

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Kateřina Teznerová**

Specifické role proteinů rodiny Argonaut u *Arabidopsis thaliana*  
Specific roles of Argonaute family proteins in *Arabidopsis thaliana*

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Vojtěch Čermák

Praha, 2021



**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 11. 8. 2021

Podpis

**Poděkování:**

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D. za všechny rady, připomínky a čas, který mi během psaní věnoval. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Vojtěchu Čermákovi za konzultování práce a přínosné připomínky. Na závěr bych chtěla poděkovat všem, kteří mě v psaní práce podporovali.

## **Abstrakt:**

Proteiny Argonaut jsou RNA vazebné proteiny s RNázovou aktivitou. Dokáží vázat krátké nekódující RNA, které mají zpravidla délku 21-24 nt. Tyto malé RNA vznikají u rostlin z dvouvláknových RNA a účastní se regulace genové exprese, na ochraně rostliny před viry, transpozóny, či dalšími invazivními genetickými elementy a ovlivňují stav chromatinu. S využitím malých RNA se proteiny Argonaut účastní mechanismu zvaného RNA interference, což je komplexní proces využívaný k regulaci genové exprese, a to na úrovni transkripční nebo posttranskripční. U rostlinného druhu *Arabidopsis thaliana* čítá rodina proteinů Argonaut 10 genů, přičemž v jiných rostlinných druzích má většina z nich své funkční homology (orthology). Jednotlivé proteiny se liší svou preferencí k různým typům malých RNA v závislosti na jejich délce, 5' koncovém nukleotidu i způsobu vzniku zdrojové dvouvláknové RNA, zároveň se liší i zapojení jednotlivých typů Argonautu do dílčích procesů RNA interference a v souvislosti s tím i jejich buněčná lokalizace. Tato práce se zabývá interakcí malých RNA s proteiny Argonaut, popisuje mechanismy jejich fungování a dále se zabývá jednotlivými paralogy proteinů Argonaut u rostliny *Arabidopsis thaliana* a jejich specifickými funkcemi.

**Klíčová slova:** Argonaut, RNA interference, malé RNA, *Arabidopsis thaliana*

## **Abstract:**

Argonaut proteins are RNA binding proteins with RNase activity. They can bind short non-coding RNAs, which are usually 21-24 nt in length. These small RNAs are formed in plants from double-stranded RNAs and are involved in the regulation of gene expression, in the protection of the plant against viruses, transposons, or other invasive genetic elements, and affect the state of chromatin. Using small RNAs, Argonaut proteins participate in a mechanism called RNA interference, a complex process used to regulate gene expression, at the transcriptional or post-transcriptional level. In the plant species *Arabidopsis thaliana*, the Argonaut family of proteins has 10 genes, while in other plant species most of them have their functional homologues (orthologs). Individual proteins differ in their preference for different types of small RNAs depending on their length, the 5' terminal nucleotide and the way in which the source double-stranded RNA is formed. At the same time, the involvement of individual types of Argonaut in the partial processes of RNA interference and in connection with their cellular localization also differs. This work is focused on the interaction of small RNAs with Argonaut proteins, describes the mechanisms of their functioning and further deals with individual paralogs of Argonaut proteins in the plant *Arabidopsis thaliana* and their specific functions.

**Key words:** Argonaute, RNA interference, small RNA, *Arabidopsis thaliana*

## Seznam použitých zkratek:

AGO – Argonaut

AMP1 - Altered Meristem Program 1

ARF - Auxin Response Factors

DCL – Dicer like protein

DDB2 - DNA Damage-binding protein 2

DRB – Double Stranded RNA Binding Protein

DRM2 - Domain Rearranged Methyltransferase 2

DSB - Double Strand Breaks, dvouvláknový zlom

dsRNA – Double strand RNA, dvouvláknová RNA

HEN1 – HUA enhancer 1

hetsiRNA - hc-siRNA, heterochromatic siRNA, heterochromatická siRNA

HSP90 - Heat Shock Protein 90

lncRNA - long noncoding RNA, dlouhá nekódující RNA

LTRs - Long Terminal Repeats Retrotranspozons

MID – Middle doména

MIR geny – micro RNA geny

miRNA – micro RNA

miRNA\* - passenger vlákno duplexu

mRNA – messenger RNA

nt – nukleotid

PAZ - PIWI-ARGONAUTE-ZWILLE doména

PHAS – phasiRNA produkující gen / lokus

phasiRNA – phased RNA, fázovaná RNA

PIF4 - Phytochrome-Interacting Factor 4

PIWI - P—Element-Induced Wimpy Testis

Pol – polymeráza

PR1 - Patogen-Related 1 protein

pre-miRNA – prekurzorová miRNA

pri-miRNA – primární miRNA

PTGS – Post Transcriptional Gene Silencing, posttranskripční genové umlčování

RAM - Root Apical Meristem

RdDM – RNA directed DNA methylation, metylace DNA řízená malými RNA

RDR2 – RNA dependentní RNA Pol 2  
RDR6 – RNA dependentní RNA Pol 6  
RdRP – RNA dependentní RNA polymeráza  
RICEs - RISC Interagující clearing 3' 5' exoribonukleáza  
RISC – RNA induced silencing complex, RNA indukovaný umlčovací komplex  
RNAi – RNA interference  
SAM - Shoot Apical Meristem  
SAR - Systemic acquired resistance  
SGS3 – Supressor Of Gene Silencing 3  
siRNA – small interfering RNA  
SKI2 - DexH box RNA helicase Superkiller 2  
sRNA – small RNA, malá RNA  
ssRNA – single strand RNA, jednovláknová RNA  
TAS – tasiRNA produkující gen/lokus  
tasiRNA – trans acting siRNA, trans působící siRNA  
TE - transponovatelné elementy  
TGS – Transcriptional Gene Silencing, transkripční genové umlčování  
uviRNA - UV-induced RNA  
vsiRNA - virová siRNA  
XRN4 - 5'-3' exoribonukleáza 4

# Obsah

1. ÚVOD.....	1
1.1. Malé RNA.....	2
1.1.1. miRNA.....	3
1.1.2. siRNA.....	5
2. Proteiny Argonaut.....	7
2.1. Nakládání sRNA do AGO.....	7
2.2. Struktura AGO.....	8
2.3. Mechanismy účinku RISC komplexu.....	9
2.4. Aktivity AGO proteinů.....	10
3. Biologické role rostlinných AGO proteinů.....	12
3.1. SKUPINA AGO 1/5/10.....	12
3.1.1. AGO 1.....	12
3.1.2. AGO 10.....	14
3.1.3. AGO 5.....	16
3.2. SKUPINA AGO 2/3/7.....	16
3.2.1. AGO 2.....	16
3.2.2. AGO 3.....	18
3.2.3. AGO 7.....	19
3.3. SKUPINA AGO 4/6/8/9.....	19
3.3.1. AGO4.....	19
3.3.2. AGO6.....	21
3.3.3. AGO8.....	21
3.3.4. AGO9.....	22
4. Závěr.....	23
5. Seznam literatury.....	24

# 1. ÚVOD

Existence proteinů Argonaut (AGO) byla objevena v roce 1998 (Bohmert *et al.*, 1998) a od té doby došlo k objevu řady funkcí jednotlivých proteinů. U rostliny *Arabidopsis thaliana* tvoří proteiny Argonaut rodinu deseti paralogů a každý z nich disponuje jedinečnými funkcemi. Už brzy po jejich objevu bylo jasné, že tyto proteiny hrají důležitou roli v regulaci vlastních rostlinných genů, v obraně rostliny proti transpozonům a transgenům. Další jejich funkcí je vypořádávání se rostliny se stresem, pomáhají např. při stresu způsobeném UV zářením, zaplavením rostliny, zasolením, či nedostatkem živin. Neopomenutelnou roli hrají v imunitních reakcích; různé druhy proteinů Argonaut pomáhají řešit napadení rostliny viry, bakteriemi, mikroby i houbami. V neposlední řadě se účastní morfogeneze rostliny a gametogeneze. Regulace genové exprese v rostlině pomocí proteinů Argonaut jsou možné díky jejich fungování v komplexu s malými RNA nazývaném RNA indukovaný umlčovací komplex. Tyto malé RNA zajišťují sekvenční specifitu pro rozpoznání cílové RNA na základě komplementarity bází. To je základem procesu genového umlčování, které se nazývá RNA interference (RNAi, Fire *et al.*, 1998). Následkem RNA interference je umlčení genové exprese, ke kterému může docházet transkripčně indukci metylace DNA nebo posttranskripčně blokováním translace či štěpením mRNA. V rámci této bakalářské práce budou rozebrány funkce jednotlivých druhů proteinu Argonaut. Cílem práce je seznámení s funkčním mechanismem proteinů Argonaut a bližší seznámení s podrobnostmi o jednotlivých paralogích proteinu Argonaut u rostlinného druhu *Arabidopsis thaliana*. Jelikož se jedná o poměrně nově popsanou genovou rodinu, tak i přes to, že výzkum proteinů Argonaut je progresivní, v jejich hlubokém poznání jsou stále zřetelné mezery, proto je každý z nich vhodným adeptem k dalšímu zkoumání.

## 1.1. Malé RNA

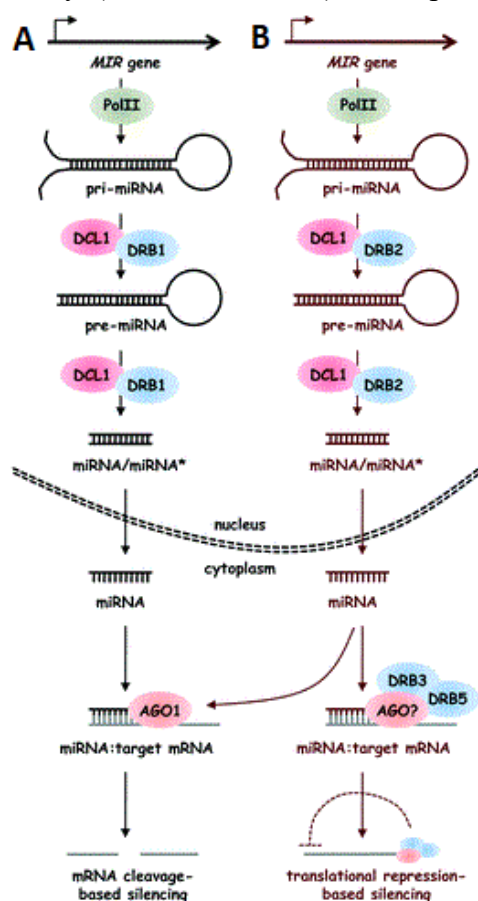
Malé RNA (sRNA) jsou důležité regulační molekuly, které se účastní regulace vlastních rostlinných genů a obrany organismu proti mobilním elementům a virům. V těchto procesech jsou malými RNA na základě komplementarity rozpoznány a následně umlčeny homologní úseky RNA a DNA molekul. Umlčení genové exprese může probíhat na transkripční úrovni (TGS), při kterém dochází k inhibici transkripce a posttranskripční (PTGS), při kterém dochází k degradaci mRNA či blokování její translace. Malé RNA vznikají v rostlinách pomocí dicer-like proteinů (DCL) jako duplexy, buď z plně komplementárních dsRNA (double strand RNA, dvouvláknová RNA) nebo z dsRNA nedokonale složené vlásenkové struktury. Délku malé RNA ovlivňuje to, jakým DCL proteinem byla vytvořena. U *A. thaliana* DCL1 a DCL4 obvykle tvoří 20-21 nt dlouhé sRNA, DCL2 tvoří 22 nt dlouhé sRNA a DCL3 tvoří 24 nt dlouhé sRNA. Malých RNA existuje několik druhů, zjednodušeně je lze rozdělit na mikro RNA (miRNA) a malé interferující RNA (siRNA, Xie *et al.*, 2004). siRNA dále můžeme dělit dle několika způsobů. Při dělení podle původu zdrojové RNA molekuly je rozdělujeme na endogenní a virové, přičemž endogenní můžeme dále dělit dle způsobu vzniku prekurzorové dsRNA. dsRNA může vzniknout hybridizací samostatných sense a antisense transkriptů, intramolekulární hybridizací sense a antisense úseků transkriptů invertovaných repetitiv (tvoří se tzv. vlásenky) a syntézou pomocí RNA dependentní RNA polymerázy (RdRP) podle existujícího ssRNA vlákna (single strand RNA, jednovláknová RNA, Borges & Martienssen, 2015). Rovněž je lze dělit podle vzniku na primární a sekundární. Sekundární vznikají tak, že podle existujícího ssRNA vlákna, které bylo rozštěpeno proteinem AGO na základě přítomnosti jiné (primární) sRNA, je vytvořeno komplementární vlákno pomocí RdRP (Yoshikawa *et al.*, 2005). Z vytvořených duplexů je jedno vlákno naloženo do AGO, čímž se formuluje RNA indukovaný umlčovací komplex (RISC).

