

Epigenetička regulacija odgovora biljaka na stres

Grgić, Miran

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:217:897323>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Miran Grgić

**Epigenetička regulacija odgovora biljaka na
stres**

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Miran Grgić

**Epigenetic regulation in plant stress
responses**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Preddiplomski sveučilišni studij Molekularna biologija na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dunje Leļjak-Levanić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Epigenetička regulacija odgovora biljaka na stres

Miran Grgić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Biljke pomoću epigenetičkih promjena mogu u stresnim uvjetima regulirati ekspresiju gena. U toj regulaciji važnu ulogu ima RNA-usmjerena metilacija DNA kojom se utišavaju pokretni genetički elementi. Osim RNA-usmjerene DNA metilacije, u odgovoru biljaka na stres sudjeluju enzimi koji postavljaju reverzibilne kemijske modifikacije na histonske repove. Primjer takvih modifikacija su metilacija, acetilacija, fosforilacija, ubikvitinacija i sumoilacija histonskih repova. Enzimi za remodeliranje kromatina mogu pomicanjem nukleosoma duž molekule DNA utjecati na ekspresiju gena. Izlaganje stresnim uvjetima može dovesti do epigenetičkog pamćenja stresa koje ima potencijal prenijeti se u novu generaciju biljaka. Manipulacijom biljnog epigenoma mogu se stvoriti biljke otporne na različite vrste stresa kao što su toplinski stres, stres izazvan niskim temperaturama, stres izazvan sušom i biotički stres. Na ovaj način mogli bi se povećati prinosi usjeva i uzgajati biljke na do sada neiskorištenim površinama.

Ključne riječi: RdDM, histoni, sRNA, kromatin, usjevi
(35 stranica, 2 slike, 0 tablica, 140 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

Epigenetic regulation in plant stress responses

Miran Grgić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Plants can use epigenetic changes to regulate gene expression under stressful conditions. RNA-directed DNA methylation, which silences mobile genetic elements, plays an important role in this regulation. In addition to RNA-directed DNA methylation, the response of plants to stress involves enzymes that place reversible chemical modifications on histone tails. Examples of such modifications are methylation, acetylation, phosphorylation, ubiquitination and sumoylation of histone tails. Chromatin remodeling enzymes can influence gene expression by moving nucleosomes along the DNA molecule. Exposure to stressful conditions can lead to an epigenetic stress memory that has the potential to be transferred to a new generation of plants. By manipulating the plant epigenome, plants resistant to different types of stress such as heat stress, low temperature stress, drought stress and biotic stress can be created. In this way, crop yields could be increased, and plants could be grown on previously unused areas.

Keywords: RdDM, histones, sRNA, chromatin, crops
(35 pages, 2 figures, 0 tables, 140 references, original in: croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor:

Prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Mehanizmi epigenetičke regulacije	2
2.1. Kromatin-remodelirajući kompleksi	2
2.2. Posttranslacijske modifikacije histona	2
2.3. Različite histonske varijante.....	3
2.4. Male nekodirajuće molekule RNA.....	5
2.5. Metilacija molekule DNA	7
2.5.1. Funkcija metilacije molekule DNA.....	7
2.5.2. Kanonski i nekanonski putevi RNA-usmjerene metilacije DNA	9
2.5.3. Održavanje obrazaca metilacije molekule DNA	13
2.5.4. Demetilacija molekule DNA	14
3. Epigenetička regulacija u biotičkom stresu	14
3.1. Male molekule RNA	15
3.2. Metilacija molekule DNA	16
3.3. Histonske modifikacije.....	16
3.4. Kromatin-remodelirajući kompleksi	17
4. Epigenetička regulacija u abiotičkom stresu	17
4.1. Toplinski stres	17
4.1.1. Transkripcijska regulacija	18
4.1.2. Epigenetička regulacija	18
4.2. Stres uzrokovan niskim temperaturama	19
4.2.1. Transkripcijska regulacija	19
4.2.2. Epigenetička regulacija	20
4.3. Stres uzrokovan nedostatkom vode.....	21
4.3.1. Transkripcijska regulacija	21
4.3.2. Epigenetička regulacija	21
4.4. Stanični odgovor na apscizinsku kiselinu.....	23
5. Strategija i perspektive u zaštiti biljaka u stresnom okolišu	24
6. Zaključak	26
7. Literatura	26
8. Životopis	35

Kratice

A – adenin

ac – acetilacija

ATP – adenozin trifosfat

C – citozin

CRC – kromatin-remodelirajući kompleks

easiRNA – epigenetički aktivirana siRNA

epiRIL – epigenetski rekombinante linije biljaka (engl. *epigenetic recombinant inbred lines*)

ETI – efektorima-uzrokovana imunost (engl. *effector-triggered immunity*)

G – gvanin

hetsiRNA – heterokromatična siRNA

hp-siRNA – siRNA podrijetlom iz ukosnica (engl. *hairpin-derived siRNA*)

JA – jasmonska kiselina

me – metilacija

MET1 – DNA METHYLTRANSFERASE1

miRNA – mikro RNA

natsiRNA – prirodna antisense siRNA (engl. *natural antisense siRNA*)

NLR – nukleotid vezujući proteini s leucinskim ponavljanjima (engl. *nucleotide binding leucine-rich repeat*)

nt – nukleotid

PAMP – molekularni obrasci na površini patogena (engl. *pathogen-associated molecular patterns*)

pb – parovi baza

phasiRNA – fazne siRNA (engl. *phased siRNA*)

PigmR – Pigm Resistant

PigmS – Pigm Susceptible

Pol – DNA-ovisna RNA polimeraza

PRR – receptori za prepoznavanje antigena patogena (engl. *pattern recognition receptors*)

PTGS – posttranskripcijsko utišavanje ekspresije gena

PTI – PAMP-om uzrokovana imunost (engl. *PAMP-triggered immunity*)

RdDM – RNA-usmjerena metilacija DNA (engl. *RNA-directed DNA methylation*)

RDR – RNA-ovisna RNA polimeraza

RNS – reaktivni dušikovi oblici

ROS – reaktivni kisikovi oblici

sRNA – male nekodirajuće RNA

SA – salicilna kiselina

siRNA – male interferirajuće RNA

T – timin

tasiRNA – trans-djelujuće siRNA (engl. *trans-acting siRNA*)

1. Uvod

Biljke su višestanični organizmi koji nemaju sposobnost kretanja. Promjenjivi i često ekstremni okolišni uvjeti uzrok su stresa te predstavljaju izazov za preživljavanje biljaka. Stres se kod biljaka definira kao stanje koje negativno utječe na metabolizam, rast i razvoj biljke (Lichtenthaler, 1998). Stresni čimbenici neposredni su uzroci stresa (Lichtenthaler, 1998). Ako je stresni čimbenik dio nežive prirode, nastali stres naziva se abiotičkim stresom. Primjeri abiotičkog stresa su toplinski stres, stres uzrokovan hladnoćom i smrzavanjem, svjetlosni stres, stres uzrokovan nedostatkom vode ili visokim osmotskim potencijalom tla, stres uzrokovan teškim metalima i drugim štetnim spojevima te stres uzrokovan manjkom kisika u rizosferi (Cramer i sur. 2011). Biotički stres nastaje kao posljedica interakcije biljaka s virusima, mikroorganizmima, gljivicama, oblicima i kukcima (Iqbal i sur. 2021). Posljedica djelovanja abiotičkih i biotičkih stresnih čimbenika na biljku je pojačano stvaranje ROS-ova i RNS-ova koji djeluju kao signalne molekule u indukciji staničnog odgovora na stres (Mandal i sur. 2022). Pri visokim koncentracijama ROS-ovi i RNS-ovi nadjačavaju enzimski i neenzimski antioksidacijski sustav stanice, neselektivno oštećuju biološke molekule te stanicu dovode u stanje oksidacijskog stresa (Mandal i sur. 2022). Biljke su najčešće pod istovremenim utjecajem nekoliko različitih vrsta stresa poput nedostatka vode, toplinskog i oksidacijskog stresa. Da bi se učinkovito zaštitile od stresa, biljne stanice posjeduju regulatorne sustave koji djeluju na razini epigenetičkih promjena i transkripcije, posttranskripcijskih promjena, translacije te posttranslacijskih promjena (Chung i sur. 2022).

Epigenetičke promjene obuhvaćaju sve promjene u strukturi kromatina koje rezultiraju pojačanom ili smanjenom ekspresijom gena bez promjene u sekvenci molekule DNA. Osnovna gradivna jedinica kromatina su nukleosomi. Nukleosomi se sastoje od molekule DNA duljine oko 146 pb koja se 1,67 puta omata oko oktamera proteina histona (H2A, H2B, H3, H4) od kojih svaki dolazi u dvije kopije (Kornberg, 1974; Rosa i Shaw, 2013; Over i Michaels, 2014). Između dvaju nukleosoma nalazi se oko 30 pb dugačak dio molekule DNA (engl. *linker DNA*) (Chodavarapu i sur. 2010). Gustoća pakiranja nukleosoma u kromatinu utječe na mogućnost vezanja transkripcijskih faktora i bazalnoga transkripcijskog aparata za specifične sekvence molekule DNA (Li i sur. 2007). Na gustoću pakiranja kromatina utječe i prisutnost histona H1 koji dodatno stabilizira nukleosome, štiti dio molekule DNA između dvaju nukleosoma i ključan je za nastajanje 30 nm širokog kromatinskog vlakna (Wu i sur. 2007; Brockers i Schneider, 2019). Kromatin se može podijeliti na rijetko pakirani, transkripcijski aktivni eukromatin i na gusto pakirani, transkripcijski neaktivni heterokromatin.

Epigenetičke promjene temelje se na aktivnosti enzima koji remodeliraju kromatin, na mogućnosti zamjene jedne histonske varijante drugom, kemijskim modifikacijama na molekuli DNA (metilacija) ili na

repovima histona (metilacija, acetilacija, fosforilacija, ubikvitinacija, sumoilacija) (Luo i sur. 2017; Chung i sur. 2022). U ovom radu predstavljeni su osnovni mehanizmi odvijanja epigenetičkih promjena u genomu biljaka nakon izlaganja stresu. Prikazana je epigenetička regulacija ekspresije gena u odgovoru na biotički stres, toplinski stres, stres izazvan niskim temperaturama i stres izazvan sušom. U posljednjoj cjelini rada navedeni su primjeri upotrebe epigenetičke regulacije ekspresije gena u zaštiti usjeva.

2. Mehanizmi epigenetičke regulacije

2.1. Kromatin-remodelirajući kompleksi

Kompleksi CRC koriste energiju oslobođenu hidrolizom molekule ATP-a za promjenu sastava, pomicanje ili izbacivanje nukleosoma s molekule DNA čime utječu na ekspresiju gena (Han i sur. 2015). Četiri su glavne potporodice CRC-ova kod biljaka; SWI/SNF, ISWI, CHD i INO80 (Chung i sur. 2022). Svaka navedena potporodica posjeduje ATP-aznu/helikaznu podjedinicu SWI2/SNF2 (Bhadouriya i sur. 2021). Kompleksi CRC zajedno s enzimima koji posttranslacijski modificiraju histone reguliraju ekspresiju gena u odgovoru na biotički i abiotički stres (Bhadouriya i sur. 2021).

2.2. Posttranslacijske modifikacije histona

N-krajevi histona mogu biti mono-, di- i trimetilirani na lizinskim bočnim ograncima te mono- ili dimetilirani na argininskim bočnim ograncima (Liu i sur. 2010). U metilaciji histonskih repova sudjeluju histonske metiltransferaze koje koriste S-adenozilmetionin kao donora metilne skupine (Pontvianne i sur. 2010). Histonske demetilaze uklanjaju metilne skupine s metiliranih repova histona. Metilacije histona H3 kao što su H3K9me1, H3K9me3 i H3K27me1 uglavnom su svojstvene utišanim transpozonomima u heterokromatinskom području kromosoma (Chung i sur. 2022). Histonska modifikacija H3K27me3 djeluje represivno na transkripciju u eukromatinskom području kromosoma (Bobadilla i Berr, 2016; Chung i sur. 2022). Histonske modifikacije H3R2me2 i H4R3me2 nalaze se u antikorelaciji s položajem histonske modifikacije H3K4me3 te djeluju represivno na transkripciju (Bobadilla i Berr, 2016). U blizini aktivno eksprimiranih gena u eukromatinskom području kromosoma nalaze se histonske modifikacije H3K4me3, H3K36me2 i H3K36me3 (Chung i sur. 2022). Promjene u metilaciji histona važan su epigenetički regulatorni čimbenik u odgovoru biljaka na abiotički i biotički stres (Bobadilla i Berr, 2016)

Meta acetilacije histona su specifični lizinski bočni ogranci na N-kraju histona H3 (K4, K9, K14, K18, K23, K27) i H4 (K5, K8, K12, K16, K20) (Liu i sur. 2016). Acetilacija histona u pravilu povećava gensku ekspresiju potičući dekonenzaciju kromatina (Luo i sur. 2017). U reverzibilnom procesu acetilacije histonskih repova sudjeluju histonske acetilaze koje kataliziraju prijenos acetilne skupine s molekule acetil-koenzima A na N-krajeve histona. Histonske deacetilaze uklanjaju acetilne skupine s histona (Luo i sur. 2017). Slično kao i metilacija, acetilacija histona sudjeluje u regulaciji ekspresije transkripcijskih faktora u odgovoru biljke na biotički i abiotički stres (Hu i sur. 2019).

Proteinske kinaze najčešće fosforiliraju serinske, treoninske i tirozinske bočne ogranke histona H3 i H2A. Fosforilacija histona H3 ima ulogu u kondenzaciji kromosoma, poticanju ekspresije gena, popravku oštećenja molekule DNA (Chung i sur. 2022) i odgovoru na stres izazvan povišenim salinitetom, niskom temperaturom ili tretmanom ABA-om (Wang i sur. 2015). Fosforilacija histonske varijante H2A.X ima ulogu u signalizaciji oštećenja molekule DNA (Lei i Berger, 2020).

Monoubikvinitirani histoni nastaju vezanjem C-kraja proteina ubikvitina za bočni ogranak lizina (Feng i Shen, 2014). Za ubikvitinaciju proteina potrebne su tri skupine enzima; E1-aktivirajući enzim, E2-konjugirajući enzim i E3-ligazni enzim (Feng i Shen, 2014). Monoubikvitinacija histona H2A povezuje se s transkripcijskom represijom pod kontrolom kompleksa PRC1. Proteinski kompleks PRC2 sudjeluje u postavljanju represivne kromatinske modifikacije H3K27me3 koja potiče aktivnost kompleksa PRC1 i monoubikvitinaciju histona H2A (Zhou i sur. 2017). Monoubikvitinacija histona H2B povezuje se s transkripcijski aktivnim lokusima (Chung i sur. 2022).

