

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Milica S. Milutinović

**Funkcionalna karakterizacija EML (EMSY-like)  
proteina kao čitača histonskih modifikacija sa  
ulogom u regulaciji razvića semena kod  
*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**

doktorska disertacija

Beograd, 2019.

University of Belgrade

Faculty of Biology

Milica S. Milutinović

**Functional characterization of EML (EMSY-like) as  
histone readers proteins involved in the regulation of  
*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. seed development**  
doctoral dissertation

Belgrade, 2019.

**Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:**

**Mentori:**

---

dr Jelena Brkljačić, vanredni profesor,  
*The Ohio State University*, Kolumbus, Ohajo, SAD

---

dr Svetlana Radović, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

**Članovi komisije:**

---

dr Danijela Mišić, naučni savetnik,  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Beograd

---

dr Aneta Sabovljević, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

---

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je na The Ohio State University, Ohajo, SAD, u okviru projekata NSF MCB-1513807 i OPBC2011-003.*

*EML doktorska disertacija je nastala kao rezultat višegodišnjeg rada velike grupe ljudi koji su mi pomogli na raznorazne načine. Pokušaću da Vas imenujem sve jer svi zaslužujete da budete pomenuti, a nadam se da ću u tome i uspeti...*

*Mojoj mentorki, dr Jeleni Brkljačić, hvala na neizmernoj posvećenosti, strpljenju i entuzijazmu, prenešenom znanju, na savetima i prijateljskoj podršci koju mi je nesebično pružala u svim fazama izrade i uobličavanja ove doktorske teze. Hvala što si me velikodušno primila u svoju laboratoriju, i život, i načinila naučnika od mene. Trebalo je uložiti dosta truda i energije da se od jednog „običnog” biologa načini „molekularac”...*

*Veliku zahvalnost dugujem mentoru dr Svetlani Radović na ukazanom poverenju, predusretljivosti i podršci tokom rada na doktorskoj disertaciji. Hvala Vam na savetima i korisnim sugestijama koji su značajno doprineli uobličavanju teksta ove disertacije.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem svom šefu dr Danijeli Mišić na njenom velikom angažovanju tokom izrade doktorske teze – hvala za potpisivanje svih molbi za odsustvo ☺, za nesebičnu podršku i vetar u leđa kada je bilo najpotrebnije, za ukazano poverenje da budem deo projekta 173024. I što si verovala da ću ovim nekim svojim tempom pisanja uspeti da završim tezu do kraja ☺*

*Sve ovo ne bi bilo izvodljivo bez pomoći dr Anete Sabovljević – Aneta, hvala na razumevanju, savetima, i podršci tokom svih faza izrade ove doktorske teze.*

*Dr Erich Grotewold-u se zahvaljujem na pruženoj prilici i ukazanom poverenju. Polaskana sam što sam imala priliku da učim od njega i njegovog mnogobrojnog tima, te stoga hvala i dr Maria Isabel Casas, dr Nik Kovinich, dr Kengo Morohashi i ostatku ekipe. Njihovo veliko iskustvo i nesebična pomoć bili su od velikog značaja za izadu ove disertacije. Dr Dave Bisaro-u i dr Tami Coursey se zahvaljujem na dugogodišnjoj i uspešnoj saradnji na EML-virus projektu. Tami, moj večni EML saborac!<sup>1</sup>*

*Bensonu E. III Lindsey dugujem veliku zahvalnost i naklonost jer je odradio lavovski deo posla oko bioinformatičke analize RNK-Seq podataka i jer je izneo na svojim plećima veliki deo EML projekta.<sup>2</sup>*

*Svojim kolegama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ želim ovom prilikom da se zahvalim na kolegijalnosti, a naročito dr Dragani Matekalo, dr Slavici Dmitrović, dr Jeleni Savić, dr Biljani Filipović, dr Nini Devrnja. Vama, kao i Nedi Aničić i Jeleni Božunović (grupa „mali i nebitni”) hvala na pozitivnoj energiji i podršci u trenucima kada je zaista bilo najteže, a bilo je takvih momenata...Šefu Centralne laboratorije dr Branislavu Šiler (dobro de, hajde, reći ću – Bane, moj životni guruu) hvala na nesebičnoj pomoći tokom uobličavanja teksta*

*ove teze, a dr Marijani Skorić hvala na korisnim savetima i konstantnom bodrenju ne samo tokom pisanja ove teze, nego i van posla. Maki, hvala ti što čuvaš sve svoje piliće! Hvala dr Jeleni Cvetković i bratu dr Milošu Nikolić (jesi ponekad naporan, ali si mi zaista veliki uzor ☺) jer su uvek znali da kažu pravu stvar u pravo vreme čak i iz daleka. Hvala dr Slađani Todorović i dr Ani Simonović jer su me spojile sa mentorkom i verovala da mogu preživeti u dalekom Ohaju. Veliko hvala dr Stevanu Avramov na pomoći oko statističke obrade podataka.*

*Sobi 116 (dr Jasmini Nestorović Živković, dr Tijani Banjanac i dr Suzani Živković) HVALA! Objašnjenje nije potrebno! I Suzy, hvala što si me uvela u svet proteina. Ti si zaslužna za moje prve korake u laboratoriji.*

*Dr Milošu Brkušanih hvala jer je moj najbolji prijatelj i što je verovao u naš zajednički uspeh do kraja! Veliko hvala i dr Mirjani Novković, Jovani Blagojević i Mirjani Jovanović!*

*Hvala svim ljudima iz zgrade u 88 W Blake, ABRC timu (Bettina, Diana, Debbie, Julie, Chris, James, Niki, Akasia i ostali), CAPS timu na pomoći oko korišćenja mikroskopa i drugih aparata, korisnim diskusijama i savetima (dr JC Jang, dr Anna Dobritsa, dr R. Keith Slotkin, dr Paula Monsma), cimerima Anji i Radetu, BRC-ZRC ekipi, a posebno hvala mojim za-CEO-život-drugaricama - Jovani, Ivani i Mariji, na bodrenju, prisustvu i u dobru i u zlu, donošenju čokolada da „mozak bolje radi”, veri da mogu da završim započeto.*

*Na kraju, Hvala mojim roditeljima i bratu, tetki i Mini i deci, i mom Rakcu, na ljubavi, podršci i veeeeelikom razumevanju, jer nije bilo lako istrpeti me poslednjih par (a možda i mnogo više od samo par) meseci. Njima ovu tezu i posvećujem!*

<sup>1</sup> I want to thank Dr Erich Grotewold, to whom I am very grateful for generously accepting me in his lab, and for giving me the opportunity to learn from him. It was a great honor to work with him and his lab members- I owe my gratitude to the Grotewold lab members: Dr Maria Isabel Casas, Dr Nik Kovich, Dr Kengo Morohashi and the rest of the crew. Their tremendous experience and selfless help were of great importance for the preparation of this dissertation. I also owe my gratitude to Dr Dave Bisaro and Dr Tami Coursey for our successful long-term collaboration! Tami, my EML companion, thank you for being part of my extended EML family, for sharing good and bad lab moments with me ☺

<sup>2</sup> I owe special thanks to Bensonu E. III Lindsey for his expert assistance he has given by performing bioinformatics analysis of RNA-Seq data, and for his help with other experiments within EML project. B, this is your success, too!

## **Funkcionalna karakterizacija EML (EMSY-like) proteina kao čitača histonskih modifikacija sa ulogom u regulaciji razvića semena kod *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**

### **Sažetak**

Razviće semena kod skrivenosemenica nastaje kao rezultat procesa dvojnog oplodjenja, u kome se jedna spermatična ćelija spaja sa jajnom ćelijom, dok se druga spermatična ćelija spaja sa centralnom ćelijom. Koordinisano razviće semenjače, endosperma i embriona nakon oplodjenja zavisi od ravnotežnog odnosa roditeljskih genoma, što je preduslov za odvijanje normalnog razvića semena. Narušavanje ravnoteže u genomskom doprinosu roditelja često dovodi do brojnih poremećaja u razviću semena i embriona, a u drastičnim slučajevima može dovesti i do potpunog prekida razvića semena. Ova pojava predstavlja jednu od glavnih prepreka za upotrebu genetičkog inženjerstva u cilju stvaranja apomiktičnih semena, kao i za prevazilaženje međuvrskih seksualnih reproduktivnih barijera. Jedan od glavnih mehanizama koji narušava ravnotežu odnosa roditeljskih genoma u semenu model biljke *Arabidopsis thaliana* jeste represija sinteze auksina uz pomoć Polikomb represivnog kompleksa 2 (PRC2). Međutim, ni smanjenje nivoa ekspresiju gena PRC2 kompleksa ni povišavanje nivoa auksina nisu dovoljni da dovedu do apomiksije. Evolutivno konzervisana uloga PRC2 tokom razvića zasniva se na ulozi ovog kompleksa da postranslaciono modifikuje histon H3, a proteini koji prepoznaju posttranslacione modifikacije (PTM) histona, odnosno čitači histonskog koda, često su uključeni u regulaciju razvića u sprezi sa PRC2. Stoga čitači histonskog koda predstavljaju pogodne kandidate za dodatni uticaj na funkciju PRC2 kompleksa. Dosadašnji podaci pokazuju da su čitači histonskih modifikacija biljaka uključeni u veliki broj različitih bioloških i razvojnih procesa u ćeliji, ali da je broj opisanih čitača relativno mali. Predmet istraživanja ove doktorske disertacije jeste regulacija razvića semena kod biljke *A. thaliana*, sa posebnim osvrtom na ulogu EML proteina u čitanju određenih modifikacija histona, kao i na ulogu ovih proteina u kontroli endogenog nivoa auksina i njegove kompartmentizacije tokom razvića semena. Rezultatima ove studije pokazano je da su čitači H3K36me3 histonske modifikacije EML1 i EML3, proteini koji pripadaju EMSY-Like Tudor/Agenet proteinskoj porodici, neophodni za održavanje normalnog odnosa roditeljskih genoma kod *A. thaliana*. Opsežnim analizama mutantnih fenotipova demonstrirano je da su EML1 i EML3 proteini neophodni za sprečavanje razvića semena u slučaju izostanka oplodjenja, kao i za regulaciju ravnoteže roditeljskih genoma nakon oplodjenja. Pretpostavljeno je da EML1 i EML3 imaju ulogu u represiji ekspresije očinskog (paternalnog) alela regulisanjem transporta aksina i transdukcije signala. Konačno, na osnovu dobijenih rezultata predložen je mehanizam

stvaranja apomiktičnih semena kod *A. thaliana*, zasnovan na finom podešavanju transporta auksina tokom razvića semena pomoću histonskih čitača EML1 i EML3. Mogućnost manipulacije nivoa ekspresije ovih proteina se može iskoristiti u praksi za propagiranje hibridnih semena, čime se mogu značajno smanjiti vreme i troškovi gajenja biljaka.

**Ključne reči:** čitači histonskih modifikacija, apomiksija, razviće semena, auksin, *Arabidopsis thaliana*, EML, PTMs, Agenet, Tudor, H3K36me3

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija biljaka

## **Functional characterization of EML (EMSY-like) as histone readers proteins involved in the regulation of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. seed development**

### **Abstract**

In flowering plants, seed development is initiated by double fertilization of the female gametophyte, whereby one sperm cell fuses with the egg cell, while the second fuses with the central cell. The successful and coordinated interaction between the developing seed compartments (seed coat, endosperm and embryo) depends on the balance in parental genome contributions. Any change in the genomic contribution of one parent often leads to severe defects including seed abortion. This represents one of the main obstacles for the engineering of asexual reproduction through seeds (apomixis), and for generating new interspecies hybrids. The repression of auxin synthesis by the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) is a major mechanism contributing to sensing genome balance. However, current efforts focusing on identification of regulators decreasing PRC2 or elevating auxin levels have not yet resulted in the production of apomictic seed. Evolutionary conserved role of PRC2 during developmental processes in plants is based on the role of this complex to modify histone H3. Furthermore, proteins involved in recognizing histone posttranslational modifications (PTMs) are often included in the regulation of plant development in conjunction with in PRC2. So far a relatively few plant so-called histone readers have been identified to be instrumental for many developmental processes. Results from this study show that EML1 and EML3, proteins that belong to the EMSY-Like Tudor/Agenet protein family, are H3K36me3 histone readers necessary to maintain parental genome balance in *Arabidopsis*. By analyzing the mutant phenotypes, our results demonstrate that both EML1 and EML3 are required to prevent seed development before fertilization, and to regulate the balance of parental contributions after fertilization. We hypothesize that EML1 and EML3 function to repress paternal gene expression by regulating auxin transport and signaling. Finally, we propose a mechanism of apomictic seed production in *Arabidopsis*, based on the fine-tuning of auxin flow during seed development, by the histone readers EML1 and EML3, which could be exploited to propagate hybrid seeds, significantly decreasing breeding time and cost.

**Keywords:** Histone readers, apomixis, seed development, auxin, *Arabidopsis thaliana*, EML, PTMs, Agenet, Tudor, H3K36me3

**Scientific field:** Biology

**Specific scientific field:** Plant physiology



## **Lista skraćenica:**

**ANOVA** - analiza varijanse

**bp** – bazni par

**cDNK** - komplementarni lanac DNK

**DAP** – dani nakon oprašivanja (eng. *days after pollination*)

**DAE** – dani nakon demaskulinizacije (eng. *days after emasculation*)

**DEG** – diferencijalno eksprimirani geni (eng. *differentially expressed genes*)

**DIC** – diferencijalno interferentna kontrastna mikroskopija (eng. *Differential Interference Contrast*)

**DNK** - dezoksiribonukleniska kiselina

**DTT** - ditioneitol

**EDTA** - etilendiamintetrasirćetna kiselina

**EMS** – etilmetan sulfonat

**EtBr** – etidijum-bromid

**GFP** - zeleni fluorescentni protein (eng. *Green Fluorescent Protein*)

**GO** – ontološka kategorizacija gena (eng. *Gene Ontology*)

**IAA** - indol-3-sirćetna kiselina

**IPTG** – izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktozid

**iRNK** – informaciona RNK

**kb** – kilobaza

**kDa**- kilodalton

**LB** – Luria-Bertani hranljiva podloga korišćena za gajenje bakterija

**LSD** - najmanja statistički značajna razlika (eng. *Least Significant Difference*)

**Mbp** – megabazni parovi

**MEG** – maternalno eksprimirani geni (eng. *maternally expressed genes*)

**MES** – 2-(N-morfolino)etansulfonska kiselina

**miRNAs** - mikro RNK (eng. *microRNAs*)

**MS** - hranljiva podloga prema Murashige i Skoog (1962)

**MWCO** - granica molekulske mase (eng. *molecular weight cut off*)

**NFDM** – bezmasno mleko u prahu (eng. *non-fat dry milk*)

**nt** – nukleotid

**OD** – optička gustina (eng. *optical density*)

**PcG** – Polikomb proteini

**PCR** – lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*)

**PEG** – paternalno eksprimirani geni (eng. *paternally expressed genes*)

**PRC1** – Polikomb Represivni kompleks 1 (eng. *Polycomb Repressive Complex 1*)

**PRC2** – Polikomb Represivni kompleks 2 (eng. *Polycomb Repressive Complex 2*)

**PTM** – posttranslacione kovalentne modifikacije

**PVDF** – poliviniliden fluorid

**RNK** - ribonukleniska kiselina

**rpm** – obrtaji u minuti (eng. *Rotation Per Minute*)

**RT-PCR** – reverzna transkripcija praćena PCR-om (eng. *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

**sRNAs** - mali RNK molekuli (eng. *small RNAs*)

**SD** - standardna devijacija

**SDS** – natrijum dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate*)

**siRNAs** - male interferirajuće RNK (eng. *short interfering RNAs*)

**TAE** – pufer koji se sadrži Tris, acetat i EDTA (eng. *Tris-acetate-EDTA*)

**T-DNK** - deo plazmidne DNK koji se integriše u biljni genom (eng. *transfer DNA*)

**TE** – transpozabilni element

**Tm** – temperaturna tačka topljenja

**Tris** - hidroksimetil-aminometan

**UV** – ultravioletna svetlost

**UTR** – netranslirajući region (eng. *untranslated region*)

**WT** – wild-type

## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Hromatin i regulacija genske ekspresije .....	1
1.2. Struktura hromatina .....	1
1.3. Epigenetika .....	2
1.3.1. Epigenetičke modifikacije: jezik u razvoju.....	2
1.3.1.1. Metilacija DNK .....	2
1.3.1.2. Modifikacije histona i hipoteza histonskog koda .....	5
1.3.1.3. Proteini čitači modifikacija na histonima .....	8
1.3.1.3.1. Agenet/Tudor porodica proteina čitača.....	9
1.4. Razviće semena.....	11
1.4.1. Struktura i razviće gametofita kod biljaka .....	11
1.4.2. Dvojno oplodjenje kod cvetnica.....	13
1.4.3. Razviće semena.....	14
1.4.3.1. Razviće embriona .....	14
1.4.3.2. Razviće endosperma.....	16
1.4.3.3. Razviće semenjače.....	18
1.5. Apomiksija.....	18
1.6. Razviće semena sa poremećenom ravnotežom doprinosa roditelja.....	20
1.7. Polikomb (PcG) proteini .....	23
1.7.1. FIS-PRC2 kompleks kod biljaka.....	26
1.8. Uloga auksina u semenom zametku i tokom ranih faza embriogeneze .....	28
1.9. Model sistem za genetička istraživanja- <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.....	30
2. Cilj rada .....	32
3. Materijal i metode .....	33
3.1. Biljni materijal .....	33
3.1.1. Hranljive podloge.....	33
3.1.2. Bakterijski sojevi.....	34
3.1.3. Plazmidni vektori .....	34
3.1.4. Prajmeri .....	39
3.2. Gajenje biljaka .....	42
3.2.1. Površinska sterilizacija semena.....	42
3.2.2. Ukrštanje biljaka .....	42

3.2.2.1. Generisanje dvostrukog <i>eml1-2 eml3-4</i> mutanta .....	42
3.4. Genotipizacija pomoću PCR tehnike .....	43
3.4.1. Izolacija DNK i lančana reakcija polimeraze (PCR) .....	43
3.4.2. Elektroforeza nukleinskih kiselina .....	44
3.4.3. Prečišćavanje DNK fragmenata iz agaroznog gela .....	44
3.5. Kloniranje .....	44
3.5.1. Gateway sistem za kloniranje .....	44
3.5.1.1. Umnožavanje kodirajuće sekvence EML1 i EML3 gena .....	44
3.5.1.2. TOPO kloniranje .....	45
3.5.1.3. LR reakcija .....	45
3.5.2. Multisite Gateway sistem za kloniranje .....	46
3.5.2.1. Umnožavanje EML1 promotora, kodirajuće sekvence i GFP sekvence za potrebe kloniranja EML1 minigenskog konstrukta .....	46
3.5.2.2. BP reakcija .....	47
3.5.2.3. Multisite LR reakcija .....	47
3.6. Restrikciono kloniranje .....	47
3.8. Transformacija bakterijskih ćelija .....	49
3.8.1. „Heat shock” transformacija <i>E. coli</i> .....	49
3.8.2. Transformacija <i>Agrobacterium tumefaciens</i> metodom elektroporacije .....	49
3.9. Izolacija plazmida iz bakterija .....	49
3.10. Analiza genske ekspresije .....	50
3.10.1. Izolovanje ukupne RNK .....	50
3.10.2. Tretman dezoksiribonukleazom (DNazom) .....	50
3.10.3. Reverzna transkripcija .....	50
3.10.4. PCR umnožavanje nakon reverzne transkripcije .....	51
3.10.5. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (RT-qPCR) .....	51
3.11. Prečišćavanje rekombinantnih proteina .....	52
3.11.1. Indukcija ekspresije rekombinantnih proteina na maloj skali .....	52
3.11.2. Prečišćavanje proteina iz <i>E. coli</i> u nativnim uslovima .....	53
3.11.3. Rasoljavanje dijafiltracijom proteina .....	53
3.12. Vezivanje za histonski proteinski čip .....	54
3.13. Transformacija biljaka .....	54
3.13.1. Floral dip .....	54

3.13.2. Agroinfiltracija .....	55
3.14. Ko-immunoprecipitacija proteina .....	56
3.14.1. Izolacija jedarnih proteina .....	56
3.14.2. Fragmentacija DNK molekula i dijafiltracija pufera.....	56
3.14.3. Ko-immunoprecipitacija.....	57
3.15. Western blot.....	58
3.15.1. Elektroforetsko razdvajanje proteina pod denaturišućim uslovima .....	58
3.15.2. Prenos proteina na membranu .....	58
3.15.3. Immunoblot analiza.....	59
3.16. Analiza transkriptoma- RNK-Seq .....	60
3.17. Mikroskopija i bojenje histoloških preparata.....	61
3.17.1. Priprema biljnog materijala za svetlosnu i konfokalnu mikroskopiju.....	61
3.17.2. Priprema biljnog materijala za diferencijalno interferentnu kontrastnu mikroskopiju (DIC).....	62
3.17.3. Histološka bojenja.....	62
3.17.3.1. Vanilin bojenje .....	62
3.17.3.2. Bojenje po Aleksanderu i vijabilnost polena.....	63
3.18. Bioinformatička analiza RNK-Seq podataka.....	63
3.19. Statistička obrada podataka .....	64
<b>4. Rezultati</b> .....	<b>65</b>
4.1. Filogenetska analiza ENT-Tudor/Agnet proteina u biljnom svetu .....	65
4.2. Genotipizacija <i>eml</i> mutanata i analiza <i>EML</i> ekspresionih profila .....	66
4.3. Fenotipska analiza <i>eml</i> mutanata .....	68
4.3.1.1. Komplementacija EML1 funkcije .....	71
4.3.1.2. Komplementacija EML3 funkcije .....	72
4.4. Lokalizacija EML proteina .....	72
4.5. Genetička i fenotipska analiza <i>eml1-2 eml3-4</i> dvostrukog mutanta nakon oplodjenja.....	75
4.6. Analiza transkriptoma <i>eml1-2 eml3-4</i> mutanta.....	80
4.7. Karakterizacija apomiksije kod <i>eml1-2 eml3-4</i> dvostrukog mutanta.....	85
4.8. Funkcionalna karakterizacija EML proteina.....	90
4.8.1. Funkcija EML proteina kao čitača histonskih modifikacija <i>in vitro</i> .....	90
4.8.1.1. Indukcija ekspresije i prečišćavanje EML1 rekombinantnog proteina ..	90
4.8.1.2. Indukcija ekspresije i prečišćavanje EML3 rekombinantnog proteina..	91

4.8.2. Vezivanje EML proteina za histonski proteinski čip .....	92
4.9. Vezivanje EML proteina za nukleozome.....	93
<b>5. Diskusija.....</b>	<b>96</b>
5.1. Potencijalna funkcija EML proteina pre i posle oplodjenja na osnovu studija lokalizacije.....	96
5.2. EML1 i EML3 sprečavaju formiranje semena u odsustvu oplodjenja kod <i>A. thaliana</i> .....	97
5.3. Uloga EML proteina u razviću semena nakon oplodjenja.....	99
5.4. Auksin: molekularni okidač za razviće semena <i>A. thaliana</i> .....	100
5.5. Model funkcije EML proteina .....	102
5.6. Razvoj tehnologije apomiksije u poljoprivredi.....	104
5.7. EML1 i EML3 - čitači modifikacija histona.....	105
<b>6. Zaključci.....</b>	<b>110</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>111</b>
<b>8. Prilozi.....</b>	<b>123</b>
<b>Biografija autora .....</b>	<b>135</b>

## 1. Uvod

### 1.1. Hromatin i regulacija genske ekspresije

Ekspresija gena u eukariotskoj ćeliji je složen proces i podrazumeva brojne mehanizme regulacije koji uključuju različite nivoe regulacije, od načina formiranja hromatinskih struktura do kontrolisane razgradnje proteinskih produkata (Brajušković, 2012).

Kontrolne „tačke” regulacije genske ekspresije eukariota su: kontrola organizacije hromatina; inicijacija transkripcije; obrada primarnog transkripta; transport informacione RNK (iRNK); inicijacija translacije; posttranslacione modifikacije proteina; i transport proteina (Simonović, 2011).

### 1.2. Struktura hromatina

U jedrima eukariotskih ćelija, molekuli DNK nisu ogoljeni, već su u konstantnoj interakciji sa proteinima i malom količinom molekula RNK, koji predstavlja kondenzovani nukleoproteinski kompleks, hromatin. Formiranje kompleksa između DNK i proteina obezbeđuje opštu organizaciju genoma u jedru, i ima presudnu ulogu u „pakovanju“ molekula DNK u jedru, zaštiti molekula DNK od dejstva nukleaza i raspodeli hromozoma tokom ćelijske deobe, kao i važnu funkciju tokom ćelijskih procesa kao što su replikacija, transkripcija, rekombinacija, popravka DNK i regulacija ekspresije gena. U interfaznom jedru na ultrastrukturnom nivou uočavaju se dve forme hromatina: kondenzovana forma hromatina, heterohromatin i difuzna forma, euhromatin. Euhromatin uglavnom sadrži transkripciono aktivne delove molekula DNK, dok je heterohromatin transkripciono neaktivan. Hromatin je dinamična struktura kod koje dolazi do prelaska euhromatina u heterohromatin, i obrnuto, u zavisnosti od tipa ćelije, stupnja razvića i odgovora na spoljašnje stimulse (Rothbart i Strahl, 2014).

Osnovnu jedinicu građe hromatina predstavlja nukleozom, koji se sastoji od oktamera histonskih proteina oko kojeg se obavija lanac od oko 147 baznih parova (bp) DNK. Histonski oktamer se sastoji od po dva molekula svakog od četiri nukleozomska histona (H2A, H2B, H3 i H4). Segment molekula DNK između dva nukleozoma naziva se vezna (eng. *linker*) DNK čija dužina varira od 10 do 90 bp (Berr i sar, 2011). Histon H1



ostvaruje interakciju sa veznom DNK i sa DNK koja obmotava histonski oktamer. Prečnik hromatinske niti koja nastaje formiranjem nukleozoma iznosi 10 nm. Pakovanjem nukleozoma u vlakno prečnika od 30 nm, dolazi do formiranja sekundarne strukture hromatinskog vlakna, koje se dalje spiralizuje i formira hromatinske petlje prečnika od 100 nm (Brajušković, 2012).

Regulacija organizacije hromatina uključuje kovalentne posttranslacione modifikacije na histonima, ATP-zavisnu mašineriju za remodelovanje hromatina kao i postojanje histonskih varijanti u nukleozomima (Berr i sar, 2011).

### **1.3. Epigenetika**

Pored genetičke informacije sadržane u redosledu nukleotida molekula DNK, postoje informacije koje dovode do naslednih promena koje se ne mogu objasniti promenama u DNK sekvenci. Ovaj tip nasleđivanja se naziva epigenetičkim. Epigenetika u širem smislu uključuje i nasleđivanje citoplazmatskih proteina (npr. priona), dok se u užem smislu pod epigenetičkim nasleđivanjem podrazumevaju nasledne promene u ekspresiji gena koje su nastale kao posledica modifikacija molekula DNK ili histona. Poslednjih godina ova oblast privlači sve veću pažnju naučnika jer se neprekidno otkrivaju novi epigenetski mehanizmi koji utiču na aktivnost gena. Epigenetski procesi uključuju složenu interakciju između metilacije DNK, modifikacija histona i nekodirajućih RNK, naročito malih interferirajućih RNK (eng. *short interfering RNAs*, siRNAs) i mikro RNK (eng. *microRNAs*, miRNAs) (EPIC Planning Committee, 2012; Berger i sar., 2009; Pikaard i Scheid, 2014).

#### **1.3.1. Epigenetičke modifikacije: jezik u razvoju**

##### **1.3.1.1. Metilacija DNK**

Metilacija DNK je modifikacija molekula DNK koja nastaje vezivanjem metil (-CH<sub>3</sub>) grupe za ugljenik na poziciji C5 pirimidinskog prstena citozina, nastala katalitičkom aktivnošću enzima pod grupnim nazivom DNK metiltransferaze. S obzirom da je metilacija DNK najranije otkrivena epigenetička modifikacija, ona je ujedno i najbolje proučena. Metilacija DNK ima važnu ulogu u održavanju stabilnosti genoma tokom embriogeneze i razvika. Naime, promenjen obrazac metilacije može dovesti do različitih

razvojnih abnormalnosti kod biljaka i sisara, kao što su promene u sazrevanju ploda paradajza odnosno letalnost embriona kod miševa (Robertson, 2005; Lang i sar., 2017; Cortellino i sar., 2011). Menjajući strukturu i organizaciju hromatina, metilacija DNK reguliše ekspresiju gena i učestvuje u regulaciji genomskog utiskivanja, kao i inaktivaciji X-hromozoma (Torres i Fujimori, 2015). Interakcija između metilacije DNK i modifikacija histona takođe je važan faktor za određivanje statusa ekspresije gena (Stroud i sar., 2014). Metilacija DNK je ključan mehanizam kod sisara i biljaka koji dovodi do utišavanja transpozona (transpozabilnih elemenata, TE) (Zemach i Zilberman, 2010).

Kod vrste *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn.) (uročnjak) postoji sedam gena koji kodiraju enzime sa DNK metiltransferaznom funkcijom: DNK metilaza rearanžiranih domena 1 (*Domains Rearranged DNA methylase 1, DRM1*) i DNK metilaza rearanžiranih domena 2 (*Domains Rearranged DNA methylase 2, DRM2*); hromometilaza 1 (eng. *chromomethylase 1, CMT1*), hromometilaza 2 (*CMT2*) i hromometilaza 3 (*CMT3*); metiltransferaza 1 (*MET1*) i metiltransferaza 2 (*MET2*). Četiri gena, *DRM2, CMT2, CMT3* i *MET1*, kodiraju funkcionalno aktivne DNK metiltransferaze (Du i sar., 2015). Kod biljaka, DNK je metilovana u tri konteksta: CG, CHG i CHH (gde je H bilo koji nukleotid izuzev nukleotida G) (Goll i Bestor, 2005). Kod *A. thaliana* je 24% citozina metilovano u CG, 6.7% u CHG i 1.7% u CHH kontekstu (Xu i sar., 2013). DNK je u najvećem broju slučajeva metilovana u kodirajućim regionima gena kao i u TE pozicioniranim u okviru heterohromatina (Lippman i sar., 2004). Za simetričnu CG metilaciju kod uročnjaka je zadužena metiltransferaza MET1, dok su za simetričnu CHG i asimetričnu CHH metilaciju odgovorne aktivnosti hromometilaza CMT3 i CMT2 kao i njihove interakcije sa histonskim modifikacijama koje imaju ulogu u inaktivaciji gena (Stroud i sar., 2014). Naime, Stroud i saradnici (2014) su pokazali da CMT2, CMT3 i DRM2 metiltransferaze zajedno regulišu asimetričnu metilaciju, i formiraju mehanizam povratne sprege sa H3K9 metilacijom i malim RNK molekulima (eng. *small RNAs, sRNAs*) kontrolišući utišavanje gena. Strukturna i funkcionalna analiza CMT3 je pokazala da je za vezivanje ovog proteina za hromatin neophodno prisustvo dva domena (BAH i hromodomen) koji prepoznaju modifikaciju hromatina H3K9me2. CMT3, stoga, predstavlja jedan od najboljih primera povratne sprege između metilacije DNK i histona (Du i sar., 2012).

Nivo metilacije DNK se menja tokom razvića ili usled promene uslova sredine i kontrolisan je povratnom spregom reakcija metilacije i demetilacije. Demetilaciju kod biljaka katalizuje genska familija 5-metilcitozin DNK glikozilaza (Barreto i sar., 2007). Najbolje proučene grupe DNK glikozilaza kod *A. thaliana* obuhvataju DME (DEMETER), ROS1 (REPRESSOR OF SILENCING 1), kao i DML2 (DEMETER-LIKE PROTEIN 2) i DML3. Pokazano je da *DME* ima aktivnu ulogu tokom gametogeneze i eksprimiran je u centralnoj ćeliji ženskog gametofita pre oplodjenja, dok u endospermu nakon oplodjenja nije detektovana njegova ekspresija. Ova DNK glikozilaza je takođe eksprimirana u muškom gametofitu i to u vegetativnoj ćeliji polenovog zrna (Schoft i sar., 2011). Funkciju DNK glikozilacije u svim vegetativnim tkivima obavljaju ROS1, DML2 i DML3 koji igraju ulogu u regulaciji nivoa metilacije TE u blizini gena i tako regulišu gensku ekspresiju (Penterman i sar., 2007). Mehanizam koji katalizuje aktivnu DNK demetilaciju učestvuje u mehanizmu popravke DNK uklanjanjem purinskih ili pirimidinskih baza i skraćeno se naziva BER (eng. *base excision repair pathway*) (Choi i sar., 2002; Gong i sar., 2002; Morales-Ruiz i sar., 2006; Ortega-Galisteo i sar., 2008). Tokom demetilacije DNK, bifunkcionalni enzimi deluju prvo kao DNK glikozilaze tokom hidrolize glikozilnih veza između baze i dezoksiriboze, a zatim kao apurinske ili apirimidinske lijaze pri čemu se formira 3'-fosfor-aldehid, odnosno 3'-fosfat. Zatim, delovanjem endonukleaze DNK lijaze APE1L (eng. *apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease-like proteins*), i DNK fosfataza ZDP (eng. *zinc finger DNA 3'-phosphoesterase*), formira se 3'OH grupa tako da se krajevi mogu spojiti uz pomoć enzima DNK polimeraze i ligaze. *A. thaliana* LIG1 (eng. LIGASE 1) kolokalizuje sa ROS1, ZDP i APE1L, zbog čega je verovatno ova ligaza uključena u proces aktivne demetilacije DNK. U literaturi je pokazano i da je LIG1 neophodan za demetilaciju i aktivaciju maternalno utisnutih gena kao što su *MEA* i *FWA* u endospermu (Li i sar., 2015).

Poslednjih godina svedoci smo značajnog napretka u razumevanju aktivne demetilacije DNK. Identifikovani su brojni proteini koji su uključeni u nizvodne korake aktivne demetilacije DNK u genomu *A. thaliana*. Faktori koji regulišu enzimsku aktivaciju DNA glikozilaza su otkriveni, i ustanovljeno je da aktivna demetilacija DNK igra ključnu ulogu u širokom spektru procesa razvića kod nekoliko biljnih vrsta. Međutim, mnoga nerazjašnjena pitanja ostaju tema budućih istraživanja, kao što su npr.

mehanizmi regrutacije DNK glikozilaza na specifičan genski lokus. Takođe, identifikovano je svega nekoliko faktora koji regulišu aktivnu DNK demetilaciju tokom procesa razvića kod biljaka. Primera radi, ustanovljeno je da je auksin okidač aktivne DNK demetilacije lokusa *APOLO* (eng. *AUXIN REGULATED PROMOTER LOOP RNA*) kod *A. thaliana* (Ariel i sar., 2014). Međutim, faktori koji povezuju auksin sa aktivnom demetilacijom *APOLO* za sada su nepoznati. Povrh svega, razvoj i optimizacija RNK-vođene dCas9 tehnologije demetilacije u biljkama bi mogla da doprinese razumevanju mehaničkih aspekata metilacije ili demetilacije DNK, te praktičnoj primeni epigenetičke manipulacije biljnih genoma.

### **1.3.1.2. Modifikacije histona i hipoteza histonskog koda**

Status modifikacija histona je, uz metilaciju DNK, ključan za regrutovanje faktora koji dovode do strukturnog organizovanja hromatina. Histonski proteini tj. njihovi repovi su podložni brojnim posttranslacionim enzimskim reakcijama koje uključuju metilaciju, acetilaciju, fosforilaciju, ADP-ribozilaciju, sumoilaciju i ubikvitinaciju, a omogućene su dejstvom velikog broja enzima na različite ostatke aminokiselina različitih histona (Zhang i sar., 2015). Pojedinačne ili kombinovane modifikacije repova histona menjaju strukturu hromatina i na taj način utiču na ekspresiju gena, popravku DNK molekula, replikaciju DNK, alternativnu obradu primarnog transkripta iRNK i pakovanje genetičkog materijala u ćeliji (Portela i Esteller, 2010). Ovaj koncept je označen kao „hipoteza histonskog koda”. Prema njemu, jedinstvene kombinacije različitih posttranslacionih kovalentnih modifikacija (eng. *PTM*) na različitim histonima (H2A, H2B, H3 i H4) određuju interakciju između histona i DNK, kao i nehistskih proteina sa hromatinom, koja oblikuje specifičan obrazac transkripcije određenog regiona u genomu (Strahl i Allis, 2000). Od devedesetih godina prošlog veka, jedna od važnih tema istraživanja, pored strukturne uloge, jeste i uloga histona i modifikacija histona u regulaciji ekspresije gena eukariota. Stabilnost odnosno dinamičnost interakcije histonskih proteina i molekula DNK regulisana je brojnim ćelijskim modulatorima koje klasifikujemo na proteine koji dodaju tj. „pišu” PTM (tzv. histonski pisači), proteini koji uklanjaju modifikacije (tzv. histonski brisači), proteini koji se vezuju za modifikacije i prevode ih u odgovarajući odgovor (tzv. histonski čitači), i na one koji vrše remodelovanje nukleozoma. Funkcionalna sprega između proteina čitača, pisača i

brisača ima funkciju da (i) regrutuje ili stabilizuje katalitičku aktivnost proteina na specifičnim mestima hromatina, (ii) reguliše specifičnost supstrata za odgovarajući protein i, (iii) alosterično reguliše aktivnost enzima (Torres i Fujimori, 2015).

Radi jednostavnijeg i bržeg pronalaženja informacija o poznatim i pretpostavljenim vezama između PTM unutar i između proteina koji stupaju u interakciju, formirana je baza podataka PTMCode. Ona trenutno sadrži 69 tipova PTM iz 19 različitih eukariotskih vrsta. Trenutno je ispitano 1,6 miliona mesta i 17 miliona funkcionalnih povezanosti kod više od 100 000 proteina (<http://ptmcode.embl.de/index.cgi>).

Metilacija predstavlja najstabilniju kovalentnu modifikaciju histona, katalizovanu posredstvom dve različite familije enzima, histon-lizin-metiltransferazama (eng. *histone lysine methyltransferases*, HKMTs) koje sadrže katalitički SET domen, i protein-arginin-metiltransferazama (eng. *protein arginine methyltransferases*, PRMTs) (Bobadilla i Berr, 2016). Metilacija histona povezana je sa transkripciono aktivnim, ali i neaktivnim hromatinom, što zavisi od položaja metilovanog aminokiselinskog ostatka u histonskom repu, zatim od toga da li se reakcija metilacije odigrava na aminokiselini lizin ili arginin, potom od stupnja metilacije (mono-, di- ili tri-metilacija), kao i od modifikacija okolnih aminokiselinskih ostataka histona H2A, H2B, H3 i/ili H4. Metilacija histona ne dovodi do promene naelektrisanja histonskog repa, već utiče na hemijske osobine histona i afinitet vezivanja za transkripcione faktore i druge regulatorne molekule (Musselman i sar., 2012; Xu i sar., 2013). Studije analize čitavog genoma (eng. *genome-wide analysis*) *A. thaliana* pokazale su da su trimetilacija H3K4 i H3K36 (H3K4me3 i H3K36me3) najzastupljenije u regionima transkriptivno aktivnih gena, dok se H3K27me3 povezuje sa transkripciono neaktivnim genima. Regioni u genomu u kojima preovladava konstitutivni heterohromatin i utišani TE, su obogaćeni H3K9me2 i H4K20me1 modifikacijama (Zhang, X., 2012). Metilacija histona je takođe reverzibilna modifikacija. Otkriven je veliki broj enzima koji imaju ulogu demetilacije putem reakcija amino oksidacije, hidroksilacije ili deiminacije (Liu i sar., 2010).

Od 49 proteina *A. thaliana* koji sadrže SET domen, 31 ima histon lizin metiltransferaznu aktivnost i oni su klasifikovani u pet kategorija (I do V), u zavisnosti od njihove strukture/organizacije domena i razlika u enzimskoj aktivnosti (Pontvianne i sar., 2010). Pored njih razlikuju se i grupa VI, koja poseduje izmenjenu aminokiselinsku

strukturu SET domena, kao i grupa VII, koja sadrži SET domene koji metiluju nehistske proteine (Ng i sar., 2007). Shodno postojanju velikog broja različitih histon-metiltransferaza, i mehanizmi regulacije procesa metilacije su takođe raznovrsni. Primera radi, i H3K27me3 i H3K9me2 su modifikacije koje se povezuju sa genskom represijom, s tim što metilaciju lizina na poziciji 27 katalizuje između ostalih metiltransferaza i PRC2 kompleks (eng. *Polycomb Repressive Complex 2*) (Turck i sar., 2007), dok je najveći deo metilacije na lizinu 9 indukovano od strane siRNK i dimetilovano uz pomoć metiltransferaza KYP (Liu i sar., 2010).

Novija istraživanja pokazuju veoma važnu ulogu metilacije arginina u epigenetičkoj regulaciji genske ekspresije. Devet članova PRMT familije je identifikovano kod *A. thaliana*, nazvanih *A. thaliana* protein-arginin-metiltransferaze (AtPRMT). Ovi enzimi su klasifikovani u tri kategorije prema katalitičkoj aktivnosti: grupa I (PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4, PRMT6, i PRMT8) i grupa II (PRMT5 i PRMT9) su enzimi koji u svom katalitičkom putu pre formiranja asimetričnog (a) ili simetričnog (s) dimetilarginina (redom), koriste intermedijer monometilarginin kao supstrat. PRMT7 enzim pripada grupi III koja katalizuje samo formiranje monometilarginina, i za sada se smatra da su histoni jedini poznati supstrat ovog enzima. Modifikacije H4R3me2a, H3R2me2s, H3R17me2a, H3R26me2a učestvuju u aktivaciji genske ekspresije dok H3R2me2a, H3R8me2a, H3R8me2s, H4R3me2s održavaju gene u transkripciono neaktivnom stanju (Niu i sar., 2012, Blanc i Richard, 2017).

Acetilacija  $\epsilon$ -amino grupa u ostacima lizina u molekulima histona, dejstvom enzima histon-acetiltransferaza (HAT), je posttranslaciona modifikacija, koja dovodi do neutralizacije pozitivnog naelektrisanja histona. Ova kovalentna promena histona slabi njihovu interakciju sa negativno naelektrisanom DNK i dovodi do stvaranja otvorenije (manje kondenzovane) hromatinske strukture. Nasuprot tome, kada se acetil grupe uklanjaju sa molekula histona dejstvom enzima histon-deacetilaza (HDAC), hromatin je tesno pakovan, teško je dostupan transkripcionim faktorima i dolazi do utišavanja gena. Pored toga, modifikovani ostaci lizina mogu da deluju i kao mesta vezivanja transkripcionih faktora i drugih proteina koji modifikuju hromatin (Musselman i sar., 2012).

### 1.3.1.3. Proteini čitači modifikacija na histonima

Prvi protein čitač modifikacija na histonima je okarakterisan 1999. godine kada je otkriveno da bromo-domen histon-acetiltransferaze (HAT PCAF) prepoznaje i vezuje se za acetilovani lizin (Dhalluin i sar., 1999). Od tada, identifikovan je veliki broj čitača koji prepoznaju različite PTM. Neki čitači histona pokazuju visok stepen specifičnosti, dok se drugi nesmetano vezuju za različite PTM. Mehanizam prepoznavanja varira među čitačima. Takođe, mehanizam prepoznavanja odgovarajuće sekvence umnogome zavisi od PTM koja se nalazi u blizini PTM za koju se protein čitač vezuje. Regrutovanje čitača ka određenom regionu u genomu je zavisno i od kombinatnog delovanja više proteina efektora. Naime, postoje slučajevi da se efektorni kompleksi sastoje od nekoliko kopija istog čitača ili od kombinacije različitih čitača, od kojih svaki pokazuje specifičnost vezivanja za različite PTM. Čitači mogu prepoznati PTM na jednom histonskom repu (*cis* mehanizam) ili različitim histonskim repovima (*trans* mehanizam) (Musselman i sar., 2012). Čitači koji prepoznaju metilovani lizin se vezuju za ovu PTM preko specifične strukture nazvane aromatični kavez (džep). Struktura aromatičnog kaveza i njegova veličina zavisi od toga da li se vezuje za mono-, di- ili trimetilovano stanje lizina koji prepoznaje. Mala veličina džepa može sprečiti interakciju sa višim statusom metilacije zbog steričnog ometanja, dok je veći džep pogodan za viši nivo metilacije, jer su neophodni kontakti mogući samo sa većom grupom metilamonijuma (Musselman i sar., 2012).

Čitači metilacije - jedne od najčešćih modifikacija na histonima, u svojoj strukturi poseduju određeni domen koji prepoznaje i vezuje se za specifično modifikovane histone i podeljeni su u tri familije proteina: 1) kraljevska super-familija (eng. *Royal super-family*) u koju svrstavamo Tudor domen i njegov homolog kod biljaka Agenet domen, bromo domen, hromo-domen (eng. *chromo domain*) i domeni slični njemu, BAH (eng. *bromo-adjacent homology*), PWWP (proteini koji sadrže konzervisan motiv sastavljen od aminokiseina prolin i triptofan) i MBT domen (eng. *malignant brain tumor*); 2) PHD super-familija sa predstavnikom PHD proteinom (eng. *plant homeodomain*); i 3) WD super-familija koju čine proteini koji poseduju WD domen (ponovci triptofan-asparaginske kiseline (W-D) dipeptida) (Zhao i sar., 2018). Iako se radi o velikoj grupi međusobno različitih proteina koji su uključeni u niz različitih

bioloških procesa u ćeliji, malo se zapravo zna o mehanizmu kojim ovi proteini prevode informaciju koju čitaju u signal koji se potom prenosi do odgovarajućih regulatornih sistema.

Koristeći *Arabidopsis* kao model sistem, Liu i Min (2016) su identifikovali 29 hromodomena u okviru 23 različita proteina, potom 71 Tudor domen u 32 različita proteina, kao i 20 PWWP domena u strukturi 20 različitih proteina. Međutim, detaljnije informacije o mehanizmima prepoznavanja PTM od strane različitih čitača još uvek nisu dostupne zbog šturih i sporadičnih podataka o delovanju i funkciji pojedinačnih histonskih čitača u biljkama. Kako dve ili više modifikacija histona obično postoje u kombinaciji, analiza kombinatorijalnih histonskih modifikacija takođe je kritična za proučavanje proteina koji ih prepoznaju. Do danas je okarakterisan mehanizam prepoznavanja svega nekoliko histonskih čitača kod biljaka. Proteini MRG1 i MRG2 (eng. *Morf-related genes 1 and 2*) predstavljaju čitače koji imaju dvojnju ulogu. Naime, hromodomen u okviru proteina prepoznaje H3K36me3 kao i H3K4me3 i reguliše ekspresiju *FLC* i *FT* kod *A. thaliana*. *X-ray* kristalografijom su identifikovana mesta prepoznavanja i stanje metilacije tj. H3K4me2/3 za koje se vezuje PHD domen iz AL familije proteina (Liu i Min, 2016). Dva detaljno proučena proteina, WDR5 (eng. *WD-repeat protein-5*) i EED (eng. *Pc protein EED*) pepoznaju H3R2 odnosno H3K27me3 (Ruthenburg i sar., 2006). Hromodomen proteina LHP1 (eng. *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1*) prepoznaje H3K27me3, dok se PHD domen proteina ORC1 (eng. *ORIGIN-RECOGNITION PROTEIN 1*) vezuje za H3K4me3 (Liu i sar., 2010). Izuzev DNK hromometilaze CMT3, do danas nije identifikovan nijedan drugi čitač H3K9me2 modifikacije. Takođe, pretpostavlja se da među čitačima postoji mehanizam dvostrukog prepoznavanja koji uključuje vezivanje različitih proteinskih domena za istu modifikaciju, kao što je pokazano u slučaju CMT3.

#### **1.3.1.3.1. Agenet/Tudor porodica proteina čitača**

Agenet domen je prvi put opisan u biljkama i grupisan je u okviru kraljevske superfamilije proteina zbog posedovanja sekvence koja je homologna sekvenci Tudor domena identifikovanog kod FMRP proteina (eng. *Fragile X Mental Retardation Protein*) životinja. Ubrzo potom, postojanje Agenet domena je identifikovano i u humanom genomu, zbog čega se ova proteinska familija danas sve više označava kao



Agenet/Tudor (Brasil i sar., 2015). Biljni ENT domen je homologan onkoproteinu EMSY, identifikovanom represoru transkripcijske aktivnosti BRCA2 (Hughes-Davies i sar., 2003).

Agenet/Tudor porodica proteina je široko zastupljena u biljnom carstvu. U genomu *A. thaliana* je otkriveno 28 gena koji kodiraju proteine koji u strukturi poseduju ovaj domen (Hughes-Davies i sar., 2003). Opsežne analize ukazuju da se Agenet/Tudor domeni uglavnom nisu usamljeni u proteinskoj strukturi, već se u organizaciji proteina pored Agenet/Tudor sekvence nalaze često i EMSY-like (ENT), BAH, PHD i/ili DUF724 domeni što doprinosi diverzifikaciji funkcija (Maurer-Stroh i sar., 2003). U genomu uročnjaka, od ukupnog identifikovanog broja proteina, koji u svojoj strukturi poseduju Agenet domen, za svega dva proteina je funkcija prepoznavanja i vezivanja za specifične PTM i pokazana. Prvi je takozvani SAWADEE domen (domen sličan Tudor domenu) u okviru SHH1 (eng. *SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOGUE 1*) proteina koji prepoznaje H3K9me2 i regrutuje RNK polimerazu IV do odgovarajućih ciljnih regiona genoma koji potom bivaju utišani (Law i sar., 2013). Drugi protein iz ove grupe, sa ulogom da interaguje sa nemodifikovanim histonima, je AIP1 (eng. *ABAPI INTERACTING PROTEIN 1*) (Brasil i sar., 2015). Zhao i saradnici (2018) su identifikovali nekoliko proteina čitača koji prepoznaju jedinstvene PTM u *A. thaliana*, a među njima i MSH6 koji prepoznaje H3K4me3. Do sada je malo poznatih proteina koji u svojoj strukturi poseduju i Agenet i ENT domene. Četiri *A. thaliana* EMSY-like (EML) proteina su identifikovana kao potencijalni čitači histonskih modifikacija na osnovu njihove strukture u kojoj se nalazi Agenet domen (Tsuchiya i Eulgem, 2010). Za *A. thaliana* gene *EMSY-like 1* (EML1) i *EMSY-like 2* (EML2) je u literaturi opisano da stupaju u interakciju sa transkripcionim faktorom EDM2 (eng. *Enhanced Downy Mildew 2*) koji vrši represiju ekspresije *FLC* gena (eng. *Flowering Locus C*) što za posledicu ima poremećen vremenski okvir cvetanja (Tsuchiya i Eulgem, 2010). Ovi proteini su homolozi R-INTERACTING FACTOR 1 (RIF1) koji je identifikovan u kukuruzu, sadrži N-terminalni ENT domen i C-terminalni Agenet domen, i za koji su Hernandez i saradnici (2007) pokazali da je neophodan za regulaciju transkripcije gena u biosintetskom putu antocijanina. Takođe, nedavno je ustanovljeno i da Agenet domen EML1 proteina ima ulogu čitača H3K4me3 i H3K36me3 modifikacije (Zhao i sar., 2018).

Tabela 1. Tabela prikaz čitača histonskih modifikacija. Modifikovano prema Andrews i sar., 2016.

