

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra experimentální biologie rostlin**

**Vojtěch Čermák**

The seal of the University of Prague is a circular emblem. It features two figures standing on a base. The figure on the left is seated and holding a book, while the figure on the right is standing and holding a staff. The seal is surrounded by a Latin inscription: "SIGILLUM UNIVERSITATIS PRAGENSIS".

**RNA interference u rostlin**

*Bakalářská práce*

**Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.**

**Praha 2010**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

V Praze dne:

Podpis:

## Obsah

Abstrakt.....	1
Abstract.....	2
Seznam použitých zkratk.....	3
Úvod.....	4
Literární přehled.....	6
1. Klíčové složky RNAi.....	6
1.1. Proteiny biogeneze malých RNA.....	7
1.2. Pol IV a Pol V.....	10
1.3. Malé RNA.....	11
1.3.1. MicroRNA.....	11
1.3.2. siRNA.....	14
1.4. Argonaut.....	17
2. Mechanismy RNAi.....	19
2.1. Štěpení RNA a blokování translace.....	19
2.2. Modifikace chromatinu.....	20
2.2.1. RdDM a tvorba heterochromatinu.....	21
2.2.2. Demethylace DNA.....	23
3. Šíření RNAi rostlinou.....	23
Seznam použité literatury.....	26

## **Abstrakt**

RNA interference je jedním z dějů, které umožňují v buňkách regulovat aktivitu genů. Tento proces je většinou spouštěn přítomností dvoušroubovicové RNA v buňce. Z takovéto RNA mohou být vyštěpovány duplexy malých RNA, většinou o délce 20-25 nukleotidů, za pomoci proteinu zvaného Dicer. Jednovláknové malé RNA uvolněné z těchto duplexů jsou základním kamenem RNA interference a lze je třídit do několika skupin na základě jejich biogeneze. U rostlin se setkáváme s miRNA a siRNA. Malé RNA asociují s proteinem zvaným Argonaut a navádějí jej na základě sekvenční komplementarity k cílové molekule. Argonaut může fungovat buďto sám nebo v komplexu s jinými proteiny. V závislosti na charakteru proteinů účastnících se tohoto děje spouští malé RNA různorodé procesy, které mohou vést ke štěpení mRNA (proces, na který stačí samotný komplex Argonaut a malá RNA), blokování translace nebo modifikacím chromatinu. S RNA interferencí se lze setkat u většiny Eukaryot, kde hraje roli ve vývoji organismů, jejich reakci na stres, úpravách chromatinu a také v obraně proti virům. U rostlin se setkáváme s rozmanitou škálou mechanismů, kterými může RNAi fungovat a kterým začínáme teprve postupně rozumět a doceňovat jejich význam.

**Klíčová slova:** RNA interference, miRNA, siRNA, rostliny, *Arabidopsis*, RdDM (RNA directed DNA methylation), PTGS (post-transcriptional gene silencing), TGS (transcriptional gene silencing), transgeny, umlčování genů

## **Abstract**

The process of RNA interference allows cells to regulate functions of their genes. This process is usually initiated by the presence of double-stranded RNA within a cell. Such double-stranded RNA is diced by a specific protein called Dicer into duplexes of small RNAs, usually 20-25 nucleotides long. Single-stranded small RNAs, released from the duplexes, are the heart of RNA interference and they can be categorized into several groups according to their biogenesis. There are two groups of small RNAs in plants: miRNA and siRNA. Small RNAs can associate with a protein called Argonaut and guide it to the target molecule on the bases of sequence complementarity. The Argonaut-small RNA complex can act on itself or it can interact with other proteins in a wide spectrum of processes. The complex can slice the target mRNA (which can be handled by the sole Argonaut and small RNA), it can suppress translation or it can direct chromatin modifications. The phenomena of RNA interference can be found in almost all Eukaryotes where it can serve many functions, for example it can control cell differentiation, participate in stress responses, direct changes in chromatin and defend the organism against viruses. A diverse set of operating modes of RNA interference can be found in plants, which we are only at the beginning to understand and appreciate their consequences.

**Keywords:** RNA interference, miRNA, siRNA, Plants, *Arabidopsis*, RdDM (RNA directed DNA methylation), PTGS (post-transcriptional gene silencing), TGS (transcriptional gene silencing), Transgenes, Gene Silencing

## Seznam použitých zkratk

AGO – Argonaut  
ARF – Auxin Response Factor, *cas*iRNA (*cis*-acting siRNA)  
CMT – chromomethylase  
DCL – Dicer-like, DCR – Dicer  
DME – Demeter  
DML – DME-like  
DRB – dsRNA-binding protein  
DRM – domains rearranged methyltransferase  
dsRNA – double-stranded RNA  
hc-siRNA – heterochromatic siRNA  
HEN1 – Hua Enhancer1  
HYL1 – Hyponastic Leaves1  
IPS – Induced by Phosphate Starvation  
LFY – Leafy  
l-siRNA – long siRNA  
MET1 – methyltransferase1  
miRNA – microRNA  
nat-siRNA – natural *cis*-antisense transcript siRNA  
NRPD – Nuclear RNA Polymerase D  
NRPE – Nuclear RNA Polymerase E  
piRNA – Piwi interacting RNA  
PTGS – post-transcriptional gene silencing  
qiRNA – QDE2 interacting small RNA  
ra-siRNA – repeat-associated siRNA  
RdDM – RNA directed DNA methylation  
RDR – RNA Dependent RNA Polymerase  
RISC – RNA-induced silencing complex  
RNAi – RNA interference  
ROS – repressor of silencing  
scnRNA – small scanRNA  
SDN – Small RNA Degrading Nuclease  
SGS – Suppressor of Gene Silencing  
siRNA – small interfering RNA  
ssRNA – single-stranded RNA  
ta-siRNA – *trans*-acting siRNA  
TGS – transcriptional gene silencing  
VSR – Viral Suppressors of RNA Silencing

## Úvod

RNA interference (RNAi) představuje relativně mladou oblast molekulární a buněčné biologie. Její objev nám umožnil spatřit naprosto novou úroveň regulace genové exprese v organismech, a jak se stále objevují nové poznatky z této oblasti, objevují se i nové procesy, které tento děj mohou ovlivňovat. Porozumění RNAi může přinést alespoň částečné odpovědi na mnohé otázky moderní biologie. Odhaluje dosud neznámé regulační procesy, umožňuje mnohem lépe pochopit komplexitu genových interakcí, dává odpovědi na některé jevy z oblasti epigenetiky a v neposlední řadě umožňuje vysvětlit funkci alespoň části nekódující DNA, jež se nachází v genomech organismů. Funkce RNAi je opravdu rozmanitá – může řídit diferenciaci buněk, morfologický vývoj, odpověď na stresy, může ovlivňovat stav chromatinu v buňce, regulovat transposomy a také může bránit buňku při napadení virem. RNAi má velký význam jako možný prostředek výzkumu, neboť umožňuje selektivně a snadno vyřadit z funkce určitý gen v organismu. Porozumění mechanismů RNAi je nezbytné i pro biotechnologické využití transgenních organismů, neboť RNAi může vést k umlčení transgenů, a tím může zabránit, aby se projevil kýžený efekt v transgenním organismu. V rostlinách se mechanismy RNAi široce diverzifikovaly v souvislosti s potřebou velké flexibility rostlinných organismů, které jsou vázány na jedno dané stanoviště, a musí proto velice pružně reagovat na jakékoliv změny ve svém prostředí.

Myšlenka, že by RNA mohla regulovat aktivitu genů, je téměř stejně tak stará jako první modely regulace genové exprese (Jacob & Monod 1961). Již před objevem RNAi byly známy případy, kdy přítomnost antisense RNA ovlivňovala (snižovala) aktivitu příslušného genu. Předpokládaný mechanismus spočíval ve fyzické interakci antisense RNA s mRNA a blokování její translace. Proces RNAi je však něco trochu odlišného, neboť dvouvláknová RNA spouští specifické katalytické procesy, které následně vedou prostřednictvím malých RNA ke změnám v genové expresi homologních sekvencí. RNAi, aniž se znal její mechanismus, byla poprvé pozorována u rostlin na konci osmdesátých let. Při pokusech o zvýraznění barvy květů za pomoci vneseného transgenů byl sledován naprosto opačný projev, než jaký byl zamýšlen – v důsledku tvorby malých RNA navozených vysokou hladinou exprese genu pro chalcon syntázu došlo i k potlačení exprese vlastního rostlinného genu (tzv. kosupresi). Umlčování exprese genů (gene silencing) se může odehrávat na posttranskripční úrovni (PTGS, zprostředkované štěpením mRNA či blokováním translace) či na úrovni transkripční (TGS, tedy zablokováním vzniku mRNA). Nedlouho po rostlinách byla RNAi pozorována i u houby *Neurospora crassa* a označena termínem „quelling“. Roku 1998 Craig C. Mello a Andrew Fire publikovali článek,

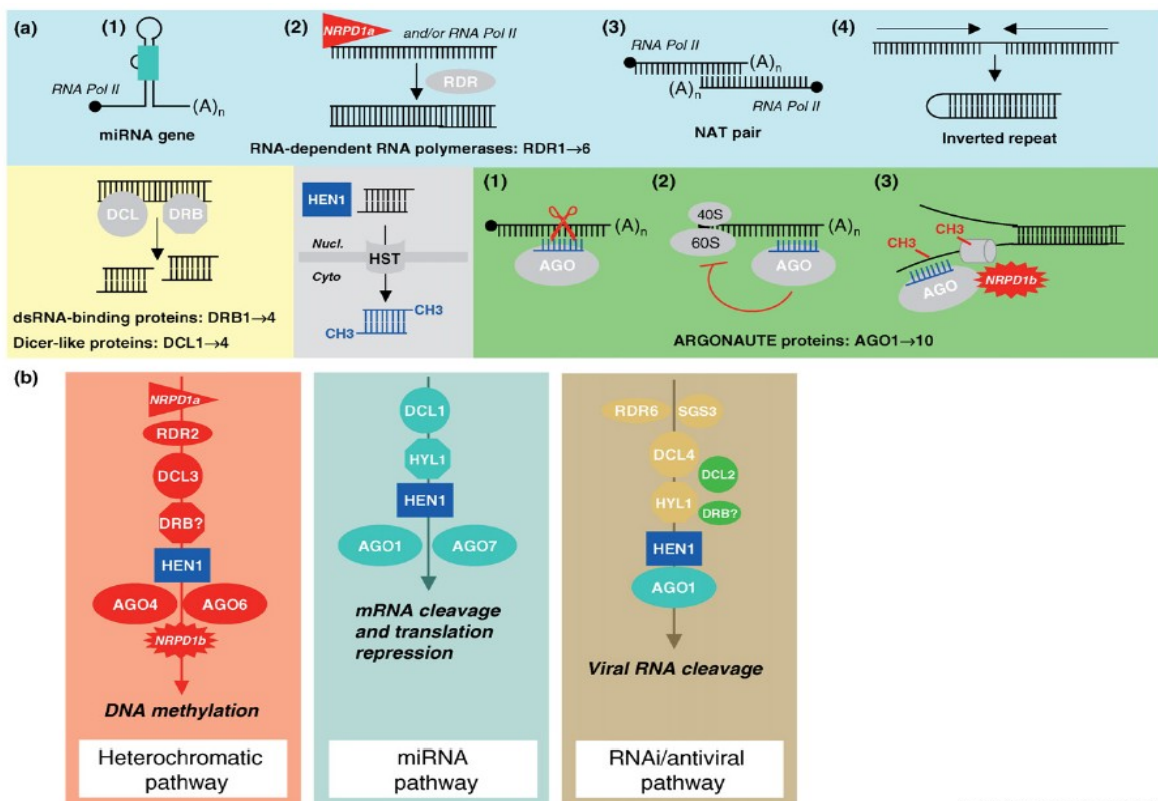
ve kterém popsali jev umlčení genové exprese spouštěný vložením dvouvláknové RNA do buněk *Caenorhabditis elegans* a prokázali tak, že mechanismus umlčování se liší od předpokládaného mechanismu účinku antisense RNA (Fire *et al.* 1998). Tento jev nazvali jako RNA interference a roku 2006 za jeho objev obdrželi Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. Nedlouho po tomto článku se ukázalo, že RNAi může vysvětlit PTGS a TGS u rostlin, quelling u hub a je zodpovědná i za účinky antisense RNA. Od té doby se naše poznání tohoto procesu stále rozvíjí a s ním se rozvíjí i naše porozumění molekulární biologii a genetice. O významnosti tohoto jevu svědčí i to, že jeho objev byl některými označen za nové paradigma v molekulární biologii (Matzke & Matzke 2004). Nezbývá než souhlasit.



