

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program:

Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor:

Speciální chemicko-biologické obory



**Adéla Příbylová**

Na velikosti záleží - biogeneze a funkce siRNA u *Arabidopsis thaliana*

Size matters - siRNAs biogenesis and function in *Arabidopsis thaliana*

**Bakalářská práce**

Školitel: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Dimitrij Tyč

Praha, 2013



Prohlášení:

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

V Praze, dne 16.5.2013

Podpis

Poděkování:

Děkuji RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D. a Mgr. Dimitriji Tyčovi za rady, připomínky a vedení při zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří mě při psaní této práce podporovali.

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| Abstrakt .....  | 1  |
| Abstract.....   | 2  |
| Seznam použitých zkratek .....                                    | 3  |
| 1. Úvod .....   | 4  |
| 1. 1. Dvouvláknová RNA.....                                       | 5  |
| 1. 2. malé RNA.....   | 5  |
| 1. 3. DICER-LIKE .....  | 6  |
| 1. 4. ARGONAUT .....  | 7  |
| 1. 4. 1. AGO1/5/10.....   | 8  |
| 1. 4. 2. AGO2/3/7.....  | 9  |
| 1. 4. 3. AGO4/6/8/9 .....   | 9  |
| 1. 5. RNA-dependentní RNA polymerázy .....                        | 10 |
| 2. NAT dráha (natural antisense transcripts).....                 | 11 |
| 3. miRNA dráha.....   | 13 |
| 4. Tvorba sekundárních siRNA, včetně ta-siRNA .....               | 14 |
| 4. 1. TAS geny .....  | 15 |
| 5. Chromatin remodelující dráha .....                             | 17 |
| 5. 1. DNA-dependentní RNA polymeráza IV a V (Pol IV a Pol V)..... | 17 |
| 5. 2. Metylace DNA závislá na malých RNA .....                    | 18 |
| 6. Viry spouštěná RNAi .....                                      | 19 |
| 6. 1. RNA viry .....  | 20 |
| 6. 2. DNA viry.....   | 20 |
| 6. 3. Mechanizmy obrany virů proti RNAi .....                     | 21 |
| 7. Využití RNAi v praxi .....                                     | 22 |
| 8. Závěr.....   | 24 |
| 9. Seznam použité literatury .....                                | 25 |

## Abstrakt

RNA interference (RNAi) hraje důležitou roli v různých biologických procesech zahrnujících regulaci genů a transposonů, vývoje částí rostlinného těla, reakci na stres, remodelaci chromatinu a antivirovou obranu. Základem RNAi jsou krátké molekuly RNA (malé RNA, sRNA), které rostliny produkují ve velikostním rozmezí 21 - 24 nukleotidů (nt) a které jsou schopny na základě komplementarity rozpoznat cílové molekuly RNAi. Malé RNA lze rozdělit na dva základní typy: microRNA (miRNA) a malé interferující RNA (siRNA). K tvorbě a aktivitě malých RNA jsou potřeba proteiny z několika genových rodin: DICER-LIKE (DCL) vytváří malé RNA z dvouvláknového RNA prekurzoru, který je často tvořen aktivitou RNA dependentní RNA polymerázy (RDR). Proteiny ARGONAUTE (AGO) s těmito malými RNA asociují a vytváří tak RNA-indukovaný umlčující komplex (RISC), který hraje klíčovou roli v rozpoznání cílové molekuly a ve výkonné fázi RNAi. Na to, jakou dráhou se bude RISC komplex ubírat, má vliv velikost, struktura i biogeneze malé RNA. RNAi působí jednak na post-transkripční úrovni (PTGS), formou degradace cílové RNA či blokováním translace, a jednak na transkripční úrovni (TGS), kde sRNA zprostředkovávají metylaci histonů a DNA.

**Klíčová slova:** *Arabidopsis thaliana*, miRNA, nat-siRNA, PTGS, RNAi, sRNA (malé RNA), siRNA, ta-siRNA, TGS

## **Abstract**

RNA interference (RNAi) play a key role in various biological processes including regulation of gens and transposons, phylogenetic of part plant body, stress response, chromatin remodeling and antiviral mechanism. The ground of RNAi is short RNA molecules (small RNA, sRNA). In plants they are produced in range from 21 to 24 nucleotides (nt) and on the basis of being complementary they recognize target molecule of RNAi. It is possible to divide small RNA in two basic classes: microRNAs (miRNA) and small interfering RNAs (siRNA). To product and put small RNA into activate needs proteins from several gene family. DICER-LIKE (DCL) proteins create small RNAs from double-strand RNA precursors, which are often created by RNA dependent RNA polymerase (RDR) activity. With these small RNAs interact ARGONAUTE (AGO) proteins and together create RNA-Induced Silencing Complex (RISC). Those complexes play a key role in recognizing target molecule in active phase of RNAi. Structure and biogenesis of sRNAs has decisive influence on RISC complex and its next way in biogenesis. RNAi cause effect on post-transcriptional level (PTGS), as degradation of target molecule or repression of translation. And on transcriptional level (TGS) as sRNA intermediate histone and DNA methylation.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, miRNA, nat-siRNA, PTGS, RNAi, sRNA (small RNA), siRNA, ta-siRNA, TGS

## Seznam použitých zkratek

|           |   |
|-----------|---|
| AGO       | Argonaute                                       |
| ARF       | Auxin respons factor                            |
| DCL       | Dicer-like                                      |
| dsRNA     | double-strand RNA                               |
| hc-siRNA  | heterochromatic siRNA                           |
| HEN1      | Hua Enhancer 1                                  |
| HST       | Hasty   |
| HYL1      | Hyponastic Leaves 1                             |
| miRNA     | microRNA  |
| nat-siRNA | natural transcript siRNA                        |
| NRPD1     | Nuclear RNA polymerase D 1 (podjednotka Pol IV) |
| NRPE1     | Nuclear RNA polymerase E 1 (podjednotka Pol V)  |
| nt        | nucleotide                                      |
| Pol II    | RNA polymerase II                               |
| Pol IV    | RNA polymerase IV                               |
| Pol V     | RNA polymerase V                                |
| pre-miRNA | miRNA precursor                                 |
| pri-miRNA | primary miRNA                                   |
| PTGS      | Post-transcriptional gene silencing             |
| RdDM      | RNA-directed DNA methylation                    |
| RDR       | RNA-dependent RNA polymerase                    |
| RISC      | RNA-Induced Silencing Complex                   |
| RNAi      | RNA interference                                |
| SDN1      | Small RNA degrading nuclease 1                  |
| SGS3      | Suppressor of gene silencing 3                  |
| siRNA     | small interfering RNA                           |
| sRNA      | small RNA                                       |
| ssDNA     | single-strand DNA                               |
| ssRNA     | single-strand RNA                               |
| ta-siRNA  | <i>trans</i> -acting siRNA                      |
| TE        | Transposable elements                           |
| TGS       | Transcriptional gene silencing                  |
| VIGS      | Virus-induced gene silencing                    |
| v-siRNA   | viral-associated siRNA                          |



# 1. Úvod

Malé RNA jsou klíčovou složkou všech procesů RNA interference, jejímž prostřednictvím tyto molekuly ovlivňují diferenciaci buněk, morfologický vývoj, zajišťují protivirovou obranu, podílejí se na reakci na biotické i abiotické stresy, regulaci transposonů a mají zásadní vliv i na stav chromatinu. Poznávání mechanismů RNA interference přináší nejen hlubší pochopení epigenetických regulačních mechanismů, ale také usnadňují práci jak v základním výzkumu, tak výzkumu aplikovaném, například při tvorbě transgenických rostlin. Dvěma klíčovými kroky v poznání RNA interference bylo jednak zjištění, že dvouvláknová RNA působí jako signál vedoucí k umlčení homologních genů. Tento mechanismus byl objevený v roce 1998 na modelu *Caenorhabditis elegans*. A druhým zásadním posunem bylo následné doložení (u rostlinného materiálu), že klíčovým mediátorem zprostředkujícím umlčení jsou právě malé RNA. Výzkumy následujících let prokázaly, že mechanismus umlčování pomocí dvouvláknové RNA (dsRNA) je mezi eukaryonty konzervován. Malé RNA, vznikající z dsRNA prekurzoru na základě své sekvence, velikosti a vnitřní struktury, spouští další kroky RNAi, které vedou k regulaci genové exprese na úrovni TGS a PTGS.

Hlavní křížovatkou různých mechanismů RNAi je štěpení dsRNA prekurzoru za vzniku malých RNA různých velikostí. V rostlinách v rozmezí od 21 do 24 nukleotidů. Malé RNA v rozmezí velikostí 21 – 22 nt se podílí zejména na post-transkripčním umlčování. Naopak 24nt sRNA mají vliv především na strukturu chromatinu a umlčování na transkripční úrovni. Velikosti 23 nt není přiřazena žádná regulační dráha. RNAi se tak dělí na dvě dráhy, které jsou závislé na velikosti sRNA (TGS a PTGS). Velký význam však má i samotný vznik dsRNA prekurzoru, ze kterého jsou sRNA tvořeny. Jedná se buď o prekurzor dokonale párující nebo obsahující nepárující nukleotidy. Tato struktura pak ovlivňuje funkci vzniklých sRNA.

Tato práce v úvodních kapitolách představuje základní složky RNAi, po nichž následuje popis dosud poznáných drah RNAi, ze kterých je patrný jak význam velikosti malých RNA, tak vliv jejich celkové biogeneze, které se účastní.

## 1. 1. Dvouvláknová RNA

Spouštěčem RNAi je dvouvláknová RNA, která může vznikat z různých prekurzorů třemi hlavními cestami. První z nich jsou jednovláknové RNA (ssRNA), které vzniknou přepisem *MIR* genů (viz kapitola 3.) pomocí DNA dependentní RNA polymerázy II (Pol II). *MIR* geny jsou nekódující geny, jejichž přepisem vzniká RNA s vnitřní komplementaritou, která vede k vytvoření dvouvláknového úseku v rámci vlásenkové struktury (Lai, 2003). Druhou cestou tvorby dsRNA je asociace dvou komplementárních vláken (sense a antisense). Tento způsob byl jako první využíván hlavně při experimentální RNA interferenci. Třetí způsob vzniku dsRNA je založen na přepisu jednovláknové RNA do dvouvláknové RNA (dsRNA) pomocí specifických rostlinných či virových RDR. Způsob zpracování jednotlivých dsRNA je uveden v kapitole 1. 3.

## 1. 2. malé RNA

Malé RNA jsou u rostlin tvořeny proteiny DCL z dsRNA prekurzoru. Rozdělujeme je na dvě základní skupiny miRNA a siRNA (Mallory a Vaucheret, 2006). miRNA jsou tvořeny z nedokonale párujících dsRNA úseků ve vlásenkových prekurzorech - transkriptech *MIR* genů (Baulcombe, 2004). Bývají nejčastěji 21nt dlouhé a regulují genovou expresi posttranskripčně, štěpením mRNA nebo inhibicí translace (Brodersen a Voinnet, 2006). siRNA jsou tvořeny z dlouhých dsRNA prekurzorů, které byly vytvořeny pomocí RDR z endogenních, virových či transgenových jednovláknových templátů, asociací komplementárních vláken či intramolekulárním párováním transkriptu invertované repetice. Velikost siRNA se pohybuje v rozsahu 21 - 24nt (Baumberger a Baulcombe, 2005). V rámci siRNA se dále vyčleňuje řada podtypů; *trans-acting* RNA (ta-siRNA), heterochromatin-asociované RNA (hc-siRNA), přirozené *cis-antisense* transkripty (nat-siRNA) a virové RNA (v-siRNA; Brodersen a Voinnet, 2006).