<b>PTM histona</b>	<b>Čitač modifikacije</b>
<b>H3Kac, H4Kac, H2Bkac</b>	BD
<b>H3KacKac, H4KacKac</b>	DBD
<b>H3K14ac</b>	DPF
<b>H3K56ac</b>	DPH
<b>H3Kpr</b>	BD
<b>H3Kcr</b>	YEATS
<b>H3K9me3</b>	ADD
<b>H3K9me2, H3K9me1</b>	Ankirin
<b>H3K20me2, H3K27me3</b>	BAH
<b>H3K36me3, H3K36me2, H3K36me1, H3K4me1</b>	Hromodomen
<b>H3K9me3, H3K9me2, H3K27me3, H3K27me2</b>	CD
<b>H3K4me3, H3K4me2, H3K4me1</b>	DCD
<b>H3Kme1, H3Kme2, H4Kme1</b>	MBT
<b>H3K4me3, H3K4me2, H3K9me3</b>	PHD
<b>H3K36me3, H4K20me1, H4K20me3, H3K79me3</b>	PWWP
<b>H3K9me1, H3K9me2, H3K9me3</b>	SAWADEE
<b>H3K4me3R8me2s</b>	Spindlin
<b>H3K4me3, H3K9me3, H4K20me3</b>	TTD
<b>H3K36me3</b>	Tudor
<b>H3K27me3, H3K9me3</b>	WD40
<b>H3K4me3</b>	CW
<b>H4R3me2s</b>	ADD
<b>H3Rme2, H4Rme2</b>	Tudor
<b>H3R2me2</b>	WD40
<b>H3S10ph, H3S28ph</b>	14-3-3
<b>H3T3ph</b>	BIR
<b>H2AXS139ph</b>	Tandem BRCT
<b>H3 nemodifikovan</b>	ADD
<b>H3 nemodifikovan</b>	BAH-PHD
<b>H3 nemodifikovan</b>	PHD
<b>H3 nemodifikovan</b>	PZP
<b>H3 nemodifikovan</b>	WD40

## 1.4. Razviće semena

### 1.4.1. Struktura i razviće gametofita kod biljaka

Semeni zametak (ovula), ženski reproduktivni organ prisutan kod golosemenica i skrivenosemenica, izgrađen je od megasporangije (nucelus) i najčešće dva listolika

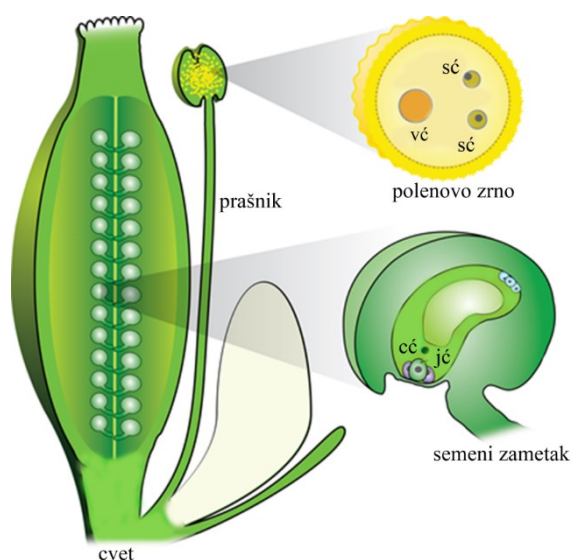
omotača (integument). Takav zametak se naziva bitegmičan zametak. Integumenti ne zahvataju nucelus u potpunosti već je njegov vrh slobodan i ovaj deo semenog zametka se naziva mikropila. Mikropila omogućava oplodjenje jer kroz nju polenova cev dolazi u kontakt sa ženskim gametofitom. Deo zametka nasuprot mikropili, kojim se zametak vezuje za tkivo megasporofila (placenta) naziva se halaza. U predelu halaze integumenti grade semenu nožicu (funikulus). Transport mineralnih i organskih materija do nucelusa se obavlja kroz ćelije halaze. Unutar diploidnog nucelusa se formira megasporocit, ćelija koja se tokom procesa sporogeneze mejotički deli i daje četiri haploidne ćelije. Tri ćelije degenerišu, a od preostale ćelije nastaje haploidna megaspore. Megaspore se mitotički deli i daje megagametofit tj. žensku gametofit generaciju golosemenica i skrivenosemenica (Goldberg i sar., 1994, Endress, 2011).

Ženski megagametofit (embrionova kesica) *Polygonum* tipa kome pripada i *A. thaliana*, sadrži 7 ćelija i 8 jedara. Ćelije nastaju kroz tri mitotičke deobe ćelije megaspore. Nakon mitotičkih deoba, ćelija koja je najbliža mikropili postaje jajna ćelija i oko nje se nalaze dve ćelije sinergide. Na suprotnom halazalnom kraju embrionove kesice nalaze se tri ćelije antipode koje degenerišu. U središnjem delu embrionove kesice nalazi se centralna ćelija sa dva polarna jedra (Drews i sar., 1998; Sundaresen i Alandete-Saez, 2010).

Svaki integument se inicijalno sastoji od unutrašnjeg i spoljašnjeg omotača. Unutrašnji integument potom podleže periklinalnim deobama pri čemu nastaje troslojna struktura. Asimetričan rast i razviće spoljašnjeg integumenta dovodi do savijanja ženskog gametofita i postavljanja mikropilarnog regiona blizu funikulusa. Istraživanja su pokazala da prisustvo ženskog gametofita nije neophodno za razviće integumenata, međutim ukoliko izostane pravilno razviće integumenata, ne dolazi ni do razvoja gametofita (Figueiredo i Köhler, 2014).

Formiranje muškog ili mikrogametofita kod cvetnica se odvija unutar specijalizovanih muških reproduktivnih organa koji se nazivaju prašnici i sastoji se od dve uzastopne faze - mikrosporogeneze i mikrogametogeneze (Borg i sar., 2009). Tipički građen prašnik sastoji se iz prašnikovog konca (*filamentum*) i prašnice (*anthera*) koja se sastoji iz dve poluantere (*thecae*), dok se svaka poluantera sastoji iz dve polenove kesice (*loculi*) u kojima se tokom procesa mikrosporogeneze obrazuju sporogene, materinske

ćelije mikrospore. Materinske ćelije polena se dele prvo mejotičkim, a zatim i mitotičkim deobama pa se kao rezultat toga stvara polenovo zrno (mikrogametofit) koje ima dve ćelije: vegetativnu i generativnu. Vegetativna se dalje ne deli, dok se generativna deli na dve spermatične ćelije (mikrogameti). Kod većine cvetnica u momentu oprašivanja polenova zrna su dvojedarna, a konačnu trojedarnu formu dobijaju u momentu klijanja u polenovu cev. Predstavnici iz familija Brassicaceae i Poaceae, primera radi, oslobađaju polen sa tri haploidne ćelije, jer se generativna ćelija deli neposredno pre klijanja polenove cevi. Oko polenovog zrna se nalaze dva omotača-spoljašni, egzina i unutrašnji, intina (Gomez i sar., 2015, Scott i sar., 2004).



Slika 1. Razviće gametofita kod biljaka. Ženski gametofit (embrionova kesica) nastaje unutar semenog zametka. Nakon mitotičkih deoba, nastaje jajna ćelija (jć) oko koje se nalaze dve ćelije sinergide (obojene ljubičasto na slici). Na suprotnom halazalnom kraju embrionove kesice nalaze se tri ćelije antipode (obojene plavo na slici) koje se degenerišu, dok se u središnjem delu embrionove kesice nalazi centralna ćelija (cc). Kao rezultat deoba materinskih ćelija polena u prašniku, stvara se polenovo zrno (mikrogametofit) koje ima dve ćelije: vegetativnu i generativnu. Vegetativna (vc) se dalje ne deli, dok se generativna deli na dve spermatične ćelije (sc). (modifikovano iz Gehring, 2013)

#### 1.4.2. Dvojno oplodjenje kod cvetnica

Kada polenovo zrno dospe na žig tučka, ono klija obrazujući polenovu cev koja se izdužuje prolazeći kroz plodnik da bi dospela do semenog zametka (Slika 1). Nakon prodora polenove cevi u semeni zametak, jedna haploidna spermatična ćelija spaja se sa haploidnom jajnom ćelijom pri čemu nastaje diploidni embrion, dok se druga

spermatična ćelija spaja sa polarnim jedrom centralne ćelije stvarajući triploidni endosperm (Hehenberger i sar., 2012). Na ovaj način kod skrivenosemenica dolazi do tzv. dvojnog oplodjenja. Spermatične ćelije su funkcionalno istovetne i proces spajanja sa jajnom odnosno centralnom ćelijom je proces koji se dešava po principu slučajnosti (Hamamura i sar., 2011). Za razliku od cvetnica, kod golosemenica oplodjenjem nastaje diploidni embrion ali ne dolazi do formiranja endosperma (Baroux i sar. 2002). U oba slučaja govorimo o zigotskoj embriogenezi koja se dešava unutar majke biljke (Dodeman i sar., 1997). Za razliku od ovog tipa embriogeneze, somatska embriogeneza se karakteriše formiranjem embriona poreklom od somatskih ćelija, a embrioni koji tom prilikom nastaju nazivaju se somatski embrioni. Razviće somatskog embriona je veoma slično razviću zigotskog embriona u pogledu morfologije, kao i u pogledu vremenski određenih faza kroz koje somatski embrion prolazi tokom svog razvića (Zimmerman, 1993). U oba tipa embriogeneze, jedna ćelija (zigot ili somatska ćelija) se razvija u embrion koji predstavlja novu individuu sa promenjenim (zigot) ili identičnim genomom (somatski embrion) (Nešković i sar., 2003; Zimmerman, 1993).

### **1.4.3. Razviće semena**

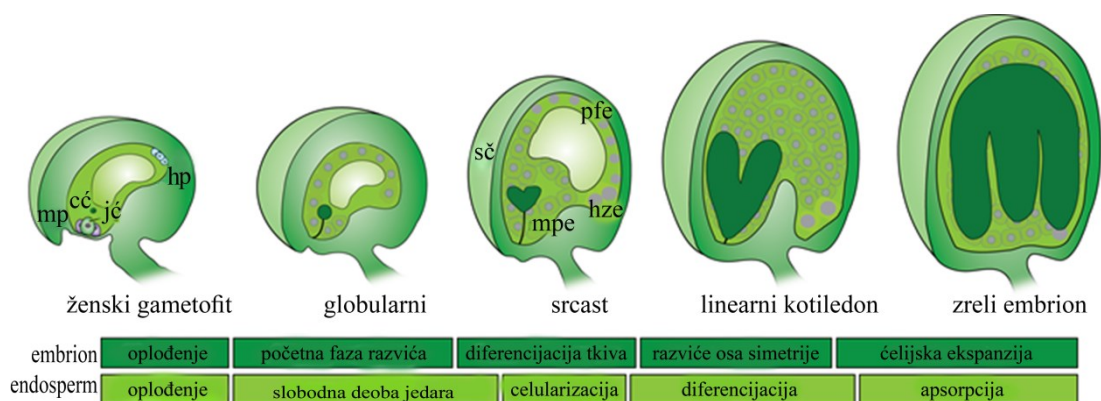
Seme nastaje iz oplodjenog semenog zametka (Slika 2). Srazmerno razviću embriona i endosperma, oplodeni semeni zametak povećava svoju zapreminu i veličinu, pri čemu od njegovih spoljašnjih i unutrašnjih integumenata nastaje zaštitni omotač embriona - semenjača. Nakon oplodjenja, procesi razvića semenjače, embriona i endosperma su koordinisani. Genetičke studije su pokazale da razviće semena i ploda izostaje u odsustvu oplodjenja, kao i da se rane faze razvića embriona i endosperma umnogome nalaze pod maternalnom kontrolom (Figuieredo i sar., 2016). Nekoliko gena koji kodiraju proteine neophodne za regulaciju ranog razvića semena, su takođe neophodni i za represiju razvića semena u odsustvu oplodjenja (vidi poglavlje FIS-PRC2 kompleks kod biljaka).

#### **1.4.3.1. Razviće embriona**

Embrion je, kao i biljka, trodimenzionalna struktura, koja nastaje uređenim ćelijskim deobama. U zrelom embrionu je prisutan samo osnovni plan građe koji se kasnije, nakon klijanja semena, usložnjava tokom postembrionalnog razvića. Tokom

embriogeneze uspostavlja se apikalno-bazalni i radijalni plan organizacije tkiva. Apikalno-bazalni plan organizacije podrazumeva da se embrion sastoji od ose embriona, koju čini tkivo koje će formirati telo klijanca, i od kotiledona, odnosno embrionalnih listova u kojima se tokom embriogeneze akumuliraju rezervne materije. Osa embriona se sastoji od epikotila, hipokotila, radikule i apikalnog meristema korena. Primera radi, *Arabidopsis* nema epikotil, za razliku od monokotiledonih biljaka kod kojih je epikotil izuzetno dobro razvijen. Radijalni plan organizacije podrazumeva diferencijaciju tri osnovna tkiva, pokrovnog (protoderm), osnovnog i prokambijalnog tkiva, koja se raspoređuju u koncentričnim krugovima (West i Harada, 1993). Nakon prve asimetrične deobe zigota, nastaje polarizovana osa embriona koju čine apikalna i bazalna ćelija embriona. Apikalna ćelija će formirati telo embriona, dok će od bazalne nastati filamentozni suspensor, kao i deo radikule. Apikalna ćelija se prvo deli uzdužno, pa poprečno formirajući kvadrant. Nakon sledeće dve uzastopne serije deoba embrion ulazi u globularnu fazu (West i Harada, 1993). Globularni stadijum je prvi prepoznatljivi stadijum u razviću embriona. Tokom globularnog stadijuma se formira protoderm. Deobe ćelija protoderma su antiklinalne i prate unutrašnje deobe ćelija formirajući sloj budućeg epidermisa. Posle dva, tri dana tokom kojih globularni embrion raste izodijametralno, dolazi do prelaza na rasteenje kojim se formira bilateralna simetrija embriona i taj stadijum se zove srcoliki (srce). Tokom prelaza sa globularnog na srcoliki stadijum dolazi do početka rasta kotiledona, izduživanja hipokotila i formiranja radikule, što se nastavlja i tokom narednog torpedo stadijuma. Takođe, prokambijum se razvija na prelazu globularnog u srcoliki stadijum. U fazi torpedo počinju da se akumuliraju rezervne materije. Kod embriona u torpedo fazi, hipokotil se i dalje izdužuje, a između kotiledona se formira apikalni meristem izdanka.

U fazi linearni kotiledon se nastavlja ekspanzija kotiledona, koja potom prelazi u fazu savijenog kotiledona i dolazi do isušivanja i pripreme za dormanciju, čime se kompletira proces formiranja semena (Slika 2) (West i Harada, 1993; Collete i sar., 2015).



Slika 2. Razviće semena *A. thaliana*. Nakon oplođenja, razviće endosperma započinje sincicijelnom fazom. Diferencijacija tkiva embriona je praćena celularizacijom endosperma koja se dešava od mikropilarnog pola (mp) ka halazalnom polu (hp). Razlikujemo tri domena endosperma: mikropilarni (mpe), periferni (pfe) i halazalni region (hze). Embrion i endosperm su okruženi semenjačom (sč). Kada embrion dostigne fazu potpune zrelosti, svega jedan ili dva sloja endosperma ostaju neapsorbovani. Skraćenice: cc-centralna ćelija; jc-jajna ćelija (modifikovano iz Gehring, 2013).

### 1.4.3.2. Razviće endosperma

Endosperm je tkivo za skladištenje hranljivih materija koje nastaje spajanjem dva polarna jedra centralne ćelije embrionove kesice sa drugom spermatičnom ćelijom polena (Zhang i sar., 2018). Razlikujemo tri tipa endosperma: jedarni (nuklearn), ćelijski (celularan) i intermedijarni (helobijalan). Kod i kod većine cvetnica, razviće endosperma *A. thaliana* pripada jedarnom ili nuklearnom tipu razvića u kome je faza sincicijuma tj. faza slobodnih deoba jedara bez citokineze praćena fazom celularizacije (Hehenberger i sar., 2012). Kod ćelijskog ili celularnog tipa razvića endosperma, pri obrazovanju endosperma, deobu jedara prati formiranje pregradnih ćelijskih zidova, dok se kod intermedijarnog tipa nakon prve deobe jedra endosperma formiraju dve ćelije od kojih se jedna dalje deli po nuklearnom tipu, dok se druga deli ili po nuklearnom ili po celularnom tipu (Nešković i sar., 2010).

U okviru sincicijuma razlikujemo tri domena: mikropilarni koji okružuje embrion, periferni i halazalni region. Eksperimentalno je pokazano da kompartmentizacija endosperma na tri domena ima ulogu regulacije protoka hranljivih materija u samom semenu (Berger, 2003). Celularizacija sincicijalnog endosperma koji okružuje embrion se dešava tokom prelaska embriona iz globularne u fazu srca. Nakon toga, celularizacija

se odigrava i u mikropilarnom i halazalnom regionu (Hehenberger i sar., 2012). Pre faze celularizacije, endosperm ispunjava centralna vakuola, koju okružuje tanak sloj sincicijuma. Tokom ove faze, saharoza koja se doprema kroz funikulus i integumente transportuje se aktivnim transportom u centralnu vakuolu gde se hidrolizuje u heksoze. Embrion se u ovoj fazi najvećim delom snabdeva saharozom uz pomoć simplastnog transporta preko plazmodezmi u suspensoru. Progresivnom celularizacijom endosperma, veličina i zapremina centralne vakuole se smanjuje, dolazi do degeneracije suspensora i transport saharoze biva preusmeren na embrion koji postaje glavni depo energije semena u razviću. Dakle, u momentu kada se embrion nalazi na stadijumu srca, simplastni transport saharoze preko suspensora biva zamenjen simplastnim transportom iz endosperma u embrion, koji uključuje aktivnost AtSUC5 transportera saharoze. U slučajevima kada postoji poremećaj u celularizaciji endosperma, centralna vakuola i dalje zauzima čitavu zapreminu endosperma predstavljajući glavno skladište šećera, onemogućavajući transport šećera u embrion i dovodeći do zaustavljanja njegovog razvića (Hehenberger i sar., 2012; Lafon-Placette i Köhler, 2014).

Proučavanjem mutacija koje dovode do promena u epigenetičkim modifikacijama zaključeno je da epigenetički mehanizmi (metilacija DNK i modifikacije histona) igraju ključnu ulogu u kontroli razvića endosperma. Uticaj metilacije DNK se ogleda na primeru *met1* mutanta *A. thaliana* kod koga globalna DNK hipometilacija izaziva produžetak sincicijalne faze ako je mutirani alel poreklom od majke ili skraćenje ove faze ukoliko se mutacija nasleđuje preko oca (Adams i sar. 2000). Takođe, aktivnošću *DME* pre oplođenja u centralnoj ćeliji, maternalni aleli u endospermu su hipometilovani što dovodi do diferencijalne ekspresije alela bilo sa majčinih ili sa očevih kopija gena i do pojave epigenetičkog fenomena genomskog utiskivanja (Moreno-Romero i sar., 2016). Uticaj modifikacija histona na razviće endosperma se najvećim delom ogleda u aktivnosti PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) kompleksa koji je specifično eksprimiran u reproduktivnoj fazi života biljke i naziva se FIS-PRC2. Identifikovani FIS-PRC2 ciljni geni u endospermu *A. thaliana* uključuju transkripcioni faktor AGL62 koji kontroliše pravovremenu celularizaciju endosperma, kao i gene *YUC10* i *TAR1*, koji su uključeni u biosintezu auksina (Hsieh i sar., 2011; Koltunow i Rabiger, 2015). Takođe, veliki broj studija je pokazao da interploidna ukrštanja dovode ili do kašnjenja u celularizaciji ili do kompletnog poremećaja u razviću endosperma što se dovodi u



vezu sa poremećenom regulacijom *FIS* gena (Erilova i sar., 2009, Hehenberger i sar., 2012) i ovi procesi će biti detaljno opisani u poglavlju „Razviće semena sa poremećenom ravnotežom doprinosa roditelja”.

#### **1.4.3.3. Razviće semenjače**

Posle oplodjenja i formiranja embriona i endosperma, integumenti takođe prolaze kroz proces diferencijacije i rasta koji će dovesti do formiranja semenog omotača (semenjače). Rast i razvoće semenog omotača je proces predvođen najpre izduživanjem (elongacijom) ćelija (Garcia i sar., 2005). Petoslojna struktura omotača koja postoji kod neoplođenog semenog zametka se zadržava i kod semena u razviću nakon oplodjenja. Tokom procesa rasta i razvića semena i embriona, svaki od slojeva ima određenu sudbinu. Jedan do dva dana nakon oplodjenja dolazi do biosinteze proantocijanidina (PA), poznatijih kao kondenzovani tanini, najpre u predelu mikropile, da bi potom do šestog dana nakon fertilizacije, deponovanje PA zahvatilo endotelijum tj. sloj unutrašnjeg integumenta koji je najbliži endospermu (Lepiniec i sar., 2006). Preostala dva sloja unutrašnjeg integumenta prolaze kroz programiranu ćelijsku smrt i resorbuju se pod pritiskom embriona tokom razvića (Haughn i Chaudhury, 2005). Slojevi koji čine spoljašnji integument takođe pokazuju drugačije sudbine: ćelije u subepidermalnom sloju razvijaju debele ćelijske zidove sposobne da se suprotstave pritisku koji embrion vrši na njih svojim rastom, dok ćelije epidermisa akumuliraju polisaharid pektin, koji ima značajnu ulogu tokom dormancije semena, kao i pri imbibiciji kojom započinje proces klijanja semena (Haughn i Chaudhury, 2005, Figueiredo i Köhler, 2014). Razviće endosperma se smatra okidačem za inicijaciju razvića semenjače. Štaviše, koordinisan rast i razvoj ove dve strukture i njihova međusobna komunikacija putem apoplasta, su faktori neophodni za pravilno razviće semena (Figueiredo i Köhler, 2014, Figueiredo i sar., 2018).

### **1.5. Apomiksija**

Apomiksija kod biljaka predstavlja vid bespolnog razmnožavanja, odnosno razviće semena bez procesa oplodjenja. Svaki organizam nastao putem bespolnog razmnožavanja ima identičan genetski materijal sa entitetom čija je kopija, te se stoga apomiksija smatra prirodnim oblikom kloniranja (Brukhin, 2017). Opisano je preko 400

apomiktičnih biljnih vrsta, grupisanih u više od 40 familija, u čemu prednjače familije Asteraceae, Rosaceae i Poaceae. Većina ovih biljaka su fakultativni apomikti koji u svom razvojnem programu smenjuju bespolno i polno razmnožavanje (Bicknell i Koltunow, 2004).

U zavisnosti od toga da li se embrion razvija iz gametofita ili iz diploidnih somatskih ćelija semenog zametka, razlikujemo gametofitnu i sporofitnu apomiksiju. Sporofitna apomiksija nosi naziv i adventivna embrionija i predstavlja obrazovanje embriona somatskom embriogenezom iz ćelija nucelusa ili integumenata koje se nalaze u blizini normalno razvijene embrionove kesice. Razviće i uspešnost preživljavanja ovakvih embriona zavisi od razvića endosperma nakon dvojnog oplodjenja. Naime, tokom mitoze megaspore, diploidne somatske ćelije koje okružuju embrionovu kesicu diferenciraju i postaju embriogene ćelije. Ove inicijalne ćelije ulaze u mitozu i formiraju mnogobrojne globularne embrione koji mogu da kompletiraju svoje razviće samo ukoliko je embrionova kesica oplodena i seksualnim putem, jer je aseksualnim embrionima neophodno prisustvo endosperma za ishranu i razviće. Sporofitna apomiksija na ovaj način dovodi do nastanka semena koje sadrži multipne embrione (Hand i Koltunow, 2014). Kod gametofitnih apomikta, semeni zametak nastaje mitotičkim deobama, uz izostanak procesa mejoze što se još naziva i apomejoza. Na osnovu porekla prekursorske ćelije koja dovodi do neredukovanog ženskog gametofita dalje razlikujemo dva mehanizma apomejoze. Ukoliko embrionova kesica nastaje od megasporocita govorimo o diplosporiji. U slučaju da je prekursorska ćelija diploidna somatska ćelija nucelusa, tzv. inicijalna ćelija aposporije (eng. *aposporous initial cell*), koja se nalazi u okolini megaspore ili na mestu gde bi megaspora trebalo da se nalazi, radi se o aposporiji (Bicknell i sar., 2016; Brukhin, 2017). I u slučaju diplosporije i aposporije, razviće embriona se odvija bez oplodjenja, odnosno partenogenetski. Razviće endosperma kod ovih biljaka može biti ili autonomno ili inicirano kao posledica oplodjenja (pseudogamno) (Koltunow, 1993).

Studije koje uključuju prirodne apomiktične vrste kao i mutante koji se seksualno razmnožavaju ali ispoljavaju delimičnu apomiksiju su dovele do identifikacije apomiktičnih lokusa kao i gena kandidata koji mogu biti zaslužni za izazivanje apomiksije kod biljaka koje se polno razmnožavaju (Barcaccia i Albertini 2013; Hand i

Koltunow, 2014). Međutim, o molekularnim i genetičkim mehanizmima regulacije apomiksije se još uvek nedovoljno zna. U prilog hipotezi da je mehanizam apomiksije epigenetički regulisan idu brojne studije rađene na biljnim vrstama, koje se seksualno reprodukuju, kod kojih mutacije u epigenetičkim putevima regulacije dovode do delimičnog ispoljavanja apomiktičnog fenotipa. Stoga, bolje razumevanje epigenetičke regulacije kod prirodnih apomikta, kao i mogućnost epigenetičke manipulacije kod vrsta koje se inače razmnožavaju seksualno, je stavljeno u žižu naučnog interesovanja, pogotovo zbog velike koristi koju bi poljoprivreda imala usled iskorišćavanja ove tehnologije - pre svega zbog jednostavnijeg dobijanja i održavanja dobrih genotipova (Barcaccia i Albertini, 2013).

### **1.6. Razviće semena sa poremećenom ravnotežom doprinosa roditelja**

Hibridizacija predstavlja proces ukrštanja, putem seksualne reprodukcije, različitih, genetički diferenciranih jedinki, populacija, ili vrsta. U naučnoj literaturi, termin međuvrsna hibridizacija se koristi za opisivanje ukrštanja različitih vrsta, dok se izraz unutarvrsna hibridizacija koristi u slučaju ukrštanja varijeteta, sorti ili populacija jedne vrste (Goulet i sar., 2017).

Postoje mnogobrojni mehanizmi, grupisani u dva tipa reproduktivnih izolacija, koji sprečavaju proces hibridizacije u prirodnim uslovima. To su prefertilizacioni i postfertilizacioni mehanizmi, tj. barijere koje nastaju pre ili posle oplodjenja. U prvom slučaju barijera nastaje kao posledica sprečenog ili slabog klijanja polena na žigu tučka, abnormalnog rasta polenove cevi ili nekog drugog uzroka koji onemogućava oplodjenje jajne ćelije. Postfertilizacione reproduktivne barijere dovode do stvaranja sterilnog ili nevijabilnog potomstva (Bushell i sar., 2003).

Formiranje hibrida tokom ukrštanja jedinki iste vrste ali različitog stepena ploidije može voditi ka simpatričkoj specijaciji i nastanku novih vrsta i zbog toga ima važnu ulogu u evoluciji i ekološkim adaptacijama biljnih vrsta (Ramsey i Schemske, 1998; Otto i Whitton, 2000). U literaturi se postfertilizaciona barijera koja nastaje unutarvrsnim ukrštanjem i koja vodi ka formiranju poliploidnog embriona, naziva triploidni blok, dok se formirana semena nazivaju „triploidna semena” (Bushell i sar., 2003). U poglavlju 1.4.2. je spomenuto da tokom dvojnog oplodjenja kod biljaka nastaje triploidni

endosperm. Odnos tj. ravnoteža genoma roditelja (2 seta hromozoma poreklom od majke i jedan set koji potiče od oca, 2m:1p) koji doprinose stvaranju triploidnog tkiva je neophodna za pravilno razviće endosperma. Naime, hibridna semena koja nastaju prilikom ukrštanja u kojima je ženski roditelj većeg stepena ploidnosti odnosno kada postoji maternalni višak hromozoma (genomski odnos  $> 2m : 1p$ ) (eng. *maternal excess*), pokazuju fenotip prevremene celularizacije endosperma. Kod potomstva recipročnog ukrštanja, gde postoji paternalni višak hromozoma (eng. *paternal excess*), javlja se fenotip povećane proliferacije endosperma i kašnjenja procesa celularizacije (Jullien i Berger, 2010; Jiang i sar., 2017). Variranje odnosa roditeljskih genoma u semenu *A. thaliana* doprinosi nastanku čitavog spektra fenotipova u embrionu i endospermu. Ovaj faktor utiče na vijabilnost semena, težinu semena, stopu ćelijskih deoba u endospermu kao i pravovremenu celularizaciju endosperma (Scott i sar., 1998). Što je veća razlika u ploidiji roditelja, to je fenotip drastičniji. Dok je procenat nevijabilnih semena nastalih ukrštanjem diploidnih i tetraploidnih jedinki između 5-10%, kod ukrštanja diploidnih i heksaploidnih roditelja on dostiže čak 80% (Scott i sar., 1998). Semena nastala u ukrštanjima gde postoji maternalni višak hromozoma su sitnija i manje težine u odnosu na semena koja su nastala ukrštanjem diploidnih biljaka, što je posledica preuranjene celularizacije endosperma. Suprotan fenotip pokazuju semena nastala u ukrštanjima gde postoji paternalni višak hromozoma, koja su krupnija usled prekomerne proliferacije ćelija endosperma (Gehring i sar., 2004). Ovo je konceptualizovano u tzv. EBN hipotezu (eng. *Endosperm Balance Number*) kojom se objašnjava razviće semena u intra- i interspecijskom ukrštanju. Prema EBN hipotezi, svako odstupanje od 2m : 1p odnosa u endospermu (2 seta hromozoma poreklom od majke i jedan set koji potiče od oca) dovodi do poremećaja u razviću endosperma, što dovodi do poremećaja u razviću embriona, i može dovesti do potpunog prekida razvića (Johnson i Hanneman, 1980). Do današnjih dana veliki broj studija je pokazao da se nepravilni razvoj endosperma smatra glavnim uzrokom nastanka nevijabilnih semena, s obzirom da je pokazano da embrion izolovan iz hibridnog semena može opstati i normalno se formirati, uz dodatak neophodnih nutrijenata (Chen i sar., 2016; Lafon-Placette i sar., 2017). Stoga, identifikacija genetičkih elemenata koji dovode do uspostavljanja hibridizacionih barijera predstavlja osnovu za potvrdu EBN hipoteze. d'Erfurth i saradnici (2009) su identifikovali *osd1* mutanta (eng. *omission of second*

*division 1) A. thaliana* kod koga izostaje druga mejotička deoba, zbog čega se formiraju neredukovani funkcionalni muški i ženski gameti. Ovaj mutant zato predstavlja pogodan model za istraživanje uticaja maternalnog viška hromozoma na razviće embriona i endosperma. Oprašivanje *osdl-1* mutanta polenom poreklom sa biljke laboratorijskog i divljeg soja (eng. wild type, skraćeno WT), omogućava oponašanje *maternal excess* fenotipa koji se javlja prilikom unutarvršnih ukrštanja ( $4n \times 2n$ ). Slično triploidnim semenima koja nastaju u  $4n \times 2n$  ukrštanjima, triploidna semena koja nastaju u *osdl*  $\times 2n$  ukrštanjima imaju redukovanu stopu proliferacije endosperma kao i preuranjen početak celularizacije endosperma u poređenju sa samooplođenim ženskim biljkama, što je u korelaciji sa smanjenom veličinom semena. Naime, dok celularizacija endosperma kod WT diploidnih i tetraploidnih semena počinje 6 dana nakon oplođenja (eng. *days after pollination*, DAP) i biva kompletirana 7-8 DAP, u slučaju triploidnih semena nastalih u *osdl*  $\times 2n$  kao i kod  $4n \times 2n$  ukrštanja celularizacija otpočinje oko 4 DAP i potpuno se završava 5 DAP. U slučaju recipročnog ukrštanja  $2n \times 4n$ , kod paternalnog viška hromozoma, razviće endosperma je praćeno hiperplazijom ćelija. Periferni i mikropilarni endosperm je podvrgnut ubrzanim ćelijskim ciklusima, usled čega dolazi i do savijanja ćelija zbog njihove prekomerne proliferacije. Veliki broj ćelija u predelu mikropilarnog endosperma vrši pritisak na embrion i na taj način onemogućava njegov normalni razvoj (Scott i sar., 1998). Jedan od uzroka ove hibridne nevijabilnosti je genetička neravnoteža gena koji podležu genomskom utiskivanju (eng. *genomic imprinting*), fenomenu gde ekspresija alela zavisi od identiteta roditelja koji je alel preneo i koji regulišu razviće endosperma (Vinkenoog i sar., 2003). Poremećen status genomskog utiskivanja je zabeležen kod hibridnih jedinki nekoliko biljnih vrsta (Florez-Rueda i sar., 2016; Kirkbride i sar., 2015; Xu i sar., 2014; Waters i sar., 2013). Najznačajniji dokazi da genomsko utiskivanje igra ključnu ulogu tokom procesa hibridizacije potiču od genetičkih studija koje pokazuju da mutirani paternalno eksprimirani geni (eng. *paternally expressed genes*, PEGs) mogu omogućiti razviće inače nevijabilnih semena, koja nastaju interploidnom hibridizacijom (Kradolfer i sar., 2013; Wolff i sar., 2015). Zanimljivo je da mutacije u ovim genima ne dovode do promene fenotipa diploidnih semena, što ukazuje na to da je funkcionalna uloga utisnutih gena maskirana u ravnotežnom genomskom odnosu endosperma  $2m : 1p$  (Wolff i sar., 2015). Jedan od identifikovanih PEG kodira enzim koji katalizuje

konverziju  $\beta$ -D-galaktoze u  $\alpha$ -D-galaktozu i uključen je u proces važan za formiranje ćelijskih zidova u endospermu. Stoga je pretpostavljeno da se PEG funkcija u uspostavljanju reproduktivne barijere može prevazići supresijom degradacije pektina koja vodi ka celularizaciji endosperma (Wolff i sar., 2015). U poređenju sa normalnim semenima, u triploidnim semenima zapažen je značajno viši nivo H3K9me2 u okviru TE koji se nalaze u blizini analiziranih PEG što dovodi do njihove deregulacije (Jiang i sar., 2017). Najnovija istraživanja su pokazala da povišen nivo biosinteze auksina u endospermu sprečava celularizaciju endosperma, što za posledicu ima fenokopiranje osobina koje ispoljavaju semena sa viškom očinskih gena (Figuieredo i sar., 2018). Mutacije u subjedinicama FIS-PRC2 kompleksa fenokopiraju osobine koje se javljaju kod semena nastalih unutarvršnim ukrštanjima gde postoji paternalni višak hromozoma, navodeći na zaključak da je deregulacija nizvodnih ciljnih gena ovog kompleksa odgovorna za neuspešno formiranje triploidnih semena (Kradolfer i sar., 2013). Mnogi od ovih gena pokazuju fenomen genomskog utiskivanja. Zanimljivo je da su poremećaji u razviću endosperma, koji su zapaženi u ukrštanjima jedinki različitog stepena ploidije iste vrste, takođe uočeni i prilikom međuvršnih ukrštanja (Florez-Rueda i sar., 2016; Ishikawa i sar., 2011; Lafon-Placette i sar., 2017; Lafon-Placette i Köhler, 2016; Scott et al., 1998). Ukrštanjem  $2n$  *A. thaliana*, sa ženskom  $4n$  biljkom *A. arenosa*,  $3n$  embrion koji nastaje nije vijabilan zbog nekompatibilnosti i nemogućnosti polenovog zrna *A. thaliana* da klija na žigu tučka *A. arenosa*. Recipročno ukrštanje je moguće ali rezultira u 95% nevijabilnih semena kada su ukrštene jedinice iste ( $2n$ ) ploidije. Međutim, pokazano je da vijabilnost semena u ukrštanjima različitih vrsta, *A. thaliana* i *A. arenosa*, doznno zavisi od ploidije roditelja. Vijabilna semena nastaju u recipročnom ukrštanju, kada je ženska  $2n$  *A. thaliana* biljka ukrštena sa  $4n$  *A. arenosa* (Gehring i sar., 2004; Joseffson i sar., 2006; Jiang i sar., 2017).

Dakle, prema EBN hipotezi, problemi koji utiču na razviće endosperma kako tokom unutarvršne tako i kod međuvršne hibridizacije se svode na isti uzrok, a to je poremećaj odnosa kopija roditeljskog genoma koji je ključan za razviće endosperma.

### **1.7. Polikomb (PcG) proteini**

Polikomb proteini su regulatori ekspresije gena koji deluju na nivou hromatina, kako kod životinja, tako i kod biljaka. *PcG* geni su prvi put identifikovani kod vinske mušice

*Drosophila melanogaster* kao geni koji regulišu tkivno-specifičnu ekspresiju *Hox* gena. *Hox* geni su podgrupa *Homeobox* gena kod kičmenjaka. Tkivno-specifična ekspresija *Hox* gena je neophodna za kontrolu razvića normalnog plana građe organizma (Schwartz i Porrotta, 2007). Vinske mušice, kod kojih je neki od *PcG* gena mutiran, pokazuju poremećaje u razviću embriona i larvi, što dovodi do abnormalnosti u planu građe kao rezultat derepresije ekspresije *Hox* gena. Brojne studije su pokazale da su *PcG* geni evolutivno konzervisani kod viših eukariota, uključujući sisare i biljke, i da *PcG* proteini interaguju jedni sa drugima formirajući na taj način više velikih proteinskih kompleksa (Rodrigues i sar., 2010). Kod biljaka, *PcG* imaju ulogu u regulaciji različitih faza razvića organizma, kao što su razviće gametofita i semena, prelazak embriona u biljku, tj. klijanje semena, kao i razviće cvetnih organa i indukciju cvetanja (Schmidt i sar., 2013, Reyes i Grossniklaus, 2003). *PcG* proteini formiraju multiproteinske komplekse, PRC1 i PRC2. Postoje 4 glavne komponente PRC2 kompleksa kod *D. melanogaster*, a to su *E(z)*, *Su(z)12*, *Esc*, i *p55*. Svaka od ovih komponenti ima bar jednu homolognu sekvencu u genomu *A. thaliana*. Homolog *Esc* gena je *FIE* (eng. *FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM*), dok je *p55* homologan sa *MSI1* (eng. *MULTI SUPPRESSOR OF IRA 1*). Geni homologni sa *Su(z)12* su *FIS2* (eng. *FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2*), *VRN2* (*VERNALIZATION 2*), i *EMF2* (eng. *EMBRYONIC FLOWER 2*). *MEA*, *CURLY LEAF* (*CLF*), i *SWINGER* (*SWN*) su geni koji pokazuju visok stepen homologije sa *E(z)* sekvencom kod vinske mušice (Bemer i Grossniklaus, 2012).

Kod *A. thaliana* su identifikovana tri PRC2 kompleksa koji kontrolišu različite faze razvića, FIS-PRC2, EMF-PRC2 i VRN-PRC2. Kompleks FIS-PRC2, koga čine proteini MEA, FIS2, FIE i MSI1, je ključan za razvoj ženskog gametofita i semena. EMF-PRC2 (SWN/CLF, EMF2, FIE i MSI1) i VRN-PRC2 (SWN/CLF, VRN2, FIE i MSI1) kontrolišu sporofitnu fazu razvića (Bemer i Grossniklaus, 2012).

PRC1 poseduje u svom kompleksu enzim E3 ubikvitin ligazu koja ima sposobnost dodavanja ubikvitin funkcionalne grupe na proteinski supstrat. Kod vinske mušice se sastoji iz četiri proteina: Polycomb (Pc), Polyhomeotic (Ph), Posterior sex combs (Psc), i dRING1. Svaki od ovih proteina ima višestruke homologe kod sisara (Schwartz i Pirrotta, 2013). PRC1 kod biljaka se sastoji iz pet subjedinica. Proteini AtRING1a-b i

AtBMI1a-c su ortolozi dRING1 i Psc proteina *D. melanogaster*. Ovi proteini imaju ulogu ubikvitin ligaza i interaguju sa TERMINAL FLOWER 2/LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (TFL2/LHP1). Subjedinica Ph kod *D. melanogaster* nema ortologne sekvence kod biljaka. EMBRYONIC FLOWER1 (EMF1) i LHP1 su preostale dve subjedinice PRC1 kompleksa koje su jedinstvene za biljke (Gaudin i sar., 2001; Calonje i sar., 2008). Ova dva proteina interaguju sa AtRING1 i/ili AtBMI1 kao i sa komponentama PRC2 kompleksa (Chen i sar., 2010; Bratzel i sar., 2010; Merini i Calonje, 2015). Novija istraživanja su pokazala da AtBMI1 proteini učestvuju u svim fazama razvića kao i da kontrolišu ćelijsku proliferaciju tokom procesa razvića biljnih organa, međutim, iako postoje nagoveštaji o postojanju različitih funkcionalnih varijanti PRC1 kompleksa, malo se zapravo zna o njihovoj strukturi i funkciji (Merini i sar., 2016). Biljke kod kojih je neka od subjedinica PRC1 kompleksa disfunkcionalna pokazuju različite oblike abnormalnosti. Primera radi, tkiva *ring1a/ring1b* dvostrukih mutanata *A. thaliana* se dediferenciraju u kalus, dok se kod *emfl* mutantnih biljaka formira nekompletan cvet odmah nakon klijanja (Berke i Snel, 2015).

Mehanizam kojim *PcG* geni ostvaruju transkripcionu represiju je glavna meta istraživanja u poslednje dve decenije. Kod životinja, PRC2 katalizuje trimetilaciju histona H3 na poziciji lizina 27 (H3K27me3) koja može usmeriti PRC1 do ciljnog mesta u genomu. Aktivnošću PRC1 nastaje monoubikvitinacija lizina na poziciji 119 histona H2A kod sisara, tj. na poziciji 118 histona H2A u okviru ciljnog gena kod vinske mušice (H2AK119ub odnosno H2AK118ub). Histonske modifikacije H3K27me3 i H2AK118ub, tj. H2AK119ub, menjaju strukturu hromatina i/ili regrutuju druge faktore koji menjaju strukturu hromatina ili interaguju sa transkripcionom mašinerijom, čime se obezbeđuje i održava kontrolisana represija specifičnog ciljnog gena (Derkacheva i Hennig, 2013). Brojne studije su pokazale da i interakcija nekodirajućih RNK (eng. *noncoding RNA*, *ncRNA*) i *PcG* gena takođe učestvuje u epigenetičkoj regulaciji ekspresije ciljnih gena (Derkacheva i Hennig, 2013).



### 1.7.1. FIS-PRC2 kompleks kod biljaka

Nakon oplodjenja, koordinisano razviće embriona, endosperma i semenjače je važno za pravilan razvoj semena. Genetičke studije su pokazale neophodnost funkcije nekoliko gena koji učestvuju u regulaciji ranog razvića semena i represiji razvića semena u odsustvu oplodjenja (Köhler i sar., 2003). Gubitak funkcije neke od komponenti FIS-PRC2 kompleksa (MEA, FIS2, FIE i MSI1) dovodi do pojave prefertilizacionog kao i postfertilizacionog fenotipa.

Prefertilizacioni fenotip mutanata FIS klase se ogleda u inicijaciji razvića diploidnog endosperma u odsustvu fertilizacije (Chaudhury i sar., 1997, Ohad i sar., 1996, Köhler i sar., 2003). Takođe, *msi1* mutacija dovodi i do razvića partenogenetskih embriona u odsustvu fertilizacije. Iako se razviće ovako nastalog embriona prekida u ranoj fazi, značajna je činjenica da je *msi1* jedini za sada identifikovani mutant u kome dolazi do partenogenetskog razvića semena *A. thaliana* (Guitton i Berger, 2005).

Postfertilizacioni fenotip *fis* mutanata se ogleda u preranom prekidu razvića semena koje je rezultat poremećaja u razviću endosperma i nemogućnosti njegove celularizacije (Grossniklaus i sar., 2001). Kao što je već opisano, razviće endosperma počinje sincicijelnom fazom tokom koje dolazi do diferencijacije mikropilarnog, centralnog i halazalnog regiona. Celularizacija endosperma se odigrava odmah nakon formiranja ovih mitotičkih domena (Hehenberger i sar., 2012). Nakon oplodjenja centralne ćelije kod *fis* mutanata ne dolazi do celularizacije endosperma i do formiranja mitotičkih domena, već sincicijum nastavlja sa ćelijskom proliferacijom što dovodi do zaustavljanja razvića embriona (Sorensen i sar., 2002; Guitton i sar., 2004).

FIS-PRC2 kompleks svojom aktivnošću u tkivu ženskog gametofita ima ključnu ulogu u sprečavanju razvića endosperma i semenjače u odsustvu oplodjenja. Nakon oplodjenja, FIS-PRC2 ima ulogu da reprimira gene koji učestvuju u proliferaciji endosperma. Stoga smanjena ekspresija *FIS* gena kod *fis* mutanata dovodi do prekomerne proliferacije endosperma i izostanka faze celularizacije što dovodi do prekida u razviću semena (Roszak i Köhler, 2011; Hehenberger i sar., 2012). Najveći broj FIS-PRC2 ciljnih gena kodira transkripcione faktore koji sadrže MADS domen (Zhang i sar. 2018). U skladu sa ovom ulogom, mutacija u sekvenci jednog takvog transkripcionog faktora nazvanog AGL62 (eng. *AGAMOUS-LIKE 62*) izaziva preuranjenu celularizaciju endosperma.

*AGL62* je neophodan za stvaranje signala koji se prenosi iz endosperma u semenjaču sa ulogom da ukloni sporofitni PRC2 kompleks koji reprimira razviće semenjače (Figueiredo i sar., 2016). Iako kod laboratorijskih i divljih sojeva *A. thaliana* ekspresija *AGL62* naglo opada pred početak celularizacije endosperma, kod *fis* mutanata to se ne dešava. Pored *AGL62*, pokazano je i da transkripcioni faktori *MINISEED3* (*MINI3*) kao i *HAIKU* (*IKU*) promoviraju sincicijelnu fazu razvoja endosperma (Luo i sar., 2005).

Maternalno eksprimiran supresor razvića semena *MEA* je jedna od najbolje proučavanih subjednica FIS-PRC2 kompleksa kod biljaka. *MEA* kodira SET domen Polikomb proteina i poseduje histon-metiltransferaznu aktivnost koja katalizuje formiranje H3K27me3 modifikacije (Grossniklaus i sar., 1998). Akronim SET je nastao kombinovanjem naziva tri gena (*Suppressor of position-effect variegation Su(var)3-9*, *Enhancer of zeste polycomb group E(z)*, i *Trithorax trx-G*) koji sadrže zajedničku sekvencu - motiv dužine 130 aminokiselina (Kinoshita i sar., 1999). *MEA* je jedan od prvih gena za koje je pokazano da podleže genomskom utiskivanju. Dok je *MEA* alel poreklom od oca (*pMEA*) utišan uz pomoć metilacije DNK, majčin *MEA* alel je u centralnoj ćeliji pre fertilizacije aktiviran uklanjanjem metilacije DNK (Gehring i sar., 2006). Majčin *MEA* alel ima ulogu da suprimira razviće semena, pre svega utišavanjem ekspresije gena neophodnih za razviće endosperma. Takođe, *MEA* učestvuje u inaktivaciji maternalno nasleđenog alela *PHERES1* (*PHE1*), na taj način kontrolišući genomsko utiskivanje paternalno eksprimiranog *PHE1*, koji kodira MADS-box transkripcioni faktor sa ulogom da promoviraju proliferaciju endosperma (Köhler i sar., 2003). Pokazano je da utišavanje ekspresije *PHE1* u *mea* mutantu može delimično da spreči poremećaje u razviću ovog mutanta, što sugeriraju da je povišena ekspresija *PHE1*, dobrim delom, uzročnik fenotipa koji se javlja kod FIS-PRC2 mutanata (Köhler i sar., 2003). Pored toga, *MEA* reguliše i status svog genomskog utiskivanja. Protein nastao od majčinskog alela, održava alel poreklom od oca u reprimiranom stanju nakon oplodjenja, što čini *MEA* u isto vreme i genom koji vrši svoje utiskivanje kao i utiskivanje drugih gena (Baroux i sar., 2006; Gehring i sar., 2006).

Zanimljivo je da *mea* mutant *Arabidopsis thaliana* pokazuje normalno razviće tokom ranih faza embriogeneze. Globularni *mea* embrioni pokazuju fenotip prekomerne ćelijske proliferacije endosperma, što dovodi i do njihovog radijalno simetričnog izduživanja i zaustavljanja toka razvića. U momentu kada embrioni normalne (ili

nemutirane) biljke dosegnu stadijum kasnog srca, *mea* embrioni se nalaze na globularnom stupnju razvića i sadrže male vakuolizirane ćelije sa nepravilnim ćelijskim zidovima. Kod izvesnog broja embriona, uočene su i nepravilne ćelijske deobe u osnovnom tkivu i prokambijumu što dovodi do odložene morfogeneze i nastanka znatno krupnijih embriona, koji poseduju nekoliko ćelijskih slojeva više nego normalne biljke. Kada su embrioni normalne biljke potpuno diferencirani, *mea* embrioni se nalaze na stadijumu kasnog srca, dimenzija i do 10 puta većih od normalnih (Grossniklaus i sar., 1998). Ovaj fenotip koji se javlja kod *mea* mutanta fenokopira povećanu proliferaciju endosperma i kašnjenje procesa celularizacije koji se javlja kod potomstva recipročnog ukrštanja gde postoji paternalni viška hromozoma (eng. *paternal excess*) (Jullien i Berger, 2010; Jiang i sar., 2017).

### **1.8. Uloga auksina u semenom zametku i tokom ranih faza embriogeneze**

Fitohormoni su organske supstance male molekulske mase koje u malim količinama stimulišu ili inhibiraju rasteenje i razviće biljaka. Deluju na svim nivoima organizacije, od ćelije, preko tkiva i organa, do celokupnog organizma (Groner i Friml, 2015). Biljke regulišu dejstvo hormona tako što kontrolišu njihovu sintezu, kao i formiranje konjugata i stvaranje inaktivnih – rezervnih formi. Do inaktivacije hormona dolazi najčešće vezivanjem za druge male molekule ili razlaganjem u metaboličkim procesima. Regulacija fizioloških procesa posredstvom biljnih hormona se odvija u nekoliko koraka, kao što su percepcija signala (vezivanje hormona za specifični receptor), transdukcija signala, i fiziološka reakcija (promena ekspresije određenih gena ili direktan efekat na biohemijskom nivou koji utiču na određene procese rasteenja ili razvića).

Auksin je prvi fitohormon čija je fiziološka uloga i mehanizam delovanja rasvetljen. Auksini imaju ključnu ulogu u svim procesima rasteenja i razvića biljaka, uključujući i formiranje semena (Tivendale i sar., 2014; Figueiredo i sar., 2018). Na nivou ćelije, auksini regulišu procese proliferacije, elongacije, diferencijacije i ćelijske smrti. Prisustvo auksina je neophodno za pravilan razvoj tučka i ženskog gametofita (Pagnussat i sar., 2009; Larsson i sar., 2014).

