

Uloga RNA utišavanja u regulaciji ekspresije gena i obrani od patogena u biljaka

Kutnjak, Marin

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:437187>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**ULOGA RNA UTIŠAVANJA U REGULACIJI EKSPRESIJE GENA I
OBRANI OD PATOGENA U BILJAKA**

Role of RNA Silencing in Regulation of Gene Expression and Pathogen Defense in Plants

SEMINARSKI RAD

Marin Kutnjak
Preddiplomski studij Molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Zagreb, 2019.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. MOLEKULE RNA U BILJAKA – PODJELA, STRUKTURA I ULOGE | 2 |
| 3. MOLEKULE sRNA U BILJAKA | 4 |
| 3.1. Osnovna obilježja i podjela molekula sRNA | 4 |
| 3.2. Biosinteza i princip djelovanja molekula sRNA | 6 |
| 4. REGULACIJA EKSPRESIJE GENA U BILJAKA | 9 |
| 4.1. Načini regulacije ekspresije gena | 9 |
| 4.2. Epigenetska regulacija ekspresije gena | 9 |
| 4.3. Uloga RNA utišavanja u regulaciji ekspresije gena | 10 |
| 5. OBRANA BILJAKA OD PATOGENA | 14 |
| 5.1. Biljni patogeni | 14 |
| 5.2. Načini obrane biljaka od patogena | 15 |
| 5.3. Uloga RNA utišavanja u obrani biljaka od patogena | 16 |
| 5.3.1. Obrana od virusa | 17 |
| 5.3.2. Obrana od bakterija | 19 |
| 5.3.3. Obrana od gljiva | 20 |
| 6. ZAKLJUČAK | 21 |
| 7. LITERATURA | 22 |
| 8. SAŽETAK | 29 |
| 9. SUMMARY | 30 |

POPIS KRATICA

A – adenin (engl. *adenine*)

AGO – Argonaut (engl. *Argonaute*)

Asp – aspartat (engl. *aspartate*)

ATP – adenzin-trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

Avr – gen za avirulenciju (engl. *avirulence gene*)

C – citozin (engl. *cytosine*)

DCL – nalik Diceru (odnosi se na endonukleaze) (engl. *Dicer-like*)

DCR – Dicer (engl. *Dicer*)

DdRP – RNA polimeraza ovisna o DNA (engl. *DNA-dependent RNA polymerase*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

dsRNA – dvolančana RNA (engl. *double-stranded RNA*)

ETI – imunost potaknuta efektorom (engl. *effector-triggered immunity*)

G – gvanin (engl. *guanine*)

H – baza A, T ili C

hcsiRNA – heterokromatinska siRNA (engl. *heterochromatic siRNA*)

His – histidin (engl. *histidine*)

Inr – inicijatorski element (engl. *initiator element*)

K – lizin (engl. *lysine*)

lncRNA – duga nekodirajuća RNA (engl. *long non-coding RNA*)

miRNA – mikroRNA (engl. *microRNA*)

mRNA – glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

natsiRNA – izvornoantisens siRNA (engl. *natural-antisense siRNA*)

ncRNA – nekodirajuća RNA (engl. *non-coding RNA*)

PAMP – molekularni uzorak patogena (engl. *pathogen-associated molecular pattern*)

Pol – polimeraza (engl. *polymerase*)

PRR – receptor za prepoznavanje patogena (engl. *pathogen recognition receptor*)

PTI – imunost potaknuta PAMP-om (engl. *PAMP-triggered immunity*)

R – gen za otpornost (engl. *resistance gene*)

RdDM – metilacija DNA usmjerena molekulom RNA (engl. *RNA-directed DNA methylation*)

RdRP – RNA polimeraza ovisna o RNA (engl. *RNA-dependent RNA polymerase*)

RISC – kompleks za utišavanje induciran molekulom RNA (engl. *RNA-induced silencing complex*)

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

RNAi – RNA interferencija (engl. *RNA interference*)

rRNA – ribosomska RNA (engl. *ribosomal RNA*)

siRNA – mala interferirajuća RNA (engl. *small (short) interfering RNA*)

snoRNA – mala jezgričina RNA (engl. *small nucleolar RNA*)

snoRNP – mali jezgričin ribonukleoprotein (engl. *small nucleolar ribonucleoprotein*)

snRNA – mala jezgrina RNA (engl. *small nuclear RNA*)

snRNP – mali jezgrin ribonukleoprotein (engl. *small nuclear ribonucleoprotein*)

sRNA – mala RNA (engl. *small RNA*)

SRP – čestica za prepoznavanje signala (engl. *signal recognition particle*)

ssRNA – jednolančana RNA (engl. *single-stranded RNA*)

stRNA – mala privremena RNA (engl. *small temporal RNA*)

T – timin (engl. *thymine*)

tasiRNA – transdjelujuća siRNA (engl. *trans-acting siRNA*)

tRNA – prijenosna RNA (engl. *transfer RNA*)

U – uracil (engl. *uracil*)

UTR – netranslatirana regija (engl. *untranslated region*)

VSR - virusni supresor RNA utišavanja (engl. *viral suppressor of RNA silencing*)

1. UVOD

Molekule RNA obavljaju mnoge esencijalne funkcije u svim domenama i carstvima živog svijeta. Iz njihove velike raznolikosti proizlaze mnogobrojne uloge u životu stanice i organizma. Uz sveprisutne molekule mRNA, rRNA, tRNA i druge, uključene u regulaciju ekspresije gena, posebna skupina RNA, tzv. male molekule RNA (*small RNAs* – sRNA) imaju jedinstvenu zadaću u održavanju homeostaze stanica i organizama. Velika je raznolikost takvih molekula u načinu biosinteze, njihovoj strukturi i specifičnoj ulozi u stanici. Uz sudjelovanje u sazrijevanju prekursora molekula mRNA i rRNA, bitna je njihova uloga u regulaciji ekspresije gena, točnije u utišavanju ekspresije gena, tzv. RNA utišavanju. Potonju funkciju provode na dvije razine – transkripcijskoj i posttranskripcijskoj. Transkripcijsko utišavanje prvenstveno se odnosi na metiliranje ciljanih regija molekule DNA, a koje je vođeno molekulama sRNA (dakle riječ je o epigenetskom utišavanju), a posttranskripcijsko na utišavanje uzrokovano degradacijom ciljanih molekula mRNA ili blokiranjem njihove translacije, također vođenim molekulama sRNA. RNA utišavanje evolucijski je očuvan mehanizam u eukariota, inducirano je dvolančanom RNA ili RNA u obliku ukosnice te ovisi o aktivnosti nekoliko proteina (npr. proteina nalik Diceru i Argonauta). Mehanizmi RNA utišavanja vrlo su raznoliki u biljaka i ispunjavaju različite zahtjeve organizma (Guo i sur. 2016). Budući da biljke nemaju tako slojevit imunološki sustav poput npr. sisavaca, u njih su razvijeni raznoliki i osobiti načini obrane od patogena. I ovdje RNA utišavanje ima ulogu jednog od temeljnih mehanizama obrane biljaka od patogena. Posebna skupina sRNA, uz ostale temeljne komponente sustava za RNA utišavanje, pruža biljkama učinkovitu obranu od virusnih i bakterijskih patogena te patogenih gljiva. Uz reakcije biljaka na patogene često je prisutan i prikladan odgovor patogena na biljne mehanizme obrane.

2. MOLEKULE RNA U BILJAKA – PODJELA, STRUKTURA I ULOGE

Molekule RNA primarni su produkt ekspresije gena i imaju temeljnu ulogu u sintezi proteina i brojnim drugim procesima u stanici. Kodirajuće mRNA (*messenger RNAs* – glasničke RNA) ključne su u sintezi proteina, dok su nekodirajuće RNA uključene u procesiranje i degradaciju molekula mRNA. Molekule rRNA (*ribosomal RNAs* – ribosomske RNA) u složenim konformacijama zajedno s proteinima tvore ribosome koji obavljaju sintezu proteina, odnosno translaciju (prevođenje) molekula mRNA, čiji slijed nukleotida određuje slijed aminokiselina budućih proteina. Pritom molekule tRNA (*transfer RNAs* – prijenosne RNA) donose do ribosoma pojedine pripadne aminokiseline prema slijedu kodona (tripleta nukleotida) molekule mRNA koja se translacija u protein. Svestranost molekula RNA očituje se u tome što neke imaju biokemijska svojstva koja im omogućuju da obavljaju funkciju genoma ili katalizatora. Jedno je od takvih svojstava sposobnost samoreplikacije molekule RNA, što je između ostaloga i ključ evolucijskog uspjeha mnogih RNA virusa koji inficiraju eukariotske stanice. Nadalje, molekule RNA mogu katalizirati cijepanje i stvaranje kovalentnih veza između nukleotida, npr. tijekom prekrajanja RNA (*RNA splicing*). Neke RNA mogu zauzeti specifične sekundarne i tercijarne strukture koje mogu pojedine kemijske grupe u nukleotidima učiniti reaktivnijima. Takve RNA, nazvane ribozimima, mogu katalizirati cijepanje i povezivanje polinukleotidnih lanaca. Male jezgrine RNA (*small nuclear RNAs* – snRNA) u eukariotskim jezgrama sudjeluju u procesiranju RNA, a RNA komponenta kompleksa telomeraze ima ulogu tijekom replikacije molekula DNA, odnosno služi kao kalup prilikom produljivanja telomera (Sugiura i sur. 2015).

Polinukleotidni lanci različitih molekula RNA variraju u veličini, odnosno u broju nukleotida. Većinu staničnih RNA čine rRNA, ribosomske molekule RNA. Eukariotski ribosomi sastoje se od male podjedinice koja uz proteine sadrži jedan tip molekule rRNA (npr. 18S rRNA) te velike podjedinice koja uz proteine sadrži dva tipa rRNA (jednu dugačku i jednu ili više kratkih, npr. 28S, 5.8S, 5S rRNA) (<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/ribosomal-rna>, 23. 5. 2019.). Biljke, alge i fotosintetski protisti sadrže tri tipa ribosoma: citoplazmatske, plastidne i mitohondrijske ribosome. 5.8S rRNA i 25S rRNA nalaze se u velikoj podjedinici citoplazmatskih ribosoma. Plastidi sadrže 23S rRNA koja je u duljini i slijedu (sekvenciji) slična onoj u bakterije *Escherichia coli* i cijanobakterija. Biljni mitohondrijski ribosomi sadrže i 5S rRNA koje nema u animalnih mitohondrija. I male i velike molekule rRNA zauzimaju složene sekundarne strukture

koje su visoko očuvane među vrstama, što upućuje na njihovu fundamentalnu funkciju zajedničku za sav živi svijet (Sugiura i sur. 2015).

