

Метилтрансферазы растений

Е. Н. Тищенко, О. В. Дубровная

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
Ул. Васильковская, 31/17, Киев, 03022, Украина

E-mail: plant@ifrg.freenet.kiev.ua

В обзоре обобщены современные данные о цитозин-С5-ДНК метилтрансферазах растений. Охарактеризованы три различных класса этих ферментов — Dnmt1/MET1, Dnmt3 и CMT. Обсуждается их предполагаемая функция, связанная с поддерживающим метилированием и метилированием de novo остатков цитозина в симметричных и асимметричных мотивах ДНК.

Ключевые слова: метилирование, цитозин, метилтрансферазы

Введение. Метилированию ДНК отводится важная роль в функциональной геномике эукариотов. Ферментативная модификация цитозина рассматривается в качестве одной из основных детерминант эпигенетической регуляции экспрессии генов и транскрипции растений. Ее предполагаемая функция также состоит в инактивации повторяющихся последовательностей, защищая таким образом геном от распространения мобильных генетических элементов и чужеродной генетической информации. Немаловажное значение уделяется метилированию ДНК в явлениях импринтинга, парамутаций, полиплоидизации, в механизмах дифференцировки клеток в процессе развития растений и их генетической нестабильности.

Отличительной чертой ядерной ДНК растений является высокий уровень ее метилирования: она может содержать до 40—50 % модифицированных остатков цитозина в симметричных (CpG, CpNpG, где N — любое основание, отличное от гуанина) и асимметричных (CpNpN) мотивах, тогда как у животных — не более 8 % [1, 2]. Принципиальное значение имеет расшифровка механизмов *de novo* и поддерживающего метилирования ДНК эукариотов — двух основных процессов метилирования,

ключевое положение в которых занимают ферменты цитозин-С5-ДНК метилтрансферазы (метилтрансферазы). При поддерживающем метилировании его паттерны в CpG и CpNpG мотивах передаются в обе дочерние нити метилтрансферазами, которые в репликативной вилке преимущественно метилируют полуметилированную ДНК, тогда как при *de novo* метилировании ферментативной модификации подвергаются ранее неметилированные остатки цитозина. Для симметричных последовательностей достаточно, чтобы метилирование *de novo* произошло один раз, после чего ферментативная модификация может осуществляться за счет активности поддерживающих метилтрансфераз. Однако для поддержания метилирования в асимметричных сайтах метилирование *de novo* должно иметь место при каждом цикле клеточного деления [1]. Механизмы метилирования ДНК далеки еще от полного понимания. До недавнего времени, пока были клонированы только гены *Dnmt1* животных, оставался открытым вопрос, кодируются ли метилтрансферазы семействами генов, выполняющих разные функции, связанные с модификациями CpG, CpNpG и CpNpN последовательностей. Кроме того, вообще было неизвестно, какие ферменты способны осуществлять *de novo* модификацию цитозина в асимметричных последовательностях. В

последнее время, после идентификации вначале в геномах растений, а затем и животных множественных генов метилтрансфераз, в этой области исследований достигнут значительный прогресс.

Общая характеристика метилтрансфераз. На текущий момент, основываясь на гомологии аминокислотных и/или полинуклеотидных последовательностей, а также на предполагаемой функции, метилтрансферазы растений и животных сгруппированы, по крайней мере, в четыре различных класса: Dnmt1/MET1, Dnmt2, Dnmt3 и CMT [3—7]. Последний характерен только для растений. Считается, что Dnmt2-класс представлен пока что метилтрансферазами животных, однако в литературе имеются сведения о том, что у арабидопсиса идентифицирована полинуклеотидная последовательность, способная кодировать полипептид, гомологичный белку Dnmt2 животных [4]. Возможно, что этот класс имеется и у растений.

Данные о полифункциональных метилтрансферазах растений обобщены в таблице. Есть основания считать, что поддерживающее метилирование в симметричных CpG и CpNpG последовательностях растений осуществляют главным образом метилтрансферазы класса Dnmt1/MET1 и CMT соответственно, в то время как за *de novo* ферментативную модификацию цитозина симметричных и асимметричных мотивов ответственны ферменты класса Dnmt3 [4—7].

Метилтрансферазы про- и эукариотов катализируют реакцию переноса метильных групп с S-аденозил-L-метионина (SAM) в C5 положение пиримидинового кольца цитозинового остатка с образованием промежуточного ковалентного комплекса ДНК—белок. Конечным продуктом этой реакции являются 5-метилцитозин и S-аденозилгомоцистеин. Во всех изученных цитозин-C5-ДНК метилтрансферазах в C-концевой области представлены консервативные мотивы аминокислотных последовательностей, которые собственно и выполняют каталитическую функцию фермента. Они расположены во многих метилтрансферазах одним и тем же упорядоченным образом и разделены, как правило, неконсервативными аминокислотными последовательностями переменной длины. Большинство метилтрансфераз эукариотов включает консервативные мотивы VIII и X прокариотов, причем мотивы VII и VIII не являются высококонсервативными и поэтому их трудно различать во многих ферментах [1, 3—18].

Наиболее изученными являются метилтрансферазы прокариотов, для которых показано, что консервативные мотивы I и X образуют сайт связывания донора метильных групп, остаток цистеина дуплета пролин-цистеин мотива IV формирует активный центр, ответственный за перенос метильной группы. При этом переменная аминокислотная последовательность TRD (target-recognizing domain) между мотивами VIII и IX направляет фермент к последовательности узнавания, фланкирующей цитозин, который подвергается метилированию [1, 3].

