

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Experimentální biologie rostlin

Studijní obor: Buněčná a molekulární biologie rostlin



Bc. Kateřina Teznerová

AGO-hook domény v metylaci DNA řízené malými RNA u *Arabidopsis thaliana*
AGO-hook domains in RNA dependent DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Vojtěch Čermák, Ph.D.

Konzultanti: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D., Mgr. Eliška Kobercová

Praha, 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 9. 8. 2023

Bc Kateřina Teznerová

Poděkování

Děkuji svému školiteli Mgr. Vojtěchu Čermákovi, Ph.D. za vedení, všechny rady, ohromnou trpělivost a čas, který mi věnoval. Velký dík rovněž patří konzultantovi RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D. za užitečné rady, připomínky a konzultace v průběhu celého studia. Mé poděkování patří rovněž Mgr. Elišce Kobercové, která mne naučila řadu metod a pomáhala mi s teoretickou přípravou. Děkuji všem členům naší laboratoře za všechnu pomoc a rady. V neposlední řadě děkuji všem mým blízkým, kteří mi byli oporou a vkládali ve mě důvěru.

Děkuji organizaci GA UK, za poskytnutí financí v rámci projektu č. 382521, jež jsem mohla využívat pro vypracování této práce.

Abstrakt

Metylace DNA řízená malými RNA (RdDM) je důležitá dráha, jež prostřednictvím navození metylace DNA reguluje genovou expresi a podílí se na obraně proti invazivním DNA elementům (zejména transposonům). Klíčovou roli v RdDM dráze hrají proteiny Argonaut (AGO) s malými RNA (sRNA), které jsou k cílové DNA sekvenčně komplementární. S proteiny Argonaut jsou schopné interagovat domény zvané AGO-hooky. U rostlin se v RdDM dráze uplatňují dva proteiny s AGO-hook doménami: NRPE1 a SPT5L. Na řešitelském pracovišti bylo nedávno objeveno, že součástí komplexu Pol V (stejně jako zmíněné dva proteiny) je ještě třetí protein SPT6L. Role SPT6L role dosud nebyla popsána, ale předpokládáme, že rovněž hraje roli v RdDM dráze.

Tato práce se zabývá studiem všech tří AGO-hook domén přítomných v Pol V komplexu a jejich rolí v RdDM dráze u rostliny *Arabidopsis thaliana*, od přípravy mutantů postrádajících různé kombinace uvedených AGO-hook domén po studium jejich role a zastupitelnosti při metylaci DNA v různých lokusech.

Klíčová slova

AGO-hook, *Arabidopsis thaliana*, NRPE1, SPT5L, SPT6L, siRNA, epigenetické značení chromatinu, protein Argonaut

Abstract

RNA-directed DNA methylation (RdDM) is an important pathway that regulates gene expression by inducing DNA methylation and is involved in regulation of gene expression and defence against invading DNA elements (especially transposons). Argonaut (AGO) proteins with small RNAs (sRNAs) that have sequence complementarity to the target DNA play a key role in the RdDM pathway. Domains called AGO-hooks are able to interact with Argonaut proteins. In plants, two proteins with AGO-hook domains are involved in the RdDM pathway: NRPE1 and SPT5L. Recently, a third protein, SPT6L, has been discovered at the investigator's site to be part of the Pol V complex (as well as the two proteins mentioned above). The role of SPT6L has not yet been described, but we hypothesize that it also plays a role in the RdDM pathway.

This work focuses on the study of all three AGO-hook domains in Pol V complex and their involve in the RdDM pathway in *Arabidopsis thaliana*, from the preparation of mutants lacking different combinations of these AGO-hook domains to the study of their role and substitution in DNA methylation at different loci.

Key words

AGO-hook, *Arabidopsis thaliana*, NRPE1, SPT5L, SPT6L, siRNA, epigenetic chromatin labelling, Argonaut protein

Seznam zkratek

AGO protein	protein Argonaut
AGO-hook	háček na proteinu Argonaut
bp	pár bází
CMT2/3	chromometyltransferáza 2/3
DCL protein	Dicer-like protein
DDR	komplex DMS3, DRD1 a RDM1
DMR	diferenciálně metylované regiony
DMS3	DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 1
DRD1	DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1
DRM2	DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2
dsRNA	dvouvláknová RNA
GFP	Green Fluorescent Protein
HEN1	HUA enhancer 1
hetsiRNA	s heterochromatinem asociovaná siRNA
hp-siRNA	hairpin siRNA
H _x K _y me _z	z-metylace lysinu y na histonu H x
MET1	metyltransferáza 1
MID	Middle
miRNA	mikro RNA
natsiRNA	natural antisense transcript siRNA
NERD	NEEDED FOR RDR2-INDEPENDENT DNA METHYLATION
NGS	Next Generation Sequencing
NRPE1	Nuclear RNA polymerase E1 (největší podjednotka Pol V)
nt	nukleotid
PAZ	Piwi Argonaut and Zwillie

PCR	polymerázová řetězcová reakce
phasiRNA	phased siRNA
PIWI	P-element Induced Wimpy
Pol	polymeráza
pre-miRNA	prekurzorová miRNA
pri-miRNA	primární miRNA
PTGS	umlčení genové exprese na posttranskripční úrovni
RdDM methylation)	Metylace DNA řízená malými RNA (RNA-dependent DNA
RDR	RNA dependentní RNA polymeráza
RNAi	RNA interference
SHH1	SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1
siRNA	malé interferující RNA
SPT5L	SUPPRESSOR OF TY INSERTION 5 LIKE, KTF1
SPT6L	SUPPRESSOR OF TY INSERTION 6 LIKE, GTB1
sRNA	malá RNA
ssRNA	jednovláknová RNA
SUVH	SU(VAR)3-9 HOMOLOG
tasiRNA	trans-acting RNA
TE	transponovatelné elementy
TGS	umlčení genové exprese na transkripční úrovni
vsiRNA	virová RNA

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Cíle práce	2
2. Přehled literatury	3
2.1. Biogeneze malých RNA	3
2.2. Mechanismy účinku sRNA	6
2.3. Epigenetické modifikace	6
2.3.1. Modifikace histonů	6
2.3.2. Metylace DNA	7
2.3.2.1. Metylace DNA řízená malými RNA (RdDM)	8
2.4. Proteiny Argonaut	11
2.4.1. Skupina AGO 1/5/10	13
2.4.2. Skupina AGO 2/3/7	13
2.4.3. Skupina AGO 4/6/8/9	14
2.5. AGO hooky	15
3. Materiál a metody	17
3.1. Příprava konstruktů	17
3.1.1. Návrh gRNA	17
3.1.2. Výroba konstruktů	19
3.2. Práce s organismy	21
3.2.1. <i>Escherichia coli</i>	21
3.2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
3.2.3. <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
3.3. média	22
3.4. Transformace organismů	23
3.4.1. příprava elektrokompetentních bakterií	23
3.4.2. Transformace a selekce bakterií	24
3.4.3. Izolace plasmidů z <i>E. coli</i>	25
3.4.4. Transformace rostlin pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
3.5. Sterilizace a setí semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
3.6. Genotypování rostlin	27
3.7. PCR	28
3.7.1. Primery	30
3.8. Elektroforéza	30
3.9. Sekvence	31
3.10. Křížení rostlin	32

3.11. Analýzy získaných mutantů	32
3.11.1. Výběr lokusů	32
3.11.2. Bisulfidická konverze a další zpracování vzorků	32
3.11.3. NGS vybraných lokusů.....	35
3.11.4. Analýza vzorků z NGS.....	35
4. Výsledky.....	36
4.1. Příprava konstruktů	36
4.1.1. Návrh gRNA.....	36
4.1.2. Příprava konstruktů	37
4.2. Výsledky mutageneze.....	42
4.2.1. Mutageneze SPT5L	42
4.2.2. Mutageneze NRPE1	47
4.3. Křížení rostlin.....	49
4.4. Analýzy metylace DNA získaných mutantů	50
5. Diskuse	64
6. Závěr	71
7. Reference.....	72
8. Použité programy a internetové stránky	85
9. Příložené soubory	86

1. Úvod

Metylace DNA řízená malými RNA (RdDM) je důležitá regulační dráha. Jejím prostřednictvím dochází k metylaci DNA, jež ovlivňuje stav chromatinu a míru transkripce. Mezi hlavní role RdDM dráhy patří umlčování transpozonů a antivirová obrana, účastní se ale i regulace genové exprese a tím ovlivňuje i přechod z jednoho vývojového stádia do dalšího.

Mezi hlavní aktéry RdDM dráhy patří malé RNA (sRNA), které bývají převážně 24 nukleotidů (nt) dlouhé a na jejichž základě dochází k vyhledání sekvenčně odpovídajících lokusů. Dalším důležitým aktérem je protein Argonaut (AGO), který se sRNA interaguje. AGO proteiny do sebe nakládají jedno vlákno sRNA a na jeho základě vyhledávají odpovídající komplementární sekvence. Samotná metylace DNA je vykonávána prostřednictvím metyltransferázy DRM2. Pro celou dráhu je nezbytná rostlině specifická polymeráza V (Pol V), s jejímž nascentním transkriptem interaguje sRNA naložená v AGO proteinu.

S AGO proteiny interaguje řada proteinů prostřednictvím tzv. AGO-hooků, kterými se tato práce zabývá. Pro RdDM dráhu jsou nejpodstatnější AGO-hooky na těchto třech proteinech: NRPE1 (největší podjednotka Pol V), SPT5L a SPT6L (jehož zapojení do komplexu Pol V bylo objeveno na řešitelském pracovišti na základě reanalýzy dat publikovaných v Chen et al., 2019 provedené školitelem Vojtěchem Čermákem.

Cílem práce bylo studovat roli jednotlivých AGO-hooků zmíněných proteinů a jejich kombinací na RdDM dráhu v rostlině *Arabidopsis thaliana*. Role AGO-hooků SPT5L a NRPE1 již byla částečně popsána, oproti tomu AGO-hook SPT6L není vůbec prozkoumán (Bies-Etheve et al., 2009; El-Shami et al., 2007). Proto si tato práce klade za cíl prostřednictvím analýz vybraných mutantů *A. thaliana* bez AGO-hook domén jednotlivých proteinů doplnit mezery v pochopení této mašinerie a nastínit význam jednotlivých AGO-hooků pro metylaci na vybraných lokusech.

V rámci této práce byly tvořeny mutanti postrádající AGO-hook doménu v proteinech NRPE1 (*nrpe1ΔAh*) a SPT5L (*spt5lΔAh* na WT a *spt6lΔAh* mutantním pozadí) prostřednictvím CRISPR/Cas9 mutagenese s cílem získat následným křížením všechny možné kombinace uvedených mutací. Se získanými mutanty byla provedena analýza metylace pomocí bisulfidické konverze ve vybraných lokusech, která měla za cíl odhalit odlišné profily metylace DNA ve studovaných lokusech, na základě kterých by bylo možné usuzovat na roli jednotlivých AGO-hooků.

Diplomová práce stojí na hypotéze znějící, že v komplexu Pol V se na RdDM dráze podílí tři AGO-hooky (NRPE1, SPT5L, SPT6L) a jejich zastupitelnost a potřebnost pro metylaci DNA se liší mezi jednotlivými lokusy. Předpokládali jsme, že jednotlivé AGO-hooky jsou funkčně

částečně redundantní, a tedy, že ztráta kterékoli domény (či dvou domén zároveň) povede ke specifickému snížení metylace a že k úplné ztrátě RdDM povede až odstranění všech tří AGO-hooků zároveň

1.1. Cíle práce

Cílem práce bylo zjistit, jakým způsobem se AGO-hooky proteinů NRPE1, SPT5L a SPT6L účastní metylace DNA a do jaké míry jsou zastupitelné. Dalším cílem bylo prozkoumat důležitost jednotlivých AGO-hooků v různých lokusech a vliv jejich absence. Tyto výsledky by měly přispět i k pochopení zatím neprobádané role proteinu SPT6L v komplexu Pol V a rozšíření současných znalostí o celkovém fungování RdDM dráhy.

Prvním podcílem bylo vytvořit mutanty bez AGO-hook domény (značení ΔAh) v proteinu NRPE1 a v proteinu SPT5L, mutant bez AGO-hook domény SPT6L byl již dříve vytvořen školitelem. Druhým podcílem bylo zkřížením získat všechny kombinace mutací v AGO-hoocích ve studovaných proteinech (viz tab. 1). Třetím podcílem bylo studovat změnu metylace ve vybraných mutantech v AGO-hooku prostřednictvím bisulfitické konverze.

mutace	pojmenování
jednoduchá	<i>nrpe1ΔAh</i>
	<i>spt5lΔAh</i>
	<i>spt6lΔAh</i>
dvojitá	<i>nrpe1ΔAh spt5lΔAh</i>
	<i>nrpe1ΔAh spt6lΔAh</i>
	<i>spt5lΔAh spt6lΔAh</i>
trojitá	<i>nrpe1ΔAh spt5lΔAh spt6lΔAh</i>

Tab. 1: Všechny kombinace mutací v AGO-hoocích rámci studovaných proteinů RdDM dráhy (NRPE1, SPT5L, SPT6L).

Předpokladem bylo, že všechny AGO-hooky jsou alespoň částečně zastupitelné a potřebné pro metylaci DNA, a tedy že až absence všech tří AGO-hooků vede ke ztrátě RdDM dráhy. Rovněž jsme předpokládali, že tato zastupitelnost a důležitost jednotlivých AGO-hooků se liší mezi jednotlivými lokusy.

2. Přehled literatury

Funkce malých RNA (sRNA) byla poprvé posána v procesu RNA interference (RNAi), jehož prostřednictvím dochází k umlčování genů (Fire et al., 1998). Tento děj je důležitý pro regulaci vlastních rostlinných genů, ale i pro obranu organismu proti transpozibilním elementům a virům. Základ RNAi tvoří proteiny Argonaut, které mají výkonnou funkci, a malé RNA (sRNA), na jejichž základě dochází k cílení molekuly DNA či RNA a následnému umlčování, které je možné díky sekvenční komplementaritě.

2.1. Biogeneze malých RNA

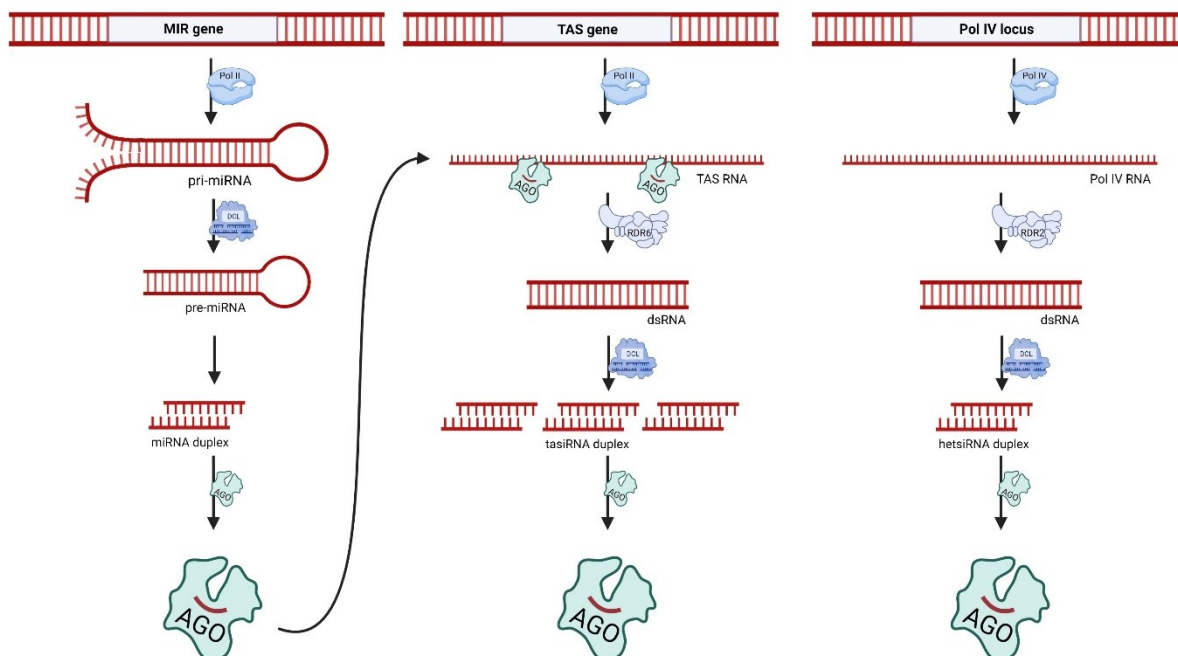
sRNA jsou regulační molekuly, které bývají 21-24 nukleotidů (nt) dlouhé. sRNA rozlišujeme na dva základní typy, a to mikro RNA (miRNA, (Feinbaum et al., 1993) a malé interferující RNA (siRNA, (Zhan, 2021). siRNA můžeme dále rozdělovat na virové (vsiRNA) a endogenní (Borges & Martienssen, 2015). Endogenní siRNA můžeme rozdělovat dle prekursorové RNA na tasiRNA (trans-acting siRNA), phasiRNA (phased siRNA), natsiRNA (natural antisense transcript siRNA), hp-siRNA (hairpin-siRNA) a hetsiRNA (heterochromatin associated siRNA, Ghildiyal & Zamore, 2009). Rovněž můžeme sRNA dělit dle původu na primární a sekundární (Yoshikawa et al., 2005).

V rámci biogeneze sRNA je důležité vytvořit tzv. dvouvláknovou RNA (dsRNA). Ta může vznikat dvěma hlavními principy; i) dvouvláknová RNA vzniká přímo transkripcí (tedy aktivitou DNA dependentní RNA polymerázy), kdy vzniká jedna molekula obsahující vzájemně párující úseky či dvě vzájemně párující molekuly, nebo ii) transkripcí klasicky vzniká jednovláknová RNA (ssRNA), ke které je komplementární vlákno dosyntetizováno pomocí RNA dependentní RNA polymerázy (RDR). Do první kategorie řadíme miRNA, natsiRNA a hp-siRNA, do druhé kategorie pak všechny ostatní typy siRNA.

Z existující dsRNA, bývají posléze sRNA do své aktivní podoby zpracovány pomocí Dicer-like proteinů (DCL). DCL proteiny ovlivňují výslednou délku dané sRNA a tím i její budoucí funkci. DCL1 obvykle produkuje 21nt miRNA/siRNA (Reinhart & Bartel, 2002), DCL4 zpravidla tvoří 21nt siRNA, DCL2 převážně vytváří 22nt a DCL3 produkuje 24nt siRNA (Pontes et al., 2006, významné dráhy biogeneze sRNA viz obr. 1).

sRNA duplexy vzniklé štěpením DCL proteiny, mají 2nt přesahy, které je potřeba chránit před 3'OH uridyací, jelikož toto značení by vedlo k degradaci RNA. Z toho důvodu jsou metylovány prostřednictvím HUA Enhancer 1 (HEN1) na 2'OH skupinách na 3' terminálním konci. Tento ochranný krok platí pro miRNA i siRNA (J. Li et al., 2005; Yang et al., 2006).

Ze sRNA duplexu je následně vedoucí (guide) vlákno naloženo do proteinu Argonaut (AGO) a formuje se RNA indukovaný umlčovací komplex (RISC), druhé passenger vlákno sRNA duplexu se dále nevyužívá. Dle typu naložené sRNA posléze dochází k umlčení genové exprese na transkripční úrovni (TGS) nebo na posttranskripční úrovni (PTGS, (Lee & Carroll, 2018)).



Obr. 1: Významné dráhy biogeneze sRNA; A: tvorba miRNA z transkriptu MIR genů. Prostřednictvím PolII vzniká transkript formující nedokonalou vlásenku pri-miRNA, ze které je pomocí DCL1 nahrubo sestřižena pre-miRNA. Z pre-miRNA je opět pomocí DCL1 sestřižena miRNA duplex o délce 21-22 nt. Vedoucí vlákno miRNA je naloženo do AGO proteinu. B: tvorba tasiRNA z transkriptu TAS genů. TAS gen je přepisován pomocí PolII, transkript je následně vyhledán a naštěpen pomocí AGO s odpovídající miRNA, RDR6 poté k těmto naštěpeným částem RNA syntetizuje komplementární vlákno a vzniká dsRNA. dsRNA je pomocí DCL4 sestřižena na 21 nt tasiRNA duplexy. Vedoucí vlákno tasiRNA je naloženo do AGO proteinu. C: tvorba hetsiRNA. Transkript PolIV je rozpoznán RDR2, která k němu dotváří komplementární vlákno za vzniku dsRNA. Tuto dsRNA následně sestřižuje DCL3 a vzniká hetsiRNA duplex. Vedoucí vlákno hetsiRNA je naloženo do AGO proteinu.

miRNA vznikají zpravidla transkpcí tzv. MIR genů (Vazquez et al., 2008). Nejprve vzniká prostřednictvím Pol II pri-miRNA, ze které je pomocí DCL nahrubo sestřižena pre-miRNA. Z pre-miRNA následně vzniká, opět pomocí DCL, zpravidla 21 nt dlouhá miRNA. Většina miRNA bývá tvořena pomocí DCL1.

Dalším typem sRNA jsou natsiRNA. natsiRNA vznikají na základě transkriptů z NAT (natural antisense transcript) lokusů, kdy dochází ke vzniku sense i přirozených antisense transkriptů. Na základě těchto dvou transkriptů vzniká dsRNA, která se dále zpracovává pomocí DCL3 na 24nt natsiRNA, respektive DCL1/2 na 21nt natsiRNA (Borsani et al., 2005; Chapman & Carrington, 2007; Yuan et al., 2015).

Na podobném principu funguje vznik hp-siRNA. hp-siRNA vznikají transkripcí invertovaných repetit, transkripcí tak vzniká vlásenka, která je dále zpracována podobně jako miRNAs rozdílem, že procesovat ji umí DCL 1/2/3/4 za vzniku hp-siRNA převážně o délce 21 nt nebo v menší míře 24 nt (Fusaro et al., 2006).

U ostatních siRNA nejprve vzniká jednovláknová RNA (ssRNA), ke které je pomocí RNA dependentní RNA polymerázy (RDR) dosyntetizováno druhé vlákno a vzniká tak dvouvláknová RNA (dsRNA). Tuto ssRNA obvykle RDR jednoduše rozpoznávají díky absenci 5' čepičky a 3' polyA konce. Vzniklá dsRNA je následně zpracována pomocí DCL a vzniká tak sRNA duplex o délce 21--24 nt.

Specifickým typem siRNA jsou hetsiRNA. hetsiRNA obvykle pochází z transpozonů či repetitivních elementů a hrají významnou roli v metylaci DNA a s ní spojeným zkompaktněním chromatinu. hetsiRNA vznikají z transkriptů rostlině specifické Pol IV. Tato prekurzorová RNA bývá 26-45 nt dlouhá (Blevins et al., 2015). Následně je formována dsRNA pomocí RDR2, která dotváří komplementární vlákno (Daxinger et al., 2009) a dochází k vyštěpení 24nt hetsiRNA duplexu z dsRNA prostřednictvím DCL3 (Borges & Martienssen, 2015). Jejich role je blíže vysvětlena v kapitole 2.3.2.1.

Doteď popsané druhy siRNA všechny spadají do kategorie primární siRNA. Na základě existující 22nt sRNA může docházet k tvorbě sekundární siRNA. Tato 22nt sRNA je komplementární k oblasti transkriptu, který pomáhá štěpit pomocí AGO proteinu. Tento rozštěpený transkript, který je prekurzorem sekundární siRNA, je rozpoznáván pomocí RDR6, která k němu dotváří komplementární vlákno, tuto dsRNA posléze sestřihává převážně DCL4 za vzniku 21nt sekundární siRNA, pozorované jsou i případy sestřihu pomocí DCL2 na délku 22 nt (H. M. Chen et al., 2010; Deleris et al., 2006; Z. Luo & Chen, 2007). Tyto sekundární sRNA umožňují robustnější odpověď po celé rostlině. Specifickým typem jsou phasiRNA a tasiRNA. phasiRNA vznikají na základě PHAS transkriptů. phasiRNA vznikají „ve fázi“, kdy DCL4 štěpí dsRNA od místa, kde byla původně naštěpena miRNA, vždy v diskrétních 21nt úsecích (Allen et al., 2005; Fei et al., 2013, 2016; Yoshikawa et al., 2005). Podskupinou phasiRNA jsou tasiRNA, které vznikají z nekódujících TAS transkriptů. PHAS i TAS transkripty jsou obvykle štěpeny na základě 22nt miRNA naložené v AGO1 a na výslednou délku 21 nt jsou sestřiženy pomocí DCL4 (Allen et al., 2005; Vazquez et al., 2004; Yoshikawa et al., 2005). Ke štěpení může ovšem docházet i na základě 21nt miRNA duplexu s bublinou v důsledku nepárující báze (Manavella et al., 2012).

2.2. Mechanismy účinku sRNA

Umlčení genové exprese prostřednictvím sRNA může probíhat na úrovni transkripční (umlčení brání transkripci), nebo posttranskripční (probíhající po transkripci cílové sekvence do RNA). Do PTGS řadíme štěpení cílové mRNA a inhibici translace, do TGS patří metylace DNA (která následně blokuje transkripci).

Štěpení cílové mRNA probíhá díky RNázové aktivitě některých AGO proteinů, zejména AGO1 a AGO7 (Baumberger & Baulcombe, 2005; Montgomery et al., 2008), v literatuře jsou však zmíněné i AGO2, AGO4 a AGO10 (Fang & Qi, 2016; Ji et al., 2011; Qi et al., 2006; Zhu et al., 2011). Na základě naložené sRNA AGO proteinem dochází k vyhledání odpovídající sekvence a jejímu rozštěpení AGO proteinem, přičemž z takto rozštěpené sekvence může docházet k tvorbě sekundárních siRNA tak, že k existujícímu vláknu vzniklému ze štěpené cílové sekvence se dotváří komplementární vlákno pomocí RDR (Yoshikawa et al., 2005).

Inhibice translace funguje tak, že se AGO protein dostává do oblasti cílové sekvence opět na základě komplementarity s naloženou sRNA, ale tentokrát se na místě zasekává a kvůli jeho přítomnosti není možné pokračovat v translaci. I přes to, že tento mechanismus je běžný spíše u živočichů, je tento proces u rostlin pozorován také (Fang & Qi, 2016; Neumeier & Meister, 2021).

Druhým způsobem umlčování je metylace DNA řízená sRNA. Metylace DNA je převážně represní značka, která způsobuje modifikaci histonů (viz kapitola 2.3) což vede ke zkompaktnění chromatinu (Du et al., 2015). Metylace DNA je navozována na základě sRNA komplementární k oblasti, která má být zametylována (viz kapitola 2.3.2.1). 2.3.2 Umlčování genové exprese na transkripční úrovni vede k snížení až zastavení transkripce daného lokusu prostřednictvím zhoršení přístupnosti dané sekvence pro jednotlivé aktéry účastníci se tohoto procesu. Toto omezení přístupnosti může být vyvoláno metylací DNA, případně následnou modifikací histonů (Zilberman et al., 2003).

2.3. Epigenetické modifikace

Pomocí epigenetických značek rostlina reguluje expresi svého genomu. Značky mohou mít význam aktivační i represní, záleží na druhu, pozici a kontextu značky. 2.2 Známe jsou hlavní dva typy epigenetických modifikací, a to metylace DNA a modifikace histonů. Oběma typům modifikace se budou věnovat následující podkapitoly. (Waterborg, 2011; Waterborg et al., 2023).

2.3.1. Modifikace histonů

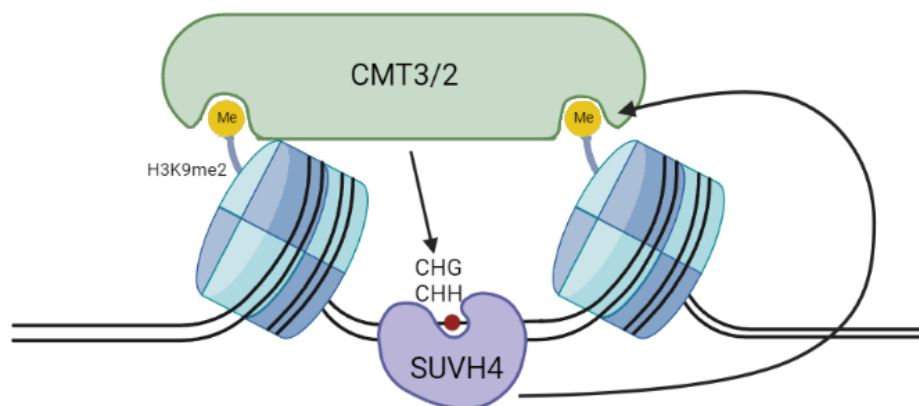
Histony jsou malé bazické proteiny, které interagují s DNA, čímž dochází k formaci nukleozomů. V každém nukleozomu najdeme oktamer histonů (2x (H2A-H2B) a 2x H3-H4) a 147 bp DNA. Nukleozomy tvoří základ chromatinu. Jednotlivé nukleozomy jsou propojeny tzv. linker DNA, se kterou dokáže interagovat histon H1. Některé histony je možné na jejich N koncích

modifikovat a tím ovlivňovat dostupnost DNA a celkové uspořádání (míru rozvolněnosti) chromatinu. Nejlépe popsány jsou metylační značky na histonu H3, přičemž různé varianty mohou způsobovat rozvolnění či zkompaktnění chromatinu. Mezi aktivační značky patří H3K4me1-3 (metylace-trimetylace lysinu K4) a H3K36me1-3 (metylace-trimetylace lysinu K36), které se vyskytují v transkripčně aktivním euchromatinu, represivními značkami jsou H3K9me2 (dimetylace lysinu K9) a H3K27me1 (metylace lysinu K27), které se vyskytují v transkripčně neaktivním heterochromatinu, specifickým typem je pak značka H3K27me3 (trimetylace lysinu K27), která je charakteristická pro „Polycomb chromatin“ (reprimovaný přítomností Polycomb Repressive Complex 2, Liu et al., 2010; Pien & Grossniklaus, 2007; Xiao et al., 2016). Z hlediska provázanosti metylace histonů a metylace DNA je důležitá značka H3K9me2, která je rozpoznávána CMT3/2 a jejím prostřednictvím navozuje odpovídající metylaci DNA (mechanismus popsán blíže v kapitole 2.3.2 (Jackson et al., 2004). Značka H3K9me2 se také podílí na navádění Pol IV, z jejíhož transkriptu posléze vznikají sRNA využívané pro RdDM dráhu (více viz kapitola 2.3.2.1).

2.3.2. Metylace DNA

Metylace DNA je jedním z důležitých mechanismů, jakými se rostlina brání projevům inzercí DNA, ať už endogenního či cizorodého původu, a zajišťuje integritu genomu. Hlavním problémem jsou transponovatelné elementy (TE), které v některých rostlinách tvoří velkou část genomu. Tyto TE rostlina umlčuje metylací cytosinů, přičemž oproti živočichům tuto metylaci pozorujeme ve všech sekvenčních kontextech cytosinu, tedy CG, CHG, CHH (H = A/T/C). Metylací DNA můžeme pozorovat v transkribovaných oblastech genů, ale i v promotorech. Metylací DNA můžeme rozdělit na dva typy – *de novo* metylace a udržovací metylace. Udržovací metylace zajišťuje doplnění metylace po replikaci DNA na nové vlákno dle vlákna templátového. Oproti tomu u *de novo* metylace dochází k navození nové metylace nemetylované DNA (a zprostředkovaně i histonových změn), může být vyvolána externími (např. stresovými) podmínkami, vývojovými změnami či z důvodu inaktivace invazní DNA (DNA viry, transgeny, nové inzercie TE). Metylované oblasti mohou vést ke tvorbě heterochromatinu, čímž dochází k trvalému umlčení oblasti (Finnegan & Matzke, 2003). Udržovací metylace DNA bývá katalyzována pomocí metyltransferáz, které jsou pro jednotlivé kontexty specifické. Metyltransferáza 1 (MET1) zajišťuje metylaci v CG kontextu, Chromometyláza 3 (CMT3) je důležitá hlavně pro metylaci v CHG a Chromometyláza 2 (CMT2) v CHH kontextu. CG je kontext symetrický (je na obou vláknech DNA stejný), a proto je možné udržet metylaci DNA pouze pomocí kopírování metylace z templátového vlákna metyltransferázou MET1, oproti tomu CHH kontext je asymetrický, a proto se u něj a u CHG pro udržení metylace využívá

zpětnovazebná smyčka, která je založena na paralelním udržování epigenetické informace ve formě H3K9me2 (obr. 2, Ebbs et al., 2005; Jackson et al., 2002).

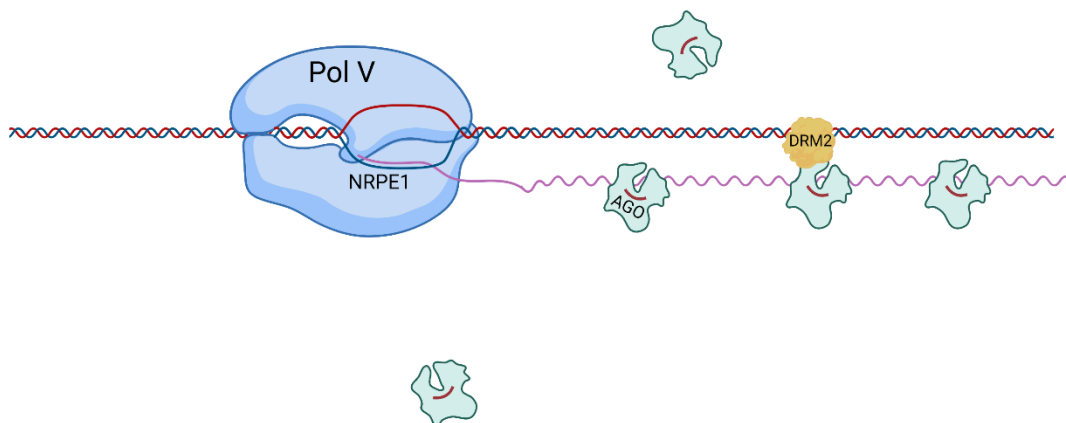


Obr. 2: SUVH4 – CMT3/2 zpětnovazebná smyčka. CMT3/2 rozpoznává metylační značku na histonu H3 (H3K9me2) a navozuje metylaci odpovídající DNA v CHG/CHH kontextu. Methylaci v CHG/CHH kontextu rozpoznává SUVH4, která navozuje metylaci odpovídajícího histonu.

2.3.2.1. Methylace DNA řízená malými RNA (RdDM)

Speciálním typem udržování či navozování methylace DNA je methylace DNA řízená RNA (RNA-directed DNA methylation; RdDM), jde o jedinou dosud popsanou dráhu, která se u rostlin podílí na metylaci *de novo*, zároveň ale hraje roli i v udržovací metylaci. Jedná se o důležitou regulační dráhu, neboť jejím prostřednictvím rostlina reguluje řadu dějů; obranu proti transponům a virům, či se podílí na přechodu z jednoho vývojového stádia do následujícího. Dle způsobu vzniku sRNA rozdělujeme RdDM na kanonickou a nekanonickou (Erdmann & Picard, 2020). RdDM je zajišťována pomocí metyltransferázy DRM2, která se do blízkosti DNA dostává komplikovaným mechanismem.

Esenciálním proteinem RdDM dráhy je protein Argonaut (AGO), který interaguje se všemi dalšími členy této dráhy, a to s sRNA, nascentním transkriptem Pol V a metyltransferázou DRM2 (viz obr. 3, Chan et al., 2005; Matzke & Mosher, 2014). AGO proteiny interagují s sRNA, což vede k naložení vedoucího vlákna sRNA do AGO. Tento komplex následně na základě komplementarity s naloženou sRNA interaguje s RNA, která je transkriptem Pol V. DNA, podle které nascentní transkript Pol V vznikl, je cílem methylace DNA. Protein AGO následně interaguje s metyltransferázou DRM2, která se dopravuje do oblasti zájmu, tedy k cílové DNA. Methyltransferáza DRM2 vykonává metylaci DNA (Chan et al., 2005; Matzke & Mosher, 2014).



Obr. 3: Komplex PolV; NRPE1 – největší podjednotka PolV, AGO – protein Argonaut s naloženým guide vláknem sRNA (červeně) interagující s nascentním transkriptem PolV, případně volně, DRM2 – Metyltransferáza, prostřednictvím AGO navozuje metylaci odpovídající DNA

V rámci RdDM dráhy protein AGO4 interaguje s nascentním transkriptem Pol V. Pol V je rostlině specifická polymeráza, která se skládá z 12 podjednotek, které jsou paralogní k Pol II, nebo s ní identické. 6 podjednotek je od svých paralogů funkčně liší, přičemž tyto změny se vyskytují v oblastech vstupu templátové DNA a exitového místa RNA (Ream et al., 2009). Pol V pravděpodobně vznikla spolu s Pol IV v charofytních řasách z Pol II (Luo & Hall, 2007). Toto evoluční odvození umožnilo specializaci Pol IV a Pol V na RdDM dráhu (Huang et al., 2015; Ream et al., 2009).

