


Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Характеристика деметилирующей ДНК-гликозилазы ROS1 из *Nicotiana tabacum* L.

Д.В. Петрова¹, Н.В. Пермякова², И.Р. Грин¹, Д.О. Жарков^{1,3} 

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия


 dzharkov@niboch.nsc.ru

Аннотация. Один из главных механизмов эпигенетической регуляции у высших эукариот основан на метилировании цитозина по положению C5 с образованием 5-метилцитозина (mC), который далее узнается регуляторными белками. У млекопитающих метилирование преимущественно протекает в динуклеотидах CG, тогда как у растений его мишенью служат последовательности CG, CHG и CHH (H – любое основание, кроме G). Корректное поддержание статуса метилирования ДНК требует баланса процессов метилирования, пассивного и активного деметилирования. В то время как у млекопитающих активное деметилирование происходит за счет направленного регулируемого повреждения mC в ДНК с последующим действием ферментов репарации, у растений функции деметилирования выполняют специализированные ДНК-гликозилазы, гидролизующие N-гликозидную связь mC-нуклеотидов. Геном модельного растения *Arabidopsis thaliana* кодирует четыре паралогичных белка, два из которых – DEMETER (DME) и REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1) – обладают 5-метилцитозин-ДНК-гликозилазной активностью и необходимы для регуляции развития, ответа на инфекции и абиотический стресс и сайленсинга трансгенов и мобильных элементов. Гомологи DME и ROS1 присутствуют во всех группах растений, однако за пределами *A. thaliana* исследованы крайне слабо. В статье приведены результаты изучения свойств рекомбинантного фрагмента белка ROS1 из *Nicotiana tabacum* (NtROS1), содержащего основные структурные домены, необходимые для каталитической активности. Методами гомологичного моделирования была построена структурная модель NtROS1, в которой выявлена укладка, характерная для ДНК-гликозилаз структурного суперсемейства «спираль–шпилька–спираль». Рекомбинантный белок NtROS1 был способен удалять из ДНК основания mC, причем активность фермента слабо зависела от статуса метилирования CG-динуклеотидов в противоположной цепи. С меньшей эффективностью фермент удалял из ДНК 5-гидроксиметилцитозин (hmC), проявляя минимальную активность при наличии mC в противоположной цепи. При экспрессии гена *NtROS1* в клетках человека в культуре происходило глобальное снижение уровня метилирования геномной ДНК. В целом можно сказать, что белок NtROS1 и другие гомологи DME и ROS1 представляют собой многообещающую основу для инженерии ферментов с целью анализа статуса эпигенетического метилирования и управления активностью генов.

Ключевые слова: эпигенетическое деметилирование; 5-метилцитозин; 5-гидроксиметилцитозин; ДНК-гликозилазы; REPRESSOR OF SILENCING 1; *Nicotiana tabacum*.

Для цитирования: Петрова Д.В., Пермякова Н.В., Грин И.Р., Жарков Д.О. Характеристика деметилирующей ДНК-гликозилазы ROS1 из *Nicotiana tabacum* L. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(4):341-348. DOI 10.18699/VJGB-22-41


Characterization of demethylating DNA glycosylase ROS1 from *Nicotiana tabacum* L.

D.V. Petrova¹, N.V. Permyakova², I.R. Grin¹, D.O. Zharkov^{1,3} 

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 dzharkov@niboch.nsc.ru

Abstract. One of the main mechanisms of epigenetic regulation in higher eukaryotes is based on the methylation of cytosine at the C5 position with the formation of 5-methylcytosine (mC), which is further recognized by regulatory proteins. In mammals, methylation mainly occurs in CG dinucleotides, while in plants it targets CG, CHG, and CHH sequences (H is any base but G). Correct maintenance of the DNA methylation status is based on the balance of methylation, passive demethylation, and active demethylation. While in mammals active demethylation is based on targeted regulated damage to mC in DNA followed by the action of repair enzymes, demethylation in plants is performed by specialized DNA glycosylases that hydrolyze the N-glycosidic bond of mC nucleotides. The genome of the model plant *Arabidopsis thaliana* encodes four paralogous proteins, two of which, DEMETER (DME) and REPRESSOR