Malé RNA jsou tvořeny duplexy obsahující dvě komplementární vlákna s dvounukleotidovými přesahy 3' konců (Elbashir *et al.*, 2001). Koncový 3' nukleotid je na 2' hydroxylové skupině metylován pomocí proteinu HUA ENHANCER1 (HEN1). Mutant v *hen1* ztrácí většinu populace miRNA (Boutet *et al.*, 2003) a siRNA. Některé populace sRNA jsou mutací postiženy více, jako například hladina siRNA odvozených od retroelementů a 5S rDNA (Xie *et al.*, 2004). Malé RNA, které nejsou metylované, jsou vyhledávány exoribonukleázou SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE1 (SDN1), která je degraduje. Nebo je nemetylovaná malá RNA uridylována na 3' konci, a tím je navedena

k degradaci jinými proteiny (Yu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). SDN1 navíc specificky degraduje jednovláknové miRNA (Ramachandran a Chen, 2008). Metylované malé RNA jsou stabilnější, na funkci RISC komplexu (viz kapitola 1. 4.) však metylace nemá prokázaný významný vliv (Qi *et al.*, 2005). Jednotlivé sRNA se liší nejen svojí velikostí, ale také vnitřní strukturou duplexu, která ovlivňuje jejich účinek.

Poměrné zastoupení velikostních kategorií všech malých RNA je u *Arabidopsis* 21:22:24 nt  $\approx$  1:0,35:1,99. Pro siRNA je poměr 21:22:24 nt  $\approx$  1:1,25:7,59, většina siRNA je tedy 24nt (Zhang *et al.*, 2007). Jednotlivé duplexy jsou mobilní a mohou se pohybovat rostlinou, a tím šířit signál RNAi. Prokázána byla pohyblivost z buňky do buňky symplastickou cestou pomocí plasmodesmů a na dlouhé vzdálenosti floémem. Jednoznačně byl transport prokázán pro 21, 22 a 24nt siRNA z nadzemní části do kořenů a v rámci nadzemních orgánů (Molnar *et al.*, 2010; Dunoyer *et al.*, 2010; Molnar *et al.*, 2011).

### 1. 3. DICER-LIKE

Rostlinné proteiny DICER-LIKE se řadí do skupiny ribonukleáz typu III. DCL svojí enzymatickou aktivitou vytváří z dsRNA prekurzoru malé RNA (Bernstein *et al.*, 2001). V *Arabidopsis* se vyskytují čtyři paralogy DCL (Schauer *et al.*, 2002; Finnegan *et al.*, 2003). Jednotlivé DCL se liší původem dsRNA, kterou zpracovávají, a velikostním rozsahem tvořených malých RNA. Každý typ se preferenčně účastní určité dráhy biogeneze malých RNA, avšak jednotlivé typy se mohou do značné míry navzájem zastupovat (Baulcombe, 2004). DCL1 vytváří miRNA i siRNA, DCL2/3/4 vytváří siRNA.

Protein DCL1 tvoří z dsRNA 21 - 22nt malé RNA a tato tvorba je závislá na dostupnosti ATP (Qi *et al.*, 2005). Primárně štěpí jednovláknové vlásenkové RNA (Zhang *et al.*, 2007). Velikost vytvořené malé RNA je podmíněna strukturou dsRNA. Z prekurzoru miRNA (pre-miRNA; viz kapitola 3.) tvoří obě dvě velikosti, primárně 21 nt dlouhé miRNA. Pokud je duplex neúplně komplementární, může DCL1 tvořit i 22 nt miRNA. Z perfektně párujícího duplexu dsRNA vytváří povětšinou pouze 21nt dlouhé siRNA (Chen *et al.*, 2010). Mutant *dcl1* ztrácí většinu populace miRNA (Hiraguri *et al.*, 2005). Průběhu tvorby malých RNA se účastní i další proteiny, které mohou ovlivňovat specifitu štěpení dsRNA, jako např. HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1).

Dalším zástupcem je protein DCL2. Je nejvíce spojen s antivirovou obranou a produkty vznikajícími pomocí RDR6 (viz kapitola 1. 5.). Rozpoznává virové dsRNA a štěpí je na v-siRNA (Xie *et al.*, 2004; Deleris *et al.*, 2006). Hraje také primární roli při tvorbě

sekundárních siRNA (Mlotshwa *et al.*, 2008) a dále při biogenezi nat-siRNA (Borsani *et al.*, 2005).

Protein DCL3 tvoří z dsRNA 24nt siRNA nezávisle na dostupnosti ATP. Účastní se RNA dependentní DNA metylace (RdDM). Prekurzor, který štěpí, je tvořen hlavně polymerázou RDR2 (Qi *et al.*, 2005). Xie *et al.*, 2004 zjistili, že RdDM u mutanta *dcl3* probíhá, ale s velmi nízkou efektivitou, a to díky zástupnosti DCL2 a DCL4.

Nejvšestrannějším a nejúčinnějším je DCL4. Jeho hlavní role je při antivirové obraně, kdy tvoří 21/22nt v-siRNA (Deleris *et al.*, 2006). Dále je potřebný při tvorbě 21nt ta-siRNA, které jsou tvořeny z dsRNA tvořených hlavně pomocí RDR6 (Mlotshwa *et al.*, 2008).

| Typ DCL     | Typický dsRNA prekurzor                 | Velikost vyštěpené malé RNA       |
|-------------|---|-----------------------------------|
| <b>DCL1</b> | vlásky s nedokonale párujícími vlákny   | <u>21</u> - 22nt <u>mi</u> /siRNA |
| <b>DCL2</b> | prekurzor tvořený RDR1/6 a virové dsRNA | (21) - 22nt                       |
| <b>DCL3</b> | prekurzor tvořený RDR2                  | 24nt siRNA                        |
| <b>DCL4</b> | prekurzor tvořený RDR1/6 a virové dsRNA | <u>21</u> - (22)nt                |

#### 1. 4. ARGONAUT

Malé RNA interagují s proteiny ARGONAUT. Genom *Arabidopsis* kóduje 10 paralogů těchto proteinů, které se liší svojí účastí v jednotlivých drahách RNAi (Morel *et al.*, 2002). Obecně, všechny AGO interagují s duplexem sRNA, z něhož na nich zůstane navázáno pouze jedno vlákno, takzvané vlákno vedoucí. To se na základě komplementarity váže na jednovláknové RNA nacházející se v buňce, čímž spouští sekvenčně specifické RNAi reakce.

AGO proteiny obsahují čtyři domény: PIWI, MID, PAZ a N-terminální. PIWI doména má endonukleázovou aktivitu. Všechny AGO *Arabidopsis thaliana* obsahují v katalytickém místě vysoce konzervovanou sekvenci Asp-Asp-His, krom AGO2 a AGO3, které obsahují Asp-Asp-Asp. V tomto místě štěpí RNA substrát za přítomnosti hořčnatého iontu (Rivas *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2005; Nowotny *et al.*, 2005). Po štěpení vzniká 5' produkt s 3'OH a 3' produkt s 5' fosfátem (Martinez a Tuschl, 2004). Osudu vzniklých produktů se budu věnovat v následujících kapitolách. MID doména váže 5' konec malé RNA. PAZ doména asociuje s nukleovými kyselinami a váže dvounukleotidový jednovláknový přesah 3' konce sRNA, nezávisle na sekvenci (Ma *et al.*, 2004).

Po navázání vedoucího vlákna proteinem AGO mluvíme o tzv. RISC komplexu, pro jehož formování i následující aktivitu je důležité asociace s dalšími proteiny. Jeho správné

složení je zajištěno hlavně chaperonem Hsp90 (Iki *et al.*, 2012). Stabilita a správné navázání siRNA do komplexu jsou mimo jiné zajištěny přítomností fosfátu na 5' konci vedoucího vlákna, který výrazně zvyšuje afinitu AGO k siRNA. Není však esenciální pro funkci tohoto komplexu (Rivas *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2005). O tom, s jakou sRNA bude AGO interagovat, rozhoduje hlavně velikost malé RNA a následně nukleotid na jejím 5' konci. Některé studie ukazují, že AGO si jako vedoucí vlákno vybírá z sRNA to, které má nižší termostabilitu na 5' konci (Eamens *et al.*, 2009). O dalším směřování RISC rozhoduje především typ AGO proteinu, ale i struktura duplexu, se kterým AGO interagoval (Baumberger a Baulcombe, 2005; Rivas *et al.*, 2005).

RISC komplex v buňce vyhledává, na základě navázané malé RNA, komplementární RNA vlákno. Podle typu AGO a celkové biogeneze dochází při interakci RISC s RNA k různým reakcím: štěpení nalezeného komplementárního vlákna, zabránění translaci nebo indukci kovalentních modifikací chromatinu. Ke štěpení komplementárního vlákna dochází za desátým nukleotidem vedoucího vlákna RISC komplexu, z pohledu 5' → 3' vedoucího vlákna (Elbashir *et al.*, 2001). Endonukleázovou aktivitu má samotný AGO s navázanou malou RNA a není k ní třeba žádných dalších proteinů (Rivas *et al.*, 2005; Baumberger a Baulcombe, 2005).

Jednotlivé paralogy AGO u *Arabidopsis* dělíme do tří skupin na základě podobnosti. První skupinu tvoří AGO1/5/10, druhou AGO2/3/7 a třetí AGO4/6/8/9 (Morel *et al.*, 2002).

#### **1. 4. 1. AGO1/5/10**

AGO1 váže miRNA, které jsou tvořeny proteinem DCL1 a některé siRNA, zahrnující ta-siRNA (primárně z *TAS1* genů; viz kapitola 4. 1.) a siRNA z transgenů, které jsou tvořené proteinem DCL4. RISC komplex tvořen z AGO1 štěpí za účasti ATP, které není nutné, ale zvyšuje jeho aktivitu. Nejčastěji váže 21 – 22 nt dlouhé malé RNA, ale je schopen navázat i 24 nt malou RNA. Jeho výskyt byl lokalizován do buněčného jádra i cytoplasmy (Vaucheret *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2005; Baumberger a Baulcombe, 2005). Primárně asociuje s malými RNA, které nesou na 5' konci uridin (Takeda *et al.*, 2008). Jelikož většina miRNA má na 5' konci uridin, AGO1 je nejdůležitějším AGO v miRNA dráze. Je rovněž považován za protein vysoce významný v antivirové obraně, neboť mutant *Arabidopsis* v *ago1*, *rdr6*, *sgs3*, *hen1* a *dcl4* byl vysoce citlivý k okurkovému mozaikovému viru (Morel *et al.*, 2002). Další výzkum však ukázal, že AGO1 s virovou siRNA prakticky neasociuje, a tedy jeho úloha v obraně proti virům bude asi méně významná (Baumberger a Baulcombe, 2005).

AGO10 je blízký paralog AGO1. Dvojitý mutant *ago1; ago10* je letální ve fázi embrya a tyto proteiny jsou tedy esenciální pro život rostliny. Mohou se však navzájem zastupovat (Lynn *et al.*, 1999).

AGO5 je druhý nejbližší paralog AGO1. Nachází se v jádře i cytoplasmě a preferuje cytosin na 5' konci malé RNA. Rostlinný mutant *ago5* nevykazuje žádný patrný vývojový defekt (Takeda *et al.*, 2008).

#### **1. 4. 2. AGO2/3/7**

AGO7 primárně asociuje s miR390, která je komplementární k *TAS3* transkriptu, což vede k iniciaci produkce ta-siRNA (viz kapitola 4.; Adenot *et al.*, 2006; Montgomery *et al.*, 2008). AGO2 a AGO3 proteiny mají na rozdíl od zbylých AGO v *Arabidopsis* v PIWI doméně Asp-Asp-Asp motiv (Nowotny *et al.*, 2005). Jsou si velice podobné a pravděpodobně vznikly nedávnou duplikací. Nacházejí se v jádře i cytoplasmě. AGO2 preferuje adenosin na 5' konci malé RNA. Mutanti *ago2* a *ago3* neprokazují žádnou změnu fenotypu (Takeda *et al.*, 2008).