Najzastupljeniji endogeni auksin kod viših biljaka je indol-3-sirćetna kiselina (eng. *indole-3-acetic acid*, IAA). Razlikujemo pet IAA puteva biosinteze: četiri triptofan-zavisna biosintetska puta i jedan triptofan-nezavisni biosintetski put (Tivendale i sar., 2014). Dva najvažnija enzima uključena u biosintezu auksina pripadaju grupama flavin-monooksigenaza (YUC ili YUCCA) i triptofan-aminotransferaza (TAA/TAR) (Stepanova i sar., 2008; Tao i sar., 2008). Uspostavljanje gradijenta auksina u biljnom organizmu je opšti obrazac za formiranje svih biljnih organa. Transport auksina se vrši na dva načina: pasivno kroz vaskularna tkiva biljke, i aktivno preko specijalizovanih proteina transportera. Aktivni transport je pod kontrolom influks transportera AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX), i efluks transportera PIN i ABCB/P-GLYPROTEIN (PGP) (Petrášek i Friml, 2009). Signalni put auksina podrazumeva zajedničko delovanje tri proteinske familije: TIR1/AFB (F-box TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN) koreceptore auksina, Aux/IAA (Auxin/INDOLE-3-ACETIC ACID) transkripcione represore i ARF (eng. *auxin response factors*) proteine stalno vezane za *cis*-aktivne faktore u promotorima ciljnih gena koji se nazivaju responsivni elementi (AuxRE). Auksin promoviše stupanje u interakciju TIR1/AFB i Aux/IAA proteina što rezultuje u uklanjanju represije izazvane Aux/IAA nakon čega ARF proteini postaju aktivni (Ulmasov i sar., 1997; Roosjen i sar., 2017).

Nekoliko gena koji učestvuju u YUCCA/TAA putu su eksprimirani u semenom zametku, i to od dvojedarnog sincicijalnog stadijuma sve do stadijuma celularizacije. Razviće embriona započinje asimetričnom deobom zigota formirajući jednu veću ćeliju sa vakuolom (bazalna ćelija) i drugu manju sa najvećim delom citoplazme i većinom organela (apikalna ćelija). Auksin se u ovom stadijumu transportuje od bazalne ka apikalnoj ćeliji preko PIN7 transportera (Friml i sar., 2003). Tokom početnih faza embriogeneze, auksin se sintetiše na dva suprotna pola embriona, u apikalnom meristemu izdanka i u suspensoru. Od suspensora do vrhova kotiledona, auksin se transportuje kroz protoderm pomoću PIN1 efluks i LAX1 influks transportera i nazad, u suprotnom smeru, pomoću efluks (PIN1 i PIN4) i influx (LAX1 i AUX1) transportera. Na ovaj način se omogućava specifikacija ćelija embriona i uspostavlja apikalno-bazalna simetrija embriona (Friml i sar., 2003; Robert i sar., 2015).

Istraživanja su pokazala da egzogeni auksin, kao i ektopična sinteza auksina u semenom zametku, ima stimulišuće dejstvo na proliferaciju endosperma, diferencijaciju semenjače i partenokarpiju (Vivian-Smith i Koltunow, 1999; Figueiredo i sar., 2016; Figueiredo i sar., 2018). Najnoviji rezultati ukazuju na važnost FIS-PRC2 kompleksa i njegovu ulogu u regulaciji ekspresije *TARI* i *YUC10* u endospermu *A. thaliana* (Figueiredo i sar., 2015; Figueiredo i sar., 2016). Takođe, eksperimenti su pokazali da protein AGL62 reguliše ekspresiju *P-GLYCOPROTEIN 10 (PGP10)* koji ima ulogu transportera auksina iz endosperma do delova semena gde će se formirati semenjača. Ovo je ujedno i prvi dokaz da je aktivnost PRC2 modulirana aktivnošću fitohormona (Figueiredo i sar., 2016). Takođe je pokazano da ektopični auksin dovodi do prevazilaženja sprofirnog PRC2 bloka za razvoj semenjače, što dovodi do aktivacije gibberelinskih (GA) signalnih puteva i produkcije PA u integumentima. Naime, biljke kod kojih je neki od gena koji ulaze u sastav sporofitnog PRC2 kompleksa mutiran, imaju sposobnost autonomnog razvoja semenjače, što navodi na zaključak da PRC2 izaziva zastoj formiranja semenjače koji se prekida nakon oplodjenja (Roszak i Köhler, 2011). Buduća istraživanja će omogućiti identifikaciju gena koji interaguju direktno ili indirektno sa auksinom, kao i bolje razumevanje molekularnih mehanizama regulacije ekspresije ovih gena u semenom zametku i tokom embriogeneze.

### **1.9. Model sistem za genetička istraživanja- *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**

Vrsta *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. je jednogodišnja biljka iz porodice Brassicaceae. Vrsta je rasprostranjena na tlu Evrope, Azije i Severne Amerike. *Arabidopsis* je prva biljka čiji je genom sekvenciran 2001. godine (*Arabidopsis Genome Initiative 2000*). Jedan je od najzastupljenijih eksperimentalnih modela u biologiji biljaka, ali i u razrešavanju pitanja bioloških struktura i funkcija koje su zajedničke za sve eukariote. Laboratorijski sojevi *Columbia* (Col-0) i *Landsberg erecta* (Ler-0) prihvaćeni su kao standardi za molekularna istraživanja. Čitav životni ciklus biljke, počev od klijanja, preko formiranja rozete listova, cvetanja, pa do pojave semena, traje 6 nedelja. Neke od osobina koje su *A. thaliana* svrstale u red najproučavanijih i najzastupljenijih model organizama, jesu velika varijabilnost u prirodi, proizvodnja velikog broja semena po biljci, kratak životni ciklus, kao i sposobnost samooplodjenja. Velike prednosti ove vrste su i ekonomičnost u veličini prostora potrebnog za rast,

moćnost stvaranja plodnih hibrida i mali broj hromozoma ( $2n = 10$ ). Haploidni genom sadži oko 135 mega baznih parova (Mbp). Moćnost jednostavne genetičke transformacije ove vrste uz pomoć bakterija *Agrobacterium tumefaciens*, neophodne za kreiranje stabilno transformisanih transgenih biljaka, bilo je presudno za izbor ove biljke kao model organizma. Pored toga, ova vrsta je vrlo podložna mutacijama koje se indukuju X-zracima ili hemijskim mutagenima kao što je EMS (etilmetan-sulfonat), ali i insercionom mutagenezom pomoću transpozona ili T-DNK iz *A. tumefaciens* (Meinke i sar. 1998; Koornneef i Meinke, 2010).

## 2. Cilj rada

Osnovni naučni cilj doktorske disertacije bio je ispitivanje uloge EML proteina u regulaciji razvića semena kod *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., identifikacija njihovog mehanizma delovanja kao proteina zaduženih za čitanje epigenetičkih modifikacija na histonima, kao i pružanje novih fundamentalnih saznanja o apomiksiji kod biljaka.

Realizacija ciljeva je obuhvatala sledeće korake:

- Genotipizacija i izolacija *eml1-2*, *eml3-4* i *eml4-1* homozigotnih mutanata *A. thaliana*, konstruisanje dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta, njihova fenotipska analiza pomoću svetlosnog i mikroskopa sa diferencijalnim interferentnim kontrastom.
- Izolacija pune dužine *EML1* i *EML3* gena PCR tehnikom i kloniranje u vektore za ekspresiju.
- Analiza nativne lokalizacije EML1 i EML3 proteina u fuziji sa GFP proteinom pomoću konfokalnog mikroskopa.
- Funkcionalna karakterizacija EML1 i EML3 rekombinantnih proteina u bakterijama (*Escherichia coli*) i duvanu (esej privremene ekspresije u vrsti *Nicotiana benthamiana*).
- Sekvenciranje transkriptoma *eml1-2 eml3-4* homozigotnog dvostrukog mutanta i njegove kontrolne WT biljke upotrebom *Illumina HiSeq 4000* platforme, korišćenjem RNK iz semena koja se odlikuju najvišim nivoom ekspresije *EML* gena.
- Ustanovljavanje liste gena čija je ekspresija značajno povišena u semenima dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta i preklapanje te liste sa već ustanovljenim listama gena sa povišenom ekspresijom u ukrštanjima gde postoji paternalni višak hromozoma, kao što su ukrštanja sa *osd1* mutantom i 2n x 4n ukrštanja.
- Predlaganje modela funkcije EML1 i EML3 u *A. thaliana* u fazama pre i posle oplodjenja.
- Ukazivanje na mogućnost praktične primene mutacija u ortolozima *EML* gena kod poljoprivredno važnih vrsta u cilju stvaranja novih hibrida.

### 3. Materijal i metode

#### 3.1. Biljni materijal

U radu su korišćena semena *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. divljih tipova Col-0 (CS70000), Ler-0 (CS20), Col-3 (CS908), kao i mutanta *eml4-1* (CS860536), dobijena od banke semena *Arabidopsis Biological Resources Center* (ABRC), Ohajo, SAD. Homozigotni recesivni mutanti *eml1-2*, *eml2-1* i *eml3-4* su identifikovani PCR genotipizacijom semena, čime je potvrđeno prisustvo T-DNK ili transpozonskih insercija (ABRC kataloški brojevi CS101744, SALK\_116222 i SALK\_106147, redom).

U eksperimentima agroinfiltracije, korišćeni su listovi biljaka *Nicotiana benthamiana* starosti tri do četiri nedelje koje su gajene u komorama pod kontrolisanim uslovima na temperaturi od 27°C i prosečnoj dužini dnevne svetlosti od 12 h.

##### 3.1.1. Hranljive podloge

###### Lurija-Bertani (LB) podloga

Tečna LB podloga sadržala je 1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) pepton, 0,5% (w/v) ekstrakt kvasca. Za pripremu čvrste LB podloge, pomenutoj smeši je dodato 2% (w/v) agara. Podloge su autoklavirane na 121°C tokom 20 minuta. Antibiotici su dodati u ohlađenu podlogu (50°C).

###### SOC tečna podloga

SOC tečna podloga sadržala je 2% (w/v) tripton, 0,5% (w/v) ekstrakt kvasca, 10 mM NaCl i 2,5 mM KCl. Nakon autoklaviranja na 121°C tokom 20 minuta, podlozi su dodati sterilni rastvori MgCl<sub>2</sub> i glukoze, do finalne koncentracije od 10 mM MgCl<sub>2</sub> i 20 mM glukoze.

###### Murashige-Skoog (MS) podloga

MS hranljiva podloga (Murashige i Skoog, 1962) je sadržala makro- i mikro- elemente u obliku MS osnovne smeše (Sigma-Aldrich, SAD), 0,5% rastvor 2-N-morfolinoetanolsulfida (MES, w/v) (Sigma-Aldrich, SAD), 1% (w/v) saharozu i 1% (w/v) agar. Pre sterilizacije na 121°C tokom 25 minuta, pH vrednost hranljive podloge



je podešana na 5,8. Nakon autoklaviranja, u prohladen rastvor je dodat rastvor vitamina dvostruke koncentracije u odnosu na Murashige i Skoog (1962) kao i odgovarajući antibiotici.

### 3.1.2. Bakterijski sojevi

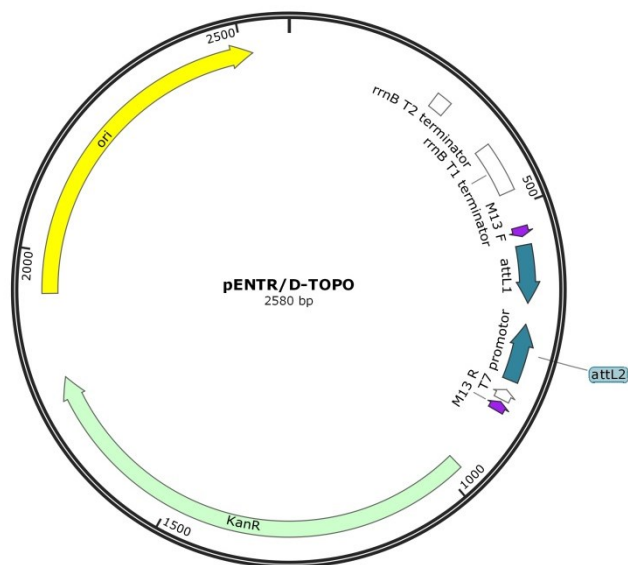
Za kloniranje gena *EML1* i *EML3* korišćen je OneShot TOP10 soj *Escherichia coli*, dok su za potrebe indukcije genske ekspresije u bakterijama korišćeni sojevi *E. coli* BL21(DE3)pLysS i BL21-A1. Za funkcionalnu karakterizaciju i lokalizaciju proteina u biljkama korišćen je soj *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

### 3.1.3. Plazmidni vektori

Za potrebe molekularnog kloniranja *Gateway* metodom korišćeni su sledeći vektori: pENTR-D/TOPO, pDONR p4-p1r, pDONR p2r-p3, pDONR 221.

**pENTR/D-TOPO** vektor, veličine 2580 baznih parova (bp), sadrži attL1 i attL2 rekombinaciona mesta između kojih se ubacuje sekvenca od interesa. Sekvence attL1 i attL2 su oivičene M13F i M13R mestima koja omogućavaju sekvenciranje inserta nakon kloniranja. Za propagaciju u prokariotskim ćelijama vektor sadrži gen za rezistenciju na kanamicin i mesto početka replikacije poreklom od plazmida pUC. Cirkularna mapa pENTR/D-TOPO vektora je prikazana na Slici 3.

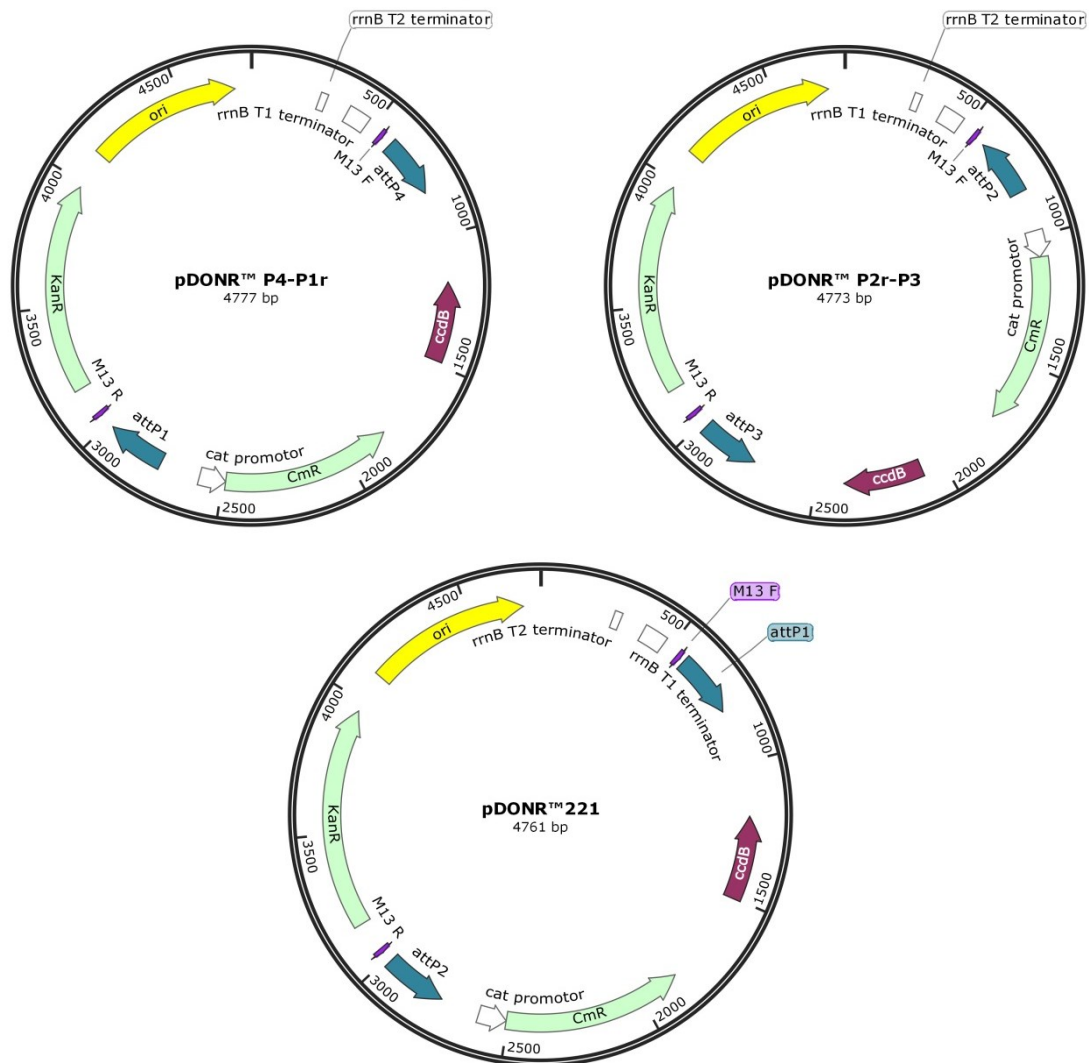
**pDONR** vektori za potrebe tri-fragmentarnog *Gateway* kloniranja sadrže sledeće karakteristike: odgovarajuća rekombinaciona mesta između kojih se ubacuje gen od interesa u BP reakciji (attP4 i attP1r za pDONR p4-p1r; attP2r i attP3 kod pDONR p2r-p3; attP1 i attP2 kod pDONR 221), kao i M13F i M13R mesta koja oivičavaju rekombinaciona mesta i omogućavaju sekvenciranje inserta nakon kloniranja (Slika 4). Sekvence att mesta u okviru pDONR vektora su date u Tabeli 2. Pored toga, vektori sadrže i gen za rezistenciju na kanamicin.



Slika 3. Mapa vektora pENTR/D-TOPO

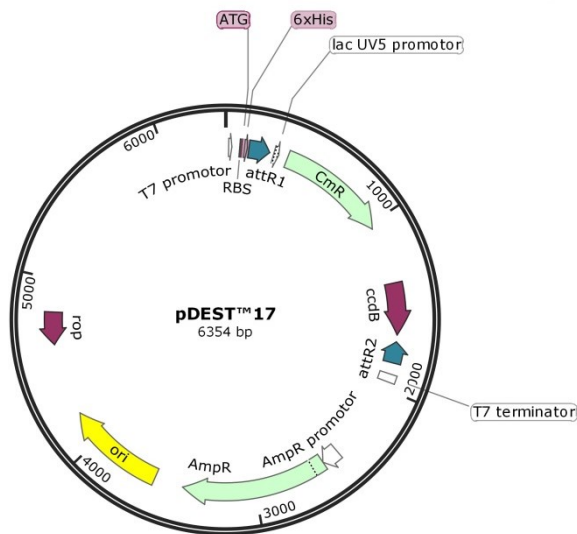
Tabela 2. att mesta u okviru pDONR vektora

pDONR vector	att mesta	Sekvenca
pDONR™ P4-P1R	attB4	Fwd: 5'-GGGG ACA ACT TTG TAT AGA AAA GTT GNN
	attB1r	Rev: 5'-GGGG AC TGC TTT TTT GTA CAA ACT TGN
pDONR™ 221	attB1	Fwd: 5'-GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TNN
	attB2	Rev: 5'-GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTN
pDONR™ P2R-P3	attB2r	Fwd: 5'-GGGG ACA GCT TTC TTG TAC AAA GTG GNN
	attB3	Rev: 5'-GGGG AC AAC TTT GTA TAA TAA AGT TGN



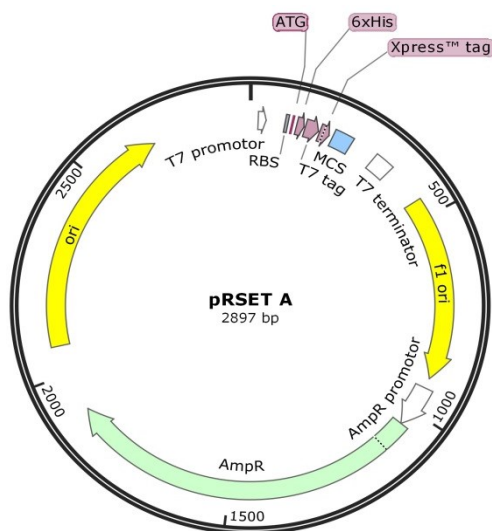
Slika 4. Mape plazmida korišćenih za *Gateway Multisite* kloniranje

Za ekspresiju *EML3* gena korišćen je vektor **pDEST17** (Slika 5). Ovaj vektor poseduje T7 promotor koji omogućava kontrolisanu ekspresiju gena od interesa u heterolognom sistemu i koji predstavlja mesto vezivanja za T7 RNK polimerazu u BL21(DE3)pLysS soju, mesto za vezivanje na ribozomu (eng. *ribosome binding site*, *RBS*) koji omogućava efikasnu translaciju željenog gena, T7 terminator, koji određuje završetak transkripcije kao i gen za otpornost na ampicilin za selekciju u *E. coli*. U sastavu plazmida pDEST17 nalazi se i sekvenca koja kodira niz histidina, tzv. N-terminalna histidin „etiketa“ (eng. *His-tag*), koja služi za prečišćavanje rekombinantnih proteina. Indukcija ekspresije gena od interesa se vrši izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktosidom (IPTG).



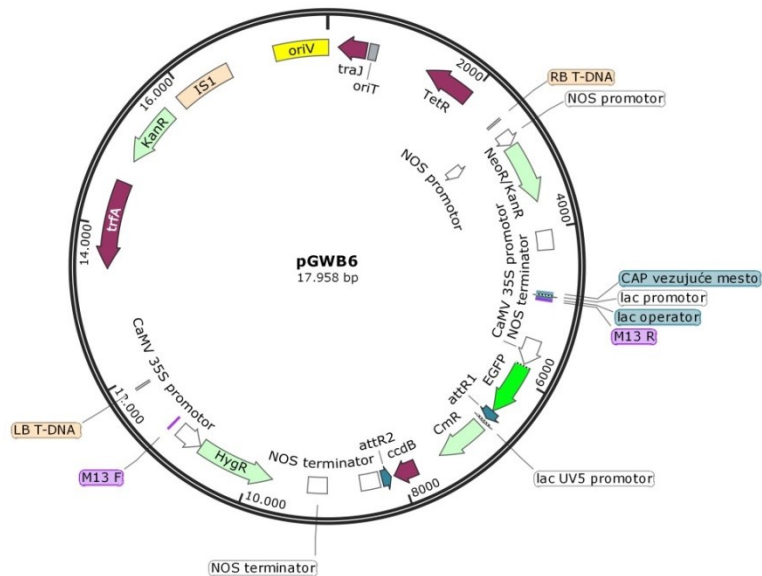
Slika 5. Mapa ekspresionog vektora pDEST17 za ekspresiju u *E. coli*

Za ekspresiju *EML1* gena korišćen je vektor **pRSETA**. Ovaj vektor poseduje T7 promotor, RBS, N-terminalnu histidin „etiketu“ za prečišćavanje rekombinantnih proteina, N-terminalnu Xpress epitopnu „etiketu“ za detekciju proteina anititelima, mesto za višestruko kloniranje (eng. *multiple cloning site*, MCS) i T7 terminator. Pored toga, vektor u svojoj kaseti poseduje i gen za otpornost na antibiotik ampicilin koji omogućuje selekciju plazmida u bakterijskim ćelijama (Slika 6).



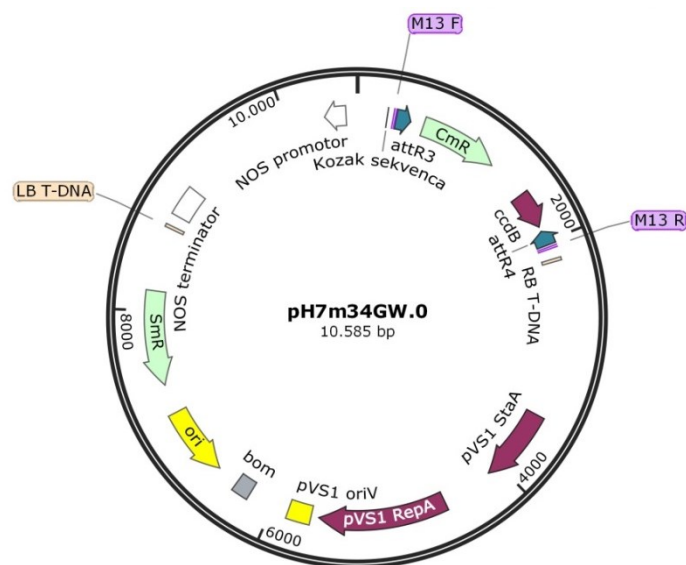
Slika 6. Mapa ekspresionog vektora pRSETA za ekspresiju u *E. coli*

Plazmid **pGWB6**, veličine oko 18 kb, spada u binarne vektore za transformaciju biljaka. Sastoji se iz konstitutivnog CaMV 35S promotora, GFP reporterskog gena za konstruisanje N-terminalnih fuzionih konstrukata (eng. *green fluorescent protein*, GFP), sekvenci attR1 i attR2 koje služe za mesto-specifičnu rekombinaciju prilikom *Gateway* tehnike kloniranja, kao i gena za otpornost na kanamicin i higromicin u biljkama (Slika 7).



Slika 7. Mapa binarnog vektora pGWB6 za ekspresiju u biljnim tkivima

Plazmid **pH7m34GW.0**, veličine oko 11 kb, spada u binarne vektore za transformaciju biljaka. Ovaj ciljni vektor (end. *destination vector*) ima attR3 i attR4 mesta koja uokviruju smrtonosni gen *ccdB* tj. fragment za izbacivanje i služe za mesto-specifičnu rekombinaciju prilikom *Multisite Gateway* trifragmentarne tehnike kloniranja. Ovaj vektor poseduje dva selektabilna markera - gen za otpornost na spektinomycin za selekciju u bakterijama, i gen za otpornost na higromicin za selekciju u biljkama (Slika 8).



Slika 8. Mapa plazmida pH7m34GW korišćenog za transformaciju *A. thaliana*

### 3.1.4. Prajmeri

U različitim PCR reakcijama korišćeni su odgovarajući specifični prajmeri, čiji su nazivi i sekvence navedeni u Tabelama 3-6.

Tabela 3. Prajmeri korišćeni za genotipizaciju mutanata. Prajmeri su dizajnirani programima Oligoanalyser ([www.idtdna.com/calc/analyser](http://www.idtdna.com/calc/analyser)) i T-DNA primer design ([www.signal.salk.edu/tdnaprimers.2](http://www.signal.salk.edu/tdnaprimers.2))

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
EML1 F	5'-AATCTGCGAATTGAGCTTGAG-3'
EML1 R	5'-TTTGTCCACACTTTTCTTCCG-3'
EML2 F	5'-GTTTCTCTCTCCTCCAAGT-3'
EML2 R	5'-AAATTCATCAGCCTGTGCTTG-3'
EML3 F	5'-ATGGATTACCGACCTTCTGAT-3'
EML3 R	5'-TCATTCATCAGCGTTAACCC-3'
Lb1.3	5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3'
Ds3-1	5'-ATGAGTGCCTGTTTCATGTTCC-3'

Tabela 4. Karakteristike PCR i kombinacije prajmera korišćenih za genotipizaciju mutanata

Opis PCR-a	Amplifikovan fragment	Naziv prajmera	Veličina produkta (bp)
EML3 genotipizacija	genomska DNK	EML3 F, EML3 R	557
	T-DNK	Lb1.3, EML3 R	497-797
EML1 genotipizacija	genomska DNK	EML1 F, EML1 R	1113
	T-DNK	EML1 F, Ds3-1	494-794
EML2 genotipizacija	genomska DNK	EML2 F, EML2 R	577-877
	T-DNK	Lb1.3, EML2 R	

Tabela 5. Prajmeri korišćeni za kloniranje. Prajmeri su dizajnirani programom Oligoanalyser ([www.idtdna.com/calc/analyser](http://www.idtdna.com/calc/analyser)).

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
EML1 TOPO F	5'-CACCGAGACACAAATTCATCAACTTGAGC-3'
EML1 TOPO R	5'-TCATCCCTGTGGCATTGGATGATCAT-3'
EML3 TOPO F	5'-CACCGATTACCGACCTTCTGATAGTAG-3'
EML3 TOPO R	5'-TCAAATATTACCGCTTTCTCCATCTGATATTTTC-3'
EML1 Pm DONR F	5'-GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGATTCAAAGTG TATCTCTATAATCTCAGT-3'
EML1 Pm DONR R	5'-GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGAATCACTATGT AGTTTAGTTTCAGAG-3'
EML3 Pm DONR F	5'-GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTTTCCCTTTGT TCACATTTTTCTA-3'
EML3 Pm DONR R	5'-GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGACTGTGTACTC TCCTGATTATTC-3'
GFP CDS DONR F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGAACCA TGGTGAGCAAGGGCGAG-3'

GFP CDS DONR R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGTACAGCTCGTCCATGCCGT-3'
EML1 CDS DONR F	5'-GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGACGAGACACA AATTCATCAACTTGAGC-3'
EML1 CDS DONR R	5'-GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCTTAAGAAGA AGACCTATATTTCAAGCTATTCAA-3'
EML3 CDS DONR F	5'-GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGACGATTACCG ACCTTCTGATAGTA-3'
EML3 CDS DONR R	5'-GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCTCAAATATT ACCGCTTTCTCCATCTGA-3'
EML1 PstI	5'-AACTGCAGTCATCCCTGTGGCATTGGA-3'
EML1 BamHI	5'-CGGGATCCATGGAGACACAAATTCATC-3'
EML3 Pm SbfI F	5'-GAGTCCTGCAGGTTCCCTTTGTTCACATTTTTCTA-3'
EML3 Pm XbaI R	5'-GCTCTAGACTGTGTACTCTCCTGATTATTC-3'

Tabela 6. Prajmeri korišćeni za RT-PCR i RT-qPCR. Prajmeri su dizajnirani programom Oligoanalyser ([www.idtdna.com/calc/analyser](http://www.idtdna.com/calc/analyser)).

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
EML1 F	5'-TTCGTTTGGATGGAAATTCTCTG-3'
EML1 R	5'-TTTGTCCACACTTTTCTTCCG-3'
EML2 F	5'-AGCAGGAAGCTTATTCTGCTG-3'
EML2 R	5'-GCAACCGTGATGACAAACCT-3'
EML3 F	5'-AACCCAGCAGAGGTAGAGAA-3'
EML3 R	5'-ACCGCTTTCTCCATCTGATATT-3'
EML4 F	5'-CGTTCACACAATCCAGATCC-3'
EML4 R	5'-GATGGAGAAAACGAAGGTGC-3'
MEA F	5'-GGTGAGGCACTAGAATTGAGCAGT-3'
MEA R	5'-CTAGCTACAAAGGTCCTTTCTTATTCC-3'
PP2A F	5'-TATCGGATGACGATTCTTCGTGCAG-3'
PP2A R	5'-GCTTGGTCGACTATCGGAATGAGAG-3'



## **3.2. Gajenje biljaka**

### **3.2.1. Površinska sterilizacija semena**

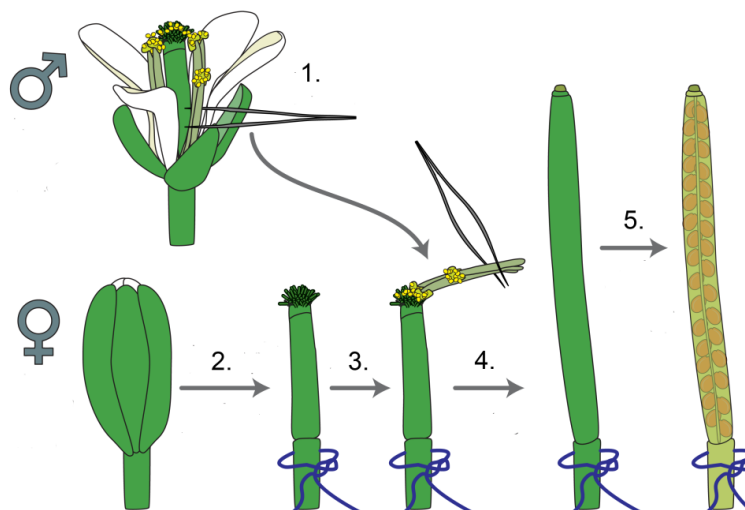
Semena *A. thaliana* su prvo isprana 70% rastvorom etanola, a potom inkubirana 20 minuta u 50% rastvoru natrijum-hipohlorita uz dodatak nekoliko kapi deterdženta (Tween 20). Nakon ispiranja sterilnom destilovanom vodom 5 do 7 puta, semena su postavljena na hranljivu MS podlogu za isključivanje. Klijanci starosti 10 do 15 dana su prebačeni u mešavinu zemlje Sunshine® LC1 i đubriva Osmocote 14:14:14 (14% azot, 14% fosfor, 14% magnezijum). Biljke su potom gajene u komorama za gajenje pod kontrolisanim uslovima dugog dana (prosečna dužina dnevne svetlosti od 12 h), na temperaturi od 22°C, pri intenzitetu svetlosti od 120–150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ .

### **3.2.2. Ukrštanje biljaka**

Za potrebe ručnog ukrštanja biljaka, izvršena je demaskulinizacija mladih cvetova, tj. uklanjanje perijanta i prašnika. Postupak ukrštanja prikazan je na Slici 9. Oprašivanje biljaka je rađeno u oba smera - cvetovi biljaka jednog genotipa upotrebljeni su kao donor polena, dok su cvetovi drugog genotipa predstavljali ženskog roditelja i obrnuto. Sve već postojeće ljuške (eng. *siliques*) su uklonjene sa biljke koja je bila odabrana da bude ženski roditelj. Potom su pažljivo sa cveta, pincetom, uklonjeni čašični i krunični listići, kao i svih 6 prašnika, dok je tučak ostavljen netaknut (koraci 2 i 3). Na biljci odabranoj da bude muški roditelj, hvatanjem za cvetnu ložu uz pomoć pincete uzet je novootvoreni cvet koji je predstavljao donora polena (korak 1). Demaskulinizirani cvetovi su oprašeni kompletnim, zrelim prašnicima (korak 4). Oprašeni tučak je potom obavijen prijanjajućom folijom i obeležen etiketom sa odgovarajućim podacima (genotip roditelja, datum, itd.). Nakon 2 do 3 dana, pojava ploda – ljuške je služila kao merilo uspeha ukrštanja (korak 5). Za potrebe kontrole samooprašivanja, izvršavana je demaskulinizacija cvetova biljaka odgovarajućih genotipova koji potom nisu oprašivani.

#### **3.2.2.1. Generisanje dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta**

U svrhu selekcije dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta, *eml1-2* i *eml3-4* mutanti su ručno ukrštani, metodom opisanom u odeljku 3.2.2. Novonastala semena su potom posađena i dvostruki mutant je identifikovan metodom genotipizacije.



Slika 9: Shematski prikaz ručnog ukrštanja. Slika je preuzeta i modifikovana sa [www.K8Baldwin.com](http://www.K8Baldwin.com).

### 3.3. Genotipizacija pomoću PCR tehnike

#### 3.3.1. Izolacija DNK i lančana reakcija polimeraze (PCR)

Izolacija ukupne genomske DNK obavljena je prema modifikovanoj metodi Edwards i sar. (1991). Uzorci listova su mehanički homogenizovani u 400  $\mu$ L ekstrakcionog pufera (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS). Nakon centrifugiranja na 21100 x g, tokom 5 minuta na sobnoj temperaturi, u supernatant je dodata je jednaka zapremina izopropanola. Posle centrifugiranja u trajanju od 5 minuta na 21100 x g, supernatant je odliven, a talog ispran sa 500  $\mu$ L 70% etanola i ponovo centrifugiran pod istim uslovima. Supernatant je odliven i talog osušen u laminaru, a potom resuspendovan u 100  $\mu$ L TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) i čuvan na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Koncentracija DNK molekula u uzorcima određivana je spektrofotometrijski merenjem apsorbancije na 260 nm uz pomoć NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, SAD). Uzorci DNK su čuvani na  $-20^{\circ}\text{C}$  do dalje upotrebe.

Za genotipizaciju i potvrdu prisustva transgena u biljnom tkivu korišćena je *GenScript Taq* DNK polimeraza (GenScript, SAD). PCR reakcija se odvijala u konačnoj zapremini od 25  $\mu$ L sa finalnim koncentracijama: 1x *GenScript* pufera, 0,2 mM dNTP smese, 0,4  $\mu$ M direktnog i reverznog prajmera, 10 ng DNK matrice i 2 U Taq polimeraze. Oligonukleotidni prajmeri koji su korišćeni su prikazani u Tabelama 3 i 4. Uslovi PCR reakcije zavisili su od temperature topljenja datog prajmera ( $T_m$ ) i sastojali su se od: jednog ciklusa denaturacije od 5 minuta na  $95^{\circ}\text{C}$ , 35 ciklusa: 30 sekundi na  $95^{\circ}\text{C}$ , 30

sekundi na temperaturi nižoj od  $T_m$  prajmera i 1,5 minuta na  $72^\circ\text{C}$ , kao i jednog ciklusa finalne ekstenzije od 10 minuta na  $72^\circ\text{C}$ .

### **3.3.2. Elektroforeza nukleinskih kiselina**

Za razdvajanje nukleinskih kiselina korišćeni su agarozni gelovi različitih koncentracija (1-4%) u 1 x TAE puferu (40 mM Tris, 20 mM sirćetna kiselina i 1 mM EDTA). Isti pufer je korišćen i za elektroforezu. Elektroforeze su se izvodile pri naponu od 100 V. U gelove je pre polimerizacije dodata fluorescentna boja etidijum-bromid u finalnoj koncentraciji od  $0,5 \mu\text{g/mL}$ , koja interkalira u molekul DNK i tako omogućava vizualizaciju osvetljavanjem gela UV svetlom. Gelovi su dokumentovani CCD kamerom, Gel Doc 2000 sistemom (BioRad, SAD). Za određivanje veličine fragmenata DNK korišćeni su odgovarajući komercijalni markeri DNK (Life Technologies, SAD).

### **3.3.3. Prečišćavanje DNK fragmenata iz agaroznog gela**

Za prečišćavanje fragmenata iz agaroznog gela korišćen je QIAquick® Gel Extraction komplet (Qiagen, Nemačka), prema uputstvu proizvođača. Na ovaj način su izolovani PCR fragmenti kao i fragmenti DNK nakon digestije.

## **3.4. Kloniranje**

### **3.4.1. Gateway sistem za kloniranje**

#### **3.4.1.1. Umnožavanje kodirajuće sekvence *EML1* i *EML3* gena**

Prvi korak u izolaciji kodirajućih sekvenci gena od interesa predstavljalo je izvođenje PCR tehnike korišćenjem cDNK WT biljaka kao matrica (Ler-0 u slučaju *EML1* i Col-0 u slučaju *EML3*) i specifičnih prajmera za ove gene. Direktni prajmeri su konstruisani tako da sadrže dodatne CACC bazne parove na 5' krajevima kako bi mesto-specifična rekombinacija mogla da se uspostavi na poziciji GTCC sekvence u samom vektoru. Start kodon je izostavljen zbog N-terminalne fuzije GFP reporterskog gena. PCR reakcija se odvijala u konačnoj zapremini od  $50 \mu\text{L}$  sa finalnim koncentracijama: 1x *Pfx* pufera, 0,3 mM dNTP smeše, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ,  $0,3 \mu\text{M}$  direktnog prajmera,  $0,3 \mu\text{M}$  reverznog prajmera, 1 U Platinum *Pfx* polimeraze (Life Technologies, SAD) i 10 ng

cDNK matrice, prema sledećem programu: 5 minuta na 94°C, 35 ciklusa od 30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na temperaturi nižoj od T<sub>m</sub> prajmera, 1,5 minut na 68°C, i finalna ekstenzija od 10 minuta na 68°C.

#### 3.4.1.2. TOPO kloniranje

Za TOPO kloniranje korišćen je pENTR<sup>TM</sup> Directional TOPO<sup>®</sup> komplet (Life Technologies, SAD).

PCR proizvodi su nakon dodavanja CACC krajeva uklonirani u pENTR-D/TOPO vektor koji na svojim krajevima ima vezan enzim topoizomerazu I. Ovaj enzim ima dvostruku ulogu da linearizuje vektor uz pomoć endonukleazne funkcije i da spaja krajeve inserta i vektora funkcionišući kao DNK ligaza. Molarni odnos PCR proizvoda i pENTR-D/TOPO vektora bio je 2:1 u ukupnoj zapremini reakcione smeše od 6 µL. Reakciona smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 5 minuta, a potom je čitava smeša iskorišćena za transformaciju TOP10 kompetentnih ćelija. Dobijene kolonije su analizirane sekvenciranjem u cilju provere sekvence konstrukata.

#### 3.4.1.3. LR reakcija

Gateway tehnologija kloniranja omogućava brzu i efikasnu *in vitro* rekombinaciju λ bakteriofazima. Tehnika se zasniva na mesto-specifičnoj rekombinaciji gde se delovi DNK koji na krajevima sadrže odgovarajuća rekombinaciona mesta (att) prenose u vektor sa kompatibilnim rekombinacionim mestom. Tzv. „ulazni” klonovi (eng. *entry clones*), donori plazmida, nastaju rekombinacijom DNK fragmenta od interesa koji sadrži odgovarajuće attB rekombinaciono mesto sa attP mestom, tako stvarajući attL mesto. TOPO ulazni klonovi već sadrže gotova attL mesta spremna za rekombinaciju. Potom se željeni fragment iz ulaznog klona, oivičen attL sekvencama, može preneti u ciljni vektor (eng. *destination vector*) koji sadrži attR rekombinaciono mesto u reakciji koja je zbog rekombinacije u kojoj učestvuju attL i attR mesta dobila naziv LR rekombinaciona reakcija ili skraćeno LR reakcija (Karimi i sar., 2002). Kodirajuća sekvencija *EML3* gena je prebačena iz ulaznog pENTR/D-TOPO vektora u pDEST17 ili pGWB6 ekspresione vektore mesto-specifičnom rekombinacijom tokom LR reakcije Gateway sistema kloniranja. Tokom ove reakcije, koju katalizuje enzim LR klonaza (*LR Clonase II mix*), dolazi do rekombinacije između attL i attR rekombinacionih mesta. LR

reakcione smeše su sadržavale 50 ng ulaznog klona, 150 ng ciljnog vektora i 2  $\mu$ L enzima LR klonaze u ukupnoj zapremini od 10  $\mu$ L. Nakon inkubacije na 25°C preko noći reakcija je zaustavljena dodatkom 2  $\mu$ g/ $\mu$ L proteinaze K. Nakon izvršene transformacije *E. coli*, selekcija je obavljena na LB agar petri šoljama sa odgovarajućim antibioticima. Sekvence novonastalih konstrukata su proveravane sekvenciranjem.

### **3.4.2. Multisite Gateway sistem za kloniranje**

#### **3.4.2.1. Umnožavanje *EML1* promotora, kodirajuće sekvence i *GFP* sekvence za potrebe kloniranja *EML1* minigenskog konstrukta**

Izolacija *EML1* promotorske sekvence: Prvi korak u izolaciji *EML1* promotorske sekvence bilo je izvođenje PCR metode uz upotrebu matrice koju predstavlja genomska DNK izolovana iz uzorka Ler-0, korišćenjem specifičnih prajmera koji poseduju attB4 i attB1r rekombinaciona mesta. Uslovi PCR reakcije su bili sledeći: 1x *Pfx* pufera, 0,3 mM dNTP smeše, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,3  $\mu$ M direktnog prajmera, 0,3  $\mu$ M reverznog prajmera, 1 U *Platinum Pfx* polimeraze (Life Technologies, SAD) i 10 ng DNK matrice, a korišćen je sledeći PCR program: 5 minuta na 94°C, 35 ciklusa od 30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na 58°C, 1,5 minut na 68°C, i finalna ekstenzija od 10 minuta na 68°C.

Izolacija *GFP* sekvence: Izolacija ove sekvence je izvršena pomoću PCR metode na pGWB6 binarnom vektoru kao matrici, korišćenjem specifičnih prajmera koji poseduju attB1 i attB2 rekombinaciona mesta. Uslovi PCR reakcije su bili sledeći: 1x *Pfx* pufera, 0,3 mM dNTP smeše, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,3  $\mu$ M direktnog prajmera, 0,3  $\mu$ M reverznog prajmera, 1 U *Platinum Pfx* polimeraze (Life Technologies, SAD) i 10 ng DNK matrice, a korišćen je sledeći PCR program: 5 minuta na 94°C, 35 ciklusa od 30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na 58°C, 1 minut na 68°C, i finalna ekstenzija od 10 minuta na 68°C.

Izolacija kodirajuće sekvence *EML1* gena: Izolacija kodirajuće sekvence je izvršena pomoću PCR metode na cDNK Ler-0 kao matrici, korišćenjem specifičnih prajmera koji poseduju attB2r i attB3 rekombinaciona mesta. Uslovi PCR reakcije su bili sledeći: Uslovi PCR reakcije su bili sa finalnim koncentracijama: 1x *Pfx* pufera, 0,3 mM dNTP smeše, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,3  $\mu$ M direktnog prajmera, 0,3  $\mu$ M reverznog prajmera, 1 U *Platinum Pfx* polimeraze (Life Technologies, SAD) i 10 ng cDNK matrice, a korišćen je

sledeći PCR program: 5 minuta na 94°C, 35 ciklusa od 30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na 58°C, 1,5 minut na 68 °C, i finalna ekstenzija od 10 minuta na 68°C.

#### **3.4.2.2. BP reakcija**

pDONR vektori su specijalizovani vektori adaptirani za *Gateway Multisite* sistem za kloniranje. Dodavanjem odgovarajućih att mesta na prajmere, PCR proizvodi se ubacuju u pDONR vektore u BP reakciji pri čemu nastaju ulazni klonovi. Reakciju katalizuje enzim BP klonaza (eng. *BP Clonase II mix*).

Promotorska sekvenca *EML1* gena je ubačena u pDONR P4-P1r vektor, *GFP* reporterski gen u pDONR 221, a *EML1* kodirajuća sekvenca u pDONR P2r-P3. BP reakciona smeša je sadržala 15-150 ng PCR proizvoda, 150 ng odgovarajućeg pDONR vektora, 2 µL BP enzima u zapremini od 8 µL. Reakcija je inkubirana preko noći na 25°C i zaustavljena dodavanjem 2 µg/µL proteinaze K. Ukupna smeša je korišćena za transformaciju TOP10 kompetentnih ćelija. Uspešnost kloniranja je proverena izolacijom plazmida koji su korišćeni kao matrica za PCR metodu u prisustvu M13 direktnog i reverznog prajmera, a potom i sekvenciranjem.

#### **3.4.2.3. Multisite LR reakcija**

Prema protokolu proizvođača, tri ulazna pDONR klona su potom ubačena u ciljani vektor pH7m34GW, LR reakcijom kojom dolazi do rekombinacije attL mesta u ulaznim plazmidima i attR mesta u ciljnom vektoru. Reakcija je katalizovana dodavanjem enzima LR klonaze plus (eng. *LR Clonase II plus*). Uslovi reakcije su bili sledeći: 20 fmola ciljnog vektora, po 10 fmola sva tri ulazna klona, u konačnoj zapremini od 8 µL. Nakon inkubacije na 25°C tokom noći, reakcija je zaustavljena dodavanjem 2 µg/µL proteinaze K. Nakon izvršene transformacije *E. coli*, selekcija je izvršena na LB agar petri šoljama koje su sadržale antibiotik spektinomycin. Ispravnost novonastalog konstrukta je proverena sekvenciranjem.

### **3.5. Restrikciono kloniranje**

Restrikcione endonukleaze prepoznaju i seku specifične kratke oligonukleotidne palindromske DNK sekvence. Na krajevima DNK molekula nakon digestije najčešće ostaju kohezivni („lepljivi“) jednolančani krajevi koji se mogu spojiti enzimom DNK

ligazom. Prilikom kloniranja, sekvenci prajmera se dodaje sekvenca koju prepoznaje određeni restrikcioni enzim kako bi se željeni amplifikovani region DNK mogao iseći i spojiti sa određenim vektorom. Za potrebe kloniranja sekvence *EML1* gena, restrikciona digestija pRSETA vektora je izvršena pomoću dva restrikciona enzima: BamHI i PstI. Restrikciona reakcija se sastojala od 5 µg vektora, 1x reakcionog pufera, po 10 U svakog restrikcionog enzima, u konačnoj zapremini reakcije od 10 µL. Reakcija je inkubirana na 37°C tokom 3 h. Uspešnost digestije proverena je na agaroznom gelu, nakon čega su fragmenti prečišćeni za dalje potrebe ligacije pomoću *ZymoResearch PCR Clean&Concentrator* kompleta (ZymoResearch, SAD). Kodirajuća sekvenca gena je prebačena u vektor ligacijom pomoću T4 DNK ligaze korišćenjem restrikcioni enzima BamHI i PstI. Ligacija željenog inserta i vektora je obavljena inkubiranjem fragmenta i vektora u prisustvu 1x pufera i 1 U T4 DNK ligaze (Promega, SAD) u 10 µL reakcije. Molarni odnos inserta i vektora je bio 3:1, a koncentracija inserta neophodnog za reakciju u kojoj se nalazi 100 ng vektora je izračunata prema formuli:

$$\frac{100 \text{ ng vektora} \times \text{veličina inserta (bp)}}{\text{veličina vektora (bp)}} \times \text{molarni odnos inserta i vektora (M)}$$

Inkubacija ligacione smeše je vršena preko noći na temperaturi od 16°C. Čitava smeša je iskorišćena za transformaciju TOP10 kompetentnih ćelija. Uspešnost ligacije je proverena izolacijom plazmida i digestijom restrikcionim enzimima. Sekvenca je proverena sekvenciranjem.

Konstruisanje *EML3* minigenskog konstrukta koji predstavlja N-terminalnu fuziju GFP reporterskog gena sa sekvencom nativnog promotora i kodirajućom *EML3* sekvencom je vršeno kroz dve faze. Prva faza je podrazumevala izbacivanje promotorske sekvence *CaMV 35S* digestijom restrikcionim enzimima XbaI i SbfI iz već postojećeg *EML3* konstrukta ukloniranog u vektor pGWB6. U drugoj fazi, umnožena je sekvenca *EML3* promotora korišćenjem matrice u vidu ulaznog klona *EML3* pDONR P4-P1r. PCR proizvod je direktno tretiran XbaI i SbfI restrikcionim enzimima i nakon toga prečišćen sa gela. Ligacija u odredišni pGWB6 vektor obavljena je uz pomoć XbaI i SbfI „lepljivih krajeva” pri čemu je izvršena zamena *CaMV 35S* promotora nativnim *EML3* promotorom. Nakon potvrde ispravnosti konstrukta sekvenciranjem, isti je transformisan elektroporacijom u *A. tumefaciens* soj GV3101.

### **3.6. Transformacija bakterijskih ćelija**

#### **3.6.1. „Heat shock” transformacija *E. coli***

Za potrebe kloniranja korišćene su komercijalno dostupne TOP10 *E. coli* kompetentne ćelije. Nakon dodavanja DNK, ćelije su inkubirane 30 minuta na ledu. Zatim su izložene toplotnom šoku na 42°C u trajanju od 45 sekundi, nakon čega je sledila inkubacija na ledu tokom 2 minuta. U mikrotubu je dodato 200 µL SOC tečnog medijuma i ćelije su inkubirane na 37°C tokom 2 h uz konstantno mešanje na 220 obrtaja u minutu (*rpm*). Kompletan zapremina smeše je razmazana na LB agar petri šolje sa odgovarajućim antibioticima. Inkubacija je obavljena na 37°C preko noći, do pojave kolonija.