OF SILENCING 1 (ROS1), possess 5-methylcytosine-DNA glycosylase activity and are necessary for the regulation of development, response to infections and abiotic stress and silencing of transgenes and mobile elements. Homologues of DME and ROS1 are present in all plant groups; however, outside *A. thaliana*, they are poorly studied. Here we report the properties of a recombinant fragment of the ROS1 protein from *Nicotiana tabacum* (NtROS1), which contains all main structural domains required for catalytic activity. Using homologous modeling, we have constructed a structural model of NtROS1, which revealed folding characteristic of DNA glycosylases of the helix-hairpin-helix structural superfamily. The recombinant NtROS1 protein was able to remove mC bases from DNA, and the enzyme activity was barely affected by the methylation status of CG dinucleotides in the opposite strand. The enzyme removed 5-hydroxymethylcytosine (hmC) from DNA with a lower efficiency, showing minimal activity in the presence of mC in the opposite strand. Expression of the NtROS1 gene in cultured human cells resulted in a global decrease in the level of genomic DNA methylation. In general, it can be said that the NtROS1 protein and other homologues of DME and ROS1 represent a promising scaffold for engineering enzymes to analyze the status of epigenetic methylation and to control gene activity.

Key words: epigenetic demethylation; 5-methylcytosine; 5-hydroxymethylcytosine; DNA glycosylases; REPRESSOR OF SILENCING 1; *Nicotiana tabacum*.

For citation: Petrova D.V., Permyakova N.V., Grin I.R., Zharkov D.O. Characterization of demethylating DNA glycosylase ROS1 from *Nicotiana tabacum* L. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(4):341-348. DOI 10.18699/VJGB-22-41

Введение

Метилирование ДНК представляет собой особый механизм контроля активности генов, который получил максимальное развитие у высших эукариот. Азотистое основание 5-метилцитозин (mC), образующееся в результате метилирования цитозина по положению C5, служит обратимой эпигенетической меткой, которая играет важную роль в регуляции транскрипции генов и защите генома от мобильных элементов. Метилирование ДНК характерно для широкого круга многоклеточных эукариот, однако значение и функции метилирования у этих организмов сильно различаются (Lee et al., 2010; Zemach, Zilberman, 2010). Например, у млекопитающих метилирование чаще всего происходит в CpG-динуклеотидах, в то время как у растений значительная доля mC приходится на тринуклеотиды CHG и CHN (где H – любое основание, кроме G). Влияние mC на активность генов главным образом опосредовано белками, содержащими метилсвязывающие домены, которые образуют комплексы с гистондеацетилазами или же сами обладают активностью гистон-специфичных метилтрансфераз, факторов ремоделирования хроматина и т. п., что ведет к конденсации хроматина и подавлению транскрипции (Ballestar, Wolffe, 2001; Baubec et al., 2013). Недавние исследования показали, что эпигенетическую роль в геноме млекопитающих играет также окисленное производное 5-метилцитозина – 5-гидроксиметилцитозин (hmC) (Branco et al., 2011). В отличие от mC, hmC обогащен в области промоторов и активно экспрессируемых генов и рассматривается как активирующий эпигенетический маркер (Pastor et al., 2011; Yu et al., 2012).

