

УДК 577.21:577.24

## ЭПИГЕНЕТИКА СЕГОДНЯ И ЗАВТРА

© 2013 г. **Б.Ф. Ванюшин**

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия,  
e-mail: vanyush@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 3 июня 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

Эпигенетика – наука о наследуемых свойствах организма, которые не связаны с изменением собственно нуклеотидной последовательности ДНК и могут быть не прямо, а опосредованно закодированы в геноме. К числу известных эпигенетических механизмов (сигналов) относятся: энзиматическое метилирование ДНК, гистоновый код (разные энзиматические модификации гистонов – ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, убиквитинирование и др.) и замалчивание генов малыми РНК (miRNA, siRNA). Обычно все эти процессы взаимосвязаны и иногда даже частично взаимозаменяемы. Это, скорее всего, служит обеспечению надежности реализации соответствующей эпигенетической сигнализации. Так или иначе эти процессы связаны с изменением структурной и функциональной организации хроматина. Метилирование ДНК у растений и животных, осуществляемое сайт-специфическими ферментами – цитозиновыми ДНК-метилтрансферазами, – приводит к возникновению в ней остатков 5-метилцитозина ( $m^5C$ ) в последовательностях CG, CNG и CNN. У растений открыто еще и адениновое метилирование ДНК. Появление остатков  $m^5C$  в ДНК существенно сказывается на взаимодействии ДНК с разными, в том числе и регуляторными, белками. Часто метилирование ДНК блокирует связывание ДНК с такими белками и препятствует транскрипции генов, а иногда оно наоборот является обязательным условием для связывания белков. Существуют даже специальные  $m^5CpG$  ДНК связывающие белки. Связывание таких белков с ДНК аранжирует весь ансамбль белков транскрипционного аппарата и необходимо для его активности. Таким образом, метилирование ДНК может служить сигналом как позитивного, так и негативного контроля за активностью генов. Метилирование ДНК у эукариот видо- и тканеспецифично, оно контролируется гормонами, изменяется с возрастом и является одним из механизмов клеточной и половой дифференцировки. Метилирование ДНК контролирует все генетические процессы (репликация ДНК, репарация, рекомбинация, транскрипция и др.). Нарушение метилирования ДНК и искажение других эпигенетических сигналов приводят к преждевременному старению и таким заболеваниям, как рак, диабет, астма, различные тяжелые психические расстройства и др. Профиль метилирования ДНК изменяется при канцерогенезе, служит надежным диагностическим признаком разных форм рака уже на ранних этапах канцерогенеза. Эпигенетические параметры имеют первостепенное значение для расшифровки механизмов соматической изменчивости, характеристики и идентификации клонов и клеточных культур (стволовые клетки) и их направленной дифференцировки. Целенаправленное изменение метилирования ДНК служит эффективным биотехнологическим средством активации экспрессии генов запасных белков семян у растений и, например, наследуемого увеличения белковости зерна пшениц. Ингибитор метилирования ДНК (5-азациитидин) используется для лечения рака кожи. Разные регуляторы энзиматических модификаций гистонов уже нашли клиническое применение при лечении некоторых болезней человека и животных. Большие надежды возлагаются сегодня на использование специфических малых РНК в терапии рака и других болезней, это преимущественно связывают с направленным ингибированием активности генов, отвечающих за раковую трансформацию клеток и метастазирование. Терапевтическое действие многих коротких биологически активных пептидов во многом может определяться их действием на эпигенетическом уровне. Таким образом, фенотип на самом деле представляет собой продукт совокупной реализации генома и эпигенома. В этой связи вполне справедливо известное выражение Нобелевского лауреата Питера Медавара «Генетика предполагает, а эпигенетика располагает». Эпигенетика является бурно развивающейся, очень

перспективной наукой XXI в., уже основательно проросшей в передовые биотехнологии, медицину и сельское хозяйство.

**Ключевые слова:** апоптоз, гистон, ДНК-метилтрансфераза, ДНК-связывающие белки, геномика, геносистематика, замалчивание генов, клеточная дифференцировка, метилирование ДНК, митохондрии, онтогенез, репликация, рак, старение, транскрипция, хроматин, эволюция, эндонуклеазы, эпигенетика, 5-метилцитозин, N<sup>6</sup>-метиладеннин.

## ВВЕДЕНИЕ

Генетика предполагает, а эпигенетика располагает.

*Питер Медавар, Нобелевский лауреат*

Всякий раз убеждаешься в том, что как будто все ученые и специалисты понимают, что такое эпигенетика, но до сих пор каждый понимает ее по-своему. Термин «эпигенетика» предложен К. Уоддингтоном как изучение причинных механизмов реализации генома (генов) в фенотип. Фенотипические изменения, которые происходят от клетки к клетке во время развития многоклеточного организма, были названы им как «фенотипический ландшафт». На самом деле это очень общее и очень неконкретное понятие (определение), которое, по сути дела, объединяет и обозначает все развитие организма, в том числе и все механизмы онтогенеза. Д. Нэнни (D.L. Nanney) рассматривает эпигенетику как область знания, объясняющую как и почему клетки (организмы) с идентичным генотипом могут различаться по наследуемому фенотипу. Другие (например, Д. Готчлинг, А. Риггс) описывают эпигенетику как науку о наследуемых изменениях, которые не связаны с мутациями собственно в ДНК. С. Эллис определяет эпигенетику как наследуемую «клеточную память», связанную со структурными изменениями хроматина. Это определение хоть и слишком общее и расплывчатое, по сути, очень верно, потому что многое в онтогенезе в конечном итоге определяется именно модуляциями структуры хроматина. Известный генетик Робин Холлидей рассматривает эпигенетику как «изучение контроля за активностью генов во времени и пространстве в процессе развития сложных организмов». Он относится к числу первых, кто указал на возможную биохимическую природу (метилирование ДНК) наследуемых эпигенетических сигналов. Эти сигналы сопутствуют и часто имеют решающее значение в ходе реали-

зации генетической информации. Эпигенетику рассматривают как свод знаний об изменениях в транскрипции генов в результате модуляции организации хроматина без изменения последовательности ДНК. В принципе, пожалуй, этим можно было бы и ограничиться. Мне бы хотелось к этому лишь добавить, что *эпигенетика – это наука о наследуемых свойствах организмов, которые не связаны с изменением собственно нуклеотидной последовательности ДНК, и они могут быть не прямо, а косвенно закодированы в геноме*. Эта бурно развивающаяся область знаний уже основательно встала на ноги, превратилась в самостоятельную науку и уже существенно проросла в современные биотехнологию и медицину. К эпигенетическим феноменам к тому же относят, в частности, явление лизогении у бактериофагов, так называемый эффект положения генов у дрозофилы, прионные болезни, инактивацию X-хромосомы при половой дифференцировке у животных и др. Так или иначе, уже на ранних этапах зарождения эпигенетики ее связывали с реорганизацией (ремодулированием, перестройками) хроматина и модификациями белков хроматина, в том числе гистонов. В 1930 г. Х. Мюллер описал мутации у дрозофилы, которые приводили к изменению фенотипа и были обусловлены, собственно, не изменением, а перемещением генов – перестройкой хромосом («eversporting displacements»). Таким образом, активность гена зависит от его местоположения в геноме, хроматине и хромосоме.

Из классических работ Нобелевского лауреата Джона Гёрдона по пересадке ядер в оплодотворенные безъядерные яйцеклетки шпорцевой лягушки стало ясно, что реализация генетической информации ядерной ДНК (яДНК) и развитие эмбриона не связаны с какими-либо мутациями в яДНК, а запускаются и контролируются некими компетентными эпигенетическими элементами (сигналами)

цитоплазмы. Интересно, что картина реснитчатости у простейшего – парамеции – передается клонально. Установлено, что транспозоны могут определять профиль экспрессии генов в соматических клетках. С другой стороны, большое разнообразие антител в основном связано с перестройками ДНК в соматических клетках. В 1975 г. Артур Риггс, а также Р. Холлидей сообщили о том, что инактивация X-хромосомы и, стало быть, половая дифференцировка у млекопитающих связаны с метилированием ДНК. В России была открыта тканевая (клеточная) разнокачественность метилирования ДНК и было сформулировано представление о том, что метилирование ДНК – механизм регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировки (Vanyushin *et al.*, 1970). На самом деле это был первый материальный химически идентифицированный и расшифрованный эпигенетический сигнал. Теперь уже появилось представление об эпигеноме, так что фенотип любого организма представляет собой суммарную реализацию генома и эпигенома. Уже вошли в употребление понятие и термин *эпимутации*. Наряду с генетическими болезнями существуют эпигенетические заболевания. Нарушения в эпигеноме вызывают рак, диабет, астму, многие психические и другие заболевания. Разумеется, это во многом зависит от среды. Так называемый эпигенетический профиль организма лежит в основе создания картины цифровой патологии (Digital Pathology). Эпигеном существенно изменяется с возрастом. В частности, мы открыли возрастную специфичность метилирования ДНК. Более того, по нашим представлениям, обусловленные метилированием ДНК эпимутации могут лежать в основе запрограммированного старения и определять продолжительность (лимит) жизни. В результате фундаментальных эпигенетических исследований изменились наши представления о генетической идентичности гомозиготных близнецов и клонов животных и растений. Оказалось, что они могут существенно различаться по эпигенетическим профилям. Соматическая изменчивость часто во многом обусловлена изменением именно эпигенетических параметров и сигналов.

Несмотря на грандиозные успехи молекулярной биологии и молекулярной генетики

прошлого века, все еще очень многие важные проблемы общебиологического значения остаются нерешенными. И среди них важнейшими являются клеточная дифференцировка и регуляция активности генов. Мы до сих пор еще до конца не понимаем, как происходит нормальное развитие организма, как изначально клетки, имеющие исходно одинаковую генетическую информацию, в процессе развития идут своим собственным (разным) путем с точной и правильной реализацией в пространстве и времени особых областей генома в специфический фенотип. Как клетка решает, когда ей делиться и начать дифференцироваться? Как бы там ни было, именно эпигенетика позволяет по-новому взглянуть на эти проблемы и найти решение таких животрепещущих загадок биологии, как клеточная идентичность (специфичность), канцерогенез, пластичность стволовых клеток, регенерация клеток и тканей у животных и растений, старение, запрограммированная смерть и др.

Об эпигенетике часто вспоминают, когда речь идет о влиянии внешней среды на экспрессию генов (диета, гормоны и другие факторы и условия среды). Эпигенетика – новый обширный и многообещающий горизонт наших знаний в постгеномную эру. Действительно, мы наследуем нечто большее, чем сумму генов, а по мнению Нобелевского лауреата Д. Уотсона, «что-то еще и кроме последовательностей ДНК». Все это подчеркивает лишний раз, что без эпигенетики невозможно решение главной проблемы биологии – приводных механизмов регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировки при разных условиях среды.

У человека генетическая информация записана в 23 парах хромосом, содержащих примерно 25 000 генов. Геном человека содержит около  $3 \times 10^9$  пар оснований или  $1 \times 10^7$  нуклеосом. Длина ДНК у высших эукариот около 2 м, и она сконденсирована в ядре примерно в 10 000 раз. Около 96 % генома млекопитающих представлено некодирующими и повторяющимися последовательностями ДНК. Здесь имеется очень много всевозможных элементов и факторов для регуляции экспрессии генов: ДНК-связывание с разными, в том числе и регуляторными, белками, метил-СрG ДНК-связывающие и другие белки, разные модификации гистонов, ремодеу-

лирование нуклеосом и перестройка хроматина в целом, гормон-рецепторные комплексы, метилирование ДНК и взаимодействие с короткими некодирующими РНК и др. Для экспрессии генов необходимы большие сложные комплексы и ансамбли из более 100 белков, участвующих в инициации и элонгации транскрипции с одного избранного промотора и в процессинге информационной РНК. Скорее всего, для образования компетентного для транскрипции состояния гена мало только одного какого-то пускового фактора (например, той или иной модификации белка), необходимо суммарное и кумулятивное действие многих факторов для создания должного активного эпигенетического статуса в определенной зоне хроматина. Эпигенетический контроль может промотировать (усиливать) первичный сигнал (стимуляция промотора) или осуществлять сайленсинг генов. Эпигенетическая память часто бывает связана со специфическими модификациями гистонов в хроматине. Такая возникшая уникальная конфигурация хроматина, по-видимому, и может передаваться от клетки к клетке в череде клеточных делений. В частности, это может происходить при сайленсинге генов, этот запрет (конформационный «замок») в определенном участке хромосомы может стать еще более прочным и значимым в результате индуцированного (разрешенного) этим состоянием хроматина дополнительного метилирования ДНК. При этом саму ДНК можно рассматривать как самоорганизующий полимер с упорядоченной структурой в хроматине, способный реагировать и воспринимать разные эпигенетические сигналы.

