

Трансгенные растения как модели для изучения эпигенетической регуляции экспрессии генов

Т.В. Маренкова¹, Е.В. Дейнеко^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия

Феномен потери экспрессии перенесенных генов в трансгенных растениях был обнаружен в начале 1990-х годов. Изучение данного явления показало зависимость частоты инактивации трансгенов от числа интегрированных копий в растительный геном, особенностей организации встройки (наличие дупликаций, векторных последовательностей и др.), места встраивания. Потеря экспрессии гена может происходить на транскрипционном или посттранскрипционном уровне, в большинстве случаев с участием малых интерферирующих РНК (siРНК). У растений наиболее распространенным эпигенетическим механизмом инактивации генов на уровне транскрипции является РНК-направленное метилирование ДНК. Уникальные для растений РНК-полимераза IV и РНК-полимераза V играют в нем важную роль. РНК-полимераза IV отвечает за синтез некодирующих транскриптов с генами-мишенями, которые переводятся в двухцепочечную форму РНК-зависимой РНК-полимеразой и с помощью фермента Dicer разрезаются на siРНК. Они метилируются и транспортируются в эффекторный комплекс, основным компонентом которого является белок семейства Argonaute. РНК-полимераза V также считывает некодирующий транскрипт с гена-мишени, но он служит платформой для привлечения siРНК и последующего присоединения белков и ферментов, ответственных за метилирование ДНК и гистонов. Посттранскрипционная инактивация генов происходит в цитоплазме и связана со специфической деградацией эффекторным комплексом (siРНК и AGO-белок) мРНК, которая имеет участок, комплементарный siРНК. У растений кроме канонического механизма РНК-направленного метилирования ДНК существуют и другие варианты эпигенетической регуляции экспрессии генов, которые включают белки, принимающие участие в инактивации генов на посттранскрипционном уровне, специфические белки и другие типы малых РНК. В данном обзоре кратко рассмотрены известные на данный момент компоненты эпигенетической регуляции и сделан акцент на новые факты.

Ключевые слова: инактивация гена; малые интерферирующие РНК (siRNA); РНК-направленное метилирование ДНК; посттранскрипционная инактивация.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Маренкова Т.В., Дейнеко Е.В. Трансгенные растения как модели для изучения эпигенетической регуляции экспрессии генов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):545-551. DOI 10.18699/VJ15.071

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Marenkova T.V., Deineko E.V. Transgenic plants as a model for studying epigenetic regulation of gene expression. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):545-551. DOI 10.18699/VJ15.071

DOI 10.18699/VJ15.071

УДК 575.117.2:577.216

Поступила в редакцию 01.07.2015 г.

Принята к публикации 09.09.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: marenkova@bionet.nsc.ru

Transgenic plants as a model for studying epigenetic regulation of gene expression

T.V. Marenkova¹, E.V. Deineko^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Tomsk State University, Tomsk, Russia

The phenomenon of loss of expression of transferred genes in transgenic plants was discovered in the early 1990s. The study of this phenomenon revealed dependence of the frequency of gene silencing on the number of integrated copies in the plant genome, the properties of the transgene sequence itself (the presence of duplications, vector sequences, and others), chromosomal position. Loss of gene expression can occur transcriptionally or post-transcriptionally in most cases involving small interfering RNA (siRNA). In plants, the most common mechanism for inactivation of genes at the level of RNA transcription is RNA-directed DNA methylation (RdDM). An important role is played by the plant-specific RNA polymerase IV and V. Pol IV is assumed to transcribe non-coding transcripts at its target loci. They are copied into long dsRNAs and are processed by DICER into siRNAs. siRNAs are then methylated and loaded into the effector complex, whose main component is a protein of the Argonaute family. RNA polymerase V also transcribes the non-coding transcript of the target gene, but it serves as a scaffold that interacts with siRNAs and that recruits proteins and enzymes responsible for DNA and histone methylation. Posttranscriptional gene inactivation occurs in the cytoplasm and is associated with a specific effector complex (AGO-siRNA), which cleaves homologous mRNA. In plants, in addition to the canonical pathway, RdDM, more mechanisms exist, which include components for posttranscriptional gene inactivation, specific proteins and other types of small RNAs. In this review, we briefly discuss the currently known components of epigenetic regulation.

Key words: inactivation of genes expression; siRNA; RNA-dependent DNA methylation; posttranscriptional gene silencing.

Трансгенные растения являются уникальными инструментами в руках исследователей для решения как прикладных, так и фундаментальных задач. С момента получения первых генетически модифицированных растений был обнаружен феномен потери экспрессии перенесенных генов (gene silencing). Растения, в которых произошла инактивация чужеродной ДНК, отбраковываются экспериментаторами, поскольку они не представляют интереса для практического использования в коммерческих целях, однако оказались удобными моделями для исследования механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов.

Частота инактивации гетерологичных генов в первом поколении от самоопыления исходных трансформантов может составлять от нескольких процентов до половины случаев, по данным разных исследователей (Napoli et al., 1990; Ma, Mitra, 2002; Sallaud et al., 2003). В группу растений с высокой частотой инактивации трансгенов в основном входят трансформанты со множественными инсерциями чужеродной ДНК, встроенными в один или несколько сайтов растительного генома. Однако известны случаи потери экспрессии трансгенов в последующих поколениях при самоопылении моноинсерционных растений (Sallaud et al., 2003; Mourrain et al., 2007) и у гибридов от их скрещиваний (Charrier et al., 2000). Частота инактивации может существенно возрастать, если в состав генетической конструкции включены тандемные копии генов как в прямой, так и обратной ориентации (Heilersig et al., 2006; Lunerová-Bedřichová et al., 2008).

