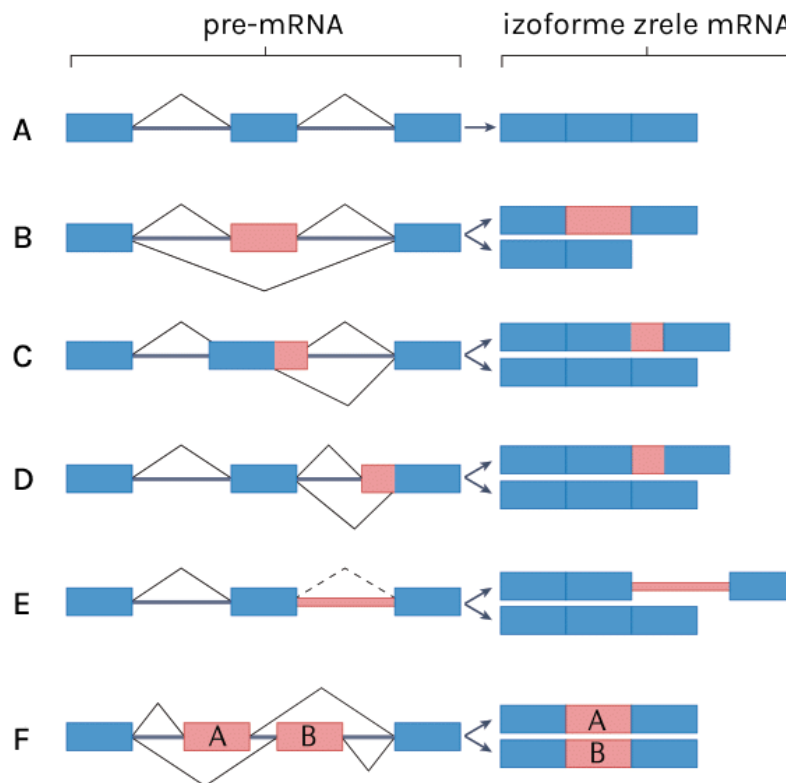
i sur., 2019). Proteinska kinaza GLE4 ortologna je kinazi MAP3/6 koja je eksprimirana u zigotama uročnjaka te sudjeluje u kaskadi YDA-MAP (Ishimoto i sur., 2019; Ueda i sur., 2017). U zigotama uročnjaka, riže, kukuruza i duhana eksprimirani su ranije spomenuti geni *WOX* porodice (Abiko i sur., 2013; Chen i sur., 2017; Haecker i sur., 2004; Ning i sur., 2006).

4. Uloga alternativnog prekrajanja u uspostavi zigotne kontrole razvoja

Važan korak u ekspresiji gena kod eukariota čini procesiranje pre-mRNA u zrele mRNA koja će se translirati u određeni protein. Procesiranje pre-mRNA odvija se kotranskripcijski kroz nekoliko procesa - procesiranjem krajeva, odnosno dodavanjem 7-metilgvanozina na 5' i poli(A) repa na 3' kraj, te prekrajanjem koje uključuje izrezivanje introna (nekođirajuće regije) i međusobno spajanje egzona (kođirajuće regije) (Wang i sur., 2015). Prekrojanje se odvija pomoću kompleksa za prekrojanje (engl. *spliceosome*) sastavljenog od pet ribonukleoproteina (U1, U2, U5 i U4/U6 snRNP) koji sadrže male jezgrine molekule RNA (snRNA) čija je uloga u prepoznavanju regija na pre-mRNA na kojima će se prekrojanje dogoditi (Wahl i sur., 2009). Ovaj proces naziva se konstitutivno prekrojanje (Slika 4A). Osim konstitutivnog prekrojanja poznato je i alternativno prekrojanje koje rezultira nastankom različitih izoformi zrele mRNA iz iste početne pre-mRNA. Alternativno prekrojanje (engl. *alternative splicing; AS*) događa se zbog toga što *spliceosome* slabije prepoznaje neka od mjesta za prekrojanje, a to može dovesti do nastanka varijanti zrele mRNA s različitim kombinacijama egzona (Gallego-Paez i sur., 2017). Postoji nekoliko poznatih mehanizama alternativnog prekrojanja koji su ukratko prikazani na Slici 4B - F (Marasco i Kornblihtt, 2023).

