Regulacija metilacije DNA biljaka malim molekulama RNA

Šafran, Josip

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:663131

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO- MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

REGULACIJA METILACIJE DNA BILJAKA MALIM MOLEKULAMA RNA

Regulation of Plants' DNA Methylation by Small RNA Molecules

SEMINARSKI RAD

Josip Šafran
Preddiplomski studij biologije
Undergraduate Study in Biology
Mentor: izv. prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

ZAGREB, 2015.

Sadržaj

1. Uvod 1
2. Molekule mikroRNA 2
   2.1. Biosinteza mikroRNA 2
   2.2. Kompleks RISC 4
   2.3. Uloge miRNA u razvoju 5
3. Interferirajuća RNA 7
   3.1. Evolucija RNA posredovane DNA metilacije (RdDM) 7
4. Biosinteza heterokromatin interferirajuće RNA (hc-siRNA) 8
   4.1. Metilacija DNA 10
   4.2. Metilacija histona 12
   4.3. Veza između metilacije DNA i histona 13
5. Uloga hc-siRNA u stanici 13
6. Zaključak 15
7. Literatura 16
8. Sažetak 18
9. Summary 18

1. Uvod

Male molekule RNA (sRNA, od engl. small RNA) imaju važne regulatorne uloge u eukariota. Istraživanja u posljednjih nekoliko desetljeća otkrila su njihovo genomsko podrijetlo, biokemijski put te staničnu funkciju. Jedan od modelnih organizama koji nam pomaže u razjašnjavanju funkcije molekula sRNA je vrsta *Arabidopsis thaliana*. Male eukariotske molekule RNA između 21-24 nukleotida (Cuperus i sur., 2011), sudjeluju u različitim biološkim procesima poput razvojnog i prostornog strukturiranja, formacije heterokromatina, preuređenju genoma te protuvirusnoj obrani. Sve male molekule RNA mogu se podijeliti na temelju duljine i specifičnih biokemijskih putova u tri velika razreda: mikro-RNA (miRNA), interferirajuće RNA (short interfering-siRNA) te piRNA (piwi-interacting RNA, Cartew i Sautheimer, 2009). Sva tri razreda nastaju iz dužih prekursora koji su kodirani genomom ili se stvaraju prilikom virusne replikacije. Dok molekule piRNA vjerojatno nastaju iz jednolančanih prekursora i neovisno o enzimu Dicer te su dosada pronađene samo u životinjskim stanicama, molekule miRNA i siRNA nastaju posredstvom enzima Dicer bilo iz dvolančane RNA u slučaju siRNA, ili jednolančanog RNA pekursora koji poprima dvolančanu formu ukosnice (hairpin). Ovakve dvolančane forme RNA nastaju aktivnošću RNA polimeraze II u slučaju miRNA, te polimeraza IV i V u slučaju siRNA. Daljnja biosinteza molekula siRNA koristi neke osnovne proteine RNA interferencije (RNAi) kao što su Dicer (DCR) i Argonaut (AGO; Matzke i Mosher, 2014) dok je daljnje procesuiranje molekule miRNA ovisno o nekoliko Dicer proteina. Dicer je RNAaza III endonukleaza koja iz dvolančanih RNA prekursora oslobađa manje dvolančane molekule RNA sa po 2-3 nukleotida koji vise sa svakog fragmenta. Dvolančane molekule RNA se zatim odmotavaju te nastaju jednolančane molekule miRNA odnosno siRNA. Proteini porodice Argonaut odgovorni su za funkcionalnu različitost molekula sRNA, no unatoč navedenim razlikama, sva tri tipa sRNA dijele slične molekularne funkcije od utišavanja translacije zbog cijepanja komplementarnih molekula RNA do utjecaja na modifikacije kromatina.

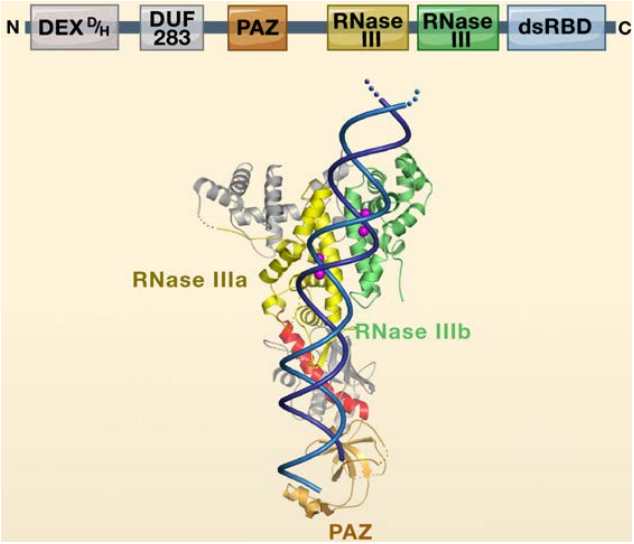
2. Molekule mikroRNA

Iako se za sRNA molekule zna od 1990, tek se u posljednjem desetljeću shvatila njihova prava uloga. Prva istraživanja koja su se provodila dokazala su da su molekule sRNA duge otprilike 25 parova baza (pb), te da su odgovorne za post-transkripcijsko utišavanje gena kod biljaka (Hamilton i Baulcombe, 1999). Ovo i druga istraživanja na drugim eukariotskim modelima su dokazala da je utišavanje gena pomoću RNA evolucijski konzerviran proces. Sama ideja da je molekula sRNA uključena u endogeni regulatorni mehanizam u eukariotskim stanicama pokrenula je potragu za novim specifičnim malim RNA. Do sada su otkriveni brojni specifični razredi endogenih RNA koje provode važne regulatorne funkcije u eukariotskoj stanici (Zamore i Haley, 2005). Pomoću molekularnog kloniranja otkrivene su mnogobrojne male molekule RNA u *A.thaliana* (L.) Heynh. Uz vrlo raširenu grupu malih molekula podvrste interferirajućih malih molekula RNA - siRNA, u vrste *A. thaliana* otkriveno je preko 200 miRNA lokusa, te mnogi od njih eksprimiraju specifične miRNA, koje se mogu podijeliti u 20 porodica (Kozomara i Griffiths-Jones, 2011, u Xiu i sur., 2012), a većinom su duge 21 pb, no mogu imati od 20-23 pb. Biljke u prosjeku imaju 120 gena koji kodiraju miRNA dok se taj broj kod ljudi penje i na 500, ovisno o tipu stanice i stadiju razvoja. U jednoj stanici možemo naći nekoliko desetaka tisuća kopija miRNA te ona imaju veoma bitnu regulatornu ulogu (Lim i sur., 2003, u Farazi i sur., 2008).

