

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor:

Speciální chemicko-biologické obory



Jakub Trojan

Vliv chromatinu na opravu dvouvláknových zlomů DNA po štěpení CRISPR/Cas a dalších programovatelných nukleáz u rostlin

Effect of chromatin on the repair of double-strand DNA breaks after cleavage by CRISPR/Cas and other programmable nucleases in plants

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Adéla Příbylová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení

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

V Praze dne 4. 5. 2023

podpis:

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat hlavně své školitelce Mgr. Adéle Příbylové, Ph.D. a konzultantovi RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D. za rady a připomínky k mé bakalářské práci. A také bych chtěl poděkovat i všem ostatním, kteří mne při psaní práce podporovali a občas mi poradili.

Obsah

Abstrakt	1
Abstract.....	2
Seznam použitých zkratek	3
1 - Úvod.....	4
2 - Programovatelné nukleázy – mechanismy rozpoznání cílových míst a způsoby štěpení	5
2.1 - Zinc finger nucleases (ZFN).....	5
2.2 - Transcription activator-like effector nucleases (TALENs).....	5
2.3 - Clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated (CRISPR/Cas).....	6
3 - Typy oprav dvouvláknových zlomů.....	8
3.1 - Dvouvláknové zlomy a signalizace	8
3.2 - Klasické nehomologní spojování konců (cNHEJ)	9
3.3 - Homologní rekombinace (HR).....	10
3.4 - Theta-mediated end joining (TMEJ)	13
3.5 - Single strand annealing (SSA)	15
4 - Vliv chromatinu na aktivitu programovatelných nukleáz	16
4.1 - ZFNs v chromatinovém kontextu.....	16
4.2 - TALENs v chromatinovém kontextu	17
4.3 - CRISPR/Cas v chromatinovém kontextu	18
5 - Opravy dvouvláknových zlomů ve vztahu ke stavu chromatinu	21
5.1 - Regulace chromatinu během oprav dvouvláknových zlomů.....	21
5.2 - Vliv chromatinového kontextu na opravy	25
Závěr.....	26
Seznam použité literatury	26

Abstrakt

Rostliny mají velkou odolnost vůči ionizujícímu záření i díky kvalitnímu opravnému aparátu na opravu dvouvláknových zlomů. Dvouvláknové zlomy jsou v rostlinách opravovány čtyřmi hlavními drahami. Nejčastěji probíhá rychlá oprava pomocí nehomologního spojování konců (NHEJ), spojující konce DNA bez většího zpracování. Přesnější, zato pomalejší a složitější, je oprava prostřednictvím homologní rekombinace (HR) využívající k opravě dlouhé úseky homologního řetězce DNA. Využívaná je přednostně v oblasti aktivních genů během S a G2 fáze buněčného cyklu. Opravy probíhají dále skrze Theta zprostředkované spojování konců (TMEJ) a single strand annealing (SSA). Obě tyto dráhy jsou řízené kratší homologii mezi konci DNA vytvořenými dvouvláknovým zlomem. Často opomíjenou součástí oprav je i překonávání represivních vlastností chromatinu, který chrání genom před poškozením a přístupem nukleáz, ale zároveň brání i přístupu opravných proteinů. Tato práce shrnuje dosavadní znalosti o opravách DNA u rostlin a vlivu chromatinu ne pouze na ně, ale i na aktivitu programovatelných nukleáz využívaných v genomovém inženýrství, jako jsou zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALEN) a clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated (CRISPR/Cas).

Klíčová slova: chromatin, CRISPR/Cas, dvouvláknový zlom, HR, NHEJ, oprava DNA, SSA, TALEN, TMEJ, ZNF

Abstract

Plants are highly resistant to ionizing radiation, also thanks to a high-quality repair system for repairing double-stranded breaks. Double-strand breaks in plants are repaired by four repair pathways. Most often, double-strand breaks are repaired by non-homologous end joining (NHEJ), which joins the broken ends without further processing. More accurate but slower and more complex is repair through homologous recombination (HR), which repairs the break using a homologous sequence. HR repair takes place preferentially in a region with active transcription and during the S and G2 phases of the cell cycle. Alternatively, repair further proceeds through single-strand annealing (SSA) or Theta mediated end joining (TMEJ). Both pathways are based on short homology between the overlapping ends of the double-strand break. An often neglected part of repairs is the overcoming of repressive chromatin, which protects the genome from DNA damage and prevents access of nucleases but also acts as a barrier for repair proteins. This work summarizes the current knowledge about DNA repair in plants. Furthermore, describe the influence of chromatin not only on the repair but also on the activity of programmable nucleases used in genetic engineering, such as zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs) and clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated (CRISPR/Cas).

Keywords: chromatin, double strand break, CRISPR/Cas, DNA repair, HR, NHEJ, SSA, TALENs, TMEJ, ZNFs

Seznam použitých zkratek

ADCP1	AGENET DOMAIN (AGD)-CONTAINING P1
AGO2	ARGONAUTE 2
Alt-EJ	Alternative end joining
ARP5	ACTIN-RELATED PROTEIN 5
ASF1	ANTI- SILENCING FUNCTION 1
ATM	ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED
ATR	ATAXIA TELANGIECTASIA-MUTATED AND RAD3-RELATED
ATRIP	ATR interacting protein homologue
BRCA2	BREAST CANCER 2
CAF1	Chromatin Assembly Factor 1
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats RNA
dHJ	Double holiday junction
ERCC1	Excision Repair Cross Complementation group 1 homologue
EXO1	Exonuclease 1
FANCM	FANCONI ANEMIA COMPLEMENTATION GROUP M
HAM1/2	HISTONE ACETYLTRANSFERASE OF THE MYST FAMILY 1/2
HP1	Heterochromatin Protein 1
HR	Homologous recombination
INO80	INO80 (Inositol Requiring 80) ORTHOLOG
MMEJ	Microhomology-mediated end joining
MRN	Komplex MRE11, NBS1 a RAD50
MRX	komplex Mre11, Rad50 a Xrs2
MRE11	MEIOTIC RECOMBINATION 11
MSH2/3	MUTS HOMOLOG 2
NAP	NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN
NBS1	NIJMEGEN BREAKAGE SYNDROME 1
cNHEJ	Classical non-homologous end joining
NRP	NAP1-RELATED PROTEIN
OPEN	Oligomerized pool engineering
PAM	Protospacer adjucent motif
PARP1	POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE 1
RAD1/10/50/51/52/54/59	Radiation insensitive 1/10/50/51/52/54/59 homolog
RdDM	RNA-directed DNA methylation
RECQ4	ATP-dependent DNA helicase Q4
RPA	REPLICATION PROTEIN A
RVD	Repeat-variable di-residue
SDSA	Synthesis dependent strand annealing
SNM1	SENSITIVE TO NITROGEN MUSTARD 1
SOG1	SUPPRESSOR OF GAMMA RADIATION 1
SSA	Single strand annealing
SUVH	SU(VAR)3-9 homologue
SWR1	SWI2/SNF2-Related 1
TALEN	Transcription activator-like effector nucleases
TMEJ	Theta mediated end joining
TOP3 α	TOPOISOMERASE 3 ALPHA
tracrRNA	Trans activating crRNA
XRCC4	HOMOLOG OF X-RAY REPAIR CROSS COMPLEMENTING 4
Xrs2	X-Ray Sensitive 2
ZFN	Zinc finger nuclease

1 - Úvod

Rostliny jsou sesilní organismy, jsou neustále vystaveny biotickým i abiotickým stresům a nemohou před nimi „utéct“. Z povahy fotosyntetizujícího autotrofa, jsou rostliny i v ideálních podmínkách vystaveny záření včetně ionizujícího, jež ohrožuje jejich genom. Ionizující záření může v DNA způsobovat dvouvláknové zlomy, které vedou od drobných mutací přes ztráty genů až v nejhrošším případě ke smrti (Cannan and Pederson, 2016). Sekundárně může záření vést k tvorbě reaktivních forem kyslíku, které mimo jiného poškození dávají vzniknout jednovláknovým přerušením. Z nich pak mohou během replikace opět vznikat dvouvláknové zlomy (Cortés-Ledesma and Aguilera, 2006). Preventivní ochranou proti těmto hrozbám je ochrana genomu pomocí kompakce DNA. Jak se totiž ukazuje, kompaktní heterochromatin zvyšuje odolnost rostlin proti záření (Falk, Lukášová and Kozubek, 2008).

Pokud však k vzniku dvouvláknového zlomu dojde, musí také existovat rychlý a efektivní způsob, jak zlom opravit. Mechanismů, jak spojit kusy poškozené DNA zpět dohromady, je hned několik a mezi eukaryotickými organismy jsou poměrně konzervované (Spampinato, 2017). Při opravách však může docházet k nepřesnostem, které jsou tak zdrojem mutagenese (Heidenreich, 2003). Opravy jsou ovlivněné i stavem chromatinu v místě zlomu, protože kondenzovaný chromatin kromě ochrany DNA před zářením současně brání přístupu opravných proteinů (Mansidor and Risca, 2022). Opravné mechanismy tedy musí mít nástroje, umožňující jim represivní stav chromatinu překonat.

Ač se rostliny tvorbě zlomů v DNA brání, jejich cílená tvorba je využívána v genovém inženýrství. Při cílené mutagenesi se využívá nepřesnosti oprav těchto dvouvláknových zlomů, kdy během opravy dojde např. k drobné inzerci či delecii, a to způsobí posunutí čtecího rámce. Cílené tvorby dvouvláknových zlomů je dále využíváno i při vládání transgenů do konkrétního místa genomu, či v dalších metodách genového inženýrství. Využívá se k tomu především programovatelných endonukleáz, jako jsou ZFN (Zinc finger nucleases), TALEN (Transcription activator-like effector nucleases) nebo CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated) systémy. ZFN a TALEN fungující na bázi proteinu s DNA vazebnou doménou spojeného s nukleázovou doménou. Kdežto CRISPR/Cas je založen na nukleáze nesoucí RNA, která je komplementární k cílové sekvenci. Jejich efektivita může být ovlivněna i stavem

chromatinu, který jim může bránit v přístupu k DNA, obdobně jako je tomu u opravných proteinů. Přestože jsou programovatelné nukleázy již mnoho let aktivně využívány a zkoumány, jen velmi málo pozornosti bylo u rostlin věnováno vlivu uspořádání chromatinu na jejich efektivitu a opravu jimi způsobených zlomů.

2 - Programovatelné nukleázy – mechanismy rozpoznání cílových míst a způsoby štěpení

2.1 - Zinc finger nucleases (ZFN)

ZFN jsou založeny na zinkových prstech, to jsou běžné DNA vazebné motivy, $\alpha\beta$ s koordinačně vázaným zinkem, které se vážou do velkého žlábků DNA, kde rozeznávají trinukleotidové sekvence (Grover *et al.*, 2010). Zinkové prsty se vyskytují v mnoha DNA vazebných proteinech, jako jsou například transkripční faktory. Spojením DNA vazebné schopnosti zinkových prstů s restriční endonukleázou FokI vznikl účinný nástroj genového inženýrství ke specifické tvorbě dvouvláknových zlomů (Kim, Cha and Chandrasegaran, 1996).

ZFN obsahují zpravidla 3-6 zinkových prstů a FokI nukleázu. ZFN tak dokáže rozeznávat sekvenci 9-18 nukleotidů. Je tedy potřeba, aby se sešly dvě ZFN v jednom místě proti sobě, neboť endonukleáza FokI funguje jako dimer (Bitinaite *et al.*, 1998). Pokud dojde k dimerizaci, FokI endonukleázy štěpí každá jedno vlákno DNA, čímž dochází ke vzniku nejčastěji čtyřnukleotidových 5' přesahujících konců. Délka přesahů může být ovlivněna délkou linkeru, kterým je spojena FokI doména se zinkovými prsty (Smith, 2000). Nevýhodou ZFN je však jejich relativně časté off targety a relativně nízká účinnost (Chen *et al.*, 2013; Khalil, 2020).

2.2 - Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)

System je odvozen od bakteriálního (*Xanthomonas*) proteinu TALE (Transcription activator-like effector) s DNA vazebnou aktivitou. Bakterie jej využívají k manipulaci transkripce rostlinného hostitele, prostřednictvím jeho navázání do promotoru (Xue *et al.*, 2021). TALE se skládá z 13-28 setů tandemových repetice po 33-35 aminokyselinách, přičemž poslední repetice má jen 20 aminokyselin (Cermak *et al.*, 2011). Na 12. a 13. pozici obsahují dvojici variabilních aminokyselinových zbytků (RVD, repeat variable di-residues). RVD mají různou afinitu k jednotlivým bazím (Boch *et al.*, 2009).

TALEN byly vytvořeny přidáním FokI nukleázy na C konec TALE proteinu. TALEN se používají jako dimery, kde dva TALEN proti sobě, každý na jedno vlákno, s tím že mezi nimi zůstává mezera zhruba 15-20 nukleotidů. V této mezeře poté štěpí FokI nukleázy každá jedno vlákno DNA a vzniká tak dvouvláknový zlom. Kombinací repetice s odlišnými RVD lze modulovat specifitu TALEN k DNA. TALEN mají relativně vysokou specifitu a relativně malé množství off targetů (štěpení mimo cílovou oblast), zatímco jejich nevýhodou je jejich velikost a problémy se vkládáním vektory do buněk, kvůli repeticím (Gupta and Musunuru, 2014; Khalil, 2020).

2.3 - Clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated (CRISPR/Cas)

CRISPR/Cas systém, poprvé objeven u *E. coli* v roce 1987 (Ishino *et al.*, 1987), slouží u prokaryot jako protivirová obrana, pokud dojde k reinfekci stejným patogenem. Patogenní DNA je štěpena díky nukleázám řízeným komplementárními RNA, tvořenou z částí patogenní DNA integrované během předchozí infekce. Fungování systému můžeme demonstrovat na bakterii *Streptococcus pyogenes*.