#### **3.6.2. Transformacija *Agrobacterium tumefaciens* metodom elektroporacije**

Transformacija bakterija metodom elektroporacije predstavlja izlaganje bakterija struji visoke voltaže što olakšava ulazak molekula DNK u ćeliju. Alikvoti od 50 µl ćelijske suspenzije *A. tumefaciens* soja GV3101 su korišćeni za transformaciju. Zapremina DNK koja je dodata u ćelijsku suspenziju bila je manja od 5 µL (ukupna koncentracija DNK bila je 5-15 ng). Suspenzija ćelija sa DNK inkubirana je 5 minuta na ledu, a zatim je unošena u ohlađenu kivetu za elektroporaciju razmaka 0,1 cm (BioRad, SAD). Elektroporacija je vršena pod sledećim uslovima: 1,4 kV, 25 µF, 200 Ω (Gene Pulser, BioRad, SAD). Po primenjenom strujnom impulsu u kivetu je odmah dodat 1 mL LB medijuma. Suspenzija ćelija je oživljavana inkubiranjem 1,5 h na 28°C uz konstantno mešanje na 180 obrtaja u minutu (*rpm*). Nakon toga su se transformisane ćelije podvrgavale selekciji na selektivnoj hranljivoj podlozi.

### **3.7. Izolacija plazmida iz bakterija**

Izolacija plazmida iz bakterija urađena je korišćenjem *PureLink® Quick Plasmid Miniprep* kompleta (Life Technologies, SAD) prema uputstvima proizvođača, nakon čega je koncentracija plazmida određivana spektrofotometrijski korišćenjem aparata *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific, SAD).



### **3.8. Analiza genske ekspresije**

#### **3.8.1. Izolovanje ukupne RNK**

Izolacija ukupne RNK iz uzoraka semena *A. thaliana* je izvršena uz korišćenje *PureLink Plant RNA Reagent* kompleta (Life Technologies, SAD) prema uputstvu proizvođača. Od 30 mg do 100 mg biljnog materijala usitnjeno je do praha pomoću tečnog azota i korišćeno u daljim koracima izolacije RNK.

Kvantifikacija RNK molekula u izolatima urađena je spektrofotometrijski, merenjem apsorbancije na 260 nm, direktnim nanošenjem 2  $\mu$ L uzorka u komoru aparata *NanoDrop ND-1000* (ThermoScientific, SAD). Kvalitet izolovane RNK je proveren razdvajanjem na 1% agaroznom gelu. Nakon izvršenih provera kvaliteta i kvantiteta izolovane RNK, izolati su čuvani na  $-80^{\circ}\text{C}$  do trenutka daljeg korišćenja.

#### **3.8.2. Tretman dezoksiribonukleazom (DNazom)**

U cilju uklanjanja ostataka genomske DNK, ukupna RNK iz svakog uzorka je tretirana dva puta DNazom (Life Technologies, SAD). Reakciona smeša se sastojala od 2  $\mu$ g RNK, 2  $\mu$ L 10x reakcionog pufera sa  $\text{MgCl}_2$  i 2 U (1 U/ $\mu$ L) DNaze. Ukupna zapremina reakcione smeše bila je 20  $\mu$ L. Reakciona smeša je inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom je dodato još 2 U (1 U/ $\mu$ L) DNaze, nakon čega je ponovljena inkubacija na sobnoj temperaturi od 10 minuta. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 2,2  $\mu$ L 25 mM EDTA (Life Technologies, SAD) i inkubacijom na  $65^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 10 minuta. Ovako pripremljena RNK služila je kao matrica za reverznu transkripciju tj. sintezu jednolančane DNK (cDNK) čija je sekvenca komplementarna sekvenci informacione RNK.

#### **3.8.3. Reverzna transkripcija**

Sinteza cDNK je vršena u PCR aparatu (Applied Biosystems Thermal Cycler, SAD) korišćenjem *SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase* kompleta (Life Technologies, SAD) prema uputstvu proizvođača. U reakciji reverzne transkripcije 1  $\mu$ g ukupne RNK tretirane DNazom je preveden u cDNK. Reakciona smeša je pripremljena na ledu, a njene komponente su 2,5  $\mu$ M oligo (dT) prajmeri, 1 mM dNTP. Smeša je inkubirana 5 minuta na  $65^{\circ}\text{C}$ , a potom je u smešu dodata smeša sastavljena od 1x reakcionog pufera,

200 U reverzne transkriptaze (*SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase*), 5 mM ditionitrola (DTT) i destilovana voda do finalne zapremine od 20  $\mu$ L. Reakcija se odvijala 1 h na 50°C i zaustavljena je zagrevanjem uzoraka 5 minuta na 85°C. Sintetisana cDNK čuvana je na -80°C do dalje upotrebe. Negativne kontrole, kojima je proveravana čistoća izolovanih RNK molekula, analizirane su istovremeno sa uzorcima i one su podrazumevale reakcije bez unetog enzima reverzne transkriptaze.

### **3.8.4. PCR umnožavanje nakon reverzne transkripcije**

PCR umnožavanje je rađeno uz pomoć *GenScript Taq* polimeraze (GenScript, SAD), za analitičke, ili *Platinum Pfx* polimeraza (Life Technologies, SAD), za preparativne potrebe. PCR reakcija se odvijala u konačnoj zapremini od 25  $\mu$ L sa finalnim koncentracijama: 1x *GenScript* pufera, 0,2 mM dNTP smese, 0,4  $\mu$ M direktnog i reverznog prajmera, 10 ng DNK matrice i 2 U *Taq* polimeraze, a korišćen je sledeći program: 5 minuta na 94°C, 35 ciklusa od 30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na temperaturi nižoj od  $T_m$  prajmera, 30 sekundi na 72°C, i finalna ekstenzija od 10 minuta na 72°C. PCR reakcija za preparativne potrebe se odvijala u konačnoj zapremini od 50  $\mu$ L sa finalnim koncentracijama: 1x *Pfx* pufera, 0,3 mM dNTP smeše, 1 mM  $MgSO_4$ , 0,3  $\mu$ M direktnog prajmera, 0,3  $\mu$ M reverznog prajmera, 1 U *Platinum Pfx* polimeraze (Life Technologies, SAD) i 10 ng cDNK matrice, prema sledećem programu: 5 minuta na 94°C, 35 ciklusa od 30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na temperaturi nižoj od  $T_m$  prajmera, 1,5 minut na 68°C, i finalna ekstenzija od 10 minuta na 68°C. Specifičnost prajmera je potvrđena gel elektroforezom RT-PCR proizvoda. Sekvence korišćenih prajmera se nalaze u Tabeli 6. Za sve uzorke urađena je i RT-PCR reakcija sa prajmerima za konstitutivno eksprimirani *PP2A* gen. Ovaj gen sa potvrđenom ekspresijom u semenu *A. thaliana*, korišćen je kao kontrola za ujednačen unos RNK molekula u RT-PCR reakciju.

### **3.8.5. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (RT-qPCR)**

RT-qPCR analiza je rađena pomoću *IQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix* kompleta (BioRad, SAD) koji sadrži *hot-start iTaq* DNK polimerazu, dNTP-ove, odgovarajući pufer i fluorescentnu boju *SYBR Green I*. Matrica cDNK je razblaživana četiri puta pre dodavanja u PCR reakciju. Po 10  $\mu$ L reakcione smeše (1x *SYBR Green Supermix*, 0,2

$\mu\text{M}$  odgovarajućih parova prajmera za gen od interesa, 1 ng cDNK), je naliveno u svaki bunarić na mikrotitar ploči. Korišćeni prajmeri su predstavljeni u Tabeli 6. Ploča je centrifugirana 3 minuta na  $1000 \times g$  i prenetu u aparat za RT-qPCR (CFX96<sup>TM</sup> Real-Time PCR Detection System, BioRad, SAD). Uslovi amplifikacije bili su sledeći: inicijalna denaturacija 3 minuta na  $95^{\circ}\text{C}$ , praćena ciklusom koji se sastojao od koraka denaturacije DNK lanaca tokom 15 sekundi na  $95^{\circ}\text{C}$ , koraka vezivanja prajmera za matricu na  $55^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 30 sekundi i elongacije lanaca od 30 sekundi na  $72^{\circ}\text{C}$ . Ciklus je ponovljen 44 puta. Nivo ekspresije ispitivanog gena standardizovan je u odnosu na ekspresiju *PP2A* gena detektovanog u istom uzorku i iskazan kao  $2^{-\text{dCt}}$ , gde je dCt razlika između Ct vrednosti gena od interesa i *PP2A* gena.

### 3.9. Prečišćavanje rekombinantnih proteina

#### 3.9.1. Indukcija ekspresije rekombinantnih proteina na maloj skali

Konstrukti His-EML1 i His-EML3 su uvedeni u BL21(DE3)pLys i BL21-AI *E. coli* kompetentne ćelije *heat-shock* transformacijom. Pojedinačne transformisane bakterijske kolonije su inokulirane u 5 mL tečnog LB medijuma sa odgovarajućim antibioticima (karbenicilin  $50 \mu\text{g/mL}$  i hloramfenikol  $34 \mu\text{g/mL}$ ) i inkubirane preko noći u rotacionom šejkeru na  $37^{\circ}\text{C}$  pri  $220 \text{ rpm}$ . Zatim je 2 mL bakterijske prekonoćne kulture inokulirano u 44 mL tečnog LB medijuma sa antibiotikom i inkubirano  $\sim 1,5 \text{ h}$  na  $37^{\circ}\text{C}$  u Erlenmajer boci zapremine 500 mL uz stalnu aeraciju na rotacionom šejkeru, pri brzini od  $220 \text{ rpm}$ , do postizanja optičke gustine  $\text{OD}_{600}=0.6$ . Nakon toga, odvojeno je 1 mL bakterijske kulture za potrebe neindukovane kontrole (eng. *Noninduced control*) dok je u preostalu zapremini dodat IPTG u konačnoj koncentraciji od 1 mM sa ciljem indukcije ekspresije His-EML1, ili L-arabinoza u koncentraciji od 0.2% za indukciju ekspresije His-EML3. Nakon indukcije, kulture sa His-EML1 konstruktom su gajene na  $30^{\circ}\text{C}$ , dok su kulture sa His-EML3 konstruktom gajene na sobnoj temperaturi, u trajanju od 18 h uz konstantno mešanje na  $220 \text{ rpm}$ . Po završetku indukcije iz kulture su odvajani alikvoti od po 1 mL za proveru indukovane sinteze rekombinantnog proteina elektroforezom na poliakrilamidnom gelu kao i za potrebe njegovog prečišćavanja. Ćelije su u alikvotima oborene centrifugiranjem 10 sekundi na  $15000 \times g$ , nakon čega je uklonjen supernatant, a talog čuvan na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.9.2. Prečišćavanje proteina iz *E. coli* u nativnim uslovima

U ovom radu je korišćena afinitetna hromatografija na nosaču sa vezanim jonima nikla ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agaroz) za potrebe prečišćavanja rekombinantnog proteina, na maloj skali u mikrotubi. Princip ove afinitetne hromatografije je da se protein od interesa veže za jone nikla preko imidazolnog prstena histidinskih ostataka. Kompeticija između imidazola iz pufera za eluciju i imidazolnog prstena histidinskih ostataka proteina za jone nikla omogućava odvajanje rekombinantnog proteina od afinitetnog nosača i dobijanje prečišćenog proteina.

Pre dodavanja  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agaroze u tubu, agaroz je uravnotežena puferom za lizu. Bakterijski talozi su resuspendovani u 200  $\mu\text{L}$  hladnog pufera za lizu (eng. *lysis buffer*; 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol; pH 8,0). Nakon dodavanja 1  $\mu\text{L}$  lizozima (Novagen, 27–33 KU/ $\mu\text{L}$ , SAD) uzorak je pažljivo izmešan i ostavljen da se inkubira 30 minuta na ledu. Lizozim je aktivan na ledu, a zbog niske temperature ne dolazi do degradacije proteina. Suspenzija je potom centrifugirana 10 minuta na 15000 x g, na temperatura od 4°C. Supernatant je prebačen u novu mikrotubu i dodato je 40  $\mu\text{L}$   $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agaroze (Qiagen, SAD). Nakon inkubacije na 4°C na rotacionom šejkeru u trajanju od 30 minuta, smeša je centrifugirana 10 sekundi na 15000 x g. Nevezana frakcija proteina koja se nalazi u supernatantu je odbačena, dok je  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agaroz tretirana 4 puta puferom za ispiranje (eng. *wash buffer*; 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 50 mM imidazol; pH 8,0). Niske koncentracije imidazola u puferu za lizu i puferu za ispiranje umanjuju nespecifično vezivanje drugih proteina. Vezani protein je eluiran puferom za eluciju (eng. *elution buffer*; 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 250 mM imidazol; pH 10,2) pri čemu je sakupljano 3 frakcije od po 30  $\mu\text{L}$ . Uspešnost prečišćavanja proteina proverena je elektroforezom na poliakrilamidnom gelu kao i imunoblot (*Western blot*) analizom.

### 3.9.3. Rasoljavanje dijafiltracijom proteina

U cilju uklanjanja soli i imidazola, prečišćeni rekombinantni proteini su podvgnuti metodi dijafiltracije. Dijafiltracija je proces koncentrovanja proteina kroz membranu kontrolisanih veličina pora i vršena je tokom centrifugiranja na 4°C na 2000 x g. Granična veličina pora (eng. *cut off*) se odnosi na veličinu molekula koji se zadržavaju u količini višoj od 99%. Za rasoljavanje uzoraka korišćena je komercijalno dostupna

kolona *Pierce*<sup>®</sup> *Concentrator 9K/20K MWCO*, zapremine 7 mL (Thermo Scientific, SAD) prema uputstvu proizvođača. Za potrebe vezivanja proteina za histonski proteinski čip, 90 µL (18 µg) prečišćenog proteina u elucionom puferu je rasoljavano sa 6,9 mL pufera za interakciju AM1 koji sadrži 0,1 mM DTT (eng. *interaction buffer*; Active Motif, SAD). Centrifugiranje je vršeno do dostizanja početne zapremine od 90 µL i dodatno razblaženo sa 5 mL pufera za interakciju uz dodatak DTT-a. Uzorak je čuvan na 4°C do dalje upotrebe, ali ne duže od nekoliko nedelja.

### **3.10. Vezivanje za histonski proteinski čip**

Slajd (čip) koji sadrži 384 različite kombinacije modifikacija histonskih repova (originalni naziv *histone peptide array*, Active Motif, SAD) je ekvilibrisan 15 minuta na 4°C, a zatim inkubiran 60 minuta na sobnoj temperaturi u puferu za blokiranje AM2 (eng. *blocking buffer*; Active Motif, SAD) na rotacionoj mešalici pri 50 rpm. Nakon ispiranja puferom za ispiranje (tri puta po 5 minuta), slajd je inkubiran preko noći na 4°C u rastvoru His-EML1 ili His-EML3 proteina i pufera za interakciju AM1. Slajd inkubiran u 5 mL pufera za interakciju je korišćen kao negativna kontrola, dok je pozitivnu kontrolu predstavljao slajd inkubiran sa His-G9a, histon-metiltransferazom za koju je poznato da se vezuje za H3K9. Dodatnu negativnu kontrolu je uključivalo vezivanje proteina His-UGT3, za koji je unapred bilo poznato da se ne vezuje za histone. Nakon vezivanja proteina, dodato je primarno anti-His antitelo u razblaženju 1:3000 (w:v) u 1xTBS puferu (0,2 M Tris, 1,5 M NaCl). Nakon 60 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, slajdovi su isprani puferom za ispiranje tri puta po 5 minuta, a zatim inkubirani sa sekundarnim antitelom za koje je konjugovan enzim peroksidaza rena (eng. *horse radish peroxidase*) u razblaženju 1:2500 (w:v) u 1xTBS puferu. Nakon 1 h inkubacije slajdovi su ponovo isprani puferom za ispiranje tri puta po 5 minuta. Za vizuelizaciju formiranih kompleksa antigena i antitela korišćen je ECL reagens (Active Motif, SAD) dok je za analizu signala korišćen *Active Motif* softverski paket.

### **3.11. Transformacija biljaka**

#### **3.11.1. Floral dip**

Transformacija biljaka *A. thaliana* obavljena je alternativnom metodom transformacije umakanjem cvetova („*floral dip*“). Za potrebe transformacije, *eml1-2* i *eml3-4* mutanti

su gajeni do pojave prvih cvetova. Primarno cvetno stablo je uklanjano da bi se smanjila apikalna dominacija i stimulisalo sekundarno grananje. Nakon 4 do 5 dana mladi cvetovi sa novonastalih stabala potapani su u bakterijsku suspenziju *Agrobacterium tumefaciens*.

Bakterijska suspenzija je pripremljena tako što je u prvom koraku 1 mL prekonoćne kulture dodato u 200 mL LB medijuma sa dodatkom antibiotika spektinomicina i gentamicina, nakon čega su bakterije inkubirane 48 h na 28°C. Čelije su staložene centrifugiranjem na 4000 x g na sobnoj temperaturi tokom 10 minuta, a talog je resuspendovan u puferu koji sadrži 5% rastvor saharoze uz dodatak surfaktanta *Silwet L-77* u konačnoj koncentraciji od 0,03%. Podešavanje OD<sub>600</sub> ćelijskih suspenzija je vršeno puferom sa saharozom i surfaktantom, do vrednosti od 0,8. Cvetovi su potapani u pripremljenu bakterijsku suspenziju, a biljke su potom horizontalno postavljene na poslužavnik, sa vlažnim filter papirom i inkubirane 24 h u mraku nakon čega su prebačene u komoru za gajenje biljaka pod kontrolisanim uslovima na temperaturi od 22°C i prosečnoj dužini dnevne svetlosti od 16 h. Dobijena semena su sakupljana radi selekcije transformanata.

Selekcija stabilnih transformanata je obavljena na MS hranljivim podlogama sa antibiotikom higromicinom. Narasli klijanci, koji su predstavljali T1 generaciju, presađivani su u saksije sa mešavinom zemlje Sunshine® LC1 i đubriva Osmocote 14:14:14 (14% azot, 14% fosfor, 14% magnezijum). Biljke su potom gajene u komori sa kontrolisanim uslovima na temperaturi od 22°C i prosečnoj dužini dnevne svetlosti od 16 h. Za odabir homozigota za dotični transgen potrebno je T1 generaciju biljaka ponovo selektovati na podlogama sa antibiotikom i sakupiti semena generacije T2. Postupak selekcije je ponovljen još jednom, nakon čega se u generaciji T3 seme koje je 100% otporno na antibiotik tretira kao homozigot za transgen.

### **3.11.2. Agroinfiltracija**

Transformisani soj *A. tumefaciens* GV3101 inokuliran je u 5 mL LB tečne podloge sa antibioticima za selekciju (kanamicin 50 µg/mL, gentamicin 25 µg/mL i higromicin 50 µg/mL za GFP-EML3 konstrukt), nakon čega je kultura gajena 24 h na 28°C, na horizontalnoj rotacionoj mešalici (220 rpm). Izvršena je inokulacija 1 mL prekonoćne kulture u 10 mL medijuma koji sadrži 9 mL tečnog LB medijuma, 10 mM MES,

odgovarajuće antibiotike za selekciju i 20  $\mu\text{M}$  acetosiringon (Sigma, SAD). Ćelije su staložene centrifugiranjem 10 minuta na 3000 *rpm* na sobnoj temperaturi. Na isti način pripremljen je soj koji sintetiše protein p19 koji vrši supresiju genskog utišavanja kao odgovora biljke na infekciju, a takođe i soj koji sintetiše GFP. Ćelije su zatim resuspendovane u puferu koji je sadržao 10 mM MES, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  i 100  $\mu\text{M}$  acetosiringon (Sigma, SAD), do optičke gustine  $\text{OD}_{600} = 1.0$  i nakon toga inkubirane 4 h na sobnoj temperaturi. U cilju istovremene infiltracije, pomešane su jednake zapremine suspenzije *GFP-EML3* (ili GFP) i p19 u infiltracionom puferu i infiltrirani su listovi biljaka *Nicotiana benthamiana*, nakon čega su biljke gajene u komori tri dana na 27°C sa svetlosnim režimom 16 h dan/ 8 h noć. Posle tog perioda, infiltrirani listovi su prikupljeni i čuvani na -80 °C do dalje upotrebe.

### **3.12. Ko-imunoprecipitacija proteina**

#### **3.12.1. Izolacija jedarnih proteina**

Jedarni proteini su izolovani korišćenjem *CellLytic™ PN Plant Nuclei Isolation/Extraction* kompleta (Sigma, SAD) prema uputstvu proizvođača. Biljni materijal je prvobitno samleven u tečnom azotu, a zatim je hladan 1x pufer za izolaciju nukleusa (eng. *Nuclei Isolation Buffer*, NIB) dodat u proporciji 3:1 (v:w). Ekstrakt je filtriran kroz gazu, a zatim taložen centrifugiranjem 10 minuta na 1260 x *g*. Supernatant je odliven, a talog resuspendovan u 500  $\mu\text{L}$  1x NIB pufera koji sadrži koktel inhibitora proteinaza (eng. *protease inhibitor cocktail*) u proporciji 1:100 (v/v). Ovaj pufer je označen kao NIBA pufer. Nakon dodavanja deterdženta Triton X-100 u konačnoj koncentraciji od 0,3%, suspenzija je taložena centrifugiranjem na 12000 x *g* u trajanju od 10 minuta. Jedarni talog je ispran još jednom sa 500  $\mu\text{L}$  1x NIBA i centrifugiran 10 minuta na 12000 x *g*. Supernatant je pažljivo odliven, a talog je resuspendovan u puferu za lizu (1 mM EDTA, 10% (v/v) glicerol, 75 mM NaCl, 0.05% (w/v) SDS, 100 mM Tris-Cl (pH 7.4), 0.1% (v/v) Triton X-100 i koktel inhibitora proteinaza (1:100)).

#### **3.12.2. Fragmentacija DNK molekula i dijafiltracija pufera**

Kako bi se obezbedilo razbijanje ćelijskog zida, oslobađanje unutarćelijskog sadržaja i fragmentacija DNK molekula, resuspendovani jedarni talog je podeljen u dve mikrotube koje su podvrgnute sonifikaciji tri puta po 10 minuta, u ciklusima 30 sekundi

uključeno/30 sekundi isključeno (Bioruptor, Diagenode). Uzorak je potom centrifugiran 5 min na 13000 *rpm* i dobijeni supernatant je prebačen u nove tube. Razdvajanjem 10  $\mu$ L uzoraka na agaroznom gelu, ustanovljeno je da su DNK fragmenti nakon sonikacije iznosili  $\sim$  500 bp. Uzorcima je potom dodat enzim endonukleaza benzonaza (Novagen, Nemačka) za uklanjanje svih oblika RNK i DNK (jednolančanih, dvolančanih, cirkularnih i linearnih formi) iz lizata. Nakon inkubacije u trajanju od 1 h na 4°C, nuklearni ekstrakti su prebačeni u tube za koncentrovanje (*Pierce*<sup>®</sup> *Concentrator 9K/20K MWCO*, 7 mL, Thermo Scientific, SAD) u cilju zamene postojećeg pufera za lizu puferom za imunoprecipitaciju (skraćeno nazvan IP pufer; 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5% NP-40, 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 1 mM PMSF i koktel inhibitora proteinaza (1:100)). Uzorci su centrifugirani na 2000 x g do momenta dok nuklearni ekstrakti nisu ukoncentrovani do početne zapremine, a potom su prebačeni u nove tube i podvrgnuti ko-imunoprecipitaciji.

### 3.12.3. Ko-imunoprecipitacija

Za imunoprecipitaciju su korišćene magnetne *Dynabeads* kuglice sa kovalentno vezanim G proteinom (Life Technologies, SAD). U mikrotube sa nuklearnim ekstraktima u 1 mL pufera za imunoprecipitaciju je dodato 50  $\mu$ L suspenzije kuglica. Mikrotube su inkubirane 60 minuta na rotacionoj mešalici na 4°C. Nakon inkubacije, mikrotube su postavljane na magnetni stalak gde dolazi do odvajanja magnetinih kuglica koje sadrže vezane proteine i supernatanta koji sadrži proteine iz ekstrakta koji se nisu vezali za kuglice. U ovom koraku koji služi da ukloni sve proteine koji se nespecifično vezuju za kuglice, odvojen je supernatant i prebačen u nove mikrotube. Odvojeno je 100  $\mu$ L uzorka za potrebe početnog uzorka (eng. *input*) i čuvano na 4°C. U preostalih 900  $\mu$ L je dodato 55  $\mu$ L rastvora GFP antitela vezanog za magnetne kuglice. Vezivanje proteina od interesa za kompleks antitelo-kuglice se odvijalo tokom 3 h na 4°C. Kuglice su potom isprane tri puta sa po 500  $\mu$ L pufera za imunoprecipitaciju, dodato je 50  $\mu$ L 2x Lemli pufera (eng. *Laemmli buffer*), nakon čega su uzorci inkubirani 3 minuta na 100°C. Uz imunoprecipitirane uzorke analizirani su i *input* uzorci, koji služe kao kontrola tj. potvrda da je u uzorku bio prisutan protein od interesa.



### 3.13 Western blot

*Western blot* je metoda koja omogućava imunodetekciju ciljnog proteina u uzorku. Metoda podrazumeva sledeće korake: razdvajanje smeše proteina elektroforezom, transfer razdvojenih proteina na membranu i imunodetekciju ciljnog proteina na membrani.

#### 3.13.1. Elektroforetsko razdvajanje proteina pod denaturišućim uslovima

SDS-PAGE (eng. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) je metoda koja omogućava razdvajanje proteina prema molekularnoj masi u denaturišućim uslovima. Za razdvajanje je korišćen diskontinuirani SDS poliakrilamidni gel sastavljen od gela za koncentrovanje (eng. *stacking gel*) i gela za razdvajanje (eng. *running gel*) u kome se proteini iz uzorka razdvajaju po svojoj masi. Elektroforeza je rađena u BioRad sistemu (*Mini-Protean II Electrophoresis Cell*, SAD) prema uputstvu proizvođača. Za razdvajanje proteina korišćen je 12% poliakrilamidni gel koji je Pasterovom pipetom razlivan između dve staklene ploče i momentalno nadslojen destilovanom vodom. Nakon 30 minuta polimerizacije, voda je odlicena i višak uklonjen filter papirom. Zatim je pripremljen 5% gel za koncentrovanje koji je prelivan preko gela za razdvajanje. U gel za koncentrovanje je zatim pažljivo uronjen češalj kako bi se formirali bunarići. Nakon 30 minuta polimerizacije, češalj je pažljivo izvađen iz gela, a bunarići su isprani destilovanom vodom. Elektroforeza je urađena u Tris-glicinskom puferu (25 mM Tris pH 8,8, 250 mM glicin, 0,1% SDS), pod konstantnim naponom od 80 V u gelu za koncentrovanje i 100 V u gelu za razdvajanje. Zajedno sa uzorcima, na gel je nanosen proteinski marker poznatih molekularnih masa (*Precision Plus Protein Dual Color Standards*, BioRad). Pre nanošenja uzoraka, obavljena je njihova denaturacija korišćenjem pufera za uzorak (5 mM Tris pH 6,8, 1,5% DTT, 2 % SDS, 0,1% bromfenol plavo, 10% glicerol) inkubacijom na 100°C tokom 3 do 5 minuta. Po završetku elektroforeze gelovi su bojeni *Coomassie* plavim ili su korišćeni za prenos elektroforetski razdvojenih proteina na membrane.

#### 3.13.2. Prenos proteina na membranu

Prenos proteina sa denaturišućih poliakrilamidnih gelova na membranu od poliviniliden fluorida (PVDF) (BioRad, SAD) ili nitroceluloznu membranu (Life Technologies, SAD)

izvršen je u puferu za transfer u BioRad sistemu (Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Cell, BioRad, SAD) tokom 60 minuta na 100 V u slučaju transfera na PVDF odnosno 45 V za prenos proteina na nitroceluloznu membranu. Nitrocelulozna membrana (veličina pora 0,2 mm) se preporučuje za transfer i detekciju histonskih proteina, dok se PVDF membrana pokazala boljom za prenos i detekciju proteina većih masa, kao što je GFP protein ili proteini od interesa u fuziji sa GFP proteinom. Uspešnost transfera je proverena bojenjem membrane rastvorom boje *Ponso S* (0,1% Ponso S, 1% glacijalna sirćetna kiselina) (ThermoScientific, SAD). Ova boja se reverzno vezuje za proteine na membrani čime je omogućena njihova vizuelizacija. Nakon toga boja je uklonjena ispiranjem membrane u vodi, uz blago mućkanje.

### 3.13.3. Imunoblot analiza

Membrane su, nakon transfera proteina, inkubirane 60 minuta u 4% rastvoru bezmasnog mleka u prahu (eng. *non-fat dry milk*, *NFDM*) kako bi se blokirala mesta na membrani za koja nisu vezani proteini. Detekcija ispitivanog proteina se vrši u dve faze – inkubacijom sa primarnim i sekundarnim antitelom. Primarno antitelo je specifično za određeni epitop ciljnog proteina, dok sekundarno antitelo prepoznaje primarno i najčešće je specifično za epitop imunoglobulina životinje iz koje je izolovano primarno antitelo. Prekonoćna inkubacija membrane sa primarnim antitelom u 5 mL pufera TBST (0,2 M Tris, 1,5 M NaCl, 0,05 % Tween 20) izvršena je na 4°C, uz blago mućkanje. Nespecifično vezana primarna antitela su uklonjena ispiranjem membrane 3 puta po 10 minuta u puferu TBST uz intenzivno mućkanje. Membrana je zatim inkubirana 1h sa sekundarnim antitelom koje je konjugovano sa peroksidazom rena. Nespecifično vezano sekundarno antitelo je uklonjeno ispiranjem membrane u puferu TBST (3 puta po 10 minuta), nakon čega je pristupljeno detekciji signala. Korišćena antitela su prikazana u Tabeli 8. Peroksidaza rena (eng. *horseradish peroxidase* - HRP) katalizuje reakciju u kojoj se supstrat (Lumigen PS-3 akridan) prevodi u jedinjenje koje daje hemiluminiscentni signal sa maksimalnom emisijom na talasnoj dužini od 430 nm. Membrane su inkubirane 5 minuta u ECL (eng. *enhanced chemiluminescence*) rastvoru za detekciju (*SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Solution A and Solution B*, ThermoScientific ili *SuperSignal Pico Chemiluminescent Substrate*, ThermoScientific, SAD) prema uputstvu proizvođača. Detekcija signala je vršena

ekspozicijom radiografskih filmova (GeneMate, BioExpress, SAD) i njihovim razvijanjem. Dužina ekspozicije zavisila je od jačine signala i kretala se od nekoliko sekundi do 15 minuta. Korišćena primarna i sekundarna antitela su prikazana u Tabeli 8.

Tabela 8. Primarna i sekundarna antitela korišćena u *Western blot* analizi

Primarno antitelo	Razblaženje	Sekundarno antitelo	Razblaženje
anti-GFP ab290 (Abcam, UK)	1:2500	anti-rabbit IgG (GE Healthcare, UK)	1:10000
anti-H3 ab1791 (Abcam, UK)	1:1000		
anti-GFP A11120 (Invitrogen, SAD)	1:1000	anti-mouse IgG (GE Healthcare, UK)	1:10000
anti-His (Active Motif, SAD)	1:2500	anti-mouse IgG (GE Healthcare, UK)	1:3000

### 3.14. Analiza transkriptoma- RNK-Seq

Priprema cDNK biblioteke je urađena korišćenjem *Illumina mRNA-Seq sample preparation* kompleta prema uputstvu proizvođača (Illumina, SAD). Prvi korak u konstrukciji cDNK biblioteka predstavljalo je izolovanje ukupne RNK, pa zatim prevođenje u molekule DNK, odnosno cDNK, primenom enzima reverzne transkriptaze. Ukupna RNK izolovana iz WT i *eml1-2 eml3-4* materijala (iz ljuski starosti 1 do 5 dana) je u cilju uklanjanja ostataka genomske DNK tretirana dva puta DNazom (Life Technologies, SAD). Potom je 1 µg ukupne RNK, izložen vezivanju za magnetne kuglice sa kovalentno vezanim oligo(dT) oligonukleotidom (Illumina, SAD) u cilju izolovanja iRNK. Budući da su iRNK molekuli predugački da bi se odmah sekvencirali potrebno ih je prvo fragmentisati, što je obavljano zagrevanjem u trajanju od 3 minuta na 94 °C u puferu za fragmentaciju (eng. *fragmentation buffer*) (Illumina, SAD). Ovako pripremljena iRNK služila je kao matrica za reverznu transkripciju korišćenjem *SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase* (Life Technologies, SAD). Reakciona smeša se sastojala od fragmentisane iRNK, 50 ng nasumičnih (eng. *random*) prajmera, 0,5 mM smeše dNTP-ova, 10 mM DTT, inhibitora RNK-aze *RNaseOUT* (Life Technologies,

SAD) i 200 U reverzne transkriptaze (*SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase*). Reakcija reverzne transkripcije odvijala se po sledećem programu: 25°C tokom 10 minuta, 42°C u trajanju od 50 minuta, 70°C tokom 15 minuta. Reakciona smeša za sintetisanje drugog lanca cDNK se sastojala od pufera za sintezu drugog lanca (Invitrogen, SAD), 0,3 mM dNTP smeše, 2 U RNase H, i 10 U DNK Pol I. Smeša je inkubirana 2,5 h na 16°C i potom prečišćavana korišćena 1,8x AMPure XP magnetnih kuglica (Beckman Coulter, SAD). Nakon popunjavanja krajeva i dodavanja dA repića, ligacija adaptera je izvršena korišćenjem *NEBNext ChIP-Seq Library Prep Master Mix Set for Illumina* kompleta prema uputstvu proizvođača (New England Biolabs, SAD). Ključni korak u pripremi biblioteke za sekvenciranje nove generacije je ligacija adaptera na oba kraja svakog fragmenta RNK. Adapteri su poznate sekvence DNK koje sadrže različite sekvence barkoda nužne za proces sekvenciranja kada se sekvencira istovremeno više uzoraka. U ovom eksperimentu su korišćeni Indeksi 25, 27 i 4 za WT uzorke odnosno Indeksi 6, 7 i 12 za *eml1-2 eml3-4* uzorke. Lizirani fragmenti su izloženi selekciji fragmenata dužine od oko ~300 bp, koja je bila praćena njihovom amplifikacijom PCR metodom (12 ciklusa). Prečišćavanje PCR proizvoda izvršeno je korišćenjem *Agencourt AMPure* magnetnih kuglica prema uputstvu proizvođača (Beckman Coulter, SAD). Kvalitet DNK biblioteka napravljenih za potrebe sekvenciranja dodatno je ispitivan slanjem uslužnoj laboratoriji *OSUCCC Nucleic Acid Shared Resource* (The Ohio State University, SAD) na analizu pomoću *Agilent 2100 Bioanalyzer* sistema (Agilent Technologies, SAD).

### **3.15. Mikroskopija i bojenje histoloških preparata**

#### **3.15.1. Priprema biljnog materijala za svetlosnu i konfokalnu mikroskopiju**

Za analizu embrionalnog razvića, ljuske su sakupljene šest dana nakon oprašivanja i držane u vodi do disekcije. Disekcija je obavljena uz pomoć svetlosnog mikroskopa, korišćenjem igle kojom je pažljivo pravljen rez po uzdužnoj brazdi ljuske da bi došlo do odvajanja semena za analizu. Uzorci za svetlosnu mikroskopiju su analizirani i snimani na svetlosnom *Olympus* mikroskopu sa U-PMTVC kamerom (Olympus, Japan).

Lokalizacija proteina u semenu je analizirana uz pomoć konfokalnog mikroskopa (Nikon Confocal A1+ mikroskop, Japan). Ljuske na različitim stadijumima razvića su

sakupljene, semena disekovana pod svetlosnim mikroskopom, fiksirana u *Vectashield* medijumu (Vectorlabs, SAD) i potom analizirana pod konfokalnim mikroskopom. Zeleni fluorescentno obeleženi protein (eng. *green fluorescent protein* - GFP) je pobuđen svetlošću talasne dužine od 488 nm, a emisija je detektovana na talasnoj dužini od 500 nm. Korišćeni su objektivni 20x, 40x i 100x (sa uljnom imerzijom).

### **3.15.2. Priprema biljnog materijala za diferencijalno interferentnu kontrastnu mikroskopiju (DIC)**

Vid faznokontrastne mikroskopije kojom se naglašava kontrast u transparentnim uzorcima jeste DIC (eng. *Differential Interference Contrast*) mikroskopija. Sistem za ovu mikroskopiju je integralni deo *Andor Revolution WD spinning disk* konfokalnog mikroskopskog sistema *Nikon TiE* (Japan). DIC mikroskopija je korišćena za analizu razvića semena i embriona nakon oplodjenja kao i u odsustvu oplodjenja, u uzorcima *eml1-2 eml3-4* dvostrukog mutanta i odgovarajućeg WT.

Disekcija ljuski sakupljenih šest dana nakon oprašivanja i deset dana nakon demaskulinizacije je obavljena pod svetlosnim mikroskopom. Ljuske su potom fiksirane u rastvoru etanola i sirćetne kiseline (9:1=v/v) preko noći na sobnoj temperaturi. Po završetku fiksacije, uzorci su inkubirani 60 min u rastvoru 90% etanola radi prosvetljavanja tkiva i eliminacije hlorofila, a potom 60 min u rastvoru 70% etanola. Uzorci su nakon toga inkubirani preko noći u Hojerovom rastvoru (Anderson, 1954) Semena su pažljivo prebačena na mikroskopsku pločicu na kojoj se nalazio Hojerov rastvor, prekrivana pokrovnim staklom i analizirana korišćenjem objektivna 20 x i 40 x (sa uljnom imerzijom).

### **3.15.3. Histološka bojenja**

#### **3.15.3.1. Vanilin bojenje**

Materijal za bojenje vanilinom su bili semeni zameci deset dana nakon demaskulinizacije kao i semena šest dana nakon oprašivanja. Uzorci su disekovani pod svetlosnim mikroskopom i potom inkubirani 15 do 30 minuta u 1% rastvoru vanilina (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehid) u 6 N HCl (w/v) (Figueiredo i sar., 2016). Uzorci su

analizirani i snimani na svetlosnom *Olympus* mikroskopu sa U-PMTVC kamerom (Olympus, Japan).

### **3.15.3.2. Bojenje po Aleksanderu i vijabilnost polena**

Za ispitivanje vijabilnosti polena korišćen je Aleksanderov metod (Alexander, 1969). Na predmetno staklo, u kapljicu Aleksanderovog reagensa, lagano je natrešen polen, te je poklopljen pokrovnim staklom. Preparati su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom. Kod vijabilnog polena citoplazma polena se boji crveno, a egzina zeleno, dok se kod nevijabilnog polena sve boji zeleno.

Fluorescentno mikroskopska metoda bojenja anilin plavim, kao fluorohromom, omogućava relativno brzo i realno sagledavanje vijabilnosti i klijavosti polena. Bojena reakcija se zasniva na vezivanju fluorohroma za kalozu ( $\beta$  1- 3 glukan) i sekundarnoj fluorescenciji tog kompleksa pod UV svetlom.

Oprašeni cvetovi, u momentu punog cvetanja, su demaskulinizirani i fiksirani 2 h do 4 h u 250  $\mu$ L 10% sirćetne kiseline, nakon čega je sledila inkubacija preko noći u 1 M NaOH. Tkivo je isprano tri puta kalijum fosfatnim puferom (50 mM KPO<sub>4</sub> pufer, pH 7,5), a potom potopljeno u rastvor anilin plave boje (0,01% anilin plavo u kalijum fosfatnom puferu) u trajanju od 1 h do 2 h. Uzorci su analizirani i snimljeni na fluorescentnom mikroskopu (Olympus, Japan).

### **3.16. Bioinformatička analiza RNK-Seq podataka**

Kompletna RNK-Seq analiza podataka je urađena od strane Benson E. Lindsey III (ABRC, Ohajo, SAD). Nakon sekvenciranja, podaci u FASTQ formatu su obrađeni tako što su uklonjene sekvence adaptera i sekvence krajeva koje nisu zadovoljavale standardne kriterijume, uz korišćenje softvera *Trim Galore*. Zatim su sekvence u *STAR* softver verzije 2.5.2a (Dobin i sar., 2013) upoređene sa *Araport11* genomom, uz maksimalnu veličinu introna od 10 kb. Duplikati sekvenci su uklonjeni uz pomoć *SAMtools* softvera (Li i sar., 2009). Unikatne sekvence koje su pokazivale homologiju sa nekim od gena iz genoma *A. thaliana* su pretvorene u brojeve sekvenci po genu uz pomoć softvera *featureCounts* (Liao i sar., 2013). Analiza diferencijalne ekspresije je rađena pomoću softvera *R package DESeq2* (Love i sar., 2014). Konačna lista od 584

gena sa povišenom ekspresijom u *eml1-2 eml3-4* dvostrukom mutantu je dobijena filtriranjem podataka dobijenih analizom diferencijalne ekspresije za gene sa log2 faktorom razlike  $> 0.6$  (oko 1.5x faktor razlike) i p-vrednošću dobijenom korekcijom uz više ponavljanja  $< 0.05$ .

Geni čiji je nivo ekspresije bio značajno povišen ili snižen u transkriptomu *eml1-2 eml3-4* su upoređeni sa genima čiji je nivo ekspresije bio povišen ili snižen u transkriptomu jedinki sa paternalnim viškom hromozoma (Erilova i sar., 2009), sa genima čiji je nivo ekspresije povišen u *osdl* ukrštanjima (Schatlowski i sar., 2014), i sa sekvencama čija je ekspresija znatno povišena u transkriptomu *mea* mutanta 3 DAP i 6 DAP (Huang i sar., 2017). Sva moguća preklapanja ovih skupova su urađena i statistička značajnost je dobijena korišćenjem *R* paketa i *SuperExactTest* softvera (Wang i sar., 2015). Svim sekvencama dodeljeni su *GO* (*Gene ontology*) termini, uz pomoć *PANTHER* sistema za ontološku klasifikaciju gena i genskih proizvoda.

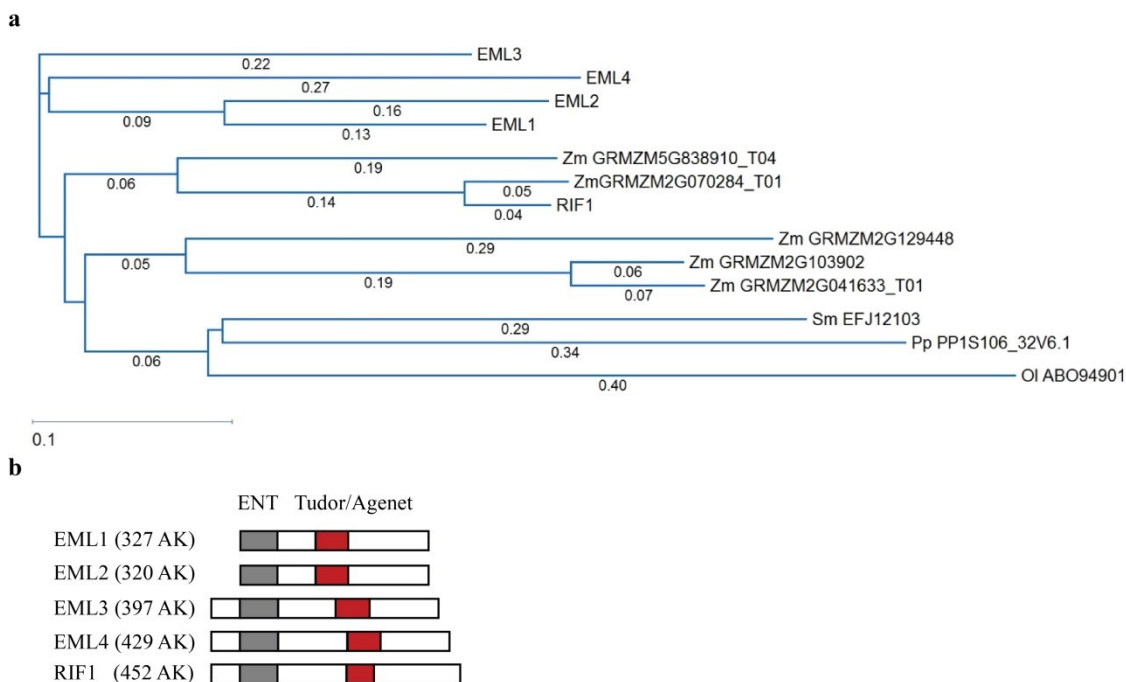
### **3.17. Statistička obrada podataka**

Svi eksperimentalni rezultati dobijeni u ovoj disertaciji predstavljaju srednje vrednosti ponovljenih eksperimentalnih rezultata (u triplikatima). Standardna devijacija (SD) i statistička značajnost je određena neparametrijskim Mann-Whitney U testom u softverskom paketu *MiniTab* (Državni Univerzitet u Pensilvaniji - Pennsylvania State University, SAD). Grafički rezultati urađeni su u softverskom paketu *Excel*.

## 4. Rezultati

### 4.1. Filogenetska analiza ENT-Tudor/Agenet proteina u biljnom svetu

U cilju utvrđivanja stepena evolutivne konzervisanosti EML proteina, analizirane su proteinske sekvence ENT-Tudor/Agenet podgrupe Agenet proteina, poreklom iz različitih biljnih vrsta.



**Slika 10. Filogenetska analiza ENT-Tudor/Agenet proteina u sekvenciranim biljnim genomima. a,** Filogenetsko stablo odabranih EML ortologa i paraloga. Sekvence su analizirane uz pomoć *Clustal Omega/MegAlign Pro* (DNASTAR) programa, a poređenje je prikazano za EML proteine *Arabidopsis thaliana* (EML1-4), RIF1 kukuruza (*Zea mays*, Zm), kao i homologne sekvence iz *Physcomitrella patens* (Pp), *Sellaginella moellendorffii* (Sm), i *Ostreococcus lucimarinus* (Ol). **b,** Strukturna organizacija EML i RIF1 proteina pokazuje prisustvo ENT i Agenet domena.

Dobijeni rezultati su ukazali da su proteini ENT-Tudor/Agenet podgrupe široko rasprostranjeni kod biljaka, tačnije identifikovani su kod 57 biljnih vrsta i predstavljeni 141 različitom proteinskom sekvencom. S obzirom na njihovu brojnost i široku rasprostranjenost, filogenetski odnosi odabranih predstavnika ove podgrupe Agenet proteina najvažnijih evolutivnih klada su prikazani u formi filogenetskog stabla, konstruisanog uz pomoć *Clustal Omega* analize (Slika 10). Filogenetska analiza je potvrdila da *Arabidopsis thaliana* i kukuruz poseduju 4 i 5 paraloga ENT-Tudor/Agenet

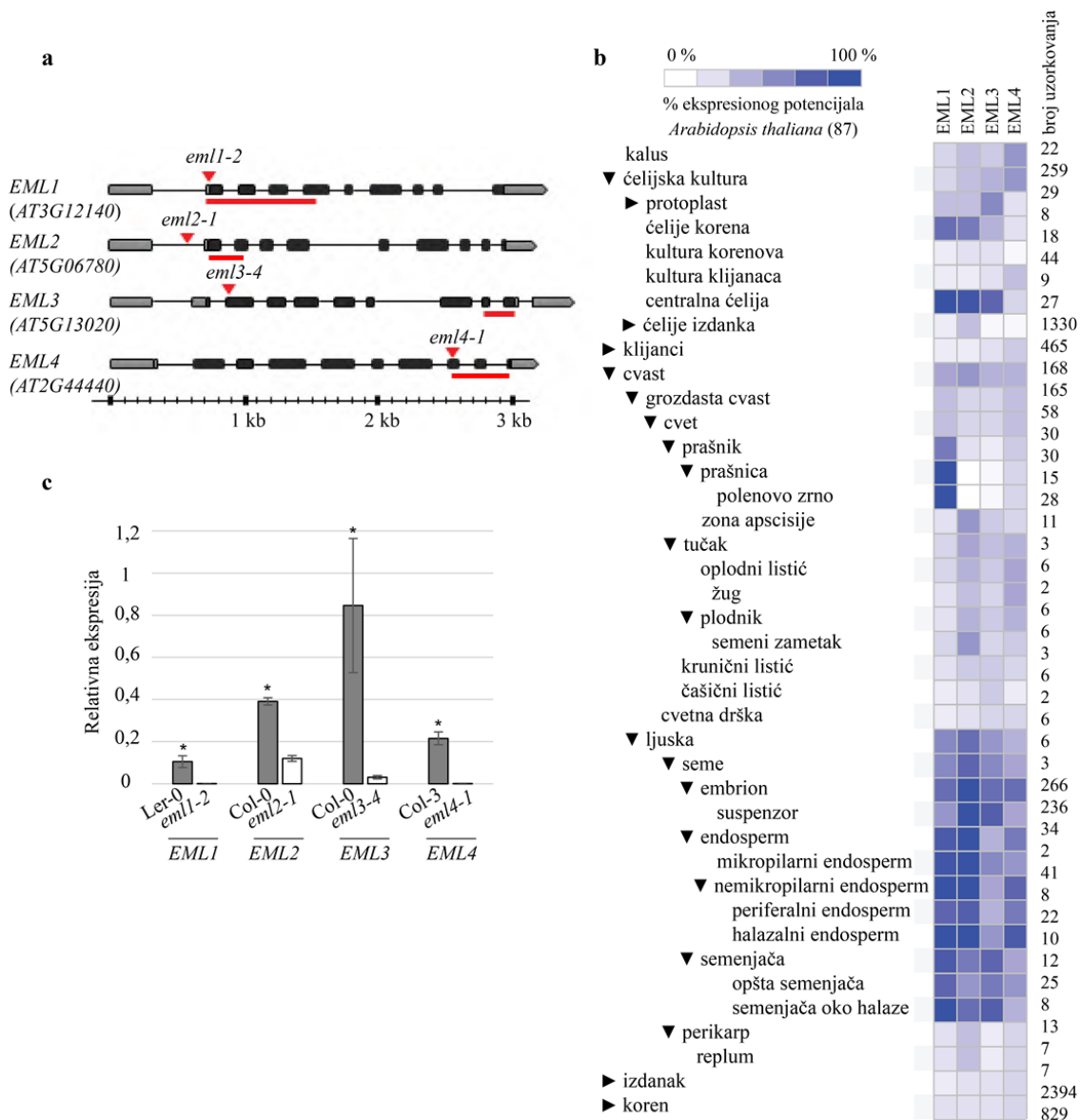


podgrupe (redom) i pokazala da se predstavnici mogu naći ne samo kod evolutivno najstarijih vrsta viših biljaka kao što su mahovine i paprati, već i kod zelenih algi (Slika 10).

Filogenetsko grupisanje proteinskih sekvenci i domena ne mora uvek značiti da srodne sekvence imaju i iste ili slične funkcije. Zbog toga je pristupljeno ispitivanju funkcije EML familije (EML1-4) proteina identifikovanih kod *A. thaliana*, uz pomoć morfoloških i različitih molekularnih i biohemijskih *in vitro* i *in planta* eseja.

