



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Luka ŠTRASNER

## **EPIGENETSKE LASTNOSTI PRI RASTLINAH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Luka ŠTRASNER

**EPIGENETSKE LASTNOSTI PRI RASTLINAH**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**EPIGENETIC TRAITS IN PLANTS**

B. SC. THESIS  
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2017

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija Kmetijstvo – agronomija – 1. stopnja. Delo je bilo opravljeno na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Jerneja Jakšeta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Metka Hudina  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Jernej Jakše  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Štajner Nataša  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 15. 9. 2017

Podpisani izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na Univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Luka Štrasner

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 575:577.2(043.2)
- KG epigenetika/rastline/vernalizacija/metilacija/genska regulacija
- AV ŠTRASNER, Luka
- SA JAKŠE, Jernej (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Univerzitetni študijski program prve stopnje Kmetijstvo - agronomija
- LI 2016
- IN EPIGENETSKE LASTNOSTI PRI RASTLINAH
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP V, 18 str., 2 sl., 15 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V prvi polovici 20. stol. sta bili genetika in razvojna biologija ločeni disciplini. Besedo »epigenetika« je prvi uporabil Conrad Waddington leta 1942. Skoval jo je iz grške besede »epigenesis«, ki je izvirno pomenila vpliv genetskih procesov na razvoj. Danes epigenetsko regulacijo genov lahko definiramo kot spremembe v genski aktivnosti, ki se dedujejo skozi mitotske in/ali mejotske celične cikle brez sprememb v zaporedju DNA. Vsaj trije biološki sistemi, med njimi DNA metilacija, modifikacija histonov in z nekodirajočimi RNA-povezano gensko utišanje, začenjajo, vzdržujejo ali spreminjajo epigenetske zapise. Ker epigenetske spremembe niso povezane s spremembami v zaporedju DNA, je njihovo dedovanje povezano z možnostjo določene stopnje reverzibilnosti. Ta stopnja pa je odvisna od posameznega mehanizma, ki je epigenetske spremembe povzročil. Primer epigenetske genske regulacije pri rastlinah je vernalizacija – sposobnost rastline, da razvije generativne organe pod vplivom nizkih temperatur. Pred vernalizacijo, je cvetenje zavrto z ekspresijo gena FLC (Flowering Locus C). Ko je rastlina nekaj časa izpostavljena nizkim temperaturam, se ekspresija gena FLC utiša skozi modifikacijo strukture kromatina na tem genskem lokusu.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 575:577.2(043.2)
- CX epigenetics/plants/vernalisation/methylation/gene regulation
- AU ŠTRASNER, Luka
- AA JAKŠE, Jernej (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy, Academic Study Programme in Agriculture - Agronomy
- PY 2016
- TI EPIGENETIC TRAITS IN PLANTS
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO V, 18 p., 2 fig., 15 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In the first half of the 20th century, genetics and developmental biology were considered separate disciplines. The word "epigenetics" was coined by Conrad Waddington in 1942. He formed it from the Greek word "epigenesis", which initially stood for the effect of genetic processes on development. Today the epigenetic regulation of genes can be defined as changes in gene activity, which are inherited through mitotic and/or meiotic cell cycles, without changes in DNA sequence. It is currently considered that at least three biological systems start, maintain, or alter epigenetic code; including DNA methylation, histone modification, and gene silencing with implementation of non-coding RNA. Since epigenetic alterations are not tied to changes in DNA sequence, the inheritance thereof is connected to a probability of reversibility to a certain degree. The aforementioned degree, however, relies on the very same mechanism that caused the epigenetic changes. An example of plant's epigenetic gene regulation is vernalization – the ability of a plant to develop generative organs when influenced by low temperatures. Before vernalization, flowering is suppressed with the expression of the FLC gene (Flowering Locus C). After the plant has been exposed to low temperatures for some time, the expression of the FLC gene is silenced through the modification of chromatin structure in this gene locus.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 ZGODOVINA EPIGENETIKE</b>	<b>2</b>
2.1 ZAČETKI	2
2.2 EPIGENETIKA DANES	6
<b>3 RASTLINSKA EPIGENETIKA</b>	<b>6</b>
3.1 TRIJE TEMELJI EPIGENETIKE	7
<b>3.1.1 DNA metilacija</b>	<b>7</b>
<b>3.1.2 Histoni, modifikacije histonov in kromatinske strukture</b>	<b>9</b>
<b>3.1.3 RNA</b>	<b>10</b>
<b>3.1.4 Sestavljanje epigenetske sestavljanke</b>	<b>12</b>
<b>4 VERNALIZACIJA</b>	<b>14</b>
4.1 ZAHTEVE ZA VERNALIZACIJO	14
4.2 GENETSKI ORIS POTI VERNALIZACIJE	14
4.3 DVE FAZI VERNALIZACIJE	15
4.4 PONASTAVITEV FLC-ja V NASLEDNJI GENERACIJI	16
4.5 NEKODIRAJOČA RNA IN VERNALIZACIJA	16
<b>5 SKLEPI</b>	<b>17</b>
<b>6 VIRI</b>	<b>18</b>
ZAHVALA	

## KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Waddingtonova epigenetska pokrajina	3
Slika 2: Interakcije pod epigenetsko pokrajino	3

## 1 UVOD

V zadnjem desetletju smo bili priča neverjetni revoluciji na področju molekularne genetike. Ta revolucija je bila osnovana na mnogih opazovanjih, ki so nakazovala na dejstvo, da DNA zaporedje ni edini nosilec informacije, potrebne za oblikovanje fenotipa organizma. Že dolgo je znano, da obstajajo mnoge izjeme od »normalne« Mendlove genetike, ki so se upirale razlagi s konvencionalno teorijo, npr. paramutacija, prvič definirana v 50. letih prejšnjega stoletja.

Zdaj so se tem izjemam pridružili na novo odkriti pojavi, ki se ne obnašajo po Mendlovih zakonih. Med njimi najbolj pomembno je utišanje transgenih zaporedij v rastlinah, kjer so bila nova DNA zaporedja dodana genomu organizma. Ta opažanja so postavila pod vprašaj klasičen pogled na fenotip kot sistem, narekovan izključno z zaporedjem DNA nukleotidnega zapisa za proteine. Iskanje odgovora na vprašanje, zakaj obstajajo te izjeme Mendlovih zakonov in iskanje mehanizmov in pravil vedenja teh pojavov so prinesla zanimive rezultate.

Moderni molekularni biologi imajo dostop do mnogih celotnih genomskih zaporedij več pomembnih vrst, med njimi tudi mnogih vrst poljščin in ostalih rastlin. Da bi lahko v popolnosti razumeli naravno zgodovino organizma in njegov potencial za spremembo v naravni selekciji, zahteva razumevanje regulacije teh genomov med rastjo, diferenciacijo in razmnoževanjem.

Zdaj razumemo, da na te procese v ključnih trenutkih vpliva epigenom, ki diktira organizacijo genoma, njegovo izražanje in popravila. Ta je v interakciji z omrežjem regulacije genov, proteinov in metabolitov med evkariontskim razvojem. Mnoga osnovna spoznanja o mehanizmih epigenetske regulacije izhajajo iz raziskav, opravljenih na rastlinah, večkrat med raziskavo pojavov, ki so bili v začetku obravnavani zgolj kot zanimivosti, njihov pomen pa je postal jasen šele kasneje. Med takšna odkritja spadajo tako transpozoni, kot nukleolarna dominanca, paramutacija, in inducibilno gensko utišanje, ki je pripeljalo do odkritja interferenčne RNA (RNAi).

V diplomskem delu bom opisal zgodovino epigenetike, temelje, na katerih epigenetski mehanizmi slonijo in njihove medsebojne interakcije. Posebno pozornost bom namenil procesu vernalizacije – promociji cvetenja po obdobju nizkih temperatur. Z razpoložljivo literaturo bom poskušal odgovoriti na vprašanja: kaj je epigenetika, kako se je kot panoga razvijala skozi zgodovino, kaj termin epigenetika pomeni danes in kako vernalizacija poteka.