На трансгенных растениях табака, риса и *Arabidopsis thaliana* получены модельные линии, позволяющие изучать данный феномен. А. Matzke с коллегами на трансгенном табаке исследовали свойства и структуру серии аллелей Н-трансгена. Аллели со сложной структурой Т-ДНК (с дубликациями, векторными последовательностями) способны вызывать процесс транс-инактивации других чужеродных генов под управлением NOS-промотора в растительном геноме (Matzke et al., 1994; Jakowitsch et al., 1999). Достаточно хорошо исследован мультикопийный трансген 271, способный вызывать замолкание экспрессии трансгенов, находящихся под управлением промотора 35S-РНК вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК) у трансгенных растений табака (Vaucheret, 1994; Park et al., 1996; Khaitová et al., 2011). Именно на трансгенных растениях петунии в 1990 г. впервые был описан феномен ко-супрессии – координированного подавления экспрессии трансгенов и гомологичных им хозяйских генов, связанного с посттранскрипционным разрушением мРНК в цитоплазме (Napoli et al., 1990), которое позже получило название «РНК-интерференция».

Нестабильность экспрессии трансгенов в растениях может быть связана как с полной потерей активности перенесенных генов, так и с мозаичным характером на уровне клеток соматической ткани. Ярким и наглядным примером мозаичной экспрессии трансгенов является перенос дополнительных генов халькосинтазы (*chs*) в петунию. В исходных трансформантах с частотой от 5 до 25 % наблюдалась инактивация экспрессии как трансгенных, так и собственных генов *chs*, которая была связана со снижением уровня мРНК и накоплением двух

специфических, частично перекрывающихся siРНК размером 21 н., комплементарных кодирующей части гена (De Paoli et al., 2009). Мозаичный характер проявления гена *gfp* под управлением 35S-промотора ВМЦК описан для многокопийных по трансгену растений табака первого и второго поколений от самоопыления. Чередувание клеток по листовой пластинке с активным и неактивным геном *gfp* носило случайный характер и отличалось значительной вариабельностью между потомками (Bastar et al., 2004). Описано мозаичное проявление маркерного гена *nptII* в клетках соматической ткани листовой пластинки у трансгенного растения табака Nu 21 (Маренкова и др., 2007). Данный фенотип наследуется в T₁-T₄ и у гибридов F₁ от скрещивания с диким типом. Выделены две линии, контрастно различающиеся по частоте возникновения растений-мозаиков. Установлено, что мозаичность проявления гена *nptII* у трансгенных растений обусловлена действием эпигенетических механизмов и связана с метилированием промотора и кодирующей части гена (Логинава и др., 2012). Интересно, что даже встраивание одной копии гена *uidA* в один и тот же район хромосомы с помощью системы Cre/lox рекомбинации может вести к вариабельности в активности гена, что проявляется в стабильном или мозаичном паттерне экспрессии трансгена (Day et al., 2000).

Трансформанты с инактивированным трансгеном используются в экспериментах по индуцированному мутагенезу и выявлению растений-мутантов, у которых произошла реактивация экспрессии чужеродной ДНК. Последующий скрининг позволяет картировать мутации, влияющие на различные этапы механизма репрессии генов. Таким образом были обнаружены многие ключевые белки и ферменты (Herr et al., 2005; Smith et al., 2007; Nahu, 2010). Однако данный подход не позволяет выявить все компоненты эпигенетической регуляции из-за наличия мультигенных семейств (утрата функции одного гена может полностью или частично компенсироваться экспрессией других генов семейства) и возможного летального эффекта от потери активности гена. Все работы в данном направлении проводятся на растениях *A. thaliana*, что связано с несомненными преимуществами данного модельного объекта: малый размер генома, небольшое число хромосом, короткий период вегетации, хорошие физическая и молекулярно-генетическая карты, полностью секвенированный геном и большие коллекции инсерционных мутантов. Ведутся исследования и на других видах трансгенных растений (табак, петуния, кукуруза, рис, сосна, тополь и др.), но на данных объектах пока возможно изучение только отдельных аспектов механизмов инактивации экспрессии генов (наследование замолкания экспрессии гена в ряду поколений, влияние на частоту потери экспрессии различных внешних и внутренних факторов и др.). Однако эти исследования также важны, поскольку, несмотря на консервативный характер эпигенетической регуляции, они позволяют выявить возможные видовые особенности.