# Literární přehled

## 1. Klíčové složky RNAi

Základem fungování RNAi jsou malé RNA, které na principu komplementarity bází rozeznávají cíl působení RNAi. Tento proces má u rostlin několik společných základních kroků, na jejichž počátku stojí dvouvláknová RNA (dsRNA; obr. 1). Ta může vznikat v buňce asociací komplementárních úseků v rámci jedné či dvou molekul RNA syntetizovaných většinou RNA polymerázou II, nebo může být exogenního původu. Do procesů RNAi může vstoupit i jednovláknová RNA bez komplementárního vlákna, a to tak, že je k ní dosyntetizováno druhé vlákno pomocí virové či rostlinné RNA dependentní RNA polymerázy (RDR). Dvoušroubovicový RNA prekursor je zpracován pomocí proteinu Dicer, jímž je z něj vystřížen duplex RNA většinou o délce 20-25 nukleotidů. Jedno z vláken tohoto duplexu, vlastní malá RNA, následně asociuje s efektorovým proteinem nazvaným Argonaut (AGO). Ten může funkci vykonávat samostatně a nebo v interakci s dalšími proteiny.



Obrázek 1: Základní přehled vzniku a fungování různých druhů malých RNA. (a) V modrém poli je možné vidět vznik dvoušroubovicové RNA: (1) prekursor miRNA v podobě vlásenky, (2) syntéza dvouvláknového prekursoru pomocí RDR, (3) transkripty dvou vzájemně se překrývajících genů (NATs) a (4) invertovaná repetice. Ve žlutém poli vyštěpení duplexu malých RNA pomocí DCL. V šedivém poli export z jádra (pokud k němu dochází). V zeleném poli jsou možné způsoby působení malých RNA. (1) Štěpení transkriptu, (2) blokování translace a (3) methylace DNA. (b) Jednotlivé dráhy a proteiny, které se jich účastní. Převzato z: Voinnet (2008)

## 1.1. Proteiny biogeneze malých RNA

K vystřížení malé RNA z dvoušroubovicového prekurzoru je potřeba proteinu z rodiny Dicer. Dicer (DCR) patří do skupiny ribonukleáz typu III a jeho rostlinný homolog se označuje jako Dicer-like (DCL). Úseky dsRNA, které vyštěpením vzniknou, nesou 5' monofosfát a 3' hydroxylovou skupinu. 3' konce duplexu mají dvounukleotidový přesah. Dicer většinou obsahuje šest funkčních domén. O navázání a štěpení dsRNA se starají domény PAZ, RNase III a dsRBD. Katalytickou funkci má doména RNase III, která se v proteinu vyskytuje dvakrát, vlastní štěpení následně probíhá na základě intramolekulární dimerizace těchto domén (Zhang *et al.* 2004). PAZ doména váže dvounukleotidový přesah na 3' konci a její vzdálenost od domény RNase III pravděpodobně rozhoduje o délce vystřížené malé RNA (MacRae *et al.* 2006). Savci, kvasinky a hád'átka kódují jeden DCR a *Drosophila* dva. Naproti tomu rostlinné DCL jsou mnohem rozmanitější, *Arabidopsis* kóduje čtyři typy DCL a jednoděložné rostliny mají zřejmě pět typů DCL (Margis *et al.* 2006). Jednotlivé rostlinné DCL se odlišují svojí účastí v biogenezi různých typů malých RNA a také tím, jak dlouhé malé RNA produkují (Kasschau *et al.* 2007). Zároveň jsou ale ve svých funkcích poměrně redundantní (Gascioli *et al.* 2005), a to obzvláště při obraně rostliny proti virům. Právě účast DCL na rostlinné obraně proti virům zřejmě sehrála roli v jejich diversifikaci. Rostlinné viry totiž kódují proteiny schopné potlačovat různé složky RNAi a pro rostlinu je tedy vhodné, aby ztrátu jedné složky obrany proti virům byla schopna nahradit složkou jinou (Deleris *et al.* 2006).

Nejvýraznější funkcí DCL1 je jeho podíl na tvorbě miRNA, podílí se ale i na tvorbě sekundárních nat-siRNA a také na vzniku l-siRNA (popis různých typů RNA přináší kapitola 1.3). Malé RNA produkované DCL1 jsou převážně 21 nukleotidů dlouhé. Vzhledem k charakteru prekurzoru miRNA a k charakteru transkriptu některých transgenů či virů, které také mohou být zpracovány pomocí DCL1 (Dunoyer *et al.* 2007), se zdá, že DCL1 se specializoval na produkci malých RNA z vlásenek s nedokonalým párováním bází. Funkcí DCL2 je produkce primárních nat-siRNA a hraje významnou roli v obraně proti virům. Prekurzory, které zpracovává, jsou především produkty RDR6, často se tedy také účastní produkce sekundárních RNA – například při umlčování sense transgenů (Mlotshwa *et al.* 2008). DCL3 se specializuje na produkci 24 nukleotidů dlouhých siRNA řídících tvorbu heterochromatinu (hc-siRNA), jež vyštěpuje z prekurzorů vytvořených pomocí RDR2. V případě jeho nefunkčnosti ale může být částečně nahrazen DCL2 a DCL4, produkujícími malé RNA jiných délek (Deleris *et al.* 2006). Posledním z Dicer-like proteinů *Arabidopsis* je DCL4, ten

se podílí na tvorbě ta-siRNA a hraje významnou úlohu v obraně proti virům. Stejně jako u DCL2 jsou jeho prekurzory často produkty RDR6 (Yoshikawa *et al.* 2005; Deleris *et al.* 2006).

S DCL při vystřížení duplexu RNA z prekurzoru spolupracují proteiny z rodiny **DRB** (dsRNA-binding protein). Jde o rodinu proteinů s dsRNA vazebnou doménou. U *Arabidopsis* je známo celkem pět těchto proteinů. HYL1 (Hyponastic Leaves1) je potřeba pro biogenezi miRNA a interaguje s DCL1 ve specifickém jaderném subkompartmentu – D-bodies (Fang & Spector 2007). DRB4 interaguje s DCL4 v biogenezi ta-siRNA (Adenot *et al.* 2006). Je možné, že i ostatní proteiny z této rodiny se ve spolupráci s DCL podílí na dalších drahách biogeneze malých RNA.

Malé rostlinné RNA jsou na svých 3' koncích běžně methylovány. Stejně tak jsou methylovány i malé RNA jiných organismů, ale například savčí miRNA methylovány nejsou. Tato funkce je vykonávána proteinem **HEN1** (Hua Enhancer). HEN1 rozpoznává nukleotid na 3' konci vlákna RNA, jenž je součástí duplexu vystříženého pomocí DCL, a naváže na jeho 2' hydroxylovou skupinu methyl. Tato modifikace poté brání degradaci malé RNA. Malé RNA bez methylace na svém 3' konci jsou v tomto místě uridylovány (Li *et al.* 2005). Exoribonukleáza SDN1 (Small RNA Degrading Nuclease) je zodpovědná za degradaci právě takovýchto malých RNA bez 2'-O metylové modifikace na 3' konci, avšak SDN1 se nezaměřuje na degradaci uridylovaných malých RNA, ba naopak, degradace uridylovaných malých RNA je pomalejší, než u těch neuridylovaných (Ramachandran & Chen 2008). Nelze tedy říct, jestli uridylylace složí jako značení pro degradaci (např. nějakému jinému proteinu než SDN1), jak bylo naznačeno při jejím objevu u malých RNA.

Pro organismus může být vhodné mít schopnost zpracovat mechanismy RNAi i jednovláknové transkripty, které nevytváří přirozeně žádné dvoušroubovicové úseky v podobě vlásenek, nebo překryvem dvou komplementárních transkriptů. K tomu u rostlin, kvasinek, hád'átek a některých dalších organismů slouží specializované RNA dependentní RNA polymerázy (u *Arabidopsis* značeny **RDR**), které jsou schopny k ssRNA syntetizovat komplementární vlákno a vytvořit tak dsRNA. Například savci ale tyto polymerázy nemají, důvodem může být, že procesy, které jsou na nich u rostlin závislé, vykonávají jiné mechanismy (např. piRNA, jež ve své biogenezi nemají dvouvláknový duplex RNA), případně by jejich funkci teoreticky mohla zastávat DNA dependentní RNA polymeráza II, u které byla prokázána i RNA dependentní RNA polymerázová aktivita (Lehmann *et al.* 2007; Zong *et al.* 2009). RDR dokáží katalyzovat polymerázovou reakci jak s primerem, tak bez primeru. Na primeru nezávislá syntéza je iniciována na 3' konci templátu. Templátem může být ssRNA i ssDNA, nikoliv však dsRNA nebo dsDNA. RDR má

také terminální transferázovou aktivitu, kdy na 3' konec RNA přidává buďto adenosin nebo guanosin (Schiebel *et al.* 1993). U houby rodu *Neurospora* (a také u *Caenorhabditis*) může příslušný homolog RDR katalyzovat, nezávisle na primeru, syntézu 9-21 nukleotidů dlouhých RNA z celé délky templátu (tedy iniciace není vázaná jen na 3' konec) a vytvářet tak siRNA, které ke své syntéze nepotřebují DCR (Makeyev & Bamford 2002). Zdáli je toto možné i u rostlin není známo, všechny dosud popsané způsoby syntézy malých RNA jsou na DCL závislé. Genom *Arabidopsis* kóduje celkem šest RDR, funkce tří blízce příbuzných RDR3a, RDR3b a RDR3c není známa, ostatní se podílejí na obraně proti virům nebo například na produkci sekundárních siRNA. RDR1 hraje hlavní roli v obraně rostlin proti virům a je silně exprimována v přítomnosti kyseliny salicylové (SA), což je rostlinný hormon hromadící se při stresu, např. v důsledku virové nákazy. S RDR1 na obraně proti virům spolupracují proteiny DCL2 a DCL4 (Diaz-Pendon *et al.* 2007). RDR2 se specializuje na biosyntetickou cestu pro tvorbu siRNA, které řídí vznik heterochromatinu, na rozdíl od DCL3 ale není v této cestě nahraditelná (Kasschau *et al.* 2007). RDR6 je třeba pro vznik ta-siRNA (Yoshikawa *et al.* 2005), nat-siRNA (Borsani *et al.* 2005), dále je potřeba během PTGS sense transgenů a pro ochranu proti virům. Jako templát pro RDR6 slouží v těchto procesech především aberantní RNA, tedy například RNA bez 5' čepičky nebo bez 3' poly-A konce. Aberantní RNA může vzniknout v případě, když RNA polymeráza II ignoruje terminátor nebo také rozštěpením transkriptu zprostředkovaným siRNA nebo miRNA (Gazzani *et al.* 2004; Luo & Chen 2007). Protože aberantní transkripty vznikají v organismu v určitém množství běžně, neboť nic nemůže fungovat dokonale, tak je třeba nějakým způsobem regulovat to, aby se templátem pro RDR6 nestávaly produkty genů, které rostlina potřebuje. Jedním z takových mechanismů může být konkurence ze strany procesů pro degradaci RNA. Transkripty, kterým chybí 5' čepička jsou běžně u rostlin degradovány exonukleázami z rodiny XRN (degradují transkript ve směru 5' → 3') a transkripty bez 3' poly-A konce pak exosomem (degraduje transkripty ve směru 3' → 5'). Templátem pro RDR6 se tak stanou jen ty RNA, které buďto dokáží tento degradační systém přesytit nebo se mu vyhnout (Gazzani *et al.* 2004). Dalším faktorem, který rozhoduje o tom, jestli se transkript stane templátem pro RDR6, může být přítomnost proteinu Argonaut (AGO). Například AGO7 je v některých případech biogeneze ta-siRNA pravděpodobně zodpovědný za navedení RDR6 k templátu a nebo alespoň za jeho stabilizaci. RDR6 má také funkci v obraně proti virům, kde může nahradit RDR1, kterou některé viry často umlčují (Diaz-Pendon *et al.* 2007). Nejvíce RDR6 spolupracuje s DCL4, ale často jsou její produkty zpracovány DCL2 případně i DCL3 (Gascioli *et al.* 2005). To jaký RDR protein vytváří daný prekurzor pro malé RNA, má velmi často vliv na to, jaký DCL protein následně tento prekurzor zpracovává

(příklady uvedeny výše). Tento jev může být dán například kolokalizací daných proteinů v buňce (Pontes *et al.* 2006) nebo interakcí mezi DCL a RDR, avšak přímá interakce mezi těmito proteiny byla zatím prokázána jen u kvasinek (Colmenares *et al.* 2007).