Alternativno prekrojanje ima važnu ulogu u regulaciji genske ekspresije te doprinosi povećanju raznolikosti proteina koje neki gen može proizvesti. Biološke funkcije alternativnog prekrojanja relativno su dobro istražene kod životinja. Poznato je da različite varijante proteina nastalih mehanizmom AS imaju razne uloge u održavanju homeostaze, staničnoj proliferaciji te razvojnim procesima (Marasco i Kornblihtt, 2023). Kod ljudi transkripti preko 95% gena prolaze kroz proces alternativnog prekrojanja, a mutacije u genima za faktore koji sudjeluju u

mehanizmu AS uzrokuju razne bolesti poput spinalne mišićne atrofije (Scotti i Swanson, 2016; Wang i sur., 2008). Osim u stvaranju novih proteinskih izoformi, alternativno prekrajanje ima



Slika 4. Različiti mehanizmi prekrajanja pre-mRNA. A. konstitutivno prekrajanje, B. preskakanje egzona, C. korištenje 5' alternativnog mjesta prekrajanja, D. korištenje 3' alternativnog mjesta prekrajanja, E. zadržavanje introna, F. međusobno isključujući egzoni. Preuzeto i prilagođeno prema (Marasco i Kornblihtt, 2023)

Najnovije istraživanje koje su proveli Zhang i sur. (2024) ukazalo je na važnost alternativnog prekrajanja u embrionalnom razvoju i uspostavi zgotne kontrole razvoja. Rani embriji miša tretirani su kemijskim agensima koji inhibiraju djelovanje nekih od ključnih faktora prekrajanja što je rezultiralo zaustavljanjem razvoja embrija u dvostaničnom stadiju. Daljnjim analizama utvrđeno je da je pristunost pravilnih izoformi mRNA, koje nastaju alternativnim prekrajanjem jedne pre-mRNA, ključno u prelasku embrija iz totipotentnog u pluripotentno stanje (Zhang i sur., 2024). Prelazak iz totipotentnog u pluripotentno stanje događa se u dvostaničnom stadiju embrija miša i vremenski se poklapa s velikim valom aktivacije zgotnog genoma (Wyatt i sur., 2022). Za vrijeme ZGA događa se izmjena naslijeđenih majčinskih faktora prekrajanja za de novo sintetizirane embrionalne faktore, stoga (Zhang i sur., 2024) u svom radu predlažu koncept zgotne aktivacije prekrajanja (engl. *zygotic splicing activation*; ZSA). Tijekom ranog embrionalnog razvoja čovjeka zabilježena je aktivnost mehanizma alternativnog prekrajanja koja se također vremenski poklapa sa ZGA, no

AS ovdje ima ulogu u utišavanju ekspresije određenih gena stvaranjem izoformi mRNA s preuranjenim terminacijskim kodonima (Torre i sur., 2023).

5. Zaključak i perspektive

Uspostava zigotne kontrole razvoja proces je kojim se kontrola embrionalnog razvoja predaje razvijajućem embriju, a događa se kako kod životinja, tako i kod biljaka. Obuhvaća procese degradacije naslijeđenih transkripata i aktivacije zigotnog genoma. Saznanja o MZT kod biljaka do nedavno su, zbog nedostupnosti ženskog gametofota i embrija, bila prilično ograničena, no razvojem novih metoda dobiva se sve bolji uvid u ovu temu. Aktivacija zigotnog genoma kod biljaka započinje već u stadiju zigote i nužna je za prvu staničnu diobu. Odmah nakon oplodnje u oplodenoj jajnoj stanici se događa intenzivno restrukturiranje kromatina kako bi bio dostupan za *de novo* transkripciju. Restrukturiranje se najvjerojatnije događa izmjenom histonskih varijanti. Postoje naznake da je ekspresija alela s očinskog kromatina neko vrijeme nakon oplodnje reprimirana djelovanjem naslijeđenih majčinskih faktora i mehanizma RdDM. Geni koji su prvi eksprimirani nakon aktivacije zigotne transkripcije jesu geni uključeni u uspostavu plana građe embrija te apikalno-bazne osi. Paralelno s aktivacijom zigotnog genoma događa se i razgradnja naslijeđenih transkripata, no za sada nisu poznati mehanizmi koji kod biljaka upravljaju ovim procesom. Do sada provedena istraživanja ukazuju na to da u procesu uspostave zigotne kontrole razvoja postoje razlike između dvosupnica i jednosupnica.