## 2 ZGODOVINA EPIGENETIKE

### 2.1 ZAČETKI

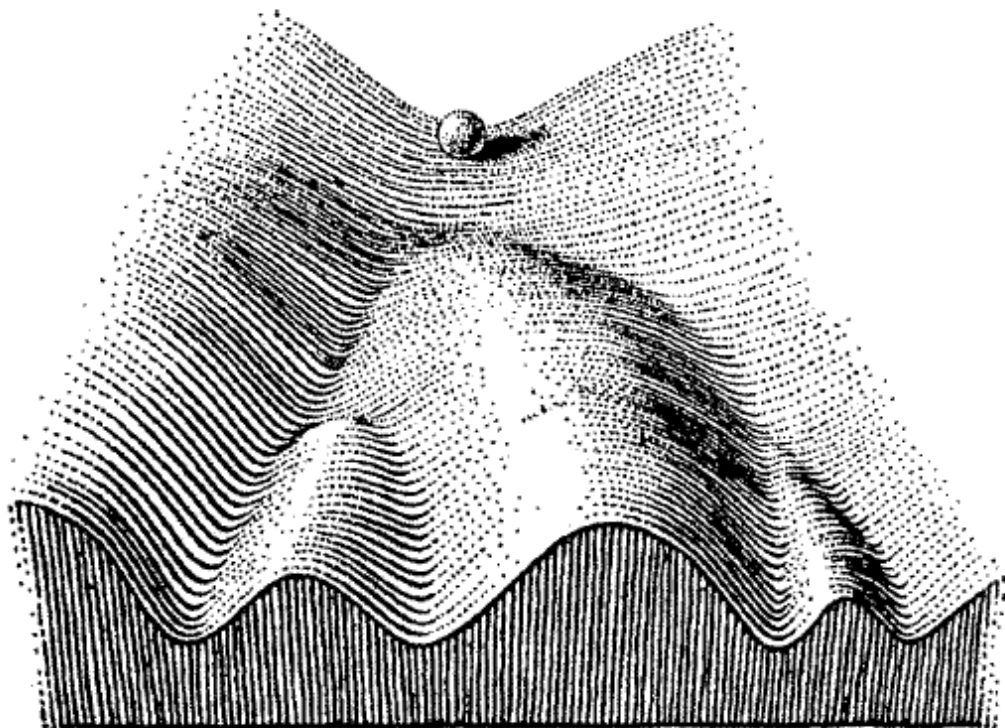
Vodilni biologi 19. stol. so verjeli, da sta dedni material in razvoj neločljivo povezana. Gregor Mendel je bil prvi, ki je ugotovil in nato tudi demonstriral, da je dedovanje možno preučevati ločeno, brez razvoja. Njegove raziskave so bile v njegovem času v veliki meri spregledane, ko pa so bile čez 35 let ponovno odkrite, se je znanost genetike res razcvetela (Holliday, 2006).

Medtem ko je študij genetike napredoval s svetlobno hitrostjo, so embriologi in razvojni biologi še vedno uporabljali postopke in metode, ki niso upoštevali vpliva genov. Proti sredini dvajsetega stoletja je bilo nekaj biologov, ki so ugotovili, da sta genetika in razvojna biologija povezani in bi morali biti sčasoma združeni v eno disciplino. Eden izmed teh biologov je bil Conrad Waddington, ki je dobro poznal obe disciplini. Uporabil je grško besedo »epigenesis«, teorijo razvoja, ki pravi da je embrij v zgodnji stopnji razvoja nediferenciran in jo spremenil v »epigenetics«. Bil je profesor genetike na univerzi v Edinbourghu in tudi prvi, ki je sestavil skupino za raziskovanje epigenetike (Holliday, 2006).

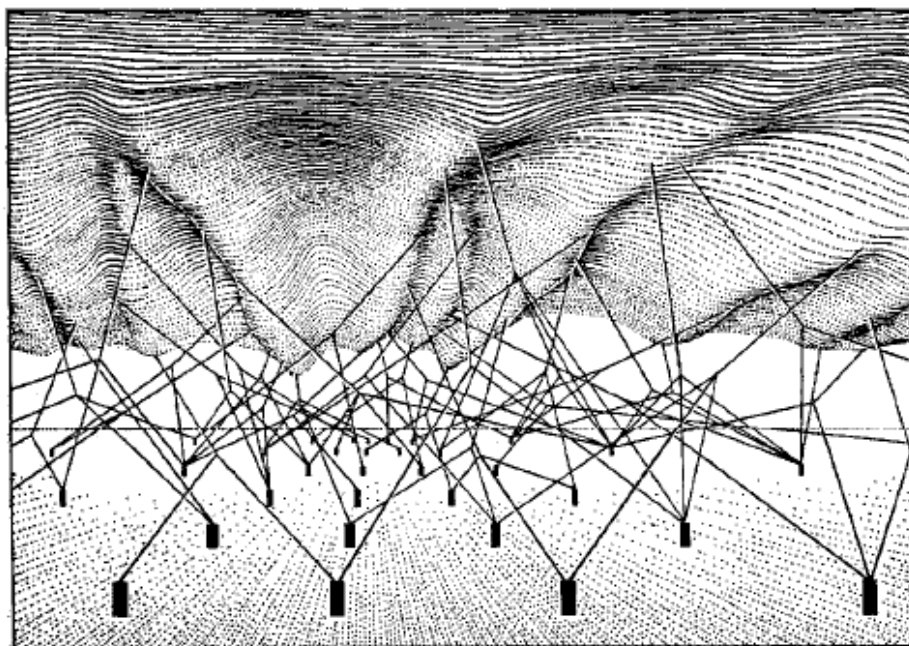
Epigenetika bi bila lahko definirana kot odvijanje genetskega programa za razvoj, vendar za Waddingtona ni bila daleč od embriologije. Njegov pogosto citirani model »epigenetske pokrajine«, ki prikazuje različne razvojne poti, katerim bi celica lahko sledila med diferenciacijo, pripisuje ogromno vlogo genom, ki pokrajino oblikujejo. Po Waddingtonu prisotnost oz. odsotnost določenih genov določi, kateri poti bo celica sledila med diferenciacijo (Deichmann, 2016).

Primeri te »epigenetske pokrajine« sta prikazana na Sliki 1 in 2. Na Sliki 1 rahlo valovit greben predstavlja oplojeno jajčece, pot, ki ji bo žogica sledila, pa predstavlja razvojno pot od oplojenega jajčeca do specifičnega tkiva ali organa na koncu doline. Pot, višina in naklon doline so pod vplivom genov in njihovih interakcij. Te je prikazal kot serijo podpornih palic (genov) in vrvi (reprezentacija »kemičnih teženj« genov), ki oblikujejo pokrajino na Sliki 2. Skozi ta model je Waddington hotel prikazati, da ni preprostih povezav med geni in fenotipom, saj če katerikoli izmed genov mutira, in posledično popusti eno izmed vrvi, rezultat ne bo odvisen zgolj od tega gena, temveč tudi od vseh ostalih (Jablonka in Lamb, 2002).

Čeprav morfologija kromosoma nakazuje, da vse somatske celice vsebujejo vse kromosome, takrat še ni bilo očitno, da vse somatske celice vsebujejo identičen DNA zapis, kot je prisoten v oplojenem jajčecu. Šele z nadaljnjim delom biologov, med njimi tudi Watsona in Cricka, t. j. njune rešitve DNA strukture v letu 1953, se je začela počasi oblikovati ta rešitev. Kljub temu sta še leta 1970 Laskey in Gurdon zapisala, da so potrebni dodatni dokazi, da somatska celica odrasle živali vsebuje še kakšne druge gene poleg tistih, ki so nujno potrebni za njihovo rast in diferenciacijo (Falsenfield, 2014).



Slika 1: Waddingtonova epigenetska pokrajina (Jablonka in Lamb, 2002)



Slika 2: Interakcije pod epigenetsko pokrajino (Jablonka in Lamb, 2002)

Drugi biolog, ki se je ukvarjal tako z genetiko kot razvojno biologijo, je bil Ernst Hadorn v Zürichu. Mnoge njegove raziskave so se osredotočale na mutacije, ki vplivajo na razvoj vinske mušice iz rodu *Drosophila*, prav tako je napisal knjigo z naslovom *Developmental Genetics and Lethal Factors*. Vrsto let je delal na preučevanju imaginalnih diskov vinskih mušic. To so regije embriotičnega tkiva, prisotnega pri stadiju ličinke. Vsak imaginalni disk se kasneje razvije v specifično strukturo, po dva za vsako krilo, dva za tipalke itd. Te celice so nediferencirane, vendar pa bi lahko rekli, da so determinirane za kasnejšo diferenciacijo (Holliday, 2006). Tudi po transplantaciji in ponovnem gojenju v naslednjih generacijah vinskih mušic so te celice ohranile njihove za imaginalni disk specifične vzorce diferenciacije po prenosu na ličinke (Falsenfield, 2014).

Waddington in Hadorn nista bila edina znana biologa, ki sta hotela premostiti razlike med genetiko in razvojno biologijo. Vendar je vsak avtor imel svojo idejo o pomenu epigenetike in nihče ni predlagal dejanskega mehanizma. Pomen dela teh dveh biologov je v poskusu združitve interakcije genov z razvojem v okolju, v katerem večina genetikov in razvojnih biologov ni govorila drug z drugim (Holliday, 2006).

Waddingtonova epigenetika je bila drugačna od razvojne genetike. Obe panogi sta se ukvarjali z istimi procesi, vendar iz drugačnih zornih kotov. Tradicionalno so razvojni genetiki raziskovali genetske razlike, ki so razjasnile procese v razvoju embrija. Zamenjali so, na primer, mutiran gen z normalnim, opazovali, kako je to vplivalo na razvoj, in poskušali ugotoviti, kakšen vpliv ima ta gen. Iskali so povezavo (coupling) med genotipsko in fenotipsko variacijo. Pristop, ki so ga uporabili Waddington in ostali, je bil malce drugačen. Seveda so prepoznali pomembnost raziskav učinkov genotipske na fenotipsko variacijo, vendar je bil to za njih le del epigenetike. Hoteli so tudi razumeti, zakaj tako pogosto genotipska in fenotipska variacija nista povezani. Z drugimi besedami, zanimali so jih primeri, pri katerih genotipska variacija ne vodi do fenotipske in pri katerih fenotipske razlike niso povezane z genskimi razlikami (Jablonka in Lamb, 2002).