2.3.1 - CRISPR/Cas v bakteriích

Streptococcus má hned 2 CRISPR/Cas systémy, a to I-C a II-A. K integraci cizorodé DNA slouží proteiny Cas1 a Cas2, případně v systému I-C je diskutována i účast Cas4 (Lee *et al.*, 2018). A v případě systému II-A se integrace účastní navíc Csn2 (Ka *et al.*, 2018). Krátký úsek cizorodé DNA (spacer) je zainkorporován mezi krátké palindromické repetice (CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Z těchto spacerů se poté tvoří crRNA s 20 nukleotidovou oblastí komplementární k cílové sekvenci. V systému II-A je potřeba ještě trans-activating crRNA (tracrRNA), jejíž část pak spolu s částí crRNA tvoří duplex (guide RNA; Deltcheva *et al.*, 2011). V dalším kroku dochází k hledání DNA párující s crRNA, tedy homologní s původním úsekem cizorodé DNA (protospacerem; (Jiang *et al.*, 2015)).

Součástí cílové sekvence je i 3-5 nukleotidová tzv. protospacer adjacent motif (PAM) sekvence. Ta slouží k odlišení vlastní a cizorodé DNA, aby nedošlo ke štěpení ve vlastním genomu (Gleditsch *et al.*, 2019), protože PAM sekvence by se v bakteriálním genomu neměla téměř vyskytovat. V systému I-C rozpoznání závisí na Cascade komplexu skládajícího se z proteinů Cas5c, Cas7 a Cas8c (Hochstrasser *et al.*, 2016). Po spárování

DNA s crRNA je na místo atrahována nukleáza Cas3, ta rozvolňuje DNA a štěpí vlákno naproti Cascade komplexu, přesný mechanismus je však nejistý (Nimkar and Anand, 2020). V systému II-A je hledání zprostředkováno komplexem nukleázy Cas9 a duplexem crRNA/tracrRNA. Hledaná PAM sekvence pro Cas9 je 3'-NGG-5' (N je jakýkoli deoxynukleotid) a Cas9 k ní má afinitu díky dvěma doménám s argininem, které interagují s guanosiny (Anders *et al.*, 2014). Poté, co Cas9 nasedne na DNA a rozpozná PAM, indukuje lokální rozvolnění DNA. A v případě komplementarity dochází k invazi guide RNA (crRNA) vlákna a tvorbě duplexu s vláknem bez PAM sekvence. Pro spuštění nukleázové aktivity je třeba komplementarity minimálně 13 bazí od PAM sekvence (Jinek *et al.*, 2012). RuvC doména štěpí vlákno s PAM sekvencí 3 nukleotidy za jejím koncem a HNH doména štěpí vlákno párující s guide RNA na pozici odpovídající druhému vlákně a vzniká tak dvouvláknový zlom s tupými konci (Gasiunas *et al.*, 2012).

2.3.2 - CRISPR/Cas v genovém inženýrství

V genovém inženýrství se využívá nejčastěji systému II. Například právě ze *Streptococcus pyogenes*, modifikovaného vytvořením tzv. single guide RNA. Tedy fúze crRNA s tracrRNA a vznik chimerické RNA (Jinek *et al.*, 2012). Během štěpení CRISPR/Cas9 může docházet k tvorbě tupých i přesahujících konců, nejčastěji s 1 přesahujícím nukleotidem na 5' konci (Jinek *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Příbylová *et al.*, 2022). Systém má mnoho využití jako je například knockout genů pomocí bodových mutací, kdy dochází ke změně čtecího rámce. Či vkládání genů a tvorba transgenních organismů, kdy je cílová DNA rozštěpena a vzniklý dvouvláknový zlom je opraven pomocí do buňky vneseného homologního úseku DNA. Tento homologní úsek se nachází na krajích dvouvláknového zlomu a současně na hranicích genu našeho zájmu (oprava je založena na podobném principu jako je oprava pomocí HR, nebo případně pomocí TMEJ – obě dráhy popsány v kapitole 3; (van Kregten *et al.*, 2016; Que *et al.*, 2019)).

Dále existují i modifikované varianty Cas9. Například Cas9 nikáza (Cas9n), jež má vymutovanou jednu nukleázovou doménu a štěpí tak pouze jedno vlákno DNA. Při použití dvojice Cas9n mířených blízko sebe na opačná vlákna dochází k tvorbě dvouvláknových zlomů, s minimalizovaným množstvím off-targetů, jelikož se k tvorbě dvouvláknového zlomu musí sejít dvě Cas9n. V případě off-targetů totiž místo dvouvláknového zlomu vznikají jen jednovláknová přerušení, která jsou opravována na rozdíl od dvouvláknových zlomů bezchybně (Ran *et al.*, 2013).

Další modifikovaná varianta má deaktivované obě nukleázové domény, tzv. dead Cas9 (dCas9). Kvůli absenci nukleázové aktivity, se dCas9 po navázání dlouho drží v cílové oblasti, neboť disociace Cas9 z vlákna je v přirozeném stavu závislá na rozštěpení vlákna. Může být využita například k inhibici transkripce (CRISPRi), pokud je fúzována s transkripčním represorem, nebo pokud je mířena do oblasti promotoru, kde brání nasednutí transkripčních aktivátorů (Larson *et al.*, 2013). Obdobně může dCas9 sloužit i k aktivaci transkripce (CRISPRa), pokud nese transaktivátory, nebo brání nasednutí represorů (Ding *et al.*, 2022). Dále může být fúzován s funkční nukleázou, podobně jako v případě TALENs a ZFN. A pak může štěpit DNA mimo rozpoznávanou sekvenci. Nebo může sloužit taky jen jako DNA sonda, pokud k němu přidáme reportérový protein. Možnosti využití modifikovaných a různě fúzovaných variant jsou obrovské. (Karlson *et al.*, 2021)

Kromě Cas9 se využívají i jiné Cas proteiny. Například Cas12, jehož odlišností je výhradní tvorba přesahujících konců a využívání PAM sekvence založené na oligo T nukleotidech, namísto G nukleotidů jako je tomu u Cas9. Dále na rozdíl od Cas9 využívá k navádění v přirozeném stavu jen jednu RNA. Má také vyšší specifitu než Cas9, neboť pro štěpení vyžaduje párování alespoň 17 nukleotidů mezi crRNA a cílovou DNA. Hlavní výhody Cas12 tedy plynou z použití v případech, kdy leží cílená sekvence v G chudé oblasti, či v případech kdy je kladen důraz na tvorbu lepivých konců (Qiu, Zhou and Liu, 2022).

3 - Typy oprav dvouvláknových zlomů

Po shrnutí dnes často používaných programovatelných nukleáz a jejich způsobu tvorby dvouvláknových zlomů v předchzí kapitole, bude dále následovat popis rostlinných opravných mechanismů, sloužících k opravě zmiňovaných dvouvláknových zlomů. Zmíněno bude rozpoznávání zlomů spolu se signalizací a dále hlavní opravné dráhy dvouvláknových zlomů, jako jsou nehomologní spojování.

3.1 - Dvouvláknové zlomy a signalizace

Aby mohlo dojít k opravě poškozené DNA, musí být poškození nejprve nalezeno. Všeobecné mechanismy signalizace a oprav dvouvláknových zlomů jsou mezi eukaryotními organismy konzervované (Spampinato, 2017), avšak stále jsou zde odlišnosti v některých drahách. Po vytvoření dvouvláknových zlomů bylo u *Arabidopsis thaliana* v místě poškození nejprve pozorováno nabožení POLY (ADP-RIBOSE) POLYMERASE1 proteinu (PARP1) nebo heterodimeru KU70/80. Pravděpodobnost výskytu jednoho či

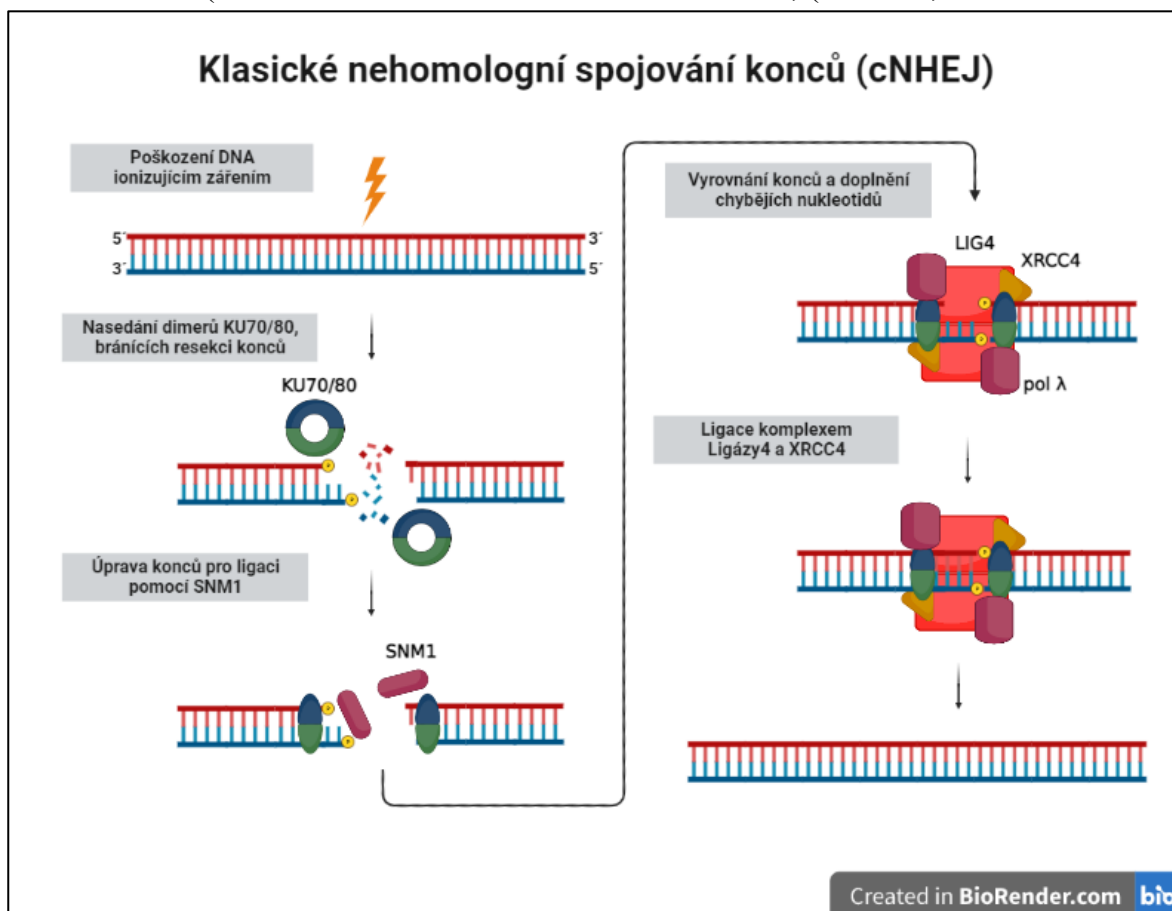
druhého v místě zlomu závisí na fázi buněčného cyklu (Yang *et al.*, 2018). Pokud se v místě zlomů nalézá PARP1, tak je tam dále naváděn MRN komplex (složen z MEIOTIC RECOMBINATION 11 (MRE11), RAD50 (Radiation insensitive 50 homologue), NIJMEGEN BREAKAGE SYNDROME 1 (NBS1)). Ten následně aktivuje ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED (ATM), jednu z ústředních proteinkináz účastnících se signalizace poškozené DNA (Lee and Paull, 2004). Druhá ústřední proteinkináza ATAXIA-TELANGIECTASIA-MUTATED AND RAD3-RELATED (ATR) je aktivována interakcí ATRIP (ATR interacting protein) s replikačním proteinem A (RPA) navázaným na ssDNA (Zou and Elledge, 2003). Obě aktivované proteinkinázy se účastní signální kaskády, jež prostřednictvím super regulátoru SOG1 (SUPPRESSOR OF GAMMA RADIATION) ovlivňuje expresi genů pro opravu DNA (Yoshiyama *et al.*, 2009). Dále SOG1 prostřednictvím WEE1 způsobuje pozastavení buněčného cyklu (De Schutter *et al.*, 2007). Kinázy také fosforylují histon H2A.X, jímž je pak značeno okolí dvouvláknových zlomů (Friesner *et al.*, 2005). Označení okolí zlomů, může umožňovat amplifikaci signálu usnadňující přístup opravných proteinů, či může přispět k určení konkrétní opravné dráhy.

3.2 - Klasické nehomologní spojování konců (cNHEJ)

K opravě dvouvláknových zlomů pomocí klasického nehomologního spojování konců (cNHEJ, classical non-homology end-joining) dochází, především pokud není v jádře dostupný donor homologní DNA, tedy pokud se jedná o G1 fázi, potažmo o počátek S fáze buněčného cyklu, kdy ještě není vytvořena sesterská chromatida. Dále tento typ opravy dominuje v nedělících se buňkách, v G0 fázi (Lieber, 1999). Oprava pomocí cNHEJ generuje více chyb než pomocí homologní rekombinace (HR), výhodou je ovšem rychlost, s jakou dokáže cNHEJ dvouvláknový zlom opravit. Celý mechanismus je poměrně dobře popsán u savců a kvasinek, avšak jeho popis u rostlin dosud pokulhává. Dráha je poměrně konzervovaná, ale u rostlin doposud nebyly nalezeny homology k některým proteinům účastnícím se cNHEJ u savců a kvasinek. Například u kvetoucích rostlin nebyly nalezeny homology DNA-dependentních proteinkináz (Chen *et al.*, 2021).

Mechanismus s rostlinnými homology pak vypadá zřejmě následovně (Viz. Obrázek 1). Na odhalené konce DNA nasedá heterodimer KU70/80, jenž pak brání resekcii konců (štěpení 5' koncového vlákna a tím tvorba 3' přesahu; (Kazda *et al.*, 2012)) a navádí k místu zlomu další proteiny. V případě dvouvláknových zlomů způsobených zářením může docházet kromě vzniku zlomu i k dalšímu poškození DNA jako je poškození bazí. Také po rozlomení

dochází k přenosu fosfátu z 5' konce na 3' konec. Takové konce nemohou být ligázou spojeny dohromady a musí nejprve dojít k jejich úpravě. U rostlin má úpravu konců na starosti SNM1 (SENSITIVE TO NITROGEN MUSTARD 1; (Molinier, Stamm and Hohn,



Obrázek 1 - Schéma NHEJ dráhy

2004; Johnson, Hellens and Love, 2011)), rostlinný homolog lidského proteinu Artemis, jež má na starosti zpracování konců při cNHEJ u lidí (Chang, Watanabe and Lieber, 2015). Opravy se dále účastní DNA polymeráza λ (Roy *et al.*, 2013) a u lidí i polymeráza μ , která se však u rostlin nevyskytuje. Komplex ligázy 4 a XRCC4 (HOMOLOG OF X-RAY REPAIR CROSS COMPLEMENTING 4) nakonec liguje konce DNA dohromady a tím zlom je opraven (West *et al.*, 2000).