Инактивация экспрессии трансгена/гена может происходить на транскрипционном (transcriptional gene silencing – TGS) и посттранскрипционном (posttranscriptional gene silencing – PTGS; co-suppression) уровнях. Соответственно,

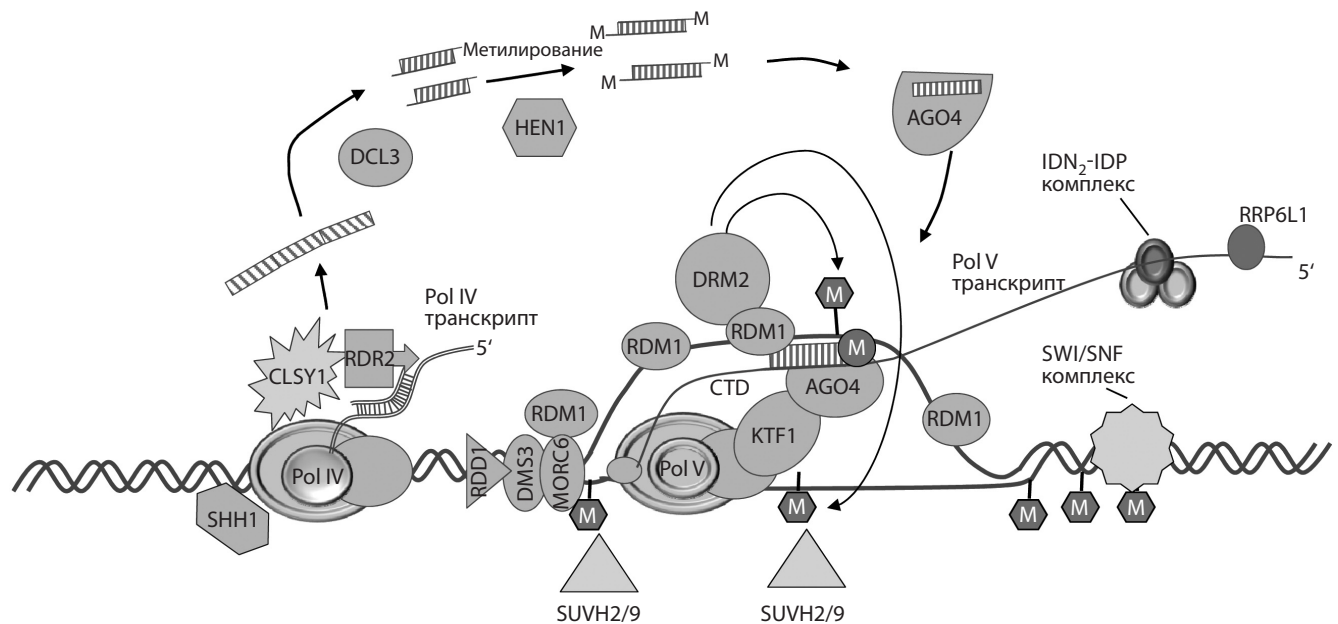


Схема РНК-направленного метилирования ДНК у растений (описание см. в тексте). Из: Matzke, Mosher (2014) с изменениями и дополнениями.

в первом случае наблюдается блокирование синтеза транскриптов мРНК, а во втором – мРНК считывается и обычно регистрируется в ядре, но в дальнейшем происходит ее разрушение в цитоплазме. При этом в большинстве случаев механизм репрессии генов запускается с участием малой интерферирующей РНК (siРНК, small interfering RNA).

РНК-направленное метилирование генов/трансгенов в растительном геноме

Основным эпигенетическим механизмом инактивации генов/трансгенов на уровне транскрипции является РНК-направленное метилирование ДНК (RdDM, RNA-directed DNA methylation). Этот механизм был открыт исследователями при изучении репликации вириода веретеновидности клубней картофеля в трансгенном табаке со вставкой кДНК вириода в ядерном геноме (Wassenegger et al., 1994). После цикла автономной репликации РНК вириода было обнаружено специфическое метилирование кДНК, связанное с образованием двухцепочечной РНК, которая разрезалась ферментом на малые РНК (Mette et al., 2000).

РНК-направленное метилирование ДНК представляет собой специализированную «транскрипционную фабрику», включающую две уникальные для растений РНК-полимеразы (РНК-полимераза IV и РНК-полимераза V) и большое число белков и ферментов (рисунок).

Опишем кратко основные события, последовательность которых ведет к репрессии гена: для образования siРНК необходимо наличие двухцепочечной РНК, которая образуется при считывании РНК-полимеразой IV с последовательности ДНК гена некодирующего транскрипта, который переводится РНК-зависимой РНК-полимеразой в двухцепочечную РНК. Последняя разрезается рибонуклеазой III на siРНК длиной 24 н., которые метилиру-

ются в области 3'-конца метилтрансферазой HEN1 (Hue Enhancer 1) и направляются в специализированный рибонуклеопротеиновый комплекс, основным компонентом которого является белок из семейства Argonaute. В составе комплекса siРНК осуществляет поиск комплементарной последовательности с последующим привлечением белков и ферментов, ответственных за подавление активности гена (Маренкова, Дейнеко, 2010; Meyer, 2013; Matzke, Mosher, 2014). Рассмотрим данный механизм инактивации генов на уровне транскрипции подробнее, уделяя внимание новым данным, полученным за последние годы.

У растений кроме трех канонических ДНК-зависимых РНК-полимераз (I, II и III) были обнаружены РНК-полимеразы IV и V, которые произошли от РНК-полимеразы II и играют ключевую роль в механизме RdDM репрессии генов. Предполагают, что РНК-полимераза IV считывает с последовательности ДНК транскрипт, который переводится РНК-зависимой РНК-полимеразой (RNA-Dependent RNA Polymerase) RDR2 или RDR6 в двухцепочечную РНК. Показано, что РНК-полимераза IV транскрибирует межгенные районы, гены эухроматина, связанные с повторами и транспозонами, при этом она отвечает примерно за 90 % последовательностей, с которых образуется siРНК размером 24 н. (Mosher et al., 2008). Остается пока неизвестным, каким образом РНК-полимераза IV узнает свои сайты. Считают, что в этом ей может помочь белок SHH1 (sawadee homeodomain homolog 1), который, будучи связанным с полимеразой, взаимодействует через уникальный тандемный Tudor-like домен (с двумя «карманами») одновременно с H3K9me и неметилированным H3K4 гистонами (Law et al., 2013). Также, предположительно, облегчает для РНК-полимеразы IV доступ к ДНК белок CLY 1 (classy 1, SWI2/SNF2-фактор), участвующий в моделировании структуры хроматина (Smith et al., 2007).