## 1.2. Pol IV a Pol V

Kromě běžných DNA dependentních RNA polymeráz, tedy Pol I, II a III, má *Arabidopsis* ještě další dvě polymerázy, a to RNA polymerázu IV a V (Pol IV a Pol V). Tyto polymerázy se specializovaly na funkce v RNAi, kde se účastní na procesu RdDM (RNA-directed DNA methylation), a tím na umlčení transposomů, repetice a transgenů, dále se také účastní například šíření signálu RNAi mezi rostlinnými buňkami i pletivy, odpovědi na biotické a abiotické stresy nebo regulace doby kvetení (Kanno *et al.* 2005; Borsani *et al.* 2005; Dunoyer *et al.* 2007; Katiyar-Agarwal *et al.* 2007; Brosnan *et al.* 2007; Bäurle *et al.* 2007). Obě tyto polymerázy jsou blízkými paralogy k Pol II, se kterou sdílejí i některé podjednotky. Pol IV má celkem čtyři unikátní podjednotky a Pol V má celkem šest unikátních podjednotek, ostatní podjednotky jsou mezi polymerázami sdíleny. Obě tyto polymerázy se od Pol II liší především v obou katalytických podjednotkách, tedy v tzv. největší a druhé největší podjednotce (Ream *et al.* 2009). Největší podjednotka se značí jako NRPD1 u Pol IV, respektive NRPE1 u Pol V. NRP (Nuclear RNA Polymerase) je způsob označení DNA dependentních RNA polymeráz u *Arabidopsis*, A až E poté značí příslušnost k Pol I až k Pol V a číslo označuje podjednotku. Pro druhou největší podjednotku má *Arabidopsis* jen jeden funkční gen, a tak ji obě polymerázy sdílejí, tato podjednotka se značí jako NRPD2/NRPE2 či jen NRPD2 nebo NRPE2. Avšak kukuřice má hned tři geny pro druhou největší podjednotku, všechny jsou zřejmě aktivní a ačkoliv jsou tyto podjednotky z velké části redundantní, tak se zdá, že mají i určité funkční odlišnosti (Sidorenko *et al.* 2009). Pol IV a Pol V byly dříve, před tím, než byla podrobněji popsána jejich funkce, značeny jako Pol IVa a Pol IVb. Jejich největší podjednotky byly pak značeny jako NRPD1a respektive NRPD1b. Jak Pol IV, tak Pol V jsou katalyticky funkční a mohou syntetizovat RNA. Největší podjednotky Pol II, IV a V se odlišují především v C-terminální doméně, Pol IV a V mají DeCL (defective chloroplast and leaves) motiv a Pol V má navíc WG/GW motiv potřebný pro asociaci s AGO4 (El-Shami *et al.* 2007). Pol IV je třeba pro vznik siRNA řídících tvorbu heterochromatinu (hc-siRNA). K RNA transkriptu vytvořenému Pol IV je pomocí RDR2 nasyntetizováno druhé vlákno a vzniklý prekursor je následně štěpen pomocí DCL3 na 24 nukleotidů dlouhé hc-siRNA. Pol IV zřejmě přepisuje především metylovanou DNA (Onodera *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2007). Některé geny, jež mají v promotorech tandemové repetice, však může Pol IV přepisovat i když nejsou metylovány

(Chan *et al.* 2006). Zdá se, že je také možné, aby Pol IV přepisovala i dsRNA vzniklou z transkriptů methylovaných oblastí (Pontes *et al.* 2006; Daxinger *et al.* 2009). hc-siRNA které v tomto procesu vytvoří DCL3 následně interagují s AGO4 (nebo v některých případech s AGO6), který ve spolupráci s Pol V může řídit metylaci DNA. Pol V se tedy neúčastní produkce malých RNA, ale je zřejmě nezbytná v procesu *de novo* methylace DNA řízené malými RNA (proces RdDM je popsán v kapitole 2.2.1).

### 1.3. Malé RNA

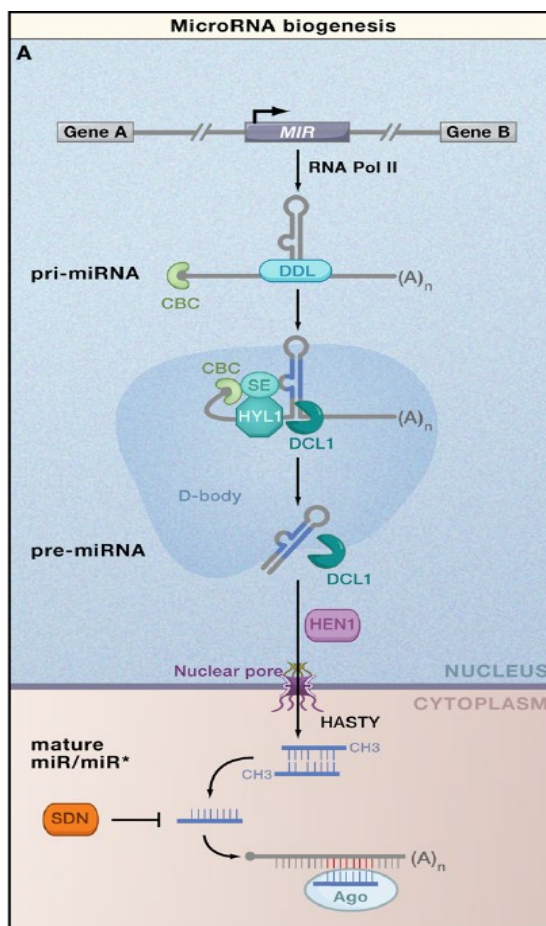
Malé RNA jsou klíčovou složkou v procesech RNA interference. Jejich délka se pohybuje zpravidla mezi 20-25 nukleotidy. U rostlin typicky vznikají z dvoušroubovicové RNA (což může být jednovláknová RNA s vlásenkou nebo dvouvláknová RNA). Na základě své biogeneze se dělí do několika skupin. Dvě základní nejvýznamnější skupiny vyskytující se u rostlin jsou miRNA a siRNA. miRNA jsou endogenního původu a vznikají z vlásenky na jednovláknovém prekursoru s nedokonalým párováním bází, kdežto siRNA mohou být jak endogenního, tak exogenního původu a mohou vznikat z jednovláknových i dvouvláknových prekurzorů s dokonalým nebo téměř dokonalým párováním bází (Ambros *et al.* 2003; Meyers *et al.* 2008). Další významnou skupinou jsou piRNA (některé z nich se také často nazývají ra-siRNA), tyto RNA se nachází pouze u živočichů, kde hrají významnou roli v ochraně genomu pohlavních buněk – umlčují retrotransposomy a repetitivní sekvence. Jejich typickou vlastností je vznik nezávislý na enzymu Dicer a interakce se specifickou skupinou proteinů Argonaut nazývanou Piwi. Mimo tyto tři typy malých RNA se v literatuře lze setkat s celou řadou dalších možných názvů, které často označují podskupinu některé z výše zmíněných skupin nebo jde o unikátní typ specifický pro určitou skupinu organismů. Například to jsou: ta-siRNA (zprostředkovávají působení miRNA mezi buňkami rostlin), nat-siRNA (regulují genovou expresi; vznikají z genů, které se navzájem částečně sekvenčně překrývají), hc-siRNA (řídí tvorbu heterochromatinu), scnRNA (řídí eliminaci sekvencí DNA v makronukleu nálevníků) a qiRNA (podílí se na kontrole poškození DNA některých hub; rod *Neurospora*).

#### 1.3.1. MicroRNA

MicroRNA dnes patří k nejprobádanějším. Jejich délka se pohybuje v rozmezí 21-24 nukleotidů. miRNA jsou endogenního původu, jejich prekursorů vznikají transkripcí MIR genů nejčastěji polymerázou II (Lee *et al.* 2004). Regulují zpravidla genovou expresi *in trans*, tedy působí na jiný lokus, než ze kterého vznikají, oproti tomu siRNA často působí *in cis*, avšak není to pravidlem. Fungování miRNA je na posttranskripční úrovni, i když dnes jsou již známy výjimky

i z tohoto pravidla (Khraiwesh *et al.* 2010). Na základě sekvenční podobnosti je možné geny pro miRNA třídit do genových rodin. U rostlin jsou tyto geny lokalizovány převážně v mimogenových oblastech, kdežto u živočichů se nejčastěji vyskytují v genových oblastech, často v intronech kódujících genů (v těchto případech se biogeneze miRNA, tak jak je popsána níže, mírně odlišuje a prekurzor vzniká přímo z vystřiženého intronu; Rodriguez *et al.* 2004).

Transkripce typických MIR genů vzniká primární transkript (pri-miRNA), který je poté zpracován do vlásenkového prekurzoru (pre-miRNA), z tohoto prekurzoru je vystřižen duplex miRNA/miRNA\* (obr. 2). Na zpracování jak primárního transkriptu pri-miRNA, tak pre-miRNA prekurzoru a vystřižení duplexu se u rostlin podílí protein DCL1. V některých případech tuto funkci zastávají i jiné DCL proteiny – zřejmě u evolučně mladých MIR genů (Rajagopalan *et al.* 2006; Vazquez *et al.* 2008). Pre-miRNA či již vyštěpený duplex je z jádra transportován do cytoplazmy. Duplex je zároveň 2'-O-methylován na svém 3' konci, což brání degradaci (stejně tak je methylována i siRNA; Li *et al.* 2005). Z duplexu je vybráno jedno vlákno vlastní miRNA a to asociuje s proteinem Argonaut, druhé vlákno (miRNA\*) je zpravidla degradováno. miRNA regulují expresi



Obrázek 2: Schéma biogeneze miRNA. Převzato z: Voinnet (2009)

genů posttranskripčně působením na mRNA, na které se u rostlin váží s vysokou komplementaritou převážně v kódujících oblastech mRNA (Rhoades *et al.* 2002), naproti tomu u živočichů se váží s nižší komplementaritou na více cílů a zpravidla ve 3' nepřekládané oblasti. Hlavním efektoem tohoto děje je u rostlin AGO1, který je schopen mRNA jednak štěpit a jednak s pomocí dalších navázaných proteinů dokáže blokovat translaci (Brodersen *et al.* 2008). Obě tyto možnosti působení se zřejmě často překrývají, přičemž štěpení se zdá být vhodným způsobem pro ireverzibilní změny, jako je například determinace osudu buněk ve vývoji, a naopak blokování translace může být vhodnější pro krátkodobější a reverzibilní odpovědi rostliny jako je reakce na stres, avšak v principu mohou oba způsoby regulovat jak reverzibilní tak ireverzibilní děje (Voinnet 2009).