У ряда изученных метилтрансфераз эукариотов участок с консервативными мотивами слит с большой регуляторной N-аминотерминальной областью, отсутствующей у прокариотов [1, 3, 4, 18]. Такая область впервые идентифицирована в метилтрансферазе Dnmt1 мыши. Обнаружена она и в первом клонированном гене метилтрансфераз растений — MET1 арабидопсиса, а впоследствии — и в других генах классов Dnmt1/MET1, CMT [1, 6, 19]. N-аминотерминальная область выполняет функции, включающие, в частности, направление метилтрансферазы в репликативную вилку во время S фазы клеточного цикла [4, 21, 22].

Сведения о том, каким образом происходит пострепликативное метилирование ДНК, ограничены и касаются в основном животных. Для точного воспроизведения паттернов метилирования в клеточном цикле предполагается, что оно должно быть сопряжено с репликацией ДНК. Для этого есть следующие основания: экспрессия гена DNMT1 регулируется в клеточном цикле; эта метилтрансфераза локализована в репликативной вилке; метилирование осуществляется согласованно с репликацией ДНК; ингибирование DNMT1 может приводить к подавлению инициации репликации ДНК [21, 23]. Однако молекулярные детерминанты этого взаимодействия еще не определены. Тем не менее, установлено, что DNMT1 является компонентом мультибелкового комплекса репликации ДНК, названного ДНК-синтесомой, который в бесклеточной системе полностью поддерживает полуконсервативную репликацию ДНК. Связанный с синтесомой фермент демонстрирует как поддерживающую, так и с низким уровнем *de novo* метилтрансферазную активность. Полученные данные указывают на то, что метилирование ДНК прочно сопряжено с репликацией через физическое взаимодействие DNMT1 и кор-компонентов реплика-

Цитозин-С5-ДНК-метилтрансферазы растений и их предполагаемая функция

Класс ферментов Название гена	Организм	Предполагаемая функция	Источник литературы
Dnmt1/MET1			
<i>MET1 (DDM2)</i>	Арабидопсис	Поддерживающая CpG в уникальных и повторяющихся последовательностях	[1, 4, 7]
		Непрямое участие в метилировании CpNpG и CpNpN?	[5, 30]
<i>MET1a, MET1b, MET1H</i>	Арабидопсис	Поддерживающая?	[9, 4]
<i>Met1, Met2</i>	Морковь	Поддерживающая	[10]
<i>PMET</i>	Горох	Поддерживающая CpG, CNG	[11]
<i>ZmMET1</i>	Кукуруза	Поддерживающая	[12]
<i>NiMET1</i>	Табак	Поддерживающая	[20]
<i>OsMET1-1, OsMET1-2</i>	Рис	Поддерживающая	[19]
<i>PpMET1</i>	Персик	Поддерживающая	[35]
Dnmt3			
<i>DRM1 и DRM2</i>	Арабидопсис	Метилирование CpG, CpNpG и CpNpN <i>de novo</i> . Поддерживающая CpNpN и CpNpG в некоторых локусах	[5, 13]
<i>Zmet3</i>	Кукуруза	<i>de novo</i>	[13]
<i>NiDRM1</i>	Табак	<i>de novo</i>	[5]
CMT			
<i>ZMET2</i>	Кукуруза	Поддерживающая CpNpG	[6]
<i>ZMET5</i>	Кукуруза	Поддерживающая CpNpG?	[6]
<i>CMT1</i>	Арабидопсис	Гетерохроматин? Несущественна	[4]
<i>CMT2</i>	Арабидопсис	Гетерохроматин?	[4]
<i>CMT3</i>	Арабидопсис	Поддерживающая CpNpG и частично — CpNpN	[5]

Примечание. CpG, CpNpG — симметричные, CpNpN — асимметричные мотивы.

тивного комплекса [24]. Поскольку DNMT1 присутствует в репликативной вилке, возникает вопрос о том, происходит ли метилирование в ДНК перед ее упаковкой в нуклеосомы, которые образуются очень быстро вслед за репликативной вилкой? Для 5S рДНК обнаружено, что DNMT1 способна метилировать ряд CpG сайтов, даже когда большая бороздка ориентирована по направлению к поверхности гистонов. Вместе с тем способность этого фермента модифицировать нуклеосомные сайты весьма зависима от природы субстрата [25].

Метилтрансферазы растений класса Dnmt1/MET1. *Arabidopsis thaliana* — первый вид растений, в котором, используя гомологию между консервативными мотивами IX и X прокариотных и мышинных метилтрансфераз, методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и скрининга библиотеки кДНК идентифицированы кДНК, относящи-

еся к семейству генов метилтрансфераз *MET1* (DDM2). Кроме того, именно для этого вида показано, что метилтрансферазы эукариотов могут кодироваться определенным семейством генов [1, 7].