Kao što je ranije spomenuto, molekule tRNA djeluju kao adapteri tako što vežu određenu aminokiselinu i sparuju se s određenim kodonom na mRNA koji je komplementaran slijedu antikodona iste tRNA, ubrzavajući pritom translaciju slijeda nukleinske kiseline u slijed aminokiselina polipeptida. Pojedina tRNA može vezati samo jednu specifičnu od 20 proteinogenih aminokiselina, međutim izoakceptorske tRNA mogu vezati istu aminokiselinu. tRNA imaju očuvanu primarnu i sekundarnu strukturu (oblik lista djeteline). U biljaka citoplazma, plastidi i mitohondriji sadrže vlastitu jedinstvenu populaciju molekula tRNA. Sljedovi biljnih citoplazmatskih tRNA odgovaraju onima iz kvasaca i ostalih eukariota, dok mnoge plastidne tRNA imaju svojstva koja su tipična za prokariotske tRNA (Sugiura i sur. 2015).

Broj različitih vrsta kodirajućih molekula mRNA u stanici u nekom trenutku usporediv je s brojem različitih proteina prisutnih u stanici, a može premašiti desetke tisuća. Molekule mRNA čine oko 1 – 2 % ukupne stanične RNA. U duljini variraju od nekoliko stotina do nekoliko tisuća nukleotida. Tipična procesirana citosolna mRNA sastoji se od pet različitih regija: strukture 7-metilgvanozinske kape na 5' kraju, 5' netranslatirane regije (*untranslated region* – UTR), regije koja kodira protein, 3' netranslatirane regije te poliadeninskog repa na 3' kraju. Kapa na 5' kraju ima važnu ulogu tijekom inicijacije translacije i štiti mRNA od degradacije. Kodirajuća regija sadrži slijed nukleotida koji se translacija u slijed aminokiselina, započinje inicijacijskim (*start*) kodonom (obično AUG), a završava terminacijskim (*stop*) kodonom (UAG, UAA ili UGA). Kodirajuća regija omeđena je s obje strana netranslatiranim regijama čija uloga često nije jasna. Poli(A) rep ubrzava prijenos mRNA iz jezgre u citoplazmu, stabilizira mRNA štiteći ju od degradacije egzonukleazama i vjerojatno ima ulogu u inicijaciji translacije. Plastidne i mitohondrijske mRNA različite su od citoplazmatskih, npr. nemaju strukture 5' kape i 3' poli(A) repa (Sugiura i sur. 2015).

Molekule RNA s posebnim ulogama u eukariota uključuju molekule miRNA (*microRNAs* – mikroRNA), snRNA, snoRNA (*small nucleolar RNAs* – male jezgričine RNA) i lncRNA (*long non-coding RNAs* – duge nekodirajuće RNA). Molekule lncRNA obuhvaćaju molekule RNA duge preko 200 nukleotida koje nemaju otvoreni okvir čitanja koji bi kodirao protein. Pronađene su i u životinja i u biljaka. Desetci tisuća molekula lncRNA eksprimirani su u stanicama sisavaca.

Njihove poznate uloge uključuju regulaciju pozicioniranja nukleosoma i strukture kromatina, kontrolu metilacije DNA i posttranslacijskih modifikacija histona, transkripcijsko utišavanje gena, brojne uloge u aktivaciji i supresiji transkripcije i mnoge druge uloge (Nelson i Cox 2017 a). U eukariota su lncRNA različito eksprimirane u različitim tkivima i različitim stresnim uvjetima, što upućuje na to da imaju dinamičnu regulaciju i utječu na regulaciju razvoja i odgovora na stres. Primjerice u vinove loze (*Vitis vinifera* L.) tretirane hladnoćom znatno je povećana ekspresija za 203 poznate lncRNA, a znatno smanjena za 144 poznate lncRNA. Dokazano je da lncRNA utječu na utišavanje gena, kontrolu vremena cvjetanja, fotomorfogenezu klijanaca, organogenezu korijena te na razmnožavanje biljaka. Neke lncRNA mogu služiti kao prekursori za sRNA (Wang i sur. 2019). Sve te RNA (miRNA, snRNA, snoRNA, lncRNA), uključujući i druge RNA koje ne kodiraju proteine (rRNA, tRNA), mogu se obuhvatiti pojmom nekodirajućih RNA (*non-coding RNAs* – ncRNA). Genomima sisavaca kodirano je više ncRNA nego kodirajućih mRNA. Otkriveno je još vrsta ncRNA poznatih ili nepoznatih funkcija, a nove se skupine otkrivaju i u recentnim istraživanjima. Tekuća istraživanja otkrivaju nove uloge ncRNA u regulaciji ekspresije gena, ali i mnogim drugim procesima u stanici (Nelson i Cox 2017 a). Male molekule RNA (kojima, između ostalih, pripadaju miRNA, snRNA i snoRNA) tema su ovog rada i objašnjene su u sljedećim poglavljima.

3. MOLEKULE sRNA U BILJAKA

3.1. Osnovna obilježja i podjela molekula sRNA

Eukariotske stanice sadrže različite vrste malih molekula RNA (sRNA). Većina sRNA u biljnoj stanici ima iznimno važnu ulogu, a mogu se podijeliti u dvije glavne skupine. Prva skupina obuhvaća male jezgrine RNA (snRNA) i male jezgrične RNA (snoRNA) duljine 60 – 300 nukleotida. Druga skupina obuhvaća vrlo male molekule RNA (obično duljine 20 – 24 nukleotida) izvedene od duljih primarnih RNA pomoću endonukleaza nalik Diceru. Molekule snRNA ključne su komponente malih jezgrinih ribonukleoproteina (*small nuclear ribonucleoproteins* – snRNP) koji imaju esencijalnu ulogu u sazrijevanju prekursora molekula mRNA, dok su snoRNA komponente kompleksa snoRNP (*small nucleolar ribonucleoproteins* – mali jezgrični ribonukleoproteini) uključenih u sazrijevanje prekursora molekula rRNA. Mehanizmi procesiranja RNA pomoću molekula snRNA i snoRNA slični su u svih eukariotskih vrsta (Sugiura i sur. 2015).

Druga skupina sRNA obuhvaća male regulacijske RNA izvedene od dvolančanih RNA (*double-stranded RNAs* – dsRNA), a koje imaju ulogu u utišavanju gena. Male RNA duljine 20 – 25 nukleotida najprije su otkrivene u biljaka u kojima su bili utišani uvedeni transgeni te u biljaka inficiranih virusima. Te sRNA sadržavale su sljedove „invazivnih“ transgenih mRNA ili virusnih genomskih RNA. Budući da su kratke i interferiraju s ekspresijom gena bitnih za održanje virusa, nazvane su male interferirajuće RNA (*small (short) interfering RNAs* – siRNA), a proces u kojem djeluju RNA interferencija (*RNA interference* – RNAi). Za tvorbu siRNA odgovorne su endonukleaze nalik Diceru (*Dicer-like endonucleases* – DCL endonukleaze) koje cijepaju duge dsRNA dobivene pomoću domaćinske ili virusne RNA polimeraze ovisne o RNA (*RNA-dependent RNA polymerase* – RdRP) (Sugiura i sur. 2015). U životinja Diceri se jednostavno označavaju kraticom DCR, a u biljaka kao proteini nalik Diceru (*Dicer-like*), tj. DCL enzimi (<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/dicer>, 24. 5. 2019.). Ostali koraci biosinteze siRNA i ostalih izabranih sRNA objašnjeni su kasnije u radu.

Mehanizam koji proizvodi i koristi molekule siRNA povezan je s putevima koji proizvode i koriste četiri druge vrste molekula sRNA duljine 20 – 25 nukleotida. Spomenuti putevi proizvode molekule miRNA, tasiRNA (*trans-acting siRNAs*), natsiRNA (*natural-antisense siRNAs*) i hcsiRNA (*heterochromatic siRNAs* – heterokromatinske siRNA). Sve ove četiri vrste sRNA imaju metiliran nukleotid na 3' kraju kako bi bile zaštićene od poliuridilacije i degradacije. Molekule miRNA u duljini variraju od 20 do 24 nukleotida, tasiRNA i natsiRNA najčešće su duge 21 nukleotid, a hcsiRNA imaju 24 nukleotida. Njihova različita duljina posljedica je toga što ih proizvode različiti DCL enzimi (Sugiura i sur. 2015).

Molekule miRNA posebna su skupina molekula RNA uključenih u regulaciju gena, nekodirajuće su, duljine oko 22 nukleotida, slijedom komplementarne posebnim regijama mRNA. Oko 1500 gena u čovjeka kodira miRNA koje zajedno mogu regulirati ekspresiju većine gena koji kodiraju proteine. miRNA se proizvode iz duljih prekursora u nekoliko koraka. Primarni transkripti miRNA (pri-miRNA) znatno variraju u veličini; neki su kodirani intronima drugih gena i koeksprimirani sa svojim „domaćinskim“ genima (Nelson i Cox 2017 b). Svi eukarioti kodiraju molekule miRNA. U uročnjaka, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, utvrđeno je preko 350 miRNA. Prva registrirana biljna miRNA bila je 156. miRNA u središnjem registru miRNA, a koja pripada vrsti *A. thaliana*, stoga je nazvana *AtmiR156*. Ovu miRNA kodira deset različitih lokusa genoma

A. thaliana. Općenito su stotine gena regulirane pomoću miRNA koje smanjuju razinu njihove ekspresije u različitim tkivima ili u različitom trenutku. miRNA ponekad kontroliraju prijelaze u razvoju i odgovore na stresne okolišne uvjete ili pak osiguravaju oštre, tkivnospecifične granice ekspresije. U usporedbi s animalnim miRNA, koje djeluju putem supresije translacije, biljne miRNA najčešće djeluju putem cijepanja (degradacije) mRNA ciljanog gena (Sugiura i sur. 2015).