На следующем этапе дцРНК разрезаются рибонуклеазой III DCL3 (dicer-like 3) на siРНК длиной 24 н. Они метилируются в области 3'-конца метилтрансферазой HEN1 и направляются в специализированные рибонуклеопротеиновые комплексы, основным компонентом которых является белок из семейства Argonaute AGO4 или AGO6. В процессе внедрения siРНК происходит удаление одной из цепей РНК и с AGO-белком связывается антисмысловая одноцепочечная siРНК, комплементарная последовательности гена-мишени. В составе комплекса siРНК по принципу комплементарности осуществляет поиск и направляет эффекторный комплекс к гену-мишени (Yang et al., 2006; Matzke, Mosher, 2014).

На данном этапе важную роль играет РНК-полимераза V, которая считывает некодирующие транскрипты длиной порядка 200 н. Предполагают, что транскрипты удерживаются в хроматине с помощью белка RRP6L1 (RRP6-like protein) (Zhang et al., 2014) и являются платформой для привлечения siРНК и последующего присоединения белков и ферментов, ответственных за метилирование ДНК и гистонов в области сайта-мишени. Для процесса транскрипции РНК-полимеразе V необходимы топоизомераза 1 α (TOP1 α) (Dinh et al., 2014) и комплекс белков DDR, который включает три белка: DRD1 (defective in RNA-directed DNA methylation 1) – предположительно влияет на структуру хроматина; DMS3 (defective in meristem silencing 3) – белок с гомологией с высококонсервативными белками SMS и RDM1 (RNA-directed DNA methylation 1) – небольшой белок с неизвестной функцией (Gao et al., 2010; Zhong et al., 2012). Данные белки, по-видимому, обеспечивают доступ РНК-полимеразе V к одноцепочечной ДНК.

РНК-полимераза V взаимодействует через CTD-домен на С-конце большой субъединицы NRPE1 с AGO4-белком и с фактором элонгации KTF1 (kow domain-containing transcription factor 1), который также имеет мотив связывания с AGO4-белком. Предполагают, что siРНК в составе AGO4-комплекса по принципу комплементарности связывается с транскриптом, считываемым РНК-полимеразой V, и привлекает метилтрансферазу DRM2 (domains rearranged methyltransferase 2), которая метилирует близлежащую ДНК (Böhmendorfer et al., 2014). Белок RDM1, входящий в состав DDR, возможно, также участвует в привлечении DRM2, поскольку он взаимодействует с AGO4 и DRM2 и связывается с одноцепочечной метилированной ДНК (Gao et al., 2010).

Комплекс белков IDN2-IDP (involved in *de novo* 2-белок и паралоги IDP1 и IDP2) стабилизирует дуплекс siРНК-транскрипт РНК-полимеразы V и участвует в изменении нуклеосомной укладки через взаимодействие с SWI/SNF комплексом (Zhu et al., 2013), а также влияет на связывание DRM2 с транскриптом полимеразы V (Böhmendorfer et al., 2014). Показано, что связывание IDN2-белка с некодирующим транскриптом зависит от AGO4-белка (Böhmendorfer et al., 2014).

Пока непонятно, как РНК-полимераза V находит свои последовательности. Известно, что большая часть РНК-полимеразы V локализуется в области транспозонов и повторов в области интронов, промотора или кодирующей части гена (Wierzbicki et al., 2012). Возможно, что

белки семейства метилтрансферазы гистонов SUVH2, SUVH9, не обладающие каталитической активностью, за счет связывания через SRA-домен с метилированной ДНК и взаимодействия с комплексом белков DDR и MORC (microorchidia-type ATPases, влияют на высший уровень структурной организации хроматина) привлекают полимеразу к сайтам-мишеням (Johnson et al., 2014; Liu et al., 2014).

Метилирование ДНК у растений осуществляется по симметричным (CG, CHG) и несимметричным сайтам (CHH) цитозиновыми метилтрансферазами трех классов. Семейство MET1 (DNA methyltransferase1) отвечает за поддерживающее метилирование CG-сайтов; уникальные для растений хромометилазы CMT3 (chromomethylase3), CMT2 – поддерживающее метилирование CHG-сайтов и семейство DRM (domains rearranged methyltransferase) – метилирование *de novo* (Ванюшин, 2012). Поддержание метилирования в несимметричных сайтах после раунда репликации требует наличия триггерного сигнала, т. е. связано с механизмом РНК-направленного метилирования ДНК. У растений обратный процесс – деметилирование ДНК может происходить не только пассивно, но и активно (независимо от репликации) при участии семейства ДНК-гликозилаз demeter (DME), которое включает белки DME (demeter), ROS1 (repressor of silencing 1), DML2 (demeter-like 2) и DML3 (demeter-like 3) (Agius et al., 2006). Предполагают, что наличие механизмов метилирования ДНК, направленного siРНК и активного деметилирования позволяет растениям более динамично регулировать степень модификации генома в ответ на внутренние и внешние сигналы (Matzke, Mosher, 2014). Существование таких антагонистических взаимоотношений косвенно подтверждается тем фактом, что многие известные генетические компоненты РНК-направленного метилирования ДНК были обнаружены как супрессоры мутации *ros1* (*rpa2*, *tsll*, *rdm2*, *ago6*, *sup32*, *ctf1*) и, наоборот, при мутациях в этих генах (*ago6*, *ago4*, *drm2*, *rdr2*, *drd1*, *met1* и генов, кодирующих субъединицы POL IV и POL V) происходит снижение уровня экспрессии ROS1-белка (Penterman et al., 2007).