Regulace exprese MIR genů se může odehrávat na několika úrovních. Geny pro miRNA mají vlastní promotor s TATA box sekvencí, jenž může být regulován různými transkripčními faktory (Xie *et al.* 2005). V promotorech MIR genů *Arabidopsis* byla nalezena vazebná místa pro transkripční faktory řízené rostlinnými hormony, jako je například ARF (potlačuje genovou expresi v nepřítomnosti auxinu), LFY nebo MYC2. Navíc také některé z těchto transkripčních faktorů jsou zpětně regulovány pomocí miRNA (Megraw *et al.* 2006). Na rozdíl od živočichů je u rostlin známo jen málo regulačních faktorů ovlivňujících maturaci miRNA, příkladem může být kompetice mezi DCL1 a DCL3, kdy DCL3 je mnohem hojnější v listech a vytváří tam jinou skupinu miRNA, než by vytvářel DCL1 (Vazquez *et al.* 2008). Dalším příkladem je exprese některých SINE elementů, které svou strukturou připomínají prekursorů miRNA a blokují tak HYL1, protein nezbytný pro maturaci miRNA. Exprese miRNA může být též regulována globálně, změnami hladin proteinů AGO1 a DCL1, ty mohou být například regulovány i samotnými miRNA (Mallory & Vaucheret 2009). Zvláštním případem regulace miRNA je nekódující gen IPS1, který má sekvenci komplementární k miRNA (miR-399), avšak v místě, kde dochází ke štěpení, se nachází smyčka, která tomuto štěpení brání, a tím tento gen může blokovat fungování příslušné miRNA (Franco-Zorrilla *et al.* 2007).

Významnou funkcí miRNA je jejich role ve vytváření struktury organismu, tedy především v diferenciaci buněk a orgánů, mnoho miRNA má pak podobný význam jako transkripční faktory či regulátory růstu (Rhoades *et al.* 2002). V poslední době se navíc ukazuje, že miRNA hrají také významnou roli například v adaptaci na biotické i abiotické stresy. Další rolí miRNA je jejich funkce ve tvorbě ta-siRNA, které na rozdíl od známých miRNA nepůsobí na buňku pouze autonomně, ale mohou se mezi jednotlivými buňkami i šířit a zprostředkovat tak signál miRNA na dálku (Tretter *et al.* 2008).

### **1.3.2. siRNA**

Oproti miRNA jsou zdroje siRNA mnohem variabilnější. Dvoušroubovicové RNA, prekursorů pro tvorbu siRNA, mohou vznikat replikací virů, transkripcí invertovaných repetit, konvergentní transkripcí transposomů či transgenů. Alternativně může být dsRNA produkována pomocí RDR syntézou komplementárního vlákna k ssRNA, kterou může představovat například aberantní mRNA, nebo transkript pro rostliny unikátní polymerázy IV. Velmi rozmanité jsou i způsoby působení siRNA – štěpení mRNA, blokování translace a indukce methylace DNA a histonů.

Malé RNA vyštěpené z dsRNA, vznikající dvousměrnou transkripcí částečně vzájemně se překrývajících genů, tedy dvou genů ležících na opačných vláknech DNA (tzv. *cis*-antisense

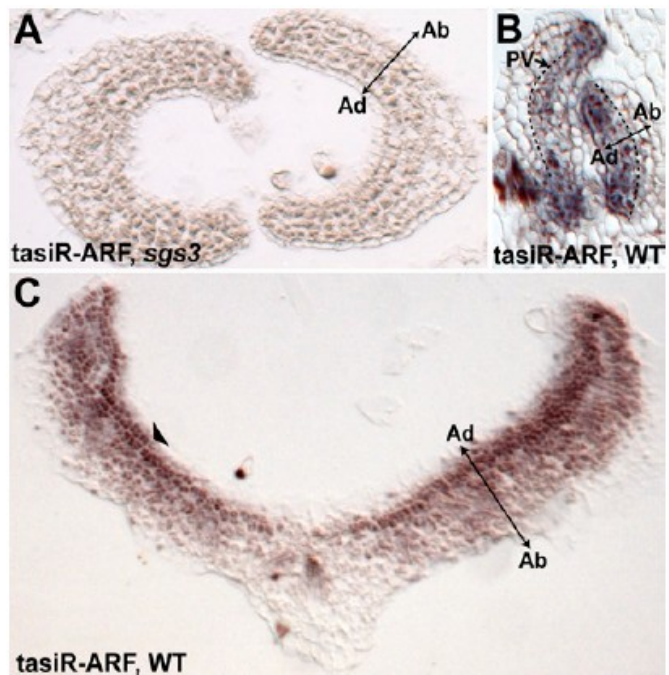


genes), bývají často nazývány **nat-siRNA** (natural *cis*-antisense transcript siRNA; cis-NAT siRNA). Podobných genů se nachází v genomech organismů relativně velké množství, například tvoří přibližně 22-26 % všech lidských genů a 8,9 % všech genů *Arabidopsis*. Všechny takovéto geny mohou být potenciálním zdrojem nat-siRNA. U *Arabidopsis* zhruba 64 % těchto genů, které byly podrobeny analýze, bylo schopno vytvářet nat-siRNA (Jin *et al.* 2008). Jejich nejvýznamnější funkcí je reakce na stres. Příkladem takového genu může být gen, jenž je umlčen solným stresem (P5CDH). S tímto genem se překrývá gen jiný, neznámé funkce, jehož exprese je spuštěna právě solným stresem. Pokud jsou exprimovány oba geny, je z oblasti, kde jsou si navzájem komplementární, generována 24 nukleotidů dlouhá primární nat-siRNA pomocí DCL2. Tato nat-siRNA následně řídí štěpení transkriptu P5CDH. Rozštěpený transkript je dále využit k tvorbě sekundární nat-siRNA, za pomoci RDR6 a DCL1, která daný efekt ještě zesiluje. Zatím neznámou roli v tomto procesu hraje NRPD1 (Borsani *et al.* 2005). Podobný proces funguje i při odpovědi rostliny na některé biotické stresy (Katiyar-Agarwal *et al.* 2006). Mimo nat-si RNA jsou NATs také zdrojem **l-siRNA** (long siRNA), které dostaly toto jméno pro svoji neobvyklou délku 30-40 nukleotidů. Jejich biogeneze je zřejmě podobná nat-siRNA, ačkoliv je řízena jinými proteiny. Nejprve pravděpodobně vzniká primární l-siRNA pomocí DCL1 a poté sekundární l-siRNA, jejíž vznik závisí na NRPD1, RDR6, a DCL4, dosud neurčenou roli zde má také AGO7. l-siRNA jsou pro rostlinu důležité při odpovědi na napadení patogenem (Katiyar-Agarwal *et al.* 2007). NATs ale nehrají roli jen v RNA interferenci, jejich repertoár je mnohem rozsáhlejší od inaktivace X chromosomu až po editaci RNA.

Příkladem vzájemné interakce drah řízených malými RNA jsou **ta-siRNA**. Jak již bylo zmíněno, produkce ta-siRNA je řízena miRNA, které štěpí prekurzor vznikající transkripcí TAS lokusu polymerázou II. Produkty tohoto štěpení jsou následně zpracovány SGS3 (stabilizuje naštěpený transkript) a RDR6 na dvouvláknovou RNA, ze které jsou za pomoci DCL4 generovány 21 nukleotidů dlouhé ta-siRNA, jež mohou poté posttranskripčně regulovat genovou expresi (Yoshikawa *et al.* 2005). U *Arabidopsis* jsou známy čtyři rodiny genů kódujících ta-siRNA. TAS1 reguluje geny neznámé funkce, TAS2 reguluje geny kódující proteiny s pentatricopeptidovým (PPR) motivem, TAS3 reguluje auxinem řízené transkripční faktory (ARF) a TAS4 reguluje transkripční faktor MYB (Rajagopalan *et al.* 2006). To, co odlišuje prekursor ta-siRNA od ostatních transkriptů, jež jsou regulovány miRNA, a umožňuje tak určit, které transkripty po rozštěpení pomocí miRNA vstoupí do dráhy produkující ta-siRNA, je nespíš přítomnost dvou komplementárních míst pro miRNA na transkriptu z TAS lokusu. Takovým způsobem štěpení pak vznikne produkt, který nemá ani 3' poly-A konec ani 5' čepičku a nemůže

tak být pravděpodobně degradován XRN exonukleázami ani exosomem (zmíněno výše). V případě TAS3 lokusu AGO7 druhé místo neštěpí (kvůli nepřesnému párování) a slouží zde nejspíš ke stabilizaci RNA, nebo přímo k navedení RDR6 k templátu (Axtell *et al.* 2006; Montgomery *et al.* 2008). ta-siRNA se oproti dosud známým miRNA mohou šířit mezi rostlinnými buňkami, příkladem toho může být *tasiR-ARF*, jenž řídí expresi transkripčního faktoru ARF3, a podílí se tím na tvorbě morfologie listu u rostlin.

Produkce *tasiR-ARF* je řízena pomocí miR390 a je lokalizována na adaxiální



Obrázek 3: Lokalizace *tasiARF* (tmavší barva) ve vznikajícím listu. (A) Kontrola neobsahující *tasiARF*. (B) Lokalizace v listových primordiích. (C) Lokalizace ve starším listu. Ad – adaxiální (svrchní) a Ab – abaxiální (spodní) strana listu. Převzato z: Chitwood *et al.* (2009)

(svrchní) straně vznikajícího listu ve vrstvách L1 a L2, avšak transportem *tasiR-ARF* vzniká gradient přes celý list, který slábne směrem k abaxiální (spodní) straně listu (obr. 3). Lokalizace vzniku *tasiR-ARF* na adaxiální straně je v tomto případě určena lokalizovanou expresí AGO7, který je efektozem funkce miR390 (Chitwood *et al.* 2009; Schwab *et al.* 2009).

Repetitivní sekvence, jako jsou transposomy, retroelementy, ribozomální RNA a repeticce centromer mohou také dávat vznik siRNA Tyto siRNA se občas označují jako **hc-siRNA** nebo také *casiRNA* (*cis*-acting siRNA). Jejich funkcí je methylace DNA v lokusech, ze kterých samy vznikly (odtud název *cis*-acting), a tím i tvorba a udržování heterochromatinu. Prekursory *hc-siRNA* jsou transkribovány polymerázou IV (u kvasinek zastává tuto funkci polymeráza II), druhé vlákno je posléze doplněno pomocí RDR2. Vzniklá dvouvláknová RNA může být štěpena pomocí DCL3 a produkovat tak 24 nukleotidů dlouhé *hc-siRNA*. Na rozdíl od RDR2 je funkce DCL3 částečně redundantní a může být v některých případech nahrazena jinými DCL, které však produkují *hc-siRNA* o jiných délkách (21 a 22 nukleotidů; Kasschau *et al.* 2007). Vniklé *hc-siRNA* následně asociují s AGO4, případně s AGO6, a účastní se RdDM (celá dráha je podrobně popsána níže).