Recentna istraživanja provedena na životinjskim modelima otvorila su nove perspektive u istraživanju uspostave zigotne kontrole razvoja. Najnovije istraživanje provedeno na embrijima miševa ukazalo je na važnost alternativnog prekrajanja u procesu uspostave zigotne kontrole razvoja i prelaska embrija iz totipotentnog u pluripotentno stanje. Međutim, istraživanja na ovu temu tek je potrebno provesti na biljnim modelima. Perspektivu u istraživanju alternativnog prekrajanja u kontekstu uspostave zigotne kontrole razvoja kod biljaka predstavlja proteinska porodica MATH-BTB. U genomima biljaka porodice *Poaceae* utvrđen velik broj gena ove porodice koji imaju brojne i vrlo specifične uloge (Gingerich i sur., 2007; Juranić i Dresselhaus, 2014; Škiljaica, 2022). U prethodnom poglavlju je istaknut protein TaMAB2, eksprimiran isključivo u zigotama i dvostaničnim embrijima pšenice te ima potencijalnu ulogu u uspostavi zigotne kontrole razvoja (Leljak-Levanić i sur., 2013). S druge strane, kod uročnjaka je prisutno svega šest MATH-BTB gena, no oni zbog alternativnog prekrajanja kodiraju za više desetaka proteinskih produkata (Keresteš, 2024). Neke od proteinskih varijanti koje je identificirao Keresteš (2024) pojavljuju se specifično na prelascima

iz jedne u drugu razvojnu fazu (pr. tranzicija iz juvenilne u adultnu fazu te tranzicija iz vegetativne adultne u reproduktivnu fazu razvitka). Uzevši u obzir sve navedeno, uloga različitih varijanti MATH-BTB proteina, koje nastaju prekrajanjem, u uspostavi zigotne kontrole razvoja kod uročnjaka nije iskuljučena. Međutim, ova uloga je hipotetska i potrebna su detaljna istraživanja kojima bi se potvrdila.

6. Literatura

- Abiko, M., Maeda, H., Tamura, K., Hara-Nishimura, I., Okamoto, T., 2013. Gene expression profiles in rice gametes and zygotes: identification of gamete-enriched genes i up- or down-regulated genes in zygotes after fertilization. *J. Exp. Bot.* 64, 1927–1940.
- Andéol, Y., 1994. Early transcription in different animal species: implication for transition from maternal to zygotic control in development. *Roux Arch. Dev. Biol. Off. Organ EDBO* 204, 3–10.
- Anderson, S.N., Johnson, C.S., Chesnut, J., Jones, D.S., Khi ay, I., Woodhouse, M., Li, C., Conrad, L.J., Russell, S.D., Sundaresan, V., 2017. The zygotic transition is initiated in unicellular plant zygotes with asymmetric activation of parental genomes. *Dev. Cell* 43, 349-358.e4.
- Armenta-Medina, A., Lepe-Soltero, D., Xiang, D., Datla, R., Abreu-Goodger, C., Gillmor, C.S., 2017. *Arabidopsis thaliana* miRNAs promote embryo pattern formation beginning in the zygote. *Dev. Biol.* 431, 145–151.
- Autran, D., Baroux, C., Raissig, M.T., Lenormi , T., Wittig, M., Grob, S., Steimer, A., Barann, M., Klostermeier, U.C., Leblanc, O., Vielle-Calzada, J.-P., Rosenstiel, P., Grimanelli, D., Grossniklaus, U., 2011. Maternal epigenetic pathways control parental contributions to *Arabidopsis* early embryogenesis. *Cell* 145, 707–719.
- Baroux, C., Autran, D., Gillmor, C.S., Grimanelli, D., Grossniklaus, U., 2008. The maternal to zygotic transition in animals and plants. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 73, 89–
- Baroux, C., Grossniklaus, U., 2015. The maternal-to-zygotic transition in flowering plants, in: *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier, pp. 351–371.
- Bayer, M., Nawy, T., Giglione, C., Galli, M., Meinel, T., Lukowitz, W., 2009. Paternal control of embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 323, 1485–1488.
- Bazzini, A.A., Lee, M.T., Giraldez, A.J., 2012. Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science* 336, 233–237.
- Braude, P., Pelham, H., Flach, G., Lobatto, R., 1979. Post-transcriptional control in the early mouse embryo. *Nature* 282, 102–105.