#### **1. 4. 3. AGO4/6/8/9**

Třetí skupina AGO preferenčně váže 24 nt siRNA s 5' koncovým adenosinem (Qi *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2008). Společně se s RDR2 a dalšími faktory účastní epigenetických modifikací vedoucích k remodelaci chromatinu (Zilberman *et al.*, 2003). PTGS se pravděpodobně vůbec neúčastní a vyskytují se primárně v jádře. V diferencovaných vegetativních orgánech *Arabidopsis thaliana* se nejvíce vyskytuje AGO4. Jeho aktivita je mnohem vyšší než u ostatních AGO této skupiny. Mutace těchto proteinů způsobuje v různé míře snížení metylace některých endogenních úseků na chromatinu a současně dochází k chybné metylaci asymetrických cytosinů a CpNpG (kde N je libovolný nukleotid). Na metylaci CpG nemá ani jeden z těchto proteinů vliv. Současně AGO4 ovlivňuje metylaci histonu H3 na lysinu 9. Funkce AGO této skupiny se navzájem velmi překrývají (Zilberman *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2007), ale liší se spektrem vázaných malých RNA (tyto sRNA nepocházejí ze stejných lokusů). AGO4 a AGO6 váží sRNA, které vznikly z podobných lokusů. Při porovnání AGO4 a AGO9 bylo zjištěno, že jimi vázané sRNA naopak vznikají z odlišných lokusů. Tato různá preference vazby malých RNA může být ovlivněna různou expresí AGO, spolu s vlivem biochemických preferencí a asociujících proteinů. Většina malých RNA asociujících s touto skupinou AGO proteinů je spojena s repetitivními úseky DNA nebo transposony (Havecker *et al.*, 2010). AGO4 váže mimo jiné i podskupinu miRNA

(Qi *et al.*, 2006). Zároveň hraje důležitou roli v obraně proti bakteriálním patogenům, neboť mutanti *ago4* jsou vysoce citliví k *Pseudomonas syringae* (Agorio a Vera, 2007). V jádře interaguje s C-terminální doménou velké podjednotky RNA polymerázy V (Pol V; Li *et al.*, 2006). AGO6 se s Pol V váže silněji než ostatní AGO (Havecker *et al.*, 2010). AGO8 a AGO9 si jsou velice sekvenčně podobné a pravděpodobně vznikly nedávnou duplikací (Takeda *et al.*, 2008).

| AGO          | Velikost vázané malé RNA | Preferenční nukleotid na 5'konci | Preferenční sRNA    |
|--------------|--------------------------|----------------------------------|---------------------|
| <b>AGO1</b>  | 21-22nt                  | 5'U (76,1%)                      | <u>miRNA</u> /siRNA |
| <b>AGO5</b>  | 24nt                     | 5'U/C (83,5%)                    |                     |
| <b>AGO10</b> |                          |                                  |                     |
| <b>AGO2</b>  | 21nt                     | 5'A (85,7%)                      |                     |
| <b>AGO3</b>  |                          |                                  |                     |
| <b>AGO7</b>  | 21-22nt                  |                                  | miRNA               |
| <b>AGO4</b>  | 24nt                     | 5'A (74%)                        | <u>siRNA</u> /miRNA |
| <b>AGO6</b>  | 24nt                     | 5'A (94%)                        | siRNA               |
| <b>AGO8</b>  |                          |                                  |                     |
| <b>AGO9</b>  | 24nt                     | 5'A (97%)                        | siRNA               |

## 1. 5. RNA-dependentní RNA polymerázy

RDR mají u rostlin nezastupitelnou roli v RNAi. Vyskytují se od jednobuněčných organismů po mnohobuněčné, zahrnující: rostliny, houby, bezobratlé živočichy a další. Naopak u hmyzu a obratlovců nebyly nalezeny žádné homologní sekvence, ač RNAi u nich byla prokázána a má v nich významnou biologickou roli. Počet genů kódujících RDR se v rámci rostlinné říše liší. *Arabidopsis thaliana* kóduje šest genů pro RDR (Zong *et al.*, 2009). První RDR, na které byla prokázána její RNA-dependentní RNA syntéza, byla izolována z rajčete (Schiebel *et al.*, 1993; Schiebel *et al.*, 1998). Všechny RDR obsahují konzervovanou doménu se shodným DXDGD motivem (kde X je libovolná aminokyselina; Iyer *et al.*, 2003).

RDR1, RDR2 a RDR6 si jsou blíže příbuzné a liší se pouze v některých motivech, které zajišťují jejich odlišnou funkci. S RDR3a-c naopak sdílí malé množství motivů (Zong *et al.*, 2009). RDR1 používá jako templát hlavně ssRNA/DNA virů a viroidů při jejich replikaci v buňce. K jejich přepisování není třeba primerů. Některé viry kódují proteiny, které mohou její činnost omezit (Dalmay *et al.*, 2000). Exprese RDR1 je zvýšena v přítomnosti kyseliny salicylové. Vytvořená dsRNA bývá substrátem pro DCL2 a DCL4. RDR2 je asociována primárně s *de novo* metylací a remodelací chromatinu. Její funkci v buňce nemůže

nahradit jiná RDR (Chan *et al.*, 2004). RDR3a, RDR3b a RDR3c pravděpodobně vznikly nedávnými genovými duplikacemi a jejich funkce je zatím neznámá. RDR6 používá jako templát hlavně aberantní transkripty, které nemají čepičku či poly(A) konec (Luo a Chen, 2007). RDR6 se tak účastní biogeneze sekundárních siRNA, včetně ta-siRNA. Zároveň se ale podílí i na tvorbě nat-siRNA, některých virových dsRNA nebo dsRNA pocházejících ze sense transgenů (Peragine *et al.*, 2004; Yoshikawa *et al.*, 2005; Borsani *et al.*, 2005).

| Typ RDR      | Templát  | Funkce  | Hl. interakční partner |
|--------------|--|---|------------------------|
| <b>RDR1</b>  | Virové RNA   | Obrana při virové infekci, vysoká exprese v přítomnosti kyseliny salicylové             | DCL2, DCL4             |
| <b>RDR2</b>  | Produkt Pol IV   | Udržování asymetrické metylace DNA, remodelace chromatinu                               | DCL3                   |
| <b>RDR3a</b> | Funkce neznámá   |   |                        |
| <b>RDR3b</b> |  |   |                        |
| <b>RDR3c</b> |  |   |                        |
| <b>RDR6</b>  | Aberantní transkripty, produkty štěpení RISC, virové RNA | Tvorba sekundárních RNA, ta-siRNA, obrana při virové infekci, umlčování sense transgenů | DCL4, DCL2             |

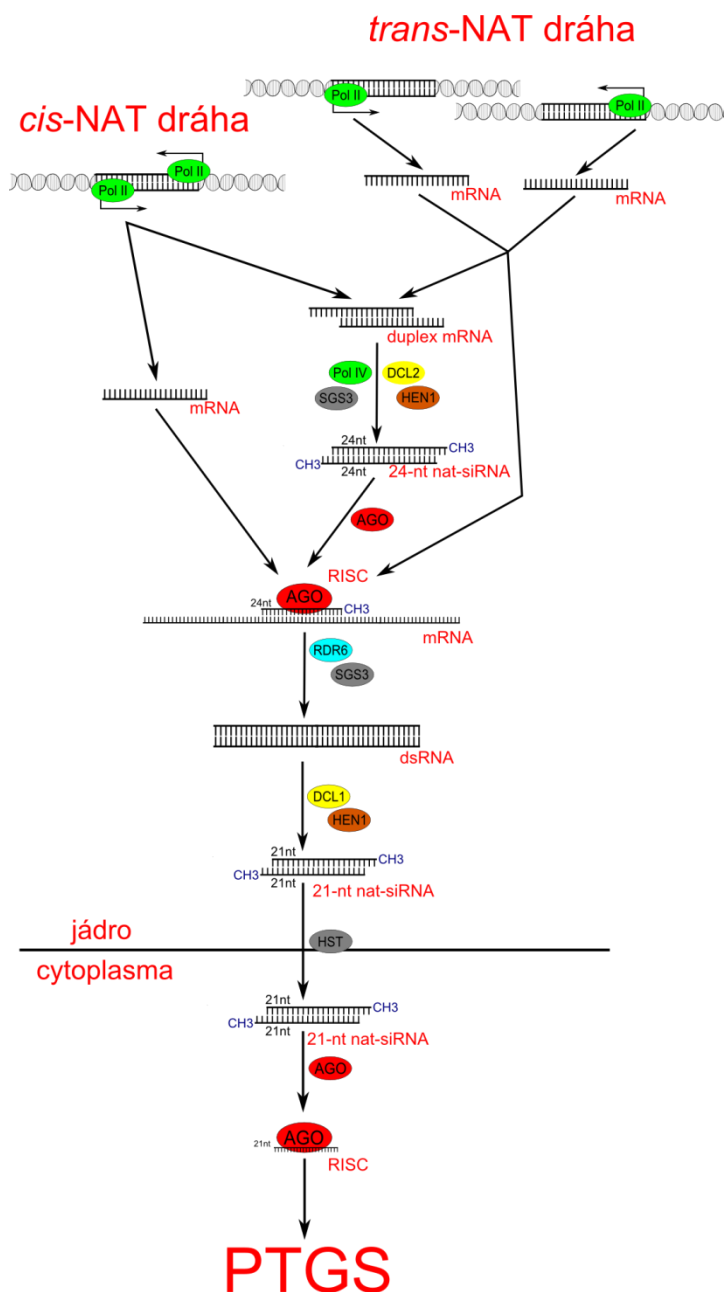
## 2. NAT dráha (natural antisense transcripts)

NAT dráha vychází z přepisu rostlinných genů, jejichž transkripty jsou vzájemně komplementární, tedy vážou se na základě watson-crickovských párování a mohou tak vytvářet dsRNA. V rostlinné buňce rozlišujeme dvě skupiny: *cis*-NAT a *trans*-NAT. *cis*-NAT vznikají párováním sense a antisense vláken, která vznikla ze stejného genového lokusu přepisovaného z obou stran. Pokud sense a antisense vlákna pochází z různých lokusů, nazýváme je *trans*-NAT. dsRNA vzniklá z *trans*-NAT zpravidla obsahuje nízký počet komplementárních úseků, které bývají často nedokonale párující a obsahují tzv. bubliny. Naopak *cis*-NAT jsou komplementární v dlouhých úsecích, které perfektně párují (Jin *et al.*, 2008). *Arabidopsis thaliana* kóduje ve svém genomu více jak 956 překrývajících se genů (Jen *et al.*, 2005), které mohou tvořit NAT. Většina z nich (72,1 %) se překrývá na 3' konci a 99 % NAT genů páruje přes svoji exonovou sekvenci (Jen *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). NAT dráha se podílí na různých úrovních regulace genové exprese, a to jak pro geny, ze kterých



byly nat-RNA přepsány, tak pro další geny *in trans*, k jejichž transkriptům je vzniklá nat-siRNA komplementární (Aravin *et al.*, 2001). Regulace pomocí nat-siRNA byla popsána především na nerostlinných modelech, kde probíhá na úrovni TGS i PTGS (Prescott a Proudfoot, 2002).

Příkladem *trans*-NAT dráhy může být reakce *Arabidopsis thaliana* na stres způsobený vyšším obsahem NaCl v půdě. Vystavení rostliny takovému stresu indukuje prepis genu *SRO5*, který má neznámou funkci. Jeho transkript páruje na svém 3' konci s 5' koncem *P5CDH* (delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase) transkriptu. *P5CDH* se účastní katabolismu P5C, který vede k hromadění ROS a zpomalení růstu. V buňkách je *P5CDH* přepisován konstitutivně.