Корректное метилирование различных локусов ДНК в клетке крайне важно, поскольку от него зависит транскрипционная активность генов. Ошибки в процессе метилирования ДНК могут приводить к тяжелым последствиям. В частности, у человека глобальное деметилирование ДНК или гиперметилирование генов-онкосупрессоров служат маркерами онкозаболеваний. Поддержание статуса метилирования ДНК в клетках основано на балансе процессов метилирования и активного и пассивного деметилирования. Механизмы активного деметилирования геномной ДНК высших эукариот были выяснены лишь в

последнее десятилетие. У млекопитающих активное деметилирование инициируется регулируемым повреждением mC, которое может происходить двумя способами: либо с дезаминированием mC до T ферментами AID/APOBEC, либо с окислением mC до hmC и дальнейших производных (5-формилцитозина и 5-карбокситозина) диоксигеназами семейства TET (Pastor et al., 2013; Bochtler et al., 2017; Wu, Zhang, 2017). Модифицированные основания далее воспринимаются клеточными системами репарации как повреждения и удаляются по пути эксцизионной репарации оснований ДНК.

В отличие от млекопитающих, у растений обнаружены уникальные ферменты, гидролизующие N-гликозидные связи mC-нуклеотидов. Эти ДНК-гликозилазы – DEMETER (DME) и REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1, также известный как DEMETER-LIKE 1 или DML1) (Choi Y. et al., 2002; Gong et al., 2002; Agius et al., 2006; Morales-Ruiz et al., 2006) – принимают участие в регуляции статуса метилирования отдельных районов ДНК растений, от которого зависит импринтинг генов при наследовании по отцовской или материнской линии и сайленсинг или активация промоторов отдельных генов в жизненном цикле растений (Li Y. et al., 2018; Parrilla-Doblas et al., 2019; Roldán-Arjona et al., 2019). После удаления основания mC образовавшийся апурино-апиридиноновый сайт (АП-сайт) расщепляется или собственной АП-лиазной активностью фермента, или АП-эндонуклеазой APE1L; далее одной из ДНК-полимераз включается нормальный нуклеотид, и разрыв лигируется ДНК-лигазой LIG1. Интересно, что DME и ROS1 могут также удалять основания hmC, который, как считается, не участвует в эпигенетической регуляции у растений (Jang et al., 2014). Локализация деметилирования ферментами DME/ROS1 регулируется малыми РНК, которые связываются с самим ферментом или с белковым комплексом, в состав которого он входит (Penterman et al., 2007; Li X. et al., 2012).

Помимо DME и ROS1, в геноме модельного растительного организма *Arabidopsis thaliana* присутствуют еще три гена, гомологичных DME и ROS1, – DEMETER-LIKE 2 (DML2), DEMETER-LIKE 3 (DML3) и AT3G47830, о функциях которых практически ничего не известно, кро-

ме участия DML2 и DML3 в поддержании корректного метилирования ДНК (Ortega-Galisteo et al., 2008; Le et al., 2014). Все эти белки относятся к структурному суперсемейству ДНК-гликозилаз «спираль–шпилька–спираль» (Helix–hairpin–Helix, HhH). Другие члены этого суперсемейства участвуют в репарации ДНК, удаляя из генома окисленные, алкилированные и дезаминированные азотистые основания (Zharkov, 2008; Федорова и др., 2010). Ферменты DME/ROS1 привлекают внимание как потенциальные инструменты для направленной регуляции активности генов. Так, показана принципиальная возможность направленного деметилирования ДНК в клетках человека ферментом ROS1 *A. thaliana* (AtROS1), слитого с РНК-направляемым белком Cas9 (Devesa-Guerra et al., 2020), а фермент DME *A. thaliana* (AtDME) применялся для анализа уровня mC в геномной ДНК (Choi W.L. et al., 2021).

В других растениях, кроме *A. thaliana*, роль DME-подобных белков в активном эпигенетическом деметилировании исследовалась очень ограниченно: имеются отдельные данные на примерах риса, пшеницы, ячменя и томата (Ono et al., 2012; Wen et al., 2012; Kapazoglou et al., 2013; Liu et al., 2015). В 2007 г. был клонирован гомолог ROS1 из *Nicotiana tabacum* (NtROS1) и показано, что рекомбинантный белок, наработанный в культуре клеток насекомых, способен расщеплять метилированную геномную ДНК табака (Choi C.-S., Sano, 2007). Ни в одном из этих случаев подробной биохимической характеристики белка не проводилось. Ранее нами было показано, что фрагмент NtROS1, соответствующий минимальному каталитически активному фрагменту AtROS1, обладает активностью 5-метилцитозин-ДНК-гликозилазы (Gruber et al., 2018).

