

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor:

Speciální chemicko-biologické obory



Šárka Motylová

Methylace DNA řízená malými RNA u *Arabidopsis thaliana*

RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Praha, 2013

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.

Podpis

V Praze dne 13. května 2013

Poděkování:

Děkuji RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D. za cenné připomínky, rady a vedení po celou dobu zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří mě při psaní této práce podporovali.

Obsah

Abstrakt	iv
Abstract	iv
Seznam použitých zkratek	v
1. Úvod	1
2. Klasifikace malých RNA	2
2.1 Proteiny biogeneze malých RNA	2
2.2 microRNA	3
2.3 siRNA	4
2.3.1 hc-siRNA	5
3. Epigenetické modifikace chromatinu	6
3.1 Modifikace histonů	7
3.1.1 H3K9 metylace	7
3.1.2 H3K27 metylace	9
3.2 Histonové varianty	10
3.3 Methylace DNA	11
3.4 Demethylace DNA	13
4. Role RNA Polymerázy IV a V v RdDM	14
4.1 Historie objevu a označení	14
4.2 Dvě největší podjednotky Pol IV a V	14
4.3 Buněčná lokalizace Pol IV a V	18
4.4 Funkce Pol IV a V	19
4.4.1 RNA Polymeráza IV	20
4.4.2 RNA Polymeráza V	21
4.5 Proteiny tvořící komplex s Pol V	21
4.5.1 Komplex DDR	21
4.5.2 Proteiny KTF1 a IDN2	22
4.5.3 Proteiny AGO4, AGO6 a AGO9	23
5. Role RNA polymerázy II v RdDM	25
6. Závěr	26
Seznam použité literatury	27

Abstrakt

Rozdílná transkripční aktivita různých oblastí genomu je zajišťována epigenetickými modifikacemi, mezi které patří metylace DNA, úprava N-koncových aminokyselin histonů a změny v zastoupení histonových variant. RNA interference je regulační proces, při kterém dochází prostřednictvím malých RNA odvozených z exogenních či endogenních sekvencí k posttranskripčnímu nebo transkripčnímu umlčení těchto sekvencí. 24-nukleotidové siRNA, tvořící část malých RNA, řídí *de novo* metylaci a spoluúčastní se udržování metylace DNA (RNA-directed DNA methylation; RdDM), která se podílí na transkripčním umlčení heterochromatinu a transponovatelných elementů, vyskytujících se u rostlin ve velkém množství. Pro krytosemenné je také charakteristická přítomnost RNA polymeráz IV a V účastnících se v této dráze, které byly poprvé objeveny v genomu *Arabidopsis thaliana*, jež se stala hlavní modelovou rostlinou i pro studium RdDM. Polymeráza IV přepisuje prekurzory siRNA; siRNA jsou následně asociované s AGO4 proteiny a navádějí metylační enzymy na cílové sekvence prostřednictvím komplementarity s transkripty polymerázy V.

Klíčová slova: RdDM (methylace DNA řízená RNA), siRNA, Pol IV, Pol V, Pol II, heterochromatin, epigenetické modifikace, metylace DNA, transkripční umlčení, *Arabidopsis*

Abstract

The differential transcriptional activity of the genome is provided by epigenetic modifications, which include DNA methylation, alteration of histone N-terminal amino acids and changes in histone variants. RNA interference is a regulatory process, in which transcriptional or post-transcriptional silencing of exogenous or endogenous sequences is mediated by the action of small RNAs derived from these sequences. The 24-nucleotide siRNAs, forming a fraction of small RNAs, direct *de novo* DNA methylation and participate in the maintenance of DNA methylation (RNA-directed DNA methylation; RdDM), which facilitates transcriptional silencing of heterochromatin and transposable elements representing a large part of plant genomes. The presence of two RNA polymerases involved in this pathway is characteristic for flowering plants, which were discovered for the first time in the genome of *Arabidopsis thaliana*, which has also become the main plant model for the study of RdDM. Polymerase IV transcribes siRNA precursors; siRNAs are subsequently associated with AGO4 proteins and guide methylation enzymes to the target sequences via complementarity with polymerase V transcripts.

Keywords: RdDM (RNA-directed DNA methylation), siRNA, Pol IV, Pol V, Pol II, heterochromatin, epigenetic modifications, DNA methylation, transcriptional silencing, *Arabidopsis*

Seznam použitých zkratek

AGO	Argonaute
ATX	Arabidopsis homolog of Trithorax
CLSY1	Classy 1
CMT2	Chromomethylase 2
CMT3	Chromomethylase 3
DCL	Dicer-like
DDM1	Deficient in DNA methylation 1
DME	Demeter
DML	Demeter-like
DMS3	Defective in meristem silencing 3
DRD1	Defective in RNA-directed DNA methylation 1
DRM1/2	Domains rearranged methyltransferase 1/2
dsRNA	double-stranded RNA
H3K27me3	Histone 3 lysine 27 trimethylation
H3K9me2	Histone 3 lysine 9 dimethylation
hc-siRNA	heterochromatic siRNA
HDA6	Histone deacetylase 6
HEN1	Hua enhancer 1
HYL1	Hyponastic leaves 1
IBM1	Increase in Bonsai methylation 1
IND2	Involved in <i>de novo</i> 1
KTF1	Kow domain-containing transcription factor 1
KYP/SUVH4	Kryptonite/ Suppressor of variegation 3-9 homolog protein 4
lncRNA	long non-coding RNA
MET1	Methyltransferase 1
miRNA	microRNA
nat-siRNA	natural <i>cis</i> -antisense transcript siRNA
NRPB2	Nuclear RNA polymerase B 2 (podjednotka Pol II)
NRPD1	Nuclear RNA polymerase D 1 (podjednotka Pol IV)
NRPD2/NRPE2	Nuclear RNA polymerase D 2/E 2 (podjednotka Pol IV a V)
NRPE1	Nuclear RNA polymerase E 1 (podjednotka Pol V)
Pol II	RNA polymerase II
Pol IV	RNA polymerase IV
Pol V	RNA polymerase V
PTGS	Post-transcriptional gene silencing
RdDM	RNA-directed DNA methylation
RDM1	RNA-directed DNA methylation 1
RDR	RNA-dependent RNA polymerase
RNAi	RNA interference
ROS1	Repressor of silencing 1
SET doména	Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax domain
siRNA	small interfering RNA
SRA doména	SET and RING finger associated domain
sRNA	small RNA
ssDNA	single-stranded DNA
ssRNA	single-stranded RNA
SUVR	Su(var)3-9 related = Suppressor of variegation 3-9 related protein
ta-siRNA	<i>trans</i> -acting siRNA
TGS	Transcriptional gene silencing

1. Úvod

Již v 80. letech minulého století byla k blokování exprese vybraných genů využívána RNA v „antisense“ orientaci vůči příslušné mRNA (Izant and Weintraub, 1985). Tento jev byl považován za důsledek mechanického zabránění translaci hybridizovanými molekulami RNA a byl označen jako RNA interference (RNAi). U rostlin bylo později umlčování zprostředkované RNAi pozorováno také po vnesení transgenů bez přítomnosti umělého „antisense“ konstruktů (Napoli et al., 1990) a o několik let později byly objeveny malé nekódující RNA u *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993). Teprve na konci 90. let bylo zjištěno, že RNAi je aktivní proces primárně založený na vytvoření dvouvláknových molekul RNA (dsRNA), které jsou dále zpracovávány za vzniku malých RNA molekul dlouhých 20 – 30 nukleotidů (Fire et al., 1998; Hamilton and Baulcombe, 1999). Tyto malé RNA rozpoznávají cílové sekvence na základě komplementarity a proteiny s nimi asociované spouštějí procesy vedoucí k umlčení genové exprese na post-transkripční (post-transcriptional gene silencing; PTGS) nebo transkripční úrovni (transcriptional gene silencing; TGS). Jedná se přitom o starý regulační proces evolučně konzervovaný mezi eukaryoty (Meister and Tuschl, 2004).

Za posledních deset let se naše znalosti o procesech souvisejících s RNAi značně prohloubily, přesto zde existuje řada nezodpovězených otázek. Velkou měrou na našich dosavadních znalostech o této problematice přispěl výzkum na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*, kde můžeme nalézt celou řadu drah regulovaných právě tímto mechanismem. Jedná se o regulaci organogeneze, gametogeneze, auxinové signalizace, odpovědi na biotické a abiotické stresy, jako např. obrana především před virovými, ale i bakteriálními patogeny, oxidativním stresem, chladem nebo nedostatkem živin (Adenot et al., 2006; Borsani et al., 2005; Garcia-Ruiz et al., 2010; Katiyar-Agarwal et al., 2006; Rhoades et al., 2002; Swiezewski et al., 2007; Vaucheret et al., 2004). Dále se malé RNA zásadním způsobem podílejí na ochraně před nekontrolovanou aktivací transponovatelných elementů, na integritě heterochromatinu (Lippman et al., 2004) a také na umlčování transgenů (Luo and Chen, 2007). Z těchto příkladů je patrné, jak důležité je pokusit se porozumět drahám, ve kterých tyto malé RNA působí. Můžeme tak získat nástroj jak zabránit nechtěnému umlčení transgenů nebo naopak záměrně umlčet vybraný gen či vytvářet geneticky modifikované rostliny odolnější vůči negativním vlivům okolního prostředí.

V buňkách *Arabidopsis* nacházíme dvě základní třídy malých RNA: microRNA (miRNA) a small interfering RNA (siRNA), které se od sebe liší především svojí biogenezí a způsobem fungování. Zatímco miRNA vznikají vždy z genů kódujících jejich prekurzory a post-transkripčně umlčují produkty jiných lokusů, siRNA vznikají především z oblastí intergenových a repetitivních sekvencí a mohou působit jak post-transkripční i transkripční umlčení lokusů, ze kterých jsou přímo odvozeny, tak i dalších lokusů *in trans* podobně jako miRNA. Právě dráze zahrnující transkripční umlčení prostřednictvím siRNA a s tím související metylaci DNA (RNA-directed DNA methylation; RdDM) je věnována tato práce s cílem shrnout a zhodnotit známé poznatky se zaměřením na roli pro rostliny

unikátních RNA polymeráz IV a V a na vzájemnou provázanost epigenetických modifikací heterochromatinu.

2. Klasifikace malých RNA

Prostřednictvím malých RNA (sRNA) je realizováno transkripční a post-transkripční umlčení (TGS; PTGS), které – jak již bylo zmíněno – se podílí na řadě pochodů v rostlinném organismu. PTGS se rozumí zabránění či redukce exprese genu na úrovni mRNA, která je degradována nebo je jiným způsobem zabráněno její translaci. TGS představuje blokování exprese již na úrovni transkripce epigenetickými modifikacemi chromatinu, kterými jsou metylace cytosinových bází v sekvenci DNA a modifikace histonů.

2.1 Proteiny biogeneze malých RNA

V rostlinách tvořené typy sRNA lze rozdělit podle délky na 21-, 22- a 24-nukleotidové. Výrazně převažuje třída 24-nt sRNA, kterých se tvoří asi dvakrát více než 21-nukleotidových. Nejméně početnou skupinu tvoří 22-nt siRNA (Zhang et al., 2007a). Všem třídám malých RNA je společná část biogeneze obsahující enzymatickou dráhu DCL – HEN1 – AGO, která se mezi jednotlivými druhy malých RNA odlišuje především zastoupením určitých paralogů DCL a AGO (ARGONAUTE) proteinů.

Na vzniku většiny malých RNA se podílí některá z buněčných RNA-dependentních RNA polymeráz (RDR), která generuje dsRNA prekurzor dále zpracováváný enzymem DCL (DICER-LIKE). Výjimku tvoří miRNA a další endogenní sekvence s invertovanými repeticemi, některé siRNA odvozené z virů (Blevins et al., 2011), některé nat-siRNA (Zhang et al., 2012) a siRNA odvozené z „antisense“ transgenů či z transgenů s invertovanou repeticí (Béclin et al., 2002). U RDR z listů rajčete byla *in vitro* prokázána enzymatická aktivita RNA polymerázy na ssRNA i ssDNA templátu s primerem i bez něj. Rostlinné RDR končí transkripci přiřazením jednoho nepárového 3' koncového nukleotidu, kterým je většinou purin (Schiebel et al., 1993). *Arabidopsis* kóduje šest genů pro RDR. RDR1, RDR2, RDR6 jsou si evolučně bližší oproti RDR3a, RDR3b a RDR3c, které vznikly relativně nedávnými duplikacemi a jejichž funkce je neznámá (Zong et al., 2009). RDR1 a RDR6 jsou zapojeny v antivirové obraně (Wang et al., 2010), RDR6 se navíc účastní biogeneze ta-siRNA (Yoshikawa et al., 2005), nat-siRNA (Katiyar-Agarwal et al., 2006) a PTGS „sense“ transgenů (Luo and Chen, 2007). RDR2 asociuje s Pol IV a je součástí dráhy RdDM zprostředkující transkripční umlčení a udržování heterochromatinu (Haag et al., 2012; Kasschau et al., 2007).

Arabidopsis obsahuje ve svém genomu celkem čtyři geny pro DCL proteiny, jejichž homology najdeme u řady dalších eukaryot (Bernstein et al., 2001). Obsahují dvě domény RNázy III, což jim umožňuje štěpit dsRNA prekurzory malých RNA za vzniku krátkých zpravidla 21 – 24-nt dsRNA duplexů s 2-nt přesahy na 3' koncích (Zhang et al., 2004). DCL1 se podílí převážně na maturaci

miRNA (Kurihara and Watanabe, 2004), DCL2 se účastní tvorby siRNA vyvolaných antivirovou odpovědí a byla popsána i jeho účast v produkci nat-siRNA (Borsani et al., 2005), DCL3 je zodpovědný hlavně za vznik endogenních 24-nt hc-siRNA (heterochromatic siRNA; Xie et al., 2004) a DCL4 má úlohu ve zpracování prekurzorů ta-siRNA a také v antivirové obraně (Gascioli et al., 2005). Existuje však částečný překryv a zástupnost funkcí DCL enzymů na jednotlivých drahách vzniku malých RNA (Gascioli et al., 2005).

Dalším krokem v dráze RNAi je metylace 3' koncových nukleotidů duplexu na 2'OH skupině zprostředkovaná metyltransferázou HEN1 (HUA ENHANCER 1) preferující 21 – 24 nt dlouhé RNA-duplexy, které jsou tak chráněny před degradací (Yang et al., 2006). Ne všechny hc-siRNA však HEN1 vyžadují; mutace *hen1* má negativní vliv pouze na siRNA odvozené z 5S rDNA a retroelementů (Xie et al., 2004).

Jedno vlákno z duplexu sRNA je pak selektivně asociováno s některým z AGO proteinů (Baumberger and Baulcombe, 2005), kterých se v genomu *Arabidopsis* nachází celkem deset. Rodina AGO proteinů zahrnuje podskupiny AGO a PIWI. Na rozdíl od AGO podskupiny se ale PIWI u rostlin nenacházejí a nalezneme je pouze u živočichů (Carmell et al., 2002; Fagard et al., 2000). Proteiny AGO obsahují PAZ doménu, vyskytující se také u DCL proteinů a sloužící k vazbě 3' konce sRNA, a dále C-koncovou PIWI doménu, která je příbuzná RNáze H a je schopná štěpit vlákno RNA (Song et al., 2004). Zatím není známo, jaké všechny mechanismy se podílejí na třídění sRNA do komplexu s příslušnými AGO proteiny, ale jedním z důležitých faktorů je 5' koncový nukleotid sRNA, který je vázán MID doménou. AGO1 má preferenci pro uridin jako 5' koncovou bázi, u AGO4 je to adenin (Mi et al., 2008). Zdá se, že délka sRNA naopak není příliš rozhodující. Poté, co je rekrutováno jedno vlákno z duplexu (guiding strand), AGO štěpí cílovou sekvenci obsahující úsek komplementární k sRNA (Baumberger and Baulcombe, 2005; Qi et al., 2005), i když ke štěpení v určitých případech docházet nemusí (Brodersen et al., 2008). AGO1 a AGO7 mají prokázanou roli v post-transkripčním umlčení (Montgomery et al., 2008; Qi et al., 2005), zatímco AGO4, AGO6 a AGO9 se účastní transkripčního umlčení (Havecker et al., 2010; Zilberman et al., 2003).

2.2 microRNA

U rostlin podobně jako u živočichů tvoří miRNA třídu 21 – 24 nt dlouhých endogenních sRNA (Reinhart et al., 2002), které jsou přepisovány RNA polymerázou II z nekódujících MIR genů (Lee et al., 2004). Takto transkribované prekurzory miRNA zvané pri-miRNA obsahují 5' čepičku a 3' polyadenylovaný konec (Lee et al., 2004), mezi kterými se nalézá komplementární oblast vytvářející vlásenku (Reinhart et al., 2002). Pri-miRNA jsou pak dále ve dvou či více krocích štěpeny DCL1 za vzniku většinou nedokonale párující vlásenky (pre-miRNA) až na dvouvláknový duplex (Kurihara and Watanabe, 2004). Na tomto procesu se podílí dsRNA vázající protein HYL1 (HYPONASTIC LEAVES 1) a SE (SERRATE), které stimulují DCL1 ke štěpení pre-miRNA a zvyšují jeho přesnost (Dong et al., 2008). AGO1 s navázanou miRNA pak zprostředkuje štěpení

komplementární mRNA (Baumberger and Baulcombe, 2005; Qi et al., 2005) nebo zabráni translaci jiným způsobem (Brodersen et al., 2008).