До сих пор не известна функция белка MOM1 (Morpheus' molecule1) в эпигенетическом механизме транскрипционной инактивации. Мутация *tom1* выделена по способности восстанавливать экспрессию замолкнувшего мультикопийного трансгена и ряда эндогенных повторяющихся последовательностей. Характерной особенностью мутации является восстановление экспрессии генов при сохранении молекулярных маркеров гетерохроматина: гиперметилированного состояния последовательности ДНК и отсутствия изменений в гистоновых белках (метилирование H3K9 и снижение метилирования H3K4) (Habu, 2010).

Недавно показано, что в процессе РНК-направленного метилирования ДНК у *A. thaliana* участвуют факторы сплайсинга РНК: белок SR45 (arginine/serine-rich 45) активен на ранних этапах образования siРНК; ZOP1 (zinc-finger and OCRE domain-containing protein), возможно, влияет на эффекторный комплекс AGO4 или на DRM2; STA1 (фактор сплайсинга PRP6-like) – на образование как siРНК, так и транскриптов, считываемых РНК-полимеразой V;

RDM16 (U4/U6 snRNP-associated protein) регулирует образование транскриптов РНК-полимеразы V (Huang, Zhu, 2014). Выявлен новый участник РНК-направленного метилирования ДНК – белки FRG1 и FRG2 (SNF2-ring-helicase-like), они относятся к семейству SNF2 helicase-like белков и физически взаимодействуют с SUVH2-белком (Groth et al., 2014).

Отметим, что исследование уровня экспрессии репортерного гена, интегрированного в разные районы хромосомы 1 *A. thaliana* на фоне супрессии основных компонентов РНК-направленного метилирования ДНК (MOM1, CMT3, DRD1, DRM2, SUVH2, histone deacetylase 1 (HD1) и др.), показало существование глобальной эпигенетической сети, которая регулирует экспрессию генов в зависимости от хромосомной локализации гена-мишени и его нуклеотидной последовательности (Luo et al., 2009).

Посттранскрипционная инактивация гена

Посттранскрипционная инактивация генов была обнаружена впервые на трансгенных растениях петунии при попытке изменить окраску цветка введением дополнительных копий генов биосинтеза антоцианов хальконсинтетазы. Однако был получен неожиданный результат – растения с белыми и неравномерно окрашенными пурпурно-белыми цветами. Это указывало на инактивацию экспрессии как трансгенных, так и собственных генов, ответственных за синтез пигментов (Napoli et al., 1990).

Инактивация ДНК на посттранскрипционном уровне происходит в цитоплазме и связана с деградацией мРНК, считываемой с гена. Специфическую деградацию мРНК направляет siРНК размером порядка 21 н., которая образуется из двухцепочечного предшественника. Нарработка дцРНК происходит либо из транскриптов, считываемых РНК полимеразой II с инвертированных повторов и образующих стабильную структуру шпильки, либо из одноцепочечных мРНК, которые переводит в двухцепочечную форму РНК-зависимая РНК-полимераза RDR6 с участием белка SGS3 (suppressor of gene silencing 3, функция Coiled-coil). Фермент DCL4 разрезает образующуюся дцРНК на siРНК размером 21 н., которые метилируются в области 3'-конца метилтрансферазой HEN1. РНП-комплекс при посттранскрипционной инактивации расположен в цитоплазме, основным его компонентом является белок AGO1. В процессе внедрения siРНК происходит удаление одной цепи РНК и с AGO-белком связывается антисмысловая одноцепочечная siРНК, комплементарная транскрибируемой области гена-мишени. Данный комплекс осуществляет ферментативный гидролиз комплементарной мРНК в цитоплазме. Наряду с деградацией мРНК часто происходит также метилирование ДНК гена-мишени в кодирующей части, что в большинстве случаев не мешает процессу транскрипции. Данные эпигенетические изменения направляются siРНК размером 24–26 н., которые образуются при участии DCL2. Роль данного метилирования ДНК в регуляции экспрессии гена на посттранскрипционном уровне пока не известна (Vaucheret, 2006; Дорохов, 2007).

Отдельно выделяется механизм посттранскрипционной инактивации, индуцированный вирусами (VIGS), известные вирусные белки-супрессоры, которые блокируют

разные этапы замолкания (Дорохов, 2007; Velásquez et al., 2009; Pooggin, 2013).