Факторы среды могут оказывать заметное влияние на активность ферментов (и их кофакторов), осуществляющих модификации гистонов и ДНК. К таким кофакторам относятся: АТФ для киназ, ацетилкоэнзим А для ацетилаз, S-аденозил-L-метионин (SAM) для разных метилтрансфераз. Разумеется, содержание этих кофакторов в клетке может существенно варьировать и зависеть от среды, в том числе и от диеты. Адекватный эпигенетический контроль в клетке формируется на основе баланса множества факторов. И не всегда это с точностью передается при делении клеток. Возникает важный вопрос: как информация о структуре хроматина передается от материнской клетки к

дочерней. В принципе, это может происходить следующим образом. Известно, что синтез «коровых» гистоновых белков четко регулируется в клеточном цикле. Транскрипция генов этих белков происходит в S-фазе клеточного цикла и хорошо скоординирована с репликацией яДНК. По мере сборки вновь образованного хроматина определенные его белки в зависимости от степени и характера их энзиматических модификаций могут связываться (или не связываться) с ДНК с образованием соответственно недоступных или доступных для транскрипции мест. При этом ДНК вновь выступает здесь в качестве самоорганизующей матрицы. Недавно стало известно, что мутации в генах ферментов энзиматических модификаций гистонов приводят к ремоделированию нуклеосом и сопровождаются нарушениями развития организмов и неоплазией. Возникновение опухолей у мутантных мышей с данной патологией традиционно относили к разряду генетических заболеваний. На самом же деле выявленные при этом изменения в характере метилирования гистонов и ДНК, структурные изменения нуклеосом не вызваны непосредственно мутировавшим геном, а поэтому с полным правом должны рассматриваться как эпигенетические aberrации. В равной степени это относится и к мутациям генов синтеза и утилизации SAM: отсутствие SAM приводит к нарушению многих реакций трансметилирования в клетке и инактивации многих ферментов, для которых SAM служит аллостерическим фактором. Это полностью соответствует мысли о том, что эпигенетика в большинстве своем имеет дело с наследуемыми явлениями (свойствами живого), которые не прямо, а косвенно закодированы в геноме. Тем не менее эпигенетика и генетика – два близкородственных феномена или области знаний. В геноме могут быть ценные гены, но в зависимости от того или иного специфического эпигенетического сигнала они вовсе могут и не реализоваться. Вместе с тем, хотя эпигенетические изменения и передаются по наследству, это происходит не бесконечно. Часто клетки стараются вернуться к исходному эпигенетическому статусу, если это им удастся, и эти эпигенетические изменения стираются в ряду поколений. Таких примеров множество. Все еще не очень ясно, могут ли и каким образом эпигенетические параметры или

черты как-то отражаться собственно в зародышевой линии, т. е. в ДНК.

Центральная догма биологии ДНК ↔ РНК → белок – сегодня пополнена новыми знаниями о белках – прионах. Так же, как ДНК и РНК, эти белки способны к репликации, они наследуются без участия матриц ДНК и РНК.

Давно известно, что белки хроматина гистоны подавляют транскрипцию: свободная от них ДНК транскрибируется гораздо лучше, чем связанная с ними ДНК в составе хроматина. Складывалось впечатление, что для эффективной транскрипции нужно «раздеть» ДНК, освободив ее от гистонов, однако В. Олфри и А. Мирский много лет назад показали, что для активации транскрипции неактивного хроматина можно проацетилировать гистоны, что сопровождается значительным ослаблением связи этих белков с ДНК. Уже сформировалось общепринятое представление о существовании так называемого «гистонового кода».

Открыты и описаны модификации гистонов – ацетилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, АДФ-рибозилирование, биотинилирование, сумоилирование, изомеризация пролинового остатка и др.

Если на самом деле и существует гистоновый код, то в отличие от генетического этот эпигенетический код не универсален. У каждого организма он свой.

Эпигенетических сигналов в клетке и организме, по-видимому, очень много, и они весьма разнообразны, многое в этой области еще неизвестно. Тем не менее многие из них уже материализованы и описаны. Среди значимых эпигенетических сигналов, например, сегодня известны:

- метилирование ДНК;
- разнообразные энзиматические модификации гистонов (*гистоновый код*);
- геномные и хромосомные перестройки;
- малые некодирующие РНК (siRNA, или так называемые малые интерферирующие РНК);
- другие.

Эти сигналы, их детальная природа, взаимодействие между ними и вызываемые ими физико-химические эффекты, их результирующее биологическое действие в клетке при разных функциональных состояниях организма и в

разных условиях внутренней и внешней среды и являются главным предметом исследования эпигенетики.

К сожалению, в небольшом обзоре невозможно подробно описать все аспекты эпигенетики. Рассмотрим лишь некоторые из них.

### МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК – ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ КОНТРОЛЯ ЗА ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ФУНКЦИЯМИ ОРГАНИЗМА

Метилирование помогает жизни, но оно может и отнять ее. На самом деле, без метилирования жизнь была бы вообще невозможна.

*Craig Cooney*

Более полувека назад профессор Андрей Николаевич Белозерский предложил мне (студенту кафедры биохимии растений МГУ) изучить нуклеотидный состав ДНК и РНК у нескольких бактерий. Анализ состава этих ДНК в то незабываемое время четко показал, что GC-содержание в ДНК видоспецифично и оно может служить важным таксономическим признаком у бактерий (Спирин и др., 1957). По сути дела, эта работа была одной из тех, которые заложили основы геносистематики. Мир ДНК эукариот в то время был практически незатронутым. Так, например, сведения о составе ДНК у представителей всего растительного царства ограничивались тогда лишь данными по ДНК зародышей пшеницы. Одна из наших задач того времени – хотя бы отчасти ответить на вопрос, каковы же ДНК у этих эукариот. Первые системные исследования состава ДНК у высших растений были выполнены в России, они касались ДНК архегониальных (мхи, плауны, хвощи, папоротники, голосеменные) и цветковых (покрытосеменные, как одно-, так и двудольные) растений.

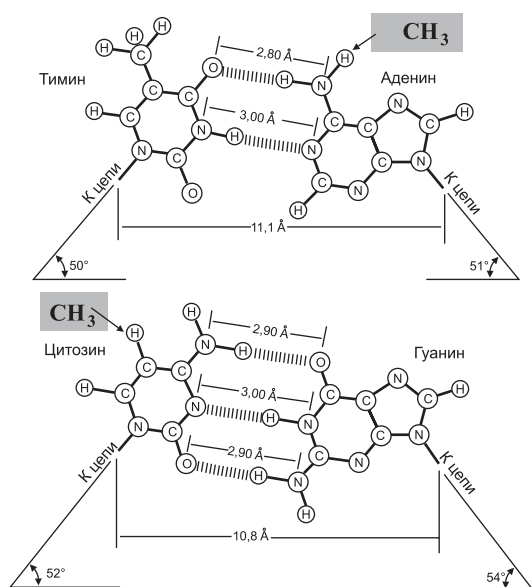
Уже тогда было установлено, что отличительной особенностью ДНК всех высших растений является относительно высокое содержание в них дополнительного основания – 5-метилцитозина ( $m^5C$ ) (табл. 1). Затем в растительных ДНК, как у бактерий, был найден  $N^6$ -метиладенин ( $m^6A$ ).

Долгое время происхождение этих оснований в ДНК оставалось неизвестным. Лишь в 1963 г. были обнаружены изначально у бакте-

**Таблица 1**  
Минорные метилированные  
основания в ДНК

Организмы	Минорные основания, %	
	m <sup>5</sup> C	m <sup>6</sup> A
Бактерии	0,01–1,53	0,02–0,70
Водоросли	0,20–3,50	0,10–0,60
Грибы	+	0–0,5
Простейшие		0,3–1,0
Растения	2,0–10,0	0,5–1,0
Беспозвоночные	0,1–2,5	?
Позвоночные	0,7–3,5	+

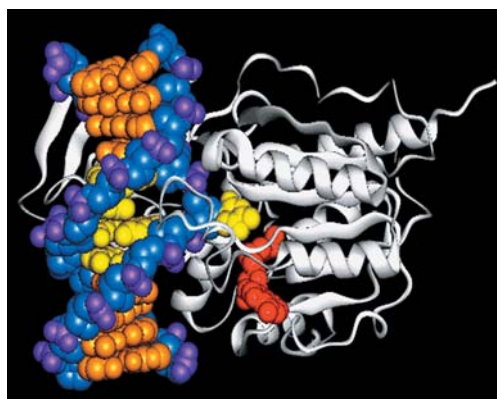
рий, а позже и у эукариот ферменты, которые в присутствии донора метильных групп *S*-аденозилметионина избирательно метилировали отдельные остатки цитозина и аденина в цепях ДНК. Стало ясно, что обнаруживаемые в молекуле ДНК «минорные» основания (m<sup>5</sup>C и m<sup>6</sup>A) не встраиваются в них в готовом виде, а возникают в результате ферментативной модификации (метилирования) соответствующих обычных оснований (рис. 1) в сформированных или формирующихся цепях ДНК. При этом фермент ДНК-метилтрансфераза «ловко расправляется» с ДНК, он образует с ней ковалентно связанный комплекс с выворачиванием наружу из дву-



**Рис. 1.** Канонические WC-пары оснований в ДНК. Стрелками показаны места метилирования оснований.

цепочечной спирали ДНК модифицируемого основания и метилирует это основание (рис. 2). После этого ковалентная связь между ферментом и ДНК рвется, комплекс распадается, а метилированное основание (m<sup>5</sup>C) возвращается на свое прежнее место в структуре ДНК.

Специфичность и функциональное значение ферментативного метилирования ДНК очень многие годы оставались неизвестными. Более того, очень распространенным было представление о том, что эти «минорные» основания вообще не играют никакой роли ни в структуре самой ДНК, ни в ее функционировании. В качестве «неотразимого» аргумента для таких представлений часто использовался излюбленный объект классической генетики – дрозофила. В геноме этого насекомого долго никому не удавалось найти минорные основания, в том числе m<sup>5</sup>C. Это давало многим, в том числе и Нобелевскому лауреату У. Гилберту, повод утверждать, что поскольку дрозофила живет без метилирования ДНК, то эта модификация генома вообще не имеет существенного значения в жизнедеятельности эукариотических организмов. Это на долгие годы охладило у многих биохимиков и молекулярных биологов мира интерес к изучению метилирования ДНК и позволило нам в течение многих лет в более или менее спокойной обстановке шаг за шагом идти по пути исследования метилирования ДНК у разных организмов. В результате было замечено, что геном дрозофилы характеризуется значительным дефицитом CpG-последовательностей, служащих обычно основным сайтом



**Рис. 2.** Комплекс цитозиновой ДНК-метилтрансферазы с ДНК.

при *in vivo* метилировании ДНК у эукариот. По нашему мнению, такая выраженная CpG-супрессия в геноме дрозофилы могла быть обусловлена только метилированием в ней цитозинового остатков. Поскольку обнаружить собственно ДНК-метилтрансферазную активность у дрозофилы в то время нам не удавалось, мы назвали такую возможную модификацию ДНК у этого насекомого «ископаемым» метилированием ДНК. Сейчас другими специалистами уже четко доказано, что у дрозофилы ДНК метилирована и эта модификация генома важна для развития насекомого, а ДНК-метилтрансферазная активность четко выявляется на ранних стадиях развития насекомого.

Мы всегда были убеждены в том, что минорные основания в ДНК и сама энзиматическая модификация генома не могут быть бесследными в структуре генома и обязательно должны сказываться на его биологических функциях.

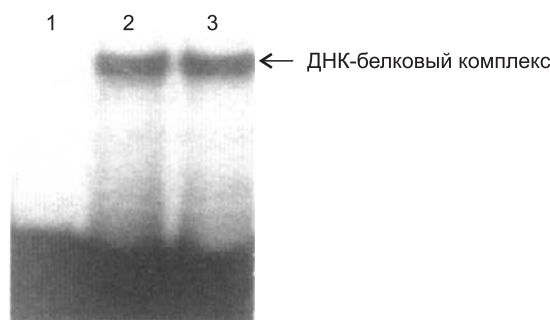
### МЕТИЛИРОВАНИЕ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА СТРУКТУРУ ДНК И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С БЕЛКАМИ

Нам удалось найти такую необычную природную двуязычную ДНК (ДНК бактериофага AR9 *Bac. brevis*), у которой вместо обычного для ДНК тимина присутствует характерное для РНК основание – урацил. Так что урацил прекратил свое существование в качестве принципиально отличительного признака РНК. Грубо говоря, урацил – это тот же тимин, но без метильной группы. Урацилсодержащая ДНК бактериофага AR9 плавилась (денатурировала) при гораздо более низкой температуре, чем эквивалентная ей по составу нормальная ДНК, содержащая тимин. Стало ясно, что метилирование остатков цитозина небезразлично для самой структуры ДНК. Это было первым надежным указанием на то, что метильные группы пиримидиновых оснований в ДНК стабилизируют ее вторичную структуру. Еще более привлекательным оказалось то, что метилирование ДНК ощутимо сказывается на ее взаимодействии (связывании) с различными белками. В частности, в ядрах растений нами выявлены белки, специфически связывающиеся с регуляторными элементами генов рРНК (135 bp subrepeat element), и продемонстрировано, что связывание некоторых из

этих ядерных белков модулируется метилированием *in vitro* цитозинового остатков ДНК. Во многих случаях метилирование ДНК по цитозиновым остаткам препятствует связыванию со специфично реагирующими с ДНК ядерными белками (факторами), которые осуществляют разные генетические процессы, в том числе транскрипцию, репликацию и репарацию ДНК. Так, например, предварительное метилирование второго цитозинового остатка в CCGG сайте во фрагменте гена рибосомной РНК пшеницы лишало его способности связывать один из ядерных пшеничных белков (рис. 3). С другой стороны, известны и так называемые m<sup>5</sup>CpG ДНК-связывающие белки, которые специфично аранжируют на ДНК весь ансамбль сложных белковых комплексов, контролирующих и осуществляющих экспрессию генов.