Večina genetskih variacij in mnoge na novo inducirane mutacije imajo majhen vpliv na fenotip ali pa ga sploh nimajo. Enako velja za okoljske variacije; večina jih nima vpliva na končni izgled živali. Razvoj običajno vodi do enakega že vnaprej definiranega izida ne glede na genske variacije in okoljske dejavnike. V Waddingtonovi terminologiji je razvoj usmerjen, kar je posledica naravne selekcije genov, katerih aktivnost in interakcije ustvarijo globoke in strme doline v njegovem modelu epigenetske pokrajine (Jablonka in Lamb, 2002).

Fenotipska plastičnost je drug primer tega – genetsko identične celice ali organizmi lahko variirajo do velike stopnje v strukturi in funkciji. Pri rastlinah se izkaže to kot možnost genotipa, da se izrazi fenotipsko različno v različnih okoljih. Celice v jetrih, ledvicah in koži so fenotipsko različne, njihove hčerinske celice pa dedujejo starševski fenotip, tukaj gre za epigenetsko variabilnost, ne genetsko. Prav tako so razlike med čebelo delavko in matico epigenetsko pogojene, saj je od prehrane ličinke odvisno, v kaj se bo razvila, ne pa od genotipa (Zhang in sod., 2013).

Čeprav sta usmerjenost in fenotipska plastičnost na diametralno nasprotni strani fenotipskih sprememb, jima je skupno, da je fenotipska variabilnost neodvisna (uncoupled)

od genetske. Prepoznavanje tega dejstva je bilo ključnega pomena za epigenetske raziskave (Jablonka in Lamb, 2002).

Razlika med epigenetiko in razvojno genetiko je bila torej v poudarku, epigenetika se je osredotočala na kompleksno razvojno omrežje z mnogimi mehanizmi, medtem ko je razvojno genetiko bolj zanimala hierarhija korakov, ki so peljali od gena do njegovega vpliva na fenotip. Dandanes je situacija drugačna. Večina razvojnih biologov govori in razmišlja v smislu kompleksnih genskih omrežij in interakcij, in posledično je epigenetska perspektiva v veliki meri zamenjala klasično razvojno genetiko. Pa vendar bi bilo zmotno enačiti epigenetiko z razvojno biologijo, ker je le-ta veliko širša disciplina, in zajema tako embriologijo, regeneracijo, rast in staranje. Čeprav se vsi ti procesi odvijajo na podlagi genov, je še vedno mogoče raziskovati mnoge pomembne vidike razvoja, ne da bi skrbeli za gene, še posebno, če se osredotočamo na višje stopnje organizacije organizmov. Epigenetika je vsekakor del razvojne biologije, nov pogled nanjo in njeno raziskovanje, nikakor pa ji ni sinonim (Jablonka in Lamb, 2002).

V ozadju razmišljanja Waddingtona, Hadorna in ostalih začetnikov epigenetike je bila evolucija. Zanimala jih je evolucija razvojnih mehanizmov: izvor stikal med alternativnimi fenotipi in evolucijske poti, ki pripeljejo do povečane ali zmanjšane usmerjenosti in fenotipske plastičnosti. Epigenetika je bila del evolucijske teorije, ne zgolj embriologije. Poizkus, ki ga je Waddington delal na lastnostih imaginalnih diskov, je znan primer aplikacije epigenetskega pristopa k evoluciji. Soroden raziskovalni program, ki v zadnjem času pridobiva na popularnosti, so raziskave fenotipov v različnih okoljih. Epigenetika po Waddingtonovo se torej nanaša na mnoge različne veje biologije; stoji na križišču razvojne biologije in genetike, z vplivom ekologije in pa seveda evolucijske biologije (Jablonka in Lamb, 2002).

Sčasoma je postalo jasno, da nekatere osnovne funkcije razvoja zahtevajo razlago. Eno izmed takih je dejstvo, da diferencirane celice, kot npr. fibroblasti ali limfociti, vzdržujejo svoj fenotip skozi celično delitev. To pomeni, da so nekateri specializirani geni, ki določajo fenotip diferenciranih celic, trajno vključeni, medtem ko so ostali geni – aktivni v drugih tipih celic – trajno utišani. Te kontrole so dedne, prav tako kot je determinirano stanje celic imaginalnih diskov pri vinski mušici dedno. Tradicionalno se dednost nanaša na prenos genov iz generacije v generacijo, tu pa je bilo ugotovljeno, da obstaja tudi mitotska dednost izražanja genov oz. genske aktivnosti v somatskih celicah višjih organizmov. Takšno dedovanje je bilo že precej nazaj opaženo pri kvasovkah in glivah ne pa pri somatskih celicah višjih organizmov s specializiranimi fenotipi. Še ena značilnost višjih organizmov so zarodne celice. Tu se nediferencirana celica deli, nastaneta ena diferencirana celica in ena nediferencirana. V primeru zarodnih celic kostnega mozga te celice proizvajajo različne tipe krvnih celic (Holliday, 2006).

Tretji primer je X kromosom sesalcev ženskega spola. Zgodaj v razvoju je en X kromosom naključno utišan v vsaki celici, drugi pa ostane aktiven, kar imenujemo inaktivacija X kromosoma. Ta dva kromosoma imata skoraj identični DNA zaporedji, nahajata se v skupni citoplazmi, tako da so razlike v genski aktivnosti omejene na kromosom sam. Ta mehanizem se sproži zgodaj v razvoju, in posledično je en X kromosom utišan, drugi pa ne. Utišanje je naključno in ko se enkrat zgodi, je ireverzibilno. To je popoln primer tako

mehanizma, ki deluje kot stikalo, kot zmožnosti dedovanja tega stikala (Griffith in sod., 2008).

Seveda obstajajo poti, po katerih lahko DNA somatskih celic variira od DNA reproduktivnih celic z učinkom na celični fenotip. Transpozoni na primer, lahko spremenijo ekspresijo v somatskih celicah, kar je dokazala Barbara McClintock, ki je prejela Nobelovo nagrado leta 1983 (Falsenfield, 2014).

## 2.1 EPIGENETIKA DANES

Do konca 20. stol. je epigenetika postala široko priznana poddisciplina biologije, za mnoge ljudi pa kar sinonim za »epigenetsko dedovanje«. Definicija epigenetike v reviji Science leta 2001 je govorila o epigenetiki kot o raziskavi sprememb v genski funkciji, ki so mitotsko in/ali mejotsko dedne in niso povzročene s strani spremembe DNA zaporedja. Tudi kot definicija epigenetskega dedovanja je v takšni obliki problematična, saj ne vključuje razvojnih sprememb, ki lahko spremenijo funkcijo genov skozi reorganizacijo DNA (npr. spremembe v genih imunskega sistema sesalcev in mnoge druge) (Jablonka in Lamb, 2002).

Na splošno se genetiki dandanes ukvarjajo s prenašanjem in obravnavanjem informacij, zapisanih v DNA, medtem ko se epigenetiki ukvarjajo z njihovo interpretacijo in dopolnitvijo z informacijami iz ostalih virov. Epigenetika se ukvarja s sistemom interakcij, ki vodi do predvidljivega in običajno funkcionalnega fenotipa; vključuje procese spontane samoorganizacije, ki so odvisni od fizičnih in kemičnih lastnosti notranjih in zunanjih okolij, tako kot tudi razvitih mehanizmov, vezanih na gene (Jablonka in Lamb, 2002).

Ker ne obstaja konsenz o tem, kaj beseda epigenetika pomeni, so znanstveniki že predlagali, da bi jo preprosto opustili, ker da epigenetika v Waddingtonovem smislu in moderna epigenetika nimata kaj dosti skupnega, zato nadaljnja uporaba besede neizogibno vodi do zmede. Zato bi bilo bolje, da bi govorili o nukleinski, epinukleinski in extranukleinskih informacijah kot pa o epigenetskih informacijah (Jablonka in Lamb, 2002)

Res je epigenetika danes precej drugačna od Waddingtonove, toda podobno velja tudi za mnoge druge termine v biologiji, vključujoč Johanssenov »gen« in Batesonovo »genetiko«, pa jih še vedno uporabljamo. Uporaben vidik epigenetike je, da je bil termin epigenetika vedno povezan z interakcijami genov, njihovih produktov, notranjega in zunanjega okolja, kakor s samostojnimi vidiki regulacije razvoja. Zato obstaja kontinuiteta med Waddingtonovo epigenetiko in današnjo: obe se osredotočata na alternative razvojnih poti, na razvojno omrežje pod stabilnostjo in fleksibilnostjo in na vpliv okoljskih dejavnikov na celice in organizme (Jablonka in Lamb, 2002).