Первыми были выделены гены *MET1* и *MET1H* и показано, что они, как и *Dnmt1* животных, содержат N-аминотерминальную регуляторную область. Гомология между их белками оказалась более высокой в С-метилтрансферазной области, чем в N-аминотерминальной, притом что степень дивергенции между этими белками была больше по сравнению с таковой между Dnmt1 мыши и человека. MET1 и Dnmt1 имеют 50 % гомологичных аминокислотных последовательностей в каталитической области фермента, тогда как в регуляторной — 24 %. На данный момент семейство генов *MET1* включает пять представителей, четыре из которых частично охарактеризованы [4]. Два гена,

METIIa и *METIII*, тесно сцеплены, тогда как два других — *METI* и *METIIb* — находятся в различных локусах. Предполагается, что эти гены произошли от общего предка через серию его дупликаций. Несвязанные гены *METIIa* и *METIIb* наиболее подобны друг другу и, по-видимому, являются продуктами недавних дупликаций.

В N-аминотерминальной регуляторной области *METI* последовательно, через определенные интервалы располагаются предполагаемый сигнал ядерной локализации, а также домен, ответственный, вероятно, за направление этого фермента в репликативную вилку, так называемая «кислая» область. Как и у животных, N-терминальная область *METI* арабидопсиса отделена от C-метилтрансферазной области чередующимися остатками аминокислот лизин—глицин [4, 7]. «Кислая» область состоит, по крайней мере, из 50 % остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот и в пределах N-терминальной области ферментов класса *METI* расположена в одном и том же положении. Роль этих областей неизвестна. Среди ферментов растений наименее консервативной является TRD область [4].

Выявлена гомология аминокислотной последовательности (остатки 207—455), направляющей метилтрансферазу Dnmt1 мыши в репликативную вилку, с последовательностью (120—280) белка *METI* арабидопсиса. Это позволило предположить аналогичную функцию и для растительных метилтрансфераз [1].

Следует отметить, что первоначальные исследования метилтрансфераз растений и животных на биохимическом уровне показали некоторые отличия между ними. Первым свойственна относительно высокая скорость как поддерживающего, так и *de novo* метилирования, в то время как вторым — преимущественно поддерживающее метилирование. По этой характеристике метилтрансферазы растений более сходны с аналогичными ферментами прокариотов. В N-аминотерминальной регуляторной области Dnmt1 идентифицированы последовательности, подавляющие метилазную активность *de novo*. Этим, видимо, и объясняется предпочтительное метилирование полуметилированных мотивов ДНК животных [21].

Особенностью метилтрансфераз Dnmt1/*METI* арабидопсиса является отсутствие в их белках обогащенного цистеином цинк-связывающего домена, что характерно для N-терминальной области белков животных [21]. Возможно, этим и определяется

ся *de novo* метилазная активность вышеупомянутого фермента растений [7]. В отличие от животных, у растительных метилтрансфераз отсутствуют делеции из 40—41 аминокислотных остатков в области узнавания, а также для них характерно наличие «кислой» области [4].

Фермент *METI* выполняет главным образом поддерживающее метилирование ДНК арабидопсиса. Об этом свидетельствуют исследования, с одной стороны, трансгенных растений арабидопсиса с интродуцированной кДНК *METI* в антисмысловой ориентации под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты, а с другой, — мутантов этого гена — *met1*. Экспрессия «антисмыслового» трансгена приводит к снижению уровня метилирования ДНК в пределах 34—71 % в большинстве CpG мотивов, а также (хотя и с меньшим эффектом) в тринуклеотидах CpNpG [26, 27]. Потеря метильных групп в 5mC происходит как в повторяющихся, так и уникальных последовательностях ДНК. Охарактеризованы две миссенс-мутации гена метилтрансферазы *METI* арабидопсиса, мутантные аллели которого названы *met1-1* и *met1-2* [28]. Точечные мутации в обоих аллелях, обусловленные заменой пары CG на AT в экзонах генов, затрагивают C-терминальную каталитическую область фермента, в результате чего глобально уменьшается уровень метилирования ДНК. Аллель *met1-1* является миссенс-мутацией, в которой остаток серина замещен на пролин. Мутация *met1-1* не изменяет консервативных мотивов белка метилтрансферазы *METI*. В то же время мутация *met1-2* обнаружена в консервативном мотиве I, причастном к связыванию донора метильных групп, и приводит к замене инвариантного глицинового остатка, существенного для каталитической активности фермента, на серин. Удивительно, но, судя по уровню метилирования ДНК, аллель *met1-2* является более слабым по сравнению с *met1-1*. Следует отметить, что оба этих аллеля одинаково влияют на ферментативную модификацию цитозина в ДНК рибосомных генов, а различия в уровне метилирования генома арабидопсиса обусловлены, главным образом, повторяющимися последовательностями центромер. За счет чего проявляется различный эффект, непонятно, но, тем не менее, такие данные указывают на участие метилтрансферазы *METI* в выборе мишени для метилирования.

Первоначально считали, что *METI* осуществляет преимущественное метилирование симметрич-

ного динуклеотида CpG [1]. В последнее время методом секвенирования с использованием бисульфита натрия показано, что в мутантах *met1-1* может происходить потеря метилированных остатков цитозина не только в тринуклеотиде CpNpG, но и в асимметричных последовательностях [28]. У мутантов *met1-1* уменьшение уровня метилирования в асимметричных мотивах может быть следствием потери симметричных CpG динуклеотидов [5]. Все это указывает на более широкую субстратную специфичность последовательностей для метилтрансферазы MET1 [28].

Ранее такая возможность метилтрансфераз растений класса Dnmt1/MET1 подтверждена результатами изучения *in vitro* экспрессии гена *PMET* гороха в бакуловирусе [11].