- Breuninger, H., Rikirsch, E., Hermann, M., Ueda, M., Laux, T., 2008. Differential expression of WOX genes mediates apical-basal axis formation in the Arabidopsis embryo. *Dev. Cell* 14, 867–876.
- Bushati, N., Stark, A., Brennecke, J., Cohen, S.M., 2008. Temporal reciprocity of miRNAs and their targets during the maternal-to-zygotic transition in *Drosophila*. *Curr. Biol.* CB 18, 501–506.
- Chen, J., Strieder, N., Krohn, N.G., Cyprys, P., Sprunck, S., Engelmann, J.C., Dresselhaus, T., 2017. Zygotic genome activation occurs shortly after fertilization in maize. *Plant Cell* 29, 2106–2125.
- Clark, G.B., Sessions, A., Eastburn, D.J., Roux, S.J., 2001. Differential expression of members of the annexin multigene family in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 126, 1072–1084.
- Del Toro-De León, G., García-Aguilar, M., Gillmor, C.S., 2014. Non-equivalent contributions of maternal and paternal genomes to early plant embryogenesis. *Nature* 514, 624–627.
- Despic, V., Neugebauer, K.M., 2018. RNA tales - how embryos read and discard messages from mom. *J. Cell Sci.* 131, jcs201996.
- Edgar, L.G., Wolf, N., Wood, W.B., 1994. Early transcription in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Dev. Camb. Engl.* 120, 443–451.
- Faure, J.-E., Rotman, N., Fortuné, P., Dumas, C., 2002. Fertilization in Arabidopsis thaliana wild type: developmental stages and time course. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 30, 481–488.
- Gallego-Paez, L.M., Bordone, M.C., Leote, A.C., Saraiva-Agostinho, N., Ascensão-Ferreira, M., Barbosa-Morais, N.L., 2017. Alternative splicing: the pledge, the turn, and the prestige : The key role of alternative splicing in human biological systems. *Hum. Genet.* 136, 1015–1042.
- Guo, H., Zhu, P., Yan, L., Li, R., Hu, B., Lian, Y., Yan, J., Ren, X., Lin, S., Li, J., Jin, X., Shi, X., Liu, P., Wang, X., Wang, W., Wei, Y., Li, X., Guo, F., Wu, X., Fan, X., Yong, J., Wen, L., Xie, S.X., Tang, F., Qiao, J., 2014. The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature* 511, 606–610.
- Guo, L., Jiang, L., Zhang, Y., Lu, X.-L., Xie, Q., Weijers, D., Liu, C.-M., 2016. The anaphase-promoting complex initiates zygote division in Arabidopsis through degradation of cyclin B1. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 86, 161–174.
- Haecker, A., Groß-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M., Laux, T., 2004. Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in Arabidopsis thaliana. *Development* 131, 657–668.
- Heuer, S., Hansen, S., Bantin, J., Brettschneider, R., Kranz, E., Lörz, H., Dresselhaus, T., 2001. The Maize MADS box gene ZmMADS3 affects node number and spikelet development