Obr. 1 - NAT dráha

*SRO5* a *P5CDH* transkripty jsou komplementární v rozsahu 760 nt a vytvářejí tak dsRNA. Ta je zpracována prostřednictvím DCL2 do zřejmě jediného 24nt nat-siRNA duplexu (Borsani *et al.*, 2005). Na základě termostability 5' konců (Eamens *et al.*, 2009) se s AGO asociuje nat-siRNA vlákno pocházející ze *SRO5* transkriptu a tvoří se funkční RISC komplex. Ten štěpí transkripty *P5CDH*, a tím snižuje jejich hladinu. Rozštěpené transkripty *P5CDH* jsou zřejmě poté přepisovány pomocí RDR6 a SUPPRESSOR OF GENE SILENCING3 (SGS3) do dsRNA, která je substrátem pro DCL1, jenž tvoří sekundární 21nt nat-siRNA (více v kapitole 4.). Na vzniku primární 24nt i sekundárních 21nt nat-siRNA se dosud neznámým způsobem účastní i Pol IV. Snižování hladiny *P5CDH* vede ke snížení degradace prolinu,

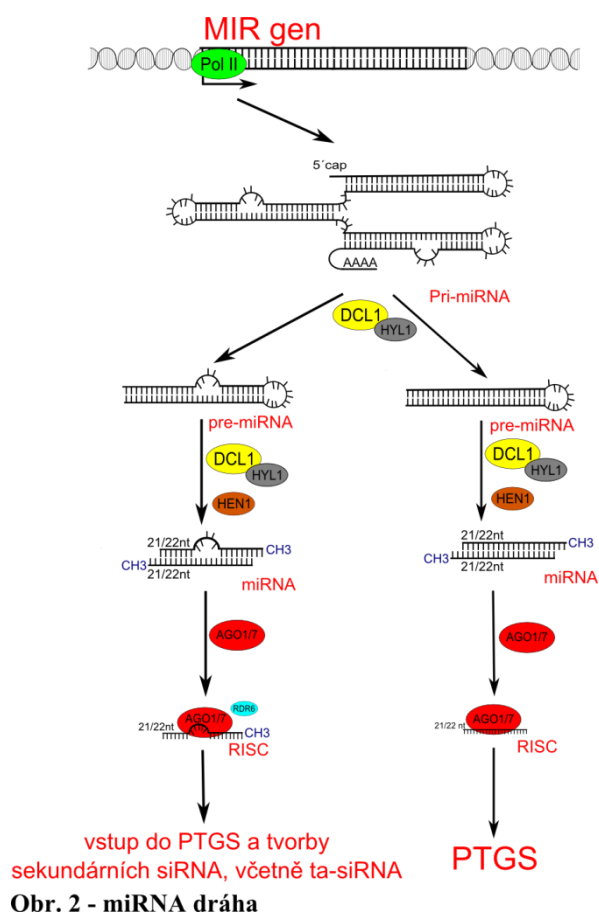
který rostlina potřebuje při reakci na stres způsobený solí. Souběžně dochází ke zvyšování hladiny ROS, které buňce sice škodí, ale současně jsou signálem pro další dráhy odpovídající na stres (Borsani *et al.*, 2005).

### 3. miRNA dráha

Mnoho dsRNA vzniká ze ssRNA, jejíž dva úseky jsou spolu komplementární a mohou tak vytvořit vnitřní duplex nebo duplexy. Přirozeně vznikají tyto vlásenky i při přepisu *MIR* genů. *MIR* geny jsou přepisovány hlavně DNA dependentní RNA polymerázou II (Pol II; Kurihara a Watanabe, 2004), neobsahují protein kódující sekvenci a nacházejí se mezi protein kódujícími geny, ale i v intronech (Bartel, 2004; Ying a Lin, 2005). Vzniklý transkript, tzv. primární miRNA (pri-miRNA), většinou obsahuje 5' čepičku a 3' poly(A) konec, svojí konformací vytváří strukturu plnou smyček. Bývá přibližně 1 kb dlouhá a protein DAWDLE na ni navádí DCL1, který ji štěpí na pre-miRNA (Morris *et al.*, 2006). DCL1 tvoří komplex s 1 a interaguje s proteinem SERRATE, tyto ovlivňují jeho funkci při tvorbě pre-miRNA z pri-miRNA (Kurihara *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Pre-miRNA je tvořena pouze jednou vlásenkou, většinou o délce 70 – 100 nt, bez 5' čepičky a 3' poly(A). Dvouvláknový úsek většinou obsahuje nepárující nukleotidy, „bubliny“. Pre-miRNA je většinou znovu rozpoznávána proteinem DCL1, který spolu s HYL1 vyštěpuje 21 či 22 nt dlouhou miRNA (Boutet *et al.*, 2003; Kurihara a Watanabe, 2004), která je pomocí HASTY (HST) transportována z jádra do cytoplasmy. Pravděpodobně ale existuje i jiná možnost exportu miRNA z jádra, neboť k transportu dochází i u *hst* mutantů. V porovnání s účinností transportu pomocí HST je alternativní transport velmi málo efektivní. Zralá miRNA se vyskytuje v cytoplasmě mnohem více než v jádře, naopak vedoucí vlákno se vyskytuje více v jádře než v cytoplasmě. Toto pozorování indikuje, že vedoucí vlákno v RISC komplexu působí hlavně v jádře (Park *et al.*, 2005). S miRNA asociují primárně AGO1 a AGO7. O tom, zda se duplex miRNA naváže do AGO1 nebo AGO7, rozhoduje preferenčně 5' nukleotid a množství dostupných AGO proteinů. Na základě sekvenování malých 22nt RNA bylo zjištěno, že většina miRNA obsahuje 5'U, a jsou tedy asociovány hlavně s AGO1 (Chen *et al.*, 2010).

Vzhledem k nedokonalému párování v pre-miRNA mohou vznikat miRNA s různě dlouhými vlákny, např. 21/21, 21/22 a 22/22 nukleotidů. V závislosti na párování v rámci duplexu miRNA se spouští různé kaskády reakcí.

Pokud jsou duplexy 21/21 nebo 21/22 miRNA s nedokonale párujícími nukleotidy, dochází po rozštěpení cílové RNA k tvorbě sekundárních siRNA (vč. ta-siRNA; viz kapitola 4.) Pokud jsou duplexy miRNA dokonale párující, tak k tvorbě sekundárních siRNA nedochází (Manavella *et al.*, 2012a). Autoři se v článku nezmiňují, jaký vliv na formování sekundárních siRNA mají dokonale nebo nedokonale párující 22/22 miRNA. Dokonale párující by vzhledem k DCL1 aktivitě vznikat neměly. Není ale zřejmé, jakou reakci spouští nedokonale párující duplex 22/22 miRNA. Jak uvádějí, podle sekvenování buněčných miRNA se tyto duplexy skoro nevyskytují a nejčastější jsou duplexy 21/22 miRNA.



miRNA hrají u rostlin roli například při vývoji květů, listů a dalších (Aukerman a Sakai, 2003; Palatnik *et al.*, 2003).

Mutace v genech DCL1, HYL1, AGO1 a HEN1 mají za následek mnoho vývojových defektů, které jsou způsobeny především nefunkčností MIR dráhy (Park *et al.*, 2002; Boutet *et al.*, 2003; Vaucheret *et al.*, 2004) a návazné dráhy tvořící sekundární siRNA (vč. ta-siRNA).

#### 4. Tvorba sekundárních siRNA, včetně ta-siRNA

Sekundární siRNA jsou siRNA tvořené z RNA molekul rozštěpených RISC. Jejich tvorba je minimálně v případě miRNA zřejmě podmíněna tím, že AGO navázal duplex miRNA s nedokonalým párováním (Manavella *et al.*, 2012a).

V případě, kdy se formuje RISC komplex z AGO1/7 spolu s nedokonale párujícím duplexem miRNA, dochází pravděpodobně ke konformační změně AGO při navazování duplexu. Tato konformační změna by mohla být signálem pro „přivolání“ RDR6 a dalších proteinů, které jsou potřeba k tvorbě sekundárních siRNA (Manavella *et al.*, 2012b). RISC komplex váže komplementární ssRNA (kódující mRNA či TAS transkript; viz níže) a

„přivolává“ SGS3. Štěpí komplementární transkript, čímž se vytváří 5' a 3' fragmenty. Fragment, který bude přepisován RDR6 do dsRNA, bývá stabilizován proteinem SGS3 (Yoshikawa *et al.*, 2013). Ze vzniklé dsRNA jsou pomocí DCL2/4 vyštěpovány 21 - 22nt sekundární siRNA (ta-siRNA). Ty jsou metylovány pomocí HEN1 a mohou stejně jako miRNA iniciovat PTGS (Xie *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2005). K přepisu 5' fragmentu primárně štěpené RNA pomocí RDR6 dochází méně často, než k přepisu 3' úseku (Yoshikawa *et al.*, 2013).

Pro tvorbu dsRNA z 3' a 5' fragmentů vzniklých rozstřížením transkriptu je důležitá komplementarita 3' a 5' konců vlákna miRNA neseného v RISC s transkriptem, na který RISC nasedá. Nepárující báze, mezi těmito konci nemají na formování ta-siRNA významný vliv. Pokud však 3' a 5' konce nejsou komplementární, k formování ta-siRNA prakticky nedochází (nedochází k vytvoření dsRNA pomocí RDR6; Zhang *et al.*, 2012). Tato komplementarita je důležitá k navázání SGS3. Ten chrání 3' střížený produkt před degradací, což je nezbytné pro tvorbu ta-siRNA. Autoři předpokládají, že tento mechanismus platí obecně pro tvorbu všech sekundárních RNA, nejen pro ta-siRNA (Yoshikawa *et al.*, 2013).