Следует отметить, что хотя MET1-семейство генов арабидопсиса гомологично метилтрансферазам Dnmt1 животных, растения арабидопсиса со сниженным уровнем метилирования являются, в отличие от *Dnmt1*-мутантов мыши, жизнеспособными несмотря на то, что у них выявлен ряд аномалий в развитии [1, 26, 27, 29]. Уменьшение содержания 5mC связано с aberrантной экспрессией генов, в том числе некоторых регуляторных генов морфогенеза [1, 26, 27]. И, наоборот, возможно эктопическое гиперметилирование ряда генов, например, *SUPERMAN*, *AGAMOUS* арабидопсиса. По мнению Финнегана и соавт. [1], тот факт, что *de novo* ферментативная модификация цитозина может стимулироваться глобальным гипометилированием ДНК, предполагает использование растениями этой эпигенетической детерминанты для защиты против факторов, нарушающих нормальную организацию генома.

Функции остальных белков MET1-семейства — METIIa, METIIb и METIII еще не определены. Данные о предполагаемой роли METIII противоречивы, этот фермент, по-видимому, играет незначительную роль в метилировании ДНК [4].

Множественность генов метилтрансфераз растений класса Dnmt1/MET1 в дальнейшем подтверждена и для других растительных объектов — моркови, гороха, риса [1, 11, 19]. В частности, в геноме моркови обнаружены два гена, *Met1* и *Met2*, которые, являясь продуктами независимых дупликаций, имеют большую степень гомологии к MET1, чем к METII арабидопсиса, в метилтрансферазной области. Предполагается, что оба они являются гомологами *MET1*, однако располагаются в

разных локусах. Большой размер *Met2* обусловлен присутствием в его последовательности пятикратно повторяющегося элемента размером 171 пара нуклеотидов (п. н.). В работе Берначиа и соавт. [10] иммунологическим методом показано, что метилтрансферазы эукариотов кодируются семейством генов. В геноме риса идентифицированы два гена — *OsMET1-1* (на хромосоме 3) и *OsMET1-2* (на хромосоме 7), первый из которых содержит 12 экзонов и 11 интронов, тогда как второй — 11 экзонов и 10 интронов. Хотя в целом для обоих генов выявлена высокая степень гомологии, для экзона 1 установлена лишь 24 %-я идентичность и показано, что в *OsMET1-2* отсутствует интрон 3 гена *OsMET1-1*. Как и в других белках класса Dnmt1/MET1, две трети аминокислотных последовательностей *OsMET1-1* и *OsMET1-2* составляет N-терминальная регуляторная область [19].

Хромометилазы СМТ растений. Следующий класс метилтрансфераз растений — хромометилазы СМТ. Среди известных ферментов, катализирующих реакцию метилирования ДНК эукариотов, класс СМТ является специфичным для растений. Его структурной особенностью является наличие хромодомена — короткого мотива, впервые обнаруженного в хроматин-связывающих белках дрозофилы (*Hrp1* и *Polysomb*) [1, 4, 6, 31]. СМТ найдены как у однодольных, так и у двудольных растений. Предполагается, что хромометилазы принадлежат к специализированному типу поддерживающих метилтрансфераз, предоставляющих растительному геному другую возможность для распространения метилированных остатков цитозина, а именно — метилирование симметричных CpNpG и/или асимметричных последовательностей [5, 6, 13]. Описано несколько мутантов арабидопсиса по гену *СМТ3* и показано, что отсутствие функциональной активности этого гена приводит к обширной потере метильных групп в 5mC pNpG-мотивах, а также к снижению уровня метилирования асимметричных сайтов в некоторых локусах [5, 32]. Фермент СМТ может контролировать, в частности, метилирование ретротранспозона *Ta3* и центромерных повторов размером 180 п. н. арабидопсиса, а также осуществлять ферментативную модификацию цитозина асимметричных последовательностей одного из его локусов — *SUPERMAN* [5].

Существует мнение, что СМТ3 преимущественно метилирует родственные транспозонам последовательности [37]. Что касается гена *ZMET2*,

то для изучения его функции были получены гомозиготные растения кукурузы со встроенным в консервативный мотив IX транспозонным элементом *Mutator*. Показано, что гипометилирование происходило только в тринуклеотиде CpNpG, тогда как уровень ферментативной модификации CpG и асимметричных мотивов ДНК не изменялся [6]. Это свидетельствует о возможной специфичности метилирования мотивов ДНК, отличных от CpG, для метилтрансфераз типа СМТ двудольных и однодольных растений.

Аминокислотные последовательности СМТ, как и таковые других метилтрансфераз, содержат консервативные элементы, характерные для каталитической С-терминальной области. Однако они отличаются по организации консервативных метилтрансферазных мотивов и по структуре N-терминального регуляторного домена. В последнем отсутствует ~ 750 аминокислотных остатков, обнаруженных в белках Dnmt1/MET1-класса метилтрансфераз. В то же время известные хромометилазы по размеру аналогичны Dnmt3-классу [6].