- and is co-expressed with ZmMADS1 during flower development, in egg cells, and early embryogenesis. *Plant Physiol.* 127, 33–45.
- Ingouff, M., Hamamura, Y., Gourgues, M., Higashiyama, T., Berger, F., 2007. Distinct dynamics of HISTONE3 variants between the two fertilization products in plants. *Curr. Biol. CB* 17, 1032–1037.
- Ingouff, M., Rademacher, S., Holec, S., Soljić, L., Xin, N., Readshaw, A., Foo, S.H., Lahouze, B., Sprunck, S., Berger, F., 2010. Zygotic resetting of the HISTONE 3 variant repertoire participates in epigenetic reprogramming in Arabidopsis. *Curr. Biol. CB* 20, 2137–2143.
- Ishimoto, K., Sohonahra, S., Kishi-Kaboshi, M., Itoh, J.-I., Hibara, K.-I., Sato, Y., Watanabe, T., Abe, K., Miyao, A., Nosaka-Takahashi, M., Suzuki, Toshiya, Ta, N.K., Shimizu-Sato, S., Suzuki, Takamasa, Toyoda, A., Takahashi, H., Nakazono, M., Nagato, Y., Hirochika, H., Sato, Y., 2019. Specification of basal region identity after asymmetric zygotic division requires mitogen-activated protein kinase 6 in rice. *Dev. Camb. Engl.* 146, dev176305.
- Itoh, J.-I., Sato, Y., Sato, Y., Hibara, K.-I., Shimizu-Sato, S., Kobayashi, H., Takehisa, H., Sanguinet, K.A., Namiki, N., Nagamura, Y., 2016. Genome-wide analysis of spatiotemporal gene expression patterns during early embryogenesis in rice. *Dev. Camb. Engl.* 143, 1217–1227.
- Jullien, P.E., Susaki, D., Yelagi ula, R., Higashiyama, T., Berger, F., 2012. DNA methylation dynamics during sexual reproduction in Arabidopsis thaliana. *Curr. Biol. CB* 22, 1825–1830.
- Juranić, M., Dresselhaus, T., 2014. Phylogenetic analysis of the expansion of the MATH-BTB gene family in the grasses. *Plant Signal. Behav.* 9, e28242.
- Jürgens, G., 1995. Axis formation in plant embryogenesis: cues and clues. *Cell* 81, 467–470.
- Kao, P., Nodine, M.D., 2019. Transcriptional Activation of Arabidopsis Zygotes is required for initial cell divisions. *Sci. Rep.* 9, 17159.
- 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 Reprod.* 26, 267–285.
- Li, D.X., Chen, S.J., Tian, H.Q., 2021. Advances in the study of zygote activation in higher plants. *Zygote* 29, 12–19.
- Lukowitz, W., Roeder, A., Parmenter, D., Somerville, C., 2004. A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in Arabidopsis. *Cell* 116, 109–119.

- Lund, E., Liu, M., Hartley, R.S., Sheets, M.D., Dahlberg, J.E., 2009. Deadenylation of maternal mRNAs mediated by miR-427 in *Xenopus laevis* embryos. *RNA N. Y. N* 15, 2351–2363.
- Mansfield, S.G., Briarty, L.G., 1991. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Can. J. Bot.* 69, 461–476.
- Marasco, L.E., Kornblihtt, A.R., 2023. The physiology of alternative splicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 24, 242–254.
- Matzke, M.A., Mosher, R.A., 2014. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.* 15, 394–408.
- Mayer, W., Smith, A., Fundele, R., Haaf, T., 2000. Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos. *J. Cell Biol.* 148, 629–634.
- Musielak, T.J., Bayer, M., 2014. YODA signalling in the early *Arabidopsis* embryo. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 408–412.
- Nardmann, J., Zimmermann, R., Durantini, D., Kranz, E., Werr, W., 2007. WOX gene phylogeny in Poaceae: a comparative approach addressing leaf and embryo development. *Mol. Biol. Evol.* 24, 2474–2484.
- Neu, A., Eilbert, E., Asseck, L.Y., Slane, D., Henschen, A., Wang, K., Bürgel, P., Hildebrandt, M., Musielak, T.J., Kolb, M., Lukowitz, W., Grefen, C., Bayer, M., 2019. Constitutive signaling activity of a receptor-associated protein links fertilization with embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 5795–5804.
- Niedojadło, K., Pięciński, S., Smoliński, D.J., Bednarska-Kozakiewicz, E., 2012. Transcriptional activity of *Hyacinthus orientalis* L. female gametophyte cells before and after fertilization. *Planta* 236, 153–169.
- Ning, J., Peng, X.-B., Qu, L.-H., Xin, H.-P., Yan, T.-T., Sun, M., 2006. Differential gene expression in egg cells and zygotes suggests that the transcriptome is restructured before the first zygotic division in tobacco. *FEBS Lett.* 580, 1747–1752.
- Nodine, M.D., Bartel, D.P., 2012. Maternal and paternal genomes contribute equally to the transcriptome of early plant embryos. *Nature* 482, 94–97.
- Okamoto, T., 2017. Analysis of proteins enriched in rice gamete. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1669, 251–263.
- Okamoto, T., Higuchi, K., Shinkawa, T., Isobe, T., Lörz, H., Koshiba, T., Kranz, E., 2004. Identification of major proteins in maize egg cells. *Plant Cell Physiol.* 45, 1406–1412.
- Peng, L., Li, Z.K., Ding, X.L., Tian, H.Q., 2018. Advances in the study of egg activation of higher plants. *Zygote Camb. Engl.* 26, 435–442.