Vežanje proteina SUMO za lizinske bočne ogranke histona naziva se sumoilacija i taj proces kataliziraju enzimi iz skupine E1, E2 i E3. Sumoilacija uzrokuje promijenjenu ekspresiju gena u odgovoru biljaka na biotički stres, toplinski stres te stres izazvan nedostatkom vode, niskom temperaturom i nedostatkom fosfata (Park i sur. 2011).

2.3. Različite histonske varijante

Kanonski histoni H2A, H2B i H3 koji su dio nukleosomskoga histonskog oktamera i histon H1 koji ga dodatno stabilizira mogu imati varijacije u svojoj primarnoj strukturi. Takvi „podtipovi“ pojedinih histona nazivaju se histonskim varijantama. Histon H4 jedini je histon koji ne posjeduje histonske varijante (Henikoff i Smith, 2015). Histoni H2A, H2B, H3 i H4 eksprimirani su u S-fazi staničnog ciklusa i vežu se na molekulu DNA nakon njezine replikacije. Histonske varijante eksprimirane su tijekom cijeloga staničnog ciklusa te mogu zamijeniti osnovne histone u nukleosomu (Jiang i Berger, 2017). Različite histonske

varijante imaju različit utjecaj na regulaciju genske ekspresije. Najznačajnije histonske varijante kod biljaka su H2A.X, H2A.Z, H2A.W, H3.3, CenH3, H1.1, H1.2 i H1.3 (Jiang i Berger, 2017).

Sekvence eksprimiranih biljnih gena sadrže kanonski histon H2A i histonsku varijantu H2A.X (Lei i Berger, 2020). Histonska varijanta H2A.X ima ulogu u signalizaciji oštećenja molekule DNA koje može nastati zbog svjetlosnog ili oksidacijskog stresa (Nisa i sur. 2019). Proteinske kinaze ATM i ATR sudjeluju u fosforilaciji histona H2A.X na serinskim bočnim ograncima što predstavlja signal da se na tom mjestu dogodilo oštećenje molekule DNA (Lei i Berger, 2020). U istraživanjima na stanicama sisavaca pokazano je da histonski šaperon FACT sudjeluje u postavljanju histonskog dimera H2A.Z-H2B u nukleosoma, no taj pronalazak još nije potvrđen kod biljaka (Piquet i sur. 2018; Lei i Berger, 2020). U prilog ovoj tvrdnji ide otkriće da taj histonski šaperon ima ulogu odgovoru na svjetlosni stres jer potiče akumulaciju antocijana (Pfab i sur. 2018).

Histonska varijanta H2A.Z pretežito se nalazi na mjestima početka transkripcije transkripcijski aktivnih gena i duž tijela transkripcijski reprimiranih gena u eukromatinskim regijama molekule DNA (Sura i sur. 2017; Lei i Berger, 2020). U slučaju da je H2A.Z dio prvog nukleosoma nakon mjesta početka transkripcije (položaj +1), tada ima ulogu u poticanju transkripcije jer sprječava zastajkivanje Pol II (Sura i sur. 2017). ATP-ovisni CRC SWR1 sudjeluje u zamjeni dimera H2A-H2B za dimer H2A.Z-H2B u nukleosomima (Jiang i Berger, 2017). U obrnutom procesu zamjene dimera H2A.Z-H2B za dimer H2A-H2B sudjeluju ATP-ovisni CRC-ovi iz potporodice INO80 (Han i sur. 2015). Histon H2A.Z ima ulogu u odgovoru biljaka na osmotski stres, a u uvjetima nedostatka vode uklanja se s induciranih gena (Sura i sur. 2017). U uvjetima toplinskog stresa transkripcijski faktor HSF1 sudjeluje u uklanjanju histona H2A.Z s gena koji se induciraju pri temperaturi od 27 °C (Cortijo i sur. 2017)

Histonska varijanta H2A.W potiče kondenzaciju kromatina i sudjeluje u utišavanju transpozona u području pericentromernog heterokromatina (Yelagandula i sur. 2014). Premda je prisutna kolokalizacija H2A.W s područjima molekule DNA koja sadrže histonsku modifikaciju H3K9me2 i metilaciju baze C, mehanizam odlaganja histona H2A.W u nukleosoma neovisan je o njima (Yelagandula i sur. 2014).

Kanonski histon H3 još se naziva histonskom varijantom H3.1 i dominantno se nalazi na području pericentromernog kromatina gdje sudjeluje u utišavanju ekspresije transpozona (Mito i sur. 2005). Histon H3 može se nalaziti i u eukromatinskim područjima kromosoma (Jiang i Berger, 2017).

Histonska varijanta H3.3 pretežito se nalazi u sastavu nukleosoma aktivno transkribiranih gena u eukromatinskom području. Telomerna područja također sadrže histon H3.3 (Jiang i Berger, 2017). Mjesta terminacije transkripcije sadrže najveću koncentraciju histona H3.3 što korelira s povećanom ekspresijom tih gena (Jiang i Berher, 2017; Wollman i sur. 2017). Geni koji sadrže histone H3.3 samo u promotorskim

područjima slabije su eksprimirani i podliježu snažnoj regulaciji njihove ekspresije (Jiang i Berger, 2017). Histonski šaperon HIRA sudjeluje u odlaganju histona H3.3 u nukleosome (Nie i sur. 2014). Prisutnost histona H2A.Z u genima antikorelira s prisutnosti histona H3.3 (Nie i sur. 2014; Jiang i Berger, 2017).

Histonska varijanta CenH3 nalazi se u nukleosomima centromernog područja kromosoma te ima ključnu ulogu u nastajanju kinetohornog kompleksa tijekom stanične diobe (Keçeli i sur. 2020).

Histonske varijante H1.1 i H1.2 konstitutivno su eksprimirane u svim stanicama te čvrsto vežu dio molekule DNA između nukleosoma ne dopuštajući metiltransferazama da pristupe molekuli DNA (Jiang i Berger, 2017).

Histonska varijanta H1.3 u normalnim je uvjetima eksprimirana samo u stanicama zapornicama gdje je zadužena za pravilno otvaranje puči (Rutowicz i sur. 2015). Ekspresija histonske varijante H1.3 inducira se u uvjetima nedostatka vode ili nakon tretmana ABA-om i nije više ograničena samo na stanice zapornice (Jiang i Berger, 2017). Smatra se da histon H1.3 uzrokuje hipermetiliranost molekule DNA jer za razliku od histonskih varijanti H1.1 i H1.2 omogućava metiltransferazama pristup sekvencama koje trebaju biti metilirane (Rutowicz i sur. 2015; Jiang i Berger, 2017).

2.4. Male nekodirajuće molekule RNA

Molekule sRNA sudjeluju u procesima RdDM-a i PTGS-a (Borges i Martienssen, 2015; Huang i Jin, 2022). Prema postanku i strukturi sRNA dijele se na molekule miRNA koje su najčešće duge 21 – 22 nt (Axtell i Meyers, 2018) i na molekule siRNA koje su najčešće duge 21 – 24 nt (Borges i Martienssen, 2015). Molekule siRNA se prema postanku i funkciji dijele na hetsiRNA, hp-siRNA, natsiRNA i na sekundarne siRNA.

Molekule miRNA nastaju iz transkripata miRNA-kodirajućih gena pomoću Pol II. Transkripti formiraju strukturu kratke ukosnice koje završavaju petljom i nazivaju se primarnim miRNA molekulama (Wang i sur. 2019). Ukosnice s petljom cijepa ribonukleaza DCL1 te nastaje prekursorska miRNA. Enzim DCL1 ponovno cijepa prekursorsku miRNA pri čemu nastaju dvolančane molekule miRNA duljine 21 – 22 nt (Wei i sur. 2021). Molekule miRNA modificiraju se na svojim 3' krajevima. Metilaza HEN1 metilira hidroksilnu skupinu na 2' ugljikovu atomu terminalnih 3' ribeza što stabilizira molekule miRNA i štiti ih od poliuridilacije (Borges i Martienssen, 2015). Metilirane molekule miRNA zatim ulaze u kompleks s proteinom AGO1. Pritom nastaje kompleks RISC koji sudjeluje u PTGS-u. Molekula sRNA u kompleksu RISC prepoznaje ciljnu molekulu mRNA, a protein AGO1 ju zatim cijepa (Guo i sur. 2016). Kompleks RISC također sudjeluje u inhibiciji translacije bez cijepanja molekule mRNA (Iwakawa i Tomari, 2013).

Nemetilirane molekule miRNA monouridiliraju se djelovanjem uridilil-transferaze URT1 ili se poliuridiliraju djelovanjem enzima HESO1 (Borges i Martienssen, 2015). Poliuridilirane molekule miRNA razgrađuju nukleaze koje prepoznaju poliuridinski rep (Borges i Martienssen, 2015). Neke monouridilirane miRNA duge 22 nt ulaze u kompleks s proteinom AGO1 te sudjeluju u PTGS-u i stvaranju molekula sekundarnih siRNA koje sudjeluju u nekanonskim putevima RdDM-a, opisanom u poglavlju 2.5.2. (Borges i Martienssen, 2015).

Molekule hp-siRNA potječu iz transkripata Pol II koji formiraju duge ukosnice koje zatim procesiraju proteini DCL1-4. Smatra se da su hp-siRNA evolucijska preteča miRNA koja također sudjeluje u PTGS-u (Borges i Martienssen, 2015).

Molekule natsiRNA duge 21 – 24 nt nastaju hibridizacijom transkripata različitih lanaca istog lokusa molekule DNA (tzv. *cis*-natsiRNA) ili hibridizacijom transkripata visokog stupnja homologije koji potječu s različitih lokusa molekule DNA (tzv. *trans*-natsiRNA) (Moldovan i sur. 2010; Borges i Martienssen, 2015). Smatra se da natsiRNA nastaju transkripcijom pomoću Pol II i/ili Pol IV. Na djelomično hibridizirane transkripte vežu se polimeraze RDR2/4 koje sudjeluju u sintezi dugačke dvolančane molekule RNA koju zatim cijepaju proteini DCL1-3 (Ivanova i sur. 2022). Molekule natsiRNA sudjeluju u regulaciji biosinteze stanične stijenke, regulaciji ekspresije katalaze te u odgovoru biljke na povišeni salinitet i bakterijske infekcije putem PTGS-a (Moldovan i sur. 2010).

Molekule sekundarnih siRNA mogu se podijeliti na molekule tasiRNA, phasiRNA i easiRNA. Biosinteza phasiRNA započinje transkripcijom pomoću Pol II s lokusa *PHAS* koji sadrže transpozone, protein-kodirajuće i protein-nekodirajuće sekvence (Borges i Martienssen, 2015). Nastali transkript prepoznaje kompleks RISC koji se sastoji od molekule miRNA i proteina AGO1 te dolazi do odcjepljivanja 5' kraja transkripta (Borges i Martienssen, 2015; Liu i sur. 2020). Protein SGS3 štiti pocijepani transkript od razgradnje egz nukleazama (Deng i sur. 2018). Polimeraza RDR6 prepoznaje protein AGO1 te se veže na 3' kraj transkripta i sintetizira drugi lanac molekule RNA. Ribonukleaza DCL4 pomoću proteina DRB iterativno cijepa dvolančani RNA prekursor čime nastaju sekundarne siRNA duljine 21 nt (Liu i sur. 2020). U biosintezi phasiRNA može sudjelovati i enzim DCL2 te u tom slučaju nastaju phasiRNA duljine 22 nt (Borges i Martienssen, 2015; Liu i sur. 2020). Molekule phasiRNA podrijetlom iz lokusa koji sadrže gene koji kodiraju proteine NLR, proteine s pentatrikoptidnim ponavljanjima te transkripcijske faktore iz porodica MYB, NAC i ARF sudjeluju u regulaciji ekspresije tih proteina. Iz navedenoga slijedi da phasiRNA djeluju kao negativni regulatori u širokom spektru razvojnih procesa, kao i u odgovoru biljaka na mehaničke ozljede, biotički stres i stres izazvan manjkom vode (Liu i sur. 2020).

Molekule tasiRNA mogu se smatrati podvrstom phasiRNA koje se prepisuju s lokusa *TASI-4* koji sadrže nekodirajuće sekvence. Molekule tasiRNA, za razliku od phasiRNA, djeluju *in-trans*, odnosno sudjeluju u razgradnji transkripata prepisanih s drugih lokusa (Deng i sur. 2018). Biosinteza tasiRNA koje potječu s lokusa *TASI,2,4* ne razlikuje se od biosinteze phasiRNA. Biosinteza tasiRNA koja potječe s lokusa *TAS3* zahtijeva vezanje dvaju kompleksa RISC koji sadrže protein AGO7 na 5' i 3' kraj transkripta. Pritom se cijepanje događa samo na 3' kraju transkripta (Deng i sur. 2018). Biljke izložene toplinskom stresu imaju smanjenu količinu *TASI* tasiRNA što uzrokuje povećanu akumulaciju transkripata gena *HTT1* i *HTT2* koji su zaslužni za termotoleranciju (Li i sur. 2014). Molekule tasiRNA podrijetlom s lokusa *TAS3* sudjeluju u regulaciji ekspresije transkripcijskih faktora iz porodice ARF (Deng i sur. 2018).

Molekule easiRNA duge 21 nt nastaju ekspresijom epigenetički aktiviranih transpozona u vegetativnoj jezgri peludnog zrna, u dediferenciranom kalusnom staničju te u mutantima sa smanjenom ekspresijom gena *DDMI* i *MET1* (Creasey i sur. 2014). Biosinteza easiRNA slična je biosintezi drugih sekundarnih RNA te uključuje biosintetski put Pol II–AGO1–RDR6–DCL4. Smatra se da je biosintetski put easiRNA, koje utišavaju transpozone putem PTGS-a, kompetitivan s kanonskim RdDM-om da bi se izbjegla metilacija DNA u zametnim stanicama (Creasey i sur. 2014)

Molekule hetsiRNA sudjeluju u procesu kanonskog RdDM-a te je njihova biosinteza i funkcija opisana u cjelini 2.5.2.