### НЕЭНЗИМАТИЧЕСКОЕ МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК

Если ДНК без всяких белков проинкубировать с меченым по метильной группе S-аденозил-L-метионином (SAM, AdoMet), то через некоторое время его радиоактивность обнаруживается уже в составе ДНК в виде вновь возникших в ней остатков 5-метилцитозина и тимина. Так, было открыто неэнзиматическое метилирование ДНК (рис. 4). Интересно, что при этом меченый тимин в ДНК обнаруживался в гораздо более заметных количествах, чем m<sup>5</sup>C. Тем самым



**Рис. 3.** Связывание ядерного белка пшеницы с DCR фрагментом (174 пар оснований) гена пшеничной рРНК блокируется метилированием *in vitro* CCGG сайта ДНК-метилтрансферазой HpaII.

1 – Фрагмент рРНК предварительно метилирован с помощью HpaII. 2, 3 – комплекс фрагмента гена рРНК с белком.

было выявлено, что неэнзиматическое метилирование ДНК в водном растворе сопровождается быстрым окислительным дезаминированием возникших остатков  $m^5C$  с превращением их в остатки тимина. Это явилось доказательством того, что метилирование остатков цитозина в ДНК может приводить к  $C \rightarrow T$  транзиции (GC-пара оснований заменяется AT-парой), а остатки 5-метилцитозина служат «горячими» мутационными точками. Само это явление лежит в основе заметного частичного исчезновения (супрессии) некоторых CpG последовательностей из генов и геномов разнообразных организмов и является одним из магистральных путей природного мутагенеза и эволюции.

### СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Существование в природе потенциальной возможности метилирования ДНК, по-видимому, и было использовано появившимися в эволюции особыми белками-ферментами ДНК-метилтрансферазами, которые в отличие от хаотичного неэнзиматического метилирования ДНК модифицируют цитозиновые или адениновые остатки в строго определенных нуклеотидных последовательностях. Мы расшифровали одну из самых первых таких метилируемых нуклеотидных последовательностей в ДНК у бактерий. В клетках бацилл *Bac. brevis* цитозиновая ДНК-метилтрансфераза метилирует цитозиновые остатки в последовательности (5') GCTGC (3'). Позднее это было подтверждено в работах Нобелевского лауреата Р. Робертса. Оказалось, что метилирование ДНК у бактерий лежит в основе явления так называемой хозяйской рестрикции-модификации. Это явление, в частности, означает, что выращенный в клетках того или иного бактериального штамма бактериофаг приобретает хозяйскую специфичность и способен заражать клетки только этого хозяина (рестрикция – ограничение круга хозяев), поскольку ДНК бактериофага метилирована хозяйскими бактериальными ДНК-метилтрансферазами и тем самым защищена от гидролиза чувствительными к такому метилированию ДНК хозяйскими ферментами эндонуклеазами. В известной мере эти данные наряду с другими



Рис. 4. Неэнзиматическое метилирование ДНК.

послужили обоснованием химической природы явления хозяйской рестрикции-модификации у бактерий. До этого мы убедились в том, что ДНК у разных бактерий метилирована по-разному, и выявили штаммовую и видовую специфичность метилирования генома у микроорганизмов. Более того, было показано, что характер метилирования ДНК у бактерий изменяется при диссоциации (R-, S-формы) и спорообразовании. Пожалуй, эти данные явились одними из самых первых указаний на то, что метилирование ДНК связано с клеточной дифференцировкой у микроорганизмов.

Предстояло еще выяснить, какова химическая и биологическая специфичность метилирования ДНК у эукариотических организмов, в том числе у растений и животных. Еще до появления методов секвенирования ДНК при анализе выщепляемых из ДНК пиримидиновых последовательностей (блоки) нам удалось показать, что в геноме растений 5-метилцитозин содержится в последовательностях Pu- $m^5C$ -Pu, Pu- $m^5C$ -T-Pu, Pu- $m^5C$ -C-Pu и Pu- $m^5C$ - $m^5C$ -Pu (Кирнос и др., 1981). Это совпало с появившимися позднее данными группы А. Разина (Израиль) о метилировании остатков цитозина в CG и CNG сайтах в растительных и животных ДНК. По нашим данным, в геноме растений значительная доля (около 30 %) 5-метилцитозина содержится именно в последовательностях  $m^5CNG$  (Кирнос и др., 1981). Существование  $m^5C$  в CNG сайтах, в особенности у животных, долгое время вообще не признавалось и первые сообщения об этом даже вызывали резкое недоверие и неприятие. Между тем такое метилирование ДНК действительно осуществляется и в животных клетках, и оно имеет существенное биологическое значение. Метилирование цитозиновых остатков в этих и асимметричных последовательностях в основном и наблюдается при индуцированном малыми двутяжевыми



РНК метилировании ДНК, сопряженном с инактивацией генов. У растений выявлен фермент, который метилирует цитозиновые остатки в любом контексте, за исключением CpG. Таким образом, в принципе, природа химической специфичности метилирования ДНК у растений и животных установлена.

У растений арабидопсиса довольно сильно метилирована ДНК центромерной и периферической областей гетерохроматина, в особенности это касается транспозонов и других повторяющихся последовательностей. ДНК эухроматина метилирована гораздо меньше,  $m^5C$  найден как в межгенных областях, так и в отдельных генах. Около 55 %  $m^5C$  содержится в CG, 23 % – в CNG и 22 % – в CNN-последовательностях (Vanyushin, Ashapkin, 2011). Все три типа метилированных последовательностей найдены в повторах центромерных областей хроматина, а тела генов почти исключительно метилированы по CG сайтам. Соответствующие кодирующие siRNA области генома содержали значительное количество остатков 5-метилцитозина в CG, CNG и CNN сайтах. Более 60 % экспрессируемых генов неметилированы вовсе. 5'- и 3'-концевые проксимальные части метилированных генов относительно гипометилированы. Неметилированные гены обычно транскрибируются весьма умеренно, и они значительно обогащены генами, кодирующими факторы транскрипции. Гены с метилированным промотором транскрибируются относительно слабо и тканеспецифично. При всех обстоятельствах метилирование промотора имеет большее значение для инактивации (сайлесинга) генов, чем метилирование собственно тела гена (Vanyushin, Ashapkin, 2009, 2011). Профиль метилирования ДНК у тройных *drm1 drm2 cmt3* мутантов арабидопсиса незначительно отличался от такового у растений дикого типа, и более 90 % метилируемых сайтов оказались метилированными. Таким образом, у растений существует мощная компенсаторная система защиты статуса метилирования генома от выпадения функций отдельных генов ДНК-метилтрансфераз.

Что касается биологической специфичности метилирования ДНК у эукариот, мы уже давно знали, что оно видоспецифично: у многих беспозвоночных степень метилирования генома очень мала; как уже упоминалось,

в ДНК дрожозофилы долгое время  $m^5C$  вообще не могли обнаружить, а у позвоночных в ДНК  $m^5C$  всегда обнаруживается в ощутимых количествах, в ДНК растений его уже вовсе нельзя назвать «минорным» основанием: часто в этих ДНК  $m^5C$  по количеству вполне сопоставим с цитозином. Например, в сателлитной ДНК у пророски почти весь цитозин представлен его метилированным производным ( $m^5C$ ).

Мы установили, что у животных и растений наряду с видовой существуют также тканевая (клеточная) (Vanyushin *et al.*, 1970), субклеточная (органонидная) и возрастная (Бердышев и др., 1967) разнокачественность (специфичность) метилирования ДНК. Один из наших американских коллег, Крейг Куни, признавал, что русские показали, что метилирование ДНК у животных уменьшается с возрастом. Это было интригующим указанием на то, что старение и уменьшение метилирования ДНК идут «рука об руку». Означает ли это, что существует связь между старением клеток и уменьшением уровня метилирования ДНК? Скорее всего, да. Б.Ф. Ванюшин с коллегами первыми показали еще в 1960-х годах, что у горбуши уровень метилирования ДНК уменьшается с возрастом (Бердышев и др., 1967). Они же показали, что это также происходит и в большинстве органов у стареющих коров и крыс (Vanyushin *et al.*, 1973). Позднее несколько групп ученых в США и Японии обнаружили, что и у мышей при старении уменьшается метилирование ДНК (Cooney, 1999). Теперь возрастное падение уровня метилирования ДНК стало вполне очевидным, и некоторые исследователи даже склонны считать, что степень метилирования ДНК может служить некими биологическими часами, по которым можно судить о возрасте и прогнозировать продолжительность жизни. Искажение метилирования ДНК может приводить к преждевременному старению. По нашему мнению, обусловленный метилированием ДНК эпимутагенез служит механизмом запрограммированного старения и фенотоза. Мы нашли существенные возрастные изменения в характере метилирования ДНК и у растений. Метилирование ДНК у растений изменяется в течение всего онтогенеза, начиная с прорастания семян вплоть до конечных стадий развития растения, в том числе и при апоптозе и фенотозе (*термин*

предложен В.П. Скулачевым) – запрограммированной гибели организма, которая особенно ярко и иногда даже «драматично» выражена у монокарпических растений. Мне довелось самому много лет назад видеть в Батумском ботаническом саду очень грустную картину: вымершую в одночасье вскоре после цветения большую многолетнюю «плантацию» бамбука. Как и у нерестящейся горбуши (Бердышев и др., 1967), запрограммированная гибель растений бамбука сопровождалась глобальным уменьшением степени метилирования ДНК во всех органах. Скорее всего, это общебиологическое явление, и, по-видимому, оно определяется гормональным контролем как у животных, так и у растений. Так что «флориген» М.Х. Чайлахяна может быть ответственным не только за индукцию цветения, но и за феноптоз в результате модуляции фитогормонами метилирования генома.

Мы обнаружили, что в разных клетках одного и того же организма ДНК метилирована по-разному, и, следовательно, метилирование генома связано с клеточной дифференцировкой. Это позволило нам первыми заявить, что метилирование ДНК – механизм регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировки (Vanyushin *et al.*, 1970). Эта и другие наши работы привлекли очень большое внимание многих исследователей в нашей стране и за рубежом и послужили толчком к интенсивному исследованию метилирования ДНК во всем мире.

Установлено, что в митохондриях и ядре одной и той же клетки ДНК метилированы по-разному. В митохондриальной ДНК сердца быка обнаружен 5-метилцитозин. Наряду с этим нами была выделена цитозиновая ДНК-метилтрансфераза из митохондрий животных и показано, что этот фермент обладает иной сайтовой специфичностью действия по сравнению с ядерной ДНК-метилтрансферазой. Так, была открыта субклеточная (органелльная) специфичность метилирования ДНК. В отличие от животных у растений мы не нашли 5-метилцитозин в ДНК митохондрий, зато в них обнаружен N<sup>6</sup>-метиладенин. В отличие от сильно метилированных ядерных ДНК высших растений, их хлоропластные ДНК неметилированы. Имеются единичные сведения о том, что ДНК иных пластид (лейкопласты, хромо-

пласты, амилопласты) высших растений могут содержать разные минорные метилированные основания, и предполагается, что метилирование ДНК может участвовать в дифференцировке пластид, однако эти данные и предположения пока еще никем не подтверждены.

### ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ

У растений обнаружено как минимум три класса цитозиновых ДНК-метилтрансфераз и более дюжины генов, кодирующих ДНК-метилтрансферазы (табл. 2, рис. 5) (Finnegan *et al.*, 2000; Vanyushin, Ashapkin, 2009). Это гораздо больше, чем у всех известных эукариот.

### ЦИТОЗИНОВЫЕ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ КЛАССА МЕТИ

Эти ферменты осуществляют так называемое поддерживающее метилирование CpG сайтов при репликации ДНК, в целом обеспечивая сохранение и передачу по наследству общей картины (pattern) метилирования этих сайтов в геноме. Поэтому неудивительно, что гены *MET1* экспрессируются во всех органах (рис. 6), а собственно само тело этих генов как у растений дикого типа, так и у разных трансгенных растений арабидопсиса практически неметилировано (рис. 7). Это же свойственно и гену главной поддерживающей метилирование CpNpG сайтов ДНК-метилтрансферазы СМТ3. Экспрессия этого гена весьма консервативна: у трансгенных линий арабидопсиса с антисмысловой конструкцией *MET1* под индуцибельным промотором экспрессия этого гена значительно не изменяется в зависимости от индукции конструкта.

### ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ РАЗНЫХ КЛАССОВ

Хотя вопрос об участии отдельных метилаз в осуществлении метилирования ДНК того или иного типа в последние годы в значительной мере прояснился, однако во многом неизученным остается значение самого существования различных типов метилирования ДНК. В меньшей степени это относится к метилированию

Таблица 2

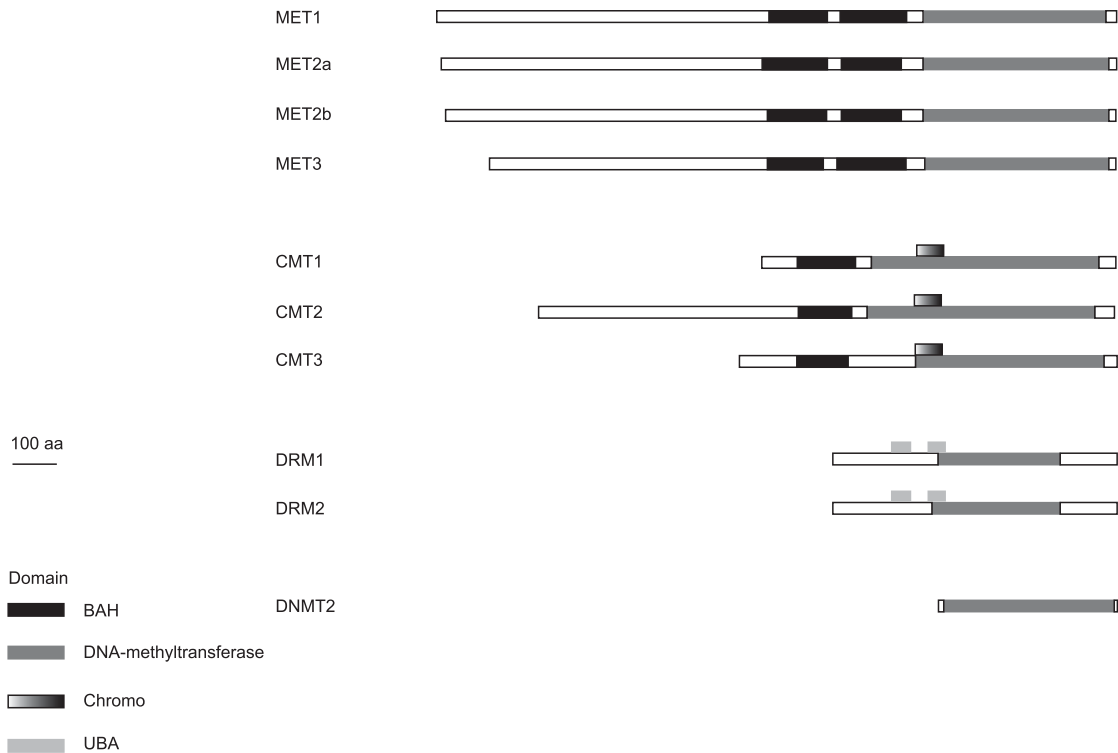
## Цитозиновые ДНК-метилтрансферазы растений

Семейство	Сокращенное наименование	Синонимы	Локус, координаты, nts	Наличие доменов	Экспрессия	Функция
MET	<b>MET1</b>	MET1, DMT1, DDM2	AT5G49160, 19949456–19955595	BAH (2) m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Во всех органах, особенно активно делящихся	<b>Главная поддерживающая CpG-метилаза</b>
	MET2a	METII, MET2, DMT2	AT4G14140, 8146340–8152126	BAH (2) m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Аналогично MET1, но в 10000 раз слабее	Не установлена
	MET2b	DMT8, METIIb	AT4G08990, 5764778–5770493	BAH (2) m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Не изучена	Не установлена
	MET3	DMT3, METIII	AT4G13610, 7915018–7921227	BAH (2) m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Не изучена	Неизвестна, у экотипа Columbia поврежден
CMT	CMT1	DMT4	AT1G80740, 30347286–30351940	BAH, Chromo, m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Не обнаружена	Неизвестна, у экотипа Columbia поврежден
	CMT2	DMT5	AT4G19020, 10414537–10421211	BAH, Chromo, m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Аналогично MET1, но в ~10 раз слабее	<b>Вторая поддерживающая CpNpG-метилаза</b>
	<b>CMT3</b>	DMT6	AT1G69770, 26251990–26257248	BAH, Chromo, m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Во всех органах, особенно в частях цветка	<b>Главная поддерживающая CpNpG-метилаза</b>
DRM	DRM1	DMT9	AT5G15380, 4991350–4994829	UBA (2) m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Не обнаружена	Вторая <i>de novo</i> ДНК-метилаза?
	<b>DRM2</b>	DMT7	AT5G14620, 4715256–4718707	UBA (2) m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Во всех органах	<b>Главная <i>de novo</i> ДНК-метилаза</b>
	DRM3	DMT10	AT3G17310, 5909007–5913248	m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Не обнаружена	Не установлена

CpG-типа и, соответственно, к ферментам класса MET1. Сама MET1, без сомнения, является главной поддерживающей ДНК-метилтрансферазой у растений. Это подтверждается не только ее высокой гомологией с поддерживающей метилтрансферазой животных Dnmt1, но и характером экспрессии. Она преимущественно экспрессируется в делящихся клетках меристематических зон. Трансгенные растения, содержащие антисенс-конструкции к MET1, как и растения с мутацией в консервативном

мотиве I гена MET1, имеют сниженный уровень метилирования уникальных и повторяющихся последовательностей ДНК. При этом уменьшение метилирования касается в основном сайтов CpG, но оно затрагивает, хотя и в меньшей степени, и метилирование сайтов CpNpG.

Основной, если не единственной, мишенью метилирования ДНК-метилтрансферазой MET1 является симметричная последовательность CpG. Уменьшение степени метилирования последовательностей CpNpG при введении в

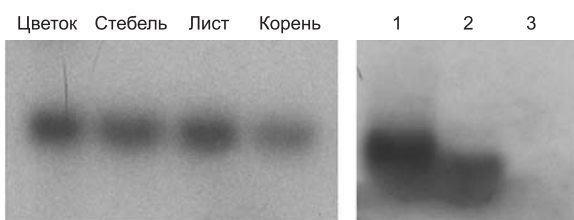


**Рис. 5.** Семейство цитозиновых ДНК-метилтрансфераз *Arabidopsis thaliana* (Vanyushin, Ashapkin, 2009. 152 p.).

растения антисенс-конструктов *MET1* может быть не прямым эффектом, а опосредованным другими метилтрансферазами. У гомозиготных самоопыляющихся линий растений, дефектных по *MET1* и, соответственно, по метилированию CpG-типа, наблюдаются прогрессивные нарушения морфогенеза. Это представляется вполне логичным следствием постепенно накапливающихся аномалий в регуляции тканеспецифической транскрипции генов в результате утраты метилированных сайтов в их регуляторных участках. Однако в действительности все обстоит несколько сложнее. В клетках таких растений на фоне общего снижения степени метилирования ДНК часто наблюдается локальное гиперметилирование некоторых генов (например гена *Superman*), сопровождающееся характерными фенотипическими проявлениями (гомейоти-

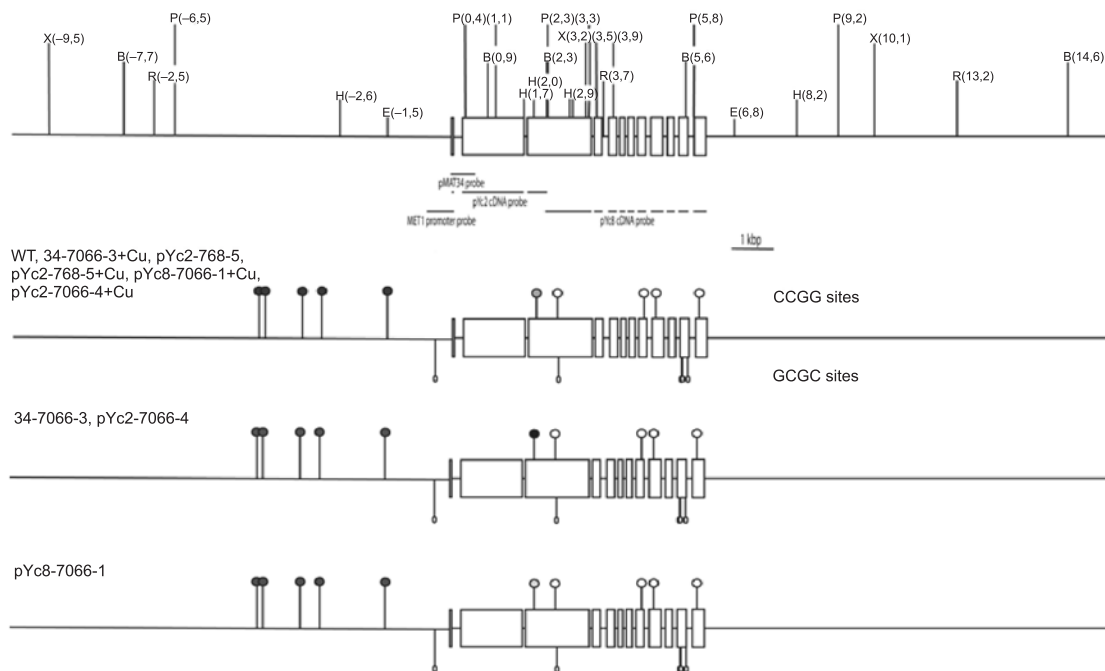
ческие трансформации цветка). Мишенью гиперметилирования в таких растениях служат остатки цитозина в асимметричных CpNpN и симметричных сайтах CpA/TrG, но никогда не служат в симметричных сайтах CpG.

При спонтанных эпимутациях гена *Superman* в растениях с активной ДНК-метилтрансферазой *MET1* (так называемые *clark kent* аллели) наблюдается гиперметилирование ДНК по сайтам всех типов. Исследование растений, у которых активность метилтрансферазы *MET1* существенно снижена с помощью трансгенных антисенс-конструктов или мутаций по самому гену *MET1*, в течение ряда последовательных поколений обнаружено постепенное накопление все более выраженных аномалий развития, которые постепенно исчезали при восстановлении активности *MET1* путем возвратного



**Рис. 6.** Транскрипция гена *MET1* у *Arabidopsis thaliana* (Ашапкин и др., 2011. С. 320–331).

1 – дикий тип; 2 – трансгенное растение без индукции антисмысловой *MET1* конструкции; 3 – то же растение после обработки Cu.



**Рис. 7.** Характер цитозинового метилирования гена *MET1* у *Arabidopsis thaliana* (Ашпкин и др., 2011. С. 320–331).

WT – растения дикого типа. Остальные – наши трансгенные растения (мутанты) с антисмысловой конструкцией гена ДНК-метилтрансферазы *MET1* под индуцибельным промотором. + Cu – растения обработаны индуктором (Cu). Черные кружки – найденные метилированные сайты, серые кружки – частично метилированные сайты, пустые кружки – неметилированные сайты.

скрещивания с растениями дикого типа. Значит, причиной аномалий является не собственно подавление активности ДНК-метилтрансферазы, а постепенное накопление аномального недометилирования в генах, регулирующих развитие.

Можно считать установленным, что *MET1* является главной поддерживающей CpG ДНК-метилтрансферазой, прямо или косвенно участвующей в регуляции транскрипции многих генов. Анализ ряда ноль-мутантов арабидопсиса по гену *SMT3* (получены как супрессоры эпимутаций гена *Superman*) показал, что в них практически полностью утрачено метилирование геномной ДНК по симметричным сайтам CpNpG, но практически не затронуто метилирование по сайтам CpG. Аналогичную картину наблюдали и при анализе метилирования ДНК у мутантов кукурузы по гену *Zmet2*, являющемуся гомологом генов *SMT1* и *SMT3* арабидопсиса. По-видимому, *SMT3* является поддерживающей CpNpG-метилтрансферазой. Степень уменьшения метилирования асимметричных

сайтов варьирует у разных линий мутантных растений в широких пределах и, по-видимому, является непрямым эффектом. При сравнении фенотипа ноль-мутантов по генам метилтрансфераз *MET1* и *SMT3*, а также характера экспрессии и метилирования ряда генов оказалось, что для супрессии активности гена *Superman* существенно метилирование по сайтам CpNpG, но не CpG, в то время как для гена *fwa* картина прямо противоположная. Иными словами, экспрессия каждого конкретного гена у растений может зависеть от метилирования любой из двух поддерживающих ДНК-метилтрансфераз. Заметим, однако, что в целом фенотипические последствия инактивации *MET1* существенно более выражены, чем эффекты инактивации *SMT3* (Vanyushin, Ashapkin, 2009).

Очевидными кандидатами на роль ферментов, ответственных за метилирование асимметричных последовательностей в ДНК растений, являются метилтрансферазы семейства DRM. Действительно, сохранение метилирования сайтов этого типа предполагает постоянное их

метилирование *de novo*, а именно DRM метилтрансферазы являются гомологами *de novo* метилтрансфераз животных. Кроме того, метилирование асимметричных сайтов практически не затронуто у многих линий растений с ноль-мутациями по генам *MET1* и *СMT3*. У двойных ноль-мутантов *drm1 drm2* арабидопсиса полностью отсутствует *de novo* ДНК-метиلاзная активность, необходимая для инактивации трансгенов. Однако прямой анализ метилирования ряда индивидуальных последовательностей ДНК у таких мутантов обнаружил, что метилирование асимметричных сайтов полностью элиминировано в одних локусах, но лишь частично – в других. С другой стороны, в некоторых локусах частично элиминировано также метилирование по сайтам CpNpG. У тройных мутантов *drm1 drm2 cmt3* полностью элиминировано метилирование по асимметричным сайтам и сайтам CpNpG и практически не затронуто метилирование по сайтам CpG. Добавим также, что ни у двойных *drm1 drm2* мутантов, ни у одинарных *cmt3* мутантов не наблюдалось заметных морфологических аномалий, в то время как у тройных *drm1 drm2 cmt3* мутантов таких аномалий множество. Это доказывает то, что функции DRM и СMT3 взаимозависимы и локус-специфичны.

При изучении биологической роли разных ДНК-метилтрансфераз до сих пор практически не учитывалось их взаимное влияние как на уровне транскрипции кодирующих их генов, так и на уровне самих реакций метилирования ДНК. Между тем существование таких влияний не вызывает сомнений: во-первых, от метилирования ДНК зависит транскрипция многих генов, в том числе и генов самих ДНК-метилтрансфераз, во-вторых, все реакции энзиматического метилирования ДНК зависят от ее метилированности по тем или иным сайтам, т. е. метилирование ДНК одной метилтрансферазой может и должно влиять на ее последующее метилирование другими метилтрансферазами. Более того, в клетках высших растений (и других эукариот), по-видимому, существует единая сложно организованная целая система эпигенетической регуляции активности генов. Все три типа метилирования ДНК тесно «увязаны» не только друг с другом, но и с двумя другими глобальными эпигенетическими системами, а именно системой модификации

гистонов и системой регуляции экспрессии генов малыми РНК. Так, например, активность Lys-9 метилазы гистона H3 необходима для метилирования сайтов CpNpG метилтрансферазой СMT3, а само метилирование гистона H3 по остатку Lys-9 зависит от метилирования ДНК по сайтам CpG метилтрансферазой MET1. Показано также, что именно малые РНК являются тем самым давно искомым элементом сайт-специфического узнавания, который обеспечивает точное «наведение» цитозинового *de novo* ДНК-метилтрансферазы на определенные последовательности ДНК.