## 3 RASTLINSKA EPIGENETIKA

Rastline so mojstrice epigenetske regulacije. Vsi pomembnejši epigenetski mehanizmi, za katere vemo, da se pojavljajo v evkariontih, so najdeni pri rastlinah in veliko bolj raziskani kot pri ostalih organizmih. DNA metilacija se odvija na CG, CHG, in CHH zaporedjih, v vzorcih, ki odražajo ravnotežje med encimi, ki metilacijo vzpostavijo, vzdržujejo in

prekinejo. Tako kot pri ostalih evkariontih histon-modificirajoči encimi vplivajo na epigenetska stanja v rastlinah. Utišanje genov z RNA je doseženo z mnogimi različnimi potmi, za boj proti virusom, orkestriran razvoj in za organizacijo genoma. Povezave med DNA metilacijo, modifikacijo histonov in nekodirajočimi RNA-ji zagotavljajo rastlini široko epigenetsko omrežje (Pikaard in Schneid, 2014).

Močna epigenetska regulacija v rastlinah odraža njihov model razvoja, sloga življenja in evolucijske zgodovine. Za razliko od rasti pri sesalcih, pri katerih se tkiva in organi specializirajo in definirajo že med razvojem zarodka, rastline rastejo z neprekinjeno proizvodnjo novih organov iz zarodnih celic meristemov. Zato je razvoj osebka pri rastlinah neprekinjen proces, na katerega v veliki meri vplivajo okoljski dejavniki, kar se odraža v veliki fenotipski plastičnosti. Rastlinam ni dano, da bi pobegnile okolju, zato so se prisiljene spoprijemati s spreminjajočimi in večkrat neugodnimi ravnimi pogoji (Pikaard in Schneid, 2014).

Razumevanje epigenetskih mehanizmov, prisotnih v rastlinah, je prišlo iz genetskih raziskav modelne rastline navadni repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*), ki je za take poskuse izjemno primerna, in je bila tudi prva izmed rastlin, katerih genom je bil sekvenciran. Agronomsko pomembne rastline, še posebno koruza (*Zea mays*), so prav tako v veliki meri prispevale k odkritju epigenetskih pojavov in regulatornih mehanizmov. Raziskave rastlinske epigenetike in epigenomike imajo dolgo in bogato zgodovino in v sinergiji z vzporednimi študijami v živalskih in glivnih sistemih pripomorejo pri razumevanju epigenetske regulacije (Pikaard in Schneid, 2014).

### 3.1 TRIJE TEMELJI EPIGENETIKE

Naslednji del bo razdeljen na štiri sekcije. Prve tri opisujejo, kako različni fenomeni zapišejo epigenetske informacije. To so DNA metilacija, kromatin in RNA, ki predstavljajo tri temelje epigenetike. Četrta sekcija govori o tem, kako te tri z medsebojno interakcijo gradijo epigenetski kod, strukturirajo genom in zagotavljajo obrambo pred tujimi sekvencami nukleinskih kislin (Grant-Downton in Dickinson, 2005).

#### 3.1.1 DNA metilacija

Metilacija DNA, kemijska modifikacija citozinskih baz je že dolga poznana v genomih rastlinskih DNA zaporedij. Mnogo je znanega o osnovnih vzorcih metilacije citozina, čeprav je bila večina raziskav opisnih. Bolj pomembno je, da je bilo pokazano, da ti vzorci metilacije citozina niso statični in nespremenljivi v istem rastlinskem genomu. Obstajajo dokazi, ki govorijo, da se vzorci metilacije citozina čez cel genom lahko radikalno spremenijo tako skozi razvojne stadije kot zaradi okoljskih pogojev. Vseeno pa je njihova pomembnost za organizem še vedno uganka (Grant-Downton in Dickinson, 2005).

Kaže, da je v rastlinah DNA metilacija veliko bolj kompleksna kot v drugih organizmih (pravzaprav niti vsi evkarionti ne kažejo metilacije citozina, ki bi jo lahko odkrili), saj lahko metilacija citozina obsega več različnih oblik (Grant-Downton in Dickinson, 2005).

V rastlinah se metilacija citozina (mC) pojavi na citozinskih bazah v vseh sekvenčnih kontekstih: simetričnih CpG in CpNpG (kjer je N lahko katerikoli nukleotid) in v asimetričnih CpNpN mestih, s specifičnimi encimi, ki vzpostavijo in uspešno vzdržujejo mC vzorce med podvojevanjem DNA; odstranitev mC prav tako izvaja DNA glikozilaza. Ker je CpG metilacija povezana s procesom pomnoževanja DNA, je to klasičen primer stabilnega dedovanja epigenetskega znaka, ki je bil povezan z utišanjem prepisovanja genov zaradi njegovih zmožnosti, da skozi interakcijo s proteini z metil vezavno domeno (angl. methyl domain binding (MBD)), zaposlijo kromatin preoblikovalne komplekse, ki vzpostavijo bolj zgoščeno kromatinsko strukturo (Lauria in Rossi, 2011). Mesta asimetrične metilacije so sicer prisotna v rastlinah, vendar niti približno ne tako pogosta kako simetrične (Grant-Downton in Dickinson, 2005).

Čeprav je metilacija citozina na začetku delovala precej nepomembno, je dejstvo, da je bila pri mnogih lokusih z »nenavadnim vedenjem« močna povezava z različnimi stopnjami metilacije, kar je nakazovalo, da je ta modifikacija v nekem smislu pomembna. V raziskavah, v katerih so rastlinski materiali tretirali s hipometilacijskim agensom (azacitidinom). Ta inhibira metilacijo citozina, z njim so uspeli začasno ustaviti utišanje rRNA genskih ponovitev pri nukleolarni dominanci (oblika znanega epigenetskega fenomena pri rastlinah in živalih) in utišanje transgenov. Za bolj natančne analize obstajajo restriksijski encimi, občutljivi na to, ali je v DNA prepoznavno mesto restrikcije metilirano ali ne. Encime, ki režejo na istem mestu, vendar imajo različno občutljivost na metilacijo, poznamo pod imenom izoizomere. Skupaj so ti encimi postali dobro orodje za prepoznavanje metiliranih mest v DNA zaporedjih (Grant-Downton in Dickinson, 2005).

Alternativno so rastlinsko DNA tretirali z natrijevim bisulfitom, ki spremeni nemetiliran citozin v uracil, na metilirani citozin pa nima učinka, tretirano DNA nato sekvencirali in primerjali z referenčnim genomom. Takšno sekvenciranje (BS – seq) je dovolilo izgradnjo metilacijske karte z natančnostjo 1 bp. Skupno te raziskave kažejo, da se metilacija citozina pojavlja večinoma v ponovitvah in transpozonih (več kot 90 % jih je metiliranih), sicer pa 20 % genov tudi kaže neko stopnjo metilacije citozina. Skupno so stopnje metilacije citozine v genomu *Arabidopsis thaliana* na CpG, CpNpG in CpNpN okoli 24 %, 6,7 % in 1,7 %, toda metilacija v teh genih je v večini omejena na CpG mesta, in je bila pretežno opažena v kodirajočih regijah, ki se prepisujejo (Lauria in Rossi, 2011).

Pri BS-sekvenciranju, čeprav ne absolutno konsistentno, se je višja stopnja metilacije (hipermetilacija) na nekem lokusu izkazala za povezano z zmanjšanjem izražanja ali pa njegovem popolnem utišanju. Znanstveniki sumijo, da je mutacija izgube funkcije posledica hipermetilacije. Najbolj znan primer tega je SUPERMAN lokus v *Arabidopsis thaliana* (kjer nižja stopnja izražanja rezultira v formaciji večjega števila prašnikov in plodnih listov) (Grant-Downton in Dickinson, 2005). Epigenetska utišanja so lahko neverjetno stabilna skozi mitozo in mejozo, čeprav lahko obdržijo zmožnost, da se povrnejo v prvotno stanje. To nakazuje na obstoj epigenetskega alela (epialela), ki je definiran kot alel, ki kaže dedne razlike v izražanju kot posledico epigenetskih modifikacij in ne sprememb v DNA zaporedju. Na primer: hipermetilirani (utišani) epialeli SUPERMAN (vpleteni v razvoj cvetenja), so stabilni skozi mnogo generacij inbridinga, v obsegu 3 % na generacijo pa se lahko vrnejo v nemetilirano (aktivno) obliko (Henderson in Jacobsen, 2007).

### 3.1.2 Histoni, modifikacije histonov in kromatinske strukture

Ne bi pretiravali, če bi dejali, da je trend v molekularni biologiji in genetiki, da je DNA zaporedje obravnavano kot najbolj pomembna struktura kromosoma in nukleusa. Ta pretirano poenostavljen pogled neizogibno vodi v idejo, da je DNA gola in brez strukture (Grant-Downton in Dickinson, 2005).