Таким образом, эпигенетические механизмы транскрипционной и посттранскрипционной инактивации генов имеют свои уникальные наборы белков и ферментов, а также и общие признаки, такие как участие дцРНК, которая разрезается ферментом Dicer на siРНК; нуклеопротеиновый комплекс, с основным компонентом – белком семейства Argonaut, который с помощью siРНК строго специфично находит комплементарную мишень.

Другие механизмы РНК-направленного метилирования ДНК

Кроме канонического механизма РНК-направленного метилирования ДНК, включающего ферменты РНК-полимеразу IV, RDR2, DCL3, РНК-полимеразу V, AGO4 и siРНК размером 24 н., известны и другие случаи репрессии генов с компонентами инактивации генов на посттранскрипционном уровне, специфическими белками и другими типами малых РНК. Так, на рисе (*Oryza sativa*) показано, что РНК в виде шпильки может разрезаться ферментом DCL3, образуя длинную микроРНК в 24 н. (long miRNA, lmiRNA). МикроРНК транспортируется в AGO4 и может направлять метилирование нуклеотидной последовательности сайта-мишени (Wu et al., 2010).

RDR6-зависимое РНК-метилирование является промежуточным звеном между посттранскрипционной инактивацией транскриптов, считываемых с транспозонов, и их метилированием *de novo*. РНК-полимераза II транскрибирует с транспозонов матричную РНК, которая может дестраиваться ферментом RDR6 с образованием двухцепочечной РНК. Затем DCL2 и/или DCL4 разрезают мРНК на siРНК размером 21–22 н. и через комплекс AGO1 запускается разрушение гомологичной мРНК в цитоплазме. Показано, что двухцепочечная РНК может также обуславливать метилирование *de novo*, в котором участвуют белки AGO2, транскрипты полимеразы V и метилтрансфераза DRM2. Инициация метилирования запускает канонический механизм РНК-направленного метилирования, в котором участвуют РНК-полимераза IV, RDR2 и DCL3 с образованием siРНК размером 24 н., что обеспечивает поддержание инактивированного состояния транспозона (Mari-Ordóñez et al., 2013; Nuthikattu et al., 2013).

В похожем механизме участвует AGO-связывающий белок NERD (needed for RDR2-independent DNA methylation) с привлечением РНК-полимераз IV и V и компонентов посттранскрипционной инактивации RDR6, SGS3, SDE3 (silencing defective) и SDE5. NERD взаимодействует с гистоном H3 и комплексом AGO2-siРНК 21 н., что обеспечивает метилирование ДНК транспозонов (Pontier et al., 2012).

Показано, что для репрессии низкокопийных генов, не образующих siРНК, важным является считывание некодирующих транскриптов РНК-полимеразой II, которые направляют РНК-полимеразу IV и РНК-полимеразу V к сайтам-мишеням и могут обеспечивать транс-инактивацию в геноме несцепленных гомологичных последовательностей (You et al., 2013).

Отметим, что данные модели инактивации генов описаны для растений *A. thaliana*, табака, петунии. Другие

виды растений изучены недостаточно, например для хвойных у *Pinus contorta* класс siРНК 24 н. и гомолог DCL3 отсутствуют и обнаружено большое разнообразие малых РНК размером 21 н. и новое семейство DCL-белков (Dolgosheina et al., 2008), в то время как у китайской ели (*Cunninghamia lanceolata*) показаны существование РНК-направленного метилирования с участием 24 н. siРНК и наличие DCL3 (Wan et al., 2012). Анализ популяции siРНК у *Brassica rapa* с мутацией в гене большой субъединицы РНК полимеразы IV показал существенно меньшее количество siРНК, зависящих от транскрипции РНК полимеразы IV, по сравнению с *A. thaliana* (Huang et al., 2013).

Таким образом, в процессе эволюции растения выработали множество механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов. Уже не подвергается сомнению важная роль механизмов посттранскрипционной инактивации в качестве иммунной защиты растений от вирусов, виридов, а транскрипционной инактивации – от неконтролируемого размножения в геноме мобильных генетических элементов. Также предполагается, что механизм РНК-направленного метилирования ДНК позволяет растению быстро и пластично регулировать экспрессию собственных генов в ответ на непредсказуемые условия внешней среды. Обсуждается роль РНК-направленного метилирования ДНК при парамутациях, импринтинге, межклеточном взаимодействии. Выдвинуто предположение, что у цветковых растений данный эпигенетический механизм служит для более быстрой стабилизации и диплоидизации генома при возникновении полиплоидии (Matzke, Mosher, 2014).

Благодарности

Данная работа выполнена в рамках проекта VI.62.1.5 (№ 01201280334) «Разработка и совершенствование генетических конструкций для оптимизации экспрессии целевых генов и синтеза рекомбинантных белков медицинского назначения у трансгенных растений и животных».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК у растений: эпигенетический контроль за генетическими функциями. Эпигенетика. Ред. С.М. Закиян, В.В. Власов, Е.В. Дементьева. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012.

Дорохов Ю.Л. «Умолкание» генов у растений. Молекуляр. биология. 2007;41(4):579-592.

Логина Д.Б., Меньшанов П.Н., Дейнеко Е.В. Анализ мозаичного проявления *nptII*-гена у контрастных по мозаицизму трансгенных растений табака. Генетика. 2012;48:1280-1286.

Маренкова (Новоселя) Т.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Мозаичный характер проявления гена *nptII* у трансгенных растений табака Nu 21. Генетика. 2007;43(7):943-954.