Сравнительное изучение аминокислотных последовательностей хромометилаз кукурузы ZMET2, ZMET5 и арабидопсиса СМТ1 СМТ2 СМТ3 выявило наличие консервативных I, IV, VI, VIII, IX и X мотивов. Хромообласть обычно локализуется между мотивами I и IV. N-терминальные области хромометилаз содержат также серии убиквитин-связанных (UBA) доменов. Кроме того, все хромометилазы содержат ВАН область (bromo adjacent homology), которая в геномах животных имеет отношение к взаимосвязи метилирования и репликации, а также к регуляции транскрипции [6, 13]. В отличие от хромометилаз обе метилтрансферазы класса Dnmt1/MET1 (MET1 и ZMET1) содержат два ВАН домена в N-терминальной регуляторной области. На основании этого предполагается, что хромометилазы и ферменты типа MET1 произошли от общего предшественника [13]. Исключительное присутствие хромометилаз в растениях позволяет объяснить более высокий уровень метилирования их CpNpG последовательностей по сравнению с одноименными сайтами ДНК животных [6].

С помощью филогенетического анализа показано, что белки ZMET2 и ZMET5 являются более близкородственными к СМТ1 и СМТ3, чем к СМТ2. N-терминальная область ZMET2 меньше таковой в Dnmt1/MET1 классе метилтрансфераз, тем не менее, в ней содержится предполагаемый

сигнал ядерной локализации. Кроме того, аминокислотные последовательности хромодоменов являются консервативными для ZMET2 и СМТ1.

На ферментативную модификацию цитозина в тринуклеотидах CpNpG, по-видимому, оказывает влияние метилирование Lys9 гистона H3. Показано, что Swi6, гомолог HP1, напрямую взаимодействует с Lys9 гистона H3 [33] и что мутация гена *kryptonite Arabidopsis thaliana*, кодирующего гистоновую метилтрансферазу, приводит к потере метилирования ДНК [34]. Механизм, лежащий в основе такой зависимости метилирования ДНК от модификации гистона, еще не ясен. Тем не менее, адаптерный белок LHP1 арабидопсиса, способный связываться с гистонами H3 при метилировании Lys9, взаимодействует с метилтрансферазой СМТ3. Следует отметить, что известные данные о последовательности метилирования Lys9 гистона H3 и симметричных мотивов ДНК противоречивы. Так, в частности, в работе [36] показано, что в нульмутантах арабидопсиса по гену *MET1* полное отсутствие метилирования CpG мотивов в гетерохроматине приводит к потере метилирования лизина.

Класс метилтрансфераз растений Dnmt3. У растений, как и у животных, метилирование ДНК *de novo*, по всей видимости, осуществляют ферменты класса Dnmt3. Идентифицированы гены *DRM1* и *DRM2* арабидопсиса, *Zmet3* кукурузы, *NtDRM1* табака [5, 8, 13]. В отличие от описанных выше ферментов, в белках DRM2 (DRM — Domains Rearranged Methylase) и *Zmet3* наблюдается перестройка консервативных каталитических мотивов. Большинство метилтрансфераз, включая Dnmt3 животных, содержат мотивы I—VI, IX и X от N- к С-терминальной области белка. Однако в аминокислотных последовательностях этих ферментов арабидопсиса и кукурузы наблюдается измененное расположение консервативных мотивов, а именно — VI, IX, X, I—V. Для метилтрансфераз перестройка консервативных элементов каталитической области не ограничивается растениями. Так, для бактериальной метилтрансферазы (ϕ)BssHII показано, что мотивы IX и X предшествуют I—VIII, в то время как в AqiI мотивы IX и X локализованы в отдельной субъединице [13, 15]. Тот факт, что такие прокариотные ферменты не утрачивают метилтрансферазной активности, свидетельствует о том, что обычное расположение консервативных элементов несущественно для их функции [13].

Идентичность аминокислотных последователь-

ностей генов белков DRM и Zmet3 составляет 66 % в С-терминальной, и только 28 % — в N-терминальных областях. Кроме того, они содержат несколько аминокислотных последовательностей, являющихся, как полагают, критическими для функционирования цитозинового метилтрансферазы. Так, Phe-Gly-Хаа-Gly-остатки входят в состав мотива I, связывающего SAM, инвариантный дипептид Pro-Cys каталитического центра — в мотив IV, Glu-Asn-Val остатки — в мотив узнавания VI. Считается, что DRM2 и Zmet3 являются функциональными метилтрансферазами. Они содержат в N-терминальных областях серии UBA доменов, функция которых неясна. Предполагается, что эти домены могут обеспечивать взаимосвязь между метилированием ДНК и убиквитин/протеосомными путями [13].

К метилтрансферазам, осуществляющим *de novo* метилирование преимущественно в последовательностях, отличных от CpG мотивов, относится также NiDRM1 табака. Ген этого фермента кодирует белок из 608 аминокислотных остатков, в котором имеются области, аналогичные DRM кукурузы и арабидопсиса [8]. Показано, что этот белок локализован исключительно в ядре и проявляет метилазную активность к неметилированным как синтетическим, так и нативным ДНК. Он также ферментативно модифицирует полуметилированную ДНК, но его активность значительно ниже, чем для неметилированного субстрата. Эксперименты *in vitro* показали, что приблизительно 70 % остатков цитозина метилируется в асимметричных CpNpN и симметричных CpNpG мотивах, тогда как в динуклеотиде CpG — только 10 %. Этот фермент неселективно метилирует любые остатки цитозина безотносительно к смежным нуклеотидам с обоих (5' и 3') концов, за исключением CpG мотивов.