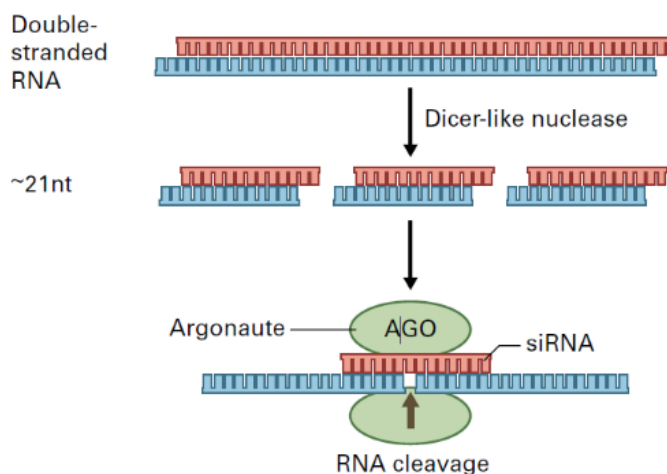
Osim molekula snRNA, snoRNA i malih RNA proizvedenih pomoću DCL enzima pronađene su i druge vrste malih stabilnih RNA: npr. enzim RNaza P koji sudjeluje u procesiranju molekula tRNA sadrži RNA komponentu (Sugiura i sur. 2015), dok je 7SL RNA dio čestice za prepoznavanje signala (*signal recognition particle* – SRP) koja se udružuje s ribosomom i usmjerava novonastale proteine prema endoplazmatskom retikulumu (<http://lncrnadb.com/7SL/>, 24. 5. 2019.).

3.2. Biosinteza i princip djelovanja molekula sRNA

Predloženi mehanizam RNA utišavanja (Sl. 1.) počinje sintezom sRNA duljine od 20 do 26 nukleotida djelovanjem niza ključnih komponenata, uključujući DCL enzime, proteine Argonaute (*Argonautes* – AGO) i RNA polimeraze ovisne o RNA (Baulcombe 2004, Chapman i Carrington 2007, Vaucheret 2006). DCL enzimi od dsRNA prekursora tvore sRNA koje se inkorporiraju u RISC, kompleks za utišavanje induciran molekulom RNA (*RNA-induced silencing complex*) (Vaucheret 2008). S obzirom na podrijetlo i način nastajanja, sRNA se temeljno dijele na siRNA i miRNA. Enzimi Argonauti čine glavninu kompleksa RISC, vežu sRNA i interagiraju s homolognom RNA, što rezultira endonukleaznim cijepanjem ili supresijom translacije mRNA, a mogući je ishod RNA utišavanja i metilacija DNA te posljedično utišavanje ekspresije gena (Voinnet 2009). RdRP (RDR) proizvode dsRNA koristeći jednolančanu RNA (*single-stranded RNA* – ssRNA) kao kalup, a nastale dsRNA dalje procesiraju DCL enzimi (Wassenegger i Krczal 2006). U različitim biljnih vrsta pronađeni su različiti geni za proteine DCL, AGO i RdRP. DCL enzimi pripadaju obitelji endonukleaza RNaza III i sadrže nekoliko domena, uključujući helikaznu, domene RNaze III i domene koje vežu dsRNA (Carmell i Hannon 2004, Margis i sur. 2006). Enzimi AGO specijalizirani su moduli koji vežu sRNA i smatraju se temeljnom komponentom kompleksa nekoliko proteina naziva RISC u mehanizmu RNA utišavanja (Vaucheret 2008, Mallory i Vaucheret 2010), a sadrže tri očuvane domene, uključujući PIWI (*P-element induced*

wimpy) domenu (Parker 2010), koja može djelovati slično kao RNaza H i cijepati ciljanu mRNA (Simon i sur. 2011). U mehanizmu cijepanja RNA sudjeluje katalitička trijada (Asp-Asp-His) u aktivnom mjestu Argonauta (istraživanja ljudskog Argonauta 2 – *human Argonaute-2*) i magnezijevi ioni (Faehnle i sur. 2013). Amplifikacija utišavanja postiže se tako što RdRP prevode ssRNA u dsRNA, koje ponovno mogu procesirati DCL enzimi, što vodi novom krugu RNA utišavanja (Muhammad i sur. 2019). RdRP su prve identificirane komponente puteva biogeneze sRNA (onih koje imaju dsRNA kao prekursor) u biljaka i imaju jedinstvenu katalitičku domenu RNA polimeraze ovisne o RNA (RdRp) (Dalmay i sur. 2000, Mourrain i sur. 2000).

DCL2 i DCL4 endonukleaze cijepaju dsRNA u duplekse siRNA duge 21 nukleotid. Jedan se lanac dupleksa siRNA duljine 21 nukleotid (koji se sad naziva siRNA) nalazi na endonukleazi Argonaut. AGO koristi prenesenu siRNA kao uputu za pronalaženje ciljanih jednolančanih RNA s komplementarnim slijedom (Sugiura i sur. 2015). Najprije se dupleks siRNA prenosi na kompleks RISC koji odmata dupleks i cijepa jedan od lanaca, i to lanac putnik (*passenger strand*), dok nepocijepani ssRNA lanac vodič (*guide strand*) ostaje inkorporiran u enzim, čime se dobije potpuno sklopljen RISC (Berg i sur. 2015 a). Endonukleaza AGO kao dio kompleksa RISC cijepa prepoznatu ciljanu ssRNA u sredini ciljane regije i time umanjuje ekspresiju transgena ili replikaciju virusa (Sugiura i sur. 2015).



Slika 1. Osnovni koraci mehanizma RNA utišavanja pomoću molekule siRNA. Detaljnije objašnjenje nalazi se u tekstu. Preuzeto iz Sugiura i sur. (2015).

Male RNA koje reguliraju ekspresiju endogenih gena navodeći degradaciju specifičnih mRNA i modifikaciju kromatina procesirane su od dugačkih dvolančanih ili samokomplementarnih jednolančnih molekula RNA. Sve četiri spomenute vrste regulacijskih malih RNA (miRNA, tasiRNA, natsiRNA, hcsiRNA) nastaju pomoću DCL endonukleaza. U biljaka (*A. thaliana*) postoje četiri vrste DCL enzima: DCL1, DCL2, DCL3 i DCL4. DCL1 cijepa (izrezuje) dupleks miRNA duljine 21 nukleotid iz jednolančanog transkripta RNA nalik ukosnici (*hairpin-like transcript*). Taj je transkript prepisan pomoću RNA polimeraze II ovisne o DNA (*DNA-dependent RNA polymerase* – DdRP) s *MIRNA* gena koji se nalaze u intergenskim regijama genoma. Molekule tasiRNA, natsiRNA i hcsiRNA izrezuju se pomoću drugih DCL enzima iz molekula dsRNA sintetiziranih pomoću RdRP enzima prema jednolančanom kalupu. Ista citoplazmatska RdRP tvori dsRNA za tasiRNA i natsiRNA, dok dsRNA prekursor za tvorbu hcsiRNA nastaje u jezgri pomoću drukčije RdRP. Bez obzira koji se DCL enzim koristi ili na koji se dsRNA ili RNA supstrat nalik ukosnici djeluje, DCL iz supstrata izrezuje dupleks RNA (dsRNA) i na endonukleazi AGO u konačnici se nalazi samo jedan lanac dupleksa. Cijepanje ciljanih mRNA vođeno molekulama miRNA, tasiRNA i natsiRNA najčešće je posredovano enzimom AGO1. AGO i preneseni lanac RNA glavna su komponenta kompleksa RISC u kojem AGO naposljetku cijepa ciljanu ssRNA i time utišava gen. Kod sinteze miRNA preneseni lanac naziva se miRNA, a odbačeni lanac miR* ili lanac putnik (*passenger strand*). Za tvorbu miRNA u biljaka odgovoran je DCL1 enzim (u jezgri), dok u životinja u tvorbi miRNA sudjeluju ribonukleaze drosha (u jezgri) i Dicer (u citoplazmi). U životinja je mRNA ciljanog gena utišana tako što AGO uzrokuje supresiju translacije iste, a u biljaka je mRNA obično pocijepana enzimom AGO. Reprutacija modifikatora histona i DNA metiltransferaza vođena molekulama hcsiRNA posredovana je enzimom AGO4 koji ima aktivnost vezanja, ali ne i cijepanja. Model mehanizma tumači da intergenske ponavljajuće regije genoma imaju kratke transkripte prepisane pomoću RNA polimeraze V ovisne o DNA, a koji ostaju povezani s DNA kalupom i koje može prepoznati AGO4 s vezanom komplementarnom hcsiRNA. Na taj je način omogućeno regrutiranje epigenetskih modifikatora na određeno mjesto u genomu te njihovom aktivnošću utišavanje ciljanih gena (Sugiura i sur. 2015).

4. REGULACIJA EKSPRESIJE GENA U BILJAKA

4.1. Načini regulacije ekspresije gena

Složeni biološki procesi često zahtijevaju koordiniranu kontrolu ekspresije brojnih gena. Razvoj biljaka i njihova sposobnost odgovora na promjene u okolišu uvelike ovise o reguliranoj ekspresiji genomske informacije. Proces ekspresije gena uključuje transkripciju (prepisivanje) gena u RNA i često translaciju tih RNA u proteine. U eukariota je pozitivna regulacija ekspresije učestalija od negativne, a uz transkripciju zbivaju se i velike promjene u strukturi kromatina. Promotori za RNA polimerazu II (DdRP II, Pol II) obično imaju TATA-kutiju (*TATA box*) i Inr (*initiator element*) slijed, kao i više uzvodnih veznih mjesta (pojačivača, engl. *enhancers*) za transkripcijske aktivatore. Za regulaciju transkripcijske aktivnosti općenito su potrebni različiti proteini i proteinski kompleksi. Učinci transkripcijskih aktivatora na Pol II posredovani su koaktivatorskim proteinskim kompleksima poput medijatora. Važnu ulogu imaju i proteinski kompleksi koji reverzibilno remodeliraju strukturu kromatina (npr. SWI/SNF i ISWI, kompleksi ovisni o ATP-u) i modificiraju histone kromatina (npr. histonske acetiltransferaze). Hormoni također utječu na regulaciju ekspresije gena, npr. auksin koji u biljaka ima ključnu ulogu u razvoju. Važnu ulogu ima regulacija ekspresije eukariotskih gena posredovana nekodirajućim molekulama RNA (ncRNA) koje djeluju putem mnogih mehanizama, ulazeći u interakciju s proteinima, molekulama mRNA i drugim ncRNA (Nelson i Cox 2017 a). Važan dio regulacije ekspresije gena čine reverzibilne epigenetske promjene genoma.