#### 4. 1. TAS geny

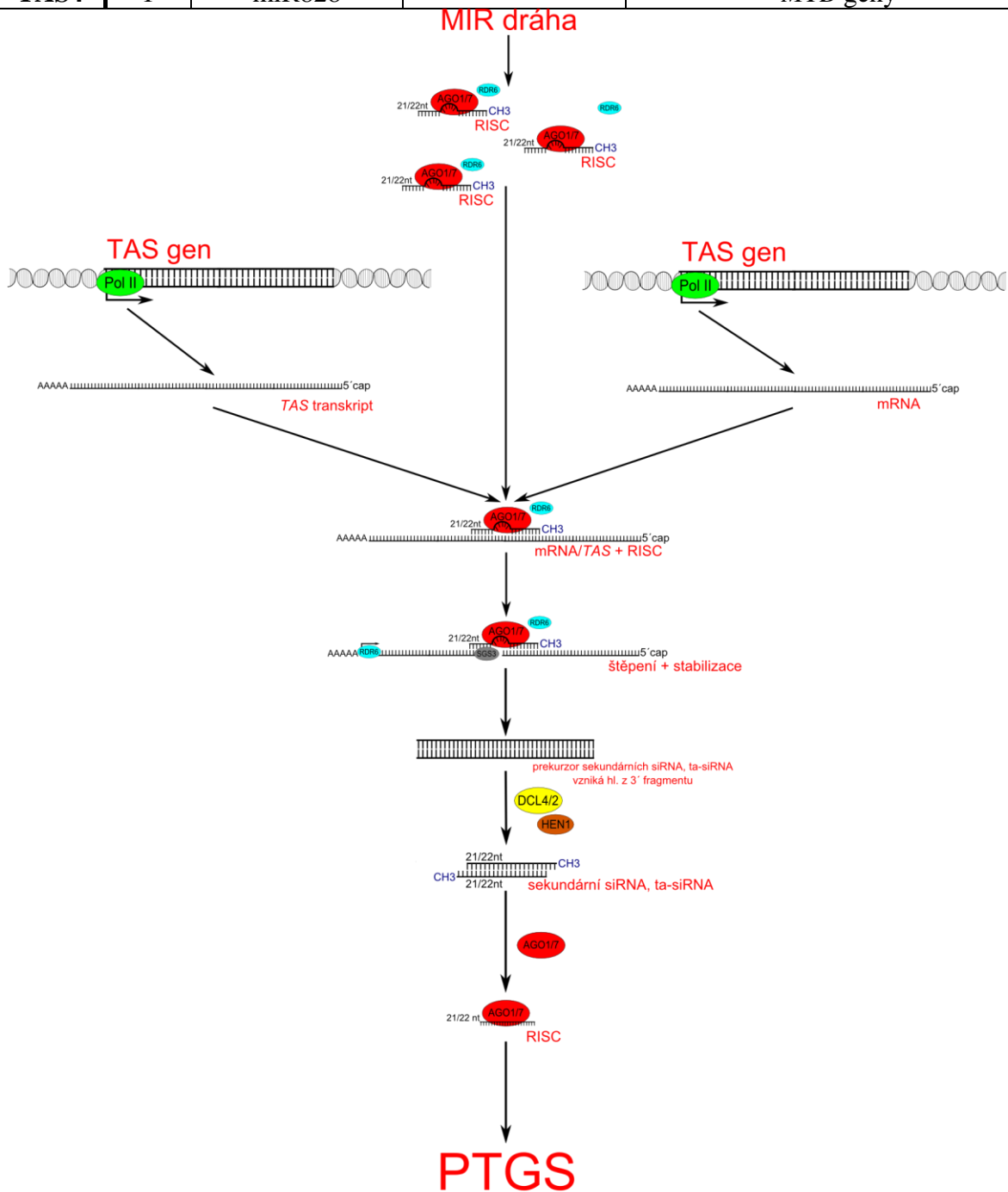
TAS transkript vzniká přepisem nekódujících TAS genů. *Arabidopsis* jich kóduje osm a řadí se do čtyř rodin: *TAS1a-c*, *TAS2*, *TAS3a-c* a *TAS4*. Každý z těchto genů obsahuje aspoň jedno cílové místo pro miRNA, které zajišťuje definované místo stříhu. Následná biogeneze vede k tvorbě sekundárních siRNA, v tomto případě tzv. ta-siRNA. Jedná se tedy o specifickou podskupinu spadající do dráhy tvořící sekundární siRNA. ta-siRNA umožňují umlčení genů *in trans* (Yoshikawa *et al.*, 2005; Axtell *et al.*, 2006).

Sestřih *TAS1a-c* a *TAS2* transkriptu zajišťuje miR173. Duplex je tvořen 22 nt vedoucím vláknem a 21 nt vláknem, které bývá jen zřídka navazováno do AGO (Allen *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010). *TAS4* je sestřihován pomocí miR828. V těchto případech vznikají ta-siRNA z 3' stříženého produktu. ta-siRNA z *TAS1* a *TAS2* regulují geny kódující proteiny neznámých funkcí, některé z těchto proteinů obsahují PPR motiv. ta-siRNA z *TAS4* regulují expresi některých MYB transkriptů (Rajagopalan *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010).

*TAS3* obsahuje dvě místa pro nasednutí miR390. První na 3' konci, které je komplementární a dochází zde k sestřihu. Druhé se nachází na 5' konci a obsahuje nepárující báze s 9 - 11 nukleotidem miR390. Bublina v katalytickém místě způsobuje, že zde nedochází ke štěpení. Tato nekomplementarita je konzervována u krytosemenných rostlin (Axtell *et al.*,

2006). ta-siRNA vznikají z 5' stříženého produktu (Rajagopalan *et al.*, 2006) a regulují hladinu mRNA kupříkladu AUXIN RESPONSNÍ FAKTORŮ (ARF) *ARF3* a *ARF4*. Ty jsou důležité např. při morfogenezi listů (Adenot *et al.*, 2006).

| Rodina TAS | Počet genů | Komplementární miRNA | Hlavní interakční AGO | Geny, které regulují                                     |
|------------|------------|----------------------|-----------------------|--|
| TAS1       | 3          | miR173               | AGO1                  | Geny neznámých funkcí, některé s PPR proteinovým motivem |
| TAS2       | 1          |                      |                       |  |
| TAS3       | 3          | miR390               | AGO7                  | ARF3 a ARF4 geny   |
| TAS4       | 1          | miR828               |                       | MYB geny   |



Obr. 3 - tvorba sekundárních siRNA (ta-siRNA)

## 5. Chromatin remodelující dráha

Níže popsaná dráha vede k remodelaci chromatinu především pomocí metylace DNA a histonů. Represní značení (metylace DNA a histonů na určitých pozicích<sup>1</sup>) vede ke kondenzaci chromatinu do heterochromatinu, a tím i ke snížení exprese genů v daném lokusu. Touto ochranou je jednak zabráněno přepisu nežádoucích sekvencí (transposonů, repetitivních sekvencí, intergenových oblastí ale i genů, jejichž produkt v daném pletivu/buňce nemá funkční význam nebo je jeho produkt nežádoucí; Onodera *et al.*, 2005) a jednak udržování především repetitivních oblastí, v rekombinačně neaktivním stavu. Narozdíl od výše popsaných drah se jí navíc účastní dvě rostlinně specifické polymerázy, jejichž funkce je popsána níže. Významný vliv na tuto dráhu mají malé RNA. Účastní se jí necelá polovina buněčných 21nt siRNA, více jak polovina 22nt siRNA a přibližně 90 % všech 24nt siRNA (Zhang *et al.*, 2007).

### 5.1. DNA-dependentní RNA polymeráza IV a V (Pol IV a Pol V)

Rostlinné buňky mají mimo klasických eukaryontních DNA-dependentních RNA polymeráz I, II a III ještě polymerázu IV a V. Tyto polymerázy jsou příbuzné Pol II a mají funkci hlavně v udržování a *de novo* tvorbě heterochromatinu (Onodera *et al.*, 2005). Polymerázy I-III typicky přepisují euchromatin a kondenzovaný heterochromatin s metylovanou DNA nepřepisují vůbec nebo jen s velmi nízkou frekvencí. Naopak Pol IV zřejmě přepisuje hlavně heterochromatin (Onodera *et al.*, 2005; Pontes *et al.*, 2006).

V genomu *Arabidopsis thaliana* byly nalezeny dva blízce paralogní geny ke genu pro největší podjednotku Pol II (NRPB1), tyto geny byly označeny *NRPD1a* a *NRPD1b* a příslušné RNA polymerázy byly označeny jako Pol IVa a Pol IVb (Kanno *et al.*, 2005). Později byla prokázána vysoká funkční rozdílnost mezi polymerázami nesoucími tyto podjednotky, a proto byly přejmenovány na NRPD1 a NRPE1<sup>2</sup> a příslušné polymerázy jsou nově značeny Pol IV a Pol V (Wierzbicki *et al.*, 2008). Obě velké podjednotky jsou exprimovány ve všech rostlinných částech huseníčku, jsou lokalizovány v jádře a hrají roli při formování heterochromatinu (Pontier *et al.*, 2005; Onodera *et al.*, 2005). Obě obsahují C-terminální DCL-like doménu, NRPE1 obsahuje navíc konzervovanou hydrofilní doménu

---

<sup>1</sup> Metylace histonů může vést jak k aktivaci, tak represí transkripce. Záleží, na jakých pozicích k ní dochází.

<sup>2</sup> Abych zpřehlednila následující text, budu používat nové značení Pol IV (= dříve Pol IVa) a Pol V (= Pol IVb), největší podjednotka Pol IV - NRPD1 (=NRPD1a) a největší podjednotka Pol V - NRPE1 (=NRPD1b). A to i v případech, kde citované články používají staré značení.

bohatou na dipeptidové úseky tryptofan-glycine/glycine-tryptofan (WG/GW), která je schopna interagovat s AGO (nejčastěji s AGO4; El-Shami *et al.*, 2007).

Pol V přepisuje zřejmě jak euchromatin, tak heterochromatin. Vlastní transkripci Pol V napomáhá DDR komplex pravděpodobně rozvolňující DNA. Je tvořený proteiny DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1 (Kanno *et al.*, 2004), DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3 (Kanno *et al.*, 2008), RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1 (Gao *et al.*, 2010). DDR komplex je nezbytný pro tvorbu transkriptů Pol V (Law *et al.*, 2010).

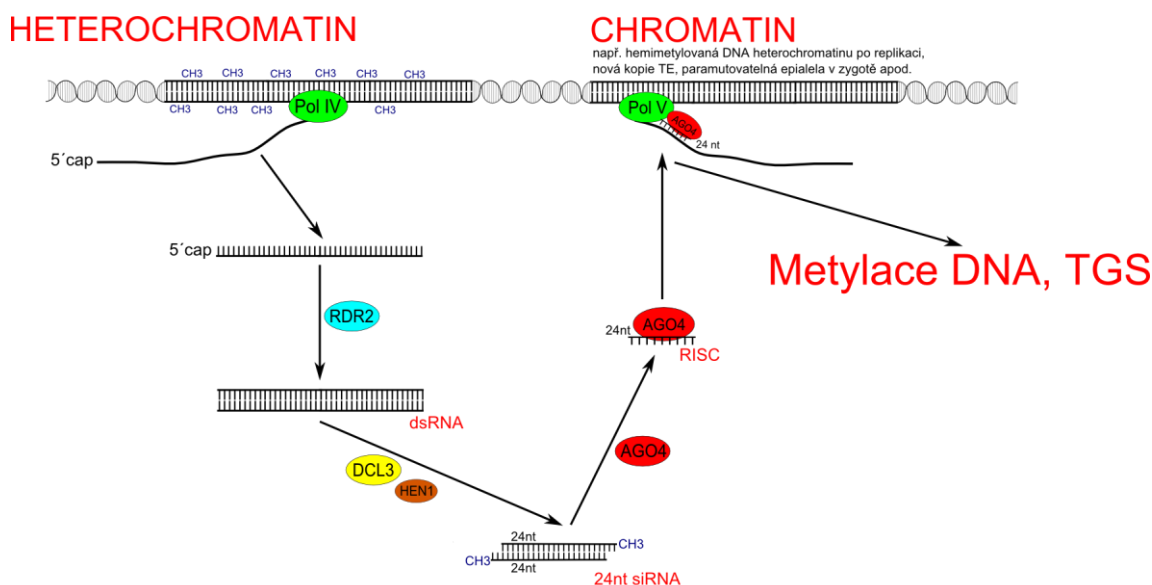
## 5. 2. Metylace DNA závislá na malých RNA

RdDM, neboli metylace DNA řízená malými RNA je proces, v němž hraje klíčovou roli Pol V, která zprostředkovává rozpoznání cílové sekvence určené k metylaci. To je umožněno interakcí jejích nascentních transkriptů s AGO nesoucím malou RNA, která zpravidla vzniká z transkriptů Pol IV. Transkripty Pol IV jsou přepisovány v jadérku pomocí RDR2, a tím je z nich tvořena dsRNA (Zhang *et al.*, 2007), která je substrátem hlavně pro DCL3. DCL3 ji naštěpí na 24nt hc-siRNA (Xie *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2005), které jsou metylované pomocí HEN1 a mimo jiné podle 5' koncového nukleotidu asociovány s AGO 4/6 a 9. Vzniklý RISC opouští jadérko, a pokud interaguje s vláknem tvořeným Pol V, tak dochází k jeho interakci (přes AGO a WG/GW motivy) s C-terminální doménou velké podjednotky Pol V (NRPE1). Pak se zřejmě přibližuje RISC komplex k chromatinu, který je následně modifikován (Li *et al.*, 2006; El-Shami *et al.*, 2007; Wierzbicki *et al.*, 2009). Takovýto signál vede nejspíše primárně k metylaci DNA a následně k metylaci/deacetylaci histonů. Těchto procesů se účastní mnoho proteinů. K *de novo* metylaci cytosinů na přepisované DNA je třeba metyl transferáz DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 1/2 a dalších. Při represním značení histonů dochází jejich deacetylaci a metylaci, především na histonech H3 na lysinu 9 (Xie *et al.*, 2004; Zilberman *et al.*, 2003).