Rostlinné miRNA jsou především významnými regulátory fyziologických a vývojových procesů, čemuž odpovídá evoluční konzervovanost celé řady rodin MIR genů. Většina miRNA je komplementární k mRNA transkripčních faktorů a proteinů řídících organogenezi a vývoj pletiv, mezi ně patří např. PHABULOSA (PHB), PHAVOLUTA (PHV), SCARECROW-like proteiny či MYB transkripční faktory, dále LEAFY, APELATA2, UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO) nebo CUP-SHAPED COTYLEDON 2 (CUC2). Další významnou skupinou proteinů, jejichž expresi ovlivňují miRNA jsou F-box proteiny, které mají samy regulační funkci, např. TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) účastníci se dráhy odpovědi na auxin či již zmíněný UFO (Jones-Rhoades and Bartel, 2004; Rhoades et al., 2002). miRNA také řídí biogenezi ta-siRNA, o kterých se zmiňuje následující kapitola (Allen et al., 2005).

2.3 siRNA

Do kategorie siRNA patří sRNA účastníci se transkripčního (TGS) i post-transkripčního umlčení (PTGS). PTGS může být namířeno proti exogenním sekvencím virového či transgenního původu nebo proti endogenním sekvencím nacházejícím se ve vlastním genomu. Endogenní PTGS zajišťují vedle miRNA také ta-siRNA (*trans*-acting siRNA) a nat-siRNA (natural *cis*-antisense transcript siRNA).

Převážně 21 nt dlouhé ta-siRNA jsou v genomu *Arabidopsis* zastoupeny čtyřmi genovými rodinami (TAS1 – 4), které se účastní především vývojové regulace (Rajagopalan et al., 2006). Například TAS3 ta-siRNA blokuje nadměrnou expresi transkripčních faktorů ARF3 a ARF4 (AUXIN RESPONSE FACTOR 3, 4), potřebných ke správnému vývoji listů (Adenot et al., 2006). Primární transkripty TAS genů jsou štěpeny AGO1 s navázanou komplementární miRNA, což je následováno jejich doplněním na dvouvláknovou molekulu enzymem RDR6 za stabilizující účasti SGS3 (SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3). dsRNA jsou následně zpracovány DCL4 a jednotlivé ta-siRNA pak prostřednictvím AGO1 nebo AGO7 regulují hladinu mRNA cílových genů (Adenot et al., 2006; Baumberger and Baulcombe, 2005; Vazquez et al., 2004; Yoshikawa et al., 2005).

Nat-siRNA vznikají z komplementárních oblastí transkriptů částečně se překrývajících genů v „antisense“ orientaci (Borsani et al., 2005). Hlavní rolí nat-siRNA je odpověď na abiotické a biotické stresy. V genomu *Arabidopsis* se vyskytuje přes 1400 takovýchto párových genů generujících nat-siRNA, jejichž produkce výrazně stoupá při reakci na stresové podmínky (Zhang et al., 2012). Biogeneze nat-siRNA není stále příliš zmapována. Nat-siRNA zprostředkuje degradaci komplementárního transkriptu některým z AGO proteinů, kterým by mohl být AGO1 (Wang et al., 2011). Toto štěpení může vést ke vzniku sekundárních nat-siRNA z daného transkriptu (Borsani et al., 2005). Zdá se, že způsob vzniku nat-siRNA souvisí s jejich délkou. Zatímco všechny identifikované 24-nt nat-siRNA jsou závislé na DCL3, RDR2 a RNA polymeráze IV, 21-nt nat-siRNA potřebují pro

svůj vznik DCL1, ale jen některé z jich RDR6 a Pol IV (Borsani et al., 2005; Katiyar-Agarwal et al., 2006; Zhang et al., 2012). Úloha RNA polymerázy IV v tvorbě nat-siRNA zůstává tedy stále nezodpovězena.

Další velkou skupinou sRNA jsou siRNA, jejichž úkolem je ochrana před cizorodými nebo nebezpečnými sekvencemi, např. virů, transgenů a transponovatelných elementů. Primární siRNA (vsRNA) odvozené z dsRNA molekul RNA virů vznikají štěpením DCL2 a DCL4 a následnou metylací HEN1 (Garcia-Ruiz et al., 2010; Kasschau et al., 2007; Vazquez et al., 2003). Prostřednictvím AGO1 pak dochází ke štěpení virových RNA (Garcia-Ruiz et al., 2010; Morel et al., 2002). Sekundární vsRNA jsou generovány činností RDR1 a RDR6, které vytvářejí dsRNA prekurzory dále opět zpracovávané DCL2 a DCL4. Tvorba těchto sekundárních vsRNA výrazně zvyšuje účinnost antivirové odpovědi (Wang et al., 2010). Dráha PTGS, která funguje také proti rostlinným DNA virům, je ještě komplexnější a účastní se jí všechny čtyři DCL proteiny (Blevins et al., 2011). Zdá se, že zastoupení jednotlivých složek RNAi by se tedy mohlo obměňovat v závislosti na typu viru a jeho strategii, kterou používá k potlačení antivirové odpovědi (Vaucheret, 2006).

K umlčování transgenů může docházet na post-transkripční i transkripční úrovni. Umlčení může být spuštěno „sense“ transgenem bez terminátoru nebo jeho nadměrnou expresí. V tomto případě vyžaduje PTGS enzym RDR6 pro tvorbu dsRNA a AGO1 (Luo and Chen, 2007; Morel et al., 2002). Jinou možností je umlčení vnesením sekvence s vnitřní komplementaritou (IR-PTGS), která sama vede k vytvoření dlouhého úseku dsRNA (Smith et al., 2000) bez potřeby RDR6 (Béclin et al., 2002). PTGS transgenů je někdy spjata také s jejich TGS prostřednictvím metylace DNA, která pak bývá redukována i v mutantech dráhy PTGS (Morel et al., 2002).

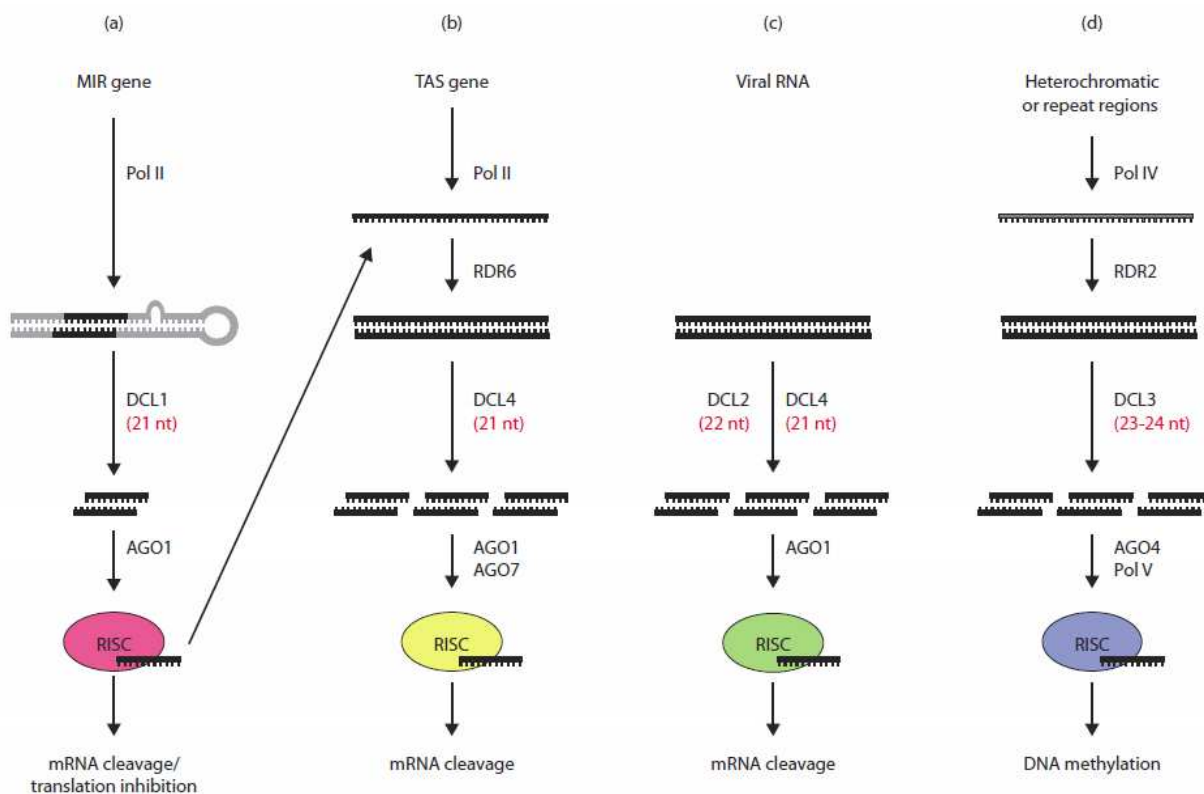
2.3.1 *hc-siRNA*

Významná frakce siRNA *Arabidopsis* vzniká z metylovaných oblastí genomu (heterochromatic siRNA; hc-siRNA). Do této frakce spadá přibližně 90% všech 24-nt siRNA; pro 21-nt siRNA se jedná o více než 40% a pro 22-nt siRNA přes 60% (Zhang et al., 2007a). 27 % všech endogenních siRNA je odvozeno z transpozonů a retroelementů. Naprostá většina siRNA je odvozena z mezigenových oblastí, které jsou tvořeny unikátními oblastmi přilehlými ke genům, ale také obsahují repetitivní sekvence, invertované repetice či satelitní DNA (Xie et al., 2004).

Sekvence, ze kterých jsou jednotlivé velikostní třídy siRNA přepisovány se vzájemně překrývají, což platí především pro 21- a 22-nt siRNA. To naznačuje, že dráhy pro jednotlivé třídy siRNA mohou v určitých oblastech genomu fungovat současně (Zhang et al., 2007a).

Transkripční umlčení endogenních sekvencí je zprostředkováno převážně 24-nt siRNA odvozenými z těchto sekvencí činností rostlinné RNA polymerázy IV (Pol IV), jejíž transkripty jsou zřejmě zpracovávány do dsRNA prekurzorů RDR2, dále štěpeny DCL3 a asociovány s AGO4, který interaguje s další rostlinnou RNA polymerázou V (Pol V), jejíž transkripty/ nascentní transkripty navádějí enzymy modifikující chromatin na cílová místa genomu (Kasschau et al., 2007; Pontier et al.,

2005; Wierzbicki et al., 2008, 2009; Xie et al., 2004). Řada otázek kolem dráhy metylace DNA řízené malými RNA (RdDM) zůstává stále nevyjasněna, např. enzymová aktivita Pol IV a V, způsob jejich rekrutování na cílové lokusy, sestavování komplexů zajišťujících epigenetické modifikace nebo vzájemná regulace a hierarchie těchto modifikací. Poznatky, které by mohly vést ke konečnému zodpovězení těchto a dalších otázek, se snaží shrnout následující kapitoly.



Obr. 1. Schéma drah malých RNA u rostlin: (a) dráha miRNA, (b) dráha ta-siRNA, (c) dráha virových siRNA, (d) dráha hc-siRNA. RISC je tzv. RNA-induced silencing komplex, jehož součástí je vždy některý z AGO proteinů. (Převzato z: Molnar et al., 2011)

3. Epigenetické modifikace chromatinu

U eukaryot regulují epigenetické modifikace, jakými jsou modifikace histonových aminokyselinových zbytků, zastoupení histonových typů a metylace DNA, expresi a strukturu genomu. Jedná se tedy o doprovodnou dědičnou informaci, která se obnovuje po každé replikaci genomu a společně se sekvencí DNA charakterizuje daného jedince. Regulace metylace DNA a modifikací histonů jsou provázené a vzájemně se ovlivňují, u *Arabidopsis* je např. metylace DNA typicky spjata s metylací H3K9 (viz níže). Methylace DNA je možná ve třech sekvenčních kontextech: CG, CHG a CHH (asymetrická) metylace (kde H = C, A, nebo T), kterou zajišťují příslušné metyltransferázy (Law and Jacobsen, 2010), o nichž pojednává další samostatná podkapitola.

Chromatin v jádře eukaryotních buněk lze na základě barvitelnosti, obsažených DNA sekvencí, asociovaných proteinů a jejich modifikací dělit na vysoce kondenzovaný heterochromatin

a transkripčně aktivní euchromatin (Beisel and Paro, 2011). U *Arabidopsis* je heterochromatin také definován přítomností transponovatelných elementů (Lippman et al., 2004).

3.1 Modifikace histonů

Základní jednotkou chromatinu jsou nukleozomy, které jsou tvořeny přibližně 150 bp DNA ovinuté okolo oktameru histonů, který obsahuje po dvou dimerech histonů H3-H4 a H2A-H2B. Posttranslační modifikace N-konců histonů a histonové varianty se podílejí na regulaci genové exprese a celkové konfiguraci chromatinu. Posttranslační modifikace histonů zahrnují metylaci, acetylaci, fosforylaci, ubikvitinaci, sumoylaci a ADP-ribozylaci. K metylaci histonů dochází na argininovém nebo lysinovém zbytku a může se jednat o mono- až trimetylaci (Pfluger and Wagner, 2007). Tato metylace může být pro transkripci aktivační nebo inhibiční v závislosti na typu modifikace, např. metylace histonu H3 v pozici lysinového zbytku 4 a 36 (H3K4me, H3K36me) bývá aktivační, naopak metylace histonu H3 v pozici lysinového zbytku 9 a 27 (H3K9me, H3K27me) většinou inhibiční. U rostlin byly zatím identifikovány metylace lyzinových zbytků v polohách 4, 9, 27 a 36 na histonu H3 a v poloze 20 na histonu H4 (Pfluger and Wagner, 2007). V této kapitole se zaměřím především na mono- a dimetylaci H3K9 (H3K9me1, H3K9me2), která je u rostlin spjata s transkripčním umlčením a kompaktním chromatinem.

Umlčení transkripce v oblastech heterochromatinu a euchromatinu podléhá rozdílným regulacím, které se projevují především na úrovni histonových modifikací. To je dokumentováno tím, že transpozony a pseudogeny jsou v oblastech pericentromerického heterochromatinu více obohaceny o H3K9me2 než ty, které leží v euchromatinu. Podobně i větší množství siRNA vzniká z míst heterochromatinu asociovaného s H3K9 než z H3K9-asociovaného euchromatinu (Bernatavichute et al., 2008; Huettel et al., 2006).

3.1.1 H3K9 metylace

U *Arabidopsis thaliana* je histonová modifikace H3K9me2 a H3K9me1 charakteristická pro heterochromatin, transponovatelné elementy a s tím spjaté transkripční umlčení, ale nikoliv H3K9me3 jako je tomu u některých jiných organismů (Jackson et al., 2004; Lippman et al., 2004).

H3K9me2 se vyskytuje ve vysoké míře v pericentromerických oblastech, kde se překrývá s místy CHG metylace DNA. Naopak uvnitř genů a v euchromatinu se téměř nevyskytuje (Bernatavichute et al., 2008). Hlavními enzymy, které řídí H3K9 dimetylaci heterochromatinu jsou histonové methyltransferázy ze skupiny SUVH proteinů (Caro et al., 2012). H3K9 metyltransferáza KYP/SUVH4 (KRYPTONITE/ SUVH4) kontroluje úroveň H3K9me2 a v menší míře také H3K9me1 (Jackson et al., 2004). Přes svoji SRA doménu se váže na metylovanou DNA preferenčně v kontextu CHH a CHG sekvencí, což vede k vysoké míře H3K9me2 právě v těchto oblastech (Johnson et al., 2007). S tím je ve shodě i skutečnost, že mutanti v KYP a v CHG metyltransferáze CMT3 jsou si

fenotypově velmi podobní – u obou dochází k výrazné ztrátě CHG a zčásti také asymetrické metylace (Jackson et al., 2002). Katalytickou metylační aktivitu zajišťuje evolučně konzervovaná SET doména, která přenáší metylovou skupinu z S-adenosylmethioninu na lysin histonu (Rea et al., 2000). Schopnost KYP monometylovat a dimetylovat H3K9 byla prokázána *in vitro*, naproti tomu trimetylace pravděpodobně není schopna (Jackson et al., 2004). Také homolog SUVH6 vykazuje stejnou afinitu k metylované DNA (Johnson et al., 2007) a má H3K9 metyltransferázovou aktivitu (Jackson et al., 2004). Aktivita KYP a SUVH6 je tedy schopna navádět CMT3 na heterochromatin, která se svojí chromodoménou váže na dimetylované H3K9 (Du et al., 2012; Lindroth et al., 2004). SUVH2 a SUVH9 podobně jako KYP obsahují SRA doménu a jsou zahrnuty do dráhy RdDM, protože jsou nutné pro zajištění DNA metylace zprostředkované *de novo* DNA metyltransferázou DRM1/2 operující především v kontextu CHH. Mechanismus, kterým se SUVH2 a SUVH9 podílejí na zajištění asymetrické metylace, však není znám. Nevyjasněnou totiž stále zůstává otázka jejich histon-metyltransferázové aktivity. Podle výsledků pokusů skupiny Stevena E. Jacobsena nejsou SUVH2 ani SUVH9 schopné metylovat H3K9 ani H3K27 (Johnson et al., 2008), naproti tomu německo-rakouský výzkumný tým předložil opačné výsledky (Naumann et al., 2005). Osobně se přikláním spíše k možnosti, že SUVH2 a SUVH9 nejsou metyltransferázami z toho důvodu, že skupina vedená S. E. Jacobsenem prověřila tuto možnost několika odlišnými experimentálními metodami vždy se stejným výsledkem. Jiným možným vysvětlením by mohla být přítomnost pomocného proteinu, který SUVH2 a SUVH9 vyžadují pro svoji aktivitu (Johnson et al., 2008). V dvojíých mutantech *svh2 svh9* však dochází ke značné redukci H3K9me₂, derepresi transkripce a úbytku transkriptů Pol V z oblasti elementu *AtSN1* (Kuhlmann and Mette, 2012). *In vitro* se SUVH2 preferenčně váže k metylovaným CG oblastem, zatímco SUVH9 především k CHH sekvencím. Jejich celkový vliv na metylaci DNA zajišťovanou DRM1/2 je jen částečně redundantní (Johnson et al., 2008). *svh2* vede k vyšší ztrátě metylace DNA v semenáčcích, zatímco *svh9* v dospělých rostlinách (Kuhlmann and Mette, 2012).