Čeprav priprava DNA za eksperimente, kot so pomnoževanje in določevanje zaporedja vsebuje čiščenje in odstranjevanje vseh proteinov, kaže, da je odstranjevanje le-teh nezaželeno, če želimo dobiti celotno sliko, kako DNA zaporedje deluje. DNA zaporedje je vir linearnih informacij, toda kako je ta polimer strukturno organiziran in zapakiran v funkcionalne kromosome, je odvisno predvsem od histonov. Ti proteini ovijajo DNA v oktamerne formacije – pari H3, H4, H2A in H2B proteinov, ki običajno ovijajo okoli 140-150bp DNA zaporedja dva navoja. Tej obliki rečemo nukleosom (Griffith in sod., 2008).

Del DNA je ovit v nukleosome, ki so nato razmaknjeni, med njimi pa so 20-35 bp dolgi proteini imenovani povezovalni histoni. Ker vzpostavljajo kontakt protein-protein z osrednjimi histoni v nukleosomu, gradijo skupaj matriko nukleosomov. Te matrike se naprej povezujejo v naslednjo strukturno organizacijo, kromatinska vlakna. Ta struktura matrik in vlaken ni fiksna, temveč je izjemno dinamična (Griffith in sod., 2008).

Regija, ki jo imenujemo heterokromatin, je zbita, tu so visoko skoncentrirana kromatinska vlakna, zato jo skozi mikroskop lažje prepoznamo. Opazili so, da je na njej zelo malo kodirajočih genov, zato pa veliko ponavljajočih se DNA zaporedij. Heterokromatinski del je povezan z dolgimi odseki ponavljajočih se zaporedij DNA in je lahko velikega funkcionalnega pomena, predvsem regije, ki vključujejo centromero. Centromera vsakega kromosoma, kjer se povezujeta sestrski kromatidi, je ključnega pomena za kromosom v mitotski in mejotični delitvi. Eukromatin pa je bogatejši s kodirajočimi DNA zaporedji, in ima veliko manj ponavljajočih se DNA zaporedij (Griffith in sod., 2008).

Heterokromatin in eukromatin zlahka prepoznamo po morfoloških značilnostih na istem kromosomu. Kjer so regije DNA velike, potrebujemo za raziskave dinamične aktivnosti in interakcij na nivoju nukleosoma in posameznih regij kromatina bolj prefinjene molekularne tehnike. Toda dokazi, da so te interakcije povezane z »anomalijami« v genskem obnašanju pri nekem lokusu, se že začenjajo nabirati. Odkritje, da je *ddm1* lokus homolog SW1/SNF1 ATP-az, ki so vključene v preoblikovanje kromatina, je bil zadosten dokaz, da lahko spremembe na nukleosomskem nivoju vplivajo na DNA metilacijo in izražanje genov. *Ddm1* mutanti kažejo precejšnjo dezintegracijo centromeričnega kromatina, kar ustreza centralni vlogi regulacije kromatina (Grant-Downton in Dickinson, 2005).

Kaj je točno mišljeno s kromatinskim preoblikovanjem in, kaj je njegov pomen za funkcijo sekvence, povezane z kromatinom? Pozicije histonov in nukleosomov na delu DNA lahko delujejo kot prostorska blokada, ki zapre dostop transkripcijskim faktorjem do promotorja, ki je ključen element za začetek transkripcije. Preoblikovalni kompleksi, sestavljeni iz



kromatin-preoblikovalnih proteinov ter večkrat v navezi s transkripcijskimi faktorji lahko skupaj dosežejo spremembo lokalne strukturne DNA-nukleosomske interakcije (npr. premakniti nukleosom naprej po DNA na drugo mesto). Ta proces lahko odkrije poprej zaprta transkripcijska mesta in zapre prej odprta (Grant-Downton in Dickinson, 2005).

V ostalih organizmih lahko preoblikovanje kromatina zavzema substitucijo histonov v nukleosomu (npr. substitucija ene verzije histonskega proteina z drugo, ki ima drugačne lastnosti) ali pa encimatsko modifikacijo obstoječih histonov s post-translacijskimi modifikacijami (PTM) na aminskih repih histonov (Grant-Downton in Dickinson, 2005).

Veliko teh PTM-ov je bilo že opisanih, med njimi: acetilacija, metilacija, fosforilacija in druge. Histonske PTM lahko vplivajo na kromatin na različne načine. Razen metilacije, lahko povzročijo spremembo v naboju nukleosoma in tako spremenijo elektrostatične interakcije znotraj nukleosoma. Vendar pa vse bolj kaže, da posamezne PTM ali pa specifična kombinacija, deluje kot signal, ki ga berejo drugi proteini, zmožni vplivati na kromatinsko strukturo (tako imenovan kod histonskega jezika) (Lauria in Rossi, 2011).

Stopnja histonskih PTM je izjemno dinamična in odvisna od aktivnosti množice encimov, ki dodajajo ali odstranjujejo specifične znake. Ker histonske PTM usmerjajo kromatinsko strukturo, so povezane z gensko regulacijo. Histonske PTM lahko direktno določijo formacijo transkripcijsko aktivnega stanja (npr. z vzpodbujanjem transkripcijskih faktorjev, da olajšajo dostop RNA polimeraze II do kromatina). Mehanizmi podvajanja histonskih PTM med podvojevanjem DNA ostajajo nejasni. Domneva se, da niso vsi tipi PTM v vseh okoliščinah preneseni na hčerinske celice. Primeri stabilnega dedovanja histonskih PTM so bili že opisani in so v rastlinah predstavljeni z vernalizacijo-inducirajočimi histonskimi podpisi v represorju cvetenja gena FLOWERING LOCUS C (FLC) v *Arabidopsis thaliana*. Ti podpisi so povezani s transkripcijsko utišanim kromatinu, ki se obdrži skozi mitotično delitev, tudi potem, ko je konec mraza (Lauria in Rossi, 2011).

Popolno razumevanje histonskega koda in njegovega nadzora v rastlinah, kjer je bolj kompleksen in vsebuje več znakov na različnih mestih kot v katerem koli drugem evkariontu, je še daleč. V rastlinah je razumevanje medsebojnih povezav histonskih znakov nujno za uspešno prevajanje »jezika histonov« (Grant-Downton in Dickinson, 2005).

### 3.1.3 RNA

Kot že opisano v prejšnjih sekcijah, imajo metilacija citozina in posttranslacijske modifikacije histonov pomembno vlogo pri epigenetski genski regulaciji v rastlinah in pomagajo vzpostaviti ali vzdrževati genska prižgana ali ugasnjena stanja na transkripcijskem nivoju. Epigenetska regulacija se lahko zgodi tudi posttranskripcijsko skozi tarčno mRNA degradacijo ali inhibicijo translacije, ki jo imenujemo post-transkripcijsko utišanje genov (angl. post-transcriptional gene silencing – PTGS). Ti PTGS mehanizmi lahko kontrolirajo časovno in prostorsko razporeditev razvojno pomembnih mRNA in tudi služijo kot učinkovita obramba proti vsiljivcem, kamor spadajo virusi, mikrobi, patogeni in transgeni (Pikaard in Schneid, 2014).

Skupna lastnost mehanizmov transkripcijskega in posttranskripcijskega utišanja v rastlinah je udeležba nekodirajoče RNA, zlasti mikro RNA (miRNA) ali majhne interferenčne RNA (siRNA, angl. small interfering RNA). Biogeneza teh nekodirajočih RNA v rastlinah je podobna geni v ostalih evkariontih, kar kaže, da ima mehanizem utišanja, ki temelji na RNA, in vključuje miRNA in siRNA, skupnega prednika. Vendar pa je podvajanje in opredelitev funkcije genov, udeleženih pri miRNA ali siRNA vodenih procesih pripeljalo do evolucije mnogih poti, ki so specializirane za določene naloge. Med njimi (1) pot za biogenezo miRNA, ki so komplementarne tarčnim zaporedjem, kar pripelje do zmanjšanja posamezne prepisane mRNA; (2) pot, po kateri miRNA začne produkcijo sekundarnih trans delujočih RNA, ki utišajo več tarč hkrati brez komplementarnosti do prvotne miRNA; (3) pot, po kateri siRNA vpliva na degradacijo tujih virusnih RNA ali transgene RNA in (4) pot, po kateri siRNA vpliva na DNA metilacijo in transkripcijsko utišanje transpozonov, virusov in specifičnih genov. Skupaj te poti zagotavljajo rastlinam ogromno od RNA posredovanih zmožnosti utišanja, kakršnih nima noben drug evkariont (Pikaard in Schneid, 2014).