Před 3' O uridyací, která vede k degradaci sRNA, se malé RNA brání společným mechanismem. Pomocí HUA enhanceru 1 (HEN1) dochází k modifikaci na 3' konci obou vláken duplexu 2'-O-metylací, která uridylační aktivitě brání. Bylo vyzkoumáno, že k metylaci dochází během vyštěpení prekurzorové miRNA (pre-miRNA) prováděného pomocí DCL1. Pokud HEN1 chybí, po vyštěpení dochází k připojení uridinů na 3' konec pomocí terminální nukleotidyltransferázy. Později bylo zjištěno, že úpravy siRNA a dalších sRNA využívají obdobný mechanismus (Li *et al.*, 2005).

### 1.1.1. miRNA

miRNA bývají dlouhé nejčastěji 21-22 nt, vyskytují se v rostlinách, živočiších i dalších eukaryotech a účastní se téměř výhradně PTGS. V buňkách se tvoří z nekódujících transkriptů tzv. MIR genů přepisovaných pomocí RNA polymerázy II (Pol II). Transkripty MIR genů jsou ssRNA s nedokonalou vnitřní komplementaritou nazývané primární miRNA (pri-miRNA), která se dokáže složit do struktury nedokonalé vlásenky. Z vytvořeného dvouvláknového úseku je u rostlin vyštěpen pomocí DCL1 miRNA duplex (viz. obr 2 A, Xie *et al.*, 2005).

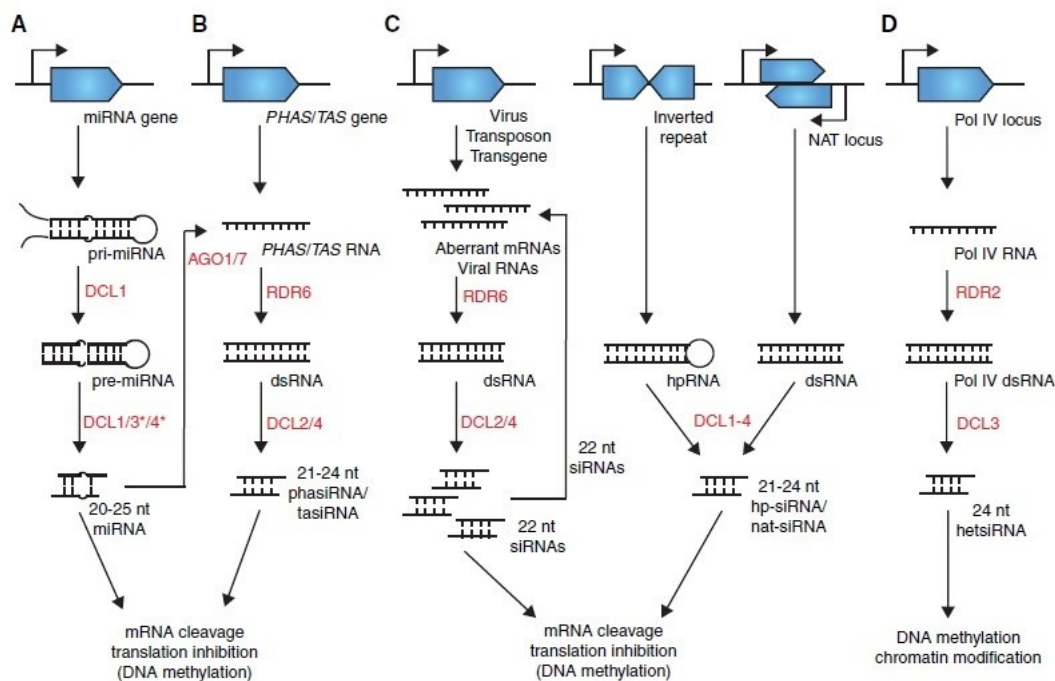
pri-miRNA obvykle bývá nejprve nahrubo štěpena pomocí DCL1 ve vzdálenosti 15-17 nt od referenční oblasti dvouvláknového úseku (oblast, ze které následujícími kroky vzniká výsledná miRNA), čímž vzniká pre-miRNA. Tuto oblast DCL1 dokáže upravovat pomocí své helikázové domény (Zhu *et al.*, 2013). Tato pre-miRNA je posléze sestřižena



Obr. 1 - miRNA biogeneze. A – Transkript prekursoru pri-miRNA je transkribován z MIR genu pomocí RNA Pol II. V jádře je pri-miRNA rozpoznána pomocí DCL1/DRB1, dochází ke dvěma štěpením a následnému uvolnění duplexu miRNA/miRNA\*. Poté dochází k separaci řetězců a exportu miRNA do cytoplazmy. Tam je miRNA naložena do komplexu RISC a využívána k navádění AGO1 ke katalytickému štěpení komplementární mRNA vedoucí k regulaci genové exprese. B - Transkript prekursoru pri-miRNA je rovněž transkribován z MIR genu pomocí RNA Pol II. V jádře je pri-miRNA rozpoznána pomocí DCL1/DRB2 a je rovněž zpracována do podoby miRNA/miRNA\*. Dochází k separaci řetězců a miRNA vlákno je transportováno do cytoplazmy. Tam může být miRNA naložena buď do komplexu RISC a být využita k regulaci genové exprese jako v případě A, nebo může být naložena do alternativního RISCu obsahujícího DRB3 a DRB5 a dále řídit mechanismus represe translace cílových genů miRNA DRB2 asociovaných. Převzato z Eamens *et al.*, 2012. Dle novějších objevů dochází k separaci řetězců miRNA a naložení do komplexu RISC ještě v jádře, teprve poté je exportována do cytoplazmy Bologna *et al.*, 2018.

pomocí DCL1. Dvouvláknový úsek pre-miRNA je vázán pomocí Double-stranded RNA Binding proteinu (DRB), který asociuje s DCL proteinem. Podle toho, se kterým DRB proteinem pre-miRNA asociuje, dochází buď ke štěpení mRNA (asociace s DRB1), nebo k blokování translace (asociace s DRB3 a DRB5, viz. obr. 1, Eamens *et al.*, 2012). AGO lokalizuje do jádra na základě jaderného lokalizačního signálu umístěného na N' konci, a tím pádem nakládání miRNA do AGO probíhá v jádře (Bologna *et al.*, 2018). AGO rovněž obsahuje jaderný exportní signál, díky kterému se AGO-miRNA dostává z jádra. Rostlinné miRNA jsou tedy nejprve maturovány v jádře, tam jsou naloženy do AGO a teprve poté jsou exportovány do cytosolu (Bologna *et al.*, 2018).

Existují dva hlavní způsoby zpracování pre-miRNA. Většinou k němu dochází způsobem „base-to-loop“, tedy ve směru od báze k jednořetězcové smyčce, čímž vzniká sRNA duplex. V malém množství případů může ovšem docházet k sestřihu pre-miRNA pomocí DCL1 způsobem „loop-to-base“, tedy opačně ve směru od jednořetězcové smyčky k bázi. Ve směru



Obr. 2 – A – biogeneze miRNA. Primární miRNA (pri-miRNA) je přepisována z endogenního nekódujícího MIR genu a zpracována pomocí DCL1 na prekurzorovou miRNA (pre-miRNA). pre-miRNA je poté zpracována znovu pomocí DCL1 na maturovaný miRNA duplex. Tato miRNA v komplexu s AGO zpravidla způsobuje gene silencing pomocí rozštěpení mRNA či přímým blokováním translace. B – biogeneze tasiRNA / phasiRNA. Endogenní transkripty PHAS a TAS jsou štěpené pomocí AGO s 22 nt miRNA a dále využívány jakožto templáty pro RDR6, čímž dochází ke generování dsRNA. Tato dsRNA je zpracovávána pomocí DCL2/4 na tzv. fázované sekundární siRNA (phasRNA) a trans-působící siRNA (tasiRNA). tasiRNA a phasiRNA vedou podobně jako miRNA především k PTGS (Chen *et al.*, 2010). dsRNA může být také produkována transkripcí invertovaných repetit, čímž vzniká vlásenková RNA (hpRNA) nebo tím, že dochází k asociaci (annealingu) sense transkriptů a přirozených antisense transkriptů (NATs). D – Biogeneze hetsiRNA. Krátké transkripty polymerázy IV (Pol IV) jsou pomocí RDR2 převedeny na dsRNA a poté zpracovány pomocí DCL3 na 24 nt hetsiRNA. Tyto hetsiRNA poté řídí RdDM a modifikaci chromatinu. Převzato z Lee & Carroll, 2018.

base-to-loop dochází k produkování maturovaných miRNA duplexů, kdežto produkty vzniklé štěpením ve směru loop-to-base jsou degradovány. O tom, o jaký směr půjde, rozhoduje orientace DCL1 komplexu (Zhu *et al.*, 2013).

Většina miRNA v rostlinách vzniká pomocí DCL1. Ze stejného prekursoru, konkrétně z evolučně mladých *MIR* genů, může vznikat i třída siRNA pomocí DCL3. Bývá dlouhá 23-27 nt a vzniká vystřížením z vlásenky. Její biogeneze je rovněž závislá na RNA dependentní RNA Polymeráze II (RDR2) a na Polymeráze IV (Pol IV, Chellappan *et al.*, 2010). Některé evolučně mladé druhy miRNA v *Arabidopsis* vznikají pomocí DCL4, jakožto například miR822, miR839 a miR859 (Rajagopalan *et al.*, 2006; Tsuzuki *et al.*, 2014).

### 1.1.2. siRNA

Stejně jako miRNA se PTGS účastní i některé druhy siRNA a kromě regulace vlastních genů degradují především transkripty virů, transpozonů a transgenů (viz. kap. 1). Vysoká míra transkripce zřejmě u těchto elementů vede ke zvýšené tvorbě aberantních RNA, které obvykle neobsahují 3' polyadenylovaný konec, popř. 5' čepičku. Tato jejich struktura vede k tomu, že je RNA dependentní RNA Pol 6 (RDR6), nebo jiné RdRP, může použít jako templáty pro tvorbu dsRNA (Luo & Chen, 2007). Tento krok determinuje vstup uvedených RNA do dráhy RNAi. Takto vzniklá dsRNA bývá štěpena pomocí DCL4 nebo DCL2 na 21 nt nebo 22 nt dlouhé siRNA duplexy (viz. obr. 2 C, Deleris *et al.*, 2006). Síla RNAi odpovědi je zvyšována DCL2 aktivitou a snižována aktivitou DCL4, protože 22 nt RNA vedou k tvorbě sekundárních RNA (Mlotshwa *et al.*, 2008). Na tomto procesu se podílí SGS3 (Iwakawa *et al.*, 2021).

Transkripty přestřížené pomocí AGO1 s naloženou 22 nt miRNA vedou k tvorbě sekundárních siRNA. Určitou podskupinu těchto siRNA tvoří trans působící RNA (tasiRNA) nebo fázované RNA (phasiRNA). tasiRNA /phasiRNA jsou 21 nt sekundární siRNA, jsou DCL4 dependentní a vznikají z TAS a PHAS genů (lokusů, viz. obr. 2 B).

Velké množství siRNA se účastní TGS. To je založeno především na 24 nt heterochromativních siRNA (hetsiRNA, někdy nazývané hc-siRNA), které většinou pochází z transpozonů nebo repetitivních elementů (Reinhart & Bartel, 2002) a spouští metylaci DNA řízenou malými RNA (RNA-directed DNA methylation, RdDM) a související modifikace chromatinu (Finnegan & Matzke, 2003). Pro *de novo* metylaci je esenciální přítomnost metyltransferázy Domains Rearranged Methyltransferase 2 (DRM2, Naumann *et al.*, 2011). hetsiRNA vznikají v kanonické RdDM dráze transkripcí krátkých 26 – 45nt dlouhých RNA

pomocí Pol IV (Blevins *et al.*, 2015). K nim poté RDR2 dotváří komplementární vlákno, čímž vzniká dsRNA (Daxinger *et al.*, 2009). Z té se posléze vyštěpuje zpravidla 24 nt hetsiRNA duplex pomocí DCL3 (viz. obr. 2 D, Borges & Martienssen, 2015).