Для углубленного изучения роли ДНК-метилтрансфераз и метилирования генома у растений мы задались целью получить трансгенные растения арабидопсиса, которые содержат в геноме экспрессируемые под разными индуцибельными промоторами (медь-, этанол- и стероид-зависимый) антисмысловые конструкции для всех известных генов растительных ДНК-метилтрансфераз. В принципе это могло дать нам действительно уникальную возможность выключать каждый из этих генов в любой последовательности и любой комбинации практически на любом этапе развития растения по нашему выбору. В результате мы получили целую коллекцию таких трансгенных растений арабидопсиса. Действительно, под воздействием индукторов нам удалось избирательно инактивировать гены соответствующих ДНК-метилтрансфераз, в том числе и MET1 (рис. 6). Оказалось, что разные типы метилирования ДНК влияют друг на друга. Так, наличие метилированного CG сайта увеличивает вероятность метилирования близлежащих сайтов CNG, а наличие метилированного CNG сайта увеличивает вероятность метилирования близлежащих сайтов CNN. У ноль-мутантов *met1* на фоне общего снижения уровня метилирования ДНК часто гиперметилованы промоторы некоторых генов по сайтам CNG и CNN.

У комбинированных мутантов *met1-drm1-drm2* заметно увеличено метилирование CNG в структурной части многих генов, как бы отчасти «заменяя» исчезнувшее CpG метилирование. Таким образом, множество ДНК-метилтрансфераз и их генов у растений, по-видимому, имеет взаимный компенсаторный смысл, обеспечивая надежную модификацию генома при различ-

ных, в том числе и неблагоприятных, условиях внешней среды и при возможной инактивации отдельных элементов энзиматического эпигенетического контроля.

При изучении полученных нами трансгенных растений арабидопсиса мы столкнулись с рядом непредвиденных обстоятельств и проблем. Так, у трансгенных растений с активными антисмысловыми конструктами генов цитозинового ДНК-метилтрансфераз морфологических изменений может сразу и не быть или же они появляются в последующих поколениях. В ходе селекции устойчивых homozygotных трансгенных линий арабидопсиса их фенотипические характеристики могут заметно изменяться. Нередко селекция таких растений невозможна из-за нарушений формирования и созревания семян. Вопреки нашим ожиданиям, инактивация генов-мишеней антисенсами может быть необратимой, т. е. сохраняться и в отсутствие индуктора. Наконец, эффекты выключения генов могут быть не следствием отсутствия собственно той или иной ДНК-метилтрансферазы, а результатом действия на другие эпигенетические механизмы.

### ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Поскольку мы волей судеб оказались одними из первых, кто задался вопросом о биологической роли метилирования ДНК на фоне общего скепсиса относительно значения этой модификации генома, нам пришлось выбирать и использовать самые разные биологические модели для доказательства исключительной роли метилирования ДНК в жизнедеятельности организмов. Изначально мы исходили из принципа, что если метилирование ДНК имеет какие-либо биологические функции, то оно само, скорее всего, не может оставаться «равнодушным» к этим функциям и должно, по крайней мере, более или менее специфично изменяться при их индукции. Так, мы пришли к таким индуцируемым моделям, как гидрокортизон–печень и обучение (память)–нейрон. И действительно, оказалось, что после введения животному гидрокортизона в его печени сильно изменяется характер метилирования ДНК и это сопряжено с индукцией в ней разных генов. Нами установлено, что при

обучении в нейронах, а не других клетках мозга, изменяется характер метилирования ДНК. Найденные изменения в ДНК при обучении – одно из первых указаний на участие генома в формировании памяти.

У растений метилирование ДНК сильно изменяется при прорастании семян, переходе к цветению, после заражения разными грибами и вирусами и при поражении растениями-паразитами. Стало понятно, что инфекционные агенты могут тонко воздействовать на организм растения, подчиняя его своим «прихотям» путем модуляции метилирования хозяйской ДНК.

Еще в 1977 г. русские сравнили характер метилирования ДНК в клетках крови у нормальных и больных лимфолейкозом коров. В целом уровень метилирования ДНК у больных этим видом рака крови животных оказался ниже. Это было одним из самых первых свидетельств того, что метилирование ДНК, по крайней мере, как-то участвует в этой болезни либо в качестве ее причины, либо в качестве следствия (Cooney, 1999). Действительно, в лимфоцитах крови крупного рогатого скота при хроническом лимфолейкозе характер метилирования генома резко изменяется. На фоне очень высокой ДНК-метилтрансферазной активности степень тотального метилирования ДНК в раковых (лейкозных) клетках животных существенно ниже, а палиндромных последовательностей наоборот гораздо выше, чем в нормальных клетках. В ядрах лимфоцитов крови лейкозных коров были обнаружены, по крайней мере, две ДНК-метиلاзные активности, одна из которых резко отличалась по сайтовой специфичности действия от ДНК-метилазной активности из клеток здоровых коров. Все это и позволило нам в числе первых обоснованно заявить, что нарушение метилирования ДНК – путь к раку. Теперь это стало истиной и получило подтверждение и развитие в работах С. Бейлина, Р. Ениша, П. Джонса, П. Пфайфера, М. Эрлих (все из США), Я.И. Бурьянова, Ф.Л. Киселева и многих других, а сведения о характере метилирования генов – ранний диагностический признак рака.

У растений метилирование ДНК контролируется разными фитогормонами и специфическими регуляторами роста и развития растений. Под действием разных фитогормонов у расте-

ний заметно уменьшается глобальное метилирование ДНК в клеточном цикле (Ванюшин, 2009). Кроме того, фитогормоны подавляют метилирование вновь синтезируемых цепей ДНК, не влияя на метилирование фрагментов Оказаки (табл. 3). Так, впервые было установлено, что фитогормоны действуют на геном растений путем модуляции его метилирования. Более того, мы считаем, что именно модуляция метилирования ДНК является одной из ведущих сторон действия гормонов у растений и животных. Не исключено, что гормон-рецепторные комплексы могут конкурировать за места связывания и метилирования генома соответствующими ДНК-метилтрансферазами.

Мы всегда рассматривали метилирование ДНК как способ негативного или позитивного контроля за активностью генов. В большинстве случаев метилирование ДНК инактивирует гены, однако уже имеются примеры того, что метилирование отдельных генов индуцирует их активность как у микробов (ген *tom*), так и у растений. Так, например, метилирование гена *pMADS3* у петунии стимулирует его экспрессию. Механизмы этой стимуляции экспрессии гена не известны. Предполагается, что метилирование CG сайта, по-видимому, препятствует сайт-специфическому связыванию некоего репрессора с сайленсерным элементом и таким образом стимулирует экспрессию гена. Метилирование 12 CG сайтов в тройном тандемном повторе у гена *PHERES1* арабидопсиса является обязательным условием экспрессии отцовского аллеля. Предполагается, что замалчивание материнского аллеля с геном *PHERES1* в центральной клетке женского гаметофита осуществляется деметилированием с помощью гликозидазы DME. Пока это лишь немногочисленные примеры того, что метилирование ДНК позитивно влияет на транскрипцию генов у растений. Как правило, подавление метилирования ДНК у мутантов с дефектами метилирования генома или под влиянием ингибиторов ДНК-метилтрансфераз сопровождается наследуемыми фенотипическими изменениями, вызванными эктопической реактивацией разных молчащих генов.

Метилирование цитозинового остатка в ДНК растений вовлечено в замалчивание повторяющихся трансгенов (Matzke M.A., Matzke A.J.M., 1995) и различных мобильных элемен-

Таблица 3

Степень метилирования  
вновь синтезированной ДНК  
в суспензионной культуре клеток табака  
и L-клетках мыши (Кирнос и др., 1993)

Клетки и условия выращивания	100 × m <sup>5</sup> C/ C+m <sup>5</sup> C	
	Репликативные фрагменты ДНК	
	≤ 5S	≥ 5S
Клетки табака	17,0 ± 0,4	40,2 ± 0,3
Клетки табака + 2,4-Д (5 мг/л)	20,2 ± 0,6	20,1 ± 0,5
L-клетки мыши	2,8 ± 0,2	4,2 ± 0,1

тов. Это позволяет рассматривать такое метилирование ДНК как механизм избирательной инактивации встроенных в геном чужеродных генов, в том числе и разных элементов вирусной природы.

Ингибитор метилирования ДНК 5-азациитидин подавляет образование адвентивных побегов у петунии, а метилирование цитозинового остатка в CCGG и CGCG сайтах в генах *MADS-box* и *CDC48* позитивно коррелирует с индукцией образования адвентивных побегов. Обработка растений 5-азациитидином приводит к наследуемому карликовости у риса и увеличению белковости зерновок у пшениц (Ванюшин и др., 2009). У трансгенных растений риса индуцированная 5-азациитидином экспрессия *bar* гена исчезает примерно через 50 дней. Это означает, что растения обладают способностью со временем более или менее восстанавливать исходный статус метилирования их генома, нарушенный этим химическим деметилирующим ДНК агентом. Аналогичную картину мы наблюдали у пшениц, у них индуцированное 5-азациитидином увеличение белковости зерновок сохранялось лишь в нескольких поколениях.

Метилирование ДНК контролирует цветение растений (Finnegan *et al.*, 1995). Так, например, обработка 5-азациитидином, как и антисмысловая инактивация *MET1* гена, делают ненужной яровизацию у холодозависимых растений арабидопсиса. Метилирование ДНК регулирует экспрессию репрессора цветения *FLC*. На самом деле холодная обработка (стресс) приводит к частичному деметилированию ДНК у



многих растений, что, скорее всего, сопряжено с холодной индукцией неких особых белков. ДНК озимых сортов пшениц метилированы в большей степени, чем яровых.

Метилирование ДНК – один из механизмов геномного импринтинга и регуляции всей программы развития. В эндосперме особые области ДНК при материнском типе наследования оказались гипометилированными, а при мужском типе наследования они по метилированию были такими же, как в зародыше или листе. Широко известная соматическая изменчивость в культуре растительных клеток и тканей обусловлена не только мутациями, но и эпимутациями, в том числе и существенным изменением профиля метилирования ДНК.

Метилирование ДНК может существенно модулироваться различными биологическими (вирусы, бактерии, грибы, паразитические растения) и абиотическими факторами (стрессы). Любопытно, что повышенный уровень радиации в результате Чернобыльской катастрофы привел к сильному увеличению глобального метилирования генома у многих растений. Профиль метилирования ДНК может заметно изменяться под воздействием среды. Обычно у стресс-толерантных и неустойчивых к тому же стрессу растений он различен. Так, например, ДНК солеустойчивых мангровых деревьев, растущих в соленых болотах, оказались гипометилированными по сравнению с ДНК этих деревьев, растущих на речных пресноводных участках. Таким образом, эпигенетическая вариабельность в естественных растительных популяциях, по-видимому, важна для адаптации растений к условиям среды.

Поражение растений хлопчатника вилтом сопровождается искажением метилирования повторяющихся, но не уникальных последовательностей в геноме растения. Существенно изменяется характер метилирования суммарной ДНК у растения-хозяина (люцерны) при развитии на нем растения-паразита (*Cuscuta* sp.). Таким образом, грибы, вирусы и другие инфекционные агенты путем модуляции метилирования ДНК могут переключать программу работы генов хозяина в свою пользу. С другой стороны, растения способны на свой лад модифицировать вирусные ДНК, которые не встроены в хозяйский геном. Так, неинкапсулированная

ДНК вируса мозаики цветной капусты быстро становится метилированной в листьях турнепса по всем HpaII/MspI сайтам.

«Правильное» метилирование может стабилизировать свободную чужеродную ДНК в клетках растения-хозяина. При трансформации клеток ячменя наиболее стабильной оказалась вирусная ДНК с полностью метилированными CG сайтами, а та же ДНК, метилированная только по адениновым остаткам, быстро деградировала. Таким образом, в клетках ячменя определенно имеется некая система распознавания неправильно метилированных ДНК, обеспечивающая их быстрое удаление из делящихся клеток. Эти интригующие сведения могут указывать на существование системы хозяйской рестрикции–модификации у растений. Это хорошо согласуется с нашими данными о выявлении у растений специфических эндонуклеаз, распознающих статус метилирования ДНК (Fedoreyeva *et al.*, 2007).

