

# Epigenetyczne mechanizmy generatywnego rozmnażania roślin okrytozalążkowych

## STRESZCZENIE

Mechanizmy epigenetyczne, takie jak metylacja DNA, interferencja RNA oraz potranslacyjne modyfikacje histonów i reorganizacje struktury chromatyny, odgrywają istotną rolę w procesach reprogramowania genomu zarówno zwierząt, jak i roślin. Prawidłowy epigenetyczny wzorec markerów eu- i heterochromatynowych pozwala bowiem na utrzymanie chromatyny w stanie aktywnym lub transkrypcyjnie wyciszonym. W cyklu życiowym roślin okrytozalążkowych mechanizmy epigenetyczne uczestniczą w reprogramowaniu genomu podczas: 1) różnicowania komórek sporofitu w komórki macierzyste spor (KMS), które przejdą podział mejotyczny, 2) rozwoju żeńskiego i męskiego gametofitu, w którym wyróżniają się gamety, 3) po procesie podwójnego zapłodnienia podczas rozwoju zarodka i bielma. Specjacja KMS i kontrola mejozy, a następnie reprogramowanie genomu komórek plemnikowych i komórki jajowej, nie są autonomiczne i odbywają się na drodze RdDM (ang. *RNA-directed DNA methylation*, metylacji DNA kierowanej przez RNA). W procesy te zaangażowane są komórki towarzyszące, które produkują „mobilne” sygnały w formie siRNA (ang. *small interfering RNA*, małe interferujące RNA). Epigenetyczna kontrola ekspresji genów z udziałem siRNA uczestniczy także w utrzymaniu integralności genomu gamet i zarodka oraz nałożeniu imprintingu rodzicielskiego.

## WPROWADZENIE

W przeciwieństwie do ssaków w zarodkach roślin okrytonasiennych nie występuje wyspecjalizowana linia komórek rozrodczych. Cykl życiowy tych organizmów obejmuje dwie odmienne fazy – wegetatywną (sporofitową) oraz generatywną (gametofitową) (Ryc. 1). Podczas przejścia z fazy wegetatywnej do generatywnej (z 2n do 1n) odbywa się specjacja komórek, które przejdą podział redukcyjny i zainicjują rozwój gametofitu. Komórki te występują w zawiązkach organów rozmnażania – męskich pylnikach oraz żeńskich słupkach z zalążkami [1]. Zarówno w męskich, jak i żeńskich organach płciowych, linia komórek generatywnych powstaje z somatycznych tkanek sporofitu, które przez niekiedy długi okres czasu żyły w określonych warunkach środowiskowych. W rozwijającym się pylniku oraz w zalążkach różnicują się Komórki Macierzyste Spor (KMS), które kierowane są na drogę podziału mejotycznego. W pylniku są to otoczone somatycznymi komórkami tapetum Komórki Macierzyste Mikrospor (KMMi), natomiast w osrodku zalążka różnicuje się Komórka Macierzysta Megaspory (KMM). Efektem podziału mejotycznego KMMi są tetrady haploidalnych mikrospor, zaś KMM – 4 liniowo ułożone zredukowane megaspory. Kolejny etap to rozwój mikrospor w gametofit męski (pyłek) i megaspory w gametofit żeński (woreczek zalążkowy). Produkowane w gametoficie gamety zawierają genetyczną i epigenetyczną informację partnerów rozmnażania, w tym specyficzny dla płci wzorec piętnowania genomowego, który będzie dziedziczony do następnego pokolenia.

Gametofit męski różnicuje się jako efekt dwóch podziałów mitotycznych. Asymetryczny podział mikrospory (mitoza I) prowadzi do powstania dwóch funkcjonalnie zróżnicowanych komórek – skierowanej na drogę rozrodczą komórki generatywnej (KG) oraz pełniącej funkcje somatyczne komórki wegetatywnej (KW). KG następnie dzieli się (mitoza II) na dwie komórki plemnikowe (KP), natomiast KW po zapyleniu wyrasta w łagiewkę pyłkową, która transportuje męskie gamety do woreczka zalążkowego. Podział komórki generatywnej może odbywać się już podczas dojrzwania pyłku w pylniku (pyłek trójkomórkowy; jednoliścienne, krzyżowe) lub dopiero po zapyleniu w rosnącej łagiewce pyłkowej (pyłek dwukomórkowy). KG a następnie KP są zasocjowane z jądrem KW tworząc tzw. męską jednostkę rozrodczą – MGU [2]. Powszechnie uważa się, że MGU uczestniczy w kontrolowanym transporcie komórek męskiej linii płciowej do woreczka zalążkowego [3], aczkolwiek nie wyklucza się iż jest to również jednostka funkcjonalna [4,5].

dr hab. prof. UMK Katarzyna Niedojadło✉,

prof. dr hab Elżbieta Bednarska-Kozakiewicz

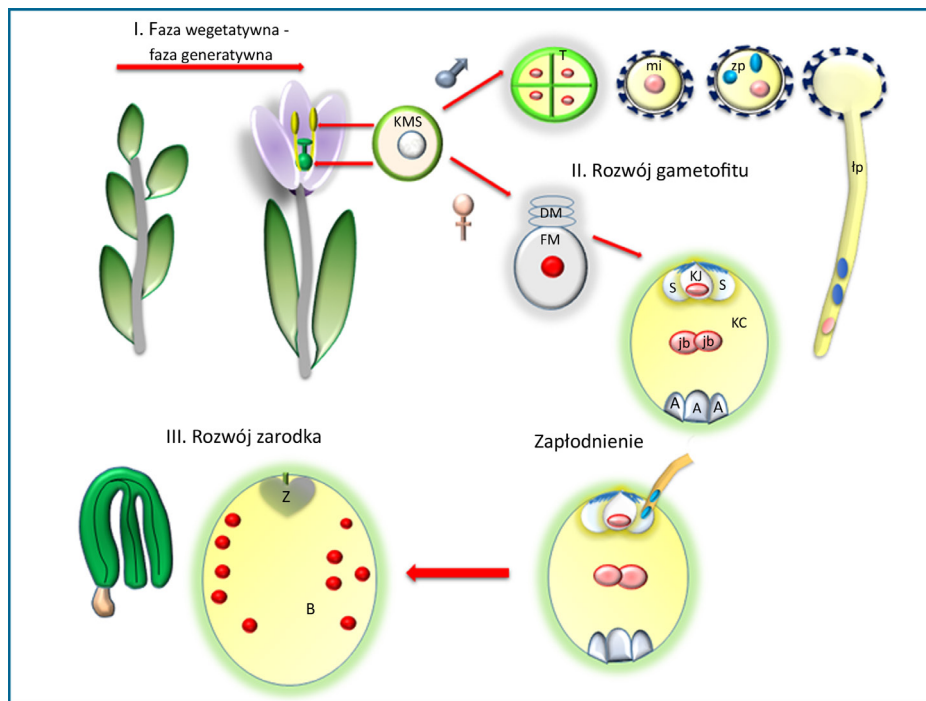
Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej, Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

[https://doi.org/10.18388/pb.2021\\_418](https://doi.org/10.18388/pb.2021_418)

✉autor korespondujący: karask@umk.pl

**Słowa kluczowe:** metylacja DNA, interferencja RNA, żeński/męski gametofit, zygota/zarodek, bielmo, imprinting genomowy

**Wykaz skrótów:** RNAi – interferencja RNA (ang. *RNA interference*), TE – transpozon (ang. *Transposable Element*), sRNA – małe niekodujące RNA (ang. *small noncoding RNA*), siRNA – małe interferujące RNA (ang. *small interfering RNA*), phasiRNA – (ang. *phased secondary siRNA*), easiRNA – epigenetycznie aktywowane siRNA (ang. *epigenetically activated siRNA*), miRNA – mikro RNA (ang. *micro RNA*), RdDM – metylacja DNA kierowana przez RNA (ang. *RNA-directed DNA methylation*), AGO – białka Argonaute (ang. *ARGONAUTE protein*), TGS – transkrypcyjne wyciszenie genu (ang. *Transcriptional Gene Silencing*), PTGS – posttranskrypcyjne wyciszenie genu (ang. *Posttranscriptional Gene Silencing*)



**Rycina 1.** Etapy reprogramowania genomu u roślin kwiatowych. KMS - komórka macierzysta spor, T - tetrada mikrospor, mi - mikrospora, zp - ziarno pyłku, lp - łagiewka pyłkowa, FM - funkcjonalna megaspory, DM - degenerujące megaspory, S - synergida, KJ - komórka jajowa, j, b - jądro biegunowe, KC - komórka centralna, A - antypoda, Z - zarodek, B - bielmo.

Woreczek zalążkowy u większości roślin kwiatowych, w tym u *Arabidopsis*, kukurydzy i ryżu, które są głównymi modelami w badaniach płciowego rozmnażania roślin, różni się jako monosporowy, tj. tylko z jednej zredukowanej megaspory tzw. megaspory funkcjonalnej, pozostałe 3 megaspory ulegają programowanej śmierci. W wyniku trzech podziałów mitotycznych megaspory funkcjonalnej, którym nie towarzyszy cytokineza, powstaje 8 jądrowy woreczek zalążkowy, który następnie różnicuje się w 7 komórkowy gametofit żeński typu Polygonum [1]. Trzy jąder po migracji do bieguna mikropylarnego i celularyzacji tworzą aparat jajowy zbudowany z komórki jajowej (KJ) i dwu synergid (S). Synergidy produkują atraktanty dla łagiewki pyłkowej, a jedna z nich staje się miejscem wrośnięcia łagiewki i uwolnienia komórek plemnikowych. Trzy jądra zlokalizowane na biegunie przeciwnym (chalazalnym) po celularyzacji tworzą antypody (A) spełniające funkcje odżywcze, natomiast pozostałe dwa jądra tzw. jądra biegunowe ulegają fuzji i stają się diplohaploidalnym jądrem komórki centralnej (KC).

U roślin okrytonasiennych występuje unikatowy proces podwójnego zapłodnienia - jedna z komórek plemnikowych ulega fuzji z komórką jajową, druga z komórką centralną. Zapłodnienie inicjuje trzeci etap w życiu rośliny - wytwarzanie zawierających zarodki nasion. Efektem zapłodnienia komórki jajowej jest rozwój diploidalnego zarodka, który zapoczątkuje różnicowanie nowego pokolenia sporofitu (przejście z  $1n$  do  $2n$ ). Z kolei połączenie haploidalnego jądra plemnikowego z diplohaploidalnym jądrem KC inicjuje rozwój tkanki odżywczej triploidalnego bielma.

Każdy z kolejnych etapów rozwoju roślin okrytonasiennych (przejście z fazy wegetatywnej do generatywnej, roz-

wój gametofitu, rozwój zawierających zarodki nasion) wymaga specyficznego, precyzyjnego reprogramowania genomu, w który zaangażowane są mechanizmy epigenetyczne.

## PODSTAWOWE MECHANIZMY EPIGENETYCZNE U ROŚLIN

Podstawową jednostką organizacji chromatyny jest włókno nukleosomowe zbudowane z powtarzających się jednostek - nukleosomów. Rdzeń nukleosomu to oktamer histonów H2A, H2B, H3, H4, na który nawinięta jest nić DNA. Histon H1 asocjuje z DNA łącznikowym i stabilizuje strukturę nukleosomu. Odmienna organizacja chromatyny prowadzi do powstania zdecondensowanej, zawierającej aktywne geny euchromatyny oraz silnie skondensowanej, heterochromatyny konstytutywnej (m.in. sekwencje pericentromerowe, telomerowe, powtarzające się, TE), a także heterochromatyny fakultatywnej, w której występują „wyłączone funkcjonalnie” geny. Odwracalne zmiany, jakie zachodzą w obrębie komponentów chromatyny (białka histonowe, DNA) umożliwiają modulację struktury chromatyny, a co za tym idzie regulację jej aktywności. Celem modyfikacji epigenetycznych jest zmiana wzajemnego powinowactwa histonów i DNA lub destabilizacja nukleosomów a także rekrutacja kompleksów remodelujących chromatynę, co skutkuje zmianą struktury chromatyny, a tym samym dostępnością aparatu transkrypcyjnego do DNA [6].

Do najbardziej powszechnych mechanizmów epigenetycznych należą (Ryc. 2):

- metylacja DNA,
- interferencja RNA, w tym metylacja DNA zależna od RNA (RdDM),

- potranslacyjne modyfikacje histonów,
- przebudowa chromatyny: zależne od ATP remodelowanie chromatyny oraz wymiana histonów.

## METYLACJA DNA

Metylacja DNA to przyłączenie do cytozyny reszty metylowej i powstanie 5' metylocytozyny. Modyfikacja ta może zachodzić w trzech kontekstach – CG i CHG (metylacja symetryczna), lub CHH (gdzie H to A, C, T) – metylacja asymetryczna [7,8]. Efektem metylacji jest kondensacja chromatyny i hamowanie aktywności transkrypcyjnej zmetylowanych obszarów genomu.

U roślin opisano trzy grupy metylotransferaz DNA [9]. Metylotransferaza DNA 1 (MET1) katalizuje metylację w kontekście CG. Metylacja ta, dzięki koordynacji MET1 z białkami rozpoznającymi hemimetylowane miejsca CG w nowo syntetyzowanej nici DNA, może być przenoszona podczas replikacji. Druga grupa to chromometylazy (CMT), które uczestniczą w niezależnej od RdDM metylacji cytozyn, lecz nie preferują hemimetylowanego DNA podczas replikacji. CMT3 katalizuje metylację cytozyn w kontekście CHG, natomiast CMT2 bierze udział w metylacji asymetrycznej CHH. Trzecia grupa to metylotransferazy DNA DRM1 i DRM2 (DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 1 i 2), które uczestniczą w *de novo* metylacji DNA we wszystkich kontekstach. Enzymy te są aktywnie kierowane do specyficznych loci DNA na drodze RdDM przy udziale 24 nt siRNA oraz lncRNA. Uczestniczące w asymetrycznej metylacji CHH enzymy CMT2 oraz DRM2 wykazują odmienne preferencje – CMT2 katalizuje metylację długich TE zlokalizowanych w heterochromatynie, natomiast DRM2 głównie metyluje krótkie TE obecne w euchromatynie.

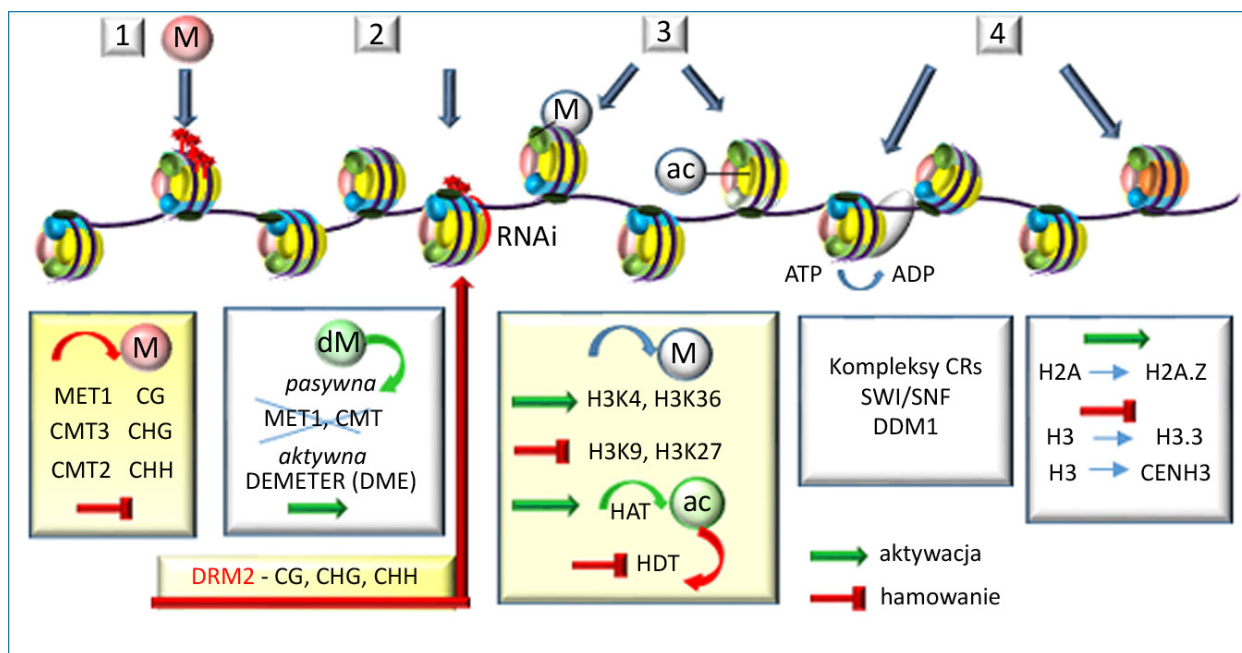
W proces metylacji DNA dodatkowo zaangażowane są białka funkcjonujące jako remodelatory chromatyny – kompleksy SWI2/SNF2-like oraz DDM1 (DECREASED IN DNA METHYLATION 1), które poprzez zmianę struktury nukleosomu koordynują metylację DNA z deacetylacją histonów [10].

## DEMETYLACJA DNA

Metylacja DNA jest procesem odwracalnym. Demetylacja genomu może być procesem pasywnym lub aktywnym [9]. Pasywna demetylacja wynika z hamowania ekspresji metylotransferaz DNA, np. MET1, w wyniku czego w kolejnych rundach replikacyjnych znacznik metylacji nie będzie nanoszony [7]. Demetylacja aktywna wykorzystuje szlaki molekularne, które uczestniczą w naprawie DNA. Usunięcie zmetylowanej cytozyny odbywa się na drodze BER (ang. *Base Excision Repair*) przy udziale glikozylaz DNA – DEMETER (DME), ROS1 (REPRESSOR OF SILENCING 1) oraz DEMETER LIKE 2 i DEMETER LIKE 3 (DML2 i DML3) [7,11]. Enzymy te są aktywne w różnych tkankach rośliny. DME jest specyficzna dla komórek linii generatywnej, gdzie uczestniczy w demetylacji matczyńskich piętnowanych genów, natomiast pozostałe – ROS1, DML2 i DML3 kontrolują aktywną demetylację w komórkach wegetatywnych [7,11]. Podobnie jak metylacja, aktywna demetylacja DNA jest skorelowana z epigenetycznymi modyfikacjami histonów. Środowisko sprzyjające demetylacji DNA tworzą acetylotransferazy histonowe, które modyfikują histony i nakierowują ROS1 na substraty [9,12].

## INTERFERENCJA RNA

Na drodze interferencji RNA regulowane są różne etapy ekspresji genów – od transkrypcji (ang. *Transcriptional Gene Silencing*, transkrypcyjne wyciszenie genów – TGS) do



**Rycina 2.** Podstawowe mechanizmy epigenetyczne u roślin kwiatowych: 1 – metylacja DNA, 2 – RdDM – metylacja DNA zależna od RNA, 3 – potranslacyjne modyfikacje histonów, 4 – przebudowa chromatyny (remodelowanie nukleosomów, wymiana histonów). M – metylacja, dM – demetylacja, ac – acetylacja, RNAi – interferencja RNA.