Dříve se myslelo, že klasická RdDM může být indukována pomocí 21 nt siRNA produkovaných pomocí RDR6 z lokusů TAS. RdDM ale nemá vliv na expresi TAS ani produkci tasiRNA (Wu *et al.*, 2012), zato cílí na transkripčně aktivní transponovatelné elementy (TE) a hraje roli v iniciaci a ustanovení umlčení TE. Tato dráha se označuje RDR6 RdDM (Nuthikattu *et al.*, 2013). Není závislá na složkách klasické „kanonické RdDM“, tedy Pol IV, RDR2 a DCL3. Nejprve dochází k tvorbě 21-22 nt siRNA produkovaných z mRNA transkripčně aktivních transpozónů. Tyto transkripty jsou degradovány pomocí RNAi se zapojením RDR6, DCL2, DCL4 a AGO1 (McCue *et al.*, 2015; Nuthikattu *et al.*, 2013). Vznikající 21-22 nt siRNA asociují s AGO6 a navádí ho k cílovým lokusům pomocí scaffoldových transkriptů Pol V, se kterými jsou komplementární (Cuerda-Gil & Slotkin, 2016; McCue *et al.*, 2015). RDR6 RdDM dráha vyžaduje ke svému fungování, stejně jako ostatní RdDM dráhy, Pol V a DRM2. Dráha funguje na řadě dlouhých strukturně autonomních TE ve chvíli, kdy jsou transkripčně aktivní (Nuthikattu *et al.*, 2013; Panda *et al.*, 2016).

Umlčovacích mechanismů v rostlinách tedy existují tři základní typy, štěpení RNA a blokování translace (řazené do PTGS) a indukce metylace DNA (TGS).

## 2. Proteiny Argonaut

Proteiny Argonaut jsou schopné asociovat s molekulami malých RNA a tvořit s nimi komplex RISC. Na základě druhu sRNA a AGO proteinu tyto komplexy umlčují cílové geny, a to na úrovni TGS nebo PTGS (viz. kap. 1, Lee & Carroll, 2018). Proteiny AGO a homologní proteiny se vyskytují u eukaryot, bakterií i archeí (Cerutti & Casas-Mollano, 2006). První z nich, AGO1, byl objeven v *Arabidopsis thaliana*. Jeho absence způsobuje trubcovitý tvar listů připomínající chapadla chobotnice (*Argonaut*), na základě čehož dostaly proteiny své jméno (Bohmert *et al.*, 1998).

### 2.1. Nakládání sRNA do AGO

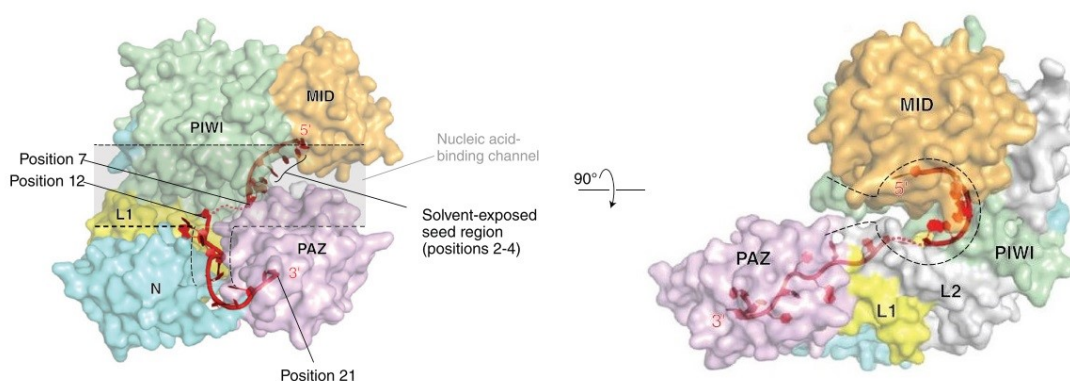
AGO proteiny mohou vytvářet komplexy s různými druhy malých RNA, přičemž různé druhy sRNA mají různé funkce. Do formy sRNA duplexů bývají prekurzorové dsRNA před nakládáním do AGO upravovány pomocí DCL. RNA duplex nejprve asociuje s proteinem AGO, ten se konformačně mění a formuje se pre-RISC. Poté dochází k zasunutí konce duplexu, přičemž duplex je rozvolněn a zkroucen N<sup>o</sup> doménou tak, aby se mohl účinně vsunout (Kwak & Tomari, 2012). Poté je jedno vlákno, konkrétně siRNA „passenger strand“ (v případě miRNA duplexu značené miRNA\*), selektivně rozštěpováno RNázovou aktivitou AGO, odpoutáno a degradováno. Druhé vlákno (guide strand) je zachováno ve zformovaném maturovaném RISC komplexu, který způsobuje umlčení genové exprese (viz. kap. 1.1, Kawamata & Tomari, 2010).

Nakládání sRNA na AGO se účastní Heat Shock Protein 90 (HSP90) a jeho kochaperony. HSP90 se váže na proteiny, mění jejich konformaci díky hydrolýze ATP, a tak urychluje nakládání dsRNA do AGO. Hydrolýza ATP je zdrojem energie pro konformační změnu proteinů, nicméně nakládání není úplně ATP-dependentní a v omezené míře dokáže běžet i bez HSP90 (Iki *et al.*, 2010). Kochaperony dokáží zvyšovat rychlost hydrolýzy vazbou klientských proteinů (taktéž substrátové proteiny; proteiny, které jsou konformačně upravovány, Röhl *et al.*, 2013), takže HSP90 dokáže konformačně upravovat více klientských proteinů, aniž by s nimi interagoval napřímo. Např. kochaperon Cyclophilin 40/SQUINT (CYP40/SQN) asociuje s AGO1 podobným způsobem jako HSP90 a usnadňuje složení RISCu. Jeho inaktivace pak snižuje účinnost aktivity miRNA (Smith *et al.*, 2009).

Aktivita sRNA je regulována tím, do jakého AGO je naložena. Zároveň druh sRNA (její délka a možná i biogeneze) a 5' nukleotid determinuje to, do jakého AGO se bude preferenčně nakládat (více viz jednotlivé AGO proteiny).

## 2.2. Struktura AGO

Všechny eukaryotické AGO mají čtyři charakteristické domény – variabilní N-terminální (N), konzervovanou PIWI-ARGONAUTE-ZWILLE (PAZ), middle (MID) a P-element-Induced Wimpy Testis (PIWI, viz. obr. 3, Tolia & Joshua-Tor, 2007). PAZ doména obsahuje oligonukleotid/oligosacharidovou vazbu, která umožňuje AGO proteinům vázat jednovláknové nukleové kyseliny (Lingel *et al.*, 2003). Rozpoznává 3' konce sRNA a kotví je pomocí ohnutí 3' konce vedoucího vlákna (tzv. guide strand) do vazebné kapsy (Ma *et al.*, 2004). Ačkoliv PAZ doména není nezbytně nutná pro nakládání sRNA do AGO, její nepřítomnost zabraňuje uvolnění passenger vlákna a vytvoření funkčního RISC komplexu (Gu *et al.*, 2012). Rigidní smyčka MID domény, též označovaná jako smyčka nukleotidové specifity, rozpoznává identitu 5' nukleotidu a přispívá k výběru správné sRNA. Navázání špatného 5' nukleotidu způsobuje zastavení sestřihové aktivity (Felice *et al.*, 2009; Frank *et al.*, 2012). Rozhraní MID a PIWI domén obsahuje vazebnou kapsu, která pomáhá vázat a kotvit 5' fosfát sRNA, který stabilizuje vzniklý komplex a usnadňuje štěpení (Rivas *et al.*, 2005). PIWI doména má podobnou strukturu jako RNáza H a umožňuje některým AGO proteinům štěpit cílovou RNA, která je komplementární k vázané RNA. Za sestřihovou aktivitu je zodpovědná konzervovaná sekvence zvaná katalytická tetráda (Asp-Asp-His/Asp-Glu, DDH/DE), přičemž se štěpení účastní hořčičnaté ionty (Nakanishi *et al.*, 2012; Rivas *et al.*, 2005).



Obr. 3 – Struktura lidského RISC komplexu s naloženým AGO2. Linker 1 (L1) žlutě, linker 2 (L2) šedě, kanály vázající nukleové kyseliny červeně tečkovaně, guide RNA červeně, doména MID oranžově, doména PAZ fialově, doména PIWI zeleně, doména N modře. Převzato z Nakanishi, 2016.

### 2.3. Mechanismy účinku RISC komplexu

V předešlé kapitole o malých RNA (kap. 1) jsem se věnovala vzniku duplexů sRNA. Tyto dvouvláknové RNA jsou hlavními spouštěči RNAi. Jsou zpracovávány a nakládány do AGO proteinů. To, jakým způsobem je s nimi nakládáno dál, je rozebráno v kapitole následující.

Většina maturovaných miRNA duplexů asociuje s AGO1 v jádře. Po odstranění passenger vlákna (miRNA\*) z miRNA duplexu dochází k exportu komplexu AGO1:miRNA do cytoplazmy (Bologna *et al.*, 2018). Tam pak dochází k PTGS (viz. kap. 1, Vaucheret *et al.*, 2004). Při štěpení cílové molekuly pak dochází k tvorbě fragmentů bez polyadenylovaného konce a čepičky. Tyto fragmenty jsou zpravidla rychle degradovány, 3' fragment pomocí 5'-3' exoribonukleázy 4 (XRN4), při jejíž nepřítomnosti dochází k nadměrné stabilitě a akumulaci mRNA (Souret *et al.*, 2004), a 5' fragment pomocí uridylylace na svém 3' konci vedoucí k degradaci v exosomu. Zde rozklad podporuje komplex SKI2-3-8, z něhož je pro rozklad esenciální RNA helikáza Superkiller 2 (SKI2). Při absenci SKI2 dochází k nadměrné tvorbě sekundárních siRNA pomocí RDR6 (Branscheid *et al.*, 2015). Dále se rozkladu 5' fragmentu účastní RISC Interacting Clearing 3'-5' Exoribonukleases (RICEs), které svou exonukleázovou aktivitou degradují uridylované fragmenty vytvořené AGO štěpením, a tak napomáhají udržení produktivního RISC komplexu a jeho recyklaci, a zabraňují tak jeho degradaci (Zhang *et al.*, 2017).

miRNA bývají asociované s membránově vázanými polyzomy spíše než s volnými polyzomy v cytoplazmě. Rozštěpení i represe translace cílové mRNA (řízené miRNA) se odehrávají na endoplazmatickém retikulu (ER, Li *et al.*, 2016). Represe translace řízená miRNA vyžaduje interakci mezi AGO1 a proteinem Altered Meristem Program 1 (AMP1) asociovaným s ER (Li *et al.*, 2013). Mimo to může probíhat také v cytozolu nezávisle na polyzomech (Li *et al.*, 2016).