Метилирование ДНК у растений и животных имеет много общего, однако у растений оно имеет целый ряд специфических особенностей. Так, например, доля метилированных CNG и асимметричных последовательностей ДНК в растительных геномах гораздо выше, чем у животных. В целом растения имеют существенно более сложную систему метилирования геномов по сравнению с животными. Прежде всего, следует отметить, что растения обладают гораздо большим арсеналом ДНК-метилтрансфераз (более 12). Это, возможно, обеспечивает им более надежную систему модификации генома, чем у животных. У растений выживают даже тройные ноль-мутанты (по генам трех разных ДНК-метилтрансфераз), тогда как у животных нокаут гена всего лишь одной ДНК-метилтрансферазы является летальным. Некоторые растительные ДНК-метилтрансферазы вообще не имеют аналогов в животном мире. Они уникальны и в отличие от животных ДНК-метилтрансфераз содержат консервативный убиквитин-связывающий домен, а их убиквитинизация может влиять на локализацию фермента в клетке в зависимости от тех или иных внеклеточных сигналов, клеточного цикла и транспозонной или ретровирусной активностей. Интересно, что активность растительных ДНК-метилтрансфераз может напрямую зависеть от регуляторов

роста растений. Кроме того, в отличие от животных растения обладают специфическими органеллами – пластидами (хлоропласты, хромопласты, амилопласты, лейкопласты), которые имеют собственные, отличные от ядерных, системы модификации (метилирования) ДНК. Эти системы могут играть важную роль в дифференцировке и функционировании пластид. Метилирование ДНК в растительных митохондриях иное, чем в ядре. В растительных мтДНК найден N<sup>6</sup>-метиладенин, но не 5-метилцитозин, который свойственен животным мтДНК. Поэтому в целом системы модификации ДНК в цитоплазматических органеллах в животной и растительной клетках весьма различны. В отличие от животных у растений, по-видимому, имеется система рестрикции–модификации генома; во всяком случае, мы установили, что у растений имеются S-аденозилметионин-зависимые эндонуклеазы, чувствительные к статусу метилирования ДНК. Судя по этим признакам, найденные и изученные нами растительные эндонуклеазы в известной мере аналогичны типичным бактериальным рестрикционным эндонуклеазам.

Растения – уникальные системы или модели организмов, которые представляют нам необычные и разнообразные возможности для расшифровки и понимания интимных механизмов и функциональной роли метилирования ДНК и функционирования геномов у эукариот. Каждый раз, глядя на уровень и характер метилирования генома, включая метилом, нужно отдавать себе отчет в том, что это, как правило, всего лишь моментальный снимок, а не полная целостная картина состояния модификации генома в онтогенезе. На самом деле, это очень динамичный процесс, результирующий метилирование и деметилирование ДНК.

Нет сомнений в том, что метилирование ДНК связано с эволюцией и таксономией организмов. Мы уже давно заметили, что в целом ДНК архегониальных и голосеменных растений метилированы в меньшей степени, чем ДНК покрытосеменных растений. При анализе профилей метилирования геномов у 30 поколений 10 линий *A. thaliana*, полученных из одного и того же предшественника, установлено, что примерно 30 000 цитозиновых остатков в ДНК этих штаммов (линий) растений метилированы

по-разному, т. е. эпигеномы у этих растений весьма различны и своеобразны. В особенности это касается характера метилирования транспозонов и кодирующих малые интерферирующие РНК элементов.

Говоря об этой модификации генома, мы должны отдавать себе отчет в том, что, по сути, мы имеем дело, по крайней мере, с тремя компонентами этой сложной реакции или даже системы: собственно субстрат реакции – ДНК, фермент (ДНК-метилтрансфераза) и донор метильных групп (S-аденозилметионин). Разумеется, контроль за модификацией ДНК и эффективностью этого процесса осуществляется на уровне всех этих компонентов, да еще и с участием иных самых разнообразных составляющих клеточного метаболизма. Наряду с этим статус метилирования генома в дифференцированной клетке на определенной стадии онтогенеза зависит также и от активности деметилирующих ДНК ферментов. Одна из таких животных деметилаз ДНК, отщепляющая непосредственно метильную группу от остатков 5-метилцитозина ДНК, открыта недавно, она выделена в виде индивидуального белка и ее ген проклонирован. Так что степень и характер метилирования генома на самом деле могут быть некими динамичными признаками, которые в каждый момент во многом определяются соотношением активностей метилирующих и деметилирующих ДНК ферментов.

Однако часто даже в присутствии этих активных ферментов, достаточного количества S-аденозилметионина (донора метильных групп и модулятора активностей ферментов) и в отсутствие соответствующих ингибиторов эти реакции в ядре невозможны просто из-за недоступности субстрата – ДНК в хроматине для ферментов. Здесь на первое место выходит организация собственно хроматина. Кроме упомянутых уже множественных модификаций гистонов, заметно модулирующих организацию хроматина и доступность ДНК для ферментов, за связывание и взаимодействие ДНК-метилтрансфераз с ДНК конкурируют многие иные белки. В частности, к ним могут относиться и белки гормон-рецепторных комплексов. Этим, по-видимому, во многом объясняются выявленная нами регуляция метилирования ДНК гормонами у растений и животных и действие

гормонов в клетке. Как бы то ни было, дальнейший прогресс в исследовании метилирования генома сильно зависит от детального изучения тонкой структуры хроматина и ее разнообразных функциональных флюктуаций в ядре.

Таким образом, на самом деле цитозинное метилирование ДНК контролирует рост и развитие растений (Ванюшин, 2006) и животных (Holliday, Pugh, 1975), оно участвует в регуляции всех генетических процессов, в том числе транскрипции, репликации, репарации ДНК, клеточной дифференцировке, геномном импринтинге и транспозиции генов.

### РЕПЛИКАТИВНОЕ МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И НАСЛЕДОВАНИЕ ХАРАКТЕРА МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОМА

Нас давно интересовал вопрос о том, когда и в какой степени метилируются ДНК в клеточном цикле у растений и животных. Известно, что синтез одной из цепей ДНК при репликации двутяжевых ДНК происходит непрерывно, а другой – прерывисто, с образованием относительно коротких фрагментов (фрагменты Оказаки), которые затем сшиваются в одну непрерывную цепь (рис. 8). Мы задались целью выделить эти фрагменты по мере синтеза (репликации) ДНК и выяснить, метилированы они или нет. Оказалось, что при выращивании клеток растений и животных в среде при высокой концентрации клеток синтез ДНК в них ограничивается образованием коротких интактных фрагментов без их лигирования. Эти фрагменты нам удалось получить в ощутимых количествах и изучить их метилирование. Они представляли собой фрагменты Оказаки, которые в условиях эксперимента Херши-Чейза сшивались с образованием нормальных длинных тяжей ДНК. Оказалось, что фрагменты Оказаки метилированы (табл. 3, рис. 8). Так было открыто и документировано собственно репликативное метилирование ДНК у растений и животных и предполагалось, что ДНК-метилтрансферазы могут входить в состав репликативного комплекса (Александровская и др., 1991; Кинос и др., 1986, 1993).

По степени и специфичности метилирования сформированные *in vivo* в проростках пшеницы фрагменты Оказаки отличались от лигированных

интермедиатов репликации и зрелой ДНК (табл. 3). В отличие от метилирования лигированной ДНК метилирование фрагментов Оказаки устойчиво к действию различных ингибиторов реакции метилирования (S-изобутиладенозин и др.) и не подавляется гормонами (ауксины у растений). Мы пришли к выводу, что в ядре имеется несколько ДНК-метилтрансфераз и метилирование ДНК на разных стадиях репликации может осуществляться разными по специфичности действия ферментами. Это полностью согласуется с современными сведениями о множественности ядерных ДНК-метилтрансфераз у животных и растений. Затем нам удалось дискриминировать репликативное и пострепликативное метилирование ДНК у растений. Эти процессы различаются по специфичности метилируемых последовательностей в ДНК и по чувствительности к разным гормонам и ингибиторам.

Мы предложили и описали механизм природной регуляции репликации ДНК метилированием (рис. 9). Нам удалось это сделать благодаря удивительному подарку природы – существованию синхронного развития злаков. Оказалось, что при развитии проростков пшеницы в стандартизированных условиях в их первом листе и coleoptile происходит природный выраженный синхронный и периодичный

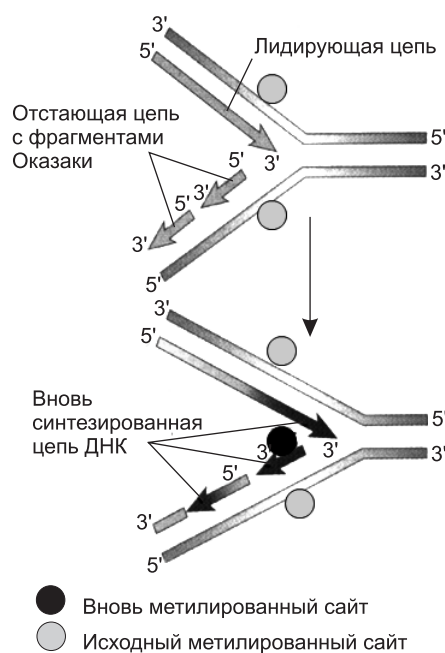
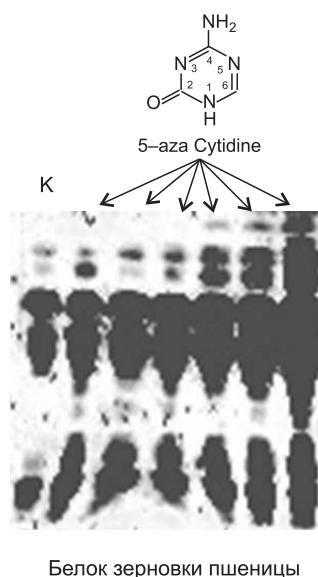


Рис. 8. Репликативное метилирование ДНК.





**Рис. 10.** Увеличение белковости зерновок пшеницы под влиянием 5-азацитидина – ингибитора метилирования ДНК.

К – контроль. Остальные дорожки – белок из зерновок растений, обработанных 5-азацитидином разными способами.

запасных белков в зерновке увеличивается. Этот факт может использоваться в биотехнологии.

Значит, целенаправленная регуляция экспрессии генов у растений может служить весьма эффективным биотехнологическим приемом. Здесь приходят на память удивительные слова Джонатана Свифта, написанные им еще в 1726 г.: «... whoever could make two ears of corn, or two blades of grass, to grow upon a spot of ground where only one grew before, would deserve better of mankind, and do more essential service to his country, than the whole race of politicians put together» (Jonathan Swift. The King of Brobdingnag to Gulliver, in Gullivers Travels, «A Voyage to Brobdingnag»). Поистине справедливые и святые слова, которые неплохо было бы твердо усвоить и нашим политикам. В них – благородная и почетная задача, адресованная и к нам из глубины веков. Может быть, в наше время ее к тому же можно дополнительно решать и несколько иным путем, например, добиться увеличения содержания белка в зерновке по крайней мере вдвое. Хлеб ценен именно белком, а крахмал можно получить из картофеля. Наш скромный опыт показывает, что этого добиться вполне возможно, в частности с использованием знаний эпигенетики.

**Деметилирование генома.** Мы уже отметили, что репликация ДНК сопровождается возникновением неметилированных сайтов во вновь образованной цепи дуплекса ДНК. Часто это ошибочно называют пассивным деметилированием ДНК. На самом деле это или неметилирование, или недометилирование ДНК при репликации в результате некоей блокады действия поддерживающей ДНК-метилтрансферазы DMT1. Вопрос о деметилировании ДНК долгое время оставался спорным, хотя все время появлялись неопровержимые сведения о том, что оно существует, в частности при эмбриогенезе. В принципе, остатки 5-метилцитозина могут выщепляться из ДНК и замещаться затем при последующей репарации остатками цитозина. По мнению М. Шифа, возможно и прямое отщепление метильной группы от остатков 5-метилцитозина с окислением ее в метанол.

У растений имеется *DEMETER (DME)* ген, экспрессирующийся у женского гаметофита с индуцированием материнских аллелей с импринтированным геном *MEDEA*. *DME* кодирует ДНК-гликозидазу -лиазу, которая активирует *MEA* ген путем вырезания некоторых остатков 5-метилцитозина у *MEA* в двух компактных областях соответственно выше и ниже кодирующей последовательности. Отцовский аллель при этом не затрагивается, поскольку *DME* экспрессируется в центральной клетке только перед оплодотворением. Другая m<sup>5</sup>C-специфическая ДНК-гликозидаза *ROS1* (repressor of silencing 1) была выявлена у трансгенных растений арабидопсиса с мутацией по *ROS1*. *DME* и *ROS1* гликозидазы преимущественно вырезают остатки 5-метилцитозина из m<sup>5</sup>CG сайтов. Они способны выстригать также остатки тимина из T-G мисматчей. Два других белка из семейства *DME*, *DEMETER-LIKE 2* и *3 (DML2, DML3)*, также являются m<sup>5</sup>C-специфическими ДНК-гликозидазами, которые необходимы для контроля за правильным метилированием различных генов. При оплодотворении один спермий оплодотворяет гаплоидную яйцеклетку с образованием диплоидного зародыша, а другой попадает в диплоидную центральную клетку, которая дает начало триплоидному эндосперму. Перед оплодотворением или на ранних стадиях развития эндосперма ДНК в нем подвержена сильному деметилированию по многим и самым

разным сайтам. Большинство  $m^5CG$  сайтов деметируется материнскими DME. Одновременное удаление обоих остатков  $m^5C$  из симметрично метилированного сайта может приводить к фатальному разрыву двуцепочечной спирали ДНК. На терминальных стадиях развития женского гаметофита экспрессия гена *MET1* сильно подавлена перед последним синцитиальным делением, она очень слаба и в центральной клетке. Может быть, это изящное благоприятное эволюционное приспособление у растений. Последний раунд репликации ДНК в отсутствие MET1 активности должен приводить к возникновению ДНК с полуметилированными сайтами, которые затем могут деметилироваться с помощью DME без роковых двуцепочечных разрывов ДНК.