Všechny dosud popisované malé RNA byly endogenního původu. RNA interference je ale spouštěna i exogenními RNA jako jsou virové RNA, transkripty transgenů a nebo RNA vnesené do rostliny experimentálně. Umlčení může být spuštěno transgenem s invertovanou repeticí nebo

i běžným „sense“ transgenem. Invertované repetice po přepsání do RNA vytvoří vlásenku s intramolekulárním dvoušroubovicovým úsekem a mohou se tak stát substrátem pro DCL, nejčastěji pro DCL4 případně i DCL3. Použití různých DCL vede k možnému širokému spektru účinků těchto transgenů – posttranskripční umlčení exprese genů, šíření signálu mezi buňkami a methylace DNA (Brodersen & Voinnet 2006). Sense transgeny potřebují k vytvoření dvouvláknového úseku funkci RDR6. Jak již bylo zmíněno, tak substrátem pro RDR6 jsou aberantní RNA. Tvorby aberantních RNA lze u transgenů dosáhnout několika způsoby: přítomností přímých opakování (které pravděpodobně mohou způsobit předčasnou terminaci, či abortivní elongaci), absencí terminátoru nebo příliš silným promotorem (při velké intenzitě transkripce nemusí některé terminátory fungovat spolehlivě; Luo & Chen 2007). Dvouvláknová RNA je následně zpracována DCL a způsobuje umlčení komplementárních sekvencí. Hladiny takto produkované siRNA závisí na AGO1 (Boutet *et al.* 2003), který by mohl hrát roli v amplifikaci tohoto procesu. Po vytvoření komplexu s siRNA, vzniklými z aberantní RNA, zřejmě AGO1 štěpí další transkripty z tohoto lokusu, které se pak stávají substrátem pro RDR6 a vedou ke vzniku dalších siRNA.

RNAi je jedním z hlavních mechanismů obrany proti virům u rostlin, které jsou hlavním exogenním zdrojem malých RNA. Pro siRNA produkované z virových RNA se někdy užívá označení **viRNA**. Tyto siRNA mohou vznikat z replikujících se virů, z vlásenek, které virové RNA vytváří, nebo z dsRNA vzniklých v případě překryvu virem produkovaných RNA. Ve většině případů se na produkci těchto siRNA podílí DCL4, který může být nahrazen DCL2 (Deleris *et al.* 2006). DCL3 hraje roli převážně v obraně proti DNA virům a role DCL1 je spíše okrajová. Na tvorbě virových siRNA se také často podílí jednotlivé RDR, které mohou rozpoznávat virovou RNA jako aberantní. To je dáno buďto samotným charakterem virové RNA nebo důsledkem rozštěpení virové RNA za pomoci siRNA vzniklých některým z výše zmíněných mechanismů, který je na RDR nezávislý. Produkce takovýchto sekundárních siRNA je potřeba pro rozšíření umlčujícího signálu do vzdálenějších pletiv (viz níže), zatímco pro rozšíření do sousedních buněk je postačující primární RNA. Viry kódují řadu proteinů, souhrnně označovaných jako VSR (Viral Suppressors of RNA Silencing), které jsou schopny blokovat mnohé ze složek RNAi. Také je možné, aby virový genom obsahoval sekvence, které poté, co je rostlina rozštěpí na malé virové RNA, štěpí následně i některé rostlinné mRNA. Tyto mRNA mohou být například produkty genů potřebných pro obranu proti virům. Některé viry jsou tedy schopny proti rostlině obrátit její vlastní zbraně. Na důležitost RNAi v obraně proti virům

poukazuje i to, že geny kódující složky RNAi patří k těm nejrychleji se evolučně vyvíjejícím v celém genomu (Ding & Voinnet 2007).

#### 1.4. Argonaut

Argonaut (AGO) je efektozem RNA interference. Jeho základní vlastností je schopnost štěpit ssRNA (slicing) na základě komplementarity s malou RNA. Štěpení ale není jedinou funkcí, kterou může vykonávat. Často Argonaut váže další proteiny a důsledkem této kooperace může být například blokování translace, degradace cílové RNA, methylace DNA nebo methylace histonů. Komplex Argonaut a malá RNA, který je schopný štěpit cílovou RNA, bývá označován jako RISC (RNA-induced silencing complex). AGO také usnadňuje interakci mezi malou RNA a cílovou RNA, RISC dokáže najít a rozštěpit cílovou RNA za desetinu doby, kterou by trvalo vytvoření duplexu mezi samotnou malou RNA a cílovou RNA (Ameres *et al.* 2007). AGO má čtyři domény: N-terminální, PAZ, MID a PIWI. MID doména váže 5' konec malé RNA a PAZ doména (stejně jako u DCL) rozeznává 3' konec. PIWI doména má strukturu ribonukleázy typu H a je schopna endonukleázové aktivity, pro tuto funkci je potřeba DDH/E motiv v katalytickém místě (Yuan *et al.* 2005; Baumberger & Baulcombe 2005). Tato doména má také schopnost vázat proteiny nesoucí GW/WG motiv, přítomný například v největší podjednotce RNA polymerázy V (El-Shami *et al.* 2007).

Argonaut je evolučně velmi starý protein. Jeho homology nacházíme již u některých Prokaryot (kde však k navedení na cíl slouží DNA; Yuan *et al.* 2005) a je primárně přítomen u všech Eukaryot – ačkoliv někdy může sekundárně chybět, jako například u některých prvoků či *Saccharomyces cerevisiae* (Drinnenberg *et al.* 2009). Množství genů kódujících různé AGO se mezi organismy velmi liší – *Schizosaccharomyces pombe* má jeden, člověk osm, *Arabidopsis* deset, rýže osmnáct a *Caenorhabditis* má přinejmenším dvacet šest genů pro různé typy tohoto proteinu. Na základě fylogenetické příbuznosti lze proteiny rodiny Argonaut rozčlenit do tří skupin. AGO proteiny (*sensu stricto*) interagují s siRNA a miRNA, PIWI proteiny interagují s piRNA a skupina 3 interaguje se sekundárními siRNA u *Caenorhabditis* (Hutvagner & Simard 2008). U *Arabidopsis* se vyskytují výhradně jen AGO proteiny, kterých je deset. Z těchto deseti proteinů byla schopnost štěpit cílovou RNA prokázána u tří: AGO1, AGO4 a AGO7 (Baumberger & Baulcombe 2005; Qi *et al.* 2006; Montgomery *et al.* 2008). Jednotlivé AGO proteiny hrají v organismu různé role a je třeba, aby byly schopny specificky rozeznávat malé RNA, se kterými mají asociovat. U rodu *Drosophila* rozeznává AGO duplex RNA na základě vnitřní struktury (tedy hlavně podle přítomnosti nepárujících nukleotidů) a jednotlivá vlákna duplexu následně odliší na základě termodynamické stability – vybere to se slabším párováním

na 5' konci (Tomari *et al.* 2004; Tomari *et al.* 2007). U rostlin však zřejmě největší význam má to, jaký konkrétní nukleotid se nachází na 5' konci malé RNA. AGO si tedy vybírá cílový duplex i konkrétní vlákno na základě identity 5' terminálního nukleotidu. Nemůže však jít o jediný mechanismus, už jen proto, že *Arabidopsis* má deset AGO, kdežto v RNA se běžně vyskytují jen čtyři typy nukleotidů. Mimoto byly nalezeny i mnohé výjimky z tohoto pravidla. Kromě 5' nukleotidu a termodynamické stability by mohlo o asociaci mezi AGO a malou RNA rozhodovat například to, kde je daný AGO lokalizován v buňce, jestli dochází k jeho expresi v konkrétním rostlinném pletivu nebo interakci s jinými proteiny, jako je třeba DCL (Takeda *et al.* 2008; Mi *et al.* 2008; Montgomery *et al.* 2008). Současné studie ukazují, že to, jaký nukleotid se nachází na 5' konci, může mít význam i u jiných organismů, než jsou rostliny (Ghildiyal *et al.* 2010).

AGO1 funguje na posttranskripční úrovni, kde může štěpit jak cílovou RNA, tak blokovat translaci (Brodersen *et al.* 2008). Malé RNA používané AGO1 mají většinou na 5' konci uridin a jsou generované DCL1 – AGO1 je potřeba především pro regulaci genové exprese pomocí miRNA (mutace v AGO1 mají vážné fenotypové následky, neboť miRNA hrají významnou roli ve vývoji rostliny, viz výše), umlčení sense transgenů (nikoliv však transgenů s invertovanými repeticemi) a pro biogenezi ta-siRNA (Ronemus *et al.* 2006). Dále hraje také roli v obraně proti virům, a tak opět jako je tomu i u jiných významných součástí RNAi účastnících se obrany proti virům, i AGO1 je cílem některých virových proteinů potlačujících v rostlinách RNAi obranné mechanismy (Zhang *et al.* 2006). Hladina AGO1 v buňce je mimo jiné udržována pomocí zpětné vazby, kde specifická miRNA a siRNA řídí štěpení mRNA produkující AGO1 (Mallory & Vaucheret 2009). AGO2 a AGO3 jsou dva blízce příbuzné proteiny. Jejich funkce není známa a mutace v jejich genech nezpůsobují žádné vývojové vady. AGO2 asociuje především s malými RNA s 5' terminálním adenosinem. Na rozdíl od ostatních AGO mají v katalytické PIWI doméně DDD motiv (Baumberger & Baulcombe 2005). AGO4 interaguje převážně s hc-siRNA (ty mají většinou 5' terminální adenosin), a je tedy nezbytný pro metylaci DNA a tvorbu heterochromatinu (viz podkapitola RdDM níže). Lokalizuje ve dvou jaderných subkompartmentech: Cajal bodies a AB-bodies (Qi *et al.* 2006; Li *et al.* 2008). Funkce AGO5 není známa, ale v některých případech interaguje s miRNA s 5' terminálním cytosinem. AGO6 je částečně redundantní v methylaci DNA některých lokusů s AGO4 (Zheng *et al.* 2007). AGO7 je třeba k produkci ta-siRNA z TAS3 lokusu (popsáno výše). AGO8 a AGO9 jsou si vzájemně blízce příbuzní. Jejich funkce v rostlinách zatím nebyla stanovena. Jsou však blízkými paralogy k AGO4 a AGO6. AGO10 je příbuzný k AGO1 a částečně se funkčně překrývají, mutanty AGO10 vykazují abnormality ve vývoji apikálního meristému prýtu a stejně jako mutanty AGO1

jsou pro embryo letální (Brodersen *et al.* 2008). Většina z AGO je nejspíš schopna účastnit se obrany proti virům – u některých byla prokázána schopnost vázat malé virové RNA a funkce většiny z nich je často potlačována virovými proteiny (Zhang *et al.* 2006; Baumberger *et al.* 2007; Takeda *et al.* 2008).

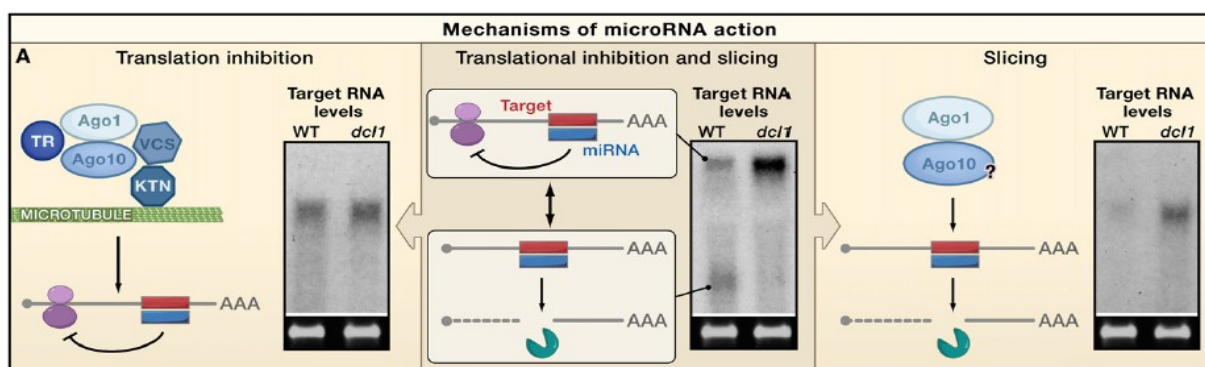
## 2. Mechanismy RNAi

RNAi může ovlivňovat genovou expresi na dvou základních úrovních, a to jednak na posttranskripční úrovni (PTGS – post-transcriptional gene silencing) a jednak na úrovni transkripce (TGS – transcriptional gene silencing). Během PTGS je míra exprese určována buďto změnou hladiny mRNA jejím štěpením a možná i řízenou degradací nebo dochází k zablokování translace na této mRNA. Při TGS je zabráněno transkripci a tím vzniku mRNA. Toho lze dosáhnout modifikacemi chromatinu, a to především v promotorové oblasti genu. Charakteristickým znakem modifikace chromatinu u rostlin během RNAi je methylace DNA v procesu RdDM (RNA-directed DNA methylation).