4.2. Epigenetska regulacija ekspresije gena

Ekspresija gena može biti upravljana i epigenetskim mehanizmima. Epigenetski mehanizmi uvelike se temelje na mnoštvu različitih vrsta kovalentnih modifikacija kromatina koje uključuju metilaciju DNA i posttranslacijske modifikacije histona, preferentno na njihovim aminoterminalnim repovima. Metilacija DNA temelji se na metilaciji citozinskih baza molekula DNA pomoću enzima DNA metiltransferaza. Proces metilacije citozina pomoću metiltransferaza DRM1 i DRM2 (*domains rearranged methylases 1 i 2*) zahtijeva aktivno ciljanje mjesta za metilaciju molekulama siRNA. Utjecaj metilacije DNA na ekspresiju gena različit je ovisno o položaju metiliranih citozina. Metilacija promotora obično je povezana sa smanjenom transkripcijom, dok je metilacija regije gena koja se prepisuje često povezana s umjerenom ili

visokom razinom ekspresije (Town i Wellmer 2015). Metilna grupa 5-metilcitozina u blizini mjesta početka transkripcije prodire u veliki utor DNA, gdje lako može interferirati s vezanjem proteina koji potiču transkripciju, stoga se smanjuje razina transkripcije (Berg i sur. 2015 b). Posttranslacijske modifikacije histona uključuju npr. metilaciju, acetilaciju, fosforilaciju, ubikvitilaciju, sumoilaciju i biotilaciju (<https://www.cellsignal.com/contents/resources-reference-tables/histone-modification-table/science-tables-histone>, 27. 5. 2019.). Acetilacija histona odvija se prijenosom acetilne skupine s acetil-koenzima A na ϵ -amino skupinu različitih lizinskih ostataka najčešće histona H3 i H4 pomoću enzima histonskih acetiltransferaza (HAT). Općenito se smatra da acetilacija histona aktivira ekspresiju gena smanjujući kondenziranost kromatina (histonski kompleks otpušta se od DNA zbog gubitka pozitivnog naboja bočnog ogranka lizina koji bi ulazio u elektrostatske interakcije s negativno nabijenim fosfatima DNA), omogućujući tako transkripcijskim faktorima pristup na određene sljedove DNA. Histoni se mogu i deacetilirati pomoću enzima histonskih deacetilaza (HDAC). Metilacija histona provodi se najčešće na lizinskim ostatcima histona H3 i H4 enzimima histonskim metiltransferazama (HMTaze) koje koriste S-adenozil metionin kao donor metilne skupine. Za razliku od acetilacije, gdje se dodaje samo jedna acetilna skupina, metilacijom histona mogu se dodati jedna, dvije ili tri metilne skupine na jedan aminokiselinski ostatak. Učinak metilacije histona na ekspresiju gena ovisi o tome koji su aminokiselinski ostatci histonskih repova modificirani. Metilacija jednih aminokiselina povećava ekspresiju gena, dok metilacija nekih drugih može imati suprotan učinak. Različite kombinacije epigenetskih markera mogu biti prepoznate i interpretirane pomoću specijaliziranih proteina koji shodno tome aktiviraju ili utišavaju ekspresiju gena, npr. tako da modificiraju strukturu kromatina (Town i Wellmer 2015). RNA utišavanje ima posebnu važnost u regulaciji ekspresije gena, što je detaljnije objašnjeno u sljedećem dijelu rada.

4.3. Uloga RNA utišavanja u regulaciji ekspresije gena

Za razliku od prokariota, gdje transkripcija i translacija nisu prostorno i vremenski odvojene, u eukariota su ova dva procesa prostorno i vremenski odvojena, stoga regulacija ekspresije na razini translacije (uz onu na razini transkripcije) ima značajnu ulogu. Neki su geni regulirani na razini i transkripcije i translacije, gdje je potonja zadužena za fino reguliranje koncentracije proteina u stanici. Eukarioti imaju barem četiri glavna mehanizma translacijske

regulacije ekspresije, od kojih tri uključuju utjecanje na inicijacijske faktore translacije, a poseban je mehanizam regulacija ekspresije gena posredovana molekulama RNA, koja često djeluje putem supresije translacije. U biljaka i životinja (uključujući oblice, vinske mušice i sisavce) miRNA predvode posttranskripcijsko utišavanje mnogih gena. Kad je fenomen prvi put opisan, primijećeno je da male RNA interagiraju s mRNA, često s njihovom 3' UTR regijom, a ishod je degradacija mRNA ili inhibicija translacije, tj. utišavanje mRNA određenog gena (Nelson i Cox 2017 a). Molekule miRNA služe kao RNA vodiči (*guide RNAs*) koji određuju specifičnost kompleksa RISC za određene mRNA. Takav tip regulacije gena gotovo je sveprisutan u eukariota. Svaka miRNA može regulirati različite gene zato što su u svakoj mRNA prisutni različiti ciljni sljedovi. Procjenjuje se da je 60 % svih gena čovjeka regulirano jednom ili više molekula miRNA (Berg i sur. 2015 b). RNA utišavanje ima ulogu u kontroli razvoja nekih organizama, zaštiti od RNA virusa (što je posebno značajno u biljaka, koje nemaju tako složen imunološki sustav poput npr. sisavaca), kontroli aktivnosti transpozona te su sRNA (hcsiRNA) uključene i u nastajanje heterokromatina. Mnoge su miRNA prisutne samo privremeno tijekom razvoja, tako da se ponekad nazivaju male privremene RNA (*small temporal RNAs* – stRNA). Identificirane su tisuće različitih miRNA u biljaka i životinja i mogu utjecati na regulaciju čak trećine gena sisavaca. Neke miRNA vežu se na samo jednu mRNA i tako utječu na ekspresiju samo jednog gena, dok neke koordiniraju ekspresiju mnogih gena. Ovaj mehanizam regulacije ekspresije nalazi široku primjenu: ako istraživač unese u organizam specifične duplekse molekule RNA čiji slijed odgovara nekoj ciljanoj mRNA, Dicer cijepa duplekse u kratke duplekse siRNA čiji se jedan lanac naposljetku veže na komplementarnu mRNA i utišava ju (npr. degradira ju enzim AGO). U biljaka se RNA interferencijom (RNAi) može učinkovito utišati gotovo svaki gen (Nelson i Cox 2017 a). Tehnika RNA interferencije naziva se *knockdown* gena (*gene knockdown*) zato što je ekspresija gena smanjena, ali ne i potpuno onemogućena kao u slučaju nokauta gena (*gene knockout*) (Berg i sur. 2015 a). Lijekovi bazirani na RNAi zasad nisu pronašli širu primjenu zbog prisutnosti brojnih nukleaza u ljudskim tkivima koje razgrađuju RNA (Nelson i Cox 2017 a).

Poput miRNA, tasiRNA i natsiRNA smanjuju gensku ekspresiju navodeći cijepanje mRNA ciljanog gena pomoću endonukleaze AGO. U *A. thaliana* tasiRNA formiraju se od samo četiri RNA kalupa i glavna im je uloga regulacija ekspresije transkripcijskih faktora uključenih u odgovor na auksin (*auxin response factors* – ARF). Nasuprot tome preko 2000 gena *A. thaliana* potencijalno je regulirano molekulama natsiRNA. Smatra se da je temeljna uloga natsiRNA

osiguravanje dodatne razine regulacije gena u kontekstu odgovora na stresne uvjete u okolišu (Sugiura i sur. 2015).

Molekule hcsiRNA, posebna skupina siRNA, najproduciranije su biljne sRNA dobivene pomoću DCL enzima. Proizvode se i djeluju na transpozone, ponavljajuće elemente i heterokromatinske regije biljnog genoma. Za razliku od miRNA, siRNA, tasiRNA i natsiRNA, 24 nukleotida duge hcsiRNA ne reguliraju ekspresiju gena pomoću cijepanja mRNA. Umjesto toga djeluju putem inhibicije transkripcije tako što usmjeravaju (regrutiraju) modifikatore histona i DNA metiltransferaze na svoje ciljane regije u kromosomu. Remodeliranje kromatina upravljano molekulama hcsiRNA štiti genom od štetnih učinaka transpozona, pokretnih genetičkih elemenata. Također je uključeno i u kratkotrajne epigenetske promjene u odgovoru na stresne uvjete i u određivanju razvojne sudbine stanice (Sugiura i sur. 2015). hcsiRNA modificiraju strukturu kromatina i utišavaju transkripciju vodeći kompleks s Argonautima na sklopove (skele – *scaffolds*) s komplementarnom RNA u nastajanju, nakon čega se regrutiraju histonske i DNA metiltransferaze, čijim se djelovanjem suprimira transkripcija. Taj kotranskripcijski mehanizam utišavanja gena čini snažan sustav nadzora RNA koji detektira i utišava neželjenu transkripciju te osigurava pamćenje i održavanje istih epigenetskih stanja putem samopojačivačke epigenetske povratne sprege (*self-reinforcing epigenetic loops*). U *A. thaliana* istražena je povezanost utišavanja gena, proizvodnje hcsiRNA i metilacije DNA usmjerene molekulama RNA (*RNA-directed DNA methylation* – RdDM), odnosno povezanost RNA interferencije i epigenetske regulacije ekspresije gena. Jedinstveni mehanizam kojim sRNA i lncRNA modificiraju strukturu kromatina i utišavaju transkripciju jest formiranje sklopova RNA. mRNA i lncRNA mogu analogno, ali neovisno o RNAi sudjelovati u regrutaciji enzima za modifikaciju histona i posljedičnom utišavanju gena (Holoch i Moazed 2015). U *A. thaliana* 24 nukleotida duge hcsiRNA predvode *de novo* metilaciju DNA i održavanje metilacije citozina na asimetričnim CHH mjestima (H = A, T ili C). Proces je ovisan o RNA polimerazama IV i V (Pol IV i V) (Ream i sur. 2009). Najprije se proizvode hcsiRNA tako što DCL3 procesira dsRNA proizvedenu pomoću RDR2 (*RNA-dependent RNA polymerase 2*) koja je prethodno koristila transkripte enzima Pol IV kao kalupe (Holoch i Moazed 2015). Prenošenje molekula hcsiRNA na AGO4 u citoplazmi potiče unošenje kompleksa u jezgru (Ye i sur. 2012), gdje se kompleks izravno veže na transkripte enzima Pol V komplementarne slijedu hcsiRNA (Wierzbicki i sur. 2009, Wierzbicki i sur. 2008). Regrutacija specifična za slijed ojačana je i izravnim interakcijama između AGO4 te GW domena