2.1. Biosinteza mikroRNA

Dosad je u intergenskim područjima genoma biljkama pronađeno više od 100 gena koji kodiraju molekule miRNA (Reinhart i sur., 2002, u Kestrel i Chen, 2013). Prije same transkripcije gena za miRNA postoje nekoliko različitih koaktivatora transkripcije u eukariota koji se aktiviraju u specifičnim uvjetima. Neki geni za molekule miRNA reguliraju se pomoću specifičnih mehanizama, kod nekih je potreban transkripcijski faktor FUSCA3 (Wang i Perry, 2013, u Kestrel i Chen, 2013), dok je kod nekih dokazano da stres djeluje na promjene njihove transkripcije (Liang i sur., 2012, u Kestrel i Chen, 2013). Geni miRNA se transkribiraju pomoću RNA polimeraze II (Pol II) te se nastala pri-miRNA stabilizira dodatkom 7- metilgvanozinske kape na 5' kraj i poliadenozinskoga repa koji se dodaje na 3' kraj molekule. Kod biljaka se pri-miRNA petlja dalje procesuira u kratke dvolančane molekule RNA koje se sastoje od zrele RNA i pratećeg RNA* lanca koji ima privjesak od 2

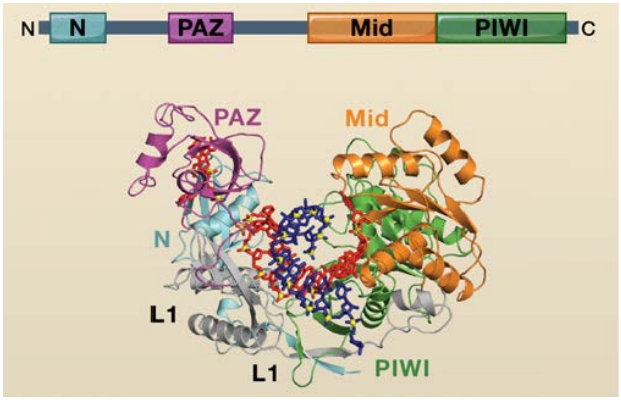
nukleotida na 3' kraju. U tom procesu posreduju četiri DCL (engl. dicer-like) RNase III endonukleaze (Margis i sur., 2006, u Kestrel i Chen, 2013). Enzim Dicer RNazu III karakterizira nekoliko domena koje se pojavljuju u specifičnom redoslijedu. Počevši od amino kraja prva je DEXD/H ATPazna domena, druga je domena DUF283 (domain of unknown function 283), zatim slijedi domena PAZ nakon koje dolaze dvije RNaza III domene (sl. 1) te je na kraju domena koja veže dvolančanu RNA (Tomari i Zamore, 2005). Domena PAZ koja je identična onoj u proteinima AGO veže dvolančanu RNA koja ima 2-nt privjeska na 3' kraju (Macrae i sur., 2009, u Carthew i sur., 2009). Svaka RNAzna domena cijepa jedan lanac RNA te je dužina biljne miRNA povezana sa specifičnim DCL proteinom. Molekule miRNA duge 21 nukleotid procesuira DCL1 i DCL4, miRNA duge 22 nukleotida procesuira DCL2, te one od 24 nukleotida procesuira DCL3 (Xie i sur., 2004). Intramolekularni razmak aktivnog mjesta RNaze III i mjesta vezanja 3' privjeska PAZ domene određuju dužinu dvolančane RNA (Macrae i sur., 2006, u Kestrel i Chen, 2013). Različitosti u dužini miRNA čine ih funkcionalno specifičnima tako da neke molekule miRNA duge 22 nukleotida imaju mogućnost izazvati stvaranja sekundarne siRNA sa ciljane mRNA. Otkriveno je dosad osam miRNA molekula dužine 22 nukleotida koje preko RDR (RNA-dependent RNA polymerase) i DCL pretvaraju mRNA u sekundarne siRNA. RDR je stanični enzim koji kopira jednolančane RNA u dvolančane RNA koje zatim DCL enzim obrađuje u siRNA. Sama dužina miRNA smatra se ključnom u stvaranju sekundarne siRNA (Chen i sur., 2010). Tri proteina su potrebna za pri-miRNA obradu i akumulaciju, TOUGH (TGH), SERRATE (SE) i HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1). Sva tri proteina vežu RNA na specifičnim regijama pri-miRNA. Proteini HYL1 i SE koriste za promicanje točnosti procesuiranja pri-miRNA pomoću DCL1 (Kurihara i sur., 2004, u Kestrel i Chen, 2013), dok TGH poboljšava aktivnost procesuiranja (Ren i sur., 2012, u Kestrel i Chen, 2013). HYL1 je fosfo-protein te zahtijeva da tijekom pri-miRNA procesuiranja bude u hipofosforiliranom stanju, a za to je zadužen protein fosfataza CPL1 (C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE1; Manavell i sur.,2012, u Kestrel i Chen, 2013). Protein koji je također bitan u fosforilaciji proteina DCL1 je DAWDLE (DDL) (Yu i sur., 2008, u Kestrel i Chen, 2013). Svi dosad navedeni procesi odvijaju se u jezgri stanice te je za prijenos pri-miRNA u citoplazmu potreban proteina HASTY (HST) koji također ima ulogu stabilizaciji miRNA (Zeng i Cullen, 2004, u Kestrel i Chen, 2013).



Slika 1. Domene i tercijarna struktura proteina Dicer, preuzeto iz Carthew i sur., 2009. Dicer proteini cijepaju dsRNA prekursore zahvaljujući dvije RNaza III domene. Postupak se događa istog trena na završetku dsRNA koja je povezana s PAZ domenom. Supstrat se zatim pozicionira u aktivno mjesto RNA-aznih domena koje cijepaju 20-30 nukleotida duge miRNA/siRNA. Na slici je ljubičasto prikazan metalni ion u aktivnom mjestu RNAznih domena, te crveno prikazana α-uzvojnica odgovorna za specifičnu dužinu nastale RNA

2.2. Kompleks RISC

Kod stvaranja induciranog kompleksa RNA utišavanja RISC (RNA-induced silencing complex) ključnu ulogu imaju proteini AGO. Cijela porodica proteina AGO može se podijeliti u filogenetske grupe: Piwi koji veže piRNA, Ago povezan sa miRNA i siRNA i treći dosad nađen samo kod oblića (Yigit i sur., 2006, u Carthew i sur.,2009). Sama struktura proteina (sl. 2.), se može podijeliti na dva režnja: jedan se sastoji od PAZ domene, a drugi od PIWI domene dok se između njih nalaze N-terminalna (N) i srednja (Mid) domena (Carthew i sur., 2009). Kod biljke *A.thaliana* (L.) Heynh nalazimo 10 različitih proteina AGO. Protein AGO1 veže većinu molekula miRNA, ta-siRNA i transgenu siRNA (Vaucheret i sur.,2004, u Chen, 2009). Proteini AGO1 i AGO10 su uključeni u translacijsku represiju ciljne mRNA posredovanu molekulama miRNA (Brodersen i sur., 2008, u Chen, 2009). Proteini AGO4 i AGO6 su povezani preko endogene siRNA i sudjeluju u utišavanju transpozona i introna (Zheng i sur., 2007, u Chen, 2009). Protein AGO7 je jedinstven po tome što se prvenstveno veže sa jednom miRNA, miR390, te služi kao okidač za proizvodnju ta-siRNA (Montgomery i sur., 2008, u Chen, 2009). Povezivanju dvolančane miRNA sa AGO1 proteinom pomažu dva proteina, HSP90 (heat shock protein 90) i SQN (squint), koji također sudjeluju i u uklanjanju pratećega lanca miRNA* (Iki i sur., 2010, u Kestrel i Chen, 2013).