### 2.1. Štěpení RNA a blokování translace

Postranskripční umlčení exprese genů u rostlin může probíhat převážně dvěma způsoby, které se navzájem nevyklučují a ve většině případů jsou nespíš používány oba zároveň (obr. 4). Jde o štěpení cílové mRNA nebo blokování translace na mRNA. Štěpení RNA je schopnost, která je AGO vlastní a byla prokázána u AGO1, AGO4 a AGO7 (Baumberger & Baulcombe 2005; Qi *et al.* 2006; Montgomery *et al.* 2008). Je logické tuto schopnost předpokládat i u dalších AGO, hlavně těch, které jsou blízce příbuzné právě zmíněným, jako je AGO6 a AGO10. Vzhledem k tomu, že malé RNA (zejména miRNA) párují ke svému cíli u rostlin s vysokou komplementaritou, a to hlavně v kódující oblasti mRNA, bylo dlouhou dobu předpokládáno, že jejich hlavním způsobem fungování je štěpení mRNA, protože tento proces je blízký tomu, jak cíl rozpoznávají siRNA. U živočichů, kde pak miRNA párují s nízkou komplementaritou ve 3' nepřekládané oblasti, dochází především k blokování translace. Nicméně ukazuje se, že jak miRNA, tak siRNA mohou také u rostlin blokovat translaci, a že tento způsob je celkem běžný. Štěpení RNA dokáže AGO zajistit sám o sobě, pouze v komplexu s malou RNA (Baumberger & Baulcombe 2005). Naproti tomu blokování translace vyžaduje účast dalších faktorů. Schopnost blokovat translaci byla prokázána u AGO1 a AGO10. Z proteinů, které s AGO spolupracují, byl nalezen VCS, faktor odstraňující 5' čepičku mRNA, a Katanin, protein štěpící mikrotubuly, ukazující na roli cytoskeletu v tomto procesu (Brodersen *et al.* 2008). Výhoda blokování translace spočívá zejména ve snadné reverzibilitě tohoto procesu, odstranění bloku translace

může být někdy velmi rychlé, na rozdíl od štěpení transkriptu, které může vést k dlouhodobějšímu umlčení díky produkci sekundárních siRNA. Vznik sekundárních siRNA v případě posttranskripčního umlčení exprese závisí na funkci RDR6, tak jak bylo popsáno výše. Sekundární siRNA především amplifikují sílu umlčení. Tento proces je také provázen jevem zvaným „transitivita“. Jde o jev, kdy dochází ke vzniku sekundárních siRNA i mimo sekvence působení primárních malých RNA, což je dáno tím, že RDR6 vytvoří komplementární vlákno k celému rozštěpenému transkriptu a z takto vzniklého prekurzoru mohou být po celé délce vyštěpovány sekundární siRNA. Ne vždy se však vznik sekundárních RNA šíří oběma směry od místa štěpení (nasednutí primární malé RNA). V některých případech se objevují sekundární siRNA pouze v jednom směru od místa štěpení. Takovýto charakter transitivity by mohl být dán použitím primeru při syntéze druhého vlákna pomocí RDR6 (Moissiard *et al.* 2007). Produkce sekundárních siRNA může být zahájena i v některých případech štěpení transkriptu za pomoci miRNA (Ronemus *et al.* 2006). Štěpení RNA není potřeba jen pro posttranskripční umlčení exprese, ale tato katalytická funkce je zřejmě třeba i v některých procesech při methyloaci DNA (Qi *et al.* 2006).



Obrázek 4: Štěpení mRNA a blokování translace pomocí malých RNA. Obrázky obsahují výstup z Northern blotu, kde na pravém sloupci je vidět analýza extraktu RNA z rostliny s nefunkční produkcí miRNA jako kontrola a na levém sloupci je extrakt RNA z wild-type rostliny. (Napravo) Regulace čistě jen pomocí štěpení cílové mRNA. (Nalevo) Regulace pouze pomocí blokování translace. (Uprostřed) Kombinace obou způsobů regulace. Převzato z: Voinnet (2009)

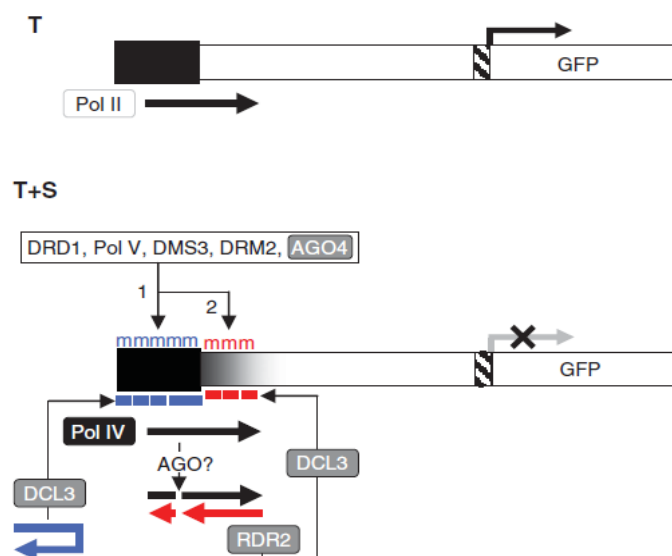
## 2.2. Modifikace chromatinu

Modifikace chromatinu v podobě methyloaci cytosinu v DNA a modifikace histonů (zejména jejich methyloaci) je způsob, jakým Eukaryota mohou kontrolovat transposomy a repetitivní sekvence, udržovat si určité struktury chromatinu (například centromery) a jak regulovat expresi genů. U mnoha organismů je methyloaci DNA z velké části zajišťována tzv. udržovacími methyltransferázami, které jsou schopny po replikaci genomu namethylvat nově nasynthetizované vlákno, podle vzoru methyloaci na vlákně původním. Tento mechanismus

methylace ale není jediným a u rostlin a mnoha dalších organismů hraje v tomto procesu klíčovou roli RNAi.

### 2.2.1. RdDM a tvorba heterochromatinu

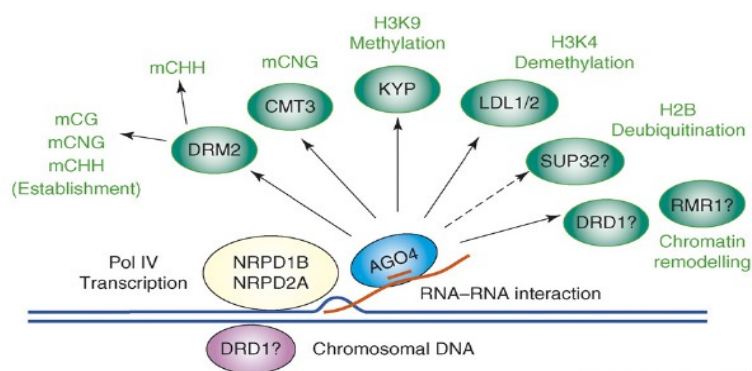
Pro tvorbu heterochromatinu se u rostlin vyvinuly speciální mechanismy RNAi zahrnující dvě specifické DNA dependentní RNA polymerázy – Pol IV a Pol V (popsány výše). U kvasinek, které tyto polymerázy nemají, je methylace histonů, v procesu ne nepodobném tomu u rostlin, zprostředkována za pomoci Pol II (Irvine *et al.* 2006). U savců je jeden z možných způsobů methylace DNA závislý na piRNA (Kuramochi-Miyagawa *et al.* 2008). Proces methylace DNA řízený malými RNA se označuje jako RdDM (RNA-directed DNA methylation) a je charakteristickým projevem modifikace chromatinu pomocí malých RNA u rostlin. RdDM způsobuje *de novo* methylaci cytosinu v oblastech DNA homologických k siRNA, a to v jakýchkoliv sekvenčních kontextech (CG, CHG a CHH; kde H značí buďto A, T nebo C). Tento proces je zodpovědný až za zhruba 30 % z methylovaného cytosinu v genomu *Arabidopsis* (Lister *et al.* 2008). Vlastní *de novo* methylaci cytosinu zajišťuje především DRM2 (domains rearranged methyltransferase2) a případně také DRM1 a CMT3 (chromomethylase3; Cao *et al.* 2003). Proces, ve kterém dojde k navedení těchto proteinů k příslušnému lokusu DNA, má několik kroků (obr. 5). Napřed s využitím DCL3 vznikají 24 nukleotidů dlouhé siRNA například z invertované repeticce. Tyto siRNA mohou interagovat s AGO4, nebo v některých případech i s AGO6 (Zheng *et al.* 2007). Komplex AGO a siRNA se může navázat na WG/GW motiv na C-



Obrázek 5: Schéma jedné z možných cest vzniku *de novo* methylace a jejího rozšíření do přilehlých sekvencí. (Nahoře) Cílový lokus (T) bez přítomnosti silenceru (S) není methylovaný a je normálně přepisován. (Dole) V přítomnosti silencerového lokusu, který produkuje vlásečku (modrá šipka), dochází k primární *de novo* methylaci (modrá přerušovaná čára). Methylovaná oblast je přepisována Pol IV a vzniká transkript (černá šipka) ke kterému je dosyntetizováno druhé vlákno pomocí RDR2 (červená šipka). Z této dvouvláknové RNA za pomoci DCL3 vznikají sekundární siRNA, které řídí sekundární methylaci přilehlých sekvencí (červená přerušovaná čára). V rámečku jsou vypsány proteiny potřebné pro vlastní *de novo* methylaci. Převzato z: Daxinger *et al.* (2009)



terminální doméně Pol V (El-Shami *et al.* 2007). AGO4 s navázanou siRNA rozeznává komplementární sekvenci zřejmě na transkriptu, který vytváří Pol V (Wierzbicki *et al.* 2009). Následně AGO4 váže další proteiny a vytváří tak komplex, který řídí metylaci DNA (obr. 6; He *et al.* 2009). Pol V pravděpodobně transkribuje celý genom (jak heterochromatin, tak euchromatin) a k iniciaci transkripce nejspíš nepotřebuje promotor. K RdDM pak tedy dochází v těch místech, kde k transkriptu Pol V existují příslušné komplementární siRNA (Wierzbicki *et al.* 2008). *De novo* methylace se ale může šířit i do přilehlých oblastí díky tvorbě sekundárních siRNA. Po vytvoření primární methylace je tato oblast přepisována pomocí Pol IV, která může s transkripcí pokračovat i do přiléhajících sekvencí. Vzniklý transkript je zpracován RDR2 a dává vznik sekundárním siRNA, které již zmíněným postupem methylují další sekvence a vytvářejí tak sekundární metylaci i v oblastech, které leží mimo primární cíl RdDM (Daxinger *et al.* 2009). V některých případech je zřejmě třeba, aby byl transkript rozpoznávaný RDR2 nejprve rozštěpen pomocí AGO4 (Qi *et al.* 2006).