Tímto způsobem se udržuje metylace heterochromatinu přepisovaného Pol IV nebo dochází k *de novo* metylaci euchromatinu v reakci na přítomnost komplementárních 24nt siRNA v buňce. V celé této dráze se vyskytuje velké množství interakčních partnerů a problematice se věnuje vysoké množství laboratoří na celém světě. V současnosti se ve vědecké literatuře objevuje řada nových poznatků, a pokud mají čtenáři zájem o bližší poznání této problematiky, doporučuji k přečtení bakalářskou práci Šárky Motylové

(„Metylace DNA řízená malými RNA u *Arabidopsis thaliana*“), která se jí věnuje do podrobná.

*De novo* metylace je zřejmě i mechanismem, který zprostředkovává paramutace - umlčení aktivní kopie určitého genu v důsledku přítomnosti jeho umlčené varianty. Vyskytuje se po oplození, kdy jedna z rodičovských gamet má konkrétní gen metylovaný a druhá ne. Po splynutí gamet dojde k *de novo* metylaci i nemetylované kopie genu, jelikož v zygotě se vyskytují 24nt siRNA produkované z metylované DNA druhé gamety (Sidorenko *et al.*, 2009).



Obr. 4 - Chromatin remodelující dráha

## 6. Viry spouštěná RNAi

Genom rostlinných virů je tvořen různými nukleovými kyselinami. Rostlinné viry zahrnují RNA i DNA viry, které mohou být jednovláknové nebo dvouvláknové. Mezi jednovláknovými dále rozlišujeme +ssRNA, -ssRNA (sense a antisense) a jednovláknové DNA (ssDNA) viry. Takovéto viry napadají rostlinné buňky, které se jejich napadení brání především pomocí mechanismů RNAi. Ty se u jednotlivých typů virů liší. Společné všem drahám protivirové RNAi je metylace duplexu v-siRNA pomocí HEN1 (Blevins *et al.*, 2006; Zvereva a Pooggin, 2012) a tvorba sekundárních v-siRNA (viz 6. 1.; Zvereva a Pooggin, 2012). Jelikož je toto téma velice rozsáhlé, budu se v následujících kapitolách věnovat pouze základním mechanismům protivirové RNAi, uvedené na některých typech virů.



## 6. 1. RNA viry

Všechny typy RNA virů se replikují přes dsRNA intermediát (pomocí rostlinných nebo virových RDR), který je spouštěčem pro RNAi (Shimura a Pantaleo, 2011).

Nejvíce rostlinných virů má genom ve formě +ssRNA. Množí se v cytoplasmě a replikují se virovou RDR, kterou povětšinou kódují. Ta přepíše +ssRNA vlákno do dsRNA a vzniklé -ssRNA vlákno následně použije jako templát pro tvorbu kódujících +ssRNA. V době kdy se vir nachází v cytoplasmě jako dsRNA intermediát může rostlina takovýto substrát štěpit pomocí DCL4 (tvorba 21 nt) a DCL2 (tvorba 22 nt), za vzniku dokonale párujících primárních v-siRNA. Antivirové obrany se nejvíce účastní DCL4, jak bylo zjištěno na *dcl4* rostlinných mutantech. Nemutované rostliny obsahovaly vysokou hladinu 21nt v-siRNA (tvořené DCL4) a nízkou hladinu 22 nt (méně jak 20 % celkové populace v-siRNA). Mutované *dcl4* rostliny obsahovaly více 22nt v-siRNA než 21nt (Deleris *et al.*, 2006; Llave, 2010; Shimura a Pantaleo, 2011). DCL1 a DCL3 se v této obraně neúčastní vůbec nebo jen velmi málo (Deleris *et al.*, 2006; Ding a Voinnet, 2007).

Substrátem pro DCL4/2 jsou také + a – ssRNA, které vytváří vlásečkové struktury. Vznikají tak primární, nedokonale párující 21/22nt v-siRNA (tato dráha je společná i DNA virům). Při většině infekcí se těchto malých RNA v napadených buňkách vyskytuje mnohem více než v-siRNA, které vznikly z dokonale párujících intermediátů (popsaných výše; Shimura a Pantaleo, 2011).

Další možností protivirové obrany je vyhledávání aberantních transkriptů pomocí rostlinných RDR (společná dráha DNA virům). Při masivní virové transkripci tak dochází k tvorbě transkriptů, které jsou substrátem pro RDR1 a RDR6. Vzniklá dsRNA je opět substrátem pro DCL4/2 (Shimura a Pantaleo, 2011).

## 6. 2. DNA viry

Obrana proti DNA virům zahrnuje oproti RNA virům všechny DCL a jimi tvořené 21, 22 a 24nt v-siRNA (Blevins *et al.*, 2006; Moissiard a Voinnet, 2006). RNAi povětšinou spouští přes své antisense transkripty, produkty RDR nebo dsRNA úseky v sekundární struktuře ssRNA (Shimura a Pantaleo, 2011). Mechanizmy RNAi jsou obdobné obraně proti RNA virům, popsaným výše.

Jednovláčkové DNA viry se replikují přes dsDNA intermediát. Například geminiviry jsou tvořeny kružnicovou ssDNA. Z jejího dsRNA intermediátu vznikají sense a antisense transkripty, které jsou komplementární na 3' konci. Ty mohou dimerizovat a takto vzniklá

dsRNA je substrátem pro DCL, za vzniku dokonale párujících primárních v-siRNA. 21/22nt v-siRNA mají obdobné efekty jako u RNA virů. 24nt v-siRNA zprostředkovávají u DNA virů pomocí AGO4 metylaci dsRNA intermediátu/kódující sekvence (Chellappan *et al.*, 2004; Shimura a Pantaleo, 2011).

Primární v-siRNA (z RNA i DNA virů) asociují hlavně s AGO1/7, ale také s AGO2/4/5, a vytváří RISC komplex, který štěpí komplementární virové sRNA (Takeda *et al.*, 2008; Garcia-Ruiz *et al.*, 2010). To vede k jejich degradaci nebo přivolání RDR6/1 (ale také RDR2) a dalších proteinů, které přepíší střížený fragment do dsRNA (Moissiard *et al.*, 2007; Garcia-Ruiz *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Ta je substrátem pro DCL4/2 a vytváří se tak sekundární v-siRNA. Tímto se umocňuje množství v-siRNA v buňce, urychluje to tak eliminaci virových sRNA v infikované buňce, a zároveň umožňuje šíření dostatečného množství v-siRNA po rostlině pro zajištění systémové rezistence (Moissiard *et al.*, 2007). O tom, s jakým AGO bude v-siRNA asociovat nebo jakou RDR bude tvořeno dsRNA vlákno, rozhodují specifické rysy každého konkrétního typu viru.

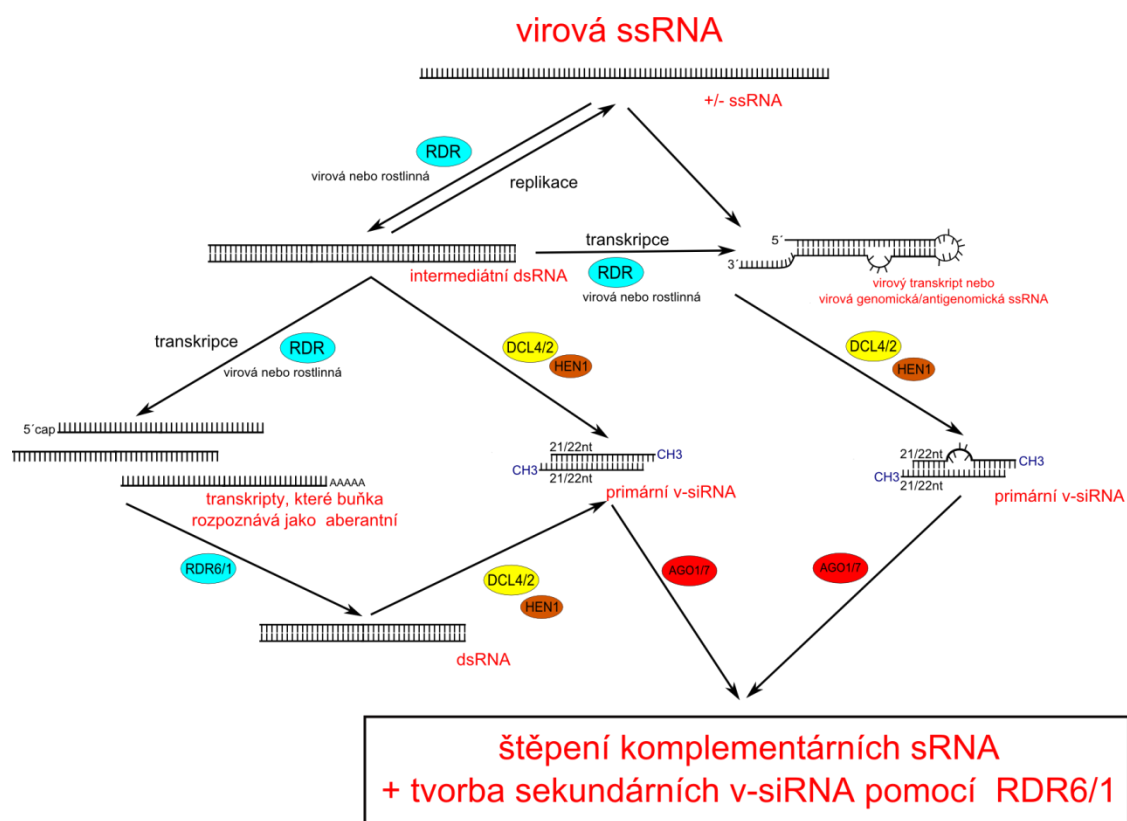
### **6.3. Mechanizmy obrany virů proti RNAi**

Viry se RNAi brání různými mechanismy. Většina virů si kóduje proteiny, které chrání jejich ssRNA před komponenty RNAi. Ale jako hlavní obranu používají tzv. supresory silencingu (proteiny blokující RNAi).

RNA viry používají hlavně supresory, které mohou: vyvazovat/degradovat sRNA nacházející se v buňce, inhibovat aktivitu DCL/RISC/HEN1, navádět AGO do proteasomu pomocí ubiquitinace. Dále pak podporovat tvorbu konkrétních miRNA (např. miR168 nebo miR162), které jsou negativními regulátory AGO a DCL. A mnoho dalších (Dunoyer *et al.*, 2004; Ding a Voinnet, 2007; Shimura a Pantaleo, 2011; Zvereva a Pooggin, 2012).

DNA viry využívají supresory silencingu například k blokování cytoplasmatických komponentů, účastnících se metylace DNA. Dále využívají mechanismus, kdy vytváří nekódující ssRNA, které jsou postupně zpracovány do v-siRNA, jenž zahlcují rostlinný RNAi aparát a ten nezvládá efektivně bránit pomnožení viru (Shimura a Pantaleo, 2011; Zvereva a Pooggin, 2012).

Na základě těchto zjištění se předpokládá, že například výskyt několika genových paralogů kódujících různé DCL v rostlinách, na rozdíl od savců (kteří kódují jen jeden Dicer), je právě důsledkem protivirové obrany s potřebou maximální flexibility vzhledem ke schopnosti virů vyřadit z funkce různé součásti RNAi dráhy (Deleris *et al.*, 2006; Waterhouse a Fusaro, 2006; Ding a Voinnet, 2007).