Vedle deseti SUVH genů obsahuje genom *Arabidopsis* pět SUVR genů, které jsou příbuzné SUVH, ale neobsahují SRA doménu. Namísto ní byla u SUVR1, SUVR2 a SUVR4 identifikovaná N-koncová doména WIYLD pojmenovaná podle konzervovaných aminokyselinových zbytků (Thorstensen et al., 2006). WIYLD doména SUVR4 váže monoubikvitinovanou histonu H2B a zároveň je nutná pro schopnost SUVR4 metylovat H3K9me₁ na H3K9me₃ (Veiseth et al., 2011). Funkce SUVR proteinů není zatím zcela objasněna, ale je zřejmé, že SUVR4 a SUVR5 se podílejí na metylaci histonových zbytků H3K9 v heterochromatinu a na transponovatelných elementech (Caro et al., 2012; Veiseth et al., 2011). U žádného ze dvou jmenovaných nebyl prokázán vliv na metylaci DNA jako je tomu u SUVH proteinů. Nedávno byla ovšem zjištěna role SUVR2 v dráze RdDM. Tomu nasvědčuje velice podobný vzor metylace DNA u *svvr2* a *drm1/2* mutantů a také neschopnost umlčet *FWA* transgen (Stroud et al., 2013), čímž jsou charakterističtí mutanti v dráze RdDM (Chan et al., 2004).

Nepřímé důkazy nasvědčují, že histonovou demetylázou zodpovědnou naopak za odstraňování represivních značek H3K9me2 a H3K9me1 je enzym IBM1 (Inagaki et al., 2010). Mutace *ibm1* vede k hypermetylaci H3K9 a k CHG hypermetylaci DNA jen v transkripčně aktivních lokusech (Inagaki et al., 2010; Miura et al., 2009). IBM1 je tedy důležitá pro stabilizaci transkripce genů a zabránění šíření heterochromatinu (Inagaki et al., 2010). Tato regulace se týká i lokusů *DCL3* a *RDR2*, se kterými IBM1 asociuje a které v mutantech *ibm1* získávají vysokou hladinu H3K9me2, CHG a CHH metylace DNA. Důsledkem toho je snížení exprese *DCL3* a *RDR2*, mírný vzestup množství 21-nt siRNA, akumulace siRNA z genové oblasti *RDR2* a následný vzrůst exprese lokusů reprimovaných *DCL3* a *RDR2*. IBM1 se tedy podílí nejen na přímém udržování aktivní transkripce, ale nepřímo i na umlčování některých lokusů (Fan et al., 2012).

Další DNA metyltransferázou vedle CMT3, která má vliv na H3K9me2 a která se podílí na její regulaci, je MET1 zodpovědná za CG metylaci DNA. Předpokládá se, že CG metylace DNA je nadřazena značce H3K9me2, neboť mutace *met1* má velký dopad na H3K9me2 lokalizaci (Soppe et al., 2002; Tariq et al., 2003), zatímco mutace *kyp* vede jen k malé ztrátě CG metylace (Jackson et al., 2002). Mutace *met1* vede k výrazné ztrátě H3K9me2 z heterochromatinových oblastí (Tariq et al., 2003) a k ektopické hypermetylaci H3K9 a CHG hypermetylaci uvnitř genů. Tento fenotyp se podobá mutaci *ibm1*, ale postihuje odlišné lokusy. Existují tedy alespoň dva odlišné mechanismy zabráňující šíření heterochromatinu a udržující transkripci (Deleris et al., 2012).

Pro umlčení exprese transpozónů a některých genů je vyžadována histonová deacetyláza HDA6, jejíž mutace vede k hyperacetylaci histonů, k redukci metylace DNA a zvýšení H3K4me2 a H3K4me3 (Aufsatz et al., 2002; Liu et al., 2012; To et al., 2011). Lokusy, na kterých operuje HDA6, se výrazně překrývají s těmi, kde působí MET1. Určitý překryv působení je pozorovatelný také u lokusů umlčovaných pomocí RdDM (To et al., 2011). HDA6 fyzicky interaguje s MET1 *in vivo*, což potvrzuje teorii, že oba proteiny působí na stejné regulační dráze (Liu et al., 2012).

3.1.2 H3K27 metylace

Modifikace histonu H3K27me1 se hojně vyskytuje v chromocentrech, naproti tomu H3K27me3 se soustředí do oblasti euchromatinu. Přestože se H3K27me1 nachází v oblasti heterochromatinu spolu s H3K9me2, jsou na sobě tyto dvě modifikace vzájemně nezávislé. Tento vztah platí také pro H3K27me1 a metylaci DNA (Jacob et al., 2009; Mathieu et al., 2005). Zatím jediné identifikované enzymy zodpovědné za monometylaci H3K27 jsou vzájemně redundantní metyltransferázy ATX5 a ATX6, které obsahují také SET doménu podobně jako metyltransferázy SUVH a jsou nutné pro umlčení repetitivních sekvencí a transpozónů. Součinnost H3K27me1, H3K9me2 a metylace DNA je tedy nutná pro zajištění umlčení heterochromatinu a kompaktnosti chromocenter (Jacob et al., 2009; Smathajitt et al., 2007).

Trimetylace H3K27 je oproti tomu jedním z hlavních mechanismů umlčování genů, a to především s ohledem na regulaci exprese genů při vývoji a v rozdílných rostlinných orgánech (Zhang et al.,

2007b). Podobnou funkci plní i u živočichů (Deal and Henikoff, 2011). H3K27me3 se vyskytuje především v euchromatinu v oblastech promotorů a uvnitř genů. Není však závislá na RNAi a siRNA, což odpovídá i roli siRNA v umlčování především heterochromatinových oblastí (Zhang et al., 2007b).

3.2 Histonové varianty

Všechna eukaryota mají více interfázních histonových variant H2A a H3, které mění vlastnosti chromatinu oproti základním variantám přítomným při dělení buňky (Deal and Henikoff, 2011). Souvislost histonových variant s mírou genové exprese byla popsána především u následujících variant.

Histonová varianta H2A.Z je vyloučena z metylované DNA u rostlin i živočichů (Zemach et al., 2010). Rozdíly v sekvenci a struktuře H2A.Z oproti hlavní histonové variantě H2A vedou k místním změnám interakcí mezi H2A-H2B dimerem a H3-H4 tetramerem (Suto et al., 2000). H2A.Z se hojně vyskytuje v 5' koncové oblasti genů v oblasti iniciace transkripce, naopak nejméně je zastoupen v oblastech heterochromatinu bohatých na transponovatelné elementy (Zilberman et al., 2008). Zdá se, že H2A.Z chrání geny před nechtěnou metylací DNA, zatímco jeho vyloučení z heterochromatinu by se mohlo podílet na umlčení transkripce (Zilberman et al., 2008).

U rostlin, podobně jako u živočichů, se vyskytují celkem tři varianty H3: základní H3.1, centromerická CENH3 a H3.3 (Deal and Henikoff, 2011). Varianta H3.3 je nejvíce zastoupena v oblastech aktivně transkribovaných genů a její výskyt koreluje s výskytem RNA Pol II a H3K4me1. Na rozdíl od H2A.Z se H3.3 u *Arabidopsis* překrývá také s výskytem CG metylace uvnitř genů. U *Arabidopsis* je H3.3 koncentrován v 3' koncových oblastech genů, celkově se tedy varianty H3.3 a H2AZ vylučují (Stroud et al., 2012). Oproti tomu H3.1 varianta se preferenčně vyskytuje v oblastech heterochromatinu (Stroud et al., 2012), čemuž odpovídá i její výrazné obohacení o H3K27 a H3K9 metylaci a shoda s výskytem metylace DNA (Johnson et al., 2004; Stroud et al., 2012). Oproti tomu 178-bp centromerické repetece asociované s CENH3 vykazují výrazně sníženou metylaci DNA a snížený výskyt H3K9me2 oproti okolnímu pericentromerickému heterochromatinu (Zhang et al., 2008).

Nové důkazy nasvědčují tomu, že transkripty Pol V navádějí na heterochromatin nejen DNA a histonové metyltransferázy, ale také chromatin remodelující komplexy určující rozmístění nukleozomů. Zároveň mutace v podjednotce SWI3B ATP-závislého SWI/SNF chromatin stabilizujícího komplexu vedla k úbytku CHH metylace na lokusech umlčovaných RdDM. Zdá se tedy, že podobně jako v případě metylace DNA a histonů zde existuje zpětnovazebná smyčka mezi rozmístěním nukleozomů a metylací DNA podílející se na udržení umlčení exprese (Zhu et al., 2013). Dalším zjištěním podporujícím vazbu mezi rozmístěním nukleozomů a metylací DNA je fakt, že nejvyšší hustota CHH a CHG metylace DNA se periodicky opakuje po 167 nukleotidech. Tato

vzdálenost je o něco kratší, než jsou průměrné vzdálenosti mezi nukleozomy v genomu rostlin (175 – 185 bp; Vershinin and Heslop-Harrison, 1998), což naznačuje, že metylovaná DNA je alespoň na některých sekvencích kompaktnější (Cokus et al., 2008).

3.3 Metylace DNA

Metylace cytosinů v pozici C5 (5-metylcytosin) je prastarou epigenetickou modifikací, kterou nalezneme ve všech říších eukaryot a také u bakterií (Zemach et al., 2010). Přestože u řady studovaných organismů, jako jsou *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Oriza sativa*, *Neurospora crassa*, *Mus musculus* či *Danio rerio*, se metylace DNA vyskytuje, u jiných došlo k jejímu vymizení, např. u *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans* nebo *Drosophila melanogaster*. U savců je metylace DNA přítomna téměř výhradně v CG kontextu, naproti tomu u rostlin je běžná také CHG a CHH metylace (Feng and Jacobsen, 2011). Může docházet k metylaci genů nebo nekódujících oblastí a transponovatelných elementů. Zatímco metylace genů se jeví původnější a evolučně společná pro všechna eukaryota, ke vzniku metylace transpozónů, jako mechanismu zabraňujícímu jejich expresi, došlo v liniích rostlin a živočichů nezávisle (Zemach et al., 2010).

U *Arabidopsis thaliana* činí celkový podíl metylace genomu přibližně 24 % pro metylaci v kontextu CG, 6,7 % pro CHG metylaci a 1,7 % pro CHH metylaci. Zvýšené hodnoty CG metylace DNA se nacházejí v heterochromatinových oblastech bohatých na tandemové a invertované repeticce a transpozony, stejně jako v pseudogenech a uvnitř genů (Cokus et al., 2008). CHG a CHH metylace je nejvíce zastoupena v pericentromerických oblastech bohatých na heterochromatin (Lister et al., 2008).

Existuje několik odlišných mechanismů metylace DNA regulující transkripční umlčování transponovatelných elementů a vznik heterochromatinových značek, které se mohou překrývat. Jedním z nich je dráha udržovací metylace DNA zahrnující CG metyltransferázu MET1, která je homologem savčí Dnmt1 rozpoznávající hemimetylovaná CG místa po replikaci (Law and Jacobsen, 2010). Na udržovací metylaci CHG míst se podílí metyltransferáza CMT3, která je řízena metylací histonu H3K9me2 (Chan et al., 2006; Du et al., 2012). Zároveň KYP se váže preferenčně na CHH a CHG metylované oblasti přes svoji SRA doménu, čímž se vytváří zpětnovazebná smyčka (Johnson et al., 2007). Důležitou úlohu CMT3 coby udržovací CHG metyltransferázy potvrzuje i její výrazně zvýšená exprese v průběhu S-fáze (Du et al., 2012). Podobně jako v případě CMT3 je zřejmě řízena i aktivita nově popsané metyltransferázy CMT2, která se podílí na metylaci CHH sekvencí (Zemach et al., 2013).

Dalším mechanismem řídicím umlčování je metylace DNA řízená siRNA (RdDM). V tomto případě je metylace DNA repetitivních úseků a transpozónů zprostředkována činností polymerázy IV a V (Onodera et al., 2005) a je závislá na aktivitě metyltransferázy DRM1/2 (DOMAINS REARRANGED METHYLASE 1/2) naváděné na cílové lokusy 24-nukleotidovými siRNA (Chan et al., 2004). Tím je

DRM1/2 nezbytná pro ustanovení *de novo* metylace DNA (např. transgenu) ve všech sekvenčních kontextech a také udržuje značnou část asymetrické metylace DNA v odpovědi na akumulaci siRNA (Cao et al., 2003). Vedle toho CMT2 homologní s CMT3 udržuje většinu CHH metylace nezávisle na siRNA, což vysvětluje jen částečnou ztrátu CHH metylace u mutantů v RdDM dráze (Zemach et al., 2013).

Stále více se ukazuje, že i činnost MET1 úzce souvisí s RdDM a že jednotlivé metylační dráhy se vzájemně ovlivňují. Mutace *met1* totiž nevede pouze ke ztrátě CG metylace, ale také CHG a CHH metylace. Také vznik siRNA v některých oblastech genomu vyžaduje aktivitu MET1. To lze vysvětlit buď nutností CG metylace pro funkci DRM1/2 a CMT3, nebo možností, že MET1 je také schopna *de novo* metylace DNA (Lister et al., 2008). Dřívější výzkum sice odhalil roli MET1 v *de novo* metylaci v kontextu CG, ale nikoliv v kontextu CHG nebo CHH (Aufsatz et al., 2004). Podle výsledků nedávné studie zde opravdu funguje regulace CHG a CHH metylace závislá na MET1. Vliv CG metylace na CHG metylaci je zprostředkován zřejmě histonovou metyltransferázou KYP (Stroud et al., 2013), protože v *met1* mutantech dochází také ke ztrátě H3K9me2 (Lippman et al., 2003). Způsob regulace asymetrické CHH metylace enzymem MET1 zatím není znám, ale pravděpodobně se jedná o regulaci společně zajišťovanou CG a CHG metylací, protože dvojitá mutace *met1 cmt3* má mnohem větší vliv na ztrátu CHH metylace než jednotlivé mutace samostatně nebo než mutace *drm1/2* (Stroud et al., 2013). Zbývající CHH metylaci vykonává zřejmě udržovací CMT2 (Zemach et al., 2013). Z aditivního efektu *met1* a *cmt3* mutací plyne, že dráhy MET1 a CMT3 by se mohly vzájemně obousměrně ovlivňovat. Tomu dále nasvědčuje zjištění, že mutace *cmt3* má vliv na CG metylaci (Stroud et al., 2013). Na zjištění všech regulačních vztahů mezi třemi udržovacími metyltransferázami budeme muset ještě počkat. K částečné ztrátě CG metylace dochází také v *drm1/2* mutantech, což napovídá, že na udržení CG metylace by se mohla podílet i RdDM (Smathajitt et al., 2007; Stroud et al., 2013). V každém případě má CG metylace významnou stabilizační roli v udržování epigenetických modifikací v následných generacích, neboť v *met1* mutantech s rostoucím počtem generací také roste stochastické rozmístění CHH metylace a H3K9me2 (Smathajitt et al., 2007).

Podobný projev jako *met1* mutace má také mutace v chromatin remodelujícím faktoru DDM1 (DEFICIENT IN DNA METHYLATION1; Soppe et al., 2002) z rodiny SWI/SNF2-like proteinů (Jeddeloh et al., 1999), který má vliv na H3K9me2 a metylaci DNA ve všech sekvenčních kontextech (Kankel et al., 2003). DDM1 totiž zajišťuje zpřístupnění DNA udržovacím metyltransferázám MET1, CMT3 a CMT2 v heterochromatinových oblastech, kde je zastoupen histon H1 uspořádávající chromatin do vyšších struktur (Zemach et al., 2013). DDM1 je tedy nutný pro transkripční umlčení heterochromatinu a množství transponovatelných elementů (Jeddeloh et al., 1998; Lippman et al., 2004). Zatímco metylace závislá na DDM1 se vyskytuje především ve středních částech dlouhých transponovatelných elementů, dráha RdDM operuje na jejich okrajích a na krátkých transpozonech (Zemach et al., 2013; Zhang et al., 2013).