Pro Pol V je specifická podjednotka NRPE1 a NRPE5, v komplexu Pol V se dále nachází jeho interakční faktor Suppressor of TY Insertion 5-like (SPT5L, KTF1, Bies-Etheve et al., 2009). Proteiny SPT5L a NRPE1 obsahují doménu zvanou AGO-hook, která napomáhá interakci s AGO proteiny (více viz kapitola 2.5, Azevedo et al., 2011). V rámci školitelské laboratoře byla na základě reanalýzy dat publikovaných Chen et al., 2019 (Čermák et al., in preparation) objevena role dalšího proteinu v komplexu Pol V, proteinu Suppressor of TY Insertion 6-like (SPT6L, GTB1), který rovněž nese doménu AGO-hook. Do tohoto komplexu následně AGO4 přivolává metyltransferázu DRM2, jejímž prostřednictvím dochází k metylaci DNA .

Dalšími komponenty v RdDM jsou proteiny DRD1 (Defective in RNA-directed DNA methylation 1) a DMS3 (Defective in Meristem Silencing 3), které spolu s RDM1 (RNA-directed DNA Methylation 1) formují komplex DDR. Proteiny komplexu DDR jsou důležité pro vazbu Pol V na cílová místa v chromatinu, pro tvorbu transkriptů a tím i pro metylaci DNA (Law & Jacobsen, 2010; Zhong et al., 2012). Komplex DDR rovněž interaguje s SUVH2 a SUVH9, na základě čehož dochází k zajištění přítomnosti Pol V v RdDM lokusech. SUVH2 a SUVH9 se na základě interakce s DDR a MORC komplexy váží do metylované DNA a přivolávají Pol V

(Liu et al., 2014), rovněž se spekuluje, že se podílejí na dimethylaci lysinu (H3K9me2) na základě RdDM metylovaných míst (Parent et al., 2021). V *Arabidopsis thaliana* H3K9me2 navozují proteiny SUVH4/5/6 (viz kapitola 2.3.2). MORC komplexy jsou důležité pro umlčování TE kondenzaci heterochromatinu a udržení nastoleného umlčení v umlčovaných oblastech (Xue et al., 2021).

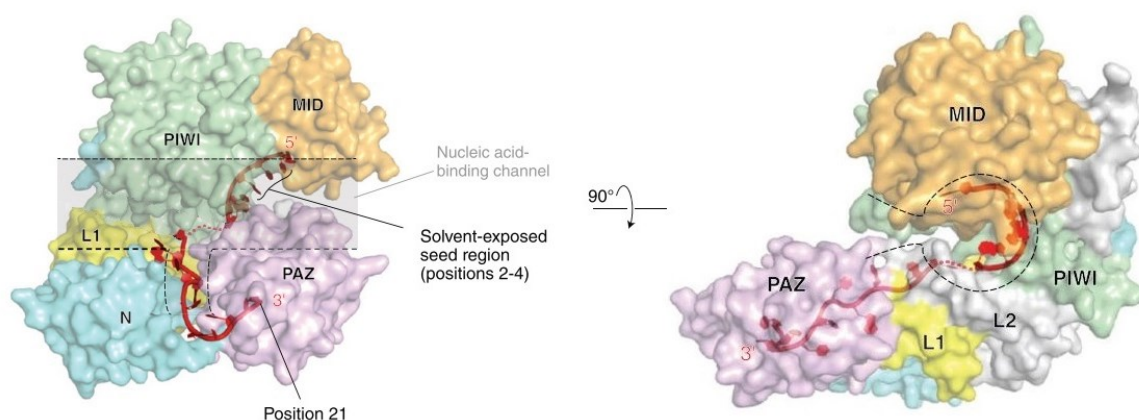
Kanonická RdDM je založená na 24nt hetsiRNA (z transkriptů Pol IV, viz kapitola 2.1), které většinou pochází z transpozónů nebo repetitivních elementů (Lee & Carroll, 2018; Matzke & Mosher, 2014). Tato dráha se podílí na udržování umlčení v dané oblasti, tedy v sekvenci DNA, která již byla zametylována a obsahuje histonové umlčovací značky (Blevins et al., 2015; Borges & Martienssen, 2015; Daxinger et al., 2009). Vedoucí vlákno hetsiRNA interaguje s AGO proteinem a společně cílí na transkript Pol V (popsáno výše). Takto navozená metylace DNA posléze může být rozpoznávána pomocí SUVH4 (popsáno výše), čímž dochází k formaci zpětnovazebné smyčky, která umožňuje udržet oblast v podobě konstitutivního heterochromatinu. Na základě SUVH4 rozpoznání metylace DNA totiž dochází k navození modifikace odpovídajícího histonu značkou H3K9me2, kterou umí rozpoznávat SHH1 (Law et al., 2013). SHH1 na základě rozpoznání metylace histonu navádí Pol IV na značený chromatin. Z transkriptu Pol IV se poté tvoří zmiňovaná prekurzorová RNA, čímž se cyklus uzavírá (tvorba sRNA viz kapitola 2.1).

Nekanonické RdDM dráhy se oproti kanonické liší tím, že v jejím základu stojí sRNA generovaná z různých zdrojů a její možná délka se neomezuje pouze na 24 nt, ale může se jednat i o 21-22nt dlouhou siRNA (Henderson et al., 2006). Oproti kanonické dráze dochází k cílení zejména do aktivního chromatinu, který je přepisován pomocí Pol II, může ovšem docházet i k cílení do již umlčeného chromatinu (Erdmann & Picard, 2020). V nejprozkoumanější nekanonické RdDM dochází k tvorbě sRNA na základě transkriptů Pol II, které jsou syntetizovány z mRNA transkripčně aktivních transpozónů. Následně dochází k formování dsRNA prostřednictvím RDR6, ze které se vyštěpují 21 a 22nt siRNA pomocí DCL2 nebo DCL4 (DCL2 tvoří 22nt sRNA a DCL4 tvoří 21nt sRNA) (Manavella et al., 2012). Vzniklé sRNA asociují s AGO4/6. Odtud je již mechanismus RdDM totožný, dochází k navádění AGO s naloženou sRNA k cílovým sekvencím (Cuerda-Gil & Slotkin, 2016).

2.4. Proteiny Argonaut

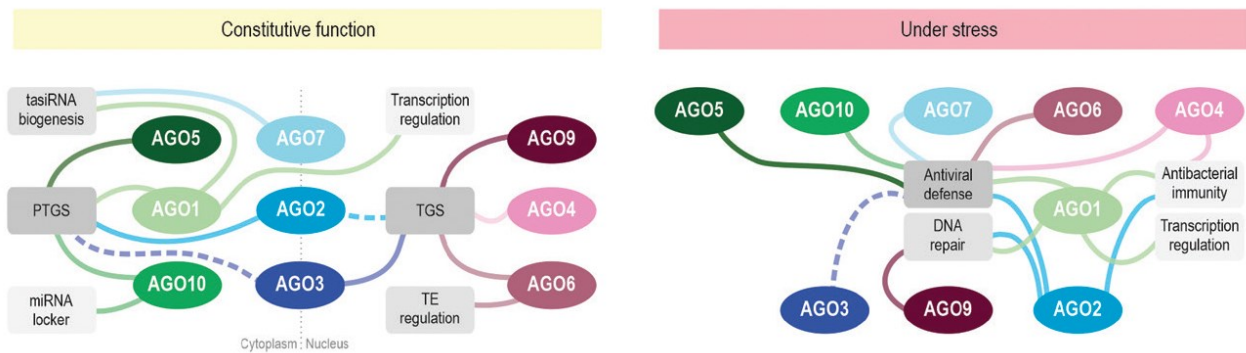
Proteiny Argonaut mají klíčovou roli v drahách sRNA. Jako první byl v roce 1998 popsán AGO1 u rostliny *Arabidopsis thaliana*, jehož mutace způsobuje vzhled listů podobný chapadlům chobotnice (Argonaut), podle nějž dostaly tyto proteiny své jméno (Bohmert et al., 1998). Od té doby byla objevena řada dalších AGO proteinů zastávající různé funkce v rostlinách, potažmo všech eukaryotech (Cerutti & Casas-Mollano, 2006). AGO proteiny interagují s sRNA za vzniku komplexu RISC, prostřednictvím něž dochází k regulaci genové exprese, přičemž dle druhu použité sRNA a AGO proteinu dochází k umlčování na úrovni transkripční (TGS) nebo posttranskripční (PTGS) (Lee & Carroll, 2018). AGO proteiny a jim homologní proteiny se vyskytují u eukaryot, bakterií i archeí (Cerutti & Casas-Mollano, 2006).

AGO proteiny se skládají ze čtyř domén, jedná se o PIWI (P-element Induced Wimpy), MID (middle), PAZ (Piwi Argonaut and Zwille) a N-terminální doménu (viz obr. 4). AGO proteiny rovněž obsahují dva linker regiony L1 a L2, které zajišťují strukturní stabilitu a napomáhají tvořit žlábek, do kterého se váže sRNA (Nakanishi, 2022). PIWI doména má RNázovou aktivitu a štěpí komplementární nukleotidové úseky, což jí umožňuje její struktura, která je podobná RNáze H, konkrétně doména obsahující DEDH/D místa (Fang & Qi, 2016; Liu et al., 2004; Song et al., 2004). MID rozpoznává 5' konec guide vlákna na základě specifického rozpoznání koncového nukleotidu, přičemž preferovaný typ nukleotidu je pro daný AGO specifický (Lingel et al., 2004) a spolu s PIWI tvoří kapsu pro jeho vazbu (Parker et al., 2005). PAZ kotví 3' konec vedoucího vlákna sRNA, který rozpoznává na základě existence 2nt přesahů. N-terminální doména nemá zatím příliš objasněnou funkci, v lidském AGO2 ovšem byla popsána funkce v rozdělování duplexů při sestavování RISC komplexu (Kwak & Tomari, 2012), další teorií je jeho role v protein-protein interakci (Brodersen et al., 2012).



Obr. 4: AGO protein s vyznačenými doménami a s naloženým vláknem sRNA; zeleně PIWI, oranžově MID, růžově PAZ, modře N, žlutě L1, bíle L2 domény. Obrázek převzat z Nakanishi, 2016, upraveno. Jedná se o lidský AGO, domény jsou konzervované

AGO proteiny se během evoluce funkčně diverzifikovaly a specializovaly se na různé biologické procesy s využíváním různých druhů sRNA. U rostliny *Arabidopsis thaliana* je známo celkem 10 AGO proteinů dělících se do tří hlavních skupin, skupina AGO 1/5/10, skupina AGO 2/3/7 a skupina AGO 4/6/8/9 (viz obr. 5). Do těchto tří skupin je dělíme na základě fylogenetické analýzy (Morel et al., 2002; Vaucheret, 2008). Řazení do skupin funkčně i nomenklaturou odpovídá i u dalších studovaných rostlin, jako například u *Physcomitrella patens* (Arif et al., 2013), *Citrus sinensis* (Sabbione et al., 2019), *Solanum lycopersicum* (Bai et al., 2012), kukuřice (Qian et al., 2011) a rýže (Kapoor et al., 2008). Navíc byl pozorován výskyt nových paralogů (dva u AGO4 v *Solanum tuberosum*, jeden u AGO10 v *Solanum lycopersicum*, Li et al., 2022; Liao et al., 2020), redukce počtu zástupců jednotlivých skupin, nebo i výskyt liniově specifických AGO18 u kukuřice a rýže (Kapoor et al., 2008; Li et al., 2022). Rovněž byla objevena čtvrtá skupina AGO-like, která vznikla u suchozemských rostlin, ale byla ztracena u krytosemenných rostlin (You et al., 2017).



Obr. 5: Rozdělení AGO proteinů na základě skupin a funkce. Skupina AGO1/5/10 (zeleně): AGO1 způsobuje regulaci transkripce, posttranskripční umlčování a biogenezi tasiRNA, hraje roli v antivirové a antibakteriální obraně a v opravách DNA. Skupina AGO 2/3/7 (modře): AGO2 hraje roli v posttranskripční regulaci genové exprese, v omezené míře je ovšem schopné i regulace na úrovni transkripční. Hraje roli v antivirové a antibakteriální obraně a v opravách DNA. Skupina 4/6/8/9 (růžově): AGO4, AGO6 i AGO9 hrají roli v transkripční regulaci genové exprese, AGO6 navíc v regulaci TE. AGO4 a 6 se podílejí na antivirové obraně, AGO4 na antibakteriální obraně, AGO9 na opravách DNA. AGO8 nezobrazeno

2.4.1. Skupina AGO 1/5/10

Nejprozkoumanějším proteinem z této skupiny je AGO1. Jedná se o hlavní efektorový protein pro miRNA a tasiRNA, který na jejich základě reguluje genovou expresi v řadě vývojových a fyziologických procesů. Je to hlavní protein vykonávající PTGS, pomocí nějž umlčuje viry, transpozony a transgeny (Wang et al., 2011). Preferenčně váže miRNA s 5' U (Mi et al., 2008)

AGO 10 hraje roli v udržování nediferencovaných kmenových buněk v apikálním meristému prýtu (SAM) a v ustanovení listové polarity. AGO10 preferenčně váže stejné sRNA jako AGO1, tedy rovněž miRNA s 5' U, na rozdíl od něj je ale sekvstruje (vychytává) a tím zabraňuje jejich navázání do AGO1, což vede zabránění umlčení těchto sRNA (Lynn et al., 1999; Zhu et al., 2011). Tímto mechanismem AGO10 brání umlčování způsobeném miRNA165/166 a podporuje tak vývoj a udržování axilárního meristému.

Posledním proteinem skupiny je AGO5, který se účastní PTGS, jako AGO1, ale jeho role je hlavně v antivirové obraně (Takeda et al., 2008) a v regulaci v reprodukčních fázích vývoje rostliny (Roussin-Léveillé et al., 2020; Tucker et al., 2012). Preferenčně váže sRNA s 5' C (Mi et al., 2008).

2.4.2. Skupina AGO 2/3/7

Hlavním proteinem skupiny AGO2/3/7 je AGO2, který vykonává PTGS, jehož prostřednictvím navozuje obranu proti různým patogenům (viry, bakterie, houby, (Harvey et al., 2011; Jaubert et al., 2011; Zhu et al., 2011). Dále napomáhá opravám dvouvláknových spojů a účastní se tak reakce na stres ozářením (Wei et al., 2012). Váže 21 nt dlouhou siRNA s 5' A (Mi et al., 2008).

AGO7 se podílí na tvorbě tasiRNA, jejímž prostřednictvím provádí PTGS, pomocí které ovlivňuje načasování růstu a vývoje laterálních orgánů (Hunter et al., 2003, 2006). Převážně interaguje s miRNA s 5' A a se specifickým 3nt centrálním regionem s konzervovaným G-A mismatchem v pozici 11 (Endo et al., 2013).

Posledním proteinem skupiny je AGO3. Přestože AGO3 vznikl duplikací AGO2 a sdílí s ním 70% sekvenční identitu, vykonává AGO3 hlavně aktivitu podobnou AGO4 – ačkoliv umí interagovat s 21nt siRNA a vykonávat tak PTGS, častěji ovšem interaguje s 24nt siRNA s 5' A a účastní se TGS (Jullien et al., 2020; Zhang et al., 2016). Tato aktivita mu je přisuzována z důvodu původu nakládáných sRNA v lokusech s metylačními hotspoty a také protože AGO3 pod AGO4 promotorem částečně zachraňuje úroveň metylace v *ago4* mutantech (Zhang et al., 2016). AGO3 má aktivitu ve specifických částech rostliny, jako je zakončení cévních svazků, tyčinek, meristémů květenství, nebo v oblasti semenného obalu (Belmonte et al., 2013; Jullien et al., 2020),

dále vykonává antivirovou obranu (Minoia et al., 2014) a jeho exprese roste i při stresu, např. zasolením (Alazem et al., 2019).

2.4.3. Skupina AGO 4/6/8/9

AGO proteiny této skupiny jsou nejvýznamnější svou účastí v RdDM dráze, hrají roli ale také ve vývoji gametofytu a v obraně proti virům, bakteriím i houbám. Nejvýznamnějším proteinem skupiny je AGO4, který je exprimován v rámci rostlin plošně, AGO6 a AGO9 mají roli ve specifických oblastech rostliny, AGO8 je pravděpodobně pseudogen. Všechny AGO proteiny této skupiny preferenčně váží 24nt hetsiRNA s 5' A (Havecker et al., 2010; Mi et al., 2008).

AGO4 hraje zásadní roli v umlčování transpozonů (Havecker et al., 2010), v buněčném cyklu pylových buněk, ve vývoji květních orgánů (Oliver et al., 2016; Zilberman et al., 2004), antivirové, antibakteriální a antifungální rezistenci (Agorio & Vera, 2007; Diezma-Navas et al., 2019; Raja et al., 2008; Rebolledo-Prudencio et al., 2022) a regulaci transkripce dlouhých nekódujících RNA (Tang et al., 2019). V rámci Cajalových tělísek provádí antivirovou obranu, která spočívá v metylaci DNA genomu DNA virů (Agorio & Vera, 2007). AGO4 umí interagovat s Pol II i s Pol V, od čehož je odvislá jeho funkce, přičemž s Pol II se vyskytuje v nukleoplazmě a s Pol V v perinukleárních oblastech (Duan et al., 2015).

AGO4 a AGO6 jsou pravděpodobně funkčně vzájemně závislé. AGO6 ovšem funguje hlavně v apikálních meristémech kořenů a prýtu a interaguje pouze s Pol V v nukleoplazmě (Duan et al., 2015). AGO6 také váže preferenčně jiné siRNA (produkované z jiných lokusů) než AGO4, byla pozorována i vazba siRNA generovaných z aktivních TE, čímž docházelo k nastolení *de novo* metylaci (McCue et al., 2015; Nuthikattu et al., 2013). AGO6 má dále roli v dormanci semen v zimě, kdy při vývoji semen navozuje metylaci v CHH kontextu, která není odbouratelná při nízkých teplotách (Iwasaki et al., 2019).

AGO9 figuruje v apikálním meristému prýtu a ve vaječných buňkách, kde pravděpodobně kontroluje formaci samičích gamet. Jeho prostřednictvím dochází ke kontrole, že gametogeneze bude iniciována pouze z jedné gametické buňky a určuje tak osud buněk ve vajíčku. Projevem mutace AGO9 nebo RDR6 je diferenciací více gametických buněk zároveň (Olmedo-Monfil et al., 2010).

AGO8 má vysokou míru sekvenční shody s AGO9, oproti ostatním proteinům skupiny má ale odlišnou strukturu, hlavní rozdíly jsou patrné v MID a PIWI doménách. Dlouho nebyla známa jeho funkce, a proto se předpokládalo, že se jedná o pseudogen. Přestože nebylo potvrzeno, že by AGO8 interagoval se sRNA, účastní se, stejně jako ostatní proteiny z této skupiny, na kontrole časného formování megaspor (Hernández-Lagana et al., 2016; Olmedo-Monfil et al., 2010).

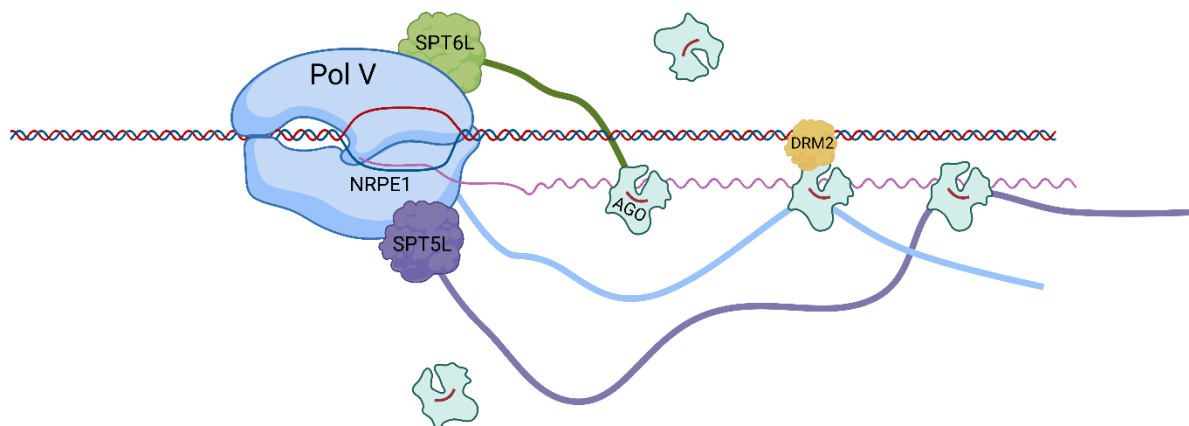
2.5. AGO hooky

AGO hooky jsou domény, které umožňují interakci s AGO proteiny. Jedná se o doménu bez sekundární struktury bohatou na glycin-tryptofanové (GW/WG) motivy, dále je doména bohatá na přítomnost serinů, naopak chudá je na přítomnost kyseliny glutamové a asparagové, cysteinů, fenylalaninů, histidinů, methioninů a tyrosinů (El-Shami et al., 2007). Najdeme je v řadě organismů, od prvoků, kvasinek, přes bezobratlé až po člověka (Karlowski et al., 2010), nebyla však nikdy potvrzena žádná konzervovaná struktura, předpokládá se tedy, že se jedná o doménu s přirozenou neuspořádaností (Trujillo et al., 2016). Konzervované jsou pouze WG/GW motivy, AGO hooky se mezi sebou liší délkou, sekvencí i počtem motivů. Průměrná délka AGO-hooku činí 84 amk a nebyl potvrzen výskyt AGO-hooku kratšího než 20 amk (Karlowski et al., 2010).

V rostlině najdeme AGO hooky na řadě míst, najdeme je například v NRPE1 (největší podjednotka Pol V), SPT5L (transkripční elongační faktor Suppressor of Ty Insertion 5 like), SPT6L (transkripční elongační faktor Suppressor of Ty Insertion 6 like), SDE3 (Silencing Defective 3) a NERD (Needed for RDR2-Independent DNA Methylation, (El-Shami et al., 2007; Garcia et al., 2012; Gu et al., 2012a; He et al., 2009; Pontier et al., 2012), v jiných organismech pak stojí za vyzdvižení lidský GW182/TNRC6A (a jeho homology TNRC6B a TNRC6C), GAWKY v *Drosophila melanogaster*, či Tas3 z kvasinek (Eystathioy et al., 2002; Schneider et al., 2006; Till et al., 2007). Předpokládáme, že pro RdDM dráhu jsou důležité AGO-hooky pouze na proteinech NRPE1, SPT5L a SPT6L (viz kapitola 2.3.2.1. obr. 6).

AGO-hook proteinu SPT5L (AT5G04290) se vyskytuje na jeho C' konci a obsahuje nejdelší AGO-hook, obsahuje 44 WG/GW motivů (Bies-Etheve et al., 2009). Protein NRPE1 (AT2G40030) má AGO-hook taky na C' konci, je ovšem následován ještě DECL doménou, AGO-hook NRPE1 obsahuje 26 WG/GW motivů. Nejkratší AGO-hook z těchto tří proteinů má protein SPT6L (AT1G65440), který má 16 WG/GW motivů.

Pomocí AGO-hooku se dostává protein AGO do blízkosti nascentního transkriptu Pol V (Azevedo et al., 2011). RdDM dráhy se účastní celkem tři AGO hooky nacházející se na největší podjednotce polymerázy V NRPE1, na SPT5L (Bies-Etheve et al., 2009) a na SPT6L (Čermák et al., in preparation). Pro AGO hooky NRPE1 a SPT5L bylo prokázáno, že umožňují přesné cílení lokusů pomocí naloženého vlákna sRNA (Lahmy et al., 2016a), role SPT6L stále není jasně známa. Proteinu SPT6L byla dříve připisována pouze role v komplexu polymerázy II, jakožto elongačního transkripčního faktoru, ovšem my se na základě dat z chromatinových imunoprecipitací (Chen et al., 2019) domníváme, že je i součástí komplexu Pol V, přičemž přítomnost AGO hook domény u SPT6L proteinu je rostlině specifická (Čermák et al., in preparation).



Obr. 6: Komplex PolV s interakčními faktory; NRPE1 – největší podjednotka PolV, obsahuje doménu AGO-hook interagující s AGO, AGO – protein Argonaut s naloženým guide vláknem sRNA (červeně) interagující s nascentním transkriptem PolV, případně volně, DRM2 – Metyltransferáza, prostřednictvím AGO navozuje metylaci odpovídající DNA, SPT5L – transkripční elongační faktor PolV, obsahuje doménu AGO-hook interagující s AGO, SPT6L - transkripční elongační faktor PolV, obsahuje doménu AGO-hook interagující s AGO.

3. Materiál a metody

3.1. Příprava konstruktů

Návrh konstruktů byl realizován pomocí programu Geneious Prime (Geneious Prime 2019.2.3 - Geneious Prime 2023.1.1, Dotmatics).

3.1.1. Návrh gRNA

Celý návrh gRNA byl realizován pomocí programu Geneious Prime. Nejprve jsem v genomové sekvenci *Arabidopsis thaliana* vyhledala geny, na které jsem plánovala cílit. V rámci těchto genů jsem lokalizovala AGO-hook doménu na základě výskytu GW/WG motivů, na které je doména bohatá. V těchto oblastech jsem navrhovala gRNA následujícím způsobem; pomocí příkazu „Find CRISPR Sites ...“ jsem vyhledala v daných genech možné gRNA. Dvojice gRNA jsem hledala podle tzv. „activity score“ a „specificity score“, které udávají jak intenzivně a jak specificky bude gRNA cílit. Ve vybraných gRNA jsem se poté snažila hledat dvojice gRNA s odpovídající směrovostí (tj. tak, aby obě gRNA směřovaly od PAM sekvence do místa delece). PAM sekvence je sekvence dlouhá 3 nt za 3' koncem gRNA, kterou rozpoznává Cas9 protein, díky čemuž může docházet k mutagenезi prostřednictvím CRISPR/Cas9 (Sternberg et al., 2014). Vhodné dvojice gRNA jsem otestovala pomocí OligoAnalyzer™ Tool (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>), kde jsem zkontrolovala kompatibilní teploty tání (T_M) a riziko tvorby vlásenek a duplexů v rámci jejich klonování pomocí PCR. Takto vybrané gRNA jsem následně dále zpracovávala. Z důvodu výroby konstruktů pomocí pCBC-DT1T2 plasmidu musely být primery navrženy tak, aby obsahovaly cílovou sekvenci gRNA, restrikční místo pro *BsaI* a přesahy pro amplifikaci z konstruktů, rovněž sekvence gRNA musela začínat G a bylo z ní třeba odstranit PAM sekvenci (Xing et al., 2014). Takto upravená sekvence gRNA byla zakomponována do zbytku CRISPR kazety, přičemž pro každou gRNA musely být navrženy dva primery z důvodu postupného skládání CRISPR kazety. Výsledná podoba primerů je znázorněna na obr. 7, použité sekvence jsou uvedeny v tab. 2.

DT1-BsF-SPT5L_gR539
 ATATATGGTCTCGATTGCCAGGTTGATCACTAGCCG GTT

DT1-F0-SPT5L_gR539
 TGCCAGGTTGATCACTAGCCG GTTTTAGAGCTAGAAATAGC

DT2-R0-SPT5L_g506
 AACCTTGGTGAAGGCGCTACTGC AATCTCTTAGTCGACTCTAC

DT2-BsR-SPT5L_gR506
 ATTATTGGTCTCGAAACCTTGGTGAAGGCGCTACTGCAA

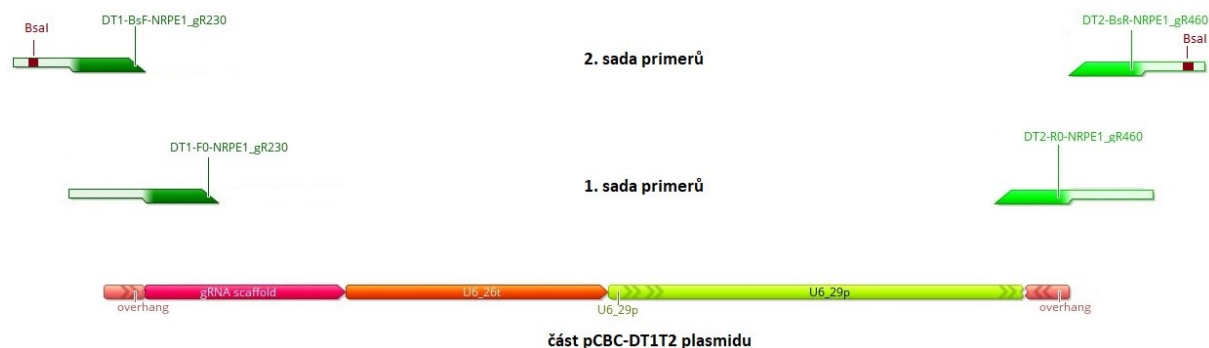
Obr. 7: Ukázka návrhu primerů pro tvorbu CRISPR kazety. DT1-F0 a DT2-R0 obsahují vloženou gRNA (žlutě a fialově) s přesahem sekvenčně odpovídajícím místům v plasmidu pCBC-DT1T2. DT1-BsF a DT2-BsR jsou navrženy tak, aby nasedaly na začleněné primery DT1-F0 a DT2-R0, obsahují opět odpovídající gRNA, poté je zde restriční místo pro štěpení pomocí BsaI (červeným textem GGTCTC).

dvojice	název	sekvence	Délka [nt]
1	DT1-BsF-NRPE1-gR384	ATATATGGTCTCGATTGATTCACTATCAACAGTCGTGTT	39
	DT1-F0-NRPE1-gR384	TGATTCACTATCAACAGTCGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	41
	DT2-R0-NRPE1-gR130	AACCCACTAGATGGAAATTTCTCAATCTCTTAGTCGACTCTAC	43
	DT2-BsR-NRPE1-gR130	ATTATTGGTCTCGAAACCCACTAGATGGAAATTTCTCAA	39
2	DT1-BsF-NRPE1-gR230	ATATATGGTCTCGATTGGGGGAAAACGCGTGGATGTGTT	39
	DT1-F0-NRPE1-gR230	TGGGGGAAAACGCGTGGATGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	41
	DT2-R0-NRPE1-gR460	AACTTCCAGTCTGCACCACCACCAATCTCTTAGTCGACTCTAC	43
	DT2-BsR-NRPE1-gR460	ATTATTGGTCTCGAAACTTCCAGTCTGCACCACCACCAA	39
3	DT1-BsF-SPT5L_gR211	ATATATGGTCTCGATTGGATGATAATACTTCAGCATGTT	39
	DT1-F0-SPT5L_gR211	TGGATGATAATACTTCAGCATGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	41
	DT2-R0-SPT5L_gR512	AACTCCGGTTTTTTTGTCCACCGCAATCTCTTAGTCGACTCTAC	43
	DT2-BsR-SPT5L_gR512	ATTATTGGTCTCGAAACTCCGGTTTTTTTGTCCACCGCAA	39
4	DT1-BsF-SPT5L_gR539	ATATATGGTCTCGATTGCCAGGTTGATCACTAGCCGGTT	39
	DT1-F0-SPT5L_gR539	TGCCAGGTTGATCACTAGCCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	41
	DT2-R0-SPT5L_gR506	AACCTTGGTGAAGGCGCTACTGCAATCTCTTAGTCGACTCTAC	43
	DT2-BsR-SPT5L_gR506	ATTATTGGTCTCGAAACCTTGGTGAAGGCGCTACTGCAA	39

Tab.2: sekvence používaných primerů pro složení CRISPR kazety, červeně vyznačeno místo štěpení prostřednictvím enzymu BsaI

3.1.2. Výroba konstruktů

Navržené primery byly použity v PCR pro složení CRISPR kazety (viz obr. 8), která se následně vkládala do binárního vektoru (pHEE401E_pUBQ:eGFP). PCR směs byla smíchána dle „PCR mixu na výrobu konstruktů“ (viz kapitola 3.7).



Obr 8: postup skládání CRISPR kazety: Do zobrazené oblasti pCBC-DT1T2 plasmidu nejprve nasedá první sada primerů na základě komplementarity. Na první sadu primerů nasedá druhá sada primerů, která již není nijak komplementární k pCBC-DT1T2. Druhá sada primerů obsahuje místo pro enzymatické štěpení pomocí enzymu BsaI, proto bylo možné provádět štěpení i vkládání CRISPR kazety v rámci jedné reakce.

Následně byla spuštěna PCR reakce o 30 cyklech dle „PCR programu pro Q5 polymerázu“ (viz kapitola 3.7) s teplotou annealingu 60 °C a časem extenze 1 min.

PCR produkt byl posléze puštěn na elektroforézu, po jejím doběhnutí byl z gelu vyříznut a vyizolován pomocí kitu Monarch DNA Gel Extraction Kit #T1020S, postupováno bylo dle příloženého protokolu. Takto získaná CRISPR kazeta byla následně vnesena do plasmidu pHEE401E_pUBQ:eGFP (Wang et al., 2015) metodou Golden Gate. Nejprve byla připravena směs (viz tab. 3), poté byl spuštěn GoldenGate program (viz tab. 4).

složka	množství [μl]
Purifikovaný PCR fragment (~ 70ng/μl)	3
pHEE-GFP templátový vektor (~ 100ng/μl)	2
10x buffer B (ThermoFischer)	1,5
10 mM ATP	1,5
BsaI Enzym (NEB/ThermoFischer)	1
T4 DNA Ligáza (HC, NEB)	1
ddH ₂ O	5
celkem	15

Tab. 3: GoldenGate mix.

Teplota [°C]	Čas
37	5 h
50	5 min
80	10 min

Tab. 4: GoldenGate program.

Při reakci GoldenGate dochází k vyštěpení původní sekvence z pHEE401E_pUBQ:eGFP plasmidu a vložení sestaveného PCR fragmentu. Vložení je možné díky přítomnosti štěpícího místa pomocí enzymu *BsaI*; *BsaI* vyštěpí původní sekvenci, místo které se vloží PCR fragment. PCR fragment již není možné vyměnit zpět za původní sekvenci, protože je již vyštěpeno místo pro *BsaI* enzym. Při vkládání CRISPR kazety s gRNA dochází k vyštěpení spektinomycinové rezistence, díky čemuž je možné jednoduše rozpoznat transformované kolonie.

3.2. Práce s organismy

3.2.1. *Escherichia coli*

Bylo pracováno s *E. coli* kmen JM109. Elektrokompetentní buňky *E. coli* byly uchovávány v $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bakterie byly kultivovány na LB médiu s přidavkem odpovídajících antibiotik (viz kapitola 3.3) při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, zpravidla po dobu 20-28 h. Kultivace probíhala v Petriho miskách o průměru 9 cm s 20-30 ml pevného média. Po ukončení kultivace byly narostlé bakteriální kolonie na Petriho miskách skladovány v lednici. S bakteriemi bylo pracováno sterilně ve flowboxu. Druhým způsobem byla kultivace v tekutém médiu ve zkumavkách či Erlenmeyerových buňkách za stálého třepání, rovněž při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 20-28 h.

3.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Bylo pracováno s *Agrobacterium tumefaciens* kmen GV3101. Elektrokompetentní buňky *A. tumefaciens* byly uchovávány v mrazáku v $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bakterie byly kultivovány na LB médiu s přidavkem odpovídajících antibiotik (viz kapitola 3.3) při $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, po dobu 3 dní. Kultivace probíhala v Petriho miskách o průměru 9 cm s 20-30 ml pevného média. Po ukončení kultivace byly narostlé bakteriální kolonie na Petriho miskách skladovány v lednici. S bakteriemi bylo pracováno sterilně ve flowboxu.

3.2.3. *Arabidopsis thaliana*

Byly používány rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp Col-0 WT, *spt6 Δ Ah* – CRISPR/Cas9 mutant zkrácený o AGO-hook doménu (906 bp; Čermák et al. nepublikováno) a *nrpe1-11* (SALK_022919). V rámci diplomové práce byly získávány rostliny *nrpe1 Δ Ah*, *spt5l Δ Ah spt6 Δ Ah* (v rámci textu linie značena pro zjednodušení pouze *spt5l Δ Ah*) a jejich potomstvo (více viz kapitola 4.3). V rámci výběru lokusů pro analýzu metylace DNA v získaných mutantech byly používány data z rostlin *nrpe1*, *spt5l* a *nrpe1d1251-1651* (publikováno v Chen et al., 2019; Stroud et al., 2013; Wendte et al., 2017).

Rostliny byly pěstovány v rašelinových peletách (Jiffy) v kultivační místnosti při dlouhodobém (16 h světlo, 8 h tma) nebo krátkodobém (8 h světlo, 16 h tma) ozáření při denní teplotě $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ a noční teplotě $19\text{ }^{\circ}\text{C}$, přičemž ozářenost byla přibližně $100\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-2}$. Semena rostlin byla sklízena s využitím ARA systému (Betatech).

3.3. média

LB médium	
složka	množství
pepton (trypton)	10.0 g
kvasničný extrakt	5.0 g
NaCl	10.0 g
agar	17.5 g
celkem	1000 ml

Tab. 5: složení LB média.