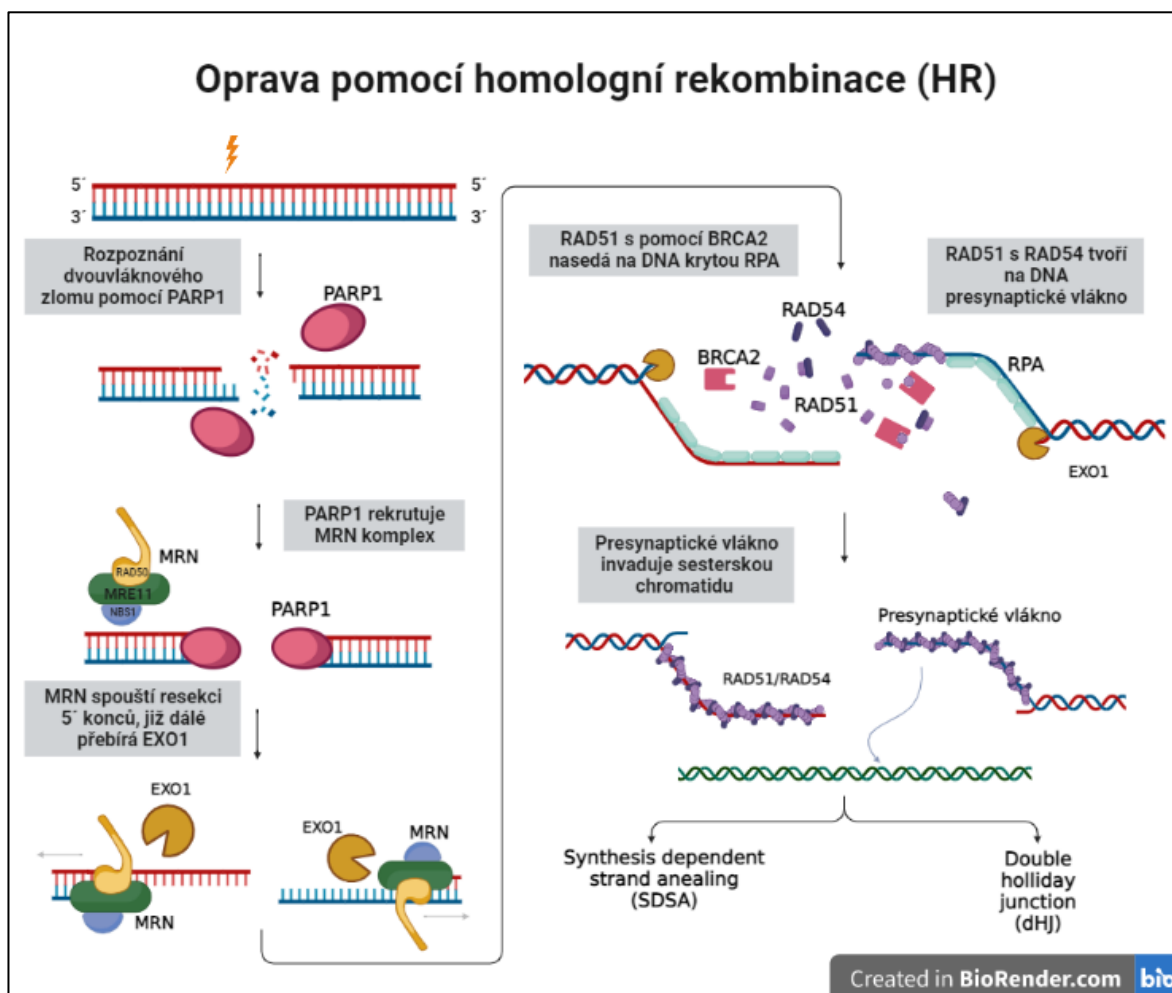
3.3 - Homologní rekombinace (HR)

Oprava dvouvláknových zlomů pomocí homologní rekombinace spočívá v opravě poškozené DNA podle jiného, ideálně nepoškozeného, homologního úseku DNA. Jako donor slouží nejčastěji sesterská chromatida a buňka tedy musí být již po replikaci (v části S a G2 fáze). Tato oprava je považována za bezchybnou a je především důležitá při opravách

dvouvláknových zlomů v místech esenciálních genů. Mimo to umožňuje crossing-over při meióze (Amunugama and Fishel, 2012). Homologní rekombinace je ovšem relativně pomalý a složitě regulovaný proces.

3.3.1 - Iniciacie homologní rekombinace

PARP1 kompetuje o volné konce DNA s komplexem KU70/80. V S a G2 fázi může PARP1 PARylovat (navěšení velké množství ADP-ribózy) KU70/80, tím dochází k jeho odstranění a následně jeho nahrazení PARP1 (Yang *et al.*, 2018). Pokud se na místo zlomu dostane PARP1 protein, tak do místa zlomu rekrutuje MRN komplex (složen z MRE11, RAD50 a NBS1). MRN komplex, respektive MRE11 v součinnosti s exonukleázou 1 (EXO 1) vytváří svou 5'→3' exonukleázovou aktivitou dlouhé 3' přesahující konce. Na odhalené vlákno se díky své afinitě k ssDNA váže RPA, jenž pak vlákno stabilizuje a chrání. U savců se na ochraně ssDNA podílí i RNA polymeráza III tvorbou komplementárního transkriptu (Liu *et*

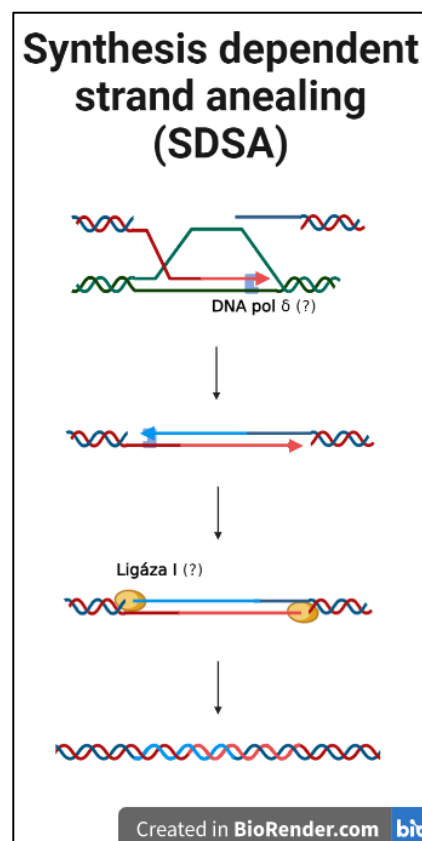


Obrázek 2 - počátek HR: rozpoznání zlomů; resekce konců; formování presynaptického vlákna; invaze presynaptického vlákna do homologního úseku sesterské chromatidy

al., 2021). Na místo zlomu je přiváděn protein RAD51 metyltransferázou SUVVR2 (Liu *et al.*, 2022). Tento proces je zprostředkován LLPS (liquid-liquid phase separation), jedná se nově navržený mechanismus vzájemných interakcí na molekulární úrovni (Peng, Hsu and Wu, 2021). RAD51 interaguje s proteinem BRCA2 (BREAST CANCER 2), který mění jeho konformaci a vazebnou aktivitu k DNA, a tím mu umožňuje nasedat na komplex RPA-DNA a tvořit presynaptické vlákno (viz obrázek 2; (Davies *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2020)). Na presynaptické vlákno nasedá RAD54, díky interakci s navázaným RAD51 (Mazin *et al.*, 2000; Hirakawa *et al.*, 2017). Poté byl pozorován přesun komplexu presynaptického vlákna, pomocí značeného RAD54, směrem k jaderné periférii (Meschichi *et al.*, 2022), tam RAD54 spolu s RAD51 iniciuje hledání homologního úseku a následnou invazi 3' přesahujícího vlákna do homologního úseku DNA (Tavares *et al.*, 2019). Dále může oprava pomocí homologní rekombinace u rostlin pokračovat dvěma cestami.

3.3.2 - Synthesis-dependent strand annealing (SDSA)

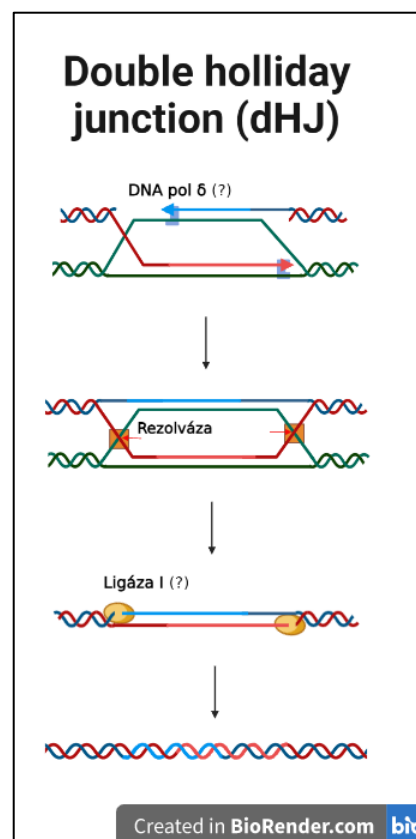
Jednou z variant homologní rekombinace je SDSA (Synthesis-dependent strand annealing; viz obrázek 3). Dochází při ní k zachycení a invazi jednoho 3' přesahujícího vlákna poškozené DNA do homologního úseku donora DNA, tím vzniká jednoduchý D-loop. Po anealingu polymeráza prodlužuje invadující vlákno DNA dle homologního úseku. Prodlužování konců se pravděpodobně účastní DNA polymeráza δ (Maloisel, Fabre and Gangloff, 2008), ale diskutována je též účast polymerázy ϵ , případně i role polymerázy α (Pursell and Kunkel, 2008; Prindle and Loeb, 2012). Po prodloužení invadujícího vlákna dochází k jeho uvolnění z homologního úseku. A dochází k opětovnému párování s druhým původním vláknem, kde dochází dokončení prvního vlákna a opravě druhého vlákna podle prvního, opraveného podle homologního úseku (viz obrázek 3). Nakonec dochází k dosyntetizování případných mezer a ligaci. Ligace se pravděpodobně účastní ligáza I, u níž bylo ukázáno, že její absence způsobuje zvýšenou citlivost k induktorům dvouvláknových zlomů (Waterworth *et al.*, 2009).



Obrázek 3 – schéma SDSA: vznik jednoduchého D-loop; prodlužování invadujícího vlákna podle homologního úseku; párování konců původního vlákna; další prodloužení vláken; ligace

3.3.3 - Double Holliday junction (dHJ)

Další variantou homologní rekombinace je vznik dvojité Hollidayovy struktury (dHJ, double Holliday junction; viz obrázek 4). Stejně jako v případě SDSA dochází k zachycení 3' přesahujícího vlákna poškozené DNA a jeho invazi do homologního úseku DNA. Poté však dochází k zachycení a invazi i 3' přesahujícího vlákna z druhého konce DNA, a tím vzniká dvojitý D-loop. Obě chybějící vlákna jsou prodloužena podle donora homologie, ovšem dochází ke vzniku dvojité Hollidayovy struktury. Tu je potřeba poté přerušit, aby došlo opět k rozdělení na samostatné řetězce DNA. Avšak během oprav v somatických buňkách je třeba bránit vzniku crossing-overu, k němuž by mohlo dojít při nesprávném rozpojení Hollidayových struktur, aby nedocházelo k chromozomovým aberacím. Vzniku crossing-overu brání hned několik mechanismů. Jednotlivé mechanismy využívají jmenovitě rezolvázové schopnosti topomizomerázy 3 alfa (TOP3 α) a helikázy RECQ4 (ATP-dependent DNA helicase Q4), či FANCM (FANCONI ANEMIA COMPLEMENTATION GROUP M) helikáz (Séguéla-Arnaud *et al.*, 2015).