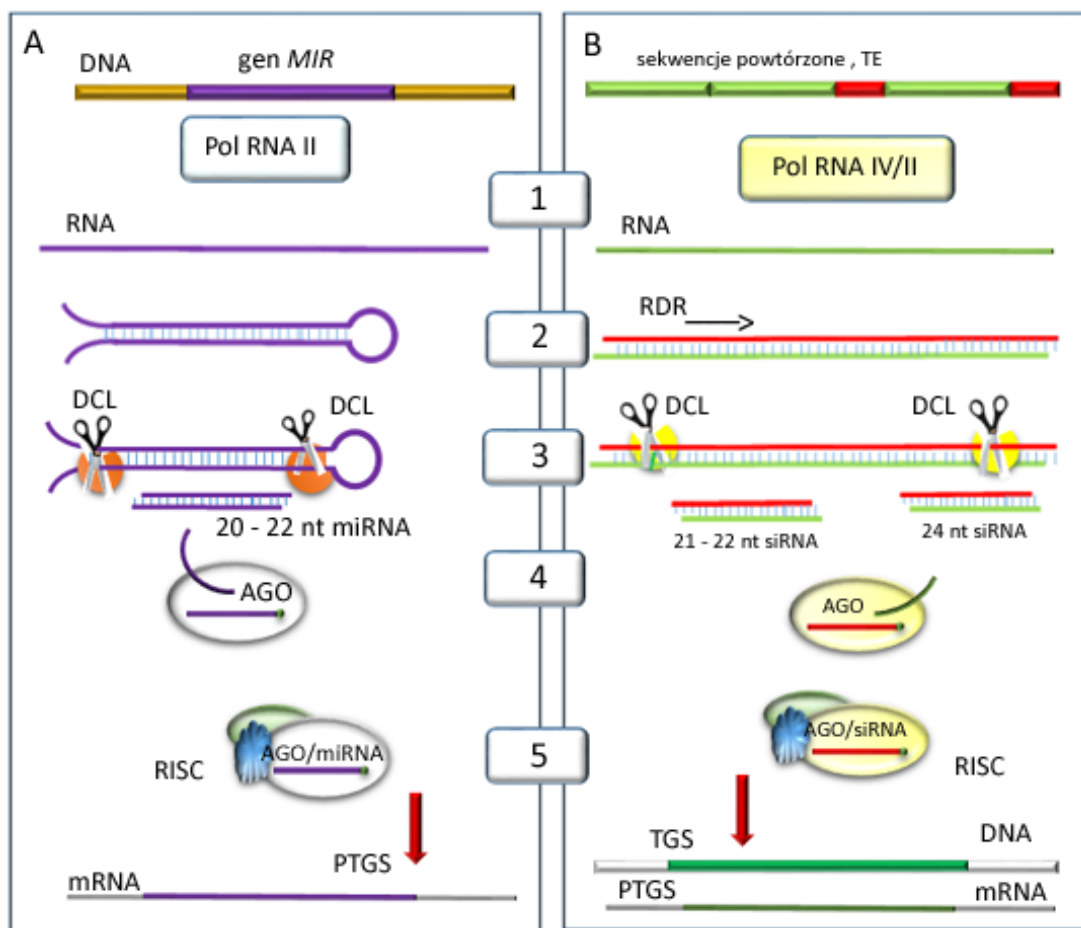
potranskrypcyjnej degradacji mRNA i hamowania translacji (ang. *Posttranscriptional Gene Silencing*, potranskrypcyjne wyciszanie genów – PTGS). U roślin w regulację tych procesów zaangażowane są trzy klasy małych niekodujących sRNA: 20-22 nt miRNA, 24 nt siRNA oraz 21-22 nt siRNA [9,13]. Biogeneza, regulacja i funkcjonowanie sRNA przebiega w 5 podstawowych etapach: (1) synteza pierwotnych jednoniciowych transkryptów, (2) tworzenie dwuniciowych dsRNA, (3) cięcie dsRNA na 21-24 nt odcinki przez endonukleazę Dicer (DCL), (4) asocjacja dsRNA z białkiem ARGONAUTE (AGO) o aktywności RNazy, degradacja jednej z nici RNA i powstanie aktywnego kompleksu RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*), (5) odnajdywanie przez kompleks AGO/sRNA albo docelowego DNA i włączenie TGS, albo docelowego mRNA i wyciszenie ekspresji genu na drodze PTGS (Ryc. 3).

Pierwotne transkrypty miRNA (pri-miRNA) powstają dzięki aktywności Pol RNA II z endogennych genów *MIR*, które są zlokalizowane w międzygenowych oraz wewnątrzgenowych (introny) sekwencjach genomu i mogą być poliadenyłowane a na końcu 5' zawierać czapkę. Dupleksy miRNA (pre-miRNA) formowane są z pierwotnego transkryptu, który dzięki komplementarności zasad formuje strukturę „spinki do włosów”. Ten pre-miRNA jest przycinany przez endonukleazę DCL1 do 21-22 nt dupleksów miRNA/miRNA\*. Dojrzewanie miRNA obejmuje rozdzielenie nici dsRNA (nić miRNA\* ulega degradacji) i asocjację

z białkiem AGO1. Powstałe tą drogą aktywne kompleksy RISC są nakierowywane na docelowe, komplementarne do miRNA transkrypty mRNA i ich dalsza ekspresja zostaje zablokowana na drodze PTGS [9].

W syntezę siRNA zaangażowana jest Pol RNA II oraz specyficzna tylko dla roślin Pol RNA IV. Enzym Pol RNA IV katalizuje transkrypcję krótkich TE zlokalizowanych głównie w euchromatynowych regionach genomu. Krótkie 30-40 nt transkrypty są przekształcane w dupleksy przez Pol RNA zależną od RNA 2 (RDR2). dsRNA są następnie przycinane do 24 nt siRNA przez enzym DCL3, jedna z nici RNA ulega degradacji, a druga w kompleksie z AGO4/6 kierowana jest na docelową sekwencję DNA. Efektem aktywności Pol RNA IV jest synteza z jednego pierwotnego transkryptu jednego 24 nt siRNA [14,15].

21 nt i 22 nt siRNA mogą pochodzić z lncRNA dłuższych niż 200 nt. Pierwotne transkrypty syntetyzowane są przez Pol RNA II przede wszystkim z długich sekwencji powtórzonych, ale także z sekwencji kodujących białka. Ich duplikację katalizuje zależna od RNA polimeraza RNA 6 (RDR6). W przycinaniu dsRNA na 21 i 22 nt odcinki uczestniczą endonukleazy DCL2 i DCL4. Kolejne etapy dojrzewania, tj. degradacja jednej z nici RNA i formowanie aktywnych kompleksów RISC odbywa się przy udziale AGO1 oraz AGO2. Syntetyzowane tą drogą siRNA biorą udział w regulacji ekspresji genów zarówno na drodze PTGS, jak i TGS.



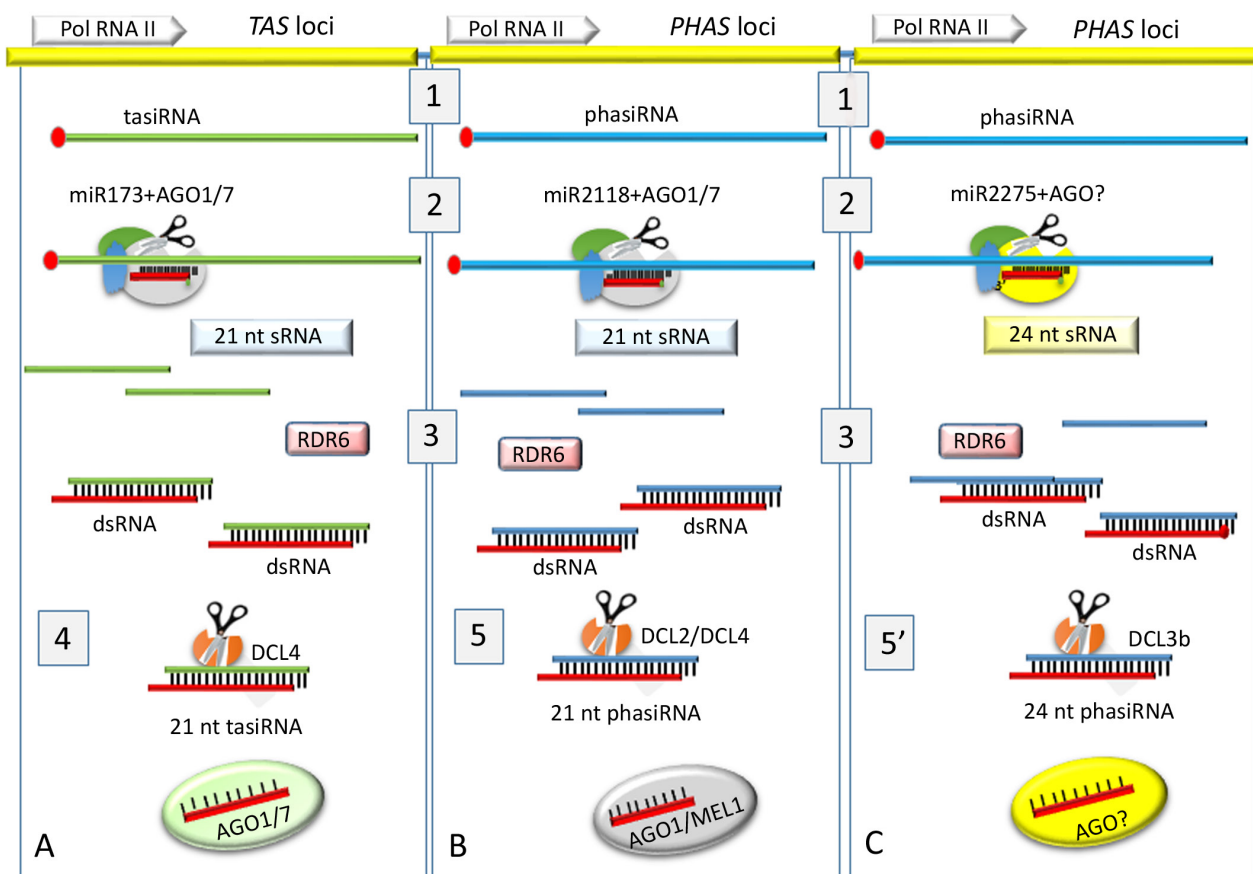
**Rycina 3.** Główne etapy biogenezy małych niekodujących RNA: A – miRNA, B – siRNA. 1 – synteza pierwotnych transkryptów, 2 – duplikacja RNA:RNA, 3 – cięcie dsRNA przez DCL, 4 – asocjacja dsRNA z AGO i degradacja jednej z nici, 5 – odnajdywanie docelowej sekwencji RNA/DNA przez aktywny kompleks RISC (TGS/PTGS).

Kompleksy siRNA/AGO1 uczestniczą w PTGS, a siRNA/AGO2 w TGS [15].

W regulacji ekspresji genów u roślin ważną rolę pełnią pochodzące z transkryptów Pol RNA II tzw. wtórne siRNA. W ich biogenezie uczestniczą miRNA (Ryc. 4). Pierwotne transkrypty wtórnych siRNA pochodzą z długich sekwencji DNA nazywanych *TAS* oraz *PHAS*. Sekwencje te zawierają wielokrotnie powtarzające się dwudziestokilku nukleotydowe odcinki, które stają się źródłem 21 nt tasiRNA (ang. *trans acting siRNA*) oraz 21 nt i 24 nt phasiRNA (ang. *phasid siRNA*) [16,17]. Pierwotne transkrypty wtórnych siRNA, podobnie jak inne transkrypty Pol RNA II, wyposażone są w czapkę na końcu 5' oraz ogon poli(A) na końcu 3'. Pierwszym etapem ich dojrzewania jest cięcie pierwotnego transkryptu przy udziale 22 nt miRNA/AGO. Powstałe liczne jednoniciowe odcinki RNA są duplikowane przez Pol RNA zależną od RNA RDR6. W efekcie z pierwotnego transkryptu powstaje wiele dsRNA (tasi/phasiRNA). Następnie endonukleaza DCL przycina dsRNA na 21 nt tasi/phasiRNA (DCL2/4) lub 24 nt phasiRNA (DCL3b). Po degradacji jednej z nici dupleksu powstają aktywne kompleksy RISC zawierające białko AGO oraz tasiRNA lub phasiRNA. 21 nt tasi/phasiRNA asocjują z AGO1, którego odpowiednikiem w linii komórek płciowych jest MEL1. Białko AGO, które wiąże 24 nt phasiRNA nie jest jeszcze do końca poznane, ale ostatnie badania wskazują, że może to być AGO2b oraz AGO18 [18].

U traw loci *PHAS* obecne są głównie w regionach międzygenowych, natomiast u roślin dwuliściennych (np. *Arabidopsis*) 21 nt phasiRNA generowane są też z genów kodujących białka [16]. Najlepiej poznane u *Arabidopsis* tasiRNA uczestniczą w regulacji genomu tkanek somatycznych [19]. Z kolei w procesach płciowego rozmnażania roślin, obok „klasycznych” 24 nt siRNA [4,20,21], szczególnie rolę pełnią phasiRNA [17,22].

siRNA zaangażowane są zarówno w PTGS, jak i TGS. Transkrypcyjne wyciszenie genów inicjowane jest na drodze *de novo* metylacji DNA (RdDM). W RdDM uczestniczą 24 nt siRNA, których źródłem jest Pol RNA IV (droga kanoniczna) oraz 21 nt siRNA powstające z długich transkryptów Pol RNA II (droga niekanoniczna). Niezależnie od biogenezy siRNA, w miejscu przeznaczonym do metylacji enzym Pol RNA V transkrybuje długie, niekodujące RNA tzw. szkieletowe RNA, które nie oddysocjują od matrycy. Kompleksy RISC, zawierające 24 nt „klasyczne” siRNA lub 21 nt siRNA, odnajdują docelowe sekwencje DNA na drodze komplementarności siRNA do szkieletowych RNA. Osadzenie aktywnego kompleksu RISC na szkieletowym RNA rekrutuje metylotransferazę DRM2, dzięki której inicjowana jest *de novo* metylacja przyległej sekwencji DNA [14,15,23].



**Rycina 4.** Biogeneza tasiRNA i phasiRNA u roślin okrytonasiennych. A – 21 nt tasiRNA, B – 21 nt phasiRNA, C – 24 nt phasiRNA. 1 – transkrypcja loci *TAS* i loci *PHAS*, 2 – cięcie pierwotnych transkryptów przez miRNA/AGO, 3 – duplikacja 21 nt i 24 nt RNA przez RDR6, 4 – dojrzewanie 21 nt tasiRNA+AGO1/7, 5- 5' dojrzewanie kompleksów phasiRNA/AGO: 21 nt phasiRNA (5) oraz 24 nt phasiRNA (5') [na podstawie 16,18].

Kompleksy AGO/siRNA, oddziałując z Pol RNA V i jej transkryptami, inicjują nie tylko *de novo* metylację DNA, ale współpracując z wieloma innymi czynnikami uczestniczą w dalszym remodelowaniu chromatyny [9,23]. Do sekwencji zawierających zmetylowane cytozyny rekrutowane są enzymy włączone w epigenetyczne modyfikacje histonów, takie jak deacetylaza histonowa, metylotransferazy histonowe (H3K9-specyficzne metylotransferazy KYP(SUVH4), SUVH5/6 i SUVH2/9) oraz K3K4-specyficzna demetylaza JUMONJI 14 (JM14), a także ATPazowe kompleksy rodziny SWI/SNF (ang. *Switch/Sucrose Non-Fermentable*, ATP-zależne kompleksy przebudowujące chromatynę typu SWI/SNF) uczestniczące w pozycjonowaniu nukleosomów. Efektem tych zmian epigenetycznych jest heterochromatynizacja docelowych sekwencji DNA. Kanoniczna droga RdDM prawdopodobnie stanowi „samonapędzającą się” pętlę w wyciszaniu heterochromatynowych TE i pełni ważną rolę w utrzymaniu integralności genomu roślin. Natomiast droga niekanoniczna wydaje się być włączona w regulację tylko pojedynczych TE obecnych w genomie oraz uczestniczy w regulacji ekspresji genów kodujących białka [9,23].

#### POTRANSLACYJNE MODYFIKACJE HISTONÓW

Epigenetyczne modyfikacje histonów to dołączanie do położonych w N-końcowych domenach tych białek reszt lizyny, argininy, treoniny lub seryny grup metylowych, acetylowych, fosforanowych oraz cząsteczek ubikwityny [8,24]. W zależności od typu naniesionego markera efektem tych modyfikacji może być „otwieranie” lub „zamykanie” struktury chromatyny. Acetylacji podlegają głównie histony H4 i H3, rzadko H1 i H2A. Modyfikacja ta prowadzi do euchromatynizacji i otwierania chromatyny. Acetylacja histonów jest odwracalnym, stosunkowo dynamicznym procesem, kontrolowanym przez dwie działające opozycyjnie grupy enzymów – acetylotransferazy (HAT) oraz deacetylasy (HDAC) [25].

Metylacji podlegają głównie reszty lizyny histonu H3. Lizyna jest aminokwasem zdolnym do akceptacji trzech grup metylowych, dzięki czemu może być mono-, di- lub trimetylowana. U roślin najlepiej poznane są 3 typy metylacji histonów – trimetylacja H3K27 (H3K27me3, trimetylacja reszty lizyny 27 histonu H3), dimetylacja histonu H3K9 (H3K9me2, dimetylacja reszty lizyny 9 histonu H3) oraz mono-, di- i trimetylacja H3K4 (H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, mono-, di- i trimetylacja reszty lizyny 4 histonu H3). H3K27me3 jest głównym markerem wyłączonej funkcjonalnie euchromatyny, występuje w miejscach hamowania ekspresji genu. Modyfikacja ta wydaje się być najmniej zależna od innych procesów epigenetycznych [26]. Obecność H3K27me3 stwierdza się przede wszystkim w transkrybowanych regionach genu, w tym genów kodujących czynniki transkrypcyjne. Geny regulowane poprzez metylację H3K27me2 są zazwyczaj tkankowo specyficzne, co wskazuje na wysoką precyzję tego procesu. Z H3K27me3 kolokalizuje białko LHP1 (LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1), które prawdopodobnie funkcjonuje jako „czytnik” tej modyfikacji chromatyny [26].

Modyfikacja H3K9me2 lokalizowana jest głównie w heterochromatynie konstytutywnej tj. w sekwencjach bogatych w TE, regionach centromerowych i pericentromerowych. H3K9me2 pełni ważną rolę w wyznaczaniu miejsc innej niż CG metylacji DNA przeprowadzanej przez chromometylasy CMT3 i CMT2, tj. na drodze niezależnej od RdDM [27].

Wszystkie trzy typy metylacji H3K4 (H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3) występują na terenie euchromatyny – modyfikacja ta jest znacznikiem aktywnej chromatyny. U *Arabidopsis* dwie trzecie genów zawiera jeden z tych markerów. H3K4me2 i H3K4me3 zlokalizowane są głównie w sekwencjach promotorowych, natomiast H3K4me1 występuje w „ciele genu”. Geny zawierające H3K4me3 ulegają wysokiej ekspresji w wielu tkankach. Za metylację histonów odpowiedzialne są metylotransferazy (HMT), które przenoszą grupę metylową z S-adenozylometioniny (SAM) na docelowe reszty aminokwasowe białka. Cechą charakterystyczną HMT jest obecność 130 aminokwasowej domeny SET. Kompleks Polycomb (PRC) (białko E(Z), Su(Var)3-9 oraz TRITHORAX) uczestniczy w metylacji euchromatynowego H3K27, prowadząc do heterochromatyzacji. Z kolei metylotransferaza SUVH4 (KRYPTONITE – KYP) bierze udział w metylacji obecnego w heterochromatynie H3K9, czego efektem jest utrzymanie nieaktywnej transkrypcyjnie struktury chromatyny [9].

Metylacja histonów, podobnie jak acetylacja, jest procesem odwracalnym. Usuwanie reszt metylowych odbywa się przy udziale demetylaz histonów (HDM) oraz enzymów posiadających domenę jumonji np. JHDM (ang. *JmjC domain-containing histone demethylase*) [28].