Navození histonových modifikací chromatinu, především H3K9me2, zřejmě minimálně v některých lokusech řídí metylace DNA (Johnson et al., 2007; Noma et al., 2013), což je podporováno také skutečností, že sekvence dlouhá jen 30 bp může být zacílena a umlčena pomocí RdDM (Pélissier and Wassenegger, 2000), což je mnohem kratší vzdálenost, než jaká je mezi jednotlivými nukleozomy s navázanými histony (Huettel et al., 2007).

3.4 Demethylace DNA

Úroveň metylace genomové DNA je negativně regulována její demethylací, kterou u *Arabidopsis* zajišťují příbuzné enzymy ROS1 (REPRESSOR OF SILENCING 1), DME (DEMETER), DML2 a DML3 (DEMETER-LIKE) patřící do skupiny DNA glykosyláz účastnících se reparace DNA (Agius et al., 2006; Choi et al., 2002). Prostřednictvím glykosylázové aktivity dochází k odstranění 5-metylcytosinové báze za vzniku apyrimidinového místa, v němž lyázová aktivita enzymu přeruší řetězec DNA (Agius et al., 2006). ROS1 řídí demethylaci transpozónů, repetitivních sekvencí a některých genů hlavně v kontextu CHG a CHH. Jeho mutace vede k celkové hypermethylaci DNA a k poklesu exprese postižených sekvencí v důsledku hypermethylace především v promotorových oblastech. Tedy i u stabilně umlčovaných elementů, jako jsou transpozony, existuje mechanismus zabraňující jejich nadměrné metylaci (Zhu et al., 2007). S ROS1 v nukleoplasmě a v jadérku kolokalizuje protein ROS3, který je schopen vázat malé RNA a obsahuje RNA vazebný motiv. Na základě porovnání vlivu jednoduchých mutací *ros1*, *ros3* a dvojité mutace *ros1 ros3* na vzor hypermethylace DNA, se zdá, že oba proteiny působí na stejné regulační dráze. Nabízí se možnost, že by ROS3 prostřednictvím malých RNA mohl navádět ROS1 do míst určených k demethylaci podobně jako je tomu u RdDM (Zheng et al., 2008). Mutace *ros1* má také praktické uplatnění při identifikaci nových komponent souvisejících s RdDM drahou. Linie *ros1* jsou vystaveny mutagennímu působení a ze zmutovaných rostlin jsou pak vyhledávány ty, které potlačily fenotypový projev *ros1*, např. reaktivací transkripčně umlčeného reportérového transgenů (He et al., 2009a, 2009b, 2009c).

DME se uplatňuje v regulaci vývoje samičího gametofytu tím, že demethylací 5' koncové oblasti a 3' koncové oblasti zvané MEA-ISR mateřské alely genu MEA (MEDEA) aktivuje jeho expresi (Choi et al., 2002; Gehring et al., 2006). MEA kóduje protein ze skupiny Polycomb proteinů (PcG proteiny) s H3K27 metyltransferázovou aktivitou (Grossniklaus et al., 1998). MEA společně s FIE (FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM) a FIS2 (FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2) zabraňuje předčasnému vývoji endospermu a po oplození reprimuje jeho nadměrný růst, který by jinak měl za následek neschopnost vytvořit životaschopná semena (Kiyosue et al., 1999; Luo et al., 1999). Také se podílí na regulaci morfogeneze a celularizace embrya (Kiyosue et al., 1999). Pro správný vývoj plodu je potřebná pouze maternální alela, zatímco paternální zůstává při gametogenezi umlčena a po dvojitém oplodnění opět dochází ve vyvíjejícím se endospermu k imprintingu nově nabyté otcovské alely (Gehring et al., 2006; Luo et al., 2000). Zdá se však, že po oplození a při

následném vývoji endospermu již DME není pro expresi mateřské alely MEA vyžadována, protože k expresi MEA dochází i přes její metylaci v *dme* mutantech (Gehring et al., 2006).

DML2 a DML3 jsou částečně redundantní DNA glykosylázy, které zabraňují hypermetylaci řady genů především v 5' a 3' koncových oblastech (Penterman et al., 2007). Tomu odpovídá i skutečnost, že metylace DNA uvnitř exprimovaných genů bývá lokalizována v jejich středových oblastech (Cokus et al., 2008).

4. Role RNA polymerázy IV a V v RdDM

4.1 Historie objevu a označení

U všech doposud studovaných eukaryot se nacházejí tři jaderné DNA-dependentní RNA polymerázy (Pol I, II, III), které jsou schopny syntetizovat všechny typy RNA. Při anotaci genomu *Arabidopsis thaliana* v roce 2000 byly objeveny dva nové geny kódující IV. třídu největší a druhé největší podjednotky RNA polymerázy, tedy potenciálně novou RNA polymerázu odlišnou od třech dosud známých eukaryotních RNA polymeráz (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

V roce 2005 byla poprvé molekulárně identifikována mutace *sde4*, která byla objevena o několik let dříve při genetickém screeningu zaměřeném na mutanty defektní v RdDM (Dalmay et al., 2000; Hamilton et al., 2002). Mutace byla zamapována do genu, který byl určen jako jeden ze dvou homologů IV. třídy největší podjednotky. To přineslo propojení mezi neznámou RNA polymerázou a dráhou transkripčního umlčení pomocí siRNA. Nově identifikovaný enzym byl pojmenován polymeráza IV (Pol IV) a jeho největší podjednotka přejmenována ze *SDE4* na NRPD1a v souladu s nomenklaturou podjednotek ostatních RNA polymeráz v *Arabidopsis thaliana* (Herr et al., 2005).

Další práce odhalila zásadní strukturní i funkční odlišnosti mezi podjednotkami NRPD1a a NRPD1b, které jsou ve skutečnosti součástí dvou evolučně příbuzných, ale samostatných RNA polymeráz, které byly označeny jako RNA polymeráza IVa a IVb (Pol IVa, Pol IVb; Pontier et al., 2005).

Pro lepší přehlednost a z důvodu funkční a strukturní rozrůzněnosti obou rostlinných polymeráz byla od roku 2008 zavedena nová nomenklatura, která přejmenovala Pol IVa na Pol IV a Pol IVb na Pol V. Zároveň se změnilo i názvosloví podjednotek. Byl přijat prefix NRPD pro podjednotky Pol IV a NRPE pro Pol V (Ream et al., 2009; Wierzbicki et al., 2008). Jednotlivé podjednotky jsou pojmenovány na základě své podobnosti s odpovídajícími podjednotkami Pol II u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinkové podjednotky jsou číslovány vzestupně podle své klesající molekulové hmotnosti. Platí tedy, že např. NRPD1 označuje největší podjednotku Pol IV a podobně NRPE1 největší podjednotku Pol V (Haag and Pikaard, 2011)

4.2 Dvě největší podjednotky Pol IV a V

Polymerázy IV a V jsou obě složeny z 12 podjednotek stejně jako Pol II. Vedle největší a druhé největší podjednotky, které zprostředkují katalytickou funkci, komplex tedy obsahuje ještě 10 menších

podjednotek, které odpovídají podjednotkám RNA-polymerázy II *S. cerevisiae* RPB3, RPB4, RPB5, RPB6, RPB7, RPB8, RPB9, RPB10, RPB11 a RPB12 (Ream et al., 2009). Přehled podjednotek a jejich homologů shrnuje tabulka č. 1.

Funkce	Bakterie	S.c.* Pol II	At homology	Názvy u rostlin
katalytická	β'	RPB1	At4g35800	NRPB1
			At1g63020	NRPD1
			At2g40030	NRPE1
	β	RPB2	At4g21710	NRPB2
			At3g23780	NRPD2/NRPE2
složení (assembly)	α	RPB3	At2g15430	NRPB3/NRPD3/NRPE3a
			At2g15400	NRPD3b/NRPE3b
	α	RPB11	At3g52090	NRPB11/NRPD11/NRPE11
			RPB10	At1g11475
		RPB12	At1g61700	NRPB10-like
			At5g41010	NRPB12/NRPD12/NRPE12
			At1g53690	NRPB12-like
pomocná (auxiliary)	ω	RPB6	At5g51940	NRPB6a/NRPD6a/NRPE6a
			At2g04630	NRPB6b/NRPE6b
		RPB8	At1g54250	NRPB8a/NRPE8a
			At3g59600	NRPB8b/NRPD8b/NRPE8b
		RPB5	At3g22320	NRPB5/NRPD5a
			At3g57080	NRPE5
			At5g57980	NRPB5-like
			At2g41340	NRPD5b/NRPE5b
			At3g54490	NRPE5-like
		RPB4	At5g09920	NRPB4
			At4g15950	NRPD4/NRPE4
		RPB7	At5g59180	NRPB7
			At4g14660	NRPD7b/NRPE7b
			At3g22900	NRPD7a
			At4g14520	NRPB7-like
		RPB9	At3g16980	NRPB9a/NRPE9a
			At4g16265	NRPB9b/NRPD9b/NRPE9b

Tab. 1 Srovnání podjednotek RNA Pol II, IV a V u *Arabidopsis* s podjednotkami bakteriální RNA Pol a s RNA Pol II u *S. cerevisiae*

(Převzato z: Ream et al., 2009; upraveno podle: Law et al., 2011)

* *S. c.* = *Saccharomyces cerevisiae*

Skutečnost, že podjednotky rostlinných RNA polymeráz IV a V jsou homologní a mnohé identické s podjednotkami Pol II, naznačuje, že od ní byly odvozeny. U *Arabidopsis* Pol IV a V sdílí s Pol II společné podjednotky NRPB3/ NRPD3/ NRPE3a, NRPB11/ NRPD11/ NRPE11, NRPB10/ NRPD10/ NRPE10, NRPB12/ NRPD12/ NRPE12, NRPB6a/ NRPD6a/ NRPE6a, NRPB8b/ NRPD8b/ NRPE8b a NRPB9b/ NRPD9b/ NRPE9b. Některé z těchto podjednotek (NRPB10/ NRPD10/ NRPE10, NRPB12/ NRPD12/ NRPE12, NRPB6a/ NRPD6a/ NRPE6a, NRPB8b/ NRPD8b/ NRPE8b) jsou společné i pro Pol I a III (Ream et al., 2009). Podjednotky RPB3, RPB6, RPB7, RPB8 a RPB9 jsou u Pol IV a/nebo Pol V *Arabidopsis* zastoupeny více variantami, u nichž bylo zjištěno, že mohou být začleněny do příslušného polymerázového komplexu (viz tabulka). Zřejmě se jedná o redundantní geny (Law et al., 2011; Ream et al., 2009). U podjednotek NRPB9a/NRPD9a/NRPE9a a NRPB9b/NRPD9b/NRPE9b však byla zaznamenána funkční rozdílnost. Mutace *NRPB/D/E9b* totiž vede k redukci metylace DNA, přestože není narušena produkce siRNA produkovaných prostřednictvím Pol IV, ani transkripce Pol V, zatímco mutace *NRPB/D/E9a* nemá na metylaci DNA nebo na funkci Pol IV a V žádný vliv. Podjednotka NRPB/D/E9b by tedy mohla mít regulační roli (Tan et al., 2012).

Dosavadní porozumění struktuře a funkci eukaryotních polymeráz je založeno především na studiu polymeráz *Saccharomyces cerevisiae*. Z toho důvodu se při popisu a porovnávání struktur rostlinných Pol II, IV a V budu odkazovat právě na kvasinkovou Pol II. Podjednotky Pol II jsou vysoce konzervované mezi eukaryoty, a proto by struktura kvasinkové Pol II měla být aplikovatelná na ostatní eukaryotické RNA polymerázy typu II (Cramer et al., 2001).

Jádro enzymu Pol II představují dvě největší podjednotky NRPB1 a NRPB2, které mezi sebou vytvářejí pozitivně nabitou štěrbinu (cleft), katalytické centrum a jeho okolí. Zbytek komplexu je převážně záporně nabitý (Cramer et al., 2000, 2001). Jednou ze stěžejních struktur, které jsou tvořeny největší podjednotkou je oblast zvaná „clamp“ neboli svorka. Je to mobilní element rozpoznávající konformaci DNA-RNA hybridu a oddělující DNA a RNA vlákna v přední části transkripční bubliny. Svorka z jedné strany vymezuje štěrbinu, kterou prochází templátová DNA a s níž by mohla interagovat. Svorka také hraje klíčovou roli v procesivitě polymerázy, protože při pohybu svírá templát a transkript. Štěrbinu z druhé strany vymezuje druhá největší podjednotka, jejíž C-koncová oblast se zároveň spolupodílí na tvorbě svorky (Cramer et al., 2000; Gnatt et al., 2001). Právě tyto dvě hlavní podjednotky jsou u Pol IV a V odlišné oproti Pol II.

Pol IV a Pol V se liší ve svých největších podjednotkách NRPD1 a NRPE1, zatímco druhou největší podjednotku (NRPD2/NRPE2) o molekulární velikosti 135 kDa sdílejí (Pontier et al., 2005). NRPD2/NRPE2 asociuje *in vivo* jak s NRPD1, tak s NRPE1 ve stabilním poměru (Pontes et al., 2006). Fylogeneticky vznikaly podjednotky polymeráz Pol IV a V postupně. Nejdříve se zřejmě vyvinula NRPD1 duplikací z NRPB1, největší podjednotky Pol II, v době, kdy se oddělil společný předek řádu zelených řas *Charales* a zelených suchozemských rostlin od ostatních řas. Naproti tomu NRPD2/NRPE2 podjednotka, která pravděpodobně vznikla reverzní transkripcí z transkriptu NRPB2,

vznikla až po vytvoření samostatné linie suchozemských rostlin. Pol V se vyskytuje jen u krytosemenných (*Magnoliophyta*), protože k duplikaci NRPE1 došlo až u této skupiny (Luo and Hall, 2007).

Přestože u *Arabidopsis* existují 2 geny kódující druhou největší podjednotku NRPD2a a NRPD2b, funkční je pouze produkt *NRPD2a* genu, který je společný pro oba enzymy. Tomu odpovídá přítomnost předčasného stop-kodonu v prvním kódujícím exonu (Pontier et al., 2005) a skutečnost, že naprostá většina transkriptů pochází z *NRPD2a* (dále jen NRPD2/NRPE2; Herr et al., 2005).

Zatímco NRPD2/NRPE2 podjednotka se výrazně shoduje se svými homology Pol I, II a III, řada aminokyselinových zbytků u NRPD1 a NRPE1 je substituována za jiné (Onodera et al., 2005). To se týká především aminokyselinových zbytků v okolí aktivního centra, které jsou v podjednotkách Pol I, II a III invariantní a zřejmě i stěžejní pro funkci polymerázy (Haag et al., 2009). U Pol II ze *S. cerevisiae* je aktivní místo vymezeno dvěma Mg^{2+} kationy označovanými jako „metal A“ a „metal B“. Metal A je koordinován na tři invariantní aspartátové zbytky D481, D483, D485 největší podjednotky RPB1 tvořící motiv, který je součástí bakteriálních, archeálních i eukaryotních RNA polymeráz (Cramer et al., 2001; Haag et al., 2009). U eukaryotních Pol I, II a III je tento motiv součástí invariantní sekvence YNADFDGDEMN. Avšak u NRPD1 podjednotky Pol IV je obsaženo jen jádro sekvence DFDGD. V případě NRPE1 Pol V je zachovaná sekvence ADFDGD. Tato skutečnost je velmi neobvyklá, protože motiv NADFDGD byl doposud znám u všech vícepodjednotkových RNA polymeráz. Konsenzus sekvence DxDGD se nachází také v aktivním místě RNA-dependentních RNA polymeráz jako je RDR2 či RDR6 u *Arabidopsis*. NRPD2/NRPE2 obsahuje ústřední motiv ED, který se nachází i v podjednotce Pol II a slouží pro koordinaci druhého Mg^{2+} kationu (Haag et al., 2009).

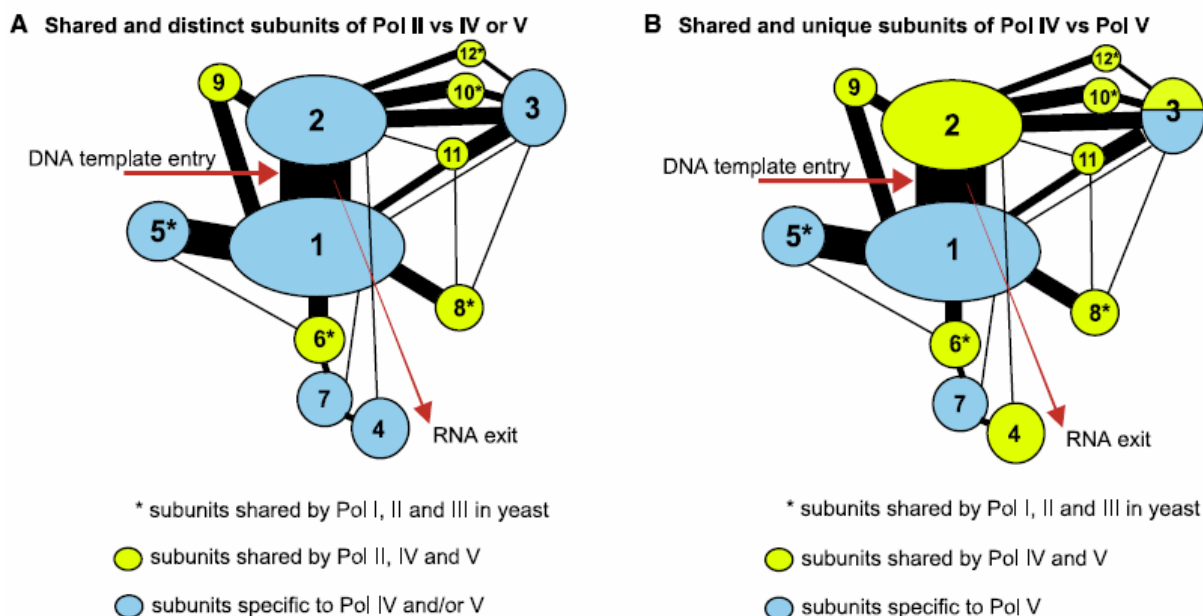
C-terminální doména (CTD) největších podjednotek Pol IV a V, NRPD1 a NRPE1, obsahuje DCL-like¹ motiv (defective chloroplast and leaves). Jádrem kódovaný DCL protein se podílí na processingu rRNA v chloroplastech (Bellaoui et al., 2003). NRPE1 vykazuje navíc ještě prodloužení své CTD o hydrofobní doménu (Pontier et al., 2005), která poskytuje vazebnou plochu pro AGO4 (Li et al., 2006). AGO4 interaguje s CTD Pol V prostřednictvím WG/GW motivů, které jsou rozmístěny v rámci této hydrofobní domény. WG/GW motivy jsou nezbytné pro specifické fungování Pol V v metylaci DNA (El-Shami et al., 2007).