Pokud RNA-zacílené AGO1 s 22 nt dlouhou miRNA nejsou degradovány, stávají se předlohou pro RDR6 za účasti Supresor of Gene Silencing 3 (SGS3), a na základě vytvořené dsRNA dochází ke vzniku sekundárních siRNA, které jsou miRNA dependentní. Tomuto jevu se jinak říká transktivní biogeneze siRNA. SGS3 interaguje s RNA rozštěpenou RISC komplexem a navádí na ni RDR6, jež k této RNA dosyntetizuje druhé vlákno. Sekundární siRNA může být nakládána do AGO1 a účastnit se PTGS (obr. 2. B, Baumberger & Baulcombe, 2005), kdy takto vzniklý komplex poté navádí k rozštěpení komplementární RNA. SGS3 je tedy nezbytný pro tvorbu sekundárních siRNA, které jsou významnou součástí

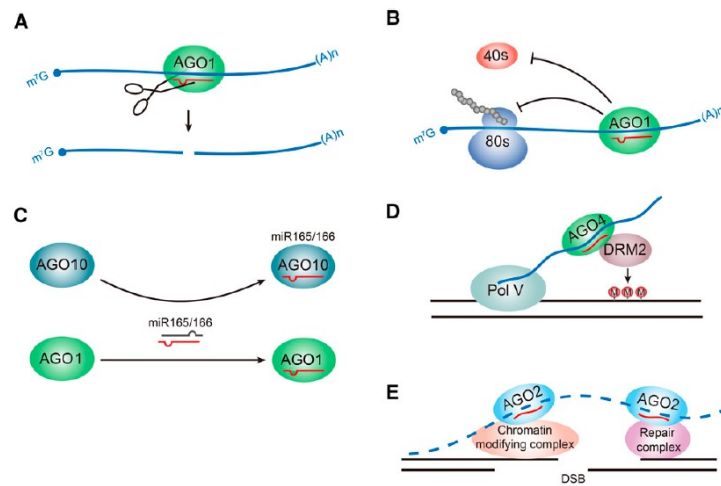
RNAi, především pak protivirové obrany. SGS3 interaguje s AGO1, poté dochází k rozštěpení RNA a SGS3 zůstává navázaný na sestřiženém transkriptu a chrání ho tak před odbouráním exonukleázami. SGS3/AGO1 interakce funguje pouze při naložení 22 nt sRNA (Yoshikawa *et al.*, 2013). TAS/PHAS transkripty rozštížené pomocí AGO1 s naloženou 22 nt miRNA vedou k tvorbě tasiRNA/phasiRNA, jež jsou 21 nt dlouhé sekundární siRNA tvořené DCL4 (viz. obr. 2 B, kap. 1.3).

24 nt hetsiRNA duplex (viz. kap. 1.3) je transportován do cytoplazmy, kde je preferenčně nakládán do AGO4 (Zhang *et al.*, 2017). Maturovaný AGO4-siRNA komplex je transportován do jádra (Ye *et al.*, 2012). Poté dochází k efektorové fázi RdDM, komplex AGO4-siRNA interaguje s komplementárními nekódujícími nascentními RNA produkovanými Pol V. Do blízkosti nascentního transkriptu se komplex dostává díky GW/WG motivu přezdívanému AGO háček, který je přítomen na největší podjednotce komplexu Pol V (NRPE1, Azevedo *et al.*, 2011). Komplex AGO4-siRNA rekrutuje DRM2, klíčovou metyltransferázu pomocí níž dochází k metylaci cílové DNA v libovolném sekvenčním kontextu (CG, CHG, CHH, Chan *et al.*, 2005).

## 2.4. Aktivity AGO proteinů

AGO proteiny se účastní regulace genové exprese několika způsoby (viz. obr. 4, Fang & Qi, 2015). Jejich RNázová (slicer) aktivita primárně vede k rozštěpení transkriptů komplementárních s neseným vláknem sRNA. Mohou ale také blokovat translaci či indukovat metylaci DNA prostřednictvím RdDM (viz. kap. 1.3). Regulovat genovou expresi lze rovněž sekvestrací (vychytáváním) sRNA, pomocí níž dokáží některé druhy AGO (u *Arabidopsis thaliana* to je AGO10) zabráňovat klasické aktivitě AGO1 (Zhu *et al.*, 2011). AGO účastníci se sekvestrace mají slabší katalytickou aktivitu než AGO1 a obsahují klasickou katalytickou tetradu, která ale neslouží ke štěpení. Tyto AGO ale účinně váží miRNA a brání tak jejich navázání na AGO1 a jím zprostředovanému umlčování odpovídající cílové mRNA (Zhu *et al.*, 2011). Sekvestrovat lze rovněž i komplex AGO-sRNA, a to pomocí nekódujících RNA sloužících jako „falešný cíl“, vzniklých jen pro nalákání komplexu RISC a snížení jeho aktivity na přirozené cílové mRNA (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007). V neposlední řadě dokáží AGO2 navádět k opravám dvouvláknových zlomů (DSB) řízenou metylací (Wei *et al.*, 2012). Ze sekvencí v blízkosti DSB jsou tvořeny DSB-induced sRNA (diRNA, dříve označované qiRNA). Tyto diRNA inhibují biogenezi rRNA a translaci proteinů (Lee *et al.*, 2009). Jejich biogeneze vyžaduje PI3 kinázu ATR, Pol IV a DCL proteiny. Tyto diRNA jsou vázány pomocí AGO2, která řídí DSB opravy (Wei *et al.*, 2012). diRNA ale nezprostředkují pomocí metylace

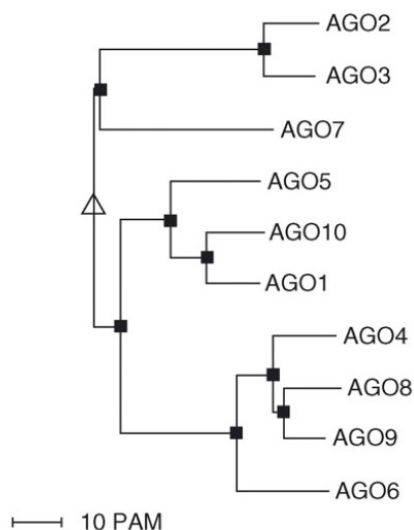
opravy DSB, nejspíše fungují jen jako navádějící molekuly do míst DSB zlomů. Samotná oprava probíhá díky histonovým modifikacím okolo DSB zlomů, které opravy iniciují (Wei *et al.*, 2012).



Obr. 4 – Způsoby činností reprezentativních AGO proteinů. A – AGO1 váže miRNA nebo tasiRNA a štěpí cílové mRNA. B – AGO1 váže miRNA a inhibuje translaci cílové mRNA. C – AGO10 funguje coby návada pro miR165/166. D – AGO4 váže hetsiRNA nebo lmiRNA a řídí DNA metylaci. E – AGO2 váže diRNA a řídí DSB opravy. Převzato z Fang & Qi, 2016.

### 3. Biologické role rostlinných AGO proteinů

Během evoluce došlo k funkční diverzifikaci rostlinných AGO proteinů. Specializovaly se na různé dráhy sRNA a na různé biologické procesy. V *A. thaliana* najdeme 10 druhů AGO proteinů (Baumberger & Baulcombe, 2005.; Rivas *et al.*, 2005). Tyto paralogy můžeme rozdělit do tří základních skupin (clade): AGO1/5/10, AGO2/3/7 a AGO4/6/8/9. Do těchto skupin byly rozděleny na základě fylogenetické analýzy (viz. obr. 5, Morel *et al.*, 2002; Vaucheret, 2008).



Obr. 5 - Fylogenetická klasifikace proteinů AGO v *Arabidopsis thaliana*. Proteiny AGO byly rozděleny do tří skupin na základě porovnání proteinových sekvencí programem MultiAlin. PAM označuje bodovou mutaci. Převzato z Vaucheret, 2006.

#### 3.1. SKUPINA AGO 1/5/10

##### 3.1.1. AGO 1

Asi nejprozkoumanějším proteinem je AGO1. Účastní se většiny vývojových drah. Je to efektorový protein pro miRNA a tasiRNA, pomocí nichž reguluje genovou expresi v řadě vývojových a fyziologických procesů. Rovněž je efektorovým proteinem pro 21 nt a 22 nt siRNA, které se účastní PTGS virů, transpozonů a transgenů (Morel *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2011). Toto posttranskripční umlčování cílových genů provádí v cytoplasmě. AGO1 preferenčně váže miRNA s 5' U (Mi *et al.*, 2008). Tyto sRNA jsou produkovány pomocí DCL1 s asistencí HYL1, což je jaderný protein vázající dsRNA (Vazquez *et al.*, 2004). miRNA nakládané do AGO1 mohou regulovat genovou expresi cílových genů i v jádře, a to tak, že váží jejich promotorové sekvence a zvyšují promotorovou aktivitu, např. miR5658 přítomná v jádře aktivuje expresi At3G25290 přímou vazbou na jeho promotor (Yang *et al.*, 2019).

AGO1 se rovněž váže na chromatin aktivních genů a podporuje jejich transkripci rekrutováním Pol II. Konkrétně sRNA a komplex Switch/Sucrose Non-Fermentable (SWI/SNF) chromatin-remodelující komplex asociují s jaderným AGO1 a způsobují vazbu AGO1 na chromatin. Tato vazba AGO1 na geny reagující na stimul může být způsobována různými podněty, jako jsou rostlinné stresy hormonální, biotické a abiotické (Dolata *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018). V cytoplazmě s AGO1 kolokalizuje 3'-5' exoribonukleáza Atrimmer 2 (ATRM2), která selektivně degraduje duplexy miRNA/miRNA\*, tato aktivita se zvyšuje při tepelném stresu (Wang *et al.*, 2018). AGO1 také usnadňuje indukci genů v signální jasmonátové (JA) dráze a aktivuje JA odpověď. Vystavení AGO1 kyselině jasmonové indukovalo produkci sRNA z JA-responzivních AGO1 cílových genů. AGO1 tedy vazbou a usnadněním exprese genů reagujících na stimul dokáže regulovat různé signální dráhy a s nimi související biologické procesy (Liu *et al.*, 2018).

Uvažuje se, že většina AGO1 proteinů neexistuje ve formě monomeru, nýbrž jsou součástí vysokomolekulárních komplexů a v této podobě migrují s polysomy. Při gelové filtraci extraktu z rostliny bylo také objeveno, že v roztoku zůstává velké množství nenavázaných sRNA, což indikuje, že různé sRNA mají různou schopnost nakládání do AGO1. Např. miR159 byla nalezena hlavně v RISC komplexu, miR171 se vyskytovala v RISCu i nenavázaná a miR168 byla detekována hlavně nenavázaná a pouze její minorita se dokázala do RISC komplexu navázat. Z toho se tedy vyvozuje, že limitujícím faktorem aktivity sRNA je její schopnost naložit se do AGO1 proteinu (Dalmadi *et al.*, 2019).

Ztrátová mutace *ago1* je letální (Bohmert *et al.*, 1998), missense mutace *ago1* způsobují řadu pleiotropních vývojových defektů. Např. mutace *ago1-52* vede k fenotypu viditelně odlišnému od wild type (Micol-Ponce *et al.*, 2014).

AGO1 se také účastní oprav DNA v reakci na UV stres. DNA Damage-Binding Protein 2 (DDB2) a AGO1 formují komplex vázaný na chromatin spolu s 21 nt siRNA, která usnadňuje rozpoznání poškození DNA. UV-induced RNA (uviRNA) asociované s komplexem AGO1-DDB2 jsou kompetentní k řetězci DNA, který je obohacený o cyklobutan-pyrimidinové dimery, což jsou nejčastější formy UV indukovaného poškození (Bajczyk *et al.*, 2019). UV záření má pozitivní vliv na složení komplexu AGO1-DDB2 a jeho doručení do míst poškození DNA obohacených cyklobutan-pyrimidinovými dimery (Schalk *et al.*, 2017). UV stres způsobuje tvorbu uviRNA, které byly produkovány pomocí RNA Pol V, RDR2 a DCL4 a tyto uviRNA

zvyšují stabilitu AGO1, což vede k sestavení AGO1-DDB2 a jeho zvýšenému využití v poškozených místech na chromatinu (Bajczyk *et al.*, 2019).

Další aktivitou AGO1 je reakce na hypoxii. Hypoxie je způsobena nedostatkem kyslíku a stěžuje mitochondriálního dýchání, čímž ovlivňuje energetický stav rostliny. Stres navozený hypoxií vede ke změně genové exprese (Moldovan *et al.*, 2010). Zaplavení rostliny spouští tvorbu inhibitorů mitochondriálních procesů, které způsobují zvýšení hladiny miR2936 a miR398. Mutanti *ago1-27* nejsou tolerantní vůči ponoření, předpokládá se tedy, že nejsou schopni navodit expresi genů specifických pro anaerobní podmínky (Loreti *et al.*, 2020). Spekuluje se, že Selenium-Binding Protein 3 (SBP3) je nepřímo modulován hypoxií k derepresi jeho transkripce, která je závislá na AGO1 a HEN1 a nezávislá na vnímání hladiny kyslíku, což se vyvozuje z jeho nízké indukce v *ago1-27* (Loreti *et al.*, 2020).