Slika 2. Domene i tercijarna struktura AGO proteina, preuzeto iz Carthew i sur., 2009. Argonaute proteini, efektorske molekule, služe za RNA utišavanje. Slika prikazuje kristalnu strukturu AGO proteina s vezanim DNA lancem za navođenje do ciljanje RNA. 5' – kraj DNA lance veže se na Mid domenu, a 3'- lanac na PAZ domenu. Aktivno mjesto AGO proteina nalazi se u PIWI domeni, ali do cijepanja dolazi samo kod savršenog preklapanja DNA i RNA lanca.

Protein koji sudjeluje u stabilizaciji RNA je metiltransferaza HEN1. Njegova uloga je da stavlja 2'-O-metilnu grupu na 3' kraju dvolančane miRNA. Sama metilacija događa se prije razdvajanje dvolančane RNA (Yu i sur., 2005, u Kestrel i Chen, 2013). Kako samoj biljci nisu stalno potrebne miRNA molekule postoji nekoliko proteina koji sudjeluju u njihovoj razgradnji. Najpoznatija je skupina malih RNA nukleaza (SDN). Nukleaza SDN1 posjeduje 3'-5' egzonukleaznu aktivnost, a ciljne su joj molekule RNA. Sam protein može degradirati metilirane miRNA, ali njegovu funkciju inhibira nukleotidiltransferaza HESO1 koja može degradirati nemetilirane RNA (Ramachandran i Chen, 2008, u Kestrel i Chen ,2013). Možemo pretpostaviti da ova dva proteina kooperiraju, te su potrebna i usklađena pri pravilnoj degradaciji miRNA molekula.

2.3. Uloge miRNA u razvoju

Tijekom razvoja biljaka presudnu regulatornu ulogu imaju molekule miRNA (Xie i sur., 2010, u de Lima i sur., 2012). Jedna od najvažnijih miRNA je miR168 koja kontrolira protein AGO1, te preko njega i sve ostale miRNA molekule (Vaucheret i sur., 2004, u Chen, 2009). Dobar primjer regulacije također je miR164 koja je odgovorna za kontrolu tri gena. Geni koji kodiraju transkripcijske faktore (TF), NAM-NAC (No Apical Meristem) i CUC (Cup- Shaped Cotyledon) koji su bitni u razvoju korijena i embrija (Raman i sur., 2008, u de Lima i sur., 2012). Za pravilno razvijanje korijenja potrebna je prisutnost miRNA165a i miRNA166b koje negativno kontroliraju TF HD-ZipIII (Carlsbecker i sur., 2010, u de Lima i sur., 2012). Poznato je da biljke kod kojih dolazi do prekomjerne ekspresije miR156, regulira SPL

(SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like), ostaju polupatuljastoga oblika, promijenjenog broja listova te imaju dulju vegetativnu fazu (Xie i sur., 2006, u de Lima i sur., 2012). Nešto drugačiju ulogu ima miR172 koja je važan regulator gena cvjetnog strukturiranja kao što su APETALA2, TOE1 i TOE2 (Aukerman i Sakai, 2003, u Chen, 2009). Kod nekih mutanata kukuruza koje prekomjerno eksprimiraju miR156 dolazi do redukcije miR172 što sugerira da bi one djelovale zajedno u vegetativnom i cvjetnom prijelazu (Chuck i sur., 2007, u Chen, 2009). U uročnjaka *A. thaliana* miR159 djeluje na MYB33, MYB65 i MYB101, gene koji su povezani s GAMYB koji kontroliraju klijanje sjemena i formiranje prašnika (Reyes i Chua, 2007, u de Lima i sur., 2012). Prekomjerna ekspresija miR159 dovodi do smanjenja sadržaja mRNA MYB33 i MYB65, što za posljedicu ima mušku sterilnost i odgođeno cvjetanje kod kratkih dana (Achard i sur., 2004, u Chen, 2009). Biljke koje tijekom klijanja ne eksprimiraju ili previše eksprimiraju miR159 postaju premalo osjetljive na apscizinsku kiselinu (Reyes i Chua, 2007, u Chen, 2009). Nekoliko gena koji sudjeluju u signalnom putu auksina pod kontrolom su miR160 i miR167. Regulacija ARF10, ARF16 i ARF17 (ARF-auxin response factors), važnih u mnogim aspektima razvoja mladice i korijena, pod kontrolom su miR160 (Mallory i sur., 2005, u de Lima i sur., 2012). Molekula miR167 djeluje na proteine ARF6 i ARF8 koji pridonose razvoju gineceja i andreceja (Wu i sur., 2006, u Chen 2009). Molekula miR164 regulira gen NAC1 koji posreduje u pojavi auksinske signalizacije u bočnom korijenju (Guo i sur., 2005, u Chen, 2009), dok miR393 cilja TIR1 (Toll-Interleukin 1 Receptor) koji kodira auksinski receptor te povezane F-box gene (Jones-Rhoades i Bartel, 2004, u Chen, 2009). Prvi korak u biosintezi hormona jasmonske kiselina regulirana je preko lipoksigenaze2 (LOX2). Ekspresija *LOX2* pod kontrolom je transkripcijskog faktora TCP4 (DNA-binding transcription factor) koji je reguliran molekulom miR913 (Schommer i sur., 2008, u Chen, 2009). Skupinu gena SCR (scarecrow) cilja miRo396c te ima glavnu ulogu u pravilnom razvoju pomoćnog meristrema tijekom grananje (Wang i sur., 2010, u de Lima i sur., 2012). Pojava puči kod biljaka, koje imaju ključnu ulogu u transpiraciji, djelomično ovisi o miR824 koja cilja AGL16 (Agamous-like MADS-box protein; Kutter i sur., 2007., u de Lima i sur., 2012). miR319 je prvi put otkrivena u mutantama gdje je virusni pojačivač doveo do prekomjerne ekspresije što je dovelo do zgužvanih listova, poznato je međutim da miR3119 cilja pet TCP gena koji kontroliraju dijeljenje stanica tijekom formiranja lista (Palatnik i sur., 2003, u Chen, 2009).