NRPD1 (kódující 150 kDa peptid) a NRPE1 (kódující 235 kDa peptid) jsou exprimovány ve všech generativních i vegetativních částech *Arabidopsis* (Pontier et al., 2005). NRPD2/NRPE2 je exprimována také po celé rostlině, nejvýrazněji v květech a kořenech (Onodera et al., 2005).

Přestože transkripci Pol IV a V se podařilo přesvědčivě reprodukovat *in vitro* až zcela recentně, již dříve existovala řada nepřímých důkazů svědčících o tom, že oba enzymy syntetizují RNA řetězce. Například mutace jednoho z aspartátových zbytků v aktivním místě NRPD1 stačí k zastavení

¹ Třípísmenná zkratka se shoduje s označením pro odlišné proteiny DICER-LIKE (DCL).

biogeneze siRNA (Haag et al., 2009) a neporušené aktivní místo NRPE1 je předpokladem syntézy *IGN5* a *IGN6* RNA, tedy domnělých PolIV-dependentních transkriptů. Dále Pol V asociuje s lokusy, ze kterých tyto transkripty vznikají, a také s transkripty samotnými (Wierzbicki et al., 2008). Podobně je Pol IV přítomna na místech heterochromatinu, od kterých jsou odvozeny siRNA (Zheng et al., 2009). Na druhou stranu, rozdílnost katalytického centra a štěrbinu (cleft) Pol IV a V oproti Pol II je tak výrazná, že lze očekávat také jejich výrazně odlišnou funkci. Nabízí se odlišný templát, např. metylovaná DNA heterochromatinu či RNA (Landick, 2009). Jedním z důkazů, které by nasvědčovaly tomu, že templátem pro Pol IV nebo Pol V je spíše RNA než DNA, je pozorování, při kterém NRPD1, NRPD2/NRPE2 a NRPE1 jsou ztraceny z jádřka po použití RNázy A, ale nikoliv při použití DNázy I, i když NRPE1 a NRPD2 jsou v tomto případě částečně delokalizovány. U Pol II je tomu přesně naopak. Tím by bylo možné vysvětlit i rekrutování Pol IV do místa určení přes aberantní transkripty Pol II, které by vznikaly při přepisu metylované DNA (Pontes et al., 2006). Nedávno byla potvrzena schopnost Pol IV využívat *in vitro* jako templát RNA i DNA (Haag et al., 2012).



Obr. 2. Srovnání složení podjednotek RNA polymeráz II, IV a V: A) Podjednotky sdílené Pol II, IV a V jsou znázorněny zeleně. Podjednotky specifické pouze pro Pol IV a/ nebo Pol V jsou znázorněny modře. B) Podjednotky sdílené Pol IV a V jsou znázorněny zeleně. Podjednotky specifické pouze pro Pol V jsou znázorněny modře. Modro-zelené znázornění třetí největší podjednotky značí, že Pol V může využívat vlastní NRPEb, nebo společnou NRPD3/NRPE3a podjednotku. (Převzato z: Ream et al., 2009)

4.3 Buněčná lokalizace Pol IV a V

Dvě největší podjednotky Pol IV a V jsou lokalizovány v jádře. Jejich vzájemné rozložení se však v rámci tohoto kompartmentu liší. NRPD1 a NRPD2/NRPE2 spolu přesně kolokalizují, ale narozdíl od NRPE1 se nacházejí pouze mimo jádřko. NRPE1 je detekovatelná jak v nukleoplasmě, tak v jasné ohraničené oblasti asociované s jádřkem, v tzv. Cajalově tělísku (Li et al., 2006; Pontes et al., 2006). Cajalova tělíška se mohou pohybovat v blízkosti jádřka, vstupovat do něj a zase z něj vystupovat

(Boudonck et al., 1999). Přibližně polovina frakce NRPE1, která se nachází mimo jádru, kolokalizuje s komplexem NRPD1/NRPD2. NRPE1 tedy není závislá na přítomnosti NRPD2/NRPE2. Na druhou stranu je lokalizace NRPD2/NRPE2 závislá mnohem více na NRPE1 než na NRPD1, protože imunolokalizační signál NRPD2/NRPE2 je mnohem více redukován v *nripe1* mutantech než v *nripd1* (Pontes et al., 2006).

Část molekul NRPE1, která se nalézá v jádru, kolokalizuje s RDR2, DCL3, AGO4 a s siRNA. 5S rDNA geny a oblasti NOR s 45S rDNA geny se nepřekrývají s místy výskytu NRPE1 a AGO4 v jádru, což dokládá, že Cajalova tělíska jsou místem, kde dochází ke vzniku dsRNA prekursorů siRNA, k jejich zpracování a interakci s AGO4 a Pol V, ale nikoliv k DNA metylaci samotné (Li et al., 2006; Pontes et al., 2006). Naopak lokalizace NRPD1, NRPD2 a části NRPE1 mimo jádru koresponduje s polohou repetitivních lokusů (NOR, 5S geny), ze kterých jsou generovány siRNA (Pontes et al., 2006).

4.4 Funkce Pol IV a V

Polymerázy IV a V se obě podílí na ustanovení *de novo* metylace DNA i jejím udržování prostřednictvím malých RNA (RdDM), a to především v repetitivních sekvencích, transpozonech a intergenových oblastech. Tato metylace vede k transkripčnímu umlčení příslušných sekvencí (Onodera et al., 2005). Každá z polymeráz však v dráze RdDM vykonává jinou úlohu (Pontier et al., 2005).

Více než 60% produkce 24-nt siRNA je závislých jen na Pol IV, zatímco jen 18% je výrazně závislých také na Pol V (Lee et al., 2012). Produkce endogenních 24-nt siRNA odvozených ze sekvencí transpozonů (např. *AtSNI*, *AtCopia2*, *AtGPI*, *AtMUI*, *SIMPLEHAT2*) a vysoce repetitivních endogenních sekvencí (např. *siRNA1003* pocházející z 5S rDNA) je závislá na fungování obou polymeráz (lokusy typu I), zatímco jejich produkce z unikátních intergenových oblastí (např. *soloLTR*) a z endogenních lokusů zastoupených jen v jedné až několika kopiích na genom (např. *siRNA02*, *cluster 2*, *TR2558*) závisí pouze na Pol IV (lokusy typu II; Gao et al., 2010; Pontier et al., 2005). Ztráta endogenních siRNA z vysoce repetitivních sekvencí (5S rDNA) a retrotranspozonů (*AtSNI*) koreluje i s redukcí metylace DNA těchto sekvencí v mutantech v podjednotkách Pol IV a V. (Pontes et al., 2006; Pontier et al., 2005). Podobně k redukcí metylace DNA a k derepresi lokusů typu II dochází u mutantů v podjednotkách obou polymeráz, i když produkce siRNA z těchto lokusů je ovlivněna pouze u mutací *nripd1* (Lahmy et al., 2009; Mosher et al., 2008; Zheng et al., 2009).

Pro dráhu vzniku sekundárních siRNA je patrná jasná preference krátkých repetitivních generujících tyto siRNA. Tyto siRNA závislé výrazně na Pol V totiž pocházejí převážně ze sekvencí retroelementů typu SINE a RC/Helitron, které se vyznačují obvykle kratší délkou (SINE v průměru 300 bp a RC/Helitron asi 1 kbp) oproti např. retroelementům typu LTR (přes 2 kbp; Lee et al., 2012). Delší retrotranspozony typu LTR většinou spadají do lokusů typu II, tedy produkce siRNA z těchto míst je závislá jen na Pol IV (Mosher et al., 2008).

V *nprd2* mutantech klesá obsah interfázního heterochromatinu oproti kontrole a histonová značka H3me2K9 chromocenter je rozptýlena do velkého počtu malých oblastí (Onodera et al., 2005). Celkové množství CHH metylace zůstává u mutantů v podjednotkách Pol IV nebo Pol V stejné jako u nemutovaných rostlin, pouze se mění její distribuce (Wierzbicki et al., 2012).

4.4.1 RNA polymeráza IV

Přesná molekulární podstata biogeneze siRNA prostřednictvím Pol IV není dosud známa. Podle jednoho modelu Pol IV přepisuje heterochromatin do jednovláknových transkriptů, které jsou dále zpracovávány RDR2 za vzniku dsRNA molekul. Podle jiné představy slouží jako templát pro Pol IV přímo dsRNA produkovaná RDR2. Jeví se však pravděpodobnější, že RDR2 následuje v dráze procesu vzniku siRNA až za Pol IV, protože v mutantech *nprd1* je RDR2 v jádře delokalizována, ale v opačném případě tomu tak není (Pontes et al., 2006). Pol IV a RDR2 spolu v jádře kolokalizují jen částečně; zatímco NRPD1 se nachází v přesně vymezených oblastech nukleoplazmy, RDR2 má silnější výskyt uvnitř jádérka a v jeho okolí, tedy je součástí centra zpracovávajícího siRNA (siRNA-processing center; Pontes et al., 2006; Smith et al., 2007). Toto je v souladu s představou, že dsRNA produkty RDR2 jsou dále zpracovávány enzymy DCL3 a AGO4, které se také vyskytují v oblasti jádérka (Pontes et al., 2006). V tomto kontextu je však závažnější zjištění, že RDR2 a Pol IV spolu fyzicky asociují, což potvrdily dva nezávislé testy (Haag et al., 2012; Law et al., 2011). Navíc se zdá, že RDR2 pro svoji enzymatickou aktivitu asociaci s Pol IV (nebo alespoň s faktorem spjatým s Pol IV) vyžaduje (Haag et al., 2012).

Stejná práce také přichází se zjištěním, že Pol IV je schopna transkripce DNA templátu v přítomnosti RNA primeru a RDR2 *in vitro*. Nabízí se tedy vysvětlení, že slabá katalytická aktivita Pol IV by mohla být kompenzována amplifikací jejích transkriptů prostřednictvím RDR2 (Haag et al., 2012). Tomu ale neodpovídá rozdílná lokalizace RDR2 a Pol IV v jádře.

Vedle RDR2 s Pol IV také interagují proteiny CLASSY1 (CLSY1) a SHH1/DTF1 (SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1/DNA-BINDING TRANSCRIPTION FACTOR 1; Law et al., 2011). CLASSY1 je chromatin remodelující faktor s helikázovou a SNF2 doménou, který je příbuzný s proteinem DRD1 nutným pro transkripci Pol V. Podle struktury se zdá, že by mohl vázat DNA nebo RNA. CLASSY1 v jádře kolokalizuje s RDR2, ale nikoliv s Pol IV. Jeho mutace vede k poklesu produkce siRNA a má také silný vliv na porušení lokalizace RDR2, ale jen mírný vliv na výskyt Pol IV. Soudí se tedy, že CLASSY1 funguje na dráze produkce siRNA mezi Pol IV a RDR2 (Smith et al., 2007).

SHH1 se podílí na akumulaci siRNA z většiny lokusů a na CHH metylaci DNA (Law et al., 2011). Jeho SAWADEE doména se váže na mono- di- a trimetylované H3K9 *in vitro*, ale tato interakce je blokována metylací H3K4. SHH1 také přímo interaguje s CLASSY1 a s Pol IV. V navrhovaném modelu by tak SHH1 spolu s CLASSY1 mohla sloužit k navádění Pol IV na cílové sekvence, protože H3K9 metylace a RdDM jsou spolu často spjaty (Zhang et al., 2013).

4.4.2 RNA polymeráza V

Pol V přepisuje mezigenové a nekódující oblasti za vzniku RNA transkriptů (long non-coding RNA; lncRNA), které jsou alespoň 200 bp dlouhé, na 5' konci mají trifosfát nebo 7-metylguanidinovou čepičku, nejsou polyadenylovány na 3' konci a mohou být iniciovány z více míst. Transkripce Pol V je nezávislá na biogenezi malých RNA nebo metylaci DNA. Avšak biogeneze siRNA spolu s transkripcí Pol V zprostředkuje vznik heterochromatinu a umlčení přilehlých genů (Wierzbicki et al., 2008).

RNA transkripty Pol V jsou nutné pro navedení AGO4 na cílová místa chromatinu. AGO4 imunoprecipituje společně s lncRNA, nelze však jednoznačně určit, zda s nimi interaguje prostřednictvím komplementárních siRNA, nebo se na ně váže přímo a siRNA vyžaduje jen pro svoji stabilizaci (Wierzbicki et al., 2009). První možnost se však jeví přijatelná, protože zatím není známo, jakým jiným mechanismem by mohl být AGO4-siRNA komplex naváděn k místu transkripce Pol V. AGO4 se váže také přímo na Pol V prostřednictvím WG/GW motivů, jak již bylo zmíněno výše.

Pol V je nutná pro umlčení i metylaci DNA na lokusech typu I i II a na obou je fyzicky přítomna, avšak její transkripce byla prokázána pouze z lokusů typu I (Kim et al., 2011; Zheng et al., 2009). O nutnosti transkripce Pol V k zajištění její úlohy v modifikacích chromatinu svědčí i rozptýlení H3K9me2 a metylace cytosinů z heterochromatinových chromocenter po působení RNázy (Pontes et al., 2009).

V případě *nrpe1* mutantů je pericentromerický heterochromatin výrazně rozvolněn a z chromocenter je částečně rozptýlena značka H3K9me2, čímž fenotyp připomíná mutaci *met1*. K tomu ale nedochází v případě mutací *nrd1* ani dalších mutací porušující biogenezi 24-nt siRNA (Pontes et al., 2009). V mutantech Pol V a chromatin-remodelujícího faktoru DRD1, který s Pol V asociuje (Kanno et al., 2004), také dochází na určitých pericentromerických repeticích k derepresi podobně jako u *met1* a *ddm1*, u nichž je dereprese provázána poklesem tvorby siRNA. Překvapivě u mutantů biogeneze 24-nt siRNA *nrd1*, *rdr2* a *dcl3* s úplnou ztrátou produkce siRNA zůstávají tyto repetice umlčené. Z uvedených poznatků vyplývá, že Pol V zřejmě funguje i v jiné dráze nezávislé na produkci 24-nt siRNA prostřednictvím Pol IV (Pontes et al., 2009). Dalším důkazem, který podporuje možnost, že Pol V má i jinou roli než bezprostředně v RdDM, je její lokalizace, která se z více než 30 % nepřekrývá ani s místy výskytu CHH metylace, ani s 24-nt siRNA (Wierzbicki et al., 2012).

4.5 Proteiny tvořící komplex s Pol V

4.5.1 Komplex DDR

DRD1, DMS3 a RDM1 spolu vytvářejí komplex nazvaný DDR, nezbytný pro produkci transkriptů Pol V. DRD1 interaguje s NRPE1 a vytváří s Pol V užší asociaci oproti DMS3. Naopak RDM1 je sice součástí komplexu, ale s NRPE1 přímo neasociuje (Law et al., 2010).

DMS3 (DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3) vykazuje podobnost se SMC proteiny pro udržení struktury chromatinu (structural maintenance of chromosome proteins; Kanno et al., 2008),

kteře tvořĩ klíčovou složku kondenzinových a kohezinových komplexů u eukaryot (Hirano, 2006). DMS3 obsahuje doménu fungující jako pant mezi dvěma coiled-coil doménami (Hirano and Hirano, 2002), které v případě DMS3 nejsou kompletní (Kanno et al., 2008), toto uspořádaní by však mělo být dostačující pro dimerizaci a vazbu na DNA (Chiu et al., 2004). DMS3 je nutný pro transkripci Pol V a pro její asociaci s chromatinem (Wierzbicki et al., 2009), v souladu s tím je i fakt, že vliv *dms3* mutantů na metylaci DNA je shodný s mutacemi v genech *NRPE1* a *NRPD2/NRPE2* (Kanno et al., 2008).