Одна из функций генов DRM1 и DRM2 арабидопсиса — метилирование *de novo* цитозина во всех известных контекстах последовательностей: CpG, CpNpG, CpNpN. Для последних показано предпочтительное метилирование CpA и CpT сайтов по сравнению с CpC. Об этой функции ферментов свидетельствует анализ ряда генов в мутантах по двум генам — *drm1*, *drm2*. В частности, не происходит иницирующего метилирования прямых повторов локуса FWA, которое обычно имеет место при трансформации FWA в растения дикого типа. В двойных мутантах также блокируется *de novo*

метилирование локуса SUPERMAN, осуществляемое в присутствии инвертированного повтора этого гена [13]. Однако в мутантах *drm* не наблюдается реактивации предварительно метилированных и эпигенетически молчащих аллелей SUPERMAN и FWA. Поэтому предположено [13], что DRM гены необходимы для установления, а не для поддержания молчания генов.

В дальнейшем было показано, что гены DRM могут выполнять поддерживающее метилирование асимметричных последовательностей и CpNpG мотивов ДНК [5]. Однако в некоторых локусах, таких как SUPERMAN, метилтрансферазы DRM функционируют совместно с CMT3, поскольку лишь в триплетных мутантах *drm1 drm2 cmt3* теряются метилированные остатки цитозина во всех асимметричных последовательностях. Более того, в некоторых локусах для поддержания метилирования тринуклеотидов CpNpG ферменты DRM являются более важными, чем CMT3. По предположению Кейо и соавт. [5], гены DRM и CMT3 функционируют избыточно и локус-специфичным образом для осуществления контроля метилирования в асимметричных и CpNpG мотивах.

Кроме вышеизложенного, участие метилтрансфераз DRM и CMT3 показано в РНК-направленном метилировании ДНК (RdDM, RNA-directed DNA methylation, процесс *de novo* метилирования последовательностей ДНК, идентичных триггерным двунитчатым РНК разных источников, в частности, вирусов, трансгенов, транспозонов) [38, 39]. Установлено, что ни *drm*, ни *cmt3* мутации не влияют на поддержание предварительно установленного РНК-направленного метилирования CpG мотивов. Однако в *drm* мутантах происходит почти полная потеря метильных групп в асимметричных и частичная — в 5meCpNpG-последовательностях. Поддержание метилирования в остальных не-CpG-мотивах зависело от активности CMT3, что свидетельствует о совместном действии DRM и CMT3 при РНК-направленном метилировании ДНК [38]. Следует отметить, что, по-видимому, эти ферменты проявляют функциональную активность после образования коротких интерферирующих РНК (siRNA), которые, как известно [40], являются результатом процессинга двунитчатых РНК, поскольку в триплетных мутантах *drm1 drm2 cmt3* выявлено отсутствие не-CpG-метилирования при повышенном уровне siRNA [38]. Кроме того, показано, что активность ферментов DRM необходима

для *de novo* метилирования во всех контекстах мотивов ДНК [38].

Экспрессия генов метилтрансфераз растений. Большинство известных генов метилтрансфераз растений экспрессируются повсеместно как в вегетативных, так и в генеративных органах, однако проявляют более высокий уровень экспрессии в меристематических тканях [7, 10, 26]. Разные члены семейства генов могут экспрессироваться дифференциально. Так, транскрипты *MET1* по крайней мере в 10000 раз более избыточны, чем *MET2*, в вегетативных и репродуктивных органах [1]. Хотя гены метилтрансфераз моркови максимально экспрессируются в пролиферирующих клетках (меристемы, примордии листьев, клетки суспензии), существуют количественные и пространственные различия в их экспрессии. Так, мРНК *Met1* равномерно распределена в вегетативных апексах побегов и примордиях листьев разного возраста, в то время как присутствие мРНК *Met2* ограничено апикальными меристемами и самыми молодыми примордиями листьев. На более поздних этапах развития ген *Met2* не функционирует. При соматическом эмбриогенезе моркови оба гена представлены равномерно на стадии глобулы и сердца, тогда как на стадии торпеды мРНК *Met2* (в отличие от мРНК *Met1*, равномерно распределенной в продольных секциях) в основном сконцентрирована в меристемах побега и корня. В зиготических зародышах развивающихся семян наблюдается аналогичная модель экспрессии этих генов [10]. Оба гена метилтрансфераз риса класса Dnmt1/MET1 экспрессируются в активно делящихся клетках, однако стационарный уровень мРНК *OsMET1-2* в корнях, соцветиях и каллусах в 7–12 раз больше, чем мРНК *OsMET1-1* [19]. Транскрипты гена *NtDRM1* табака повсеместно накапливаются во всех тканях и во время клеточного цикла в культивируемых BY2-клетках [8].

мРНК гена *DRM2* также обнаружена во всех основных тканях кукурузы [13]. Экспрессия гена *ZmMET1* кукурузы происходит исключительно в активно пролиферирующих клетках апексов [8]. Это предполагает связь транскрипции *ZmMET1* гена с репликацией. Подтверждением этому служит одновременное уменьшение транскриптов *ZmMET1* и гистона H3, являющегося маркером репликации ДНК, в проростках при их поранении и засолении, когда подавляется клеточное деление. Холодовый стресс также резко снижает экспрессию

этих генов в клетках корней. Однако этот фактор окружающей среды не оказывает влияния на накопление транскриптов *ZmMET1* в мезокотиле побега, в то время как транскрипция гена гистона H3 резко падает. Дифференциальное накопление транскриптов *ZmMET1* совпадает с уровнем содержания его белка, определенного вестерн-блоттингом. Холод индуцирует деметилирование ДНК в областях As/Ds транспозонов, но не в других генах, причем такое деметилирование первоначально происходит в корнях. Эти результаты свидетельствуют о том, что экспрессия гена *ZmMET1* не зависит полностью от репликации ДНК, и уровень метилирования ДНК уменьшается селективно при холодовом стрессе. Показано, что *DRM2* экспрессируется в листьях, корнях, соцветиях растений арабидопсиса, в то время как в этих же тканях посредством РНК-блот-анализа не обнаружено мРНК *DRM1*, что предполагает значительно более низкий уровень экспрессии гена *DRM1*, чем *DRM2* [13].