3. Interferirajuća RNA

Sekvencirajući genom biljke *A.thaliana* otkrivene su male molekule RNA koje nastaju iz različitih mehanizama od onih koji su poznati kod miRNA, te imaju važnu ulogu u ekspresiji gena, to su male interferirajuće RNA (siRNA). One većinom nastaju iz dugačke dvolančane RNA (dsRNA) koja nastaje komplementarnom transkripcijom ili aktivnošću RNA ovisne RNA polimeraze (RDRPs; Pandey i sur.,2012). Veliki broj siRNA nastaje iz samo jedne prekursorske molekule siRNAt, ali većinom njihov broj nadmašuje miRNA. Iako se siRNA molekule nalaze u velikom broju one su rijetko očuvane u srodnim vrstama. Molekule siRNA djeluju na transkripcijsko utišavanje na razini modifikacije kromatina i na posttranskripcijsko utišavanje gena degradacijom ciljanih transkripta. Na temelju biosintetskih puteva siRNA se mogu podijeliti u nekoliko razreda: hc-siRNA (heterochromatin associated siRNA), ta-siRNA (trans-acting siRNAs), ra-siRNA (repeat-associated siRNAs), lsiRNA (long siRNAs) i nat-siRNAs (natural antisense transcript siRNA; Pandey i sur.,2012). Biosinteza siRNA koristi neke od najosnovnijih proteina RNA interferencije, DCL koji procesira dvolanačane RNA u siRNA i protein AGO koji ima bitnu efektorsku funkciju uključujući i sekvencijski-specifične modifikacije kromatina (Castel i sur., 2013, u Matzke i Mosher, 2014).

3.1. Evolucija RNA posredovane DNA metilacije (RdDM)

RNA polimeraza IV i V su polimerazne specifične za biljnu stanicu te imaju bitnu ulogu u RdDM i transkripcijskom utišavanju gena. Pol IV i Pol V su dva holoenzima građena od minimalno dvanaest podjedinica koje su poznate kao NRPD (nuclear RNA polymerase D) za Pol IV i NRPE za Pol V. Pol IV i Pol V dijele mnoge podjedinice sa Pol II, koje zajednički nazivamo NRPB, dok su novonastale podjedinice Pol IV i Pol V nastale duplikacijom Pol II podjedinica (Tucker i sur., 2010, u Matzke i Mosher, 2014). Prvi dokaz specijaliziranih podjedinica nalazimo kod algi roda Charales, filogenetski najbliže kopnenim biljkama, koje posjeduju gen za NRPD1. Druge katalitički važne podjedinice Pol IV i Pol V, NRPD2/NRPE2, alge ne posjeduju ali ih nalazimo kod svih kopnenih ne cvjetajućih biljaka uključujući jetrenjarke, mahovine, lignofita, paprati i golosjemečanje (Luo i Hall, 2007, u Matzke i Mosher, 2014). Slično tome NRPD7 i NPRE7 su zasad nađene samo kod mahovina ali se pretpostavlja se da ih posjeduju sve kopnene biljke. Druge specijalizirane podjedinice kao što su NRPE1, NRPD4/NRPE4 i NRPE5 su zasad nađene samo kod jednosupnica i dvosupnica (Tucker i sur., 2010, u Matzke i Mosher, 2014). Ovakva postepena evolucija

pretpostavlja da su jedinstvena svojstva Pol IV i Pol V nastajala postupno tijekom biljne evolucije. Interferirajuća RNA građena od 24 nukleotida pojavljuje se u velikom broju kod jednosupnica i dvosupnica, dok se kod filogenetski starijih kritosjemenjača, golosjemenjača i paprati pojavljuje u manjoj mjeri. Četinjače su izgubile RdDM zbog očitog nepostojanja 24-nt siRNA (Dolgosheina i sur., 2008, u Matzke i Mosher, 2014). Nedavno su ipak pronađene u cvjetovima *Picea abies* L. i somatskim embrijima *Larix leptolepis* (Lamb.) Carr., te se iz toga da zaključit da je kod četinjača RdDM ograničen na reproduktivna tkiva. Njihova 24-nukleotidna siRNA je kompleksna te se povezuje sa transpozonima ukazujući da je povezana sa Pol IV u procesu RdDMa i transkripcijskim utišavanjem gena. Genetskim analizama provedenim na *Chlamydomonas reinhardtii, Selaginella moellendorffii* i *Physcomitrella patens* nisu nađene siRNA, iako neka istraživanja ukazuju na nisku razinu transkripcije 22-24 nukleotida dugih siRNA u vrste *P. patens*. U vrste *P. patens* protein DCL3 je potreban za akumulaciju ovih siRNA te za utišavanje dva LTR (long terminal repeat) retrotranspozona (Cho i sur., 2008, u Matzke i Mosher, 2014). Ova opažanja pokazuju da su RdDM i transkripcijsko utišavanje gena konzervirani procesi kod kopnenih biljaka, iako aktivnost Pol IV varira u intenzitetu i ulozi u razvoju.

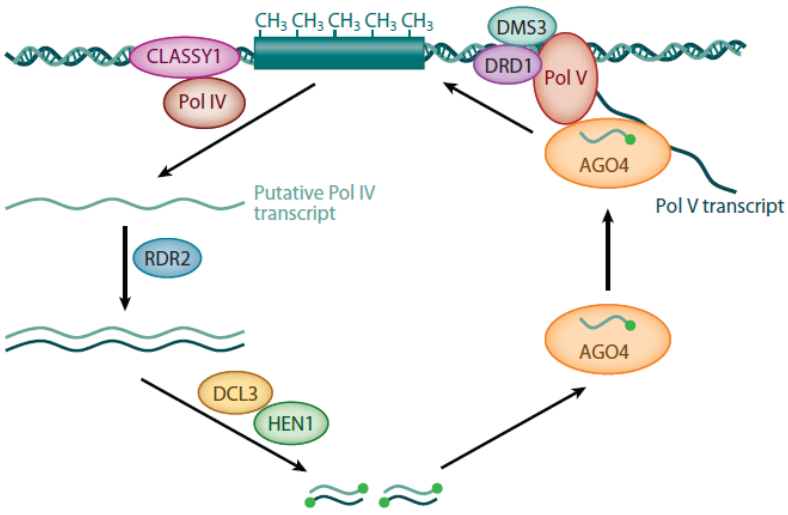
4. Biosinteza heterokromatin interferirajuće RNA (hc-siRNA)