Pol V i transkripcijskog faktora KTF1 (SPT5L) koji veže transkript (El-Shami i sur. 2007, He i sur. 2009). Dok potonje interakcije stabiliziraju lokalizaciju AGO4 duž transkripta Pol V u nastajanju, protein RDM1 (*RAD52 motif containing 1*) ostvaruje fizičku vezu između AGO4 i DNA metiltransferaze DRM2, dakle napatuk za utišavanje ekspresije gena prenosi se od malih RNA do kovalentnih modifikacija DNA (Gao i sur. 2010). RDM1 ima afinitet za metiliranu DNA, što povećava vjerojatnost da uspješno poveže kompleks Pol V-KTF1-DRM2-AGO4 s ranije metiliranim mjestima na DNA (Holoch i Moazed 2015). Utvrđeno je da DRM2 preferentno metilira lanac DNA koji je kalup za transkripte Pol V. Predložen je model prema kojem AGO4, vezanjem na transkript Pol V koji je komplementaran hcsiRNA, usmjeruje DRM2 specifično na DNA lanac kalup koji izlazi iz izlaznog kanala Pol V (Zhong i sur. 2014). Kod nekih gena identitet utišanog lokusa održava se pomoću samopojačivačkih interakcija koje uključuju deacetilaciju histona i metilaciju DNA, dok amplifikacija hcsiRNA i utišavanje pripadnih gena ovise o suradnji između kompleksa Pol V-KTF1-DRM2-AGO4 i Pol IV te već postojećim modifikacijama kromatina (Blevins i sur. 2014). U metilaciji DNA ovisnoj o RNA bitni su samopojačivački mehanizmi pozitivne povratne sprege. Na primjer, regije DNA čija je metilacija ovisna o RNA u *A. thaliana* također su obogaćene metilacijom H3K9 (metilacijom lizina na devetom mjestu u aminokiselinskom slijedu histona H3), a ta se dva epigenetska signala međusobno nadopunjuju. Tri različite H3K9 metiltransferaze – KYP (SUVH4), SUVH5 i SUVH6 – pridonose održavanju uzoraka metilacije DNA, a KYP ima primarnu ulogu (Matzke i Mosher 2014). KYP je regrutiran na mjesta u genomu gdje je DNA metilirana, dok se faktor SHH1, vezan za Pol IV, veže na nukleosome koji imaju metiliran H3K9 i nemetiliran H3K4 potičući time biosintezu hcsiRNA, odnosno metilaciju odgovarajuće DNA ovisnu o hcsiRNA (Law i sur. 2013, Zhang i sur. 2013). Proteini SUVH2 i SUVH9 vežu se na metiliranu DNA, nemaju H3K9 metiltransferaznu aktivnost (Johnson i sur. 2008), a pokazano je da izravno regrutiraju Pol V na mjesta ranije metilirane DNA, omogućujući time nastanak sklopova početnog transkripta za regrutaciju kompleksa AGO4-siRNA i daljnje pojačavanje signala za metilaciju DNA (Johnson i sur. 2014, Liu i sur. 2014). Još jedna DNA metiltransferaza, CMT3, regrutirana je izravno na metilirani H3K9, metilira CHG mjesta i time održava stanje metilirane DNA (Law i Jacobsen 2010). Ovakve povratne sprege osiguravaju održanje epigenetske informacije. Mehanizam metilacije DNA na asimetričnim mjestima u genomu *A. thaliana* jedan je od najprominentnijih primjera epigenetske regulacije ekspresije gena pomoću malih molekula RNA i samopojačivačkih povratnih sprege.

5. OBRANA BILJAKA OD PATOGENA

5.1. Biljni patogeni

Biljke se neprestano moraju braniti od neželjenih bakterija, virusa, viroida, gljiva, algašica, protista, mikoplazmi, beskrležnjaka, pa čak i drugih biljaka. Kao dio imunološkog sustava kralježnjaka, stanice specijalizirane za obranu brzo se mobiliziraju na mjesto infekcije (zaraze), gdje ubijaju patogene ili ograničavaju njegovo širenje po organizmu. Biljne stanice imaju stečenu i inducibilnu obranu koje sprečavaju većinu infekcija. Zahvaljujući tome, u biljnim populacijama u prirodi većina je biljaka zdrava većinu vremena, a ako se bolest i pojavi, obično je ograničena na samo nekoliko biljaka i zahvaća tek manji dio tkiva biljke. Bolest, kao ishod uspješne infekcije, rijetko ubija biljku. Interakcije između biljaka i patogena predmet su intenzivnog istraživanja (Hammond-Kosack i Jones 2015).

Patogeni i štetočine koevoluirali su s biljnim domaćinima još puno prije udomaćivanja (domestikacije) usjevnih biljaka. Biljni je patogen bilo koji organizam čiji se cjelokupni ili dio životnog ciklusa odvija unutar biljke, često uzrokujući posljedice štetne po biljku. Biljna je štetočina herbivoran kukac, oblič, sisavac ili ptica koja jede vegetativno tkivo biljke, plodove i sjemenke. Biljke su otporne na većinu biljnih štetočina i patogena. Svaka se biljna stanica može braniti od patogenih mikroorganizama i beskrležnjaka. Neki oblici obrane, poput antimikrobnih sekundarnih metabolita, konstitutivni su, lokalizirani u određenim staničnim odjeljcima i spremni biti oslobođeni prilikom oštećenja stanice. Drugi obrambeni odgovori, poput onih induciranih prodiranjem patogena, zahtijevaju detekciju patogena (Hammond-Kosack i Jones 2015).

Samo mali udio infekcija patogenom rezultira bolešću biljke. Jedan ili više od četiri glavna čimbenika može biti odgovoran za ovako slabu učinkovitost patogena: a) napadnuta vrsta biljke nije u mogućnosti ispuniti potrebe potencijalnog patogena za preživljenje (nije domaćin određenog patogena), b) biljka posjeduje strukturne barijere ili toksične spojeve koji ograničavaju infekciju određenih vrsta patogena (takva obrana može biti važna za otpornost na bolest), c) prepoznavanjem patogena inducira se obrambeni mehanizam i invazija ostaje lokalizirana ili se d) mijenjaju okolišni uvjeti i patogen nestaje prije nego što je infekcija došla do točke u kojoj više ne ovisi o štetnim vanjskim čimbenicima. Inducirana obrana može se pojaviti vrlo brzo (npr. stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta) ili nešto kasnije (npr. akumulacija antimikrobnih spojeva). Aktivacija

obrane u listu može inducirati obranu u distalnim listovima zbog kretanja signalnih molekula po biljci. Obrambeni sustav biljke mora biti u mogućnosti razlikovati štetne biljne patogene od korisnih organizama kao što su bakterije roda *Rhizobium* za mahunarke i mikorizne gljive za većinu vaskularnih biljaka (Hammond-Kosack i Jones 2015).

5.2. Načini obrane biljaka od patogena

Uspješni patogeni moraju ući u biljku domaćina, dovoljno dugo rasti kako bi prikupili hranjive tvari, utišali obranu i razmnožili se, nastavljajući tako svoj životni ciklus. Svaka od tih faza zahtijeva različita rješenja za različite probleme. Patogeni imaju razvijene različite i specifične načine prodiranja u biljke. Neke vrste izravno penetriraju površinske slojeve pomoću mehaničkog pritiska ili enzimskog napada, neke prolaze kroz prirodne otvore (poput puči i lenticela), a neke ulaze samo kroz ranjeno tkivo. Kad se patogen nalazi unutar biljke, započinje jedna od triju glavnih strategija napada: a) nekrotrofija (ubijaju se biljne stanice kako bi infekcija mogla napredovati), b) biotrofija (biljne stanice ostaju žive tijekom infekcije) ili c) hemibiotrofija (u početku su biljne stanice žive, ali ih u kasnijim fazama infekcije patogen ubija). Proces infekcije, kolonizacije i razmnožavanja naziva se patogenezom. Patogeni soj koji uzrokuje bolest naziva se virulentnim. Obligatni biotrofi mogu opstati jedino u živoj biljci (Hammond-Kosack i Jones 2015).

Pokretanje obrane povezano je s brзом aktivacijom gena povezanih s obranom i često kulminira tzv. hipersenzitivnim odgovorom koji uzrokuje lokaliziranu programiranu staničnu smrt kako bi se spriječilo daljnje širenje patogena. Otpornost biljaka na patogene može biti posredovana dominantnim biljnim genima za otpornost (*resistance – R genes*) koji su komplementarni genima avirulencije (*avirulence – Avr genes*) patogena. Geni *Avr* patogena kodiraju efektorske proteine koje prepoznaju produkti gena *R* (Hammond-Kosack i Jones 2015). Efektorski proteini *Avr* imaju veliku raznolikost sljedova, a njihova je uloga u patogenima i domaćinskim biljkama trenutno malo poznata. Biljni su proteini *R* pak iznimno sličnih struktura, a imaju motive kao što su ponavljanja bogata leucinom, domene za vezanje nukleotida, domene serinskih ili treoninskih proteinskih kinaza i druge. Proteini *R* detektiraju patogene i iniciraju prijenos signala u aktivaciji obrambenih mehanizama. Proučavanjem genoma brojnih patogena i štetočina došlo se do zaključaka da geni za efektorske proteine djeluju putem supresije ili inaktivacije biljne obrane. Reakcije biljne obrane uključuju složene biokemijske puteve i mnoge signalne molekule,

uključujući reaktivne kisikove vrste (*reactive oxygen species* – ROS), dušikov(II) oksid (NO), salicilnu kiselinu (SA), jasmonsku kiselinu (JA) i etilen, kako bi se potakla indukcija proteina, sekundarnih metabolita i, često, reakcije ojačavanja stanične stijenke na mjestu infekcije te sustavne promjene na napadnutoj biljci koje doprinose otpornosti u slučaju napada patogena na druga mjesta na biljci. Poseban način obrane od biljnih virusa uključuje posttranskripcijsko utišavanje gena, detaljnije objašnjeno u sljedećem dijelu rada. U obrani od kukaca sudjeluju proteini inhibitori proteinaza. Mnogi aspekti inducirane biljne obrane očuvani su i u drugih eukariota (Hammond-Kosack i Jones 2015).