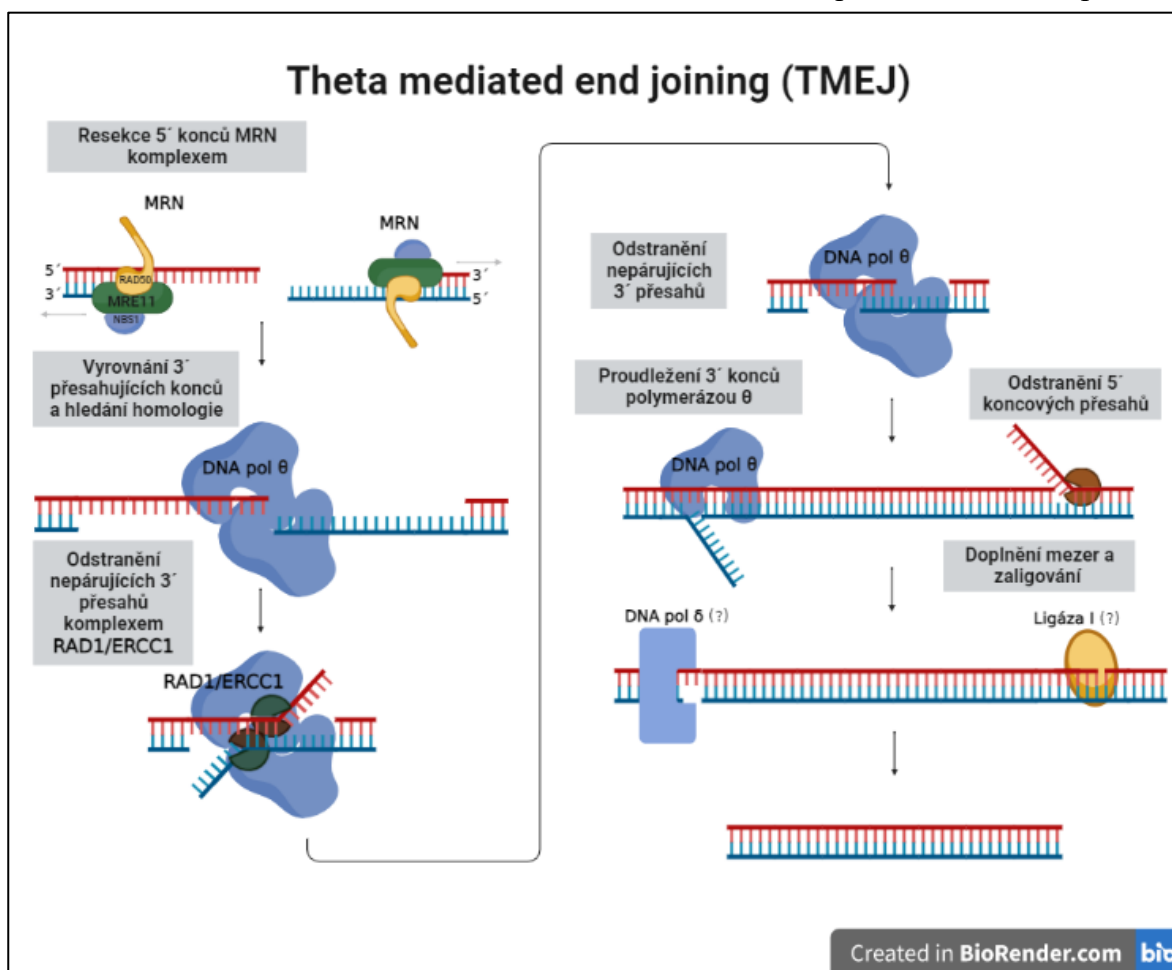
Obrázek 4 – Schéma dHJ: vznik dvojitého D-loop a prodloužování obou vláken podle homologního úseku; vznik dvojité Hollidayovy struktury a její následné štěpení resolvázami (TOP3 α a RECQ4, či FANCM); ligáze

3.4 - Theta-mediated end joining (TMEJ)

Další možností pro buňku, jak opravit dvouvláknový zlom, je pomocí DNA polymerázy θ (TMEJ, Theta mediated end joining) využívající mikrohomologii v oblasti přesahujících konců DNA (viz obrázek 5). Tuto cestu můžeme v literatuře také najít pod označením MMEJ (microhomology mediated end joining), či Alt-EJ (alternative end joining). Tento typ opravy nijak výrazně nekompetuje s ostatními typy a slouží tedy především jako záložní mechanismus, když selže oprava pomocí homologní rekombinace, či NHEJ (Wyatt *et al.*, 2016). Tento typ opravy je opět popsán především u lidských buněk a z toho důvodu se

následující popis týká lidské polymerázy θ . Mechanismus se ale vyskytuje i u rostlin (van Kregten *et al.*, 2016).

Pro správnou funkci vyžaduje polymeráza θ , aby došlo k resekci konců DNA. Tu obstarává MRN komplex. V tomto kroku může tedy oprava, započatá pomocí homologní rekombinace, přepnout na opravu pomocí TMEJ. Na rozdíl od homologní rekombinace je resekce nezávislá na Exo1, neboť v TMEJ dráze stačí vznik pouze kratších 3' přesahů



Obrázek 5 – Schéma TMEJ dráhy od resekce po ligaci

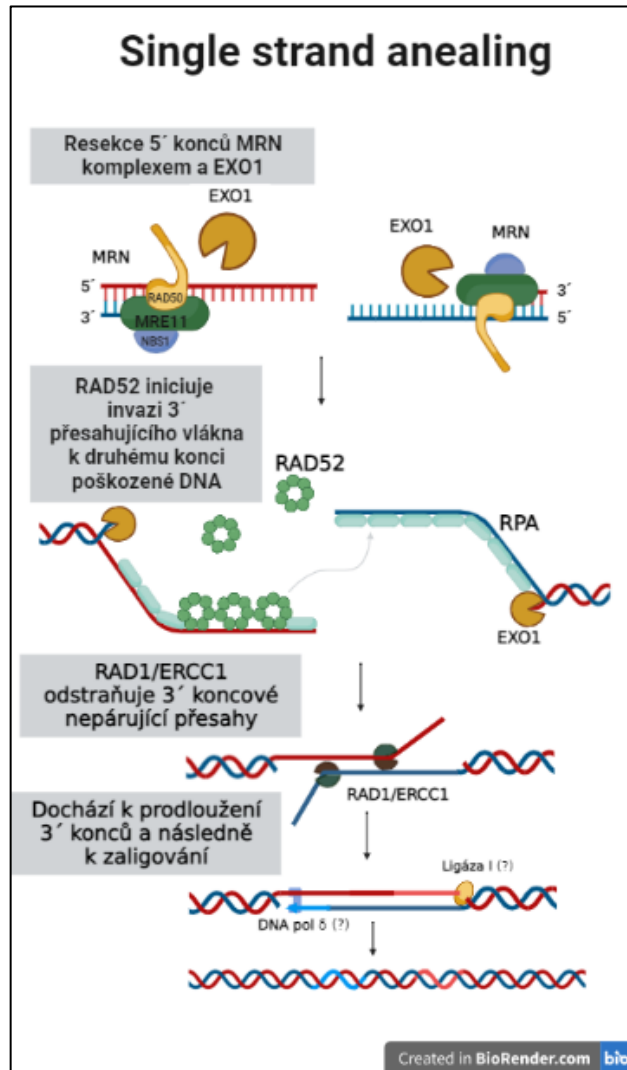
(Truong *et al.*, 2013). Ke zlomu je rekrutována polymeráza θ . Jejího navádění se dle studie na savcích pravděpodobně účastní PARP1 (Mateos-Gomez *et al.*, 2015). Polymeráza θ indukuje hledání homologie na přesahujících 3' koncích (Kent *et al.*, 2015). Homologní úsek musí mít minimálně 2 báze, ideálně však 4 v případě lidské polymerázy. Po spárování mohou vznikat nepárující 3' koncové přesahy, takzvané 3' „flaps“, které výrazně snižují efektivitu polymerázy při prodlužování vlákna (He and Yang, 2018). U kvasinek jsou tyto 3' koncové přesahy odstraňovány komplexem Rad1/Rad10 (Karumbati *et al.*, 2003). Jejich

homology u rostlin jsou ERCC1 (Excision Repair Cross Complementation group 1 homologue) a RAD1 (Mahapatra and Roy, 2020). Kromě delecí vzniklých odstraňováním těchto 3' přesahů, je problémem i vysoká chybovost polymerázy θ . V případě delších úseků můžeme spekulovat o kooperaci polymerázy θ s dalšími eukaryotickými polymerázami, jako je tomu u kvasinek a savců (Meyer, Fu and Heyer, 2015; Layer *et al.*, 2020). Díky helikázové aktivitě polymerázy θ může docházet k rozvolnění DNA před prodlužujícím se vláknem (Kent *et al.*, 2015; Ozdemir *et al.*, 2018) a vzniku nepárujících 5' přesahů z původních vláken. Pokud dojde k jejich vytvoření, tak jsou tyto nepárující, 5' koncové, přesahy z DNA opět odstraněny. Tohoto odstraňování by se mohly účastnit proteiny GEN1 a SEND1, které kromě své resolvázové aktivity umí i velmi dobře vyštěpovat nepárující 5' koncové přesahy DNA (Bauknecht and Kobbe, 2014). Případně se vyštěpování může účastnit exonukleáza FEN1, která se účastní odstraňování přesahů u savců (Mengwasser *et al.*, 2019). Vzniklé mezery po odštěpení přesahů jsou poté doplněny a dochází k ligaci. Ligáza 3, která liguje konce u savců, u rostlin chybí. Předpokládá se tedy, že u rostlin její funkci přebírá Ligáza 1, která u savců ligázu 3 zastupuje (Patterson-Fortin and D'Andrea, 2020).

3.5 - Single strand annealing (SSA)

U rostlin existuje ještě další opravná dráha založená na homologii, někdy též řazená pod HR, a to single strand annealing (Orel, Kyryk and Puchta, 2003). Stejně jako v případě klasické homologní rekombinace dochází k dlouhé resekcí konců pomocí MRN komplexu a EXO1 (Mimitou and Symington, 2008). Na rozdíl od klasických oprav dle homologní rekombinace, se však této opravě neúčastní další molekula DNA, nýbrž jako donor homologie zde slouží druhý 3' přesahující konec poškozené DNA (viz obrázek 6) obdobně jako u TMEJ. Rozlišení mezi TMEJ a SSA může mít na svědomí PARP1, má kladný vliv na opravu pomocí TMEJ a zároveň inhibuje Rad52, jenž slouží jako ústřední protein v SSA dráze (Wang *et al.*, 2021; Luedeman *et al.*, 2022).

Anealing DNA je zprostředkován u kvasinek interakcí proteinů Rad52 a Rad59 s RPA na odhalených 3' koncích poškozené DNA (Davis, 2003). Rad59 se však u vyšších eukaryot nevyskytuje. N-terminální doména Rad52, je homologní k velké části Rad59 a stejně tak dochází i k překryvu funkcí těchto proteinů (Kagawa *et al.*, 2002). Tato N-terminální doména je konzervovaná a vyskytuje se i v rostlinách (Samach *et al.*, 2011). SSA potřebuje homologní úsek o délce mezi 29 až zhruba 400 nukleotidy (Sugawara, Ira and Haber, 2000). Po anealingu dochází k odstranění 3' přesahujících nepárových zbytků, stejnou drahou jako u TMEJ. Tedy s využitím proteinů Rad1 a Rad10 a navíc s pomocí proteinů Msh2 a Msh3 (Sugawara *et al.*, 1997), respektive



Obrázek 6 – Schéma SSA dráhy od resekce konců po ligaci

ERCC1, RAD1, MSH2 a MSH3 u rostlin. Přestože není známo, která polymeráza se účastní doplňování mezer, tak diskutovány jsou polymeráza δ podobně jako při homologní rekombinaci, nebo translační polymeráza ζ (Gallagher *et al.*, 2020). V případě parazitického prvka *Leishmania* se například SSA účastní polymeráza θ , stejně jako v TMEJ. Stejně jako doplňování mezer je sporná i ligace. Diskutuje se účast Ligázy I, podobně jako u TMEJ či homologní rekombinace (Vu *et al.*, 2022).

4 - Vliv chromatinu na aktivitu programovatelných nukleáz

4.1 - ZFNs v chromatinovém kontextu

Možný vliv uspořádání chromatinu a aktivní transkripce na štěpení pomocí ZFNs, byl zmíněn ve studii zabývající se tvorbou ZFNs pomocí OPEN (Oligomerized Pool

ENgineering), která byla provedena na lidských buněčných liniích. ZFNs byly neaktivní při cílení do netranskribovaného genu a naopak aktivní v buněčné linii s aktivní transkripcí téhož genu (Maeder *et al.*, 2008). K podobným výsledkům došli i autoři studie porovnávající stav chromatinu ve dvou virových integračních oblastech v lidských buňkách. Ve studii byla testována přístupnost lokusu AAVS1 s otevřeným chromatinem v transkripčně aktivní oblasti a lokusu CCR5 s uzavřeným chromatinem, pomocí ZFNs a virového DNA vazebného proteinu Rep78. Dle očekávání nebyly ZFNs v uzavřeném chromatinu lokusu CCR5 efektivní (van Rensburg *et al.*, 2013). Tím že ZFNs jsou založeny na zinkových prstech obdobně jako velké množství transkripčních faktorů, můžeme diskutovat o jejich obdobném přístupu k DNA. Vzhledem k tomu, že éra využití ZFNs je již na ústupu kvůli objevům účinnějších nástrojů genového inženýrství, tak se pozornost vědců již na vliv uspořádání chromatinu na jejich funkci nesoustředí.

4.2 - TALENs v chromatinovém kontextu

U TALENs byl pozorován vliv různých stavů chromatinu na efektivitu štěpení, podobně jako u ZFNs. Ve studii na porovnání ZFNs a TALENs probíhající na zárodečné linii a embryích *Danio rerio* byla u TALENs ukázána vyšší úspěšnost mutageneze, a i vyšší množství signifikantně mutagenních nukleáz v případě cílení do otevřeného chromatinu. V případě heterochromatinu byl rozdíl v efektivitě obou nukleáz ještě prohlouben (Chen *et al.*, 2013). Ve studii na lidských buňkách byl pozorován vliv uspořádání chromatinu na účinnost TALENs také. Efektivita štěpení TALENs mezi uzavřeným heterochromatinem a otevřeným euchromatinem se lišila v průměru 3 až 5 krát, přičemž vyšší efektivita štěpení byla dle očekávání v euchromatinu (Chen *et al.*, 2016). Ve stejné studii se ukazuje, že na schopnost efektivně štěpit v chromatinu má efekt i počet repetice v TALE. Největší problém s přístupem do heterochromatinu měly TALENs s nejmenším počtem repetice a štěpení těmito krátkými TALENs se pohybovalo sotva nad detekovatelnou hranicí. Toto pozorování lze vysvětlit nižší afinitou krátkých TALEs k DNA. Vazebná afinita TALEs je totiž nelineárně závislá na počtu RVD repetice. Afinita TALE k DNA se řídí Gaussovským rozložením, kdy výrazně narůstá kolem počtu 10 až 14 repetice, nejvyšší afinity dosahují TALEs s 15 až 19 repeticemi a s dále narůstajícím počtem repetice afinita opět klesá (Rinaldi *et al.*, 2017).

Kromě vlivu chromatinu byl u TALENs zaznamenán i vliv metylace DNA na vazebnou afinitu. Ve studii zabývající se aktivací transkripce pomocí TALEs se ukázal pozitivní vliv inhibovaných metyltransferáz a histondeacetyláz na jejich funkci (Bultmann *et al.*, 2012). Metylace cytosinů brání rozpoznání DNA vazebným úsekem RVD. Konkrétně se jedná o repetici s dvojicí aminokyselin histidin a aspartát (HD) v RVD místě, jež rozpoznávají cytosin pomocí slabých vazebných interakcí (Mak *et al.*, 2012), které přebytečná metylová skupina narušuje. Porušení párování v jednotlivých repeticích pak narušuje afinitu celého TALE k DNA. Citlivost TALEs k metylaci cytosinů lze překonat nahrazením HD repetice repeticí nespecificky vázající RVD s asparaginem (N*); (Valton *et al.*, 2012)).