Tijekom 2002. i 2003. godine otkriveno je da siRNA molekule mogu nastati iz ponavljajućih sekvenci sa područja centromera, transpozona, ali i drugih područja DNA (Lippman i Martienssen, 2004. u Carthew, 2009). Ubrzo nakon toga otkrivene su i ta-siRNA koje se izrezuju sa specifičnih gena te reguliraju diskretne setove ciljanih gena (Vazquez i sur., 2004, u Carthew, 2009). Genetskom analizom uročnjaka *A. thaliana* otkriveno je da ključnu ulogu u biosintezi 24-nukleotidnih siRNA imaju proteini DCL3 i RDR2 (Xie i sur., 2004). Važnu ulogu uz postojeća dva proteina ima i AGO4, protein za koje se vjeruje da ima ulogu u epigenetskom utišavanju lokusa SUP (Zilberman i sur., 2003, u Xie i sur., 2012). Proteini DCL3, RDR2 i AGO4 su potrebni za gomilanje 24-nukleotidnih siRNA koje su porijeklom sa transpozona i ponavljajućih sekvenci. Gubitak funkcije bilo koja od ta tri proteina dovodi do prestanka nakupljanja 24-nukleotidnih siRNA i smanjenja epigenetskih karakteristika heterokromatina kao što je metilacija citozina na DNA i dimetilacije lizina 9 na histonu H3, H3K9, (Xie i sur., 2004). Iz tih razloga gledamo na 24-nt siRNA kao na heterokromatin inerferirajuću RNA (hc-siRNA). Ostali proteini koji sudjeluju u biosintezi hc-siRNA su pronađeni genetičkim metodama. Uz tri nuklearne RNA polimeraze (Pol I, Pol II, Pol III) koje

nalazimo kod svih eukariota, biljke posjeduju još i Pol IV i Pol V koje specifično sudjeluju u putu utišavanje kromatina (Xie i sur., 2012). Iako se sastoji od dvanaest, najvažnija podjedinica Pol IV je NRPD1, a kod Pol V su važne dvije podjedinice NRPE1 i NRPD2, te one imaju bitnu ulogu u putu utišavanja kromatina. Dokazano je da se proteini AGO4 i NRPE1 ne nalaze u cijeloj stanici nego samo u AB (AGO4/NRPD1b) i Cajalskom nuklearnom tjelešcu (Li i sur.,2006, u Xie i sur., 2012).

Enzim Pol IV (sl.3) transkribira jednolančanu RNA na koju djeluje protein RDR2 te ih on procesuira u dvolančane RNA uz pomoć proteina CLASSY1 (CLSY1) koji preinačava kromatin. Nedavno je dokazano da vezanju Pol IV na DNA pomažu dva proteina, SHH1 (Sawadee Homeodoain Homologue 1) i DTF1 (DNA-binding transcription factor 1); (Law i sur.,2013, Zhang i sur., 2013, u Hu i sur., 2013). Nakon njega protein DCL3 pretvara dvolančane RNA u 24-nukleotidne siRNA koje zatim pojačivač Hua (HEN1) metilira na 3' kraju (Matzke i Mosher, 2014). Smatra se da je Pol IV odgovorna za većinu 24-nukleotidnih siRNA u *A.thaliana* dok je Pol V potrebna za *de novo* metilaciju te da pojača biosintezu hc-siRNA (Matzke i Mosher, 2014). Kod usmjeravanja hc-siRNA-AGO4 kompleksa tijekom metilacije DNA posredovane RNA molekulama, RdDM, (RNA-directed DNA methylation) Pol V može djelovat na dva različita načina. Prvo, preko terminalne karboksilne domene NRPE1 koja sadrži ponavljajuće WG/GW motive za koje je dokazano da sudjeluju u izravnoj protein-protein interakciju sa AGO4 (Li i sur., 2005, u Xie i sur., 2012). Drugo, tijekom transkripcije Pol V stvara intergenske nekodirajuće transkripte (IGN) kod specifičnih RdDM lokusa koji pomažu u navođenju AGO4 proteina na ciljane lokuse. (Wierzbicki i sur., 2008, u Xie i sur., 2012). Transkripcija enzimom Pol V može biti omogućena proteinom DRD1 (DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1) koji je zadužen za odmotavanje DNA dupleksa, dok RDM1 (RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1), DMS3 (DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3) i MORCH6 (MICRORCHIDIA 6) pomažu stabilizirati odmotanu DNA. Također Pol V pomažu proteini SUVH2 i SUVH9 vežući se na već metiliranu DNA pomoću SRA domena (Matzke i Mosher, 2014). Pol V transkribira potpornu RNA koja se spaja sa siRNA vezanom unutar proteina AGO4. Predloženo je nekoliko različitih modela povezivanja siRNA sa potpornom RNA. Prema prvom, nedavno identificirana komponenta RdDM, IDN2 ima mogućnost vezanja dsDNA sa 5' privjeskom, te sudjeluje u stabilizaciji interakcija između AGO4 vezane siRNA i potporne RNA (Zhang i sur., 2012, u Xu i sur., 2013). Druga mogućnost je da potporna RNA stabilizira siRNA-DNA interakcije vežući se direktno na AGO4. Treća mogućnost je da će potporna

RNA povećati učinkovitost interakcije AGO4 sa ciljanim nizom djelujući na strukturne karakteristike heterokromatina (Wierzbicki i sur., 2008, u Xu i sur., 2013.) Protein AGO4 je vezan za karboksilnu domenu najveće podjedinice Pol V preko KTF1 (KOW DOMAIN-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR 1). RDM1 povezuje AGO4 protein sa DRM2 koji katalizira *de novo* metilaciju DNA (Matzke i Mosher., 2014). Uklanjanje represivnih histonskih modifikacija, poput H3K9 pomoću SUVH4, SUVH5 i SUVH6, olakšano je uklanjanjem aktivnih markera pomoću HDA6 (HISTONE DEACETYLASE 6), JMJ14 (JUMONJI 14) i UBP26 (UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 26).



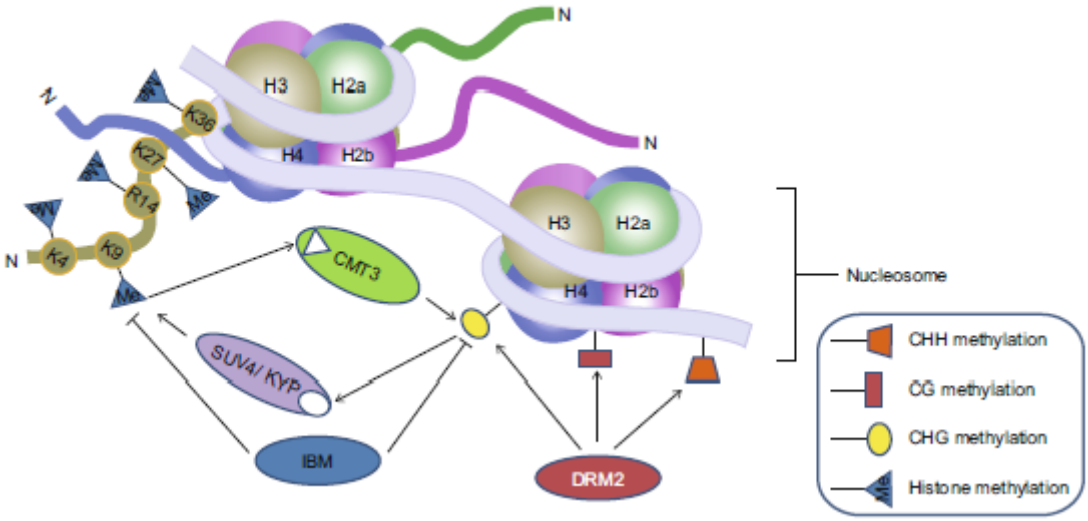
Slika 3. Biosinteza i funkcija heterokromatske interferirajuće RNA, preuzeto iz Chen X., 2009. Pol IV transkribira jednolančane nekodirajuće sljedove koje RDR2 kopira u dsRNA. DCL3 procesuria dsRNA u 24-nt siRNA koje HEN 1 metilira. Zatim siRNA ulazi u AGO4 protein tvoreći RISC kompleks. Pol V pomaže preko interakcije sa AGO4 dovođenju siRNA na izvorišni lokus. Transkripcijskim aktivnostima Pol IV i Pol V pomažu CLASSY1, RDR, DCL3, DRD1 i DMS3