Do míst štěpení transkriptů genů patogenů jsou sRNA transportovány pomocí extracelulárních vesikulů (EV). Exosom-like EV obsahují různé RNA-vazebné proteiny, včetně AGO1, RNA helikázy (RH) a anexinů (ANN). AGO1, RH11 a RH37 selektivně váží RNA nabohacené v EV, ale ne EV-asociované RNA, takže se předpokládá, že přispívají k selektivnímu nakládání sRNA do EV. Mutanti *ago1*, *rhh11rh37* a *annlann2* vykazují sníženou sekreci sRNA do EV. Tyto RNA vazebné proteiny tedy hrají důležitou roli v nakládání RNA a stabilizaci EV. AGO1 je sekretován v EV a specificky váže 20-22 nt sRNA. Sekrece sRNA prostřednictvím exosomů a exosom-like EV je konzervovaným mechanismem pro komunikaci mezi buňkami v rámci celého organismu (He *et al.*, 2021).

### 3.1.2. AGO 10

Co se týče proteinových sekvencí, je proteinu AGO1 velmi podobný AGO10 (Vaucheret, 2008). AGO10 se účastní udržování nediferencovaných kmenových buněk v Shoot Apical Meristem (SAM, Lynn *et al.*, 1999) a ustanovení listové polarity (Liu *et al.*, 2009). Je exprimován v provaskulatuře, adaxiálních listových primordiích a meristémech (Lynn *et al.*, 1999; Moussian *et al.*, 1998). AGO10 váže miRNA s 5' U (Zhu *et al.*, 2011), tedy stejně jako AGO1.

AGO10 kompetuje s AGO1 o miR165/166 a tlumí jejich aktivitu sekvestrací, čímž např. uvolňuje expresi genů rodiny HD-ZIP III regulujících vývoj meristému (Zhu *et al.*, 2011). Rovněž zprostředkovává funkci miR172 v ustanovení identity tyčinek a ve vývoji květů

z květních kmenových buněk (Ji *et al.*, 2011). Může vázat virovou siRNA a spolupracovat s AGO1 a AGO2 při protivirové obraně v květenstvích (Garcia-Ruiz *et al.*, 2015).

Obdobně AGO10 kompetuje s AGO1 o miR168. Tato miR168 se může vyskytovat ve variantě 21 nt /22 nt duplexu. Guide strand (22 nt) je možné nakládat do AGO10 i AGO1. Naložení do AGO1 vede ke klasickému umlčování odpovídající mRNA, kdežto naložení do AGO10 vede k sekvestraci. Aktivita AGO10 je omezená, neboť má úzkou doménu exprese, AGO10 takto alespoň částečně ukrývá miR168 před regulací prostřednictvím AGO1 (Iki *et al.*, 2018).

AGO10 podporuje vývoj axilárního meristému (AM) pomocí zacílení genu REVOLUTA (REV) prostřednictvím miR165/166. Specifická exprese AGO10 v AM pravděpodobně potlačuje aktivitu miR165/166-AGO1, který jinak znemožňuje REV expresi a AM iniciaci v čase a prostoru (Zhang *et al.*, 2020). Exprese AGO10 je kontrolována v prostoru a čase pomocí auxinu, brasinosteroidů a světla, které iniciují AM v paždích listů v určitém věku rostliny. AGO10 je aktivován pomocí Auxin Response Factor 5 (ARF5), jeho exprese je zvýšena v paždí starších listů. Oproti tomu je jeho transkripce potlačována pomocí Brassinazole-Resistant 1 (BZR1) a Phytochrome-Interacting Factor 4 (PIF4), k jejich expresi dochází u mladých listů (Zhang *et al.*, 2020). AGO10 i REV vykazují podobný vzor v expresi, nejprve jsou oba geny exprimovány na adaxiální straně mladých listů, poté ve středové zóně, kde se formuje vaskulatura a nakonec ve vaskulatuře a v listovém paždí. Oproti tomu AGO1 se exprimuje nejprve v mladých listech, ve starších listech je výrazný výskyt ve střední zóně a málo na adaxiální straně. V listech před AM iniciací se AGO1 vyskytuje v nízkých množstvích ve vaskulatuře a listovém paždí (Zhang *et al.*, 2020).

Další dráha, které se AGO10 účastní, je časoprostorová regulace miR398. AGO10 totiž brání maturované miR398 v návratu do samičího gametofytu pomocí sekvestrace. AGO10 je aktivován pomocí Swi2/Snf2-Related1 (SWR1) a ER-MPK v chaláze, čímž zajišťuje udržení správného vývoje vajíček (Zhan, 2021), konkrétně správnou funkci Agamous Like genů (AGL). AGO10 lokalizovaný v chaláze slouží jako vrátný kontrolující pohyb miRNA mezi samičím gametofytem a sporofytickými pletivy (Cai *et al.*, 2021).

### 3.1.3. AGO 5

AGO5 preferenčně nakládá 24 nt dlouhé sRNA s 5' C (Mi *et al.*, 2008). Rovněž se účastní antivirové obrany, váže vsiRNA (z Cucumber mosaic virus) a kooperuje s AGO2 při potlačování infekce Potato virus X (Brosseau & Moffett, 2015; Takeda *et al.*, 2008).

Mimo virové infekce se exprese AGO5 omezuje na buňky megaspor a somatické buňky v jejich okolí. Semidominantní mutant *ago5* je defektní v iniciaci megagametogeneze, předpokládá se tedy, že AGO5 zprostředkovává megagametogenezi (Tucker *et al.*, 2012). AGO5 se také účastní kontroly doby kvetení pomocí modulace exprese transkripčních Squamosa-Promoter Binding-Like faktorů (SPL). AGO5 funkčně a fyzicky interaguje s miR156, přičemž miR156 dráha řídí dospívání rostliny (Wang, 2014). *ago5* mutant vykazuje časně kvetoucí fenotyp, represe kvetení pomocí overexprese miR156 je velmi potlačena, oproti tomu morfologie listů zůstává nezměněna. Role AGO5 tedy spočívá v zprostředkování aktivity miR156 v meristemických tkáních, ale ne ve vegetativních, oproti tomu AGO1 se pravděpodobně účastní této regulace ve tkáních vegetativních. Tento mechanismus však funguje spíše na doladění aktivit CONSTANS (CO) a Flowering Locus T (FT), které jsou na miR156 dráze nezávislé (Roussin-Léveillé *et al.*, 2020). AGO5 se účastní i vývoje pylu, jeho vysoká míra exprese byla detekována v cytoplazmě spermatických buněk maturovaných zrn a v rostoucích pylových láčkách (Borges *et al.*, 2011). AGO5 je tedy exprimován ve vysokém množství během celého života rostliny a při tvorbě semen, včetně meristémů květenství, jeho role je v reprodukční fázi vývoje rostliny (Mantegazza *et al.*, 2014; Roussin-Léveillé *et al.*, 2020).

## 3.2. SKUPINA AGO 2/3/7

### 3.2.1. AGO 2

AGO2 má funkci překrývající se s AGO1. Váže 21 nt siRNA s 5' A (Mi *et al.*, 2008). Jeho hlavní rolí je antivirová obrana vůči širokému spektru virů, proti kterým navozuje odolnost, např. Turnip crinkle virus, Cucumber mosaic virus (CMV), Turnip mosaic virus či Tomato bushy stunt virus (Carbonell *et al.*, 2012; Harvey *et al.*, 2011; Schuck *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2011). Kromě rostlinných imunitních reakcí může být AGO2 exprimován i v samcích a samičích gametách (více viz. kap. 3.2.2., Jullien *et al.*, 2020).

K regulaci virové infekce dochází tak, že AGO2 s navázanou virovou siRNA (vsiRNA) inhibuje virovou replikaci (Schuck *et al.*, 2013). Přestože běžně kyselina salicylová (SA) a abscisová (ABA) pracují jako antagonisté, při regulaci protivirové obraně vykazují

pozitivní vztah, konkrétně indukce AGO2 pomocí ABA je SA dependentní. Transkripční faktory související s ABA a SA regulují expresi genů ovlivňujících RNA umlčování, což vysvětluje, jak tyto hormony ovlivňují resistenci vůči virům (Alazem *et al.*, 2019).

Primingem indukovaná aktivace AGO2 doprovází rezistenci *Arabidopsis* k CMV. Tento priming je součástí tzv. získané systémové rezistence (SAR), což je širokospektrální odpověď na rezistenci k nemoci, která může být navozena patogenem, či chemickým ošetřením (např. BTH, benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester). Jedná se o priming, tedy vybuzení následné robustnější aktivace obranných genů při útoku patogenů. Bylo vyzkoumáno, že po BTH-primování u *Arabidopsis* dochází k akumulaci vyšších množství mRNA pro AGO2 a AGO3, hlouběji bylo zkoumáno pouze AGO2. Tato zvýšená exprese AGO2 je asociována s trimetylací lysinu 4 na histonu H3 a acetylací histonu H3 v AGO2 promotoru před aktivací a je rovněž spjata s indukovanou rezistencí ke žlutému kmeni viru CMV. Priming tedy zahrnuje modifikaci histonů v promotoru pro AGO2, což podmiňuje zvýšenou aktivaci AGO2, která je spojená s rezistencí na CMV (Ando *et al.*, 2021). Při tomto stavu zvýšení aktivity AGO2 dochází naopak k umlčení AGO10, čímž dojde k přechodu od růstu k obraně (Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2012) a tím ke zpomalení růstu a vývoje (Ando *et al.*, 2021).

Na základě selekčního tlaku způsobeného Potato Virus X můžeme pozorovat zvýšený výskyt polymorfismu u AGO2, který vede ke zvýšené odolnosti k tomuto viru. Tyto polymorfismy ovlivňují antivirovou aktivitu AGO2, aniž by ale ovlivnily jeho další funkce, jako je např. antibakteriální rezistence nebo metylace DNA. Na základě koevoluce virů a rostlin se viry zjevně naučily obcházet a potlačovat procesy RNAi a tato interakce ovlivnila přirozené varianty komponent RNA umlčování (Brosseau *et al.*, 2020).

AGO2 má rovněž antimikrobiální a antibakteriální aktivitu, tu navozuje pomocí vazby miR393b\*, čímž umlčuje Golgi lokalizovaný protein MEMB12. Represe jeho translace způsobí exocytózu antimikrobiálních proteinů souvisejících s patogenezí 1 (PR1, Zhang *et al.*, 2007). AGO2 je indukován bakteriální infekcí, a tím pozitivně stimuluje imunitní reakci. N<sup>o</sup> terminální doména AGO2 je obohacená Arg-Gly repeaty (RG/GR), které jsou metylované pomocí Protein Arginin Metyltransferázy 5 (PRMT5). Metylace argininu má dvojí funkci v regulaci AGO2. Metylovaná argininová rezidua mohou podporovat degradaci AGO2 proteinu a jsou rovněž vázány Tudor-doménovými proteiny (TSNs), které degradují AGO2 asociované sRNA. Snížená exprese PRMT5 během infekce by mohla vést

k redukci metylace argininů na AGO2, což by vedlo k akumulaci AGO2 a AGO2 asociovaných sRNA, čímž by došlo k podnícení imunity rostliny (Hu *et al.*, 2019).

AGO2 má i aktivitu antifungální (Cao *et al.*, 2016). Obrana proti nekrotrofnímu patogenu *Sclerotinia sclerotiorum* je zajišťována pomocí AGO2 asociovaných miRNA vedoucí k obranné reakci rostliny. Tato obrana byla objevena v *ago2* mutantech při integrované analýze miRNAomu a transkriptomu. Byla identifikována řada diferenciačně exprimovaných genů (DEGs) a diferenciačně exprimovaných miRNA (DEMs). Integrovaná analýza DEMs a DEGs prokázala přes 40 potenciálních AGO2 dependentních *Sclerotinia sclerotiorum* responsivních (ATSR) DEM-DEG párů zahrnujících modulaci imunitního rozpoznávání, toku vápníku, redoxní homeostázy, akumulace hormonů a jejich signalizace, modifikace buněčné stěny a homeostáze kovových iontů. Dále přispívají k této obraně i tři DEGs z identifikovaných párů DEM-DEG a to GSTU2, GSTU5, a RBOHF, které souvisí s ROS a redoxní homeostázou (Cao *et al.*, 2020).

Exprese AGO2 může být také indukována  $\gamma$ -zářením, která způsobuje DNA léze (Culligan *et al.*, 2004), zároveň ale způsobuje tvorbu diRNA, které se účastní DSB oprav (viz. kap. 2.4., Wei *et al.*, 2012).