#### PRZEBUDOWA CHROMATYNY

W remodelowaniu chromatyny uczestniczą zawierające podjednostkę katalityczną ATPazy kompleksy CRC (CHROMATIN REMODELING COMPLEX), m.in. kompleksy SWI/SNF, SWR1, SNF2 (w tym IDM1), oraz specyficzny dla linii komórek rozrodczych DDM1 [29,30]. Główne procesy włączone w przebudowę chromatyny to przesuwanie nukleosomów i usuwanie oktamerów histonowych [6]. Z remodelowaniem chromatyny ściśle związany jest proces wymiany histonów. W nukleosomie, obok histonów kanonicznych, występują ich warianty, które włączane są do chromatyny niezależnie od replikacji [31,32]. Remodeler SNF2 (u *Arabidopsis* ATRX) kontroluje wymianę histonu H3 na H3.3, którego obecność aktywuje kompleks metylotransferazy histonu H3K27 (PRC2). Do zmetylowanych H3 wiąże się białko LHP1, którego obecność „utrwała” skondensowaną strukturę chromatyny [26]. Natomiast remodeler IDM1 uczestniczy w wymianie H2A na H2A.Z. Ten wariant histonu H2A występuje w miejscach euchromatynizacji – H2A.Z oddziałuje z glikozylazą ROS1 zapobiegając hypermetylacji DNA oraz promuje acetylację histonów [30, 33]. Z kolei wariant centromerowego H3 – CNH3 uczestniczy w powstawaniu kinetochoru i prawidłowym rozdzielaniu chromatyd podczas podziału [34].

Efektom występowanie różnych wariantów tego samego histonu jest odmienny potencjał do ich modyfikacji epigenetycznych [32].

## EPIGENETYCZNA REGULACJA PRZEJŚCIA Z FAZY WEGETATYWNEJ DO GENERATYWNEJ

### SPECJACJA KOMÓREK LINII REPRODUKCYJNEJ

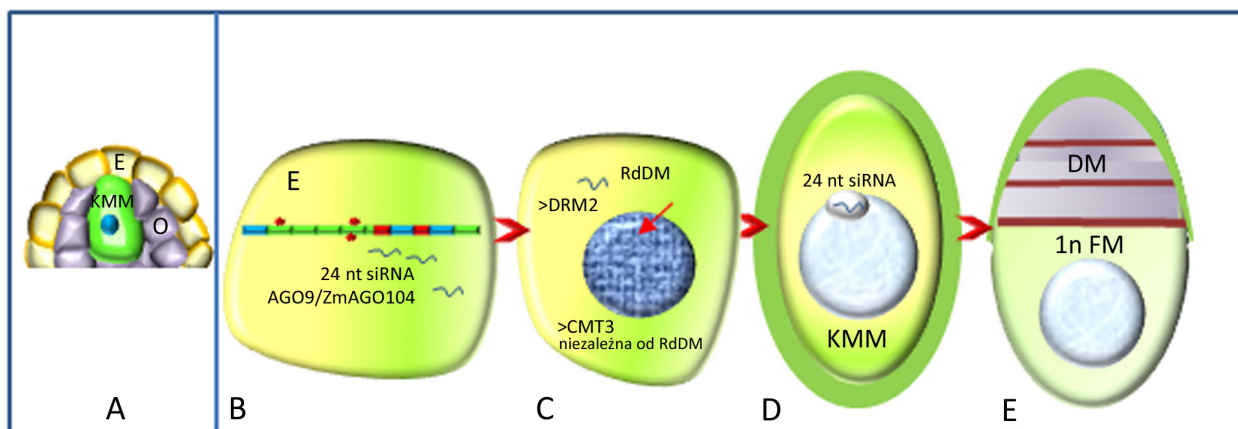
Przejście z fazy wegetatywnej do generatywnej (Ryc. 1) to różnicowanie komórek somatycznych rośliny w komórki, które przejdą podział redukcyjny (KMS). To, które komórki zostaną skierowane na drogę reprodukcyjną zależy od ich lokalizacji w zawiązkach pylników, czy zalążków. Proces ten nie jest bowiem autonomiczny, uczestniczą w nim somatyczne komórki otaczające, które produkują mobilne sygnały w postaci siRNA. Zarówno w linii żeńskiej, jak i męskiej, w różnicujących się KMS wzrasta objętość jądra komórkowego i następuje globalna dekondensacja chromatyny. Wiąże się to z epigenetycznym reprogramowaniem chromatyny, w którym uczestniczą procesy metylacji DNA oraz modyfikacje histonów. Reprogramowanie komórek somatycznych w komórki linii reprodukcyjnej badane jest głównie u dwuliściennej *Arabidopsis* oraz u jednoliściennych ryżu i kukurydzy.

### LINIA ŻEŃSKA

W zalążku w specjację komórki macierzystej megaspor włączony jest proces wyciszania ekspresji genów z udziałem 24 nt siRNA występujących w kompleksie z AGO9 u *Arabidopsis* oraz ZmAGO104 u kukurydzy [35,36] (Ryc. 5). Ta klasa siRNA produkowana jest po aktywacji TE w komórkach epidermy ośrodka [20,34]. Również współpracujące z nimi białka AGO nie są produkowane w KMM, miejscem ich biogenezy są głównie komórki epidermalne ośrodka [31,35]. Obecnie uważa się, że epidermalne AGO9 (i jego homologi) w kompleksie z 24 nt siRNA są transportowane do pozostałych komórek zalążka, gdzie uczestniczą w wyciszaniu TE, regulacji ekspresji genów oraz specjacji tylko jednej z komórek ośrodka w KMM (Ryc. 5) [17,20].

Podczas specjacji KMM w pozostałych komórkach ośrodka obserwuje się wzrost ekspresji enzymów uczestniczących w metylacji DNA na drodze RdDM (DRM2) oraz niezależnie od RdDM (CMT3). Towarzyszy temu obniżenie poziomu acetylacji H3K9ac, co wskazuje na epigenetyczne wyciszanie chromatyny. Uważa się, że efektem działania epidermalnych sygnałowych siRNA na komórki ośrodka jest hamowanie genów koniecznych do zajścia mejozy / wyjścia z cyklu mitotycznego. Tylko jedna z komórek ośrodka „wymyka się” z tej kontroli (izolacja kalozowa?), następuje odblokowanie genów meiotycznych i dochodzi do podziału redukcyjnego [20].

Udział białek AGO oraz szlaku RdDM w specjacji KMM potwierdzają badania mutantów. U *Arabidopsis* w zalążkach mutantów *ago9* [35] i *ago4* [37] a także u mutantów *zmag104* u kukurydzy [36] w ośrodku różnicuje się kilka KMM. Dodatkowo u mutantów *zmag104* następuje obniżenie poziomu metylacji DNA w kontekście CHG i CHH, wzrasta też transkrypcja regionów powtórzonych i aktywacja TE, które u roślin dzikich pozostają zmetylowane [36]. Ujawnia to, iż ważną funkcją kompleksów AGO/siRNA w komórkach rozwijającego się zalążka jest wyciszanie TE. Nieprawidłowa liczba KMM występuje też u mutantów innych elementów RdDM np. *atrd2*, *atrd6*, *atdcl3* [35]. Interesujące, że odpowiedź na mutacje elementów szlaku RdDM są różne. U mutantów *ago9* następuje specjacja KMM, ale na skutek zaburzeń w kondensacji chromatyny mejoza zostaje zahamowana i nie powstaje tetrad megaspor. Jednakże KMM wchodzi w megagametogenezę i różnicuje się w niezredukowany 7 komórkowy gametofit żeński (diplosporowy woreczek zalążkowy). Natomiast u mutantów *zmag104* nie dochodzi do wyróżnicowania KMM (brak ściany kalozowej), ale jedna z komórek ośrodka przejmuje funkcję megaspori funkcjonalnej, z której rozwija się diploidalny gametofit żeński (aposporowy woreczek zalążkowy) [38,39]. Te odmienne odpowiedzi wskazują, że przejście z fazy wegetatywnej do generatywnej jest progresywnie regulowane przy udziale różnych kompleksów AGO/24 nt siRNA. ZmAGO104 działa jako represor somatycznego rozwoju komórek, które zachowują zdolność do podziałów mito-



**Rycina 5.** Model udziału 24 nt siRNA w reprogramowaniu somatycznej komórki zalążka w komórkę linii generatywnej (KMM) u *Arabidopsis*. A – KMM w ośrodku zalążka. B – E – Specyfikacja KMM, B – synteza 24 nt siRNA w komórkach epidermalnych, C – transport siRNA do komórek ośrodka, w których na drodze RdDM oraz niezależnie od RdDM uczestniczą w hamowaniu genów koniecznych do zajścia mejozy, D – tylko w jednej komórce następuje odblokowanie genów meiotycznych i zachodzi mejoza, E – efektem mejozy jest powstanie zredukowanej funkcjonalnej megaspori. E – epiderma, O – ośrodek, KMM – komórka macierzysta megaspor, FM – funkcjonalna megaspora, DM – degenerująca megaspora [na podstawie 17,20].

tycznych, ale w sposób specyficzny dla funkcjonalnej megaspori, podczas gdy AGO9 hamuje specyfikację w kierunku generatywnym innych, poza KMM, komórek ośrodka. Wytwarzanie gametofitów żeńskich z komórek, które nie przeszły mejozy, wydaje się świadczyć o niezależnej regulacji procesu megasporogenezy (mejozy) i megagametogenezy (rozwój gametofitu).

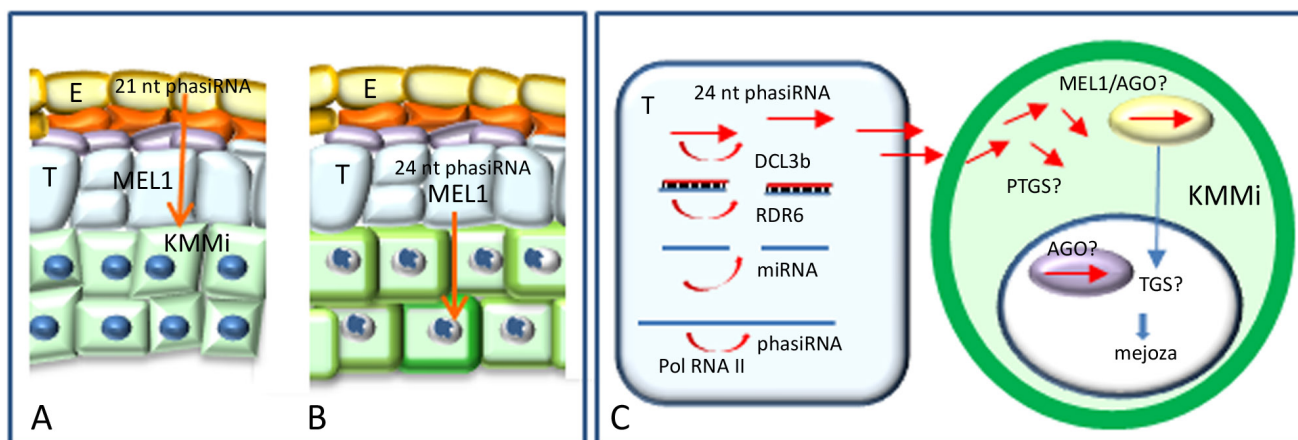
Jak wiadomo zmiany wzorca metylacji DNA są silnie skorelowane z innymi modyfikacjami chromatyny, takimi jak skład nukleosomu i potranslacyjne modyfikacje histonów. Badania u *Arabidopsis* pokazały, że różnicowaniu KMM towarzyszą dynamiczne zmiany poziomu białek histonowych [40,41]. Przed inicjacją mejozy następuje przejściowe globalne usunięcie histonu H1, a następnie H2A.Z, co wskazuje na przebudowę chromatyny. Chromatyna ulega silnej dekondensacji, a liczba chromocentromów obniża się. Dekondensacja chromatyny nie jest całkowita – nadal widoczne są wyznakowane CENH3 (wariant histonu H3 specyficzny dla centromeru) sekwencje powtórzone, w których obecny jest specyficzny dla heterochromatynowych TE H3K9me2. Na tej podstawie sugeruje się, że obserwowane zmiany w heterochromatynie KMM nie są związane z endogennymi TE, co pozostaje w zgodzie z danymi iż funkcjonujące w KMM siRNA pochodzą z otaczających komórek somatycznych [17]. W porównaniu do komórek ośrodka, w KMM następuje obniżenie poziomu H3K27me2 oraz wzrost H3K4me2, zatem docelowe zmiany dotyczą przede wszystkim regionów euchromatynowych. Jednakże mimo obecności markerów „dostępnej” chromatyny w KMM spada poziom acetylacji histonu H4 oraz Pol RNA II, co wskazuje że euchromatyna pozostaje w stanie „potencjalnie otwartym”. Ostatecznym efektem obserwowanych zmian (*de novo* metylacja DNA, modyfikacje histonów) jest ustalenie nowego wzorca transkrypcji, który staje się odmienny od otaczających komórek somatycznych [40,42].

## LINIA MĘSKA

Podobnie jak w linii żeńskiej, również w pylniku specjacja komórek linii płciowej nie jest autonomiczna, lecz odbywa się na drodze sygnalizacji komórkowej z udziałem

ruchomych małych niekodujących RNA (Ryc. 6). U roślin jednoliściennych w procesie tym szczególną rolę odgrywają reprodukcyjne 21 nt i 24 nt phasiRNA [17]. Ich precyzyjna rola pozostaje wciąż nieznaną, ale badania na mutantach pokazały, że odgrywają one krytyczną rolę w męskiej płodności. U kukurydzy [22] i ryżu [43] przed inicjacją mejozy w komórkach epidermalnych pylnika produkowane są 21 nt phasiRNA, które są wiązane przez specyficzny dla linii reprodukcyjnej AGO1 – MEIOSIS ARRESTED AT LEPTOTENE1 (MEL1). Poziom tych pre-mejotycznych phasiRNA obniża się podczas dalszego rozwoju pylnika. Z kolei już podczas mejozy komórki tapetum syntetyzują 24 nt phasiRNA [22,43,44]. Zarówno 21 nt jak i 24 nt phasiRNA są mobilne i po syntezie przemieszczają w kierunku centrum pylnika. Specyficzne miejsca biogenezy oraz przemieszczanie się reprodukcyjnych phasiRNA potwierdzają badania mutantów sygnalizacji międzykomórkowej. 21 nt phasiRNA nie są produkowane u mutantów sygnalizacji epidermalnej, natomiast 24 nt phasiRNA sygnalizacji subepidermalnej. Efektem braku phasiRNA są zaburzenia, takie jak nadmiar, bądź brak mejocytów oraz nieprawidłowe różnicowanie tapetum. Brak wyróżnicowanych KMMi występuje głównie u mutantów 24 nt phasiRNA, co wskazuje na ich kluczową rolę reprogramowaniu komórek linii generatywnej [22].

Udział phasiRNA w specyfikacji KMMi potwierdzają badania mutantów szlaku ontogenezy phasiRNA. Ekspresja molekuł włączonych w biogenezę oraz funkcjonowanie 21 nt phasiRNA, tj. miR2118 (który jest konieczny do rozcinania pierwotnych transkryptów pre-phasiRNA), lincRNA oraz MEL1 jest skorelowana w czasie z różnicowaniem komórek somatycznych w komórki linii płciowej. W dalszych etapach rozwoju pylnika poziom ekspresji tych molekuł znacząco obniża się [16]. Autorzy tych badań proponują, że phasiRNA pełnią funkcję mobilnych sygnałów, które koordynują rozwój pylnika. Produkowany w epidermie 21 nt phasiRNA uczestniczyłby w specjacji tkanek pylnika, w tym tkanki sporogennej, natomiast produkowany w tapetum 24 nt RNA byłby włączony w kontrolę mejozy. Rola phasiRNA w różnicowaniu komórek pylnika byłaby zatem podobna do funkcji pochodzących z TE mobilnych siRNA



**Rycina 6.** Model udziału phasiRNA w reprogramowaniu somatycznych komórek pylnika w komórki linii generatywnej (KMMi) u ryżu: A – przed mejozą w komórkach epidermalnych syntetyzowane są ruchome premejotyczne 21 nt phasiRNA, B – we wczesnej mejozie tapetum produkuje 24 nt phasiRNA, C – pochodzące z tapetum 24 nt phasiRNA są transportowane do KMMi, w których na drodze PTGS/TGS (?) aktywują geny mejotyczne oraz uczestniczą w remodelowaniu chromatyny i przebiegu mejozy. E – epiderma, T – tapetum, KMMi – komórki macierzyste mikrospor [na podstawie 17].



w załączku *Arabidopsis*. Ten wzorzec akumulacji reprodukcyjnych phasiRNA nie jest jednakże powszechny. U jęczmienia i pszenicy akumulację 24 nt phasiRNA stwierdzono już przed mejozą, ale ich biogeneza, która wydaje się być odmienna od tych obecnych u ryżu i kukurydzy, nie jest do końca poznana. Prawdopodobnie są wiązane przez AGO6 i mogą uczestniczyć w utrzymaniu męskiej płodności podczas stresu środowiskowego [18].

Kierowane nieautonomicznie zmiany ekspresji genów podczas specjacji KMMi znajdują odzwierciedlenie w szczególnym dla tych komórek wzorcu metylacji DNA [45]. W porównaniu do komórek tapetum, w KMMi wysoki poziom metylacji DNA występuje w kontekście CG i CHG, natomiast jest niski w kontekście CHH. U *Arabidopsis*, pomimo globalnej dekondensacji chromatyny, w KMMi obecne są hypermetylowane regiony (głównie w kontekście CHH, ale również CG i CHG), które kodują małe RNA. Hypermetylowane regiony, których metylacja odbywa się na drodze kanonicznej RdDM, tj. z udziałem Pol RNA IV i V, zlokalizowane są przede wszystkim w pobliżu TE, co wskazuje na wyciszanie obecnych tam sekwencji transpozonowych. Natomiast specyficzne płciowo regiony hypermetylowane najczęściej nakładają się na sekwencje genowe, rzadko na TE. Ujawnia to, że podczas specjacji KMMi metylacja na drodze kanonicznej RdDM uczestniczy głównie w integracji genomu poprzez wyciszanie TE. Z kolei obecność płciowo specyficznych sekwencji hypermetylowanych może odzwierciedlać udział RdDM w regulacji indywidualnych genów [45]. Kilka genów, które podlegają tego typu regulacji, zostało scharakteryzowane w KMMi u *Arabidopsis*. Jednym z nich jest gen *MPS1* (MULTIPOLAR SPINDLE 1), który koduje białko uczestniczące w organizacji wrzeciona kariokinetycznego. Prawidłowy splicing mRNA genu *MPS1* wymaga zależnej od RNA metylacji ostatniego intronu. Jego retencja u mutantów *de novo* metylotransferaz DNA (*drm1*, *drm2*) i *rdr2* prowadzi do pojawienia się przedwczesnego kodonu stop i produkcji niefunkcjonalnego białka MPS1. Efektem są zaburzenia mejozy i powstawanie triad oraz pentad [45]. Jak dotąd u *Arabidopsis* nie określono, jakie rodzaje sRNA włączone są w regulację ekspresji genów w KMMi. Wiadomo, że u tego gatunku produkowane są zarówno tasiRNA, jak i 21 nt phasiRNA, które na drodze niekanonicznej mogą wyciszać specyficzne geny [16]. Ponieważ tasiRNA uczestniczą głównie w procesach wegetatywnych, można przypuszczać że w komórkach linii generatywnej, podobnie jak u traw, ważną rolę odgrywają 21 nt phasiRNA, które u *Arabidopsis* produkowane są również z genów kodujących białka [16,22].

Reorganizacja chromatyny podczas specjacji KMMi przebiega podobnie jak KMM, co sugeruje że procesy te są wymagane do przejścia z fazy wegetatywnej do generatywnej i są konserwowane w obydwu liniach płciowych. U *Arabidopsis* w jądrach komórek zlokalizowanych w centrum pylnika dochodzi do globalnej dekondensacji chromatyny oraz dużej redukcji liczby i wielkości chromocentrow [41]. Podobnie jak w KMM, z chromatyny KMMi usuwany jest histon H1, znacząco obniża się poziom H2A.Z. W proces usuwania H1 prawdopodobnie włączona jest pośredniczona przez CDK2 fosforylacja tego histonu, który po usunięciu ulega degradacji w proteasomach. Jednocześnie następuje obni-

żanie poziomu znaczników „wyłączonej” euchromatyny (H3K27me3) oraz wzrost poziomu chromatyny „otwartej” [40]. Zmianom struktury chromatyny towarzyszą zmiany wzorca transkrypcji. Aż ponad 1000 genów kodujących czynniki transkrypcyjne ulega ekspresji w KMMi [46]. W komórkach tych dochodzi też do ekspresji prawie 1300 TE, które stanowią aż ok. 30% wszystkich znanych TE u *Arabidopsis*. Ponad połowa tych TE jest specyficzna tylko dla KMMi, co wskazuje że pełnią one ważną rolę w przebiegu mejozy [47]. KMMi są miejscem ekspresji AGO3 i AGO8, które w kompleksie z siRNA mogą uczestniczyć w „endogennym” wyciszaniu genów. Natomiast gen *AGO9*, podobnie jak w linii żeńskiej, ulega ekspresji w somatycznych tkankach pylnika [47].