5.3. Uloga RNA utišavanja u obrani biljaka od patogena

RNA utišavanje važno je za otpornost biljaka na mnoge vrste virusa. Biljke zaražene nekim virusom mogu se oporaviti i stvoriti nove izdanke koji nemaju simptome infekcije. To je moguće zato što biljke mogu umanjiti akumulaciju mnogih vrsta virusa mehanizmom RNA utišavanja. Iako su biljni virusi vrlo različiti u mnogim aspektima, svaka vrsta tijekom svojeg ciklusa sintetizira virusne molekule RNA. Nakupljanje virusne RNA, osobito dsRNA, pruža signal koji aktivira mehanizam utišavanja. Tvorba molekula dsRNA može biti dio procesa replikacije virusnog genoma, posljedica postojanja invertiranih ponavljanja unutar ssRNA koja se sparuju, pri čemu nastaje struktura ukosnice, ili pak zbog postojanja komplementarnih produkata RNA nastalih preklapajućom dvosmjernom transkripcijom (simultanom transkripcijom obaju lanaca genoma). RNA utišavanje učinkovit je mehanizam obrane zbog sljedećih karakteristika: specifičan je za virusnu RNA (siRNA izvode se od dsRNA virusnog podrijetla), velik je potencijal za amplifikaciju (biljne RdRP koriste siRNA kao početnice za sintezu sekundarnih dugih virusnih dsRNA s ssRNA kalupa) te siRNA djeluju i kao mobilni signal koji se pokreće prije ili istodobno s virusom koji se širi biljkom (tako je osigurano da virus ne može izbjeći učinak utišavanja prolaskom između stanica ili floemom). Kao odgovor na RNA utišavanje mnogi biljni virusi kodiraju proteine koji djeluju kao supresori ovog mehanizma. Supresori utišavanja različitih vrsta virusa uglavnom su nepovezani s obzirom na slijed ili strukturu. Pod jakim selekcijskim pritiskom RNA utišavanja nezavisno je evoluiralo nekoliko različitih mehanizama s istom ulogom (konvergentna evolucija). Supresorski proteini često imaju dodatne nevezane uloge u replikaciji virusa, a njihova mogućnost suprimiranja RNA utišavanja razvila se kao dodatno svojstvo (Hammond-Kosack i Jones 2015).

5.3.1. Obrana od virusa

RNAi ključan je biološki proces koji u biljaka transkripcijski i posttranskripcijski inhibira ekspresiju gena, a potrebne su tri različite skupine proteina kako bi se osigurala otpornost na virulentnost patogena (DCL, AGO, RdRP). Kao odgovor u patogena može doći do ekspresije supresora RNAi domaćina. Djelovanje na mehanizam utišavanja strategija je virulentnosti patogena koja omogućuje širenje infekcije u napadnutoj biljci (Muhammad i sur. 2019). Virusi trebaju vektor za prijenos iz jednog domaćina u drugi koristeći resurse domaćina za svoju reprodukciju i širenje. U biljaka virusi uz lokalne lezije potiču sustavnu infekciju koja uzrokuje malformacije, klorozu i kržljav rast. Većina biljnih virusa, izuzev nekoliko obitelji DNA virusa, ima ssRNA ili dsRNA genom. Za razliku od drugih patogena virusi se multipliciraju unutar domaćinske stanice, stoga mehanizam RNA utišavanja ima ključnu ulogu u obrani od virusa. Primarne mete RNA utišavanja upravo su virusi s RNA genomom koji proizvode dsRNA intermedijere (međuprodukte) tijekom procesa reprodukcije (Muhammad i sur. 2019). DCL2 i DCL4 izravno procesiraju virusne RNA i tvore siRNA duge redom 22 i 21 nukleotid, koje se potom prenose na komplekse AGO1 i AGO2 radi cijepanja (Wang i sur. 2011). U slučaju DNA virusa dsRNA nije prisutna tijekom ciklusa replikacije, a za RNA utišavanje potrebni su RdRP6 i supresor utišavanja gena 3 (*Suppressor of gene silencing 3* – SGS3) (Bisaro 2006). Kod DNA virusa također su potrebna sva četiri DCL enzima za sintezu siRNA u stanicama domaćina (Akbergenov i sur. 2006). Multiplikacija virusa povećava akumulaciju molekula siRNA izvedenih iz virusne RNA tijekom infekcije i općenito dolazi do transkripcije gena uključenih u RNAi (Muhammad i sur. 2019). DCL2 i DCL4 ključni su u obrani od RNA virusa, u njihovim mutantama učinkovitija je akumulacija virusne RNA i sustavna infekcija (Garcia-Ruiz i sur. 2010, Dzianott i sur. 2012, Andika i sur. 2015). DCL2 je esencijalan za poticanje prenošenja RNA utišavanja od stanice do stanice, dok DCL4 sudjeluje u unutarstaničnom utišavanju i inhibira međustanično utišavanje; DCL2 može zamijeniti DCL4 ako je DCL4 odsutan ili suprimiran djelovanjem virusa (Zhang i sur. 2012, Qin i sur. 2017). Kod DNA virusa DCL3 i 24 nukleotida duga siRNA sudjeluju u putu RdDM (metilacije DNA usmjerene molekulama RNA) kako bi obranili biljku od infekcije (Blevins i sur. 2006, Aregger i sur. 2012). Obitelj proteina HYL1 (*hyponastic leaves 1*) i HEN1 (*Hua enhancer 1*) uključeni su u biogenezu siRNA DNA virusa pomoću DCL enzima (Akbergenov i sur. 2006). Dosadašnja istraživanja potvrđuju da su 21 i 22 nukleotida duge siRNA

(odnosno DCL4 i DCL2 enzimi) uključene u mehanizam utišavanja kako biljnih RNA virusa, tako i DNA virusa (Li i sur. 2018). Biljke imaju i posebne proteine koji vežu dvolančanu RNA (*double-stranded RNA binding proteins* – DRB proteine) čija je uloga poticanje DCL enzima na preciznu sintezu sRNA. DRB proteini nekatalitički su faktori s motivom za vezanje dsRNA, u *A. thaliana* njihove različite varijante uključene su u put biogeneze miRNA i siRNA, metilaciju virusnoga genoma, regrutaciju epigenetskih faktora za represiju koji reguliraju transkripciju na ciljanom lokusu i općenito antivirusnim odgovorima (Muhammad i sur. 2019). siRNA dobivene pomoću DCL enzima inkorporiraju se u enzime AGO, što je važan korak u mehanizmu utišavanja strane nukleinske kiseline. U biljaka su identificirani različiti enzimi AGO i otkrivene su uloge njih nekoliko u obrani od više virusa. Genetička analiza enzima AGO u *A. thaliana* pokazala je da su samo AGO1, 2 i 7 uključeni u otpornost na viruse i imaju ulogu u RNA utišavanju i restrikciji virusa (Jaubert i sur. 2011, Garcia-Ruiz i sur. 2015). Istraživači otkrivaju nove članove obitelji proteina AGO u različitim biljnim vrstama, no njihove uloge uglavnom još ostaju nepoznate. RdRP domaćina koriste virusne primarne siRNA kao početnice i prevode ih u duge dsRNA od kojih pak nastaju sekundarne siRNA, potičući tako amplifikaciju siRNA signala. RDR1, 2 i 6 smatraju se važnim enzimima koji sudjeluju u različitim biološkim procesima RNA utišavanja (Muhammad i sur. 2019). Mehanizam RNAi općenito je važan mehanizam obrane biljaka, međutim potrebna su dodatna istraživanja kako bi se otkrile specifične funkcije pojedinih komponenata ovog puta i njihova potencijalna primjena te omogućio razvoj novih metoda.

U složenim odnosima živog svijeta virusi nisu ostali bez vlastitog odgovora na reakcije biljaka. Kako bi se neutralizirali učinci RNA utišavanja, u dobro prilagođenih biljnih virusa razvijeni su virusni supresori RNA utišavanja (*viral suppressors of RNA silencing* – VSRs) koji uvelike umanjuju biljnu obranu protiv takvih virusa (Burgyán i Havelda 2011). Trenutno se smatra da su VSR esencijalni za uspješnu virusnu infekciju i da većina virusa ima barem jedan VSR koji blokira RNA utišavanje u pojedinom koraku. Različiti VSR različitih virusa interagiraju s proteinima DCL, DRB, AGO, onemogućuju prijenos siRNA na AGO ili potiču degradaciju enzima AGO, inhibirajući tako RNA utišavanje na različite načine i na različitim razinama. Postojanje više supresorskih proteina u jednog virusa omogućuje djelovanje na različite obrambene mehanizme domaćina na staničnoj razini i time uspješniju infekciju. Kako bi se zaustavila amplifikacija RNA utišavanja i prijenos signala, potrebno je inhibirati aktivnost RdRP; VSR ulaze u interakciju i inhibiraju RdRP domaćina, tj. zaustavljaju sintezu sekundarne siRNA i tako

suprimiraju RNA utišavanje. Osim svojstva supresije sustava za RNAi domaćina, određeni supresori uključeni su u replikaciju i pokretanje virusa, a potrebni su im i proteinski faktori domaćina za uspješnu infekciju (Muhammad i sur. 2019).

5.3.2. Obrana od bakterija

Biljke i bakterije stupaju u međusobnu interakciju na različite načine, a ta interakcija može biti korisna, štetna ili neutralna. Štetne interakcije rezultiraju razvojem bolesti biljke domaćina. Prilikom bakterijske infekcije biljke prepoznaju molekularne uzorke patogena (*pathogen-associated molecular patterns* – *PAMPs*) i kontroliraju nakupljanje različitih siRNA ili miRNA pomoću sustava za RNAi (Muhammad i sur. 2019). Molekularne uzorke patogena predstavljaju šećeri i lipoproteini specifični za patogena ili nukleinske kiseline eksprimirane tijekom životnog ciklusa patogena. Proteini domaćina koji takve uzorke prepoznaju zovu se receptori za prepoznavanje patogena (*pathogen recognition receptors* – *PRRs*) (<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/pathogen-associated-molecular-pattern>, 18. 8. 2019.). sRNA proizvedene tijekom infekcije ili pojačavaju signale povezane s obranom i ekspresiju gena za rezistenciju ili utišavaju određene gene koji negativno reguliraju imunost biljaka. Kao odgovor na imunost potaknutu PAMP-om (*PAMP-triggered immunity* – PTI), bakterije sintetiziraju određene efektore koji suprimiraju mehanizam RNAi domaćina. Različiti bakterijski efektori ulaze u stanice domaćina te, mijenjajući transkriptom i proteom stanica, čine ih osjetljivim na patogena. Nakon prepoznavanja efektora patogena u biljaka se aktivira druga razina obrane u obliku imunosti potaknute efektorom (*effector-triggered immunity* – ETI) (Muhammad i sur. 2019). Utvrđeno je da nekoliko endogenih siRNA i miRNA ostvaruje finu regulaciju odgovora PTI i ETI (Pumplin i Voinnet 2013, Staiger i sur. 2013). PTI i ETI uglavnom djeluju na bakterijske sigma faktore povezane sa željezom kako bi poremetili metabolizam željeza bakterije, zato što povećana ekspresija tih sigma faktora pruža bakterijama toleranciju na imunost biljke (Nobori i sur. 2018). Usporedbom uloge mehanizma RNAi protiv različitih patogena uočeno je da nedostatak funkcije jednog proteina može biti nadoknađen nekim drugim proteinom tijekom virusne ili gljivične infekcije, dok kod bakterijskih infekcija zasad nema informacija o utjecaju smanjenja ili supresije ekspresije određene komponente RNAi na funkciju i ekspresiju drugih komponenata ovog puta obrane biljaka (Muhammad i sur. 2019).