2.5. Metilacija molekule DNA

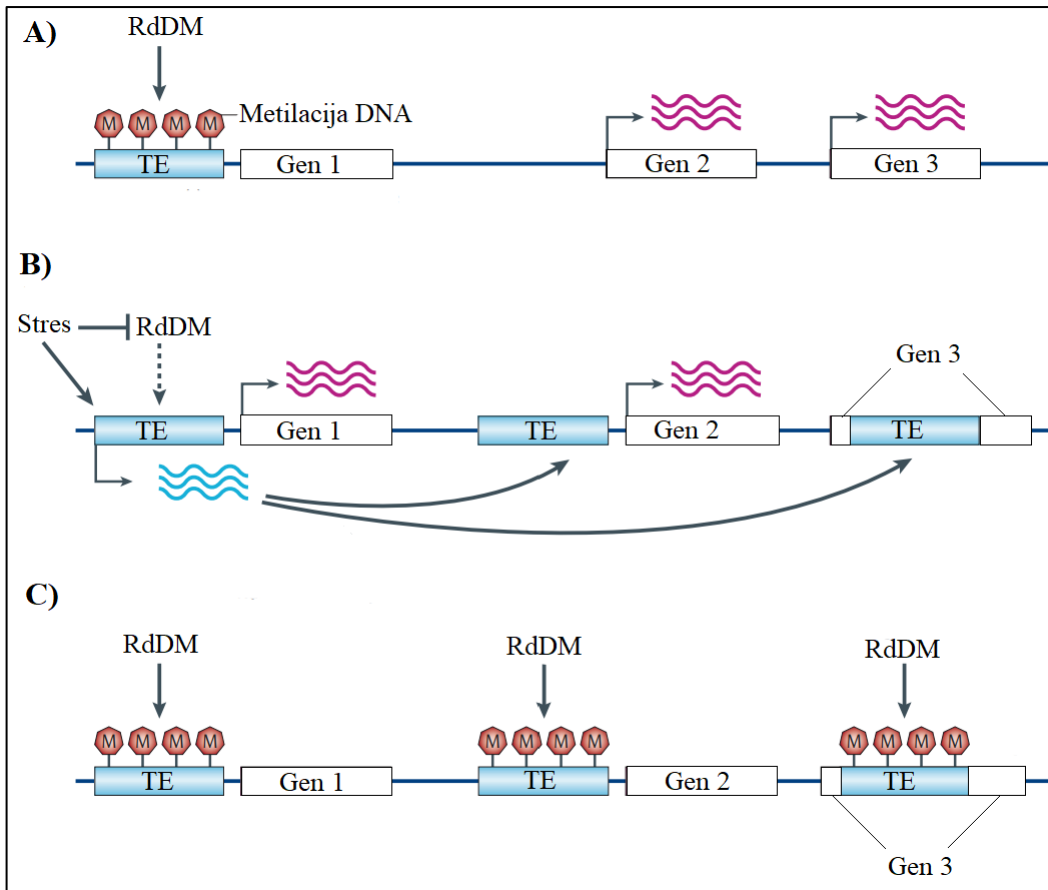
2.5.1. Funkcija metilacije molekule DNA

Učinak metilacije molekule DNA ovisi o poziciji i funkciji metilirane sekvence. Metilacijom genskih promotora uglavnom se utišava ekspresija gena koji se nalazi pod kontrolom toga promotora (Zhang i sur. 2018), no postoje iznimke poput promotora gena *ROS1* koji kodira DNA demetilazu ROS1 (Lei i sur. 2015; Williams i sur. 2015). Najčešće je zbog metilacije onemogućeno vezanje transkripcijskih aktivatora, a pospješeno je vezanje represora transkripcije (Kumar i Mohapatra 2021) te se na taj način utišava ekspresija gena. Također, metilacija promotorskih regija može utjecati na stvaranje posttranslacijskih modifikacija repova histona koje inhibiraju transkripciju (Zhang i sur. 2018). Metilacija intragenskih sekvenci svojstvena je konstitutivno eksprimiranim genima te se uglavnom odvija unutar egzona na dinukleotidima CG udaljenim od početka i završetka transkripcije (Bewick i Schmitz 2017). Histonska varijanta H3.3 regulira metilaciju intragenskih sekvenci na način da smanjuje vezanje histona H1 za nukleosome što olakšava metiltransferazama da pristupe molekuli DNA i metiliraju je (Wollmann i sur.

2017; Zhang i sur. 2018). Smatra se da je glavna uloga metilacije intragenskih sekvenci smanjivanje razlika u ekspresiji gena jer sprječava vezanje histonske varijante H2A.Z koja utječe na ekspresiju gena u ovisnosti o razvojnem stadiju biljke i okolišnim signalima (Zilberman i sur. 2008; Zhang i sur. 2018). Metilacija introna može utjecati na alternativno procesiranje transkripata mRNA (Zhang i sur. 2018).

Važna funkcija metilacije molekule DNA je utišavanje transpozona. Transpozoni su genetički elementi koji se mogu izrezati s jednog mjesta u genomu i premjestiti na drugo mjesto u genomu (tzv. DNA transpozoni) ili se kopirati i premjestiti na drugo mjesto u genomu bez izrezivanja (tzv. RNA transpozoni) (Hsu i sur. 2021). Svojim kretanjem po genomu transpozoni izazivaju mutacije koje pridonose nestabilnosti genoma (Colonna Romano i Fanti, 2022). Transpozoni mogu pozitivno utjecati na ekspresiju nizvodnih gena djelujući kao kriptički promotori ili *cis*-regulatorna mjesta za vezanje transkripcijskih faktora. Metilacijom transpozona smanjuje se ekspresija nizvodnih gena (Hirsch i Springer, 2017). RdDM zajedno s kromatin-remodelirajućim proteinom DDM1 sudjeluje u utišavanju transpozona (Matzke i Mosher, 2014; Zhang i sur. 2018). U stanju stresa se zbog inaktivacije mehanizma RdDM aktiviraju transpozoni što dovodi do promjene u ekspresijskim obrascima gena te do moguće aktivacije ekspresije gena koji sudjeluju u odgovoru na stres (slika 1) (Matzke i Mosher, 2014).

Metilacija DNA u pericentromernim regijama kromosoma ima ulogu u kromosomskim interakcijama (Zhang i sur. 2018).



Slika 1. Aktivacija transpozona (TE) pod djelovanjem stresa. **A)** RNA-usmjerena metilacija DNA (RdDM) utišava transpozone u normalnim uvjetima rasta. Gen 1 nalazi se pod transkripcijskom kontrolom utišanog transpozona. Geni 2 i 3 su eksprimirani. **B)** U stanju stresa inhibira se RdDM mehanizam što dovodi do aktivacije transpozona i ekspresije gena 1. Transposon se premješta po genomu i ugrađuje ispred gena 2 što potiče njegovu ekspresiju. Ugradnjom transpozona u gen 3 prekida se njegova ekspresija. **C)** Povratkom u normalne uvjete, RdDM ponovno utišava transpozone metilacijom što dovodi do prekida ekspresije gena 1 i 2. (Prilagođeno prema Matzke i Mosher, 2014)

2.5.2. Kanonski i nekanonski putevi RNA-usmjerene metilacije DNA

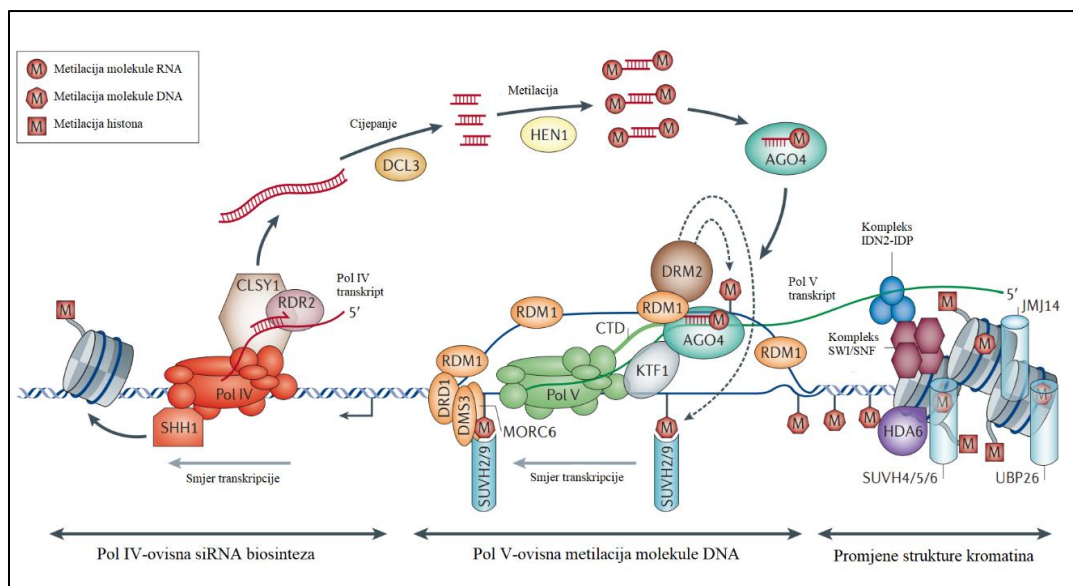
Metilacija molekule DNA *de novo* kod biljaka se odvija na prethodno nemetiliranom petom ugljikovom atomu C u sekvencama CG, CHG i CHH (H označava dušičnu bazu A, T ili C) (He i sur. 2011; Zhang i sur. 2018; Chung i sur. 2022). RdDM predstavlja glavni mehanizam *de novo* metilacije novih lokusa molekule DNA kod biljaka (Erdmann i Picard, 2020). Druga važna uloga RdDM-a je održavanje

metilacijskih obrazaca na lokusima s prethodno metiliranim dušičnim bazama C (Erdmann i Picard, 2020). Ovisno o funkciji i mehanizmu odvijanja, proces RdDM-a može se odvijati kanonskim ili nekanonskim putem. Kanonski RdDM sudjeluje u održavanju metilacijskih obrazaca, a različiti nekanonski mehanizmi RdDM-a sudjeluju u metilaciji molekule DNA *de novo* (Erdmann i Picard, 2020).

Kanonski put RdDM-a (slika 2) započinje transkripcijom ponavljajućih i transpozonskih sekvenci s heterokromatinskih lokusa molekule DNA pomoću Pol IV (Matzke i Mosher, 2014). Pol IV nalazi se u interakciji s proteinom SHH1 koji prepoznaje H3K9me2 i H3K9me0 (Law i sur. 2013; Zhang i sur. 2013). Proteini CLSY1-4 djeluju kao tkivno-specifični i ATP-ovisni kromatin-remodelirajući proteini koji sudjeluju u prepoznavanju represivnih kromatinskih modifikacija (Zhang i sur. 2018; Erdmann i Picard, 2020). Protein CLSY1 ili CLSY2 posreduje u interakciji između Pol IV i proteina SHH1 te sudjeluje u prepoznavanju H3K9me2 na krakovima kromosoma. Protein CLSY3 ili CLSY 4 ulazi u interakciju samo s Pol IV i prepoznaje 5-meC u dinukleotidima CG pericentromernog područja kromosoma (Erdmann i Picard, 2020; Zhou i sur. 2022). Iz navedenoga slijedi da kanonski RdDM ima ulogu u održavanju već postojećih metilacijskih oznaka. Transkripcijom pomoću Pol IV nastaju jednolančani RNA transkripti duljine između 30 i 45 nt (Erdmann i Picard, 2020). U interakciji s Pol IV nalazi se polimeraza RDR2 koja sintetizira drugi lanac nastalog transkripta RNA u 5' → 3' smjeru služeći se postojećim lancem kao kalupom (Singh i sur. 2019). RDR2 na 3' kraj novosintetiziranog lanca RNA nasumično dodaje jedan nukleotid (Singh i sur. 2019). Svaki lanac nastale dvolančane molekule RNA cijepa ribonukleaza DCL3 tako da na 3' kraju lanca koji je sintetizirala Pol IV ostanu dva stršeca nukleotida u odnosu na 5' kraj lanca koji je sintetizirala RDR2. Nakon cijepanja pomoću proteina DCL3, lanac koji je sintetizirala Pol IV dug je 24 nt, a lanac koji je sintetizirala RDR2 dug je 23 nt (Singh i sur. 2019). Metilaza HEN1 metilira hidroksilnu skupinu na 2' ugljikovu atomu terminalnih 3' riboza čime se stabilizira dvolančani prekursor hetsiRNA (Ji i Chen, 2012). Protein AGO4 i/ili protein AGO6 vežu 24 nt dugačak lanac hetsiRNA i odvođe ga do mjesta aktivne transkripcije koju vrši Pol V (Zhang i sur. 2018). U germinativnim stanicama tu funkciju vrši protein AGO9 (Erdmann i Picard, 2020).

Pol V preferentno se veže na eukromatinska područja genoma koja sadrže transpozone u intergenskim područjima, promotorima ili tijelu gena. Transkripcijom pomoću Pol V nastaje duga nekodirajuća molekula RNA bez poliadenilacije na svojem 3' kraju, koja djeluje kao strukturna okosnica za vezanje siRNA u kompleksu s proteinima AGO (Wierzbicki i sur. 2008). U vezanju Pol V na molekulu DNA posreduju histonske metiltransferaze SUVH2/9 koje prepoznaju metilacijske oznake na molekuli DNA (Matzke i Mosher, 2014). Kompleks DDR koji se sastoji od kromatin-remodelirajućeg proteina DRD1, proteina DMS3 iz porodice SMC te proteina RDM1 interagira s Pol V i proteinima SUVH2/9 te na taj način posreduje u pozicioniranju Pol V (Wongpalee i sur. 2019). Proteini RDM1, DMS3 i ATP-aza

MORC6 sudjeluju u razmatanju i stabilizaciji razmotane uzvojnice molekule DNA kako bi Pol V mogla vršiti transkripciju (Matzke i Mosher, 2014). Protein AGO4 pozicionira se uz Pol V pomoću interakcija s C-terminalnom domenom najveće podjedinice Pol V (Matzke i Mosher, 2014) i interakcija s elongacijskim faktorom KTF1 (He i sur. 2009). Protein RDM1 zajedno s kompleksom siRNA-AGO4 (Matzke i Mosher, 2014) sudjeluje u pozicioniranju DNA-metiltransferaze DRM2 koja preferentno metilira dvolančanu molekulu DNA (Zhong i sur. 2014). Pol V također posreduje u procesima remodeliranja kromatina. Na dugi nekodirajući transkript Pol V veže se proteinski kompleks IDN2-IDP . Taj kompleks zatim dolazi u interakciju s CRC-om iz potporodice SWI/SNF koji je zaslužan za transkripcijsko utišavanje transpozona (Zhang i sur. 2018). Proteini koji sudjeluju u postavljanju represivnih modifikacija na histone također djeluju u sklopu RdDM-a. Primjer takvih proteina su histonska deacetilaza HDA6, metilaze SUVH4-6, demetilaza JMJ14 i proteaza UBP26 koja deubikvitilira histone H2B (Matzke i Mosher, 2014).