4.1. Metilacija DNA

Genomska DNA je gusto pakirana histonskim oktamerima u kromatin, čija se najmanja jedinica naziva nukleosom. Nukleosom se sastoji od dvije kopije histonskih proteina H2A, H2B, H3 i H4 koji su povezani sa 146 parova baza dugom dvostrukom DNA. Kovalentne modifikacije kromatina kao što su metilacija citozina te postranskripcijska modifikacija histona imaju ključnu ulogu u određivanju strukture kromatina, održanju njegove stabilnosti i kontroli ekspresije gena. Nedavnim istraživanjima otkriveno je da siRNA, transkribirana sa transpozona, može posredovati u metilaciji DNA te dimetilaciji lizina 9 na histonu H3 i na taj

način ne samo potisnuti transpozone nego i gene koji su locirani pored njih (Liu i sur., 2010, u Xu i sur., 2013)

Metilacija je važna modifikacija DNA, a vrši je enzima DNA-metiltransferaza. Sam proces podrazumijeva dodatak metilne skupine na 5C atom ugljika u pirimidinskom prstenu citozina. U animalnim stanica za pravilnu metilaciju iza citozina uvijek mora doći gvanin (CG), dok su kod biljaka moguće i druge kombinacije. Osim kombinacije CG, između citozina i gvanina može doći adenin, citozin ili timin (CAG, CCG, CTG), te treća kada poslije citozina na sljedeća dva mjesta može doći adenin, citozin ili timin u bilo kojem odnosu (CAA, CAC, CAT, CCA, CCC, CCT, CTA, CTC, CTT). Kod biljke *A. thaliana* otkriveno je da je 24 % CG , 6.7% CHG i 1.7% CHH lokusa metilirano (H = adenin, citozin, timin; Cokus i sur., 2008, u Xu i sur., 2013). Većina metilacije DNA događa se u kodirajućim područjima i transpozonima bogatim heterokromatskim regijama (Lippman i sur., 2004, u Xu i sur., 2013). Održavanje DNA metilacije primarno ovisi o tri metiltransferaze (sl.4): DRM2 (DOMAIN REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2) katalizira *de novo* DNA metilaciju (Zhang i sur.,2006, u Xi i sur., 2013), MET1 (METHLYTRANSFERASE 1) odgovoran je za održavanje CG metilacije nakon replikacije DNA (Saze i sur., 2003, u Xu i sur., 2013), CMT3 (CHROMOMETHYLASE3) metiltransferaza specifična za biljke služi za održavanje metilacije u CHG slučaju (Cao i Jacobsen, 2002, u Xu i sur., 2013).



Slika 4. Shematski prikazana struktura i modifikacija kromatina, preuzeto iz Xu i sur., 2013. Struktura nukleosoma sastoji se od dvije kopije četiri histonska proteina i dvostruke DNA. Histon ima globularnu domenu i N-terminalni rep koji se postranslacijski modificira metilacijom lizina, dok H3K9me2 provodi porodica SUVH enzima. DRM2 sudjeluje u *de novo* metiliciji na svim CG,CHG i CHH mjestima. DNA metilaciju i H3K9me2 povezuje aktivan i pasivan sustav. Kod aktivnog sustava SRA domena SUV4/KYP veže se na metilirane CHG regije, dok SET domena metilira susjedne histone., dok CMT3, nosi kromodomenu, može se vezati na

H3K9me2 te metilirati susjedna CHG mjesta. IBM1, histonska demetilaza sudjeluje u pasivnom sustavu, sprječava povezivanje metiliranih histona i DNA.

DNA metilacija je reverzibilan proces, jer porodica 5-metilcitozin DNA glikozilaza katalizira aktivnu DNA demetilaciju u biljaka (Barreto i sur., 2007, u Xu i sur., 2013), te je nedavno otkriveno da IDM1, histonska acetiltransferaza, regulira DNA demetilaciju vežući metiliranu DNA te stvarajući pogodan okoliš za funkciju 5-metilcitozin DNA glikozilazu (Qian i sur., 2012, u Xu i sur., 2013).

4.2. Metilacija histona

Nukleosom se sastoji od dimera četiri histonska proteina koji imaju dobro strukturirane globularne domene koje su u bliskoj interakciji sa DNA i ne tako dobro strukturirani amino terminalni rep. N-terminalni rep strši van nukleosoma te je osjetljiv na različite kovalentne modifikacije, uključujući metilaciju, acetilaciju i fosforilaciju (Bernstain i sur., 2007, u Xu i sur., 2013). Bitno je spomenuti da je metilacija moguća i na drugim dijelovima histona. Metilacija histona može se dogoditi na različitim aminokiselinskim ostacima (lizin i arginin), na različitim mjestima i pod različitim stupnjevima. Broj metilnih skupina može na jednom aminokiselinskom ostatku također varirati. Kod *A.thaliana* matilacija lizina događa se na Lys4 (K4), Lys9 (K9), Lys27 (K27), i Lys36 (K36) H3 histona (Grossniklaus i sur., 1998, u Xu i sur., 2013). Metilacija histona može se povezati sa ekspresijom ili represijom gena, npr. H3 metilacija na mjestu K4 i K39 povezuje se sa aktivnom transkripcijom gena, dok se H3 metilacija mjesta K9 i K27 povezuje sa konstitutivno kondenziranim kromatinom i genima koji nisu aktivni u razvoju (Berger, 2007, u Xu i sur., 2013). Mehanizmi koje kontroliraju različite oblike metilacije se razlikuju, H3K27 metilaciju uzrokuju PcG (Polycomb group) proteini (Turck i sur., 2007, u Xu i sur., 2013), dok metilaciju H3K9 inducira hc-siRNA. Metilaciju lizina na H3 histonu kataliziraju različita histonske metiltransferaze sa očuvanom SET domenom (Liu i sur., 2010, u Xu i sur., 2013). U vrste *A. thaliana* otkrivene su 3 metiltransferaze, SUV4, SUV5 i SUV6, sa očuvanom SET domenom odgovornom za dimetilaciju H3K9 (Jackson i sur., 2002, u Xu i sur., 2013). DNA metilacija kao i histonske modifikacije nisu trajne te je dosad otkriven velik broj enzima sa mogućnošću demetilacije metiliranih histona preko aminoosidacije, hidroksilacije ili deaminacije (Li i sur., 2010, u Xu i sur.,2013)