RDM1 (RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1) je potřebný pro vznik transkriptů Pol V (Law et al., 2010) a tím také pro produkci 24-nukleotidových siRNA závislých na Pol IV i V (typ I). RDM1 zřejmě váže metylovanou ssDNA. Mutace *rdm1* redukuje CHH metylaci DNA, což naznačuje, že RDM1 se účastní *de novo* metylace DNA. RDM1 ko-immunoprecipituje s AGO4, DRM1/2 a s podjednotkou NRPB1 RNA polymerázy II (Gao et al., 2010).

DRD1 (DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1) je nezbytný pro *de novo* metylaci řízenou siRNA (Kanno et al., 2005). Naproti tomu nemá vliv na metylaci rDNA a centromerických opakování v jakémkoliv sekvenčním kontextu (Kanno et al., 2004). Jedná se o protein patřící do rodiny SWI/SNF2-like proteinů (Kanno et al., 2004), jejíž součástí je i chromatin-remodelující protein DDM1 (Jeddeloh et al., 1999). Předpokládá se tedy, že jeho funkcí je zpřístupnění heterochromatinu enzymům dráhy RdDM nebo rekrutování Pol V na chromatin (Zemach et al., 2013). V souladu s tím je skutečnost, že kolokalizuje s částí molekul NRPDE1 (Pontes et al., 2006) a je nutný k jejich asociaci s umlčovanými lokusy (Wierzbicki et al., 2008).

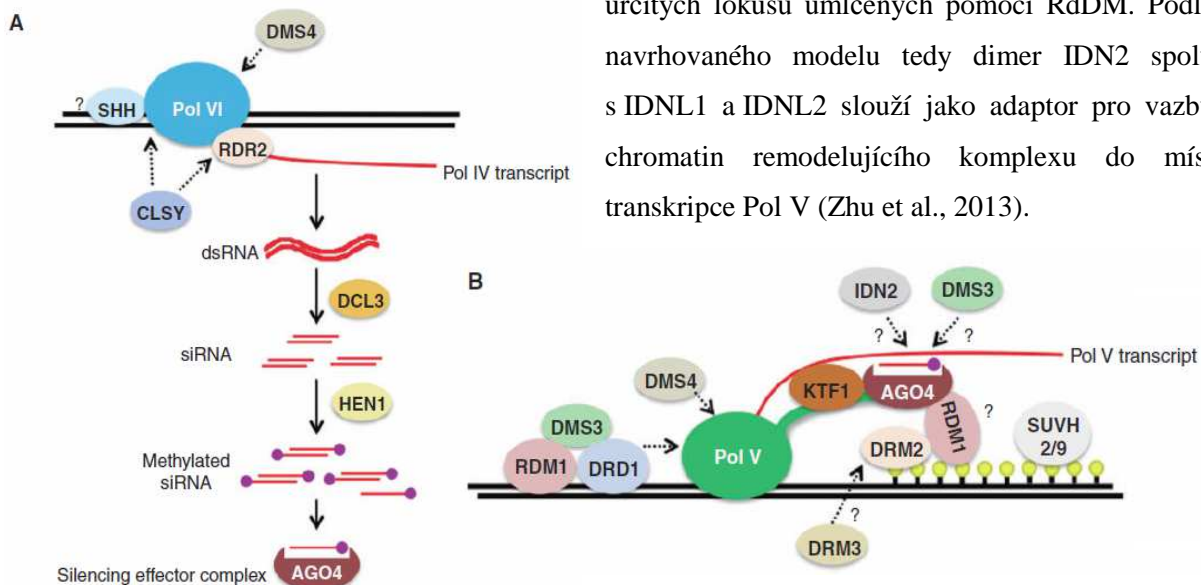
4.5.2 Proteiny *KTF1* a *IDN2*

Dalším proteinem přítomným v komplexu Pol V je KTF1/SPT5-like (KOW DOMAIN-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR 1), který je podobný SPT5 transkripčnímu faktoru RNA polymerázy II, ale na rozdíl od něj obsahuje na svém C-konci přes 40 opakování WG/GW (He et al., 2009b). Přes tuto doménu je schopen interagovat s AGO4 (Bies-Etheve et al., 2009; He et al., 2009b). Dále se může vázat na chromatin (Rowley et al., 2011) a jeho RNA vazebná doména váže jednořetězcovou RNA včetně transkriptů Pol V. KTF1 kolokalizuje s AGO4 a částečně i s Pol V v nukleoplazmě (He et al., 2009b). Jeho stabilita a zřejmě i schopnost vázat chromatin je závislá na Pol V, naopak není závislá na produkci 24-nt siRNA. Mutace *spt5l* má podobný efekt jako mutace *ago4*, tedy dochází k poklesu metylace DNA a značek H3K9me2. Podle současné představy je KTF1/SPT5-like rekrutován na chromatin vazbou na transkripty Pol V, kde pak interaguje s AGO4, se kterým vytvoří platformu pro vazbu dalších enzymů podílejících se na represivních modifikacích chromatinu (Rowley et al., 2011).

Vedle KTF1 a AGO4 asociuje s transkripty Pol V také protein IDN2 (INVOLVED IN DE NOVO 1; Zhu et al., 2013), který je *in vitro* přes svoji XS doménu schopen vázat dsRNA s přesahem na 5' konci

(Ausin et al., 2009). Prostřednictvím své coiled-coil domény je schopen vytvářet homodimer, ale pravděpodobně také přes tuto doménu interaguje s dalšími dvěma jemu blízkými příbuznými proteiny IDN2-like 1 a 2 (IDNL1 a IDNL2), se kterými vytváří komplex fungující na dráze RdDM (Ausin et al., 2012). IDN2 fyzicky interaguje prostřednictvím podjednotky SWI3B se SWI/SNF chromatin remodelujícím komplexem. Mutace některých podjednotek tohoto komplexu vedou k derepresi

určitých lokusů umlčených pomocí RdDM. Podle navrhovaného modelu tedy dimer IDN2 spolu s IDNL1 a IDNL2 slouží jako adaptor pro vazbu chromatin remodelujícího komplexu do míst transkripce Pol V (Zhu et al., 2013).



Obr. 3. Navrhovaný model RdDM: A) Transkripty Pol IV jsou přepisovány do dsRNA enzymem RDR2, které jsou štěpeny DCL3 na 24-nt duplexy siRNA. Ty jsou metylovány na 3' konci HEN1 a jedno z vláken asociuje s AGO4. Chromatin remodelující faktor CLSY1 zřejmě umožňuje transkripci Pol IV a RDR2. SHH1 by se mohlo účastnit navedení Pol IV na heterochromatin.

B) Nekódující transkript Pol V slouží k vazbě siRNA-AGO4 komplexu, pravděpodobně prostřednictvím komplementarity mezi siRNA a lncRNA. DRD1 a DMS3 usnadňují transkripci Pol V. IDN2 váže lncRNA a slouží pro vazbu dalších proteinů. Podobnou úlohu zřejmě zastává také KTF1. Tímto způsobem by mohla být navedena DRM1/2 na cílovou sekvenci. Protože RDM1 váže AGO4 a DRM1/2, mohla by se podílet na stabilizaci vazby DRM1/2 s celým komplexem. Přepokládá se, že DMS4 funguje jako transkripční faktor. Metylované cytosiny jsou znázorněny jako žlutá kolečka.

(Převzato z: Saze et al., 2012)

4.5.3 Proteiny AGO4, AGO6 a AGO9

AGO4 váže preferenčně 23-24-nt siRNA a z malé části (3%) asociuje i s miRNA (Qi et al., 2006). Oproti AGO1 váže AGO4 významné množství siRNA odvozených z repetitivních sekvencí, tomu odpovídá jeho asociace s velkým množstvím siRNA z pericentromerických oblastí. Asociuje ale také s siRNA odvozenými z transponovatelných elementů, genů, pseudogenů a intergenových oblastí (Qi et al., 2006). AGO4-siRNA komplex je pak zřejmě na základě komplementarity siRNA s nascentními transkripty Pol V naváděn na cílové sekvence (Qi et al., 2006; El-Shami et al., 2007; Wierzbicki et al., 2009). Zdá se, že při nejmenším pro zacílení do genových oblastí není přítomnost odpovídajících 24-nt siRNA jedinou podmínkou. Nezbytná pro vazbu AGO4 je také transkripce či transkripty Pol V na odpovídajících lokusech, a to z více než 90% případů (Zheng et al., 2013).

AGO4 se kromě jádra vyskytuje také v cytoplazmě spolu s 21-nt a 24-nt siRNA, které jsou zde převážně ve formě duplexu. Na základě provedených experimentů zřejmě AGO4 v cytoplazmě

asociuje s těmito duplexy, ze kterých štěpením odstraní přebytečné vlákno RNA za vzniku zralého AGO4-siRNA komplexu. Tato interakce pak vede k vystavení jaderného lokalizačního signálu (NLS), díky čemuž je zajištěno, že do jádra vstoupí jen AGO4 s navázanou molekulou siRNA. V souladu s tím je skutečnost, že v cytoplazmě převážná frakce AGO4 molekul není s siRNA asociována, zatímco v jádře je tomu přesně naopak (Ye et al., 2012). Vznik zralého komplexu AGO4 a navázanou siRNA vyžaduje chaperon HSP90, který se tohoto procesu účastní i u jiných organismů (Iwasaki et al., 2010; Ye et al., 2012).

AGO4 se podílí na vzniku siRNA a ustanovení metylace DNA jen na určitých lokusech, kde jeho mutace vede k výrazné redukci CHG a CHH metylace (Zilberman et al., 2004). Schopnost AGO4 štěpit RNA významně přispívá k produkci siRNA z některých lokusů a k jejich metylaci (*MEA-ISR*, *SIMPLEHAT2*), zatímco v případě *AtMu1* a *SUP* lokusů vlastní katalytická aktivita AGO4 nemá na metylaci DNA vliv (Qi et al., 2006). Zdá se ale, že u většiny AGO4-dependentních lokusů je enzymatická štěpící aktivita pro akumulaci siRNA vyžadována (Havecker et al., 2010). Štěpení AGO4 by mohlo aktivovat vznik, nebo být součástí procesu vzniku sekundárních siRNA. Naproti tomu nekatalytická funkce AGO4 zřejmě souvisí s rolí AGO4 jako platformy navádějící chromatin-remodelující faktory na cílové lokusy (Qi et al., 2006).

Výskyt AGO4 na genomových sekvencích se překrývá s místy zvýšeného výskytu CHH metylace, která je nejsilnější v promotorových oblastech zahrnujících transponovatelné elementy. Tyto promotory náleží z významné části genům, jejichž exprese se mění v odpovědi na biotické a abiotické stresy. Po vystavení stresu několikanásobně vzrostla míra CHH metylace právě na těchto lokusech v porovnání se zbytkem genomu (Zheng et al., 2013). Toto zjištění ukazuje na význam transponovatelných elementů pro epigenetickou kontrolu exprese genů prostřednictvím siRNA (Havecker et al., 2010).

Jedním z možných zdůvodnění specifické aktivity AGO4 pro různé lokusy je účast jiných AGO proteinů. AGO6 a AGO9 jsou nejbližšími paralogy AGO4 (Morel et al., 2002), které také váží téměř výhradně 24-nt siRNA a upřednostňují na jejich 5' konci adenosinový zbytek (Havecker et al., 2010). Všechny tři uvedené AGO jsou asociovány s siRNA pocházejícími především z transpozonů, tandemových repetíc, ale také z některých lokusů kódujících miRNA. Avšak v rámci jednotlivých tříd se mezi sebou AGO proteiny liší v zastoupení. Nejpodobnější v zastoupení lokusů asociovaných s siRNA jsou si AGO4 a AGO6 (Havecker et al., 2010), které mají částečně redundantní funkci. Byly ale zaznamenány i určité rozdíly, např. mutace *ago6* nemá oproti *ago4* vliv na metylaci 5S rDNA (Zheng et al., 2007; Zilberman et al., 2004).

Rozdíly mezi populacemi siRNA vázaných na AGO4, AGO6 a AGO9 jsou dány do značné míry rozdíly v jejich expresi. AGO4 je exprimován v embryích, listech, v květech a v šedulích *Arabidopsis thaliana*. AGO6 je lokalizován do vzrostných vrcholů stonku, kořene a vodivých pletiv. AGO9 je zastoupen ve vyvíjejícím se vajíčku a v oblasti stonkového meristému embrya (Havecker et al., 2010).

Dalším AGO proteinem, který se do určité míry podílí na transkripčním umlčování spolu s AGO4 je AGO1. Nasvědčují tomu výsledky sekvenování, které odhalily, že přibližně 30% malých RNA, které asociují s AGO1 tvoří 24-nt siRNA. Tyto 24-nt siRNA pocházejí z rozmanitých sekvencí, a to především z intergenových oblastí, které se téměř nepřekrývají s místy původu 21-nt malých RNA asociovaných také s AGO1. Naopak v případě 21-nt siRNA asociovaných s AGO4 je jedná pouze o „sestřihové varianty“ 24-nt siRNA. Oproti siRNA asociovaným typicky s AGO4 obsahují 24-nt siRNA asociované s AGO1 na 5' konci uridinový zbytek (Wang et al., 2011). Byla také zjištěna asociace AGO1 s siRNA odvozenými z invertovaných repetitiv (Mi et al., 2008).

Interpretace role AGO1 v transkripčním umlčení není jednoduchá; přestože v mutantech *ago1* dochází k aktivaci exprese některých transpozonů (*ATCOPIA4*, *ATENSPM5*) doprovázené ztrátou H3K9me2 a vytvořením H3K4me2, metylace jejich DNA zůstává zachována (Lippman et al., 2003).

5. Role RNA polymerázy II v RdDM

Mechanismus, jakým je Pol IV, resp. Pol V schopna zacílit *de novo* metylaci DNA na určité lokusy, stále není zcela jasný. Úlohu by zde však mohla hrát RNA polymeráza II (Pol II), přinejmenším u lokusů typu II. Pol II totiž generuje transkripty komplementární k oblastem uvnitř lokusů typu II a k přilehlým oblastem. Přitom nedochází k poklesu těchto transkriptů navádějících komplex siRNA-AGO4 k místu metylace DNA u mutantů *nripe1*, ale dochází k němu u mutantů *nripb2-3* polymerázy II. Pol II je zřejmě schopna rekrutovat AGO4-siRNA komplex do oblastí lokusů typu II, protože lokalizace AGO4 v mutantech *nripb2-3* je v těchto místech snížena. V souladu s tím je i existence čtyř GW/WG motivů v NRPB2 podjednotce, které je myc-AGO4 schopen vázat při pull-down eseji. Navíc požadavek DRD1 pro transkripci lokusů typu II neplatí pouze pro Pol V, ale také pro Pol II (Zheng et al., 2009). Zajímavé je, že RDM1 nutný pro transkripci Pol V imunoprecipituje s Pol II, tedy ji pravděpodobně váže, ale nikoliv s Pol V (Gao et al., 2010).

Přítomnost Pol IV i V je v oblastech přilehlých k lokusům typu II snížena u mutantů *nripb2-3*. Mutace v Pol II má stejně jako mutace v Pol V vliv na metylaci DNA a H3K9me2 na těchto lokusech, což naznačuje, že transkripce Pol II by mohla navádět Pol V za účelem ustanovení DNA metylace (Zheng et al., 2009). Otázkou zůstává, proč to není rovnou Pol II, která by naváděla metylační faktory na lokusy typu II, je-li schopna vázat AGO4.

RNA polymeráza II se také podílí na biogenezi 24-nt siRNA z lokusů typu II. Možným mechanismem je zpětnovazebné zvyšování produkce siRNA, podobně jako se předpokládá u Pol V v případě lokusů typu I. Tomu nasvědčuje i mírné snížení množství siRNA z lokusů typu II, jejichž produkce je závislá pouze na Pol IV, ale nikoliv na Pol V, v důsledku mutace *nripb2-3* (Zheng et al., 2009).

Dalším důkazem, který svědčí pro přímou účast Pol II v dráze RdDM, je význam Mediátoru v této dráze. Mediátor je vícepodjednotkový komplex, který se podílí na aktivaci transkripce Pol II (Kelleher III et al., 1990). Mutace jeho podjednotky vede ke snížení výskytu Pol V na lokusech typu I i II

a snižuje se i produkce navádějících transkriptů z lokusů typu II, jež je závislá na Pol II. Zároveň dochází k derepresi transkripce z obou typů lokusů v těchto mutantech. Nejjednodušším vysvětlením, které se nabízí, je účast Pol II v transkripčním umlčování také na lokusech typu I. Tomu odpovídá i přítomnost Pol II na lokusech obou typů (Kim et al., 2011). V rozporu s touto možností jsou ale dřívější výsledky práce B. Zhenga a jeho kolegů, kteří přítomnost Pol II na lokusech typu I nepozorovali (Zheng et al., 2009).

Nepřímé důkazy přináší také zjištění, že z vnesené homologní sekvence umlčené *in trans* prostřednictvím 24-nt siRNA vznikají transkripty Pol II. V liniích, které nemají tuto sekvenci umlčenou, přitom ke vzniku těchto nekódujících transkriptů nedochází, přestože i zde vznikají sekundární siRNA z homologního konstruktů umlčeného *in cis* (You et al., 2013).

Vedle DRD1 je dalším proteinem, který interaguje s Pol V i Pol II RDM4/DMS4 (RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 4/DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 4) vykazující sekvenční podobnost s kvasinkovým IWR1, který tvoří komplex s Pol II a některými jejími obecnými transkripčními faktory (He et al., 2009c; Krogan et al., 2006). Mutace *rdm4* vede k redukci 24-nt siRNA a transkriptů generovaných Pol V. Zároveň má vliv na expresi genů odpovědi na stres a rezistence vůči patogenům, jejichž exprese je zprostředkována Pol II (He et al., 2009c).