## MEJOZA

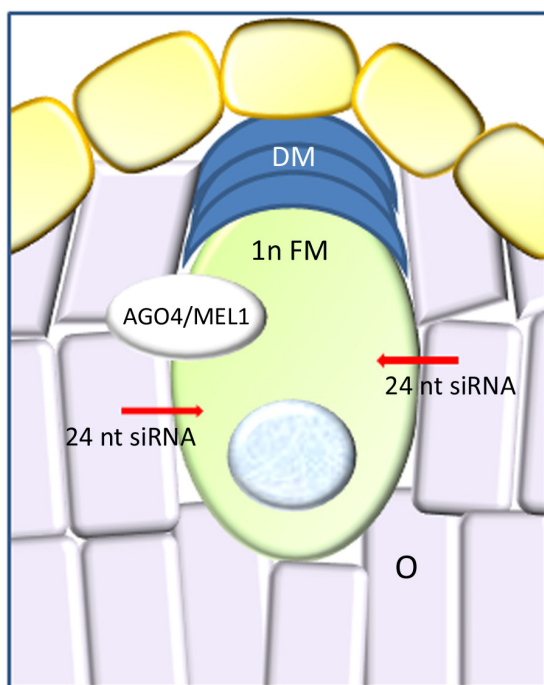
Modyfikacje epigenetyczne włączone są też w procesy zachodzące podczas mejozy. Opisanie wcześniej badania mutantów białek AGO u *Arabidopsis* pokazały, że programowanie i przebieg mejozy są pod kontrolą małych niekodujących RNA [42,48]. Podczas mejozy mają miejsce też zmiany w organizacji chromatyny i składzie nukleosomów. Globalny spadek poziomu H1, do którego dochodzi już podczas premejotycznej fazy S, a następnie usuwanie z oktameru histonu H2A.Z prawdopodobnie są elementem przygotowania struktury nici chromatynowych do parowania chromosomów homologicznych [42]. Remodelowanie chromatyny włączone jest w ustalanie częstości i pozycji miejsc rekombinacji. Badania u *Arabidopsis* pokazały, że powstające podczas rekombinacji dwuniciowe pęknięcia DNA (DSB) występują w regionach o niskiej gęstości nukleosomów [49]. Po rozpoczęciu mejozy histony H1 oraz H2A.Z są ponownie inkorporowane do nukleosomów [40], a całe chromosomy są wzbogacane w „otwierający chromatynę” H3K4me3. Jednocześnie prawie całkowicie eliminowany jest hamujący H3K27me3, lecz w obszarach heterochromatynowych znacząco wzrasta poziom represyjnego H3K9me2. Dystrybucja tych modyfikacji histonowych prawdopodobnie odzwierciedla zróżnicowaną organizację genomu *Arabidopsis*, tj. lokalizacji i gęstości sekwencji genowych oraz powtórzonych [42].

## MODYFIKACJE EPIGENETYCZNE KOMÓREK GAMETOFITU

Zarówno w linii żeńskiej, jak i męskiej, zredukowane komórki pomejotyczne (funkcjonalna megaspory, mikrospory) rozwijają się w gametofit, w którym różnicują się żeńskie lub męskie gamety (Ryc. 1). Epigenetyczne reprogramowanie gamet odgrywa istotną rolę nie tylko w regulacji ekspresji genów oraz transpozonów, ale także w piętnowaniu rodzicielskim, a następnie w pozapłodnieniowym reprogramowaniu zygoty.

## GAMETOFIT ŻEŃSKI

W specjację i mitotyczne podziały FM zaangażowane są somatyczne siRNA (Ryc. 7). Badania u *Arabidopsis* oraz ryżu wskazują, że otaczające tetradę komórki subepidermalne produkują 24 nt siRNA, które w kompleksie z AGO4-5 u *Arabidopsis* [37], lub jego homologa MEL1 u ryżu [48,50],



**Rycina 7.** Model udziału somatycznych 24 nt siRNA i AGO4 u *Arabidopsis* i MEL1 u ryżu w reprogramowaniu funkcjonalnej megaspory. FM – funkcjonalna megaspory, DM – degenerujące megaspory, O – ośrodek.

kontrolują rozwój i różnicowanie gametofitu żeńskiego. Ujawnia to, iż szlak reprogramowania FM w gametofit z udziałem somatycznych 24 nt siRNA jest niezależny od specjacji KMM, w której uczestniczą kompleksy 24 nt siRNA z białkiem AGO9. Obecnie uważa się, że w rozwijającym się zalążku funkcjonują dwa różne systemy kontroli komórek linii generatywnej. Pierwszy, związany z funkcjonowaniem kompleksów 24 nt somatycznych siRNA i AGO9. Uruchamiany jest on przed mejozą i kontroluje specjację tylko jednej komórki ośrodka w KMM, która opuści cykl mitotyczny i podzieli się mejotycznie. Drugi system, w którym również uczestniczą somatyczne 24 nt siRNA, jest zależny od białek AGO4-5/MEL1. Ten szlak regulacji epigenetycznej jest aktywny po mejozie i kontroluje powrót FM do cyklu mitotycznego oraz różnicowanie żeńskiego gametofitu [17,51,52].

Podczas selekcji jednej z czterech megaspory pluripotencjalnej megaspory funkcjonalnej (FM) obserwuje się zmiany epigenetyczne, które są podobne do występujących przed mejozą w KMM. W FM dochodzi do dekondukcji chromatyny, czemu towarzyszy niski poziom znaczników heterochromatynowych, takich jak H3K27me1 i H3K27me3 oraz H3K16ac i białka LHP1 [40,41]. Dodatkowo odbywa się usuwanie histonów H1 i H2A. Z [53-55]. W specjację FM włączone są też zmiany epigenetyczne, które są specyficzne tylko dla tej komórki. Całkowitej eliminacji ulega obecny w konstytutywnej chromatynie centromerowej KMM represyjny wariant histonu H3K9me2, co może wskazywać na aktywację obecnych tam sekwencji DNA. Jednocześnie obniża się poziom zmetylowanego histonu H3K4me3, który jest markerem euchromatynowej, „otwartej” struktury chromatyny, co wraz z niskim poziomem aktywnej pol RNA II dowodzi

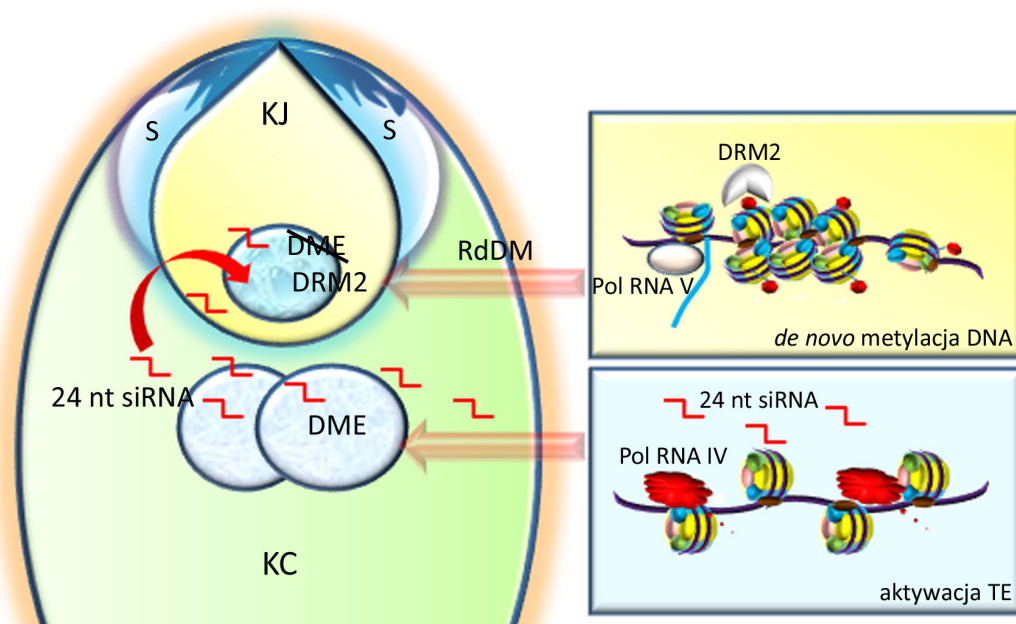
transkrypcyjnemu wyciszeniu FM [40,41]. Ostatecznie dochodzi do przebudowy chromatyny z udziałem kompleksu remodelującego typu SWI/SNF2 i „przełączenia” haploidalnej FM na drogę mitotycznej fazy rozwoju żeńskiego gametofitu [9]. W takim stanie epigenetycznym FM rozpoczyna replikację przed pierwszym podziałem mitotycznym. Na istotną rolę dynamiki zmian organizacji chromatyny w procesie przeprogramowania FM z cyklu mejotycznego w mitotyczny wskazują badania mutantów *mos7 Arabidopsis* [56]. FM pozbawione podjednostki nukleoporyny MOS7/Nupp88 są niekompetentne do wejścia na drogę megagametogenezy. Nukleoporyny uczestniczą w eksporcie RNA i ich brak prawdopodobnie prowadzi do zatrzymania w jądrze komórkowym FM transkryptów niezbędnych dla progresji rozwojowej. Z kolei z badań komórek zwierzęcych wiadomo, że białka te wpływają na przestrzenną organizację jądra komórkowego poprzez wiązanie domen chromatyny, co z kolei może tłumaczyć istotny wpływ zmian organizacji chromatyny wyższego rzędu na włączenie programu mitotycznego [42].

Podczas kolejnych podziałów mitotycznych FM dochodzi do ponownej kondensacji chromatyny. U *Arabidopsis* w chromocentrach wszystkich jąder tworzącego się syncytium przywrócony zostaje wysoki poziom znacznika heterochromatyny konstytutywnej H3K9me2, porównywalny do obserwowanego w komórkach somatycznych. Dodatkowo w obszarach euchromatynowych wzrasta poziom białek LHP1 oraz SWINGER, które funkcjonują w metylującym histony kompleksie Polycomb. LHP1 wiążąc się ze znacznikiem nieaktywnych genów, jakim jest histon H3K27me3, uczestniczy w remodelowaniu chromatyny prowadzącym do jej inaktywacji [9,57].

Dalsze zmiany w organizacji i aktywności chromatyny następują podczas procesu celularyzacji gametofitu. Zmiany te prowadzą do ostatecznego epigenetycznego zróżnicowania siedmiu odmiennych funkcjonalnie komórek woreczka zalążkowego. W dojrzałym żeńskim gametoficie szczególnie obserwowany jest „epigenetyczny dymorfizm” komórki jajowej i komórki centralnej (Ryc. 8). W komórce jajowej *Arabidopsis*, kukurydzy, ryżu i hiacynta chromatyna jest bardziej skondensowana, utrzymana w stanie represyjnym i transkrypcyjnie wyciszona. Z kolei chromatyna komórki centralnej jest zdekondukcjonowana, u *Arabidopsis* pozbawiona chromocentrow, nie zawiera epigenetycznych markerów wyciszenia i jest transkrypcyjnie aktywna [42,58-60].

#### METYLACJA DNA

Komórka jajowa i centralna charakteryzują się odmiennymi wzorcami metylacji DNA. Znajduje to odzwierciedlenie w zróżnicowanej aktywności enzymów uczestniczących w metylacji i demetylacji DNA. W dojrzałej komórce jajowej rzodkiewnika i ryżu, w wyniku bardzo niskiej lub zahamowanej ekspresji MET1, poziom metylacji DNA w kontekście CG ulega obniżeniu [61]. W gamecie aktywne są natomiast metylotransferazy DNA CMT3 odpowiedzialne za metylację DNA w kontekście CHG [62] oraz DRM2 i DRM1, które uczestniczą w *de novo* metylacji DNA w kontekście CHH [61,63]. W komórce jajowej nie ujawniono natomiast aktywności glikozylazy DEMETER (DME), co wskazuje iż w



**Rycina 8.** Epigenetyczny dymorfizm komórki jajowej i komórki centralnej. W utrzymaniu integralności genomu komórki jajowej oraz regulacji ekspresji wybranych genów na drodze RdDM uczestniczą mobilne 24 nt siRNA produkowane w wyniku aktywacji TE komórki centralnej. KJ – komórka jajowa, S – synergida, KC – komórka centralna, DME – glikozylaza DNA DEMETER [na postawie 61,63,68].

dojrzałej gamecie utrzymywany jest stały wzorzec metylacji DNA [42].

W komórce centralnej obserwuje się niski poziom metylotransferaz DNA odpowiedzialnych za *de novo* metylację oraz brak ekspresji enzymów podtrzymujących metylację DNA, co wiąże się z utratą heterochromatyny. Pomimo braku MET1, metylacja DNA w kontekście CG zostaje utrzymana, prawdopodobnie dzięki aktywności homologów MET1 – MET2a i MET2b, które w komórce centralnej podlegają specyficznej ekspresji [61]. U *Arabidopsis* w komórce centralnej zachodzi ekspresja metylotransferazy DNA DRM2, ale jej poziom jest istotnie niższy niż w komórce jajowej. W przeciwieństwie do komórki jajowej, w komórce centralnej dochodzi do ekspresji enzymów uczestniczących w demetylacji DNA. U *Arabidopsis* jest to glikozylaza DEMETER [61], natomiast u ryżu jej ortologu ROS1 i ROS1a [64]. Demetylacja DNA pełni ważną rolę nie tylko w komórce centralnej, ale po zapłodnieniu podczas rozwoju bielma. Wykazano, że u mutantów *dme Arabidopsis* brak ekspresji DME prowadzi do hypermetylacji DNA komórki centralnej, a po zapłodnieniu do zaburzeń rozwoju bielma i ostatecznie aborcji nasion [65,66].

#### MODYFIKACJE HISTONÓW

Dojrzałe żeńskie gamety charakteryzuje odmienny wzorzec ekspresji izoform białek histonowych. Komórka jajowa nie zawiera wariantów histonu H3.1, chociaż transkrypty HTR1 i HTR3 są w komórce wykrywane. Synteza H3.1 jest ściśle powiązana z syntezą DNA i nie wykluczone, że brak tego wariantu histonu może wynikać z zatrzymania progresji cyklu komórkowego gamety przed fazą S. Dojrzała komórka jajowa zawiera natomiast wysoki poziom wariantu histonu H3.3 kodowany przez *HTR5*. Ta izoforma histonu

H3 może być inkorporowana w dowolnej fazie cyklu komórkowego i jest istotna w regulacji struktury i aktywacji transkrypcji chromaty. Wykazano, że w ssaczych komórkach embrjonalnych H3.3 zdeponowany przez HIRA ułatwia rekrutację kompleksu remodelującego chromatinę PRC2 i odkładanie heterochromatynowego markera H3K27me3, ale do tej pory nie wyjaśniono, czy histony te pełnią podobną funkcję w komórce jajowej. W przeciwieństwie do komórki centralnej, komórka jajowa zawiera chromocentra, jednakże na ich terenie nie wykryto centromerowego wariantu histonu H3, gameta pozbawiona jest także transkryptów CENH3. Biologiczne znaczenie tej obserwacji dla komórki jajowej nie zostało do tej pory wyjaśnione [9]. Heterochromatyna w chromocentrach zawiera represyjny wariant histonu H3K9me2. Z kolei rozproszonej chromaty nie towarzyszy wysoki poziom białka LHP1/TFL2 lokalizowanego w wyciszonych przez PRC2 obszarach euchromatyny wzbogaconych wariantem histonu H3K27me3 [58]. W komórce jajowej dochodzi do zahamowania transkrypcji genów kodujących białka, na co wskazuje niski poziom aktywnej/elongacyjnej formy Pol RNA II [60].

W dojrzałej komórce centralnej obecny jest wariant histonu H3.1 kodowany przez *HTR3* oraz H3.3 kodowany przez *HTR8* i *HTR14*. Ten ostatni uznawany jest za wariant unikalny, ponieważ do tej pory został wykryty tylko w tej komórce. Interesujące, że komórka centralna bogata jest w transkrypty centromerowego wariantu histonu H3 (CENH3), natomiast nie lokalizowano w komórce ich białek. Ponadto jądro komórki centralnej pozbawione jest chromocentrow. Wiadomo, że w komórkach eukariotycznych CENH3 uczestniczy w prawidłowej biogenezie kinetochoru i właściwej segregacji chromosomów [9,67]. Nie można więc wykluczyć, że obecność transkryptów CENH3 świadczyć może o przygotowaniu komórki do pozapłodnienio-

wej reorganizacji chromatyny i podziału jądra pierwotnej komórki bielkowej, który ma miejsce przed podziałem zygoty [60]. Rozproszoną chromatynę komórki centralnej charakteryzuje nie tylko demetylowany DNA, ale także obniżony poziom markera heterochromatyny jakim jest wariant histonu H3K9me2. W komórce centralnej poziom elongacyjnej formy Pol RNA II jest wyższy niż w komórce jajowej [60]. Aktywność transkrypcyjną gamety potwierdza także niższy poziom białka LHP1/TFL2 i histonu H3K27me3 [58].

## INTERFERENCJA RNA

Epigenetyczne różnicowanie komórki jajowej kontrolowane jest przez syntetyzowane w komórce centralnej siRNA. Efektem aktywnej demetylacji DNA (DME) oraz obniżenia poziomu MET1 jest dekondensacja chromatyny komórki centralnej. Demetylacji ulegają sekwencje powtórzone oraz bogate w AT i pozbawione markerów heterochromatynowych sekwencje TE. Aktywacja TE prowadzi do generowania 24 nt siRNA, które przemieszczają się do komórki jajowej w celu wyciszenia na drodze RdDM obecnych tam komplementarnych sekwencji TE [68]. Zdolność przemieszczania się siRNA z komórki centralnej do gamety potwierdzają badania w wykorzystaniem techniki mikroiniekcji. U *Arabidopsis* fluorescencyjnie znakowane 24 nt dwuniciowe siRNA wprowadzone do komórki centralnej już po pierwszej godzinie wykrywane są w postaci dwuniciowych lub jednoniciowych cząsteczek w żeńskiej gamecie [69]. W komórce jajowej *de novo* metylacja DNA zachodzi prawdopodobnie przez niekanoniczny szlak RDR6-RdDM włączający aktywność DRM2 i Pol RNA V, która katalizuje syntezę docelowych dla siRNA szkieletowych RNA. Nie zależy natomiast od aktywności Pol RNA IV, uczestniczącej w syntezie kanonicznych 24 nt siRNA. W gamecie nie wykryto bowiem obecności NRPD1 – specyficznej podjednostki katalitycznej Pol RNA IV oraz metylotransferazy DNA CMT2 [70]. Informacje te wydają się potwierdzać, że 24 nt siRNA włączone w remodelowanie chromatyny komórki jajowej nie są produkowane w gamecie.

Proces kierowanej przez komórkę centralną metylacji DNA komórki jajowej pełni dwie funkcje. Metylacja komplementarnych sekwencji heterochromatynowych TE gwarantuje utrzymanie stabilności genetycznej gamety. Z drugiej strony wiadomo, że mechanizmy wyciszenia w komórce jajowej wykraczają poza centromerowe sekwencje TE i rozciągają się na regiony euchromatynowe. Prowadzi to do globalnego zahamowania transkrypcji w komórce jajowej, co wiąże się z epigenetycznym przeprogramowaniem gamety i nabywaniem totipotencji [68,71,72].