4.3. Veza između metilacije DNA i histona

Istraživanje genoma vrste *A.thaliana* potvrdilo je vezu između H3K9 i CHG metilacije. Moguće objašnjenje te veze leži u kombiniranoj reakciji vezivanja CMT3-KYP na ciljane regije i proteina IBM1 (INCREASE IN BONSAI METHYLATION1) koji sprječava vezanje na H3K9 (Miura i sur., 2009, u Xu i sur., 2013). Veza između histona H3K9 i DNA metilacije događa se zbog mogućnosti proteina da prepoznaju metilirani citozin i lizin. Protein KYP je jedan od tih proteina koji sa svojom SRA domenom prepoznaje metilirani citozin kod dvolačanih oligonukletida, te ima mogućnost direktnog čitanja metilirane DNA (Johnson i sur., 2007, u Xu i sur., 2013). Nadalje, CMT3 koji nosi kromodomenu može direktno prepoznati i vezati K9 na repu histona H3 (Lindroth i sur., 2004, u Xu i sur., 2013). Međuovisno djelovanje CMT3 i KYP veže regulaciju metilacije DNA i dimetilaciju histona H3K9 u pozitivnu povratnu spregu (Lindroth i sur., 2004, u Xu i sur., 2013). Drugi potencijalni mehanizam uključuje uklanjanje dimetilacije H3K9 pomoću proteina IBM1 (Saze i sur., 2008, u Xu i sur., 2013). Protein IBM1 katalizira uklanjanje metilacije i dimetilacije sa H3K9 u vrste *A.thaliana.* Gubitak funkcije proteina IBM1 dovodi do nekontrolirane metilacije lokusa BONSAI, što utječe da CMT3 i KYP hipermetiliraju citozina van CG lokusa (Miura i sur., 2009, u Xu i sur., 2013). Protein IBM1 također sudjeluje u siRNA ovisnoj regulaciji ekspresije gena (Fan i sur., 2012, u Xu i sur., 2013).

5. Uloga hc-siRNA u stanici

Heterokromatinska interferirajuća RNA ima ključnu ulogu u biljnom razvoju i fiziologiji. Jedna od najčešćih uloga je u očuvanju genetske stabilnosti i kontrola transpozona (Mosher i sur., 2010, u Matzke i Mosher, 2014). Molekula hc-siRNA od 24 nukleotida koju stvara DCL3 stvara kompleks s proteinom AGO4 koji pomaže povezivanju DNA i H3K9 metiltransferaze na ciljane lokuse. Gubitak funkcije AGO4 dovodi do prestanka metilacije (Qi i sur., 2006, u Xu i sur., 2013). Proteini RdDMa u vrste *A.thaliane* započinju metilaciju kada se transpozon kopira u najmanje četiri genomska lokusa. Transpozon povećavajući broj svojih kopija povećava i odgovor RdDMa. Umjesto da samo bude uključen u stvaranje konstitutivnog heterokromatina, RdDM može stvoriti dinamičnije modifikacije koje su podložne pasivnim i aktivnim demetilacijama (Zheng i sur., 2013, u Matzke i Mosher, 2014). Bitnu ulogu hc-siRNA imaju u ekspresiji velikog broja gena. Za varijacije u vremenu cvatnje

u vrste *A.thaliana* odgovorna je siRNA koja modificira FLC (FLOWERING LOCUS C). siRNA se prepisuje sa transpozona koji se umeće u intronsku regiju gena, te dolazi do njegove metilacije, što ima za posljedicu smanjenu ekspresiju FLC što je posljedica ranijeg cvjetanja (Liu i sur.,2004, u Chen, 2009). Drugi primjer je gen koji kodira za endosperm specifični protein FWA (FLOWERING WAGENINGEN). Do metilacije dolazi kada se transpozon SINE (Short Interspersed Nuclear Elements) umetne u promotor gena FWA te dolazi do transkripcije siRNA. Gubitak metilacije promotora dovodi do ekspresije FWA i kasnog cvjetanja (Chan i sur., 2006, u Chen, 2009). Gen SDC koji kodira za F-box protein, sadrži u svojem promotoru ponavljajuće regije sa kojih dolazi do transkripcije siRNA, što dovodi do metilacije DNA (Henderson i Jacobsen, 2008, u Chen., 2009). Nemetilacija gena SDC dovodi do uvrnuća listova prema dolje, što se razlikuje od divljeg tipa uročnjaka *A. thaliana* sa ravnim listovima.

Dokazano je da hc-siRNA i RdDM igraju važnu ulogu u razvitku embrija tijekom reprodukcije biljaka. Tijekom muške gametogeneze regulacija DDM1 i RdDM korelira sa aktivacijom i mobilizacijom transpozona u vegetativnoj jezgri peludnog zrna (vegetative nucleus – VN). Reaktivacijom transpozona nastala siRNA se akumulira u jezgri polenske mješinice polena, te se pretpostavlja da od tuda migrira u spermalnu stanicu (Slotkin i sur., 2009, u Xie i sur., 2012). Takva mogućnost postoji i u ženskom gametofitu. Do produkcije transpozona i siRNA dolazi u stanicama središnje jezgre koje eksprimiraju povišene koncentracije DNA glikozilaze DME (DEMETER) odgovorne za demetilaciju DNA (Choi i sur., 2002, u Xie i sur., 2012). Takve siRNA bi mogle dovesti do utišavanja transpozona u jajnoj stanici te kasnije i kod embrija. Ova ideja je temeljena na dokazima da je siRNA u biljkama mobilna te da su transpozonske sekvence hipermetilirane u spermalnoj stanici i embriju (Brosnan i sur., 2007, Gehring i sur., 2009, u Xie i sur., 2012). Molekule hc-siRNA porijeklom sa majčinih gena mogu sudjelovati u represiji nekih očinski naslijeđenih alela u ranoj embriogenezi (Autran i sur., 2011, u Xie i sur., 2012). Iz ovoga se može zaključiti da pojava hc-siRNA u pomoćnim stanicama može služiti kao pokretni signal za pravilno reprogramiranje genoma u spermalnoj stanici kao i pripadajućim embrijima.