Při studii sledující chování TALENs a CRISPR/Cas9 v různých stavech chromatinu *in vivo* v lidských buňkách byly kromě pozorovaných rozdílů v efektivitě štěpení obou nukleáz zjištěny i rozdíly v kinetice hledání jejich cílové sekvence. U TALENs i u Cas9 byla ukázána dvoustupňová kinetika hledání (Jain *et al.*, 2021), podobně jako je tomu i u jiných DNA vazebných proteinů (Wunderlich and Mirny, 2008). Při hledání se dají rozlišit dvě fáze, rychlé globální hledání závislé na prostorovém uspořádání v jádře a pomalé lokální hledání, kdy dochází k posouvání podél DNA a hledání cílové sekvence. Cas9 a TALENs umí přepnout z rychlé globální fáze hledání na lokální v rozmezí 20 ms. Přestože poměr globálního a lokálního hledání je u obou nukleáz podobný, v euchromatinu má větší výhodu Cas9, neboť TALEs více reagují na různé překážky jako histony, či transkripční faktory. Při hledání v heterochromatinu naopak dosahují TALENs ve většině případů podobné, nebo i vyšší efektivity štěpení než Cas9 (Jain *et al.*, 2021).

4.3 - CRISPR/Cas v chromatinovém kontextu

Různé studie ukazují změny v aktivitě CRISPR/Cas9 v závislosti na stavu chromatinu v cílovém lokusu, kde v oblastech s kompaktním heterochromatinem dochází ke snížení efektivity mutagenese CRISPR/Cas9 (Chen *et al.*, 2016; Daer *et al.*, 2017). Takové snížení efektivity může být dlouhotrvající po celou dobu rostlinného vývoje a může způsobovat až 250 násobné rozdíly v efektivitě mutagenese mezi jednotlivými cílovými sekvencemi, cílenými totožnou gRNA (Weiss *et al.*, 2022). Naopak v některých dalších studiích nebyl při porovnání aktivity CRISPR/Cas9 se stavem chromatinu nalezen rozdíl (Feng *et al.*, 2016), nebo bylo pozorováno pouze opoždění aktivity CRISPR/Cas9 (Kallimasioti-Pazi *et al.*, 2018). Aktivitu CRISPR/Cas9 tak zřejmě neovlivňuje pouze čistě otevřenost, či

uzavřenost chromatinu, ale svou roli zde evidentně hraje i konkrétní epigenetické značení, účast různých histonových variant a podoně.

4.3.1 - Nukleozomy

Například bylo ukázáno, že efektivita CRISPR/Cas9, respektive efektivita jeho mutagenese je výrazně snížena až na desetinu, pokud se rozpoznávaná sekvence nebo PAM sekvence nachází na nukleozomu. Cas9 může mít totiž problém v takových místech na DNA nasednout. Ke snížení efektivity dochází, i pokud se na nukleozomu nachází jen část rozpoznávané sekvence, ale zde není efekt tak výrazný (Hinz, Laughery and Wyrick, 2015; Horlbeck *et al.*, 2016). Nukleozom je dynamický, může například docházet k jeho částečnému spontánnímu odvíjení a navíjení, tzv. „dýchání“ (Buning and Van Noort, 2010), také se po DNA pohybovat do stran postupným převýjením, závislým na ATP, jedná se o tzv. „klouzání“ (Bowman, 2010). Toto nukleozomové dýchání může vysvětlovat, že dochází jen k částečnému poklesu v efektivitě, pokud je rozpoznávaná sekvence či PAM sekvence na hranici nukleozomu (Isaac *et al.*, 2016). Pro umožnění bezproblémového přístupu CRISPR/Cas9 do DNA na nukleozomu jsou potřeba remodelační faktory. V případě kompaktního chromatinu také může přijít nasnadu CRISPR/Cas12a, jehož aktivita je snížena vlivem nukleozomu oproti jeho aktivitě na volné DNA jen na čtvrtinu (Strohkendl *et al.*, 2021).

4.3.2 - Metylovaná DNA

Efektivita CRISPR/Cas9 systému je ovlivněna též metylací DNA, konkrétně metylací cytosinů. Bylo ukázáno, že metylace cytosinů, nikoli v kódující oblasti genu, nýbrž v promotorové oblasti, nepřímo negativně reguluje mutagenese pomocí CRISPR/Cas9 (Příbylová *et al.*, 2022). To je ve shodě se staršími studiemi na savcích, kde bylo ukázáno, že metylace nedokáže sama o sobě zabránit štěpení (Hsu *et al.*, 2013). Přesto však úroveň metylace negativně koreluje s vazebnou aktivitou Cas9 *in vivo*. (Wu *et al.*, 2014). Methylace v promotorové oblasti genů může totiž u rostlin atrahovat SUVH proteiny (Li *et al.*, 2018). Ty indukují dimetylaci H3K9, jež je spojována s heterochromatinem. Methylace cytosinů může též atrahovat histondeacetylázy (Zemach and Grafí, 2003), jež zvyšují kladný náboj histonů. DNA je poté držena na nukleozomu o to pevněji. To, že metylace DNA neovlivňuje efektivitu CRISPR/Cas9 přímo, bylo ukázáno nezměněnou vazebnou aktivitou v metylovaných oblastech po purifikaci DNA (Fujita, Yuno and Fujii, 2016).

4.3.3 – Aktivní transkripce

Při aktivaci transkripce v umlčené oblasti pomocí transaktivátoru byla stále pozorována snížená efektivita mutagenese CRISPR/Cas9. To může ukazovat na kompetici mezi transkripčními faktory, popřípadě polymerázou na jedné straně a Cas9 na straně druhé (Daer *et al.*, 2017). Stejně tak byla nalezena vyšší hladina mutací v transgenním netranskribovaném lokusu s metylovaným, tedy umlčeným promotorem, v porovnání s tím samým lokusem, kde byla transkripce stále aktivní (Příbylová *et al.*, 2022). Je však otázkou, zda je snížená mutagenese následkem změněné vazebné, či nukleázové aktivity CRISPR/Cas9, nebo zdali je následkem případné efektivnější opravy. Ze studie na savcích však vyplývá, že aktivní transkripce může mutagenesi CRISPR/Cas9 naopak dokonce ještě umocnit. Efekt byl pozorován, pokud single guide RNA párovala s přepisovaným vláknem. Bylo totiž ukázáno, že RNA polymerázy, nejčastěji RNA polymeráza II, dokáží vypudit Cas9 z místa zlomu a tím se zvyšuje šance nepřesné opravy, či dalšího štěpení (Clarke *et al.*, 2018).

4.3.4 - Modifikace histonů a histonové varianty

Jak již bylo zmíněno vliv na funkci CRISPR/Cas systému mají i modifikace histonů. Jedná se především o modifikace histonu H3, například jeho acetylace H3K9ac, H3K27ac, H3K36ac, H3K56ac, nebo jeho metylace H3K4me a H3K36me3 všechny pozitivně korelují s CRISPR/Cas9 mutagenesí (Weiss *et al.*, 2022). Trimethylovaný H3K4me3 dokáže za stabilizace H3K79me aktivovat transkripci v umlčené oblasti, neboť H3K4me3 atrahuje transkripční faktory, které pak rozvolňují chromatin. Zde můžeme spekulovat vliv kompetice transkripčních faktorů na vazebnou aktivitu Cas9. Takováto upregulace genů však nebyla pozorována v CpG ostrovech (Cano-Rodriguez *et al.*, 2016). Naopak metylace H3K9 či H3K27 koreluje s CRISPR/Cas9 mutagenesí silně negativně (Weiss *et al.*, 2022). Dále pak hrají roli v ovlivnění aktivity CRISPR/Cas9 varianty histonu H2A. Například depozice histonu H2A.W přispívá snížené přístupnosti heterochromatinu, neboť ten díky své C-terminální doméně váže linkerovou DNA obdobně jako histon H1, a tak mezi nimi dochází ke kompetici. H2A.W však na rozdíl od histonu H1 umožňuje nukleozomové dýchání. To vysvětluje, proč po vymutování H2A.W dochází ke snížení přístupnosti chromatinu, přesto že se H2A.W sám na snížené přístupnosti podílí (Bourguet *et al.*, 2021).

4.3.5 - Remodelace a přístup do chromatinu

Přesto, že chromatinové a epigenetické značky mohou regulovat přístupnost chromatinu pro CRISPR/Cas systém, tak i CRISPR/Cas9 sám o sobě má schopnost otevírání chromatinu. To bylo demonstrováno na savčích buňkách využitím dCas9 jako transkripčního aktivátoru. Kde dCas9 po nasednutí v kompaktním heterochromatinu umožňuje přístup dalších transkripčních faktorů a dochází ke spuštění transkripce. Stejně tak po nasednutí umožňuje jednodušší přístup i pro další nukleázy (Polstein *et al.*, 2015). K podobným výsledkům, že dCas9 zpřístupňuje chromatin pro přístup transkripčních faktorů, dospěla i pozdější studie, kde autoři navrhují čistě mechanickou podstatu otevírání chromatinu rozvolňováním duplexu DNA, nebo stérické stínění nukleozomu Cas9. Též ukazují že Cas9 nemá žádný vliv na modifikace histonů, což není vzhledem k prokaryotickému původu překvapivé (Barkal *et al.*, 2016).

5 - Opravy dvouvláknových zlomů ve vztahu ke stavu chromatinu

Stav chromatinu ovlivňuje i opravu DNA. Stejně jako tvoří bariéru pro nukleázy (viz výše), tak brání kompaktní chromatin přístupu opravných proteinů. Pro efektivní opravu je tedy třeba, aby došlo k jeho remodelaci (Shaked, Avivi-Ragolsky and Levy, 2006). Pozorovatelné jsou i rozdíly v opravě na základě původního chromatinového kontextu. Například na základě kontextu mohou být rekrutovány opravné proteiny s různou úspěšností, a tedy ve specifickém kontextu může být rozdíl ve frekvenci jednotlivých opravných drah.

5.1 - Regulace chromatinu během oprav dvouvláknových zlomů

Remodelace chromatinu po vzniku dvouvláknových zlomů je poměrně složitý proces zahrnující velkou spoustu proteinů. Dochází k výměně a modifikaci histonů, či odstranění celých nukleozomů pomocí remodelačních komplexů, proteinkináz, histonacetyláz a histonových chaperonů.

5.1.1 - Histonové varianty a jejich modifikace

V rostlinách je identifikovaná celá řada histonových variant, ze kterých se skládají jednotlivé nukleosomy. Ty poté mohou ovlivňovat opravy dvouvláknových zlomů v závislosti na jejich složení, které se může měnit podle toho, ze které oblasti chromatinu pochází.

Histonová varianta H2A.X, která se vyskytuje především v euchromatinu (Lorković *et al.*, 2017), je krátce po vzniku fosforylována aktivovanými kinázami ATM a ATR (aktivace viz

kapitola 3.1; (Waterworth *et al.*, 2019)). Fosforylovaný γ -H2A.X lemující poškozenou DNA slouží často jako marker při pozorování dvouvláknových zlomů, jelikož značení γ -H2A.X od sebe jasně odděluje jednotlivé zlomy (Keogh *et al.*, 2006). γ -H2A.X také pravděpodobně slouží jako značka při regulaci buněčného cyklu (Bennett, Papamichos-Chronakis and Peterson, 2013).

Často zmiňovanou dvojicí remodelačních faktorů v souvislosti s opravami dvouvláknových zlomů u savců jsou komplexy SWR1 a INO80 (Wang *et al.*, 2019). Dříve se předpokládalo že remodelační komplex INO80 je na místo zlomu naváděn fosforylovaným histonem γ -H2A.X (Morrison *et al.*, 2004), novější práce však toto tvrzení rozporuje s tím, že přístup INO80 závisí spíše na probíhající fázi opravy. Studie navíc ukazuje negativní korelaci přístupu INO80 s množstvím γ -H2A.X, (Bennett, Papamichos-Chronakis and Peterson, 2013). Ve starší literatuře se rovněž uvádí, že rozvolňování chromatinu pomocí INO80 umožňuje přístup dalších proteinů spojených s opravami. Díky pomalé kinetice nasedání by mělo jít především o exonukleázy, které se podílejí na vytváření 3' přesahující konce, čímž by docházelo k pozorované stimulaci HR. (Van Attikum *et al.*, 2004). Ovšem studie od Bennet *et al.* ukazuje, že exonukleázy se spíše na místo dostávají v závislosti na fázi probíhající opravy (Bennett, Papamichos-Chronakis and Peterson, 2013) a INO80 tak pravděpodobně pouze stimuluje jejich funkci. V pozdějších studiích se ukazuje role INO80 při odstraňování histonu H2A.Z, čímž opravy může ovlivňovat (Brahma *et al.*, 2017). U rostlin pak byl vliv INO80 na opravu pozorován také, ale pouze u podjednotky ARP5 (ACTIN-RELATED PROTEIN 5; (Kandasamy *et al.*, 2009)).

Rovněž v okolí dvouvláknového zlomu dochází k acetylaci histonů H2 a H4 acetyltransferázou NuA4 (Nucleosome acetyltransferase of H4), čímž dochází k rozvolňování chromatinu a upregulaci HR. K místu zlomu je u kvasinek naváděna za pomoci MRX (složeného z Mre11, Rad50 a Xrs2) komplexu (Jobin-Robitaille *et al.*, 2013). NuA4 navíc u kvasinek inhibuje opravu cNHEJ, díky acetylaci dalších specifických proteinů. Zároveň však je inhibována, pokud se již v oblasti probíhající oprava skrze cNHEJ nachází (Ahmad *et al.*, 2021). Vliv na rozvolnění v oblasti dvouvláknového zlomu má na opravu DNA i rostlinný homolog NuA4, a to konkrétně podjednotky HAM1 a HAM2 (HISTONE ACETYLTRANSFERASE OF THE MYST FAMILY 1/2) (Campi *et al.*, 2012).