Analizy transkryptomu komórki jajowej wykazały, że w gamecie obok ekspresji białek szlaku TGS i 24 nt siRNA, takich jak RDR2, DCL3 i AGO4 aktywne są także geny związane z biogenezą miRNA (m.in. DCL1, HYL1 oraz białek zawierających domenę wiążącą dsRNA DsRBD) oraz AGO1 tworzących RISC [62] w szlaku PTGS. Podobnie, transport między gametami dotyczy także cząsteczek miRNA. Badania Ibarra i wsp. (2012) [71] dowiodły, że ulegający ekspresji w komórce centralnej miRNA, którego celem jest transkrypt białka GFP pochodzącego z transgenu komórki jajowej, przemieszcza się i istotnie obniża poziom fluorescencji biał-

ka w gamecie. Szlaki PTGS istotne są także dla funkcjonowania komórki centralnej, bowiem w aparacie jajowym białko SGS3 ulega głównie ekspresji w tej gamecie [71].

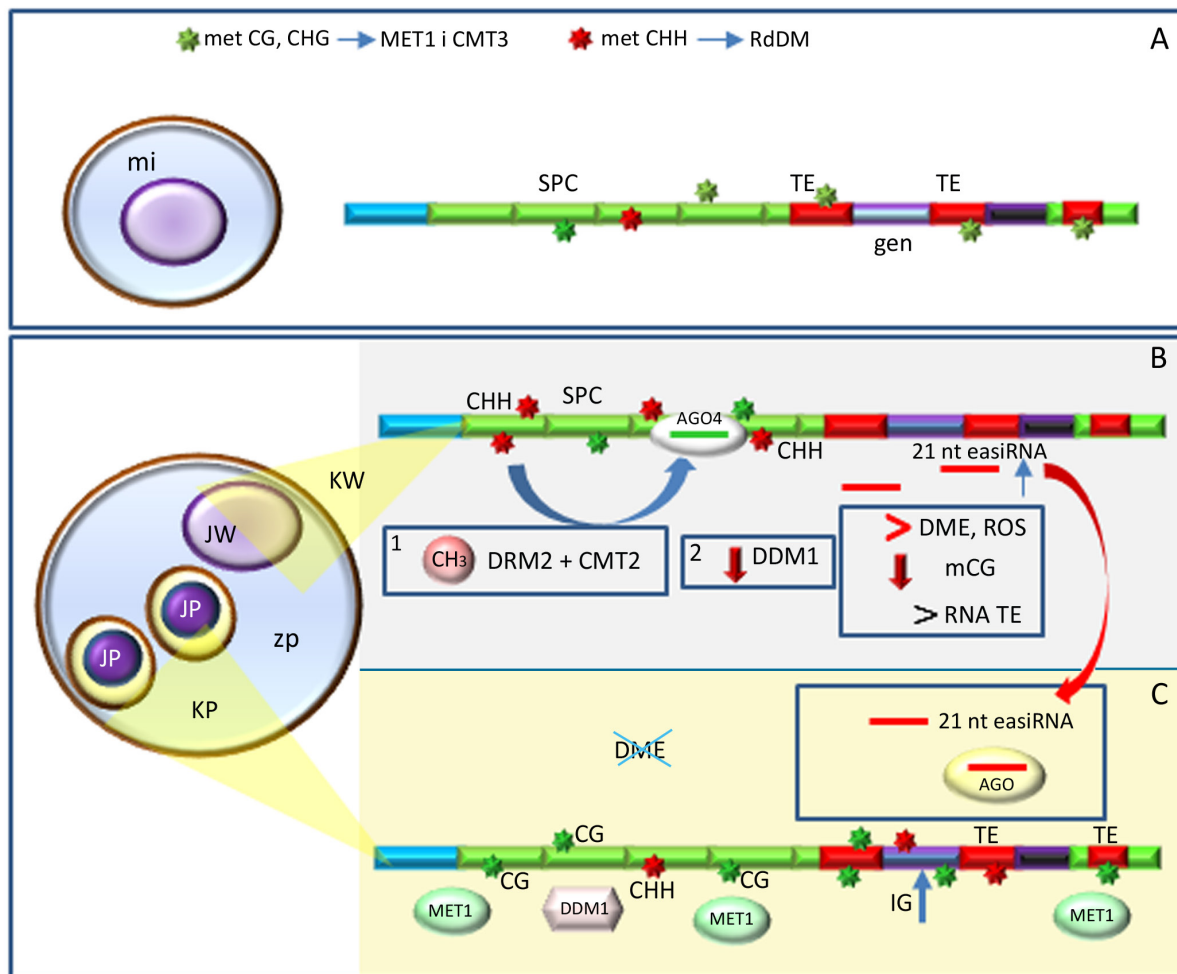
## GAMETOFIT MĘSKI

Od dawna wiadomo, że los komórek pyłkowych jest determinowany asymetrycznym podziałem mikrospory, podczas którego komórki o identycznym genomie wyposażone są w cytoplazmę o zróżnicowanej zawartości organeli komórkowych. Wkrótce po podziale widoczna staje się odmienna organizacja chromatyny, która w komórce generatywnej ulega silnej kondensacji, natomiast w jądrze wegetatywnym pozostaje zdekondensowana [73]. Zmianom tym towarzyszy odmienny poziom transkrypcji, który jest wyższy w komórce wegetatywnej aniżeli w komórce generatywnej. Ważną rolę w tym pierwszym etapie specyfikacji komórek pyłkowych odgrywa ściana kalozowa, która tuż po mitozie mikrospory oddziela siostrzane komórki pyłkowe [74]. Precyzyjnie regulowana przestrzenno-czasowa depozycja a następnie degradacja ściany kalozowej pełni ważną rolę w specjacji siostrzanych komórek pyłkowych [75]. Brak degradacji ściany kalozowej u mutantów genu *SGC* (*STICKKY GENERATIVE CELL*) nie pozwala na uwolnienie komórki generatywnej od sporodermi i komórka ta nie zostaje otoczona przez komórkę wegetatywną. Efektem są zaburzenia dalszego różnicowania komórki generatywnej, pyłek jest nieplodny. Pokazuje to, że krytyczną rolę w ustalaniu wzorca różnicowania komórki generatywnej pełni bezpośredni kontakt z komórką wegetatywną. Potwierdzają to badania genetyczne, które ujawniły, że różnicowanie gamet nie jest autonomiczne i odbywa się na drodze sygnałowania epigenetycznego przez produkowane w komórce wegetatywnej siRNA, podobnie jak w procesie reprogramowania komórek somatycznych pylnika w komórce linii generatywnej (KMMi) z udziałem 21 nt i 24 nt phasiRNA (Ryc. 6) [4,76,77].

Dojrzewanie męskiego gametofitu to okres zróżnicowanej aktywności transkrypcyjnej komórek pyłkowych, który np. u hiacynta trwa aż do wytworzenia dojrzałych komórek plemnikowych w łagiewce pyłkowej [78,79]. Procesy epigenetyczne włączone są zarówno w determinację męskiego epigenomu, który zostanie przekazany do zygoty (stabilizacja genomu, piętnowanie genomowe), ale również w regulację odmiennego i zmieniającego się poziomu transkrypcji komórki wegetatywnej i komórki generatywnej/komórek plemnikowych [5,78,80]. Epigenetyczne różnicowanie komórek męskiego gametofitu ujawniają: (1) zmiany wzorca metylacji DNA, (2) modyfikacje białek histonowych oraz (3) wymiana histonów kanonicznych na płciowo-specyficzne.

## METYLACJA DNA

Badania prowadzone głównie u *Arabidopsis* pozwoliły poznać zróżnicowanie wzorca metylacji DNA podczas dojrzewania komórek męskiego gametofitu (Ryc. 9). Po mejozie, w stosunku do KMMi, w heterochromatynowych sekwencjach okołocentromerowych i satelitarnych mikrospor odbywa się aktywna demetylacja w kontekście CHH, lecz utrzymywana przez MET1 i CMT3 metylacja CG i CHG pozostaje bez zmian [21,45]. Podczas dalszego rozwoju, w



**Rycina 9.** Model reprogramowania genomu komórek męskiego gametofitu u *Arabidopsis*. A – mikrospora, B – komórka wegetatywna: produkowane po aktywacji TE 21 nt siRNA są transportowane do komórek plemnikowych C, gdzie na drodze RdDM oraz niezależnie od RdDM uczestniczą w hamowaniu TE oraz metylacji piętnowanych genów (SPC – sekwencje pericentromerowe, IG – piętnowany gen) [na podstawie 4,9,21,45,71,76].

ziarnie pyłku dochodzi do istotnego zróżnicowania wzorca metylacji DNA między komórką wegetatywną a gametami [71,76]. W komórce wegetatywnej ma miejsce *de novo* metylacja w kontekście CHH głównie sekwencji pericentromerowych i satelitarnych. Proces ten jest ustanawiany i utrzymywany zarówno na drodze RdDM, jak i niezależnie od tego szlaku przez chromometylazę CMT2 [9]. Sekwencje TE obecne w chromatynie ubogiej w H3K9me2 są przede wszystkim metylowane na drodze RdDM. Natomiast metylacja TE zlokalizowanych w bogatej w H3K9me2 heterochromatynie konstytutywnej jest efektem aktywności CMT2 [9]. Metylację chromatyny wegetatywnej z udziałem siRNA potwierdza obecność metylotransferazy DRM2 oraz białka AGO4 [76,81]. Jednocześnie z aktywną metylacją, w komórce wegetatywnej mają miejsce procesy prowadzące do pasywnej i aktywnej demetylacji. Istotnie obniża się ekspresja metylotransferazy MET1 (pasywna demetylacja) oraz wzrasta poziom glikozylazy DME oraz ROS, które uczestniczą w aktywnej demetylacji [71,76,82].

Równowaga między aktywną metylacją sekwencji pericentromerowych i demetylacją utrzymywana jest dzięki hamowaniu ekspresji DDM1, enzymu który jest konieczny do

rearanżacji chromatyny podczas niezależnej od RdDM *de novo* metylacji DNA. Efektem aktywności glikozylazy DME i ROS jest obniżenie metylacji DNA w kontekście CG i reaktywacja TE, również tych które zlokalizowane są w pobliżu genów [21,72,76]. Pierwotne transkrypty reaktywowanych sekwencji TE są następnie cięte przy udziale miRNA na 21 nt epigenetycznie aktywowane siRNA (easiRNA), które przemieszczają się do komórek plemnikowych [51]. Ostatnie badania niespodziewanie ujawniły, że do akumulacji 21 nt transkryptów w pyłku konieczna jest Pol RNA IV [83], co wskazuje że ten enzym uczestniczy w biogenezie nie tylko klasycznych 24 nt siRNA, ale również wtórnych easiRNA [84].

W komórkach plemnikowych *Arabidopsis* poziom metylacji sekwencji pericentromerowych w kontekście CHH jest niski, podobny do tego który występował w mikrosporze [21,45,76]. Na tej podstawie sugeruje się, że w męskich gametach *de novo* metylacja DNA kierowana przez kompleksy 24 nt siRNA/AGO4 pozostaje ograniczona. Nasze badania u hiacyntha wykazały obecność białka AGO4 zarówno w jądrze komórki generatywnej, jak i w komórkach plemnikowych [81]. Można zatem przypuszczać, że podczas róż-

nicowania męskich gamet odbywa się metylacja DNA kierowana 24 nt siRNA/AGO4. Czy jest to droga autonomiczna, czy też sygnałowana przez komórkę wegetatywną – jak wcześniej proponował zespół Calarco (2012) [76] – nie wiadomo. Są dowody, że komórka wegetatywna uczestniczy w epigenetycznym reprogramowaniu genomu gamet poprzez mobilne 21 nt easiRNA. Ta klasa siRNA prawdopodobnie włączona jest w utrzymanie integralności genomu poprzez hamowanie TE oraz wyciszenie piętnowanych ojcowskich alleli. Uważa się, że ważnym celem 21 nt easiRNA są sekwencje transpozono- we, które są zlokalizowane w pobliżu piętnowanych genów. Inicjowana w sekwencjach TE metylacja zostaje „poszerzona” na sekwencje genów, które mają zostać wyciszone w męskich gametach, a pozostaną aktywne w gametach żeńskich [4,71]. Przeciwnie do komórki wegetatywnej, w genomie komórek plemnikowych, które przeniosą swój epigenom do następnego pokolenia sporofitu, wzrasta poziom metylacji w kontekście CG i CHG. W utrzymaniu wysokiego poziomu metylacji CG i CHG uczestniczą metylotransferaza DNA MET1 oraz enzym DDM1 [4,21,76], a także brak demetylasy DME [82]. Metylacja DNA w komórkach plemnikowych może być kontrolowana przez komórkę wegetatywną także za pośrednictwem substratu dla metylotransferaz. Badania wykazały, że enzym MAT3 (METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE 3) odpowiedzialny za syntezę SAM, będącego donorem grupy metylowej dla metylotransferaz DNA, ulega ekspresji przede wszystkim w komórce wegetatywnej [84].

Z uwagi na niski poziom DRM2 w komórkach plemnikowych [21] rozważa się inną/dodatkową rolę dla „wegetatywnych” siRNA obecnych w męskich gametach. Ich celem mogą być transkrypty retrotranspozono- w oraz innych genów, mogą więc być włączone w regulację ekspresji genów na drodze PTGS [77]. Nie można też wykluczyć, że 21 nt easiRNA są magazynowane w gametach, a do ich aktywacji dochodzi dopiero po zapłodnieniu [51].

W wyciszenie ekspresji genów na drodze PTGS podczas różnicowania męskich gamet prawdopodobnie włączone są też endogenne miRNA. U hiacynta białko AGO1, które specyficznie wiąże się z miRNA, obecne jest nie tylko w komórce wegetatywnej, ale również w komórce generatywnej i na niskim poziomie także w komórkach plemnikowych [81].

Kwestią otwartą pozostają drogi transportu produkowanych w komórce wegetatywnej siRNA do komórek plemnikowych. Proponuje się obecność specyficznych importerów dla ruchomych siRNA w błonie komórki generatywnej i komórek plemnikowych, ale przede wszystkim zwraca się uwagę na udział w tym procesie MGU, tj. miejsca fizycznego zbliżenia jądra komórki wegetatywnej z męskimi gametami [86]. Na rolę MGU w epigenetycznej regulacji genomu komórek męskiego gametofitu wskazują nasze badania u hiacynta. U tego gatunku MGU powstaje już w stadium dwu komórkowego pyłku i utrzymuje się po II mitozie. Interesujące jest to, że w zbliżonych do siebie obszarach jąder wegetatywnego i generatywnego zlokalizowana jest chromatyna o specyficznym wzorcu epigenetycznym – obniżonym poziomie 5mC i podwyższonym poziomie acetylacji histonów [5].

## MODYFIKACJE HISTONÓW

Podczas dojrzewania męskiego gametofitu zmianom wzorca metylacji DNA towarzyszą zmiany prowadzące do reorganizacji chromatyny, takie jak wymiana histonów oraz potranslacyjne modyfikacje tych białek. Efektem jest odmienna organizacja/kondensacja chromatyny komórki wegetatywnej oraz komórki generatywnej/komórek plemnikowych.

## WARIANTY HISTONÓW

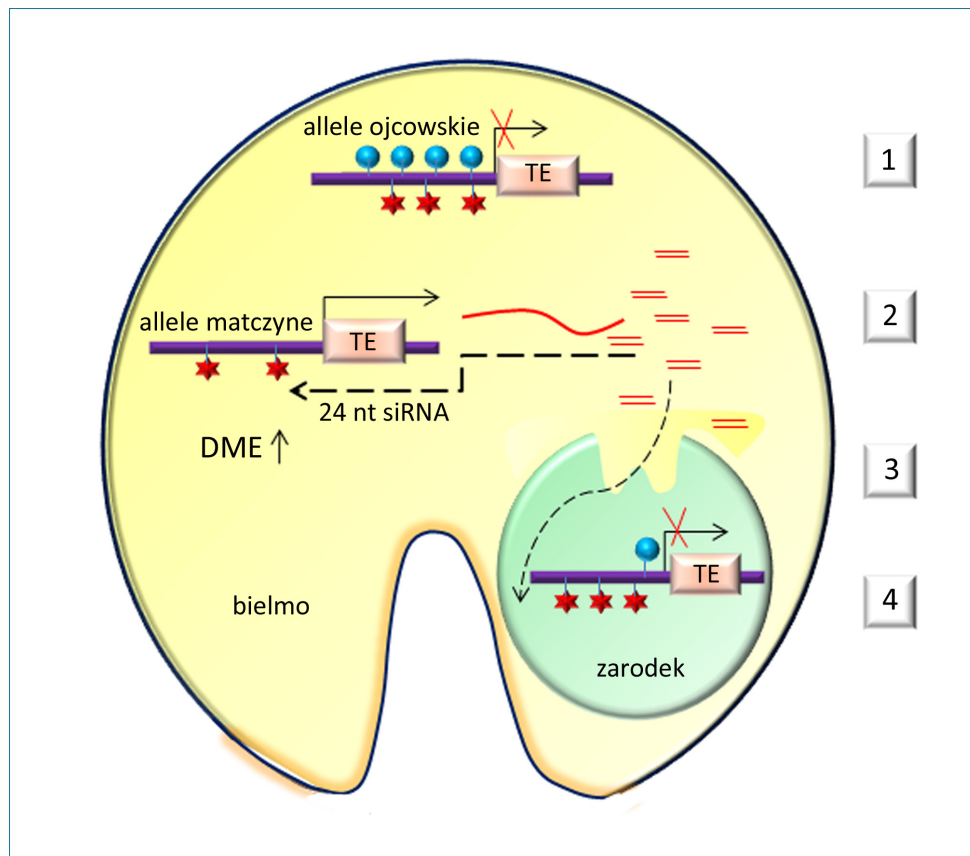
W komórce generatywnej, a następnie w komórkach plemnikowych stwierdzono obecność wariantów histonów, które nie występują w jądrze wegetatywnym i komórkach somatycznych [32,87]. W jądrze generatywnym dwukomórkowego pyłku *Lillium* zlokalizowano warianty histonów rdzeniowych – gH2A, gH2B, gH3 oraz gH4 oraz histonu łącznikowego H1 [31,88,89]. Do ich ekspresji dochodzi już po podziale mikrospory, co wskazuje, że wymiana histonów klasycznych na płciowe odbywa się podczas różnicowania komórek pyłkowych. Z kolei w jądrach gamet trójkomórkowego pyłku *Arabidopsis* zidentyfikowano charakterystyczne dla linii generatywnej warianty histonu H3 – HTR5 oraz HTR10 (HISTONE THREE RELATED 10), który określany jest mianem męskiego histonu płciowego H3 (MGH, ang. *Male Gamete Histon 3*) [90]. Synteza tego specyficznego histonu odbywa się już we wczesnych etapach dojrzewania ziarna pyłku. Obecność HTR10 w komórce generatywnej stwierdzono wkrótce po asymetrycznym podziale mikrospory, ale do jego akumulacji dochodziło dopiero w komórkach plemnikowych [90,91].

Specyficznym dla męskiej linii rozrodczej jest też wariant centromerowy H3 – HTR12 [67]. Analiza dystrybucji centromerowego HTR12 (lub CENH3) ujawniła, że jest on obecny już w jądrze mikrospory [90]. Podczas dojrzewania ziarna pyłkowego u lilii i *Arabidopsis* ten wariant H3 jest eliminowany z jądra wegetatywnego [31], natomiast u ryżu jest on odnajdywany zarówno po pierwszym, jak i drugim podziale mitotycznym we wszystkich komórkach gametofitu męskiego [92].

Także w komórce wegetatywnej pyłku obecne są specyficzne dla niej warianty histonów. Zidentyfikowane u lilii transkrypty MPH3 są prekursorami wariantu histonu wykazującego dużą homologię do wariantów H3.1 oraz H3.3. Lokalizowane są już w stadium mikrospory, a po jej podziale w komórce wegetatywnej. Przypuszcza się, że histon MPH3 wspiera aktywność transkrypcyjną tej komórki [93].