Маренкова Т.В., Дейнеко Е.В. Инактивирование генов у растений на уровне транскрипции. Генетика. 2010;46(5):581-592.

Agius F., Kapoor A., Zhu J.K. Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006;103:11796-11801.

Bastar M.T., Luthar Z., Skof S., Bohanec B. Quantitative determination of mosaic GFP gene expression in tobacco. Plant Cell Rep. 2004;22:939-944.

Böhmendorfer G., Rowley M.J., Kuciński J., Zhu Y., Amies I., Wierzbicki A.T. RNA-directed DNA methylation requires stepwise binding of silencing factors to long non-coding RNA. Plant J. 2014;79(2):181-191. DOI: 10.1111/tj.12563

Charrier B., Scollan C., Ross S., Zubko E., Meyer P. Co-silencing of homologous transgenes in tobacco. Mol. Breeding. 2000;6:407-419.

Day C.D., Lee E., Kobayashi J., Holappa L.D., Albert H., Ow D.W. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. Gene. Dev. 2000;14:2869-2880.

De Paoli E., Dorantes-Acosta A., Zhai J., Accerbi M., Jeong D.H., Park S., Meyers B.C., Jorgensen R.A., Green P.J. Distinct extremely abundant siRNAs associated with cosuppression in petunia. RNA. 2009;15:1965-1970. DOI: 10.1261/rna.1706109

Dinh T.T., Gao L., Liu X., Li D., Li S., Zhao Y., O'Leary M., Le B., Schmitz R.J., Manavella P., Li S., Weigel D., Pontes O., Ecker J.R., Chen X. DNA topoisomerase 1 α promotes transcriptional silencing of transposable elements through DNA methylation and histone lysine 9 dimethylation in Arabidopsis. PLOS Genet. 2014;10:e1004446. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004446

Dolgosheina E.V., Morin R.D., Aksay G., Sahinalp S.C., Magrini V., Mardis E.R., Mattsson J., Unrau P.J. Conifers have a unique small RNA silencing signature. RNA. 2008;14:1508-1515. DOI: 10.1261/rna.1052008

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. An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. Nature. 2010;465(7294):106-109. DOI: 10.1038/nature09025

Groth M., Stroud H., Feng S., Greenberg M.V., Vashisht A.A., Wohlschlegel J.A., Jacobsen S.E., Ausin I. SNF2 chromatin remodeler-family proteins FRG1 and -2 are required for RNA-directed DNA methylation. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2014;111:17666-17671. DOI: 10.1073/pnas.1420515111

Habu Y. Epigenetic silencing of endogenous repetitive sequences by MORPHEUS' MOLECULE1 in *Arabidopsis thaliana*. Epigenetics. 2010;5:562-565.

Heilersig H.J., Loonen A., Bergervoet M., Wolters A.M., Visser R.G. Post-transcriptional gene silencing of GBSSI in potato: effects of size and sequence of the inverted repeats. Plant Mol. Biol. 2006;60:647-662. DOI: 10.4161/epi.5.7.12518

Herr A.J., Jensen M.B., Dalmay T., Baulcombe D.C. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. Science. 2005;308(5718):118-120.

Huang C., Zhu J. RNA splicing factors and RNA-directed DNA methylation. Biology (Basel). 2014;3:243-254. DOI: 10.3390/biology3020243

Huang Y., Kendall T., Mosher R.A. Pol IV-dependent siRNA production is reduced in *Brassica rapa*. Biology (Basel). 2013;2:1210-1223. DOI: 10.3390/biology2041210

Jakowitsch J., Papp I., Moscone E.A., van der Winden J., Matzke M.A., Matzke A.J.M. Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters *in trans*. Plant J. 1999;17:131-140.

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. SRA- and SET-domain-containing proteins link RNA polymerase V occupancy to DNA methylation. Nature. 2014;507:124-128. DOI: 10.1038/nature12931

Khaitová L.C., Fojtová M., Křížová K., Lunerová J., Fulneček J., Depicker A., Kovařík A. Paramutation of tobacco transgenes by small RNA-mediated transcriptional gene silencing. Epigenetics. 2011;6:650-660.

Law J.A., Du J., Hale C.J., Feng S., Krajewski K., Palanca A.M., Strahl B.D., Patel D.J., Jacobsen S.E. Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1. Nature. 2013;498:385-389. DOI: 10.1038/nature12178