Obrázek 6: Schéma možných interakcí mezi komplexem Pol V (ta je zde značena ještě starým názvoslovím) a AGO4 s proteiny řídícími modifikace chromatinu. Pořadí akce proteinů modifikujících chromatin není známo. Obrázek také znázorňuje interakci siRNA vázané na AGO4 s transkriptom produkovaným Pol V (RNA značena červeně, chromosomová DNA modře). AGO4 zároveň interaguje s Pol V, což na obrázku naznačeno není. Převzato z: Chan (2008)

Methylace DNA nemusí vést vždy k umlčení transkripce, methylace transkribované sekvence většinou nemá na transkripci vliv, k umlčení vede pouze methylace promotoru, o čemž svědčí i fakt, že zhruba jedna třetina genů *Arabidopsis* je methylována ve své transkribované oblasti bez výraznějšího dopadu na genovou expresi. Tato methylace je však zajišťována převážně udržovací methyltransferázou MET1 (methyltransferase1) a ne procesem RdDM (Lister *et al.* 2008). Methylace v transkribované oblasti genu může mít někdy význam pro udržování posttranskripčního umlčení exprese. Sekundární siRNA produkované po rozštěpení mRNA a syntéze komplementárního vlákna pomocí RDR6 mohou vést k methylaci DNA v komplementárních oblastech. Z těchto methylovaných oblastí DNA může být následně produkován RNA transkript pomocí Pol IV, který je překvapivě zpracován RDR6

na dvouvláknovou RNA, jež dává vznik sekundárním siRNA. Tyto siRNA nejsou nezbytné pro štěpení mRNA a fungování PTGS v přítomnosti zdroje primárních siRNA (například replikující se virus), ale mohou udržovat PTGS i poté, co zdroj primárních siRNA zanikne (Eamens *et al.* 2008).

### 2.2.2. Demethylace DNA

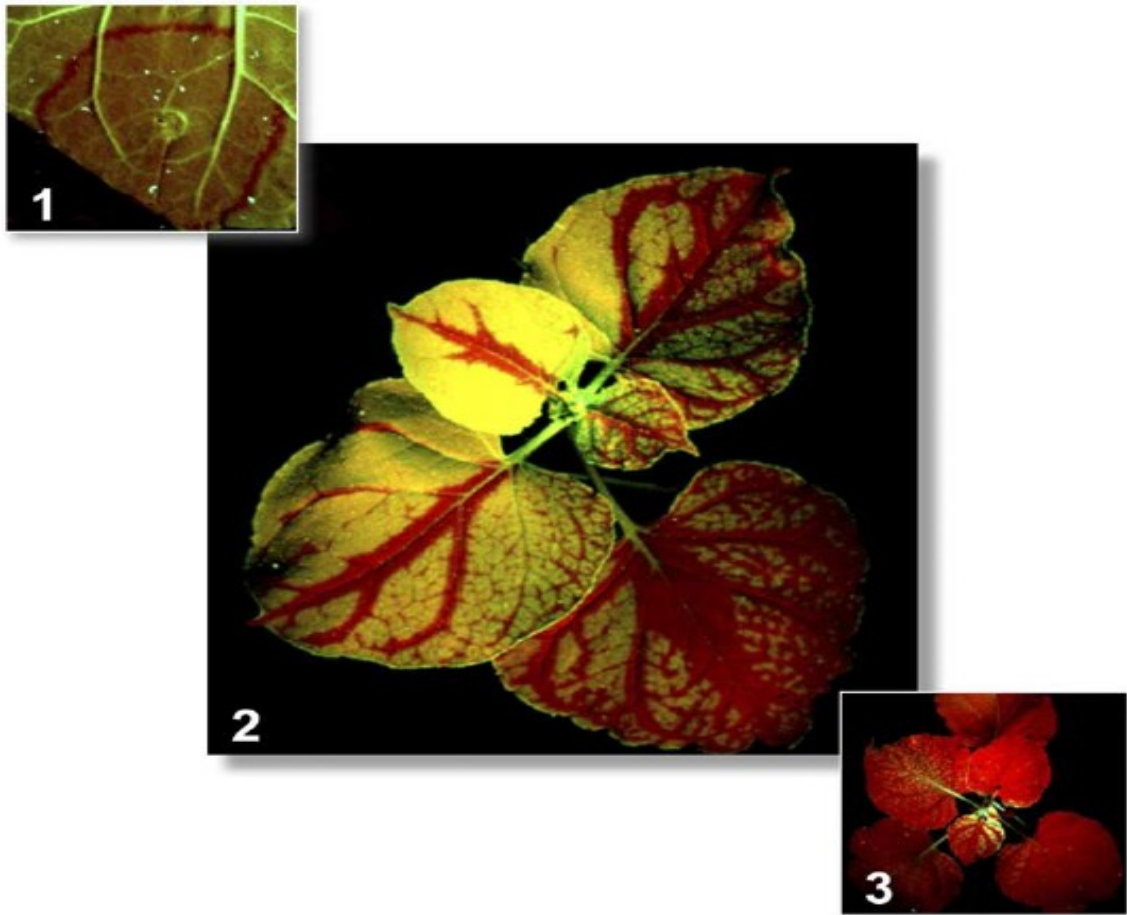
Aby mohla rostlina oboustranně regulovat metylaci DNA, musí mít mechanismy, kterými je schopna metylaci DNA odstranit. U *Arabidopsis* jsou známy čtyři proteiny s glykosylázovou-lyázovou aktivitou schopné odstraňovat methylované deoxyribonukleosidy: ROS1 (repressor of silencing), DME (Demeter), DML2 a DML3 (DME-like). DML brání nechtěnému umlčení genů, a to především tím, že demethylují 5' a 3' oblasti genu, čímž zabrání metylaci promotoru, který je pro expresi genu nezbytný (Penterman *et al.* 2007). ROS1 také brání nechtěné metylaci genů a zdá se, že tento proces může být řízen malými RNA, které zřejmě váže pomocný protein ROS3 (Zheng *et al.* 2008). DME je protein potřebný pro imprinting u rostlin. Je exprimován v centrální buňce zárodečného vaku, kde se stará o demethylaci tří genů: *FWA*, *MEDEA* a *FIS2*. Tyto geny jsou nezbytné pro vývoj endospermu a v běžném pletivu exprimovány nejsou, neboť jsou v nich vloženy opakující se sekvence, které jsou běžně methylovány. V přítomnosti DME jsou však díky demethylaci aktivovány. Jejich metylaci pak již není třeba obnovovat, neboť endosperm, který z centrální buňky zárodečného vaku vzniká, je geneticky terminálním pletivem, které je zkonsumováno vyvíjejícím se embryem (Gehring *et al.* 2006).

## 3. Šíření RNAi rostlinou

U rostlin nemusí být působení malých RNA umlčujících genovou expresi omezeno jen na jednu buňku, ale může se šířit i mezi buňkami. S tímto jevem se můžeme setkat i u některých živočichů jako je *Caenorhabditis* nebo *Schmidtea* (patřící mezi ploštěnce) a lze jej vyvolat pomocí uměle vnesené dsRNA také u rodu *Drosophila* (Voinnet 2005). U rostlin transport probíhá dvěma cestami, které jsou běžně využívány pro transport makromolekul v rostlinných pletivech. Signál se může jednak pohybovat z buňky do buňky přes plasmodesmy nebo systémově mezi jednotlivými orgány pomocí floému (obr. 7). Signál šířený z buňky do buňky se může rozšířit z buňky původu do vzdálenosti dalších 10-15 vrstev buněk. Takový signál může být spuštěn například transgenem s invertovanou repeticí. V tomto případě ze zpracované vlásky vznikají siRNA o délkách 21 a 24 nukleotidů, ale pouze siRNA o délce 21 nukleotidů produkované DCL4 mohou sloužit k rozšíření umlčení exprese mezi buňkami. Při velmi vysokých hladinách koncentrace dsRNA prekursoru může být funkce DCL4 částečně nahrazena i jinými DCL.

Efektorem, který štěpí cílové molekuly mRNA v buňkách, jež tento signál přijímají, je AGO1. V tomto konkrétním případě jsou pro šíření potřeba i NRPD1 a RDR2, které plní neurčitou funkci pravděpodobně při příjmu signálu (Dunoyer *et al.* 2007). Dalšími příklady, kdy může dojít k šíření signálu mezi buňkami, je ta-siRNA a virové siRNA. Proces šíření těchto signálů je podobný uvedenému příkladu, avšak nezávislý na RDR2 a NRPD1. Molekulou, která signál mezi buňkami přenáší, je pravděpodobně duplex siRNA vzniklý vyštěpením z prekursoru pomocí DCL (Dunoyer *et al.* 2010).

Signál při umlčení exprese šířící se z jednoho orgánu do jiného prochází floémem. Tento jev je možné pozorovat například při naroubování části rostliny na podnož produkující signál schopný umlčet sledovaný gen roubu. Zdroj signálu může být podobný jako při šíření umlčení exprese mezi sousedními buňkami – např. transgen s invertovanou repeticí, ze kterého mohou vznikat 21 nukleotidů dlouhé siRNA. Tyto siRNA jsou pravděpodobně produkovány DCL4, avšak k umlčení dojde, i když jsou jednotlivé DCL mutované, což naznačuje, že floémem je buďto transportován samotný prekursor a siRNA vznikají až v roubu nebo jsou všechny DCL v tomto procesu navzájem redundantní. Pro příjem signálu v roubu jsou zapotřebí složky tvorby heterochromatinových siRNA, tedy: NRPD1, RDR2, DCL3 a AGO4. Tato dráha dává vznik primárním siRNA v buňkách roubu, které štěpí transkript sledovaného genu. Z takto rozštěpeného transkriptu vznikají sekundární siRNA za pomoci RDR6 a DCL4/DCL2. siRNA vzniklé aktivitou RDR6 vykazují jednosměrnou transitivity, neboť neodpovídají siRNA z podnože, ale mají sekvenční podobnost k části transkriptu, která leží směrem k 3' konci od sekvence komplementární s transgenem, jenž je zdrojem siRNA v podnoži. Funkce, kterou má v tomto procesu NRPD1 a RDR2, zatím není známa (Brosnan *et al.* 2007). Jaké všechny role může hrát systémové šíření umlčení exprese se přesně neví. Pro rostlinu má určitě výhodu v obraně proti virům, kdy umožňuje „naočkovat“ rostlinná pletiva ještě dřív, než se do nich rozšíří virová infekce.



Obrázek 7: Systémové šíření umlčení GFP v *Nicotiana benthamiana*. (1) Místo, kde byl do rostliny vnesen transgen způsobující umlčení exprese GFP. Červená barva je autoflorescence chlorofylu pod UV zářením a ukazuje na místa umlčení GFP. (2) Umlčení se začíná šířit systémově celou rostlinou. (3) GFP bylo již umlčeno v téměř celé rostlině. Převzato z: (Voinnet 2005)

## Seznam použité literatury

- Adenot, X. *et al.*, 2006. DRB4-Dependent TAS3 trans-Acting siRNAs Control Leaf Morphology through AGO7. *Current Biology*, 16(9), 927-932.
- Ambros, V. *et al.*, 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 9(3), 277-279.
- Ameres, S.L., Martinez, J. & Schroeder, R., 2007. Molecular Basis for Target RNA Recognition and Cleavage by Human RISC. *Cell*, 130(1), 101-112.
- Axtell, M.J. *et al.*, 2006. A Two-Hit Trigger for siRNA Biogenesis in Plants. *Cell*, 127(3), 565-577.
- Baumberger, N. & Baulcombe, D.C., 2005. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33), 11928-11933.
- Baumberger, N. *et al.*, 2007. The Polerovirus Silencing Suppressor P0 Targets ARGONAUTE Proteins for Degradation. *Current Biology*, 17(18), 1609-1614.
- Bäurle, I. *et al.*, 2007. Widespread Role for the Flowering-Time Regulators FCA and FPA in RNA-Mediated Chromatin Silencing. *Science*, 318(5847), 109-112.
- Borsani, O. *et al.*, 2005. Endogenous siRNAs Derived from a Pair of Natural cis-Antisense Transcripts Regulate Salt Tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, 123(7), 1279-1291.
- Boutet, S., Vazquez, F., Liu, J., Béclin, C. *et al.*, 2003. *Arabidopsis* HEN1: A Genetic Link between Endogenous miRNA Controlling Development and siRNA Controlling Transgene Silencing and Virus Resistance. *Current Biology*, 13(10), 843-848.
- Brodersen, P. *et al.*, 2008. Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320(5880), 1185-1190.
- Brodersen, P. & Voinnet, O., 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics*, 22(5), 268-280.
- Brosnan, C.A. *et al.*, 2007. Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(37), 14741-14746.
- Cao, X. *et al.*, 2003. Role of the DRM and CMT3 Methyltransferases in RNA-Directed DNA Methylation. *Current Biology*, 13(24), 2212-2217.
- Colmenares, S.U. *et al.*, 2007. Coupling of Double-Stranded RNA Synthesis and siRNA Generation in Fission Yeast RNAi. *Molecular Cell*, 27(3), 449-461.
- Daxinger, L. *et al.*, 2009. A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. *EMBO J*, 28(1), 48-57.