YEB médium		
složka	množství	koncentrace [%]
pepton (trypton)	10,0 g	1.0
kvasničný extrakt	1,0 g	0.1
sacharóza	5,0 g	0.5
0,5% MgSO ₄	100,0 ml	0.05
celkem	900 ml	

Tab 6: složení YEB média, roztok MgSO₄ se klávuje odděleně z důvodu rizika vysrážení.

SOC médium		
složka	množství	Koncentrace složek
pepton	1 g	2%
kvasničný extrakt	0.25 g	0,50%
glukóza (anhydrát)	0.18 g	20mM
NaCl	0.03 g	10mM
KCl	0.009 g	2,5mM
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.1 g	10mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.12 g	10mM
celkem	50 ml	

Tab.7: složení SOC média; Hotový roztok se sterilizuje přes 0,22μm filtr Nalgene. Rozpipetovaný po 1 ml do zkumavek se skladuje v lednici.

½ MS médium	
složka	množství
dH ₂ O	1,000 ml
MS soli Sigma	2,2 g
sacharóza	10,0 g
agar	8,0 μl

Tab. 8: složení ½ MS média na pěstování *A. thaliana* in vitro, pH roztoku 5,8 (upravováno KOH), měří se před přidáním agaru.

YEB recovery		
složka	množství (na 100 ml roztoku)	koncentrace složek v médiu
YEB (bez MgSO ₄ , včetně sacharózy)	90 ml	
1M NaCl	1 ml	100 mM
3M KCl	83 µl	25 mM
MgCl ₂ (bezvodý)	95 mg	100 mM
MgSO ₄ (x 7 H ₂ O)	246 mg	100 mM
sacharóza	181 mg	53 mM
dH ₂ O	do 100 ml	

Tab. 9: Složení YEB recovery směsi. Všechny soli byly smíchány tak, aby jejich objem činil 10 ml (doředěno dH₂O), poté byl roztok smíchán s YEB médiem.

Do LB média na pěstování *E. coli* se přidává kanamycin, na pěstování *A. tumefaciens* rifampicin a gentamycin. Do tekutého YEB média pro pěstování *A. tumefaciens* s plazmidem patří antibiotika kanamycin, gentamycin a rifampicin. Používaná množství antibiotik viz tab. 10 používaná antibiotika a jejich koncentrace.

složka	množství (na 100 ml média)	koncentrace složek v zásobním roztoku	koncentrace složek v médiu
kanamycin	100 µl	50 mg/ml	50 mg/l
gentamycin	100 µl	50 mg/ml	50mg/l
rifampicin	250 µl	10 mg/ml	10 mg/l
spekctinomycin	100 µl	50 mg/ml	50 mg/l

Tab. 10: používaná antibiotika a jejich koncentrace.

3.4. Transformace organismů

3.4.1. příprava elektrokompetentních bakterií

Na předem připravené pevné LB médium s kanamycinem byla rozčárkována ze zásobní konzervy *E. coli* a kultivována 1 den při 37 °C, nebo *A. tumefaciens* a kultivováno 3 dny při 28 °C. Po ukončení kultivace byly 2 vybrané kolonie zaočkovány do 50 ml tekutého LB média (*E. coli*) nebo 10 ml YEB média (*A. tumefaciens*) s odpovídajícími antibiotiky a byly kultivovány na třepačce 16-20 h při 37 °C (*E. coli*) nebo 28 °C (*A. tumefaciens*) za třepání 160 otáček / min. Po ukončení kultivace byly zaočkovány 4 ml bakteriální suspenze do 200 ml LB / YEB média s příslušnými antibiotiky (množství a koncentrace viz tab. 10) a byly kultivovány za stálého třepání při 37 °C / 28 °C do dosažení optické hustoty 0,4 / 0,6 při vlnové délce 600 nm, poté byla suspenze zchlazena na ledové lázni (chlazeno alespoň 15 min). Složení používaných médií je specifikováno viz kapitola 3.3.

Zchlazená suspenze byla rozlita do 8 50ml předchlazených centrifugačních zkumavek (do každé zkumavky 25 ml suspenze), zkumavky byly centrifugovány při 4 °C a 4000 RPM (2500

G) po dobu 10 min (v následujících krocích vždy centrifugováno dle tohoto postupu). Supernatant byl slit a sediment byl resuspendován.

V případě *E. coli* se resuspendovalo nejprve v 6 ml dH₂O, pak se všechny vzorky slily a doplnily na 20 ml, druhá resuspendace byla v 25 ml 10% glycerolu, třetí resuspendace byla v 1 ml sterilního vychlazeného 10% glycerolu. Velmi pečlivě byl odstraněn supernatant a bakterie se resuspendovaly v 800 µl GYT média. Ve 100x zředěném vzorku *E. coli* byla změřena optická denzita (cílem bylo 2×10^{10} - 3×10^{10} buněk/ml, což odpovídá ~ 1 OD₆₀₀).

V případě *A. tumefaciens* se nejprve resuspendovalo v 25 ml vychlazené sterilní dH₂O, druhá resuspendace byla v 10 ml vychlazené sterilní dH₂O, 2 vzorky se slily a doplnily na 25 ml, třetí resuspendace byla v 2 ml sterilního 10% glycerolu, všechny vzorky byly slity. Supernatant byl opatrně odsát sterilní špičkou připojenou na vývěvu, sediment se resuspendoval v 1 ml sterilního 10% glycerolu.

Vzorky byly následně rozpipetovány po 40 µl (*E. coli*), nebo 100 µl (*A. tumefaciens*) do 1,5ml sterilních mikrozkušavek. Zkušavka byla uzavřena a okamžitě ponořena do tekutého dusíku a umístěna ke skladování při -80 °C.

3.4.2. Transformace a selekce bakterií

Plasmid pHEE-GFP se zanesenou CRISPR kazetou s gRNA byl vnášen do bakterie *E. coli* pomocí elektroporace. Elektroporace byla prováděna pomocí elektroporátoru Eppendorf Eporator (Eppendorf SE). Kompetentní buňky byly vždy rozmrazeny na ledu, poté bylo přidáno 0,5 µl plasmidové DNA, společná směs se 1 min inkubovala v ledové lázni. Následně byla směs přepipetována do vychlazené kyvety Gene Pulser® Cuvette s 0,2 cm mezerou (Bio Rad) a vložena do elektroporátoru.

Po elektroporaci bylo ihned připipetováno médium a vznikuvší směs byla přepipetována do nové zkušavky ke kultivaci. Pro elektroporaci do *E. coli* bylo používáno nastavení 2,5 kV, bylo přidáváno SOC médium a kultivace probíhala za 37 °C 1 h za stálého míchání. Pro elektroporaci *A. tumefaciens* bylo používáno nastavení 2 kV, byla přidávána YEB recovery směs, kultivace probíhala při 28 °C po dobu 3 h za stálého míchání. Složení médií blíže popsáno v kapitole 3.3

Po elektroporaci byla kultura vyseta na plotny s antibiotiky, přičemž byly sety dvě varianty; 1. 50 µl původní koncentrace, zbytek kultury byl zcentrifugován, přebytečný roztok byl slit, kultura byla resuspendována a tvořila 2. variantu. Kultury *E. coli* byly kultivovány na plotnách při 37 °C do druhého dne, poté byly přesunuty do lednice.

Z narostlých ploten byly vybírány kolonie, které byly přeneseny na selekci na médium se spectinomycinem a médium bez spectinomycinu. Kultury, které nepřežily na spectinomycinovém médiu, vyštěpily gen rezistence a do jejího původního místa se vložila

CRISPR kazeta s gRNA. Pro kontrolu vložení CRISPR kazety byla provedena PCR reakce o složení “Základní PCR mix” s využitím primerů M13F a U6-29p-R a byla spuštěna dle „Základního PCR programu“ s teplotou annealingu 58 °C a dobou extenze 50 s, viz kapitola 3.7. Vyselektované plasmidy byly izolovány dle postupu viz kapitola 3.4.3.

Vyizolované plasmidy z *E. coli* byly elektroporovány do kompetentních buněk *Agrobacterium tumefaciens* (viz kapitola 3.4.2). Po ukončení kultivace se pracovalo se dvěma vybranými liniemi plasmidu. Následně byla kultura vyseta na plotny s rifampicinem a gentamycinem, přičemž byly sety dvě varianty; 1. 50 µl původní koncentrace, zbytek kultury byl zcentrifugován, přebytečný roztok byl slit, kultura byla resuspendována a tvořila 2. variantu. Takto vyšeté kultury byly ponechány ke kultivaci při 28 °C po tři dny. Po tří denní kultivaci bylo 6 vybraných linií od každého vzorku přesazeno na nové plotny se stejným médiem.

3.4.3. Izolace plasmidů z *E. coli*

Vybrané bakteriální kolonie byly zaneseny do 3 ml tekutého média s odpovídajícím antibiotikem pomocí sterilního párátka. Médium s přidanými bakteriemi při 37 °C do druhého dne za stálého míchání na třepačce.

Bakteriální kultura se po ukončení kultivace zpracovávala. Nejprve byla kultura centrifugována a byl odstraněn veškerý supernatant. Následně byly plasmidy izolovány pomocí High-Speed Mini Kitu dle přiloženého protokolu, bylo postupováno beze změn. Vyizolované plasmidy byly skladovány v -20 °C. Účinnost izolace byla kontrolována na NanoDrop™ 2000 spektrofotometru (Thermo Fischer Scientific) a štěpením plasmidů pHEE401E_pUBQ:eGFP pomocí enzymů NheI a HindIII. Následně byly připraveny vzorky pro sekvenaci, byly použity primery U6-29p-F a U6-29p-R (viz kapitola 3.7.1). Sekvence byla provedena na servisním pracovišti v Biocevu v Laboratoři sekvenace DNA.

3.4.4. Transformace rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Rostliny *Arabidopsis thaliana* byly napěstovány do stádia s květy (uzavřenými až mírně otevřenými). Nejprve proběhla příprava tekutého LB média s narostlým *A. tumefaciens* s příslušným plazmidem. Vybraná bakteriální kolonie byla ve flowboxu sterilním párátkem nanášena do Erlenmeyerovy baňky, poté bylo přidáno 30-40 ml připraveného média (složení viz kapitola 3.3). Erlenmeyerovy baňky s médiem a plazmidem byly umístěny ke kultivaci na třepačku Biometra WT 17 při 28 °C do druhého dne za intenzivního míchání (200-300 otáček/min).

Druhý den byly narostlým médiem transformovány rostliny. Nejprve byly z rostlin ostrihávány veškeré šesule a květy. Suspenze *A. tumefaciens* byla ve flowboxu slita do 50ml zkumavek (falkon), falkony byly stáčeny na centrifuze Hettich centrifuge universal 32 R při 5000

RPM 20 min při 4 °C. Následně byl slit supernatant, sediment byl resuspendován v 5 ml 5% roztoku sacharózy. Suspenze z jednotlivých falkon byly spojeny a doplněny do celkového objemu 50 ml roztokem 5% sacharózy a bylo přidáno 25 µl Silwet Star (AgroBio Opava s.r.o.). Takto připravený roztok byl přelit do velké Petriho misky, kde do něj byla namáčena celá květenství rostlin určených k transformaci tak, aby byla všechna poupata a vzrostné vrcholy ponořené alespoň 5 s. Poté byly rostliny překryty igelitem a umístěny ke kultivaci ve tmě do druhého dne, poté byly umístěny zpět do kultivační místnosti. Celé pracovní místo bylo uklizeno savem.

3.5. Sterilizace a setí semen *Arabidopsis thaliana*

Semínka byla před sterilizací sklizena do mikrozkušavek. Otevřené mikrozkušavky se semínky byly položeny bokem do exikátoru, doprostřed exikátoru byla umístěna kádinka s 50 ml SAVA, do kterého bylo následně opatrně vliato 1,5 ml koncentrované HCl, načež byl exikátor okamžitě uzavřen víkem. Sterilizace probíhala po dobu alespoň 4 h. Po uběhnutí 4 h byl exikátor otevřen, byla opatrně odstraněna kádinka a zkumavky se semínky byly uzavřeny.

Semínka transformovaných rostlin byla vyseta *in vitro* na selekci na sterilní pevné ½ MS médium s hygromycinem (viz kapitola 3.3). Nejprve byla semínka sterilizována. Po sterilizaci byly zkumavky se semínky přemístěny do flowboxu. Každá zkumavka byla rovnoměrně vysypána na vlastní předpřipravenou plotnu. Hotové plotny byly přikryty víkem, zataženy prodyšnou páskou a umístěny do lednice na dvoudenní stratifikaci semen, poté byly přemístěny do kultivační místnosti. Zhruba po dvou týdnech byly plotny přineseny z kultivační místnosti a vybrané rostliny byly přesazeny do rašelinových peletek. Vybírány byly rostliny, kterým vyrostly pravé lístky a kořeny. Vyseté rostliny byly ze začátku pěstovány pod plastovým poklopem pro zvýšení vlhkosti, aby se lépe aklimatizovaly na přesun z *in vitro* podmínek a byly umístěny do kultivační místnosti.

3.6. Genotypování rostlin

DNA byla izolována následujícím způsobem. Do 2ml zkumavek se zámek byly ustríhány listy genotypovaných rostlin (vždy jeden z každé rostliny). Do zkumavek byly poté přidány v digestoři vždy 2 ocelové kuličky, 400 μ l extrakčního pufru (složení viz tab. 11) a 400 μ l chloroformu. Zkumavky byly homogenizovány v homogenizátoru Retsch MM301 při 28/s po dobu 3 min. Zhomogenizované vzorky byly centrifugovány na centrifuze Heraeus Biofuge 13 při 13000 RPM po dobu 5 min. Byly připraveny nové 1,5ml zkumavky, do kterých bylo napipetováno 330 μ l izopropanolu a 330 μ l horní fáze z předchozích centrifugovaných zkumavek, tyto zkumavky byly promíchány a opět centrifugovány při 13000 RPM 5 min. Poté byla odpipetována veškerá tekutina a zkumavky byly ponechány vyschnout. K sedimentu bylo následně vždy přidáno 100 μ l 2mM TRIS pH 8,5. Zkumavky byly uloženy do mrazáku do -20 °C.

Vzorky byly následně analyzovány pomocí PCR, kdy PCR mix byl připraven dle “Základní PCR mix“ s využitím vhodné sady primerů a PCR běžela dle programu “Základní PCR program” (viz kapitola 3.7). PCR produkty byly zhodnoceny pomocí elektroforézy (viz kapitola 3.8).

DNA extrakční pufr			
Složky	Finální koncentrace [M]	koncentrace zásobního roztoku [M]	množství
Tris HCl pH7,5	0,2	1,8	5,56 ml
NaCl	0,25	5	2,5 ml
EDTA pH8	0,025	0,5	2,5 ml
SDS	0,5		0,25 g
dH ₂ O			doplnit do 50 ml

Tab. 11: složení DNA extrakčního pufru

3.7. PCR

PCR je metoda, pomocí níž je možné amplifikovat vybrané úseky DNA pomocí DNA dependentní DNA polymerázy. PCR se skládá z cyklů, které mají vždy stejné kroky, které se liší teplotou a dobou trvání. PCR vždy začíná počáteční denaturací a končí finální extenzí. V jednotlivých cyklech se střídají fáze denaturace, annealingu a extenze. Při denaturaci dochází k rozpojení dvouvláknové DNA na dvě jednovláknová. Během annealingu na jednovláknovou DNA nasedají primery, které jsou komplementární k části cílové DNA. Během extenze dochází k syntéze komplementárního vlákna ke každé jednovláknové DNA. PCR se zpravidla pouští na 25-30 cyklů, může ovšem běžet i 35-40 cyklů pro maximální výtěžnost.

Tato kapitola obsahuje seznam používaných PCR mixů a PCR programů. Použité konkrétní primery, teploty nasedání primerů a doba extenze jsou upřesněny v odpovídajících kapitolách. Všechny používané primery měly koncentraci 10 μM (pokud není uvedeno jinak).

Složka	Množství [μl]
Dream Taq Pol MM (Thermo Fisher Scientific)	5
Forward primer	0,2
Reverse primer	0,2
DNA vzorek / vzorek plasmidu	0,5 / ND
Voda	doplnit do 10
Celkem	10

Tab. 12: Základní PCR mix. Všechny složky lze spolu smíchat jako premix. V případě vzorku na detekci plasmidu se bakterie nanáší pomocí párátko tak, že se malé množství vzorku nabere a nanese do mikroskopu před připipetováním připraveného PCR mixu.

složka	Koncentrace složky	množství [μl]
Q5 Reaction Buffer (New England BioLabs)	5x	10
Q5 High GC Enhancer (New England BioLabs)	5x, NEB	10
dNTP	10mM	1
Q5 Polymeráza (New England BioLabs)	HF, 2U/μl	0,5
pCBC-DT1T2 Templát	cca 100 ng/μl	1
DT1-BsF	20μM	1
DT1-F0	1μM	1
DT2-R0	1μM	1
DT2-BsR	20μM	1
ddH ₂ O		23,5
celkem		50

Tab. 13: PCR mix na výrobu konstruktů, Q5 Polymeráza byla přidávána jako poslední.

fáze	teplota [°C]	čas	
Počáteční denaturace	98	30 s	
Denaturace	98	10 s	
Annealing	XX	30 s	
Extenze	72	XX	29 x opakovat
Finalní extenze	72	10 min	
	4	forever	

Tab. 14: PCR program pro Q5 polymerázu. Teplota při annealingu a doba extenze závisí na použitých primerech a délce produktu.

fáze	teplota [°C]	čas	
Počáteční denaturace	95	3 min	
Denaturace	95	10 s	
Annealing	58	30 s	
Extenze	72	XX	25 x opakovat
Finalní extenze	72	5 min	
	12	forever	

Tab. 15: Základní PCR program, doba extenze se lišila dle studovaného materiálu; pro vzorky s NRPE1 i SPT5L kazetou extenze trvala 3 min, zkrácená varianta 30 s, pro plasmidy 50 s.

3.7.1. Primery

Primery byly navrhovány s využitím programu Geneious Prime a pomocí OligoAnalyzer™ Tool na webových stránkách <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>. Primery na genotypování byly navrhovány tak, aby byly v místě nezasaženém delecí na základě gRNA, ale aby zároveň od místa delece nebyly příliš daleko. Dalšími kritérii bylo, aby dvojice primerů měly podobnou teplotu tání (T_M) a netvořily spolu duplexy nebo vlásenky. Seznam použitých primerů je znázorněn v tab. 16.

název	sekvence	délka [nt]	T_M [°C]
NRPE1_crispr_R	CAGAAATTGGGTCTCCATCAG	21	56,3
NRPE1-11_LP	TTTTCTCCAAGITGTGATCG	21	56,5
SPT5L_crispr_F	TTCAACTGTGCCGTGAGAAG	20	58,4
SPT5L_crispr_R	GGTGAAGATAGTAAACTGAGATAATG	27	56,1
NRPE1_8009_R	GCTCTTGCTCCTCAGAGGTG	20	57,6
SPT5L_6833_R	AACAAACCGAACCATGAGGG	20	55,5
U6-29p_F	TTAATCCAAACTACTGCAGCCTGAC	25	51,7
U6-29p_R	AGCCCTCTTCTTTCGATCCATCAAC	25	58,8
pUBQ-Fwd	TACCCGACGAGTCAGTAATAAAC	23	53,9
e-GFP_rev	TGGCTGTTGTAGTTGTACTC	20	52

Tab. 16: seznam používaných primerů v PCR reakcích.

3.8. Elektroforéza

Elektroforéza slouží k dělení DNA na základě délky. Vzorky DNA se nanášejí do předpřipraveného agarózového gelu do jamek, který je umístěn ve vaně s 0,5X TAE pufrům (složení zásobního roztoku viz tab. 17, pro použití se 100x ředí). Gel s nanesenými vzorky je následně vystaven směrovému elektrickému proudu, na jehož základě jednotlivé složky putují gelem různou rychlostí dle své délky. Do jedné z jamek se vždy nanášejí žebříček, který má definovaně dlouhé složky, dle kterých lze vyčíslit délku pozorovaných vzorků. Po doběhnutí elektroforézy se gel nafotí pod UV zářením.

složka	množství
TRIS	242 g
ledová kys. Octová	57,1 ml
0,5M EDTA pH 8,0	100 ml

Tab. 17: složení 50X zásobního roztoku TAE

Pomocí elektroforézy byly analyzovány PCR vzorky. Byly používány 1,2% gely s přimíchaným GelRED™ Biotum (složení viz tab. 18), žebříčky Thermo Sciences GeneRuler

100 bp Plus nebo GeneRuler 1 kbp, PCR vzorky byly smíchány před nanesením do gelu s nanášecím pufrem DNA Gel Loading Dye (6X, v poměru 1 díl nanášecího pufru ku 5 dílům PCR vzorku, Thermo Fischer Scientific). Elektroforéza byla vždy pouštěna při 80 V.

složka	množství
agaróza	1,2 g
0,5X TAE	100 ml
GelRED	10 μ l

Tab. 18: složení gelu na elektroforézu

Gely byly analyzovány pomocí G:BOX s UV transiluminátorem, digitální výstup z tohoto zařízení byl zpracován programem GeneSnap (verze 7.09), oboje od firmy SynGene. Fotografie byly ukládány ve formátu TIF, po úpravě (oříznutí nadbytečných částí gelu atp.) a vložení popisek byly uloženy ve formátu JPEG. Množství DNA na gelu (a tím i koncentrace DNA ve vzorku) byly stanovovány porovnáním intenzity jasu daného vzorku na gelu se standardem pomocí programu GeneTools 4.01 od firmy SynGene.

3.9. Sekvence

Sekvence vzorků byla realizována servisním pracovištěm v Biocevu v Laboratoři sekvenace DNA. Sekvenované plasmidy byly připraveny dle tab. 19, ostatní sekvenované vzorky byly vždy připraveny pomocí PCR (připravena dle “základního mixu PCR”, pouštěna dle „základního PCR programu“ ve zkrácené variantě, viz kapitola 3.7). Při použití zkrácené varianty PCR vzniká pouze produkt z mutantní alely (i když je rostlina heterozygotní), který je tak použitelný k sekvenování. Z těchto PCR produktů byla připravena sekvenační směs o tomto složení (tab. 20).

Složka	množství [μ l]
Primer	0,5
Plasmid	3
Voda	Doplnit do 8
Celkem	8

Tab. 19: směs na sekvenaci vzorku plasmidu.

Složka	množství [μ l]
Primer	0,5
DNA	7,5
Voda	Doplnit do 8
Celkem	8

Tab. 20: směs na sekvenaci vzorku DNA.

3.10. Křížení rostlin

Byly napěstovány rostliny *Arabidopsis thaliana* do stádia s uzavřenými až lehce otevřenými květy. Na jedné rostlině bylo vybráno poupě, které bylo pomocí ostré pinzety natrženo a pinzetou následně otevřeno. Z květu byly následně odstraněny všechny kališní a korunní lístky a tyčinky, až zbyl pouze pestík. Květ byl označen barevnou lepící páskou na stonku. Na druhé rostlině byl vybrán lehce otevřený květ. Pinzetou byl uchycen tak, že se pootevřel a následně byl z rostliny utržen. Druhou pinzetou mu byly otrhány všechny kališní a korunní lístky a pestík, zbyly pouze tyčinky. Těmito tyčinkami byl opylován pestík druhé rostliny. Takto opracované rostliny byly umístěny zpět do kultivační místnosti.

3.11. Analýzy získaných mutantů

3.11.1. Výběr lokusů

Na základě existujících dat o metylaci v rostlinách (data byla získána z databáze GEO: GSE108673, GSE39901, GSE93360), byly pomocí programu deepTools a příkazu „ComputeMatrix“ (Ramírez et al., 2016) na platformě Galaxy Europe (<https://usegalaxy.eu/>) vytipovány lokusy se změnami metylace. Výběr byl následně zúžen s využitím programu IGV (verze 2.16.0, Robinson et al., 2011). Na základě této analýzy bylo zjišťováno, jestli je v daném lokusu metylace zvýšená či snižená vůči WT. Byly posuzovány lokusy, které jsou cílené RdDM dráhou (nrpel hypoCHH DMR -differentially methylated regions, Zhang et al., 2018). Změna míry metylace byla zjišťována tak, že data z ComputeMatrix byla nahrána do excelu, kde se pro jednotlivé lokusy spočítala průměrná metylace (vstupní data byla zaokrouhlena na 3 desetinná místa). Následně byly mezi jednotlivými studovanými genotypy míry metylace porovnány (stanovovaly se úrovně snižená, zvýšená, nezměněná).

3.11.2. Bisulfidická konverze a další zpracování vzorků

Vzorky používané na bisulfidickou konverzi byly vyizolovány pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), bylo postupováno dle přiloženého protokolu beze změn. DNA byla izolována ze směsných vzorků napěstovaných třítýdenních rostlin. Vyizolovaná DNA byla podrobena bisulfidické konverzi prostřednictvím kitu EpiMark® Kit (New England BioLabs), bylo postupováno podle přiloženého protokolu beze změn, bylo získáno 20 µl každého bisulfidicky konvertovaného vzorku (BS vzorku).

BS vzorky byly tzv „barkódovány“ prostřednictvím dvoukolové PCR (postupováno dle protokolu popsáno v Herbold et al., 2015). První kolo PCR probíhalo s primery cílícími do vybraných lokusů (viz tab. 21 a 22). V druhém kole PCR byly všechny PCR produkty z různých lokusů od jednoho vzorku barkódovány tzv „head primery“, což jsou primery obsahující

8nt jedinečné sekvence (barkód) určené ke snadnému roztřídění vzorků po jejich smísení (postup pro PCR viz tab. 23 a 24, seznam popsaných head sekvencí viz Herbold et al., 2015).

Mezi prvním a druhým kolem PCR byly vzorky přečištěny (viz tab. 25 a 26) a zkontrolovány pomocí elektroforézy (postup viz kapitola 3.8). V případě přítomnosti pouze požadovaného produktu byly vzorky použity rovnou do druhé PCR. V případě, že vzorky obsahovaly více různě dlouhých produktů, byl správně dlouhý produkt z gelu vyříznut a vyizolován pomocí kitu Monarch DNA Gel Extraction Kit #T1020S, takto vyizolovaný vzorek byl poté použit do druhé PCR.

Vzorky z druhé PCR byly opět zkontrolovány pomocí elektroforézy. Z vyfocené gelu byla odečtena koncentrace jednotlivých vzorků (viz kapitola 3.8) a byl připraven směsný roztok všech vzorků z druhé PCR, který byl odeslán na externí NGS analýzu do BIOCEVU. Směsný vzorek byl smíchán tak, aby zde bylo od každého PCR produktu 5 ng.

složka	množství [μl]
Syber Green Hot Start Pol MM (Generi Biotech)	10
forward primer	0,4
reverse primer	0,4
DNA	1
Voda	8,2
Celkem	20

Tab. 21: první kolo PCR – PCR mix. Všechny složky (krom DNA) lze spolu smíchat jako premix.

fáze	Teplota [°C]	Čas	
Počáteční denaturace	95	3 min	
Denaturace	95	30 s	
Annealing	51	30 s	
Extenze	68	1 min	35x opakovat
Finální extenze	72	5 min	
	12	Forever	

Tab. 22: první kolo PCR – PCR program.

složka	množství [μl]
Dream Taq Pol MM (Thermo Fisher Scientific)	10
head primer	0,8
PCR vzorek	1
dH ₂ O	8,2

Tab. 23: druhé kolo PCR – PCR mix. Všechny složky (krom DNA) lze spolu smíchat jako premix.

fáze	Teplota [°C]	Čas	
Počáteční denaturace	95	3 min	
Denaturace	95	30 s	
Annealing	52	1 min	
Extenze	72	1 min	9x opakovat
Finální extenze	72	7 min	
	12	Forever	

Tab. 24: druhé kolo PCR – PCR program.

složka	množství [μl]
PCR vzorek	5
Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP) (Thermo Fisher Scientific)	0,66
Exonuclease I (Thermo Fisher Scientific)	0,12
dH ₂ O	4,22

Tab. 25: směs na přečištění vzorků.

fáze	Teplota [°C]	Čas [min]
1.	37	30
2.	80	10

Tab. 26: program na přečištění vzorků.

3.11.3. NGS vybraných lokusů

BS vzorky byly zpracovány servisním pracovištěm v BIOCEVu metodou NGS (Next Generation Sequencing) následujícím způsobem. Směsný vzorek byl přečištěn pomocí NEBNext Sample Purification Beads v poměru 1,2x objemu vzorku. DNA se eluovala do 27 μ l 0,1% TE. Jako input pro přípravu knihovny pomocí kitu NEBNext Ultra II DNA Library Prep bylo použito 25 μ l eluovaného vzorku, celkem 30 ng DNA a pro amplifikaci byly v protokolu použity 4 cykly. Výsledná knihovna měla koncentraci 5,5 nM. Na přístroj Illumina MiSeq se nanášela 10pM knihovna jako 1% spike v MiSeq Reagent Kit v2, 2x250bp.

3.11.4. Analýza vzorků z NGS

Výstupem NGS sekvenace (viz kapitola 3.11.3) byla data v souhrnném souboru ve formátu fastq. S daty bylo pracováno v Galaxy Europe (<https://usegalaxy.eu/>, The Galaxy Community, 2022). Po nahrání dat byla prostřednictvím programu „FastQC“ (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) zkontrolována kvalita výstupů. Následně byla data prostřednictvím programu „Je-Demultiplex“ (Girardot et al., 2016) rozříděna do samostatných souborů, rozřazení probíhalo na základě přiložených sekvencí barkódů. Výchozí nastavení programu bylo upraveno takto: bylo použito párové čtení, pozice barkódů „both“, použití barkódů pro párování vzorků „both“, redundantní barkódy „yes“ (striktně „no“), délka barkódů „8“, odstranit z readů sekvence barkódů „yes“, přidat odpovídající barkód na konec čtené sekvence „no“, maximum mismatchů „1“, počet odstraněných bazí za barkódem „16“ (odpovídá zbývající délce primeru). Výsledné soubory byly zkontrolovány programy „FastQC“ a „MultiQC“ (Ewels et al., 2016).

Soubory byly následně zpracovány pomocí programu „bwameth“ (Pedersen et al., 2014), jehož prostřednictvím byla data v souboru napamována na referenční sekvence vybraných lokusů (příkládá se ve fasta formátu). Získaná data byla zkontrolována programem „Samtools flagstat“ (<https://samtools.github.io/hts-specs/>, Li et al., 2009). Poté byl využit program „MethylDackel“ (<https://github.com/dpryan79/MethylDackel>), jehož prostřednictvím byla zpracována data získaná pomocí „bwameth“. MethylDackel byl oproti výchozímu nastavení upraven takto: jako referenční sekvence byl nahrán používaný referenční soubor ve formátu fasta, jako rozříděný BAM soubor byl vždy použit jeden ze souborů z bwameth, využití regionů z BED souborů „enabled“ (přiložený souhrnný BED soubor obsahoval anotaci pro část lokusu, která byla aplikována s výjimkou sekvence primerů a s informací, které z vláken DNA bylo amplifikováno), použít sloupec s vláknem „yes“, použít nastavení „Extract methylation metrics from an alignment file“, možnosti výstupu „CpG methylation fractions (--fraction), ponechat duplikované alignmenty „yes“, ponechat singletony „yes“, možnosti kontextu metylační metriky „select all“ (výstupem budou celkem tři soubory, pro CG, CHG a CHH kontext). Ze získaných souborů byla provedena statistická pozorování.

4. Výsledky

AGO-hooky jsou domény schopné interagovat s AGO proteiny a hrají významnou roli hned u několika proteinů v RdDM dráze. Experimentální práce byla navržena tak, aby došlo k ověření, případně vyvrácení, role AGO hooků u proteinů NRPE1, SPT5L a SPT6L v rámci komplexu Pol V v RdDM dráze. Pracovala jsem proto na návržení a realizaci delece AGO hooku v SPT5L a NRPE1. Spolu s již dříve vytvořeným *spt6LΔAh* jsem vytvářela rostliny s různými kombinacemi těchto tří proteinů s/bez-AGO-hooku. Následně jsem získané mutanty podrobila analýze metylace DNA ve vybraných lokusech.

4.1. Příprava konstruktů

4.1.1. Návrh gRNA

Pro každý AGO-hook byly navrhovány dvě sady gRNA pro zvýšení šance na úspěšnou mutagenезi (odlišené značením: A a B). gRNA byly vybírány tak, aby po deleci na místě nezůstaly žádné WG/GW motivy, maximálně jeden. Po výběru vhodných gRNA (viz kapitola 3.1.1) byly hledány vždy dvě dvojice gRNA a v případě NRPE1, kde není AGO-hook doména C-terminálně umístěná, byly vybrány dvojice tvořící deleci zachovávající čtecí rámeček. Na základě těchto požadavků byla pro SPT5L kazetu vybrána dvojice A gR211 a gR512, dvojice B byla gR539 a gR506. Pro NRPE1 kazetu byla dvojice A gR384 a gR130, dvojici B tvořily gR230 a gR460 (sekvence viz tab. 27). Vzdálenost mezi gRNA v NRPE1 kazetě byla v obou případech 1560 bp, v případě SPT5L kazety byla vzdálenost u dvojice A 2318 bp a u dvojice B 2225 bp.

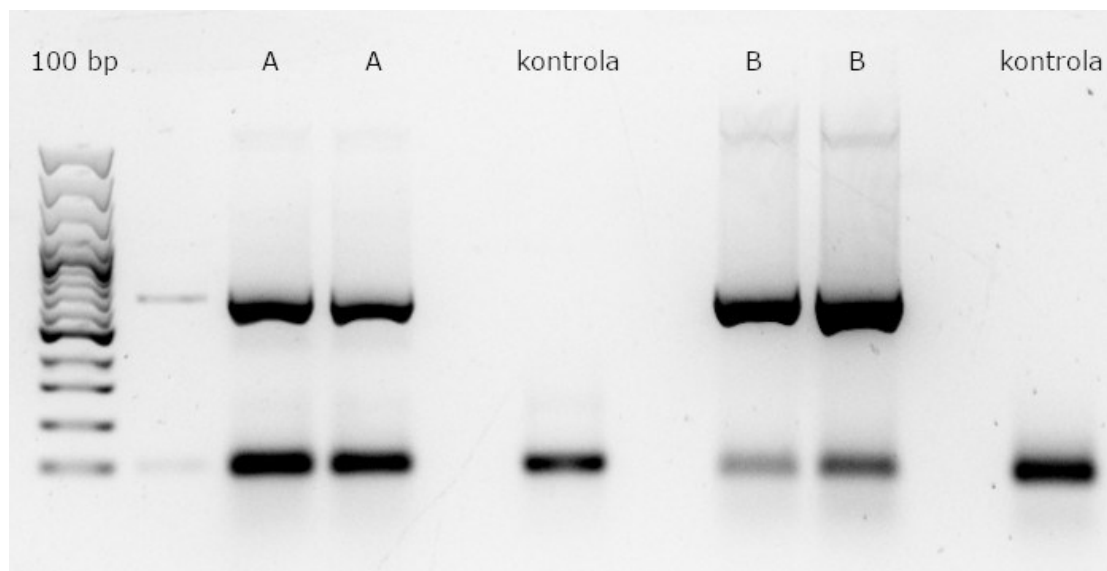
gen	varianta	název gRNA	sekvence
SPT5L	A	gR211	GGATGATAATACTTCAGCAT
		gR512	TCCGGTTTTTTTGTACCCGC
	B	gR539	GCCAGGTTGATCACTAGCCG
		gR506	CTTGGTGAAGGCGCTACTGC
NRPE1	A	gR384	ACGACTGTTGATAGTGAATC
		gR130	AAGAAATTTCCATCTAGTGG
	B	gR230	TGGGGAAAACGCGTGGATGTTGG
		gR460	TTCCAGTCTGCACCACCACC

Tab. 27: Tabulka používaných gRNA pro mutaci AGO-hooků v proteinech SPT5L a NRPE1.

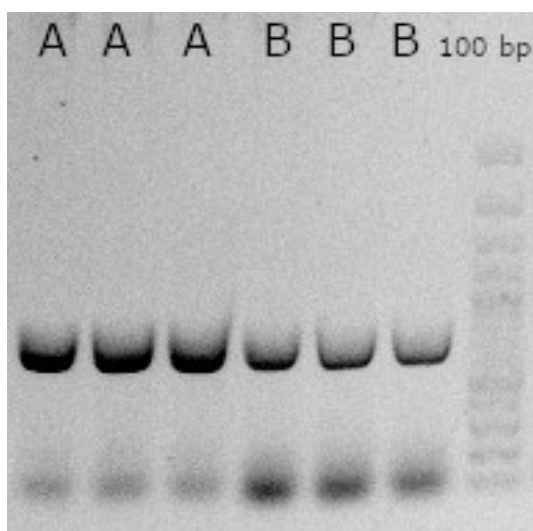
Klonování gRNA bylo *in silico* otestováno v programu Geneious Prime. Nejprve bylo otestováno nasedání primerů do plasmidu pCBC-DT1T2. Poté bylo otestováno vyštěpení CRISPR kazety. Jako poslední bylo otestováno vložení CRISPR kazety do pHEE401E_pUBQ:eGFP plasmidu.