6. Závěr

Problematika metylace DNA malými RNA je v současnosti předmětem intenzivního zájmu a studia, což v nedávné době vedlo k zodpovězení některých stěžejních otázek týkajících se RdDM. Příkladem může být objevení nové CHH metyltransferázy CMT2 nebo prokázání transkripce Pol IV a V *in vitro* (Haag et al., 2012; Zemach et al., 2013). Zároveň zde zbývá řada otázek, které stále čekají na vyřešení. Velmi zajímavým a také nesnadným úkolem bude objasnění úlohy Pol II v této dráze, která by mohla rekrutovat Pol V a případně i Pol IV na cílové lokusy. S postupujícím poznáním se však vynořují také nové otázky a perspektivy. Aktuálně k nim přibyla funkce proteinu SHH1, který interaguje s Pol IV a zároveň je schopen vázat histon H3 s metylovaným lysinem na pozici 9 (Zhang et al., 2013). Velký potenciál pro další výzkum přinesla také rozsáhlá analýza metylomu *Arabidopsis* u 86 mutantů účastnících se v dráze transkripčního umlčení (Stroud et al., 2013). Máme tedy dobrý důvod se domnívat, že v blízké budoucnosti se podaří sestavit mnohem kompletnější obraz procesu RdDM a s ní souvisejících regulací u rostlin.

Seznam použité literatury

- Adenot, X., Elmayan, T., Laressergues, D., Boutet, S., Bouché, N., Gascioli, V., and Vaucheret, H. (2006). DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Current Biology* *16*, 927–932.
- Agius, F., Kapoor, A., and Zhu, J. (2006). Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 11796–11801.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., and Carrington, J.C. (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* *121*, 207–221.
- Aufsatz, W., Mette, M.F., Winden, J.V.D., Matzke, M., and Matzke, A.J.M. (2002). HDA6, a putative histone deacetylase needed to enhance DNA methylation induced by double-stranded RNA. *The EMBO Journal* *21*, 6832–6841.
- Aufsatz, W., Mette, M.F., Matzke, A.J.M., and Matzke, M. (2004). The role of MET1 in RNA-directed de novo and maintenance methylation of CG dinucleotides. *Plant Molecular Biology* *54*, 793–804.
- Ausin, I., Mockler, T.C., Chory, J., and Jacobsen, S.E. (2009). IDN1 and IDN2 are required for de novo DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *Nature Structural & Molecular Biology* *16*, 1325–1327.
- Ausin, I., Greenberg, M.V.C., Simanshu, D.K., Hale, C.J., Vashisht, A. A., Simon, S. A., Lee, T., Feng, S., Española, S.D., Meyers, B.C., et al. (2012). INVOLVED IN DE NOVO 2-containing complex involved in RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 8374–8381.
- Baumberger, N., and 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*, 11928–11933.
- Beisel, C., and Paro, R. (2011). Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nature Reviews. Genetics* *12*, 123–135.
- Bellaoui, M., Keddie, J.S., and Gruijsem, W. (2003). DCL is a plant-specific protein required for plastid ribosomal RNA processing and embryo development. *Plant Molecular Biology* *53*, 531–543.
- Bernatavichute, Y.V., Zhang, X., Cokus, S., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E. (2008). Genome-Wide Association of Histone H3 Lysine Nine Methylation with CHG DNA Methylation in Arabidopsis thaliana. *PloS One* *3*, e3156.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* *409*, 363–366.
- Bies-Etheve, N., Pontier, D., Lahmy, S., Picart, C., Vega, D., Cooke, R., and Lagrange, T. (2009). RNA-directed DNA methylation requires an AGO4-interacting member of the SPT5 elongation factor family. *EMBO Reports* *10*, 649–654.
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Aregger, M., Borah, B.K., Schepetilnikov, M., Baerlocher, L., Farinelli, L., Meins, F., Hohn, T., and Pooggin, M.M. (2011). Massive production of small RNAs from a non-coding region of Cauliflower mosaic virus in plant defense and viral counter-defense. *Nucleic Acids Research* *39*, 5003–5014.

- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R., and Zhu, J.-K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell* *123*, 1279–1291.
- Boudonck, K., Dolan, L., and Shaw, P.J. (1999). The Movement of Coiled Bodies Visualized in Living Plant Cells by the Green Fluorescent Protein. *Molecular Biology of the Cell* *10*, 2297–2307.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L., and Voinnet, O. (2008). Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. *Science* *320*, 1185–1190.
- Béclin, C., Boutet, S., Waterhouse, P., and Vaucheret, H. (2002). A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Current Biology* *12*, 684–688.
- Cao, X., Aufsatz, W., Zilberman, D., Mette, M.F., Huang, M.S., Matzke, M., and Jacobsen, S.E. (2003). Role of the DRM and CMT3 Methyltransferases in RNA-Directed DNA Methylation. *Current Biology* *13*, 2212–2217.
- Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q., and Hannon, G.J. (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes & Development* *16*, 2733–2742.
- Caro, E., Stroud, H., Greenberg, M.V.C., Bernatavichute, Y.V., Feng, S., Groth, M., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J., and Jacobsen, S.E. (2012). The SET-Domain Protein SUV5 Mediates H3K9me2 Deposition and Silencing at Stimulus Response Genes in a DNA Methylation – Independent Manner. *PLoS Genetics* *8*, e1002995.
- Chan, S.W., Zilberman, D., Xie, Z., Johansen, L.K., Carrington, J.C., and Jacobsen, S.E. (2004). RNA Silencing Genes Control de Novo DNA Methylation. *Science* *303*, 1336.
- Chan, S.W.-L., Henderson, I.R., Zhang, X., Shah, G., Chien, J.S.-C., and Jacobsen, S.E. (2006). RNAi, DRD1, and histone methylation actively target developmentally important non-CG DNA methylation in arabidopsis. *PLoS Genetics* *2*, e83.
- Chiu, A., Revenkova, E., and Jessberger, R. (2004). DNA Interaction and Dimerization of Eukaryotic SMC Hinge Domains. *The Journal of Biological Chemistry* *279*, 26233–26242.
- Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Jacobsen, S.E., and Fischer, R.L. (2002). DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in arabidopsis. *Cell* *110*, 33–42.
- Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C.D., Pradhan, S., Nelson, S.F., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E. (2008). Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* *452*, 215–219.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., Fu, J., Gnatt, A.L., Maier-Davis, B., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Edwards, A.M., David, P.R., and Kornberg, R.D. (2000). Architecture of RNA Polymerase II and Implications for the Transcription Mechanism. *Science* *288*, 640–649.
- Cramer, P., Bushnell, D. A., and Kornberg, R.D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* *292*, 1863–1876.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., and Baulcombe, D.C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* *101*, 543–553.
- Deal, R.B., and Henikoff, S. (2011). Histone variants and modifications in plant gene regulation. *Current Opinion in Plant Biology* *14*, 116–122.

- Deleris, A., Stroud, H., Bernatavichute, Y., Johnson, E., Klein, G., Schubert, D., and Jacobsen, S.E. (2012). Loss of the DNA Methyltransferase MET1 Induces H3K9 Hypermethylation at PcG Target Genes and Redistribution of H3K27 Trimethylation to Transposons in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* 8, e1003062.
- Dong, Z., Han, M., and Fedoroff, N. (2008). The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9970–9975.
- Du, J., Zhong, X., Bernatavichute, Y.V., Stroud, H., Feng, S., Caro, E., Vashisht, A. A, Terragni, J., Chin, H.G., Tu, A., et al. (2012). Dual binding of chromomethylase domains to H3K9me2-containing nucleosomes directs DNA methylation in plants. *Cell* 151, 167–180.
- El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M.-A., Jacobsen, S.E., Cooke, R., and Lagrange, T. (2007). Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes & Development* 21, 2539–2544.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J., Bellini, C., and Vaucheret, H. (2000). AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11650–11654.
- Fan, D., Dai, Y., Wang, X., Wang, Z., He, H., Yang, H., Cao, Y., Deng, X.W., and Ma, L. (2012). IBM1, a JmjC domain-containing histone demethylase, is involved in the regulation of RNA-directed DNA methylation through the epigenetic control of RDR2 and DCL3 expression in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 40, 8905–8916.
- Feng, S., and Jacobsen, S.E. (2011). Epigenetic modifications in plants: an evolutionary perspective. *Current Opinion in Plant Biology* 14, 179–186.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Gao, Z., Liu, H.-L., Daxinger, L., Pontes, O., He, X., Qian, W., Lin, H., Xie, M., Lorkovic, Z.J., Zhang, S., et al. (2010). An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature* 465, 106–109.
- Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Fahlgren, N., Brempelis, K.J., and Carrington, J.C. (2010). *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *The Plant Cell* 22, 481–496.
- Gascioli, V., Mallory, A.C., Bartel, D.P., and Vaucheret, H. (2005). Partially Redundant Functions of *Arabidopsis* DICER-like Enzymes and a Role for DCL4 in Producing trans-Acting siRNAs. *Current Biology* 15, 1494–1500.
- Gehring, M., Huh, J.H., Hsieh, T., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J.J., Goldberg, R.B., and Fischer, R.L. (2006). DEMETER DNA Glycosylase Establishes MEDEA Polycomb Gene Self-Imprinting by Allele-Specific Demethylation. *Cell* 124, 495–506.
- Gnatt, A.L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D. A., and Kornberg, R.D. (2001). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)* 292, 1876–1882.

- Grossniklaus, U., Vielle-Calzada, J.-P., Hoepfner, M.A., and Gagliano, W.B. (1998). Maternal Control of Embryogenesis by MEDEA, a Polycomb Group Gene in Arabidopsis. *Science* 280, 446–450.
- Haag, J.R., and Pikaard, C.S. (2011). Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12, 483–492.
- Haag, J.R., Pontes, O., and Pikaard, C.S. (2009). Metal A and metal B sites of nuclear RNA polymerases Pol IV and Pol V are required for siRNA-dependent DNA methylation and gene silencing. *PLoS One* 4, e4110.
- Haag, J.R., Ream, T.S., Marasco, M., Nicora, C.D., Norbeck, A.D., Pasa-Tolic, L., and Pikaard, C.S. (2012). In Vitro Transcription Activities of Pol IV, Pol V, and RDR2 Reveal Coupling of Pol IV and RDR2 for dsRNA Synthesis in Plant RNA Silencing. *Molecular Cell* 48, 811–818.
- Hamilton, A.J., and Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950–952.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., and Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *The EMBO Journal* 21, 4671–4679.
- Havecker, E.R., Wallbridge, L.M., Hardcastle, T.J., Bush, M.S., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Schwach, F., Doonan, J.H., and Baulcombe, D.C. (2010). The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *The Plant Cell* 22, 321–334.
- He, X.-J., Hsu, Y.-F., Pontes, O., Zhu, J., Lu, J., Bressan, R. A., Pikaard, C., Wang, C.-S., and Zhu, J.-K. (2009a). NRPD4, a protein related to the RPB4 subunit of RNA polymerase II, is a component of RNA polymerases IV and V and is required for RNA-directed DNA methylation. *Genes & Development* 23, 318–330.
- He, X.-J., Hsu, Y.-F., Zhu, S., Wierzbicki, A.T., Pontes, O., Pikaard, C.S., Liu, H.-L., Wang, C.-S., Jin, H., and Zhu, J.-K. (2009b). An effector of RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. *Cell* 137, 498–508.
- He, X.-J., Hsu, Y.-F., Zhu, S., Liu, H.-L., Pontes, O., Zhu, J., Cui, X., Wang, C.-S., and Zhu, J.-K. (2009c). A conserved transcriptional regulator is required for RNA-directed DNA methylation and plant development. *Genes & Development* 23, 2717–2722.
- Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T., and Baulcombe, D.C. (2005). RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308, 118–120.
- Hirano, T. (2006). At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7, 311–322.
- Hirano, M., and Hirano, T. (2002). Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA. *The EMBO Journal* 21, 5733–5744.
- Huettel, B., Kanno, T., Daxinger, L., Aufsatz, W., Matzke, A.J.M., and Matzke, M. (2006). Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in Arabidopsis. *The EMBO Journal* 25, 2828–2836.
- Huettel, B., Kanno, T., Daxinger, L., Bucher, E., van der Winden, J., Matzke, A.J.M., and Matzke, M. (2007). RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1769, 358–374.

- Inagaki, S., Miura-Kamio, A., Nakamura, Y., Lu, F., Cui, X., Cao, X., Kimura, H., Saze, H., and Kakutani, T. (2010). Autocatalytic differentiation of epigenetic modifications within the Arabidopsis genome. *The EMBO Journal* 29, 3496–3506.
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., and Suzuki, T. (2010). Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes. *Molecular Cell* 39, 292–299.
- Izant, J.G., and Weintraub, H. (1985). Constitutive and conditional suppression of exogenous and endogenous genes by anti-sense RNA. *Science* 229, 345–352.
- Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X., and Jacobsen, S.E. (2002). Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416, 556–560.
- Jackson, J.P., Johnson, L., Jasencakova, Z., Zhang, X., Schubert, I., Jenuwein, T., and Jacobsen, S.E. (2004). Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in Arabidopsis thaliana. *Chromosoma* 112, 308–315.
- Jacob, Y., Feng, S., Leblanc, C.A., Bernatavichute, Y.V., Stroud, H., Cokus, S., Johnson, L.M., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., and Michaels, S.D. (2009). ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 763–769.
- Jeddeloh, J. A., Bender, J., and Richards, E. J. (1998). The DNA methylation locus DDM1 is required for maintenance of gene silencing in Arabidopsis. *Genes & Development* 12, 1714–1725.
- Jeddeloh, J. A., Stokes, T. L., and Richards, E. J. (1999). Maintenance of genomic methylation requires a SWI2 / SNF2-like protein. *Nature Genetics* 22, 94–97.
- Johnson, L., Mollah, S., Garcia, B. A., Muratore, T. L., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Jacobsen, S.E. (2004). Mass spectrometry analysis of Arabidopsis histone H3 reveals distinct combinations of post-translational modifications. *Nucleic Acids Research* 32, 6511–6518.
- Johnson, L. M., Bostick, M., Zhang, X., Kraft, E., Henderson, I., Callis, J., and Jacobsen, S.E. (2007). The SRA Methyl-Cytosine-Binding Domain Links DNA and Histone Methylation. *Current Biology* 17, 379–384.
- Johnson, L.M., Law, J. A., Khattar, A., Henderson, I.R., and Jacobsen, S.E. (2008). SRA-domain proteins required for DRM2-mediated de novo DNA methylation. *PLoS Genetics* 4, e1000280.
- Jones-Rhoades, M.W., and Bartel, D.P. (2004). Computational Identification of Plant MicroRNAs and Their Targets, Including a Stress-Induced miRNA. *Molecular Cell* 14, 787–799.
- Kankel, M.W., Ramsey, D.E., Stokes, T.L., Flowers, S.K., Haag, J.R., Jeddeloh, J.A., Riddle, N.C., Verbsky, M.L., and Richards, E.J. (2003). Arabidopsis MET1 Cytosine Methyltransferase Mutants. *Genetics* 1122, 1109–1122.
- Kanno, T., Mette, M.F., Kreil, D.P., Aufsatz, W., Matzke, M., and Matzke, A.J.M. (2004). Involvement of Putative SNF2 Chromatin Remodeling Protein DRD1 in RNA-Directed DNA Methylation. *Current Biology* 14, 801–805.
- Kanno, T., Aufsatz, W., Jaligot, E., Mette, M.F., Matzke, M., and Matzke, A.J.M. (2005). A SNF2-like protein facilitates dynamic control of DNA methylation. *EMBO Reports*.
- Kanno, T., Bucher, E., Daxinger, L., Huettel, B., Böhmendorfer, G., Gregor, W., Kreil, D.P., Matzke, M., and Matzke, A.J.M. (2008). A structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation. *Nature Genetics* 40, 670–675.