- Deleris, A. *et al.*, 2006. Hierarchical Action and Inhibition of Plant Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense. *Science*, 313(5783), 68-71.
- Diaz-Pendon, J.A. *et al.*, 2007. Suppression of Antiviral Silencing by Cucumber Mosaic Virus 2b Protein in *Arabidopsis* Is Associated with Drastically Reduced Accumulation of Three Classes of Viral Small Interfering RNAs. *Plant Cell*, 19(6), 2053-2063.
- Ding, S. & Voinnet, O., 2007. Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell*, 130(3), 413-426.
- Drinnenberg, I.A. *et al.*, 2009. RNAi in Budding Yeast. *Science*, 326(5952), 544-550.
- Dunoyer, P. *et al.*, 2007. Intra- and intercellular RNA interference in *Arabidopsis thaliana* requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways. *Nat Genet*, 39(7), 848-856.
- Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J.C. & Voinnet, O., 2010. Small RNA Duplexes Function as Mobile Silencing Signals Between Plant Cells. *Science*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20413458> [Accessed April 27, 2010].
- Eamens, A., Vaistij, F.E. & Jones, L., 2008. NRPD1a and NRPD1b are required to maintain post-transcriptional RNA silencing and RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 55(4), 596-606.
- El-Shami, M. *et al.*, 2007. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes & Development*, 21(20), 2539-2544.
- Fang, Y. & Spector, D.L., 2007. Identification of Nuclear Dicing Bodies Containing Proteins for MicroRNA Biogenesis in Living *Arabidopsis* Plants. *Current Biology*, 17(9), 818-823.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.
- Franco-Zorrilla, J.M. *et al.*, 2007. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genetics*, 39(8), 1033-1037.
- Gascioli, V. *et al.*, 2005. Partially Redundant Functions of *Arabidopsis* DICER-like Enzymes and a Role for DCL4 in Producing trans-Acting siRNAs. *Current Biology*, 15(16), 1494-1500.
- Gazzani, S. *et al.*, 2004. A Link Between mRNA Turnover and RNA Interference in *Arabidopsis*. *Science*, 306(5698), 1046-1048.
- Gehring, M., Huh, J.H., Hsieh, T., Penterman, J. *et al.*, 2006. DEMETER DNA Glycosylase Establishes MEDEA Polycomb Gene Self-Imprinting by Allele-Specific Demethylation. *Cell*, 124(3), 495-506.

- Ghildiyal, M. *et al.*, 2010. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA\* strands into the RNA interference pathway. *RNA*, 16(1), 43-56.
- He, X. *et al.*, 2009. An Effector of RNA-Directed DNA Methylation in *Arabidopsis* Is an ARGONAUTE 4- and RNA-Binding Protein. *Cell*, 137(3), 498-508.
- Hutvagner, G. & Simard, M.J., 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 22-32.
- Chan, S.W. *et al.*, 2006. Two-Step Recruitment of RNA-Directed DNA Methylation to Tandem Repeats. *PLoS Biol*, 4(11), e363.
- Chan, S.W., 2008. Inputs and outputs for chromatin-targeted RNAi. *Trends in Plant Science*, 13(7), 383-389.
- Chitwood, D.H. *et al.*, 2009. Pattern formation via small RNA mobility. *Genes & Development*, 23(5), 549-554.
- Irvine, D.V. *et al.*, 2006. Argonaute Slicing Is Required for Heterochromatic Silencing and Spreading. *Science*, 313(5790), 1134-1137.
- Jacob, F. & Monod, J., 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3, 318-356.
- Jin, H. *et al.*, 2008. Small RNAs and the regulation of cis-natural antisense transcripts in *Arabidopsis*. *BMC Molecular Biology*, 9(1), 6.
- Kanno, T. *et al.*, 2005. Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nat Genet*, 37(7), 761-765.
- Kasschau, K.D. *et al.*, 2007. Genome-Wide Profiling and Analysis of *Arabidopsis* siRNAs. *PLoS Biol*, 5(3), e57.
- Katiyar-Agarwal, S. *et al.*, 2007. A novel class of bacteria-induced small RNAs in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 21(23), 3123-3134.
- Katiyar-Agarwal, S. *et al.*, 2006. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(47), 18002-18007.
- Khraiweh, B. *et al.*, 2010. Transcriptional Control of Gene Expression by MicroRNAs. *Cell*, 140(1), 111-122.
- Kuramochi-Miyagawa, S. *et al.*, 2008. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes & Development*, 22(7), 908-917.
- Lee, Y. *et al.*, 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20), 4051-4060.

- Lehmann, E., Brueckner, F. & Cramer, P., 2007. Molecular basis of RNA-dependent RNA polymerase II activity. *Nature*, 450(7168), 445-449.
- Li, C.F. *et al.*, 2008. Dynamic Regulation of ARGONAUTE4 within Multiple Nuclear Bodies in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 4(2), e27.
- Li, J. *et al.*, 2005. Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 15(16), 1501-1507.
- Lister, R. *et al.*, 2008. Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in *Arabidopsis*. *Cell*, 133(3), 523-536.
- Luo, Z. & Chen, Z., 2007. Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(3), 943-958.
- MacRae, I.J. *et al.*, 2006. Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science*, 311(5758), 195-198.
- Makeyev, E.V. & Bamford, D.H., 2002. Cellular RNA-Dependent RNA Polymerase Involved in Posttranscriptional Gene Silencing Has Two Distinct Activity Modes. *Molecular Cell*, 10(6), 1417-1427.
- Mallory, A.C. & Vaucheret, H., 2009. ARGONAUTE 1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways. *EMBO Reports*, 10(5), 521-526.
- Margis, R. *et al.*, 2006. The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Letters*, 580(10), 2442-2450.
- Matzke, M.A. & Matzke, A.J.M., 2004. Planting the Seeds of a New Paradigm. *PLoS Biol*, 2(5), e133.
- Megraw, M. *et al.*, 2006. MicroRNA promoter element discovery in *Arabidopsis*. *RNA*, 12(9), 1612-1619.
- Meyers, B.C. *et al.*, 2008. Criteria for Annotation of Plant MicroRNAs. *Plant Cell*, 20(12), 3186-3190.
- Mi, S. *et al.*, 2008. Sorting of Small RNAs into *Arabidopsis* Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell*, 133(1), 116-127.
- Mlotshwa, S. *et al.*, 2008. DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in *Arabidopsis*. *PloS One*, 3(3), e1755.
- Moissiard, G., Parizotto, E.A., Himber, C. & Voinnet, O., 2007. Transitivity in *Arabidopsis* can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA*, 13(8), 1268-1278.
- Montgomery, T.A. *et al.*, 2008. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell*, 133(1), 128-141.



- Onodera, Y. *et al.*, 2005. Plant Nuclear RNA Polymerase IV Mediates siRNA and DNA Methylation-Dependent Heterochromatin Formation. *Cell*, 120(5), 613-622.
- Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J.H., Ballinger, T., Henikoff, S. & Fischer, R.L., 2007. DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(16), 6752-6757.
- Pontes, O. *et al.*, 2006. The *Arabidopsis* Chromatin-Modifying Nuclear siRNA Pathway Involves a Nucleolar RNA Processing Center. *Cell*, 126(1), 79-92.
- Qi, Y. *et al.*, 2006. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 443(7114), 1008-1012.
- Rajagopalan, R. *et al.*, 2006. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development*, 20(24), 3407-3425.
- Ramachandran, V. & Chen, X., 2008. Degradation of microRNAs by a Family of Exoribonucleases in *Arabidopsis*. *Science*, 321(5895), 1490-1492.
- Ream, T.S. *et al.*, 2009. Subunit Compositions of the RNA-Silencing Enzymes Pol IV and Pol V Reveal Their Origins as Specialized Forms of RNA Polymerase II. *Molecular Cell*, 33(2), 192-203.
- Rhoades, M.W. *et al.*, 2002. Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell*, 110(4), 513-520.
- Rodriguez, A. *et al.*, 2004. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Research*, 14(10a), 1902-1910.
- Ronemus, M., Vaughn, M.W. & Martienssen, R.A., 2006. MicroRNA-Targeted and Small Interfering RNA-Mediated mRNA Degradation Is Regulated by Argonaute, Dicer, and RNA-Dependent RNA Polymerase in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18(7), 1559-1574.
- Schiebel, W. *et al.*, 1993. RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. II. Catalytic in vitro properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(16), 11858-11867.
- Schwab, R. *et al.*, 2009. Endogenous TasiRNAs Mediate Non-Cell Autonomous Effects on Gene Regulation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 4(6), e5980.
- Sidorenko, L. *et al.*, 2009. A Dominant Mutation in mediator of paramutation2, One of Three Second-Largest Subunits of a Plant-Specific RNA Polymerase, Disrupts Multiple siRNA Silencing Processes. *PLoS Genet*, 5(11), e1000725.
- Takeda, A. *et al.*, 2008. The Mechanism Selecting the Guide Strand from Small RNA Duplexes is Different Among Argonaute Proteins. *Plant Cell Physiol.*, 49(4), 493-500.
- Tomari, Y., Du, T. & Zamore, P.D., 2007. Sorting of *Drosophila* Small Silencing RNAs. *Cell*, 130(2), 299-308.
- Tomari, Y. *et al.*, 2004. A Protein Sensor for siRNA Asymmetry. *Science*, 306(5700), 1377-1380.

- Tretter, E.M. *et al.*, 2008. Activity Range of *Arabidopsis* Small RNAs Derived from Different Biogenesis Pathways. *Plant Physiol.*, 147(1), 58-62.
- Vazquez, F. *et al.*, 2008. Evolution of *Arabidopsis* MIR genes generates novel microRNA classes. *Nucl. Acids Res.*, 36(20), 6429-6438.
- Voinnet, O., 2005. Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Letters*, 579(26), 5858-5871.
- Voinnet, O., 2009. Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*, 136(4), 669-687.
- Voinnet, O., 2008. Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 464-470.
- Wierzbicki, A.T. *et al.*, 2009. RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat Genet*, 41(5), 630-634.
- Wierzbicki, A.T., Haag, J.R. & Pikaard, C.S., 2008. Noncoding Transcription by RNA Polymerase Pol IVb/Pol V Mediates Transcriptional Silencing of Overlapping and Adjacent Genes. *Cell*, 135(4), 635-648.
- Xie, Z. *et al.*, 2005. Expression of *Arabidopsis* MIRNA Genes. *Plant Physiol.*, 138(4), 2145-2154.
- Yoshikawa, M. *et al.*, 2005. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 19(18), 2164-2175.
- Yuan, Y. *et al.*, 2005. Crystal Structure of *A. aeolicus* Argonaute, a Site-Specific DNA-Guided Endoribonuclease, Provides Insights into RISC-Mediated mRNA Cleavage. *Molecular Cell*, 19(3), 405-419.
- Zhang, H. *et al.*, 2004. Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell*, 118(1), 57-68.
- Zhang, X. *et al.*, 2007. Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(11), 4536-4541.
- Zhang, X. *et al.*, 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & Development*, 20(23), 3255-3268.
- Zheng, X., Pontes, O., Zhu, J., Miki, D. *et al.*, 2008. ROS3 is an RNA-binding protein required for DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Nature*, 455(7217), 1259-1262.
- Zheng, X. *et al.*, 2007. Role of *Arabidopsis* AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *The EMBO Journal*, 26(6), 1691-1701.
- Zong, J., Yao, X., Yin, J., Zhang, D. & Ma, H., 2009. Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: Duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene*, 447(1), 29-39.