4.1.2. Příprava konstruktů

Konstrukty byly tvořeny dle postupu viz 3.1.2. Pro NRPE1 i SPT5L kazety byly vždy tvořeny dva konstrukty (varianta A a B) pro zvýšení šance na úspěch mutagenese. Výsledek vkládání gRNA byl pozorován pomocí elektroforézy (viz obr. 9 a 10). Z gelu byly následně PCR produkty obsahující CRISPR kazetu vyříznuty, vyizolovány a vnášeny do plasmidu pHEE401E_pUBQ:eGFP metodou GoldenGate (viz kapitola 3.1.2).



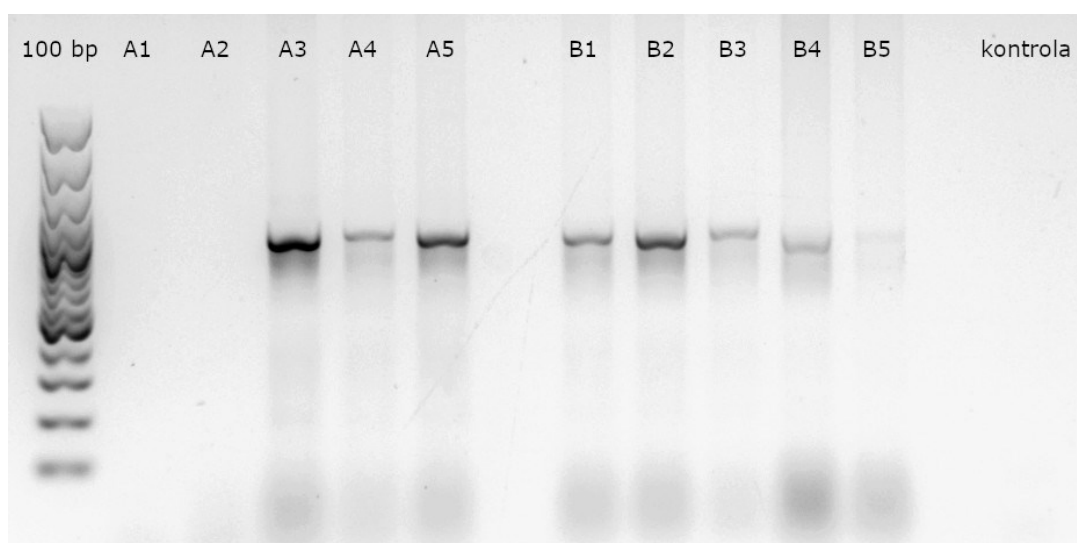
Obr. 9: gel s SPT5L složenou CRISPR kazetou, A značí variantu s gR211 a gR512 primery, B značí variantu s gR539 a gR506 primery, kontrola je PCR směs bez přidaného plasmidu, délka požadovaného produktu je 626 bp.



Obr. 10: gel s NRPE1 složenou CRISPR kazetou, A značí variantu s gR384 a gR130 primery, B značí variantu s gR230 a gR460 primery.

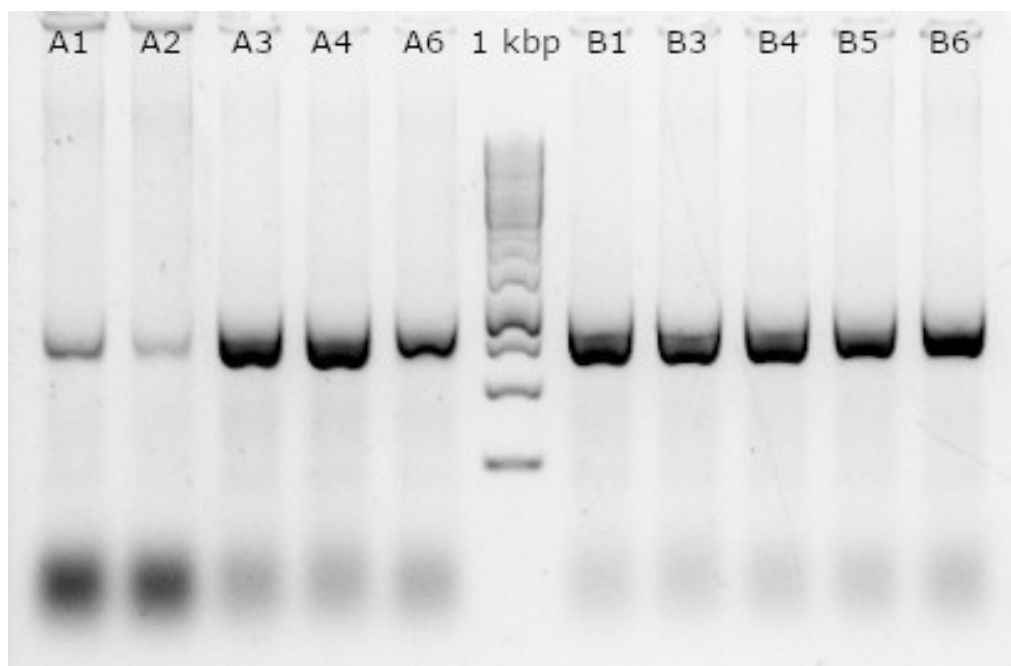
Z narostlých bakteriálních klonů (napěstovány dle postupu viz kapitola **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) bylo vybráno u každé varianty 20 linií, které byly selektovány na spectinomycinu.

U plasmidů s SPT5L kazetou na spectinomycinovém médiu nevyrostly žádné kolonie a došlo tak k potvrzení vyštěpení genu resistance na jehož místo se vkládá CRISPR kazeta. Bylo náhodně vybráno 5 linií od každé varianty, pro které byla spuštěna PCR (dle „základní PCR mix“ s využitím M13F a U6-29p-R primerů a s teplotou annealingu 58 °C a dobou extenze 50 s, viz kapitola 3.7). Mnou použitá kombinace primerů měla dát produkt velikosti 916 bp, což jsem prostřednictvím elektroforézy potvrdila u 3/5 linií u varianty A a 4/5 linií u varianty B (viz obr. 11).



Obr. 11: potvrzení bakteriálních kolonií s plasmidy s vloženou SPT5L CRISPR kazetou, žebříček 100 bp, jako kontrola je použita PCR směs bez přidání plasmidu.

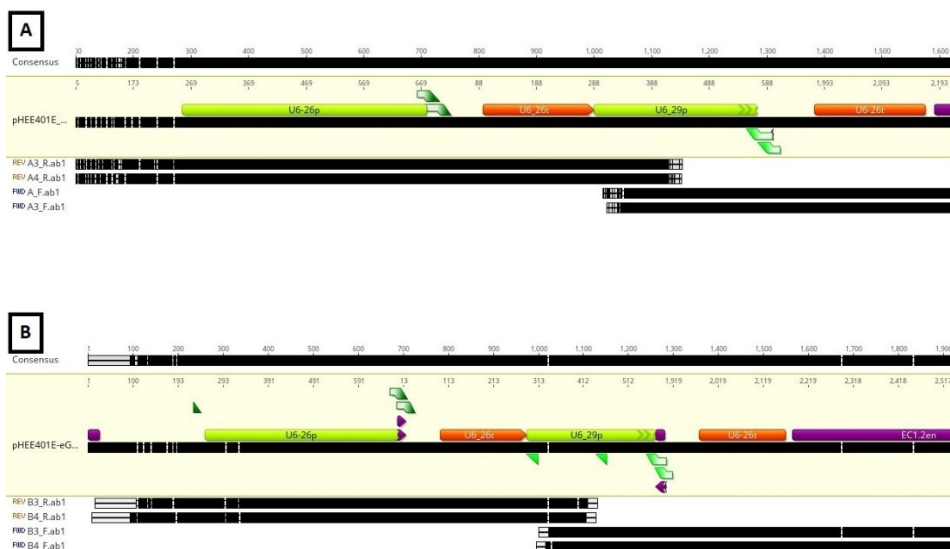
U plasmidů s NRPE1 kazetou na spectinomycinovém médiu nevyrostly žádné nebo velmi malé kolonie a došlo tak k potvrzení vyštěpení genu resistance na jehož místo se vkládá CRISPR kazeta. Bylo náhodně vybráno 5 linií od každé varianty, pro které byla spuštěna PCR (dle „Základní PCR mix“ s využitím M13F a U6-29p-R primerů a s teplotou annealingu 58 °C a dobou extenze 50 s, viz kapitola 3.7), bylo vybíráno z variant, které na spectinomycinovém médiu neměly žádnou narostlou kolonii. Mnou použitá kombinace primerů měla dát produkt velikosti 916 bp, což jsem prostřednictvím elektroforézy potvrdila u 5/5 linií u varianty A a 5/5 linií u varianty B (viz obr. 12).



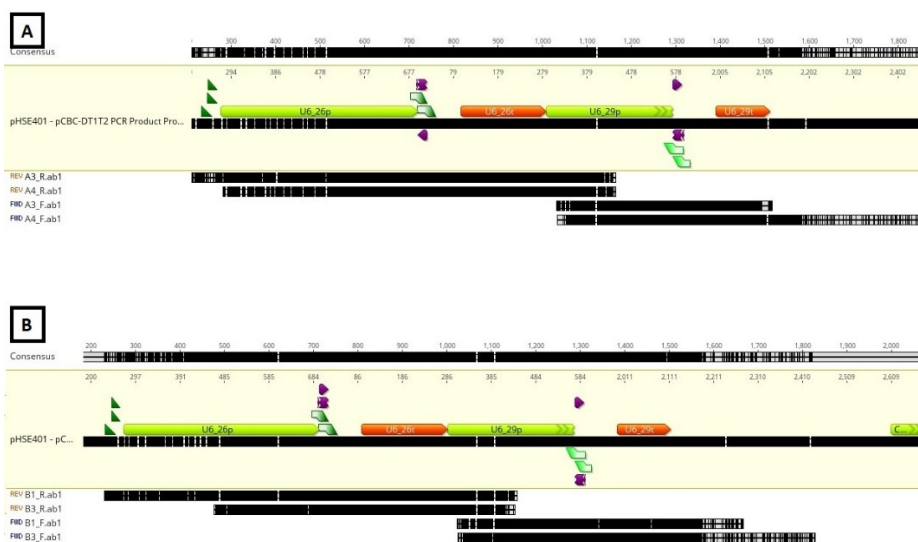
Obr. 12: potvrzení bakteriálních kolonií s plasmidy s vloženou NRPE1 CRISPR kasetou, žebříček 1 kbp.

Byly vybrány 2 kolonie od každé varianty, které byly kultivovány dle postupu viz kapitola 3.4.3. Pro SPT5L kasetu byly vybrány kolonie A3 a A4, B3 a B4, pro NRPE1 kasetu kolonie A3 a A4, B1 a B3. Z bakteriální kultury byl izolován plazmid a následně sekvenován viz postup v kapitole 3.4.3.

Sekvenací bylo zjištěno, že došlo ke vložení konstruktů u všech sekvenovaných linií v případě SPT5L i NRPE1 kaset (ukázka namapování dat ze sekvenace na *in silico* vytvořenou sekvenci pomocí Geneious Prime viz obr. 13 a 14).



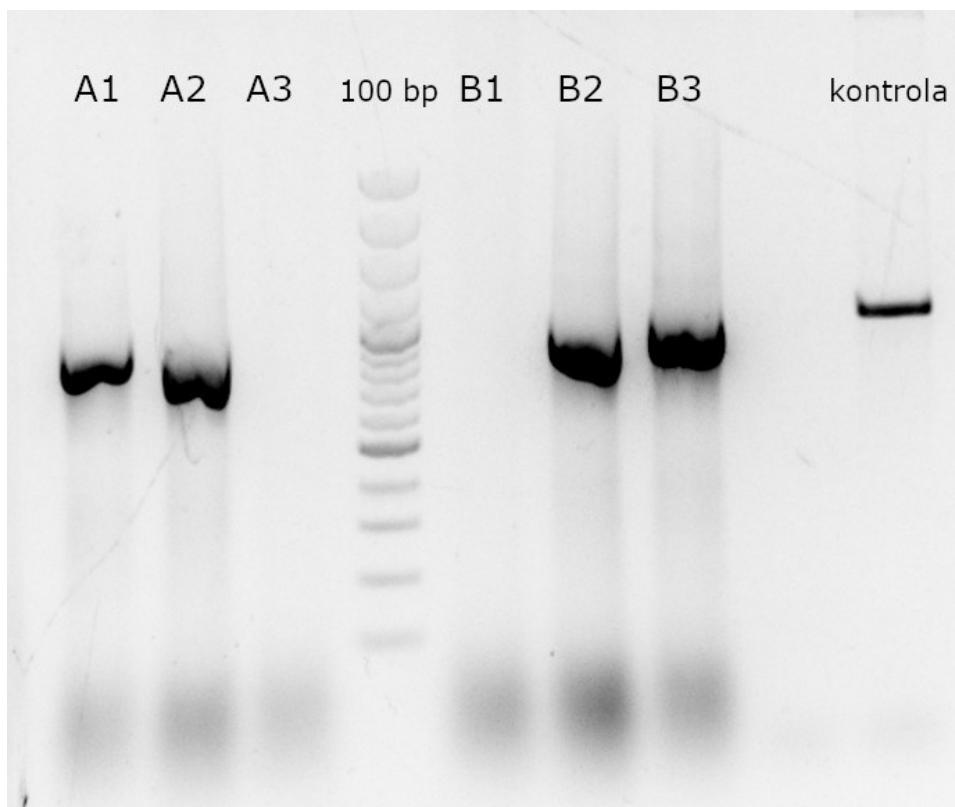
Obr. 13: aligment výstupu sekvenace SPT5L CRISPR kazety, černá barva značí shodu; A – kolonie A3, A4, B – kolonie B3 a B4.



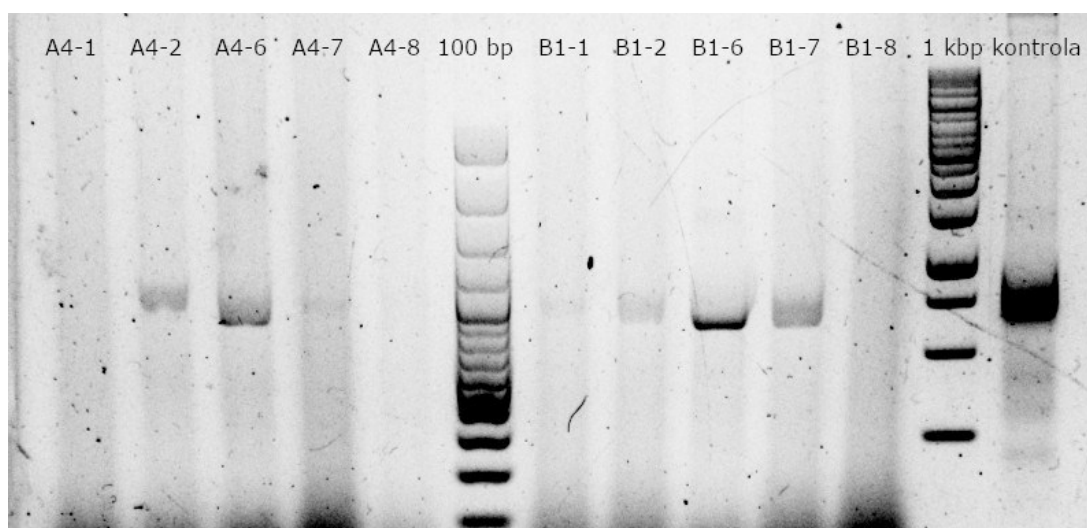
Obr. 14: aligment výstupu sekvenace NRPE1 CRISPR kazety, černá barva značí shodu; kolonie A3, A4, B1 a B3.

Do *A. tumefaciens* byly elektroporovány vždy 2 varianty plasmidu vybrané na základě výsledků sekvenace. Pro SPT5L kazetu byly vybrány A3 a B3, pro NRPE1 kazetu A4 a B1. Z linií s elektroporovanými plasmidy (elektroporováno dle kapitoly 3.4.2, pěstováno na médiu viz kapitola 3.3) bylo vybráno 6 linií od každého vzorku pro další kultivaci. Po ukončení kultivace *A. tumefaciens* byla připravena PCR s použitím M13F a U6-29p-R primerů o složení „Základní PCR mix“ a byla spuštěna dle programu „Základní PCR mix“ s teplotou annealingu 58 °C a dobou extenze 50 s, viz kapitola 3.7 Následnou elektroforézou byla potvrzena přítomnost plasmidu

s SPT5L CRISPR kasetou u 4 ze 6 testovaných kolonií (2/3 kolonií u obou variant, viz obr. 15), s NRPE1 CRISPR kasetou u 5 z 10 testovaných kolonií (2/5 a 3/5, viz obr. 16).



Obr. 15: potvrzení plasmidů s SPT5L CRISPR kasetou u kolonií *A. tumefaciens*, žebříček 100 bp, pozitivní kontrola je SPT5L CRISPR kazeta A3 *E. coli*.



Obr. 16: potvrzení plasmidů s NRPE1 CRISPR kasetou u kolonií *A. tumefaciens*, žebříček 100 bp, pozitivní kontrola je NRPE1 CRISPR kazeta B1 *E. coli*.

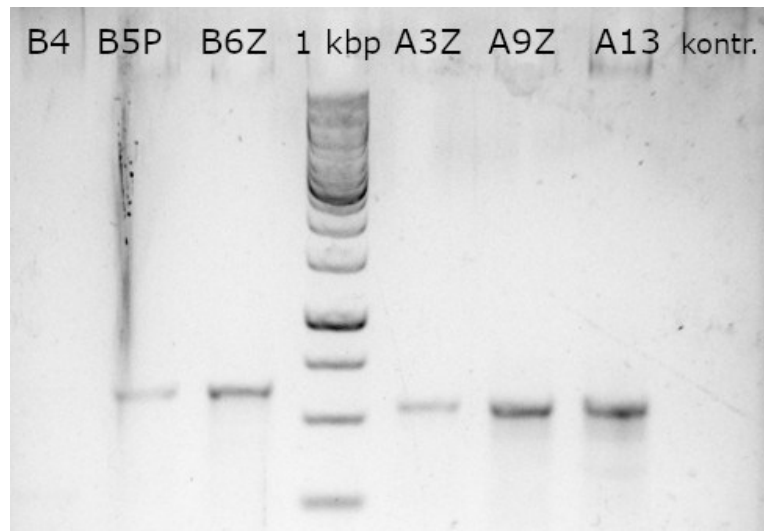
Z těchto kolonií byla vybrána od každé varianty jedna, pro SPT5L kazetu A2 a B2 a pro NRPE1 kazetu A4-6 a B1-6. Prostřednictvím vybraných linií *A. tumefaciens* byly transformovány rostliny *Arabidopsis thaliana*, WT rostlina byla transformována kolonií s CRISPR kazetou pro NRPE1 a *spt6lΔAh* mutantní rostlina byla transformována kolonií s CRISPR kazetou pro SPT5L (postup viz kapitola 3.4.4). Semínka transformovaných rostlin byla vyseta *in vitro* na selekční médium (postup viz kapitola **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Úspěšnost klíčení byla u 80-90 % u rostlin transformovaných T-DNA nesoucí CRISPR kazetu pro NRPE1 i SPT5L (stanoveno okometricky). Poté, co narostly rezistentní rostliny, byly genotypovány dle postupu v kapitole 3.6

4.2. Výsledky mutagenese

Pro získání homozygotních mutantů bez CRISPR kazety s gRNA bylo nutné vypěstovat alespoň dvě generace. Pro zjištění přítomnosti mutace byly rostliny ogenotypovány a dle výsledků genotypování bylo postupováno dále. Pro genotypování rostlin s SPT5L kazetou byly používány primery SPT5L_crispr_F a SPT5L_crispr_R, pro rostliny s NRPE1 kazetou byly použity primery NRPE1_crispr_R a NRPE1_11_LP (viz tab. 16). Hledány byly vzorky, které po PCR obsahovaly produkt o délce 520 bp resp. 613 bp (varianta A a B) v případě SPT5L kazety a 1233 bp v případě NRPE1 kazety (varianta A i B). Vzorky s SPT5L kazetou určené k sekvenaci byly připravovány s primerem SPT5L_6833_R a vzorky s NRPE1 kazetou určené k sekvenaci byly připravovány s primerem NRPE1_8009_R. Pro jednoduché zjišťování přítomnosti CRISPR kazety s gRNA obsahovala kazeta gen pro GFP, díky kterému bylo možné rostliny prohlédnout pod fluorescenční binolupou a ponechat pouze rostliny, co nesvítily po ozáření modrým světlem.

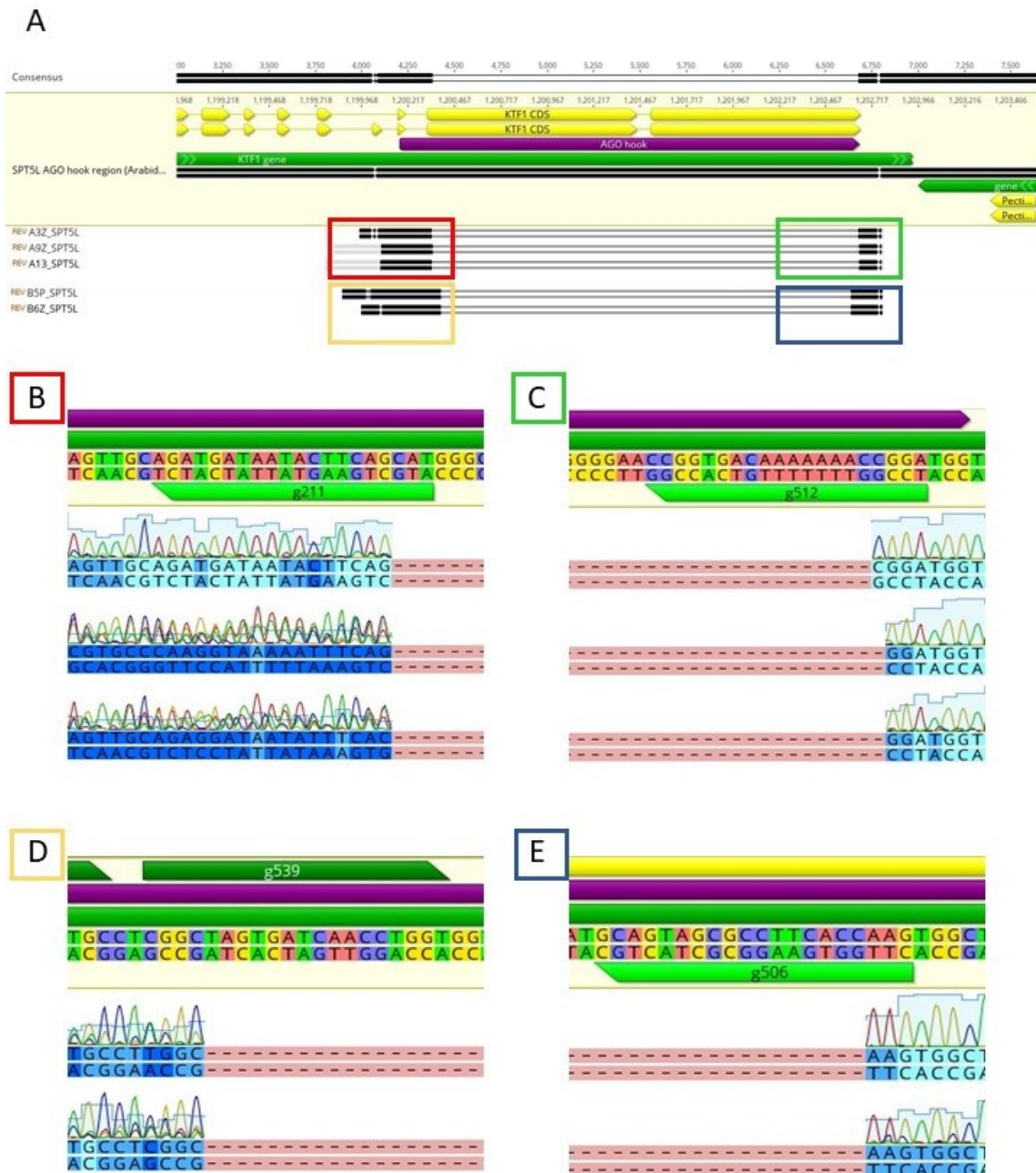
4.2.1. Mutagenese SPT5L

V první generaci bylo genotypováno 43 rostlin které narostly na selekčním médiu, z nichž 11 bylo heterozygotních (4/8 varianty A a 7/26 varianty B). K sekvenování byly vybrány linie B5P, B6Z, A3Z, A9Z a A13 (viz obr. 17).



*Obr. 17: Ověření výsledků genotypování heterozygotních *spt5l* linie na homozygotním *spt6l* pozadí. Vzorky puštěny v klasickém PCR programu se zkrácenou dobou extenze na 30 s (tj. vzniká pouze produkt z mutanční alely, který je tak použitelný k sekvenování). Jako kontrola byl použit vzorek PCR směsi bez přidané DNA.*

Sekvence prokázala přítomnost požadované delece. U vzorků varianty A došlo u jednoho vzorku ze tří k posunu čtecího rámce o 1 nt, zbylé dva zůstaly ve čtecím rámci. U vzorků varianty B došlo u obou vzorků k posunu čtecího rámce o 1 nt (viz ob. 18). V případě SPT5L nebylo cíleno na mutaci přímo ve čtecím rámci, všechny rostlinné linie tedy bylo možné používat v dalších generacích.

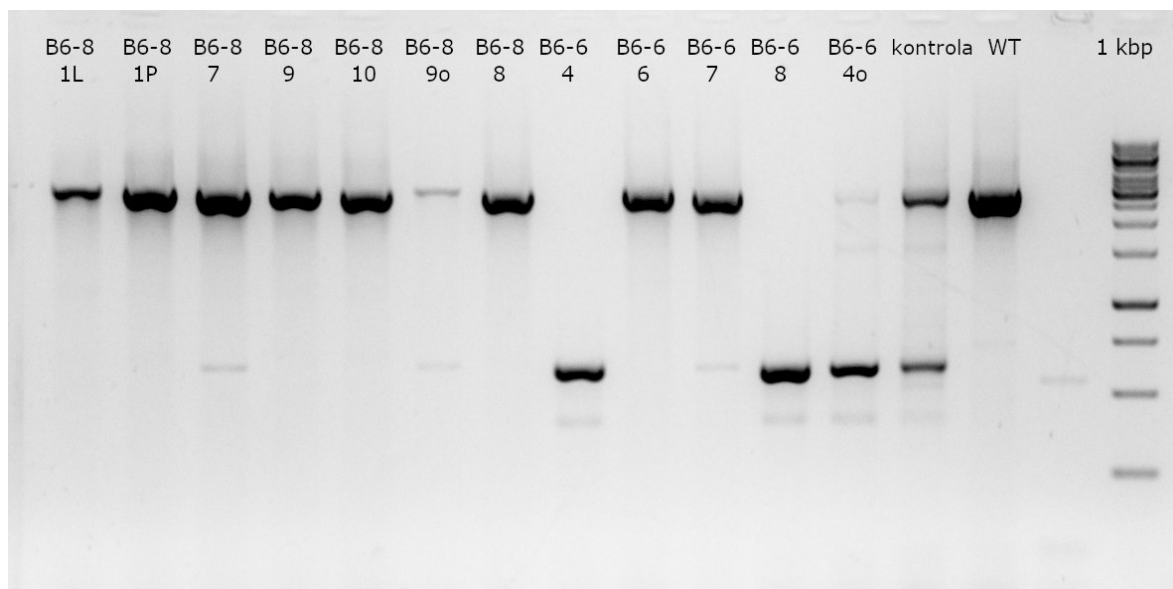


Obr. 18: Data ze sekvenace vzorků namapovaná do sekvenace SPT5L v programu Geneious Prime. A – souhrnný obrázek vzorků A3Z, A9Z, A13, B5P a B6Z, na světležlutém poli referenční genom *A. thaliana*, B – detail mutace postupně v rostlinách A3Z, A9Z a A13 vlevo (5' konec delece), došlo k deleci bez posunu čtecího rámce, C – detail mutace postupně v rostlinách A3Z, A9Z a A13 vpravo (3' konec delece), došlo k deleci s posunem čtecího rámce o 1 nt u A3Z, k deleci bez posunu čtecího rámce došlo u A9Z a A13, D – detail mutace postupně v rostlinách B5P a B6Z vlevo (5' konec delece), došlo k deleci s posunem čtecího rámce o 1 nt, E – detail mutace postupně v rostlinách B5P a B6Z vpravo (3' konec delece), došlo k deleci bez posunu čtecího rámce.

V druhé generaci bylo genotypováno 18 rostlin (bez GFP fluorescence, 10 potomků B6Z, 6 potomků A9Z, 2 potomci A13), ukázalo se ovšem, že žádná z nich není mutantní. Proto byly vysety rostliny nové (potomci A3Z, A4P, A6, A16, B4, B5P a B6Z) a tentokrát při genotypování nebyla zohledněna fluorescence GFP. Bylo genotypováno celkem 58 rostlin, z toho 8 bylo heterozygotních (5 z nich s CRISPR kazetou, 3 bez CRISPR kazety, detekováno fluorescencí GFP) a 5 bylo homozygotních

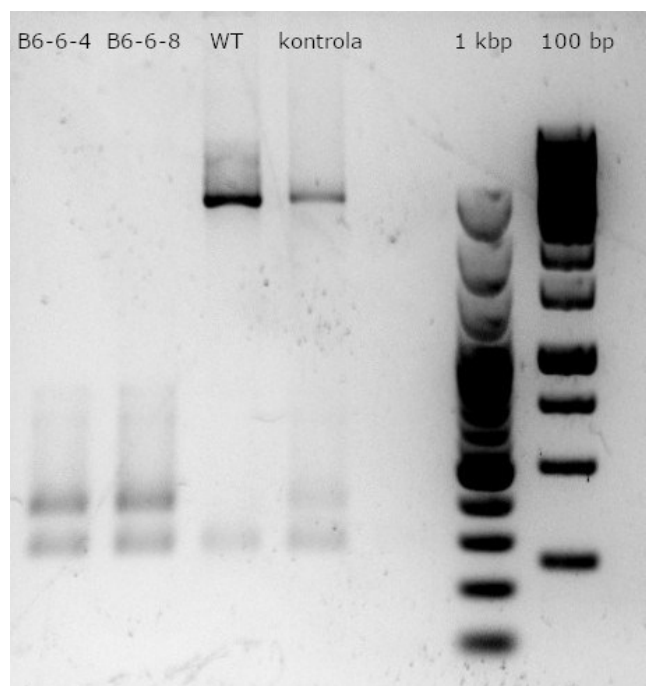
(všechny s CRISPR kazetou s gRNA). Všechny rostliny byly potomky B6Z krom dvou heterozygotů bez GFP fluorescence, kteří byli potomkem A4 (obr 32 viz příloha). Při následné zkrácené PCR s vybranými homozygotními a heterozygotními vzorky (rostliny značené A4-7, B6-5, B6-6, B6-7 a B6-8) se podařilo získat produkt o správné délce pouze ve vzorcích B6-6, B6-7 a B6-8, vzorky A byly proto vyřazeny (obr. 33 viz příloha). Pro mutanty potvrzené zkrácenou PCR pak specifitu produktu potvrdilo i enzymatické štěpení vzorků. Potvrzení enzymatickým štěpením spočívalo ve štěpení PCR produktů enzymem *Pst*I (cílí do nemutované oblasti mezi používanými primery), které prokázalo, že se jedná o specifické produkty.

Byla vyseta třetí generace – semínka rostliny B6-8 \emptyset (potomek rostliny B6Z, \emptyset značí absenci CRISPR kazety) jakožto nejnadějnějšího heterozygota bez CRISPR kazety s gRNA. Genotypování ovšem ukázalo na přítomnost pouze 4 heterozygotů a 19 WT rostlin (obr. 34 viz příloha). Pro heterozygotní rostliny se PCR však nepodařilo zopakovat. Byla proto vyseta semínka sesterských homozygotních rostlin s CRISPR kazetou B6-6 a B6-8. V jejich potomstvu bylo genotypováno 12 rostlin (7 potomků B6-8 a 5 potomků B6-6), z nichž 4 byli heterozygoti (2x B6-8, 2x B6-6) a 2 byli homozygoti (B6-6-4 a B6-6-8, viz obr. 19). Vzorky byly posléze otestovány na přítomnost CRISPR kazety s gRNA (prostřednictvím „základní PCR program“ s využitím primerů pUBQ-Fwd a e-GFP_rev, s teplotou annealingu 56 °C, dobou extenze 1 min a 40 cykly, viz kapitola 3.7), ani jeden homozygot ji neobsahoval (data neukázána).



Obr. 19: T3 generace *spt51ΔAh* rostlin. Zleva potomci rostliny B6-8, potomci rostliny B6-6, kontrola B6Z (rodič B6-6 a B6-8 rostlin) a WT, 1kbp žebříček.

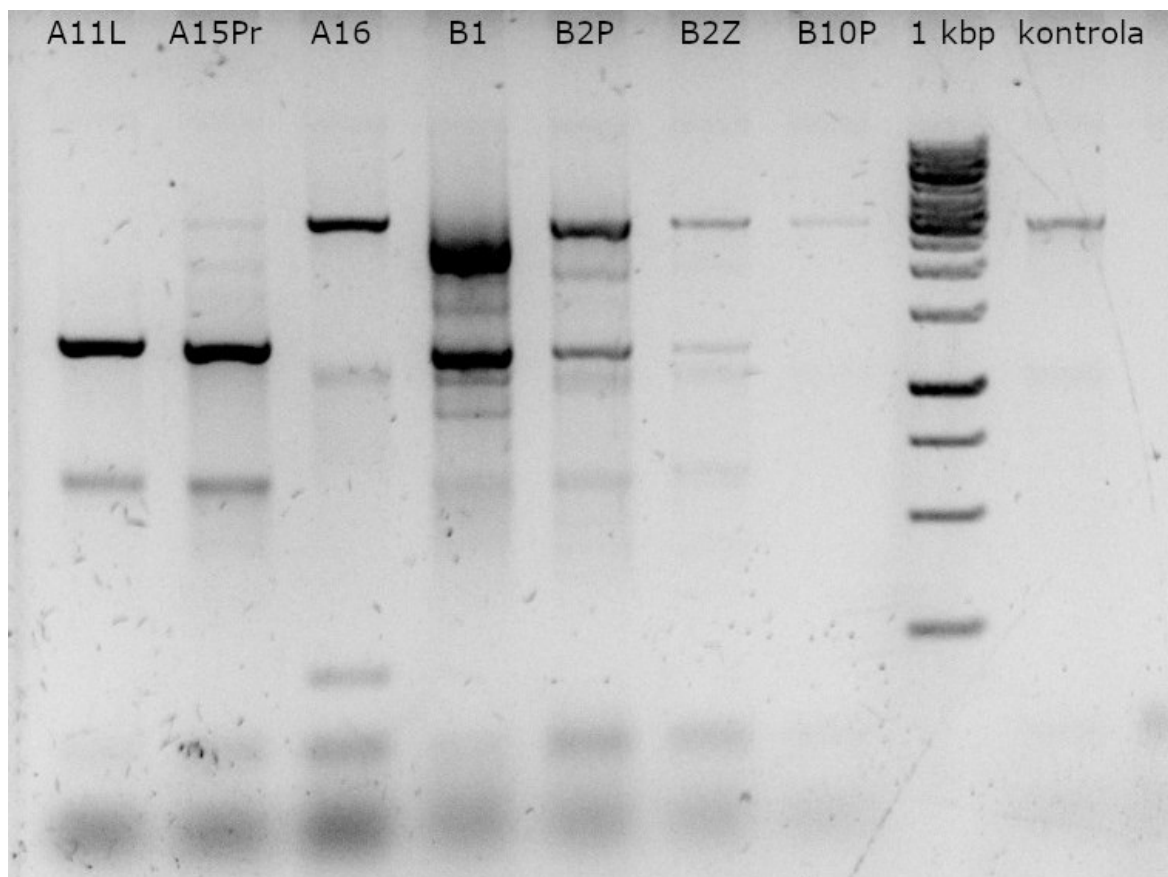
PCR produkty z B6-6-6 a B6-6-8 byly následně podrobeny enzymatickému štěpení enzymem *Pst*I (viz obr. 20).



Obr. 20: enzymatické štěpení PCR produktů vzorků B6-6-4 a B6-6-8, kontrola je B6Z (heterozygot) a WT. Enzymatickým štěpením došlo ke specifickému naštěpení vzorků a potvrdila se tak specifčnost produktů.