#### **4.2. Genotipizacija *eml* mutanata i analiza *EML* ekspresionih profila**

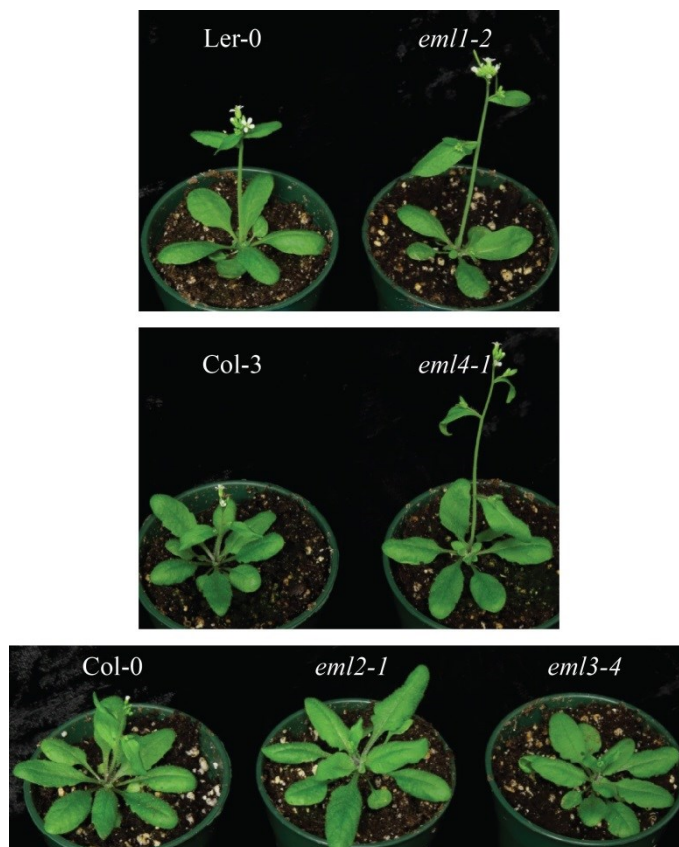
U cilju funkcionalne karakterizacije EML proteina korišćeni su *eml* mutanti koji su ili dobijeni direktno od banke semena *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC, SAD) ili identifikovani genotipizacijom posle segregacije mutantnih ABRC T-DNK ili transpozon insercionih linija. Shematski prikaz T-DNK/transpozon insercionih linija u *EML* genskoj familiji je dat u okviru Slike 11a. Homozigotne mutantne biljke su identifikovane i potvrđene alel-specifičnim PCR-om nakon čega su semena tih biljaka sakupljena i korišćena u daljim eksperimentima. Sekvence prajmera korišćenih u PCR analizi su predstavljene u Tabelama 3 i 4 (poglavlje Materijal i Metode). Pretraživanjem *online* baza podataka ekspresionih profila pokazano je da su sva četiri *EML* gena ekspimirana pre i posle oplodjenja. Nakon oplodjenja ekspresija *EML1-EML4* je detektovana u semenu i to u embrionu, endospermu i semenjači, dok je pre oplodjenja bila uočena u polenu i semenom zametku (Slika 11b). Korišćenjem cDNK izolovane iz *eml1-4*, *eml2-1*, *eml3-2* i *eml4-1* mutanata, kao i njihovih odgovarajućih WT, RT-qPCR analiza je pokazala da transkripti *EML* gena u mutantnim jedinkama ili nisu detektovani, ili su bili prisutni u veoma maloj količini u odnosu na WT, čime je pokazano da su ovi mutanti *knock-out* ili *knock-down* mutanti (Slika 11c).



**Slika 11. Ekspresiona analiza *EML* gena u različitim tkivima, kao i u *eml1-2*, *eml2-1*, *eml3-4* i *eml4-1* mutantima. a**, Shematski prikaz T-DNK/transpozonskih insercija (obeležene trouglovima) u okviru *EML* genske familije. Crvene linije predstavljaju amplikone koji su korišćeni za testiranje *EML* ekspresije u mutantnim biljkama. Tamno sivi pravougaonici predstavljaju egzone, svetlo sivi pravougaonici su UTR netranslirajući regioni, dok crne linije oznaćavaju introne. **b**, Ekspresija *EML* gena u različitim tkivima (*Genevestigator*). **c**, RT-qPCR analiza *EML1*, *EML2*, *EML3* i *EML4* gena u ljuskama WT i mutantnih jedinki. Vrednosti relativne ekspresije su prikazane kao srednja vrednost 3 nezavisna ponavljanja  $\pm$  standardna devijacija. Vrednosti su normalizovane vrednostima ekspresije za *PP2A* (*At1g13320*) gen koji je služio kao kontrola. Statistićki znaćajna razlika izmeću mutanata i njihovih odgovarajućih WT je prikazana zvezdicom ( $P < 0.05$ , Mann-Whitney U test).

### 4.3. Fenotipska analiza *eml* mutanata

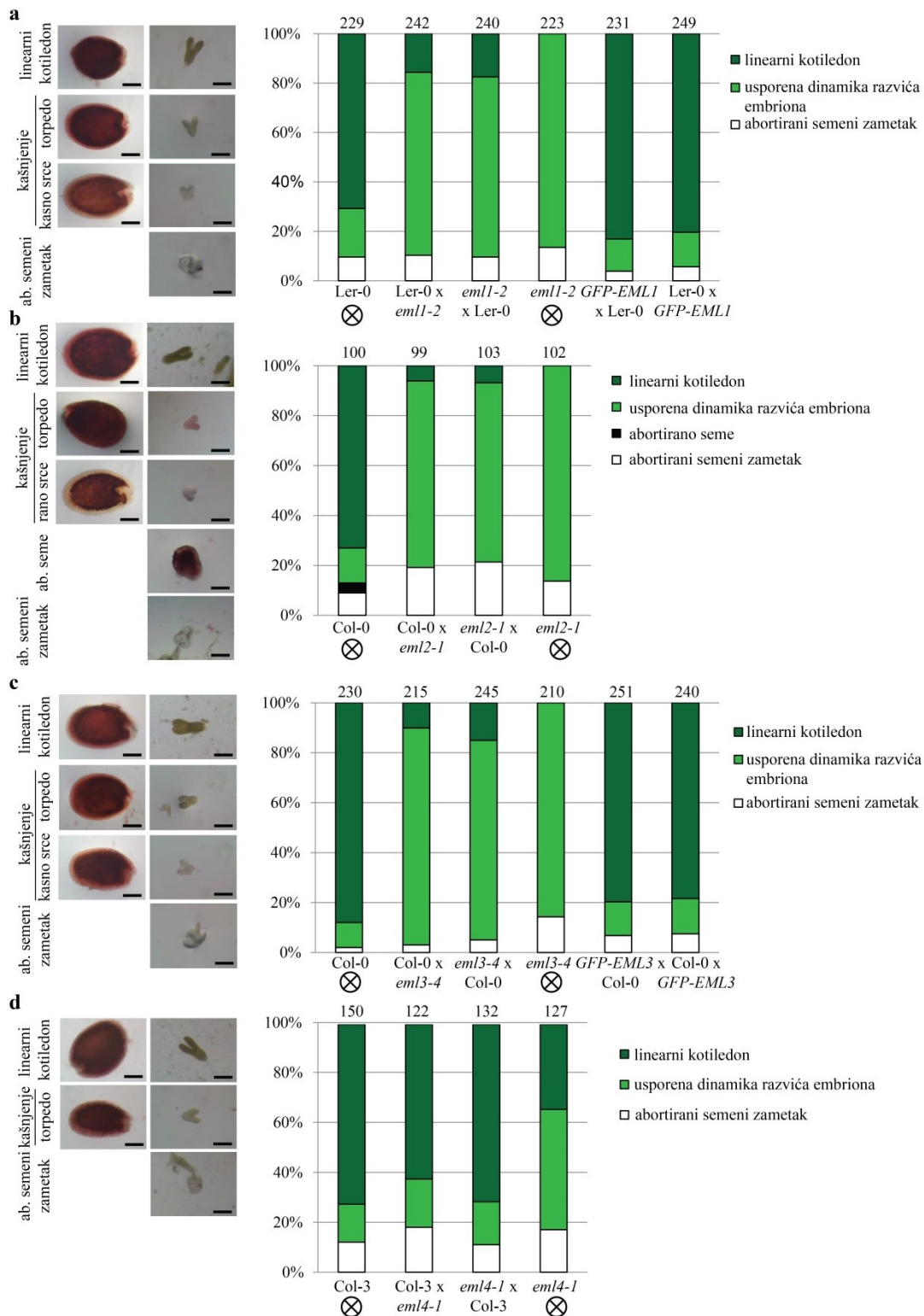
Razlike u vegetativnom razviću *eml* mutanata u odnosu na njihove odgovarajuće WT nisu uočene, kao što je i očekivano na osnovu ekspresionog profila ovih gena iz baze podataka (Slika 12). Međutim, zapaženo je da postoje razlike u razviću semena i u embrionalnom razviću mutanata u odnosu na WT (Slika 13).



**Slika 12. Fenotipska analiza *eml* mutanata.** Uporedni pregled vegetativnih karakteristika mutantnih jedinki starih 35 dana i njihovih odgovarajućih WT.

U cilju detaljne analize reproduktivnog razvića mutanata, *eml* mutanti su ili recipročno ukršteni sa odgovarajućim WT ili je izvršeno njihovo ručno oprašivanje. Tok razvića semena je praćen tokom 5., 6., 7., i 8. dana nakon oprašivanja (DAP), što odgovara sledećim stupnjevima embrionalnog razvića: torpedo, linearni kotiledon, savijeni kotiledon i zreli embrion. Primećeno je da embrionalno razviće mutanata zaostaje za WT sve do 7 DAP. S obzirom na to da se fenotip mogao uočiti u svim prethodnim fazama razvića, prikazan je efekat mutacija u *EML* genima na razviće semena 6 DAP. U cilju razlikovanja neoplođenih semenih zametaka od semena kao i za poređenja

razvojnih stadijuma semena i embriona korišćena je metoda bojenja vanilinom uz disekciju embriona. Bojenje vanilinom se zasniva na sposobnosti vanilina da reaguje sa proantocijanidinima koji se sintetišu u semenjači pri čemu nastaje braon-crvena boja. S obzirom da se semenjača razvija samo nakon oplodjenja, crvenkasta boja nastala nakon bojenja služi kao siguran pokazatelj da je do oplodjenja došlo i da analizirana struktura predstavlja seme, a ne neoplođeni semeni zametak (Roszak i Köhler, 2011). Na osnovu bojenja vanilinom ustanovljeno je da izvestan procenat (2-20%) semenih zametaka ostaje neoplođen kod svih mutantnih genotipova, što dovodi do potpunog prekida njihovog razvića (abortiranja) (Slika 13). Jedino *eml3-4* mutant pokazuje statistički značajno povišen procenat abortiranih semenih zametaka u poređenju sa WT, kao i sa jedinkama nastalim iz recipročnih ukrštanja sa WT (Slika 13c, Prilog 1). Ovaj efekat je nešto manje značajan, ali ipak prisutan i kod *eml2-1* (Slika 13b, Prilog 1). Disekcijom embriona nakon bojenja je pokazano da nakon ukrštanja *eml* mutanti ispoljavaju fenotip koji se odlikuje usporenom dinamikom razvića embriona, u odnosu na njihove WT. Dok Ler-0 embrioni imaju razvijene kotiledone 6 DAP, embrioni *eml1-2* mutanata se 6 DAP nalaze tek na stadijumu kasnog srca odnosno na torpedo stadijumu (Slika 13a). Takođe, većina embriona disekovanih iz homozigotnih *eml2-1*, *eml3-4* i *eml4-1* semena pokazuje kašnjenje u procesu razvića u poređenju sa WT semenima. F1 semena nastala recipročnim ukrštanjima *eml1-2*, *eml2-1* i *eml3-4* sa njihovim odgovarajućim WT, takođe pokazuju kašnjenje, ali nešto manjeg stepena od homozigotnih mutanata (Slika 13). Ovaj rezultat sugeriše da efekat EML proteina zavisi od doze, bar kada je u pitanju fenotip koji se odlikuje usporenom dinamikom razvića embriona. Rezultati analize reproduktivnog razvića *eml* mutanata ukazuju na učešće EML proteina u procesima oplodjenja i embrionalnog razvića. Biljke kojima su *EML1* i *EML3* geni mutirani pokazuju relativno blag fenotip tokom reproduktivnog razvića (Slika 13), te je jedan od glavnih ciljeva ove teze bio proučavanje uloge i interakcije ova dva gena, dok će funkcionalna analiza na osnovu kombinacija ostalih *EML* mutanata predstavljati predmet budućih istraživanja.



**Slika 13. Mutacije u *EML* genima dovode do fenotipa koji se odlikuje usporenom dinamikom razvića embriona.** Homozigotni *eml* mutanti i njihovi odgovarajući WT su oprašivani ručno. Dobijena F1 semena su šest dana nakon oprašivanja tretirana rastvorom vanilina u cilju razlikovanja semena od neoplođenih (abortiranih) semenih zametaka.

Grafikoni predstavljaju analizu različitih kategorija semena/semenih zametaka na osnovu njihove faze razvića i odnose se na *eml1-2* (a), *eml2-1* (b), *eml3-4* (c) i *eml4-1* (d). Semena su klasifikovana u sledeće kategorije: usporena dinamika razvića embriona (rano srce, kasno srce, torpedo), linearni kotiledon i abortirano seme. Brojevi na grafiku predstavljaju ukupan broj analiziranih semena tj. semenih zametaka. Panel a dodatno prikazuje rezultat eseja komplementacije *pEML1::GFP-EML1* transgene linije (označene sa GFP-EML1) koja je recipročno ukrštena sa Ler-0. Panel c dodatno prikazuje rezultat eseja komplementacije *pEML3::GFP-EML3* transgene linije (označene sa GFP-EML3) koja je recipročno ukrštena sa Col-0. Skala: 100 µm. Simbol X označava oznaku za samooprašivanje odnosno ručno oprašivanje biljaka istog genotipa.

U cilju određivanja tipa nasleđivanja fenotipa uočenog kod biljaka kod kojih je mutiran *EML1* ili *EML3* gen, heterozigotne *eml1-2* i *eml3-4* biljke su ukrštene sa njihovim odgovarajućim WT i praćeno je razviće embriona 6 DAP. Nezavisno od porekla mutantnog alela tj. od toga da li je mutantni alel bio nasleđen od majke ili oca, u oko 50% novonastalih semena uočena je usporena dinamika u razviću embriona (Tabela 7). Zapažena segregacija mutantnog alela se nije razlikovala od očekivane segregacije za stopu gametofitnog nasleđivanja ( $P = 0.2$  za *EML1 eml1-2* x Ler-0;  $P = 0.4$  za *EML3 eml3-4* x Col-0, One-way ANOVA praćena Fisher's LSD testom). Na osnovu ove segregacije je zaključeno da se mutantni alel nasleđuje dominantno ili da ima gametofitni efekat, što govori o tome da su *EML1* i *EML3* haploinsuficijentni geni, odnosno da kod mutantnih biljaka jedan preostali normalni, nemutirani alel *EML1* tj. *EML3* gena nije dovoljan da omogući normalno razviće embriona.

Tabela 7. Nasleđivanje fenotipa koji se odlikuje usporenom dinamikom razvića embriona

Genotip	Kašnjenje u razviću embriona (n)	Normalno razviće embriona (n)	Ukupan broj (n)
<i>EML1 eml1-2</i> x <i>EML1 EML1</i>	47% (106)	53% (120)	226
<i>EML3 eml3-4</i> x <i>EML3 EML3</i>	48% (97)	52% (105)	202

### 4.3.1. Komplementaciona analiza uz pomoć transgenih EML biljaka

#### 4.3.1.1. Komplementacija EML1 funkcije

U eksperimentima gde su mutantne homozigotne biljke ukrštene sa WT, nastala heterozigotna semena su pokazivala fenotip koji se odlikuje usporenom dinamikom

razvića embriona nezavisno od toga da li je mutantni alel bio nasleđen od majke ili oca (Slika 13). U cilju utvrđivanja da li mutacija u *EML1* zaista dovodi do pojave uočenog fenotipa, urađen je esej komplementacije *EML1* gena. Kloniran je *EML1* mini genski konstrukt čija se genska kasetna sastojala od *EML1* nativnog promotora (sekvenca koja se nalazi 1349 bp uzvodno od ATG start kodona i sastoji se od 5' UTR netranslirajućeg regiona (eng. *5' untranslated region*) i introna), *GFP* reporterskog gena i *EML1* kodirajuće sekvence (*pEML1::GFP-EML1*). Ovaj konstrukt je upotrebljen za transformaciju *eml1-2* mutantne biljke i homozigotni transformanti (nazvani skraćeno GFP-EML1) su identifikovani u T3 generaciji. Analiza razvića semena nastalih recipročnim ukrštanjem GFP-EML1 transgenih biljaka i Ler-0 pokazala je da se njihovo embrionalno razviće nije razlikovalo od embriona WT biljaka, bez obzira na smer ukrštanja, što ukazuje na zaključak da je mutacija u *EML1* genu odgovorna za pojavu mutantnog fenotipa (Slika 13a).

#### **4.3.1.2. Komplementacija EML3 funkcije**

Za esej komplementacije gena, uklonirana je *EML3* sekvenca gena pune dužine u vektor za ekspresiju u biljkama, pGWB6. Strategija konstruisanja *EML3* mini gena je detaljno opisana u poglavlju Materijal i Metode. Mini gen *EML3* je transformisan u *eml3-4* mutantne biljke i homozigotni transformanti (nazvani skraćeno GFP-EML3) su identifikovani u T3 generaciji. Analizom embriona F1 generacije semena, nastalih recipročnim ukrštanjem GFP-EML3 transgenih biljaka i Col-0, nije uočena razlika između WT i transgenih uzoraka bez obzira na smer ukrštanja, što potvrđuje da je mutacija u *EML3* genu odgovorna za pojavu fenotipa uočenog u *eml3-4* mutantu (Slika 13c).

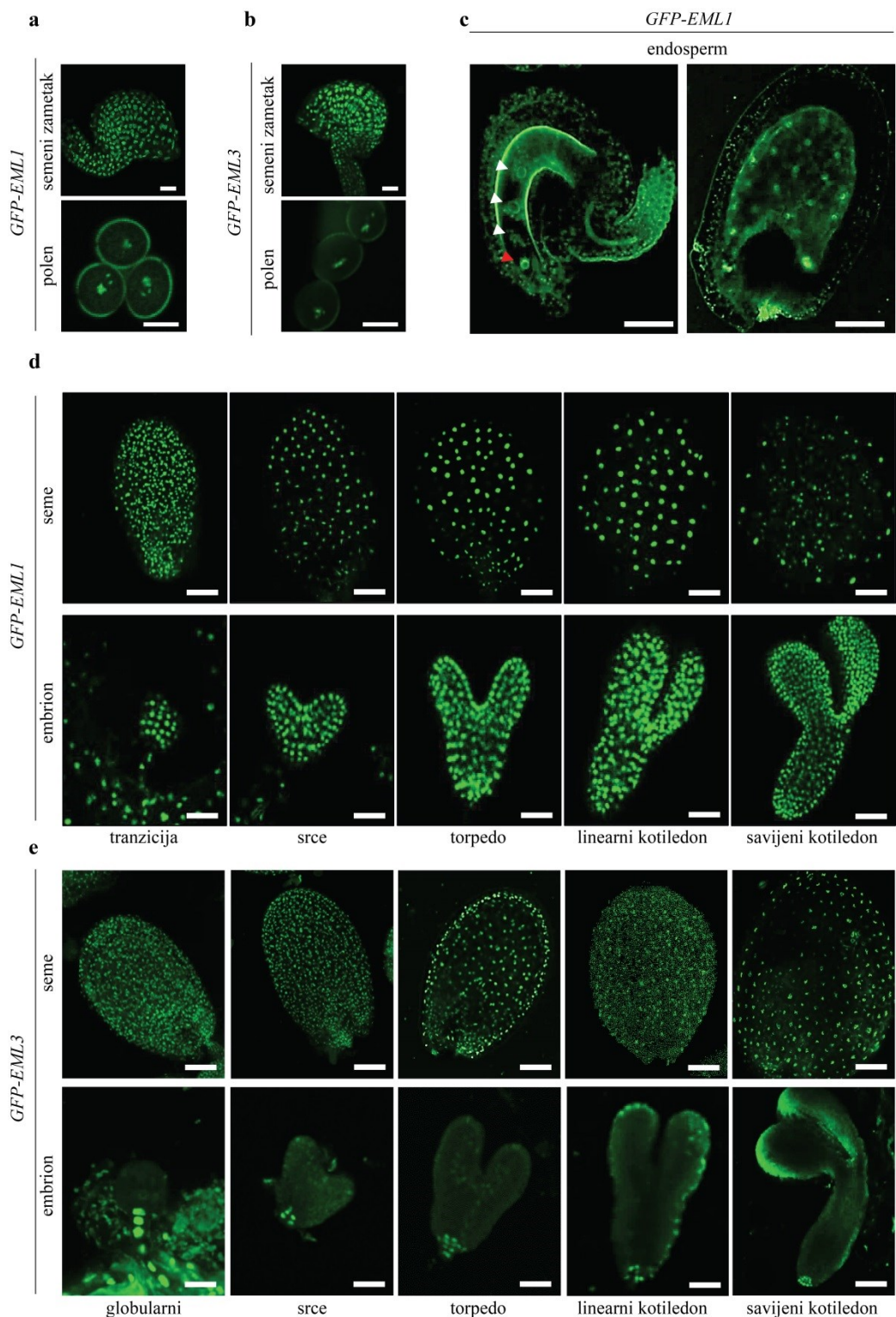
#### **4.4. Lokalizacija EML proteina**

Za lokalizovanje EML1 i EML3 proteina korišćene su GFP-EML1 i GFP-EML3 transgene biljke. Analiziranjem razvića semena konfokalnom mikroskopijom utvrđeno je da je EML1 eksprimiran pre oplođenja, i to u semenom zametku i u polenu. Signal GFP-EML1 proteinske fuzije uočen je kako u vegetativnom jedru tako i u generativnim jedrima polenovog zrna (Slika 14a). Posle oplođenja, GFP-EML1 signal je bio uočen tokom celokupnog razvića semena, i to u semenjači i u embrionu (Slika 14d). Takođe,

prisustvo EML1 je pokazano i u endospermu tokom ranih faza razvića semena (2. i 3. dan nakon oplodjenja) (Slika 14c).

Analizom transgenih GFP-EML3 biljaka utvrđeno je da EML3 ima sličnu lokalizaciju kao EML1 protein. Pre oplodjenja, prisustvo EML3 je uočeno i u semenom zametku i u polenu, s tom razlikom što je EML3 signal u polenu znatno slabiji od signala uočenog za EML1 (Slika 14b). Nakon oplodjenja, EML3 se uočava u semenjači tokom čitavog razvića, u apikalnom meristemu korena, kao i u suspenzoru embriona (Slika 14e). Lokalizacija oba proteina u semenima nastalim u recipročnim ukrštanjima EML1 i EML3 transgenih biljaka i njihovih odgovarajućih WT biljaka bila je nezavisna od toga da li je transgen poticao od majke ili od oca, što je pokazano na Slici 15a i 15b. Na osnovu lokalizacije EML1 i EML3 zaključeno je da oba proteina imaju gametofitnu funkciju, odnosno ulogu u procesima koji prethode oplodjenju. Prisustvo oba proteina u različitim tkivima tokom razvića semena navodi na zaključak da se njihova uloga nastavlja i nakon oplodjenja, sa zajedničkom ulogom u embrionu i semenjači, i izraženijom ulogom EML1 u endospermu.



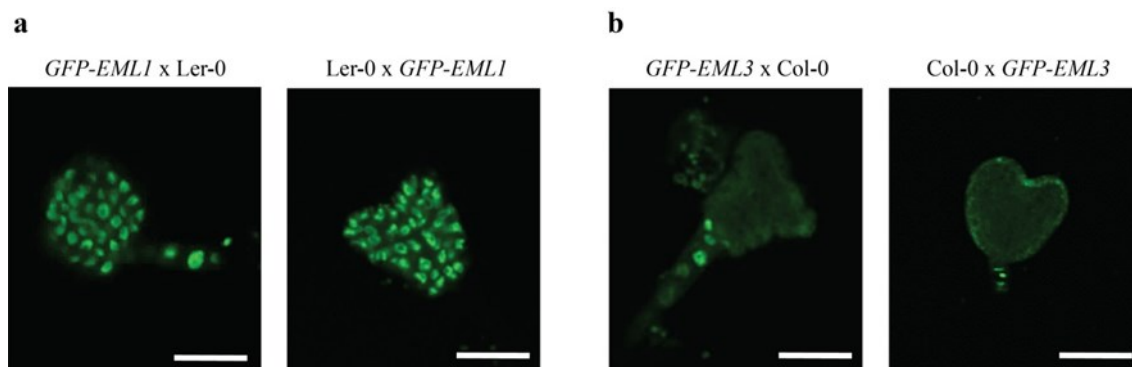


**Slika 14.** Lokalizacija EML1 i EML3 u semenom zametku, polenovom zrnu i semenu. **a**, Konfokalne fotomikrografije lokalizacije EML1 proteina u polenu i semenim zamecima *GFP-EML1* homozigotnih transgenih biljaka. Skala: 20  $\mu\text{m}$ . **b**, Konfokalne fotomikrografije lokalizacije EML3 proteina u polenu i semenim zamecima *GFP-EML3* homozigotnih transgenih biljaka. Skala: 20  $\mu\text{m}$ . **c**, Lokalizacija EML1 u endospermu semena u razviću. Semena su dobijena ukrštanjem *GFP-EML1* muškog roditelja i Ler-0

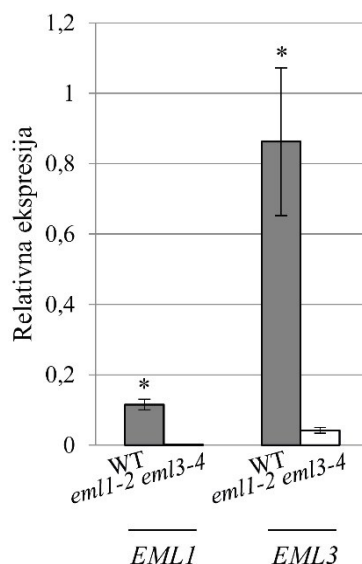
ženskog roditelja kako bi se izbegla maternalna ekspresija GFP-EML1 u semenjači, koja čini lokalizovanje GFP-EML1 u endospermu tehnički neizvodljivim. Ekspresija GFP-EML1 u endospermu je uočena na stadijumu 2 DAP (levo) i 3 DAP (desno). Jedra u endospermu su obeležena belom strelicom, dok je jedro embriona označeno crvenom strelicom. Skala: 100  $\mu$ m. **d**, Konfokalne fotomikrografije lokalizacije EML1 proteina u semenima u razviću i embrionima *GFP-EML1* homozigotnih transgenih biljaka. Gornji paneli pokazuju ekspresiju u semenjači, dok donji predstavljaju ekspresiju u embrionu. Skala: 100  $\mu$ m (gornji paneli), 50  $\mu$ m (donji paneli). **e**, Konfokalne fotomikrografije EML3 lokalizacije u semenima u razviću i embrionima *GFP-EML3* homozigotnih transgenih biljaka. Gornji paneli pokazuju ekspresiju u semenjači, dok donji predstavljaju ekspresiju u embrionu. Skala: 100  $\mu$ m (gornji paneli), 50  $\mu$ m (donji paneli).

#### **4.5. Genetička i fenotipska analiza *eml1-2 eml3-4* dvostrukog mutanta nakon oplodjenja**

Rezultati eksperimenata heterologne ekspresije *EML* gena u kvascima, koji su urađeni u laboratoriji dr Erich Grotewold-a (Državni Univerzitet u Ohaju – *The Ohio State University*, SAD), su pokazali da su EML1 i EML3 proteini sposobni da formiraju homo- i heterodimere u *Saccharomyces cerevisiae* (rezultati nisu ovde predstavljeni). Naime, sličan ekspresioni obrazac *EML1* i *EML3* gena (Slika 11b), kao i obrazac lokalizacije proteina (Slika 14), potom fenotip koji ispoljavaju odgovarajući mutanti (Slika 13), i njihova međusobna interakcija u kvascima, navodi na zaključak da postoji interakcija između ovih gena. Kako bi se ova hipoteza testirala, konstruisan je *eml1-2 eml3-4* dvostruki mutant i urađena su recipročna ukrštanja ovog mutanta sa odgovarajućim WT, koji je prethodno identifikovan iz iste F2 segregirajuće populacije. Kako *eml1-2* i *eml3-4* mutanti imaju različitu genetičku pozadinu (eng. *background*), *eml1-2 eml3-4* dvostruki mutant u svojoj pozadini ima pomešane genome Ler-0 and Col-0 laboratorijskih sojeva. Radi adekvatnog poređenja, WT je takođe izolovan iz iste F2 generacije i predstavlja Col-0/Ler-0 hibrid. Korišćenjem cDNK izolovane iz *eml1-2 eml3-4* mutanata, kao i njihovih odgovarajućih WT, RT-qPCR analiza je pokazala da transkripti *EML1* i *EML3* gena u mutantnim jedinkama ili nisu detektovani, ili su bili prisutni u veoma maloj količini u odnosu na WT (Slika 16).



Slika 15. EML1 i EML3 su lokalizovani u embrionu nezavisno od roditeljskog porekla transgena. a, EML1 je eksprimiran u embrionu F1 semena nastalih u recipročnim ukrštanjima GFP-EML1 i njegovog odgovarajućeg WT. Skala: 50  $\mu$ m. b, EML3 je eksprimiran u embrionu F1 semena nastalih u recipročnim ukrštanjima GFP-EML3 i njegovog odgovarajućeg WT. Skala: 50  $\mu$ m.



**Slika 16. Ekspresiona analiza EML gena u dvostrukom *em11-2 em13-4* mutantu.** RT-qPCR analiza EML1 i EML3 gena u ljuskama WT i mutantnih jedinki. Vrednosti relativne ekspresije su prikazane kao srednja vrednost 3 nezavisna ponavljanja  $\pm$  standardna devijacija. Vrednosti su normalizovane vrednostima ekspresije za *PP2A* (*At1g13320*) gen koji je služio kao kontrola. Statistički značajna razlika između mutanata i njihovih odgovarajućih WT je prikazana zvezdicom ( $P < 0.05$ , Mann-Whitney U test).

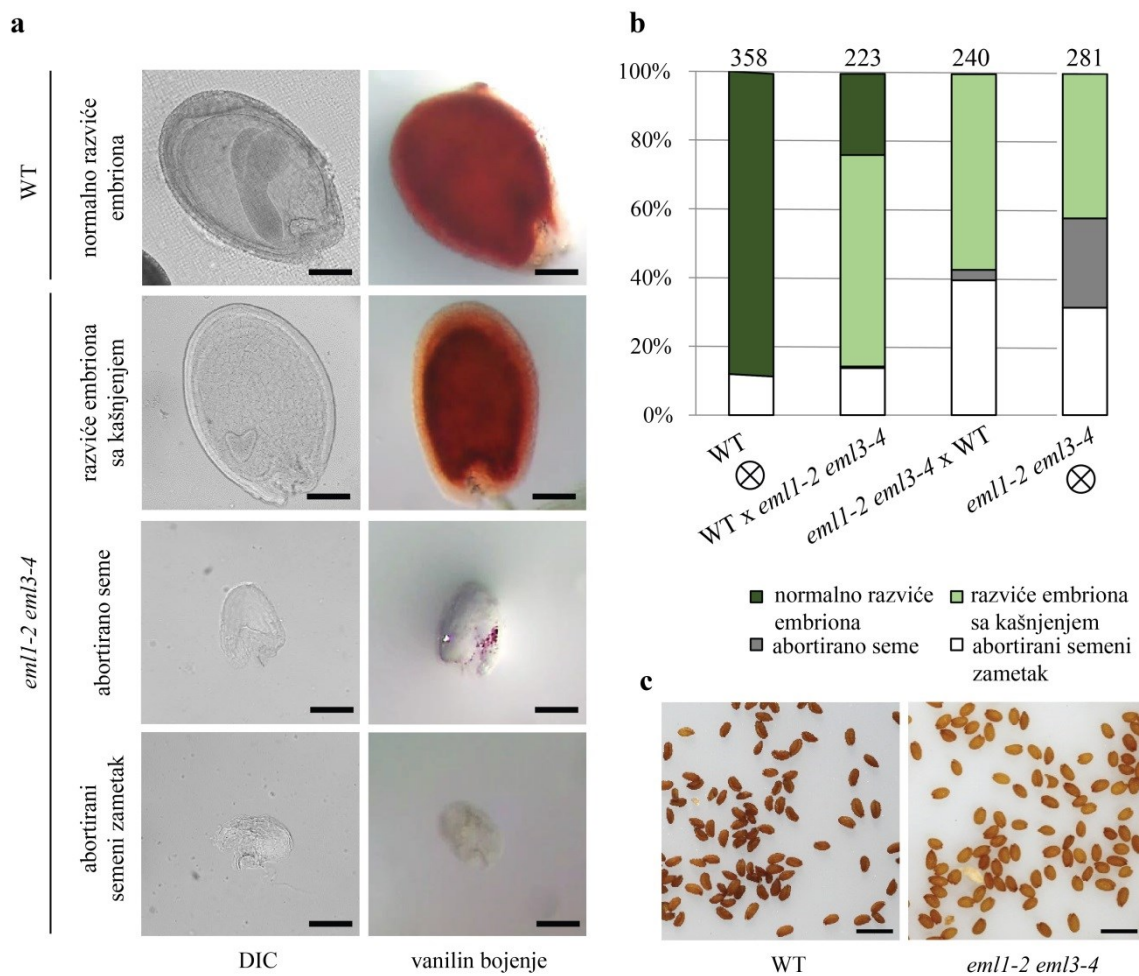
Semena dvostrukog mutanta, analizirana disekcijom embriona i vanilin bojenjem na stupnju 6 DAP nakon samoukrštanja, odlikovala su se dodatnim poremećajima u razviću semena u odnosu na pojedinačne *em11-2* i *em13-4* mutante. Dok su se kod oko 90% WT semena embrioni nalazili na stupnju linearni kotiledon, u ljuskama homozigotnog dvostrukog mutanta uočena su tri tipa poremećaja u reproduktivnom

razviću: prekid razvića semenih zametaka (abortiranje), potpuni prekid razvića semena (abortirana semena) i usporena dinamika razvića embriona. Abortirani semeni zameci, koji se karakterišu malim dimenzijama rasta i odsustvom reakcije nakon vanilin bojenja, čine 32% od ukupnog broja izbrojanih semenih zametaka, struktura nalik semenima i semena. Preostalih 68% izbrojanih struktura je pokazalo prisustvo semenjače nakon vanilin bojenja i zbog toga su klasifikovane kao semena. Oko 40% ovih semena karakterisale su mala dimenzija i minimalno bojenje vanilinom, kao i prekid razvića semena ubrzo nakon oplodjenja. Preostala semena u ljuskama dvostrukog mutanta su bila normalnih dimenzija i intenzivno obojena vanilinom, ali je nakon disekcije uočeno da razviće embriona kasni u odnosu na WT semena. Dok je razviće embriona kod WT bilo sinhronizovano i na stupnju linearnog kotiledona, dvostruki homozigotni *eml1-2 eml3-4* mutant se 6 DAP uglavnom nalazio na stadijumu srcolikog embriona (Slika 17a i b, Prilog 1). Uprkos ovom početnom kašnjenju, ova semena dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta su pokazala sposobnost da nastave proces razvića sve do stupnja zrelog semena. Iako su se zrela semena dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta razlikovala od WT semena na osnovu svetlije boje i neznatno uvećane veličine, njihov procenat klijanja od oko 90% nije se značajno razlikovao od WT, na osnovu čega je zaključeno da je 40% homozigotnih semena dvostrukog mutanta vijabilno (Slika 17c).

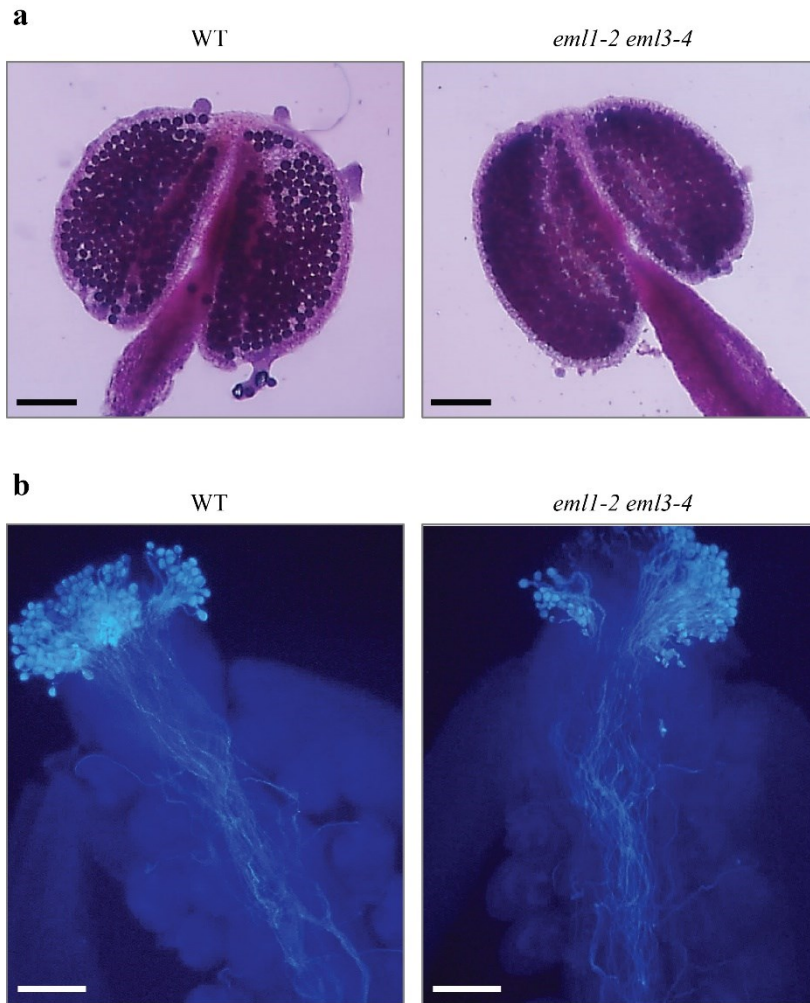
Pored analize samooprašenih cvetova dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta, urađena je i analiza semena nastalih u recipročnim ukrštanjima dvostrukog mutanta i njihovog WT. Na Slici 17 i u Tabeli P1 moguće je uočiti postojanje statistički značajne razlike u broju abortiranih semenih zametaka u ljuskama koje nastaju u ukrštanjima gde je dvostruki *eml1-2 eml3-4* mutant korišćen kao ženski roditelj (32-40%), u odnosu na ukrštanja gde su za ženskog roditelja korišćeni cvetovi WT, što se može objasniti postojanjem sinergističkog maternalnog efekta između dva gena koji je neophodan za sprečavanje potpunog prekida razvića semenih zametaka pre oplodjenja. Slika 17 takođe pokazuje da je zastupljenost semena sa potpunim prekidom razvića kod homozigotnog dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta iznosi 26%, dok kod heterozigotnih biljaka koja nastaju u recipročnim ukrštanjima dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta i njegovog WT potpuni prekid razvića semena gotovo i nije prisutan. Ovaj fenotip nije uočen nakon disekcije ljuski *eml1-2* ili *eml3-4* mutanata, što takođe ukazuje na postojanje sinergizma između *EML1* i *EML3*. U svakom tipu recipročnog ukrštanja postojalo je oko 60% semena kod

kojih je razviće embriona pokazivalo fenotip koji se odlikuje usporenom dinamikom razvića embriona, što je statistički značajno u odnosu na analizirana semena samooprašenog dvostrukog mutanta. Ovaj fenotip takođe pokazuje zavisnost od doze EML proteina, što je zaključeno na osnovu prisustva embriona na stadijumu srca i torpeda kod heterozigotnih jedinki dobijenih ukrštanjem dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta sa WT, dok se kod homozigotnog dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta 6 DAP nalaze isključivo na stadijumu srca (Slika 17).

Kako svi uočeni razvojni poremećaji (potpuni prekid razvića semenih zametaka, potpuni prekid razvića semena, usporena dinamika razvića embriona) nisu potpuno penetrabilni, može se zaključiti da istovremena mutacija *EML1* i *EML3* dovodi do složenog fenotipa u semenu. Takođe, na osnovu poređenja fenotipa semena dvostrukog mutanta u homozigotnom i heterozigotnom stanju, može se pretpostaviti da usporena dinamika razvića embriona predstavlja blaži fenotip od fenotipa abortiranog semena jer usporena dinamika razvića embriona nastaje kada su *EML1* i *EML3* aleli mutirani samo u jednom roditelju, dok potpuni prekid razvića semena zahteva da oba alela budu mutirana kod oba roditelja. Da bi se ispitala mogućnost da kod ukrštanja gde je korišćen mutantni polen poremećaji u razviću semena nastaju zbog poremećaja u vijabilnosti ili klijanju polena, polen dvostrukog mutanta je testiran korišćenjem Aleksanderovog reagensa i eseja za *in vivo* klijanje polena (Slika 18). Rezultati obe analize su pokazali da je polen dvostrukog mutanta vijabilan i da se njegovo klijanje odvija nesmetano, na osnovu čega je zaključeno da se uočeni defekti koji nastaju tokom razvića semena pojavljuju nakon procesa oplodjenja. Fenotipska analiza *eml1-2 eml3-4* dvostrukog mutanta sveukupno ukazuje na dve različite funkcije EML proteina: ulogu u semenom zametku od koje zavisi uspešno oplodjenje i ulogu nakon oplodjenja koja zavisi od doze, što nije neobično za epigenetičke regulatore i biće detaljnije objašnjeno u poglavlju Diskusija.



**Slika 17. EML1 i EML3 regulišu razviće semena nakon oplodjenja.** **a**, dvostruki *eml1-2 eml3-4* mutant je bio samooprašen ili recipročno ukršten sa odgovarajućim WT i dobijena semena su upoređena sa semenima samooprašenog WT 6 DAP. Nakon disekcije semena u dobijenim ljuskama, semeni zameci/semena su podvrgnuti bojenju vanilin rastvorom nakon čega su klasifikovani na abortirane semene zametke, abortirana semena kao i semena koja pokazuju ili fenotip koji se odlikuje usporenom dinamikom razvića embriona (srce i/ili torpedo stadijum) ili normalno razviće embriona (linearni kotiledon). Definisane kategorije su analizirane i DIC mikroskopijom. Skala: 100  $\mu$ m. **b**, Analiza i procentualna zastupljenost semernih zametaka/semena 6 DAP prema kategorizaciji prikazanoj pod **a**. Brojevi na vrhu grafikona predstavljaju ukupan broj analiziranih semena. Podaci predstavljaju srednju vrednost od ukupno 8 do 10 analiziranih ljuski za svaki genotip. **c**, zrela semena dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta i odgovarajućeg WT. Skala: 1 mm.

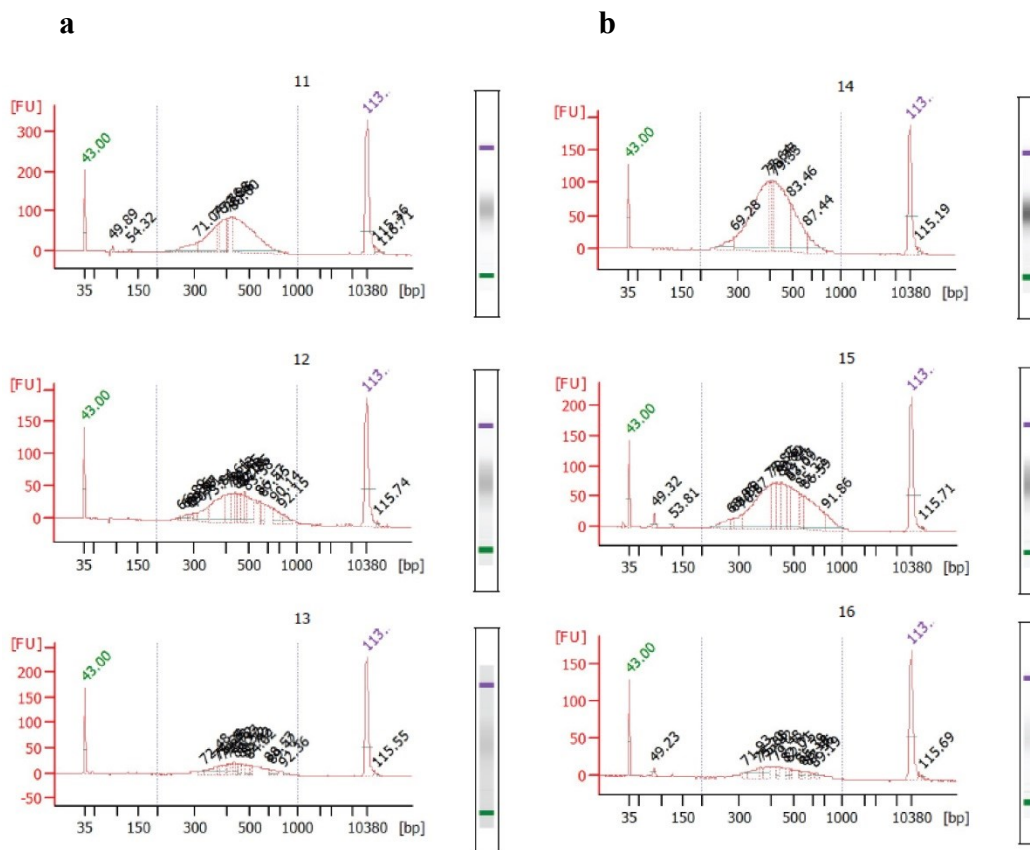


**Slika 18. Vijabilnost i klijanje polenovih zrna nisu promjenjeni kod *eml1-2 eml3-4*.** **a,** WT i *eml1-2 eml3-4* zrela polenova zrna su bojena Aleksanderovim rastvorom radi provjere vijabilnosti. Crveno/ljubičasta boja je pokazatelj da je polenovo zrno vijabilno. Skala: 100  $\mu\text{m}$ . **b,** *In vivo* klijanje polenovog zrna i razvoj polenove cevi WT i *eml1-2 eml3-4* je uočeno metodom bojenja anilin plavim. Skala: 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.6. Analiza transkriptoma *eml1-2 eml3-4* mutanta

U cilju identifikacije ciljnih gena čija je ekspresija pod kontrolom EML1 i EML3, urađena je analiza transkriptoma, metodom RNK-Seq. Kao što je pretpostavljeno, sekvenciranje transkriptoma dvostrukog mutanta *eml1-2 eml3-4* je pružilo veliku količinu informacija o ciljnim genima transkribovanim u semenu *A. thaliana*. Korišćenjem HiSeq 4000 (Illumina, San Diego, USA), i iRNK izolovane iz mutanta i iz WT, dobijene su sparane sekvence dužine 150 bp koje su odgovarale broju od 37336

gena genoma *A. thaliana*. Ovi podaci su zatim analizirani serijom softverskih paketa koji su opisani u poglavlju Materijal i Metode, kako bi se dobila konačna lista gena koji su diferencijalno eksprimirani u mutantu u poređenju sa WT. Podaci su javno dostupni preko NCBI GEO [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>] pod brojem GSE113847.



**Slika 19. Analiza kvaliteta biblioteka pripremljenih za sekvenciranje sledeće generacije dobijene pomoću sistema *Agilent 2100 Bioanalyzer*.** a, Elektroferogrami tri biološka ponavljanja uzoraka izolovanih iz semena dvostrukog mutanta i sintetička slika gela koja prikazuje uzorke organske pozicijama markera. b, Elektroferogrami tri biološka ponavljanja WT i sintetička slika gela koja prikazuje pozicije markera. X osa označava dužinu fragmenata u nukleotidima, dok Y osa označava intenzitet fluorescencije.

Biblioteke su konstruisane korišćenjem iRNK izolovane iz ljuski 1-5 DAP tri nezavisna uzorka dvostrukog mutanta *eml1-2 eml3-4* i tri uzorka WT. Procena kvaliteta konstruisanih biblioteka izvršena je analizom pomoću *Agilent 2100 Bioanalyzer* sistema (Agilent Technologies, SAD). Analiza je pokazala da je kvalitet testiranih uzoraka bio u referentnom opsegu, pošto su se na elektroferogramima cDNK molekuli nalazili u opsegu od 300 do oko 1000 bp, sa najvećim pikom na oko 500 bp (Slika 19). Budući da



su uzorci bili zadovoljavajućeg kvaliteta, poslani su na sekvenciranje. Nakon završenog sekvenciranja, različiti DNK uzorci su razdvojeni (eng. *demultiplexing*) u trećem koraku generisanja podataka i sastavni su deo FASTAQ datoteke (Wang i sar., 2016). Nakon filtriranja gena čiji se nivo ekspresije u *eml1-2 eml3-4* dvostrukom mutantu razlikovao 1.5 x u odnosu na WT, i za koje je *p* vrednost  $\leq 0,05$ , identifikovano je 584 gena koji imaju značajno povišen nivo ekspresije u dvostrukom *eml1-2 eml3-4* mutantu i 174 gena čija ekspresija je snižena u odnosu na WT.

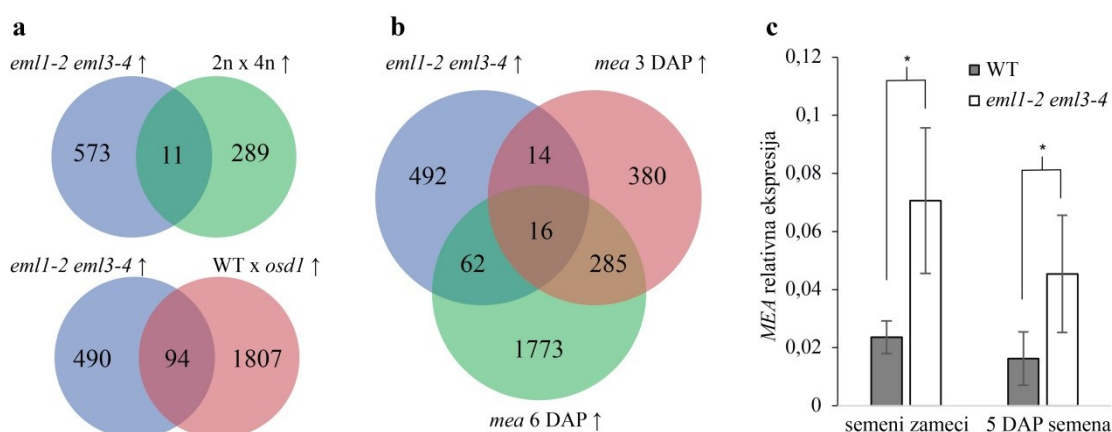
U cilju ontološke kategorizacije gena čija je ekspresija povišena kod dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta, izvršena je GO (*Gene ontology*) analiza. Na osnovu ove analize ustanovljeno je da su među genima sa povišenom ekspresijom najzastupljeniji geni koji učestvuju u biološkim procesima vezanim za metabolizam auksina, odnosno u transportu i funkciji prenosa signala ovog hormona (Tabela 8).

Tabela 8. GO kategorizacija gena čija ekspresija je povišena kod dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta *A. thaliana*

GO kategorizacija	broj gena	<i>P</i> vrednost
Odgovor na auksin (GO:0009733)	37	$8.2 \times 10^{-10}$
Auksinom aktivirani signalni put (GO:0009734)	21	$8.2 \times 10^{-7}$
Organizacija ćelijskog zida (GO:0071555)	30	$2.5 \times 10^{-4}$
Odbrambeni odgovor (GO:0006952)	60	$6.2 \times 10^{-4}$
Odgovor na interakciju sa drugim organizmima (GO:0051707)	48	$2.3 \times 10^{-3}$
Regulacija rasta organa (GO:0046620)	6	$2.7 \times 10^{-3}$
Odgovor na jasmonsku kiselinu (GO:0009753)	16	$3.0 \times 10^{-3}$
Transport auksina (GO:0060918)	10	$4.7 \times 10^{-3}$

U cilju provere da li je povišena ekspresija gena koji učestvuju u metabolizmu auksina povezana sa fenotipom paternalnog viška na molekularnom nivou, izvršeno je poređenje diferencijalno ekspimiranih gena (eng. *differentially expressed genes*, DEG) *eml1-2 eml3-4* sa setovima gena za čiju ekspresiju je iz literature poznato da je povišena u

semenima kod kojih postoji paternalni višak hromozoma u genomu. Prvi ovakav set su predstavljali geni čija je ekspresija povišena u  $2n \times 4n$  unutarvršnim ukrštanjima različitog stepena ploidije (Erilova i sar., 2009), kao i set gena čija ekspresija je povišena u ukrštanjima WT i *omission of second division (osd1)* mutanta koji stvara neredukovana diploidna polenova zrna (Schatlowski i sar., 2014). Na Slici 20a može se uočiti statistički značajan preklap ciljnih gena (Prilog 2), kada se uporede geni sa povišenom ekspresijom kod dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta i WT x *osd1* (Schatlowski i sar., 2014), odnosno  $2n \times 4n$  uzorka (Erilova i sar., 2009).