Часто спрашивают, что лучше: когда ДНК сильно или слабо метилирована? Мой ответ – ни то и ни другое. Она должна быть метилирована нормально, как это умеет делать и поддерживать всеми силами и возможностями нормальная клетка, следуя принципу поддержания гомеостаза. Действительно, когда мой коллега из Национального токсикологического центра США Л. Пуарье исключает из рациона питания аминокислоту метионин (источник метильных групп), у всех подопытных крыс через две недели неотвратно развивается рак (гепатома) печени. Рак развивается и в том случае, когда у трансгенных мышей активирован ген фермента человеческой ДНК-метилтрансферазы, что приводит к суперметилированию у них генома. В результате нокаута только одного из генов ДНК-метилтрансфераз у животных останавливается развитие эмбрионов и включается запрограммированная гибель клеток (апоптоз). К изменению метилирования ДНК нужно относиться с большой осторожностью.

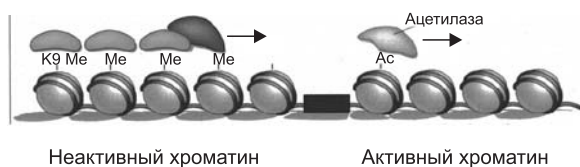
Как бы то ни было, скептики, о которых упоминалось в начале статьи, повержены, и сегодня доподлинно известно, что метилирование ДНК в клетке – не пустяк: оно контролирует **все!** генетические процессы, в том числе и такие, как транскрипция, репликация, рекомбинация, транспозиция генов, репарация, инактивация X-хромосомы (половая дифференцировка). Не удивительно, что к изучению этой относительно небольшой энзиматической модификации генома сейчас прикован очень большой интерес многих исследователей мира.

## МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И ДРУГИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ

С раскрытием и описанием исключительной роли метилирования ДНК в жизни организмов, по сути дела, впервые по-настоящему произошли становление и материализация эпигенетики. Долгое время эпигенетику не признавали вовсе, а часто стыдливо или даже намеренно о ней умалчивали. В основном это происходило потому, что природа эпигенетических сигналов и пути их реализации в организме были очень расплывчатыми. Теперь стало ясно, что одним из таких эпигенетических сигналов в клетке выступает энзиматическая модификация (метилирование) самой генетической матрицы (Ванюшин, 2006).

В клетке есть и другие системы эпигенетических сигналов, их много и они весьма разнообразны. У некоторых из них решительная роль принадлежит не ДНК, а белкам, в том числе белкам хроматина. Сегодня говорят о гистоновом «коде». Этот код существенно расширяет потенциал собственно генетического кода ДНК. Вследствие той или иной модификации гистонов изменяется структура хроматина, что приводит к наследуемым изменениям в транскрипции генов. Модификация гистонов «туда и обратно» (метилирование, фосфорилирование, ацетилирование, убиквитинирование без или с приставкой *de-*) часто определяет, будут ли гены активными или нет. К этому примыкают еще и множественные специальные негистоновые регуляторные белки, формирующие затейливые комплексы на ДНК, которые замалчивают гены или, напротив, запускают их в работу. Мы на пороге расшифровки и этих любопытных сигналов.

Имеется уже много данных о том, что существует взаимозависимость между метилированием ДНК и модификацией гистонов. У *Neurospora* метилирование лизина 9 в гистоне H3 критично для цитозинового метилирования ДНК и нормального развития гриба. Иначе говоря, гистоны могут выступать в качестве переносчика сигналов для метилирования генома. С другой стороны, у арабидопсиса метилирование CpG в ДНК предшествует и направляет метилирование лизина 9 в гистоне H3. Интересно, что неметилированный по лизину 4 (K4) хвост гистона H3 служит аллостерическим актива-



**Рис. 11.** Активация хроматина в результате деметилирования ДНК и ацетилирования гистонов.

тором ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a. Этап взаимодействия неметилированного хвоста гистона является своеобразным checkpoint для метилирования ДНК этим ферментом.

У животных и растений существует связь между метилированием ДНК и деацетилированием гистонов. Например, ген гистоновой деацетилазы необходим для метилирования ДНК, индуцированного малыми РНК (dsRNA). Поистине «метилирование встречается с ацетилированием». С другой стороны, известно, что нокаут гена деметилазы гистона подавляет *de novo* метилирование ДНК и искажает развитие эмбрионов мыши. Без деметилирования остатка метил-лизина K4 в гистоне H3 у мыши *de novo* метилирование ДНК ферментом ДНК-метилтрансферазой dmt3a не происходит.

### НАПРАВЛЯЕМОЕ РНК МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И ЗАМАЛЧИВАНИЕ ГЕНОВ

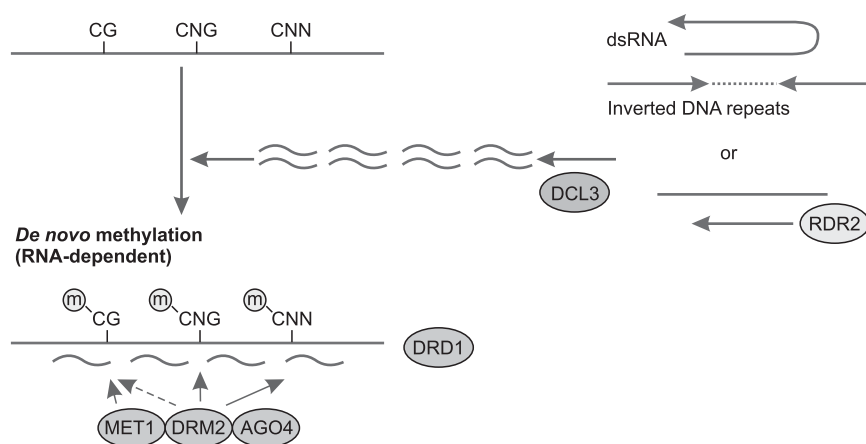
Особый интерес привлекает сегодня изучение механизмов и биологической роли метилирования ДНК, направляемого малыми РНК (RNA-di-

rected DNA methylation), которые осуществляют специфическое выключение генов (gene silencing) (Matzke M.A., Matzke A.J., 1995).

Считается, что сайт-специфичные ДНК-метилтрансферазы в присутствии маленькой сигнальной РНК (рис. 12) осуществляют *de novo* метилирование ДНК по CNG и другим сайтам в нуклеотидной последовательности ДНК, узнаваемой малой РНК; это метилирование мобилизует соответствующие ферменты, которые, в частности, и модифицируют гистоны.

Модификация гистонов приводит к индукции или усилению метилирования CNG сайтов, которое затем поддерживается без участия РНК-триггера (рис. 11). В цепи этих событий метилирование ДНК может быть как причиной, так и следствием «замалчивания» генов. Не удивительно, что особый прогресс в области направленного РНК метилирования генов достигнут благодаря изучению метилирования ДНК именно у растений, а не животных. Это, по-видимому, во многом объясняется тем, что именно растения обладают выраженным метилированием CNG и несимметричных сайтов в ДНК, которое в основном и вовлечено в РНК-направляемое метилирование генома. В последнее время появилось много указаний на то, что такое наведенное РНК. Метилирование ДНК в триплексе РНК-ДНК играет решающую роль в замалчивании генов малыми РНК; у организмов или мутантов с дефектным цитозинным метилированием ДНК это РНК-замалчивание генов неэффективно.

Открытие специфических так называемых малых РНК (siRNA, miRNA) произвело взрыв



**Рис. 12.** Замалчивание генов малыми интерферирующими РНК (siRNA).

в представлениях о молекулярных механизмах регуляции экспрессии генов и сыграло исключительную роль в признании и упрочении эпигенетики. Как правило, эти РНК закодированы в повторяющихся инвертированных последовательностях генома, в результате считывания которых и последующего процессинга они появляются в виде коротких 12–14-членных олигонуклеотидов. Эти регуляторные фрагменты впервые были выявлены у петунии, и было показано, что они контролируют экспрессию генов, отвечающих за синтез пигментов, и определяют характер окраски цветка. Они узнают соответствующие им комплементарные последовательности в ДНК или мРНК и, связываясь с ними, могут блокировать экспрессию соответствующих генов на уровне транскрипции и (или) трансляции. Считается, что большинство таких палиндромных повторов в геноме эукариот имеет вирусное происхождение и в принципе могут защищать клетки от вирусных генетических инвазий.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из существенных эпигенетических сигналов в клетке является метилирование ДНК. У высших растений ДНК сильно метилированы по остаткам цитозина; 5-метилцитозин локализован преимущественно в CG и CNG последовательностях. Глобальное метилирование ДНК видо-, ткане-, органоидспецифично, оно изменяется при прорастании семян, переходе растений к цветению, различных вирусных и грибных инфекциях и уменьшается с возрастом. Как правило, ДНК архегониальных менее метилированы, чем ДНК цветковых растений. Найдены видовые различия филогенетического значения по встречаемости метилированных CNG последовательностей в геномах растений. Тканевая специфичность метилирования ДНК, выявленная изначально у животных (Vanuyshin *et al.*, 1970), затем обнаружена у растений. Отдельные гены в разных тканях одного и того же организма метилированы по-разному. Содержание  $m^5C$  в ДНК разных тканей связано и с так называемым градиентом цветения. Первое же картирование характера метилирования целого генома (метилом) *Arabidopsis thaliana* показало, что ДНК перичентромерного гетерохроматина,

повторяющиеся последовательности и зоны образования малых интерферирующих РНК сильно метилированы, примерно треть генов метилировано в транскрибируемых областях и только около 5 % генов – в промоторной области.

Метилированные в транскрибируемых областях гены, характеризуются конститутивной транскрипционной активностью, в то время как у метилируемых по промоторной области генов существует сильно выраженная тканевая специфичность экспрессии. Так, например, мы установили, что степень метилирования промотора пататинового гена в разных тканях картофеля обратно коррелирует со степенью экспрессии этого гена, он заметно неометилирован в клубнях картофеля, где в основном и осуществляется синтез этого белка.

Специфические изменения в характере метилирования ДНК происходят на протяжении всей жизни растения, начиная от прорастания семян и вплоть до его гибели, запрограммированной или вызванной разными агентами и факторами биологической и абиотической природы. Онтогенез растений и животных вообще невозможен без метилирования генома, потому что метилирование ДНК участвует в контроле за всеми генетическими функциями, включая транскрипцию, репликацию, репарацию ДНК, транспозицию генов, геномный импринтинг и клеточную дифференцировку. Индуцируемое холодом цветение растений регулируется метилированием ДНК. При холодной обработке (яровизация) ДНК частично деметируется и в результате активируются гены, отвечающие за индукцию цветения.

Метилирование генома вовлечено в замалчивание генов маленькими РНК (siRNA). Нокаут и нокаун генов соответствующих ДНК-метилтрансфераз сопровождаются серьезными изменениями фенотипических свойств, нарушением роста и развития. Индуцированное 5-азациитидином деметилирование ДНК при формировании зерновки приводит к наследуемому увеличению белковости пшениц. Таким образом, избирательная регуляция метилирования ДНК – новое эффективное средство биотехнологического контроля за продуктивностью растений.

Мы обнаружили, что репликация генома сопровождается появлением полуметилиро-



ванных сайтов в ДНК; возникшая при этом асимметрия метилирования цепей ДНК значительно уменьшается или вовсе исчезает к концу клеточного цикла. На этом основании нами предложена модель регуляции репликации ДНК метилированием.

Мы установили, что первичные репликативные элементы генома (фрагменты Оказаки) метилированы. Так, было открыто и документировано собственно репликативное метилирование ДНК у растений и животных и показано, что ДНК-метилтрансферазы могут входить в состав репликативного комплекса. Мы пришли к выводу, что в ядре имеется несколько ДНК-метилтрансфераз, и метилирование ДНК на разных стадиях репликации может осуществляться разными по специфичности действия ферментами. Это подтвердилось современными сведениями о множественности ядерных ДНК-метилтрансфераз. Нам удалось дискриминировать репликативное и пострепликативное метилирование ДНК у растений. Эти процессы различаются по специфичности метилируемых сайтов в ДНК и по чувствительности к разным гормонам и ингибиторам метилирования.

Найдено, что фитогормоны контролируют метилирование ДНК. Под действием фитогормонов заметно уменьшается глобальное метилирование ДНК. Кроме того, они подавляют метилирование вновь синтезируемых цепей ДНК, не влияя на метилирование фрагментов Оказаки. Так, впервые было обнаружено, что фитогормоны воздействуют собственно на геном путем модуляции его метилирования. Мы считаем, что именно модуляция метилирования ДНК является одним из ведущих механизмов действия гормонов у растений и животных. Не исключено, что гормон-рецепторные комплексы конкурируют за места связывания и метилирования генома соответствующими ДНК-метилтрансферазами.

Нет сомнений в том, что метилирование ДНК связано с эволюцией и таксономией растений. Мы уже давно заметили, что в целом ДНК архегониальных и голосеменных растений метилированы в меньшей степени, чем ДНК покрытосеменных растений. При анализе профилей метилирования геномов у 30 поколений 10 линий *A. thaliana*, полученных из одного и того же предшественника, установлено, что примерно 30 000 цитозиновых остатков в ДНК

этих штаммов (линий) метилированы по-разному, т. е. эпигеномы у этих растений весьма различны и своеобразны. В особенности это касается характера метилирования транспозонов и кодирующих малые интерферирующие РНК элементов.