Remodelační komplex SWR1, který vyměňuje histon H2A po acetylaci acetyltransferázou NuA4 za H2A.Z (Altaf et al., 2010), jak se ukazuje, má vliv i na opravu DNA u rostlin (Rosa et al., 2013), konkrétně podporuje opravu pomocí HR. V případě bakteriálního SWR1 se naopak ukazuje podpora NHEJ dráhy, jelikož SWR1 hraje roli při navádění Ku80 (Van Attikum, Fritsch and Gasser, 2007). Pozdější studie ukazuje jen malý vliv na NHEJ v *swr1* mutantech, zatímco většina defektů je zaviněna absencí H2A.Z. Mimo to ovšem studie na *swr1* mutantech ukazuje změny v expresi dalších opravných genů (Morillo-Huesca et al., 2010).

Inkorporace histonu H2A.Z SWR1 komplexem u kvasinek stimuluje aktivitu Exo1 a pravděpodobně i přesnost replikace polymerázy δ (Van *et al.*, 2015), což také zvyšuje efektivitu opravy pomocí HR. U rostlin se H2A.Z standardně vyskytuje v neaktivních genech a v promotorech aktivních genů a jeho role v opravě DNA je nejistá (Gómez-Zambrano, Merini and Calonje, 2019).

V heterochromatinu savců se typicky nachází trimetylovaný histon H3K9me3. U savců se na H3K9me3 váže HP1 protein, který se poté, díky vzájemné agregaci s dalšími HP1 proteiny vážícími H3K9me3, podílí na kondenzaci chromatinu. Signální kaskáda dvouvláknových zlomů může způsobovat jeho fosforylaci a tím následné rozvolnění chromatinu (Maison and Almouzni, 2004). U rostlin se však homologní HP1 like protein do heterochromatinu nedostává, roli HP1 tak přebírá nepříbuzný protein ADCP1 (AGENET DOMAIN (AGD)-CONTAINING P1; (Zhao *et al.*, 2019)). Alternativně by mohl být přístup do heterochromatinu zprostředkován fosforylací rostlině specifického histonu H2A.W.7 pomocí ATM či ATR. H2A.W.7 se vyskytuje především v pericentromerickém heterochromatinu a také v euchromatinu v heterochromatinových ostrovech (Lorković *et al.*, 2017).

5.1.2 - Histon chaperony

Histon chaperonové komplexy CAF1 (Chromatin Assembly Factor 1) a ASF1 (ANTI-SILENCING FUNCTION 1) inkorporující histony H3 a H4 do nově vzniklé DNA po replikaci se zřejmě účastní i změn v chromatinu v souvislosti s opravou dvouvláknových zlomů. Tomuto tvrzení nahrává účast CAF1 na opravě jednovláknových přerušení (Moggs *et al.*, 2000). Bylo spekulováno, že po remodelaci chromatinu dalšími proteiny během HR opět obnovují uspořádání nukleozomů a uvolňují pozastavení buněčného cyklu způsobného

probíhající opravou (Kim and Haber, 2009; Gao *et al.*, 2012). Ztráta CAF1 u *Arabidopsis thaliana* vede k chromozomové nestabilitě, zkracování telomer, k overexpresi proteinů typických pro HR a TMEJ, avšak nedochází ke změně aktivity NHEJ dráhy (Varas, Santos and Pradillo, 2017). Podobný fenotyp se objevuje i po ztrátě ASF1 (Zhu *et al.*, 2011). Tento fenotyp u CAF1 mutanta je však závislý na proteinech NRP1 a NRP2, které (Gao *et al.*, 2012). Možný podíl těchto chaperonů na opravách dvouvláknových zlomů by se mohl ukázat v NHEJ dráze. CAF1 totiž u lidských buněk přímo interaguje s komplexem KU70/80 (Hoek, Myers and Stillman, 2011). A ASF1 u lidských buněk dokonce opravu dvouvláknového zlomu pomocí NHEJ skutečně stimuluje (Lee *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2022).

Dalšími důležitými histonovými chaperony jsou NAPs a s nimi související NRPs. NAPs váží histony H2A a H2B. Ukazuje se totiž, že ztráta NRP1 a NRP2 u *Arabidopsis thaliana* vede k defektům v HR. Protože nedochází ke změnám v expresi HR genů, byla diskutována interakce s INO80 či RAD51 (Gao *et al.*, 2012). Na lidských buňkách bylo ukázáno, že NAP1 stimuluje aktivitu RAD54 vyvazováním histonů H1 a tím sekundárně ovlivňuje i RAD51 (Machida *et al.*, 2014). Ohledně možné interakce s INO80 bylo ukázáno, že NRP1 je nad INO80 ve vztahu k HR epistatický (Zhou *et al.*, 2016). Dále je pak skloňována účast NRP1 i v odstraňování histonu H2A.Z (Wang *et al.*, 2020).

5.1.3 - Malé RNA

Ukazuje se, že v opravě dvouvláknových zlomů hrají roli i malé RNA, a to nejen u rostlin, ale i v lidských buňkách. U rostlin jsou tyto malé RNA tvořeny RNA polymerázou IV z úseků v okolí dvouvláknového zlomu. Malé RNA se zde však neúčastní na změnách metylace jako je tomu v RdDM (RNA-directed DNA methylation) dráze, kde hrají malé RNA ústřední roli, nýbrž hrají pravděpodobně roli v navigaci dalších opravných proteinů prostřednictvím DICER-LIKE proteinů a ARGONAUTE 2 (AGO2). Dále se pak ukazuje závislost této dráhy na aktivitě proteinkinázy ATR, tedy potažmo na fosforylaci H2A.X (Wei *et al.*, 2012).

U savců dochází k tvorbě ještě dalšího typu malých RNA spojených s dvouvláknovými zlomy. Tento typ malých RNA je tvořen RNA polymerázou II naváděnou k místu zlomu pomocí MRN komplexu. Předpokládá se, že slouží k amplifikaci signálu o dvouvláknovém zlomu a k navádění dalších proteinů (Francia *et al.*, 2016; Michelini *et al.*, 2017).

Rozdíly v těchto dvou drahách jsou shrnuty v publikaci (Rzeszutek and Betlej, 2020).

5.2 - Vliv chromatinového kontextu na opravy

Ve studii na lidských buňkách byla ukázána rozdílnost oprav v rámci různých oblastí euchromatinu, kdy oblasti s aktivní transkripcí nebo depozicí histonu H3K36me3 jsou preferenčně opravovány prostřednictvím HR, zatímco oblasti bez H3K36me3, či aktivní transkripce jsou opravovány cNHEJ dráhou i během G2 fáze buňčného cyklu (Aymard *et al.*, 2014). Během G1 fáze buňčného cyklu dochází v buňce preferenčně k opravě pomocí cNHEJ, protože v tu chvíli ještě není vytvořena sesterská chromatida, která je pro HR potřeba (Mao *et al.*, 2008). V oblastech bez aktivní transkripce či bez depozice H3K36me3 se po odstranění XRCC4 (ústředního proteinu cNHEJ dráhy) neukazuje žádná změna v efektivitě opravy dvouvláknového zlomu, přestože se za normálních okolností XRCC4 v těchto oblastech v místech zlomů vyskytuje (Aymard *et al.*, 2014). Pozdější studie ukazuje, že po vymutování XRCC4 dochází v G1 fázi k defektu v cNHEJ dráze a oprava probíhá až v S/G2 fázi prostřednictvím TMEJ (Yu *et al.*, 2020).

Oprava pomocí HR v heterochromatinu se může od té v euchromatinu mírně lišit. U *Drosophily* byl totiž v případě heterochromatinu pozorován přesun úseku s dvouvláknovým zlomem do oblasti jaderné periferie, kde až teprve dochází k nasedání RAD51 a hledání homologie (Ryu *et al.*, 2015). Podobné chování bylo zaznamenáno i v případě zlomů v pericentrické oblasti u savců. S tím, že zlomy, které se nepřesunou mimo oblast heterochromatinu, jsou opraveny prostřednictvím NHEJ či SSA (Tsouroula *et al.*, 2016). Přesun poškozeného vlákna k jaderné periférii byl pozorován i u rostlin (Meschichi *et al.*, 2022) a tedy můžeme předpokládat, že se jedná o konzervovaný proces. Opět se však jedná především o G2 fázi buňčného cyklu, neboť v G1 fázi dochází k opravě skrze NHEJ.

Závěr

Přestože tato práce popisuje také vliv stavu chromatinu na funkci programovatelných nukleáz, tak, jak již bylo zmíněno, může být reálně problém odlišit ho od vlivu, jenž má stav chromatinu na opravu dvouvláknových zlomů. Efektivita nukleáz je totiž často posuzována podle účinnosti jimi indukované mutagenese, která závisí na frekvenci bezchybných oprav jimi vytvořených zlomů. A v případě oprav je pak velkým nedostatkem, že se často posuzuje účast proteinu na opravě dvouvláknových zlomů převážně jen v závislosti na snížené odolnosti vůči ionizujícímu záření (v lepším případě induktorům dvouvláknových zlomů). Díky tomu máme spoustu proteinů s možnou účastí v opravách, ale o mechanismu jejich účinku nevíme téměř nic.

Seznam použité literatury

Obrazová dokumentace v této práci byla vytvořena s pomocí programu biorender.com.

Ahmad, S. *et al.* (2021) ‘Antagonistic relationship of NuA4 with the non-homologous end-joining machinery at DNA damage sites’, *PLoS Genetics*. Edited by L.S. Symington, 17(9), p. e1009816. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009816>.

Amunugama, R. and Fishel, R. (2012) ‘Homologous Recombination in Eukaryotes’, in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier, pp. 155–206. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387665-2.00007-9>.

Anders, C. *et al.* (2014) ‘Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease’, *Nature*, 513(7519), pp. 569–573. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature13579>.

Aymard, F. *et al.* (2014) ‘Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(4), pp. 366–374. Available at: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2796>.

Barkal, A.A. *et al.* (2016) ‘Cas9 Functionally Opens Chromatin’, *PLoS ONE*. Edited by H. Fujii, 11(3), p. e0152683. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152683>.

Bauknecht, M. and Kobbe, D. (2014) ‘AtGEN1 and AtSEND1, Two Paralogs in Arabidopsis, Possess Holliday Junction Resolvase Activity’, *Plant Physiology*, 166(1), pp. 202–216. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.114.237834>.

Bennett, G., Papamichos-Chronakis, M. and Peterson, C.L. (2013) ‘DNA repair choice defines a common pathway for recruitment of chromatin regulators’, *Nature Communications*, 4(1), p. 2084. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms3084>.

Bitinaite, J. *et al.* (1998) ‘Fok I dimerization is required for DNA cleavage’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), pp. 10570–10575. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10570>.

- Boch, J. *et al.* (2009) ‘Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors’, *Science*, 326(5959), pp. 1509–1512. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1178811>.
- Bourguet, P. *et al.* (2021) ‘The histone variant H2A.W and linker histone H1 co-regulate heterochromatin accessibility and DNA methylation’, *Nature Communications*, 12(1), p. 2683. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22993-5>.
- Bowman, G.D. (2010) ‘Mechanisms of ATP-dependent nucleosome sliding’, *Current Opinion in Structural Biology*, 20(1), pp. 73–81. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.12.002>.
- Brahma, S. *et al.* (2017) ‘INO80 exchanges H2A.Z for H2A by translocating on DNA proximal to histone dimers’, *Nature Communications*, 8(1), p. 15616. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms15616>.
- Bultmann, S. *et al.* (2012) ‘Targeted transcriptional activation of silent oct4 pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetic modifiers’, *Nucleic Acids Research*, 40(12), pp. 5368–5377. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gks199>.
- Buning, R. and Van Noort, J. (2010) ‘Single-pair FRET experiments on nucleosome conformational dynamics’, *Biochimie*, 92(12), pp. 1729–1740. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.08.010>.
- Campi, M. *et al.* (2012) ‘Participation of Chromatin-Remodeling Proteins in the Repair of Ultraviolet-B-Damaged DNA’, *Plant Physiology*, 158(2), pp. 981–995. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.111.191452>.
- Cannan, W.J. and Pederson, D.S. (2016) ‘Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin: DOUBLE-STRAND DNA BREAK FORMATION IN CHROMATIN’, *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), pp. 3–14. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.25048>.
- Cano-Rodriguez, D. *et al.* (2016) ‘Writing of H3K4Me3 overcomes epigenetic silencing in a sustained but context-dependent manner’, *Nature Communications*, 7(1), p. 12284. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms12284>.
- Cermak, T. *et al.* (2011) ‘Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting’, *Nucleic Acids Research*, 39(12), pp. e82–e82. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr218>.
- Chang, H.H.Y., Watanabe, G. and Lieber, M.R. (2015) ‘Unifying the DNA End-processing Roles of the Artemis Nuclease’, *Journal of Biological Chemistry*, 290(40), pp. 24036–24050. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680900>.
- Chen, S. *et al.* (2013) ‘A large-scale in vivo analysis reveals that TALENs are significantly more mutagenic than ZFNs generated using context-dependent assembly’, *Nucleic Acids Research*, 41(4), pp. 2769–2778. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gks1356>.
- Chen, S. *et al.* (2021) ‘Structural insights into the role of DNA-PK as a master regulator in NHEJ’, *Genome Instability & Disease*, 2(4), pp. 195–210. Available at: <https://doi.org/10.1007/s42764-021-00047-w>.
- Chen, X. *et al.* (2016) ‘Probing the impact of chromatin conformation on genome editing tools’, *Nucleic Acids Research*, 44(13), pp. 6482–6492. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw524>.

Clarke, R. *et al.* (2018) ‘Enhanced Bacterial Immunity and Mammalian Genome Editing via RNA-Polymerase-Mediated Dislodging of Cas9 from Double-Strand DNA Breaks’, *Molecular Cell*, 71(1), pp. 42–55.e8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.005>.

Cortés-Ledesma, F. and Aguilera, A. (2006) ‘Double-strand breaks arising by replication through a nick are repaired by cohesin-dependent sister-chromatid exchange’, *EMBO reports*, 7(9), pp. 919–926. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400774>.

Daer, R.M. *et al.* (2017) ‘The Impact of Chromatin Dynamics on Cas9-Mediated Genome Editing in Human Cells’, *ACS Synthetic Biology*, 6(3), pp. 428–438. Available at: <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00299>.