- Liu Z.W., Shao C.R., Zhang C.J., Zhou J.X., Zhang S.W., Li L., Chen S., Huang H.W., Cai T., He X.J. The SET domain proteins SUVH2 and SUVH9 are required for Pol V occupancy at RNA-directed DNA methylation loci. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014;111:7474-7479. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003948
- Luo C., Durgin B.G., Watanabe N., Lam E. Defining the functional network of epigenetic regulators in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant.* 2009;2:661-674. DOI: 10.1093/mp/ssp017
- Lunerová-Bedřichová J., Bleys A., Fojtová M., Khaitová L., Depicker A., Kovařík A. Trans-generation inheritance of methylation patterns in a tobacco transgene following a post-transcriptional silencing event. *Plant J.* 2008;54(6):1049-1062. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03475.x
- Ma C., Mitra A. Intrinsic direct repeats generate consistent post-transcriptional gene silencing in tobacco. *Plant J.* 2002;31:37-49.
- Mari-Ordóñez A., Marchais A., Etcheverry M., Martin A., Colot V., Voinnet O. Reconstructing *de novo* silencing of an active plant retrotransposon. *Nat. Genet.* 2013;45:1029-1039. DOI: 10.1038/ng.2703
- Matzke A.J.M., Neuhuber F., Park Y.-D., Ambros P.F., Matzke M.A. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Mol. Gen. Genet.* 1994;244:219-229.
- Matzke M.A., Mosher R.A. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.* 2014;15:394-408. DOI: 10.1038/nrg3683
- Mette M.F., Aufsatz W., van der Winden J., Matzke M.A., Matzke A.J.M. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* 2000;19:5194-5201.
- Meyer P. Transgenes and their contributions to epigenetic research. *Int. J. Dev. Biol.* 2013;57:509-515. DOI: 10.1387/ijdb.120254pm
- Mosher R.A., Schwach F., Studholme D., Baulcombe D.C. Pol IVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008;105:3145-3150. DOI: 10.1073/pnas.0709632105
- Mourrain P., van Blokland R., Kooter J.M., Vaucheret H. A single transgene locus triggers both transcriptional and post-transcriptional silencing through double-stranded RNA production. *Planta.* 2007;225:365-379.
- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell.* 1990;2:279-289.
- Nuthikattu S., McCue A.D., Panda K., Fultz D., De Fraia C., Thomas E.N., Slotkin R.K. The initiation of epigenetic silencing of active transposable elements is triggered by RDR6 and 21-22 nucleotide small interfering RNAs. *Plant Physiol.* 2013;162:116-1131. DOI: 10.1104/pp.113.216481
- Park Y.-D., Papp I., Moscone E.A., Iglesias V.A., Vaucheret H., Matzke A.J.M. Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J.* 1996;9:183-194.
- Penterman J., Uzawa R., Fischer R.L. Genetic interactions between DNA demethylation and methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2007;145:1549-1557.
- Pontier D., Picart C., Roudier F., Garcia D., Lahmy S., Azevedo J., Alart E., Laudíé M., Karlowski W.M., Cooke R., Colot V., Voinnet O., Lagrange T. NERD, a plant-specific GW protein, defines an additional RNAi-dependent chromatin-based pathway in *Arabidopsis*. *Mol. Cell.* 2012;48:121-132. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.07.027
- Pooggin M. How can plant DNA viruses evade siRNA-directed DNA methylation and silencing? *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:15233-15259. DOI: 10.3390/ijms140815233
- Sallaud C., Meynard D., van Boxtel J., Gay C., Bès M., Brizard J.P., Larmande P., Ortega D., Raynal M., Portefaix M., Ouwerkerk P.B., Rueb S., Delseny M., Guiderdoni E. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theor. Appl. Genet.* 2003;106:1396-1408.
- Smith L.M., Pontes O., Searle I., Yelina N., Yousafzai F.K., Herr A.J., Pikaard C.S., Baulcombe D.C. An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2007;19:1507-1521.
- Vaucheret H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* 2006;20:759-771.
- Vaucheret H. Promoter-dependent trans-inactivation in transgenic tobacco plants: kinetic aspects of gene silencing and gene reactivation. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 1994;316:310-323.
- Velásquez A.C., Chakravarthy S., Martin G.B. Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *Vis Exp.* 2009;28:pii: 1292. DOI: 10.3791/1292
- Wan L.C., Wang F., Guo X., Lu S., Qiu Z., Zhao Y., Zhang H., Lin J. Identification and characterization of small non-coding RNAs from Chinese fir by high throughput sequencing. *BMC Plant Biology.* 2012;12:146. DOI: 10.1186/1471-2229-12-146
- Wassenegger M., Heimes S., Riedel L., Sanger H. RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell.* 1994;76:567-576.
- Wierzbicki A.T., Cocklin R., Mayampurath A., Lister R., Rowley M.J., Gregory B.D., Ecker J.R., Tang H., Pikaard C.S. Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the *Arabidopsis* epigenome. *Genes Dev.* 2012;26:1825-1836. DOI: 10.1101/gad.197772.112
- Wu L., Zhou H., Zhang Q., Zhang J., Ni F., Liu C., Qi Y. DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Mol. Cell.* 2010;38:465-475. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.03.008
- Yang Z., Ebright W.U., Yu B., Chen X. HEN1 recognizes 21–24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucl. Acids Res.* 2006;34:667-675.
- You W., Lorkovic Z.J., Matzke A.J., Matzke M. Interplay among RNA polymerases II, IV and V in RNA-directed DNA methylation at a low copy transgene locus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 2013;82:85-96. DOI: 10.1007/s11103-013-0041-4
- Zhang H., Tang K., Qian W., Duan C.G., Wang B., Zhang H., Wang P., Zhu X., Lang Z., Yang Y., Zhu J.K. An Rrp6-like protein positively regulates noncoding RNA levels and DNA methylation in *Arabidopsis*. *Mol. Cell.* 2014;54:418-430. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.019
- Zhong X., Hale C.J., Law J.A., Johnson L.M., Feng S., Tu A., Jacobsen S.E. DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012;19:870-875. DOI: 10.1038/nsmb.2354
- Zhu Y., Rowley M.J., Bohmdorfer G., Wierzbicki A.T.A. SWI/SNF chromatin-remodeling complex acts in noncoding RNA-mediated transcriptional silencing. *Mol. Cell.* 2013;49:298-309. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.11.011