Говоря об этой модификации генома, мы должны отдавать себе отчет в том, что, по сути, мы имеем дело, по крайней мере, с тремя компонентами этой сложной реакции или даже системы: собственно субстрат реакции – ДНК, фермент (ДНК-метилтрансфераза) и донор метильных групп (S-аденозилметионин). Разумеется, контроль за модификацией ДНК и эффективностью этого процесса осуществляется на уровне всех этих компонентов, да еще и с участием иных самых разнообразных составляющих клеточного метаболита. Наряду с этим, статус метилирования генома в дифференцированной клетке на определенной стадии онтогенеза зависит также и от активности деметилирующих ДНК ферментов. Одна из таких деметилаз ДНК животных, отщепляющая непосредственно метильную группу от остатков 5-метилцитозина ДНК, открыта недавно, она выделена в виде индивидуального белка, ее ген проклонирован. Так что степень и характер метилирования генома на самом деле могут быть некими динамичными признаками, которые в каждый момент во многом определяются соотношением активностей метилирующих и деметилирующих ДНК ферментов.

Однако часто даже в присутствии этих активных ферментов, достаточного количества S-аденозилметионина (донора метильных групп и модулятора активностей ферментов) и в отсутствии соответствующих ингибиторов эти реакции в ядре невозможны просто из-за недоступности субстрата – ДНК в хроматине для ферментов. Здесь на первое место выходит организация собственно хроматина. Кроме упомянутых уже множественных модификаций гистонов, заметно модулирующих организацию хроматина и доступность ДНК для ферментов, за связывание и взаимодействие ДНК-метилтрансфераз с ДНК конкурируют многие иные белки. В частности, к ним могут относиться и белки гормон-рецепторных комплексов. Этим, по-видимому, во многом объясняются выявленная нами регуляция метилирования ДНК

гормонами у растений и животных и действие гормонов в клетке. Как бы то ни было, дальнейший прогресс в исследовании метилирования генома в значительной мере зависит от детального изучения тонкой структуры хроматина и ее разнообразных функциональных флюктуаций в ядре.

Открыто адениновое метилирование ДНК у растений; N<sup>6</sup>-метиладенин (m<sup>6</sup>A) найден в митохондриальной и ядерной ДНК. У *Arabidopsis thaliana* ген цитозиновой ДНК-метилтрансферазы DRM2 метилирован как по цитозиновым (CCGG), так и адениновым (GATC) остаткам. Индукция антисмысловых конструкций цитозиновой ДНК-метилтрансферазы (MET1) у трансгенных растений арабидопсиса приводит к изменению характера метилирования адениновых остатков в гене *DRM2*. Значит, у растений существует взаимозависимый контроль между метилированием адениновых и цитозиновых оснований. Это новый механизм утонченного эпигенетического контроля сопряженными метилированиями ДНК за функциями генома у эукариот.

Из богатой митохондриями фракции вакуолярных везикул, возникающих при апоптозе у стареющих колеоптилей пшеницы, выделена **первая** адениновая ДНК-метилтрансфераза высших эукариот. В присутствии S-аденозил-L-метионина (SAM) этот Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-зависимый фермент (*wadmtase*) метилирует *de novo* остаток аденина в середине последовательности TGATCA у одно- и двутяжевых ДНК, предпочитая одנותяжевые структуры. По-видимому, *wadmtase* модифицирует мтДНК и участвует в регуляции репликации митохондрий; не исключено, что она же метилирует и яДНК.

Из колеоптилей пшеницы выделены SAM-зависимые эндонуклеазы WEN1 и WEN2, чувствительные к статусу метилирования ДНК. Эти свойства не были известны для эндонуклеаз высших эукариот, а характерны лишь для некоторых бактериальных рестрикционных эндонуклеаз, что указывает на возможное существование системы рестрикции-модификации у растений. Конкурентные ингибиторы метилирования ДНК S-аденозил-L-гомоцистеин и S-изобутиладенозин также модулируют гидролиз ДНК этими ферментами. Таким образом, открыт новый тип регуляции активности эукариотиче-

ских (растительных) эндонуклеаз, основанный на их модуляции донором метильных групп SAM и его аналогами – ингибиторами реакции метилирования. По-видимому, ферменты WEN1 и WEN2 участвуют в деградации ядерной ДНК при запрограммированной гибели растительной клетки. По некоторым свойствам эндонуклеаза WEN1 напоминает животную эндонуклеазу G, которая фрагментирует ДНК при апоптозе. Другая выделенная из колеоптилей пшеницы уникальная эндонуклеаза WEN2, как и WEN1, также чувствительна к статусу метилирования ДНК и модулируется SAM. У растений существует система сопряженной регуляции SAM-зависимых (в том числе и чувствительных к статусу метилирования ДНК) эндонуклеазных активностей с разнонаправленным действием на них эффектора (модулятора) SAM. К тому же действие этих эндонуклеаз модулируется гистоном H1, это может существенно влиять на межнуклеосомную фрагментацию яДНК этими ферментами при апоптозе.

Описанные здесь модификации генома и гистонов, малые интерферирующие РНК – очень delicate и эффективные природные механизмы регуляции активности генов, состояния, репликации и репарации генома в клетке. Модификации генома тесно связаны с другими утонченными эпигенетическими сигналами, превращениями в структурной и функциональной организации генома и клетки, которые в совокупности и определяют жизнь, ее сущность и качество. Принципиально важно отметить, что существующие в клетке множественные эпигенетические системы и сигналы часто взаимозависимы. Во многом это имеет некий подстраховочный смысл, для того чтобы гарантированно обеспечить надежность регуляторного сигнала. Конкретные цепочки, отдельные связи и изошренная паутина этих взаимозависимых сигналов еще очень далеки от полного понимания. Однако нет никакого сомнения в том, что метилирование ДНК и модификации гистонов, а также избирательный сайленсинг генов малыми РНК играют очень важную роль в жизни клетки и организма, поэтому дальнейшие исчерпывающие исследования в этой захватывающей области знаний – очень важная и плодотворная задача нашего века, который по праву называют эрой эпигенетики. Именно эпи-

генетике принадлежит исключительная роль в решении многих общебиологических проблем. По данным биотехнологического бюллетеня Массачусетского технологического института (MIT, США), эпигенетика принадлежит к десятку новых технологий, которые в ближайшее десятилетие могут перевернуть весь мир. Без эпигенетических знаний невозможны развитие и совершенствование клеточных технологий (стволовые клетки), надежная диагностика, предупреждение и лечение разных форм рака, предупреждение преждевременного старения. Эпигенетика лежит в основе эффективных способов борьбы со многими инфекционными (в том числе вирусными) болезнями человека, животных и растений. Несомненно, эпигенетика послужит и делу улучшения качества урожая разных сельскохозяйственных культур, продуктивности пород животных. Иными словами, без эпигенетики прогресс биологии, медицины, сельского хозяйства и биотехнологий немислим.

### ЛИТЕРАТУРА

- Александрюшкина Н.И., Ротаенко Е.П., Никифорова И.Д. и др. Двухэтапное метилирование генома пшеницы в культуре клеток и в проростке // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 361–368.
- Ашапкин В.В., Кутуева Л.И., Ванюшин Б.Ф. Регулируется ли метилированием транскрипция гена цитозиновой ДНК-метилтрансферазы MET1 у растения *Arabidopsis thaliana*? // Генетика. 2011. Т. 47. С. 320–331.
- Бердышев Г.Д., Коротяев Г.К., Боярских Г.В., Ванюшин Б.Ф. Нуклеотидный состав ДНК и РНК соматических тканей горбуши и его изменение в течение нереста // Биохимия. 1967. Т. 32. С. 988–993.
- Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика // Генетика. 2006. Т. 42. С. 1–14.
- Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК у растений: механизмы и биологическая роль // Тимирязевские чтения / Ред. В.В. Кузнецов. Ин-т физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. М.: Наука, 2009. Вып. 69. 77 с.
- Кирнос М.Д., Александрюшкина Н.И., Ванюшин Б.Ф. 5-метилцитозин в пиримидиновых последовательностях ДНК растений и животных: специфичность метилирования // Биохимия. 1981. Т. 46. С. 1458–1474.
- Кирнос М.Д., Александрюшкина Н.И., Ванюшин Б.Ф. Двухэтапное метилирование реплицирующегося генома в клетках высших растений // Усп. биол. химии. 1993. Т. 33. С. 148–172.
- Спирин А.С., Белозерский А.Н., Шугаева Н.В., Ванюшин Б.Ф. Изучение видовой специфичности нуклеиновых кислот у бактерий // Биохимия. 1957. Т. 22. С. 744–754.
- Cooney C. Methyl Magic. Kansas City: McMeel, 1999. 253 p.
- Fedoreyeva L.I., Sobolev D.E., Vanyushin B.F. Wheat endonuclease WEN1 dependent on S-adenosyl-L-methionine and sensitive to DNA methylation status // Epigenetics. 2007. V. 2. P. 50–53.
- Fedoreyeva L.I., Vanyushin B.F. N6-Adenine DNA-methyltransferase in wheat seedlings // FEBS Lett. 2002. V. 514. P. 305–308.
- Finnegan E.J., Genger R.K., Kovac K. *et al.* DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 5824–5829.
- Holliday R., Pugh J.E. DNA modification mechanisms and gene activity during development // Science. 1975. V. 187. P. 226–232.
- Matzke M.A., Matzke A.J.M. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: What does it really tell us? // Trends Genet. 1995. V. 11. P. 1–3.
- Vanyushin B.F., Ashapkin V.V. DNA methylation in higher plants: past, present and future // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1809. P. 360–368.
- Vanyushin B.F., Ashapkin V.V. DNA methylation in plants. N.Y.: Nova Biomedical Books: Nova Science, 2009. 152 p.
- Vanyushin B.F., Tkacheva S.G., Belozersky A.N. Rare bases in animal DNA // Nature. 1970. V. 225. P. 948–949.
- Vanyushin B.F., Nemirovsky L.E., Klimenko V.V. *et al.* The 5-methylcytosine in DNA of rats. Tissue and age specificity and the changes induced by hydrocortisone and other agents // Gerontologia. 1973. V. 19. P. 138–152.

### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Эпигенетика / Ред. С.М. Закиян, В.В. Власов, Е.В. Дементьева. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. 592 с.
- Эпигенетика / Под ред. С.Д. Эллис. М.: Техносфера, 2010. 496 с.

## EPIGENETICS TODAY AND TOMORROW

**B.F. Vanyushin**

M.V. Lomonosov Moscow State University, A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow, Russia, e-mail: vanyush@belozersky.msu.ru

Epigenetics is a science of inheritable organism properties that are not associated with changes in the DNA nucleotide sequence but can be indirectly encoded in the genome. The most known epigenetic mechanisms (signals) are enzymatic DNA methylation, the histone code (various enzymatic histone modifications including acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination and others), and gene silencing mediated by small RNAs (miRNA, siRNA). Very often all these processes are interconnected or even partially interchangeable. This seems to be needed for reliable realization of respective epigenetic signaling. Anyway, these processes are closely associated with chromatin structural and functional organization. DNA methylation in plants and animals carried out by site-specific enzymes cytosine DNA-methyltransferases produces 5-methylcytosine (m<sup>5</sup>C) residues in such DNA sequences as CG, CNG and CNN. Adenine DNA methylation also occurs in plants. The resulting m<sup>5</sup>C residues in DNA influence substantially the interaction of DNA with different proteins including regulatory ones. Often DNA methylation prevents DNA binding to such proteins and inhibits gene transcription but sometimes it is a must for binding to other regulatory proteins. Specific m<sup>5</sup>CpG DNA-binding proteins have been described. Binding of such proteins to DNA orchestrates the whole protein ensemble of the transcription machinery and induces its activity. Thus, DNA methylation can serve as a signal of negative or positive control for gene activities. DNA methylation in eukaryotes is species- and tissue (cell) specific. It is regulated by hormones and aging-related changes, being one of the mechanisms controlling cellular and sex differentiation. DNA methylation controls all genetic functions: DNA replication, recombination, repair, transcription and others. Distortions in DNA methylation and other epigenetic signals cause premature aging, cancer, diabetes, asthma, and severe mental dysfunctions. Changes in the DNA methylation profile accompany carcinogenesis, being a reliable diagnostic marker of various cancer species even at early stages of tumor formation. Epigenetic parameters are very significant for understanding of somaclonal variation mechanisms; characterization of clones and cell cultures, including stem cells at various differentiation stages; and determination of their differentiation directions. Directed change in the DNA methylation profile is an efficient biotechnological tool of activation of transcription of seed storage protein genes in cereals, and it is used, in particular, for inheritable increase in protein content in wheat grain. The inhibitor of DNA methylation 5-azacytidine is used for treatment of skin cancer. Various regulators of enzymatic modifications of histones are efficient in the treatment of different tumors as well. Use of specific small RNAs in the therapy of cancer and other diseases appears to be particularly promising, especially in connection with directed inhibition of transcription of genes responsible for cell malignization and metastasis. The therapeutic action of many known small biologically active peptides seems to be expressed mainly at the epigenetic level.

Thus, a phenotype is a product of combined expression of the genome and epigenome. In this regard, the known P. Medawar's expression «genetics supposes but epigenetics disposes» sounds quite correct and very impressive. In fact, epigenetics is a relatively new, quickly developing, and very promising science of the 21st century that has already engrained in biotechnologies, medicine, and agriculture.

**Key words:** apoptosis, histone, DNA methyltransferase, DNA-binding proteins, genomics, gene systematics, gene silencing, cell differentiation, DNA methylation, mitochondria, development, replication, cancer, aging, transcription, chromatin, evolution, endonucleases, epigenetics, 5-methylcytosine, N<sup>6</sup>-methyladenine.