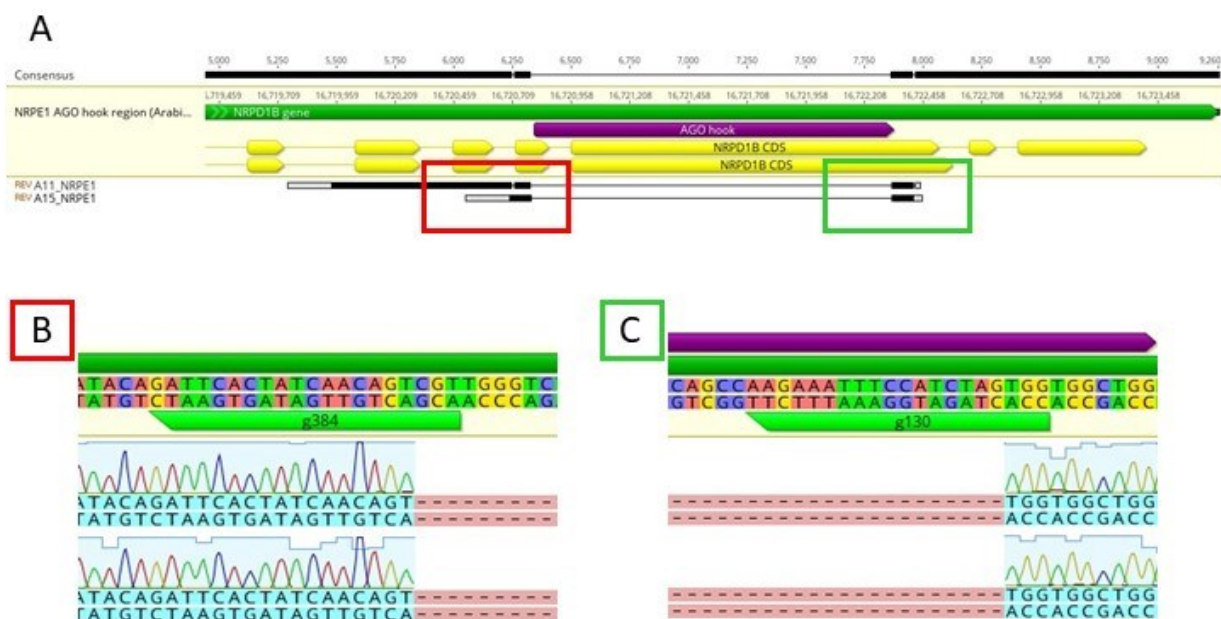
4.2.2. Mutageneze NRPE1

V první generaci bylo genotypováno 27 rostlin, které nerostly na selekčním médiu, z nich 5 bylo heterozygotních (viz obr. 21, 2/8 první varianty a 3/19 druhé varianty). K sekvenování byly vybrány linie A11L a A15Pr, B1, B2P a B2Z.



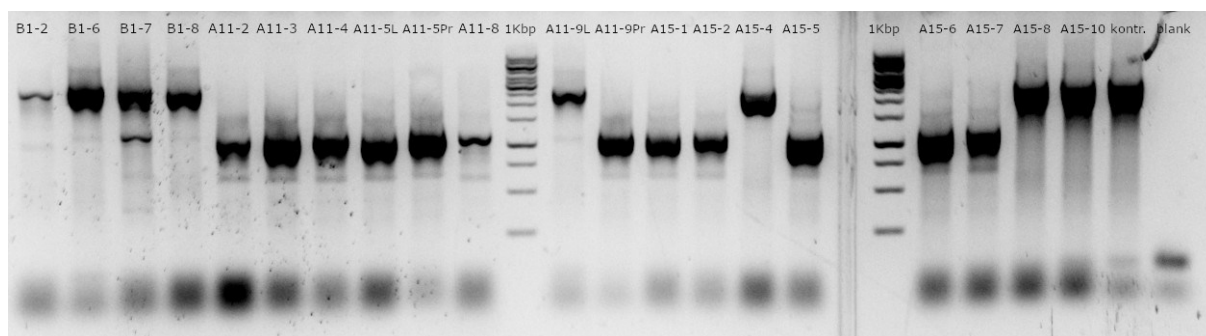
Obr. 21: Obr: Ověření výsledků genotypování vybraných mutantních *nrpe1ΔAh* linií. Vzorky puštěny v klasickém PCR programu s dobou extenze 1,5 min. Kontrola je WT vzorek.

Sekvence prokázala přítomnost delece ve čtecím rámci u obou sekvenovaných vzorků (A11, A15, viz obr. 22), vyizolovaná DNA rostlin varianty B byla nekvalitní, měla nízké výtěžky a sekvence proto nebyla brána v potaz (obr. 35 viz příloha).



Obr. 22: Data ze sekvenace vzorků namapovaná do sekvence genu NRPE1 v programu Geneious Prime. A – souhrnný obrázek vzorků A11 a A15, na světle žlutém poli referenční genom *A. thaliana*, B – detail mutace postupně v rostlinách A11 a A15 vlevo (5' konec delece), došlo k deleci bez posunu čtecího rámce, C – detail mutace postupně v rostlinách A11 a A15 vpravo (3' konec delece), došlo k deleci bez posunu čtecího rámce.

V druhé generaci bylo genotypováno 20 rostlin (bez GFP fluorescence, potomci A11L a A15), z toho 5 bylo heterozygotních a 12 bylo homozygotních (viz obr. 23). Rovněž bylo potvrzeno (prostřednictvím „základní PCR program“ s využitím primerů pUBQ-Fwd a e-GFP_rev, s teplotou annealingu 56 °C, dobou extenze 1 min a 40 cykly, viz kapitola 3.7), že vzorky A11-3, A11-4, A11-5L, A11-9Pr, A15-1 a A15-7 neobsahují CRISPR kazetu s gRNA (data neukázána, testovány pouze mutantní vzorky).



Obr. 23: T2 generace *nrpe1ΔAh* rostlin. Zleva potomci rostliny B1, potomci rostliny A11, 1kbp žebříček, potomci rostliny A11, potomci rostliny A15, 1kbp žebříček, potomci rostliny A15, WT kontrola, vzorek bez DNA (blank).

Ve třetí generaci byla vyseta semínka rostlin A11-4, A11-5 a A15-1 pro účely křížení s dvojitým *spt5l spt6l* mutantem.

4.3. Křížení rostlin

Křížení bylo prováděno dle postupu viz kapitola 11. Křížení bylo prováděno oběma směry, tedy pyl byl přenášen z *nrpe1ΔAh* na *spt5lΔAh spt6lΔAh* i opačně. Úspěšnost tvorby šešulí byla 7/10 květů u přenosu pylu z *nrpe1ΔAh* na *spt5lΔAh spt6lΔAh*, a 0/2 květů při přenosu pylu z *spt5lΔAh spt6lΔAh* na *nrpe1ΔAh*.

Cílem křížení bylo získat všechny varianty mutantů, tedy jednoduché mutanty *nrpe1ΔAh*, *spt5lΔAh*, *spt6lΔAh*, dvojitě mutanty *nrpe1ΔAh spt5lΔAh*, *nrpe1ΔAh spt6lΔAh*, *spt5lΔAh spt6lΔAh* a trojitěho mutantu *nrpe1ΔAh spt5lΔAh spt6lΔAh*. Křížením mutantů *nrpe1ΔAh* a *spt5lΔAh spt6lΔAh* je teoreticky možné získat v F2 generaci všechny níže uvedené kombinace WT a mutantních alel jednotlivých genů (viz tab. 28), ze kterých je na základě genotypování možné vyhledat požadované varianty homozygotních mutantů.

	ABC	AbC	ABc	Abc	aBC	abC	aBc	abc
ABC	AABBCC	AABcCC	AABBCc	AABbCc	AaBBCC	AaBbCC	AaBBCc	AaBbCc
AbC	AABbCC	AAbbCC	AABbCc	AAbbCc	AaBbCC	AabbCC	AaBbCc	AabbCc
ABc	AABBCc	AABbCc	AABBcc	AABbcc	AaBBCC	AaBbCc	AaBBcc	AaBbcc
Abc	AABbCc	AAbbCc	AABbcc	AAbbcc	AaBbCc	AabbCc	AaBbcc	Aabbcc
aBC	AaBBCC	AaBbCC	AaBBcC	AaBbCc	aaBBCC	aaBbCC	aaBBcC	aaBbCc
abC	AaBbCC	AabbCC	AaBbCc	AabbCc	aaBbCC	aabbCC	aaBbCc	aabbCc
aBc	AaBBCc	AaBbCc	AaBBcc	AaBbcc	aaBBCC	aaBbCc	aaBBcc	aaBbcc
abc	AaBbCc	AabbCc	AaBbcc	Aabbcc	aaBbCc	aabbCc	aaBbcc	aabbcc

Tab. 28: Všechny kombinace mutantů v F2 generaci získatelné zkřížením rostlin *nrpe1ΔAh* (a) a *spt5lΔAh* (b) *spt6lΔAh* (c). Barevně zvýrazněné jsou požadované varianty.

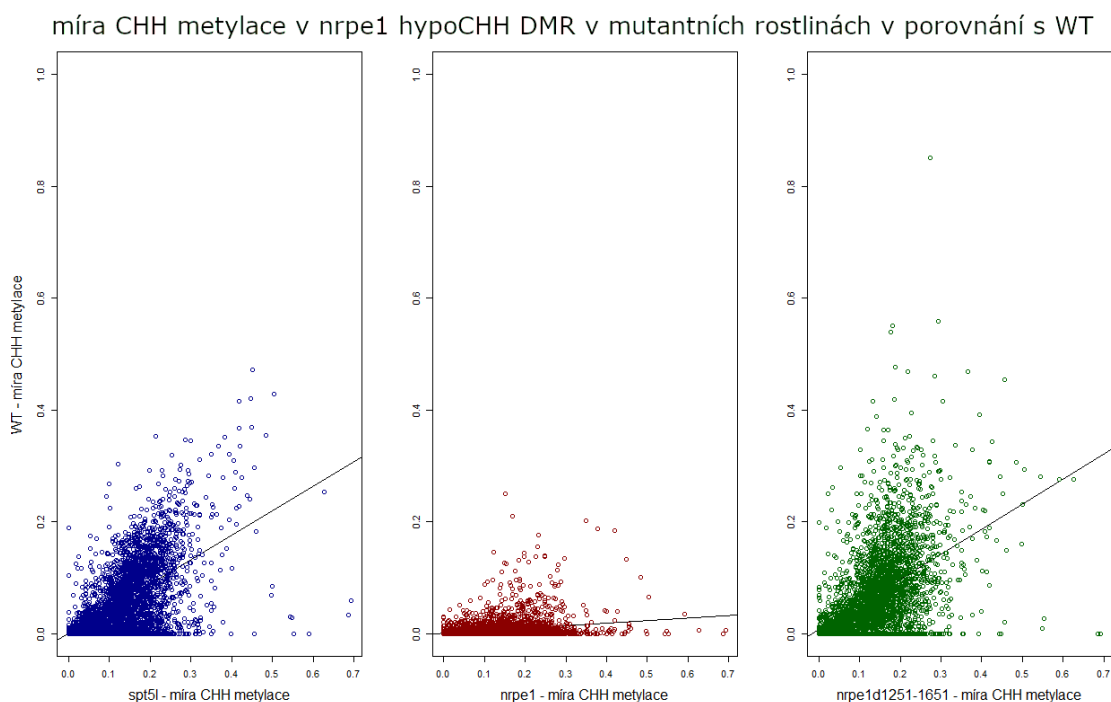
4.4. Analýzy metylace DNA získaných mutantů

4.4.1. Výběr lokusů pro analýzu

Studované lokusy byly vybírány na základě existujících dat o CHH metylaci (z důvodu významnosti RdDM dráhy pro navození CHH metylace, více viz kapitola 2.3) v rostlinách WT a mutantech *nrpe1*, *spt5l* a *nrpe1d1251-1651* a také na základě pokrytí Pol II a SPT6L (Chen et al., 2019; Stroud et al., 2013; Wendte et al., 2017, Čermák et al., in preparation). Na základě porovnání souboru s daty o přítomnosti metylace v *nrpe1* vůči souboru s daty o přítomnosti metylace v *spt5l* a s daty o přítomnosti metylace ve WT bylo zjišťováno, zda je metylace v daném lokusu zvýšená či snižená (viz kapitola 3.11.1). Bylo zjištěno, že v porovnání vůči WT dochází v mutantech k výraznému ponížení metylace DNA, naleznou se ovšem i případy lokálního zvýšení metylace DNA, či žádné změny metylace DNA (viz tab. 29, graf 1).

procenta lokusů s danou mírou změny metylace v mutantech vůči WT			
Methylace	spt5l [%]	nrpe1 [%]	nrpe1d1251-1651 [%]
snížená	91,24	97,31	85,04
Zvýšená	6,75	0,99	13,06
nezměněná	2,02	1,69	1,90

Tab. 29: Procenta lokusů s danou změnou úrovně metylace v porovnání s WT. Zavedeny kategorie snížená, zvýšená a nezměněná.



graf 1: míra CHH metylace v *nrpe1* hypoCHH DMR pro WT (osa y) a pro *spt5l*, *nrpe1*, *nrpe1d1251-1651* (osa x). Změna hladiny metylace ve studovaných mutantech oproti WT (zleva v *spt5l*, *nrpe1* a *nrpe1d1251-1651*).

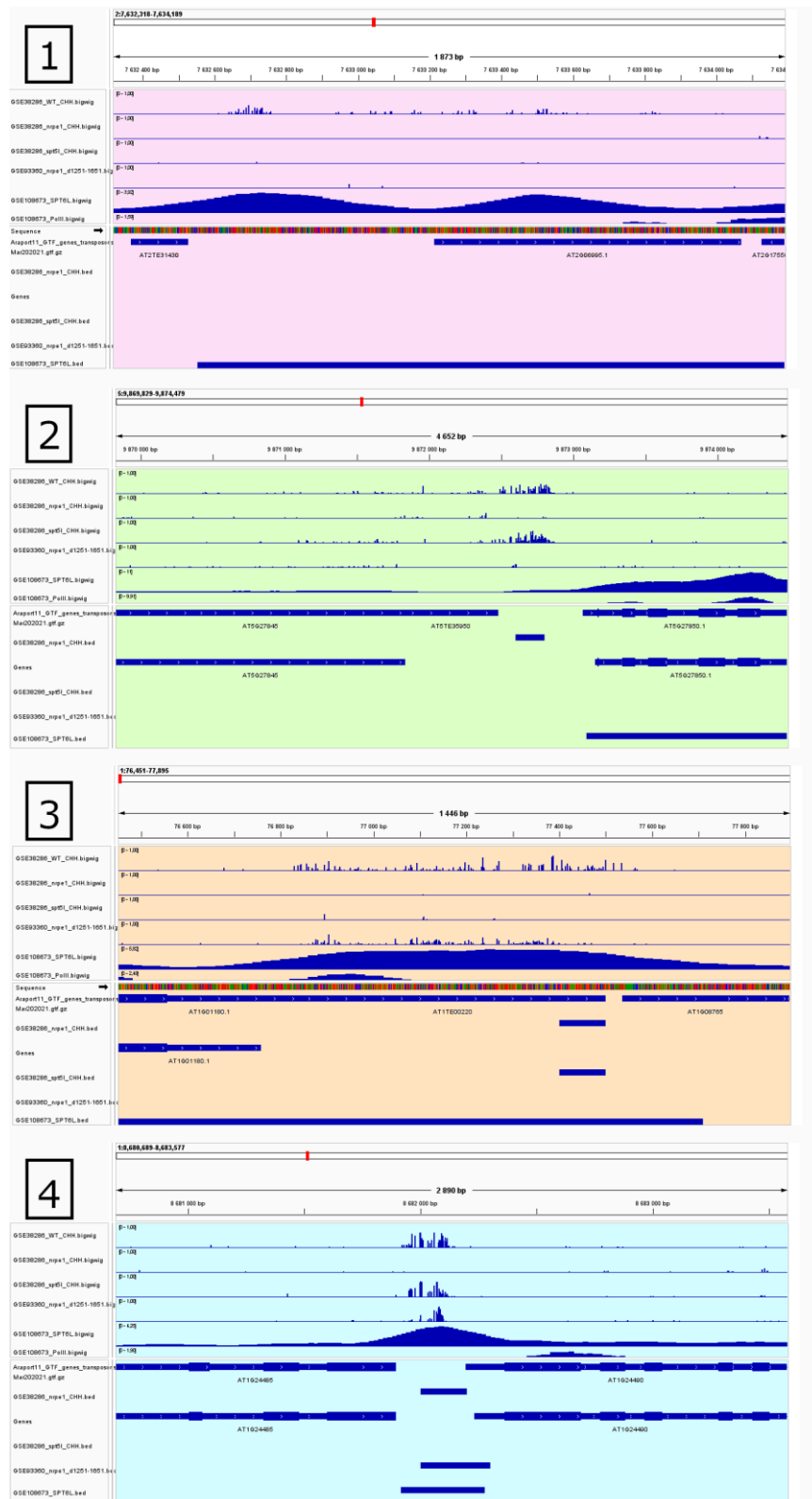
Bylo vybráno celkem 11 lokusů, pro které byly navrženy primery. Tyto primery byly otestovány a byly z nich vybrány 4 nejlépe fungující páry (viz tab. 30 a 31, použité primery vyznačeny žlutě, použité lokusy viz obr. 24).

Č.	název	souřadnice (chromozóm: začátek-konec)	Kategorizace lokusu (preference použití)	metylace přítomna v genotypch	metylace chybí v genotypch	přítomnost SPT6L
1	AT2G06995	2:7,632,318-7,634,189	A (1)	WT	nrpe1, spt5l, nrpe1_dAh	ano
2	AT1TE93275	1:28,514,259-28,517,149	A (2-3)	WT	nrpe1, spt5l, nrpe1_dAh	ano
3	AT4G04040	4:1,938,720-1,939,160	A (2-3)	WT, nrpe1 (výrazný pokles)	spt5l, nrpe1_dAh	ano
4	AT1TE28175	1:8,733,008-8,734,452	A (4)	WT	nrpe1, spt5l, nrpe1_dAh	ano
5	AT5TE35950	5:9,869,829-9,874,479	B (1)	WT, spt5l	nrpe1 nrpe1_dAh	ne
6	AT2TE20755	2:5,047,373-5,051,113	B (2)	WT, spt5l (méně)	nrpe1, nrpe1_dAh	ne
7	AT1TE00220	1:76,451-77,895	C (1)	WT, nrpe1_dAh	nrpe1, spt5l	ano
8	AT1TE00150	1:55,267-57,325	C (2)	WT, nrpe1_dAh	nrpe1, spt5l	ano
9	AT1G24490	1:8,680,689-8,683,577	D (1)	WT, spt5l, nrpe1_dAh (pokles)	nrpe1	ano
10	AT1G53480	1:19,962,078-19,967,860	D (2)	WT, spt5l, nrpe1_dAh	nrpe1	ano
11	AT2TE64585	2:14,572,134-14,574,005	D (3)	WT, nrpe1_dAh (výrazný pokles), spt5l	nrpe1	málo

Tab. 30: Vybrané lokusy na základě existujících dat o CHH metylaci a jejich vlastnosti. Žlutě zvýrazněné jsou výsledně použité lokusy. Varianty kontextu označují kombinace metylací v daném lokusu v různých genotypch (rozeepsáno ve sloupcích „metylace přítomna“ a „metylace chybí“. Přítomnost SPT6L značí pokrytí lokusu proteinem SPT6L. nrpe1d1251-1651 jsou zde značeny nrpe1_dAh.

název	hotový forward primer	hotový reverse primer
AT2G06995	GCTATGCGCGAGCTGCCCATCARCAAAAATATATACAAACAA	GCTATGCGCGAGCTGCTAGAGAAAAGAGAAAGAGAGAGAAATAAT
AT1TE93275	GCTATGCGCGAGCTGCTTACAATTACAAATCCACAACACAATTAT	GCTATGCGCGAGCTGCTATAATTTYTGAAATTTTAGAGTTAGG
AT4G04040	GCTATGCGCGAGCTGCTTTTCTCTCATCACTRTACATTCTTCT	GCTATGCGCGAGCTGCGATTATTATTGTATTGTAGTATTGATGTTGTAT
AT1TE28175	GCTATGCGCGAGCTGCATGGTTTGTATATGGAGGGTTTGG	GCTATGCGCGAGCTGCTTTRCTCCTTTTTTATTACTTTATTTTTA
AT5TE35950	GCTATGCGCGAGCTGCCTTTCTCTTCTCTTCTTTTTCTCT	GCTATGCGCGAGCTGCGATTAGAGAAAYGTAGAATAATGGTATT
AT2TE20755	GCTATGCGCGAGCTGCTTAATACAAATTTTCATCTTACACATTTAAT	GCTATGCGCGAGCTGCATAAATTATTTGGGAAAATTGTTTATATGATTAA
AT1TE00220	GCTATGCGCGAGCTGCGYYATGGAGAGTATGAAAAGT	GCTATGCGCGAGCTGCCAATACTTCTTTCTTTCTCAAAAA
AT1TE00150	GCTATGCGCGAGCTGCCAATTC AACTTTTCCCATCAAATATATA	GCTATGCGCGAGCTGCTGTAGTAGTTAGAGATGTTGTGGT
AT1G24490	GCTATGCGCGAGCTGCGTTGTAGAATTTAATGGTTATAGTTGTTA	GCTATGCGCGAGCTGCCTAACACACAACTATATATCTCACCTT
AT1G53480	GCTATGCGCGAGCTGCCACAAAARAAAATCAAATCCTATCCT	GCTATGCGCGAGCTGCTGATGGAGAATTAATGAGAAATGGGG
AT2TE64585	GCTATGCGCGAGCTGCATTCATAAACATATTATAAATAARATCAAC	GCTATGCGCGAGCTGCTGTTTGTGAAATTTYAAAAATTGGATT

Tab. 31: Primery ve vybraných lokusech na základě existujících dat o CHH metylaci. Žlutě zvýrazněné jsou výsledně použité varianty primerů.



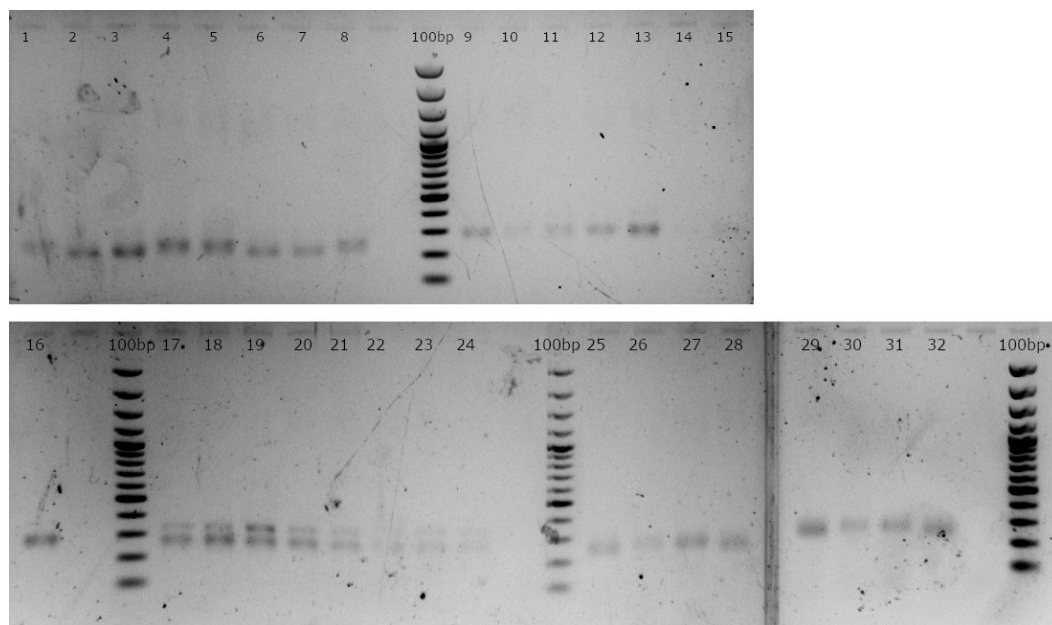
Obr. 24: použité lokusy: růžově kontext A (methylace přítomná pouze ve WT), 1- lokus AT2G06995; zeleně kontext B (methylace přítomná ve WT a *spt5l*), 2 - lokus AT5TE35950; oranžově kontext C (methylace přítomná ve WT a *nrpel1d1251-1651*), 3- lokus AT1TE00220; modře kontext D (methylace přítomná ve WT, *spt5l* a *nrpel1d1251-1651*), 4 lokus AT1G24490. Pořadí řádků CHH methylace ve WT, *nrpel1*, *spt5l*, *nrpel1d1251-1651*; nabohacení na SPT6L protein; referenční genom *Arabidopsis thaliana*, *nrpel1* DMR hypoCHH lokusy.

4.4.2. Bisulfidická konverze DNA a amplifikace vybraných lokusů

Ve vybraných lokusech (viz předešlá kapitola) byla studována metylace DNA prostřednictvím bisulfidické konverze. Byly zpracovávány vzorky genotypů WT, *nrpe1-11*, *nrpe1ΔAh* a *spt6lΔAh* dle postupu viz kapitola 3.11.2 (omezený počet genotypů byl použit z důvodu časové náročnosti přípravy mutantů, více viz diskuse). Od každého genotypu byly připraveny dvě repliky. Pro první kolo PCR byly použity primery pro lokusy AT2G06995, AT5TE35950, AT1TE00220 a AT1G24490 (viz tab. 31 a obr. 25). V případě přítomnosti více produktů ve vzorku po proběhnutí 1. PCR reakce byl produkt o správné délce vyříznut z gelu a vyizolován pro další použití. Pro barkódování v druhém kole PCR bylo použito 8 primerů s 8nt barkódovací sekvencí (viz tab. 31). Ze všech vzorků byl nakonec připraven směsný roztok, barkódy sloužily k označení jednotlivých vzorků.

Název barkódu	sekvence barkódu	Genotyp – replika
A	AACCAAGG	WT-1
B	AACCGGTT	<i>nrpe1-11-1</i>
C	AACGATGG	<i>nrpe1ΔAh-1</i>
D	AACGTAGG	<i>spt6lΔAh-1</i>
E	AACGTTTCG	WT-2
F	AAGGAAGG	<i>nrpe1-11-2</i>
G	AAGGATCG	<i>nrpe1ΔAh-2</i>
H	AAGGCGAT	<i>spt6lΔAh-2</i>

Tab. 32: Seznam použitých barkódů a vzorků, pro které byly použity.



Obr. 25: gel se vzorky z 1. PCR. Vzorky 1-8 jsou s primery pro lokus AT2G06995, 9-16 pro lokus AT5TE35950, 17-24 pro lokus AT1TE00220 a 25-32 pro lokus AT1G24490. Pořadí je vždy WT-1, *nrpe1-1*, *nrpe1ΔAh-1*, *spt6lΔAh-1*, WT-2, *nrpe1-2*, *nrpe1ΔAh-2*, *spt6lΔAh-2*, 100 bp žebříček.

4.4.3. NGS ve vybraných lokusech

Směsný vzorek byl zpracován na servisním pracovišti v BIOCEVu postupem viz kapitola 3.11.3. Získaná data byla zpracována dle kapitola 3.11.4. Na základě rozřazení dat dle barkódů (Je--demultiplex) vzniklo 18 souborů, pro každý barkód dva (forward a reverse směr, neboť sekvenace byla formou párového čtení), navíc vznikly dva soubory pro nezařaditelné ready (značeny unassigned nebo U, viz tab. 33).

forward soubor	reverse soubor
A AACCAAGG 1	A AACCAAGG 2
B AACCGGTT 1	B AACCGGTT 2
C AACGATGG 1	C AACGATGG 2
D AACGTAGG 1	D AACGTAGG 2
E AACGTTCG 1	E AACGTTCG 2
F AAGGAAGG 1	F AAGGAAGG 2
G AAGGATCG 1	G AAGGATCG 2
H AAGGCGAT 1	H AAGGCGAT 2
unassigned 1	unassigned 2

Tab. 33: soubory vytvořené rozřazením dat dle odpovídajících barkódů programem Je-demultiplex.

Prostřednictvím programu Je-demultiplex bylo dále zjištěno celkové množství readů, počet zařazených a nezařazených readů a počty odpovídající jednotlivým barkódům, viz tab. 34.

kategorie	Počet párů readů
zpracované páry readů	77641
zařazené páry readů	61290
nezařazené páry readů	16351
ready přiřazené ke konkrétním barkódům:	
A	5170
B	6587
C	10597
D	7190
E	6011
F	11430
G	10320
H	3985

Tab. 34: počty získaných párů readů metodou NGS.

Prostřednictvím programu bwameth byla data namapována na sekvence studovaných lokusů, které byly připraveny do společného fasta souboru, soubor obsahoval sekvenci mezi použitými primery. Namapovávány byly vždy páry readů, tedy oba soubory pro jeden barkód. Výsledkem bylo 9 bam souborů. Tyto bam soubory byly zpracovány pomocí programu MethylDackel tak, že výsledný soubor obsahoval data o lokaci a míře metylace jednotlivých cytosinů v pozorovaném lokusu, přičemž data byla rozdělena do tří samostatných souborů obsahující data pouze s CG/CHG/CHH metylací. Tato data byla vyexportována a graficky vyjádřena jako míra metylace podél dané sekvence lokusů (viz obr. 26, 27 a 28) či statisticky sumarizována (viz grafy 2, 3 a 4).

Z dat bylo také spočteno průměrné pokrytí cytosinů ready. Data byla získána z MethylDackel analýzy tak, že byly sečteny absolutní počty readů na cytosin, toto číslo bylo vyděleno počtem cytosinů na lokus (viz tab. 35).

průměrné pokrytí cytosinů ready										
lokusy	kontext	A	B	C	D	E	F	G	H	U
AT2G06995	CG	1193	453	622	370	599	1080	1105	458	1068
AT2G06995	CHG	635	465	635	375	610	1094	1126	467	985
AT2G06995	CHH	697	472	640	377	615	1103	1133	474	933
AT5TE35950	CG	1241	705	539	279	364	479	420	277	657
AT5TE35950	CHG	843	706	543	274	361	477	416	278	645
AT5TE35950	CHH	902	742	567	285	378	502	429	300	712
AT1TE00220	CG	683	318	1763	1511	636	793	776	410	1533
AT1TE00220	CHG	722	311	1736	1492	626	782	764	401	1526
AT1TE00220	CHH	784	315	1753	1500	629	787	768	406	1252
AT1G24490	CG	1894	1463	1831	978	1046	2568	2166	470	2248
AT1G24490	CHG	1910	1494	1859	985	1056	2603	2193	474	2297
AT1G24490	CHH	1686	1489	1854	982	1052	2585	2185	472	2248

Tab. 35: Průměrné pokrytí cytosinů v lokusech: znázorňuje průměrný počet readů na cytosin v lokusu. Výsledky zaokrouhleny na celá čísla.

Ze získaných dat byla provedena porovnání úrovní metylace ve studovaných lokusech, samostatně pro jednotlivé kontexty metylace (viz tab. 35). Bylo stanoveno procentuální zastoupení metylace ve studovaných lokusech. Z důvodu malého počtu cytosinů v CG a CHG kontextu byly jednotlivé repliky sloučeny, z dat byla poté spočtena průměrná metylace v daném lokusu a kontextu (data zobrazena v tab. 36). Z těchto dat byla sestavena tab. 37, ve které je uvedena změna metylace pro jednotlivé lokusy v jednotlivých studovaných mutantech v porovnání s WT.

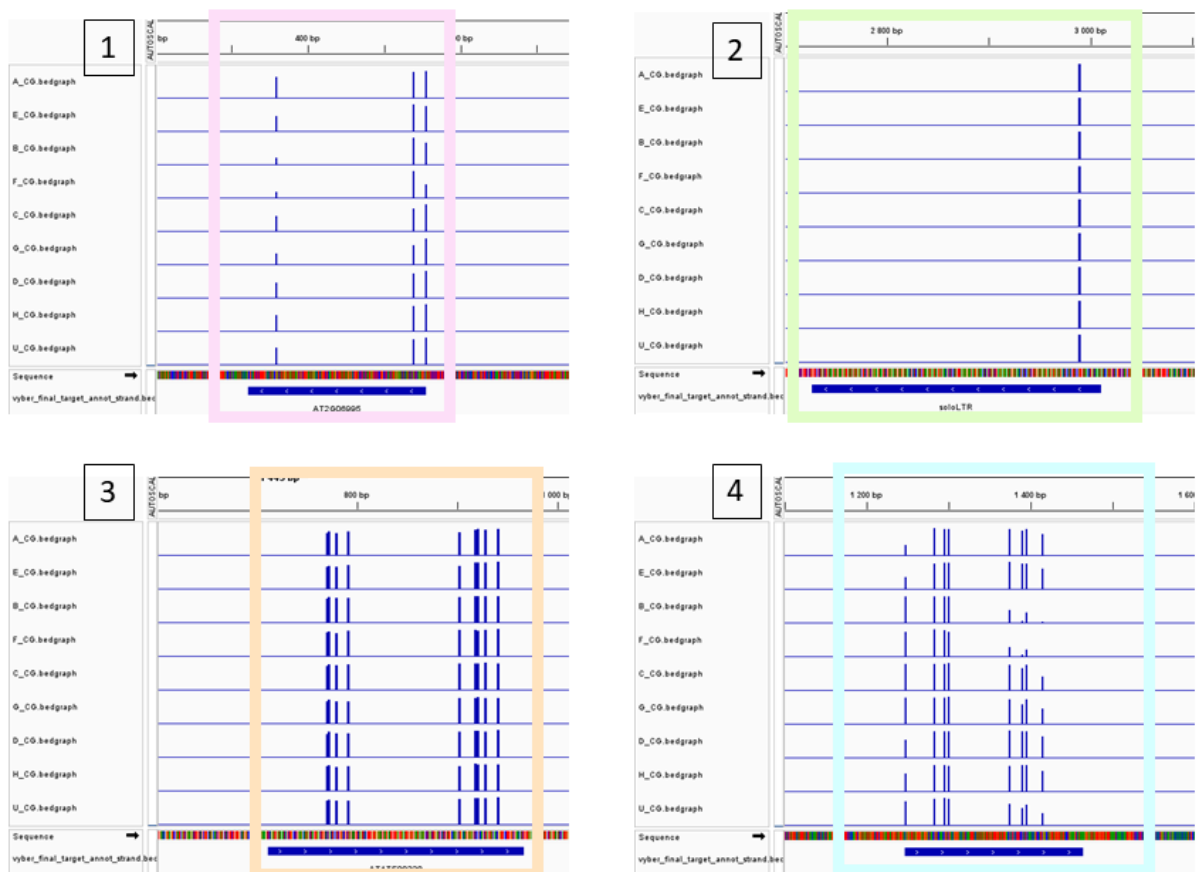
Průměrná metylace v lokusech					
lokusy	kontext	WT	nrpe1	nrpe1ΔAh	spt6lΔAh
AT2G06995	CG	63,67%	1,45%	14,90%	34,07%
AT2G06995	CHG	41%	1%	3%	32%
AT2G06995	CHH	58%	1%	1%	65%
AT5TE35950	CG	91,62%	28,07%	38,52%	91,43%
AT5TE35950	CHG	77%	8%	9%	79%
AT5TE35950	CHH	19%	4%	3%	17%
AT1TE00220	CG	85,42%	89,25%	88,63%	87,74%
AT1TE00220	CHG	60%	44%	48%	61%
AT1TE00220	CHH	33%	1%	1%	34%
AT1G24490	CG	84,17%	52,69%	83,01%	88,66%
AT1G24490	CHG	80%	2%	7%	85%
AT1G24490	CHH	74%	11%	1%	80%

Tab. 36: procentuální zastoupení míry metylace DNA ve studovaných genotypech. Data byla spočítána zprůměrováním dat o zastoupení metylace v obou replikách jednotlivých genotypů

lokusy	CG kontext			CHG kontext			CHH kontext		
	nrpe1	nrpe1ΔAh	spt6lΔAh	nrpe1	nrpe1ΔAh	spt6lΔAh	nrpe1	nrpe1ΔAh	spt6lΔAh
AT2G06995	snížená	snížená	snížená	snížená	snížená	snížená	snížená	snížená	zvýšená
AT5TE35950	snížená	snížená	nezměněná	snížená	snížená	nezměněná	snížená	snížená	nezměněná
AT1TE00220	zvýšená	zvýšená	zvýšená	snížená	snížená	nezměněná	snížená	snížená	nezměněná
AT1G24490	snížená	nezměněná	zvýšená	snížená	snížená	zvýšená	snížená	snížená	zvýšená

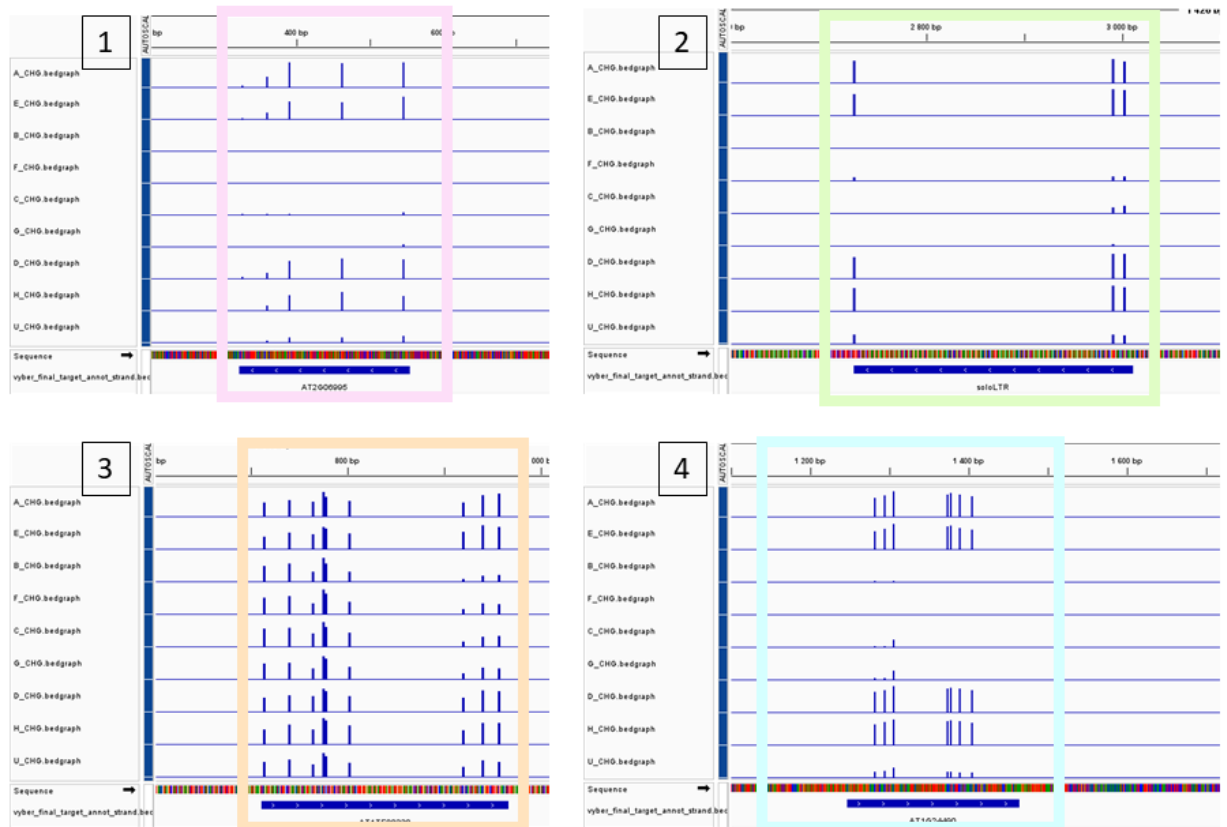
Tab. 37: popis změny metylace v mutantech v porovnání s WT. Zeleně vyznačena snížená úroveň metylace, červeně zvýšená, černě nezměněná (do nezměněné se počítá do 2 % odlišnosti).