В связи с потенциальной ценностью ферментов системы активного деметилирования растений как инструментов для генетических технологий в настоящей работе охарактеризована субстратная специфичность рекомбинантного каталитического фрагмента NtROS1 по отношению к основаниям mC и hmC в разном контексте метили-

рованных CpG-динуклеотидов и показано, что экспрессия NtROS1 в клетках человека вызывает глобальное снижение уровня метилирования ДНК.

Материалы и методы

В работе использовали обратную транскриптазу ProtoScript II, ДНК-полимеразу Q5 Hot Start High-Fidelity, урацил-ДНК-гликозилазу *Escherichia coli*, эндонуклеазы рестрикции *ClaI* и *SacI* (все – New England BioLabs, США) и полинуклеотидкиназу бактериофага T4 («Биосан», Россия). Олигонуклеотиды, перечисленные в таблице, были синтезированы в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН из коммерчески доступных амидофосфитов (Glen Research, США). При необходимости олигонуклеотиды метили по 5'-концу ³²P с использованием γ [³²P]АТФ (лаборатория биотехнологии ИХБФМ СО РАН) и полинуклеотидкиназы фага T4.

При построении модели каталитического фрагмента NtROS1 в программе Swiss-Model (Waterhouse et al., 2018) применяли шаблоны AtDME (AF-Q8LK56-F1-model_v1) и AtROS1 (AF-Q9SJQ6-F1-model_v1) из базы данных AlphaFold (Jumper et al., 2021).

Для получения каталитически неактивного варианта NtROS1 с заменой Asp1359Asn использовали плазмиду pLATE31 со вставкой, кодирующей каталитически активный фрагмент NtROS1 (аминокислотные остатки 754–1796) (Gruber et al., 2018), праймеры D1359Nfwd и D1359Nrev (см. таблицу) и набор для сайт-направленного мутагенеза Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England BioLabs). Полученные плазмиды анализировали секвенированием по Сэнгеру. Белок дикого типа и мутантный вариант D1359N нарабатывали и выделяли, как описано ранее (Gruber et al., 2018).

Активность NtROS1 исследовали с помощью двуцепочечных субстратов, полученных отжигом олигонуклеотидов C1, C2, M1, M2, H1 и H2 (см. таблицу). Смесь для реакции содержала 50 нМ субстрата, 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 0.1 % бычий сыворо-

Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название	Последовательность (5'→3')
ПЦР с обратной транскрипцией	
RTPCRfwd	AGAAGGAGATATAAАСТАТGTCАТTCАТТАGАAGACGGAAACCG
RTPCRrev	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGTTTTСАТСТGGCTTTСТТТАGТСС
Сайт-направленный мутагенез	
D1359Nfwd	ССТGТСААСАСАААСGТТGGC
D1359Nrev	GAAAGCAAGGTGGTGAAGTGT
Исследование активности и специфичности фермента	
C1	GСТТGТАСТТТАGCGСАТТGАТТСТСАССАСG
C2	CGTGGTGAGAАТСААТGCGСТААAGTАСАAGC
M1	GСТТGТАСТТТТАGМGСАТТGАТТСТСАССАСG (M = mC)
M2	CGTGGTGAGAАТСААТGМGСТААAGTАСАAGC (M = mC)
H1	GСТТGТАСТТТТАGHGСАТТGАТТСТСАССАСG (H = hmC)
H2	CGTGGTGAGAАТСААТGHGСТААAGTАСАAGC (H = hmC)