- Kasschau, K.D., Fahlgren, N., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Cumbie, J.S., Givan, S. A., and Carrington, J.C. (2007). Genome-wide profiling and analysis of Arabidopsis siRNAs. *PLoS Biology* 5, e57.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Zhu, J.-K., Staskawicz, B.J., and Jin, H. (2006). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18002–18007.
- Kelleher III, R.J., Flanagan, P.M., and Kornberg, R.D. (1990). A Novel Mediator between Activator Proteins and the RNA Polymerase II Transcription Apparatus. *Cell* 61, 1209–1215.
- Kim, Y.J., Zheng, B., Yu, Y., Won, S.Y., Mo, B., and Chen, X. (2011). The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in Arabidopsis thaliana. *The EMBO Journal* 30, 814–822.
- Kiyosue, T., Ohad, N., Yadegari, R., Hannon, M., Dinneny, J., Wells, D., Katz, A., Margossian, L., Harada, J.J., Goldberg, R.B., et al. (1999). Control of fertilization-independent endosperm development by the MEDEA polycomb gene in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4186–4191.
- Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., et al. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440, 637–643.
- Kuhlmann, M., and Mette, M.F. (2012). Developmentally non-redundant SET domain proteins SUVH2 and SUVH9 are required for transcriptional gene silencing in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* 79, 623–633.
- Kurihara, Y., and Watanabe, Y. (2004). Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12753–12758.
- Lahmy, S., Pontier, D., Cavel, E., Vega, D., El-Shami, M., Kanno, T., and Lagrange, T. (2009). PolV(PolIVb) function in RNA-directed DNA methylation requires the conserved active site and an additional plant-specific subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 941–946.
- Landick, R. (2009). Functional divergence in the growing family of RNA polymerases. *Structure* 17, 323–325.
- Law, J. A., and Jacobsen, S.E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews. Genetics* 11, 204–220.
- Law, J. A., Ausin, I., Johnson, L.M., Vashisht, A. A., Zhu, J.-K., Wohlschlegel, J. A., and Jacobsen, S.E. (2010). A protein complex required for polymerase V transcripts and RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Current Biology* 20, 951–956.
- Law, J. A., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., and Jacobsen, S.E. (2011). SHH1, a homeodomain protein required for DNA methylation, as well as RDR2, RDM4, and chromatin remodeling factors, associate with RNA polymerase IV. *PLoS Genetics* 7, e1002195.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Lee, T., Gurazada, S.G.R., Zhai, J., Li, S., Simon, S. A., Matzke, M. A., Chen, X., and Meyers, B.C. (2012). RNA polymerase V-dependent small RNAs in Arabidopsis originate from small, intergenic loci including most SINE repeats. *Epigenetics* 7, 781–795.

- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* 23, 4051–4060.
- Li, C.F., Pontes, O., El-Shami, M., Henderson, I.R., Bernatavichute, Y.V., Chan, S.W.-L., Lagrange, T., Pikaard, C.S., and Jacobsen, S.E. (2006). An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 126, 93–106.
- Lindroth, A.M., Shultis, D., Jasencakova, Z., Johnson, L., Schubert, D., Patnaik, D., Pradhan, S., Goodrich, J., Schubert, I., Jenuwein, T., et al. (2004). Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with CHROMOMETHYLASE3. *The EMBO Journal* 23, 4286–4296.
- Lippman, Z., May, B., Yordan, C., Singer, T., and Martienssen, R. (2003). Distinct Mechanisms Determine Transposon Inheritance and Methylation via Small Interfering RNA and Histone Modification. *PLoS Biology* 1, 420–428.
- Lippman, Z., Gendrel, A., and Black, M. (2004). Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 430, 471–476.
- Lister, R., Malley, R.C.O., Tonti-Filippini, J., Gregory, B.D., Berry, C.C., Millar, A.H., and Ecker, J.R. (2008). Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in *Arabidopsis*. *Cell* 133, 523–536.
- Liu, X., Yu, C.-W., Duan, J., Luo, M., Wang, K., Tian, G., Cui, Y., and Wu, K. (2012). HDA6 directly interacts with DNA methyltransferase MET1 and maintains transposable element silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 158, 119–129.
- Luo, J., and Hall, B.D. (2007). A multistep process gave rise to RNA polymerase IV of land plants. *Journal of Molecular Evolution* 64, 101–112.
- Luo, Z., and Chen, Z. (2007). Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19, 943–958.
- Luo, M., Bilodeau, P., Koltunow, A., Dennis, E.S., Peacock, W.J., and Chaudhury, A. M. (1999). Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 296–301.
- Luo, M., Bilodeau, P., Dennis, E.S., Peacock, W.J., and Chaudhury, A. (2000). Expression and parent-of-origin effects for FIS2, MEA, and FIE in the endosperm and embryo of developing *Arabidopsis* seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10637–10642.
- Mathieu, O., Probst, A.V., and Paszkowski, J. (2005). Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* 24, 2783–2791.
- Meister, G., and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343–349.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., et al. (2008). Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133, 116–127.
- Miura, A., Nakamura, M., Inagaki, S., Kobayashi, A., Saze, H., and Kakutani, T. (2009). An *Arabidopsis* jmjC domain protein protects transcribed genes from DNA methylation at CHG sites. *The EMBO Journal* 28, 1078–1086.
- Molnar, A., Melnyk, C., and Baulcombe, D.C. (2011). Silencing signals in plants: a long journey for small RNAs. *Genome Biology* 12, 215.

- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E., and Carrington, J.C. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell* *133*, 128–141.
- Morel, J., Godon, C., Mourrain, P., Béclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., and Vaucheret, H. (2002). Fertile Hypomorphic ARGONAUTE (*ago1*) Mutants Impaired in Post-Transcriptional Gene Silencing and Virus Resistance. *The Plant Cell* *14*, 629–639.
- Mosher, R. A., Schwach, F., Studholme, D., and Baulcombe, D.C. (2008). PolIVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 3145–3150.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell* *2*, 279–289.
- Naumann, K., Fischer, A., Hofmann, I., Krauss, V., Irmeler, K., Hause, G., Aurich, A., Dorn, R., Jenuwein, T., and Reuter, G. (2005). Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in Arabidopsis. *The EMBO Journal* *24*, 1418–1429.
- Noma, K., Allis, D.C., and Grewal, S.I.S. (2013). Transitions in Distinct Histone H3 Methylation Patterns at the Heterochromatin Domain Boundaries. *Science* *293*, 1150–1155.
- Onodera, Y., Haag, J.R., Ream, T., Costa Nunes, P., Pontes, O., and Pikaard, C.S. (2005). Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* *120*, 613–622.
- Pélissier, T., and Wassenegger, M. (2000). A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed DNA methylation. *RNA* *6*, 55–65.
- Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J.H., Ballinger, T., Henikoff, S., and Fischer, R.L. (2007). DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 6752–6757.
- Pfluger, J., and Wagner, D. (2007). Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Current Opinion in Plant Biology* *10*, 645–652.
- Pontes, O., Li, C.F., Costa Nunes, P., Haag, J., Ream, T., Vitins, A., Jacobsen, S.E., and Pikaard, C.S. (2006). The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell* *126*, 79–92.
- Pontes, O., Costa-Nunes, P., Vithayathil, P., and Pikaard, C.S. (2009). RNA polymerase V functions in Arabidopsis interphase heterochromatin organization independently of the 24-nt siRNA-directed DNA methylation pathway. *Molecular Plant* *2*, 700–710.
- Pontier, D., Yahubyan, G., Vega, D., Bulski, A., Saez-Vasquez, J., Hakimi, M.-A., Lerbs-Mache, S., Colot, V., and Lagrange, T. (2005). Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in Arabidopsis. *Genes & Development* *19*, 2030–2040.
- Qi, Y., Denli, A.M., and Hannon, G.J. (2005). Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. *Molecular Cell* *19*, 421–428.
- Qi, Y., He, X., Wang, X.-J., Kohany, O., Jurka, J., and Hannon, G.J. (2006). Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* *443*, 1008–1012.
- Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J., and Bartel, D.P. (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. *Genes & Development* *20*, 3407–3425.

- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., et al. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* *406*, 593–599.
- Ream, T.S., Haag, J.R., Wierzbicki, A.T., Nicora, C.D., Norbeck, A.D., Zhu, J.-K., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., Pasa-Tolić, L., and Pikaard, C.S. (2009). Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II. *Molecular Cell* *33*, 192–203.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & Development* *16*, 1616–1626.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell* *110*, 513–520.
- Rowley, M.J., Avrutsky, M.I., Sifuentes, C.J., Pereira, L., and Wierzbicki, A.T. (2011). Independent chromatin binding of ARGONAUTE4 and SPT5L/KTF1 mediates transcriptional gene silencing. *PLoS Genetics* *7*, e1002120.
- Saze, H., Tsugane, K., Kanno, T., and Nishimura, T. (2012). DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant & Cell Physiology* *53*, 766–784.
- Schiebel, W., Haas, B., Marinkovic, S., Klanner, A., and Sangers, H.L. (1993). RNA-directed RNA Polymerase from Tomato Leaves. *The Journal of Biological Chemistry* *268*, 11858–11867.
- Smathajitt, C., Paszkowski, J., Mathieu, O., Reinders, J., and Caikovski, M. (2007). Transgenerational Stability of the Arabidopsis Epigenome Is Coordinated by CG Methylation. *Cell* *130*, 851–862.
- Smith, L.M., Pontes, O., Searle, I., Yelina, N., Yousafzai, F.K., Herr, A.J., Pikaard, C.S., and Baulcombe, D.C. (2007). An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in Arabidopsis. *The Plant Cell* *19*, 1507–1521.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.-B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G., and Waterhouse, P.M. (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* *407*, 319–320.
- Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* *305*, 1434–1437.
- Soppe, W.J.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I., and Fransz, P.F. (2002). DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis. *The EMBO Journal* *21*, 6549–6559.
- Stroud, H., Otero, S., Desvoyes, B., Ramírez-Parra, E., and Jacobsen, S.E. (2012). Genome-wide analysis of histone H3.1 and H3.3 variants in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 5370–5375.
- Stroud, H., Greenberg, M.V.C., Feng, S., Bernatavichute, Y.V., and Jacobsen, S.E. (2013). Comprehensive Analysis of Silencing Mutants Reveals Complex Regulation of the Arabidopsis Methyloome. *Cell* *152*, 352–364.
- Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A. *Nature Structural Biology* *7*, 1121–1124.
- Swiezewski, S., Crevillen, P., Liu, F., Ecker, J.R., Jerzmanowski, A., and Dean, C. (2007). Small RNA-mediated chromatin silencing directed to the 3' region of the Arabidopsis gene encoding the developmental regulator, FLC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 3633–3638.

- Tan, E.H., Blevins, T., Ream, T.S., and Pikaard, C.S. (2012). Functional Consequences of Subunit Diversity in RNA Polymerases II and V. *Cell Reports* 1, 208–214.
- Tariq, M., Saze, H., Probst, A.V., Lichota, J., Habu, Y., and Paszkowski, J. (2003). Erasure of CpG methylation in Arabidopsis alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8823–8827.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 408, 796–815.
- Thorstensen, T., Fischer, A., Sandvik, S.V., Johnsen, S.S., Grini, P.E., Reuter, G., and Aalen, R.B. (2006). The Arabidopsis SUV4 protein is a nucleolar histone methyltransferase with preference for monomethylated H3K9. *Nucleic Acids Research* 34, 5461–5470.
- To, T.K., Kim, J.-M., Matsui, A., Kurihara, Y., Morosawa, T., Ishida, J., Tanaka, M., Endo, T., Kakutani, T., Toyoda, T., et al. (2011). Arabidopsis HDA6 regulates locus-directed heterochromatin silencing in cooperation with MET1. *PLoS Genetics* 7, e1002055.
- Vaucheret, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & Development* 20, 759–771.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Cre, P., and 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 & Development* 18, 1187–1197.
- Vazquez, F., Liu, J., Fagard, M., Grati, A., Morel, J., Chen, X., and Ascq, V. (2003). Arabidopsis HEN1: A Genetic Link between Endogenous miRNA Controlling Development and siRNA Controlling Transgene Silencing and Virus Resistance. *Current Biology* 13, 843–848.
- Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A.C., Hilbert, J.-L., Bartel, D.P., and Cr  t  , P. (2004). Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Molecular Cell* 16, 69–79.
- Veiseth, S.V., Rahman, M.A., Yap, K.L., Fischer, A., Egge-Jacobsen, W., Reuter, G., Zhou, M.-M., Aalen, R.B., and Thorstensen, T. (2011). The SUV4 Histone Lysine Methyltransferase Binds Ubiquitin and Converts H3K9me1 to H3K9me3 on Transposon Chromatin in Arabidopsis. *PLoS Genetics* 7, e1001325.
- Vershinin, A.V., and Heslop-Harrison, J.S. (1998). Comparative analysis of the nucleosomal structure of rye, wheat and their relatives. *Plant Molecular Biology* 36, 149–161.
- Wang, H., Zhang, X., Liu, J., Kiba, T., Woo, J., Ojo, T., Hafner, M., Tuschl, T., Chua, N.-H., and Wang, X.-J. (2011). Deep sequencing of small RNAs specifically associated with Arabidopsis AGO1 and AGO4 uncovers new AGO functions. *The Plant Journal* 67, 292–304.
- Wang, X.-B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W.-X., Chen, X., Yu, J.-L., and Ding, S.-W. (2010). RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 484–489.
- Wierzbicki, A.T., Haag, J.R., and Pikaard, C.S. (2008). Noncoding Transcription by RNA Polymerase Pol IVb/Pol V Mediates Transcriptional Silencing of Overlapping and Adjacent Genes. *Cell* 135, 635–648.
- Wierzbicki, A.T., Ream, T.S., Haag, J.R., and Pikaard, C.S. (2009). RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nature Genetics* 41, 630–634.
- Wierzbicki, A.T., Cocklin, R., Mayampurath, A., Lister, R., Rowley, M.J., Gregory, B.D., Ecker, J.R., Tang, H., and Pikaard, C.S. (2012). Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci,

Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the Arabidopsis epigenome. *Genes & Development* 26, 1825–1836.

Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., and Carrington, J.C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology* 2, E104.

Yang, Z., Ebright, Y.W., Yu, B., and Chen, X. (2006). HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Research* 34, 667–675.

Ye, R., Wang, W., Iki, T., Liu, C., Wu, Y., Ishikawa, M., and Zhou, X. (2012). Cytoplasmic Assembly and Selective Nuclear Import of Arabidopsis ARGONAUTE4 / siRNA Complexes. *Molecular Cell* 46, 1–12.

Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M.Y., and Poethig, R.S. (2005). A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & Development* 19, 2164–2175.

You, W., Lorkovic, Z.J., Matzke, A.J.M., and Matzke, M. (2013). Interplay among RNA polymerases II, IV and V in RNA-directed DNA methylation at a low copy transgene locus in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology online pub*.

Zemach, A., McDaniel, I.E., Silva, P., and Zilberman, D. (2010). Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* 328, 916–919.

Zemach, A., Kim, M.Y., Hsieh, P.-H., Coleman-Derr, D., Eshed-Williams, L., Thao, K., Harmer, S.L., and Zilberman, D. (2013). The Arabidopsis Nucleosome Remodeler DDM1 Allows DNA Methyltransferases to Access H1-Containing Heterochromatin. *Cell* 153, 193–205.

Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., and Filipowicz, W. (2004). Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell* 118, 57–68.

Zhang, H., Ma, Z., Zeng, L., Tanaka, K., Zhang, C., Ma, J., Bai, G., and Wang, P. (2013). DTF1 is a core component of RNA-directed DNA methylation and may assist in the recruitment of Pol IV. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America online pub*, 1–6.

Zhang, W., Lee, H.-R., Koo, D.-H., and Jiang, J. (2008). Epigenetic Modification of Centromeric Chromatin: Hypomethylation of DNA Sequences in the CENH3-Associated Chromatin in Arabidopsis thaliana nad Maize. *The Plant Cell* 20, 25–34.

Zhang, X., Henderson, I.R., Lu, C., Green, P.J., and Jacobsen, S.E. (2007a). Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 4536–4541.

Zhang, X., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y.V., Pellegrini, M., Goodrich, J., and Jacobsen, S.E. (2007b). Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in Arabidopsis. *PLoS Biology* 5, e129.

Zhang, X., Xia, J., Lii, Y.E., Barrera-Figueroa, B.E., Zhou, X., Gao, S., Lu, L., Niu, D., Chen, Z., Leung, C., et al. (2012). Genome-wide analysis of plant nat-siRNAs reveals insights into their distribution, biogenesis and function. *Genome Biology* 13, R20.

Zheng, B., Wang, Z., Li, S., Yu, B., Liu, J.-Y., and Chen, X. (2009). Intergenic transcription by RNA polymerase II coordinates Pol IV and Pol V in siRNA-directed transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Genes & Development* 23, 2850–2860.

- Zheng, Q., Rowley, M.J., Bo, G., Sandhu, D., Gregory, B.D., and Wierzbicki, A.T. (2013). RNA polymerase V targets transcriptional silencing components to promoters of protein-coding genes. *The Plant Journal* 73, 179–189.
- Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A., and Zhu, J.-K. (2007). Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *The EMBO Journal* 26, 1691–1701.
- Zheng, X., Pontes, O., Zhu, J., Miki, D., Zhang, F., Li, W.-X., Iida, K., Kapoor, A., Pikaard, C.S., and Zhu, J.-K. (2008). ROS3 is an RNA-binding protein required for DNA demethylation in Arabidopsis. *Nature* 455, 1259–1262.
- Zhu, J., Kapoor, A., Sridhar, V.V., Agius, F., and Zhu, J.-K. (2007). The DNA glycosylase/lyase ROS1 functions in pruning DNA methylation patterns in Arabidopsis. *Current Biology* 17, 54–59.
- Zhu, Y., Rowley, M.J., Böhmendorfer, G., and Wierzbicki, A.T. (2013). A SWI/SNF Chromatin-Remodeling Complex Acts in Noncoding RNA-Mediated Transcriptional Silencing. *Molecular Cell* 49, 298–309.
- Zilberman, D., Cao, X., and Jacobsen, S.E. (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299, 716–719.
- Zilberman, D., Cao, X., Johansen, L.K., Xie, Z., Carrington, J.C., and Jacobsen, S.E. (2004). Role of Arabidopsis ARGONAUTE4 in RNA-Directed DNA Methylation Triggered by Inverted Repeats. *Current Biology* 14, 1214–1220.
- Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., and Henikoff, S. (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* 456, 125–129.
- Zong, J., Yao, X., Yin, J., Zhang, D., and Ma, H. (2009). Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: Duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene* 447, 29–39.