MiRNA in siRNA si delita več skupnih lastnosti tako v rastlinah kot v ostalih evkariontih. Obe nastaneta iz dvoverižnih RNA (dsRNA) prekursorjev pod vplivom RNazaIII-povezanih Dicer (DCL) endonukleaz. Nove miRNA in siRNA so nato vključene v multiproteinski RNA-inducirajoči kompleks utišanja (RISC, angl. RNA-induced silencing complex), ki ima v svoji sredini člana iz družine proteinov Argonaute (AGO). AGO protein veže 3' konec majhne RNA skozi njeno PAZ domeno in uporablja nekodirajočo RNA za iskanje in združitve baznih parov tarčnih komplementarnih RNA verig. Posledično je lahko tarčna komplementarna RNA razcepljena z AGO proteinovo PIWI domeno. Lahko je translacija blokirana brez cepljenja RNA ali pa kromatin-modificirajoči mehanizmi transkripcijsko utišajo lokus. Različni izidi so odvisni od tako vrste nekodirajoče RNA, ki je v igri kot tudi od AGO proteinskega partnerja (Pikaard in Schneid, 2014).

Dvoverižni prekursorji miRNA ali siRNA so proizvedeni na več načinov. Pri miRNA se transkripti DNA prepisani kot ostali geni z RNA polimerazo II (RNA Pol II) z obsežno samokomplementarnostjo zložijo sami v dvoverižne strukture in tako ustvarijo značilne lasnične strukture, z nepopolnimi dvoverižnimi stebli, katere lahko razreže DCL1. Pri siRNA so dvoverižni prekursorji ustvarjeni s konvergentno, dvosmerno transkripcijo, ki tako ustvarja transkripte ki se prekrivajo in imajo ujemajoče se bazne pare. Alternativno so RNA transkripti lahko uporabljeni kot predloge za encim od RNA-odvisna RNapolimeraza (RdRp, angl. RNA-dependentRNAPolymerase), ki ustvari komplementarno verigo (Pikaard in Schneid, 2014).

Razlika v osnovnih mehanizmih za biogenezo siRNA in njene funkcije je temelj za evolucijo različnih poti utišanj nekodirajoče RNA. Za razliko od sesalcev ali vinske mušice, rastline uporabljajo od RNA odvisno RNA polimerazo za produkcijo dsRNA. Genom rastline *Arabidopsis thaliana* kodira šest različnih RdRP genov, prav tako ima štiri različne Dicer endonukleaze, DICER-LIKE (DCL) 1 do 4, medtem ko imajo sesalci samo en Dicer, vinska mušica pa dva (Pikaard in Schneid, 2014).

Rastlinski Dicerj proteini generirajo majhne RNA-je različnih velikosti: miRNA z 21 nukleotidi (DCL1), siRNA z 21 nukleotidi (DCL4), 22 nukleotidov (DCL2), ali pa 23-24 nukleotidov (DCL3). SiRNA različnih dolžin imajo različno, vendar delno prekrivajoče se funkcije, ki temeljijo na njihovih povezavah z AGO družino proteinov, ki ima 10 članov v Arabidopsisu. Različni RdRP-ji, Dicerji, in AGO proteini so uporabljeni v najrazličnejših možnih kombinacijah, ki zagotavljajo utišanje genov z nekodirajočimi RNA (Pikaard in Schneid, 2014).

### 3.1.4 Sestavljanje epigenetske sestavljanke

Obstaja več različnih molekularnih komponent, ki so vključene v odločanje, kako se genska DNA zaporedja na kromosomu obnašajo in delujejo. V nekem smislu te molekulske komponente sodelujejo pri tvorbi epigenetskega regulatornega sistema. Taisti sistem ima veje tudi v obrambi genoma. Očitno ta molekularni sistem, ki ne obsega zgolj nukleusa, temveč celoten organizem, ne more biti reduciran na univerzalni »kod«, tako kot sta bila razvozlana DNA in RNA koda. Naslednji veliki korak je ugotoviti, kako sestaviti vse koščke v popolno sliko o tem, kako epigenetski sistem deluje na molekularnem nivoju. Pri tem pa se pojavi vprašanje – ali ta sistem vzdržuje že obstoječe stanje (*status quo*) ali želi povzročiti spremembo (Grant-Downton in Dickinson, 2005).

Pri vzdrževanju *statusa quo* obstajajo dokazi, ki potrjujejo, da obstaja povratni mehanizem med DNA metilacijo in znaki na histonih v rastlinah. CMT3 protein nosi kromodomeno, kar je sprožilo predvidevanja, da so metilirani histoni vezani s CMT3, kar povzroči CpNpG metilacijo. Do te vezave pride samo, kadar sta H3 lizina 9 in 27 metilirana. Vendar pa MET1 protein (citozin 5-metiltransferaza 1) nima kromodomene. Zato je možno, da bodisi MET1 ne potrebuje histonskega metilacijskega znaka za svoje vzorce metilacije, ali pa namesto tega uporablja histonske acetilacijske vzorce. Na ta način lahko modifikacija histona na kromatinu okrepi vzorce DNA metilacije. Enako lahko informacije in okrepitev tečejo v obratni smeri (Grant-Downton in Dickinson, 2005).

V rastlinah je mnogo metil-citozin vezavnih proteinov (MBD proteini, angl. methyl binding proteins), vendar pa njihovo vlogo še ni popolnoma jasna. Več raziskav pri rastlini *Arabidopsis thaliana* je potrdilo obstoj okoli 12 MBD proteinov. Zelo malo lahko razberemo, kako ti MBD proteini delujejo, saj so se, kot kaže, rastlinski MBD proteini razvili ločeno od tistih, ki so prisotni v sesalcih in si ne delijo drugih regij, razen CpG-binding domene. Dokazano pa je, da vsaj eden izmed njih (AtMBD6) sodeluje s proteinskim kompleksom z aktivnostjo histonskih deacetilaz. Ta dokaz podpira prej odkrite ugotovitve, da na utišanje skozi histonske deacetilaze deloma vpliva stanje DNA metilacije. HDT1 in HDT6 histonske deacetilaze delujejo v kombinaciji z metiltransferazami, da ustvarijo respresivno stanje (Grant-Downton in Dickinson, 2005).

Če so histonska znamenja in interakcije nukleosomov pri gradnji kromatinske strukture tako pomembna za transkripcijo genov, kaj ohranja to stanje, ko se genom podvoji med celično delitvijo? Očitno morajo med formacijo tkiv pridobljene populacije celic obdržati ta stanja, da lahko obdržijo koordiniran program razvoja. Simetrična metilacija je lahko obnovljena s pomočjo encimov, ki prepoznajo hemimetilirana mesta (metilirana samo ena vijačnica DNA) po replikaciji DNA. Težje pa je videti, kako se informacija o kromatinski

strukturi lahko ohrani skozi replikacijo DNA, ko je ta informacija naključno razporejena med nukleosome hčerinskih verig in razredčena z vključitvijo novih nukleotidov. To bi lahko bila domena dveh drugih skupin proteinov, Polycomb-Group (Pc-G) in Trithorax Group (TrxG). Prvotno sta bili odkriti v vinski mušici. Njuna ohranitev funkcije v rastlinah je bila že večkrat opisana. Rastlinski Pc-G mutanti so bili povezani z motnjami v fenomenih, povezanih z epigenetiko (npr. imprinting) in pogosto kažejo rahla odstopanja v razvoju. Kaže, da Pc-G proteini delujejo skozi ohranjanje izključenega kromatinskega stanja na tarčnih genih, kjer je bilo to izključeno stanje prej vzpostavljeno. Nasprotno pa Trx-G proteini delujejo skozi aktivno kromatinsko stanje. Vendar pa je to lahko poenostavljanje, kako ti dve skupini regulirata ekspresijo genov. Čeprav so na molekularnem nivoju rastlinski Pc-G in Trx-G proteini slabše raziskani v primerjavi s tistimi pri vinski mušici, kaže, da delujejo na podoben način. Navedeno pomeni, da ne delujejo samostojno, temveč v multiproteinskih kompleksih z raznimi DNA vezavnimi proteini, lastnostmi modifikacije histonov in restrukturiranja kromatina (Grant-Downton in Dickinson, 2005).

Kako pa je lahko *status quo* razbit? Če lahko raziskave sprememb evkromatina v heterokromatin odkritega v kvasovkah apliciramo na rastline, sprememba od enega stabilnega epigenetskega stanja v drugo ni takojšnja, temveč poteka skozi več mitotičnih delitev. Izbris obstoječih DNA metilacijskih vzorcev se lahko zgodi na dva načina, bodisi skozi pasivno demetilacijo, kjer odsotnost aktivnosti DNA metiltransferaz skozi celične cikle razredči stopnjo metilacije ali pa skozi aktivno demetilacijo. V rastlinah se demetilacija najverjetneje zgodi s pomočjo izreza baz/DNA glikozilazne poti, kajti DNA demetilaze še niso bile odkrite (Grant-Downton in Dickinson, 2005).