6. Zaključak

Otkrićem malih molekula RNA otvoreno je novo poglavlje u razumijevanju rada i funkcije biljnih i životinjskih stanica. Novootkrivene sRNA se mogu podijeliti u nekoliko različitih skupina od kojih su najbitnije mikro-RNA (miRNA) i interferirajuća RNA (siRNA). Iako su po mnogočemu slične sRNA se razlikuju po svojoj dužini, mjestu nastanka, biosintezi i funkciji. miRNA koriste nekoliko proteina u biosintezi koji su karakteristični za RNA interferenciju kao što su Dicer (DCL) i Argonout (AGO), dok samo prepisivanje provodi polimeraza II (Pol II). AGO proteini kod miRNA imaju još jednu funkciju, a to je stvaranje RISC kompleksa koji sudjeluje u utišavanju mRNA. Postoji mnogo miRNA molekula koje sudjeluju u svim aspektima biljnog razvoja, od kontrole transpozona, uloge u razvoju cvijeta i biosintezi biljnih hormona, preko uloge u prašniku te do razvitka listova i puči. Druga bitna mala RNA kojom su bogate biljke je interferirajuća RNA. Za njeno prepisivanje odgovorne su Pol IV i Pol V, polimeraze specifične za biljke. Ona najviše doprinosi genetskoj stabilnosti, utišavajući transpozone, i regulaciji genske ekspresije. Proces RdDMa se postupno evolucijski razvijao. Prve naznake nalazimo kod algi, dok je taj proces konzerviran u svim današnjim kopnenim biljkama. Proteini DCL3, RDR2 i AGO4 bitni su u stvaranju i akumulaciji siRNA. Heterokromatinska interferirajuća RNA duga 24 nukleotida ima ključnu ulogu u biljnom razvoju i fiziologiji sudjelovanjem u DNA metilaciji i dimetilaciji histona H3K9. Ona također sudjeluje u pravilnom formiraju cvjetova i listova. Molekule siRNA imaju važnu ulogu tijekom razvoja embrija u vrijeme reprodukcije jer akumulacijom u pomoćnim stanicama te kasnijom migracijom u gamete imaju velik utjecaj na razvitak biljke. Unatoč svim dosad otkrivenim funkcijama hc-siRNA postoje još neka pitanja na koja treba odgovoriti. Na primjer kako dolazi do interakcije između DNA metiltransferaze i H3K9 metiltransferaze sa AGO4/siRNA kompleksom; kako DNA metiltransferaza i histon metiltransferaza prepoznaju i eliminiraju određene sekvence; koji još ključni elementi posreduju u epigenetsko utišavanju posredovanom siRNA molekulama. Dodatna istraživanja su potrebna za bolje razumijevanje utišavanja DNA posredstvom malih molekula RNA.

7. Literatura

Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs, *Cell*, **136**, 642–655

Chen HM, Chen LT, Patelb K, Hang Y, Baulcombe DC et al. (2010) 22-nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants, *Proceedings of the National Academy of science of the United States of America*, **107**, 15269–15274

Chen X (2009) Small RNAs and their roles in plant development, *The Annual Review of Cell and Developmental* **25**, 21-44

Cuperus JT, Fahlgren N, Carringtonb J (2011) Evolution and Functional Diversification of MIRNA Genes, *The Plant Cell*, **23**, 431–442

De Lima JC, Loss-Morais G, Margis R (2012) MicroRNAs play critical roles during plant develpment ans in response to abiotic stresses, *Genetics and Molecular Biology*, **35**, 4 (supp), 1069-1077

Farazi TA, Juranek SA,Tuschl1 T (2008) The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members, *Development* **135**, 1201-1214

Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional genesilencing in plants, *Science*, **286**, 950–952

Kestrel R, Xuemei C (2013) Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs, *The Plant Cell*, **25**, 2383–2399

Matzke MA, Mosher RA (2014) RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of ncreasing complexity, *Nature Reviews Genetics* **15**, 394–408

Pandey R, Bhardwaj AR, Katiyar-Agarwal S (2012) Endogenous Small RNAs and Antibacterial Resistance in Plants. U: Sunkar R, ur. MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, New York, pp 233-259

Tomari Y, Zamore PD (2005) Perspective: machines for RNAi, *Genes & Development*, **19**, 517–529

Xie Z (2012) Small RNAs in Plants. U: Sunkar R, ur. MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, New York, pp. 1-28

Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, et al. (2004) Genetic and Functional Diversification of Small RNA Pathways in Plants. *PLOS Biology,* **2**(5): e104

Xu C, Tian J, Mo B (2013) siRNA-mediated DNA methylation and H3K9 dimethylation in plants, *Protein & Cell*, ***9***, 656-663

Zamore PD, Haley B (2005) Ribo-genome: the big world of small RNAs, *Science*, **309**, 1519-1524

8. Sažetak

Male RNA molekule imaju bitnu ulogu u eukariotskim stanicama. Zbog svoje karakteristične funkcije i dužine podijeljene su u nekoliko razreda. Najbrojnije su miRNA, piRNA i siRNA. Modelni organizam za proučavanje biosinteze i funkcije ovih molekula je biljka *A.thaliana.* Heterokromatin interferirajuća siRNA regulira transkripcijsko utišavanje gena izazivanjem DNA metilacije i dimetilacije H3K9. RNA posredovana DNA metilacija (RdDM) je glavni epigenetski put posredovan malim molekulama RNA kod biljaka. RdDM zahtijeva specifičnu transkripcijsku mašineriju koja se sastoji od dvije polimeraze, Pol IV i Pol V, specifične za biljke, i velikog broja pratećih proteina čija se uloga kod RdDM samo djelomično razumije. Najbitniji od njih su DCL3, RDR2 i AGO4. Dva su moguća puta utišavanja RNA molekulama. Kod prvoga male RNA uzrokuju transkripcijsko utišavanje gena formiranjem heterokromatina, a kod drugog dolazi do postranskripcijskog utišavanja degradacijom mRNA ili inhibicijom translacije. Male RNA molekule mogu nastati transkripcijom od endogenih lokusa ali i sa virusnih i transgenih nukleinskih kiselina. MiRNA i siRNA djeluju u somatskim i generativnim stanicama kod širokog spektra eukariotskih organizama u kojima sudjeluju u raznim funkcijama, od regulacije transpozona, biosinteze biljnih hormona do razvoja cvijeta i listova

9. Summary

Small RNA molecules have an important function in eukaryotic cells. Having a rather characteristic function and length, they are divided into several classes. The most abundant ones are miRNA, piRNA and siRNA. The model organism used for the study of biosynthesis and functions of these molecules is a plant *A.thaliana.* Heterochromatin interfering siRNA regulates transcriptional silencing of genes by inducing DNA methylation and dimethylation of H3K9. RNA directed DNA methylation (RdDM) is the main epigenetic pathway which is in plants directed by small RNA molecules. RdDM requires a specific transcription machinery which consists of two polymerases that are rather specific for plants - Pol IV and Pol V – and a large number of accompanying proteins whose function in RdDM is not entirely clear. The most important of these proteins are DCL3, RDR2 and AGO4. There are two possible ways of RNA silencing by using molecules. In the first instance, small RNA molecules cause transcriptional silencing of genes by forming heterochromatin and in the second, post-transcriptional silencing occurs because of mRNA degradation or inhibition of translation.

Small RNA molecules are created by transcription from endogenous locus, as well as viral and transgenic nucleic acids. MiRNA and siRNA operate in somatic and generative cells in a broad spectrum of eukaryotic organisms where they participate in various functions - from regulation of transposons and biosynthesis of plant hormones to the development of the flower and leaves.