5.3.3. Obrana od gljiva

Gljive su eukariotski organizmi, postoji ih preko milijun vrsta i smatraju se jednom od najvažnijih skupina biljnih patogena. Patogene gljive mogu penetrirati u domaćina kroz prirodne otvore, rane ili pomoću posebnih hifalnih struktura. Osim što mogu biti patogene, određene vrste gljiva mogu biti i vektori za prijenos različitih virusa. Slično drugim eukariotima i gljive imaju osnovne komponente sustava RNAi koje obavljaju obranu od virusa. Biljke i gljive koje su biljni patogeni imaju sličan sustav za RNAi koji služi domaćinu za obranu od patogena, ali i invadirajućem organizmu za rast, razvoj i patogenezu. DCL enzimi gljiva stvaraju sRNA koje se vežu na biljne AGO1 kako bi se preuzela kontrola nad sustavom za RNAi i utišala imunost biljke domaćina. Komponente sustava RNAi povezane su s virulentnošću biljnih patogenih gljiva. Prilikom infekcije patogenim gljivama, u biljaka se aktivira biosinteza različitih sRNA ili miRNA koje pojačavaju ili inhibiraju određene signalne puteve povezane s rezistencijom ili osjetljivošću na patogene gljive. Neke miRNA prenose se do patogena putem RNA interferencije između carstava sa svrhom utišavanja ili inhibiranja gena povezanih s virulentnošću patogena koji je u interakciji s biljkom. S druge strane patogene gljive sintetiziraju određene efektorske proteine koji preuzimaju kontrolu nad komponentama RNAi ili utišavaju gene domaćina vezane za obranu od patogena. U interakciji biljaka i patogena različite vrste sRNA pridonose imunosti domaćina putem utišavanja gena, međutim sRNA patogena izazivaju virulentnost. Ponekad se taj utjecaj može proširiti na organizam drugog carstva i regulirati utišavanje gena u organizmu s kojim je u interakciji – takav se tip već spomenute interakcije naziva RNA interferencija između carstava (*cross-kingdom RNAi*), u kojoj se signali za utišavanje translociraju između organizama u interakciji, čime je omogućeno da jedan organizam utišava gene drugog organizma i obratno (Muhammad i sur. 2019). Tako je npr. primijećeno da biljke *A. thaliana* izlučuju ekstracelularne vezikule s sRNA na mjesta infekcije, a koje ulaze u stanice sive plijesni, *Botrytis cinerea* Pers. (Cai i sur. 2018). Biljke pamuka potiču biogenezu dviju specifičnih miRNA prilikom infekcije gljivom *Verticillium dahliae* Kleb., a koje se prenose do stanica gljive kako bi sudjelovale u utišavanju (Zhang i sur. 2016).

6. ZAKLJUČAK

Istraživanja su u današnje vrijeme u svim područjima znanosti intenzivnija no ikada prije, svakodnevno se dolazi do novih spoznaja, a istraživači se susreću s dužnošću suradnje i multidisciplinarnog integriranja otkrića s ciljem da njihov rad bude u potpunosti oplemenjen i upotrijebljen za daljnji razvitak znanosti. Kontinuirano se provode nova istraživanja i otkrivaju nova saznanja. U mnoštvu kompleksnih i reguliranih mehanizama koji se odvijaju unutar biljke, RNA utišavanje zauzima posebno mjesto. Područje je iznimnog znanstvenog interesa i razvoja, mnogo je toga otkriveno o putevima njegova djelovanja i o njegovoj ulozi, međutim brojni detalji mehanizama RNA utišavanja aktualna su tema i tek trebaju biti istraženi i opisani. Ti se detalji posebno odnose na raznolikost vrsta malih molekula RNA, njihove višestruke uloge, detalje pojedinih koraka mehanizama te sastav i specifične uloge pojedinih komponenata različitih kompleksa koji sadrže sRNA. Raznolikost strukture i uloga molekula sRNA u biološkim procesima još je uvijek velik izazov za istraživače te vjerojatno skriva brojne tajne. Cilj je što iscrpnije razriješiti trenutno ponegdje mutne granice u klasifikaciji i ulogama molekula sRNA, ali i njihovu isprepletenost.

Istraživači nadalje imaju zadaću opisati trenutno nepoznate detalje mehanizama koji se odvijaju tijekom interakcije biljaka i virulentnih patogena: nukleinske kiseline, proteine i ostale molekule koje sudjeluju u takvom međuodnosu te njihove specifične uloge, reakcije biljaka na specifične patogene, odgovor patogena na reakcije biljaka te njihov razvoj i prilagodbe tijekom vremena. Brojne su dobrobiti i potencijalne primjene saznanja iz ovog područja, npr. u poljoprivredi su metode koje primjenjuju otpornost temeljenu na RNA utišavanju moćan alat koji se koristi za proizvodnju otpornih biljnih usjeva, iako postoje ograničenja i suvremene alternativne metode (Duan i sur. 2012). Osim za povećanje otpornosti na infekcije i štetočine, metode temeljene na RNA utišavanju primjenjuju se i za mijenjanje vremena cvjetanja, poboljšanje komercijalnih svojstava voća i cvjetova, povećanje hranjivih vrijednosti, uklanjanje toksičnih spojeva i alergena te razvoj industrijski vrijednih proizvoda (Guo i sur. 2016).

7. LITERATURA

- Akbergenov R., Si-Ammour A., Blevins T., Amin I., Kutter C., Vanderschuren H., Zhang P., Gruissem W., Meins F., Hohn T. i sur. (2006). Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucleic Acids Res.* **34**, 462–471.
- Andika I. B., Maruyama K., Sun L., Kondo H., Tamada T., Suzuki N. (2015). Different Dicer-like protein components required for intracellular and systemic antiviral silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* **10**, e1039214.
- Aregger M., Borah B. K., Seguin J., Rajeswaran R., Gubaeva E. G., Zvereva A. S., Windels D., Vazquez F., Blevins T., Farinelli L., Pooggin M. M. (2012). Primary and secondary siRNAs in Geminivirus-induced gene silencing. *PLoS Pathog.* **8**, e1002941.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356–363.
- Berg J. M., Tymoczko J. L., Gatto G. J., Jr., Stryer L. (2015 a). Exploring genes and genomes. U: Berg J. M., Tymoczko J. L., Gatto G. J., Jr., Stryer L. (ur.) *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, NY, str. 135–168.
- Berg J. M., Tymoczko J. L., Gatto G. J., Jr., Stryer L. (2015 b). The control of gene expression in eukaryotes. U: Berg J. M., Tymoczko J. L., Gatto G. J., Jr., Stryer L. (ur.) *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, NY, str. 941–959.
- Bisaro D. M. (2006). Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology* **344**, 158–168.
- Blevins T., Pontvianne F., Cocklin R., Podicheti R., Chandrasekhara C., Yerneni S., Braun C., Lee B., Rusch D., Mockaitis K., Tang H., Pikaard C. S. (2014). A two-step process for epigenetic inheritance in *Arabidopsis*. *Mol Cell.* **54**, 30–42.
- Blevins T., Rajeswaran R., Shivaprasad P. V., Beknazariants D., Si-Ammour A., Park H. S., Vazquez F., Robertson D., Meins F. Jr., Hohn T., Pooggin M. M. (2006). Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res.* **34**, 6233–6246.
- Burgyán J., Havelda Z. (2011). Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.* **16**, 265–272.

- Cai Q., Qiao L., Wang M., He B., Lin F. M., Palmquist J., Huang S. D., Jin H. (2018). Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science* **360**, 1126–1129.
- Carmell M. A., Hannon G. J. (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 214–218.
- Chapman E. J., Carrington J. C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 884–896.
- Dalmay T., Hamilton A., Rudd S., Angell S., 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.
- Duan Ch.-G., Wang Ch.-H., Guo H.-Sh. (2012). Application of RNA silencing to plant disease resistance. *Silence* **3**, 5.
- Dzianott A., Sztuba-Solińska J., Bujarski J. J. (2012). Mutations in the antiviral RNAi defense pathway modify Brome mosaic virus RNA recombinant profiles. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **25**, 97–106.
- El-Shami M., Pontier D., Lahmy S., Braun L., Picart C., Vega D., Hakimi M. A., Jacobsen S. E., Cooke R., Lagrange T. (2007). Reiterated WG–GW motifs form functionally and evolutionarily conserved Argonaute-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev.* **21**, 2539–2544.
- Faehle Ch. R., Elkayam E., Haase A. D., Hannon G. J., Joshua-Tor L. (2013). The making of a slicer: Activation of human Argonaute-1. *Cell Rep.* **3**, 1901–1909.
- 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., Matzke M., Pikaard C. S., Zhu J. K. (2010). An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature* **465**, 106–109.
- Garcia-Ruiz H., Carbonell A., Hoyer J. S., Fahlgren N., Gilbert K. B., Takeda A., Giampetruzzi A., Garcia Ruiz M. T., McGinn M. G., Lowery N., Martinez Baladejo M. T., Carrington J.

- C. (2015). Roles and programming of *Arabidopsis* Argonaute proteins during turnip mosaic virus infection. *PLoS Pathog.* **11**, e1004755.
- Garcia-Ruiz H., Takeda A., Chapman E. J., Sullivan C. M., Fahlgren N., Brempelis K. J., 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.
- Guo Q., Liu Q., Smith N. A., Liang G., Wang M.-B. (2016). RNA silencing in plants: Mechanisms, technologies and applications in horticultural crops. *Curr. Genomics* **17**, 476–489.
- Hammond-Kosack K. E., Jones J. D. G. (2015). Responses to plant pathogens. U: Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L. (ur.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, str. 984–1050.
- He X. J., Hsu Y. F., Pontes O., Zhu J., Lu J., Bressan R. A., Pikaard C., Wang C. S., Zhu J. K. (2009). NRPD4, a protein related to the RPB4 subunit of RNA polymerase II, is a component of RNA polymerases IV and V and is required for RNA-directed DNA methylation. *Genes Dev.* **23**, 318–330.
- Holoch D., Moazed D. (2015). RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 71–84.
- Jaubert M., Bhattacharjee S., Mello A. F. S., Perry K. L., Moffett P. (2011). Argonaute 2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against potato virus X in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **156**, 1556–1564.
- Johnson L. M., Du J., Hale C. J., Bischof S., Feng S., Chodavarapu R. K., Zhong X., Marson G., Pellegrini M., Segal D. J., Patel D. J., Jacobsen S. E. (2014). SRA- and SET-domain-containing proteins link RNA polymerase V occupancy to DNA methylation. *Nature* **507**, 124–128.
- Johnson L. M., Law J. A., Khattar A., Henderson I. R., Jacobsen S. E. (2008). SRA-domain proteins required for DRM2-mediated *de novo* DNA methylation. *PLoS Genet.* **4**, e1000280.