Slika 2. Kanonski mehanizam RNA-usmjerene DNA metilacije. Transkripcijom pomoću Pol IV nastaju molekule heterokromatičnih malih interferirajućih molekula RNA koje se u kompleksu s proteinom AGO4 vežu na dugi nekodirajući transkript koji nastaje transkripcijom pomoću Pol V. Ova interakcija usmjerava metilacijske enzime i enzime koji modificiraju strukturu kromatina prema molekuli DNA. Oznake: SHH1 (SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOGUE 1); Pol IV (RNA polimeraza IV), CLSY1 (CLASSY 1); RDR2 (RNA-ovisna RNA polimeraza 2); DCL3 (DICER-LIKE 3); HEN1 (HUA ENHANCER1); AGO4 (ARGONAUTE 4); KTF1 (KOW DOMAIN-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR 1); RDM1 (RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1); DRM2 (DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2); Pol V (RNA polimeraza V); CTD (C-terminalna domena); DRD1 (DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1); DMS3 (DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3); SUVH (SUPPRESSOR OF VARIATION 3-9 HOMOLOG); MORC6 (MICRORCHIDIA 6); IDN2-IDP (INVOLVED IN DE NOVO 2-IDN2 PARALOGUE); SWI/SNF (SWITCH/SUCROSE NON FERMENTABLE); UBP26 (UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 26); JMJ14 (JUMONJI 14); HDA6 (HISTONE DEACETYLASE 6). (Prilagođeno prema Matzke i Mosher, 2014)

Nekanonski putevi RdDM-a poveznica su između privremenog utišavanja transpozona pomoću molekula sRNA i dugotrajnog utišavanja transpozona pomoću kanonskog RdDM-a (Erdmann i Picard, 2020). Glavna razlika između kanonskog i nekanonskih puteva RdDM-a je u postanku sRNA koje ulaze u kompleks s proteinima AGO. Mehanizam miRNA-usmjerene metilacije DNA odvija se na način da prekursorsku miRNA cijepa enzim DCL3 te tako nastaju 24 nt duge siRNA koje ulaze u kompleks s

proteinom AGO4. U ovom mehanizmu umjesto prekursorske miRNA može sudjelovati i mRNA s dugim ukosnicama (Cuerda-Gil i Slotkin, 2016). Mehanizam RDR6-RdDM odvija se na način da nastale 21 – 22 nt duge sekundarne siRNA ulaze u kompleks s proteinom AGO6 (Cuerda-Gil i Slotkin, 2016). Mehanizam RDR6-DCL3-RdDM, za razliku od mehanizma RDR6-RdDM, kao supstrate za enzim DCL3 koristi dvolančane RNA prekursori sekundarnih siRNA koji su nastali djelovanjem enzima RDR6. Nastale 24 nt duge siRNA ulaze u kompleks s proteinima AGO4 ili AGO6 (Cuerda-Gil i Slotkin, 2016). Mehanizam Pol IV-NERD-RdDM koristi dvolančane RNA prekursori sekundarnih siRNA koji su nastali djelovanjem enzima RDR6 kao supstrate za enzime DCL2-4. Nastale siRNA ulaze u kompleks s proteinom AGO2 koji se veže na kromatin u interakciji s proteinom NERD (Cuerda-Gil i Slotkin, 2016). Mehanizam RdDM-a neovisan o proteinima DCL koristi dvolančane RNA nastale djelovanjem polimeraza RDR2 i RDR6. Takve dvolančane molekule RNA ulaze u kompleks s proteinom AGO4 i naknadno se skraćuju na 3' kraju pomoću egzonukleaza (Cuerda-Gil i Slotkin, 2016).

Budući da se Pol V preko proteina SUVH2/9 veže za već postojeće metilne skupine na molekuli DNA, postavlja se pitanje na koji način dolazi do *de novo* metilacije molekule DNA kad nisu prisutne metilne skupine na sekvencama koje trebaju biti metilirane. Smatra se da Pol V nasumično transkribira duge nekodirajuće molekule RNA s različitih dijelova genoma, ali je frekvencija takve transkripcije značajno manja od transkripcije na prethodno metiliranim dijelovima DNA (Tsuzuki i sur. 2020). Ugradnjom novog transpozona ili ponovnom aktivacijom već ugrađenog transpozona stimulira se nastajanje siRNA koje se zatim mogu vezati na dugi nekodirajući transkript koji je nastao nasumičnom transkripcijom. Prema ovom modelu proteini SUVH2/9 imaju više funkcija od prepoznavanja metilnih skupina.

2.5.3. Održavanje obrazaca metilacije molekule DNA

Nakon replikacije molekule DNA novosintetizirani lanac ne sadrži metilacijske oznake te ga je potrebno metilirati prema oznakama na roditeljskom lancu. Metilaciju dinukleotida CG održava DNA-metiltransferaza MET1 koja ostvaruje interakciju s histonskom deacetilazom HDA6. Ova dva enzima djeluju sinergistički na represiju transpozona (Liu i sur. 2012). Metilaciju sekvence CHG održavaju kromometilaza CMT3 i u manjoj mjeri kromometilaza CMT2 koje prepoznaju histonsku modifikaciju H3K9me2 nastalu djelovanjem enzima SUVH4/5/6 (Zhang i sur. 2018). Metilaciju asimetrične sekvence CHH dominantno održava DNA-metiltransferaza DRM2 koja djeluje u sklopu metilacije molekule DNA RdDM-om (Law i Jacobsen, 2010). Kromometilaza CMT2 preuzima ulogu RdDM-a u održavanju metilacijskih obrazaca na heterokromatinskim područjima koja sadrže histon H1 zbog čega je onemogućeno

odvijanje RdDM-a (Zhang i sur. 2018). Mehanizam RdDM-a također sudjeluje u održavanju metilacijskih obrazaca u sekvencama CG i CHG (Erdmann i Picard, 2020).

2.5.4. Demetilacija molekule DNA

Demetilacija molekule DNA važan je mehanizam regulacije ekspresije gena, aktivnosti transpozona i odgovora biljaka na stres. Pasivna demetilacija događa se tijekom replikacije molekule DNA zbog inaktivacije ili smanjene koncentracije enzima koji sudjeluju u održavanju metilacije (Li i sur. 2018). Aktivna demetilacija nastaje zbog aktivnosti DNA-glikozilaza DME, ROS1 i DML2/3 koje aktivno izrezuju 5-meC (Li i sur. 2018). Protein DME dominantno je eksprimiran u središnjoj stanici ženskoga gametofita i u vegetativnoj stanici muškoga gametofita, a proteini ROS1 i DML2/3 eksprimirani su u vegetativnim stanicama biljke (Zhang i sur. 2018). Protein DME demetilira male transpozone bogate A-T parovima baza u eukromatinskim regijama genoma što utječe na ekspresiju gena pod kontrolom tih transpozona (Zhang i sur. 2018). Protein ROS1 demetilira transpozone koji se nalaze u blizini protein-kodirajućih gena čime se sprječava širenje metilacijskih oznaka na njih (Tang i sur. 2016). Isti autori navode da ROS1 djeluje antagonistički s velikim brojem lokusa koji su podložni RdDM-u. Iz tog razloga ROS1 ima važnu ulogu u aktivaciji transpozona i indukciji gena koji sudjeluju u odgovoru na stres (Yang i sur. 2022). Metilacija promotora gena *ROS1* potiče ekspresiju proteina ROS1. Na ovaj način metilacija molekule DNA pomoću RdDM-a i DNA-metilaze MET1 te demetilacija pomoću ROS1 tvore povratnu spregu. Povećana razina metilacije molekule DNA potiče ekspresiju ROS1 koji poništava učinak RdDM-a na velikom broju lokusa (Lei i sur. 2015; Williams i sur. 2015; Zhang i sur. 2018).

3. Epigenetička regulacija u biotičkom stresu

Biljke su meta napada velikoga broja virusa, bakterija i gljiva. Premda nemaju imunostni sustav kao životinje, biljke posjeduju brojne druge mehanizme za obranu od patogena (Huang i Jin, 2022). Biljne stanice posjeduju membranske receptore PRR koji sudjeluju u prepoznavanju molekula PAMP-a na površini patogena. Interakcija između PAMP-a i PRR-a pokreće nespecifičnu imunost PTI (Huang i Jin, 2022). Ovaj je tip imunosti svojstven svim varijetetima neke biljne vrste (Nürnberg i Kemmerling, 2018). Patogeni mogu zaobići PTI sintezom efektorskih molekula koje modificiraju ekspresiju gena uključenih u obranu biljke. Biljke imaju sposobnost prepoznati efektorske molekule patogena pomoću receptorskih proteina NLR što aktivira specifičnu imunost ETI (Huang i Jin, 2022). ETI je specifičan za pojedini varijetet biljke

(Nürnberg i Kemmerling, 2018). Programirana stanična smrt i hipersenzitivni odgovor biljke najčešće su rezultat djelovanja ETI (Gao i sur. 2015). Lokalni odgovori biljke na napad patogena potiču biosintezu SA koja putuje floemom do drugih biljnih tkiva djelujući kao signal za indukciju obrambenog odgovora. Ova se pojava naziva sistemska stečena rezistencija (engl. *systemic acquired resistance*) (Gao i sur. 2015). Simbioza biljke s nepatogenim bakterijama u području korijena (npr. bakterije roda *Rhizobium*) dovodi do indukcije biosinteze etilena i JA koji floemom putuju do drugih biljnih tkiva. Ovaj SA-neovisni put aktivacije obrambenog sustava biljke naziva se inducirana sistemska rezistencija (engl. *induced systemic resistance*) (Choudhary i sur. 2007). Sistemska rezistencija i inducirana sistemska rezistencija dovode do povećane otpornosti biljke na ponovni napad patogena (Choudhary i sur. 2007; Gao i sur. 2015). Smatra se da je sinteza SA kao signalne molekule učinkovita u obrani od biotrofnih organizama koji ne ubijaju stanice, već ih koriste za dobivanje energije. Sinteza etilena i JA učinkovitija je u obrani od nekrotrofnih organizama koji u ubijaju biljne stanice (Ramirez-Prado i sur. 2018).

3.1. Male molekule RNA

Molekule sRNA imaju višestruku ulogu u odgovoru na napad patogena. Molekule sRNA sudjeluju u regulaciji signalizacije posredovane biljnim hormonima kao što su auksin, ABA, SA i JA. Primjerice, molekula *miR393* zaslužna je za razgradnju transkripata auksinskih receptora. Na taj način biljka svoje stanične resurse, umjesto za rast i razvoj, koristi za obranu od patogena (Zhang i sur. 2011; Huang i sur. 2016). Druga funkcija sRNA je obrana od patogena putem PTGS-a. Mutanti *rdr6* i *dcl2-4* koji imaju nefunkcionalne enzime biosintetskog puta siRNA pokazuju smanjenu otpornost na napad gljive *Botrytis cinerea*. Smatra se da se siRNA vezikulama transportiraju u stanice patogena i ondje posttranskripcijski utišavaju transkripte gena za virulenciju (Cai i sur. 2018). Transkripti virusa s jednolančanim RNA genomom ulaze u interakciju s polimerazama RDR. Sintetiziranu dvolančanu RNA zatim cijepaju proteini DCL. U slučaju infekcije virusima s dvolančanim RNA genomom, molekule RNA odmah cijepaju proteini DCL. Nastale molekule sRNA virusnog podrijetla sudjeluju u PTGS-u virusnih transkripata (Huang i sur. 2016). U slučaju infekcije virusima s DNA genomom, biljne stanice koriste njihov genom kao kalup za sintezu molekula sRNA koje sudjeluju u RdDM-ovisnom TGS-u pomoću kojega se utišavaju geni virusa. Također, molekule sRNA koje potiču iz virusnih genoma mogu povećati svoju brojnost djelovanjem polimeraza RDR te sudjelovati u PTGS-u (Huang i sur. 2016).

3.2. Metilacija molekule DNA

Mehanizam RdDM sudjeluje u regulaciji ekspresije gena tijekom biotičkog stresa. Istraživanja na riži (*Oryza sativa*) pokazala su da lokus *Pigm* kodira za receptore NLR. Receptor PigmR biljkama daje svojstvo otpornosti na gljivicu *Magnaporthe oryzae*, ali smanjuje rast i prinos biljke. Protein PigmS djeluje kao negativan regulator receptora PigmR-a. U promotoru gena koji kodira za PigmS nalaze se dva transpozona s kratkim inverznim ponavljanjima koji kontroliraju njegovu ekspresiju. Mutanti sa smanjenom ekspresijom enzima koji sudjeluju u RdDM-u imaju smanjenu metilaciju tih transpozona što uzrokuje povišenu ekspresiju PigmS-a (Deng i sur. 2017).

Biljni hormoni mogu regulirati metilaciju molekule DNA. Tretman biljaka SA-om izaziva smanjenu metilaciju transpozona i povećanu ekspresiju gena pod njihovom kontrolom (Huang i Jin, 2022). Hormon ABA uzrokuje povećanu razinu metilacije u tkivu tumora vrata korijena biljke *Arabidopsis thaliana* nakon infekcije bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* (Gohlke i sur. 2013). Smatra se da ABA, koja je važan regulator odgovora na abiotičke stresove, djeluje negativno na obrambeni sustav biljke jer inhibira stanične odgovore na regulatore rasta SA, JA i etilen (Huang i Jin, 2022).

Demetilacija molekule DNA posredovana demetilazom ROS1 sudjeluje u aktivaciji transkripcije gena koji kodiraju za neke receptore iz skupine PRR i NLR u odgovoru na infekciju bakterijom *Pseudomonas syringae*. Ovo otkriće upućuje na važnost aktivne demetilacije u obrambenom odgovoru biljke (Halter i sur. 2021; Huang i Jin, 2022).

3.3. Histonske modifikacije

Histonske acetiltransferaze i histonske deacetilaze važne su za epigenetičku regulaciju ekspresije gena u odgovoru na napad patogena. JA i etilen induciraju ekspresiju histonske deacetilaze HDA19 (Zhou i sur. 2005; Ramirez-Prado i sur. 2018). Općenito, histonske deacetilaze djeluju represivno na signalizaciju u odgovoru na SA. Mutanti *hda19* i *hda6* imaju povišenu razinu acetilacije histona H3 u genima *PR1* i *PR2* čija je ekspresija inducirana SA-signalnim putem (Ramirez-Prado i sur. 2018). Također, HDA19 interagira s transkripcijskim faktorima WRKY38/62 koji sudjeluju u represiji SA-ovisnih gena (Ramirez-Prado i sur. 2018). Tretman biljaka pomoću SA dovodi do inhibicije HDA19 (Mengel i sur. 2017). Uočeno je da mutanti *hda19* i *hda6* pokazuju povećanu otpornost na zarazu bakterijom *Pseudomonas syringae*. Histonska deacetilaza HD2B, s druge strane, djeluje kao pozitivan regulator obrane biljke od bakterije *Pseudomonas syringae* (Ramirez-Prado i sur. 2018).

Metilacija histona zajedno s acetilacijom regulira obrambeni odgovor biljke. Primjerice, demetilaza JMJ27 pozitivan je regulator odgovora biljke na infekciju bakterijom *Pseudomonas syringae*. JMJ27 demetilira H3K9me2 i H3K9me1 te potiče ekspresiju transkripcijskih faktora WRKY25/33 (Ramirez-Prado i sur. 2018). Sličnu ulogu u obrani od ove bakterije ima demetilaza IBM1 koja, osim što uklanja metilacijske oznake s H3K9me2, negativno regulira metilaciju molekule DNA na sekvencama CHG unutar gena (Huang i Jin, 2022).