Z dat uvedených v tabulkách 36 a 37 je patrné, že v lokusu AT2G06995 je metylace snížena ve všech mutantních genotypech kromě *spt6lΔAh* v CHH kontextu. V lokusu AT5TE35950 je metylace snížena vždy, krom v mutantu v *spt6lΔAh* ve všech kontextech. V lokusu AT1TE00220 je metylace zvýšená ve všech mutantech v CG kontextu a ve všech kontextech v mutantu *spt6l* není snížena. V lokusu AT1G24490 je metylace snížena vždy, krom všech kontextů v *spt6lΔAh*.

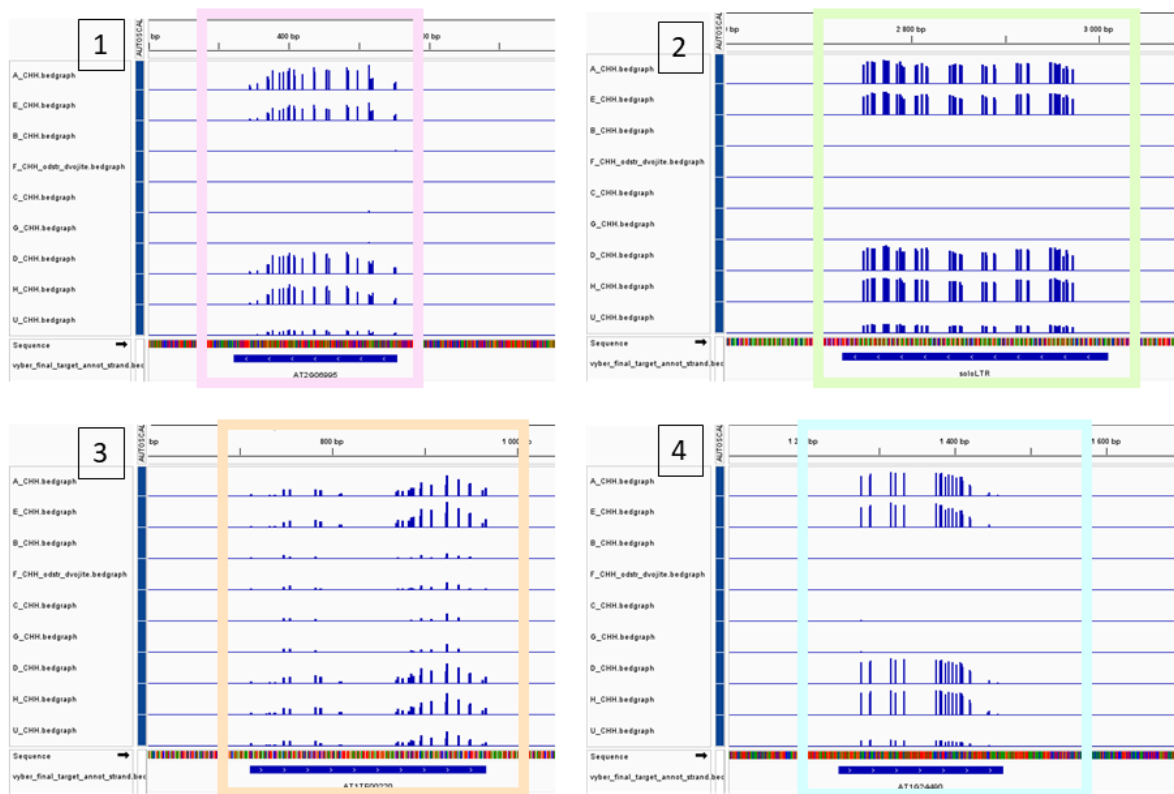


Obr. 26: míra metylace pozorovaná v CG kontextu. 1 – lokus AT2606995, 2 – lokus AT5TE35950, 3 – lokus ATITE00220, 4 – lokus AT1G24490. Pořadí řádků je vždy vzorek s barkódem WT (A, E), *nrpe1* (B, F), *nrpe1ΔAh* (C, G), *spt6lΔAh* (D, H) a nezařazené sekvence (U).

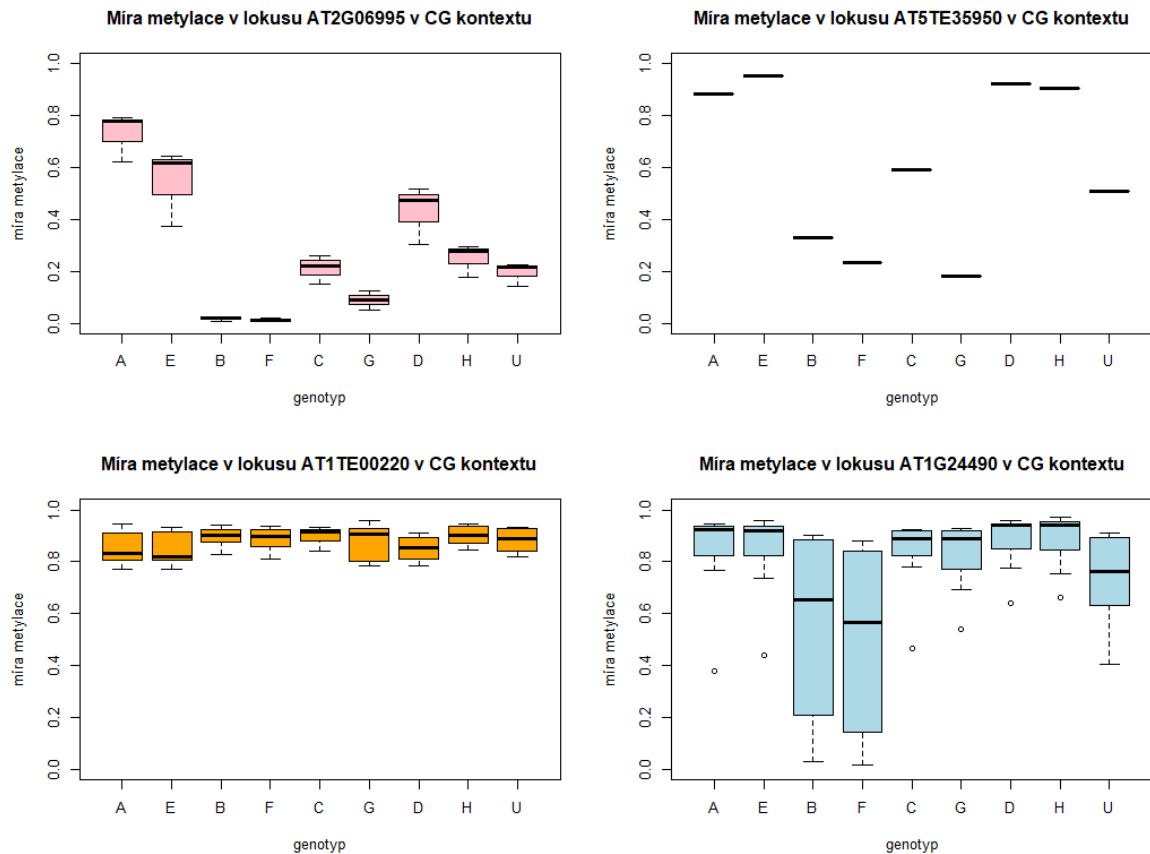
Na obrázku 26 zobrazujícím míru metylace v jednotlivých lokusech v CG kontextu je patrné, že nejméně byla ovlivněna metylace v lokusu AT1TE00220, naopak nejvíce ovlivněná je metylace v lokusu AT1G24490. Na obrázku 27 zobrazujícím míru metylace v jednotlivých lokusech v CHG kontextu je překvapivý razantní úbytek metylace v lokusu AT1G24490 v *nrpe1ΔAh* mutantovi. Na obrázku 28 zobrazujícím míru metylace v jednotlivých lokusech v CHH kontextu je vidět výrazné snížení metylace v *nrpe1* a *nrpe1ΔAh* mutantovi, a naopak úroveň metylace v *spt6lΔAh* téměř srovnatelná s WT.



Obr. 27: míra metylace pozorovaná v CHG kontextu. 1 – lokus AT2606995, 2 – lokus AT5TE35950, 3 – lokus ATITE00220, 4 – lokus AT1G24490. Pořadí řádků je vždy vzorek s barkódem WT (A, E), *nrpe1* (B, F), *nrpe1ΔAh* (C, G), *spt61ΔAh* (D, H) a nezařazené sekvence (U).

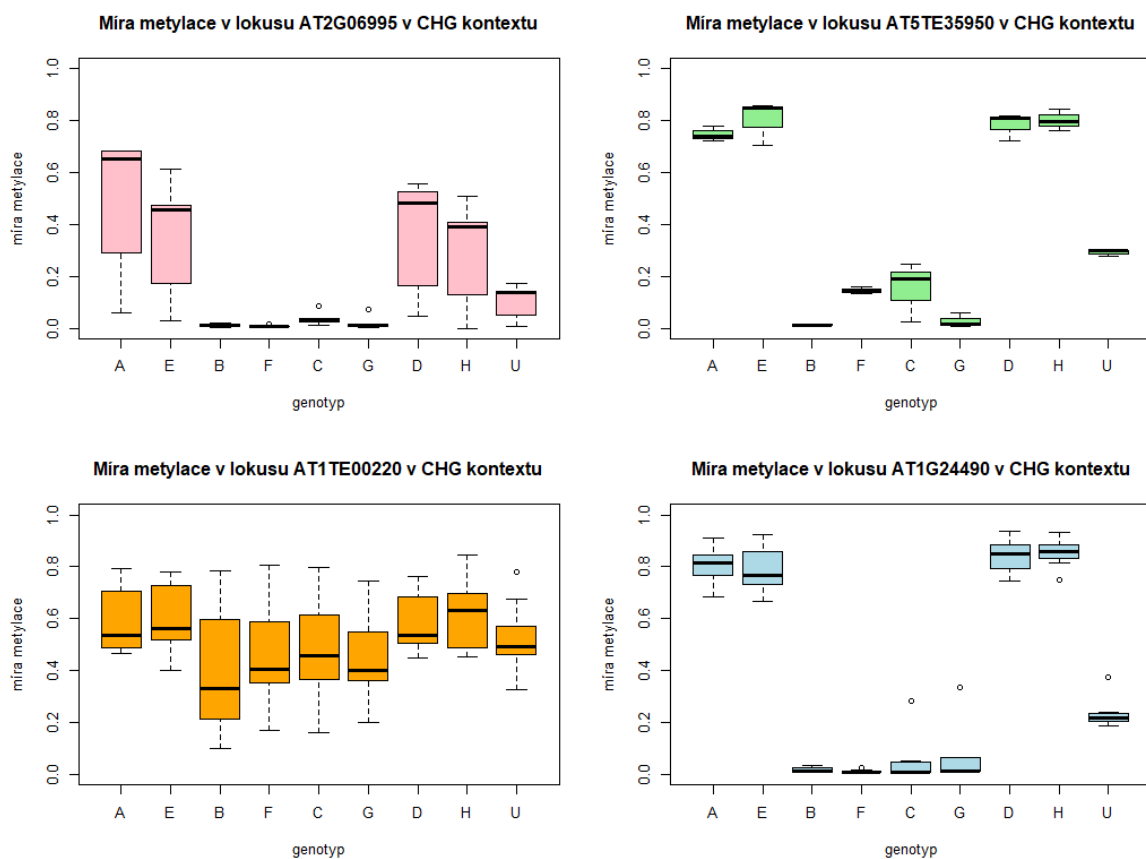


Obr. 28: míra metylace pozorovaná v CHH kontextu. 1 – lokus AT260695, 2 – lokus AT5TE35950, 3 – lokus ATITE00220, 4 – lokus AT1G24490. Pořadí řádků je vždy vzorek s barkódem WT (A, E), *nrpe1* (B, F), *nrpe1ΔAh* (C, G), *spt6lΔAh* (D, H) a nezařazené sekvence (U).



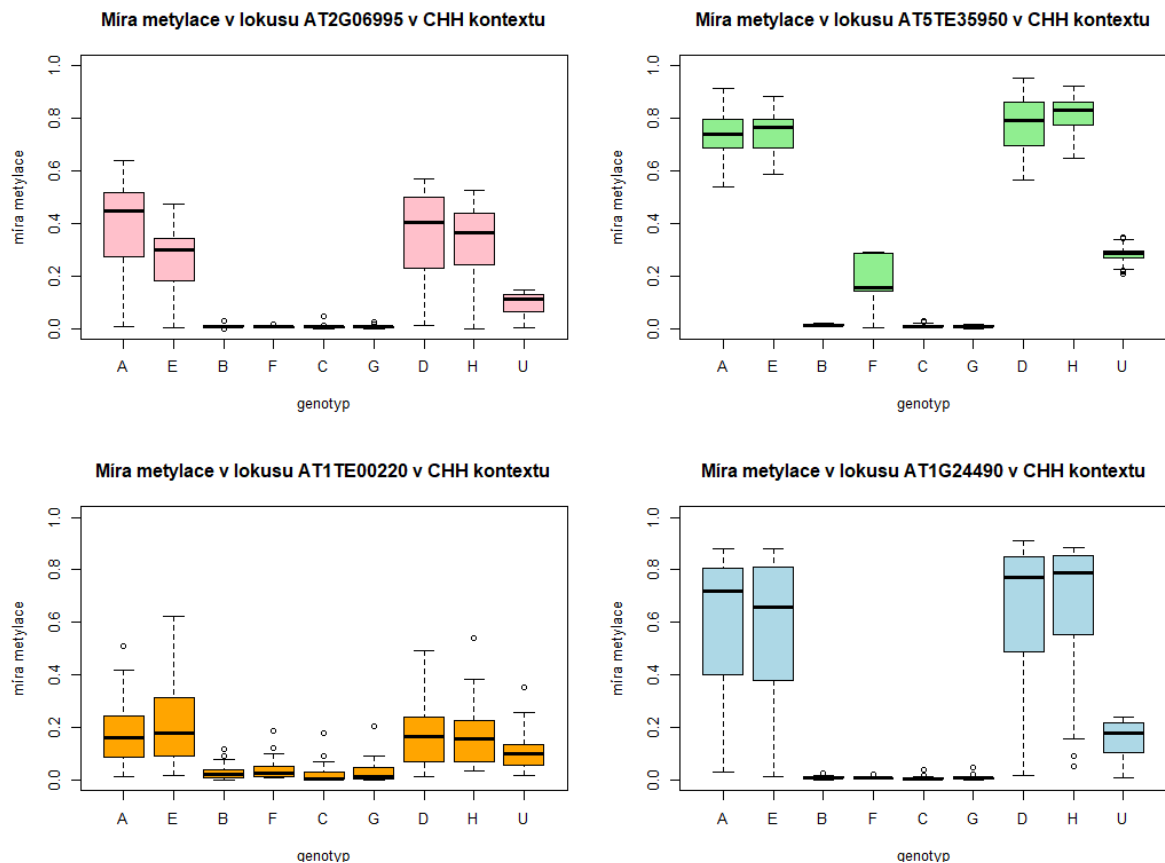
graf 2: Boxploty zachycující míru metylace cytosinů v CG kontextu. Růžově znázorněna metylace v lokusu AT2G06995, zeleně v lokusu AT5TE35950, oranžově v lokusu AT1TE00220 a modře v lokusu AT1G24490. Horizontální přímka v boxech značí medián, střední krabicová část je seshora ohraničena 3. kvartilem, zespodu 1. kvartilem. Vertikální úsečky vyjadřují variabilitu dat pod prvním a nad třetím kvartilem. Tečky značí odlehlé hodnoty pozorování.

Z boxplotů zachycujících míru metylace v CG kontextu (viz graf 2) je patrné, že s výjimkou WT v AT2G069995 a *nripe1ΔAh* v AT5TE35950 si míra metylace v replikách odpovídá. Zmíněná nerovnoměrnost v datech je zřejmě způsobena převážně nízkým počtem cytosinů (v sekvenované oblasti AT5TE35950 je pouze jeden cytosin a v AT2G06695 jsou pouze 3 cytosiny v CG kontextu).



graf 3: Boxploty zachycující míru metylace v CHG kontextu. Růžově znázorněna metylace v lokusu AT2G06995, zeleně v lokusu AT5TE35950, oranžově v lokusu AT1TE00220 a modře v lokusu AT1G24490. Horizontální příčka v boxech značí medián, střední krabicová část je ohraničena 3. kvartilem, zespodu 1. kvartilem. Vertikální úsečky vyjadřují variabilitu dat pod prvním a nad třetím kvartilem. Tečky značí odlehle hodnoty pozorování.

Z boxplotů zachycujících míru metylace v CHG kontextu (viz graf 3) je patrné, že s výjimkou v nrpe1 v AT5TE35950 si míra metylace v replikách odpovídá. V lokusu AT5TE35950 byly v sekvenování oblasti pouze 3 cytosiny na CHG kontext, tato data je opět třeba brát s rezervou.



graf 4: Boxploty zachycující míru metylace v CHH kontextu. Růžově znázorněna metylace v lokusu AT2G06995, zeleně v lokusu AT5TE35950, oranžově v lokusu AT1TE00220 a modře v lokusu AT1G24490. Horizontální příčka v boxech značí medián, střední krabicová část je ohraničena 3. kvartilem, zespodu 1. kvartilem. Vertikální úsečky vyjadřují variabilitu dat pod prvním a nad třetím kvartilem. Tečky značí odlehlé hodnoty pozorování.

Z boxplotů zachycujících míru metylace v CHH kontextu (viz graf 4) je patrné, že s výjimkou v *nrpel* v AT5TE35950 (vybočuje i v CHG kontextu) si míra metylace v replikách odpovídá. Z dat vyplývá, že v lokusu AT2G06995 oproti ve WT metylace v *nrpel* a *nrpelΔAh* není téměř žádná. Toto zjištění je v souladu s předpokladem (viz kapitola 4.4.1). Je ovšem zajímavé, že je obdobně vysoká míra metylace ve WT a v *spt6lΔAh*. V lokusu AT1G24490 platí to samé, co pro lokus AT2G06995. V lokusu AT1TE00220 je celková míra metylace nižší, opět je pozorováno snížení metylace v *nrpel* a *nrpelΔAh*, které bylo předpokládáno. Úroveň metylace v *spt6lΔAh* a WT je opět v podstatě stejná. V lokusu AT2G06995 platí to samé, co pro lokus AT1TE00220. Zajímavým výstupem je vysoká míra metylace v *spt6lΔAh* mutantech.

5. Diskuse

Protein Argonaut hraje centrální roli v RdDM dráze, neboť interaguje s sRNA, nascentním transkriptem Pol V, komponentami Pol V komplexu a metyltransferázou DRM2 (Chan et al., 2005; Matzke & Mosher, 2014). S AGO proteiny jsou schopné některé podjednotky Pol V komplexu interagovat prostřednictvím specifických AGO-vazebných domén, tzv. AGO-hooků. Vzhledem k důležitosti AGO proteinu pro RdDM dráhu jsme se rozhodli studovat význam AGO-hooků na proteinech, které se této dráhy účastní. Hlavní hypotézou, na které má práce stojí, zní, že pro RdDM jsou důležité AGO-hooky na proteinech NRPE1, SPT5L a SPT6L, přičemž role posledního z nich byla nedávno objevena na řešitelském pracovišti (Čermák et al., in preparation). Hypotéza rovněž předpokládá, že zastupitelnost a potřebnost jednotlivých AGO-hooků pro metylaci DNA se liší mezi jednotlivými lokusy. Hlavním cílem práce bylo prozkoumat důležitost jednotlivých AGO-hooků v různých lokusech a vliv jejich absence na úroveň metylace.

Prvním podcílem proto bylo vytvoření mutantních rostlin bez těchto AGO-hooků: *nrpe1ΔAh* a *spt5lΔAh spt6lΔAh* (delece AGO-hooku v SPT5L v *spt6lΔAh* mutantu, kterého již dříve vytvořil V. Čermák). Mutanti byly vytvářeny prostřednictvím CRISPR/Cas9 mutagenese, přičemž bylo cíleno na odstranění jednotlivých AGO-hooků tak, aby byly odstraněny veškeré WG/GW motivy (tolerance 1), které jsou pro roli AGO-hooku esenciální. Tento princip mutagenese byl nový oproti předchozím používaným mutantům ve studovaných proteinech v *Arabidopsis thaliana* - Wendteho mutant v *nrpe1d1251-1651* byl vytvořen dle Chiu et al., 2004 metodou SLIM (místně řízená mutagenese nezávislá na ligáze, Wendte et al., 2017). SLIM metoda spočívá ve složení a amplifikaci PCR produktu na základě 4 primerů (2 dlouhé a 2 krátké), následném enzymatickém štěpení enzymem *DpnI* a hybridizací, výsledný produkt se používá k transformaci kompetentních bakterií *E. coli*. Oproti využití CRISPR/Cas9 je tato metoda problematická v omezené délce možné delece a potřebě specifických míst pro gRNA, krizovým místem metody může být i potřeba navržení čtyř primerů pro přípravu potřebných konstruktů. Dalším, kdo připravoval RdDM mutanty byl Lahmy, který tvořil částečné mutanty v proteinech NRPE1 a SPT5L. Využíval jinou strategii mutagenese, v NRPE1 zaměňoval region 1258-1708 za multimery WG nebo AG motivy (použitý Alanin na rozdíl od Tryptofanu neumožňuje vazbu AGO), v SPT5L byly konstrukty založeny na genomickém fragmentu obsahujícím SPT5L promotor a ORF bez AGO-hooku (Lahmy et al., 2016). Oproti zmiňovaným dvěma metodám je námi používaný CRISPR/Cas9 systém jednodušší na provedení a je možné jím deletovat specifické navržené sekvence s přesností na 1 nt (v závislosti na konkrétní gRNA), ve vysokém procentu případů nedochází k porušení čtecího rámce. Další výhodou je poměrně snadné odkřížení CRISPR kazety po provedené mutagenesi, čímž je zavedena stabilní mutantní linie.

Příprava gRNA vycházela z prací Wang et al., 2015 a Xing et al., 2014. Při navrhování dvojic gRNA bylo bráno v potaz hlavně specifity score a activity score. Všechny 4 získané CRISPR kazety byly proto použity na mutagenезi pro zvýšení šance na získání mutantů.

Mutagenезe rostlin *A. thaliana* byla navržena, s ohledem na časovou náročnost, tak, že CRISPR kazeta s gRNA pro NRPE1 se zanášela do WT rostlin a CRISPR kazeta s gRNA pro SPT5L do *spt6 Δ Ah* rostlin (dříve vytvořeny Vojtěchem Čermákem). Cílem bylo křížit získané T1 mutanty s cílem zisku všech kombinací AGO-hookových mutantů jednoduchých, dvojitých, trojitého mutantu a WT. Tento plán se ovšem ukázal jako problematický, neboť bylo obtížné získat již dvojitého *spt5 Δ Ah spt6 Δ Ah* mutantu. Z důvodu komplikací při přípravě *spt5 Δ Ah spt6 Δ Ah* mutantu se ke křížení používaly T2 (*nrpe1 Δ Ah*), respektive T3 (*spt5 Δ Ah spt6 Δ Ah*) rostliny.

I přes to, že sekvenace potvrdila mutaci alespoň v jedné alele v rostlinách značených A3Z, A9Z, A13, B5P a B6Z, tak se v jejich potomstvu opakovaně nedařilo mutanty získat. Při prvním pokusu o genotypování T2 generace (potomstvo B6Z, A9Z, A13) se ukázalo problematickým protrhání rostlin na základě přítomnosti GFP fluorescence (značící přítomnost CRISPR kazety), přičemž vysegregování CRISPR kazety je esenciální pro tvořenou mutantní linii (aby již nemohla mutovat po zkřížení a bylo možné získat i single mutanty). Po protrhání rostlin totiž v potomstvu nezbyla žádná mutantní rostlina. Vysvětlením by mohlo být, že i přes potvrzení genotypováním a sekvenací se nejednalo o mutantní linie a po odstranění CRISPR kazety to pouze vyšlo najevo. Mutace mohla být přítomna pouze v části rostliny, ze které byla vyizolovaná DNA (v listu). Pokud by totiž nedošlo k mutaci na úrovni generativních buněk, nemusela by se mutace objevovat v další generaci. Toto vysvětlení by rovněž vysvětlovalo, proč se v dalších generacích podařilo získat pouze GFP pozitivní mutanty, jelikož tím, že stále měli přítomnou CRISPR kazetu, mohli dodatečně zmutovat.

Při druhém pokusu T2 generace bylo vyseto potomstvo sekvenovaných rostlin (A3Z, B5P a B6Z), navíc byli přidáni potomci A4P, A6, A16 s B4. V případě těchto rostlin nebyl brán zřetel na přítomnost CRISPR kazety, rostliny byly pouze rozděleny do dvou skupin „svítící“ a „nesvítící“. V rámci těchto rostlin byli pozorováni svítící (4) i nesvítící (5) heterozygoti a 5 svítících homozygotů (zjištěno pomocí PCR, viz obr. 32 v příloze), mutace se objevovaly výhradně v potomstvu rostlin B6Z a A4. Z takto nízkých počtů mutantů by se opět dalo usuzovat, že mnozí rodiče ve skutečnosti nebyli mutantní.

V T3 generaci byly vyseti potomci nesvítící heterozygotní rostliny B6-8 \emptyset (\emptyset používáno jako symbol pro nesvítící rostliny). Genotypování ovšem odhalilo, že se v potomstvu vyskytovali pouze heterozygoti (4) a WT (19, viz obr. 34 v příloze). PCR se navíc pro heterozygotní rostliny nepodařila zopakovat. Nabízí se několik vysvětlení; rostlina B6-8 \emptyset byla chimerická, což by umožňovalo z části květů získat mutantní potomstvo a z jiných pouze WT. Druhým

navazujícím vysvětlením by bylo, že rostliny, které byly WT a zároveň potomkem B6-8 \emptyset , sice neměly svítící fenotyp, ale CRISPR kazetu nevyštěpily a mohly tak dále mutovat (došlo by pouze k umlčení exprese GFP). Mohly by tak vznikat heterozygotní mutanti v potomstvu WT rostlin se stále přítomnou CRISPR kazetou. Posledním vysvětlením by mohlo být, že při první PCR vznikl pouze náhodný produkt o shodné délce s požadovaným specifickým produktem a ve druhé PCR se tento jev neopakoval a všechny rostliny tak mohly být WT.

3 generace byla z toho důvodu vyseta znovu, tentokrát byly jako rodičovské rostliny použity homozygoti B6-6 a B6-8 (ze skupiny svítících). V potomstvu těchto rostlin byly detekovány 4 heterozygoti (B6-6-7, B6-6-4o, B6-8-7 a B6-8-9o) a 2 homozygoti (B6-6-4 a B6-6-8) z celkových 12 rostlin. Homozygotní rostliny byly podrobeny enzymatickému štěpení, které potvrdilo, že se jedná o specifické produkty. PCR na přítomnost CRISPR kazety s gRNA navíc odhalila, že ani jeden homozygot kazetu neobsahoval. Tato dvě ověření vedla k potvrzení, že rostliny B6-6-4 a B6-6-8 jsou skutečně mutantní a vzhledem k absenci CRISPR kazety se dá předpokládat, že i jejich rodič byl skutečně mutantní.

Při navrhování experimentu jsme nepředpokládali, že takové potíže se získáním mutantů mohou nastat. Jelikož byl k zanášení CRISPR kazety používán konstrukt pHEE401E_pUBQ:eGFP, který má Cas9 pod promotorem a enhancerem specifickými pro vaječnou buňku, mělo dojít již v T1 generaci ke stabilnímu zavedení mutace v generativní linii. Jako možné vysvětlení se nabízí, vaječný promotor nebyl tak specifický, jak jsme předpokládali a mohlo tak dojít ke vzniku chimerických rostlin. Vysvětlením by naopak neměla být neživotaschopnost dvojitého mutantu *spt5 Δ Ah spt6 Δ Ah*, neboť je v rámci laboratoře potvrzena životaschopnost mutantu *spt5 Δ spt6 Δ Ah* (transgenní linie), která má na mutovaný organismus větší vliv, než částečná mutace (Čermák et al., in preparation).

Tvorba *nrpe1 Δ Ah* mutantních rostlin probíhala bez větších potíží. V první generaci bylo 5 z 27 heterozygotních (A11L, A15Pr, B1, B2P, B2Z). Nejprve byly sekvenovány pouze rostliny B1, B2P a B2Z, z důvodu špatné kvality vzorků ovšem bylo velmi obtížné získané sekvence namapovat na genom a byly proto osekvenovány rostliny A11L a A15, u kterých genotypování potvrdilo mutaci v jedné alele. Později bylo zjištěno, že ke špatným výtěžkům DNA nízké kvality v rámci práce s rostlinami s NRPE1 kazetou docházelo pravděpodobně z důvodu použití zkaženého chloroformu při izolaci. Přesto bylo primárně pracováno s rostlinami A.

V druhé generaci bylo vysazeno potomstvo rostlin A11L, A15 a B1. Genotypováním došlo ke zjištění, že z celkem 20 rostlin bylo 5 heterozygotních a 12 homozygotních. PCR na přítomnost CRISPR kazety s gRNA v homozygotních vzorcích odhalila, že ani jeden homozygot kazetu neobsahoval. Mutantní rostliny v *nrpe1* byly tedy dle očekávání přítomny již v T1 generaci.

Kříženy byly rostliny B6-6-4 a B6-6-8 (*spt5 Δ Ah spt6 Δ Ah*, T3 generace) s A11-4 a A15-1 (*nrpe1 Δ Ah*, T3 generace), čímž práce na přípravě mutantů v AGO-hoocích prozatím skončila. Původní časový plán nebylo možné dodržet kvůli prodlevám způsobeným potížemi s linií s SPT5L kazetou. V rámci získávání *spt5 Δ Ah spt6 Δ Ah* mutantů bylo nutné dvakrát opakovat celou generaci rostlin a z toho důvodu se nepodařilo stihnout připravit křížené mutanty v době, ve které by se ještě dali použít na bisulfidickou analýzu.

Druhým podcílem bylo zkřížením získaných mutantních rostlin získat možné kombinace mutací v AGO-hooku (viz tab. 28 v kapitole 4.3). Z výše uvedených důvodů se příprava *spt5 Δ Ah spt6 Δ Ah* mutantních rostlin výrazně prodloužila a do diplomové práce se nepodařilo získat všechny požadované mutanty. Tvorbu mutantních linií se podařilo dostat pouze do fáze zkřížení *nrpe1 Δ Ah* a *spt5 Δ Ah spt6 Δ Ah*. Jelikož bylo kříženo převážně přenosem pylu z *nrpe1 Δ Ah* na *spt5 Δ Ah spt6 Δ Ah* (10/12 křížení), není překvapivé, že bylo úspěšnější (7/10 květů vytvořilo šesuli, oproti 0/2 v opačném směru přenosu pylu).

Posledním cílem pak byla analýza metylace DNA získaných mutantů ve vybraných lokusech prostřednictvím bisulfidické analýzy. Tato analýza sloužila jako pilotní pokus pro budoucí hlubší studium vlivu mutace AGO-hooků na celogenomové úrovni. Kvůli problémům při přípravě *spt5 Δ Ah spt6 Δ Ah* mutantů byly použity pouze genotypy existující v době provádění analýzy, tedy WT, *nrpe1*, *nrpe1 Δ Ah* a *spt6 Δ Ah*.

Při výběru vhodných lokusů jsem vycházela z publikovaných dat Stroud et al., 2013 a Wendte et al., 2017, konkrétně jsem používala data pro WT_CHH, *nrpe1*_CHH, *nrpe1d1251-1651*_CHH a *spt5l*_CHH, dále jsem používala data o pokrytí lokusů a SPT6L (Chen et al., 2019; Čermák, v přípravě; Stroud et al., 2013). Zvolená varianta částečné mutace v *nrpe1d1251-1651* a *spt5l* byla zvolena cíleně, kvůli zisku různých lokusů závislých na různých komponentech RdDM dráhy. Knock-out mutant *nrpe1* byl zařazen, jelikož na základě ztráty metylace v *nrpe1* byly selektovány vybírané lokusy.

Lokusy byly vybírány tak, aby v různých lokusech byly pro metylaci DNA různě významné jednotlivé proteiny s AGO-hooky. Toho bylo docíleno tak, že se nejprve vyfiltrovaly lokusy důležité pro RdDM na základě ztráty metylace v *nrpe1* (*nrpe1* hypoCHH DMR data). V rámci těchto lokusů jsem porovnávala metylaci ve WT vůči mutantům *spt5l*, *nrpe1* a *nrpe1d1251-1651*. V tomto souboru lokusů byly následně vybírány konkrétní lokusy prostřednictvím zobrazení dat pomocí programu IGV, přičemž byly hledány lokusy, ve kterých se metylace v pozorovaných genotypech projevovala různě. Byly vybírány lokusy, ve kterých je metylace přítomna pouze ve WT, ve WT a *spt5l*, WT a *nrpe1d1251-1651*, nebo ve WT, *spt5l* a *nrpe1d1251-1651*. Při výběru bylo rovněž sledováno pokrytí proteinem SPT6L. Tímto způsobem byly vybrány čtyři studované

lokusy na pilotní pokus s WT, *nrpe1*, *nrpe1ΔAh* a *spt6ΔAh* DNA vzorky podrobenými bisulfidické konverzi.

Pro výběr lokusů byl použit ze souboru částečných mutantů v NRPE1 publikovaných ve Wendte et al., 2017 cíleně mutant *nrpe1d1251-1651* jakožto mutace odstraňující největší část AGO-hooku, ale zároveň nezasahující do jiných domén proteinu NRPE1. Po mutaci v oblasti 1251-1651 totiž v mutantovi na konci zůstaly dva WG/GW motivy, přičemž tyto dva WG/GW motivy mohou být dostačující pro interakci s AGO proteiny (Elkayam et al., 2017). Oproti tomu mnou navržené delece pokrývají všechny WG/GW motivy v NRPE1 proteinu umístěním (mutace v A variantě je v oblasti 1286-1772 a B V oblasti 1297-1783), v oblasti 1251-1286 se žádný WG/GW motiv nenachází (část pokrytá pouze mutantem *nrpe1d1251--1651*). Zmíněné dva WG/GW motivy by mohly být vysvětlením částečné metylace v *nrpe1d1251--1651* mutantovi v pozorovaných lokusech a metylace o úrovni *nrpe1* mutantu v mnou vytvořených *nrpe1ΔAh* mutantech. Zajímavé je rovněž pozorování, že ponechání pouze dvou WG/GW motivů je dostačující jen pro částečné zachování metylaci, nestačí tedy na plné zachování funkce. Druhým možným vysvětlením vymizení metylace v *nrpe1ΔAh* by mohlo být, že mutací se porušila i jiná funkce NRPE1 proteinu, a proto se chová, jako knock-out *nrpe1*.