**Slika 20. Odsustvo funkcije EML1 i EML3 dovodi do promena u ekspresiji gena koji fenokopiraju transkriptome u slučaju paternalnog viška ili odsustva MEA funkcije.** **a**, Venov dijagram prikazuje preklapanje gena čija je ekspresija povišena u ukrštanjima gde se ispoljava paternalni višak hromozoma i u *eml1-2 eml3-4* dvostrukom mutantu (označeno sa WT x *osd1* ↑,  $2n \times 4n$  ↑ i *eml1-2 eml3-4* ↑). Statistička značajnost je ustanovljena korišćenjem hipergeometrijskog testa. *P* vrednosti za svaki presek su prikazane u Prilogu 2. **b**, Venov dijagram prikazuje preklapanje gena čija je ekspresija povišena u *mea* mutantu u uzorcima 3 DAP i 6 DAP, kao i u *eml1-2 eml3-4* dvostrukom mutantu (označeno sa *mea* 3 DAP ↑, *mea* 6 DAP ↑ i *eml1-2 eml3-4* ↑). Statistička značajnost je ustanovljena korišćenjem hipergeometrijskog testa. *P* vrednosti za svaki presek su prikazane u Prilogu 2. **c**, Wild-type (WT) i *eml1-2 eml3-4* biljke su bile ili demaskulinizirane ili samooprašene i RNK je izolovana iz ljuski 24 h nakon demaskulinizacije (semeni zameci) ili 5 dana nakon oprašivanja (5 DAP semena), nakon čega je urađen RT-qPCR korišćenjem *MEA* prajmera. Vrednosti relativne ekspresije su prikazane kao srednja vrednost 3 nezavisna ponavljanja ± standardna devijacija u sličaju 5 DAP semena, i 4 nezavisna ponavljanja ± standardna devijacija u sličaju semenih zametaka. Vrednosti su normalizovane vrednostima ekspresije za *PP2A* (At1g13320) gen koji je služio kao kontrola. Statistički značajna razlika između mutanta i WT je prikazana zvezdicom ( $P < 0.05$ , Mann-Whitney U test).

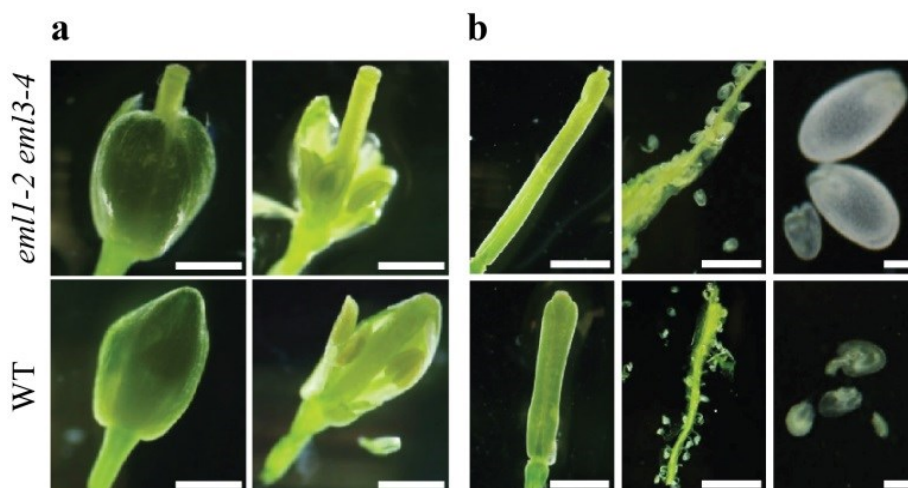
Ovi podaci ukazuju da oplodena semena *eml1-2 eml3-4* ispoljavaju neke karakteristike koje se uočavaju kod semena kod kojih postoji paternalni višak hromozoma i da je fenotip koji je uočen u semenima dvostrukog mutanta nakon oplodjenja rezultat poremećene ravnoteže doprinosa roditeljskih genoma tokom oplodjenja. U literaturi je poznato da semena *mea* mutanta pokazuju fenotipske osobine koje ispoljavaju semena nastala u ukrštanjima gde se ispoljava paternalni višak hromozoma (Tiwari i sar., 2010). Radi testiranja da li *eml1-2 eml3-4* pokazuje sličnosti sa *mea* na molekularnom nivou, upoređeni su geni čija ekspresija je povišena u *eml1-2 eml3-4* i/ili *mea* mutantima na stadijumu 3 DAP i 6 DAP (Huang i sar., 2017). Rezultati ove analize, predstavljeni Venovim dijagramom, pokazali su da je 16 genskih sekvenci zajedničko među transkriptomima sva tri seta podataka, dok je dodatnih 14 gena bilo zajedničko za *eml1-2 eml3-4* i *mea* mutante na stadijumu 3 DAP, kao i 62 gena na 6 DAP stupnju (Slika 20b). Statistička analiza uz pomoć hipergeometrijskog testa je potvrdila da se sva tri preklapanja statistički značajno razlikuju od uzorka istog broja gena odabranih iz genoma po principu slučajnosti (Prilog 2). Ovaj rezultat podržava hipotezu da EML1/EML3 i MEA imaju zajedničke ciljne gene koje reprimiraju tokom razvića. Regulatorna uloga EML proteina i drugih subjedinica FIS-PRC2 kompleksa ograničena je na MEA, jer nije pokazano postojanje statistički značajnog podskupa zajedničkih ciljnih gena između *eml1-2 eml3-4* i gena koji imaju povišen nivo ekspresije u *fie* ili *fis2* mutantima (Prilog 2). Stoga možemo zaključiti da je fenokopiranje paternalnog viška u *eml1-2 eml3-4* limitirano samo na *mea* mutant iz FIS-PRC2 kompleksa.

U cilju provere da li nedostatak EML1/EML3 funkcije u dvostrukom mutantu dovodi do promene ekspresije *MEA* urađena je RT-qPCR analiza na semenim zamecima izolovanim iz dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta kao i na semenima na stupnju 5 DAP. Tehnikom RT-qPCR kvantifikovana je iRNK *MEA* korišćenjem prajmera koji su prikazani u Tabeli 6 (poglavlje Materijal i Metode). Vrednosti su normalizovane vrednostima ekspresije za *PP2A* gen koji je služio kao kontrola. Rezultati su pokazali da je ekspresija *MEA* u dvostrukom *eml1-2 eml3-4* mutantu bila značajno povišena u odnosu na WT, kako pre, tako i posle oplodjenja (Slika 20c), što je slično promeni u ekspresiji *MEA* koja je uočena nakon RNA-Seq. S obzirom na to da MEA reguliše i sopstvenu ekspresiju, ovaj rezultat ukazuje na mogućnost da su EML1 i EML3 deo kompleksa koji ima ulogu da reprimira ekspresiju *MEA* kako pre tako i posle oplodjenja,

čime podsećaju na neke od mutanata u FIS-PRC2 kompleksu (*fis* mutanti). Paradoks da je ekspresija *MEA* povišena u *eml1-2 eml3-4*, dok ovaj mutant u isto vreme pokazuje fenotip nalik na *mea* ili *fis*, može se objasniti modelom gde EML1/EML3 i FIS-PRC2 kompleks imaju zajedničke ciljne gene, što je u skladu sa rezultatima RNA-Seq.

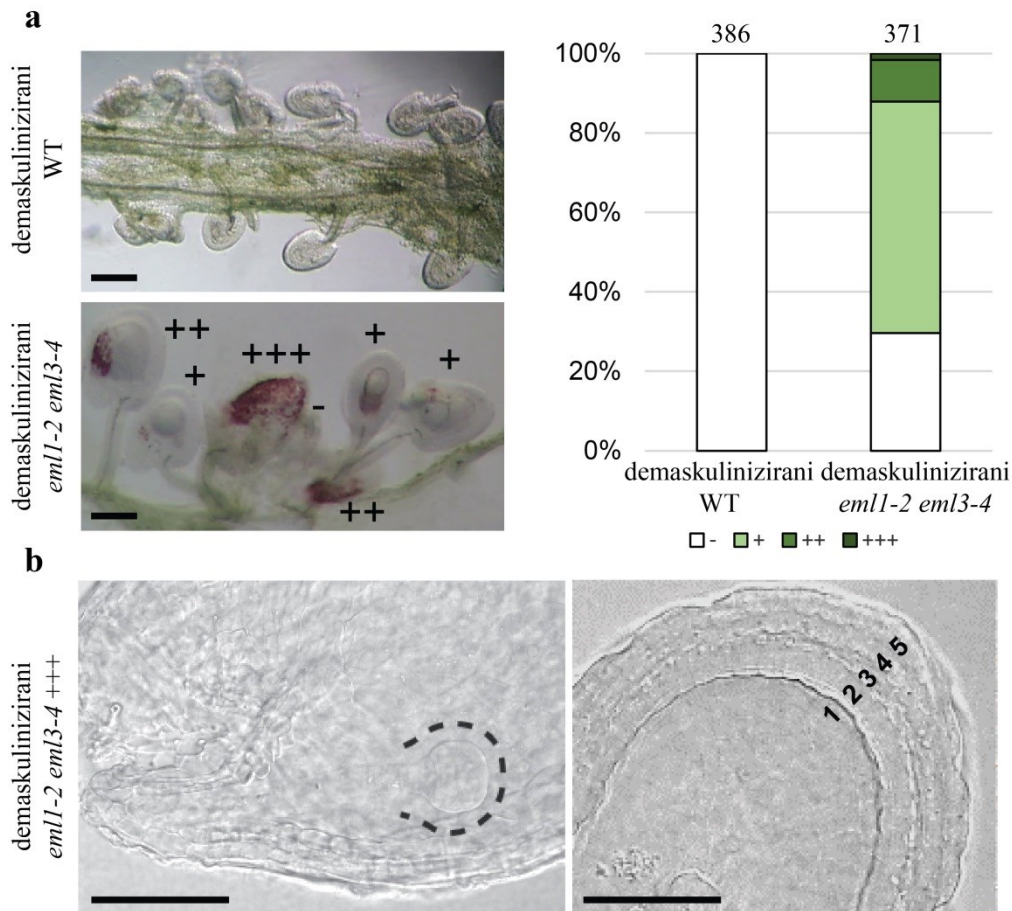
#### **4.7. Karakterizacija apomiksije kod *eml1-2 eml3-4* dvostrukog mutanta**

Tokom analize fenotipa dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta, uočeno je da tučkovi cvetova izviruju iz još uvek zatvorenog cveta (Slika 21a), ali da zadržavaju sposobnost nesmetane produkcije semena. Cvetovi gotovo svih vrsta roda *Arabidopsis* su samooplodni i delimično kleistogamni, što znači da se oprašivanje dešava pre otvaranja pupoljka (Alvarez-Buylla i sar., 2010). Shodno tome, postojala je mogućnost da se deo semena dvostrukog mutanta razvija u odsustvu procesa oplodjenja. Takođe, zbog fenotipskih sličnosti *eml1-2 eml3-4* mutanta i *fis* mutanata, koji su već detaljno opisani u literaturi kao mutanti koji imaju sposobnost da formiraju semena i strukture nalik semenima u odsustvu oplodjenja (Leroy i sar., 2007; Ohad i sar., 1996; Chaudhury i sar., 1997; Köhler i sar., 2003; Guitton i Berger, 2005; Grossniklaus i sar., 1998), dizajniran je eksperiment koji bi pokazao da li i *eml1-2 eml3-4* pokazuje isti fenotip. U cilju testiranja ove hipoteze, prašnici su uklonjeni sa cvetova WT i dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta i posmatrano je dalje razviće neoprašenog tučka. Ova analiza je pokazala prisustvo struktura koje po morfološkim karakteristikama i veličini podsećaju na semena u ljuskama koje nastaju iz neoprašenih tučkova mutanta, dok ovu pojava nije uočena kod WT (Slika 21b).

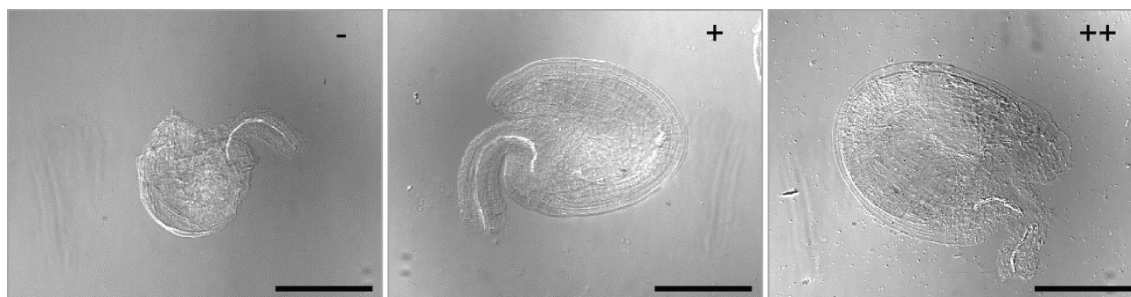


**Slika 21.** Ljuske nastale demaskulinizacijom *eml1-2 eml3-4* cvetova sadrže strukture nalik semenima. **a**, Zatvoreni (levi paneli) i otvoreni cvet (desni paneli) wild-type (WT) i *eml1-2 eml3-4*. Skala: 1 mm. **b**, Zatvorena (levi paneli) i otvorena ljuska (srednji paneli) WT i dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta 6 DAE. Nakon demaskulinizacije cvetova i disekcije ljuski uočeno je prisustvo neoplođenih semenih zametaka kod WT, dok se kod dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta nalaze strukture nalik semenima (desni paneli). Skala: 1 mm za ljuske, 100 μm za semene zametke/semena.

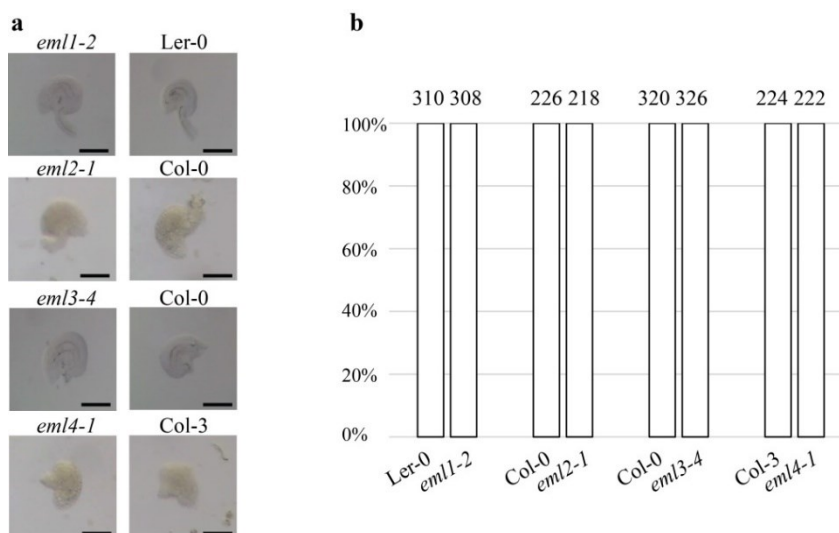
Da bi se ove strukture nalik semenima detaljnije analizirale, deset dana nakon uklanjanja prašnika tj. demaskulinizacije (eng. *days after emasculation*- DAE), ljuske su disekovane i analizirane pod mikroskopom. Za kategorizaciju semenih zametaka, tj. semena ili struktura nalik semenima, ljuske su podvrgnute bojenju rastvorom vanilina. Rezultati su pokazali da WT tučkovi sadrže samo neoplođene semene zametke, dok je kod dvostrukog mutanta svega 30% zametaka imalo potpuni prekid razvića (Slika 22a). Kod ovog mutanta se oko 70% semenih zametaka razvilo u strukture nalik semenima koje su prema intenzitetu bojenja podeljene u tri grupe: mala abortirana semena, abortirana semena srednje veličine i semena normalne veličine (Slike 22, 23). Od ukupnog broja uočenih struktura, 58% pripadalo je kategoriji malih abortiranih semena, koja se, iako su mala, značajno razlikuju od neoplođenih semenih zametaka po svojoj veličini, bojenju proantocijanidina kao i po morfologiji (Slika 22, Tabela P1). Rezultati ove analize ukazuju na to da, za razliku od pojedinačnih mutanata (Slika 24), dvostruki *eml1-2 eml3-4* mutant može da proizvede semena u odsustvu procesa oplođenja, navodeći na zaključak da EML1 i EML3 imaju sinergističku ulogu u sprečavanju apomiksije i obezbeđivanju procesa polnog razmnožavanja.



**Slika 22. EML1 i EML3 sprečavaju razviće semena u odsustvu oplodjenja. a**, *eml1-2 eml3-4* dvostruki mutant je demaskuliniziran i upoređen sa demaskuliniziranim WT 10 dana nakon uklanjanja prašnika. Ljuske su disekovane i podvrgnute bojenju vanilin rastvorom radi karakterizacije semenih zametaka/semena u razvoju. Uočene su četiri kategorije: (-) abortirani semeni zameci; (+) mala abortirana semena; (++) abortirana semena srednje veličine; (+++) potpuno razvijena semena sa embrionom (levi panel). Analiza i procentualna zastupljenost semenih zametaka/semena 10 DAE prema kategorizaciji prikazanoj na levom panelu. Brojevi na vrhu grafikona predstavljaju ukupan broj analiziranih semenih zametaka/semena (desni panel). Podaci predstavljaju srednju vrednost od ukupno 10 analiziranih ljuski za svaki genotip. Statistički značajna razlika među genotipovima za svaku od + i ++ kategorija je uočena ( $P < 0.05$ , One-way ANOVA praćena Fisher's LSD testom). **b**, DIC mikrografija (+++) potpuno razvijenoj semenu sa embrionom koji je oivičen isprekidanom linijom radi bolje vizuelizacije (panel levo). Na desnom panelu nalazi se DIC mikrografija na kojoj se uočava prisustvo pet slojeva semenjače koji postoje kod +++ kategorije semena. Skala: 100  $\mu$ m.



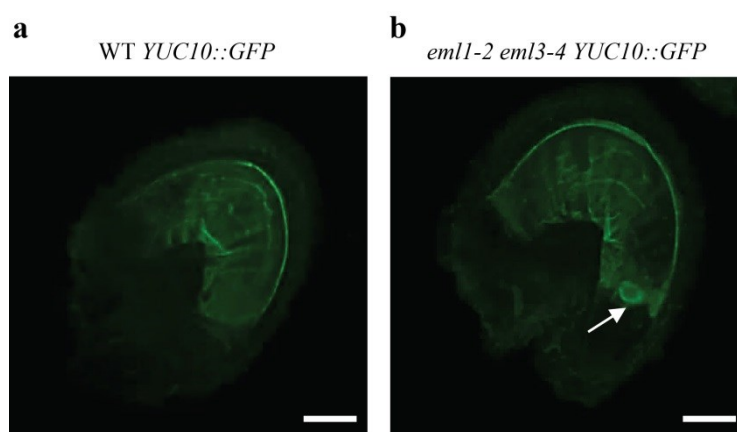
**Slika 23. Karakterizacija malih i abortiranih semena srednje veličine razvijenih u odsustvu oplodjenja kod dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta.** Dvostruki *eml-2 eml3-4* mutant je demaskuliniziran i ljuske su disekovane radi karakterizacije neoplođenih semenih zametaka i struktura nalik semenima 10 DAE DIC mikroskopijom. (-) neoplođeni semeni zametak; (+) malo abortirano seme; (++) abortirano seme srednje veličine. Skala: 100  $\mu$ m.



**Slika 24. Demaskulinizacijom *eml1-2*, *eml2-1*, *eml3-4* i *eml4-1* mutanata ne dolazi do formiranja semena u odsustvu oplodjenja.** **a**, Vanilin bojenje semenih zametaka *eml* mutanata i njihovih odgovarajućih WT nakon uklanjanja prašnika. Skala: 100  $\mu$ m. **b**, Rezultati predstavljaju procentualnu vrednost semenih zametaka *eml* mutanata nakon vanilin bojenja. Brojevi na vrhu grafikona predstavljaju ukupan broj analiziranih semenih zametaka.

Nezavisno od njihove veličine i morfologije, semena formirana nakon demaskulinizacije dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta ne završavaju proces razvića i vremenom imaju potpuni prekid razvića. Oko 12% semena srednje i normalne veličine podseća na fenotip koji se javlja kod *fie* i *msi1* mutanata (razviće endosperma i semenjače kod oba mutanta i partenogeneza kod *msi1* u odsustvu oplodjenja), na osnovu njihovih dimenzija, intenzivnog bojenja proantocijanidina u semenjači, i povremenog prisustva globularnog embriona. Međutim, na osnovu malih dimenzija i slabog

intenziteta vanilin bojenja, glavna (oko 60%) struktura u ljuskama dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta nalikuje onima opaženim kod *vrn2* mutanta, koji se karakteriše razvićem semenjače u odsustvu oplodjenja, ali ne i razvićem endosperma. U cilju provjere da li kod dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta izostaje formiranje endosperma u odsustvu oplodjenja, te on stoga fenokopira *vrn2*, korišćen je *YUC10::GFP* marker koji se eksprimira u endospermu samo ako dođe do oplodjenja (Robert i sar., 2013; Figueiredo i dar., 2015). *YUC10::GFP* marker je ubačen u mutantnu i WT genetičku pozadinu tako što je izvršeno ukrštanje *YUC10::GFP* transgenih biljaka sa *eml1-2 eml3-4* i WT biljkama, nakon čega su formirana semena F1 generacije korišćena za dalje eksperimente. Cvetovi F1 biljaka su demaskulinizirani i konfokalnom mikroskopijom je pokazano da se *YUC10::GFP* signal javlja u jedru autonomno formiranog semena 5 DAE kod biljaka koje imaju pozadinu dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta, dok sa druge strane signal nije uočen u WT semenim zamecima (Slika 25). Prema veličini, ova semena odgovaraju kategoriji malih abortiranih semena prethodno identifikovanih metodom vanilin bojenja nakon demaskulinizacije dvostrukog mutanta (Slike 22 i 23). Ovaj rezultat govori da kod dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta dolazi do inicijacije autonomnog razvića endosperma koji ne napreduje dalje od ove faze. Svi pomenuti rezultati sugerišu da EML1 i EML3 imaju sinergističku ulogu u prevenciji aseksualnog razvića semena uz favorizovanje razvića semena nakon oplodjenja.



**Slika 25. Semenim zamecima dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta sintetišu auksin ektopično. a,** Ekspresija *YUC10::GFP* u neoplođenim WT semenim zamecima. **b,** Aktivnost *YUC10* reportera u semenima *eml1-2 eml3-4* nastala u odsustvu oplodjenja, 5 DAE. Strelica pokazuje jedro u endospermu. Skala: 20  $\mu$ m.



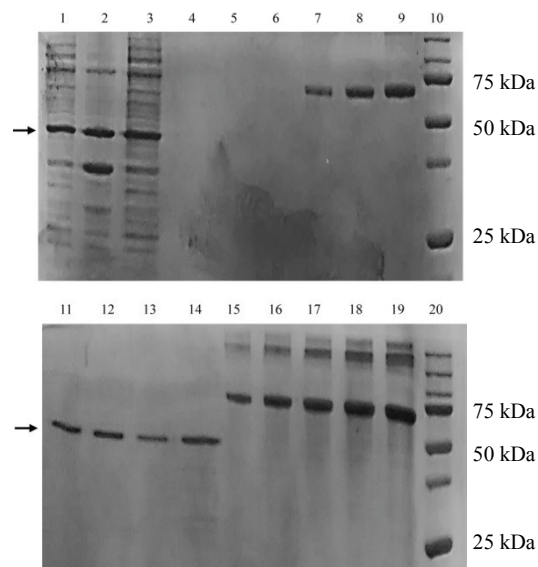
## **4.8. Funkcionalna karakterizacija EML proteina**

Kao što je pomenuto u poglavlju 1.3.1.3.1. („Agenet/Tudor porodica proteina čitača”), EML proteini u svojoj strukturi sadrže Agenet domen. Literaturni podaci ukazuju da proteini sa ovim domenom imaju sposobnost da se vezuju za histone i učestvuju u regulaciji genske ekspresije. Zbog toga je nakon funkcionalne analize genetičkim metodama pristupljeno ispitivanju EML funkcije na nivou proteina. Detaljni rezultati ovih eksperimenata opisani su u nastavku.

### **4.8.1. Funkcija EML proteina kao čitača histonskih modifikacija *in vitro***

#### **4.8.1.1. Indukcija ekspresije i prečišćavanje EML1 rekombinantnog proteina**

U svrhu prečišćavanja, rekombinantni His-EML1 je kloniran i eksprimiran u bakteriji *E. coli*, kao što je opisano u poglavlju Materijal i Metode. Radi ustanovljivanja optimalnih uslova za postizanje visokih prinosa His-EML1 proteina, ispitivani su različiti parametri bakterijske ekspresije. Testirana je indukcija sinteze proteina pomoću izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktozida (IPTG) pri koncentraciji 1,0 mM, pri čemu je varirana dužina inkubiranja nakon indukcije (2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 18 h, 21 h). Vrednosti optičke gustine bakterijske kulture u trenutku indukcije podešene su na  $OD_{600} = 0,6$ . Takođe, ispitivan je i uticaj dve različite temperature inkubiranja nakon indukcije (30°C i 37°C). Na osnovu elektroforetske pokretljivosti je procenjeno da His-EML1 protein pokazuje neznatno (~5-10 kDa) uvećanu molekulsku masu od predviđene, koja iznosi 37 kDa (Slika 26). Po analiziranju rezultata ekspresije pod različitim uslovima ustanovljeno je da se najveći prinos solubilnog proteina postiže kada se kultura gaji 18 h na temperaturi od 30°C (Slika 26). Ovi uslovi su dalje primenjeni za proizvodnju i prečišćavanje proteina radi njegovog korišćenja u daljim esejima. Procedura prečišćavanja rekombinantnog proteina je detaljno opisana u poglavlju „Prečišćavanje rekombinantnih proteina” (poglavlje Materijal i metode).

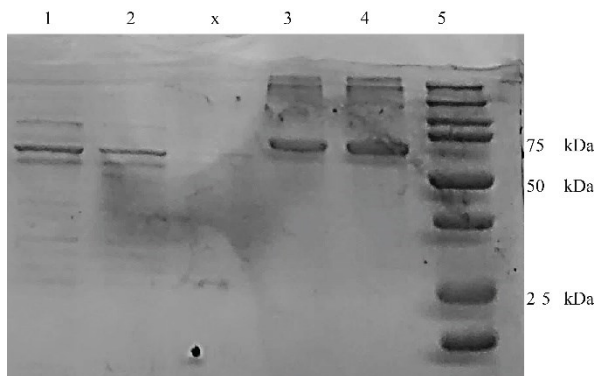


**Slika 26. SDS-PAGE analiza rezultata dobijenih nakon prečišćavanja EML1 proteina.** 1, solubilni lizat. 2, nesolubilni lizat. 3, frakcija koja se ne vezuje za Ni-NTA kolonu. 4, prvo pranje. 5, drugo pranje. 6, treće pranje. 7-9, poznate koncentracije BSA proteina (1 µg, 2 µg, 3 µg). 10, proteinski marker. 11, prva elucija. 12, druga elucija. 13, treća elucija. 14, ostatak vezane frakcije proteina. 15-19, poznate koncentracije BSA proteina (1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg). 20, proteinski marker. Strelica pokazuje poziciju EML proteina.

#### 4.8.1.2. Indukcija ekspresije i prečišćavanje EML3 rekombinantnog proteina

U svrhu prečišćavanja, rekombinantni His-EML3 je kloniran i ekspimiran u bakteriji *E. coli*, kao što je opisano u poglavlju Materijal i Metode. Radi ustanovljivanja optimalnih uslova za postizanje visokih prinosa His-EML3 proteina, ispitivani su različiti parametri bakterijske ekspresije. Testirana je indukcija sinteze proteina pomoću L-arabinoze pri finalnoj koncentraciji 0,2 % tokom šest različitih vremena inkubiranja nakon indukcije (2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 18 h, 21 h), pri vrednosti optičke gustine bakterijske kulture u trenutku indukcije od  $OD_{600} = 0,6$ . Takođe, ispitivan je i uticaj tri različite temperature inkubiranja nakon indukcije (20°C, 30°C i 37°C). Na osnovu elektroforetske pokretljivosti je procenjeno da His-EML3 protein, slično kao i His-EML1, pokazuje neznatno (~5-10 kDa) uvećanu molekulsku masu od predviđenih 43 kDa (Slika 27). Po analiziranju rezultata ekspresije pod različitim uslovima ustanovljeno je da se najveći prinos solubilnog proteina dobija kada se kultura gaji 18 h na temperaturi od 20°C (Slika 27). Ovi uslovi su dalje primenjeni za masovnu proizvodnju proteina, koji su

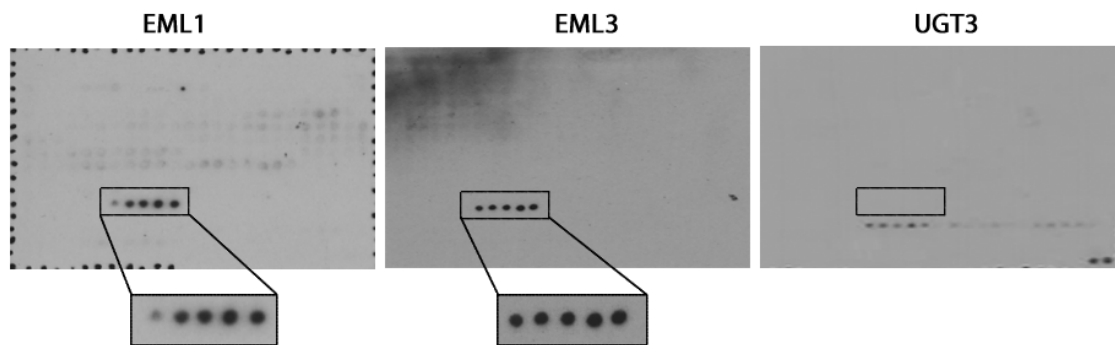
potom prečišćeni i korišćeni u daljim esejima. Procedura prečišćavanja rekombinantnog proteina je detaljno opisana u poglavlju „Prečišćavanje rekombinantnih proteina” (poglavlje Materijal i metode).



**Slika 27. SDS-PAGE analiza rezultata dobijenih nakon prečišćavanja EML3 proteina.** 1, prva elucija. 2, ostatak vezane frakcije proteina. 3- 4, poznate koncentracije BSA proteina (1 µg, 2 µg). 5, proteinski marker.

#### **4.8.2. Vezivanje EML proteina za histonski proteinski čip**

U cilju testiranja interakcije EML proteina i histona *in vitro*, izvršeno je vezivanje prečišćenih EML1 i EML3 proteina za histonski proteinski čip (*histone peptide array*). Ovaj čip se sastoji od peptida dužine 19 amino kiselina koji pokrivaju čitavu dužinu N-terminalnog histonskog repa histona H2A, H2B, H3 i H4 sa kombinacijama različitih modifikacija. Čip sadrži 384 jedinstvenih histonskih modifikacija u različitim kombinacijama u dva ponavljanja na slajdu. Vezivanje EML1 i EML3 je detektovano uz pomoć antitela na His-tag. Nakon vezivanja za histonski čip, ustanovljeno je da oba proteina imaju afinitet vezivanja za peptide histona H3 koji sadrže lizin na poziciji 36 (Slika 28). Tačnije, EML1 i EML3 se vezuju za istih 5 peptida koji sadrže sledeće modifikacije (čitano sa leva na desno): nemodifikovani H3K36, H3K36me1, H3K36me2, H3K36me3 i H3K36ac. Za oba proteina, softverski paket Active Motif je pokazao najintenzivniji signal vezivanja za H3K36me3 modifikaciju. Protein UDP-glikoziltransferaza3 (UGT3), koji je korišćen kao negativna kontrola u ovom esej, nije pokazao vezivanje za peptide na slajdu (Slika 28).



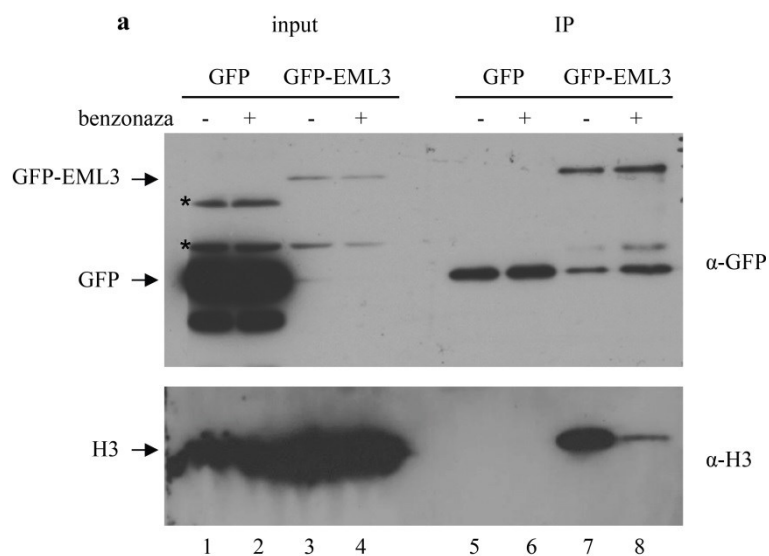
**Slika 28. EML1 i EML3 se preferencijalno vezuju za određene modifikacije histona.** Ekspimirani, histidinima obeleženi EML1 i EML3 prepoznaju i vezuju se direktno za H3K36 modifikacije. Detektovani pozitivni signali su uokvireni pravougaonima koji su izdvojeni i uvećani radi bolje vidljivosti. Pozitivni signali predstavljaju fragmente H3 peptida (aminokiseline na poziciji 26 do 45) koji sadrže, čitano sa leva na desno, nemodifikovani H3K36, H3K36me1, H3K36me2, H3K36me3 i H3K36ac, redom. Ekspimirani, histidinima obeležen UDP-glukuronoziltransferaza 3 (UGT3) protein je nakon prečišćavanja korišćen kao negativna kontrola u ovom eksperimentu. Prazan pravugaonik na UGT3 slajdu pokazuje da ne postoji vezivanje ovog proteina za H3K36 fragmente. Drugi detektovani signali na ovom slajdu su rezultat nespecifičnog vezivanja na osnovu prisustva pozadinskog (background) kontrolnog signala u donjem desnom uglu. Eksperiment je ponovljen tri puta za svaki protein.

Kako je ovo jedinih 5 peptida na slajdu koji sadrže H3K36, možemo zaključiti da EML proteini pokazuju afinitet za vezivanje za ovaj aminokiselinski ostatak. Osim toga, ovih 5 peptida obuhvataju aminokiseline na poziciji 26-45 i na taj način takođe uključuju i lizin na poziciji 27. U literaturi je opisano da je metilacija ovog aminokiselinskog ostatka u korelaciji sa represijom genske ekspresije. Sa druge strane, EML1 i EML3 nisu pokazali afinitet vezivanja ni za jedan od nekoliko peptida koji obuhvataju aminokiseline 16-35 u okviru N-terminalnog repa histona H3 i modifikovani su ili na poziciji lizin 27 (mono-, di- ili trimetilovan, ili acetilovan) ili u kombinaciji sa drugim PTMs, što dodatno pokazuje specifičnost EML proteina da se vezuju za H3K36, a ne za H3K27 *in vitro*.

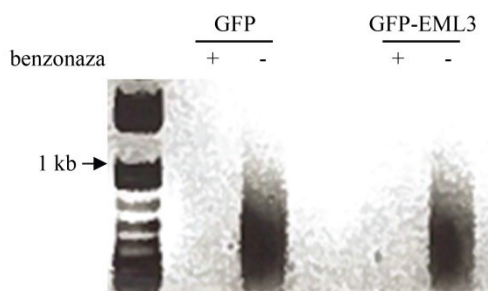
#### 4.9. Vezivanje EML proteina za nukleozome

Da bi testirali mogućnost interakcije EML proteina sa hromatinom *in planta*, GFP-EML3 protein pod kontrolom *CaMV35S* promotora ekspimiran je u *Nicotiana benthamiana* i imunoprecipitiran uz pomoć antitela na GFP. Nakon elektroforetskog

razdvajanja proteina i imunodetekcije anti-H3 antitelom, histon H3 je detektovan u GFP-EML3 imunoprecipitiranim frakcijama (Slika 29a, kolona 7), ali ne i u kontrolnom GFP uzorku (Slika 29a, kolona 5). Ovaj rezultat ukazuje da se EML3 proteini vezuju za nukleozome. Histon H3 je detektovan u imunoprecipitiranim uzorcima i kada su uzorci tretirani benzonazom, enzimom koji služi za uklanjanje DNK iz proteinskog lizata (Slika 29b, za poređenje su kolone 7 i 8), što sugeriše da EML3 direktno interaguje sa histonom H3 unutar jedra biljne ćelije. U saradnji sa laboratorijom Dr. Dave Bisaro (*The Ohio State University, SAD*) pokazano je da EML1 takođe ima sposobnost interakcije sa nukleozomima (Coursey i sar., 2018). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim *in vitro* koji sugerišu da je mehanizam funkcije EML proteina čitanje histonskih modifikacija.



**b**



**Slika 29. GFP-EML3 direktno interaguje sa histonom H3 in planta.** **a**, *p35S::GFP-EML3* je eksprimiran u listovima *Nicotiana benthamiana*. Nuklearni ekstrakti su imunoprecipitirani korišćenjem anti-GFP antitela. „Slobodan” GFP konstrukt je korišćen kao kontrola. Ko-immunoprecipitirani (eng. *co-IP-ed*) nativni histon H3 je detektovan anti-histon H3 antitelom. Uzorci su uključivali i tretman sa (+) ili bez (-) benzonaze kako bi testirali da li interakcija zavisi od prisustva DNK.. Nespecifično vezivanje detektovano anti-GFP antitelom su obeleženi zvezdicom. Pozicije detektovanih proteina su označeni strelicama. Ko-immunoprecipitacija je ponovljena 5 puta i prikazan je reprezentativni *Western blot*. **b**, Agarozna gel elektroforeza sonifikovanih nuklearnih ekstrakata GFP i GFP-EML3 uzoraka nakon tretmana benzonazom.

## 5. Diskusija

Tokom dvojnog oplodjenja kod skrivenosemenica, jedna jajna ćelija spajanjem sa jednom od dve spermatske ćelije daje diploidni embrion, dok druga spermatska ćelija daje triploidni endosperm. Embrion i endosperm su okruženi semenjačom, diploidnom strukturom poreklom od majke, koja nastaje od integumenata semenog zametka. Smatra se da je odnos 2:1 genoma majke i oca u triploidnom endospermu neophodan kod mnogih vrsta skrivenosemenica za održavanje normalnog razvića semena. Međutim, istraživanja su pokazala da, takav odnos genoma predstavlja i seksualnu reproduktivnu barijeru kako za proces hibridizacije između različitih biljnih vrsta, tako i za proces apomiksije (Bushel i sar., 2003; Scott i sar., 1998; Spielman i sar., 2003). Kod *A. thaliana* su razvijeni brojni mehanizmi u cilju održavanja pravilnog odnosa roditeljskih genoma. Oni podrazumevaju regulaciju gena i transpozabilnih elemenata delovanjem metilacije DNK, metilacije histona od strane PRC2 kompleksa (Köhler i sar., 2012), malih (Erdmann i sar., 2017, Borges i sar., 2018, Martinez i sar., 2018), kao i paternalno ekspimiranog auksina (Figueriredo i sar., 2015). S obzirom da ni mnogobrojni pokušaji da se navedeni mehanizmi iskoriste u cilju prevazilaženja međuvrskih barijera i stvaranja apomiktičnih semena, jasno je postoje dodatni kontrolni mehanizmi koji regulišu ove procese, a koje je neophodno identifikovati.

### 5.1. Potencijalna funkcija EML proteina pre i posle oplodjenja na osnovu studija lokalizacije

Rezultati analize ukrštanja *eml* mutanata *A. thaliana* ukazuju na to da su *EML* geni važni akteri tokom procesa oplodjenja i razvića semena. Disekcija pod mikroskopom je omogućila identifikaciju razvojnih stadijuma embriona nakon ukrštanja, pri čemu je uočljiv jasan trend usporene dinamike razvića embriona *eml* mutanata u odnosu na WT. U recipročnim ukrštanjima mutanata i njihovih odgovarajućih WT, taj fenotip je nešto slabijeg intenziteta, što se može objasniti postojanjem efekta doze koji je značajan za funkciju *EML* gena (Slika 13).

Kako bi bolje razumeli fenotip nastao kombinovanjem mutacija u *EML1* i *EML3* genima, urađene su detaljne studije lokalizacije proteina. Ova istraživanja su pokazala da su *EML1* i *EML3* funkcionalni u gametofitu, ukazujući na važnu ulogu ovih proteina

čitača neposredno pre procesa oplodjenja. Takođe, prisustvo EML1 i EML3 proteina u različitim delovima semena, ukazuje na njihovu regulatornu funkciju i nakon oplodjenja. Oba proteina najverovatnije imaju preklopljenje uloge nakon oplodjenja u embrionu i semenjači, dok je uloga EML1 zastupljenija tokom razvića endosperma (Slika 14). Interesantno je primetiti da se EML1 i EML3 signal može detektovati i u suspenzoru, što ukazuje na zajedničku funkciju ova dva proteina u transportu molekula do embriona. Jedna od mogućnosti je da se ova transportna uloga ogleda u snabdevanju embriona saharozom tokom ranih faza razvića. Naime, poznato je da je saharoza neophodna za koordinisano razviće embriona i endosperma. U endospermu, saharoza se konvertuje u heksoze, i to glukozu i fruktozu (Hehenberger i sar., 2012; Morley-Smith i sar., 2008). Protok saharoze od maternalnih tkiva ka embrionu značajno doprinosi finalnoj veličini semena i njegovoj vijabilnosti (Hehenberger i sar., 2012; Aguirre i sar., 2018). U literaturi postoji podatak da smanjeni protok saharoze ka embrionu izazvan mutacijama u transporterima saharoze, SWEET i AtSUC5, dovodi do usporene dinamike razvića embriona i redukcije veličine i težine semena (Chen i sar., 2012; Baud i sar., 2005). Takođe, Wang i Ruan (2013) su pokazali da i komunikacija između auksina i saharoze igra važnu ulogu i doprinosi ravnoteži između procesa izduživanja ćelija i ćelijskih deoba tokom razvića semena. Kod *fis2* mutanta *A. thaliana* nepostojanje celularizacije endosperma rezultuje u postojanju visokih koncentracija saharoze koja se ne transportuje do embriona što dovodi do zastoja u razviću (Hehenberger i sar., 2012).

## **5.2. EML1 i EML3 sprečavaju formiranje semena u odsustvu oplodjenja kod *A. thaliana***

Još jedna zajednička karakteristika *eml 1-2 eml3-4* mutanta i *fis* mutanta je i mogućnost formiranja semena u odsustvu oplodjenja. Kod *fis* mutanata *A. thaliana*, razviće semena u odsustvu oplodjenja se karakteriše razvićem autonomnog endosperma. U zavisnosti od toga da li dolazi i do formiranja semenjače, ovako formirana semena delimo na dve grupe. Kod prve grupe semena, u koju spadaju semena *fie* i *msi1* mutanata, dolazi do inicijacije razvića semenjače. Drugoj grupi pripadaju semena *fis2* i *mea* mutanata, koja, u većini slučajeva, ne razvijaju semenjaču. S druge strane, *vrn2* mutanti sporofitnog PRC2 kompleksa imaju sposobnost razvića semenjače u odsustvu razvića endosperma (Roszak i Köhler, 2011). Figueiredo i saradnici (2015) su svojim istraživanjima



sugerisali da FIS-PRC2 kompleks vrši represiju sinteze maternalnog auksina u centralnoj ćeliji, dok sporofitni EMF/VRN-PRC2 kompleks reprimira razviće integumenata u semenjaču pre nego što dođe do procesa oplodjenja. Proces oplodjenja predstavlja okidač koji dovodi do produkcije paternalnog auksina koji inicira razviće endosperma i transportuje se do integumenata čime se uklanja represija sporofitskog PRC2 kompleksa i započinje razviće semenjače (Figueiredo i Köhler, 2018). Stoga, PRC2 kompleks, zajedno sa maternalno reprimiranom sintezom auksina igra ključnu ulogu u sprečavanju autonomnog razvića semena u odsustvu oplodjenja, dok poremećaji u ovim procesima dovode do ispoljavanja fenotipa kakav se uočava kod mutanata sa paternalnim viškom hromozoma.

Nedostatak ekspresije *AGL62* izaziva defekte u razvoju semenjače što je u korelaciji sa poremećenim eksportom auksina (Figueiredo i sar., 2016). Kod autonomnih semena formiranih kod *fis* mutanata, ektopična ekspresija auksina u centralnoj ćeliji dovodi do inicijacije razvića semenjače, međutim semena ne dostižu konačnu veličinu oplodjenih semena i odlikuju se potpunim prekidom razvića 6 do 7 DAE (Figueiredo i sar., 2015; Figueiredo i sar., 2016). Pored auksina, neophodni su i dodatni signali koji sprečavaju degenerisanje semenog zametka, moguće u vidu giberelinskog signala (Creff i sar., 2015) ili drugih malih peptida sa funkcijom signalnih molekula (Ingram i Gutierrez-Marcos, 2015; Figueiredo i Köhler, 2016). Takođe, skorašnja istraživanja su pokazala da prekomerna proizvodnja auksina fenokopira paternalni višak genoma (Figueiredo, 2018).

Drugi mehanizam koji dovodi do pojave razvića semena u odsustvu oplodjenja podrazumeva oslobađanje sadržaja polenove cevi u embrionovu kesicu (eng. *pollen tube release*, PTR). Istraživanja pokazuju da je PTR dovoljan da započne uvećavanje semenih zametaka i njihovo razviće u strukture nalik semenima koje sadrže semenjaču i endosperm u kome se formira 1 do 2 nukleusa. Ovaj fenomen, identifikovan samo kod biljaka, nazvan je uvećanje semenog zametka zavisno od polenove cevi (eng. *pollen tube-dependent ovule enlargement morphology*, *POEM*) i dešava se samo kada semeni zametak „prihvati” sadržaj polenove cevi nezavisno od oplodjenja (Kasahara i sar., 2016; Zhong i sar., 2017).

Eksperimentalno je pokazano da dvostruki *eml1-2 eml3-4* mutant predstavlja još jednu kategoriju mutanata koji imaju sposobnost produkcije semena u odsustvu oplodjenja. Nakon demaskulinizacije dvostrukog mutanta i disekcije ljuski, utvrđeno je da procentualno najveću zastupljenost čine strukture nalik semenima koje se odlikuju prisustvom začetka semenjače i endosperma (Slike 21 i 22). Fenotip koji ispoljavaju ova semena, a koji se ogleda u veličini semena i inicijaciji razvića semenjače, je vrlo sličan fenotipu koji se ispoljava kod *vrn* mutanata. Međutim, za razliku od semena *vrn* biljaka kod kojih se razvija samo semenjača, semena dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta se odlikuju i prisustvom endosperma. Nasuprot malim semenima, semena srednje veličine i potpuno formirana semena dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta nastala u odsustvu oplodjenja, kod kojih je semenjača kompletno diferencirana, fenotipski podsećaju na *msi1* ili *fie* mutante. Podatak da ovaj fenotip nije zapažen ni kod jednog pojedinačnog *eml* mutanta (Slika 24), navodi na zaključak da EML1 i EML3 imaju sinergističku ulogu tokom sprečavanja razvića semena u odsustvu oplodjenja, čime omogućavaju polno razmnožavanje. Iako strukture nalik semenima, koje se uočavaju kod dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta, ispoljavaju izvesne sličnosti sa strukturama koje nastaju kod PRC2 mutanata, ove strukture pokazuju čitav niz fenotipskih razlika u donosu na ove mutante, podsećajući mahom na fenotip koji nastaje usled ektopične produkcije auksina ili usled aplikacije auksina u odsustvu oplodjenja.

### **5.3. Uloga EML proteina u razviću semena nakon oplodjenja**

Iako se fenotip semena *eml1-2 eml3-4* koja nastaju procesom oplodjenja razlikuje od semena *fis* mutanata, oni dele mnoge zajedničke molekularne karakteristike i pretpostavljeno je da fenotipske razlike potiču od faze u razviću u kojoj ove dve vrste proteina obavljaju svoju funkciju. Takođe, EML1 i EML3 su potencijalno uključeni u mehanizam represije *MEA* ekspresije i pre i posle oplodjenja i kao deo ovog mehanizma mogu dovesti do ublaženog oblika poremećaja u razviću semena, gde umesto potpunog prekida razvića semena, zapaženog kod *fis* mutanata, dolazi do kompleksnog fenotipa kod *eml1-2 eml3-4* dvostrukog mutanta koji uključuje kako kašnjenje u razviću embriona, tako i prekid razvića semena. Semena *mea* (Tiwari i sar., 2010) i dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta pokazuju fenotipske osobine koje ispoljavaju semena nastala u ukrštanjima gde se ispoljava paternalni višak hromozoma. Triploidna semena koja se

formiraju u ukrštanjima gde postoji paternalni višak hromozoma ( $2n \times 4n$ ) se karakterišu prekomernom proliferacijom ćelija endosperma koja onemogućava celularizaciju i razviće semena (Erilova i sar., 2009; Kradolfer i sar., 2013). Analizom transkriptoma triploidnih semena ustanovljeno je da se među genima čija je ekspresija značajno povišena u odnosu na kontrolna diploidna semena, nalaze geni uključeni u homeostazu auksina, i to pre svega geni biosintetskog puta auksina (*TAA/TAR* i *YUC*), geni uključeni u transport auksina (*PIN* i geni nalik *PGP*), i auksin responsivni faktori (ARFs) (Figueiredo i sar., 2016). Među rezultatima ove studije nalaze se dva dokaza da semena dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta pokazuju osobine paternalnog viška hromozoma. Prvo, promene u ekspresiji gena u transkriptomu dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta su u korelaciji sa promenama zapaženim u hibridizacionim ukrštanjima (Slika 20a). U okviru grupe gena identifikovane u preklopu dva seta podataka na Slici 20a nalaze se geni sa ekstracelularnom lokalizacijom, prevashodno enzimi ćelijskog zida i mali peptidi, uključujući EC1.4, peptid specifičan za jajnu ćeliju neophodan za fuzionisanje sa spermatičnom ćelijom (Sprunck i sar., 2012). Drugo, zrela semena dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta su većih dimenzija i svetlije boje u odnosu na kontrolna semena. Ovakav fenotip je izražen kod semena nastala u ukrštanjima gde postoji paternalni višak hromozoma (Scott i sar., 1998; Erilova i sar., 2009). Analiziranjem semena u eksperimentima ukrštanja biljaka dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta i WT, dolazimo do zaključka da *EML1* i *EML3* imaju maternalnu regulatornu ulogu u semenim zamecima što omogućava uspešno oplodjenje, dok sa druge strane, odgovarajuća doza ovih gena nakon oplodjenja omogućava normalno razviće embriona. Ovakva dualna uloga je karakteristična za epigenetičke regulatore kao što su čitači histonskih modifikacija (Dilkes i Comai, 2004).