3.4. Kromatin-remodelirajući kompleksi

Zamjenu histona H2A za histonsku varijantu H2A.Z katalizira CRC SWR1. Ovime se suprimiraju SA-ovisni obrambeni geni i sistemska stečena rezistencija (March-Díaz i sur. 2007). Također, mutanti s nefunkcionalnim kompleksom SWR1 pokazuju narušeni obrambeni odgovor posredovan etilenom i JA (Berriri i sur. 2016). SYD je podjedinica CRC-a koja suprimira ekspresiju gena *SNC1* čiji je genski produkt protein iz skupine NLR. Budući da nije otkriveno nikakvo vezno mjesto za protein SYD na molekuli DNA, smatra se da bi smanjenje ekspresije gena *SNC1* mogla biti posljedica indirektno regulacije pomoću proteina SYD (Huang i Jin, 2022). Osim proteina SYD, kromatin-remodelirajuća ATP-aza DDM1 također negativno regulira ekspresiju gena *SNC1* (Ramirez-Prado i sur. 2018). Pozitivni regulator gena *SNC1* je kromatin-remodelirajući faktor CHR5 (Ramirez-Prado i sur. 2018). Autoimuni odgovor biljke u normalnim uvjetima rasta sprječava podjedinica SWP73 koja se nalazi u CRC-u iz potporodice SWI/SNF. Protein SWP73 suprimira neke receptore iz skupine NLR. Nakon što biljku napadne bakterija *Pseudomonas syringae*, sRNA podrijetlom iz bakterije posttranskripcijski utišavaju transkripte gena *SWP73* (Huang i Jin, 2022). Sličnu ulogu u sprječavanju autoimunog odgovora biljke ima i protein BRHIS1 koji se veže na monoubikvitinirane histone u promotorima obrambenih gena riže (Li i sur. 2015).

4. Epigenetička regulacija u abiotičkom stresu

4.1. Toplinski stres

Izlaganje biljaka temperaturama koje su 10 do 15 °C više od optimalne temperature za njihov rast uzrokuje toplinski stres (Wahid i sur. 2007). Oštećenja membrana i citoskeletnih proteina, pogrešno smatanje proteina i smanjena aktivnost enzima neposredna su posljedica djelovanja povišene temperature na stanice. Takve promjene na molekularnoj razini uzrok su smanjene stope fotosinteze i staničnog disanja, nastajanja ROS-ova te usporavanja rasta i razvoja biljke (Zhao i sur. 2020; Chung i sur. 2022).

4.1.1. Transkripcijska regulacija

Transkripcijski faktor HSFA1 glavni je transkripcijski regulator odgovora na toplinski stres. U normalnim uvjetima rasta HSFA1 nalazi se u interakciji sa šaperonima HSP70 i HSP90. Protein HSFA1 disocira nakon izlaganja toplinskom stresu i potiče ekspresiju nizvodnih transkripcijskih faktora DREB2A, HSFA2, HSFA7, HSF8 i MBF1C (Zhao i sur. 2020). Porast broja pogrešno smotanih proteina u endoplazmatskom retikulumu dovodi do aktivacije odgovora nesmotanih proteina (engl. *unfolded protein response*) koji rezultira odvođenjem transkripcijskih faktora bZIP17/28/60 u jezgru (Bao i Howell, 2017). U percepciji toplinskog stresa također sudjeluju i drugi transkripcijski faktori kao što su MYB30 i transkripcijski faktori iz porodice WRKY (Zhao i sur. 2020).

4.1.2. Epigenetička regulacija

U stanju toplinskog stresa sintetiziraju se proteini HSP koji djeluju kao proteinski šaperoni, ali i antioksidacijski enzimi poput askorbat-peroksidaze koji sudjeluju u uklanjanju ROS-ova. Histoni u blizini gena *APX2* i *HSP18/22.0/70* nakon izlaganja toplinskom stresu dobivaju posttranslacijske modifikacije H3K9Ac i H3K4me3 koje dovode do ekspresije tih gena (Miryeganeh, 2021).

Histonske deacetilaze HDA6 i HD2C sudjeluju u odgovoru na toplinski stres. HDA6 utišava ekspresiju gena u okviru RdDM-a, ali može djelovati i neovisno o RdDM-u (Popova i sur. 2013). Toplinski stres inducira ekspresiju HD2C (Buszewicz i sur. 2016) koja utišava gene koji su aktivirani pod utjecajem toplinskog stresa (Zhao i sur. 2020). HD2C interagira s HDA6, HDA19, DNA-metiltransferazom DNMT2 te s CRC-om iz potporodice SWI/SNF koji sadrži katalitičku podjedinicu BRM (Buszewicz i sur. 2016). Iz navedenoga proizlazi da bi deacetilacija histona mogla biti funkcionalno povezana s remodeliranjem kromatina (Chung i sur. 2022).

Histonska acetiltransferaza GCN5 sudjeluje u postavljanju permisivnih histonskih modifikacija H3K9ac i H3K14ac (Hu i sur. 2015) na promotor gena *HSFA3* koji regulira ekspresiju HSP-ova (Schramm i sur. 2007) i na promotor gena *UVH6* koji sudjeluje u popravku oštećenja molekule DNA (Liu i sur. 2003). Mutanti *gcn5* imaju smanjenu ekspresiju gena *UVH6*, *MBF1C* i *HSFA2/3* zbog čega im je narušena termotolerancija (Hu i sur. 2015).

Mutanti s nefunkcionalnim kanonskim putem RdDM-a osjetljivi su na toplinski stres (Popova i sur. 2013). Kod biljke *Arabidopsis thaliana* toplinski stres dovodi do povećane metilacije genoma, no kod drugih biljaka je moguće postojanje različitih obrazaca metilacije DNA u odgovoru na toplinski stres (Chung i sur.

2022). Gen *SDC* u normalnim je uvjetima rasta utišan pomoću RdDM-a (Miryeganeh, 2021). Toplinski stres aktivira ekspresiju proteina SDC što dovodi do aktivacije gena koji sudjeluju u odgovor na dugotrajni toplinski stres i do oporavka od stresa (Chang i sur. 2020).

Istraživanja na riži (*Oryza sativa*) pokazala su da toplinski stres aktivira ekspresiju endospermalnog proteina FIE1 koji je dio kompleksa PRC2. Povećana ekspresija proteina FIE1 dovodi do smanjenog prinosa. Smatra se da je ekspresija gena *FIE1* regulirana metilacijom DNA i histonskim modifikacijama H3K9me2 (Folsom i sur. 2014; Miryeganeh, 2021). Istraživanja na biljci *Arabidopsis thaliana* pokazala su da je za prestanak rasta biljke u uvjetima toplinskog stresa zaslužan kromatin-remodelirajući protein CHR12 (Mlynárová i sur. 2007; Chung i sur. 2022).

Kao što je navedeno u cjelini 2.4, molekule tasiRNA sudjeuju u PTGS-u transkripata *HTT1* i *HTT2* u normalnim uvjetima rasta. Proteini HTT1 i HTT2 akumuliraju se u toplinskom stresu i zaslužni su termotoleranciju (Li i sur. 2014).

4.2. Stres uzrokovan niskim temperaturama

Ovisno o okolišnoj temperaturi, dvije su vrste stresa izazvanog niskim temperaturama. Stres uzrokovan hladnoćom (engl. *chilling stress*) nastaje pri temperaturama u rasponu od 0 °C do 20 °C, a stres uzrokovan smrzavanjem (engl. *freezing stress*) nastaje pri temperaturama nižim od 0 °C (Ritonga i Chen, 2020). Hladnoća izaziva smanjenu fluidnost membrana koja dovodi do prokapavanja membrana i porasta koncentracije kalcijevih iona u citosolu, smanjene učinkovitost membranskog prijenosa elektrona pri čemu nastaju ROS-ovi i smanjene aktivnost enzima (Theocharis i sur. 2012). Pri temperaturama nižim od 0 °C nastaju kristalići leda u apoplastnom prostoru što uzrokuje otežano primanje vode i velika oštećenja membrana (Ritonga i Chen, 2020).

4.2.1. Transkripcijska regulacija

Povišena koncentracija kalcijevih iona u citosolu aktivira transkripcijske faktore CAMTA3/5 koji sadrže kalmodulinsku domenu. Navedeni transkripcijski faktori aktiviraju ekspresiju gena koji kodiraju za transkripcijske faktore CBF iz porodice transkripcijskih faktora DREB (Medina i sur. 1999). Niske temperature također potiču premještanje transkripcijskih faktora RVE4/8 iz citosola u jezgru gdje aktiviraju ekspresiju nizvodnih transkripcijskih faktora CBF (Kidokoro i sur. 2021). Proteini CCA1 i LHY djeluju represivno na transkripciju gena *CBF* u normalnim uvjetima rasta, a nakon izlaganja biljke niskim

temperaturama se razgrađuju (Kidokoro i sur. 2021). Dodatna razina regulacije ekspresije gena *CBF* postignuta je represivnim djelovanjem transkripcijskog faktora PIF3 koji postaje stabilan pri niskim temperaturama (Jiang i sur. 2017). Iako se prethodno smatralo da je protein ICE1 važan transkripcijski aktivator gena *CBF*, nova istraživanja pokazala su da on nema takvu ulogu (Kidokoro i sur. 2021).

Transkripcijski faktori CBF glavni su transkripcijski regulatori odgovora na niske temperature koji sudjeluju u aktivaciji gena *COR*. Geni *COR* zaslužni su za toleranciju biljaka na niske temperature (Chang i sur. 2020). Osim regulatornog puta CBF-COR, u odgovoru na niske temperature sudjeluje i biljni hormon ABA koji inducira ekspresiju gena *CBF* i *COR* (Kidokoro i sur. 2021).

4.2.2. Epigenetička regulacija

Protein PKL je kromatin-remodelirajući faktor koji sudjeluje u CBF-ovisnom odgovoru na stres. Mutanti *pkl* imaju smanjenu ekspresiju gena *CBF3* i gena *COR* te pokazuju preosjetljivost na niske temperature (Yang i sur. 2019). Mutanti *pkl* imaju smanjenu metilaciju na velikom broju ciljnih lokusa RdDM-a, no samo je mali broj takvih lokusa pokazao prestanak utišavanja transpozona. Predložen je model u kojem PKL potpomaže odvijanju RdDM-a (Yang i sur. 2019). Protein PKL surađuje s kompleksima PRC2 i SWR1 u postavljanju represivne histonske modifikacije H3K27me3 u blizini gena koji sadrže histonske varijante H2A.Z (Carter i sur. 2018). Smanjeni broj H3K27me3 u promotorima dvaju gena *COR*, *COR15A* i *GOLS3*, nakon tretmana biljaka niskim temperaturama povezuje se s pamćenjem izlaganja stresu (Kwon i sur. 2009).

Povišena ekspresija histonske deacetilaze HD2D pospješuje toleranciju biljaka na tretman niskim temperaturama. U tretiranim biljkama zabilježena je smanjena količina malondialdehida koji je indikator oštećenja staničnih membrana u odnosu na divlji tip biljaka (Han i sur. 2016). Histonska deacetilaza HD2C se nakon izlaganja stresu razgrađuje pomoću proteina HOS15 koji je dio E3-ubikvitin ligaznog kompleksa. Proteasomalna razgradnja ubikvitinirane deacetilaze HD2C uzrokuje povećanu razinu acetilacije u promotorima gena *COR* što doprinosi aktivaciji njihove ekspresije. Također, protein HOS15 dovodi transkripcijski faktor CBF na promotore gena *COR* što dodatno pojačava njihovu ekspresiju (Chang i sur. 2020).

Tretiranje kukuruza (*Zea mays*) niskim temperaturama inducira povišenu ekspresiju histonskih deacetilaza što dovodi do smanjene acetilacije repetitivnih sekvenci u heterokromatinskom području genoma. Smanjena acetilacija povezana je sa smanjenom razinom metilacije DNA i smanjenim brojem

represivnih histonskih modifikacija H3K9me2 u tom dijelu genoma. Produljeno izlaganje biljaka stresu uzrokovalo je ponovnu uspostavu metilacijskih obrazaca (Hu i sur. 2012).

Aktivacija transpozona nakon izlaganja niskim temperaturama može utjecati na ekspresiju gena. Najpoznatiji primjer je gen *RUBY* čija je ekspresija pod kontrolom transpozona. Genski produkti gena *RUBY* sudjeluju u biosintezi antocijana koji daju karakterističnu grimiznu boju plodovima krvave naranče (Chang i sur. 2020).

4.3. Stres uzrokovan nedostatkom vode

Nedostatak vode u tlu ili povišeni osmotski potencijal tla uzrokuje otežano primanje vode u biljku. Da bi se uspješno nosile s nedostatkom vode, biljke induciraju se ekspresiju gena u biosintetskom putu ABA-e što dovodi do porasta koncentracije ABA-e i ekspresije ABA-ovisnih gena. Također, događa se promjena u ekspresiji brojnih gena koji nisu pod regulacijskom kontrolom ABA-e.

4.3.1. Transkripcijska regulacija

Glavni transkripcijski regulatori ABA-ovisne reakcije na stres su proteini AREB iz porodice transkripcijskih faktora bZIP koji se mogu vezati na regije DNA *ABRE* i potaknuti ekspresiju ABA-ovisnih gena (Liu i sur. 2018). Osim transkripcijskih faktora AREB, ABA-ovisna regulatorna mreža odgovora na stres uključuje djelovanje transkripcijskih faktora MYB/MYC, WRKY, NAC i NF-Y (Singh i Laxmi, 2015). Glavni transkripcijski regulatori ABA-neovisnog puta odgovora na stres su transkripcijski faktori DREB2A i ZFHD te transkripcijski faktori NAC koji sudjeluju u ABA-ovisnoj i u ABA-neovisnoj regulatornoj mreži (Singh i Laxmi, 2015). Transkripcijski faktor DREB2A veže se na veznu domenu *DRE* u genima čiju ekspresiju aktiviraju (Singh i Laxmi, 2015).

4.3.2. Epigenetička regulacija

Izlaganje stresu povećava ekspresiju enzima 9-cis-epoksikarotenoid dioksidogeneze koji sudjeluje u biosintezi hormona ABA-e. Do povećane ekspresije dolazi zbog nakupljanja histonskih modifikacija H3K4me3 u tijelu gena *NCED3* koji kodira za taj enzim. U postavljanju H3K3me3 sudjeluje metiltransferaza ATX1 (Chung i sur. 2022).

Smatra se da geni kao što su *RD29A*, *LTI65*, *RD22* i *RAP2.4* čija se ekspresija inducira u uvjetima nedostatka vode dobivaju aktivirajuće histonske modifikacije H3K4me3 i H3K9ac u svojim promotorskim regijama (Chang i sur. 2020). Broj navedenih histonskih modifikacija sve se više povećava što je izlaganje stresu dugotrajnije i što je stres intenzivniji. Tijekom perioda oporavka od stresa navedene se histonske modifikacije uklanjaju (Chang i sur. 2020).