- Pérez-Montero, S., Carbonell, A., Morán, T., Vaquero, A., Azorín, F., 2013. The embryonic linker histone H1 variant of *Drosophila*, dBigH1, regulates zygotic genome activation. *Dev. Cell* 26, 578–590.
- Ramirez-Parra, E., Gutierrez, C., 2007. The many faces of chromatin assembly factor 1. *Trends Plant Sci.* 12, 570–576.
- Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C., Weisbeek, P., 1994. Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* 120, 2475–2487.
- Schulz, K.N., Harrison, M.M., 2019. Mechanisms regulating zygotic genome activation. *Nat. Rev. Genet.* 20, 221–234.
- Scotti, M.M., Swanson, M.S., 2016. RNA mis-splicing in disease. *Nat. Rev. Genet.* 17, 19–32.
- Shen, L., Inoue, A., He, J., Liu, Y., Lu, F., Zhang, Y., 2014. Tet3 and DNA replication mediate demethylation of both the maternal and paternal genomes in mouse zygotes. *Cell Stem Cell* 15, 459–471.
- Sprunck, S., Baumann, U., Edwards, K., Langridge, P., Dresselhaus, T., 2005. The transcript composition of egg cells changes significantly following fertilization in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant J. Cell Mol. Biol.* 41, 660–672.
- Tadros, W., Goldman, A.L., Babak, T., Menzies, F., Vardy, L., Orr-Weaver, T., Hughes, T.R., Westwood, J.T., Smibert, C.A., Lipshitz, H.D., 2007. SMAUG is a major regulator of maternal mRNA destabilization in *Drosophila* and its translation is activated by the PAN GU kinase. *Dev. Cell* 12, 143–155.
- Tadros, W., Lipshitz, H.D., 2009. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Dev. Camb. Engl.* 136, 3033–3042.
- Thomsen, S., Iers, S., Janga, S.C., Huber, W., Alonso, C.R., 2010. Genome-wide analysis of mRNA decay patterns during early *Drosophila* development. *Genome Biol.* 11, R93.
- Torre, D., Francoeur, N.J., Kalma, Y., Gross Carmel, I., Melo, B.S., Deikus, G., Allette, K., Flohr, R., Fridrikh, M., Vlachos, K., Madrid, K., Shah, H., Wang, Y.-C., Sridhar, S.H., Smith, M.L., Eliyahu, E., Azem, F., Amir, H., Mayshar, Y., Marazzi, I., Guccione, E., Schadt, E., Ben-Yosef, D., Sebra, R., 2023. Isoform-resolved transcriptome of the human preimplantation embryo. *Nat. Commun.* 14, 6902.
- Uchiumi, T., Shinkawa, T., Isobe, T., Okamoto, T., 2007. Identification of the major protein components of rice egg cells. *J. Plant Res.* 120, 575–579.
- Ueda, M., Aichinger, E., Gong, W., Groot, E., Verstraeten, I., Vu, L.D., De Smet, I., Higashiyama, T., Umeda, M., Laux, T., 2017. Transcriptional integration of paternal and maternal factors in the *Arabidopsis* zygote. *Genes Dev.* 31, 617–627.