Najpomembnejši faktor sprememb v epigenetskih sistemih so nekodirajoča RNA zaporedja. Obstaja jasna povezava z nekodirajočo RNA sproženim utišanjem in metilacijo in kromatinskimi spremembami na homolognih genomskih DNA zaporedjih, tako pri transkripcijskem utišanju genov (TGS, angl. transcriptional gene silencing) in PTGS. V obeh primerih je metilacija vodena s strani siRNA, ustvarjena iz dsRNA zaporedij. Kako siRNA deluje s svojim homologom na genomski DNA še ni popolnoma jasno. Specifičnost od RNA posredovane DNA metilacije (RdDM, angl. RNA-directed DNA methylation) kaže, da se zgodi neposredna vezava DNA-RNA pod vplivom proteinskih kompleksov. Identiteta teh proteinov ostaja skrivnost. Odkrit je bil DRD1, rastlinsko specifičen protein kromatinskega preoblikovanja SW1/SNF2 tipa, ki je potreben za ta proces (Grant-Downton in Dickinson, 2005).

Dve DRM metiltransferazi in MET1 delujeta skupaj, da vzpostavita metilacijski vzorec iz RNA predloge, ki je nato vzdrževana, tudi če RNA izgine. Manj jasno je, kako so vzpostavljena kromatinska stanja, ali obstajajo RNA-vodeči kompleksi, ki vzpostavijo kromatinske spremembe neposredno skozi modificirajoče encime, ali obstaja povratni sistem iz samega vzorca metilacije, ki vzpostavi kromatinske spremembe, ali pa oboje (Grant-Downton in Dickinson, 2005)

## 4 VERNALIZACIJA

Rastline so razvile zmožnost spreminjanja svojega programa razvoja kot odziv na zunanje dražljaje. Ena izmed takih lastnosti je prehod na cvetenje. V mnogih rastlinskih vrstah je čas tega prehoda odvisen od sprememb letnih časov, ki jih rastlina zazna. Fotoperioda in temperatura sta dve glavni komponenti, ki ju rastlina spremlja, da izbere čas za začetek cvetenja (Sung in Amasino, 2004).

Vernalizacija je izraz, ki opisuje promocijo cvetenja po nekem obdobju nizkih temperatur. Natančneje, vernalizacija je indukcija cvetenja z obdobjem mraza, vendar pa ni nujno, da po vernalizaciji rastline začnejo nemudoma cveteti, dobijo pa to sposobnost. V mnogih rastlinskih vrstah je za vernalizacijo potrebna dolga izpostavljenost nizkim temperaturam tipične zime. To je uporabna adaptacija, kajti mnoge vrste, ki potrebujejo vernalizacijo, so dvoletnice: rastline začno rasti v prvem letu, cvetijo pa spomladi v prihodnjem letu (Sung in Amasino, 2004).

Izraz vernalizacija izvira iz latinske besede »vernus« in pomeni »pomladanski«. Pri rastlinah, ki potrebujejo vernalizacijo, je ključnega pomena, da rastline niso »prelisičene« v cvetenje konec jeseni po obdobju prehodnega mraza, ki mu je sledilo obdobje toplega vremena, zato je potrebno daljše obdobje hladnega vremena. Cvetenje mnogih rastlin je vzpodbujeno tudi z dolgimi fotoperiodami, kar je dodatno zagotovilo, da se cvetenje ne bo zgodilo jeseni, ko so dnevi kratki (Sung in Amasino, 2004).

### 4.1 ZAHTEVE ZA VERNALIZACIJO

Genske študije na variacijah v zahtevah za vernalizacijo z uporabo različnih akcesij Arabidopsisov so pokazale, da so te zahteve v glavnem regulirane z dvema dominantnima genoma, FRIGIDA (FRI) in FLOWERING LOCUS C (FLC). Naravne mutacije FRI alela so odgovorne za zgodnje cvetenje brez vernalizacije v mnogih akcesijah. V odsotnosti FRI alela je stopnja izražanja FLC zmanjšana in rastline ne potrebujejo vernalizacije za začetek cvetenja. Dodatno, obstaja naravna variacija FLC alela, ki se lahko pokaže v obliki nizkega izražanja FLC. Akcesije, ki vsebujejo aktiven FRI kot tudi FLC alel, potrebujejo vernalizacijo za cvetenje. Torej je zahteva po vernalizaciji v Arabidopsisu odvisna predvsem od stopnje FLC izražanja (Kim in Sung, 2014).

FLC nosi zapis za MADS-box vezavni protein, ki deluje kot represor transkripcije. FLC se veže neposredno na nižje ležeče integratorje cvetenja, med njimi FT, FD in SOC1 ter tako inhibira njihovo transkripcijo (Kim in Sung, 2014). FLC ekspresija je med vernalizacijo zmanjšana in ohranjena na nizki stopnji po tem, ko se rastline vrnejo v toplejše okolje. Regulacija FLC je osnova epigenetskega spomina vernalizacije (Groszmann in sod., 2011).

### 4.2. GENETSKI ORIS POTI VERNALIZACIJE

Mnogo raziskav je bilo namenjenih odkritju in identifikaciji faktorjev, prisotnih pri vernalizaciji. Med identificiranimi geni so VERNALISATION 2 (VRN2), ki vsebujejo zapis za homolog supresor Zeste 12 proteina, ki je komponenta polycomb represorskega kompleksa (PRC2) (Groszmann in sod., 2011).

VERNALISATION INDEPENDENT 3 (VIN3) in VRN5 gena, ki kodirata rastlinske homeodomenske (PHD) proteine, sta prav tako potrebna za vernalizacijsko represijo FLC. Kaže, da so ti PHD proteini povezani s PRC2 kompleksom. VIN3 je izražen v veliki stopnji med nizkimi temperaturami in njegova asociacija s PRC2 kompleksom nakazuje, da poveča delovanje PRC2 kompleksa med obdobjem nizkih temperatur. Represija FLC izražanja je prav tako povezana s povečanjem H3K27me3. Časovne raziskave kažejo zelo majhne razlike v H3K27me3 pri FLC transkripcijski/translacijski začetni regiji med mrazom, in nato progresivno povečanje vzdolž gena, ko se rastline ponovno vrnejo na toplejše temperature. Spremembe H3K27 pri FLC zaostajajo za spremembami pri FLC transkripciji, kar nakazuje da so posledica znižane transkripcije (Groszmann in sod., 2011).

VRN1, VRN2, VIL1/VRN5 so izraženi, ne glede na vernalizacijo. V kontrastu je VIN3 izražanje inducirano zgolj takrat, ko so rastline v daljšem obdobju nizkih temperatur. Ko so rastline prinesene na toplejše temperature, se transkripcija VIN3 hitro zmanjša (Kim in Sung, 2014).

Identifikacija VRN2 in VIN3 kot nujnih komponent pri FLC represiji, potrjuje, da v procesu sodelujejo tudi modifikacije histonov. Kromatin FLC regije med vernalizacijo doživi serijo sprememb. Med in po vernalizaciji so stopnje histonskih modifikacij, povezanih z gensko aktivacijo, znižane, modifikacije histonov, povezanih z gensko represijo (npr. H3K27me2 in H3K27me3), pa so znatno zvišane (Kim in Sung, 2014).

#### 4.3 DVE FAZI VERNALIZACIJE

Obstajata dve fazi vernalizacije – začetno zmanjšanje FLC z represijo transkripcije in naslednja faza vzdrževanja inaktiviranega stanja. Regiji, odvisni za obe fazi sta različni. Faza vzdrževanja je bolj raziskana kakor začetna represija. Raziskave z FLC:GUS fuzijskimi konstrukti kažejo, da je velik prvi intron FLC gena potreben za stabilno začetno zmanjšanje FLC ekspresije. V konstruktih, kjer je bil intron v veliki meri izbrisan, se je zmanjšanje ekspresije pokazalo, vendar se ni ohranilo skozi razvoj rastline. Za vzdrževanje inaktiviranega stanja so potrebni proteini polycomb kompleksa, CURLY LEAF/SWINGER (CLF/SWN), VRN2 in FIE. Kaže, da je začetna faza neodvisna od funkcije PRC2. Za vzdrževanje inaktiviranega stanja je potrebno dodati H3K27me3 na kromatin preko CLF/SWN homologa Enhancer of Zeste. Na začetku je H3K27me3 dodan na kromatin na regijo transkripcije. To represivno histonsko znamenje se kasneje razširi na prvi intron in naprej do 3' konca gena. DNA replikacija je potrebna, da se lahko vzdrževanje izvaja. Ob odsotnosti DNA replikacije v starejši listih je FLC ekspresija zmanjšana med vernalizacijo in H3K27 je dodan na regijo začetka transkripcije. Z novo rastjo med normalnimi temperaturami se gen povrne v normalno aktivno stanje in so represivna histonska znamenja odstranjena (Groszmann in sod., 2011).

Celo predel gena je močno H3K27 trimetiliran ob odsotnosti FLC promotorja, kar nakazuje, da imajo DNA zaporedja v genu notranja H3K27me3 mesta vezave. Adicija H3K27me3 FLC regiji je lahko razložena kot posledica izgube FLC transkripcije. Kadar je funkcija PRC2 zmanjšana v linijah z nizkimi ali visokimi stopnjami FLC, je FLC ekspresija zvišana, kar kaže, da prisotnost H3K27me3 inhibira transkripcijo (Groszmann in sod., 2011).