Таким образом, на сегодня в растениях обнаружены три полифункциональных класса цитозин-С5-метилтрансфераз — Dnmt1/MET1, Dnmt3 и CMT, которые, по-видимому, осуществляют поддерживающее метилирование и метилирование *de novo* симметричных и асимметричных последовательностей генома. Метилтрансферазы класса Dnmt1/MET1 преимущественно метилируют CpG мотивы, тогда как хромометилазы CMT класса — CpNpG последовательности ДНК. Ферментативная модификация цитозина *de novo* как симметричных, так и асимметричных мотивов генома происходит при участии метилтрансфераз класса Dnmt3.

E. N. Tishchenko, O. V. Dubrovnyaya

Methyltransferases of plants

Summary

In the review the current data on the plant cytosine-C5-DNA-methyltransferases (methyltransferase) are summarized. Three different classes of these enzymes — Dnmt1/MET1, Dnmt3 and CMT are described. The proposed function, dealing with maintenance and de novo methylation of cytosine residues in symmetric and asymmetric motifs of DNA, is under discussion.

Key words: methylation, cytosine, methyltransferase.

O. M. Тищенко, О. В. Дубровная

Метилтрансферазы растений

Резюме

В огляді узагальнено сучасні дані стосовно цитозин-С5-ДНК

метилтрансфераз рослин. Наведено характеристику трьох різних класів цих ферментів — Dnmt1/MET1, Dnmt3 і СМТ. Обговорюється їхня передбачувана функція, пов'язана з підтримуючим та *de novo* метилуванням залишків цитозину в симетричних і асиметричних мотивах ДНК.