Davies, A.A. *et al.* (2001) ‘Role of BRCA2 in Control of the RAD51 Recombination and DNA Repair Protein’, *Molecular Cell*, 7(2), pp. 273–282. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00175-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00175-7).

Davis, A. (2003) ‘The Rad52–Rad59 complex interacts with Rad51 and replication protein A’, *DNA Repair*, 2(10), pp. 1127–1134. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(03\)00121-6](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(03)00121-6).

De Schutter, K. *et al.* (2007) ‘*Arabidopsis* WEE1 Kinase Controls Cell Cycle Arrest in Response to Activation of the DNA Integrity Checkpoint’, *The Plant Cell*, 19(1), pp. 211–225. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045047>.

Deltcheva, E. *et al.* (2011) ‘CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III’, *Nature*, 471(7340), pp. 602–607. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature09886>.

Ding, X. *et al.* (2022) ‘Recent Progress and Future Prospect of CRISPR/Cas-Derived Transcription Activation (CRISPRa) System in Plants’, *Cells*, 11(19), p. 3045. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells11193045>.

Falk, M., Lukášová, E. and Kozubek, S. (2008) ‘Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to γ -radiation’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(12), pp. 2398–2414. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.07.010>.

Feng, C. *et al.* (2016) ‘Efficient Targeted Genome Modification in Maize Using CRISPR/Cas9 System’, *Journal of Genetics and Genomics*, 43(1), pp. 37–43. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2015.10.002>.

Feng, S. *et al.* (2022) ‘RIF1-ASF1-mediated high-order chromatin structure safeguards genome integrity’, *Nature Communications*, 13(1), p. 957. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28588-y>.

Francia, S. *et al.* (2016) ‘DICER, DROSHA and DNA damage-response RNAs are necessary for the secondary recruitment of DNA damage response factors’, *Journal of Cell Science*, p. jcs.182188. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.182188>.

Friesner, J.D. *et al.* (2005) ‘Ionizing Radiation–dependent γ -H2AX Focus Formation Requires Ataxia Telangiectasia Mutated and Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-related’, *Molecular Biology of the Cell*, 16(5), pp. 2566–2576. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-10-0890>.

Fu, R. *et al.* (2020) ‘Rice OsBRCA2 Is Required for DNA Double-Strand Break Repair in Meiotic Cells’, *Frontiers in Plant Science*, 11, p. 600820. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.600820>.

- Fujita, T., Yuno, M. and Fujii, H. (2016) 'Allele-specific locus binding and genome editing by CRISPR at the p16INK4a locus', *Scientific Reports*, 6(1), p. 30485. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep30485>.
- Gallagher, D.N. *et al.* (2020) 'A Rad51-independent pathway promotes single-strand template repair in gene editing', *PLOS Genetics*. Edited by G.P. Copenhaver, 16(10), p. e1008689. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008689>.
- Gao, J. *et al.* (2012) 'NAP1 Family Histone Chaperones Are Required for Somatic Homologous Recombination in *Arabidopsis*', *The Plant Cell*, 24(4), pp. 1437–1447. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.112.096792>.
- Gasiunas, G. *et al.* (2012) 'Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39). Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>.
- Gleditsch, D. *et al.* (2019) 'PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures', *RNA Biology*, 16(4), pp. 504–517. Available at: <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1504546>.
- Gómez-Zambrano, Á., Merini, W. and Calonje, M. (2019) 'The repressive role of Arabidopsis H2A.Z in transcriptional regulation depends on AtBM11 activity', *Nature Communications*, 10(1), p. 2828. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10773-1>.
- Grover, A. *et al.* (2010) 'Re-programming DNA-binding specificity in zinc finger proteins for targeting unique address in a genome', *Systems and Synthetic Biology*, 4(4), pp. 323–329. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11693-011-9077-4>.
- Gupta, R.M. and Musunuru, K. (2014) 'Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9', *Journal of Clinical Investigation*, 124(10), pp. 4154–4161. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI72992>.
- He, P. and Yang, W. (2018) 'Template and primer requirements for DNA Pol θ -mediated end joining', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(30), pp. 7747–7752. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1807329115>.
- Heidenreich, E. (2003) 'Non-homologous end joining as an important mutagenic process in cell cycle-arrested cells', *The EMBO Journal*, 22(9), pp. 2274–2283. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg203>.
- Hinz, J.M., Laughery, M.F. and Wyrick, J.J. (2015) 'Nucleosomes Inhibit Cas9 Endonuclease Activity *in Vitro*', *Biochemistry*, 54(48), pp. 7063–7066. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01108>.
- Hirakawa, T. *et al.* (2017) 'RAD 54 forms DNA repair foci in response to DNA damage in living plant cells', *The Plant Journal*, 90(2), pp. 372–382. Available at: <https://doi.org/10.1111/tpj.13499>.
- Hochstrasser, M.L. *et al.* (2016) 'DNA Targeting by a Minimal CRISPR RNA-Guided Cascade', *Molecular Cell*, 63(5), pp. 840–851. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.07.027>.
- Hoek, M., Myers, M.P. and Stillman, B. (2011) 'An Analysis of CAF-1-interacting Proteins Reveals Dynamic and Direct Interactions with the KU Complex and 14-3-3 Proteins', *Journal of*

Biological Chemistry, 286(12), pp. 10876–10887. Available at:
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.217075>.

Horlbeck, M.A. *et al.* (2016) ‘Nucleosomes impede Cas9 access to DNA in vivo and in vitro’,
eLife, 5, p. e12677. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.12677>.

Hsu, P.D. *et al.* (2013) ‘DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases’, *Nature Biotechnology*, 31(9), pp. 827–832. Available at: <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>.

Isaac, R.S. *et al.* (2016) ‘Nucleosome breathing and remodeling constrain CRISPR-Cas9 function’,
eLife, 5, p. e13450. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.13450>.

Ishino, Y. *et al.* (1987) ‘Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product’, *Journal of Bacteriology*, 169(12), pp. 5429–5433. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>.

Jain, S. *et al.* (2021) ‘TALEN outperforms Cas9 in editing heterochromatin target sites’, *Nature Communications*, 12(1), p. 606. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20672-5>.

Jiang, F. *et al.* (2015) ‘A Cas9–guide RNA complex preorganized for target DNA recognition’,
Science, 348(6242), pp. 1477–1481. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aab1452>.

Jinek, M. *et al.* (2012) ‘A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity’, *Science*, 337(6096), pp. 816–821. Available at:
<https://doi.org/10.1126/science.1225829>.

Jobin-Robitaille, O. *et al.* (2013) ‘Phospho-dependent recruitment of NuA4 by MRX at DNA breaks regulates RPA dynamics during resection’, *Epigenetics & Chromatin*, 6(S1), pp. P93, 1756-8935-6-S1-P93. Available at: <https://doi.org/10.1186/1756-8935-6-S1-P93>.

Johnson, R.A., Hellens, R.P. and Love, D.R. (2011) ‘A transient assay for recombination demonstrates that *Arabidopsis* SNM1 and XRCC3 enhance non-homologous recombination’, *Genetics and molecular research: GMR*, 10(3), pp. 2104–2132. Available at:
<https://doi.org/10.4238/vol10-3gmr1347>.

Ka, D. *et al.* (2018) ‘Molecular organization of the type II-A CRISPR adaptation module and its interaction with Cas9 via Csn2’, *Nucleic Acids Research*, 46(18), pp. 9805–9815. Available at:
<https://doi.org/10.1093/nar/gky702>.

Kagawa, W. *et al.* (2002) ‘Crystal Structure of the Homologous-Pairing Domain from the Human Rad52 Recombinase in the Undecameric Form’, *Molecular Cell*, 10(2), pp. 359–371. Available at:
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00587-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00587-7).

Kallimasioti-Pazi, E.M. *et al.* (2018) ‘Heterochromatin delays CRISPR-Cas9 mutagenesis but does not influence the outcome of mutagenic DNA repair’, *PLOS Biology*. Edited by T. Misteli, 16(12), p. e2005595. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005595>.

Kandasamy, M.K. *et al.* (2009) ‘*Arabidopsis* actin-related protein ARP5 in multicellular development and DNA repair’, *Developmental Biology*, 335(1), pp. 22–32. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.08.006>.

- Karlson, C.K.S. *et al.* (2021) ‘CRISPR/dCas9-Based Systems: Mechanisms and Applications in Plant Sciences’, *Plants*, 10(10), p. 2055. Available at: <https://doi.org/10.3390/plants10102055>.
- Karumbati, A.S. *et al.* (2003) ‘The Role of Yeast DNA 3'-Phosphatase Tpp1 and Rad1/Rad10 Endonuclease in Processing Spontaneous and Induced Base Lesions’, *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), pp. 31434–31443. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M304586200>.
- Kazda, A. *et al.* (2012) ‘Chromosome end protection by blunt-ended telomeres’, *Genes & Development*, 26(15), pp. 1703–1713. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.194944.112>.
- Kent, T. *et al.* (2015) ‘Mechanism of microhomology-mediated end-joining promoted by human DNA polymerase θ ’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(3), pp. 230–237. Available at: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2961>.
- Keogh, M.-C. *et al.* (2006) ‘A phosphatase complex that dephosphorylates γ H2AX regulates DNA damage checkpoint recovery’, *Nature*, 439(7075), pp. 497–501. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature04384>.
- Khalil, A.M. (2020) ‘The genome editing revolution: review’, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), p. 68. Available at: <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00078-y>.
- Kim, J.-A. and Haber, J.E. (2009) ‘Chromatin assembly factors Asf1 and CAF-1 have overlapping roles in deactivating the DNA damage checkpoint when DNA repair is complete’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(4), pp. 1151–1156. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0812578106>.
- Kim, Y.G., Cha, J. and Chandrasegaran, S. (1996) ‘Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), pp. 1156–1160. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>.
- van Kregten, M. *et al.* (2016) ‘T-DNA integration in plants results from polymerase- θ -mediated DNA repair’, *Nature Plants*, 2(11), p. 16164. Available at: <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.164>.
- Larson, M.H. *et al.* (2013) ‘CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression’, *Nature Protocols*, 8(11), pp. 2180–2196. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.132>.
- Layer, J.V. *et al.* (2020) ‘Polymerase δ promotes chromosomal rearrangements and imprecise double-strand break repair’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(44), pp. 27566–27577. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2014176117>.
- Lee, H. *et al.* (2018) ‘Cas4-Dependent Prespacer Processing Ensures High-Fidelity Programming of CRISPR Arrays’, *Molecular Cell*, 70(1), pp. 48-59.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.003>.
- Lee, J.-H. and Paull, T.T. (2004) ‘Direct Activation of the ATM Protein Kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 Complex’, *Science*, 304(5667), pp. 93–96. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1091496>.
- Lee, K.Y. *et al.* (2017) ‘ASF1a Promotes Non-homologous End Joining Repair by Facilitating Phosphorylation of MDC1 by ATM at Double-Strand Breaks’, *Molecular Cell*, 68(1), pp. 61-75.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.021>.

- Li, X. *et al.* (2018) ‘Mechanistic insights into plant SUVH family H3K9 methyltransferases and their binding to context-biased non-CG DNA methylation’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(37). Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1809841115>.
- Li, Y. *et al.* (2015) ‘A versatile reporter system for CRISPR-mediated chromosomal rearrangements’, *Genome Biology*, 16(1), p. 111. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0680-7>.
- Lieber, M.R. (1999) ‘The biochemistry and biological significance of nonhomologous DNA end joining: an essential repair process in multicellular eukaryotes’, *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 4(2), pp. 77–85. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1999.00245.x>.
- Liu, Q. *et al.* (2022) ‘The histone methyltransferase SUVR2 promotes DSB repair via chromatin remodeling and liquid–liquid phase separation’, *Molecular Plant*, 15(7), pp. 1157–1175. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.05.007>.
- Liu, S. *et al.* (2021) ‘RNA polymerase III is required for the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination’, *Cell*, 184(5), pp. 1314–1329.e10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.048>.
- Lorković, Z.J. *et al.* (2017) ‘Compartmentalization of DNA Damage Response between Heterochromatin and Euchromatin Is Mediated by Distinct H2A Histone Variants’, *Current Biology*, 27(8), pp. 1192–1199. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.03.002>.
- Luedeman, M.E. *et al.* (2022) ‘Poly(ADP) ribose polymerase promotes DNA polymerase theta-mediated end joining by activation of end resection’, *Nature Communications*, 13(1), p. 4547. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32166-7>.
- Machida, S. *et al.* (2014) ‘Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1’, *Scientific Reports*, 4(1), p. 4863. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep04863>.
- Maeder, M.L. *et al.* (2008) ‘Rapid “Open-Source” Engineering of Customized Zinc-Finger Nucleases for Highly Efficient Gene Modification’, *Molecular Cell*, 31(2), pp. 294–301. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.016>.
- Mahapatra, K. and Roy, S. (2020) ‘An insight into the mechanism of DNA damage response in plants- role of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1: An overview’, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 819–820, p. 111689. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2020.111689>.
- Maison, C. and Almouzni, G. (2004) ‘HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(4), pp. 296–305. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm1355>.
- Mak, A.N.-S. *et al.* (2012) ‘The Crystal Structure of TAL Effector PthXo1 Bound to Its DNA Target’, *Science*, 335(6069), pp. 716–719. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1216211>.
- Maloisel, L., Fabre, F. and Gangloff, S. (2008) ‘DNA Polymerase δ Is Preferentially Recruited during Homologous Recombination To Promote Heteroduplex DNA Extension’, *Molecular and Cellular Biology*, 28(4), pp. 1373–1382. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.01651-07>.