V neposlední řadě se AGO2 podílí i na modulování tolerance k zasolení. S AGO2 proteinem interaguje protein MUG13.4 s R3H doménou (Wang *et al.*, 2019). MUG13.4 by mohl ovlivňovat štěpící aktivitu AGO2 asociovaného s miR173. MUG13.4 i AGO2 byly přednostně exprimovány v semenech a kořenech rostlin, mutanti projevovali hypersensitivitu na stres ze zasolení a zpomalený růst. V odpovědi na stres MUG13.4 rovněž intenzivně ovlivňuje fenotyp mutantu *ago2*, který je defektní ve schopnosti štěpení cílových RNA. Funkce AGO2 je tedy závislá na MUG13.4. AGO2 zvyšuje toleranci vůči stresu zasolením ovlivňováním působení signalační kaskády SOS (Shi *et al.*, 2000) na transkripční úrovni (Wang *et al.*, 2019).

### 3.2.2. AGO 3

AGO3 má podobnou genomovou lokaci a cca 70% sekvenční identitu s AGO2 (Vaucheret, 2008). Preferenčně váže 24 nt hetsiRNA s 5' A (Zhang *et al.*, 2016) rovněž bylo detekováno i jeho vázání 21 nt sRNA (Jullien *et al.*, 2020). Má antivirovou funkci, dokáže štěpit Potato spindle tuber viroid (*in vitro*, Minoia *et al.*, 2014). V rámci

epigenetického umlčování je spíše redundantní s fylogeneticky vzdálenějším AGO4 než s AGO2 (Zhang *et al.*, 2016).

AGO3 vznikl recentní duplikací v AGO2 lokusu, ale funkčně se velmi liší. AGO2 a AGO3 nemají překrývající se funkci v reprodukčních pletivech. Exprese AGO3 byla detekována v buňkách chalazálního integumentu vajíček a semen a také v oblastech zakončení cévních svazků, konkrétně na konci filament tyčinek a meristémů květenství. Oproti tomu je AGO2 převážně exprimován v samčích a samičích gametách. Ve vegetativních pletivech můžeme pozorovat bazální akumulaci AGO2, kdežto AGO3 je pod hranicí detekovatelnosti. Umístění AGO3 ve vaskulárních zakončeních naznačuje prostorově omezenou roli v antivirové obraně, jelikož floém je viry často využíván k systemické infekci – přenosu do sinkových pletiv (Jullien *et al.*, 2020). AGO3 je přítomen v cytoplazmě a kosedimentuje s monosomy i polysomy. Přítomnost ve frakci s polysomy naznačuje možnou roli v PTGS prostřednictvím inhibice translace (Jullien *et al.*, 2020).

### 3.2.3. AGO 7

Posledním členem skupiny je AGO7 (dříve označovaný ZIP). Ten asociuje převážně s 5' A miRNA se specifickým centrálním regionem (Endo *et al.*, 2013), např. s 21 nt miR390, která cílí na nekódující TAS3 transkripty, což vede k biogenezi tasiRNA (Montgomery *et al.*, 2008). tasiRNA cílí na auxin responzivní faktory (ARFs), ty se podílejí na regulaci načasování vývoje a regulaci vývoje laterálních orgánů, například ustanovení listové polarity, morfologie listu, či heteroblastie (Adenot *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2006; Hunter *et al.*, 2006). Tento vývoj je negativně ovlivněn v mutantech *drb1ago7*, *drb2ago7* a *drb4ago7*, což naznačuje důležitost DRB proteinů v této dráze (Pegler *et al.*, 2019).

## 3.3. SKUPINA AGO 4/6/8/9

AGO4, AGO6 a AGO9 váží především DCL3-dependentní 24 nt hetsiRNA s 5' A, které spouští RdDM v rostlinách (Havecker *et al.*, 2010; Mi *et al.*, 2008). AGO4 má rozsáhlou expresi v embryích a dospělých rostlinách. Oproti tomu AGO6 a AGO9 mají nízkou expresi, která je omezena na embrya a meristémové oblasti (Lee & Carroll, 2018).

### 3.3.1. AGO4

Hlavním proteinem skupiny je AGO4. Podílí se na RdDM, umlčování transpozonů a tvorbě a udržování heterochromatinu (Havecker *et al.*, 2010). Hraje také důležitou roli v meióze mateřských buněk pylu. Mutant *ago4* má defekty ve vývoji květních orgánů,

v kondenzaci chromozomů během metafáze I, opožděné chromozomy v anafázi I a vysoké procento pylových zrn v polyádách místo v tetradách vyprodukovaných na konci meiózy (Oliver *et al.*, 2016; Zilberman *et al.*, 2004). Je vyžadován pro rezistenci vůči infekci *Pseudomonas syringae* a dalším bakteriím. Bylo prokázáno, že tato rezistence funguje nezávisle na RdDM dráze (Agorio & Vera, 2007). AGO4 se také podílí na regulaci transkripce dlouhých nekódujících RNA (lncRNA). Ta je zprostředkována místně specifickými modifikacemi chromatinu pomocí AGO4 asociovaných sRNA (Tang *et al.*, 2019).

AGO4 také napomáhá obraně vůči DNA virům (geminivirům a pararetrovirům, Raja *et al.*, 2008). V Cajalových tělískách se odehrává antivirová DNA metylace. Methylace genomu Tomato Yellow Leaf Curl Virus může být blokována proteinem V2, který je kódován virem (Wang *et al.*, 2014) a interaguje s AGO4, čímž interferuje s jeho vazebnou schopností k virové DNA (Wang *et al.*, 2019). K projevení funkce virového proteinu a k potlačení AGO4-dependentní metylace je nezbytná lokalizace V2-AGO4 do Cajalových tělísek (Wang *et al.*, 2020). AGO4 dependentní metylace virové DNA je možná jen při absenci V2 proteinu. Podobné projevy byly pozorovány rovněž u Cotton Leaf Curl Multan viru (Wang *et al.*, 2019). Toto chování naznačuje, že některé druhy geminivirů si vyvinuly způsob, jak rozpoznat a zacílit AGO4 a zvýšit tak svou virovou infekci (Wang *et al.*, 2020). K podobným závěrům se došlo i při zkoumání RdDM a odpovědi na infekci virem Tobacco Rattle Virus (Diezma-Navas *et al.*, 2019).

Pro RdDM je důležitá přítomnost Pol V, která spolu s nascentním transkriptem slouží jako lešení pro vázání komplexů AGO4-siRNA. Transkripty Pol V mají na 10 pozici (z 5' konce) U, který je komplementární k A v 24 nt siRNA navázané v AGO4, a to z důvodu kotranskripčního štěpení transkriptů Pol V řízeného siRNA. Tato Pol V ke svému správnému fungování vyžaduje elongační faktor Suppressor of TY Insertion 5-like (SPT5L), jeho funkce zatím ale není hluboce prozkoumána (Liu *et al.*, 2018). Mutanti *ago4* i *spt5l* vykazují částečnou ztrátu RdDM (Liu *et al.*, 2018). SPT5L obsahuje WG/GW oblast zvanou AGO háček, stejně jako největší podjednotka Pol V (Azevedo *et al.*, 2011). SPT5L nejspíše napomáhá při několika krocích RdDM, včetně rekrutování AGO4, a následnému kotranskripčnímu slicingmu transkriptů Pol V a udržování stability a množství transkriptů Pol V (Liu *et al.*, 2018). V mutantech *spt5l* ale stále může docházet k částečné metylaci zprostředkované RdDM, a to tak, že RdDM může stále být navozena fyzickou interakcí AGO4-siRNA s DRM2. Toto chování naznačuje duální

mechanismus, kterým AGO4 stimuluje DRM2 aktivitu, buď pomocí slicingů transkriptů Pol V nebo interakcí s DRM2 (Liu *et al.*, 2018). Pro navození RdDM je tedy potřeba aby AGO4 interagoval s AGO háčkem, ať už tím na Pol V nebo na SPT5L.

AGO4 a AGO6 jsou pravděpodobně vzájemně závislé. Liší se v kolokalizaci s Pol II a Pol V v rámci buněčného jádra. AGO4 kolokalizuje a fyzicky interaguje s Pol II v nukleoplazmě, zatímco v perinukleárních ohniscích kolokalizuje s Pol V. AGO6 kolokalizuje s Pol V v nukleoplazmě, ale ne s Pol II, a v porovnání s AGO4 je důležitější v akumulaci Pol V dependentní nekódující RNA. Jsou tedy funkčně odlišné (Duan *et al.*, 2015). AGO4 je exprimován po celé rostlině, zato AGO6 převážně v SAM a RAM (Root Apical Meristem, Eun *et al.*, 2011).

### 3.3.2. AGO6

AGO6, částečně popsán již v rámci předchozí kapitoly, je důležitý pro akumulaci specifických heterochromatin souvisejících siRNA, pro DNA metylaci a TGS, v čemž je částečně redundantní s AGO4 (Zheng *et al.*, 2007). Od AGO4 se liší vazebnou preferencí pro siRNA produkovanou z jiných lokusů, což může být připisováno jejich různé expresi v čase a prostoru a interakci s cílovým lokusem (Havecker *et al.*, 2010). AGO6 také váže 21-22 nt siRNA generované z transkripčně aktivních TEs a spouští iniciaci *de novo* metylace, což by mohlo být propojením mezi PTGS a TGS TE (McCue *et al.*, 2015; Nuthikattu *et al.*, 2013).

AGO6 se účastní RdDM CHH oblasti na promotoru Allantoinase (ALN) ve specifických tkáních, která stimuluje dormanci semen v zimě. CHH metylace je stimulována nízkými teplotami při vývoji semen, tato stimulace však nebyla pozorována v dospělých rostlinách. Jedná se o tkáňově specifickou RDR6-RdDM, která umožňuje udržet informaci o dřívějších nízkých teplotách pro optimalizaci doby klíčení. Po vyklíčení je informace v embryích smazána a v těch tak může být nastavena optimální genová exprese pro další generaci. (Iwasaki *et al.*, 2019).

### 3.3.3. AGO8

AGO8 a AGO9 mají vysokou míru sekvenční shody (Vaucheret, 2008). Jsou kódovány dvěma sousedními lokusy. Struktura AGO8 se liší od ostatních AGO, hlavně v sRNA vazebné MID doméně a PIWI doméně. Tyto odlišnosti vedly dříve k závěrům, že se jedná o pseudogen (Kapoor *et al.*, 2008; Vaucheret, 2008). Jeho funkce zatím není příliš prozkoumána.

### 3.3.4. AGO9

AGO9 je exprimován v SAM a v epidermální vrstvě vyvíjejících se vajíček. Za běžných okolností je samičí gametogeneze iniciována z jedné gametické buňky, a to funkční megasporu, která je vytvořena po meióze ze somaticky odvozené megasporové mateřské buňky (MMC). Někteří rostlinní mutanti mají více MMC a jsou tak schopni formovat gamety apomikticky bez meiózy. Somatické buňky ve vajíčku jsou nejspíše schopné reagovat na vnitřní buněčné signály, které hrají roli v determinaci. V *Arabidopsis* dochází ke kontrole formace samičích gamet prostřednictvím AGO9, který omezuje specifikaci prekurzorů gametofytu. Spolehlivost kontroly specifikace prekurzorů gametofytu se odvíjí od množství mutovaných alel, jelikož alely *ago9* jsou dominantní. Mutace *ago9* způsobují diferenciaci více gametických buněk. Efekt mutace je stejný jako při mutaci SGS3 a RDR6. AGO9 asociuje s 24 nt hetsiRNA z transpozónů ve vyvíjejícím se vajíčku a limituje počet zvětšených subepidermálních diploidních meiocytů na jednu v rámci vyvíjejícího se vajíčka. AGO9 je tedy klíčový protein pro určení osudu buněk ve vajíčku (Olmedo-Monfil *et al.*, 2010).

AGO9 rovněž může vázat sRNA retrotranspozónů *Athila* exprimovaných ve vajíčku před opylením. *Athila* je typ Long Terminal Repeats Retrotransposons (LTRs), který je v *Arabidopsis* lokalizován především v pericentromerických oblastech a k jeho intaktivaci je potřeba AGO9. Jedná se o tkáňově specifický mechanismus sRNA dependentního umlčování TE ve vajíčku (Durán-Figueroa & Vielle-Calzada, 2010).