- Law J. A., Du J., Hale C. J., Feng S., Krajewski K., Palanca A. M., Strahl B. D., Patel D. J., Jacobsen S. E. (2013). Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1. *Nature* **498**, 385–389.
- Law J. A., Jacobsen S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 204–220.
- Li Y., Muhammad T., Wang Y., Zhang D., Crabbe M. J. C., Liang Y. (2018). Salicylic acid collaborates with gene silencing to tomato defense against tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Pak. J. Bot.* **50**, 2041–2054.
- Liu Z. W. i sur. (2014). The SET domain proteins SUVH2 and SUVH9 are required for Pol V occupancy at RNA-directed DNA methylation loci. *PLoS Genet.* **10**, e1003948.
- Mallory A., Vaucheret H. (2010). Form, function, and regulation of Argonaute proteins. *Plant Cell* **22**, 3879–3889.
- Margis R., Fusaro A. F., Smith N. A., Curtin S. J., Watson J. M., Finnegan E. J., Waterhouse P. M. (2006). The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Lett.* **580**, 2442–2450.
- Matzke M. A., Mosher R. A. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 394–408.
- Mourrain P., Béclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J. B., Jouette D., Lacombe A. M., Nikic S., Picault N., Rémoué K., Sanial M., Vo T. A., Vaucheret H. (2000). *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**, 533–542.
- Muhammad T., Zhang F., Zhang Y., Liang Y. (2019). RNA interference: A natural immune system of plants to counteract biotic stressors. *Cells* **8**, 38.
- Nelson D. L., Cox M. M. (2017 a). Regulation of gene expression. U: Nelson D. L., Cox M. M. (ur.) *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, NY, str. 2343–2436.

- Nelson D. L., Cox M. M. (2017 b). RNA metabolism. U: Nelson D. L., Cox M. M. (ur.) Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman and Company, New York, NY, str. 2156–2246.
- Nobori T., Velásquez A. C., Wu J., Kvitko B. H., Kremer J. M., Wang Y., He S. Y., Tsuda K. (2018). Transcriptome landscape of a bacterial pathogen under plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, E3055–E3064.
- Parker J. S. (2010). How to slice: Snapshots of Argonaute in action. *Silence* **1**, 3.
- Pumplin N., Voinnet O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: Defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 745–760.
- Qin C., Li B., Fan Y., Zhang X., Yu Z., Ryabov E., Zhao M., Wang H., Shi N., Zhang P., Jackson S., Tör M., Cheng Q., Liu Y., Gallusci P., Hong Y. (2017). Roles of Dicer-like proteins 2 and 4 in intra- and intercellular antiviral silencing. *Plant Physiol.* **174**, 1067–1081.
- Ream T. S., Haag J. R., Wierzbicki A. T., Nicora C. D., Norbeck A. D., Zhu J. K., Hagen G., Guilfoyle T. J., Pasa-Tolić L., Pikaard C. S. (2009). Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II. *Mol Cell.* **33**, 192–203.
- Simon B., Kirkpatrick J. P., Eckhardt S., Reuter M., Rocha E. A., Andrade-Navarro M. A., Sehr P., Pillai R. S., Carlomagno T. (2011). Recognition of 2'-o-methylated 3'-end of piRNA by the PAZ domain of a Piwi protein. *Structure* **19**, 172–180.
- Staiger D., Korneli C., Lummer M., Navarro L. (2013). Emerging role for RNA-based regulation in plant immunity. *New Phytol.* **197**, 394–404.
- Sugiura M., Takeda Y., Waterhouse P., Small I., Curtin Sh., Millar T. (2015). Nucleic acids. U: Buchanan B. B., Grissem W., Jones R. L. (ur.) Biochemistry & Molecular Biology of Plants. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, str. 240–288.
- Town Ch. D., Wellmer F. (2015). Genome structure and organization. U: Buchanan B. B., Grissem W., Jones R. L. (ur.) Biochemistry & Molecular Biology of Plants. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, str. 401–437.
- Vaucheret H. (2008). Plant Argonautes. *Trends Plant Sci.* **13**, 350–358.

- Vaucheret H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: Mechanisms and regulations. *Genes Dev.* **20**, 759–771.
- Voinnet O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* **136**, 669–687.
- Wang P., Dai L., Ai J., Wang Y., Ren F. (2019). Identification and functional prediction of cold-related long noncoding RNA (lncRNA) in grapevine. *Sci. Rep.* **9**, 6638.
- Wang X.-B., Jovel J., Udomporn P., Wang Y., Wu Q., Li W.-X., Gascioli V., Vaucheret H., Ding S.-W. (2011). The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative Argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**, 1625–1638.
- Wassenegger M., Krczal G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci.* **11**, 142–151.
- Wierzbicki A. T., Ream T. S., Haag J. R., Pikaard C. S. (2009). RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nature Genet.* **41**, 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**, 635–648.
- Ye R., Wang W., Iki T., Liu C., Wu Y., Ishikawa M., Zhou X., Qi Y. (2012). Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of *Arabidopsis* Argonaute4/siRNA complexes. *Mol Cell.* **46**, 859–870.
- Zhang H., Ma Z. Y., Zeng L., Tanaka K., Zhang C. J., Ma J., Bai G., Wang P., Zhang S. W., Liu Z. W., Cai T., Tang K., Liu R., Shi X., He X. J., Zhu J. K. (2013). DTF1 is a core component of RNA-directed DNA methylation and may assist in the recruitment of Pol IV. *Proc Natl Acad Sci USA.* **110**, 8290–8295.
- Zhang T., Zhao Y. L., Zhao J. H., Wang S., Jin Y., Chen Z. Q., Fang Y. Y., Hua C. L., Ding S. W., Guo H. S. (2016). Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nat. Plants* **2**, 1–6.

Zhang X., Singh J., Li D., Qu F. (2012). Temperature-dependent survival of turnip crinkle virus-infected *Arabidopsis* plants relies on an RNA silencing-based defense that requires DCL2, AGO2, and HEN1. *J. Virol.* **86**, 6847–6854.

Zhong X., Du J., Hale C. J., Gallego-Bartolome J., Feng S., Vashisht A. A., Chory J., Wohlschlegel J. A., Patel D. J., Jacobsen S. E. (2014). Molecular mechanism of action of plant DRM *de novo* DNA methyltransferases. *Cell* **157**, 1050–1060.

<https://www.cellsignal.com/contents/resources-reference-tables/histone-modification-table/science-tables-histone>, 27. 5. 2019.

<http://Incrnadb.com/7SL/>, 24. 5. 2019.

<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/pathogen-associated-molecular-pattern>, 18. 8. 2019.

<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/dicer>, 24. 5. 2019.

<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/ribosomal-rna>, 23. 5. 2019.

8. SAŽETAK

U biljaka (kao i ostalih eukariota) postoji velika raznolikost molekula RNA. One imaju esencijalne i posebne uloge u stanici i organizmu. Uz kodirajuće mRNA važnu ulogu u ekspresiji gena imaju i ncRNA, u koje se ubrajaju tRNA, rRNA, lncRNA, snRNA, snoRNA, miRNA, siRNA i druge sRNA. Tema su ovog rada male molekule RNA, sRNA, čiji su najbolje istraženi predstavnici upravo neke ncRNA: snRNA, snoRNA, miRNA i siRNA. miRNA i siRNA sudjeluju u putevima RNA utišavanja, odnosno smanjuju razinu ekspresije ciljanih gena u različitim uvjetima. U biljaka se utišavanje obično provodi na posttranskripcijskoj razini putem cijepanja mRNA ciljanog gena. Za aktivnost ovih sRNA potrebni su određeni proteini, prvenstveno DCL enzimi, koji cijepaju njihove prekursore, te Argonauti, koji su glavna komponenta kompleksa RISC i cijepaju ciljane komplementarne molekule mRNA. hcsiRNA imaju posebnu ulogu u regulaciji ekspresije gena na transkripcijskoj razini, gdje se metilacijom DNA usmjerenom molekulom RNA utišavaju ciljani geni (epigenetska regulacija). Osim regulacije ekspresije endogenih gena, siRNA i RNAi pružaju biljkama važan način obrane od patogena, prvenstveno od virusa, bakterija i gljiva. U interakciji biljaka i njihovih patogena prisutni su i odgovori patogena na biljne obrambene mehanizme. I jedni i drugi mehanizmi mijenjaju se i razvijaju tijekom vremena. Otkrića iz područja RNA utišavanja našla su primjenu u razvijanju različitih metoda koje se koriste za oplemenjivanje biljaka.

9. SUMMARY

Plants (just like other eukaryotes) have great diversity of RNA molecules that have essential and specific functions in cell and organism. Alongside coding mRNAs important function in gene expression have ncRNAs too, which include tRNAs, rRNAs, lncRNAs, snRNAs, snoRNAs, miRNAs, siRNAs and other sRNAs. Main topic of this paper are small RNAs (sRNAs), whose best investigated representatives are some ncRNAs: snRNAs, snoRNAs, miRNAs and siRNAs. miRNAs and siRNAs act in RNA silencing pathways, i. e. they reduce expression level of targeted genes in different conditions. In plants, silencing is usually executed on posttranscriptional level by targeted gene mRNA degrading. For activity of these sRNAs are required some proteins, in first place DCL enzymes, which cleave their precursors, and Argonaute enzymes, which are principal component of RISC complex and they degrade targeted complementary mRNAs. hcsiRNAs have specific role in regulation of gene expression on transcriptional level: targeted genes are silenced by RNA-directed DNA methylation (epigenetic regulation). Beside endogenous genes expression regulation, siRNAs and RNAi provide important defense mechanisms that protect plants from pathogens, especially from viruses, bacteria and fungi. In interaction of plants and their pathogens, pathogen responses on plant defense mechanisms are also present, both are changing and developing through time. Discoveries in the field of RNA silencing found application in developing of different methods for agricultural plant breeding.