- Mansisidor, A.R. and Risca, V.I. (2022) ‘Chromatin accessibility: methods, mechanisms, and biological insights’, *Nucleus*, 13(1), pp. 238–278. Available at: <https://doi.org/10.1080/19491034.2022.2143106>.
- Mao, Z. *et al.* (2008) ‘DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells’, *Cell Cycle*, 7(18), pp. 2902–2906. Available at: <https://doi.org/10.4161/cc.7.18.6679>.
- Mateos-Gomez, P.A. *et al.* (2015) ‘Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses recombination’, *Nature*, 518(7538), pp. 254–257. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature14157>.
- Mazin, A.V. *et al.* (2000) ‘Rad54 Protein Is Targeted to Pairing Loci by the Rad51 Nucleoprotein Filament’, *Molecular Cell*, 6(3), pp. 583–592. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00057-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00057-5).
- Mengwasser, K.E. *et al.* (2019) ‘Genetic Screens Reveal FEN1 and APEX2 as BRCA2 Synthetic Lethal Targets’, *Molecular Cell*, 73(5), pp. 885-899.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.12.008>.
- Meschichi, A. *et al.* (2022) ‘The plant-specific DDR factor SOG1 increases chromatin mobility in response to DNA damage’, *EMBO reports*, 23(12). Available at: <https://doi.org/10.15252/embr.202254736>.
- Meyer, D., Fu, B.X.H. and Heyer, W.-D. (2015) ‘DNA polymerases δ and λ cooperate in repairing double-strand breaks by microhomology-mediated end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(50). Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1507833112>.
- Michelini, F. *et al.* (2017) ‘Damage-induced lncRNAs control the DNA damage response through interaction with DDRNAs at individual double-strand breaks’, *Nature Cell Biology*, 19(12), pp. 1400–1411. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb3643>.
- Mimitou, E.P. and Symington, L.S. (2008) ‘Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing’, *Nature*, 455(7214), pp. 770–774. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature07312>.
- Moggs, J.G. *et al.* (2000) ‘A CAF-1–PCNA-Mediated Chromatin Assembly Pathway Triggered by Sensing DNA Damage’, *Molecular and Cellular Biology*, 20(4), pp. 1206–1218. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.20.4.1206-1218.2000>.
- Molinier, J., Stamm, M. and Hohn, B. (2004) ‘SNM-dependent recombinational repair of oxidatively induced DNA damage in *Arabidopsis thaliana*’, *EMBO reports*, 5(10), pp. 994–999. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400256>.
- Morrison, A.J. *et al.* (2004) ‘INO80 and γ -H2AX Interaction Links ATP-Dependent Chromatin Remodeling to DNA Damage Repair’, *Cell*, 119(6), pp. 767–775. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.037>.
- Nimkar, S. and Anand, B. (2020) ‘Cas3/I-C mediated target DNA recognition and cleavage during CRISPR interference are independent of the composition and architecture of Cascade surveillance complex’, *Nucleic Acids Research*, 48(5), pp. 2486–2501. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1218>.

- Orel, N., Kyryk, A. and Puchta, H. (2003) 'Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome: *DSB-induced intrachromosomal recombination in plants*', *The Plant Journal*, 35(5), pp. 604–612. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01832.x>.
- Ozdemir, A.Y. *et al.* (2018) 'Polymerase θ -helicase efficiently unwinds DNA and RNA-DNA hybrids', *Journal of Biological Chemistry*, 293(14), pp. 5259–5269. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000565>.
- Patterson-Fortin, J. and D'Andrea, A.D. (2020) 'Exploiting the Microhomology-Mediated End-Joining Pathway in Cancer Therapy', *Cancer Research*, 80(21), pp. 4593–4600. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-1672>.
- Peng, P.-H., Hsu, K.-W. and Wu, K.-J. (2021) 'Liquid-liquid phase separation (LLPS) in cellular physiology and tumor biology', *American Journal of Cancer Research*, 11(8), pp. 3766–3776.
- Polstein, L.R. *et al.* (2015) 'Genome-wide specificity of DNA binding, gene regulation, and chromatin remodeling by TALE- and CRISPR/Cas9-based transcriptional activators', *Genome Research*, 25(8), pp. 1158–1169. Available at: <https://doi.org/10.1101/gr.179044.114>.
- Příbylová, A. *et al.* (2022) 'DNA methylation can alter CRISPR/Cas9 editing frequency and DNA repair outcome in a target-specific manner', *New Phytologist*, 235(6), pp. 2285–2299. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.18212>.
- Prindle, M.J. and Loeb, L.A. (2012) 'DNA polymerase delta in dna replication and genome maintenance', *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53(9), pp. 666–682. Available at: <https://doi.org/10.1002/em.21745>.
- Pursell, Z.F. and Kunkel, T.A. (2008) 'DNA Polymerase ϵ : A Polymerase of Unusual Size (and Complexity)', in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Elsevier, pp. 101–145. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)00004-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)00004-4).
- Qiu, M., Zhou, X.-M. and Liu, L. (2022) 'Improved Strategies for CRISPR-Cas12-based Nucleic Acids Detection', *Journal of Analysis and Testing*, 6(1), pp. 44–52. Available at: <https://doi.org/10.1007/s41664-022-00212-4>.
- Que, Q. *et al.* (2019) 'Plant DNA Repair Pathways and Their Applications in Genome Engineering', in Y. Qi (ed.) *Plant Genome Editing with CRISPR Systems*. New York, NY: Springer New York (Methods in Molecular Biology), pp. 3–24. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8991-1_1.
- Ran, F.A. *et al.* (2013) 'Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity', *Cell*, 154(6), pp. 1380–1389. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>.
- van Rensburg, R. *et al.* (2013) 'Chromatin structure of two genomic sites for targeted transgene integration in induced pluripotent stem cells and hematopoietic stem cells', *Gene Therapy*, 20(2), pp. 201–214. Available at: <https://doi.org/10.1038/gt.2012.25>.
- Rinaldi, F.C. *et al.* (2017) 'The effect of increasing numbers of repeats on TAL effector DNA binding specificity', *Nucleic Acids Research*, 45(11), pp. 6960–6970. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx342>.

- Roy, S. *et al.* (2013) 'Involvement of *AtPolλ* in the Repair of High Salt- and DNA Cross-Linking Agent-Induced Double Strand Breaks in Arabidopsis', *Plant Physiology*, 162(2), pp. 1195–1210. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.113.219022>.
- Ryu, T. *et al.* (2015) 'Heterochromatic breaks move to the nuclear periphery to continue recombinational repair', *Nature Cell Biology*, 17(11), pp. 1401–1411. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb3258>.
- Rzeszutek, I. and Betlej, G. (2020) 'The Role of Small Noncoding RNA in DNA Double-Strand Break Repair', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), p. 8039. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21218039>.
- Samach, A. *et al.* (2011) 'Identification of Plant *RAD52* Homologs and Characterization of the *Arabidopsis thaliana RAD52* -Like Genes', *The Plant Cell*, 23(12), pp. 4266–4279. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.111.091744>.
- Séguéla-Arnaud, M. *et al.* (2015) 'Multiple mechanisms limit meiotic crossovers: TOP3α and two BLM homologs antagonize crossovers in parallel to FANCM', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(15), pp. 4713–4718. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1423107112>.
- Shaked, H., Avivi-Ragolsky, N. and Levy, A.A. (2006) 'Involvement of the Arabidopsis *SWI2/SNF2* Chromatin Remodeling Gene Family in DNA Damage Response and Recombination', *Genetics*, 173(2), pp. 985–994. Available at: <https://doi.org/10.1534/genetics.105.051664>.
- Smith, J. (2000) 'Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains', *Nucleic Acids Research*, 28(17), pp. 3361–3369. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/28.17.3361>.
- Spampinato, C.P. (2017) 'Protecting DNA from errors and damage: an overview of DNA repair mechanisms in plants compared to mammals', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(9), pp. 1693–1709. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2436-2>.
- Strohkendl, I. *et al.* (2021) 'Inhibition of CRISPR-Cas12a DNA targeting by nucleosomes and chromatin', *Science Advances*, 7(11), p. eabd6030. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd6030>.
- Sugawara, N. *et al.* (1997) 'Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17), pp. 9214–9219. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9214>.
- Sugawara, N., Ira, G. and Haber, J.E. (2000) 'DNA Length Dependence of the Single-Strand Annealing Pathway and the Role of *Saccharomyces cerevisiae RAD59* in Double-Strand Break Repair', *Molecular and Cellular Biology*, 20(14), pp. 5300–5309. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.20.14.5300-5309.2000>.
- Tavares, E.M. *et al.* (2019) 'In vitro role of Rad54 in Rad51-ssDNA filament-dependent homology search and synaptic complexes formation', *Nature Communications*, 10(1), p. 4058. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12082-z>.
- Truong, L.N. *et al.* (2013) 'Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in

- mammalian cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(19), pp. 7720–7725. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1213431110>.
- Tsouroula, K. *et al.* (2016) 'Temporal and Spatial Uncoupling of DNA Double Strand Break Repair Pathways within Mammalian Heterochromatin', *Molecular Cell*, 63(2), pp. 293–305. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.002>.
- Valton, J. *et al.* (2012) 'Overcoming Transcription Activator-like Effector (TALE) DNA Binding Domain Sensitivity to Cytosine Methylation', *Journal of Biological Chemistry*, 287(46), pp. 38427–38432. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.408864>.
- Van Attikum, H. *et al.* (2004) 'Recruitment of the INO80 Complex by H2A Phosphorylation Links ATP-Dependent Chromatin Remodeling with DNA Double-Strand Break Repair', *Cell*, 119(6), pp. 777–788. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.033>.
- Van, C. *et al.* (2015) 'Deposition of histone H2A.Z by the SWR-C remodeling enzyme prevents genome instability', *DNA Repair*, 25, pp. 9–14. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.10.010>.
- Varas, J., Santos, J.L. and Pradillo, M. (2017) 'The Absence of the Arabidopsis Chaperone Complex CAF-1 Produces Mitotic Chromosome Abnormalities and Changes in the Expression Profiles of Genes Involved in DNA Repair', *Frontiers in Plant Science*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00525>.
- Vu, T.V. *et al.* (2022) 'Single-strand annealing: Molecular mechanisms and potential applications in CRISPR-Cas-based precision genome editing', *Biotechnology Journal*, 17(7), p. 2100413. Available at: <https://doi.org/10.1002/biot.202100413>.
- Wang, J. *et al.* (2019) 'Roles of the INO80 and SWR1 Chromatin Remodeling Complexes in Plants', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), p. 4591. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20184591>.
- Wang, J. *et al.* (2021) 'RAD52 Adjusts Repair of Single-Strand Breaks via Reducing DNA-Damage-Promoted XRCC1/LIG3 α Co-localization', *Cell Reports*, 34(2), p. 108625. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108625>.
- Wang, Y. *et al.* (2020) 'NAP1-RELATED PROTEIN1 and 2 negatively regulate H2A.Z abundance in chromatin in Arabidopsis', *Nature Communications*, 11(1), p. 2887. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16691-x>.
- Waterworth, W.M. *et al.* (2009) 'DNA ligase 1 deficient plants display severe growth defects and delayed repair of both DNA single and double strand breaks', *BMC Plant Biology*, 9(1), p. 79. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-79>.
- Waterworth, W.M. *et al.* (2019) 'Phosphoproteomic analysis reveals plant DNA damage signalling pathways with a functional role for histone H2 AX phosphorylation in plant growth under genotoxic stress', *The Plant Journal*, 100(5), pp. 1007–1021. Available at: <https://doi.org/10.1111/tbj.14495>.
- Wei, W. *et al.* (2012) 'A Role for Small RNAs in DNA Double-Strand Break Repair', *Cell*, 149(1), pp. 101–112. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.002>.

- Weiss, T. *et al.* (2022) *Drastic differential CRISPR-Cas9 induced mutagenesis influenced by DNA methylation and chromatin features*. preprint. *Plant Biology*. Available at: <https://doi.org/10.1101/2022.02.28.482333>.
- West, C.E. *et al.* (2000) ‘Arabidopsis DNA ligase IV is induced by gamma-irradiation and interacts with an Arabidopsis homologue of the double strand break repair protein XRCC4’, *The Plant Journal*, 24(1), pp. 67–78. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00856.x>.
- Wu, X. *et al.* (2014) ‘Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells’, *Nature Biotechnology*, 32(7), pp. 670–676. Available at: <https://doi.org/10.1038/nbt.2889>.
- Wunderlich, Z. and Mirny, L.A. (2008) ‘Spatial effects on the speed and reliability of protein–DNA search’, *Nucleic Acids Research*, 36(11), pp. 3570–3578. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkn173>.
- Wyatt, D.W. *et al.* (2016) ‘Essential Roles for Polymerase θ -Mediated End Joining in the Repair of Chromosome Breaks’, *Molecular Cell*, 63(4), pp. 662–673. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.020>.
- Xue, J. *et al.* (2021) ‘The genetic arms race between plant and *Xanthomonas*: lessons learned from TALE biology’, *Science China Life Sciences*, 64(1), pp. 51–65. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1699-4>.
- Yang, G. *et al.* (2018) ‘Super-resolution imaging identifies PARP1 and the Ku complex acting as DNA double-strand break sensors’, *Nucleic Acids Research*, 46(7), pp. 3446–3457. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gky088>.
- Yoshiyama, K. *et al.* (2009) ‘Suppressor of gamma response 1 (*SOG1*) encodes a putative transcription factor governing multiple responses to DNA damage’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), pp. 12843–12848. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0810304106>.
- Yu, W. *et al.* (2020) ‘Repair of G1 induced DNA double-strand breaks in S-G2/M by alternative NHEJ’, *Nature Communications*, 11(1), p. 5239. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19060-w>.
- Zemach, A. and Grafí, G. (2003) ‘Characterization of *Arabidopsis thaliana* methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins: *Methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins in Arabidopsis*’, *The Plant Journal*, 34(5), pp. 565–572. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01756.x>.
- Zhao, S. *et al.* (2019) ‘Plant HP1 protein ADCP1 links multivalent H3K9 methylation readout to heterochromatin formation’, *Cell Research*, 29(1), pp. 54–66. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0104-9>.
- Zhou, W. *et al.* (2016) ‘Distinct roles of the histone chaperones NAP1 and NRP and the chromatin-remodeling factor INO80 in somatic homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*’, *The Plant Journal*, 88(3), pp. 397–410. Available at: <https://doi.org/10.1111/tpj.13256>.
- Zhu, Y. *et al.* (2011) ‘Arabidopsis homologues of the histone chaperone ASF1 are crucial for chromatin replication and cell proliferation in plant development: AtASF1 genes are crucial for plant development’, *The Plant Journal*, 66(3), pp. 443–455. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04504.x>.

Zou, L. and Elledge, S.J. (2003) 'Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes', *Science*, 300(5625), pp. 1542–1548. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1083430>.