## POTRANSLACYJNE MODYFIKACJE BIAŁEK HISTONOWYCH

W jądrach komórek pyłkowych ujawniono obecność zarówno markerów euchromatyny, jak i heterochromatyny. Występowanie acetylowanych histonów (acH3 i acH4), które znakują aktywne obszary chromatyny, stwierdzono w jądrach obydwu komórek pyłkowych [94,95]. Niski poziom tego markera lokalizowano także w komórkach plemnikowych, zarówno u roślin o trójkomórkowych (jęczmienia [96], ryżu [92]) jak i dwukomórkowych (hiacynt [5]). Równoległe występowanie w komórkach pyłkowych enzymu



**Rycina 10.** Model epigenetycznego reprogramowania genomu zarodka z udziałem 24 nt siRNA produkowanych dzięki aktywności matczynych TE w bielmie. 1 – wyciszony genom ojcowski w bielmie 2 – aktywna demetylacja matczynego DNA z udziałem DME w bielmie, 2 – aktywacja matczynych TE i 3 – transport bielmowych siRNA do zarodka, 4 – *de novo* metylacja DNA komplementarnych sekwencji TE i wybranych genów w zarodku.

deacetylazy histonowej HDT1/2 wskazuje, że podczas dojrzewania męskiego gametofitu mają miejsce dynamiczne zmiany acetylacji chromatyny [5].

Również specyficzne markery aktywnej euchromatyny H3K4 i H3K36 lokalizowane są w jądrach obydwu komórek pyłkowych [5,31,94,97]. Kontrowersyjna pozostaje obecność tych markerów w chromatynie komórek plemnikowych. H3K4me oraz H3K36 lokalizowano w gametach trójkomórkowego pyłku ryżu i jęczmienia [92,96]. Z kolei w komórkach plemnikowych *Arabidopsis* obecność metylowanego H3K4, jak i K36 stwierdzono tylko w jądrze wegetatywnym [98]. Te rozbieżne wyniki mogą wynikać z badania męskich gamet w różnych okresie ich dojrzewania. Np. u hiacynta tuż po II mitozie w jądrach gamet obecny jest zarówno H3K4me3, jak i H3K36, ale po dłuższym okresie hodowli w jądrach plemnikowych lokalizowano tylko H3K36 [5].

Podobnie jak w przypadku znaczników euchromatyny, również marker heterochromatyny konstytutywnej H3K9me2 lokalizowany był w jądrach obydwu komórek pyłkowych [31,94,97], a u ryżu i jęczmienia także w komórkach plemnikowych [92,96]. Modyfikacji tej nie ujawniono tylko w jądrach gamet *Arabidopsis* [98].

Obecność i poziom znaczników aktywnej chromatyny w komórkach męskiego gametofitu pozostają w zgodzie z ich zróżnicowaną aktywnością transkrypcyjną i odmienną organizacją/kondensacją chromatyny. Interesującym wyjątkiem

jest znacznik wyłączony funkcjonalnie euchromatyny H3K27me3. Przeprowadzone u różnych gatunków badania, pokazały, że znacznik ten jest obecny w jądrze wegetatywnym, natomiast nie występuje w mało aktywnej transkrypcyjnie chromatynie komórek plemnikowych. Prawdopodobnie H3K27me3 jest usuwany już z komórki generatywnej wkrótce po asymetrycznym podziale mikrospory. Podczas dojrzewania trójkomórkowego pyłku jęczmienia [96] i ryżu [92] znacznik ten lokalizowano zarówno w jądrze wegetatywnym, jak i na niskim poziomie w jądrze generatywnym. Natomiast po podziale komórki generatywnej H3K27me3 obecny był tylko w jądrze wegetatywnym, nie lokalizowano go w jądrach komórek plemnikowych. Tą wczesną eliminację H3K27me3 potwierdzają badania pyłku lilii [97] oraz hiacynta [99]. U obydwu gatunków w dojrzałym dwukomórkowym pyłku H3K27me3 obecny był tylko w jądrze wegetatywnym, komórka generatywna – także podczas wzrostu łagiewki pyłkowej – pozbawiona była tego markera [99]. Jak dotąd nie wiadomo jakie mechanizmy są odpowiedzialne za brak H3K27me3 w chromatynie męskich gamet. Usuwanie H3K27me3 odbywa się w tym samym czasie co wymiana histonów kanonicznych na warianty płciowe, tj. podczas dojrzewania komórki generatywnej. Można zatem przypuszczać, że remodelowanie chromatyny prowadzące do jej silnej kondensacji jest wystarczające do „wyłączenia” euchromatyny, która jednakże pozostaje potencjalnie „otwarta”, co pozwala na jej aktywację wkrótce po zapłodnieniu [61] i ekspresję męskiego genomu w nowym pokoleniu sporofitu [12].

## MECHANIZMY EPIGENETYCZNE W PROCESIE ZAPŁODNIENIA I WCZESNEJ EMBRIOGENEZY

W procesie podwójnego zapłodnienia (Ryc. 1) u roślin okrytozalążkowych komórka jajowa i komórki plemnikowe są dawcą hypermetylowanego genomu, z wyciszonymi na drodze metylacji DNA sekwencjami TE oraz genami położonymi w najbliższym ich sąsiedztwie. Z kolei genom komórki centralnej jest hypometylowany, co warunkuje aktywację sekwencji TE i syntezę 24 nt siRNA, które eksportowane do komórki jajowej zapewniają utrzymanie integralności genomu zygoty/rozwijającego się zarodka (Ryc. 10). Mimo, że genom triploidalnego bielma nie jest przekazywany następnemu pokoleniu, to prawidłowy wzorzec ekspresji jego genów jest istotny dla rozwoju bielma i zarodka oraz żywotności nasion. W procesach tych istotną rolę pełni piętowanie genomowe, które warunkuje zróżnicowaną ekspresję genów w zależności od pochodzenia rodzicielskiego (ang. *parent-of-origin effect*) [100-102].

### METYLACJA DNA

Zarodek dziedziczy wzór metylacji DNA z komórki jajowej i komórki plemnikowej, a utrzymanie tego wzorca jest istotne dla epigenetycznego przeprogramowania totipotencjalnej zygoty, procesów różnicowania i wiernego przekazywania informacji genetycznej w podziałach komórkowych [102]. Poziom metylacji DNA w kontekście CG w zarodku zostaje przywrócony dzięki aktywności metylotransferazy DNA MET1, której ekspresja zostaje wznowiona tuż po zapłodnieniu [61,103]. W zarodku *Arabidopsis* poziom metylacji DNA w kontekście CG staje się porównywalny poziomem odnotowanym w komórkach innych tkanek rośliny. U mutantów *met1* rzodkiewnika i ryżu globalna utrata metylacji DNA prowadzi do nieprawidłowego rozwoju zarodka oraz obniżonej żywotności nasion [104,105].

Z kolei poziom metylacji DNA w kontekście CHH w zarodku wzrasta stopniowo, co koreluje ze wzrostem ekspresji metylotransferaz DNA DRM2 i CMT2 [106,107]. We wczesnych zarodkach *Arabidopsis* poszczególne miejsca CHH w DNA są zmetylowane w około 20%, podczas gdy w dojrzałych zarodkach metylacja DNA w kontekście CHH zbliża się do 100% [103]. Podczas embriogenezy metylacja DNA w kontekście CHH odbywa się zarówno w sposób zależny od RdDM, jak i niezależnie od siRNA w wyniku aktywności metylotransferazy DNA CMT2 [105]. Za stopniową metylację DNA w kontekście CHH głównie odpowiedzialny jest szlak metylacji na drodze RdDM, bowiem u mutantów *Arabidopsis* *drm1* i *drm2* oraz *pol RNA IV* i *V* procesu tego nie obserwowano. We wczesnych etapach rozwoju zarodka w procesie uczestniczy metylotransferaza DRM1, której ekspresja prawdopodobnie pochodzi jeszcze z komórki jajowej. W późniejszych etapach rozwoju ekspresja DRM1 ulega zahamowaniu, a jedyną metylotransferazą DNA uczestniczącą w procesach *de novo* metylacji DNA na drodze RdDM staje się DRM2 [61]. *De novo* metylacja DNA jest zależna od 24 nt siRNA, które mogą pochodzić z komórki plemnikowej, tkanek zalążka lub bielma [4,35,61,108]. Sam zarodek może również autonomicznie generować 24 nt siRNA [106,109]. Intensywne podziały komórek zarodka sprzyjają bowiem dynamicznej kondensacji i dekondensacji chromatyny, co

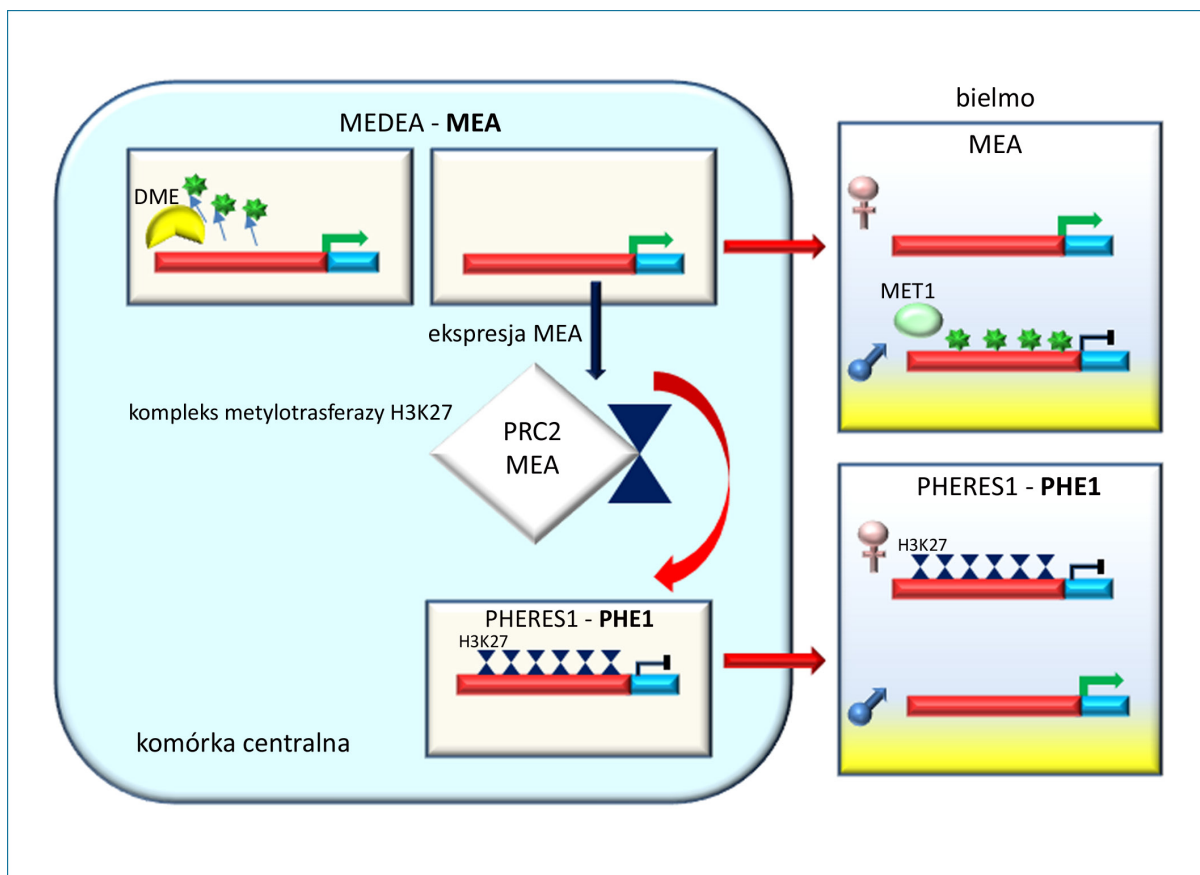
umożliwia dostęp Pol RNA IV zarówno do heterochromatynowych i euchromatynowych sekwencji TE [109]. Poziom metylacji DNA w kontekście CHH w zarodku wydaje się być skorelowany z docelowymi regionami DNA dla aktywności demetylasy DME w bielmie [66,71].

Hypermetylacja genomu dojrzałego zarodka prowadzi do kondensacji chromatyny, co zapobiega niekorzystnej indukcji ekspresji genów i aktywacji TE. Ponadto chroni genom zarodka przed uszkodzeniami DNA wywołanymi mutacjami podczas spoczynku nasion [106]. Wysoki poziom metylacji DNA w zarodkach obserwowano nie tylko u *Arabidopsis* ale także u innych gatunków roślin, m.in. *Brassica rapa*, ciecierzycy i soi [102]. Kiedy warunki środowiska stają się korzystne hypometylacja genomu z kolei prowadzi do dekondensacji chromatyny i warunkuje wznowienie ekspresji genów związanych z kiełkowaniem nasion [103,106,107]. Wykazano, że podczas kiełkowania nasion *Arabidopsis* heterochromatynowe chromocentra zmniejszają się [106].

Pomimo, że wzorzec metylacji DNA jest przekazywany między pokoleniami, to istnieją dowody wskazujące, że „epigenetyczna pamięć” ustalona podczas rozwoju rośliny jest wymazywana podczas embriogenezy, co wiąże się z procesami przeprogramowania komórek. W zygocie *Arabidopsis* histony H3 odziedziczone z komórki jajowej i plemnikowej są usuwane i zastępowane przez nowo syntetyzowane białka [68]. Klasycznym przykładem przeprogramowania zarodka jest epigenetyczna regulacja ekspresji genu *FLC* (FLOWERING LOCUS C), represora kwitnienia regulowanego przez wernalizację. U *Arabidopsis* aktywacja, bądź hamowanie ekspresji tego genu związane są ze zmianami w strukturze chromatyny w obrębie jego locus [110]. W sekwencji DNA kodującej *FLC* niska temperatura indukuje utratę znaczników aktywnej chromatyny, tj. deacetylację histonów oraz demetylację H3K4 i H3K36, następuje natomiast kierowana aktywnością PRC2 metylacja H3K27me3. „Wyłączenie” locus *FLC* zostaje utrwalone poprzez związanie z chromatyną białka LHP1 – markera heterochromatynizacji. Poziom metylacji DNA pozostaje natomiast niski i nie ulega znaczącym zmianom [111]. Pamięć wernalizacji, czyli inhibicja *FLC*, nie jest przekazywana do następnego pokolenia. W wernalizowanych roślinach ekspresja genu *FLC* pozostaje wyciszona w gametach, ale podczas embriogenezy ekspresja genu jest reaktywowana [112].

Zarodek i bielmo różnią się wzorem metylacji DNA. DNA bielma ulega aktywnej i pasywnej demetylacji we wszystkich kontekstach. Odbywa się to przy udziale glikozylazy DNA DME, która w komórce centralnej jest aktywna już przed zapłodnieniem, oraz dzięki obniżonemu poziomowi metylotransferazy DNA MET1 [64,66]. Wzorzec metylacji DNA jest istotny dla prawidłowego rozwoju bielma. U mutantu *dme Arabidopsis* obserwowano bowiem hypermetylację jego genomu, czego efektem były zaburzenia rozwoju endospermy i ostatecznie aborcja nasion [113]. Bielmo jest ubogie w metylację CG, podczas gdy poziom metylacji w kontekście CHH, podobnie jak w zarodku, stopniowo wzrasta. We wczesnych etapach rozwoju bielma nie odnotowano ekspresji DRM2, co wskazuje, że *de novo* metylacja DNA z udziałem RdDM jest wyłączona [61,114]. Podczas dalszych etapów rozwoju, kiedy bielmo ulega celularyzacji i różnicowa-





**Rycina 11.** Model imprintingu genu *MEA* i *PHERES1* w bielmie. W komórce centralnej dzięki aktywnej demetylacji DNA przez DME sekwencji flankujących gen *MEA* po zapłodnieniu w bielmie dochodzi do ekspresji genu z alleli matczyńskich, ekspresja allelu ojcowskiego *MEA* zostaje zahamowana przez metylację DNA z udziałem MET1. Demetylacja DNA w rejonach sąsiadujących z genem *PHERES1* w komórce centralnej prowadzi do odkładania w allelach matczyńskich H3K27me3 przez FIS-PRC2, co promuje po zapłodnieniu w bielmie zahamowanie ich ekspresji, metylacja DNA i brak aktywności FIS-PRC2 w komórce plemnikowej wyklucza obecność H3K27me3, co zapobiega w bielmie transkrypcyjnemu wyciszeniu allelu ojcowskiego *PHERES1* [na podstawie 100].

waniu, następuje stopniowy wzrost metylacji DNA w kontekście CHH, zgodnie ze wzrostem ekspresji syntetyzowanych *de novo* metylotransferaz DNA. Jednocześnie demetylacja DNA z udziałem DME prowadzi do aktywacji euchromatynowych sekwencji TE i inicjacji *de novo* metylacji DNA w szlaku RdDM. Włączone mechanizmy metylacji DNA w kontekście CHH dotyczą także genomu ojcowskiego [72].

#### INTERFERENCJA RNA

W zapłodnionej komórce jajowej dochodzi do reorganizacji struktury chromatyny [61], co przekłada się na prze-programowanie totipotencjalnej zygoty i ostatecznie tworzenie epigenetycznego wzorca przekazywanego następnym pokoleniom. Prze-programowanie genomu zygoty i zarodka odbywa się na drodze interferencji RNA, poprzez włączenie *de novo* metylacji DNA. Poprawna metylacja genomu zarodka warunkuje aktywację konkretnych, koniecznych do embriogenezy genów, a wyciszone sekwencje TE nie zaburzają integracji jego genomu. Uważa się, że w wyciszeniu transpozonów zarodka uczestniczą zależne od Pol RNA IV 24 nt siRNA, które generowane są z demetylowanych dzięki aktywności DME sekwencji TE w bielmie, zarówno z genomu matki, jak i ojca. Te bielmowe 24 nt siRNA przemieszczają się do zarodka, gdzie na drodze RdDM kierują metylacją DNA komplementarnych sekwencji TE. Do tej pory brak jest jednakże bezpośredniego dowodu na

transport siRNA z bielma do zarodka [102]. Badania ostatnich lat pokazały, że wyciszenie sekwencji TE w zarodku może odbywać się też na drodze autonomicznej. Dzięki de-kondensacji chromatyny zygoty możliwy staje się wybuch syntezy 24 nt siRNA zależnych od Pol RNA IV, które są wyciszone podczas innych faz rozwojowych. Papparedy i wsp. (2020) wykazali, że w zarodkach *A. thaliana* aktywne są tysiące TE, które zlokalizowane są zarówno w heterochromatynowych, jak i euchromatynowych regionach genomu [109]. Generowane z TE 24 nt siRNA odpowiedzialne są za przywrócenie metylacji DNA w obrębie sekwencji TE, z których pochodzą. Proponuje się, że synteza siRNA z heterochromatynowych sekwencji TE związana jest z aktywacją, tuż po zapłodnieniu, transkrypcji genów kodujących rRNA (w tym setek loci 5S rRNA), które znajdują się w sąsiedztwie TE w regionach centromerowych. Synteza siRNA z euchromatynowych regionów zawierających sekwencje TE jest z kolei opóźniona w stosunku do aktywacji heterochromatynowych TE. Wynika to prawdopodobnie z obecności białek remodelujących chromatynę m.in. CLSY1/2, związanych z Pol RNA IV inicjującą szlak RdDM, których poziom wzrasta podczas embriogenezy. Ostatecznie wraz ze wzrostem kondensacji chromatyny poziom siRNA generowanych z heterochromatynowych sekwencji TE obniża się, a poziom siRNA syntetyzowanych z euchromatynowych TE wzrasta i osiąga najwyższy poziom w stadium dojrzałego zarodka. Wzrostowi hipermetylacji euchromatynowych TE towarzyszy

szy dalsza hipermetylacja heterochromatynowych TE ale proces ten wydaje się być już niezależny od 24 nt siRNA, a zależny od aktywności CMT2 [109].