U normalnim uvjetima rasta represivnu histonsku modifikaciju H3K27me3 prepoznaje kompleks PRC1-LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 koji utišava ekspresiju stresom-aktiviranih gena iz porodice transkripcijskih faktora NAC. Nakon izlaganja stresu H3K27me3 uklanja se s tijela gena čime se omogućuje genska ekspresija. Mutanti *prc1-like heterochromatin protein1* imaju smanjenu metilaciju na H3K27, povećanu osjetljivost na ABA-u, veću otpornost na sušu, smanjenu količinu SA-e i manju otpornost na napad patogene bakterije *Pseudomonas syringae* u odnosu na biljke divljega tipa (Ramirez-Prado i sur. 2019). Osim metilacije, acetilacija histona regulira ekspresiju nekih sušom-induciranih gena. Kod biljke *Populus trichocarpa* transkripcijski faktor AREB1 veže se za motiv *ABRE* u genima koji kodiraju za transkripcijske faktore NAC i regrutira histonsku acetiltransferazu GCN5. Histonska modifikacija H3K9ac aktivira ekspresiju transkripcijskog faktora NAC u odgovoru na nedostatak vode (Chang i sur. 2020).

Metilacija molekule DNA još je jedan važan čimbenik odgovora biljaka na stres izazvan nedostatkom vode. Izlaganje stresu povećava metilaciju genoma biljke *P. trichocarpa* u odnosu na divlji tip biljaka čime se regulira ekspresija brojnih transkripcijskih faktora. Metilacija gena koji kodiraju za transkripcijske faktore u pravilu je povećala njihovu ekspresiju, dok je smanjena metilacija snižavala stopu transkripcije (Liang i sur. 2014) U istraživanju na riži (*Oryza sativa*) uočeno je da su kultivari osjetljivi na nedostatak vode hipometilirani, a kultivari otporni na sušu imaju hipermetilaciju genoma (Gayacharan i Joel, 2013).

U istraživanju na *P.trichocarpa* uočeno je da 65 % ispitivanih transpozona koji se nalaze u promotorima gena koji kodiraju za transkripcijske faktore hipometilirano u odgovoru na nedostatak vode, a preostalih 35 % transpozona je hipermetilirano (Liang i sur. 2014). U istraživanju na kukuruзу (*Zea mays*) otkriveno je da transpozoni reguliraju 33 % gena koji sudjeluju u odgovoru na stres. Međutim, ne djeluju svi transpozoni aktivirajuće na gene koje reguliraju (Makarevitch i sur. 2015). Primjerice, kukuruz (*Zea mays*) u promotoru gena *NAC111* sadrži transpozone s inverznim ponavljanjima koji kontroliraju njegovu ekspresiju. Metilacija transpozona pomoću RdDM-a i odlaganje represivne histonske modifikacije H3K9me2 uzrokuju veću osjetljivost kukuruza na sušu. Kod mutanata s pojačanom ekspresijom gena *NAC111* uočena je otpornost na manjak vode (Mao i sur. 2015).

Slično kao i u odgovoru na toplinski stres, protein CHR12 sudjeluje u privremenom prekidu rasta biljke nakon izlaganja stresu (Chang i sur. 2020).

4.4. Stanični odgovor na abscizinsku kiselinu

Stresni uvjeti kao što su suša, niske i visoke temperature te povećani salinitet tla induciraju biosintezu biljnog hormona ABA-e (Vishwakarma i sur. 2017). ABA se može vezati za receptore PYR1/PYL/RCAR čime se inhibira djelovanje enzima iz porodice fosfataza PP2C. Posljedica inhibicije PP2C-ova je otpuštanje i aktivacija proteinskih kinaza SnRK2 (Chang i sur. 2020). Aktivnost kinaze SnRK2 važna je za regulaciju transkripcije, procesiranja molekula RNA, postavljanja epigenetičkih modifikacija i za regulaciju vremena cvjetanja (Wang i sur. 2013; Chang i sur. 2020).

Tretman ABA-om uzrokuje promjenu strukture kromatina posredovanu CRC-ovima. Podjedinica SWI3B kompleksa iz potporodice SWI/SNF interagira s proteinom HAB1 koji pripada porodici fosfataza PP2C. Protein HAB1 u normalnim uvjetima rasta inhibira aktivnost SWI3B čime se onemogućuje ekspresija ABA-ovisnih gena. Tretman ABA-om blokira djelovanje HAB1 te SWI3B sudjeluje u aktivaciji ekspresije ABA-ovisnih gena (Saez i sur. 2008). BRM je podjedinica CRC-a iz porodice SWI2/SNF2 koja djeluje represivno na ABA-ovisne gene u nedostatku stresnih uvjeta. Kinaze SnRK2 i fosfataze PP2C reguliraju aktivnost proteina BRM. Inaktivni fosforilirani protein BRM aktivira se fosfataznom aktivnosti PP2C (Chang i sur. 2020).

Histonske modifikacije imaju ulogu u odgovoru na tretman ABA-om. Promjena u obrascu acetilacije histona sudjeluje u regulaciji transkripcije ABA-receptora PYL4-6 i nekih ABA-ovisnih gena poput *ABII/2*. Kompleks MSII-HDA19-SNL sudjeluje u deacetilaciji promotora gena *PYL4-6* i inhibira njihovu ekspresiju (Mehdi i sur. 2016; Chang i sur. 2020). Mutanti *hda19* pokazuju veću otpornost na stres izazvan nedostatkom vode, stres izazvan povišenim salinitetom i toplinski stres (Ueda i sur. 2018) što ukazuje na to da je histonska deacetilaza HDA19 negativan regulator odgovora na stres. Histonske deacetilaze HDA6 i HD2C sudjeluju u regulaciji ekspresije gena *ABII/2* koji kodiraju proteine iz porodice PP2C (Chang i sur. 2020). Utvrđeno je da mutanti *hda6* i *hd2c* imaju povećanu ekspresiju gena *ABII/2* i smanjenu otpornost na tretman vodenom otopinom natrijeva klorida i ABA-om (Luo i sur. 2017). Metilacija histona regulira ekspresiju gena *SnRK2.8*. Ekspresija gena *ABI3* inducira se nakon tretmana biljaka ABA-om. Protein *ABI3* aktivira ekspresiju gena koji kodira za histonsku demetilazu JM30. Represivne histonske modifikacije H3K27me3 uklanjaju se s promotora gena *SnRK2.8* pomoću JM30. Ekspresija kinaze SnRK2.8 dodatno potiče ekspresiju gena *ABI3* (Wu i sur. 2019; Chang i sur. 2020). Ova je regulatorna kaskada važna u odgovoru mladoga klijanca na nedostatak vode (Wu i sur. 2019). Ubikvitinacija

histona regulira veliki broj gena povezanih s dormancijom sjemena. Nedostatak E3-ligaznih enzima HUB1/2 uzrokuje skraćenu dormanciju sjemena i represiju velikog broja gena među kojima su *NCED9* i *ABI4* (Chang i sur. 2020). Protein NDX ulazi u interakciju s komponentama kompleksa PRC1. Zatim PRC1 monoubikvitinacijom histona H2A utišava ekspresiju ABA-ovisnih gena kao što je *ABI4* koji kodira transkripcijski faktor s domenom AP2 (Zhu i sur. 2020). Ekspresija proteina NDX smanjena je pod utjecajem ABA-e što omogućuje ekspresiju gena *ABI4* (Zhu i sur. 2020).

ABA-ovisni geni regulirani su RdDM-om i ROS1-ovisnom demetilacijom molekule DNA. Nakon tretmana mutanata *ros1* ABA-om, neki ABA-ovisni geni su hipermetilirani i slabije ekspimirani. Primjer takvog gena je gen *NIC3* čiji genski produkt sudjeluje u recikliranju kofaktora NAD⁺ (Kim i sur. 2019). Osim na ekspresiju gena, metilacija molekule DNA u odgovoru na tretman ABA-om može utjecati na lokalizaciju proteina unutar stanice. Mutanti *hd2c* te mutanti s nefunkcionalnim mehanizmom RdDM-om pokazuju pogrešnu staničnu lokalizaciju RNA-helikaza STRS1/2 (Khan i sur. 2014). Proteini STRS1/2 smanjuju ekspresiju transkripcijskih faktora u odgovoru na stres. Ekspresija helikaza STRS1/2 smanjuje se nakon tretmana ABA-om, a mutanti *strs1/2* pokazuju povećanu toleranciju na toplinski stres, stres izazvan nedostatkom vode i stres izazvan povišenom koncentracijom soli (Khan i sur. 2014).

Kao što je navedeno u cjelini 2.3, tretman ABA-om potiče ekspresiju histonske varijante H1.3 čime se također modulira ekspresija gena (Jiang i Berger, 2017).

5. Strategija i perspektive u zaštiti biljaka u stresnom okolišu

Manipulacija epigenetičkim mehanizmima otpornosti biljaka na stres mogla bi čovječanstvu omogućiti veći prinos usjeva i povećanu otpornost na ekstremne klimatske uvjete. Međutim, ne treba zanemariti mnoge izazove koje je potrebno savladati prije uspješne implementacije novih načina zaštite biljaka koji se temelje na epigenetičkim mehanizmima regulacije ekspresije gena.

Premda je u prirodi moguće pronaći biljke s različitim epialelima (tj. različitim obrascima metilacije istih lokusa na molekuli DNA), takva pojava nije česta. Smatra se da epialeli nastaju zbog pogrešaka u održavanju metilacijskih obrazaca DNA nakon mitotskih dioba (Hofmeister i sur. 2020). Prednost takvih biljaka jest mejotska stabilnost epialela što otvara prostor za križanje biljaka s različitim epialelima u svrhu dobivanja potomstva s epigenetički poželjnim svojstvima (Kakoulidou i sur. 2021). Zbog činjenice da je pojava epialela u prirodi rijetka pojava, razvila se potreba za razvojem tehnologije uređivanja epigenoma (engl. *epigenome editing*). Postoji nekoliko pristupa pomoću kojih se može uređivati epigenom neke biljke.

Kemijski inducirane promjene epigenoma odnose se na epigenetske promjene uzrokovane tretmanom inhibitorima DNA-metiltransferaza (češće) i histonskih deacetilaza (rjeđe) (Kakoulidou i sur. 2021). Na taj način inducira se ekspresija utišanih transpozona i gena pod njihovom transkripcijskom kontrolom. Glavni nedostatak ove metode je nespecifično djelovanje koje zahvaća cijeli genom, a ne samo ciljani lokus (Kakoulidou i sur. 2021).

Mutacije gena koji sudjeluju u RdDM-u mogu inducirati promjene u epigenomu biljke. Primjerice, mutanti biljke *Populus trichocarpa* koji sadrže mutacije u genima *drm1*, *drm2* i *cmt3* pokazuju pojačanu otpornost na infekciju patogenom bakterijom *Pseudomonas syringae* tijekom više generacija (Luna i Ton, 2012). Biljke s mutacijama u genima čiji genski produkti sudjeluju u metilaciji DNA mogu se križati s divljim tipom biljaka da bi se dobili epigenetski rekombinantne linije biljaka, tzv. epiRIL-ovi. Postupak se provodi na način da se potomci u prvoj generaciji križaju ili povratno s biljkom divljeg tipa ili međusobno. Selektiraju se one biljke koje su dominantni homozigoti za metilacijske enzime. Selektirane se biljke zatim samooprašuju tijekom nekoliko generacija da bi se dobili epialelni homozigoti. Dobivene epiRIL-ove moguće je selektirati za poželjna svojstva (Lauss i Keurentjes, 2018). U istraživanjima na biljci *Arabidopsis thaliana* za izradu epiRIL-ova korišteni su mutanti *met1* ili *ddm1*. Ovakav pristup problematičan je za izradu epiRIL-ova na usjevima jer uzrokuje smanjenu plodnost ili letalni fenotip (Kakoulidou i sur. 2021). Smatra se da su mutanti s nefunkcionalnim genom *MSH1* dobri kandidati za primjenu ove tehnologije na usjevima jer dobiveni epiRIL-ovi imaju povećanu biomasu u odnosu na divlji tip biljaka (Viridi i sur. 2015; Kakoulidou i sur. 2021).

Biljke mogu „zapamtiti“ prethodnu izloženost stresu. U mehanizmu pamćenja stresa sudjeluju dvije skupine gena. Prvu skupinu čine geni koji će imati promijenjenu ekspresiju zbog epigenetičkih promjena nastalih kao posljedica djelovanje stresa. Drugu skupinu čine geni koji će tijekom ponovnog izlaganja stresu inducirati brži i snažniji odgovor biljke (Kakoulidou i sur. 2021). Privikavanje na stres (engl. *stress priming*) je postupak u kojem se roditeljske biljke ili biljke u ranim razvojnim stadijima izlažu obično blagim stresnim čimbenicima s ciljem stvaranja epigenetičkog pamćenja (Liu i sur. 2022). Moguće je da stvoreno epigenetičko pamćenje uzrokovano jednom vrstom stresa sudjeluje u odgovoru na izlaganje drugoj vrsti stresa. Ova se pojava naziva višestruka otpornost na stres (engl. *cross-stress resistance*) (Sun i sur. 2021). Primjerice, izlaganje biljaka niskim temperaturama uzrokuje uzrokuje ABA-ovisan odgovor i promjenu u ekspresiji ABA-ovisnih gena. Takve će biljke u budućnosti biti otpornije na sušu (Hatzig i sur. 2018). Da bi se epigenetičke promjene naslijedile kroz više generacija, potrebno je potomke u svakoj generaciji izlagati stresnim čimbenicima (Kakoulidou i sur. 2021). Održavanje epigenetičkih oznaka tijekom duljeg vremenskog perioda uslijed evolucijskih pritisaka može dovesti do promjena na razini genotipa što rezultira trajnom otpornošću na neki stresni čimbenik (Liu i sur. 2022).

6. Zaključak

U epigenetičkoj regulaciji ekspresije gena u odgovoru na abiotički i biotički stres sudjeluju male molekule RNA, enzimi koji sudjeluju u RNA-usmjerenj metilaciji molekule DNA, kromatin-remodelirajući kompleksi i enzimi koji modificiraju histonske repove. Izlaganje stresu uzrokuje velike promjene u metilaciji molekule DNA koje potiču aktivaciju transpozona. Promijenjena ekspresija velikoga broja gena koji sudjeluju u odgovor na stres rezultat je zajedničkog učinka smanjene metilacije DNA, aktivacije transpozona, promjena u histonskim modifikacijama te promjena u strukturi i sastavu kromatina. Epigenetičke promjene zadržavaju se nakon izlaganja stresu i smanjuju posljedice svakog ponovnog izlaganja stresu. Pamćenje izloženosti stresu može postojati u više generacija biljaka što otvara prostor korištenju tehnologija kojima se modificira epigenom usjeva s ciljem boljeg preživljavanja i dobivanja većeg prinosa.