## 4. Závěr

V rámci této práce jsem nastínila důležitost proteinů Argonaut u rostliny *Arabidopsis thaliana*. Věnovala jsem se interakci proteinů s malými RNA a popsala rozdíly ve fungování s jednotlivými druhy malých RNA. Dále jsem charakterizovala proteiny Argonaut, popsala jejich strukturu a mechanismus účinku s naloženou malou RNA, se kterou formuje základ štěpícího komplexu RISC. Poté jsem upozornila i na další aktivity proteinů Argonaut. V neposlední řadě jsem se zaměřila na rozdělení proteinů Argonaut do tří skupin vytvořených na základě fylogenetické analýzy a na charakteristiku každého z nich. Proteiny Argonaut jsou dnes předmětem intenzivního výzkumu a díky tomu došlo v posledních letech alespoň částečně k prozkoumání funkce většiny z nich. Doteď se však vysoká pozornost věnovala převážně hlavním proteinům jednotlivých skupin a u ostatních členů zůstává řada nezodpovězených otázek potřebných k pochopení jejich mechanismů fungování. Ani u hlavních zástupců proteinů Argonaut výzkum není zdaleka u konce, jelikož i u nich došlo v posledních letech k řadě průlomových objevů nových funkcí.

## 5. Seznam literatury

- Adenot, X., Elmayan, T., Lauressergues, D., Boutet, S., Bouché, N., Gascioli, V., & Vaucheret, H. (2006). DRB4-Dependent TAS3 trans-Acting siRNAs Control Leaf Morphology through AGO7. *Current Biology*, 16(9), 927–932. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.03.035>
- 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>
- Ando, S., Jaskiewicz, M., Mochizuki, S., Koseki, S., Miyashita, S., Takahashi, H., & Conrath, U. (2021). Priming for enhanced ARGONAUTE2 activation accompanies induced resistance to cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology*, 22(1), 19–30. <https://doi.org/10.1111/mpp.13005>
- 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>
- Bajczyk, M., Bhat, S. S., Szewc, L., Szweykowska-Kulinska, Z., Jarmolowski, A., & Dolata, J. (2019). Novel nuclear functions of *arabidopsis* argonaute1: Beyond rna interference. *Plant Physiology*, 179(3), 1030–1039. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01351>
- 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>
- 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. (1998a). 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>
- Bologna, N. G., Iselin, R., Abriata, L. A., Sarazin, A., Pumplin, N., Jay, F., Grentzinger, T., Dal Peraro, M., & Voinnet, O. (2018). Nucleo-cytosolic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway. *Molecular Cell*, 69(4), 709–719.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.007>
- Borges, F., & Martienssen, R. A. (2015). 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., Pereira, P. A., Slotkin, R. K., Martienssen, R. A., & Becker, J. D. (2011). MicroRNA activity in the *Arabidopsis* male germline. *Journal of Experimental Botany*, *62*(5), 1611–1620. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq452>
- Branscheid, A., Marchais, A., Schott, G., Lange, H., Gagliardi, D., Andersen, S. U., Voinnet, O., & Brodersen, P. (2015). SKI2 mediates degradation of RISC 5'-cleavage fragments and prevents secondary siRNA production from miRNA targets in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research*, *43*(22), 10975–10988. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1014>
- Brosseau, C., Bolaji, A., Roussin-Léveillé, C., Zhao, Z., Biga, S., & Moffett, P. (2020). Natural variation in the *Arabidopsis* AGO2 gene is associated with susceptibility to potato virus X. *New Phytologist*, *226*(3), 866–878. <https://doi.org/10.1111/nph.16397>
- Brosseau, C., & Moffett, P. (2015). Functional and genetic analysis identify a role for *arabidopsis* ARGONAUTE5 in antiviral RNA silencing. *Plant Cell*, *27*(6), 1742–1754. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00264>
- Cai, H., Liu, L., Zhang, M., Chai, M., Huang, Y., Chen, F., Yan, M., Su, Z., Henderson, I., Palanivelu, R., Chen, X., & Qin, Y. (2021). Spatiotemporal control of miR398 biogenesis, via chromatin remodeling and kinase signaling, ensures proper ovule development. *The Plant Cell*, 1530–1553. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab056>
- Cao, J. Y., Xu, Y. P., & Cai, X. Z. (2020). Integrated miRNAome and Transcriptome Analysis Reveals Argonaute 2-Mediated Defense Responses Against the Devastating Phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00500>
- Cao, J. Y., Xu, Y. P., Li, W., Li, S. S., Rahman, H., & Cai, X. Z. (2016). Genome-wide identification of dicer-like, argonaute, and RNA-dependent RNA polymerase gene families in brassica species and functional analyses of their *arabidopsis* homologs in resistance to *sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Plant Science*, *7*(OCTOBER2016), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01614>
- Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Gilbert, K. B., Montgomery, T. A., Nguyen, T., Cuperus, J. T., & Carrington, J. C. (2012). Functional analysis of three *Arabidopsis* argonautes using slicer-defective mutants. *Plant Cell*, *24*(9), 3613–3629. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.099945>
- 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>
- Chellappan, P., Xia, J., Zhou, X., Gao, S., Zhang, X., Coutino, G., Vazquez, F., Zhang, W., & Jin, H. (2010). siRNAs from miRNA sites mediate DNA methylation of target genes. *Nucleic Acids Research*, *38*(20), 6883–6894. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq590>
- 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>

- Culligan, K., Tissier, A., & Britt, A. (2004). ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, *16*(5), 1091–1104. <https://doi.org/10.1105/tpc.018903>
- Dalmadi, Á., Gyula, P., Bálint, J., Szittyá, G., & Havelda, Z. (2019). AGO-unbound cytosolic pool of mature miRNAs in plant cells reveals a novel regulatory step at AGO1 loading. *Nucleic Acids Research*, *47*(18), 9803–9817. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz690>
- Daxinger, L., Kanno, T., Bucher, E., van der Winden, J., Naumann, U., Matzke, A. J. M., & Matzke, M. (2009). 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>
- Dolata, J., Bajczyk, M., Bielewicz, D., Niedojadlo, K., Niedojadlo, J., Pietrykowska, H., Walczak, W., Szweykowska-Kulinska, Z., & Jarmolowski, A. (2016). Salt stress reveals a new role for ARGONAUTE1 in miRNA biogenesis at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Plant Physiology*, *172*(1), 297–312. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00830>
- 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/emboj.201489453>
- Durán-Figueroa, N., & Vielle-Calzada, J. P. (2010). ARGONAUTE9-dependent silencing of transposable elements in pericentromeric regions of *Arabidopsis*. *Plant Signaling and Behavior*, *5*(11), 8–12. <https://doi.org/10.4161/psb.5.11.13548>
- Eamens, A. L., Kim, K. W., & Waterhouse, P. M. (2012). DRB2, DRB3 and DRB5 function in a non-canonical microRNA pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling and Behavior*, *7*(10). <https://doi.org/10.4161/psb.21518>
- 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>
- Eun, C., Lorkovic, Z. J., Naumann, U., Long, Q., Havecker, E. R., Simon, S. A., Meyers, B. C., Matzke, A. J. M., & Matzke, M. (2011). AGO6 functions in RNA-mediated transcriptional gene silencing in shoot and root meristems in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, *6*(10), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025730>
- 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>

- Felice, K. M., Salzman, D. W., Shubert-Coleman, J., Jensen, K. P., & Furneaux, H. M. (2009). The 5' terminal uracil of let-7a is critical for the recruitment of mRNA to Argonaute2. *Biochemical Journal*, *422*(2), 329–341. <https://doi.org/10.1042/BJ20090534>
- 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>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *391*(February), 806–811. <https://www.nature.com/articles/35888.pdf>
- Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., García, J. A., & Paz-Ares, J. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genetics*, *39*(8), 1033–1037. <https://doi.org/10.1038/ng2079>
- Frank, F., Hauver, J., Sonenberg, N., & Nagar, B. (2012). *Arabidopsis* Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs. *EMBO Journal*, *31*(17), 3588–3595. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.204>
- Garcia, D., Collier, S. A., Byrne, M. E., & Martienssen, R. A. (2006). Specification of Leaf Polarity in *Arabidopsis* via the trans-Acting siRNA Pathway. *Current Biology*, *16*(9), 933–938. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.03.064>
- Garcia-Ruiz, H., Carbonell, A., Hoyer, J. S., Fahlgren, N., Gilbert, K. B., Takeda, A., Giampetruzzi, A., Garcia Ruiz, M. T., McGinn, M. G., Lowery, N., Martinez Baladejo, M. T., & Carrington, J. C. (2015). Roles and Programming of *Arabidopsis* ARGONAUTE Proteins during Turnip Mosaic Virus Infection. *PLoS Pathogens*, *11*(3), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004755>
- Gu, S., Jin, L., Huang, Y., Zhang, F., & Kay, M. A. (2012). Slicing-independent RISC activation requires the argonaute PAZ domain. *Current Biology*, *22*(16), 1536–1542. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.040>
- 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, B., Cai, Q., Qiao, L., Huang, C. Y., Wang, S., Miao, W., Ha, T., Wang, Y., & Jin, H. (2021). RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles. *Nature Plants*, *7*(3), 342–352. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00863-8>
- Hu, P., Zhao, H., Zhu, P., Xiao, Y., Miao, W., Wang, Y., & Jin, H. (2019). Dual regulation of *Arabidopsis* AGO2 by arginine methylation. *Nature Communications*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08787-w>

- 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>
- Iki, T., Cléry, A., Bologna, N. G., Sarazin, A., Brosnan, C. A., Pumplin, N., Allain, F. H. T., & Voinnet, O. (2018). Structural Flexibility Enables Alternative Maturation, ARGONAUTE Sorting and Activities of miR168, a Global Gene Silencing Regulator in Plants. *Molecular Plant*, *11*(8), 1008–1023. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.05.006>
- Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M. C., Matsumoto-yokoyama, E., Mitsuhara, I., Meshi, T., & Ishikawa, M. (2010). Article In Vitro Assembly of Plant RNA-Induced Silencing Complexes Facilitated by Molecular Chaperone HSP90. *Molecular Cell*, *39*(2), 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.014>
- Iwakawa, H., Lam, A. Y. W., Mine, A., Fujita, T., Kiyokawa, K., Yoshikawa, M., Takeda, A., Iwasaki, S., & Tomari, Y. (2021). Ribosome stalling caused by the Argonaute-microRNA-SGS3 complex regulates the production of secondary siRNAs in plants. *Cell Reports*, *35*(13), 109300. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109300>
- 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>
- 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>
- Kawamata, T., & Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends in Biochemical Sciences*, *35*(7), 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.009>
- Kwak, P. B., & Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature Structural and Molecular Biology*, *19*(2), 145–151. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2232>
- Lee, C. H., & Carroll, B. J. (2018). 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, H. C., Chang, S. S., Choudhary, S., Aalto, A. P., Maiti, M., Bamford, D. H., & Liu, Y. (2009). QiRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage. *Nature*, *459*(7244), 274–277. <https://doi.org/10.1038/nature08041>
- Li, J. F., Chung, H. S., Niu, Y., Bush, J., McCormack, M., & Sheen, J. (2013). Comprehensive protein-based artificial microRNA screens for effective gene silencing in plants. *Plant Cell*, *25*(5), 1507–1522. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.112235>
- 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, S. S., Le, B., Ma, X., Li, S. S., You, C., Yu, Y., Zhang, B., Liu, L., Gao, L., Shi, T., Zhao, Y., Mo, B., Cao, X., & Chen, X. (2016). Biogenesis of phased siRNAs on membrane-bound polysomes in *Arabidopsis*. *ELife*, *5*, 1–24. <https://doi.org/10.7554/elife.22750>
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., & Sattler, M. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*, *426*(6965), 465–469. <https://doi.org/10.1038/nature02123>
- Liu, C., Xin, Y., Xu, L., Cai, Z., Xue, Y., Liu, Y., Xie, D., Liu, Y., & Qi, Y. (2018). *Arabidopsis* ARGONAUTE 1 Binds Chromatin to Promote Gene Transcription in Response to Hormones and Stresses. *Developmental Cell*, *44*(3), 348–361.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.12.002>
- Liu, Q., Yao, X., Pi, L., Wang, H., Cui, X., & Huang, H. (2009). The ARGONAUTE10 gene modulates shoot apical meristem maintenance and establishment of leaf polarity by repressing miR165/166 in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, *58*(1), 27–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03757.x>
- Liu, W., Duttke, S. H., Hetzel, J., Groth, M., Feng, S., Gallego-Bartolome, J., Zhong, Z., Kuo, H. Y., Wang, Z., Zhai, J., Chory, J., & Jacobsen, S. E. (2018). RNA-directed DNA methylation involves co-transcriptional small-RNA-guided slicing of polymerase  $\nu$  transcripts in *Arabidopsis*. *Nature Plants*, *4*(3), 181–188. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0100-y>
- Loreti, E., Betti, F., Ladera-Carmona, M. J., Fontana, F., Novi, G., Valeri, M. C., & Perata, P. (2020). ARGONAUTE1 and ARGONAUTE4 regulate gene expression and hypoxia tolerance. *Plant Physiology*, *182*(1), 287–300. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00741>
- 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>
- Ma, J. B., Ye, K., & Patel, D. J. (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, *429*(6989), 318–322. <https://doi.org/10.1038/nature02519>