## PIĘTNOWANIE GENOMOWE

Piętnowanie genomowe to proces prowadzący do modyfikacji allelu danego genu w zależności od jego pochodzenia. Ekspresja piętnowanego genu jest ograniczona albo do allelu matczynego (ang. *maternally expressed gene*, MEG) albo allelu ojcowskiego (ang. *paternally expressed gene*, PEG). MEG i PEG odgrywają ważną rolę w rozwoju bielma, związane są m.in. z transportem związków odżywczych, proliferacją, czy też kontrolą wielkości nasion [110,115]. W piętnowaniu genomowym uczestniczą różne mechanizmy molekularne, m.in. metylacja DNA, modyfikacje histonów przeprowadzane przez białka grupy Polycomb oraz interferencja RNA [108,115]. Epigenetyczne regulatory zaangażowane w ustalanie imprintingu genomowego bielma same mogą także podlegać piętnowaniu [116].

Asymetria metylacji DNA w komórce centralnej i komórce plemnikowej, a także dziedziczenie w bielmie demetylowanego genomu matczynego oraz hypermetylowanego genomu ojcowskiego uważane są za główne czynniki kontrolujące prawidłowe piętnowanie genomowe [117]. W bielmie prowadzi to do występowania w piętnowanych genach obszarów o zróżnicowanej metylacji DNA (DMR). Dla piętnowania genomowego niezbędny jest szlak demetylacji DNA z udziałem glikozyazy DME (a u ryżu ROS1), która aktywna jest już przed zapłodnieniem w komórce centralnej [64,71,118]. Ulegające demetylacji DNA sekwencje TE często znajdują się w regionach flankujących piętnowane geny. Dlatego też ich demetylacja dzięki aktywności DME może wpływać również na aktywację piętnowanych genów [66,117]. Z kolei w linii męskiej, siRNA produkowane w wyniku demetylacji sekwencji TE w komórce wegetatywnej, są eksportowane do komórek plemnikowych, gdzie na drodze RdDM wyciszają ojcowskie allele genów MEG. Metylacja ojcowskich alleli w męskich gametach odbywa się także dzięki aktywności MET1 (w kontekście CG) i CMT3 (w kontekście CHG) [76]. Po zapłodnieniu odziedziczone regiony DMR rodzicielskich genomów pozwalają określić, gdzie matczyne allele jest często hypometylowane, zwłaszcza w odniesieniu do DMR związanych z piętnowanymi genami [71,100]. Obok metylacji DNA w procesach imprintingu genomowego istotną rolę odgrywa obecność wariantu histonu H3K27me3. Ta potranslacyjna modyfikacja histonu H3 jest ustalana dzięki aktywności białek z grupy PcG (Polycomb), które promują kondensację chromatyny i pauzowanie Pol RNA II w obrębie wyłączanych loci genów uniemożliwiają ich transkrypcję [116,119]. H3K27me3 jest uznawany za „wtórny” znacznik genomowego imprintingu, ponieważ wbudowanie tego markerowego histonu w genom matki wymaga wcześniejszej demetylacji DNA [119].

Obecnie znanych jest kilka modeli regulacji ekspresji piętnowanych genów (MEG i PEG) w bielmie [100]. Transkrypcja alleli matczynych może być regulowana w sposób zależny od asymetrii metylacji DNA w komórce centralnej i komórce plemnikowej lub niezależnie od metylacji DNA w gametach. Pierwszy przypadek dotyczy piętnowania ge-

nów, które na drodze metylacji sekwencji regulatorowych są wyłączone w tkankach sporofitu. Podczas różnicowania gametofitu, w komórce centralnej allele matczyne ulegają demetylacji przez DME (allele hypometylowane) i po zapłodnieniu stają się aktywne w bielmie. Natomiast metylacja alleli ojcowskich, która zostaje nałożona podczas rozwoju pyłku [120], po zapłodnieniu nie zmienia się, co warunkuje zahamowanie ich ekspresji w bielmie [100]. Przykładem tego mechanizmu jest imprinting genu *FWA* (FLOWERING WAGENINGEN). Gen ten flankowany jest sekwencjami TE SINE, które w tkankach sporofitowych pozostają wyciszone dzięki aktywności RdDM i MET1. W komórce centralnej sekwencje TE flankujące *FWA* podlegają demetylacji przez DME, co prowadzi do aktywacji matczynego allelu. Natomiast w komórce plemnikowej – dzięki aktywności MET1 – sekwencje te pozostają zmetylowane, gen jest nieaktywny. Po zapłodnieniu odziedziczone asymetryczne wzorce metylacji DNA komórki centralnej i plemnikowej warunkują ekspresję tylko matczynych alleli *FWA* w rozwijającym się bielmie. U *Arabidopsis* mutacja genu *met1* prowadzi do aktywacji ojcowskiego allelu i biallelicznej ekspresji *FWA* w bielmie, natomiast mutacja *dme1* prowadzi do zahamowania ekspresji alleli matczynych [65,116].

Inny mechanizm funkcjonuje wtedy, gdy piętnowany gen ulega ekspresji w tkankach sporofitu. W tym przypadku sekwencje flankujące locus genu nie mogą podlegać metylacji DNA, bowiem hamowałyby to ich transkrypcję. W konsekwencji podczas rozwoju gametofitu genom komórki centralnej zawiera już demetylowany allel piętnowanego genu (allel hypometylowany) i aktywność DME nie jest wymagana. Asymetria metylacji DNA obydwu alleli imprintingowanego genu zostaje utrzymana dzięki zahamowaniu ojcowskiego allelu w komórce plemnikowej, co odbywa się na drodze metylacji DNA z udziałem siRNA i RdDM (allel hypermetylowany) [100].

Podczas rozwoju bielma asymetria metylacji DNA gamet warunkuje również „wyłączenie” matczynych alleli genów, które ulegają ekspresji z alleli ojcowskich. W tym przypadku hamowanie MEG odbywa się przy udziale H3K27me3, który staje się głównym markerem wyciszanych alleli imprintingowanych genów. Akumulacja tego wariantu histonu może odbywać się w sposób zależny, bądź niezależny od aktywności demetylasy DNA DME. U *Arabidopsis* w modyfikacji histonu H3K27me3 uczestniczy kompleks FIS-PRC2 (FERTILIZATION INDEPENDENT (FIS)-PRC COMPLEX 2), w skład którego wchodzi FIS2 (FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2), MEA (MEDEA), FIE (FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM) oraz MSI1 (MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1) [121]. Geny *MEA* i *FIS2* są piętnowane i w bielmie podlegają ekspresji tylko z matczynych alleli (Ryc. 11). FIS-PRC2 jest aktywny w komórce centralnej, natomiast elementów tego kompleksu nie wykryto w komórkach plemnikowych. W komórce centralnej dzięki aktywności DME następuje specyficzna demetylacja DNA w rejonach flankujących imprintingowane geny, co umożliwia metylację H3K27me3 przez kompleks FIS-PRC2. Akumulacja tej hamującej modyfikacji chromatyny prowadzi do transkrypcyjnego wyciszenia matczynych alleli, pomimo iż ich DNA pozostaje hypometylowane. Genom komórek plemnikowych pozbawiony jest hamującej modyfikacji

H3K27me3 [5] ale ich DNA pozostaje silnie zmetylowane z udziałem metylotransferazy DNA MET1. Odziedziczone epigenetyczne wzorce gamet prowadzą w rozwijającym się bielmie do zahamowania ekspresji alleli matczyńskich i aktywności allelu ojcowskiego piętnowanego genu. Przykładem tego mechanizmu jest imprinting czynnika transkrypcyjnego z rodziny MADS-box PHE1 (PHERES 1). Gen ten jest flankowany na końcu 3' sekwencjami powtórzonymi, które są demetylowane w komórce centralnej przez DME. Umożliwia to metylację H3K27me3 w matczyńskich allelach przez FIS-PRC2, co prowadzi do ich wyciszenia. Natomiast obecny w komórkach plemnikowych ojcowski allel *PHE1* podlega tylko metylacji DNA i po fuzji z komórką centralną staje się aktywny w bielmie (Ryc. 11). Istnieje także mechanizm z udziałem H3K27me3 i białek grupy PcG, który może uczestniczyć w regulacji aktywności alleli MEG, prowadząc w bielmie do wyciszenia allelu ojcowskiego [100,116].

W przypadku alleli ojcowskich (PEG) genów podlegających ekspresji w bielmie a także tkankach sporofitu, których rejony flankujące nie podlegają metylacji DNA, warunkowane jest wyciszeniem alleli matczyńskich (MEG) w komórce centralnej dzięki aktywności kompleksu FIS-PRC2 oraz specyficznych dla gamety czynników transkrypcyjnych (TF). H3K27me3 pełni więc rolę pierwotnego znacznika, a wyciszenie matczyńskich alleli nie wymaga aktywności DME. Wykazano, że u *Arabidopsis* sekwencje TE RC/Helitron sąsiadujące z PEG stanowią miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych rodziny MADS-box, które związane są z akumulacją H3K27me3, a tym samym wyłączeniem tych rejonów [100]. W komórkach plemnikowych natomiast ekspresja białek kompleksu PRC2 jest zahamowana i brak wariantu histonu H3K27me3 warunkuje aktywność ojcowskiego allelu po zapłodnieniu. Gdy do wyciszenia alleli ojcowskich (PEG) dochodzi w wyniku konstytutywnej akumulacji H3K27me3, wówczas wybiórcza ich ekspresja w bielmie wymaga usunięcia przed zapłodnieniem tego wariantu histonu w komórkach plemnikowych, podczas gdy w komórce centralnej oraz w tkankach sporofitu utrzymania akumulacji markera. Brak ekspresji białek kompleksu PRC2 w komórkach plemnikowych warunkuje eliminację H3K27me3, a tym samym aktywację alleli ojcowskich w bielmie [119,122]. Niezależnie od metylacji DNA, asymetryczna akumulacja H3K27me3 w gametach warunkuje więc ostateczne wyciszenie matczyńskich alleli w bielmie [100,116].

## PODSUMOWANIE

U roślin okrytozalążkowych epigenetyczna kontrola ekspresji genów na poziomie transkrypcyjnym (TGS) i potranskrypcyjnym (PTGS) determinuje odmienne strategie rozwojowe oraz funkcje komórek somatycznych i linii płciowej. Mechanizmy, takie jak metylacja DNA, potranslacyjne modyfikacje histonów i interferencja RNA, regulują strukturę chromatyny i utrzymują ją w stanie aktywnym lub transkrypcyjnie wyciszonym. Efektem jest zróżnicowana ekspresja genów w komórkach o odmiennych funkcjach biologicznych. Na podstawie dotychczasowych badań wiadomo, że w procesach generatywnego rozmnażania roślin okrytozalążkowych prawidłowy epigenetyczny wzorzec ekspresji genów warunkuje:

Przejście rośliny z fazy wegetatywnej (2n) do generatywnej (1n); specjacja komórek macierzystych spor (KMS) i kontrola mejozy odbywają się z udziałem mobilnych cząsteczek siRNA produkowanych w somatycznych komórkach organów rozmnażania, tj. w komórkach epidermalnych i tapetum pylnika oraz w komórkach epidermy i ośrodka załączka.

Rozwój męskiego i żeńskiego gametofitu oraz różnicowanie gamet; reprogramowanie oraz utrzymanie integralności genomu gamet nie jest autonomiczne, w proces ten zaangażowane są siRNA eksportowane z komórki wegetatywnej do komórek plemnikowych oraz z komórki centralnej do komórki jajowej.

Piętnowanie rodzicielskie; w komórkach plemnikowych imprinting ojcowskich alleli odbywa się na drodze *de novo* metylacji DNA z udziałem siRNA produkowanych w komórce wegetatywnej, natomiast w komórce jajowej dzięki potranslacyjnej modyfikacji histonu H3K27me3 poprzedzonej demetylacją DNA piętnowanego genu.

Po procesie podwójnego zapłodnienia reprogramowanie genomu zarodka oraz rozwój bielma; *de novo* metylacja DNA na drodze RdDM, która kierowana jest mobilnymi, produkowanymi w bielmie siRNA, determinuje przełączenie genomu zygoty na somatyczny program rozwoju i warunkuje utrzymanie integralności i stabilności genomu rozwijającego się zarodka.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bednarska E (1994) Zarys embriologii roślin okrytonasiennych. Wydawnictwo UMK Toruń
2. Russell SD, Cass DD (1981) Ultrastructure of the sperms of *Plumbago zeylanica*. 1. Cytology and association with the vegetative nucleus. *Protoplasma* 107:85-107
3. McCue AD, Cresti M, Feijó JA, Slotkin RK (2011) Cytoplasmic connection of sperm cells to the pollen vegetative cell nucleus: potential roles of the male germ unit revisited. *J Exp Bot* 62: 1621-1631
4. Slotkin RK, Vaughn M, Borges F, Tanurdzi CM, Becker JD, Feijó JA, Martienssen RA (2009) Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* 136, 461-472
5. Kozłowska M, Niedojadło K, Brzostek M, Bednarska-Kozakiewicz E (2016) Epigenetic marks in the *Hyacinthus orientalis* L. mature pollen grain and during *in vitro* pollen tube growth. *Plant Reprod* 29: 251-263
6. Sacharowski SP, Sarnowski TJ (2019) Mechanizmy kontrolujące strukturę chromatyny. *Postępy Biochemii* 65: 9-20
7. Law JA, Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11: 204-220
8. Feng S, Jacobsen SE (2011) Epigenetic modifications in plants: An evolutionary perspective. *Curr Opin Plant Biol* 14: 179-186
9. Ashapkin VV, Kutueva LI, Aleksandrushkina NI, Vanyushin BF (2019) Epigenetic Regulation of Plant Gametophyte Development. *Int J Mol Sci* 20: 3051
10. Franz P, de Jong JH (2002) Chromatin dynamics in plants. *Curr Opin Plant Biol* 5: 560-567
11. Lei M, Zhang H, Julian R, Tang K, Xie S, Zhu JK (2015) Regulatory link between DNA methylation and active demethylation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 3553-3557
12. Borg M, Pappareddy RK, Dombey R, Axelsson E, Nodine MD, Twell D, Berger F (2021) Epigenetic reprogramming rewires transcription during the alternation of generations in *Arabidopsis*. *eLife* 10: e61894

13. Lee CH, Carroll BJ (2018) Evolution and diversification of small RNA pathways in flowering plants. *Plant Cell Physiol* 59: 2169-2187
14. Wierzbicki AT, Ream TS, Haag JR, Pikaard CS (2009) RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat Genet* 41: 630-634
15. Wierzbicki AT, Cocklin R, Mayampurath A, Lister R, Jordan Rowley M, Gregory BD, Ecker JR, Tang H, Pikaard CS (2012) Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the *Arabidopsis* epigenome. *Genes Dev* 26: 1825-1836
16. Komiya R (2017) Biogenesis of diverse plant phasiRNAs involves an miRNA – trigger and Dicer – processing. *J Plant Res* 130: 17-23
17. Nonomura KI (2018) Small RNA pathways responsible for non-cell-autonomous regulation of plant reproduction. *Plant Reprod* 31: 1-29
18. Bélanger S, Pokhrel S, Czymmek K, Meyers BC (2020) Premeiotic, 24-Nucleotide Reproductive PhasiRNAs Are Abundant in Anthers of Wheat and Barley But Not Rice and Maize. *Plant Physiol* 184: 1407-1423
19. Allen E, Howell MD (2010) miRNAs in the biogenesis of trans-acting siRNAs in higher plants. *Semi Cell Dev Biol* 21:798-804
20. Baroux C, Michael T, Raissig MT, Grossniklaus U (2011) Epigenetic regulation and reprogramming during gamete formation in plants. *Curr Opin Genet Dev* 21: 124-133
21. Borges F, Calarco JP, Martienssen RA (2012) Reprogramming the epigenome in *Arabidopsis* pollen. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 77: 1-5.
22. Zhai J, Zhang H, Arikat S, Huang K, Nan GL, Walbot V, Meyers BC (2015) Spatiotemporally dynamic, cell-type-dependent premeiotic and meiotic phasiRNAs in maize anthers. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 3146-3151
23. McCue, AD, Panda K, Nuthikattu S, Choudury SG, Thomas EN, Slotkin RK (2015) ARGONAUTE 6 bridges transposable element mRNA-derived siRNAs to the establishment of DNA methylation. *EMBO J* 34: 20-35
24. Berr A, Shafiq S, Shen WH (2011) Histone modifications in transcriptional activation during plant development. *Biochim Biophys Acta* 1809: 567-576
25. Ma X, Lv S, Zhang C (2013) Histone deacetylases and their functions in plants. *Plant Cell Rep* 32: 465-478
26. Zhang AX, Germann S, Blus BJ, Khorasanizadeh S, Gaudin V, Jacobsen SE (2007) The *Arabidopsis* LHP1 protein colocalizes with histone H3 Lys27 trimethylation. *Nat Struct Mol Biol* 14: 869-871
27. Bernatavichute YV; Zhang X, Cokus S, Pellegrini M, Jacobsen SE (2008) Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 3: e3156
28. Tsukada Y (2012) Hydroxylation mediates chromatin demethylation. *J Biochem* 151: 229-246
29. Grant-Downton R, Hafidh S, Twell D, Dickinson HG (2009) Small RNA pathways are present and functional in the angiosperm male gametophyte. *Mol Plant* 2: 500-512
30. Nie WF, Lei M, Zhang M, Tang K, Huanga H, Zhang C, Miki D, Liu P, Yang Y, Wang X, Zhang H, Lang Z, Liu N, Xu X, Yelagandula R, Zhang H, Wang Z., Chai X, Andreucci A, Yu JQ, Bergerf F, Lozano-Duran R, Zhu JK (2019) Histone acetylation recruits the SWR1 complex to regulate active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *PNAS*: 116: 16641-16650
31. Okada T, Singh MB, Bhalla PL (2006) Histone H3 variants in male gametic cells of lily and H3 methylation in mature pollen. *Plant Mol Biol* 62: 503-512
32. Ingouff M, Berger F (2010) Histone3 variants in plants. *Chromosoma* 119: 27-33
33. Sura W, Kabza M, Karlowski WM, Bielszewska T, Kus-Slowinska, Paweloszek L, Sadowski J, Ziolkowski PA (2017) Dual Role of the Histone Variant H2A.Z in Transcriptinal Regulation of Stress-Response Genes. *Plant Cell* 29: 791-807
34. Lermontova I, Kuhlmann M, Friedel S, Rutten T, Heckmann S, Sandmann M, Demidov D, Schubert V, Schubert I (2013) *Arabidopsis* KINETOCHORE NULL2 Is an Upstream Component for Centromeric Histone H3 Variant cenH3 Deposition at Centromeres. *Plant Cell* 25: 3389-3404
35. Olmedo-Monfil V, Dura'n-Figueroa N, Arteaga-Va'zquez M, Demesa- Are'valo E, Autran D, Grimanelli D, Slotkin RK, Martienssen RA, Vielle-Calzada JP (2010) Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature* 464, 628-632
36. Singh M, Goel S, Meeley RB, Dantec C, Painold H, Michaud C, Leblanc O, Grimanelli D (2011) Production of Viable Gametes without Meiosis in Maize Deficient for an ARGONAUTE Protein. *Plant Cell* 23: 443-458
37. Tucker MR, Okada T, Hu Y, Scholefield A, Taylor JM, Koltunow AM (2012) Somatic small RNA pathways promote the mitotic events of megagametogenesis during female reproductive development in *Arabidopsis*. *Development* 139: 1399-1404
38. Armenta-Medina A, Demesa-Arévalo E, Vielle-Calzada JP (2011) Epigenetic control of cell specification during female gametogenesis (2011) *Sex Plant Reprod* 24:137-147
39. Grimanelli D (2012) Epigenetic regulation of reproductive development and the emergence of apomixis in angiosperms. *Curr Opin Plant Biol* 15: 57-62
40. She W, Grimanelli D, Rutowicz K, Whitehead MW, Puzio M, Kotlinski M, Jerzmanowski A, Baroux C (2013). Chromatin reprogramming during the somatic-to-reproductive cell fate transition in plants. *Development* 140: 4008-4019
41. She W, Baroux C (2015) Chromatin dynamics in pollen mother cells underpin a common scenario at the somatic-to-reproductive fate transition of both the male and female lineages in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci* 6: 294
42. Baroux C, Autran D (2015) Chromatin dynamics during cellular differentiation in the female reproductive lineage of flowering plants. *Plant J* 83: 160-17637
43. Fei Q, Yang L, Liang W, Zhang D, Meyers BC (2016) Dynamic changes of small RNAs in rice spikelet development reveal specialized reproductive phasiRNA pathways. *J Exp Bot* 67: 6037-6049
44. Nan GL, Zhai J, Arikat S, Morrow D, Fernandes J, Mai L, Nguyen N, Meyers BC, Walbot V (2017) MS23, a master basic helix-loop-helix factor, regulates the specification and development of the tapetum in maize. *Development* 144: 163-172
45. Walker J, Gao H, Zhan J, Aldridge B, Vickers M, Higgins JD, Feng X (2018) Sexual lineage specific DNA methylation regulates *Arabidopsis* meiosis. (2018) *Nature Genetics* 50: 130-137
46. Yang H, Lu P, Wang Y, Ma H (2011) The transcriptome landscape of *Arabidopsis* male meiocytes from high-throughput sequencing: The complexity and evolution of the meiotic process. *Plant* 65: 503-516
47. Chen C, Farmer A D, Langley RJ, Mudge J, Crow JA, May GD, Huntley J, Smith AG, Retzel EF (2010) Meiosis-specific gene discovery in plants: RNA-Seq applied to isolated *Arabidopsis* male meiocytes. *BMC Plant Biol* 10: 280
48. Nonomura KI, Morohoshi A, Nakano M, Eiguchi M, Miyao A, Hirochika H, Kurata N (2007) A germ cell specific gene of the ARGONAUTE family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. *Plant Cell* 19: 2583-2594
49. Yelina NE, Choi K, Chelysheva L, Macaulay M, de Snoo B, Wijnker E, Miller N, Drouaud J, Grelon M, Copenhaver GP, Mezard C, Kelly KA, Henderson IR (2012) Epigenetic remodeling of meiotic crossover frequency in *Arabidopsis thaliana* DNA methyltransferase mutants. *PLoS Genet* 8: e100284
50. Komiya R, Ohyanagi H, Niihama M, Watanabe T, Nakano M, Kurata N, Nonomura K (2014) Rice germline-specific Argonaute MEL1 protein binds to phasiRNAs generated from more than 700 lincRNAs. *Plant J* 78: 385-397
51. Martinez G, Köhler C (2017) Role of small RNAs in epigenetic reprogramming during plant sexual reproduction. *Curr Opin Plant Biol* 36: 22-28
52. Petrella R, Cucinotta M, Mendes MA, Underwood CHJ, Colombo L (2021) The emerging role of small RNAs in ovule development, a kind of magic. *Plant Reprod* Jun 17 doi: 10.1007/s00497-021-00421-4