Obr. 5 - Viry spouštěná RNAi

## 7. Využití RNAi v praxi

Mechanismy RNAi používáme jako účinný a efektivnější nástroj pro analýzu funkcí rostlinných genů. Metoda je založena na snížení exprese konkrétního genu nebo jeho úplné umlčení, následné sledování rostlinného fenotypu a odvozování jakou funkci cílený gen měl. Snížení exprese lze dosáhnout expresí speciálně designovaných transgenů spouštějících RNAi nebo prostřednictvím virem indukovaného genového umlčení (VIGS).

Termín VIGS byl poprvé zaveden pro jev, kdy je do virového genomu vložena sekvence rostlinného genu, a ten je po infekci rostlinou umlčován v rámci protivirové obrany (umlčování viru). Tomuto objevu předcházela pozorování, kdy byla navozena rezistence rostliny vůči viru po vnesení transgenů odvozeného od virové RNA. Virová RNA byla degradována na základě siRNA vzniklých z transgenů (van Kammen, 1997). VIGS, využívající rekombinantní virový vektor k blokování exprese endogenních genů, byla metoda oceňována hlavně pro svoji jednoduchost, rychlost a možnost ovlivnění takřka libovolného rostlinného materiálu. Naopak mezi nevýhody této metody se například počítá, že neumožňuje úplné umlčení, jelikož k umlčení dochází hlavně na úrovni PTGS (Baulcombe,

1999). Rovněž je nutné plné genové zmapování modelového organismu, aby nedocházelo k umlčení nechtěných genů. Při VIGS se využívají modifikované virové vektory, nesoucí fragment rostlinného genu, který je po infikování buňky umlčen pomocí RNAi. Nejpoužívanější virový vektor je odvozen z RNA viru *Tobacco rattle virus*, který je účinný hlavně mezi rostlinami čeledi *Solanaceae*, zahrnující *Nicotina benthamiana* (Ratcliff *et al.*, 2001), rajče (Liu *et al.*, 2002), brambor (Brigneti *et al.*, 2004) a petúnií (Chen *et al.*, 2004). Pro VIGS v *Arabidopsis thaliana* je používán stejný virový vektor s jinou metodou jeho vnesení. Virový vektor je umístěn mezi T-DNA hraniční oblasti *Agrobacteria tumefaciens*, které je schopné vložit geny mezi těmito oblastmi do genomu rostlinné buňky (Ratcliff *et al.*, 2001; Burch-Smith *et al.*, 2006). V současnosti existuje velké množství takovýchto virových vektorů, využívaných pro sledování buněčné signalizace, metabolismu, reakcí na biotické a abiotické stresy, vývoj jednotlivých pletiv a mnoho dalších (Becker a Lange, 2010; Purkayastha a Dasgupta, 2009).

V souvislosti s odhalováním zákonitostí RNAi byla vedle VIGS a již dlouho používané inaktivace pomocí antisense RNA zavedena pro inaktivaci genů metoda využívající jednoduché konstrukty s invertovanou repeticí, které po transkripci vytváří vlásenkovou strukturu. K tvorbě dsRNA tak není třeba žádných dalších proteinů, čímž je buňka méně energeticky zatěžována a celý proces se tím urychlí (Lacomme *et al.*, 2003). Vzniklá dsRNA je primárně štěpena pomocí DCL4, za vzniku 21nt siRNA. Ta nejvíce asociuje s AGO1 a v RISC komplexu iniciují PTGS (Ding a Voinnet, 2007). Na efektivnost techniky má vliv zvolený vektor, nesený fragment a jeho délka, ale také orientace fragmentu, metoda a místo inserce v genomu. Délka neseného fragmentu by neměla být delší jak 1500 bází. Nejčastěji se používají délky v rozmezí 150 – 800 nt, optimum se nachází v rozmezí 200 – 300 nt.

## 8. Závěr

V předchozích odstavcích jsem se pokusila shrnout současné znalosti RNA interference. Jednotlivé dráhy jsou mezi sebou velmi propojeny a využívají společných mechanismů i proteinů. Informace jsem sepisovala tak, jak je uvádí autoři. Důležité je si uvědomit, že některé mechanismy, které byly popsány např. na miRNA mohou působit stejně na siRNA a obráceně. Jako například transport miRNA z jádra do cytoplasmy pomocí HST. U ostatních drah, netýkajících se miRNA, jsem tento protein na export z jádra nezmiňovala, ale na základě informací z literatury jej předpokládám. Stejně tak, že tvorbu sekundárních siRNA způsobují jak miRNA, tak siRNA. Ale v tomto případě bude zřejmě mechanismus regulace odlišný.

## 9. Seznam použité literatury

- Adenot, X., Elmayan, T., Laressergues, D., Boutet, S., Bouché, N., Gascioli, V., and Vaucheret, H.** (2006). DRB4-Dependent TAS3 trans-Acting siRNAs Control Leaf Morphology through AGO7. *Current Biology* **16**: 927–932.
- Agorio, A. and Vera, P.** (2007). ARGONAUTE4 Is Required for Resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*(W). *Plant Cell* **19**: 3778–90.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., and Carrington, J.C.** (2005). microRNA-Directed Phasing during Trans-Acting siRNA Biogenesis in Plants. *Cell* **121**: 207–221.
- Aravin, A.A., Naumova, N.M., Tulin, A.V., Vagin, V.V., Rozovsky, Y.M., and Gvozdev, V.A.** (2001). Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Current Biology* **11**: 1017–1027.
- Aukerman, M.J. and Sakai, H.** (2003). Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2-Like Target Genes. *Plant Cell* **15**: 2730–2741.
- Axtell, M.J., Jan, C., Rajagopalan, R., and Bartel, D.P.** (2006). A Two-Hit Trigger for siRNA Biogenesis in Plants. *Cell* **127**: 565–577.
- Bartel, D.P.** (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **116**: 281–297.
- Baulcombe, D.** (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **431**: 356–363.
- Baulcombe, D.C.** (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 109–113.
- Baumberger, N. and Baulcombe, D.C.** (2005). *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *PNAS* **102**: 11928–11933.
- Becker, A. and Lange, M.** (2010). VIGS – genomics goes functional. *Trends in Plant Science* **15**: 1–4.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J.** (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363–366.
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H.-S., Vazquez, F., Robertson, D., Meins, F.J., Hohn, T., and Pooggin, M.M.** (2006). Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Research* **34**: 6233–6246.

- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R., and Zhu, J.-K.** (2005). Endogenous siRNAs Derived from a Pair of Natural cis-Antisense Transcripts Regulate Salt Tolerance in Arabidopsis. *Cell* **123**: 1279–1291.
- Boutet, S., Vazquez, F., Liu, J., Béclin, C., Fagard, M., Gratias, A., Morel, J.-B., Crété, P., Chen, X., and Vaucheret, H.** (2003). Arabidopsis HEN1: A Genetic Link between Endogenous miRNA Controlling Development and siRNA Controlling Transgene Silencing and Virus Resistance. *Current Biology* **13**: 843–848.
- Brigneti, G., Martín-Hernández, A.M., Jin, H., Chen, J., Baulcombe, D.C., Baker, B., and Jones, J.D.G.** (2004). Virus-induced gene silencing in Solanum species. *The Plant Journal: For Cell And Molecular Biology* **39**: 264–272.
- Brodersen, P. and Voinnet, O.** (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* **22**: 268–280.
- Burch-Smith, T.M., Schiff, M., Liu, Y., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2006). Efficient Virus-Induced Gene Silencing in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **142**: 21–27.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., and Baulcombe, D.C.** (2000). An RNA-Dependent RNA Polymerase Gene in Arabidopsis Is Required for Posttranscriptional Gene Silencing Mediated by a Transgene but Not by a Virus. *Cell* **101**: 543–553.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., and Voinnet, O.** (2006). Hierarchical Action and Inhibition of Plant Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense. *Science* **313**: 68–71.
- Ding, S.-W. and Voinnet, O.** (2007). Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell* **130**: 413–426.
- Dunoyer, P., Lecellier, C.-H., Parizotto, E.A., Himber, C., and Voinnet, O.** (2004). Probing the MicroRNA and Small Interfering RNA Pathways with Virus-Encoded Suppressors of RNA Silencing. *Plant Cell* **16**: 1235–1250.
- Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J.C., and Voinnet, O.** (2010). Small RNA Duplexes Function as Mobile Silencing Signals Between Plant Cells. *Science* **328**: 912–916.
- Eamens, A.L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Wang, M.-B., and Waterhouse, P.M.** (2009). The Arabidopsis thaliana double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *RNA* **15**: 2219–2235.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T.** (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**: 188–200.
- El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M.-A., Jacobsen, S.E., Cooke, R., and Lagrange, T.** (2007). Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev.* **21**: 2539–2544.
- Finnegan, E.J., Margis, R., and Waterhouse, P.M.** (2003). Posttranscriptional Gene Silencing Is Not Compromised in the Arabidopsis CARPEL FACTORY (DICER-

- LIKE1) Mutant, a Homolog of Dicer-1 from *Drosophila*. *Current Biology* **13**: 236–240.
- Gao, Z., Liu, H.-L., Daxinger, L., Pontes, O., He, X., Qian, W., Lin, H., Xie, M., Lorkovic, Z.J., Zhang, S., Miki, D., Zhan, X., Pontier, D., Lagrange, T., Jin, H., Matzke, A.J.M., Matzke, M., Pikaard, C.S., and Zhu, J.-K.** (2010). An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature* **465**: 106–9.
- Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Fahlgren, N., Brempelis, K.J., and Carrington, J.C.** (2010). Arabidopsis RNA-Dependent RNA Polymerases and Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense and Small Interfering RNA Biogenesis during Turnip Mosaic Virus Infection. *Plant Cell* **22**: 481–496.
- Havecker, E.R., Wallbridge, L.M., Hardcastle, T.J., Bush, M.S., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Schwach, F., Doonan, J.H., and Baulcombe, D.C.** (2010). The Arabidopsis RNA-Directed DNA Methylation Argonautes Functionally Diverge Based on Their Expression and Interaction with Target Loci. *Plant Cell* **22**: 321–334.
- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K., and Fukuhara, T.** (2005). Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB- family dsRNA-binding proteins in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **57**: 173–188.
- Chan, S.W.-L., Zilberman, D., Xie, Z., Johansen, L.K., and al, et** (2004). RNA Silencing Genes Control de Novo DNA Methylation. *Science* **303**: 1336.
- Chellappan, P., Vanitharani, R., and Fauquet, C.M.** (2004). Short Interfering RNA Accumulation Correlates with Host Recovery in DNA Virus-Infected Hosts, and Gene Silencing Targets Specific Viral Sequences. *J. Virol.* **78**: 7465–7477.
- Chen, H.-M., Chen, L.-T., Patel, K., Li, Y.-H., Baulcombe, D.C., and Wu, S.-H.** (2010). 22-nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *PNAS* **107**: 15269–15274.
- Chen, J.C., Jiang, C.Z., Gookin, T., Hunter, D., Clarke, D.G., and Reid, M.S.** (2004). Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence. *Plant molecular biology.* **55**: 521–530.
- Iki, T., Yoshikawa, M., Meshi, T., and Ishikawa, M.** (2012). Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants. *The EMBO Journal* **31**: 267–278.
- Iyer, L.M., Koonin, E.V., and Aravind, L.** (2003). Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases. *BMC Structural Biology* **3**: 1.
- Jen, C.-H., Michalopoulos, I., Westhead, D.R., and Meyer, P.** (2005). Natural antisense transcripts with coding capacity in Arabidopsis may have a regulatory role that is not linked to double-stranded RNA degradation. *Genome Biology* **6**: R51.