V rámci pracoviště byla zavedena nová metoda přípravy vzorků na NGS sekvenování. Podle Herbold et al., 2015 byly navrženy primery na dvě postupné PCR, kdy první primery cílily na pozorovanou oblast lokusu a druhé primery sloužily jako barkódy pro označení PCR produktů z jednotlivých studovaných genotypů. Barkódy umožnily přípravu sekvenační knihovny všech kombinací genotypů a studovaných lokusů z jednoho směšného vzorku, čímž se snížila časová a zejména finanční náročnost. Data získaná z NGS sekvenace směšného vzorku byla podrobena analýze prostřednictvím Galaxy Europe (<https://usegalaxy.eu/>).

V rámci analýzy studovaných lokusů byly pozorovány samostatně kontexty metylace CG, CHG a CHH. Pro kontexty CG a CHG je důležité zmínit, že pro ně není předpokládán výrazný vliv RdDM dráhy, naopak je popisován významný vliv jiných metyltransferáz (MET1 pro CG a CMT3 pro CHG, Du et al., 2012; Lindroth et al., 2001; Pavlopoulou & Kossida, 2007; Zemach et al., 2013). CMT2, která umí navozovat metylaci v CHH kontextu, neovlivňuje metylaci v místech cílených RdDM dráhou (Sasaki et al., 2019).

V rámci analýzy studovaných lokusů bylo pozorováno následující: V CG kontextu se projevy metylace výrazně liší v lokusech AT2G06995 a AT5TE35950, oproti tomu v lokusech AT1TE00220 a AT1G24490 zůstává metylace vysoká ve všech studovaných genotypech (s výjimkou *nrpe1* v AT1G24490, kde je pozorován výrazný rozptyl dat). Z těchto výsledků by se dalo usuzovat, že na CG metylaci na lokusu AT1TE00220 nemá RdDM dráha vliv a na lokusu AT1G24490 pouze minoritní, a že metylace je zde udržována prostřednictvím MET1. Oproti tomu

v lokusech AT2G06995 a AT5TE35950 je vidět výrazný rozdíl mezi studovanými genotypy. Dalo by se tak uvažovat, že RdDM dráha zde hraje důležitou roli pro navození CG metylace DNA. Zvláště pak v AT2G06995 je evidentní, že mutace v *nrpe1* a *nrpe1ΔAh* mají rozdílně intenzivní vliv na metylaci DNA, nejslabší vliv má *spt6lΔAh* mutace. Vzhledem k tomu, že v AT5TE35950 došlo k přečtení pouze jednoho cytosinu v tomto kontextu, je obtížné výsledky interpretovat a nelze je považovat za významné. V případě AT2G06695 byly přečteny pouze 3 cytosiny a rovněž tak nemusely zachytit podstatu věci.

V CHG kontextu je pozorovatelný projev změny metylace DNA v lokusech AT1G24490, AT2G06995 a AT5TE35950. V lokusu AT1TE00220 metylace dosahuje podobných hodnot ve všech studovaných genotypy, i zde je ovšem patrné snížení metylace v *nrpe1* a *nrpe1ΔAh*. V tomto lokusu se tedy pravděpodobně na metylaci podílí převážně metyltransferáza CMT3, která jsou pro CHG kontext typická, a vliv RdDM dráhy na CHG je zde minoritní. Možným vysvětlením snížení metylace v *nrpe1* a *nrpe1ΔAh* je, že se zde RdDM podílí na udržení metylace DNA, a proto v mutantech metylace klesá. Dalším vysvětlením by mohlo být, že se RdDM podílí na navození metylace, a proto je bez AGO-hooku NRPE1 snižena. V ostatních lokusech je viditelný vliv mutace v *nrpe1* a *nrpe1ΔAh*, kde metylace výrazně klesá, oproti tomu metylace v *spt6lΔAh* dosahuje podobných hodnot, jako ve WT. V těchto lokusech zřejmě RdDM dráha hraje výraznou roli v navození a udržení metylace DNA, jelikož se i přes funkci CMT3 drží v hodnotách blízkých nule. Opět je důležité zmínit, že v lokusu AT5TE35950 byly čteny pouze 3 cytosiny a data je nutné brát s rezervou.

Vzhledem k nižší důležitosti RdDM pro CG a CHG kontexty je zajímavé pozorování případů, kdy došlo k výraznému snížení metylace v *nrpe1* a *nrpe1ΔAh* v CG a CHG kontextech. Vysvětlením by ho mohlo být, že tyto CG a CHG kontexty byly v oblasti, která je aktivně demetylovaná v určitém vývojové stádiu a při absenci RdDM není znovu ustanovena ve všech kontextech (Penterman et al., 2007).

V CHH kontextu byl pozorován signifikantní vliv mutace v *nrpe1* a *nrpe1ΔAh* na metylaci DNA. Vzhledem k tomu, že byly lokusy vybírány na základě ztráty metylace v *nrpe1*, tak ztráta metylace v něm není překvapivá. Naopak překvapivé je zjištění, že obdobný pokles metylace se projevil i v *nrpe1ΔAh*, a to i přes to, že mnou navržený NRPE1 mutanti pozbývali celý AGO-hook (všechny CG/GW motivy). Oproti tomu nebyl pozorován vliv *spt6lΔAh* mutace na intenzitu CHH metylace DNA. Možným vysvětlením je, že je projev mutace kompenzován jiným proteinem. Toto tvrzení podporují i data prezentovaná v diplomové práci Tomáše Kašpara, kde byla popsána diferenciální exprese genů v *nrpe1*, *spt6lΔAh* a *nrpe1 spt6lΔAh*. Z těchto dat vyplývá, že *spt6lΔAh* má podobnou genovou expresi jako WT a *nrpe1 spt6lΔAh* má podobnou expresi jako *nrpe1*. Kašparova data jsou ovšem založena pouze na 4 diferenciálně exprimovaných genech, přičemž

jedním z nich je AT2G06995, u kterého jsem pozorovala sníženou míru metylace v CG kontextu. Jako alternativní vysvětlení se nabízí, že má SPT6L v některých vybraných lokusech vliv na RdDM opačný, než jsme předpokládali, tedy že aktivně snižuje úroveň metylace DNA v lokusu a ta proto po jeho mutaci mírně roste.

Pouze v lokusu AT5TE35950 jsme předpokládali, že vliv *spt6LΔAh* mutace nebude mít vliv, neboť v tomto lokusu není SPT6L pokrytí. Zajímavé je také pozorování stejného vlivu mutace *nrpe1* a *nrpe1ΔAh* v lokusu AT2TE00220, jelikož tento lokus byl vybrán kvůli rozdílnému vlivu na metylaci v *nrpe1_CHH* a *nrpe1d1251-1651_CHH*. Jak již bylo rozebráno výše, vliv na tento rozdílný projev má zejména charakter obou částečných mutací.

Výsledky z pilotního pokusu studia vlivu mutací v AGO-hookách na metylaci DNA potvrdily, že nově zavedená metoda funguje, neboť se v případě *nrpe1* mutace podařilo replikovat výsledky (Stroud et al., 2013). Zároveň se částečně potvrdil předpoklad, že AGO-hooky mohou být v jednotlivých lokusech zastupitelné, neboť vliv mutace *spt6LΔAh* se projevil jen mírně a pouze v několika případech. V případě *nrpe1ΔAh* se tento předpoklad potvrdit nepodařilo, neboť ve většině případů metylace výrazně klesla, mnohdy až na úroveň *nrpe1*. Toto zjištění naopak napovídá, že AGO-hook NRPE1 je esenciální a nenahraditelný, minimálně v některých lokusech, což je v rozporu s dříve publikovanými daty (Lahmy et al., 2016; Wendte et al., 2017). Bohužel na základě získaných dat nelze zcela potvrdit či vyvrátit hypotézu, že všechny AGO-hooky jsou alespoň částečně zastupitelné a potřebné pro metylaci DNA, jelikož se nepodařilo v době vypracování diplomové práce získat všechny požadované kombinace mutantů.

6. Závěr

Cílem této práce bylo zjistit roli AGO-hooků proteinů NRPE1, SPT5L a SPT6L v RdDM dráze, jejich význam a možnou zastupitelnost v lokusech. Práce byla členěna do několika podcílů, prvním byla tvorba mutantů bez AGO-hook domény *nrpe1ΔAh* a *spt5lΔAh spt6lΔAh*. Tito mutantů měli být následně kříženi za zisku všech mutantů jednoduchých, dvojitých a trojitých a WT v T1 generaci. Získané mutanty bylo plánováno podrobit bisulfidické konverzi a následné analýze vybraných lokusů v rámci pilotního pokusu, na kterém se bude zakládat další práce s AGO-hook mutanty.

Podářilo se získat *nrpe1ΔAh* a *spt5lΔAh spt6lΔAh* mutanty, bohužel z časových důvodů nebylo pokračováno dál než do bodu jejich křížení. V rámci diplomové práce se tak nepodařilo dodržet cíl zisku všech kombinací mutantů v AGO-hooku.

Analýza *nrpe1*, *nrpe1ΔAh* a *spt6lΔAh* prokázala, že RdDM dráha má význam pro metylaci nejen v CHH kontextu, ale i v CG a CHG kontextech. V rámci pozorování CHH kontextu v daných lokusech došlo ke zjištění, že mutace v *nrpe1* i *nrpe1ΔAh* má velký vliv na přítomnost metylace DNA v pozorovaných lokusech, naopak *spt6lΔAh* mutace měla velmi malý vliv. Na základě pilotního pokusu lze tvrdit, že se role SPT6L AGO-hooku neprojevila, naopak role NRPE1 AGO-hooku se projevila jako esenciální. Pro zodpovězení otázky, jak jsou jednotlivé AGO-hooky zastupitelné je ovšem nutné pozorovat změnu metylace i ve dvojitých mutantech a trojitým mutantovi.

7. Reference

- Agorio, A., & Vera, P. (2007). ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *19*(11), 3778–3790. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.054494>
- Alazem, M., Kim, K. H., & Lin, N. S. (2019). Effects of abscisic acid and salicylic acid on gene expression in the antiviral RNA silencing pathway in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(10). <https://doi.org/10.3390/ijms20102538>
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M., & Carrington, J. C. (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, *121*(2), 207–221. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.004>
- Arif, M. A., Frank, W., & Khraiwesh, B. (2013). Role of RNA interference (RNAi) in the moss *Physcomitrella patens*. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(1), 1516–1540. <https://doi.org/10.3390/ijms14011516>
- Azevedo, J., Cooke, R., & Lagrange, T. (2011). Taking RISCs with Ago hookers. *Current Opinion in Plant Biology*, *14*(5), 594–600. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.07.002>
- Bai, M., Yang, G. S., Chen, W. T., Mao, Z. C., Kang, H. X., Chen, G. H., Yang, Y. H., & Xie, B. Y. (2012). Genome-wide identification of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families and their expression analyses in response to viral infection and abiotic stresses in *Solanum lycopersicum*. *Gene*, *501*(1), 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.02.009>
- Baumberger, N., & Baulcombe, D. C. (2005). *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(33), 11928–11933. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505461102>
- Belmonte, M. F., Kirkbride, R. C., Stone, S. L., Pelletier, J. M., Bui, A. Q., Yeung, E. C., Hashimoto, M., Fei, J., Harada, C. M., Munoz, M. D., Le, B. H., Drews, G. N., Brady, S. M., Goldberg, R. B., & Harada, J. J. (2013). Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the *Arabidopsis* seed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.1222061110>
- Bies-Etheve, N., Pontier, D., Lahmy, S., Picart, C., Vega, D., Cooke, R., & Lagrange, T. (2009). RNA-directed DNA methylation requires an AGO4-interacting member of the SPT5 elongation factor family. *EMBO Reports*, *10*(6), 649–654. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.31>
- Blevins, T., Podicheti, R., Mishra, V., Marasco, M., Wang, J., Rusch, D., Tang, H., & Pikaard, C. S. (2015). Identification of pol IV and RDR2-dependent precursors of 24 nt siRNAs guiding de novo DNA methylation in *Arabidopsis*. *ELife*, *4*(OCTOBER2015), 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.09591>
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., & Banning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO Journal*, *17*(1), 170–180. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.1.170>
- Borges, F., & Martienssen, R. A. (2015a). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(12), 727–741. <https://doi.org/10.1038/nrm4085>

- Borges, F., & Martienssen, R. A. (2015b). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(12), 727–741. <https://doi.org/10.1038/nrm4085>
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P. E., Sunkar, R., & Zhu, J. K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell*, *123*(7), 1279–1291. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.035>
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Schaller, H., Khafif, M., Schott, G., Bendahmane, A., & Voinnet, O. (2012). Isoprenoid biosynthesis is required for miRNA function and affects membrane association of ARGONAUTE 1 in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(5), 1778–1783. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112500109>
- Cerutti, H., & Casas-Mollano, J. A. (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: From protists to man. *Current Genetics*, *50*(2), 81–99. <https://doi.org/10.1007/s00294-006-0078-x>
- Chan, S. W. L., Henderson, I. R., & Jacobsen, S. E. (2005). Gardening the genome: DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *Nature Reviews Genetics*, *6*(5), 351–360. <https://doi.org/10.1038/nrg1601>
- Chapman, E. J., & Carrington, J. C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews Genetics*, *8*(11), 884–896. <https://doi.org/10.1038/nrg2179>
- Chen, C., Shu, J., Li, C., Thapa, R. K., Nguyen, V., Yu, K., Yuan, Z. C., Kohalmi, S. E., Liu, J., Marsolais, F., Huang, S., & Cui, Y. (2019). RNA polymerase II-independent recruitment of SPT6L at transcription start sites in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, *47*(13), 6714–6725. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz465>
- Chen, H. M., Chen, L. T., Patel, K., Li, Y. H., Baulcombe, D. C., & Wu, S. H. (2010). 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(34), 15269–15274. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001738107>
- Chiu, J., March, P. E., Lee, R., & Tillett, D. (2004). Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis (SLIM): a single-tube methodology approaching 100% efficiency in 4 h. *Nucleic Acids Research*, *32*(21). <https://doi.org/10.1093/nar/gnh172>
- Cuerda-Gil, D., & Slotkin, R. K. (2016). Non-canonical RNA-directed DNA methylation. *Nature Plants*, *2*(11). <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.163>
- Daxinger, L., Kanno, T., Bucher, E., Van Der Winden, J., Naumann, U., Matzke, A. J. M., & Matzke, M. (2009a). A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. *EMBO Journal*, *28*(1), 48–57. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.260>
- Daxinger, L., Kanno, T., Bucher, E., Van Der Winden, J., Naumann, U., Matzke, A. J. M., & Matzke, M. (2009b). A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. *EMBO Journal*, *28*(1), 48–57. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.260>
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., & Voinnet, O. (2006). Erratum: Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense (Science (2016)). *Science*, *351*(6271). <https://doi.org/10.1126/science.aaf2336>

- Diezma-Navas, L., Pérez-González, A., Artaza, H., Alonso, L., Caro, E., Llave, C., & Ruiz-Ferrer, V. (2019). Crosstalk between epigenetic silencing and infection by tobacco rattle virus in Arabidopsis. *Molecular Plant Pathology*, *20*(10), 1439–1452. <https://doi.org/10.1111/mpp.12850>
- Du, J., Johnson, L. M., Jacobsen, S. E., & Patel, D. J. (2015). DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(9), 519–532. <https://doi.org/10.1038/nrm4043>
- Du, J., Zhong, X., Bernatavichute, Y. V., Stroud, H., Feng, S., Caro, E., Vashisht, A. A., Terragni, J., Chin, H. G., Tu, A., Hetzel, J., Wohlschlegel, J. A., Pradhan, S., Patel, D. J., & Jacobsen, S. E. (2012). Dual binding of chromomethylase domains to H3K9me2-containing nucleosomes directs DNA methylation in plants. *Cell*, *151*(1), 167–180. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.034>
- Duan, C., Zhang, H., Tang, K., Zhu, X., Qian, W., Hou, Y., Wang, B., Lang, Z., Zhao, Y., Wang, X., Wang, P., Zhou, J., Liang, G., Liu, N., Wang, C., & Zhu, J. (2015). Specific but interdependent functions for Arabidopsis AGO 4 and AGO 6 in RNA-directed DNA methylation. *The EMBO Journal*, *34*(5), 581–592. <https://doi.org/10.15252/embj.201489453>
- Ebbs, M. L., Bartee, L., & Bender, J. (2005). H3 Lysine 9 Methylation Is Maintained on a Transcribed Inverted Repeat by Combined Action of SUVH6 and SUVH4 Methyltransferases. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(23), 10507–10515. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.23.10507-10515.2005>
- Elkayam, E., Faehnle, C. R., Morales, M., Sun, J., Li, H., & Joshua-Tor, L. (2017). Multivalent Recruitment of Human Argonaute by GW182. *Molecular Cell*, *67*(4), 646–658.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.07.007>
- El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M. A., Jacobsen, S. E., Cooke, R., & Lagrange, T. (2007). Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes and Development*, *21*(20), 2539–2544. <https://doi.org/10.1101/gad.451207>
- Endo, Y., Iwakawa, H. O., & Tomari, Y. (2013). Arabidopsis ARGONAUTE7 selects miR390 through multiple checkpoints during RISC assembly. *EMBO Reports*, *14*(7), 652–658. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.73>
- Erdmann, R. M., & Picard, C. L. (2020a). RNA-directed DNA Methylation. In *PLoS Genetics* (Vol. 16, Issue 10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009034>
- Erdmann, R. M., & Picard, C. L. (2020b). RNA-directed DNA Methylation. In *PLoS Genetics* (Vol. 16, Issue 10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009034>
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, *32*(19), 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Eystathiou, T., Chan, E. K. L., Tenenbaum, S. A., Keene, J. D., Griffith, K., & Fritzler, M. J. (2002). *Mol Biol Cell* 2002 Eystathiou. *13*(April), 1–14. <https://doi.org/10.1091/mbc.01>
- Fang, X., & Qi, Y. (2016). RNAi in plants: An argonaute-centered view. *Plant Cell*, *28*(2), 272–285. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00920>

- Fei, Q., Xia, R., & Meyers, B. C. (2013). Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *Plant Cell*, 25(7), 2400–2415. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114652>
- Fei, Q., Yang, L., Liang, W., Zhang, D., & Meyers, B. C. (2016). Dynamic changes of small RNAs in rice spikelet development reveal specialized reproductive phasiRNA pathways. *Journal of Experimental Botany*, 67(21), 6037–6049. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw361>
- Feinbaum, R., Ambros, V., & Lee, R. (1993). The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*, 116(116), 843–854.
- Finnegan, E. J., & Matzke, M. A. (2003). The small RNA world. *Journal of Cell Science*, 116(23), 4689–4693. <https://doi.org/10.1242/jcs.00838>
- Fusaro, A. F., Matthew, L., Smith, N. A., Curtin, S. J., Dedic-Hagan, J., Ellacott, G. A., Watson, J. M., Wang, M. B., Brosnan, C., Carroll, B. J., & Waterhouse, P. M. (2006). RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *EMBO Reports*, 7(11), 1168–1175. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400837>
- Garcia, D., Garcia, S., Pontier, D., Marchais, A., Renou, J. P., Lagrange, T., & Voinnet, O. (2012). Ago Hook and RNA Helicase Motifs Underpin Dual Roles for SDE3 in Antiviral Defense and Silencing of Nonconserved Intergenic Regions. *Molecular Cell*, 48(1), 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.028>
- Ghildiyal, M., & Zamore, P. D. (2009). Small silencing RNAs: An expanding universe. *Nature Reviews Genetics*, 10(2), 94–108. <https://doi.org/10.1038/nrg2504>
- Girardot, C., Scholtalbers, J., Sauer, S., Su, S. Y., & Furlong, E. E. M. (2016). Je, a versatile suite to handle multiplexed NGS libraries with unique molecular identifiers. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1284-2>
- Gu, X. L., Wang, H., Huang, H., & Cui, X. F. (2012). SPT6L encoding a putative WG/GW-repeat protein regulates apical-basal polarity of embryo in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 5(1), 249–259. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr073>
- Harvey, J. J. W., Lewsey, M. G., Patel, K., Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, J. P., & Baulcombe, D. C. (2011). An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS ONE*, 6(1), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014639>
- Havecker, E. R., Wallbridge, L. M., Hardcastle, T. J., Bush, M. S., Kelly, K. A., Dunn, R. M., Schwach, F., Doonan, J. H., & Baulcombe, D. C. (2010). The *Arabidopsis* RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell*, 22(2), 321–334. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072199>
- He, X. J., Hsu, Y. F., Zhu, S., Wierzbicki, A. T., Pontes, O., Pikaard, C. S., Liu, H. L., Wang, C. S., Jin, H., & Zhu, J. K. (2009). An Effector of RNA-Directed DNA Methylation in *Arabidopsis* Is an ARGONAUTE 4- and RNA-Binding Protein. *Cell*, 137(3), 498–508. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.028>
- Henderson, I. R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B. C., Green, P. J., & Jacobsen, S. E. (2006). Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nature Genetics*, 38(6), 721–725. <https://doi.org/10.1038/ng1804>
- Herbold, C. W., Pelikan, C., Kuzyk, O., Hausmann, B., Angel, R., Berry, D., & Loy, A. (2015). A flexible and economical barcoding approach for highly multiplexed amplicon sequencing of

- diverse target genes. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUL), 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00731>
- Hernández-Lagana, E., Rodríguez-Leal, D., Lúa, J., & Vielle-Calzada, J. P. (2016). A multigenic network of ARGONAUTE4 clade members controls early megaspore formation in arabidopsis. *Genetics*, 204(3), 1045–1056. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.188151>
- Huang, Y., Kendall, T., Forsythe, E. S., Dorantes-Acosta, A., Li, S., Caballero-Pérez, J., Chen, X., Arteaga-Vázquez, M., Beilstein, M. A., & Mosher, R. A. (2015). Ancient origin and recent innovations of RNA polymerase IV and V. *Molecular Biology and Evolution*, 32(7), 1788–1799. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv060>
- Hunter, C., Sun, H., & Poethig, S. (2003). The Arabidopsis Heterochronic Gene ZIPPY Is an ARGONAUTE Family Member. *Current Biology*, 13, ARTMED1118.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.09.004>
- Hunter, C., Willmann, M. R., Wu, G., Yoshikawa, M., Gutiérrez-Nava, M. de la L., & Poethig, R. S. (2006). Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in Arabidopsis. *Development*, 133(15), 2973–2981.
<https://doi.org/10.1242/dev.02491>
- Iwasaki, M., Hyvärinen, L., Piskurewicz, U., & Lopez-Molina, L. (2019). Non-canonical RNA-directed DNA methylation participates in maternal and environmental control of seed dormancy. *eLife*, 8, 1–17. <https://doi.org/10.7554/eLife.37434>
- Jackson, J. P., Johnson, L., Jasencakova, Z., Zhang, X., PerezBurgos, L., Singh, P. B., Cheng, X., Schubert, I., Jenuwein, T., & Jacobsen, S. E. (2004). Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in Arabidopsis thaliana. *Chromosoma*, 112(6), 308–315. <https://doi.org/10.1007/s00412-004-0275-7>
- Jackson, J. P., Lindroth, A. M., Cao, X., & Jacobsen, S. E. (2002). Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 416(6880), 556–560. <https://doi.org/10.1038/nature731>
- Jaubert, M., Bhattacharjee, S., Mello, A. F. S., Perry, K. L., & Moffett, P. (2011). ARGONAUTE2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against potato virus X in arabidopsis. *Plant Physiology*, 156(3), 1556–1564. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178012>
- Ji, L., Liu, X., Yan, J., Wang, W., Yumul, R. E., Kim, Y. J., Dinh, T. T., Liu, J., Cui, X., Zheng, B., Agarwal, M., Liu, C., Cao, X., Tang, G., & Chen, X. (2011). ARGONAUTE10 and ARGONAUTE1 regulate the termination of floral stem cells through two microRNAs in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, 7(3), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001358>
- Jullien, P. E., Grob, S., Marchais, A., Pumplin, N., Chevalier, C., Bonnet, D. M. V., Otto, C., Schott, G., & Voinnet, O. (2020). Functional characterization of Arabidopsis ARGONAUTE 3 in reproductive tissues. *Plant Journal*, 103(5), 1796–1809.
<https://doi.org/10.1111/tpj.14868>
- Kapoor, M., Arora, R., Lama, T., Nijhawan, A., Khurana, J. P., Tyagi, A. K., & Kapoor, S. (2008). Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice. *BMC Genomics*, 9, 1–17.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-451>
- Karlowski, W. M., Zielezinski, A., Carrère, J., Pontier, D., Lagrange, T., & Cooke, R. (2010). Genome-wide computational identification of WG/GW Argonaute-binding proteins in

- Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 38(13), 4231–4245.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq162>
- Kwak, P. B., & Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature Structural and Molecular Biology*, 35(2), 145–151.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109300>
- Lahmy, S., Pontier, D., Bies-Etheve, N., Laudié, M., Feng, S., Jobet, E., Hale, C. J., Cooke, R., Hakimi, M. A., Angelov, D., Jacobsen, S. E., & Lagrange, T. (2016a). Evidence for ARGONAUTE4–DNA interactions in RNA-directed DNA methylation in plants. *Genes and Development*, 30(23), 2565–2570. <https://doi.org/10.1101/gad.289553.116>
- Lahmy, S., Pontier, D., Bies-Etheve, N., Laudié, M., Feng, S., Jobet, E., Hale, C. J., Cooke, R., Hakimi, M. A., Angelov, D., Jacobsen, S. E., & Lagrange, T. (2016b). Evidence for ARGONAUTE4–DNA interactions in RNA-directed DNA methylation in plants. *Genes and Development*, 30(23), 2565–2570. <https://doi.org/10.1101/gad.289553.116>
- Law, J. A., Du, J., Hale, C. J., Feng, S., Krajewski, K., Palanca, A. M. S., Strahl, B. D., Patel, D. J., & Jacobsen, S. E. (2013). Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1. *Nature*, 498(7454), 385–389. <https://doi.org/10.1038/nature12178>
- Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 204–220.
<https://doi.org/10.1038/nrg2719>
- Lee, C. H., & Carroll, B. J. (2018a). Evolution and Diversification of Small RNA Pathways in Flowering Plants. *Plant & Cell Physiology*, 59(11), 2169–2187.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcy167>
- Lee, C. H., & Carroll, B. J. (2018b). Evolution and Diversification of Small RNA Pathways in Flowering Plants. *Plant & Cell Physiology*, 59(11), 2169–2187.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcy167>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., & Chen, X. (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Current Biology*, 15(16), 1501–1507.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.029>
- Li, Z., Li, W., Guo, M., Liu, S., Liu, L., Yu, Y., Mo, B., Chen, X., & Gao, L. (2022). Origin, evolution and diversification of plant ARGONAUTE proteins. *Plant Journal*, 109(5), 1086–1097. <https://doi.org/10.1111/tpj.15615>
- Liao, Z., Hodén, K. P., Singh, R. K., & Dixelius, C. (2020). Genome-wide identification of Argonautes in Solanaceae with emphasis on potato. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-77593-y>
- Lindroth, A. M., Cao, X., Jackson, J. P., Zilberman, D., McCallum, C. M., Henikoff, S., & Jacobsen, S. E. (2001). Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*, 292(5524), 2077–2080.
<https://doi.org/10.1126/science.1059745>

- Lingel, A., Simon, B., Izaurre, E., & Sattler, M. (2004). Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nature Structural and Molecular Biology*, *11*(6), 576–577. <https://doi.org/10.1038/nsmb777>
- Liu, C., Lu, F., Cui, X., & Cao, X. (2010). Histone methylation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, *61*, 395–420. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.091939>
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., & Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, *305*(5689), 1437–1441. <https://doi.org/10.1126/science.1102513>
- Liu, Z. W., Shao, C. R., Zhang, C. J., Zhou, J. X., Zhang, S. W., Li, L., Chen, S., Huang, H. W., Cai, T., & He, X. J. (2014). The SET Domain Proteins SUVH2 and SUVH9 Are Required for Pol V Occupancy at RNA-Directed DNA Methylation Loci. *PLoS Genetics*, *10*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003948>
- Luo, J., & Hall, B. D. (2007). A multistep process gave rise to RNA polymerase IV of land plants. *Journal of Molecular Evolution*, *64*(1), 101–112. <https://doi.org/10.1007/s00239-006-0093-z>
- Luo, Z., & Chen, Z. (2007). Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. *Plant Cell*, *19*(3), 943–958. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045724>
- Lynn, K., Fernandez, A., Aida, M., Sedbrook, J., Tasaka, M., Masson, P., & Barton, M. K. (1999). The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in Arabidopsis development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene. *Development*, *126*(3), 469–481. <https://doi.org/10.1242/dev.126.3.469>
- Manavella, P. A., Koenig, D., & Weigel, D. (2012). Plant secondary siRNA production determined by microRNA-duplex structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(7), 2461–2466. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200169109>
- Matzke, M. A., & Mosher, R. A. (2014a). RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics*, *15*(6), 394–408. <https://doi.org/10.1038/nrg3683>
- Matzke, M. A., & Mosher, R. A. (2014b). RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics*, *15*(6), 394–408. <https://doi.org/10.1038/nrg3683>
- McCue, A. D., Panda, K., Nuthikattu, S., Choudury, S. G., Thomas, E. N., & Slotkin, R. K. (2015). ARGONAUTE 6 bridges transposable element m RNA -derived si RNA s to the establishment of DNA methylation . *The EMBO Journal*, *34*(1), 20–35. <https://doi.org/10.15252/emj.201489499>
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G. J., & Qi, Y. (2008). Sorting of Small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell*, *133*(1), 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.034>
- Minoia, S., Carbonell, A., Di Serio, F., Gisel, A., Carrington, J. C., Navarro, B., & Flores, R. (2014). Specific Argonautes Selectively Bind Small RNAs Derived from Potato Spindle Tuber Viroid and Attenuate Viroid Accumulation In Vivo. *Journal of Virology*, *88*(20), 11933–11945. <https://doi.org/10.1128/jvi.01404-14>

- Montgomery, T. A., Howell, M. D., Cuperus, J. T., Li, D., Hansen, J. E., Alexander, A. L., Chapman, E. J., Fahlgren, N., Allen, E., & Carrington, J. C. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell*, *133*(1), 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.033>
- Morel, J. B., Godon, C., Mourrain, P., Béclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., & Vaucheret, H. (2002). Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell*, *14*(3), 629–639. <https://doi.org/10.1105/tpc.010358>
- Nakanishi, K. (2022). Critical reviews and perspectives anatomy of four human Argonaute proteins. *Nucleic Acids Research*, *50*(4), 6618–6638.
- Neumeier, J., & Meister, G. (2021). siRNA Specificity: RNAi Mechanisms and Strategies to Reduce Off-Target Effects. *Frontiers in Plant Science*, *11*(January), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.526455>
- Nuthikattu, S., McCue2, A. D., Panda, K., Fultz, D., DeFraia, C., Thomas, E. N., & Slotkin, R. K. (2013). The Initiation of Epigenetic Silencing of Active Transposable Elements Is Triggered by RDR6 and 21-22 Nucleotide Small Interfering RNAs1. *Plant Cell*, *19*(1), 1–17. <https://doi.org/doi/10.1104/pp.113.216481>
- Oliver, C., Santos, J. L., & Pradillo, M. (2016). Accurate chromosome segregation at first meiotic division requires AGO4, a protein involved in RNA-dependent DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, *204*(2), 543–553. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.189217>
- Olmedo-Monfil, V., Durán-Figueroa, N., Arteaga-Vázquez, M., Demesa-Arévalo, E., Autran, D., Grimanelli, D., Slotkin, R. K., Martienssen, R. A., & Vielle-Calzada, J. P. (2010). Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature*, *464*(7288), 628–632. <https://doi.org/10.1038/nature08828>
- Parent, J. S., Cahn, J., Herridge, R. P., Grimanelli, D., & Martienssen, R. A. (2021). Small RNAs guide histone methylation in *Arabidopsis* embryos. *Genes and Development*, *38*(11–12), 841–846. <https://doi.org/10.1101/gad.343871.120>
- Parker, J. S., Roe, S. M., & Barford, D. (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature*, *434*(7033), 663–666. <https://doi.org/10.1038/nature03462>
- Pavlopoulou, A., & Kossida, S. (2007). Plant cytosine-5 DNA methyltransferases: Structure, function, and molecular evolution. *Genomics*, *90*(4), 530–541. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.06.011>
- Pedersen, B. S., Eyring, K., De, S., Yang, I. V., & Schwartz, D. A. (2014). *Fast and accurate alignment of long bisulfite-seq reads*. 00(00), 1–2. <http://arxiv.org/abs/1401.1129>
- Penterman, J., Zilberman, D., Jin, H. H., Ballinger, T., Henikoff, S., & Fischer, R. L. (2007). DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(16), 6752–6757. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701861104>
- Pien, S., & Grossniklaus, U. (2007). Polycomb group and trithorax group proteins in *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, *1769*(5–6), 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.01.010>

- Pontes, O., Li, C. F., Nunes, P. C., Haag, J., Ream, T., Vitins, A., Jacobsen, S. E., & Pikaard, C. S. (2006). The Arabidopsis Chromatin-Modifying Nuclear siRNA Pathway Involves a Nucleolar RNA Processing Center. *Cell*, *126*(1), 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.031>
- Pontier, D., Picart, C., Roudier, F., Garcia, D., Lahmy, S., Azevedo, J., Alart, E., Laudié, M., Karlowski, W. M., Cooke, R., Colot, V., Voinnet, O., & Lagrange, T. (2012). NERD, a Plant-Specific GW Protein, Defines an Additional RNAi-Dependent Chromatin-Based Pathway in Arabidopsis. *Molecular Cell*, *48*(1), 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.027>
- Qi, Y., He, X., Wang, X. J., Kohany, O., Jurka, J., & Hannon, G. J. (2006). Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, *443*(7114), 1008–1012. <https://doi.org/10.1038/nature05198>
- Qian, Y., Cheng, Y., Cheng, X., Jiang, H., Zhu, S., & Cheng, B. (2011). Identification and characterization of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in maize. *Plant Cell Reports*, *30*(7), 1347–1363. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1046-6>
- Raja, P., Sanville, B. C., Buchmann, R. C., & Bisaro, D. M. (2008). Viral Genome Methylation as an Epigenetic Defense against Geminiviruses. *Journal of Virology*, *82*(18), 8997–9007. <https://doi.org/10.1128/jvi.00719-08>
- Ramírez, F., Ryan, D. P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A. S., Heyne, S., Dündar, F., & Manke, T. (2016). deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W160–W165. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW257>
- Ream, T. S., Haag, J. R., Wierzbicki, A. T., Nicora, C. D., Norbeck, A. D., Zhu, J. K., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., Paša-Tolić, L., & Pikaard, C. S. (2009). Subunit Compositions of the RNA-Silencing Enzymes Pol IV and Pol V Reveal Their Origins as Specialized Forms of RNA Polymerase II. *Molecular Cell*, *33*(2), 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.015>
- Rebolledo-Prudencio, O. G., Estrada-Rivera, M., Dautt-Castro, M., Arteaga-Vazquez, M. A., Arenas-Huertero, C., Rosendo-Vargas, M. M., Jin, H., & Casas-Flores, S. (2022). The small RNA-mediated gene silencing machinery is required in Arabidopsis for stimulation of growth, systemic disease resistance, and suppression of the nitrile-specifier gene NSP4 by *Trichoderma atroviride*. *Plant Journal*, *109*(4), 873–890. <https://doi.org/10.1111/tjp.15599>
- Reinhart, B. J., & Bartel, D. P. (2002). Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science*, *297*(5588), 1831. <https://doi.org/10.1126/science.1077183>
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*, *29*(4), 24–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
- Roussin-Léveillé, C., Silva-Martins, G., Moffett, P., Roussin-Léveillé, C., Silva-Martins, G., & Moffett, P. (2020). ARGONAUTE5 Represses Age-Dependent Induction of Flowering through Physical and Functional Interaction with miR156 in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, *61*(5), 957–966. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa022>
- Sabbione, A., Daurelio, L., Vegetti, A., Talón, M., Tadeo, F., & Dotto, M. (2019). Genome-wide analysis of AGO, DCL and RDR gene families reveals RNA-directed DNA methylation is