53. Wierzbicki AT, Jerzmanowski A (2005). Suppression of histone H1 genes in *Arabidopsis* results in heritable developmental defects and stochastic changes in DNA methylation. *Genetics* 169: 997-1008
54. Coleman-Derr D, Zilberman D (2012). Deposition of histone variant H2A.Z within gene bodies regulates responsive genes. *PLoS Genet* 8: e1002988
55. Zemach A, Kim MY, Hsieh PH, Coleman-Derr D, Eshed-Williams L, Thao K, Harmer SL, Zilberman D (2013) The *Arabidopsis* nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell* 153: 193-205
56. Park GT, Frost JM, Park JS, Kim TH, Lee JS, Oh SA, Twell D, Brooks JS, Fischer RL, Choi Y (2014) Nucleoporin MOS7/Nup88 is required for mitosis in gametogenesis and seed development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 18393-18398
57. Turck F, Roudier F, Farrona S, Martin-Magniette ML, Guillaume E, Buisine N, Gagnot S, Martienssen RA, Coupland G, Colot V (2007). *Arabidopsis* TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genet* 3: e86
58. Pillot M, Baroux C, Vazquez MA, Autran D, Leblanc O, Vielle-Calzada JP, Grossniklaus U, Grimanelli D (2010a) Embryo and endosperm inherit distinct chromatin and transcriptional states from the female gametes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 307-320
59. 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. *Plant Cell* 22: 3249-3267
60. Niedojadlo K, Pięciński Sz, Smoliński DJ, Bednarska-Kozakiewicz E (2012) Transcriptional activity of *Hyacinthus orientalis* L. female gametophyte cells before and after fertilization. *Planta* 236:153-169
61. Jullien PE, Susaki D, Yelagandula R, Higashiyama T, Berger F (2012) DNA methylation dynamics during sexual reproduction in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 22: 1825-1830
62. Wuest SE; Vijverberg K, Schmidt A, Weiss M, Gheyselincx J, Lohr M, Wellmer F, Rahnenführer J, von Mering C, Grossniklaus U (2010) *Arabidopsis* female gametophyte gene expression map reveals similarities between plant and animal gametes. *Curr Biol* 20: 506-512
63. Cao X., Jacobsen SE (2002) Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in *de novo* DNA methylation and gene silencing. *Curr Biol* 12: 1138-1144
64. Park K, Kim MY, Vickers M, Park JS, Hyun Y, Okamoto T, Zilberman D, Fischer RL, Feng X, Choi Y, Scholten S (2016) DNA demethylation is initiated in the central cells of *Arabidopsis* and rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 15138-15143
65. Hsieh TF, Shin J, Uzawa R, Silva P, Cohen S, Bauer MJ, Hashimoto M, Kirkbride RC, Harada JJ, Zilberman D, Fischer RL (2011) Regulation of imprinted gene expression in *Arabidopsis* endosperm. *PNAS* 108: 1755-1762
66. Park K, Lee S, Yoo H, Choi Y (2020) DEMETER-mediated DNA Demethylation in Gamete Companion Cells and the Endosperm, and its Possible Role in Embryo Development in *Arabidopsis*. *J Plant Biol* 63: 321-329
67. Ingouff M, Rademacher S, Holec S, Soljić L, Xin N, Readshaw A, Foo SH, Lahouze B, Sprunck S, Berger F (2010) Zygotic resetting of the HISTONE 3 variant repertoire participates in epigenetic reprogramming in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 20: 2137-2143
68. Su Z, Wang N, Hou Z, Li B, Li D, Liu Y, Cai H, Qin Y, Chen X (2020) Regulation of Female Germline Specification via Small RNA Mobility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 32: 2842-2854
69. Erdmann RM, Hoffmann A, Walter HK, Wagenknecht HA, Groß-Hardt R, Gehring M (2017) Molecular movement in the *Arabidopsis thaliana* female gametophyte. *Plant Reprod* 30: 141-146
70. Ingouff M, Selles B, Michaud C, Vu TM, Berger F, Schorn AJ, Autran D, Van Durme M, Nowack MK, Martienssen RA, Grimanelli D (2017) Live-cell analysis of DNA methylation during sexual reproduction in *Arabidopsis* reveals context and sex-specific dynamics controlled by noncanonical RdDM. *Genes Dev* 31: 72-83
71. Ibarra CA, Feng X, Schoft VK, Hsieh TF, Uzawa R, Rodrigues JA, Zemach A, Chumak N, Machlicova A, Nishimura T, Rojas D, Fischer RL, Tamaru H, Zilberman D (2012) Active DNA demethylation in plant companion cells reinforces transposon methylation in gametes. *Science* 337: 1360-1364
72. Gehring M (2019) Epigenetic dynamics during flowering plant reproduction: evidence for reprogramming? *New Phytol* 224: 91-96
73. Bednarska E, Górska-Brylasy A (1987) Ultrastructural transformations of nuclei in differentiating *Hyacinthus orientalis* L. pollen grain cells. *Acta Soc Bot Pol* 4: 667-685
74. Górska-Brylasy A (1970) The „callose stage“ of the generative cells in pollen grains. *Grana* 10: 21-30
75. Huang X, Sun MX (2021) Epigenetic regulation and intercellular communication during male gametophyte development. *J Plant Physiol* 258-259: 153391.
76. Calarco J, Borges F, Donoghue M, Van Ex F, Jullien P, Lopes T, Gardner R, Berger F, Feijó J, Becker J, Martienssen RA (2012) Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA. *Cell* 151: 194-205
77. Martinez G, Panda K, Kohler C, Slotkin RK (2016). Silencing in the sperm cells is directed by RNA movement from the surrounding nurse cell. *Nat Plants* 2: 16030
78. Zienkiewicz K, Zienkiewicz A, Rodriguez-Garcia MI, Smoliński DJ, Świdziński M, Bednarska E (2008) Transcriptional activity and distribution of splicing machinery elements during *Hyacinthus orientalis* L. pollen tube growth. *Protoplasma* 233: 129-139
79. Zienkiewicz K, Suwinska A, Niedojadlo K, Zienkiewicz A, Bednarska E (2011) Nuclear activity of sperm cells during *Hyacinthus orientalis* L. *in vitro* pollen tube growth. *J Exp Bot* 62: 1255-1269
80. Bednarska E (1984) Ultrastructural and metabolic transformations of differentiating *Hyacinthus orientalis* L. pollen grain cells. I. RNA and protein synthesis. *Acta Soc Bot Pol* 53: 145-158
81. Niedojadlo K, Kupiecka M, Kolowierz-Lubnau A, Lenartowski R, Niedojadlo J, bednarska-Kozakiewicz E (2020) Dynamic distribution of ARGONAUTE1 (AGO1) and ARGONAUTE4 (AGO4) in *Hyacinthus orientalis* L. pollen grains and pollen tubes growing *in vitro*. *Protoplasma* 257: 793-805
82. Park JS, Frost JM, Park K, Ohr H, Park GT, Kim S, Eom H, Lee I, Brooks JS, Fischer RL, Choi Y (2017) Control of DEMETER DNA demethylase gene transcription in male and female gamete companion cells in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 2078-2083
83. Borges F, Parent JS, van Ex F, Wolff P, Martínez G, Köhler C, Martienssen RA (2018) Transposon-derived small RNAs triggered by miR845 mediate genome dosage response in *Arabidopsis*. *Nat Genet* 50: 186-192
84. Wang Z, Butel N, Santos-González J, Borges F, Jun Y, Martienssen RA, Martínez G, Köhler C (2020) Polymerase IV Plays a Crucial Role in Pollen Development in *Capsella*. *Plant Cell* 32: 950-966
85. Chen Y, Zou T, McCormick S (2016) S-Adenosylmethionine Synthetase 3 Is Important for Pollen Tube Growth. *Plant Physiol* 172: 244-253
86. Liu L, Wang T (2021) Male gametophyte development in flowering plants: A story of quarantine and sacrifice. *J Plant Physiol* 258-259: 153365
87. Ueda K, Kinoshita Y, Xu ZJ, Ide N, Ono M, Akahori Y, Tanaka I, Inoue M (2000) Unusual core histones specifically expressed in male gametic cells of *Lilium longiflorum*. *Chromosoma* 108: 491-500
88. Ueda K, Suzuki M, Ono M, Ide N, Tanaka I, Inoue M (2005) Male gametic cell specific histone gH2A gene of *Lilium longiflorum*: genomic structure and promoter activity in the generative cell. *Plant Mol Biol* 59: 229-238
89. Yang H, Yang N, Wang T (2016) Proteomic analysis reveals the differential histone programs between male germline cells and vegetative cells in *Lilium davidii*. *Plant J* 85: 660-674
90. Ingouff M, Hamamura Y, Gourgues M, Higashiyama T, Berger F (2007) Distinct dynamics of HISTONE3 variants between the two fertilization products in plants. *Curr Biol* 17: 1032-1037
91. Okada T, Endo M, Singh MB, Bhalla PL (2005) Analysis of the histone H3 gene family in *Arabidopsis* and identification of the male-gamete specific variant AtMGH3. *Plant J* 44: 557-568

92. Houben A, Kumke K, Nagaki K, Hause G (2011) CENH3 distribution and differential chromatin modifications during pollen development in rye (*Secale cereal L.*) Chromosome Res 19: 471-480
93. Sano Y, Tanaka I (2005) A Histone H3.3-like Gene Specifically Expressed in the Vegetative Cell of Developing Lily Pollen. Plant Cell Physiol 46: 1299-1308
94. Ribeiro T, Viegas W, Morais-Cecilio L (2009) Epigenetic marks in the mature pollen of *Quercus suber L.* (Fagaceae). Sex Plant Reprod 22: 1-7
95. Janousek B, Zluvova J, Vyscot B (2000) Histone H4 acetylation and DNA methylation dynamics during pollen development. Protoplasma 211: 116-122
96. Pandey P, Houben A, Kumlehn J, Melzer M, Rutten T (2013) Chromatin Alterations during Pollen Development in *Hordeum vulgare*. Cytogenet Genome Res 141: 50-57
97. Sano Y, Tanaka I (2010) Distinct localization of histone H3 methylation in the vegetative nucleus of lily pollen. Cell Biol Int 34: 253-259
98. Cartagena JA, Matsunaga S, Seki M, Kurihara D, Yokoyama M, Shinozaki K, Fujimoto S, Azumi Y, Uchiyama S, Fukui K (2008) The *Arabidopsis* SDG4 contributes to the regulation of pollen tube growth by methylation of histone H3 lysines 4 and 36 in mature pollen. Dev Biol 315: 355-368
99. Kozłowska M, Niedojadło K, Bednarska-Kozakiewicz E (2015) Distribution of methylated histone H3 and 5' methylcytosine in male gametophyte cells of hyacinth. EMBO Young Scientists Forum Warszawa, 2 - 3 lipca 2015
100. Batista RA, Köhler C (2020) Genomic imprinting in plants-revisiting existing models. Genes Dev 34: 24-36
101. Kordyum EL, Mosyakin SL (2020) Endosperm of Angiosperms and Genomic Imprinting. Life (Basel) 10: 104
102. Ono A, Kinoshita T (2021) Epigenetics and plant reproduction: Multiple steps for responsibly handling succession. Curr Opin Plant Biol 61: 102032
103. Bouyer D, Kramdi A, Kassam M, Heese M, Schnittger A, Roudier F, Colot V (2017) DNA methylation dynamics during early plant life. Genome Biol 18:179
104. Xiao W, Custard KD, Brown RC, Lemmon BE, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL (2006) DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. Plant Cell 18: 805-814
105. Hu L, Li N, Xu C, Zhong S, Lin X, Yang J, Zhou T, Yuliang A, Wu Y, Chen YR, Cao X, emach A, Rustgi S, Wettstein D, Liu B (2014). Mutation of a major CG methylase in rice causes genome-wide hypomethylation, dysregulated genome expression, and seedling lethality. Proc Natl Acad Sci USA 111: 10642-10647
106. Kawakatsu T, Nery JR, Castanon R, Ecker JR (2017) Dynamic DNA methylation reconfiguration during seed development and germination. Genome Biol 18: 171
107. Chow HT, Chakraborty T, Mosher RA (2020) RNA-directed DNA Methylation and sexual reproduction: expanding beyond the seed. Curr Opin Plant Biol 54: 11-17
108. Mosher RA, Melnyk CW, Kelly KA, Dunn RM, Studholme DJ, Baulcombe DC (2009) Uniparental expression of PollIV-dependent siRNAs in developing endosperm of *Arabidopsis*. Nature 460: 283-286
109. Papareddy RK, Páldi K, Paulraj S, Kao P, Lutzmayer S, Nodine MD (2020) Chromatin regulates expression of small RNAs to help maintain transposon methylome homeostasis in *Arabidopsis*. Genome Biol, 21: 251
110. Yang H, Berry S, Olsson TSG, Hartley M, Howard M, Dean C (2017) Distinct phases of Polycomb silencing to hold epigenetic memory of cold in *Arabidopsis*. Science 357: 1142-1145
111. Baulcombe DC, Dean C (2014) Epigenetic regulation in plant responses to the environment Cold Spring Harb Perspect Biol 6: a019471
112. Borg M, Jacob Y, Susaki D, LeBlanc C, Buendia D, Axelsson E, Kawashima T, Voigt P, Boavida L, Becker J, Higashiyama T, Martienssen R, Berger F (2020) Targeted reprogramming of H3K27me3 resets epigenetic memory in plant paternal chromatin. Nat Cell Biol 22: 621-629
113. Frost JM, Kim MY, Park GT, Hsieh PH, Nakamura M, Lin SJH, Yoo H, Choi J, Ikeda Y, Kinoshita T, Choi Y, Zilberman D, Fischer RL (2018) FACT complex is required for DNA demethylation at heterochromatin during reproduction in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 115: E4720-E4729
114. Belmonte MF, Kirkbride RC, Stone SL, Pelletier JM, Bui AQ, Yeung EC, Hashimoto M, Fei J, Harada CM, Munoz MD, Le BH, Brady SM, Goldberg RB, Harada JJ (2013) Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the Arabidopsis seed. Proc Natl Acad Sci USA 110: E435-E444
115. Gehring M, Satyaki PR (2017) Endosperm and Imprinting, Inextricably Linked. Plant Physiol 173: 143-154
116. Hornslien KS, Miller JR, Grini PE (2019) Regulation of parent-of-origin allelic expression in the endosperm. Plant Physiol 180: 1498-1519
117. Satyaki PR, Gehring M (2017) DNA methylation and imprinting in plants: machinery and mechanisms. Crit Rev Biochem Mol Biol 52: 163-175
118. Kim MY, Ono A, Scholten S, Kinoshita T, Zilberman D, Okamoto T, Fischer RL (2019) DNA demethylation by ROS1a in rice vegetative cells promotes methylation in sperm. Proc Natl Acad Sci USA 116: 9652-9657
119. Moreno-Romero J, Jiang H, Santos-Gonzalez J, Kohler C (2016) Parental epigenetic asymmetry of PRC2-mediated histone modifications in the *Arabidopsis* endosperm. EMBO J 35: 1298-1311
120. Hsieh PH, He S, Buttress T, Gao H, Couchman M, Fischer RL, Zilberman D, Feng X (2016) *Arabidopsis* male sexual lineage exhibits more robust maintenance of CG methylation than somatic tissues. Proc Natl Acad Sci USA 113: 15132-15137
121. Henning L, Derkacheva M (2009) Diversity of Polycomb group complexes in plants: same rules, different players? Trends Genet 25: 414-423
122. Klosinska M, Picard CL, Gehring M (2016) Conserved imprinting associated with unique epigenetic signatures in the Arabidopsis genus. Nat Plants 2: 16145

# Epigenetic mechanisms of sexual reproduction in angiosperms

Katarzyna Niedojadło✉, Elżbieta Bednarska-Kozakiewicz

Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń

✉corresponding author: karask@umk.pl

**Key words:** DNA methylation, RNA interference, female/male gametophyte, zygote/embryo, endosperm, genomic imprinting

## ABSTRACT

Epigenetic mechanisms, such as DNA methylation, RNA interference, posttranslational histone modifications and rearrangements of chromatin structure play an important role during genome reprogramming in both animals and plants. The correct epigenetic pattern of eu- and heterochromatin marks allows for maintaining chromatin in an active or transcriptionally silenced state. In the life cycle of angiosperms, epigenetic mechanisms participate in genome reprogramming during: 1) differentiation of sporophyte cells into spore mother cells (SMC) that undergo meiosis, 2) development of female and male gametophytes, within which the gametes differentiate and 3) after double fertilization during the embryo and endosperm development. SMC speciation and control of meiosis, followed by reprogramming of the sperm cells and egg cell genome, are non-cell-autonomous and require RdDM pathway (*RNA-directed DNA methylation*). These processes involve companion cells, which produce „mobile” siRNAs (*small interfering RNAs*) signal molecules. Epigenetic control of gene expression through siRNAs also participates in maintenance of gametes and embryo genome integrity and in the parental imprinting.