#### 4.4 PONAŠTAVITEV FLC-ja V NASLEDNJI GENERACIJI

Ena izmed značilnosti vernalizacije je, da mora poteči vsako generacijo. To pomeni, da mora biti inaktiviran FLC ponastavljen na aktivno stanje v naslednji generaciji (Groszmann et al., 2011). Pred vernalizacijo je FLC visoko izražen in njegov kromatin je bogat z H3K4me3, aktivnim histonskim znamenjem. Z vernalizacijo se aktivna histonska znamenja pri FLC kromatinu zmanjšajo. To zmanjšanje spremlja zmanjšanje komponent aktivnega kromatinskega modifikacijskega kompleksa. Namesto tega represivni kromatinski modifikacijski kompleksi, tudi PRC2, postanejo predominantni na FLC kromatinu, kar se kaže v obilici represivnih histonskih znamenj, kot so H3K27me3. Vernalizacija sproži spremembo kromatina na FLC-ju. Ta represija FLC-ja je stabilna tudi po izpostavitvi nizkih temperatur. Toda ta represija je stabilna zgolj skozi mitozo, FLC je ponovno aktiviran v naslednji generaciji. To je prilagoditvena značilnost Arabidopsisa, ki poskrbi, da vernalizacija poteka v vsaki generaciji (Kim in Sung, 2014).

FLC je ponovno aktiviran med gametogenezo in zgodnjo embriogenezo po oploditvi. Na tej stopnji mora biti FLC kromatin preoblikovan iz represivnega v aktivno stanje. Komponente aktivnega kromatinskega modifikacijskega kompleksa, še posebno FRI-C in PAF1, so nujni za ponovno aktivacijo FLC-ja, vendar podrobnosti teh mehanizmov še niso znane (Kim in Sung, 2014).

#### 4.5 NEKODIRAJOČA RNA IN VERNALIZACIJA

Kompleksi proteinov polycomb skupine regulirajo široko paleto genov v evkariontih. Vendar sami mehanizmi, kako so ti kompleksi povezani s tarčnimi geni, še niso dobro raziskani. Zadnje raziskave kažejo, da so nekodirajoče RNA (ncRNA, angl. non-coding RNA) del PRC2 mehanizmov. Pri sesalcih je več dolgih ncRNA (lncRNA, ang. long non-coding RNA) kot npr. ANRIL, HOTAIR, Xist in Kcnq1ot1, v neposrednem stiku s komponentami PRC2 in usmerjajo PRC2 do tarčnega kromatina. Vpletenost ncRNA, pa ni omejena zgolj na PRC2 (Kim in Sung, 2014).

Vrsta ncRNA je bila izoliranih z različnimi kromatin modificirajočimi kompleksi, kar nakazuje, da ncRNA molekule sodelujejo pri različnih regulacijah ekspresije genov pri evkariontih. Pri regulaciji FLC so bili odkriti dve dolgi ncRNA, COOLAIR in COLDAIR (Kim in Sung, 2014).

COOLAIR (angl. cold induced long antisense intragenic RNA) protismiselni transkripti so izraženi iz promotorja, ki se nahaja na 3' koncu FLC gena, in nastaneta vsaj dva različno procesirana transkripta. Domneva se, da COOLAIR sodeluje pri začetnem zmanjšanju FLC. COOLAIR transkript je induciran po maksimalno desetih dneh na nizkih temperaturah in prehitva VIN3 indukcijo. Prav tako se domneva, da je pri mehanizmu COOLAIR RNA pri zmanjšanju ekspresije FLC motnja promotorja rezultat prisotnosti protismiselnih transkriptov, ki povzročijo represijo FLC gena, kar vodi v represijo smiselnih transkriptov FLC gena. Pomanjkanje FLC produkta nato pelje v zgodnje cvetenje (Groszmann in sod., 2011).

Še ena dolga ncRNA, poznana pod imenom COLDAIR (angl. cold assisted intronic non-coding RNA), je transkript iz FLC lokusa. COLDAIR je prepisan iz prvega introna FLC v smiselni smeri. Podobno kot COOLAIR, je COLDAIR prav tako induciran z vernalizacijo. COLDAIR transkripti so v neposrednem stiku s CLF, eno izmed PRC2 komponent. Znižana ekspresija COLDAIR preko mehanizmov interferenčne RNA (RNAi) zmanjša dejavnost PRC2 na FLC kromatinu. Zmanjšana dejavnost PRC2 se izkaže v zmanjšani stopnji H3K27me3. Skupaj je COLDAIR del mehanizma, ki pripelje PRC2 do FLC kromatina med vernalizacijo. Kako ta mehanizem deluje, še ni jasno (Kim in Sung, 2014).

## 5 SKLEPI

Epigenetski pojavi vplivajo na izražanje genov na stopnji kromatinske strukture in organizacije ter tako omogočajo ali preprečujejo dostop regulatornih kompleksov do genoma.

Trenutne raziskave epigenetskih mehanizmov kažejo na to, da so epigenetski mehanizmi vključeni v skoraj vse vidike življenja rastline, med njimi tudi agronomsko pomembne lastnosti, kot so čas cvetenja, razvoj sadežev, odzivi na okoljske spremembe in rastlinske obrambne odzive.

Raziskave na rastlini *Arabidopsis thaliana* so izboljšale naše razumevanje molekularnih mehanizmov vernalizacijskega odziva. Epigenetski mehanizmi, ki so odgovorni za vernalizacijski odziv, vključujejo različne modele regulacije izražanja genov – od histonskih modifikacij do molekul RNA. Kar se naučimo iz raziskav vernalizacijskega odziva, pripomore k našemu razumevanju izražanja genov.

Ker je vernalizacijski odziv sprožen z okoljskimi dejavniki, je eden izmed boljših modelnih sistemov za preučevanje podrobnosti mehanizmov sprememb izražanja genov induciranih z okoljskimi dejavniki v evkariontih. Združeno z dostopnimi genetskimi viri in nedavnimi tehnološkimi napredki na področju molekularne genetike, bodo raziskave vernalizacije na modelni rastlini *Arabidopsis thaliana* in ostalih cvetočih rastlinah še naprej širile naše razumevanje genske regulacije pri rastlinah in širše pri evkariontih.

Prav tako pa se epigenetika uveljavlja kot zelo pomembna panoga pri žlahtnjenju rastlin. Čeprav raziskave osnov epigenetskih mehanizmov precej počasi dobivajo podobo, bodo v prihodnosti glede na njihov pomen za rast in razvoj rastlin najverjetneje široko uporabljene za izboljšanje lastnosti agronomsko pomembnih rastlin.



## 6 VIRI

- Deichmann U. 2016. Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic. *Developmental Biology*, 416, 1: 249-254
- Falsenfield G. 2014. A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6: a018200, doi: 10.1101/cshperspect.a018200: 10 str.
- Grant-Downton R. T., Dickinson H. G. 2005. Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The Epigenetic Network in Plants. *Annals of Botany*, 96: 1143-1164
- Goldberg A. D., Allis C. D., Bernstein E. 2007. Epigenetics: A landscape takes shape. *Cell*, 128, 4: 635-638
- Griffiths A., Wessler S., Lewontin R., Carroll S. 2008. Introduction to genetic analysis. 9th ed. New York, W. H. Freeman and Company: 838 str.
- Groszmann M., Greaves I. K., Albert N., Fujimoto R., Helliwell C. A., Dennis E. S., Peacock W. J. 2011. Epigenetics in plants- vernalisation and hybrid vigour. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1809, 8: 427-437
- Henderson I. R., Jacobsen S. E. 2007. Epigenetic inheritance in plants. *Nature*, 447: 418-424
- Holliday R. 2006. Epigenetics: A historical overview. *Epigenetics*, 1, 2: 76-80
- Kim D. H., Sung S. 2014. Genetic and epigenetic mechanisms underlying vernalization. *The Arabidopsis Book*, 12: e0171, doi: 10.1199/tab.0171: 15 str.
- Pikaard C. S., M. Schneid O., 2014. Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6, 12: a019315, doi: 10.1101/cshperspect.a019315: 31 str.
- Jablonka E., Lamb M. J. 2002. The changing concept of epigenetics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 981: 82-96
- Lauria M., Rossi V. 2011. Epigenetic control of gene regulation in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1809: 369-378
- Sung S., Amasón R. M. 2004. Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 1: 4-10
- Turck F., Coupland G. 2013. Natural variation in epigenetic gene regulation and its effects on plant developmental traits. *Evolution*, 68, 3: 620-631
- Zhang Y., Fischer M., Colot V., Bossdorf O. 2013. Epigenetic variation creates potential for evolution of plant phenotypic plasticity. *New Phytologist*, 197, 1: 314-322

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Jerneju Jakšetu za vso pomoč in nasvete pri izdelavi diplomskega dela.

Zahvaljujem se kolegom in kolegicam, ki so s svojo spodbudo, pomočjo in prijateljstvom poskrbeli za prijetnejši in lažji študij.

Zahvaljujem se tudi družini za vso pomoč, podporo in razumevanje med študijem.