- Jin, H., Vacic, V., Girke, T., Lonardi, S., and Zhu, J.-K.** (2008). Small RNAs and the regulation of cis-natural antisense transcripts in Arabidopsis. *BMC Molecular Biology* **9**: 6.
- Van Kammen, A.** (1997). Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants. *Trends in Plant Science* **2**: 409–411.
- Kanno, T., Bucher, E., Daxinger, L., Huettel, B., Böhmendorfer, G., Gregor, W., Kreil, D.P., Matzke, M., and Matzke, A.J.M.** (2008). A structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation. *Nature Genetics* **40**: 670–5.
- Kanno, T., Huettel, B., Mette, M.F., Aufsatz, W., Jaligot, E., Daxinger, L., Kreil, D.P., Matzke, M., and Matzke, A.J.M.** (2005). Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nature Genetics* **37**: 761–765.
- Kanno, T., Mette, M.F., Kreil, D.P., Aufsatz, W., Matzke, M., and Matzke, A.J.** (2004). Involvement of Putative SNF2 Chromatin Remodeling Protein DRD1 in RNA-Directed DNA Methylation. *Current Biology* **14**: 801–805.
- Kurihara, Y., Takashi, Y., and Watanabe, Y.** (2006). The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* **12**: 206–212.
- Kurihara, Y. and Watanabe, Y.** (2004). Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *PNAS* **101**: 12753–12758.
- Lacomme, C., Hrubikova, K., and Hein, I.** (2003). Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats. *The Plant Journal: For Cell And Molecular Biology* **34**: 543–553.
- Lai, E.C.** (2003). microRNAs: Runts of the Genome Assert Themselves. *Current Biology* **13**: R925–R936.
- Law, J.A., Ausin, I., Johnson, L.M., Vashisht, A.A., Zhu, J.-K., Wohlschlegel, J.A., and Jacobsen, S.E.** (2010). A Protein Complex Required for Polymerase V Transcripts and RNA-Directed DNA Methylation in Arabidopsis. *Current Biology* **20**: 951–956.
- Li, C.F., Pontes, O., El-Shami, M., Henderson, I.R., Bernatavichute, Y.V., Chan, S.W.-L., Lagrange, T., Pikaard, C.S., and Jacobsen, S.E.** (2006). An ARGONAUTE4-Containing Nuclear Processing Center Colocalized with Cajal Bodies in Arabidopsis thaliana. *Cell* **126**: 93–106.
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., and Chen, X.** (2005). Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in Arabidopsis. *Current Biology* **15**: 1501–1507.
- Liu, Y., Schiff, M., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal: For Cell And Molecular Biology* **31**: 777–786.
- Llave, C.** (2010). Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant–virus interactions. *Trends in Plant Science* **15**: 701–707.

- Luo, Z. and Chen, Z.** (2007). Improperly Terminated, Unpolyadenylated mRNA of Sense Transgenes Is Targeted by RDR6-Mediated RNA Silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 943–958.
- Lynn, K., Fernandez, A., Aida, M., Sedbrook, J., Tasaka, M., Masson, P., and Barton, M.K.** (1999). The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in Arabidopsis development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene. *Development* **126**: 469–481.
- Ma, J.-B., Ye, K., and Patel, D.J.** (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* **429**: 318–322.
- Mallory, A.C. and Vaucheret, H.** (2006). Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature Genetics* **38 Suppl 1**: S31–S36.
- Manavella, P.A., Koenig, D., and Weigel, D.** (2012a). Plant secondary siRNA production determined by microRNA-duplex structure. *PNAS* **109**: 2461–2466.
- Manavella, P.A., Koenig, D., and Weigel, D.** (2012b). Plant secondary siRNA production determined by microRNA-duplex structure. *PNAS* **109**: 2461–2466.
- Martinez, J. and Tuschl, T.** (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* **18**: 975–980.
- Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Peragine, A., Endres, M.W., Li, J., Chen, X., Poethig, R.S., Bowman, L.H., and Vance, V.** (2008). DICER-LIKE2 Plays a Primary Role in Transitive Silencing of Transgenes in Arabidopsis. *PLoS ONE* **3**: e1755.
- Moissiard, G., Parizotto, E.A., Humber, C., and 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**: 1268–1278.
- Moissiard, G. and Voinnet, O.** (2006). RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four Arabidopsis Dicer-like proteins. *PNAS* **103**: 19593–19598.
- Molnar, A., Melnyk, C., and Baulcombe, D.C.** (2011). Silencing signals in plants: a long journey for small RNAs. *Genome Biology* **12**: 215.
- Molnar, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R., and Baulcombe, D.C.** (2010). Small Silencing RNAs in Plants Are Mobile and Direct Epigenetic Modification in Recipient Cells. *Science* **328**: 872–875.
- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E., and Carrington, J.C.** (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell* **133**: 128–141.
- Morel, J.-B., Godon, C., Mourrain, P., Béclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., and Vaucheret, H.** (2002). Fertile Hypomorphic ARGONAUTE (ago1) Mutants

- Impaired in Post-Transcriptional Gene Silencing and Virus Resistance. *Plant Cell* **14**: 629–639.
- Morris, E.R., Chevalier, D., and Walker, J.C.** (2006). DAWDLE, a Forkhead-Associated Domain Gene, Regulates Multiple Aspects of Plant Development1[W]. *Plant Physiology* **141**: 932–41.
- Nowotny, M., Gaidamakov, S.A., Crouch, R.J., and Yang, W.** (2005). Crystal Structures of RNase H Bound to an RNA/DNA Hybrid: Substrate Specificity and Metal-Dependent Catalysis. *Cell* **121**: 1005–1016.
- Onodera, Y., Haag, J.R., Ream, T., Nunes, P.C., Pontes, O., and Pikaard, C.S.** (2005). Plant Nuclear RNA Polymerase IV Mediates siRNA and DNA Methylation-Dependent Heterochromatin Formation. *Cell* **120**: 613–622.
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C., and Weigel, D.** (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**: 257–263.
- Park, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., and Poethig, R.S.** (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *PNAS* **102**: 3691–3696.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., and Chen, X.** (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer Homolog, and HEN1, a Novel Protein, Act in microRNA Metabolism in Arabidopsis thaliana. *Current Biology* **12**: 1484–1495.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H.L., and Poethig, R.S.** (2004). SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev.* **18**: 2368–2379.
- Pontes, O., Li, C.F., Nunes, P.C., Haag, J., Ream, T., Vitins, A., Jacobsen, S.E., and Pikaard, C.S.** (2006). The Arabidopsis Chromatin-Modifying Nuclear siRNA Pathway Involves a Nucleolar RNA Processing Center. *Cell* **126**: 79–92.
- Pontier, D., Yahubyan, G., Vega, D., Bulski, A., Saez-Vasquez, J., Hakimi, M.-A., Lerbs-Mache, S., Colot, V., and Lagrange, T.** (2005). Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in Arabidopsis. *Genes Dev.* **19**: 2030–2040.
- Prescott, E.M. and Proudfoot, N.J.** (2002). Transcriptional collision between convergent genes in budding yeast. *PNAS* **99**: 8796–8801.
- Purkayastha, A. and Dasgupta, I.** (2009). Virus-induced gene silencing: A versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 967–976.
- Qi, Y., Denli, A.M., and Hannon, G.J.** (2005). Biochemical Specialization within Arabidopsis RNA Silencing Pathways. *Molecular Cell* **19**: 421–428.
- Qi, Y., He, X., Wang, X.-J., Kohany, O., Jurka, J., and Hannon, G.J.** (2006). Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* **443**: 1008–1012.

- Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J., and Bartel, D.P.** (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **20**: 3407–3425.
- Ramachandran, V. and Chen, X.** (2008). Degradation of microRNAs by a Family of Exoribonucleases in *Arabidopsis*. *Science* **321**: 1490–1492.
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A.M., and Baulcombe, D.C.** (2001). Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal: For Cell And Molecular Biology* **25**: 237–245.
- Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.-J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L.** (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**: 340–349.
- Shimura, H. and Pantaleo, V.** (2011). Viral induction and suppression of RNA silencing in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1809**: 601–612.
- Schauer, S.E., Jacobsen, S.E., Meinke, D.W., and Ray, A.** (2002). DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends in Plant Science* **7**: 487–491.
- Schiebel, W., Haas, B., Marinković, S., Klanner, A., and Sanger, H.L.** (1993). RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. II. Catalytic in vitro properties. *J. Biol. Chem.* **268**: 11858–11867.
- Schiebel, W., Pelissier, T., Riedel, L., Thalmeir, S., and al, et** (1998). Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell* **10**: 2087–101.
- Sidorenko, L., Dorweiler, J.E., Cigan, A.M., Arteaga-Vazquez, M., Vyas, M., Kermicle, J., Jurcin, D., Brzeski, J., Cai, Y., and Chandler, V.L.** (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 Genetics* **5**: e1000725–e1000725.
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., and Watanabe, Y.** (2008). The Mechanism Selecting the Guide Strand from Small RNA Duplexes is Different Among Argonaute Proteins. *Plant Cell Physiol* **49**: 493–500.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P., and Bartel, D.P.** (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev.* **18**: 1187–1197.
- Wang, X.-B., Jovel, J., Udornporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W.-X., Gascioli, V., Vaucheret, H., and Ding, S.-W.** (2011). The 21-Nucleotide, but Not 22-Nucleotide, Viral Secondary Small Interfering RNAs Direct Potent Antiviral Defense by Two Cooperative Argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**: 1625–1638.
- Wang, X.-J., Gaasterland, T., and Chua, N.-H.** (2005). Genome-wide prediction and identification of cis-natural antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology* **6**: R30.

- Waterhouse, P.M. and Fusaro, A.F.** (2006). Viruses Face a Double Defense by Plant Small RNAs. *Science* **313**: 54–55.
- Wierzbicki, A.T., Haag, J.R., and Pikaard, C.S.** (2008). Noncoding Transcription by RNA Polymerase Pol IVb/Pol V Mediates Transcriptional Silencing of Overlapping and Adjacent Genes. *Cell* **135**: 635–648.
- Wierzbicki, A.T., Ream, T.S., Haag, J.R., and Pikaard, C.S.** (2009). RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nature Genetics* **41**: 630–4.
- Xie, Z., Allen, E., Wilken, A., and Carrington, J.C.** (2005). DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* **102**: 12984–12989.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., and Carrington, J.C.** (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *Plos Biology* **2**: E104–E104.
- Yang, L., Liu, Z., Lu, F., Dong, A., and Huang, H.** (2006). SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell And Molecular Biology* **47**: 841–850.
- Ying, S.-Y. and Lin, S.-L.** (2005). Intronic microRNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **326**: 515–520.
- Yoshikawa, M., Iki, T., Tsutsui, Y., Miyashita, K., Poethig, R.S., Habu, Y., and Ishikawa, M.** (2013). 3' fragment of miR173-programmed RISC-cleaved RNA is protected from degradation in a complex with RISC and SGS3. *PNAS* **110**: 4117–4122.
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M.Y., and Poethig, R.S.** (2005). A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **19**: 2164–2175.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., and al, et** (2005). Methylation as a Crucial Step in Plant microRNA Biogenesis. *Science* **307**: 932–5.
- Zhang, C., Ng, D.W.-K., Lu, J., and Chen, Z.J.** (2012). Roles of target site location and sequence complementarity in trans-acting siRNA formation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **69**: 217–226.
- Zhang, X., Henderson, I.R., Lu, C., Green, P.J., and Jacobsen, S.E.** (2007). Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *PNAS* **104**: 4536–4541.
- Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A., and Zhu, J.-K.** (2007). Role of *Arabidopsis* AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *EMBO Journal* **26**: 1691–1701.
- Zilberman, D., Cao, X., and Jacobsen, S.E.** (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* **299**: 716–9.

- Zong, J., Yao, X., Yin, J., Zhang, D., and Ma, H.** (2009). Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: Duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene* **447**: 29–39.
- Zvereva, A.S. and Pooggin, M.M.** (2012). Silencing and Innate Immunity in Plant Defense Against Viral and Non-Viral Pathogens. *Viruses (1999-4915)* **4**: 2578–2597.