- Mantegazza, O., Gregis, V., Chiara, M., Selva, C., Leo, G., Horner, D. S., & Kater, M. M. (2014). Gene coexpression patterns during early development of the native *Arabidopsis* reproductive meristem: Novel candidate developmental regulators and patterns of functional redundancy. *Plant Journal*, *79*(5), 861–877. <https://doi.org/10.1111/tpj.12585>
- 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/emboj.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>
- Micol-Ponce, R., Aguilera, V., & Ponce, M. R. (2014). A genetic screen for suppressors of a hypomorphic allele of *Arabidopsis* ARGONAUTE1. *Scientific Reports*, *4*. <https://doi.org/10.1038/srep05533>
- 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>
- Mlotshwa, S., Pruss, G. J., Peragine, A., Endres, M. W., Li, J., Chen, X., Poethig, R. S., Bowman, L. H., & Vance, V. (2008). Dicer-like2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, *3*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001755>
- Moldovan, D., Spriggs, A., Yang, J., Pogson, B. J., Dennis, E. S., & Wilson, I. W. (2010). Hypoxia-responsive microRNAs and trans-acting small interfering RNAs in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *61*(1), 165–177. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp296>
- 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>
- Moussian, B., Schoof, H., Haecker, A., Jürgens, G., & Laux, T. (1998). Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis. *EMBO Journal*, *17*(6), 1799–1809. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.6.1799>
- Nakanishi, K. (2016). Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *7*(5), 637–660. <https://doi.org/10.1002/wrna.1356>

- Nakanishi, K., Weinberg, D. E., Bartel, D. P., & Patel, D. J. (2012). Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature*, *486*(7403), 368–374. <https://doi.org/10.1038/nature11211>
- Naumann, U., Daxinger, L., Kanno, T., Eun, C., Long, Q., Lorkovic, Z. J., Matzke, M., & Matzke, A. J. M. (2011). Genetic evidence that DNA methyltransferase DRM2 has a direct catalytic role in RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, *187*(3), 977–979. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.125401>
- Nuthikattu, S., McCue, A. D., Panda, K., Fultz, D., DeFraia, C., Thomas, E. N., & Keith Slotkin, R. (2013). The initiation of epigenetic silencing of active transposable elements is triggered by RDR6 and 21-22 nucleotide small interfering RNAs. *Plant Physiology*, *162*(1), 116–131. <https://doi.org/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>
- Pajerowska-Mukhtar, K. M., Wang, W., Tada, Y., Oka, N., Tucker, C. L., Fonseca, J. P., & Dong, X. (2012). The HSF-like transcription factor TBF1 is a major molecular switch for plant growth-to-defense transition. *Current Biology*, *22*(2), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.12.015>
- Panda, K., Ji, L., Neumann, D. A., Daron, J., Schmitz, R. J., & Slotkin, R. K. (2016). Full-length autonomous transposable elements are preferentially targeted by expression-dependent forms of RNA-directed DNA methylation. *Genome Biology*, *17*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1032-y>
- Pegler, J. L., Oultram, J. M. J., Curtin, S. J., Grof, C. P. L., & Eamens, A. L. (2019). Further Disruption of the TAS3 Pathway via the Addition of the AGO7 Mutation to the DRB1, DRB2 or DRB4 Mutations Severely Impairs the Reproductive Competence of *Arabidopsis thaliana*. *Agronomy*, *9*(11), 1–23. <https://doi.org/10.3390/agronomy9110680>
- 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>
- Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J., & Bartel, D. P. (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*, *20*(24), 3407–3425. <https://doi.org/10.1101/gad.1476406>
- 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>

- Rivas, F. v., Tolia, N. H., Song, J. J., Aragon, J. P., Liu, J., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nature Structural and Molecular Biology*, *12*(4), 340–349. <https://doi.org/10.1038/nsmb918>
- Röhl, A., Rohrberg, J., & Buchner, J. (2013). The chaperone Hsp90: Changing partners for demanding clients. *Trends in Biochemical Sciences*, *38*(5), 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.02.003>
- 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>
- Schalk, C., Cognat, V., Graindorge, S., Vincent, T., Voinnet, O., & Molinier, J. (2017). Small RNA-mediated repair of UV-induced DNA lesions by the DNA damage-binding protein 2 and argonaute 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(14), E2965–E2975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618834114>
- Schuck, J., Gursinsky, T., Pantaleo, V., Burgyán, J., & Behrens, S. E. (2013). AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant in vitro system. *Nucleic Acids Research*, *41*(9), 5090–5103. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt193>
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., & Zhu, J. K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(12), 6896–6901. <https://doi.org/10.1073/pnas.120170197>
- Smith, M. R., Willmann, M. R., Wu, G., Berardini, T. Z., Möller, B., Weijers, D., & Poethig, R. S. (2009). Cyclophilin 40 is required for microRNA activity in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(13), 5424–5429. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812729106>
- Souret, F. F., Kastenmayer, J. P., & Green, P. J. (2004). AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Molecular Cell*, *15*(2), 173–183. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.006>
- 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>
- Tolia, N. H., & Joshua-Tor, L. (2007). Slicer and the Argonautes. *Nature Chemical Biology*, *3*(1), 36–43. <https://doi.org/10.1038/nchembio848>
- Tsuzuki, M., Takeda, A., & Watanabe, Y. (2014). Recovery of dicer-like 1-late flowering phenotype by miR172 expressed by the noncanonical DCL4-dependent biogenesis pathway. *Rna*, *20*(8), 1320–1327. <https://doi.org/10.1261/rna.044966.114>

- 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. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: Mechanisms and regulations. *Genes and Development*, *20*(7), 759–771. <https://doi.org/10.1101/gad.1410506>
- Vaucheret, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science*, *13*(7), 350–358. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.04.007>
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P., & Bartel, D. P. (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes and Development*, *18*(10), 1187–1197. <https://doi.org/10.1101/gad.1201404>
- Vazquez, F., Gascioli, V., Crété, P., & Vaucheret, H. (2004). The Nuclear dsRNA Binding Protein HYL1 Is Required for MicroRNA Accumulation and Plant Development, but Not Posttranscriptional Transgene Silencing. *Current Biology*, *14*(4), 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.01.035>
- Wang, B., Li, F., Huang, C., Yang, X., Qian, Y., Xie, Y., & Zhou, X. (2014). V2 of tomato yellow leaf curl virus can suppress methylation-mediated transcriptional gene silencing in plants. *Journal of General Virology*, *95*(PART 1), 225–230. <https://doi.org/10.1099/vir.0.055798-0>
- Wang, H., Liu, C., Ren, Y., Wu, M., Wu, Z., Chen, Y., He, L., Tang, B., Huang, X., Shabala, S., Yu, M., & Huang, L. (2019). An RNA-binding protein MUG13.4 interacts with AtAGO2 to modulate salinity tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Science*, *288*(February), 110218. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110218>
- Wang, J. W. (2014). Regulation of flowering time by the miR156-mediated age pathway. *Journal of Experimental Botany*, *65*(17), 4723–4730. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru246>
- Wang, L., Ding, Y., He, L., Zhang, G., Zhu, J. K., & Lozano-Duran, R. (2020). A virus-encoded protein suppresses methylation of the viral genome through its interaction with ago4 in the cajal body. *ELife*, *9*, 1–21. <https://doi.org/10.7554/eLife.55542>
- 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, X., Wang, Y., Dou, Y., Chen, L., Wang, J., Jiang, N., Guo, C., Yao, Q., Wang, C., Liu, L., Yu, B., Zheng, B., Chekanova, J. A., Ma, J., & Ren, G. (2018). Degradation of unmethylated miRNA/miRNA\*s by a DEDDy-type 3' to 5' exoribonuclease Atrimmer 2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(28), E6659–E6667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721917115>

- Wang, Y., Wu, Y., Gong, Q., Ismayil, A., Yuan, Y., Lian, B., Jia, Q., Han, M., & Deng, H. (2019). Geminiviral V2 Protein Suppresses Transcriptional Gene. *Journal of Virology*, *93*(6), 1–15.
- 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>
- Wu, L., Mao, L., & Qi, Y. (2012). Roles of DICER-LIKE and ARGONAUTE proteins in TAS-derived small interfering RNA-triggered DNA methylation. *Plant Physiology*, *160*(2), 990–999. <https://doi.org/10.1104/pp.112.200279>
- Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S. A., & Carrington, J. C. (2005). Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant Physiology*, *138*(4), 2145–2154. <https://doi.org/10.1104/pp.105.062943>
- Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., Jacobsen, S. E., & Carrington, J. C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, *2*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020104>
- Yang, G., Li, Y., Wu, B., Zhang, K., Gao, L., & Zheng, C. (2019). MicroRNAs transcriptionally regulate promoter activity in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, *61*(11), 1128–1133. <https://doi.org/10.1111/jipb.12775>
- Ye, R., Wang, W., Iki, T., Liu, C., Wu, Y., Ishikawa, M., Zhou, X., & Qi, Y. (2012). Cytoplasmic Assembly and Selective Nuclear Import of *Arabidopsis* ARGONAUTE4/siRNA Complexes. *Molecular Cell*, *46*(6), 859–870. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.04.013>
- Yoshikawa, M., Iki, T., Tsutsui, Y., Miyashita, K., Scott Poethig, R., Habu, Y., & Ishikawa, M. (2013). 3' fragment of miR173-programmed RISC-cleaved RNA is protected from degradation in a complex with RISC and SGS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(10), 4117–4122. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217050110>
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Mee, Y. P., & Poethig, R. S. (2005). 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>
- Zhan, J. (2021). Get out and stay out: spatiotemporally regulated miR398 biogenesis enables proper ovule development. *The Plant Cell*, 1403–1404. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab054>
- Zhang, C., Fan, L., Le, B. H., Ye, P., Mo, B., & Chen, X. (2020). Regulation of ARGONAUTE10 Expression Enables Temporal and Spatial Precision in Axillary Meristem Initiation in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, *55*(5), 603–616.e5. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2020.10.019>
- Zhang, Xiaoming, Zhao, H., Gao, S., Wang, W. C., Katiyar-Agarwal, S., Huang, H. da, Raikhel, N., & Jin, H. (2011). *Arabidopsis* Argonaute 2 Regulates Innate Immunity via

- miRNA393\*-Mediated Silencing of a Golgi-Localized SNARE Gene, MEMB12. *Molecular Cell*, 42(3), 356–366. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.010>
- Zhang, Xiaoyu, Henderson, I. R., Lu, C., Green, P. J., & Jacobsen, S. E. (2007). Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), 4536–4541. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611456104>
- Zhang, Z., Hu, F., Sung, M. W., Shu, C., Castillo-González, C., Koiwa, H., Tang, G., Dickman, M., Li, P., & Zhang, X. (2017). RISC-interacting clearing 3'-5' exoribonucleases (RICES) degrade uridylylated cleavage fragments to maintain functional RISC in *Arabidopsis thaliana*. *ELife*, 6, 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.24466>
- Zhang, Z., Liu, X., Guo, X., Wang, X. 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>
- Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A., & Zhu, J. K. (2007). Role of *Arabidopsis* AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *EMBO Journal*, 26(6), 1691–1701. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601603>
- 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., Zhou, Y., Castillo-González, C., Lu, A., Ge, C., Zhao, Y. T., Duan, L., Li, Z., Axtell, M. J., Wang, X. J., & Zhang, X. (2013). Bidirectional processing of pri-miRNAs with branched terminal loops by *Arabidopsis* Dicer-like1. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(9), 1106–1115. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2646>
- 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>