#### **5.4. Auksin: molekularni okidač za razviće semena *A. thaliana***

U diploidnim organizmima somatske ćelije poseduju dve kopije genoma, jednu nasleđenu od majke, a drugu od oca. To znači da je svaki gen prisutan u dve kopije. Prema Mendelovom zakonu o nasleđivanju osobina, kopije gena poreklom od majke i oca sa jednakom verovatnoćom utiču na ishod genotipa potomaka. Za razliku od većine gena, geni koji podležu fenomenu utiskivanja (eng. *imprinted genes*), ekspimiraju alel poreklom samo od jednog roditelja. Primera radi, utisnuti alel nasleđen od majke u

potomku će biti neaktivan, dok će isti alel poreklom od oca biti eksprimiran, ili obrnuto (Gehring, 2013). Za razliku od sisara, kod kojih je pokazano da se „utisnuti” geni mogu nalaziti u embrionu i u placenti (Barlow, 2011), prvobitno je pretpostavljeno da se genomsko utiskivanje kod cvetnica javlja samo u triploidnom tkivu endospermu koje sadrži kako maternalno eksprimirane gene (eng. *maternally expressed genes*, MEGs), tako i paternalno eksprimirane gene (eng. *paternally expressed genes*, PEGs) (Gehring, 2013). Tri nezavisne grupe istraživača su analizom transkriptoma dobijenih izolacijom endosperma iz recipročnih ukrštanja različitih ekotipova *A. thaliana* potvrdili postojanje nekoliko stotina utisnutih gena (Hsieh i sar., 2011; Gehring i sar., 2011; Pignatta i sar., 2014). U alel-specifičnoj analizi transkriptoma je identifikovano oko 80 potencijalnih gena podložnih imprintingu u embrionu *A. thaliana* (Raissig i sar., 2013). Za razliku od endosperma, pretpostavljeno je da u slučaju genomskog utiskivanja u embrionu dolazi do uklanjanja modifikacija tokom završnih faza embriogeneze i njihovog ponovnog uspostavljanja tokom gametogeneze. Tačan mehanizam, međutim, još uvek nije poznat (Raissig i sar., 2013).

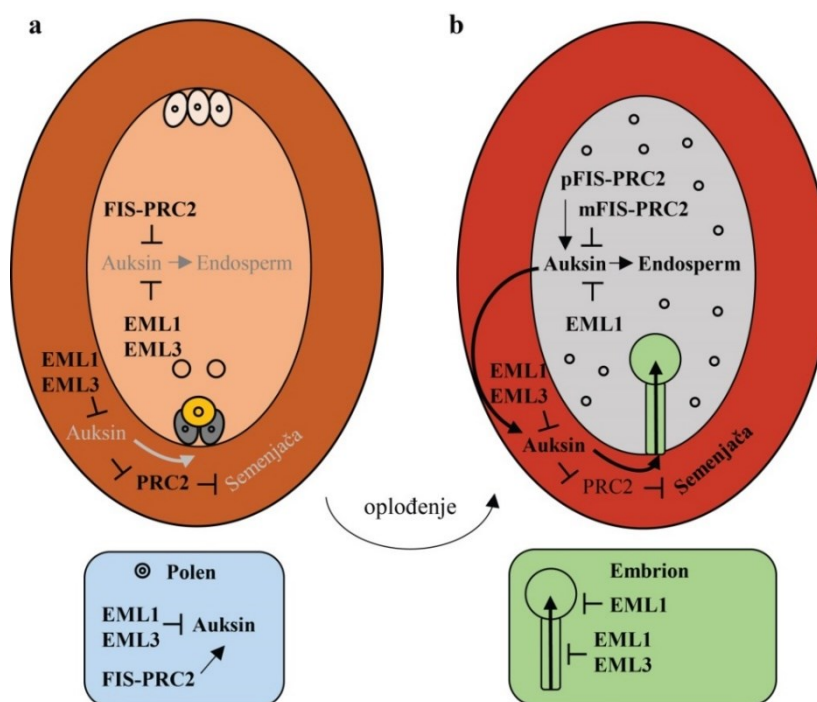
U *fis* mutantima dolazi do aktivacije ekspresije dva paternalno eksprimirana gena u semenim zamecima (*YUC10* i *TAR1*) u odsustvu oplodjenja, kao i do ektopične produkcije auksina. Ova činjenica sugerise da biosinteza auksina koja prati proces oplodjenja centralne ćelije i razvoj endosperma zavisi od PEG *YUC10* i *TAR1* i da FIS-PRC2 kompleks direktno kontroliše ove gene u endospermu (Figueiredo i sar., 2015). Ortolozi *YUC10* *A. thaliana*, *OsYUCCA11* pirinča i *ZmYUCCA1* kukuruza takođe su utisnuti geni koji su paternalno eksprimirani. Takođe, *TAR1*, je identifikovan kao PEG kod mnogih biljnih vrsta (Chen i sar., 2018). Podatak da su geni uključeni u biosintezu auksina utisnuti u endospermu udaljenih vrsta cvetnica je vrlo interesantan jer prema dosadašnjim saznanjima, genomsko utiskivanje među evolutivno bliskim vrstama pokazuje nisku stopu konzervisanosti (Hatorangan i sar., 2016). Ovo podržava hipotezu da sinteza auksina nakon oplodjenja predstavlja evolutivno konzervisan mehanizam koji obezbeđuje normalno razviće endosperma kod cvetnica (Hatorangan i sar., 2016). Takođe, nekoliko gena identifikovanih kao PEG kod različitih biljnih vrsta imaju ulogu epigenetičkih regulatora, uključujući hromatin remodelirajuće faktore i histon H3K9 metiltransferazne gene. Na primer, *SU(VAR)3-9 Homolog 7 A. thaliana* kodira protein

koji sadrži SET domen sa histon metiltransferaznom funkcijom, učestvuje u uspostavljanju postfertilizacione hibridizacione barijere (Wolff i sar., 2015).

### 5.5. Model funkcije EML proteina

Na osnovu pokazanih rezultata, postavljena je hipoteza o ulozi EML1 i EML3 kao regulatora nivoa auksina pre i nakon oplodjenja u cilju odvijanja normalnog razvića semena. Činjenica da je ekspresija markera biosintetičkog puta auksina, *YUC10*, gena koji je normalno eksprimiran nakon oplodjenja, detektovana u semenim zamecima dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta, takođe ide u prilog ovoj hipotezi (Slika 25). Predložena uloga EML proteina nakon oplodjenja je podržana i detaljnijom GO analizom koja je pokazala da se među genima čija je ekspresija povišena, a uključeni su u signalnu transdukciju i transport auksina, nalaze: receptor auksina AFB1, influks transporteri auksina LAX2 i LAX3, efluks transporteri auksina ABCB4 i ABCB19, kao i vakuolarni transporter auksina WAT1. Ovi geni imaju isti ili sličan ekspresioni obrazac kao i *EML1* i *EML3* tokom rane embriogeneze (Dharmasiri i sar., 2005; Robert i sar., 2015). PGP4 i PGP19 su uključeni u efluks auksina (Cho i sar., 2012; Cho i sar., 2014), dok je njihov homolog PGP10 uključen u transport auksina od endosperma do integumenata (Fugueiredo i sar., 2016). Rezultati pokazuju da *Arabidopsis* koristi sveobuhvatnu mrežu represivnih mehanizama u cilju sprečavanja ekspresije postfertilizacionih gena u ženskom gametofitu. Pored toga što su deo represivne mašinerije koja sprečava preuranjeno delovanje auksina i razviće semena pre oplodjenja, EML proteini deluju neposredno nakon oplodjenja kako bi se osigurao uravnoteženi doprinos roditeljskih genoma, čime moduliraju signalne puteve auksina i njegov transport. Na osnovu fenotipa dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta (Slika 17) i lokalizacije EML1 i EML3 proteina u integumentima (Slika 14), predložen je model funkcije EML1 i EML3 gde se naglašava njihova uloga u reprimiranju delovanja auksina u integumentima pre oplodjenja (Slika 30a). Na osnovu ovih rezultata i literaturnih podataka, radna hipoteza je da EML proteini, zajedno sa FIS-PRC2, imaju ulogu u utišavanju efekta auksina u centralnoj ćeliji. Za razliku od *fis* mutanata kod kojih se u odsustvu oplodjenja endosperm kompletno razvija, kod demaskuliniziranog dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta dolazi samo do inicijacije razvića endosperma, verovatno jer je u ovom mutant FIS-PRC2 mehanizam represije i dalje funkcionalan.

Inicijacija razvića endosperma kod dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta dovodi do uvećanja obima semenih zametaka i razvića semenjače, čime oni oponašaju mutante kod kojih je sadržaj polenove cevi oslobođen u odsustvu fertilizacije (Kasahara i sar., 2016; Zhong i sar., 2017). Auksin sintetisan u endospermu transportuje se do integumenata dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta, gde je nivo auksinskog odgovora već povišen zbog nedostatka EML funkcije, što dovodi do formiranja semenjače. Takođe, transport auksina do jajne ćelije dovodi do inicijacije razvića embriona. Ova hipoteza je potkrepljena nedavnim istraživanjima u kojima je pokazano da se nivo auksina povećava nakon oprašivanja i da je ovaj maternalni signal neophodan za normalnu embriogenezu (Robert i sar., 2018). Analiza endogenog sadržaja auksina u različitim delovima semena dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta, bi omogućila razjašnjavanje ove hipoteze. Predloženi model je konzistentan sa fenotipom uočenim nakon demaskulinizacije dvostrukog *eml1-2 eml3-4* mutanta i objašnjava mehanizam kojim nedostatak *EML1* i *EML3* funkcije dovodi do apomiksije. Pretpostavka je da nakon oplodjenja, *EML1* i *EML3*, iz muškog i ženskog gametofita, nastavljaju da vrše funkciju represora signala auksina (Slika 30b).



Slika 30. Model delovanja EML proteina

Budući eksperimentalni pristup podrazumeva rasvetljavanje mehanizma kojim su EML proteini kao proteini čitači uključeni u transport auksina i kojim kontrolišu roditeljsku ravnotežu tokom ranih faza razvića semena, što će biti ključno za potpunije razumevanje uloge EML tokom razvića semena.

## **5.6. Razvoj tehnologije apomiksije u poljoprivredi**

Procenjuje se da će do 2050. godine, potreba za proizvodnjom hrane za 50 do 70% nadmašiti trenutni nivo potreba kako bi predviđena brojnost populacije od preko 9 milijardi ljudi uspela da se prehrani (Jaggard i sar., 2010). Usled negativnog uticaja klimatskih promena neophodno je i postojanje novih superiornijih kultivara koji bi bili poboljšani u poređenju sa sadašnjim kultivarima ne samo u pogledu prinosa, nego i što se tiče efikasnijeg usvajanja vode i azota iz zemljišta. Takođe, oni bi morali biti otporniji i na delovanje biotičkog i abiotičkog stresa (Wheeler, 2015). Klasičnim procesima oplemenjivanja i selekcije biljaka, u proseku je potrebno 7 do 12 godina za propagaciju novog kultivara i pojavljivanja njegovog proizvoda na tržištu. Međutim, zanimljivo je da se fiksiranje genotipa javlja i prirodno u određenim biljnim vrstama procesom apomiksije. Teoretski, apomiksija može smanjiti vremenski okvir stvaranja novih kultivara (Acquaah, 2009). Uspešna primena fenomena apomiksije u stvaranju novih hibridnih genotipova bi mogla dovesti do nove agrikulturne revolucije koja bi imala i ekonomski i socijalni benefit za društvo. S druge strane, primena apomiksije u cilju stvaranja novih poljoprivredno značajnih hibrida zahteva podrobnije poznavanje mehanizama koji regulišu reproduktivno razviće biljaka. Pokušaji uvođenja gena koji regulišu apomiksiju iz prirodnih apomiktičnih vrsta u kultivarske biljne vrste procesom ukrštanja, do danas su zabeleženi kao neuspeli (npr. iz *Tripsacum* u kukuruz) (Leblanc i sar., 2004). Genomsko utiskivanje kao i efekat doze gena predstavlja barijeru za razvoj aseksualne reprodukcije kod biljaka i životinja (Reik i sar., 2001; Spillane i sar., 2004; Baroux i sar., 2002). Apomiksija je proces regulisan velikim brojem gena čija je ekspresija tkivno-specifična i vremenski ograničena, tako da je teško izolovati pojedinačne gene koji kontrolišu seksualnu i aseksualnu reprodukciju u apomiktičnim biljkama. O genetičkoj regulaciji ovog procesa se još uvek nedovoljno zna. Ipak, iz godine u godinu sve je veći broj identifikovanih gena povezanih sa procesom apomiksije. Primera radi, to su *SERK* (Albertini i sar., 2005; Podio i sar., 2014), *LEC*

(Fambrini i sar., 2006), i *MSH1* (Guitton i Berger, 2005). Postoji relativno malo studija o molekularnoj regulaciji apomiksije, ali je postignut dovoljno veliki broj rezultata, koji su postavili solidnu osnovu za dalje studije. Istraživanja su pokazala da su modifikacije hromatina, siRNK i metilacija DNK uključeni u regulaciju ekspresije gena na transkripcionom i posttranskripcionom nivou (Garcia-Aguilar i sar., 2010; Spielman i sar., 2003; Ferreira i sar., 2018; Albertini i sar., 2005). U procesu seksualne reprodukcije, hormoni su takođe važni faktori uključeni u regulacije mitoze kao i diferencijacije oplođenih jajnih ćelija. Pod stimulacijom egzogenih steroidnih hormona (estron, androsteron, progesterone, epibrasinolid) kao i auksina, *Arabidopsis thaliana* može da kompletira razviće endosperma bez oplodjenja (Rojek i sar., 2015; Figueiredo i sar., 2015; Figueiredo i sar., 2016). Rezultati proistekli iz ove studije pokazuju da se nedostatak EML funkcije, koju karakteriše preuranjena ekspresija gena koji učestvuju u regulaciji signalnog puta i transporta auksina u ženskom gametofitu, može iskoristiti za inženjering apomiktičkih semena. Isto tako, lako je zamisliti da bi povećana doza EML sprečila potpuni prekid razvića semenih zametaka ili formiranog semena u međuvrsnim ukrštanjima. Uz otkrivanje ovog potencijalnog regulatornog mehanizma, razvoj apomikta i novih međuvrsnih hibrida bio bi dostupan.

### **5.7. EML1 i EML3 - čitači modifikacija histona**

Histoni imaju dinamičku ulogu u regulaciji strukture hromatina i aktivnosti gena. Histoni u region hromatina podležu različitim tipovima modifikacija koje određuju interakciju između histona i DNK, kao i nehistskih proteina sa hromatinom i ova epigenetička informacija se označava kao „histonski kod” (Strahl i Allis, 2000). Proteini koji u svojoj strukturi sadrže Tudor tj. Agenet domen, pripadaju velikoj grupi čitača histonskih modifikacija koji su specijalizovani za vezivanje za metilovane aminokiseline lizin i/ili arginin na repovima histone i time omogućavaju razumevanje histonskog koda (Liu i Min, 2016). Mala podgrupa biljnih proteina pored Tudor/Agenet domena, sadrži i ENT domen, koji je homologan humanom EMSY domenu BRCA2 proteina (Hughes-Davies i sar., 2003). Jedan od prvih opisanih proteina iz ove subgrupe proteina, je RIF1 (eng. *R-Interacting Factor 1*), protein koji je identifikovan u kukuruzu kao regulator gena u biosintetskom putu antocijanina (Hernandez i sar., 2007). Analize srodnosti pokazale su bliske filogenetske veze EML proteina *A. thaliana* koji u svojoj



strukturi poseduju ENT i Agenet domen, sa proteinima slične građe poreklom iz drugih biljnih vrsta. Na Slici 10 može se uočiti da je ENT/Agenet strukturalna organizacija konzervisana između divergentnih biljnih vrsta i da se proteini sa ovakvom strukturom mogu naći ne samo kod skrivenosemenica nego i kod zelenih algi, mahovina kao i kod prečica. Broj studija o novootkrivenim PTM se neprestano povećava, međutim još uvek se nedovoljno zna o proteinima čitačima koji ih prepoznaju i za njih se vezuju, a naročito o posledicama koje nastaju združenim efektima čitača sa hromatinom (Andrews i sar., 2016; Liu i Min, 2016).

Nekoliko rezultata potvrđuju da EML1 i EML3 predstavljaju čitače modifikacija histona kod *A. thaliana*. Pre svega, i EML1 i EML3 u svojoj strukturi poseduju Agenet domen, homolog Tudor domena, koji je identifikovan kod životinja i za koji je demonstrirana funkcija vezivanja za metilovane aminokiseline lizin i arginin (Ballare i sar., 2012; Musselman i sar., 2012; Maurer-Stroh i sar., 2003). Za potvrdu funkcije EML1 i EML3 kao čitača histonskih modifikacija, korišćen je pristup heterologne ekspresije u *E. coli* za dobijanje rekombinantnih proteina. U eksperimentima ko-immunoprecipitacije u *N. benthamiana* je demonstrirano vezivanje EML1 i EML3 proteina za nukleozome, direktnim vezivanjem za histon H3. Specifičnost vezivanja za PTM histone H3 je utvrđena vezivanjem EML proteina za histonski proteinski čip. Rezultati ovog eseja pokazuju da se EML1 i EML3 vezuju isključivo za H3K36 i ne pokazuju specifičnost samo za jedan tip modifikacije. Naime, iako postoji veći afinitet prema H3K36me3, oba proteina se takođe vezuju i za peptide koji sadrže mono-, di-, i tri-metilovan H3K36, kao i acetilovan H3K36 i nemodifikovane rezidue H3K36. Ovakvo nespecifično vezivanje može biti objašnjeno ograničenjima koja postoje u postavci samog *in vitro* eksperimenta. S druge strane, „promiskuitetno” vezivanje može biti i posledica same strukture Agenet domena. Naime, višestruko poravnanje sekvenci prikazano na Slici 31 pokazuje visok stepen evolutivne konzervacije između sekvenci Agenet domena EML1 i EML3 proteina, i drugih članova familije, EML2 i EML4, ali i drugih proteina *A. thaliana* kodiranih od strane *AT1G80810*, *AT4G31880*, i *AT5G10950* koji u svojoj strukturi poseduju Tudor/PWWP/MBT domen. Poređenjem biljnih sa humanim proteinima koji sadrže Tudor domen, PHD Finger Protein 1 (PHF1) i PHD Finger Protein 19 (PHF19), i imaju sposobnost vezivanja za H3K36 modifikacije, uočeno je da su kod biljnih proteina prisutne samo tri od četiri aminokiseline koje formiraju

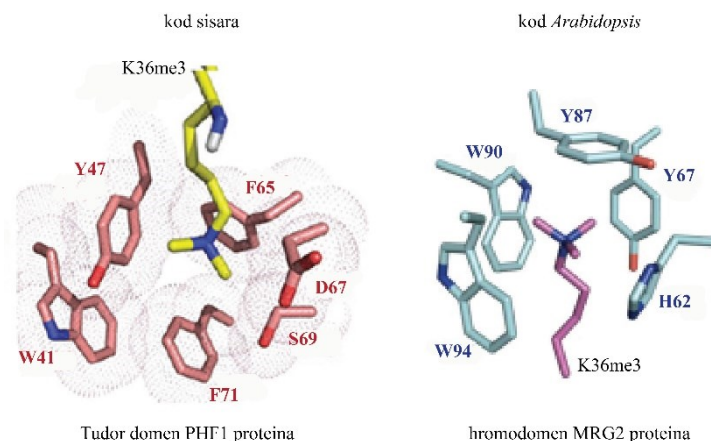
aromatični kavez sa ulogom vezivanja za H3K36me3 (Musselman i sar., 2012). Studije modelovanja, tj. predviđanja sekundarne stukture proteina, sugerišu da se Agenet domen EML proteina sastoji od četiri  $\beta$  ploče koji formira strukturu nalik Tudor domenu PHF1 (Cai i sar., 2013; Brasil i sar., 2015) i hromodomenu MRG2 (Bu i sar., 2014) (Slika 32). Iako Agenet domeni EML1 i EML3 formiraju  $\beta$  konformaciju karakterističnu za proteine iz kraljevske familije proteina, njihova primarna sekvenca ukazuje na odsustvo aromatičnog kaveza, što može dovesti do odstupanja od specifičnosti za H3K36me3 PTM i njihovog „promiskuitetnog” vezivanja za više modifikacija. Takođe, EML1 i EML3 mogu imati veoma sličan afinitet vezivanja za target sekvence, ali predstavljaju komponente različitih proteinskih kompleksa koji uslovljavaju različita funkcionalna stanja.

```

PHF1      R P R L W E G Q D V L A R W T - D G L L Y L G T I K K V D S A R E V C L V Q F E D D S Q F L V L - - - - -
PHF19     M S K L T E G Q Y V L C R W T - D G L Y L G K I K R V S S S K Q S C L V T F E D N S K Y W V L - - - - -
EML4      - - E S F L G R R V R T K W P E D N T F Y D A I I T Q Y N P V E G R H A L V Y D I A - - - - - T P S E T W E W V R L S
EML1      - A E A L I G R K V W T K W P E D N H F Y E A I I T Q Y N A D E G R H A L V Y D I H - - - - - A A N E T W E W - - - -
EML2      - A E A L I G R K V W T K W P E D N S F Y E A V V T Q Y N A N E G R H A L V Y D I N - - - - - T V N E T W E W V D L N
EML3      - Y D P L V G R K V W T K W P D D N Q Y Y E A V I T D Y N P V E G R H A L V Y D I N - - - - - S A N E T W E W - - - -
AT1G80810 - G E D L V G K R V N I W W P L D K T F Y E G V I D S Y C T R K K M H R V I Y S D G D S E E L N L T E E R W E L L E D D
AT4G31880 - G E S L V G S R I K V W W P M D Q A Y Y K G V V E S Y D A A K K K H L V I Y D D G D Q E I L Y L K N Q K W S P L D E S
AT5G10950 - G E A L V G S R I R V W W P M D S K F Y K G V V D S Y V S S K K K H R V F Y E D G D K E T L D L K K E R W E L I E - -
          * : * * * . : . : .

```

**Slika 31. Agenet domeni imaju nekompletan aromatični kavez/džep.** Višestruko poravnanje sekvenci Agenet domena EML1-4, tri *Arabidopsis* proteina sa Tudor/PWWP/MBT domenima (AT1G80810, AT4G31880, i AT5G10950) koji pokazuju procentualno visok stepen aminokiselinske sličnosti sa EML Agenet domenima, kao i Tudor domena strukturnih homologa animalnih proteina PHF1 i PHF19, uz pomoć ClustalW2. Sivo osenčeni aminokiselinski ostaci kod PHF1 i PHF19 su konzervisani aromatični ostaci neophodni za formiranje aromatičnog kaveza za H3K36me3 vezivanje. Zvezdica obeležava identične ostatke, dok su tačke oznake za slične aminokiselinske ostatke različitih stepena evolutivne očuvanosti.



**Slika 32. Primeri pozicioniranja i vezivanja H3K36me3 modifikacije u okviru aromatičnog kaveza/džepa:** Tudor domena PHF1 kod sisara i hromodomena MRG2 kod *A. thaliana* (preuzeto i modifikovano prema Cai i sar., 2013 i Bu i sar., 2014.)

Zhao i saradnici (2018) su nedavno objavili karakterizaciju nekoliko novih čitača modifikacija histona kod *A. thaliana*, među njima i EML1. Iako su rezultati ove studije pokazali da se EML1 vezuje i za H3K36me3 i za H3K4me3, afinitet vezivanja je bio veći za H3K4me3. Nasuprot ovome, rezultati ovog rada nisu potvrdili vezivanje EML1 ni za jedan od 37 peptida u sastavu histonskog proteinskog čipa koji sadrži H3K4me3 modifikaciju, ni u jednom biološkom ponavljanju (Cousey i sar., 2018). Razlike u afinitetu vezivanja mogu se objasniti korišćenjem EML1 proteina pune dužine za testiranje interakcija sa različitim modifikacijama u ovom radu, dok su Zhao i saradnici (2018) koristili samo Agenet domen. Može se pretpostaviti da prisustvo ENT domena na N-terminalnom kraju EML proteina menja i usmerava specifičnost vezivanja ka H3K36me3 modifikaciji.

Kod metazoa i kvasaca, H3K36me3 dovodi do transkripcione aktivacije ciljnih gena, uključenih u procese regulacije transkripcije i alternativne obrade transkripta (eng. *splicing*), popravke DNK i represije intragenske transkripcije (Carozza i sar., 2005; Joshi i Struhl, 2005; Mikkelsen i sar., 2007; Luco i sar., 2010; Li i sar., 2013). Do sada je u literaturi opisana karakterizacija samo jedne familije proteina koja ima sposobnost vezivanja i čitanja H3K36 modifikacija kod biljaka. Bu i saradnici (2014) su pokazali da su MRG1 i MRG2 dvostruki čitači koji imaju funkciju regulacije ekspresije gena uključenih u fotoperiodizam i regulaciju cvetanja prepoznavanjem dve različite modifikacije histona- H3K4me3 and H3K36me3. Ovi proteini u svojoj strukturi imaju

hromodomene, pripadnike kraljevske familije proteina čitača, koji se vezuju za modifikovane histone. Dvostruko vezivanje čitača je prepoznato i kod MRG702 proteina u pirinču. MRG702 je inače, homolog MRG1 tj. MRG2 (Jin i sar., 2015). Kod *A. thaliana*, H3K36me3 i H3K27me3 modifikacije imaju antagonističku ulogu u regulaciji ekspresije *FLC* i utisnutog gena *MOP9.5* (Yang i sar., 2014; Cheng i sar., 2018). Iako na prvi pogled rezultati ovog istraživanja da EML1 i EML3 kao čitači H3K36me3 modifikacije imaju represivnu ulogu sličnu PRC2 kompleksu mogu izgledati kontradiktorno, ovakva uloga ne bi predstavljala presedan. Primera radi, Tudor domeni humanih PHF1 i PHF19 proteina, koji predstavljaju čitače H3K36me3, interaguju sa PRC2 kompleksom dovodeći do širenja H3K27me3, modifikacije koja ima ulogu u represiji transkripcije, duž euhromatina (Cai i sar., 2013). Stoga, može se pretpostaviti da vezivanje EML za modifikacije prisutne u transkripciono aktivnom hromatinu ima ulogu u uspostavljanju i održavanju fakultativnog heterohromatina i da na taj način EML čitači kontrolišu aktivnost gena u zavisnosti od stanja hromatina.

## 6. Zaključci

- Na osnovu analize *in vitro* i *in vivo* vezivanja, utvrđeno je da su EML1 i EML3 čitači histonskih modifikacija, sa preferencijom za H3K36me3 modifikaciju.
- Studije lokalizacije proteina su pokazale da EML1 i EML3 igraju ulogu u gametofitu pre procesa oplodjenja. Takođe, prisustvo EML1 i EML3 proteina u različitim delovima semena, ukazuje na njihovu regulatornu funkciju i nakon oplodjenja kada oba proteina najverovatnije imaju preklopljenje uloge u embrionu i semenjači, dok je uloga EML1 zastupljenija tokom razvića endosperma.
- Analizom *eml* mutantnih biljaka pokazano je da EML1 i EML3 imaju maternalnu regulatornu ulogu, koja se ogleda u održavanju fertilizacionog potencijala semenih zametaka, što omogućava uspešno oplodjenje. Funkcija ovih proteina je zavisna od njihove doze, koja nakon oplodjenja omogućava normalno razviće embriona.
- Fenotipskom analizom je ustanovljeno da su i EML1 i EML3 neophodni za prevenciju razvića semena *A. thaliana* u odsustvu oplodjenja.
- Funkcija EML1 i EML3 je regulacija transporta i signalne transdukcije auksina što dovodi do represije paternalne genske ekspresije.
- Na osnovu svih priloženih rezultata može se izvesti zaključak da *EML* geni imaju krucijalnu ulogu tokom razvića semena *A. thaliana*, i da ovaj regulatorni mehanizam predstavlja kontrolnu tačku za održanje ravnoteže udela roditeljskih genoma nakon oplodjenja.
- Funkcionalna karakterizacija EML proteina u *A. thaliana* je omogućila korak napred koji vodi ka stvaranju novih apomiktičnih vrsta kao i međuvrskih hibrida značajnih za poljoprivredu.

## 7. Literatura

- ACQUAHH, G. 2009. *Principles of plant genetics and breeding*, John Wiley & Sons.
- ADAMS, S., VINKENOOG, R., SPIELMAN, M., DICKINSON, H. G. & SCOTT, R. J. 2000. Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana* require DNA methylation. *Development*, 127, 2493-2502.
- AGUIRRE, M., KIEGLE, E., LEO, G. & EZQUER, I. 2018. Carbohydrate reserves and seed development: An overview. *Plant reproduction*, 31, 263-290.
- ALBERTINI, E., MARCONI, G., REALE, L., BARCACCIA, G., PORCEDDU, A., FERRANTI, F. & FALCINELLI, M. 2005. SERK and APOSTART. Candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. *Plant Physiology*, 138, 2185-2199.
- ALEXANDER, M. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain technology*, 44, 117-122.
- ALVAREZ-BUYLLA, E. R., BENITEZ, M., CORVERA-POIRE, A., CHAOS CADOR, A., DE FOLTER, S., GAMBOA DE BUEN, A., GARAY-ARROYO, A., GARCIA-PONCE, B., JAIMES-MIRANDA, F., PEREZ-RUIZ, R. V., PINEYRO-NELSON, A. & SANCHEZ-CORRALES, Y. E. 2010. Flower development. *Arabidopsis Book*, 8, e0127.
- ANDERSON, L. E. 1954. Hoyer's solution as a rapid permanent mounting medium for bryophytes. *The bryologist*, 57, 242-244.
- ANDREWS, F. H., STRAHL, B. D. & KUTATELADZE, T. G. 2016. Insights into newly discovered marks and readers of epigenetic information. *Nature chemical biology*, 12, 662.
- ARIEL, F., JEGU, T., LATRASSE, D., ROMERO-BARRIOS, N., CHRIST, A., BENHAMED, M. & CRESPI, M. 2014. Noncoding transcription by alternative RNA polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. *Molecular cell*, 55, 383-396.
- BALLARÉ, C., LANGE, M., LAPINAITE, A., MARTIN, G. M., MOREY, L., PASCUAL, G., LIEFKE, R., SIMON, B., SHI, Y. & GOZANI, O. 2012. Phf19 links methylated Lys36 of histone H3 to regulation of Polycomb activity. *Nature structural & molecular biology*, 19, 1257.
- BARCACCIA, G. & ALBERTINI, E. 2013. Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma. *Plant reproduction*, 26, 159-179.
- BARLOW, D. P. 2011. Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model. *Annual review of genetics*, 45, 379-403.
- BAROUX, C., GAGLIARDINI, V., PAGE, D. R. & GROSSNIKLAUS, U. 2006. Dynamic regulatory interactions of Polycomb group genes: MEDEA autoregulation is required for imprinted gene expression in *Arabidopsis*. *Genes & development*, 20, 1081-1086.
- BAROUX, C., SPILLANE, C. & GROSSNIKLAUS, U. 2002. Evolutionary origins of the endosperm in flowering plants. *Genome Biology*, 3, reviews1026. 1.
- BARRETO, G., SCHAFER, A., MARHOLD, J., STACH, D., SWAMINATHAN, S. K., HANDA, V., DODERLEIN, G., MALTRY, N., WU, W., LYKO, F. & NIEHRS, C. 2007. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature*, 445, 671-5.
- BAUD, S., WUILLEME, S., LEMOINE, R., KRONENBERGER, J., CABOCHE, M., LEPINIEC, L. & ROCHAT, C. 2005. The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 43, 824-836.
- BEMER, M. & GROSSNIKLAUS, U. 2012. Dynamic regulation of Polycomb group activity during plant development. *Current opinion in plant biology*, 15, 523-529.
- BERGER, F. 2003. Endosperm: the crossroad of seed development. *Current opinion in plant biology*, 6, 42-50.

- BERGER, S. L., KOUZARIDES, T., SHIEKHATTAR, R. & SHILATIFARD, A. 2009. An operational definition of epigenetics. *Genes & development*, 23, 781-783.
- BERKE, L. & SNEL, B. 2015. The plant Polycomb repressive complex 1 (PRC1) existed in the ancestor of seed plants and has a complex duplication history. *BMC evolutionary biology*, 15, 44.
- BERR, A., SHAFIQ, S. & SHEN, W.-H. 2011. Histone modifications in transcriptional activation during plant development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1809, 567-576.
- BICKNELL, R., CATANACH, A., HAND, M. & KOLTUNOW, A. 2016. Seeds of doubt: Mendel's choice of *Hieracium* to study inheritance, a case of right plant, wrong trait. *Theoretical and Applied Genetics*, 129, 2253-2266.
- BICKNELL, R. A. & KOLTUNOW, A. M. 2004. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *The Plant Cell*, 16, S228-S245.
- BLANC, R. S. & RICHARD, S. 2017. Arginine methylation: the coming of age. *Molecular cell*, 65, 8-24.
- BOBADILLA, R. & BERR, A. 2016. Histone Methylation-A Cornerstone for Plant Responses to Environmental Stresses? *Abiotic and Biotic Stress in Plants-Recent Advances and Future Perspectives*. InTech.
- BORG, M., BROWNFIELD, L. & TWELL, D. 2009. Male gametophyte development: a molecular perspective. *Journal of experimental botany*, 60, 1465-1478.
- BORGES, F., PARENT, J.-S., VAN EX, F., WOLFF, P., MARTÍNEZ, G., KÖHLER, C. & MARTIENSSSEN, R. A. 2018. Transposon-derived small RNAs triggered by miR845 mediate genome dosage response in Arabidopsis. *Nature genetics*, 1.
- BRAJUŠKOVIC, G. 2012. Molekularna biologija 2. Savremena administracija, Beograd.
- BRASIL, J. N., CABRAL, L. M., ELOY, N. B., PRIMO, L. M., BARROSO-NETO, I. L., GRANGEIRO, L. P. P., GONZALEZ, N., INZÉ, D., FERREIRA, P. C. & HEMERLY, A. S. 2015. AIP1 is a novel Agenet/Tudor domain protein from Arabidopsis that interacts with regulators of DNA replication, transcription and chromatin remodeling. *BMC plant biology*, 15, 270.
- BRATZEL, F., LÓPEZ-TORREJÓN, G., KOCH, M., DEL POZO, J. C. & CALONJE, M. 2010. Keeping cell identity in Arabidopsis requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination. *Current Biology*, 20, 1853-1859.
- BRUKHIN, V. 2017. Molecular and genetic regulation of apomixis. *Russian Journal of Genetics*, 53, 943-964.
- BU, Z., YU, Y., LI, Z., LIU, Y., JIANG, W., HUANG, Y. & DONG, A.-W. 2014. Regulation of Arabidopsis flowering by the histone mark readers MRG1/2 via interaction with CONSTANS to modulate FT expression. *PLoS genetics*, 10, e1004617.
- BUSHELL, C., SPIELMAN, M. & SCOTT, R. J. 2003. The basis of natural and artificial postzygotic hybridization barriers in Arabidopsis species. *The Plant Cell*, 15, 1430-1442.
- CAI, L., ROTHBART, S. B., LU, R., XU, B., CHEN, W.-Y., TRIPATHY, A., ROCKOWITZ, S., ZHENG, D., PATEL, D. J. & ALLIS, C. D. 2013. An H3K36 methylation-engaging Tudor motif of polycomb-like proteins mediates PRC2 complex targeting. *Molecular cell*, 49, 571-582.
- CALONJE, M., SANCHEZ, R., CHEN, L. & SUNG, Z. R. 2008. EMBRYONIC FLOWER1 participates in polycomb group-mediated AG gene silencing in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20, 277-291.
- CARROZZA, M. J., LI, B., FLORENS, L., SUGANUMA, T., SWANSON, S. K., LEE, K. K., SHIA, W.-J., ANDERSON, S., YATES, J. & WASHBURN, M. P. 2005. Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell*, 123, 581-592.

- CHAUDHURY, A. M., MING, L., MILLER, C., CRAIG, S., DENNIS, E. S. & PEACOCK, W. J. 1997. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 4223-4228.
- CHEN, C., BEGCY, K., LIU, K., FOLSOM, J. J., WANG, Z., ZHANG, C. & WALIA, H. 2016. Heat stress yields a unique MADS box transcription factor in determining seed size and thermal sensitivity. *Plant physiology*, 171, 606-622.
- CHEN, D., MOLITOR, A., LIU, C. & SHEN, W.-H. 2010. The Arabidopsis PRC1-like ring-finger proteins are necessary for repression of embryonic traits during vegetative growth. *Cell research*, 20, 1332.
- CHEN, L.-Q., QU, X.-Q., HOU, B.-H., SOSSO, D., OSORIO, S., FERNIE, A. R. & FROMMER, W. B. 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science*, 335, 207-211.
- CHENG, L., SHAFIQ, S., XU, W. & SUN, Q. 2018. EARLY FLOWERING IN SHORT DAYS (EFS) regulates the seed size in Arabidopsis. *Science China Life Sciences*, 61, 214-224.
- CHO, M., HENRY, E. M., LEWIS, D. R., WU, G., MUDAY, G. K. & SPALDING, E. P. 2014. Block of ATP-binding cassette B19 ion channel activity by 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid impairs polar auxin transport and root gravitropism. *Plant physiology*, 166, 2091-2099.
- CHO, M., LEE, Z.-W. & CHO, H.-T. 2012. ATP-binding cassette B4, an auxin-efflux transporter, stably associates with the plasma membrane and shows distinctive intracellular trafficking from that of PIN-FORMED proteins. *Plant physiology*, 159, 642-654.
- CHOI, Y., GEHRING, M., JOHNSON, L., HANNON, M., HARADA, J. J., GOLDBERG, R. B., JACOBSEN, S. E. & FISCHER, R. L. 2002. DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in Arabidopsis. *Cell*, 110, 33-42.
- COLETTE, A., LU, K.-J. & WEIJERS, D. 2015. Building a plant: cell fate specification in the early Arabidopsis embryo. *Development*, 142, 420-430.
- COMMITTEE, E. P. 2012. Reading the second code: Mapping epigenomes to understand plant growth, development, and adaptation to the environment. *The Plant Cell*, 24, 2257-2261.
- CORTELLINO, S., XU, J., SANNAI, M., MOORE, R., CARETTI, E., CIGLIANO, A., LE COZ, M., DEVARAJAN, K., WESSELS, A. & SOPRANO, D. 2011. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell*, 146, 67-79.
- COURSEY, T., MILUTINOVIC, M., REGEDANZ, E., BRKLJACIC, J. & BISARO, D. M. 2018. Arabidopsis Histone Reader EMSY-LIKE 1 Binds H3K36 and Suppresses Geminivirus Infection. *Journal of virology*, JVI. 00219-18.
- CREFF, A., BROCARD, L. & INGRAM, G. 2015. A mechanically sensitive cell layer regulates the physical properties of the Arabidopsis seed coat. *Nature Communications*, 6, 6382.
- D'ERFURTH, I., JOLIVET, S., FROGER, N., CATRICE, O., NOVATCHKOVA, M. & MERCIER, R. 2009. Turning meiosis into mitosis. *PLoS biology*, 7, e1000124.
- DERKACHEVA, M. & HENNIG, L. 2013. Variations on a theme: Polycomb group proteins in plants. *Journal of experimental botany*, 65, 2769-2784.
- DHALLUIN, C., CARLSON, J. E., ZENG, L., HE, C., AGGARWAL, A. K. & ZHOU, M.-M. 1999. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, 399, 491.
- DHARMASIRI, N., DHARMASIRI, S., WEIJERS, D., LECHNER, E., YAMADA, M., HOBBI, L., EHRISMANN, J. S., JÜRGENS, G. & ESTELLE, M. 2005. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Developmental cell*, 9, 109-119.
- DILKES, B. P. & COMAI, L. 2004. A differential dosage hypothesis for parental effects in seed development. *The Plant Cell*, 16, 3174-3180.



- DOBIN, A., DAVIS, C. A., SCHLESINGER, F., DRENKOW, J., ZALESKI, C., JHA, S., BATUT, P., CHAISSON, M. & GINGERAS, T. R. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29, 15-21.
- DODEMAN, V. L., DUCREUX, G. & KREIS, M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48, 1493-1509.
- DREWS, G. N., LEE, D. & CHRISTENSEN, C. A. 1998. Genetic analysis of female gametophyte development and function. *The Plant Cell*, 10, 5-17.
- DU, J., JOHNSON, L. M., JACOBSEN, S. E. & PATEL, D. J. 2015. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16, 519.
- DU, J., ZHONG, X., BERNATAVICHUTE, Y. V., STROUD, H., FENG, S., CARO, E., VASHISHT, A. A., TERRAGNI, J., CHIN, H. G. & TU, A. 2012. Dual binding of chromomethylase domains to H3K9me2-containing nucleosomes directs DNA methylation in plants. *Cell*, 151, 167-180.
- EDWARDS, K., JOHNSTONE, C. & THOMPSON, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research*, 19, 1349.
- ENDRESS, P. K. 2011. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. *Annals of Botany*, 107, 1465-1489.
- ERDMANN, R. M., SATYAKI, P. R., KLOSINSKA, M. & GEHRING, M. 2017. A Small RNA Pathway Mediates Allelic Dosage in Endosperm. *Cell reports*, 21, 3364-3372.
- ERILOVA, A., BROWNFIELD, L., EXNER, V., ROSA, M., TWELL, D., SCHEID, O. M., HENNIG, L. & KÖHLER, C. 2009. Imprinting of the polycomb group gene MEDEA serves as a ploidy sensor in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, 5, e1000663.
- FAMBRINI, M., DURANTE, C., CIONINI, G., GERI, C., GIORGETTI, L., MICHELOTTI, V., SALVINI, M. & PUGLIESI, C. 2006. Characterization of LEAFY COTYLEDON1-LIKE gene in Helianthus annuus and its relationship with zygotic and somatic embryogenesis. *Development genes and evolution*, 216, 253.
- FERREIRA, L. G., DE ALENCAR DUSI, D. M., IRSIGLER, A. S. T., GOMES, A. C. M. M., MENDES, M. A., COLOMBO, L. & DE CAMPOS CARNEIRO, V. T. 2018. GID1 expression is associated with ovule development of sexual and apomictic plants. *Plant cell reports*, 37, 293-306.
- FIGUEIREDO, D. D., BATISTA, R. A. & KOHLER, C. 2018. Auxin regulates endosperm cellularization in Arabidopsis. *bioRxiv*, 239301.
- FIGUEIREDO, D. D., BATISTA, R. A., ROSZAK, P. J., HENNIG, L. & KÖHLER, C. 2016. Auxin production in the endosperm drives seed coat development in Arabidopsis. *Elife*, 5.
- FIGUEIREDO, D. D., BATISTA, R. A., ROSZAK, P. J. & KÖHLER, C. 2015. Auxin production couples endosperm development to fertilization. *Nature plants*, 1, 15184.
- FIGUEIREDO, D. D. & KÖHLER, C. 2014. Signalling events regulating seed coat development. Portland Press Limited.
- FIGUEIREDO, D. D. & KÖHLER, C. 2018. Auxin: a molecular trigger of seed development. *Genes & development*, 32, 479-490.
- FLOREZ-RUEDA, A. M., PARIS, M., SCHMIDT, A., WIDMER, A., GROSSNIKLAUS, U. & STÄDLER, T. 2016. Genomic imprinting in the endosperm is systematically perturbed in abortive hybrid tomato seeds. *Molecular biology and evolution*, 33, 2935-2946.
- FRIML, J., VIETEN, A., SAUER, M., WEIJERS, D., SCHWARZ, H., HAMANN, T., OFFRINGA, R. & JÜRGENS, G. 2003. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature*, 426, 147.
- GARCIA-AGUILAR, M., MICHAUD, C., LEBLANC, O. & GRIMANELLI, D. 2010. Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes. *The Plant Cell*, 22, 3249-3267.

- GARCIA, D., GERALD, J. N. F. & BERGER, F. 2005. Maternal control of integument cell elongation and zygotic control of endosperm growth are coordinated to determine seed size in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17, 52-60.
- GAUDIN, V., LIBAULT, M., POUTEAU, S., JUUL, T., ZHAO, G., LEFEBVRE, D. & GRANDJEAN, O. 2001. Mutations in LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 affect flowering time and plant architecture in Arabidopsis. *Development*, 128, 4847-4858.
- GEHRING, M. 2013. Genomic imprinting: insights from plants. *Annual Review of Genetics*, 47.
- GEHRING, M., CHOI, Y. & FISCHER, R. L. 2004. Imprinting and seed development. *The Plant Cell*, 16, S203-S213.
- GEHRING, M., HUH, J. H., HSIEH, T.-F., PENTERMAN, J., CHOI, Y., HARADA, J. J., GOLDBERG, R. B. & FISCHER, R. L. 2006. DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *cell*, 124, 495-506.
- GOLDBERG, R. B., DE PAIVA, G. & YADEGARI, R. 1994. Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science*, 266, 605-614.
- GOLL, M. G. & BESTOR, T. H. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 481-514.
- GÓMEZ, J. F., TALLE, B. & WILSON, Z. A. 2015. Anther and pollen development: a conserved developmental pathway. *Journal of integrative plant biology*, 57, 876-891.
- GONG, Z., MORALES-RUIZ, T., ARIZA, R. R., ROLDÁN-ARJONA, T., DAVID, L. & ZHU, J.-K. 2002. ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *cell*, 111, 803-814.
- GOULET, B. E., RODA, F. & HOPKINS, R. 2017. Hybridization in plants: old ideas, new techniques. *Plant physiology*, 173, 65-78.
- GRONES, P. & FRIML, J. 2015. Auxin transporters and binding proteins at a glance. The Company of Biologists Ltd.
- GROSSNIKLAUS, U., SPILLANE, C., PAGE, D. R. & KÖHLER, C. 2001. Genomic imprinting and seed development: endosperm formation with and without sex. *Current opinion in plant biology*, 4, 21-27.
- GROSSNIKLAUS, U., VIELLE-CALZADA, J.-P., HOEPPNER, M. A. & GAGLIANO, W. B. 1998. Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a polycomb group gene in Arabidopsis. *Science*, 280, 446-450.
- GUITTON, A.-E. & BERGER, F. 2005. Loss of function of MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1 produces nonviable parthenogenetic embryos in Arabidopsis. *Current Biology*, 15, 750-754.
- GUITTON, A.-E., PAGE, D. R., CHAMBRIER, P., LIONNET, C., FAURE, J.-E., GROSSNIKLAUS, U. & BERGER, F. 2004. Identification of new members of Fertilisation Independent Seed Polycomb Group pathway involved in the control of seed development in Arabidopsis thaliana. *Development*, 131, 2971-2981.
- HAMAMURA, Y., SAITO, C., AWAI, C., KURIHARA, D., MIYAWAKI, A., NAKAGAWA, T., KANAOKA, M. M., SASAKI, N., NAKANO, A. & BERGER, F. 2011. Live-cell imaging reveals the dynamics of two sperm cells during double fertilization in Arabidopsis thaliana. *Current Biology*, 21, 497-502.
- HAND, M. L. & KOLTUNOW, A. M. 2014. The genetic control of apomixis: asexual seed formation. *Genetics*, 197, 441-450.
- HATORANGAN, M. R., LAENEN, B., STEIGE, K. A., SLOTTE, T. & KÖHLER, C. 2016. Rapid evolution of genomic imprinting in two species of the Brassicaceae. *The Plant Cell*, 28, 1815-1827.
- HAUGHN, G. & CHAUDHURY, A. 2005. Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis. *Trends in plant science*, 10, 472-477.

- HEHENBERGER, E., KRADOLFER, D. & KÖHLER, C. 2012. Endosperm cellularization defines an important developmental transition for embryo development. *Development*, 139, 2031-2039.
- HERNANDEZ, J. M., FELLER, A., MOROHASHI, K., FRAME, K. & GROTEWOLD, E. 2007. The basic helix–loop–helix domain of maize R links transcriptional regulation and histone modifications by recruitment of an EMSY-related factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 17222-17227.
- HSIEH, T.-F., SHIN, J., UZAWA, R., SILVA, P., COHEN, S., BAUER, M. J., HASHIMOTO, M., KIRKBRIDE, R. C., HARADA, J. J. & ZILBERMAN, D. 2011. Regulation of imprinted gene expression in Arabidopsis endosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 1755-1762.
- HUANG, F., ZHU, Q. H., ZHU, A., WU, X., XIE, L., WU, X., HELLIWELL, C., CHAUDHURY, A., FINNEGAN, E. J. & LUO, M. 2017. Mutants in the imprinted PICKLE RELATED 2 gene suppress seed abortion of fertilization independent seed class mutants and paternal excess interploidy crosses in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 90, 383-395.
- HUGHES-DAVIES, L., HUNTSMAN, D., RUAS, M., FUKS, F., BYE, J., CHIN, S.-F., MILNER, J., BROWN, L. A., HSU, F. & GILKS, B. 2003. EMSY links the BRCA2 pathway to sporadic breast and ovarian cancer. *Cell*, 115, 523-535.
- INGRAM, G. & GUTIERREZ-MARCOS, J. 2015. Peptide signalling during angiosperm seed development. *Journal of Experimental Botany*, 66, 5151-5159.
- ISHIKAWA, R., OHNISHI, T., KINOSHITA, Y., EIGUCHI, M., KURATA, N. & KINOSHITA, T. 2011. Rice interspecies hybrids show precocious or delayed developmental transitions in the endosperm without change to the rate of syncytial nuclear division. *The Plant Journal*, 65, 798-806.
- JAGGARD, K. W., QI, A. & OBER, E. S. 2010. Possible changes to arable crop yields by 2050. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365, 2835-2851.
- JIANG, H., MORENO-ROMERO, J., SANTOS-GONZÁLEZ, J., DE JAEGER, G., GEVAERT, K., VAN DE SLIJKE, E. & KÖHLER, C. 2017. Ectopic application of the repressive histone modification H3K9me2 establishes post-zygotic reproductive isolation in Arabidopsis thaliana. *Genes & development*, 31, 1272-1287.
- JIN, J., SHI, J., LIU, B., LIU, Y., HUANG, Y., YU, Y. & DONG, A. 2015. MORF-RELATED GENE702, a reader protein of trimethylated histone H3 lysine 4 and histone H3 lysine 36, is involved in brassinosteroid-regulated growth and flowering time control in rice. *Plant physiology*, 168, 1275-1285.
- JOHNSTON, S. & HANNEMAN, R. 1980. Support of the Endosperm Balance Number hypothesis utilizing some tuber-bearing Solanum species. *American Potato Journal*, 57, 7-14.
- JOSEFSSON, C., DILKES, B. & COMAI, L. 2006. Parent-dependent loss of gene silencing during interspecies hybridization. *Current Biology*, 16, 1322-1328.
- JOSHI, A. A. & STRUHL, K. 2005. Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Molecular cell*, 20, 971-978.
- JULLIEN, P. E. & BERGER, F. 2010. Parental genome dosage imbalance deregulates imprinting in Arabidopsis. *PLoS genetics*, 6, e1000885.
- KASAHARA, R. D., NOTAGUCHI, M., NAGAHARA, S., SUZUKI, T., SUSAKI, D., HONMA, Y., MARUYAMA, D. & HIGASHIYAMA, T. 2016. Pollen tube contents initiate ovule enlargement and enhance seed coat development without fertilization. *Science advances*, 2, e1600554.
- KINOSHITA, T., YADEGARI, R., HARADA, J. J., GOLDBERG, R. B. & FISCHER, R. L. 1999. Imprinting of the MEDEA polycomb gene in the Arabidopsis endosperm. *The Plant Cell*, 11, 1945-1952.