- Ueda, M., Zhang, Z., Laux, T., 2011. Transcriptional activation of Arabidopsis axis patterning genes WOX8/9 links zygote polarity to embryo development. *Dev. Cell* 20, 264–270.
- Vastenhouw, N.L., Cao, W.X., Lipshitz, H.D., 2019. The maternal-to-zygotic transition revisited. *Development* 146, dev161471.
- Wahl, M.C., Will, C.L., Lührmann, R., 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136, 701–718.
- Wang, E.T., Si berg, R., Luo, S., Khrebtukova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S.F., Schroth, G.P., Burge, C.B., 2008. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456, 470–476.
- Wang, K., Chen, H., Miao, Y., Bayer, M., 2020. Square one: zygote polarity and early embryogenesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 53, 128–133.
- Wang, Y., Liu, J., Huang, B., Xu, Y.-M., Li, J., Huang, L.-F., Lin, J., Zhang, J., Min, Q.-H., Yang, W.-M., Wang, X.-Z., 2015. Mechanism of alternative splicing and its regulation (Review). *Biomed. Rep.* 3, 152–158.
- Wyatt, C.D.R., Pernaute, B., Gohr, A., Miret-Cuesta, M., Goyeneche, L., Rovira, Q., Salzer, M.C., Boke, E., Bogdanovic, O., Bonnal, S., Irimia, M., 2022. A developmentally programmed splicing failure contributes to DNA damage response attenuation during mammalian zygotic genome activation. *Sci. Adv.* 8, eabn4935.
- 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. *Plant Cell* 18, 805–814.
- Yartseva, V., Giraldez, A.J., 2015. The maternal-to-zygotic transition during vertebrate development: a model for reprogramming. *Curr. Top. Dev. Biol.* 113, 191–232.
- Yu, X., Zhang, X., Zhao, P., Peng, X., Chen, H., Bleckmann, A., Bazhenova, A., Shi, C., Dresselhaus, T., Sun, M.-X., 2021. Fertilized egg cells secrete endopeptidases to avoid polytubey. *Nature* 592, 433–437.
- Zhang, H., Wang, Y., Hu, Z., Wu, Y., Chen, N., Zhu, Y., Yu, Y., Fan, H., Wang, H., 2024. Zygotic splicing activation of the transcriptome is a crucial aspect of maternal-to-zygotic transition and required for the conversion from totipotency to pluripotency. *Adv. Sci.* 11, 2308496.
- Zhang, J., Yue, L., Wu, X., Liu, H., Wang, W., 2021. Function of small peptides during male-female crosstalk in plants. *Front. Plant Sci.* 12, 671196.
- Zhang, M., Wu, H., Su, J., Wang, H., Zhu, Q., Liu, Y., Xu, J., Lukowitz, W., Zhang, S., 2017. Maternal control of embryogenesis by MPK6 and its upstream MKK4/MKK5 in Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 92, 1005–1019.

- Zhao, B.S., Wang, X., Beadell, A.V., Lu, Z., Shi, H., Kuuspalu, A., Ho, R.K., He, C., 2017. m6A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature* 542, 475–478.
- Zhao, J., Xin, H., Qu, L., Ning, J., Peng, X., Yan, T., Ma, L., Li, S., Sun, M., 2011. Dynamic changes of transcript profiles after fertilization are associated with *de novo* transcription and maternal elimination in tobacco zygote, and mark the onset of the maternal-to-zygotic transition. *Plant J.* 65, 131–145.
- Zhao, P., Begcy, K., Dresselhaus, T., Sun, M.-X., 2017. Does early embryogenesis in eudicots and monocots involve the same mechanism and molecular players? *Plant Physiol.* 173, 130–142.
- Zhao, P., Shi, C., Wang, L., Sun, M., 2022. The parental contributions to early plant embryogenesis and the concept of maternal-to-zygotic transition in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 65, 102144.
- Zhao, P., Zhou, X., Shen, K., Liu, Z., Cheng, T., Liu, D., Cheng, Y., Peng, X., Sun, M.-X., 2019. Two-step maternal-to-zygotic transition with two-phase parental genome contributions. *Dev. Cell* 49, 882-893.e5.

7. Životopis

Rođena sam 8. lipnja 2002. godine u Osijeku gdje sam završila osnovnoškolsko (Osnovna škola Višnjevac) i srednjoškolsko obrazovanje (III. gimnazija Osijek). Prijediplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisujem 2021. godine. Od 2022. godine članica sam Udruge studenata biologije – BIUS, a 2023. godine postajem voditeljica Sekcije za biospeleologiju. Od 2023. godine aktivna sam članica Hrvatskog biospeleološkog društva te Speleološkog odsjeka PDS Velebit. U akademskoj godini 2023./2024. obavljala sam laboratorijsku stručnu praksu na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za nekodirajuće DNA.