7. Literatura

Axtell, M. J. i Meyers, B. C. (2018): Revisiting criteria for plant microRNA annotation in the era of big data. **The Plant Cell** 30: 272-284.

Bao, Y. i Howell, S. H. (2017): The unfolded protein response supports plant development and defense as well as responses to abiotic stress. **Frontiers in Plant Science** 8: 344.

Berriri, S., Gangappa, S. N. i Kumar, S. V. (2016): SWR1 Chromatin-remodeling complex subunits and H2A.Z have non-overlapping functions in immunity and gene regulation in *Arabidopsis*. **Molecular Plant** 9: 1051-1065.

Bewick, A. J. i Schmitz, R. J. (2017): Gene body DNA methylation in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 36: 103-110.

Bhadouriya, S. L., Mehrotra, S., Basantani, M. K., Loake, G. J. i Mehrotra, R. (2021): Role of chromatin architecture in plant stress responses: An update. **Frontiers in Plant Science** 11: 603380.

Bobadilla, R. i Berr, A. (2016): Histone methylation - A cornerstone for plant responses to environmental stresses? U: Shanker, A. K. i Shanker, C. (ur.) Abiotic and biotic stress in plants - Recent advances and future perspectives. InTech, str. 31-61.

Borges, F. i Martienssen, R. A. (2015): The expanding world of small RNAs in plants. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 16: 727-741.

Brockers, K. i Schneider, R. (2019): Histone H1, the forgotten histone. **Epigenomics** 11: 363-366.

Buszewicz, D., Archacki, R., Palusiński, A., Kotliński, M., Fogtman, A. i sur. (2016): HD2C histone deacetylase and a SWI/SNF chromatin remodelling complex interact and both are involved in mediating

the heat stress response in *Arabidopsis*: HD2C and BRM complex regulate response to heat. **Plant, Cell & Environment** 39: 2108-2122.

Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F.-M. i sur. (2018): Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. **Science** 360: 1126-1129.

Carter, B., Bishop, B., Ho, K. K., Huang, R., Jia, W. i sur. (2018): The chromatin remodelers PKL and PIE1 act in an epigenetic pathway that determines H3K27me3 homeostasis in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, 30: 1337-1352.

Chang, Y., Zhu, C., Jiang, J., Zhang, H., Zhu, J. i sur. (2020): Epigenetic regulation in plant abiotic stress responses. **Journal of Integrative Plant Biology** 62: 563–580.

Chodavarapu, R. K., Feng, S., Bernatavichute, Y. V., Chen, P.-Y., Stroud, H. i sur. (2010): Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. **Nature** 466: 388-392.

Choudhary, D. K., Prakash, A. i Johri, B. N. (2007): Induced systemic resistance (ISR) in plants: Mechanism of action. **Indian Journal of Microbiology** 47: 289-297.

Chung, S., Kwon, C. i Lee, J.-H. (2022): Epigenetic control of abiotic stress signaling in plants. **Genes & Genomics** 44: 267–278.

Colonna Romano, N. i Fantì, L. (2022): Transposable elements: Major players in shaping genomic and evolutionary patterns. **Cells** 11: 1048.

Cortijo, S., Charoensawan, V., Brestovitsky, A., Buning, R., Ravarani, C. i sur. (2017): Transcriptional regulation of the ambient temperature response by H2A.Z nucleosomes and HSF1 transcription factors in *Arabidopsis*. **Molecular Plant** 10: 1258–1273.

Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M. i Shinozaki, K. (2011): Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective. **BMC Plant Biology** 11: 163.

Creasey, K. M., Zhai, J., Borges, F., Van Ex, F., Regulski, M. i sur. (2014): miRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in *Arabidopsis*. **Nature** 508: 411-415.

Cuerda-Gil, D. i Slotkin, R. K. (2016): Non-canonical RNA-directed DNA methylation. **Nature Plants** 2: 16163.

Deng, P., Muhammad, S., Cao, M. i Wu, L. (2018): Biogenesis and regulatory hierarchy of phased small interfering RNAs in plants. **Plant Biotechnology Journal** 16: 965-975.

Deng, Y., Zhai, K., Xie, Z., Yang, D., Zhu, X. i sur. (2017): Epigenetic regulation of antagonistic receptors confers rice blast resistance with yield balance. **Science** 355: 962-965.

Erdmann, R. M. i Picard, C. L. (2020): RNA-directed DNA methylation. **PLOS Genetics** 16: e1009034.

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

Folsom, J. J., Begcy, K., Hao, X., Wang, D. i Walia, H. (2014): Rice *Fertilization-Independent Endosperm1* regulates seed size under heat stress by controlling early endosperm development. **Plant Physiology** 165: 238-248.

- Gao, Q.-M., Zhu, S., Kachroo, P. i Kachroo, A. (2015): Signal regulators of systemic acquired resistance. **Frontiers in Plant Science** 6: 228.
- Gayacharan i Joel, A. J. (2013): Epigenetic responses to drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). **Physiology and Molecular Biology of Plants** 19: 379-387.
- Gohlke, J., Scholz, C.-J., Kneitz, S., Weber, D., Fuchs, J. i sur. (2013): DNA methylation mediated control of gene expression is critical for development of crown gall tumors. **PLoS Genetics** 9: e1003267.
- Guo, Q., Liu, Q., Smith, N. A., Liang, G. i Wang, M.-B. (2016): RNA silencing in plants: Mechanisms, technologies and applications in horticultural crops. **Current Genomics** 17: 476-489.
- Halter, T., Wang, J., Amesefe, D., Lastrucci, E., Charvin, M. i sur. (2021): The Arabidopsis active demethylase ROS1 cis-regulates defence genes by erasing DNA methylation at promoter-regulatory regions. **ELife** 10: e62994.
- Han, S.-K., Wu, M.-F., Cui, S. i Wagner, D. (2015): Roles and activities of chromatin remodeling ATPases in plants. **The Plant Journal** 83: 62-77.
- Han, Z., Yu, H., Zhao, Z., Hunter, D., Luo, X. i sur. (2016): AtHD2D gene plays a role in plant growth, development, and response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Frontiers in Plant Science** 7: 310.
- Hatzig, S. V., Nuppenau, J.-N., Snowdon, R. J. i Schießl, S. V. (2018): Drought stress has transgenerational effects on seeds and seedlings in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). **BMC Plant Biology** 18: 297.
- He, X.-J., Chen, T. i Zhu, J.-K. (2011): Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. **Cell Research** 21: 442-465.
- He, X.-J., Hsu, Y.-F., Zhu, S., Wierzbicki, A. T., Pontes, O. i sur. (2009): An effector of RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis* is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. **Cell** 137: 498-508.
- Henikoff, S. i Smith, M. M. (2015): Histone variants and epigenetics. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology** 7: a019364.
- Hirsch, C. D. i Springer, N. M. (2017): Transposable element influences on gene expression in plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms** 1860: 157-165.
- Hofmeister, B. T., Denkena, J., Colomé-Tatché, M., Shahryary, Y., Hazarika, R. i sur. (2020): A genome assembly and the somatic genetic and epigenetic mutation rate in a wild long-lived perennial *Populus trichocarpa*. **Genome Biology** 21: 259.
- Hsu, P.-S., Yu, S.-H., Tsai, Y.-T., Chang, J.-Y., Tsai, L.-K. i sur. (2021): More than causing (epi)genomic instability: Emerging physiological implications of transposable element modulation. **Journal of Biomedical Science** 28: 58.
- Hu, Y., Lu, Y., Zhao, Y. i Zhou, D.-X. (2019): Histone acetylation dynamics integrates metabolic activity to regulate plant response to stress. **Frontiers in Plant Science** 10: 1236.

- Hu, Y., Zhang, L., He, S., Huang, M., Tan, J. i sur. (2012): Cold stress selectively unsilences tandem repeats in heterochromatin associated with accumulation of H3K9ac: Epigenetic regulation of knob during cold stress. **Plant, Cell & Environment** 35: 2130-2142.
- Hu, Z., Song, N., Zheng, M., Liu, X., Liu, Z. i sur. (2015): Histone acetyltransferase GCN5 is essential for heat stress-responsive gene activation and thermotolerance in *Arabidopsis*. **The Plant Journal** 84: 1178-1191.
- Huang, C.-Y. i Jin, H. (2022): Coordinated epigenetic regulation in plants: A potent managerial tool to conquer biotic stress. **Frontiers in Plant Science** 12: 795274.
- Huang, J., Yang, M. i Zhang, X. (2016): The function of small RNAs in plant biotic stress response: Small RNAs and biotic stress. **Journal of Integrative Plant Biology** 58: 312-327.
- Iqbal, Z., Iqbal, M. S., Hashem, A., Abd_Allah, E. F. i Ansari, M. I. (2021): Plant defense responses to biotic stress and its interplay with fluctuating dark/light conditions. **Frontiers in Plant Science** 12: 631810.
- Ivanova, Z., Minkov, G., Gisel, A., Yahubyan, G., Minkov, I. i sur. (2022): The multiverse of plant small RNAs: How can we explore it? **International Journal of Molecular Sciences** 23: 3979.
- Iwakawa, H. i Tomari, Y. (2013): Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. **Molecular Cell** 52: 591-601.
- Ji, L. i Chen, X. (2012): Regulation of small RNA stability: Methylation and beyond. **Cell Research** 22: 624-636.
- Jiang, B., Shi, Y., Zhang, X., Xin, X., Qi, L. i sur. (2017): PIF3 is a negative regulator of the *CBF* pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 114: 6695-6702.
- Jiang, D. i Berger, F. (2017): Histone variants in plant transcriptional regulation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms** 1860: 123-130.
- Kakoulidou, I., Avramidou, E. V., Baránek, M., Brunel-Muguet, S., Farrona, S. i sur. (2021): Epigenetics for crop improvement in times of global change. **Biology** 10: 766.
- Keçeli, B. N., Jin, C., Van Damme, D. i Geelen, D. (2020): Conservation of centromeric histone 3 interaction partners in plants. **Journal of Experimental Botany** 71: 5237-5246.
- Khan, A., Garbelli, A., Grossi, S., Florentin, A., Batelli, G. i sur. (2014): The *Arabidopsis* STRESS RESPONSE SUPPRESSOR DEAD-box RNA helicases are nucleolar- and chromocenter-localized proteins that undergo stress-mediated relocalization and are involved in epigenetic gene silencing. **The Plant Journal** 79: 28-43.
- Kidokoro, S., Hayashi, K., Haraguchi, H., Ishikawa, T., Soma, F. i sur. (2021): Posttranslational regulation of multiple clock-related transcription factors triggers cold-inducible gene expression in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 118: e2021048118.
- Kim, J.-S., Lim, J. Y., Shin, H., Kim, B.-G., Yoo, S.-D. i sur. (2019): ROS1-dependent DNA demethylation is required for ABA-inducible *NIC3* expression. **Plant Physiology** 179: 1810-1821.

- Kornberg, R. D. (1974): Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA: Chromatin structure is based on a repeating unit of eight histone molecules and about 200 DNA base pairs. **Science** 184: 868-871.
- Kumar, S. i Mohapatra, T. (2021): Dynamics of DNA methylation and its functions in plant growth and development. **Frontiers in Plant Science** 12: 596236.
- Kwon, C. S., Lee, D., Choi, G. i Chung, W.-I. (2009): Histone occupancy-dependent and -independent removal of H3K27 trimethylation at cold-responsive genes in *Arabidopsis*. **The Plant Journal** 60: 112-121.
- Lauss, K. i Keurentjes, J. J. B. (2018): QTLepi Mapping in *Arabidopsis thaliana*. U: Bemer, M. i Baroux, C. (ur.) *Methods in Molecular Biology: Plant Chromatin Dynamics*. New York, Springer, str. 373-394.
- Law, J. A., Du, J., Hale, C. J., Feng, S., Krajewski, K. i sur. (2013): Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1. **Nature** 498: 385-389.
- Law, J. A. i Jacobsen, S. E. (2010): Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nature Reviews Genetics** 11: 204-220.
- Lei, B. i Berger, F. (2020): H2A variants in *Arabidopsis*: Versatile regulators of genome activity. **Plant Communications** 1: 100015.
- Lei, M., Zhang, H., Julian, R., Tang, K., Xie, S. i sur. (2015): Regulatory link between DNA methylation and active demethylation in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 112: 3553-3557.
- Li, B., Carey, M. i Workman, J. L. (2007): The role of chromatin during transcription. **Cell** 128: 707-719.
- Li, S., Liu, J., Liu, Z., Li, X., Wu, F. i sur. (2014): *HEAT-INDUCED TASI TARGET1* mediates thermotolerance via HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR A1a-directed pathways in *Arabidopsis*. **The Plant Cell** 26: 1764-1780.
- Li, X., Jiang, Y., Ji, Z., Liu, Y. i Zhang, Q. (2015): BRHIS 1 suppresses rice innate immunity through binding to monoubiquitinated H2A and H2B variants. **EMBO Reports** 16: 1192-1202.
- Li, Y., Kumar, S. i Qian, W. (2018): Active DNA demethylation: Mechanism and role in plant development. **Plant Cell Reports** 37: 77-85.
- Liang, D., Zhang, Z., Wu, H., Huang, C., Shuai, P. i sur. (2014): Single-base-resolution methylomes of *Populus trichocarpa* reveal the association between DNA methylation and drought stress. **BMC Genetics** 15: S9.
- Lichtenthaler H. K. (1998): The stress concept in plants: An introduction. **Annals of the New York Academy of Sciences** 851: 187-198.
- Liu, C., Lu, F., Cui, X. i Cao, X. (2010): Histone methylation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology** 61: 395-420.
- Liu, H., Able, A. J. i Able, J. A. (2022): Priming crops for the future: Rewiring stress memory. **Trends in Plant Science** 27: 699-716.