- KIRKBRIDE, R. C., YU, H. H., NAH, G., ZHANG, C., SHI, X. & CHEN, Z. J. 2015. An epigenetic role for disrupted paternal gene expression in postzygotic seed abortion in *Arabidopsis* interspecific hybrids. *Molecular plant*, 8, 1766-1775.
- KÖHLER, C., HENNIG, L., BOUVERET, R., GHEYSELINCK, J., GROSSNIKLAUS, U. & GRUISSEM, W. 2003. *Arabidopsis* MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development. *The EMBO journal*, 22, 4804-4814.
- KÖHLER, C., WOLFF, P. & SPILLANE, C. 2012. Epigenetic mechanisms underlying genomic imprinting in plants. *Annual review of plant biology*, 63, 331-352.
- KOLTUNOW, A. & RABIGER, D. S. 2015. Development: Turning on endosperm in seeds. *Nat Plants*, 1, 15189.
- KOLTUNOW, A. M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell*, 5, 1425.
- KOORNNEEF, M. & MEINKE, D. 2010. The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal*, 61, 909-921.
- KRADOLFER, D., HENNIG, L. & KÖHLER, C. 2013. Increased maternal genome dosage bypasses the requirement of the FIS polycomb repressive complex 2 in *Arabidopsis* seed development. *PLoS genetics*, 9, e1003163.
- LAFON-PLACETTE, C., JOHANNESSEN, I. M., HORNSLIEN, K. S., ALI, M. F., BJERKAN, K. N., BRAMSIEPE, J., GLÖCKLE, B. M., REBERNIG, C. A., BRYSTING, A. K. & GRINI, P. E. 2017. Endosperm-based hybridization barriers explain the pattern of gene flow between *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis arenosa* in Central Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, E1027-E1035.
- LAFON-PLACETTE, C. & KÖHLER, C. 2014. Embryo and endosperm, partners in seed development. *Current Opinion in Plant Biology*, 17, 64-69.
- LANG, Z., WANG, Y., TANG, K., TANG, D., DATSENKA, T., CHENG, J., ZHANG, Y., HANDA, A. K. & ZHU, J.-K. 2017. Critical roles of DNA demethylation in the activation of ripening-induced genes and inhibition of ripening-repressed genes in tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201705233.
- LARSSON, E., ROBERTS, C., CLAES, A., FRANKS, R. G. & SUNDBERG, E. 2014. Polar auxin transport is essential for medial versus lateral tissue specification and vascular-mediated valve outgrowth in *Arabidopsis* gynoecia. *Plant physiology*, pp. 114.245951.
- LAW, J. A., DU, J., HALE, C. J., FENG, S., KRAJEWSKI, K., PALANCA, A. M. S., STRAHL, B. D., PATEL, D. J. & JACOBSEN, S. E. 2013. Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1. *Nature*, 498, 385.
- LEBLANC, O., GRIMANELLI, D., HERNANDEZ-RODRIGUEZ, M., GALINDO, P. A., SORIANO-MARTINEZ, A. M. & PEROTTI, E. 2004. Seed development and inheritance studies in apomictic maize-Tripsacum hybrids reveal barriers for the transfer of apomixis into sexual crops. *International Journal of Developmental Biology*, 53, 585-596.
- LEPINIEC, L., DEBEAUJON, I., ROUTABOUL, J.-M., BAUDRY, A., POURCEL, L., NESI, N. & CABOCHE, M. 2006. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 405-430.
- LEROY, O., HENNIG, L., BREUNINGER, H., LAUX, T. & KÖHLER, C. 2007. Polycomb group proteins function in the female gametophyte to determine seed development in plants. *Development*, 134, 3639-3648.
- LI, F., MAO, G., TONG, D., HUANG, J., GU, L., YANG, W. & LI, G.-M. 2013. The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutSa. *Cell*, 153, 590-600.
- LI, H., HANDSAKER, B., WYSOKER, A., FENNEL, T., RUAN, J., HOMER, N., MARTH, G., ABECASIS, G. & DURBIN, R. 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25, 2078-2079.
- LI, Y., CÓRDOBA-CANERO, D., QIAN, W., ZHU, X., TANG, K., ZHANG, H., ARIZA, R. R., ROLDÁN-ARJONA, T. & ZHU, J.-K. 2015. An AP endonuclease functions in

- active DNA demethylation and gene imprinting in Arabidopsis. *PLoS genetics*, 11, e1004905.
- LIAO, Y., SMYTH, G. K. & SHI, W. 2013. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30, 923-930.
- LIPPMAN, Z., GENDREL, A.-V., BLACK, M., VAUGHN, M. W., DEDHIA, N., MCCOMBIE, W. R., LAVINE, K., MITTAL, V., MAY, B. & KASSCHAU, K. D. 2004. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *nature*, 430, 471.
- LIU, C., LU, F., CUI, X. & CAO, X. 2010. Histone methylation in higher plants. *Annual review of plant biology*, 61, 395-420.
- LIU, Y. & MIN, J. 2016. Structure and function of histone methylation-binding proteins in plants. *Biochemical Journal*, 473, 1663-1680.
- LOVE, M. I., HUBER, W. & ANDERS, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15, 550.
- LUCO, R. F., PAN, Q., TOMINAGA, K., BLENCOWE, B. J., PEREIRA-SMITH, O. M. & MISTELI, T. 2010. Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science*, 327, 996-1000.
- LUO, M., DENNIS, E. S., BERGER, F., PEACOCK, W. J. & CHAUDHURY, A. 2005. MINISEED3 (MINI3), a WRKY family gene, and HAIKU2 (IKU2), a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 17531-17536.
- MARTINEZ, G., WOLFF, P., WANG, Z., MORENO-ROMERO, J., SANTOS-GONZALEZ, J., CONZE, L. L., DEFRAIA, C., SLOTKIN, R. K. & KÖHLER, C. 2018. Paternal easiRNAs regulate parental genome dosage in Arabidopsis. *Nature genetics*, 1.
- MAURER-STROH, S., DICKENS, N. J., HUGHES-DAVIES, L., KOUZARIDES, T., EISENHABER, F. & PONTING, C. P. 2003. The Tudor domain 'Royal Family': tudor, plant agenet, chromo, PWWP and MBT domains. *Trends in biochemical sciences*, 28, 69-74.
- MEINKE, D. W., CHERRY, J. M., DEAN, C., ROUNSLEY, S. D. & KOORNNEEF, M. 1998. Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. *Science*, 282, 662-682.
- MERINI, W. & CALONJE, M. 2015. PRC 1 is taking the lead in P c G repression. *The Plant Journal*, 83, 110-120.
- MERINI, W., ROMERO-CAMPERO, F. J., GOMEZ-ZAMBRANO, A., ZHOU, Y., TURCK, F. & CALONJE, M. 2016. The Arabidopsis Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) components AtBMI1A, B and C impact gene networks throughout all stages of plant development. *Plant physiology*, pp. 01259.2016.
- MIKKELSEN, T. S., KU, M., JAFFE, D. B., ISSAC, B., LIEBERMAN, E., GIANNOUKOS, G., ALVAREZ, P., BROCKMAN, W., KIM, T.-K. & KOCHER, R. P. 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, 448, 553.
- MORALES-RUIZ, T., ORTEGA-GALISTEO, A. P., PONFERRADA-MARÍN, M. I., MARTÍNEZ-MACÍAS, M. I., ARIZA, R. R. & ROLDÁN-ARJONA, T. 2006. Demeter and repressor of silencing 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 6853-6858.
- MORENO-ROMERO, J., JIANG, H., SANTOS-GONZÁLEZ, J. & KÖHLER, C. 2016. Parental epigenetic asymmetry of PRC2-mediated histone modifications in the Arabidopsis endosperm. *The EMBO journal*, e201593534.
- MORLEY-SMITH, E. R., PIKE, M. J., FINDLAY, K., KÖCKENBERGER, W., HILL, L. M., SMITH, A. M. & RAWSTHORNE, S. 2008. The transport of sugars to developing embryos is not via the bulk endosperm in oilseed rape seeds. *Plant physiology*, 147, 2121-2130.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15, 473-497.

- MUSSELMAN, C. A., LALONDE, M.-E., CÔTÉ, J. & KUTATELADZE, T. G. 2012. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nature Structural and Molecular Biology*, 19, 1218.
- NEŠKOVIĆ, M. & KONJEVIĆ, R. Čulafić Lj.(2003): Fiziologija biljaka. *NNK-International, Beograd*.
- NG, D. W., WANG, T., CHANDRASEKHARAN, M. B., ARAMAYO, R., KERTBUNDIT, S. & HALL, T. C. 2007. Plant SET domain-containing proteins: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1769, 316-329.
- NIU, L., LU, F., ZHAO, T., LIU, C. & CAO, X. 2012. The enzymatic activity of Arabidopsis protein arginine methyltransferase 10 is essential for flowering time regulation. *Protein & cell*, 3, 450-459.
- OHAD, N., MARGOSSIAN, L., HSU, Y.-C., WILLIAMS, C., REPETTI, P. & FISCHER, R. L. 1996. A mutation that allows endosperm development without fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 5319-5324.
- ORTEGA-GALISTEO, A. P., MORALES-RUIZ, T., ARIZA, R. R. & ROLDÁN-ARJONA, T. 2008. Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant molecular biology*, 67, 671-681.
- OTTO, S. P. & WHITTON, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual review of genetics*, 34, 401-437.
- PAGNUSSAT, G. C., ALANDETE-SAEZ, M., BOWMAN, J. L. & SUNDARESAN, V. 2009. Auxin-dependent patterning and gamete specification in the Arabidopsis female gametophyte. *Science*, 324, 1684-1689.
- PENTERMAN, J., ZILBERMAN, D., HUH, J. H., BALLINGER, T., HENIKOFF, S. & FISCHER, R. L. 2007. DNA demethylation in the <em>Arabidopsis</em> genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 6752.
- PETRÁŠEK, J. & FRIML, J. 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136, 2675-2688.
- PIGNATTA, D., ERDMANN, R. M., SCHEER, E., PICARD, C. L., BELL, G. W. & GEHRING, M. 2014. Natural epigenetic polymorphisms lead to intraspecific variation in Arabidopsis gene imprinting. *elife*, 3, e03198.
- PIKAARD, C. S. & SCHEID, O. M. 2014. Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6, a019315.
- PODIO, M., FELITTI, S. A., SIENA, L. A., DELGADO, L., MANCINI, M., SEIJO, J. G., GONZÁLEZ, A. M., PESSINO, S. C. & ORTIZ, J. P. A. 2014. Characterization and expression analysis of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK) genes in sexual and apomictic Paspalum notatum. *Plant molecular biology*, 84, 479-495.
- PONTVIANNE, F., BLEVINS, T. & PIKAARD, C. S. 2010. Arabidopsis histone lysine methyltransferases. *Advances in botanical research*. Elsevier.
- PORTELA, A. & ESTELLER, M. 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*, 28, 1057.
- RAISSIG, M. T., BEMER, M., BAROUX, C. & GROSSNIKLAUS, U. 2013. Genomic imprinting in the Arabidopsis embryo is partly regulated by PRC2. *PLoS genetics*, 9, e1003862.
- RAMSEY, J. & SCHEMSKE, D. W. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 467-501.
- REIK, W., DEAN, W. & WALTER, J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293, 1089-1093.
- REYES, J. C. & GROSSNIKLAUS, U. Diverse functions of Polycomb group proteins during plant development. *Seminars in cell & developmental biology*, 2003. Elsevier, 77-84.

- ROBERT, H. S., GRONES, P., STEPANOVA, A. N., ROBLES, L. M., LOKERSE, A. S., ALONSO, J. M., WEIJERS, D. & FRIML, J. 2013. Local auxin sources orient the apical-basal axis in Arabidopsis embryos. *Current Biology*, 23, 2506-2512.
- ROBERT, H. S., GRUNEWALD, W., SAUER, M., CANNOOT, B., SORIANO, M., SWARUP, R., WEIJERS, D., BENNETT, M., BOUTILIER, K. & FRIML, J. 2015. Plant embryogenesis requires AUX/LAX-mediated auxin influx. *Development*, 142, 702-711.
- ROBERT, H. S., PARK, C., GUTIÉRREZ, C. L., WÓJCIKOWSKA, B., PĚNČÍK, A., NOVÁK, O., CHEN, J., GRUNEWALD, W., DRESSELHAUS, T. & FRIML, J. 2018. Maternal auxin supply contributes to early embryo patterning in Arabidopsis. *Nature plants*, 4, 548.
- ROBERTSON, K. D. 2005. DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6, 597.
- RODRIGUES, J. C., LUO, M., BERGER, F. & KOLTUNOW, A. M. 2010. Polycomb group gene function in sexual and asexual seed development in angiosperms. *Sexual plant reproduction*, 23, 123-133.
- ROJEK, J., PAWELKO, L., KAPUSTA, M., NACZK, A. & BOHDANOWICZ, J. 2015. Exogenous steroid hormones stimulate full development of autonomous endosperm in Arabidopsis thaliana. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 84.
- ROOSJEN, M., PAQUE, S. & WEIJERS, D. 2017. Auxin response factors: output control in auxin biology. *Journal of experimental botany*, 69, 179-188.
- ROSZAK, P. & KÖHLER, C. 2011. Polycomb group proteins are required to couple seed coat initiation to fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 20826-20831.
- ROTHBART, S. B. & STRAHL, B. D. 2014. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1839, 627-643.
- RUTHENBURG, A. J., WANG, W., GRAYBOSCH, D. M., LI, H., ALLIS, C. D., PATEL, D. J. & VERDINE, G. L. 2006. Histone H3 recognition and presentation by the WDR5 module of the MLL1 complex. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13, 704.
- SCHATLOWSKI, N., WOLFF, P., SANTOS-GONZÁLEZ, J., SCHOFT, V., SIRETSKIY, A., SCOTT, R., TAMARU, H. & KÖHLER, C. 2014. Hypomethylated pollen bypasses the interploidy hybridization barrier in Arabidopsis. *The plant cell*, tpc. 114.130120.
- SCHMIDT, A., WÖHRMANN, H. J., RAISSIG, M. T., ARAND, J., GHEYSELINCK, J., GAGLIARDINI, V., HEICHINGER, C., WALTER, J. & GROSSNIKLAUS, U. 2013. The Polycomb group protein MEDEA and the DNA methyltransferase MET1 interact to repress autonomous endosperm development in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 73, 776-787.
- SCHOFT, V. K., CHUMAK, N., CHOI, Y., HANNON, M., GARCIA-AGUILAR, M., MACHLICOVA, A., SLUSARZ, L., MOSIOLEK, M., PARK, J.-S. & PARK, G. T. 2011. Function of the DEMETER DNA glycosylase in the Arabidopsis thaliana male gametophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 8042-8047.
- SCHWARTZ, Y. B. & PIRROTTA, V. 2007. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nature Reviews Genetics*, 8, 9.
- SCHWARTZ, Y. B. & PIRROTTA, V. 2013. A new world of Polycombs: unexpected partnerships and emerging functions. *Nature reviews Genetics*, 14, 853.
- SCOTT, R. J., SPIELMAN, M., BAILEY, J. & DICKINSON, H. G. 1998. Parent-of-origin effects on seed development in Arabidopsis thaliana. *Development*, 125, 3329-3341.
- SCOTT, R. J., SPIELMAN, M. & DICKINSON, H. G. 2004. Stamen structure and function. *The Plant Cell*, 16, S46-S60.
- SIMONOVIĆ, A. 2011. Biotehnologija i genetičko inženjerstvo biljaka. *NNK internacional, Beograd*.

- SØRENSEN, M. B., MAYER, U., LUKOWITZ, W., ROBERT, H., CHAMBRIER, P., JÜRGENS, G., SOMERVILLE, C., LEPINIEC, L. & BERGER, F. 2002. Cellularisation in the endosperm of *Arabidopsis thaliana* is coupled to mitosis and shares multiple components with cytokinesis. *Development*, 129, 5567-5576.
- SPIELMAN, M., VINKENOOG, R. & SCOTT, R. J. 2003. Genetic mechanisms of apomixis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 358, 1095-1103.
- SPILLANE, C., CURTIS, M. D. & GROSSNIKLAUS, U. 2004. Apomixis technology development—virgin births in farmers' fields? *Nature biotechnology*, 22, 687.
- SPRUNCK, S., RADEMACHER, S., VOGLER, F., GHEYSELINCK, J., GROSSNIKLAUS, U. & DRESSELHAUS, T. 2012. Egg cell-secreted EC1 triggers sperm cell activation during double fertilization. *Science*, 338, 1093-1097.
- STEPANOVA, A. N., ROBERTSON-HOYT, J., YUN, J., BENAVENTE, L. M., XIE, D.-Y., DOLEŽAL, K., SCHLERETH, A., JÜRGENS, G. & ALONSO, J. M. 2008. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell*, 133, 177-191.
- STRAHL, B. D. & ALLIS, C. D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403, 41.
- STROUD, H., DO, T., DU, J., ZHONG, X., FENG, S., JOHNSON, L., PATEL, D. J. & JACOBSEN, S. E. 2014. Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in *Arabidopsis*. *Nature structural & molecular biology*, 21, 64.
- SUNDARESAN, V. & ALANDETE-SAEZ, M. 2010. Pattern formation in miniature: the female gametophyte of flowering plants. *Development*, 137, 179-189.
- TAO, Y., FERRER, J.-L., LJUNG, K., POJER, F., HONG, F., LONG, J. A., LI, L., MORENO, J. E., BOWMAN, M. E. & IVANS, L. J. 2008. Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, 133, 164-176.
- TIVENDALE, N. D., ROSS, J. J. & COHEN, J. D. 2014. The shifting paradigms of auxin biosynthesis. *Trends in plant science*, 19, 44-51.
- TIWARI, S., SPIELMAN, M., SCHULZ, R., OAKEY, R. J., KELSEY, G., SALAZAR, A., ZHANG, K., PENNELL, R. & SCOTT, R. J. 2010. Transcriptional profiles underlying parent-of-origin effects in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 10, 72.
- TORRES, I. O. & FUJIMORI, D. G. 2015. Functional coupling between writers, erasers and readers of histone and DNA methylation. *Current opinion in structural biology*, 35, 68-75.
- TSUCHIYA, T. & EULGEM, T. 2010. The *Arabidopsis* defense component EDM2 affects the floral transition in an FLC-dependent manner. *The Plant Journal*, 62, 518-528.
- TURCK, F., ROUDIER, F., FARRONA, S., MARTIN-MAGNIETTE, M.-L., GUILLAUME, E., BUISINE, N., GAGNOT, S., MARTIENSSEN, R. A., COUPLAND, G. & COLOT, V. 2007. *Arabidopsis* TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS genetics*, 3, e86.
- ULMASOV, T., MURFETT, J., HAGEN, G. & GUILFOYLE, T. J. 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell*, 9, 1963-1971.
- VINKENOOG, R., BUSHELL, C., SPIELMAN, M., ADAMS, S., DICKINSON, H. G. & SCOTT, R. J. 2003. Genomic imprinting and endosperm development in flowering plants. *Molecular Biotechnology*, 25, 149-184.
- VIVIAN-SMITH, A. & KOLTUNOW, A. M. 1999. Genetic analysis of growth-regulator-induced parthenocarpy in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 121, 437-452.
- WANG, L. & RUAN, Y.-L. 2012. New insights into roles of cell wall invertase in early seed development revealed by comprehensive spatial and temporal expression patterns of GhCWIN1 in cotton. *Plant Physiology*, 160, 777-787.



- WANG, M., ZHAO, Y. & ZHANG, B. 2015. Efficient test and visualization of multi-set intersections. *Scientific reports*, 5, 16923.
- WATERS, A. J., BILINSKI, P., EICHTEN, S. R., VAUGHN, M. W., ROSS-IBARRA, J., GEHRING, M. & SPRINGER, N. M. 2013. Comprehensive analysis of imprinted genes in maize reveals allelic variation for imprinting and limited conservation with other species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 19639-19644.
- WEST, M. & HARADA, J. J. 1993. Embryogenesis in higher plants: an overview. *The Plant Cell*, 5, 1361.
- WHEELER, T. 2015. . Climate change impacts on food systems and implications for climate-compatible food policies.
- WOLFF, P., JIANG, H., WANG, G., SANTOS-GONZALEZ, J. & KÖHLER, C. 2015. Paternally expressed imprinted genes establish postzygotic hybridization barriers in *Arabidopsis thaliana*. *Elife*, 4.
- XU, C., TIAN, J. & MO, B. 2013. siRNA-mediated DNA methylation and H3K9 dimethylation in plants. *Protein & cell*, 4, 656-663.
- XU, W., DAI, M., LI, F. & LIU, A. 2014. Genomic imprinting, methylation and parent-of-origin effects in reciprocal hybrid endosperm of castor bean. *Nucleic acids research*, 42, 6987-6998.
- YANG, H., HOWARD, M. & DEAN, C. 2014. Antagonistic roles for H3K36me3 and H3K27me3 in the cold-induced epigenetic switch at *Arabidopsis* FLC. *Current Biology*, 24, 1793-1797.
- ZEMACH, A. & ZILBERMAN, D. 2010. Evolution of eukaryotic DNA methylation and the pursuit of safer sex. *Current Biology*, 20, R780-R785.
- ZHANG, T., COOPER, S. & BROCKDORFF, N. 2015. The interplay of histone modifications—writers that read. *EMBO reports*, 16, 1467-1481.
- ZHANG, X. 2012. Chromatin modifications in plants. *Plant Genome Diversity Volume 1*. Springer.
- ZHAO, S., ZHANG, B., YANG, M., ZHU, J. & LI, H. 2018. Systematic Profiling of Histone Readers in *Arabidopsis thaliana*. *Cell reports*, 22, 1090-1102.
- ZHONG, S., ZHANG, J. & QU, L. J. 2017. The signals to trigger the initiation of ovule enlargement are from the pollen tubes: The direct evidence. *Journal of integrative plant biology*, 59, 600-603.
- ZIMMERMAN, J. L. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The plant cell*, 5, 1411.

## 8. Prilozi

### 8.1. Prilog 1. Statistička značajnost brojnosti semenih zametaka među *eml* mutantima (One-way ANOVA sa Fišerovim testom verovatnoće)

	Broj stepena slobode (DF)	Podešena suma kvadrata (Adj SS)	Podešena sredina kvadrata (Adj MS)	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	Standardna varijacija (StDev)	Interval poverenja (95% CI)	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	3	7,600	2,533	1,81	<b>0,186</b>	<i>eml1-2 x eml1-2</i>	5	6,000	1,414	(4,878; 7,122)	<i>eml1-2 x eml1-2</i>	5	6,000	<b>A</b>
Greška	16	22,400	1,400			<i>eml1-2 x Ler-0</i>	5	4,600	0,894	(3,478; 5,722)	<i>Ler x eml1-2</i>	5	5,000	<b>A</b>
ukupan broj	19	30,000				<i>Ler-0 x eml1-2</i>	5	5,000	1,225	(3,878; 6,122)	<i>eml1-2 x Ler</i>	5	4,600	<b>A</b>
						<i>Ler-0 x Ler-0</i>	5	4,400	1,14	(3,278; 5,522)	<i>Ler-0 x Ler-0</i>	5	4,400	<b>A</b>
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	3	49,000	16,333	7,26	<b>0,043</b>	<i>Col-0 x Col-0</i>	2	4,500	2,12	(1,56; 7,44)	<i>eml2-1 x Col-0</i>	2	11,000	<b>A</b>
Greška	4	9,000	2,250			<i>eml2-1 x eml2-1</i>	2	7,000	1,41	(4,06; 9,94)	<i>Col-0 x eml2-1</i>	2	9,500	<b>A</b>
ukupan broj	7	58,000				<i>eml2-1 x Col-0</i>	2	11,000	1,41	(8,06; 13,94)	<i>eml2-1 x eml2-1</i>	2	7,000	<b>AB</b>
						<i>Col-0 x eml2-1</i>	2	9,500	0,707	(6,555; 12,445)	<i>Col-0 x Col-0</i>	2	4,500	<b>B</b>
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	3	80,550	26,850	9,34	<b>0,001</b>	<i>Col-0 x Col-0</i>	5	1,000	1	(-0,607; 2,607)	<i>eml3-4 x eml3-4</i>	5	6,000	<b>A</b>
Greška	16	46,000	2,875			<i>Col-0 x eml3-4</i>	5	1,200	1,304	(-0,407; 2,807)	<i>eml3-4 x Col-0</i>	5	2,400	<b>B</b>
ukupan broj	19	126,550				<i>eml3-4 x Col-0</i>	5	2,400	0,548	(0,793; 4,007)	<i>Col-0 x eml3-4</i>	5	1,200	<b>B</b>
						<i>eml3-4 x eml3-4</i>	5	6,000	2,92	(4,39; 7,61)	<i>Col-0 x Col-0</i>	5	1,000	<b>B</b>
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	3	14,670	4,889	1,30	<b>0,338</b>	<i>eml4-1 x eml4-1</i>	3	7,330	3,51	(4,76; 9,91)	<i>Col-3 x eml4-1</i>	3	7,333	<b>A</b>
Greška	8	30,000	3,750			<i>eml4-1 x Col-3</i>	3	4,667	0,577	(2,088; 7,245)	<i>eml4-1 x eml4-1</i>	3	7,333	<b>A</b>
ukupan broj	11	44,670				<i>Col-3 x eml4-1</i>	3	7,333	1,155	(4,755; 9,912)	<i>Col-3 x Col-3</i>	3	6,000	<b>A</b>
						<i>Col-3 x Col-3</i>	3	6,000	1	(3,422; 8,578)	<i>eml4-1 x Col-3</i>	3	4,667	<b>A</b>
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	4	342,400	85,608	8,85	<b>0,000</b>	<i>eml1-2 x eml1-2</i>	5	6,000	1,414	(3,098; 8,902)	<i>eml1-2 eml3-4 x eml1-2 eml3-4</i>	10	13,900	<b>A</b>
Greška	20	193,600	9,678			<i>eml2-1 x eml2-1</i>	2	7,000	1,41	(2,41; 11,59)	<i>eml4-1 x eml4-1</i>	3	7,330	<b>B</b>
ukupan broj	24	536,000				<i>eml3-4 x eml3-4</i>	5	6,000	2,92	(3,10; 8,90)	<i>eml2-1 x eml2-1</i>	2	7,000	<b>B</b>
						<i>eml4-1 x eml4-1</i>	3	7,330	3,51	(3,59; 11,08)	<i>eml3-4 x eml3-4</i>	5	6,000	<b>B</b>
						<i>eml1-2 eml3-4 x eml1-2 eml3-4</i>	10	13,900	3,73	(11,85; 15,95)	<i>eml1-2 x eml1-2</i>	5	6,000	<b>B</b>

Prilog 1. Statistička značajnost brojnosti semena sa kašnjenjem u razviću embriona među *eml* mutantima (One-way ANOVA sa Fišerovim testom verovatnoće)

	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	3	2864,800	954,933	115,75	<b>0,000</b>	<i>eml1-2</i> x <i>eml1-2</i>	5	38,600	1,949	(35,877; 41,323)	<i>eml1-2</i> x <i>eml1-2</i>	5	38,600	<b>A</b>
Greška	16	132,000	8,250			<i>eml1-2</i> x Ler-0	5	35,000	2,92	(32,28; 37,72)	Ler x <i>eml1-2</i>	5	35,800	<b>A</b>
ukupan broj	19	2996,800				Ler-0 x <i>eml1-2</i>	5	35,800	4,44	(33,08; 38,52)	<i>eml1-2</i> x Ler	5	35,000	<b>A</b>
						Ler-0 x Ler-0	5	9,000	1	(6,277; 11,723)	Ler-0 x Ler-0	5	9,000	<b>B</b>
<b>kategorija: kašnjenje u razvoju embriona</b>														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	3	1612,000	537,330	35,82	<b>0,002</b>	Col-0 x Col-0	2	7,000	1,410	(-0,60; 14,60)	<i>eml2-1</i> x <i>eml2-1</i>	2	44,000	<b>A</b>
Greška	4	60,000	15,000			<i>eml2-1</i> x <i>eml2-1</i>	2	44,000	5,660	(36,40; 51,60)	<i>eml2-1</i> x Col-0	2	37,000	<b>A</b>
ukupan broj	7	1672,000				<i>eml2-1</i> x Col-0	2	37,000	2,830	(29,40; 44,60)	Col-0 x <i>eml2-1</i>	2	36,000	<b>A</b>
						Col-0 x <i>eml2-1</i>	2	36,000	4,240	(28,40; 43,60)	Col-0 x Col-0	2	7,000	<b>B</b>
<b>kategorija: kašnjenje u razvoju embriona</b>														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	3	4129,200	1376,400	112,59	<b>0,000</b>	Col-0 x Col-0	5	4,600	1,140	(2,789; 6,411)	<i>eml3-4</i> x Col-0	5	39,400	<b>A</b>
Greška	16	195,600	12,220			Col-0 x <i>eml3-4</i>	5	37,600	2,7	(35,79; 39,41)	Col-0 x <i>eml3-4</i>	5	37,600	<b>A</b>
ukupan broj	19	4324,800				<i>eml3-4</i> x Col-0	5	39,400	1,517	(37,589; 41,211)	<i>eml3-4</i> x <i>eml3-4</i>	5	36,000	<b>A</b>
						<i>eml3-4</i> x <i>eml3-4</i>	5	36,000	6,16	(32,69; 39,31)	Col-0 x Col-0	5	4,600	<b>B</b>
<b>kategorija: kašnjenje u razvoju embriona</b>														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	3	361,000	120,333	14,02	<b>0,001</b>	<i>eml4-1</i> x <i>eml4-1</i>	3	20,670	4,160	(16,77; 24,57)	<i>eml4-1</i> x <i>eml4-1</i>	3	20,670	<b>A</b>
Greška	8	68,670	8,583			<i>eml4-1</i> x Col-3	3	8,000	3,610	(4,10; 11,90)	Col-0 x Col-0	3	8,000	<b>B</b>
ukupan broj	11	429,670				Col-3 x <i>eml4-1</i>	3	8,000	1	(4,099; 11,901)	Col-3 x <i>eml4-1</i>	3	8,000	<b>B</b>
						Col-3 x Col-3	3	8,000	1,73	(4,10; 11,90)	<i>eml4-1</i> x Col-3	3	8,000	<b>B</b>

Prilog 1. Statistička značajnost brojnosti normalnih semena među *eml* mutantima (One-way ANOVA sa Fišerovim testom verovatnoće)

<b>kategorija: linearni kotiledon</b>														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	3	3936,600	1312,200	279,19	<b>0,000</b>	<i>eml1-2 x eml1-2</i>	5	0,000	0,000	(-2,055324; 2,055324)	Ler-0 x Ler-0	5	32,400	<b>A</b>
Greška	16	75,200	4,700			<i>eml1-2 x Ler-0</i>	5	0,000	0,000	(-2,055324; 2,055324)	Ler-0 x <i>eml1-2</i>	5	0,000	<b>B</b>
ukupan broj	19	4011,800				Ler-0 x <i>eml1-2</i>	5	0,000	0,000	(-2,055324; 2,055324)	<i>eml1-2 x Ler-0</i>	5	0,000	<b>B</b>
						Ler-0 x Ler-0	5	32,400	4,34	(30,34; 34,46)	<i>eml1-2 x eml1-2</i>	5	0,000	<b>B</b>
<b>kategorija: linearni kotiledon</b>														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	3	1998,380	666,125	108,76	<b>0,000</b>	<i>eml2-1 x eml2-1</i>	2	0,000	0,000	(-4,858779; 4,858779)	Col-0 x Col-0	2	36,500	<b>A</b>
Greška	4	24,500	6,125			<i>eml2-1 x Col-0</i>	2	0,000	0,000	(-4,858779; 4,858779)	Col-0 x <i>eml2-1</i>	2	0,000	<b>B</b>
ukupan broj	7	2022,880				Col-0 x <i>eml2-1</i>	2	0,000	0,000	(-4,858779; 4,858779)	<i>eml2-1 x Col-0</i>	2	0,000	<b>B</b>
						Col-0 x Col-0	2	36,500	4,95	(31,64; 41,36)	<i>eml2-1 x eml2-1</i>	2	0,000	<b>B</b>
<b>kategorija: linearni kotiledon</b>														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	3	6120,600	2040,200	551,41	<b>0,000</b>	<i>eml3-4 x eml3-4</i>	5	0,000	0,000	(-1,823611; 1,823611)	Col-0 x Col-0	5	40,400	<b>A</b>
Greška	16	59,200	3,700			<i>eml3-4 x Col-0</i>	5	0,000	0,000	(-1,823611; 1,823611)	Col-0 x <i>eml3-4</i>	5	0,000	<b>B</b>
ukupan broj	19	6179,800				Col-0 x <i>eml3-4</i>	5	0,000	0,000	(-1,823611; 1,823611)	<i>eml3-4 x Col-0</i>	5	0,000	<b>B</b>
						Col-0 x Col-0	5	40,400	3,85	(38,58; 42,22)	<i>eml3-4 x eml3-4</i>	5	0,000	<b>B</b>
<b>kategorija: linearni kotiledon</b>														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	3	788,200	262,750	21,02	<b>0,000</b>	<i>eml4-1 x eml4-1</i>	3	14,330	4,040	(9,63; 19,04)	Col-3 x Col-3	3	36,000	<b>A</b>
Greška	8	100,000	12,500			<i>eml4-1 x Col-3</i>	3	31,330	3,060	(36,63; 36,04)	<i>eml4-1 x Col-3</i>	3	31,330	<b>AB</b>
ukupan broj	11	888,200				Col-3 x <i>eml4-1</i>	3	25,330	4,620	(20,63; 30,04)	Col-3 x <i>eml4-1</i>	3	25,330	<b>B</b>
						Col-3 x Col-3	3	36,000	1,73	(31,29; 40,71)	<i>eml4-1 x eml4-1</i>	3	14,330	<b>C</b>

Prilog 1. Statistička značajnost brojnosti semenih zametaka kod *eml1-2 eml3-4* dvostrukog mutanta (One-way ANOVA sa Fišerovim testom verovatnoće)

	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	3	1322,900	440,970	39,23	<b>0,000</b>	WT x WT	11	4,636	2,157	(2,584; 6,689)	<i>eml1-2 eml3-4</i> x WT	9	19,330	<b>A</b>
Greška	35	393,400	11,240			WT x <i>eml1-2 eml3-4</i>	9	6,667	1,414	(4,398; 8,936)	<i>eml1-2 eml3-4</i> x <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	13,900	<b>B</b>
ukupan broj	38	1716,400				<i>eml1-2 eml3-4</i> x WT	9	19,330	5,07	(17,06; 21,60)	WT x <i>eml1-2 eml3-4</i>	9	6,667	<b>C</b>
						<i>eml1-2 eml3-4</i> x <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	13,900	3,73	(11,75; 16,05)	WT x WT	11	4,636	<b>C</b>

Prilog 1. Statistička značajnost brojnosti abortirana semena kod *eml1-2 eml3-4* dvostrukog mutanta (One-way ANOVA sa Fišerovim testom verovatnoće)

	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	3	933,110	311,038	150,53	<b>0,000</b>	<i>eml1-2 eml3-4</i> x <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	11,700	2,273	(10,777; 12,623)	<i>eml1-2 eml3-4</i> x <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	11,700	<b>A</b>
Greška	35	73,320	2,066			WT x <i>eml1-2 eml3-4</i>	9	0,222	0,444	(-0,528; 1,417)	<i>eml1-2 eml3-4</i> x WT	8	1,333	<b>B</b>
ukupan broj	38	1005,440				<i>eml1-2 eml3-4</i> x WT	9	1,333	0,926	(0,361; 2,306)	WT x <i>eml1-2 eml3-4</i>	9	0,444	<b>B</b>
						WT x WT	11	0,000	0	(-0,879882; 0,879882)	WT x WT	11	0,000	<b>B</b>

Prilog 1. Statistička značajnost brojnosti semena sa kašnjenjem u razviću embriona kod *eml1-2 eml3-4* dvostrukog mutanta (One-way ANOVA sa Fišerovim testom verovatnoće)

kategorija: seme sa kašnjenjem u razviću embriona														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	3	5704,600	1901,530	69,89	<b>0,000</b>	WT x WT	11	0,000	0,000	(-3,192866; 3,192866)	<i>eml1-2 eml3-4</i> x <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	17,300	<b>B</b>
Greška	35	952,300	27,210			WT x <i>eml1-2 eml3-4</i>	9	28,440	4,300	( 24,91; 31,97)	<i>eml1-2 eml3-4</i> x WT	9	29,330	<b>A</b>
ukupan broj	38	6656,900				<i>eml1-2 eml3-4</i> x WT	9	29,330	8,57	( 25,80; 32,86)	WT x <i>eml1-2 eml3-4</i>	9	28,440	<b>A</b>
						<i>eml1-2 eml3-4</i> x <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	17,300	4,9	( 13,95; 20,65)	WT x WT	11	0,000	<b>C</b>
kategorija: linearni kotiledon														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	
Faktor	3	8070,700	2690,230	148,78	<b>0,000</b>	<i>eml1-2 eml3-4</i> x <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	0,000	0,000	(-2,729913; 2,72991)	WT x WT	11	34,000	<b>A</b>
Greška	35	632,900	18,080			<i>eml1-2 eml3-4</i> x WT	9	0,000	0,000	(-2,877581; 2,877581)	WT x <i>eml1-2 eml3-4</i>	9	10,890	<b>B</b>
ukupan broj	38	8703,600				WT x <i>eml1-2 eml3-4</i>	9	10,890	3,33	(8,01;13,77)	<i>eml1-2 eml3-4</i> x WT	9	0,000	<b>C</b>
						WT x WT	11	34,000	7,38	(31,40;36,60)	<i>eml1-2 eml3-4</i> x <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	0,000	<b>C</b>

Prilog 1. Statistička značajnost brojnosti semenih zametaka kod demaskuliniziranog *eml1-2 eml3-4* dvostrukog mutanta (One-way ANOVA sa Fišerovim testom verovatnoće)

	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	1	3808,800	3808,800	192,36	<b>0,000</b>	demask. <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	11,000	3,330	(8,04; 13,96)	demask. WT	10	38,600	<b>A</b>
Greška	18	356,400	19,800			demask. WT	10	38,600	5,340	(35,64; 41,56)	demask. <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	11,000	<b>B</b>
ukupan broj	19	4165,200												

Prilog 1. Statistička značajnost brojnosti semena kod demaskuliniziranog *eml1-2 eml3-4* dvostrukog mutanta (One-way ANOVA sa Fišerovim testom verovatnoće)

<b>sve kategorije zajedno</b>														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	1	3406,100	3406,050	411,75	<b>0,000</b>	demask. <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	26,100	4,070	(24,19; 28,01)	demask. <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	26,100	<b>A</b>
Greška	18	148,900	148,9	8,270		demask. WT	10	0,000	0,000	(-1,910826; 1,910826)	demask. WT	10	0,000	<b>B</b>
ukupan broj	19	3555,000												
<b>kategorija: plus (+)</b>														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	1	2332,800	2332,800	265,09	<b>0,000</b>	demask. <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	21,600	4,200	(19,63; 23,57)	demask. <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	21,600	<b>A</b>
Greška	18	158,400	158,400	8,8		demask. WT	10	0,000	0,000	(-1,910840; 1,910840)	demask. WT	10	0,000	<b>B</b>
ukupan broj	19	2491,200												
<b>kategorija: plus plus (++)</b>														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	1	76,050	76,050	31,91	<b>0,000</b>	demask. <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	3,900	2,183	(2,874; 4,926)	demask. <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	3,900	<b>A</b>
Greška	18	42,900	42,900	2,383		demask. WT	10	0,000	0,000	(-1,025657; 1,025657)	demask. WT	10	0,000	<b>B</b>
ukupan broj	19	118,950												
<b>kategorija: plus plus plus (+++)</b>														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	1	1,800	1,800	1,98	<b>0,177</b>	demask. <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	0,600	1,350	(-0,034; 1,234)	demask. <i>eml1-2 eml3-4</i>	10	0,600	<b>A</b>
Greška	18	16,400	16,400	0,911		demask. WT	10	0,000	0,000	(-0,634155; 0,634155)	demask. WT	10	0,000	<b>A</b>
ukupan broj	19	18,200												



Prilog 1. Statistička značajnost brojnosti semenih zametaka u eseju EML1 komplementacije (One-way ANOVA sa Fišerovim testom verovatnoće)

	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	5	58,700	11,740	6,71	<b>0,000</b>	<i>eml1-2 x eml1-2</i>	5	6,000	1,414	(4,779; 7,221)	<i>eml1-2 x eml1-2</i>	5	6,000	<b>A</b>
Greška	24	42,000	1,750			<i>eml1-2 x Ler-0</i>	5	4,600	0,894	(3,379; 5,821)	<i>Ler x eml1-2</i>	5	5,000	<b>A</b>
ukupan broj	29	100,700				<i>Ler-0 x eml1-2</i>	5	5,000	1,225	(3,779; 6,221)	<i>eml1-2 x Ler</i>	5	4,600	<b>A</b>
						<i>Ler-0 x Ler-0</i>	5	4,400	1,14	(3,179; 5,621)	<i>Ler-0 x Ler-0</i>	5	4,400	<b>A B</b>
						<i>GFP-EML1 x Ler-0</i>	5	1,800	1,095	(0,579; 3,021)	<i>Ler-0 x GFP-EML1</i>	5	2,800	<b>BC</b>
						<i>Ler-0 x GFP-EML1</i>	5	2,800	1,924	(1,579; 4,021)	<i>GFP-EML1 x Ler-0</i>	5	1,800	<b>C</b>

Prilog 1. Statistička značajnost brojnosti semenih zametaka u eseju EML3 komplementacije (One-way ANOVA sa Fišerovim testom verovatnoće)

	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	5	85,470	17,093	7,54	<b>0,000</b>	Col-0 x Col-0	5	1,000	1	(-0,607; 2,607)	<i>eml3-4</i> x <i>eml3-4</i>	5	6,000	<b>A</b>
Greška	24	54,400	2,267			Col-0 x <i>eml3-4</i>	5	1,200	1,304	(-0,407; 2,807)	Col-0 x <i>GFP-EML3</i>	5	3,600	<b>B</b>
ukupan broj	29	139,870				<i>eml3-4</i> x Col-0	5	2,400	0,548	(0,793; 4,007)	<i>GFP-EML3</i> x Col-0	5	3,400	<b>B</b>
						<i>eml3-4</i> x <i>eml3-4</i>	5	6,000	2,92	(4,39; 7,61)	<i>eml3-4</i> x Col-0	5	2,400	<b>B C</b>
						<i>GFP-EML3</i> x Col-0	5	3,400	1,14	( 2,010; 4,790)	Col-0 x <i>eml3-4</i>	5	1,200	<b>C</b>
						Col-0 x <i>GFP-EML3</i>	5	3,600	0,894	( 2,210; 4,990)	Col-0 x Col-0	5	1,000	<b>C</b>

Prilog 1. Statistička značajnost brojnosti semena sa kašnjenjem u razviću embriona u eseju EML1 komplementacije (One-way ANOVA sa Fišerovim testom verovatnoće)

<b>kategorija: semena sa kašnjenjem u razviću embriona</b>														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	5	6424,700	1284,940	208,37	<b>0,000</b>	<i>eml1-2</i> x <i>eml1-2</i>	5	38,600	1,949	(36,308; 40,892)	<i>eml1-2</i> x <i>eml1-2</i>	5	38,600	<b>A</b>
Greška	24	148,000	6,170			<i>eml1-2</i> x Ler-0	5	35,000	2,92	( 32,71; 37,29)	Ler x <i>eml1-2</i>	5	35,800	<b>A B</b>
ukupan broj	29	6572,700				Ler-0 x <i>eml1-2</i>	5	35,800	4,44	( 33,51; 38,09)	<i>eml1-2</i> x Ler	5	35,000	<b>B</b>
						Ler-0 x Ler-0	5	9,000	1,000	( 6,708; 11,292)	Ler-0 x Ler-0	5	9,000	<b>C</b>
						<i>GFP-EML1</i> x Ler-0	5	6,000	1,414	( 3,708; 8,292)	Ler-0 x <i>GFP-EML1</i>	5	7,000	<b>C</b>
						Ler-0 x <i>GFP-EML1</i>	5	7,000	1,414	( 4,708; 9,292)	<i>GFP-EML1</i> x Ler-0	5	6,000	<b>C</b>
<b>kategorija: linearni kotiledon</b>														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	5	7864,700	1572,930	172,53	<b>0,000</b>	<i>eml1-2</i> x <i>eml1-2</i>	5	0,000	0,000	(-2,786900; 2,786900)	Ler-0 x <i>GFP-EML1</i>	5	40,000	<b>A</b>
Greška	24	218,800	9,120			<i>eml1-2</i> x Ler-0	5	8,400	1,517	( 5,613; 11,187)	<i>GFP-EML1</i> x Ler-0	5	38,400	<b>A</b>
ukupan broj	29	8083,500				Ler-0 x <i>eml1-2</i>	5	7,600	1,673	( 4,813; 10,387)	Ler-0 x Ler-0	5	32,400	<b>B</b>
						Ler-0 x Ler-0	5	32,400	4,34	( 29,61; 35,19)	Ler-0 x <i>eml1-2</i>	5	7,600	<b>C</b>
						<i>GFP-EML1</i> x Ler-0	5	38,400	4,560	( 35,61; 41,19)	<i>eml1-2</i> x Ler-0	5	8,400	<b>C</b>
						Ler-0 x <i>GFP-EML1</i>	5	40,000	3,160	( 37,21; 42,79)	<i>eml1-2</i> x <i>eml1-2</i>	5	0,000	<b>D</b>

Prilog 1. Statistička značajnost semena sa kašnjenjem u razviću embriona u eseju EML3 komplementacije (One-way ANOVA sa Fišerovim testom verovatnoće)

kategorija: semena sa kašnjenjem u razviću embriona														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	5	7534,300	1506,850	166,50	<b>0,000</b>	Col-0 x <i>GFP-EML3</i>	5	6,800	1,304	( 4,023; 9,577)				
Greška	24	217,200	9,050			<i>GFP-EML3</i> x Col-0	5	6,800	1,924	( 4,023; 9,577)	<i>eml3-4</i> x Col-0	5	39,400	<b>A</b>
ukupan broj	29	7751,500				Col-0 x Col-0	5	4,600	1,14	( 1,823; 7,377)	Col-0 x <i>eml3-4</i>	5	37,600	<b>A</b>
						Col-0 x <i>eml3-4</i>	5	37,600	2,7	( 34,82; 40,38)	<i>eml3-4</i> x <i>eml3-4</i>	5	36,000	<b>A</b>
						<i>eml3-4</i> x Col-0	5	39,400	1,517	(36,623; 42,177)	Col-0 x <i>GFP-EML3</i>	5	6,800	<b>B</b>
						<i>eml3-4</i> x <i>eml3-4</i>	5	36,000	6,16	( 33,22; 38,78)	<i>GFP-EML3</i> x Col-0	5	6,800	<b>B</b>
											Col-0 x Col-0	5	4,600	<b>B</b>
kategorija: linearni kotiledon														
	DF	Adj SS	Adj MS	F	P vrednost	Faktor	N	Srednja vrednost	StDev	95% CI	Faktor	N	Srednja vrednost	Fišerov test tačne verovatnoće
Faktor	5	9560,200	1912,030	185,94	<b>0,000</b>	<i>GFP-EML3</i> x Col-0	5	40,000	2,450	( 37,04; 42,96)	Col-0 x Col-0	5	40,400	<b>A</b>
Greška	24	246,800	10,280			Col-0 x <i>GFP-EML3</i>	5	37,600	5,730	( 34,64; 40,56)	<i>GFP-EML3</i> x Col-0	5	40,000	<b>A</b>
ukupan broj	29	9807,000				Col-0 x Col-0	5	40,400	3,850	( 37,44; 43,36)	Col-0 x <i>GFP-EML3</i>	5	37,600	<b>A</b>
						Col-0 x <i>eml3-4</i>	5	4,400	1,517	( 1,440; 7,360)	<i>eml3-4</i> x Col-0	5	7,400	<b>B</b>
						<i>eml3-4</i> x Col-0	5	7,400	2,410	( 4,44; 10,36)	Col-0 x <i>eml3-4</i>	5	4,400	<b>BC</b>
						<i>eml3-4</i> x <i>eml3-4</i>	5	0,000	0,000	(-2,959854; 2,959854)	<i>eml3-4</i> x <i>eml3-4</i>	5	0,000	<b>C</b>

8.2. Prilog 2.

preklapanja	literaturni izvor	skup podataka 1	skup podataka 2	zabeležen preklop gena	<i>P</i> vrednost
2n x 4n ↓	Erilova i sar., 2009	299			NA
2n x 4n ↑	Erilova i sar., 2009	300			NA
WT x <i>osd1</i> ↑	Schatlowski i sar., 2014	1901			NA
<i>mea</i> 3 DAP ↑	Huang i sar., 2017	695			NA
<i>mea</i> 6 DAP ↑	Huang i sar., 2017	2136			NA
<i>fie</i> ↑	Hsieh i sar., 2011	104			NA
<i>fis</i> 2 ↑	Erilova i sar., 2009	109			NA
<i>eml1-2 eml3-4</i> ↑	ova doktorska disertacija	584			NA
<i>eml1-2 eml3-4</i> ↑ & 2n x 4n ↓	ova doktorska disertacija	584	299	3	0,31
<i>eml1-2 eml3-4</i> ↑ & 2n x 4n ↑	ova doktorska disertacija	584	300	11	0,008
<i>eml1-2 eml3-4</i> ↑ & WT x <i>osd1</i> ↑	ova doktorska disertacija	584	1901	94	8,89E-24
<i>eml1-2 eml3-4</i> ↑ & <i>mea</i> 3 DAP ↑	ova doktorska disertacija	584	695	30	7,49E-07
<i>eml1-2 eml3-4</i> ↑ & <i>mea</i> 6 DAP ↑	ova doktorska disertacija	584	2136	78	3,29E-12
<i>eml1-2 eml3-4</i> ↑ & <i>fie</i>	ova doktorska disertacija	584	104	1	0,51
<i>eml1-2 eml3-4</i> ↑ & <i>fis2</i>	ova doktorska disertacija	584	109	3	0,24

## Biografija autora

Milica S. Milutinović je rođena 12.12.1987. godine u Beogradu. Osnovnu školu, kao i VIII beogradsku gimnaziju, je završila u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2006. godine, smer Biologija, a diplomirala je 18.11.2011. godine sa prosečnom ocenom 9,41. Doktorske studije je upisala školske 2011/2012. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Fiziologija i molekularna biologija biljaka. Od januara 2012. godine radi kao istraživač pripravnik u Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživač saradnik izabrana je decembra 2013. godine. Angažovana je, od januara 2012. godine, na nacionalnom projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja republike Srbije iz programa osnovnih istraživanja pod nazivom: „Fiziološka, hemijska i molekularna analiza diverziteta retkih i ugroženih biljnih vrsta u cilju *ex situ* zaštite i produkcije biološki aktivnih jedinjenja“ (OI173024). Od avgusta 2012. godine do februara 2018. godine, Milica Milutinović bila je na naučnom usavršavanju na *The Ohio State University*, Kolumbus, Ohajo, SAD. Autor je ili koautor 8 naučnih radova. Autor je ili koautor 11 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanih u izvodu (M34) i 1 saopštenja na nacionalnim naučnim skupovima štampanih u izvodu (M64). Milica Milutinović je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije. Dobitnik je nagrade za najbolju poster prezentaciju na simpozijumu međunarodnog značaja „3<sup>rd</sup> International Conference on Plant Biology, 22<sup>nd</sup> SPPS Meeting“ u junu 2018. godine.