Ключові слова: метилування, цитозин, метилтрансферази.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Finnegan R. J., Genger R. K., Peacock W. J., Dennis E. S. DNA methylation in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*—1998.—49.—P. 223—247.
2. Ng H.-H., Bird A. DNA methylation and chromatin modification // *Curr. Opin. Genet. Develop.*—1999.—9.—P. 158—163.
3. Bestor T. H. The DNA methyltransferase of mammals // *Hum. Mol. Genet.*—2000.—9.—P. 2395—2402.
4. Finnegan E. J., Kovac K. A. Plant DNA methyltransferases // *Plant Mol. Biol.*—2000.—43.—P. 189—201.
5. Cao X., Jacobsen S. Role of the Arabidopsis DRM methyltransferases in *de novo* DNA methylation and gene silencing // *Curr. Biol.*—2002.—12.—P. 1138—1144.
6. Papa C. M., Springer N. M., Muszynski M. G., Meeley R., Kaeppler S. M. Maize chromomethylase *Zea methyltransferase2* is required for CpNpG methylation // *Plant Cell.*—2001.—13.—P. 1919—1928.
7. Finnegan E. J., Dennis E. S. Isolation and identification by sequence homology of putative cytosine methyltransferase from *Arabidopsis thaliana* // *Nucl. Acids Res.*—1993.—21.—P. 2383—2388.
8. Wada Y., Ohya H., Yamaguchi Y., Koizumi N., Sano H. Preferential *de novo* methylation of cytosine residues in non-CpG sequences by a domains rearranged DNA methyltransferase from tobacco plants // *J. Biol. Chem.*—2003.—278.—P. 42386—42393.
9. Genger R. K., Kovac K. A., Dennis E. S., Peacock W. J., Finnegan E. J. Multiple DNA methyltransferases in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol. Biol.*—1999.—41.—P. 269—278.
10. Bernacchia G., Primo A., Giorgetti L., Pitto L., Cella R. Carrot DNA-methyltransferase is encoded by two classes of genes with differing patterns of expression // *Plant J.*—1998.—13.—P. 317—329.
11. Pradhan S., Cummings M., Roberts R. J., Adams R. L. P. Isolation, characterization and baculovirus-mediated expression of the cDNA coding cytosine DNA methyltransferases from *Pisum sativum* // *Nucl. Acids Res.*—1998.—26.—P. 1214—1222.
12. Sterwad N., Kusano T., Sano H. Expression of ZmMET1, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in coil-stressed quiescent // *Nucl. Acids Res.*—2000.—28.—P. 3250—3259.
13. Cao X., Springer N. M., Muszynski M. G., Phillips R. L., Kaeppler S. M., Jacobsen S. E. Conserved plant genes with similarity to mammalian *de novo* DNA methyltransferases // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—97.—P. 4979—4984.
14. Chen X. DNA modification by methyltransferases // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—1995.—5.—P. 4—10.
15. Sethmann S., Ceglowski P., Willert J., Iwanicka-Neuticka R., Trantner T. A., Walter M. (φ)BssIII A novel cytosine-C5-DNA-methyltransferase with target-recognizing domains at separated localizations of the enzyme // *EMBO J.*—1999.—18.—P. 3502—3509.
16. Mi S., Roberts R. J. How M. MspI and M. HpaII decide which base to methylate // *Nucl. Acids Res.*—1992.—20.—P. 4811—4816.
17. Yen R. W. S., Vertino P. M., Nelkin B. D., Yu J. J., Deiry W. Isolation and characterization of the encoding human DNA methyltransferase // *Nucl. Acids Res.*—1992.—20.—P. 2287—2291.
18. Bestor T., Laudano A., Mattaliano R., Ingram V. Cloning and sequencing of cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells // *J. Mol. Biol.*—1988.—203.—P. 971—983.
19. Teerwanichpan P., Chandrasekharan M. B., Jiang Y., Naran-gajavana J., Hall T. C. Characterization of two rice DNA methyltransferase genes and RNAi-mediated reactivation of a silenced transgene in rice callus // *Planta.*—2004.—218.—P. 337—349.
20. Wada Y., Miyamoto K., Kusano T., Sano H. Association between up-regulation of stress-responsive genes and hypomethylation of genomic DNA in tobacco plants // *Mol. Genet. Genomics.*—2004.—271, N 6.—P. 658—666.
21. Leonhardt H., Page A. W., Weier H.-U., Bestor T. H. A targeting sequences directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei // *Cell.*—1992.—71.—P. 865—873.
22. Robertson K. L., Jones P. DNA methylation: past, present and future directions // *Carcinogenesis.*—2000.—21.—P. 461—467.
23. Mimutinovic S., Zhuang Q., Niveleau A., Szyf M. Epigenomic Stress response. Knockdown of DNA methyltransferase1 triggers an intra-S-phase arrest of DNA replication and induction of stress response genes // *J. Biol. Chem.*—2003.—278.—P. 14985—14995.
24. Vertino P. V., Sekowski J. A., Coll J. M., Applegren N., Ham S., Hickey R. J., Malkas L. H. DNMT1 is a component of a multiprotein DNA replication complex // *Cell Cycle.*—2002.—1, N 6.—P. 416—423.
25. Okuwaki M., Verreault A. Maintenance DNA methylation of nucleosome core particles // *J. Biol. Chem.*—2004.—279.—P. 2904—2912.
26. Ronemus M. J., Galbiati M., Ticknor C., Chen J., Dellaporta S. L. Demethylation-Induced development pleiotropy in *Arabidopsis* // *Science.*—1996.—273.—P. 654—656.
27. Finnegan R. J., Peacock W. J., Dennis E. S. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1996.—93.—P. 8449—8454.
28. Kankel M. W., Ramsey D. E., Stokes T. L., Flowers S. K., Haag J. R., Jeggeloh J. A., Riddle N. C., Verbsky M. L., Richards E. J. *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutant // *Genetics.*—2003.—163.—P. 1109—1122.
29. Li E., Bestor T. H., Jaenisch R. Targeted mutation of DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality // *Cell.*—1992.—69.—P. 915—926.
30. Bartee L., Bender J. Two Arabidopsis methylation-deficiency mutations confer only partial effects on methylated endogenous gene family // *Nucl. Acids Res.*—2001.—29.—P. 2127—2134.
31. Henikoff S., Comai L. A DNA methyltransferase homology with chromodomain exists in multiple forms in Arabidopsis // *Genetics.*—1998.—148.—P. 307—318.
32. Lindroth A. M., Cao X., Jackson J. P., Zilberman D., McCallum C. M., Henikoff S., Jacobsen S. E. Requirement of *Chromo methylase 3* is required of CpXpG methylation // *Science.*—2001.—292.—P. 2077—2080.
33. Nakayama J., Rice J. C., Strahl B. D., Allis D. C. Grewal S.

- L. S. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly // *Science*.—2001.—292.—P. 110—113.
34. Jackson J. P., Lindroth A. M., Cao X., Jacobsen S. E. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase // *Nature*.—2002.—416.—P. 556—560.
35. Giannino D., Mele G., Cozza R., Bruno L., Testone G, Ticconi C., Bitonti M. B., Innocenti A. M., Mariotti D. Isolation and characterization of maintenance DNA methyltransferase gene from peach (*Prunus persica* [L] Batsch): transcript localization in vegetative and reproductive meristems of triple buds // *J. Exp. Bot.*—2003.—54.—P. 2623—2633.
36. Tariq M., Saze H., Probst A. V., Lichota J., Habu Y., Paszkowski J. Erasure of CpG methylation in *Arabidopsis* alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—2003.—100.—P. 8823—8827.
37. Kato M., Miura A., Bender J., Jacobsen S. E., Kakutani T. Role of CG and non-CG methylation in immobilization of transposons in *Arabidopsis* // *Curr. Biol.*—2003.—13.—P. 421—426.
38. Cao X., Aufsatz W., Zilberman D., Mette M. F., Huang M. S., Matzke M., Jacobsen S. E. Role of the DRM and CTM3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation // *Curr. Biol.*—2003.—13.—P. 2212—2217.
39. Mathieu O., Bender J. RNA-directed DNA methylation // *J. Cell Sci.*—2004.—117.—P. 4881—4888.
40. Hamilton A., Voinnet O., Chappell L., Baulcombe D. The classes of short interfering RNA in RNA silencing // *EMBO J.*—2002.—21.—P. 4671—4579.

УДК 581.144:581.142:575.16:577.113.4

Надійшла до редакції 29.10.04