- involved in fruit abscission in *Citrus sinensis*. *BMC Plant Biology*, *19*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1998-1>
- Sasaki, E., Kawakatsu, T., Ecker, J. R., & Nordborg, M. (2019). Common alleles of CMT2 and NRPE1 are major determinants of CHH methylation variation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, *15*(12), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008492>
- Schneider, M. D., Najand, N., Chaker, S., Pare, J. M., Haskins, J., Hughes, S. C., Hobman, T. C., Locke, J., & Simmonds, A. J. (2006). Gawky is a component of cytoplasmic mRNA processing bodies required for early *Drosophila* development. *Journal of Cell Biology*, *174*(3), 349–358. <https://doi.org/10.1083/jcb.200512103>
- Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, *305*(5689), 1434–1437. <https://doi.org/10.1126/science.1102514>
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, *507*(7490), 62–67. <https://doi.org/10.1038/nature13011>
- Stroud, H., Greenberg, M. V. C., Feng, S., Bernatavichute, Y. V., & Jacobsen, S. E. (2013). Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the *Arabidopsis* methylome. *Cell*, *152*(1–2), 352–364. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.054>
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., & Watanabe, Y. (2008). The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among Argonaute proteins. *Plant and Cell Physiology*, *49*(4), 493–500. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn043>
- Tang, Z., Xu, M., Cai, J., Ma, X., Qin, J., & Meng, Y. (2019). Transcriptome-wide identification and functional investigation of the RDR2- and DCL3-dependent small RNAs encoded by long non-coding RNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling and Behavior*, *14*(8), 1–8. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1616518>
- The Galaxy Community. (2022). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2020 update. *Nucleic Acids Research*, *48*(W1), W395–W402. <https://doi.org/doi.org/10.1093/nar/gkac247>
- Till, S., Lejeune, E., Thermann, R., Bortfeld, M., Hothorn, M., Enderle, D., Heinrich, C., Hentze, M. W., & Ladurner, A. G. (2007). A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nature Structural and Molecular Biology*, *14*(10), 897–903. <https://doi.org/10.1038/nsmb1302>
- Trujillo, J. T., Beilstein, M. A., & Mosher, R. A. (2016). The Argonaute-binding platform of NRPE1 evolves through modulation of intrinsically disordered repeats. *New Phytologist*, *212*(4), 1094–1105. <https://doi.org/10.1111/nph.14089>
- Tucker, M. R., Okada, T., Hu, Y., Scholefield, A., Taylor, J. M., & Koltunow, A. M. G. (2012). Somatic small RNA pathways promote the mitotic events of megagametogenesis during female reproductive development in *Arabidopsis*. *Development*, *139*(8), 1399–1404. <https://doi.org/10.1242/dev.075390>
- Vaucheret, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science*, *13*(7), 350–358. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.04.007>

- Vazquez, F., Blevins, T., Ailhas, J., Boller, T., & Meins, F. (2008). Evolution of Arabidopsis MIR genes generates novel microRNA classes. *Nucleic Acids Research*, *36*(20), 6429–6438. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn670>
- Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A. C., Hilbert, J. L., Bartel, D. P., & Crété, P. (2004). Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of arabidopsis mRNAs. *Molecular Cell*, *16*(1), 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.09.028>
- Wang, X. B., Jovel, J., Udornporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W. X., Gascioli, V., Vaucheret, H., & Ding, S. W. (2011). The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering rnas direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, *23*(4), 1625–1638. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082305>
- Wang, Z. P., Xing, H. L., Dong, L., Zhang, H. Y., Han, C. Y., Wang, X. C., & Chen, Q. J. (2015). Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in Arabidopsis in a single generation. *Genome Biology*, *16*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0715-0>
- Waterborg, J. H. (2011). Plant histone acetylation: In the beginning... *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1809*(8), 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.02.005>
- Waterborg, J. H., Lu, Y., Bu, Q., Chuan, M., Cui, X., Zhao, Y., & Zhou, D. X. (2023). Metabolic regulation of the plant epigenome. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1809*(8), 353–359. <https://doi.org/10.1111/tpj.16122>
- Wei, W., Ba, Z., Gao, M., Wu, Y., Ma, Y., Amiard, S., White, C. I., Danielsen, J. M. R., Yang, Y. G., & Qi, Y. (2012). A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. *Cell*, *149*(1), 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.002>
- Wendte, J. M., Haag, J. R., Singh, J., McKinlay, A., Pontes, O. M., & Pikaard, C. S. (2017). Functional Dissection of the Pol V Largest Subunit CTD in RNA-Directed DNA Methylation. *Cell Reports*, *19*(13), 2796–2808. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.091>
- Xiao, J., Lee, U. S., & Wagner, D. (2016). Tug of war: adding and removing histone lysine methylation in Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology*, *34*, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.08.002>
- Xing, H.-L., Dong, L., Wang, Z.-P., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Liu, B., Wang, X.-C., & Chen, Q.-J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, *1*(1), 3–13. <https://doi.org/doi:10.1186/s12870-014-0327-y>
- Xue, Y., Zhong, Z., Harris, C. J., Gallego-Bartolomé, J., Wang, M., Picard, C., Cao, X., Hua, S., Kwok, I., Feng, S., Jami-Alahmadi, Y., Sha, J., Gardiner, J., Wohlschlegel, J., & Jacobsen, S. E. (2021). Arabidopsis MORC proteins function in the efficient establishment of RNA directed DNA methylation. *Nature Communications*, *12*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24553-3>
- Yang, Z., Ebright, Y. W., Yu, B., & Chen, X. (2006). HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Research*, *34*(2), 667–675. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj474>
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Mee, Y. P., & Poethig, R. S. (2005a). A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes and Development*, *19*(18), 2164–2175. <https://doi.org/10.1101/gad.1352605>

- Yoshikawa, M., Peragine, A., Mee, Y. P., & Poethig, R. S. (2005b). A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes and Development*, *19*(18), 2164–2175. <https://doi.org/10.1101/gad.1352605>
- You, C., Cui, J., Wang, H., Qi, X., Kuo, L. Y., Ma, H., Gao, L., Mo, B., & Chen, X. (2017). Conservation and divergence of small RNA pathways and microRNAs in land plants. *Genome Biology*, *18*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1291-2>
- Yuan, C., Wang, J., Harrison, A. P., Meng, X., Chen, D., & Chen, M. (2015). Genome-wide view of natural antisense transcripts in Arabidopsis thaliana. *DNA Research*, *22*(3), 233–243. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsv008>
- Zemach, A., Kim, M. Y., Hsieh, P. H., Coleman-Derr, D., Eshed-Williams, L., Thao, K., Harmer, S. L., & Zilberman, D. (2013). The arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell*, *153*(1), 193–205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.033>
- Zhan, J. (2021). Get out and stay out: spatiotemporally regulated miR398 biogenesis enables proper ovule development. *The Plant Cell*, *286*(5441), 950–952. <https://doi.org/doi:10.1093/plcell/koab054>
- Zhang, Y., Harris, C. J., Liu, Q., Liu, W., Ausin, I., Long, Y., Xiao, L., Feng, L., Chen, X., Xie, Y., Chen, X., Zhan, L., Feng, S., Li, J. J., Wang, H., Zhai, J., & Jacobsen, S. E. (2018). Large-scale comparative epigenomics reveals hierarchical regulation of non-CG methylation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(5), E1069–E1074. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716300115>
- Zhang, Z., Liu, X., Guo, X., Wang, X.-J. J., & Zhang, X. (2016). Arabidopsis AGO3 predominantly recruits 24-nt small RNAs to regulate epigenetic silencing. *Nature Plants*, *2*(5), 1–7. <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2016.49> Arabidopsis
- Zhong, X., Hale, C. J., Law, J. A., Johnson, L. M., Feng, S., Tu, A., & Jacobsen, S. E. (2012). DDR complex facilitates global association of RNA polymerase v to promoters and evolutionarily young transposons. *Nature Structural and Molecular Biology*, *19*(9), 870–875. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2354>
- Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., Sze, S. H., Liou, L. W., Barefoot, A., Dickman, M., & Zhang, X. (2011a). Arabidopsis argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell*, *145*(2), 242–256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.024>
- Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., Sze, S. H., Liou, L. W., Barefoot, A., Dickman, M., & Zhang, X. (2011b). Arabidopsis argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell*, *145*(2), 242–256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.024>
- Zilberman, D., Cao, X., & Jacobsen, S. E. (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, *299*(5607), 716–719. <https://doi.org/10.1126/science.1079695>
- Zilberman, D., Cao, X., Johansen, L. K., Xie, Z., Carrington, J. C., & Jacobsen, S. E. (2004). Role of Arabidopsis ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Current Biology*, *14*(13), 1214–1220. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.055>

8. Použité programy a internetové stránky

Geneious Prime 2019.2.3 - Geneious Prime 2023.1.1, Dotmatics

GeneSnap (verze 7.09)

GeneTools 4.01 (SynGene)

IGV (verze 2.16.0, Robinson et al., 2011)

Galaxy Europe (<https://usegalaxy.eu/>)

Rstudio (2023.06.1 Build 524) s R 4.2.2

Programy použité v rámci Galaxy Europe:

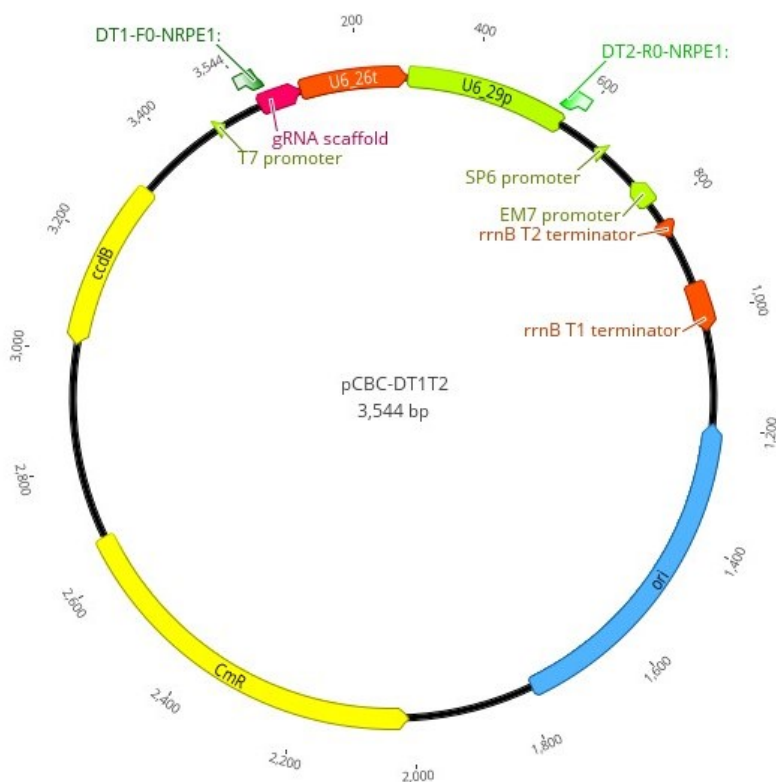
Andrews, S. (n.d.). *FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*.
<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Definition of SAM/BAM format. (n.d.). <https://samtools.github.io/hts-specs/>

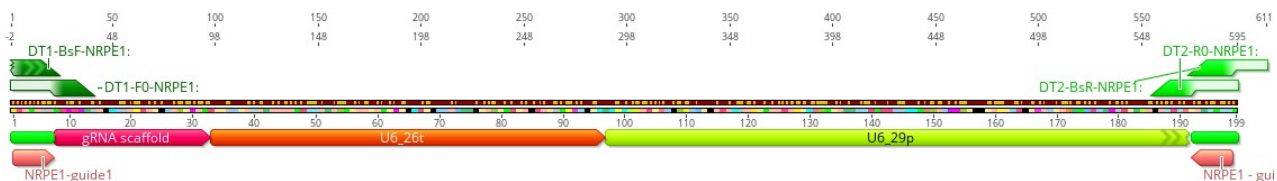
NCBI. (n.d.). sra-tools. In *GitHub repository*. GitHub. <https://github.com/ncbi/sra-tools>

Li, H. (n.d.). *Mathematical Notes on SAMtools Algorithms*.
<http://www.broadinstitute.org/gatk/media/docs/Samtools.pdf>

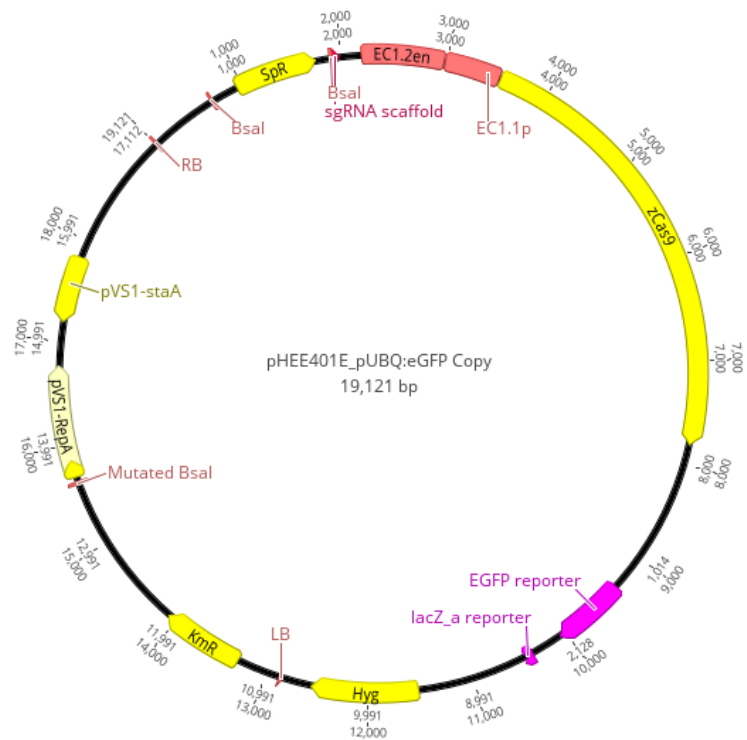
9. Příložené soubory



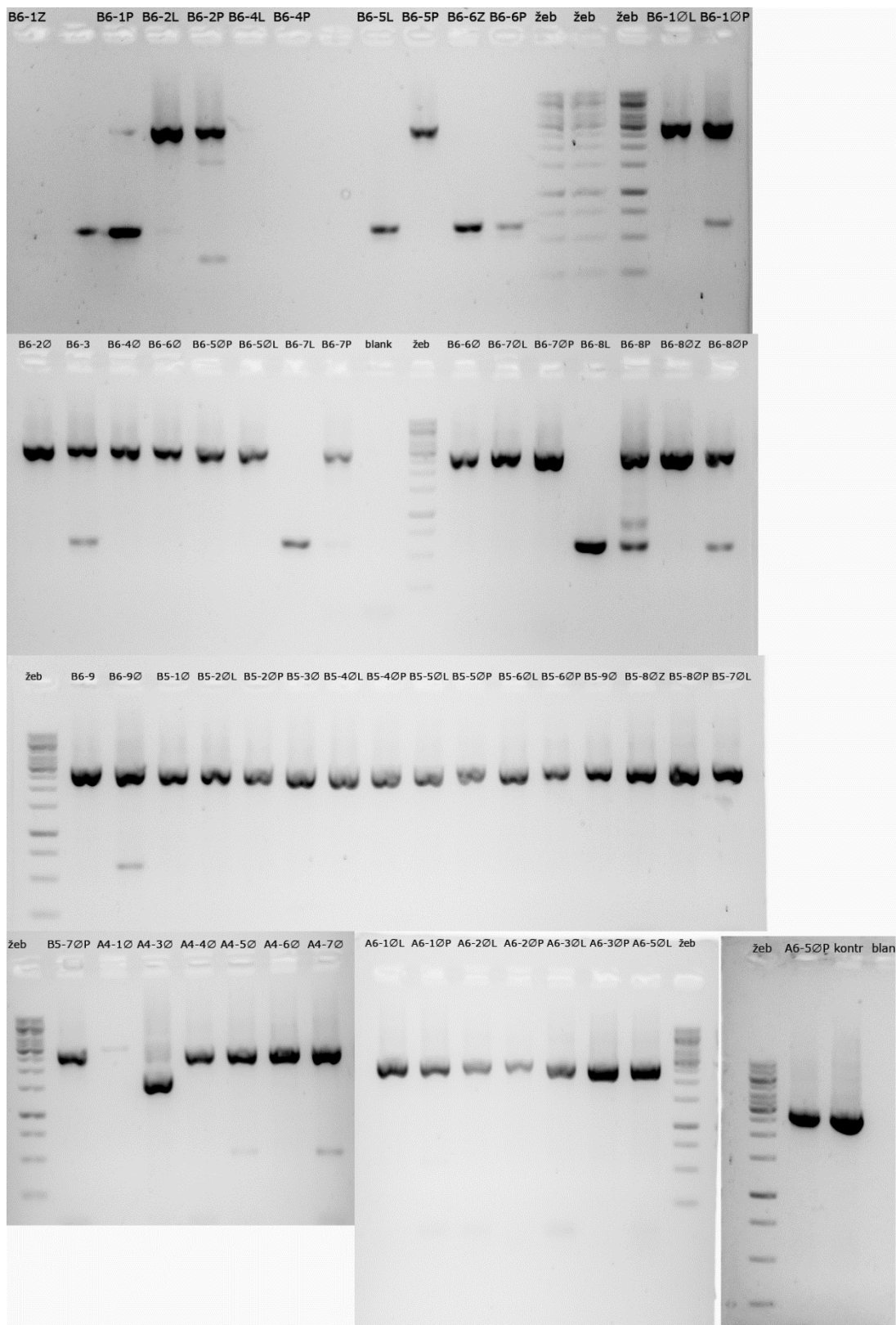
Obr. 29: plasmid pCBC-DT1T2 sloužící k sestavení CRISPR kazety s gRNA. V plasmidu se nacházejí místa odpovídající sekvencím v DT1-F0 a DT2-R0 primerech, tato místa ohraničují U6_29 promotor, U6_26 terminátor a gRNA scaffold. Plasmid dále obsahuje gen pro kanamycinovou a chloramfenicolovou rezistenci.



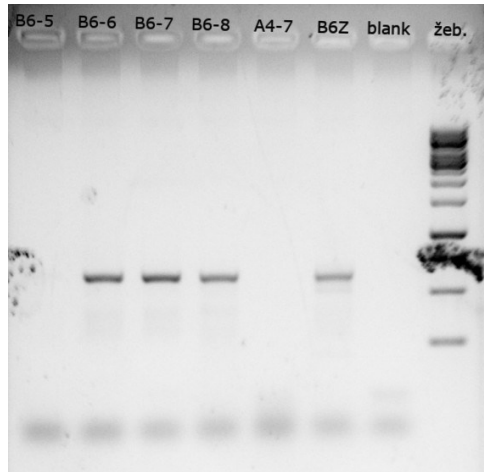
Obr. 30: detail CRISPR kazety s gRNA, PCR produkt získaný in silico na základě testovaných primerů. Primery ohraničují U6_29 promotor, U6-26 terminátor a gRNA scaffold.



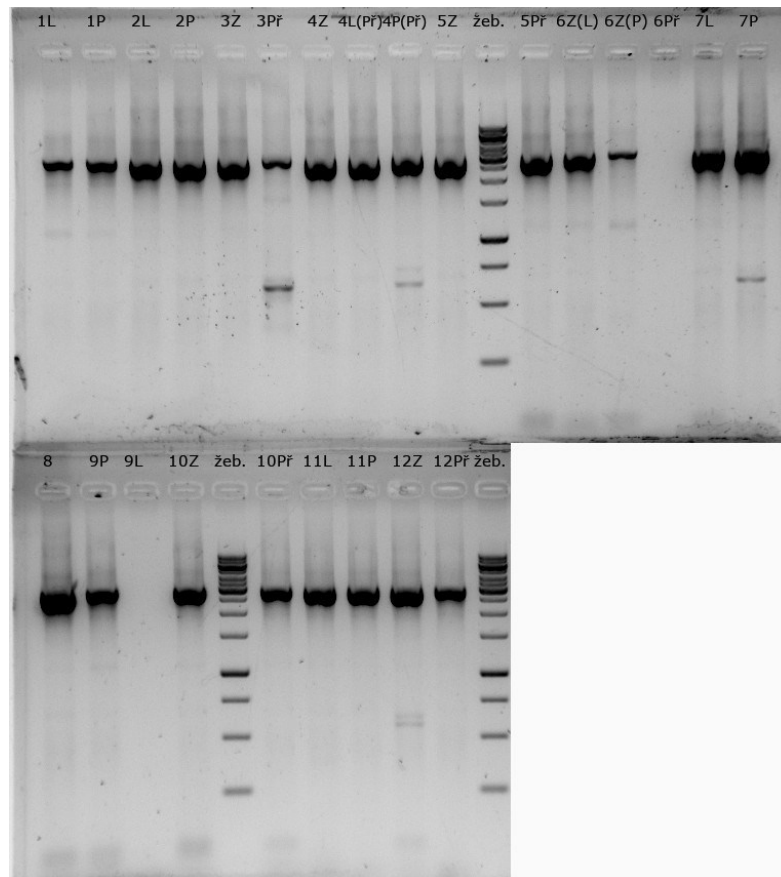
Obr. 31: plasmid *pHEE401E_pUBQ:eGFP*. V plasmidu se nacházejí místa štěpná *BsaI* odpovídající sekvencím v *DT1-BsF* a *DT2-BsR* primerech. Plasmid dále obsahuje gen pro kanamycinovou a hygromycinovou rezistenci. V místě, do kterého se CRISPR kazeta vkládá je spektinomycinová rezistence, která slouží pro kontrolu vložení. *Cas9* je pod promotorem *EC1.1* a enhancerem *EC1.2*, což umožňuje specifickou expresi ve vaječné buňce. V plasmidu je GFP reportérový gen umožňující kontrolu na přítomnost CRISPR kazety v transformovaném organismu.



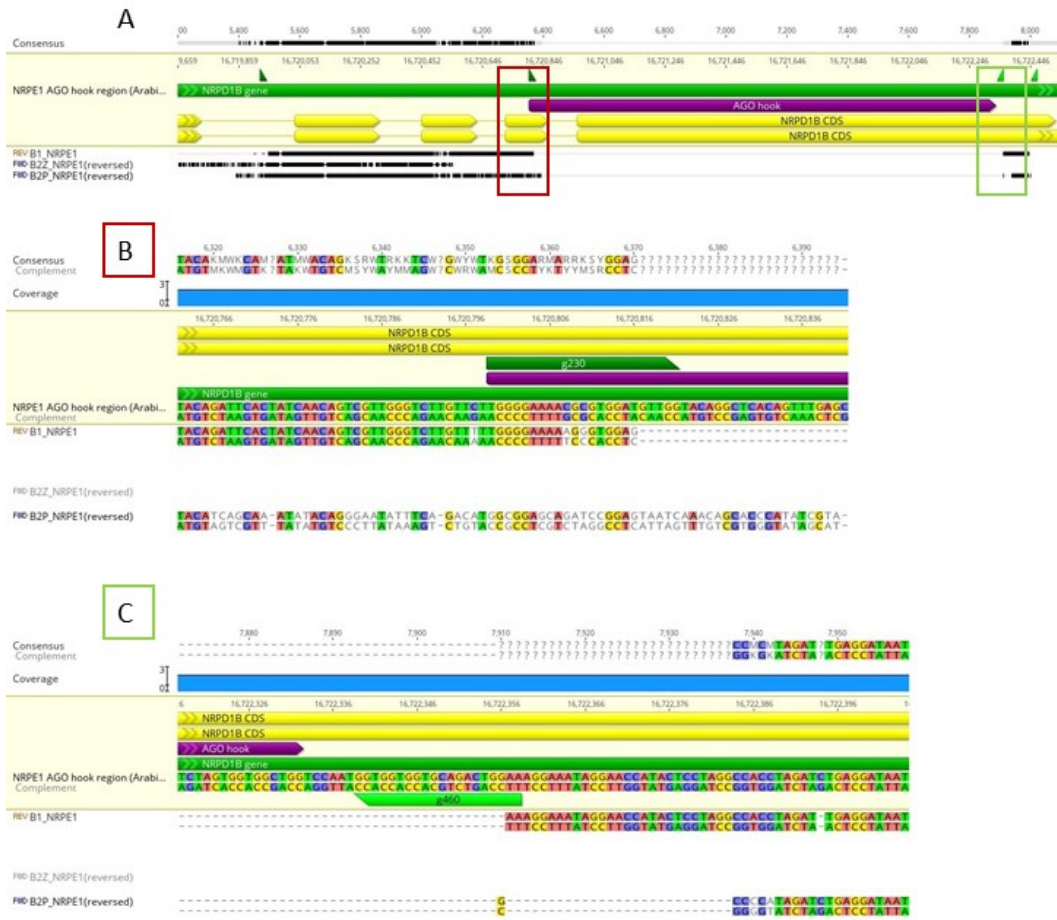
Obr. 32: Gel všech vyizolovaných DNA rostlin *spt5l* v T2 generaci (druhý pokus) dokazující přítomnost homozygotních variant (B6-5L, B6-6Z, B6-6P, B6-7L, B6-8L) a heterozygotních variant bez CRISPR kazety (B6-1ØP, B6-8ØP, B6-PØ, A4-5Ø, A4-7Ø). Použitý je 1kbp žebříček. Ø symbolizuje nesvítící rostliny.



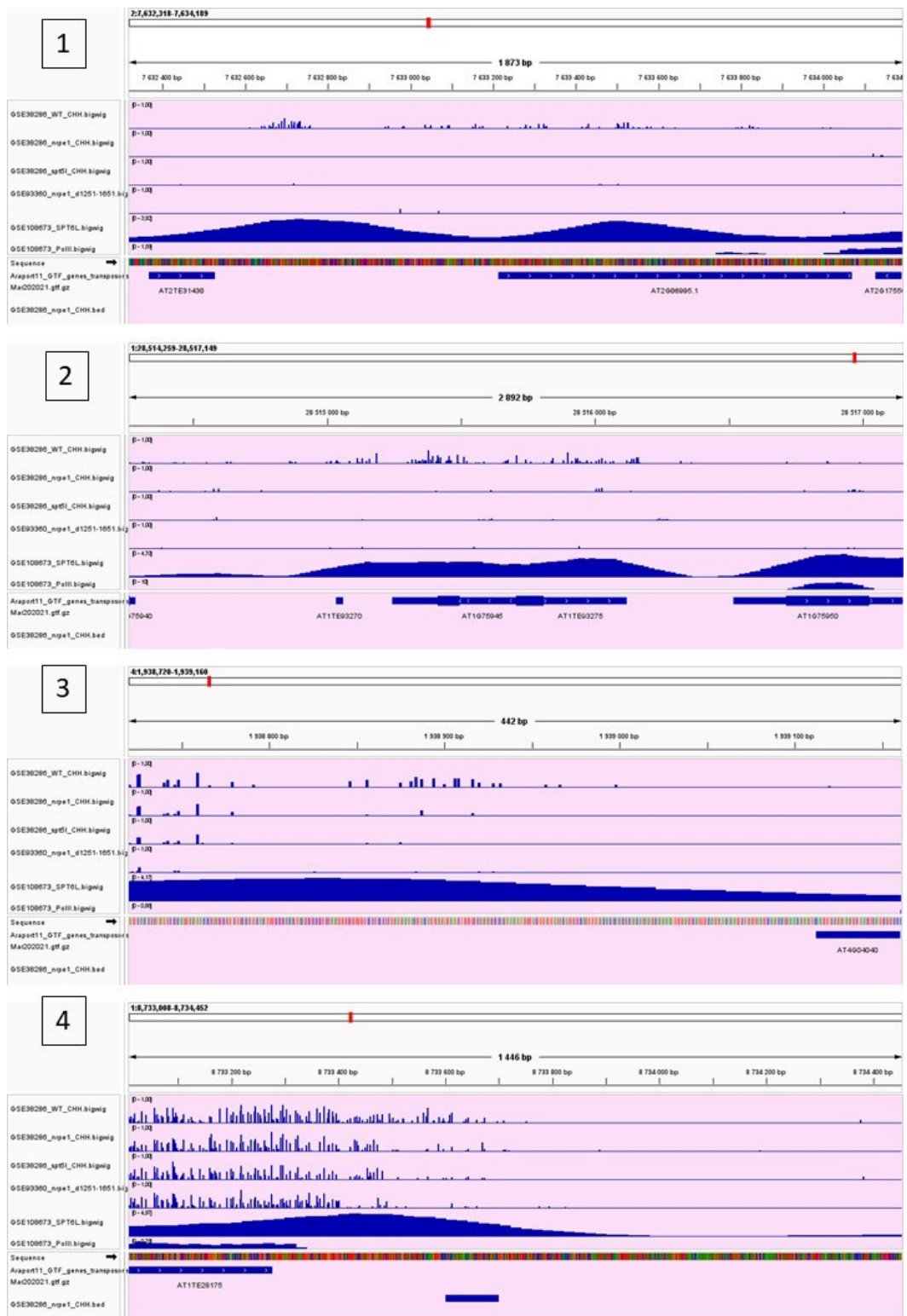
Obr. 33: Gel s DNA *spt5l* rostlin v T2 generaci (druhý pokus), které byly vybrány na základě první PCR pro druhou zkrácenou verzi PCR. Došlo k potvrzení specifických produktů pouze u vzorků B6-6, B6-7 a B6-8, kontrola je rostlina B6Z z T1 generace, žebříček je 1 kbp.



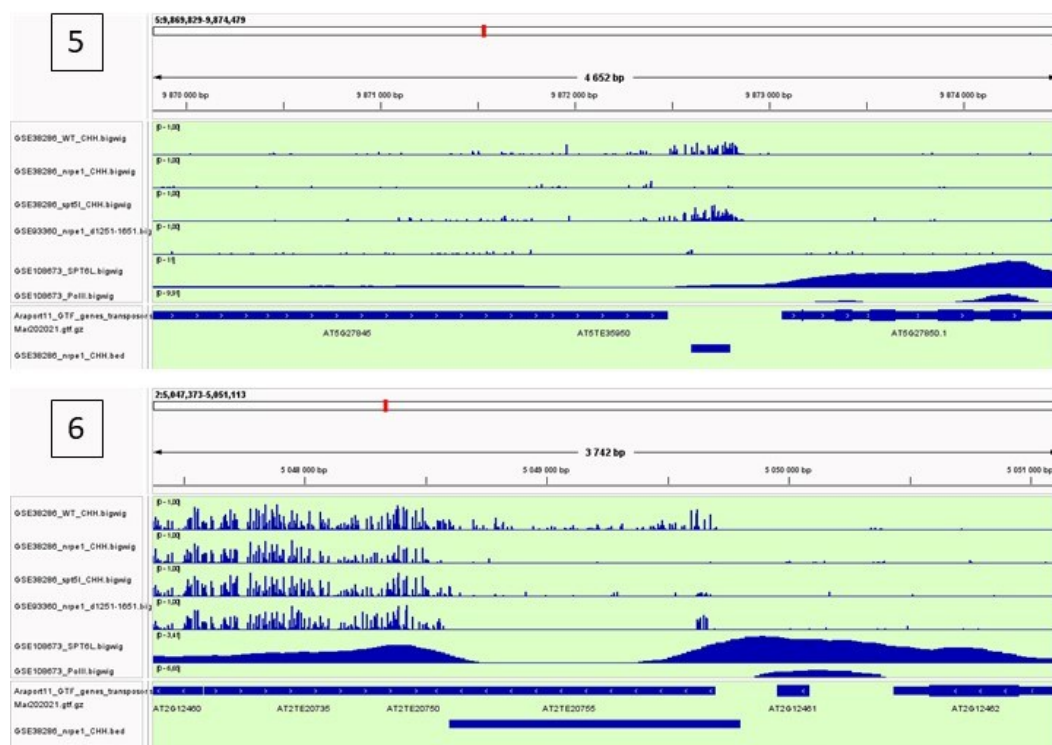
Obr. 34: Gel všech vyizolovaných DNA rostlin *spt5l* v T3 generaci (první pokus) dokazující, že žádná rostlina není homozygotní v mutantní alele (všechny rostliny jsou potomkem B6-8 \emptyset). Použitý je 1kbp žebříček.



Obr. 35: Sekvence B rostlin s NRPE1 kazetou, nekvalitní vzorky. A – souhrnný obrázek vzorků B1, B2P, B2Z, na světležlutém poli referenční genom *A. thaliana*, B – detail mutace vlevo (5' konec delece), C – detail mutace vpravo (3' konec delece).



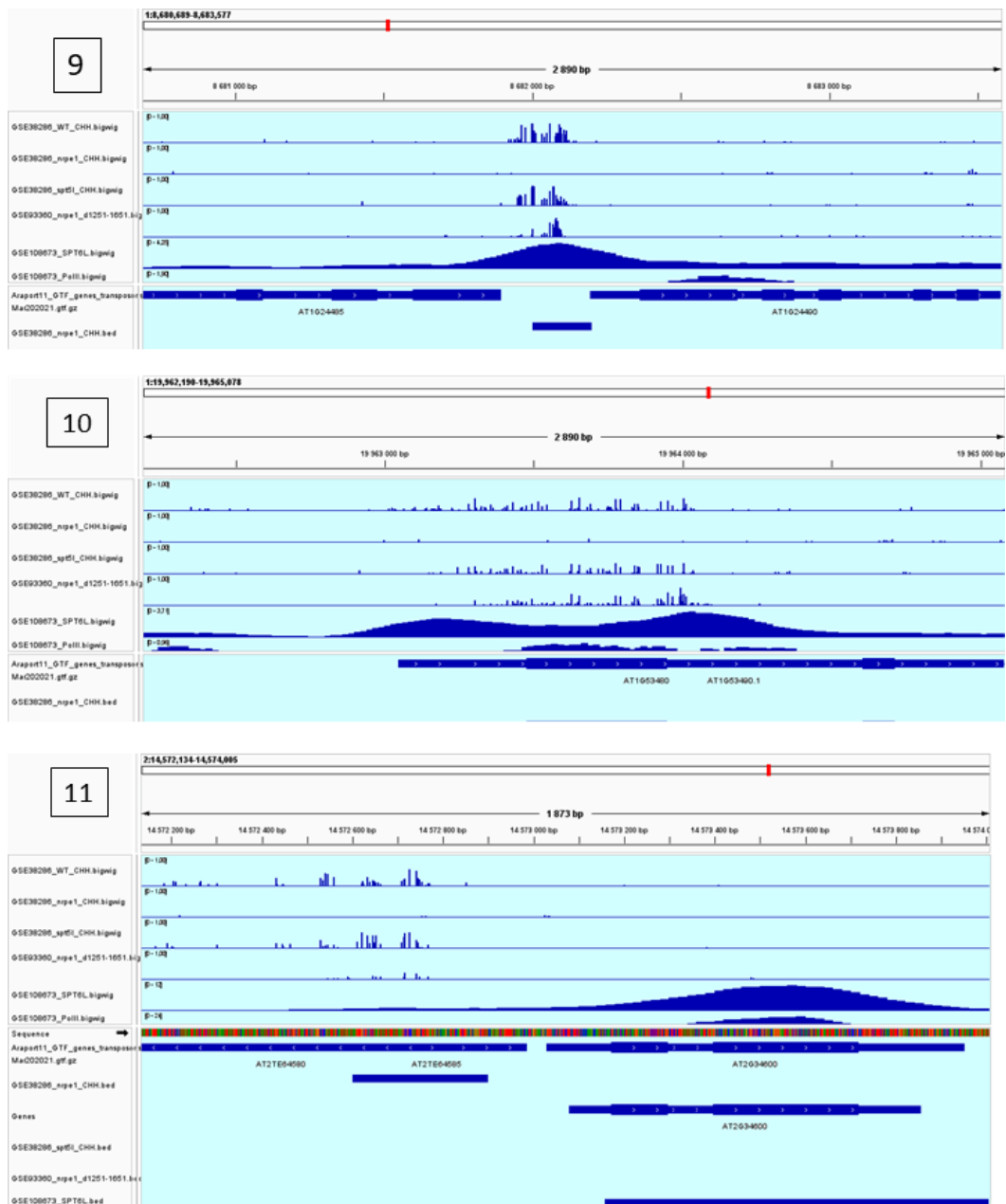
Obr. 36: vybrané lokusy v kontextu *A* (metylace přítomná pouze ve WT). 1- lokus AT2G06995, 2 – lokus AT1TE93275, 3 – lokus AT4G04040, 4 – lokus AT1TE28175. Pořadí řádků: WT, nrpe1, spt5l, nrpe1ΔAh, SPT6L pokrytí, genom *Arabidopsis thaliana*, nrpe1 DMR hypoCHH



Obr. 37: vybrané lokusy v kontextu B (metylace přítomna ve WT a *spt5l*), 5 - lokus AT5TE35950, 6 – lokus AT2TE20755. Pořadí řádků: WT, *nrpe1*, *spt5l*, *nrpe1ΔAh*, SPT6L pokrytí, genom *Arabidopsis thaliana*, *nrpe1* DMR hypochH



Obr. 38: vybrané lokusy v kontextu C (metylace přítomna ve WT a *nrpe1ΔAh*), 7- lokus AT1TE00220, 8 – lokus AT1TE00150. Pořadí řádků: WT, *nrpe1*, *spt5l*, *nrpe1ΔAh*, SPT6L pokrytí, genom *Arabidopsis thaliana*, *nrpe1* DMR hypochH



Obr. 39: vybrané lokusy v kontextu D (metylace přítomna ve WT, *spt5l* a *nrpe1* Δ Ah). 9 – lokus AT1G24490, 10 – lokus AT1G53480, 11 – lokus AT2TE64585. Pořadí rádků: WT, *nrpe1*, *spt5l*, *nrpe1* Δ Ah, SPT6L pokrytí, genom *Arabidopsis thaliana*, *nrpe1* DMR hypoCHH