- Liu, S., Lv, Z., Liu, Y., Li, L. i Zhang, L. (2018): Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics and Molecular Biology** 41: 624-637.
- Liu, X., Yang, S., Yu, C.-W., Chen, C.-Y. i Wu, K. (2016): Histone acetylation and plant development. U: Lin, C. i Luan, S. (ur.) The enzymes: Developmental signaling in plants. Academic Press, str. 172-199.
- Liu, X., Yu, C.-W., Duan, J., Luo, M., Wang, K. i sur. (2012): HDA6 directly interacts with DNA methyltransferase MET1 and maintains transposable element silencing in *Arabidopsis*. **Plant Physiology** 158: 119-129.
- Liu, Y., Teng, C., Xia, R. i Meyers, B. C. (2020): PhasiRNAs in plants: Their biogenesis, genic sources, and roles in stress responses, development, and reproduction. **The Plant Cell** 32: 3059-3080.
- Liu, Z., Hong, S.-W., Escobar, M., Vierling, E., Mitchell, D. L. i sur. (2003): *Arabidopsis UVH6*, a homolog of human *XPD* and yeast *RAD3* DNA repair genes, functions in DNA repair and is essential for plant growth. **Plant Physiology** 132: 1405-1414.
- Luna, E. i Ton, J. (2012): The epigenetic machinery controlling transgenerational systemic acquired resistance. **Plant Signaling & Behavior** 7: 615-618.
- Luo, M., Cheng, K., Xu, Y., Yang, S. i Wu, K. (2017): Plant responses to abiotic stress regulated by histone deacetylases. **Frontiers in Plant Science** 8: 2147.
- Makarevitch, I., Waters, A. J., West, P. T., Stitzer, M., Hirsch, C. N. i sur. (2015): Transposable elements contribute to activation of maize genes in response to abiotic stress. **PLoS Genetics** 11: e1004915.
- Mandal, M., Sarkar, M., Khan, A., Biswas, M., Masi, A. i sur. (2022): Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in plants – maintenance of structural individuality and functional blend. **Advances in Redox Research** 5: 100039.
- Mao, H., Wang, H., Liu, S., Li, Z., Yang, X. i sur. (2015): A transposable element in a NAC gene is associated with drought tolerance in maize seedlings. **Nature Communications** 6: 8326.
- March-Díaz, R., García-Domínguez, M., Lozano-Juste, J., León, J., Florencio, F. J. i sur. (2007): Histone H2A.Z and homologues of components of the SWR1 complex are required to control immunity in *Arabidopsis*: Histone H2A.Z and PIE1 control the SAR response. **The Plant Journal** 53: 475-487.
- Matzke, M. A. i Mosher, R. A. (2014): RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity. **Nature Reviews Genetics** 15: 394-408.
- Medina, J., Bargues, M., Terol, J., Pérez-Alonso, M. i Salinas, J. (1999): The *Arabidopsis CBF* gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. **Plant Physiology** 119: 463-470.
- Mehdi, S., Derkacheva, M., Ramström, M., Kraleman, L., Bergquist, J. i sur. (2016): The WD40 domain protein MSI1 functions in a histone deacetylase complex to fine-tune abscisic acid signaling. **The Plant Cell** 28: 42-54.
- Mengel, A., Ageeva, A., Georgii, E., Bernhardt, J., Wu, K. i sur. (2017): Nitric oxide modulates histone acetylation at stress genes by inhibition of histone deacetylases. **Plant Physiology** 173: 1434-1452.

- Miryeganeh, M. (2021): Plants' epigenetic mechanisms and abiotic stress. **Genes** 12: 1106.
- Mito, Y., Henikoff, J. G. i Henikoff, S. (2005): Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. **Nature Genetics** 37: 1090-1097.
- Mlynárová, L., Nap, J.-P. i Bisseling, T. (2007): The SWI/SNF chromatin-remodeling gene *AtCHR12* mediates temporary growth arrest in *Arabidopsis thaliana* upon perceiving environmental stress: Chromatin remodeling in growth response to stress. **The Plant Journal** 51: 874-885.
- Moldovan, D., Spriggs, A., Dennis, E. S. i Wilson, I. W. (2010): The hunt for hypoxia responsive natural antisense short interfering RNAs. **Plant Signaling & Behavior** 5: 247-251.
- Nie, X., Wang, H., Li, J., Holec, S. i Berger, F. (2014): The HIRA complex that deposits the histone H3.3 is conserved in *Arabidopsis* and facilitates transcriptional dynamics. **Biology Open** 3: 794-802.
- Nisa, M.-U., Huang, Y., Benhamed, M. i Raynaud, C. (2019): The plant DNA damage response: Signaling pathways leading to growth inhibition and putative role in response to stress conditions. **Frontiers in Plant Science** 10: 653.
- Nürnbergger, T. i Kemmerling, B. (2018): Pathogen-associated molecular patterns (PAMP) and PAMP-triggered immunity. U: Roberts, J. A. (ur.) Annual plant reviews: Molecular aspects of plant disease resistance. John Wiley & Sons, Ltd., str. 16-47.
- Over, R. S. i Michaels, S. D. (2014): Open and closed: The roles of linker histones in plants and animals. **Molecular Plant** 7: 481-491.
- Park, H. J., Kim, W.-Y., Park, H. C., Lee, S. Y., Bohnert, H. J. i sur. (2011): SUMO and SUMOylation in plants. **Molecules and Cells** 32: 305-316.
- Pfab, A., Breindl, M. i Grasser, K. D. (2018): The *Arabidopsis* histone chaperone FACT is required for stress-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes. **Plant Molecular Biology** 96: 367-374.
- Piquet, S., Le Parc, F., Bai, S.-K., Chevallier, O., Adam, S. i sur. (2018): The histone chaperone FACT coordinates H2A.X-dependent signaling and repair of DNA damage. **Molecular Cell** 72: 888-901.
- Pontvianne, F., Blevins, T. i Pikaard, C. S. (2010): *Arabidopsis* histone lysine methyltransferases. U: Kader, J.-C. i Delseny, M. (ur.) Advances in botanical research: Volume 53. Elsevier, str. 1-22.
- Popova, O. V., Dinh, H. Q., Aufsatz, W. i Jonak, C. (2013): The RdDM pathway is required for basal heat tolerance in *Arabidopsis*. **Molecular Plant** 6: 396-410.
- Ramirez-Prado, J. S., Latrasse, D., Rodriguez-Granados, N. Y., Huang, Y., Manza-Mianza, D. i sur. (2019): The Polycomb protein LHP 1 regulates *Arabidopsis thaliana* stress responses through the repression of the MYC 2-dependent branch of immunity. **The Plant Journal** 100: 1118-1131.
- Ramirez-Prado, J. S., Piquerez, S. J. M., Bendahmane, A., Hirt, H., Raynaud, C. i sur. (2018): Modify the histone to win the battle: Chromatin dynamics in plant-pathogen interactions. **Frontiers in Plant Science** 9: 355.
- Ritonga, F. N. i Chen, S. (2020): Physiological and molecular mechanism involved in cold stress tolerance in plants. **Plants** 9: 560.
- Rosa, S. i Shaw, P. (2013): Insights into chromatin structure and dynamics in plants. **Biology** 2: 1378-1410.

- Rutowicz, K., Puzio, M., Halibart-Puzio, J., Lirski, M., Kroteń, M. A. i sur. (2015): A specialized histone H1 variant is required for adaptive responses to complex abiotic stress and related DNA methylation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology** 169: 2080-2101.
- Saez, A., Rodrigues, A., Santiago, J., Rubio, S. i Rodriguez, P. L. (2008): HAB1–SWI3B interaction reveals a link between abscisic acid signaling and putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes in *Arabidopsis*. **The Plant Cell** 20: 2972-2988.
- Schramm, F., Larkindale, J., Kiehlmann, E., Ganguli, A., English i sur. (2007): A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of *Arabidopsis*: Role of *Arabidopsis* HsfA3. **The Plant Journal** 53: 264-274.
- Singh, D. i Laxmi, A. (2015): Transcriptional regulation of drought response: A tortuous network of transcriptional factors. **Frontiers in Plant Science** 6: 895.
- Singh, J., Mishra, V., Wang, F., Huang, H.-Y. i Pikaard, C. S. (2019): Reaction mechanisms of Pol IV, RDR2, and DCL3 drive RNA channeling in the siRNA-directed DNA methylation pathway. **Molecular Cell** 75: 576-589.
- Sun, C., Ali, K., Yan, K., Fiaz, S., Dormatey, R. i sur. (2021): Exploration of epigenetics for improvement of drought and other stress resistance in crops: A review. **Plants** 10: 1226.
- Sura, W., Kabza, M., Karlowski, W. M., Bieluszewski, T., Kus-Slowinska, M. i sur. (2017): Dual role of the histone variant H2A.Z in transcriptional regulation of stress-response genes. **The Plant Cell** 29: 791-807.
- Tang, K., Lang, Z., Zhang, H. i Zhu, J.-K. (2016): The DNA demethylase ROS1 targets genomic regions with distinct chromatin modifications. **Nature Plants** 2: 16169.
- Theocharis, A., Clément, C. i Barka, E. A. (2012): Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. **Planta** 235: 1091-1105.
- Tsuzuki, M., Sethuraman, S., Coke, A. N., Rothi, M. H., Boyle, A. P. i sur. (2020): Broad noncoding transcription suggests genome surveillance by RNA polymerase V. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 117: 30799-30804.
- Ueda, M., Matsui, A., Nakamura, T., Abe, T., Sunaoshi, Y. i sur. (2018): Versatility of HDA19-deficiency in increasing the tolerance of *Arabidopsis* to different environmental stresses. **Plant Signaling & Behavior** 13: e1475808.
- Virdi, K. S., Laurie, J. D., Xu, Y.-Z., Yu, J., Shao, M.-R. i sur. (2015): *Arabidopsis* MSH1 mutation alters the epigenome and produces heritable changes in plant growth. **Nature Communications** 6: 6386.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J. i sur. (2017): Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: A review on current knowledge and future prospects. **Frontiers in Plant Science** 8: 161.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M. i Foolad, M. (2007): Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany** 61: 199-223.
- Wang, J., Mei, J. i Ren, G. (2019): Plant microRNAs: Biogenesis, homeostasis, and degradation. **Frontiers in Plant Science** 10: 360.

- Wang, P., Xue, L., Batelli, G., Lee, S., Hou, Y.-J. i sur. (2013): Quantitative phosphoproteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 110: 11205-11210.
- Wang, Z., Casas-Mollano, J. A., Xu, J., Riethoven, J.-J. M., Zhang, C. i sur. (2015): Osmotic stress induces phosphorylation of histone H3 at threonine 3 in pericentromeric regions of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 112: 8487-8492.
- Wei, X., Ke, H., Wen, A., Gao, B., Shi, J. i sur. (2021): Structural basis of microRNA processing by Dicer-like 1. **Nature Plants** 7: 1389-1396.
- Wierzbicki, A. T., Haag, J. R. i Pikaard, C. S. (2008): Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. **Cell** 135: 635-648.
- Williams, B. P., Pignatta, D., Henikoff, S. i Gehring, M. (2015): Methylation-sensitive expression of a DNA demethylase gene serves as an epigenetic rheostat. **PLOS Genetics** 11: e1005142.
- Wollmann, H., Stroud, H., Yelagandula, R., Tarutani, Y., Jiang, D. i sur. (2017): The histone H3 variant H3.3 regulates gene body DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. **Genome Biology** 18: 94.
- Wongpalee, S. P., Liu, S., Gallego-Bartolomé, J., Leitner, A., Aebersold, R. i sur. (2019): CryoEM structures of *Arabidopsis* DDR complexes involved in RNA-directed DNA methylation. **Nature Communications** 10: 3916.
- Wu, C., Bassett, A. i Travers, A. (2007): A variable topology for the 30-nm chromatin fibre. **EMBO Reports** 8: 1129-1134.
- Wu, J., Ichihashi, Y., Suzuki, T., Shibata, A., Shirasu, K. i sur. (2019): Abscisic acid-dependent histone demethylation during postgermination growth arrest in *Arabidopsis*. **Plant, Cell & Environment** 42: 2198-2214.
- Yang, L., Lang, C., Wu, Y., Meng, D., Yang, T. i sur. (2022): ROS1-mediated decrease in DNA methylation and increase in expression of defense genes and stress response genes in *Arabidopsis thaliana* due to abiotic stresses. **BMC Plant Biology** 22: 104.
- Yang, R., Hong, Y., Ren, Z., Tang, K., Zhang, H. i sur. (2019): A Role for PICKLE in the regulation of cold and salt stress tolerance in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science** 10: 900.
- Yelagandula, R., Stroud, H., Holec, S., Zhou, K., Feng, S. i sur. (2014): The histone variant H2A.W defines heterochromatin and promotes chromatin condensation in *Arabidopsis*. **Cell** 158: 98-109.
- Zhang, H., Lang, Z. i Zhu, J.-K. (2018): Dynamics and function of DNA methylation in plants. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 19: 489-506.
- Zhang, H., Ma, Z.-Y., Zeng, L., Tanaka, K., Zhang, C.-J. i sur. (2013): DTF1 is a core component of RNA-directed DNA methylation and may assist in the recruitment of Pol IV. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 110: 8290-8295.
- Zhang, W., Gao, S., Zhou, X., Chellappan, P., Chen, Z. i sur. (2011): Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. **Plant Molecular Biology** 75: 93-105.

- Zhao, J., Lu, Z., Wang, L. i Jin, B. (2020): Plant responses to heat stress: Physiology, transcription, noncoding RNAs, and epigenetics. **International Journal of Molecular Sciences** 22: 117.
- Zhong, X., Du, J., Hale, C. J., Gallego-Bartolome, J., Feng, S. i sur. (2014): Molecular mechanism of action of plant DRM *de novo* DNA methyltransferases. **Cell** 157: 1050-1060.
- Zhou, C., Zhang, L., Duan, J., Miki, B. i Wu, K. (2005): *HISTONE DEACETYLASE19* is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in *Arabidopsis*. **The Plant Cell** 17: 1196-1204.
- Zhou, M., Coruh, C., Xu, G., Martins, L. M., Bourbousse, C. i sur. (2022): The CLASSY family controls tissue-specific DNA methylation patterns in *Arabidopsis*. **Nature Communications** 13: 244.
- Zhou, Y., Romero-Campero, F. J., Gómez-Zambrano, Á., Turck, F. i Calonje, M. (2017): H2A monoubiquitination in *Arabidopsis thaliana* is generally independent of LHP1 and PRC2 activity. **Genome Biology** 18: 69.
- Zhu, Y., Hu, X., Duan, Y., Li, S., Wang, Y. i sur. (2020): The *Arabidopsis* nodulin homeobox factor AtNDX interacts with AtRING1A/B and negatively regulates abscisic acid signaling. **The Plant Cell** 32: 703-721.
- Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T. i Henikoff, S. (2008): Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. **Nature** 456: 125-129.

8. Životopis

Miran Grgić rođen je 2000. godine u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole upisuje Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga, smjer Prirodoslovna gimnazija. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja uspješno sudjeluje na brojnim natjecanjima u organizaciji Agencije za odgoj i obrazovanje, od čega se izdvaja osvojeno 3. mjesto na Državnom natjecanju iz biologije u kategoriji četvrtih razreda. Nakon završenoga srednjoškolskog obrazovanja upisuje Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, smjer Molekularna biologija. Laboratorijsku stručnu praksu odradio je u laboratoriju za fiziologiju bilja pod mentorstvom prof. dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek i pod neposrednim vodstvom Sandre Vitko, mag. biol. Dobitnik je Stipendije Sveučilišta u Zagrebu u kategoriji izvrsnih studenata u akademskoj godini 2021./2022. Zanimaju ga teme vezane za biljnu genetiku i metabolizam. Tečno se služi engleskim jezikom u govoru i pismu. U slobodno vrijeme voli kuhanje, duge šetnje prirodom i odlazak na pub kvizove.