точный альбумин и 100 нМ NtROS1. Смесь инкубировали при 37 °С, через определенное время (2–300 мин) отбирали аликвоты и смешивали их с равным объемом стоп-раствора (80 % формамид, 20 мМ ЭДТА, 0.1 % ксиленцианол, 0.1 % бромфеноловый синий). При необходимости аликвоты предварительно прогревали в течение 2 мин при 95 °С в присутствии 0.1 М NaOH и нейтрализовали эквимольным количеством HCl. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 20 % полиакриламидном геле, содержащем 7.2 М мочевины, и визуализировали радиолюминесцентным сканированием с использованием системы Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare). Результаты обсчитывали в программе Quantity One v4.6.3 (Bio-Rad Laboratories, США). Определение кажущихся констант скорости проводили в программе SigmaPlot v11.0 (Systat Software, США) путем нелинейной регрессии зависимости концентрации продукта от времени реакции к уравнению $[P] = [P]_{\max}(1 - e^{-kt})$, где $[P]$ – концентрация продукта, $[P]_{\max}$ – максимальная концентрация продукта, k – константа скорости реакции, t – время.

Чтобы оценить статус глобального метилирования ДНК при экспрессии в клетках человека, кодирующие последовательности NtROS1 дикого типа и D1359N были переклонированы в плазмиду pIRES-eGFP-puro (Clontech, США) по сайтам рестрикции *SacI* и *ClaI*. Клетки HEK293 Phoenix ($1.2 \cdot 10^6$) трансфицировали 5 мкг плазмиды кальций-фосфатным методом и выращивали в монослое в среде DMEM с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой (HyClone, США), через 24 и 48 ч обновляя среду с добавлением в нее пуromицина до концентрации 3 мкг/мл. Эффективность трансфекции оценивали при помощи проточной цитофлуориметрии (NovoCyte 3000, ACEA Biosciences, США) с детекцией флуоресценции белка eGFP, кодируемого той же плазмидой. Наличие экспрессии *NtROS1* в трансфицированных клетках подтверждали ПЦР с обратной транскрипцией с мРНК β-актина в качестве контроля. Из собранных клеток ($5 \cdot 10^6$)

выделяли геномную ДНК набором QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) и определяли относительное содержание mC с использованием антител к 5-метилцитозину (набор MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit, EpiGenetek, США). Результаты измерений сравнивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

ДНК-гликозилазы растений, специфичные по отношению к mC, отличаются значительными размерами. Так, белки AtDME и AtROS1 из *A. thaliana*, как и их паралоги DML2 и DML3, имеют в длину более 1000 аминокислотных остатков (рис. 1). Протяженные N-концевые участки этих полипептидов не структурированы, хотя некоторые их части необходимы для активности фермента. С-концевые участки содержат консервативный каталитический домен HhH и железно-серный кластер (FeS-кластер), который характерен для многих ДНК-гликозилаз, узнающих окислительные повреждения ДНК, а также РНК-связывающий мотив (RNA Recognition Motif, RRM) и пермутированный цинковый палец типа CXXC, уникальные для семейства DME/ROS1 (см. рис. 1, а). В отличие от всех других ДНК-гликозилаз суперсемейства HhH, каталитический домен у белков семейства DME/ROS1 разорван длинной неконсервативной вставкой (Ponferrada-Marín et al., 2011). Исходя из литературных данных о белке ROS1 из *A. thaliana*, ранее нами был клонирован фрагмент кДНК *NtROS1*, кодирующий аминокислотные остатки 754–1796 (Gruber et al., 2018). Этот участок содержит все элементы, необходимые для проявления каталитической активности у AtROS1 (Hong et al., 2014).

Поскольку структуры белков семейства DME/ROS1 на сегодня неизвестны, для более детального понимания организации каталитического фрагмента NtROS1 было проведено его гомологичное моделирование на основе моделей AtDME и AtROS1 из коллекции шаблонов AlphaFold (Jumper et al., 2021). Две получившиеся модели были

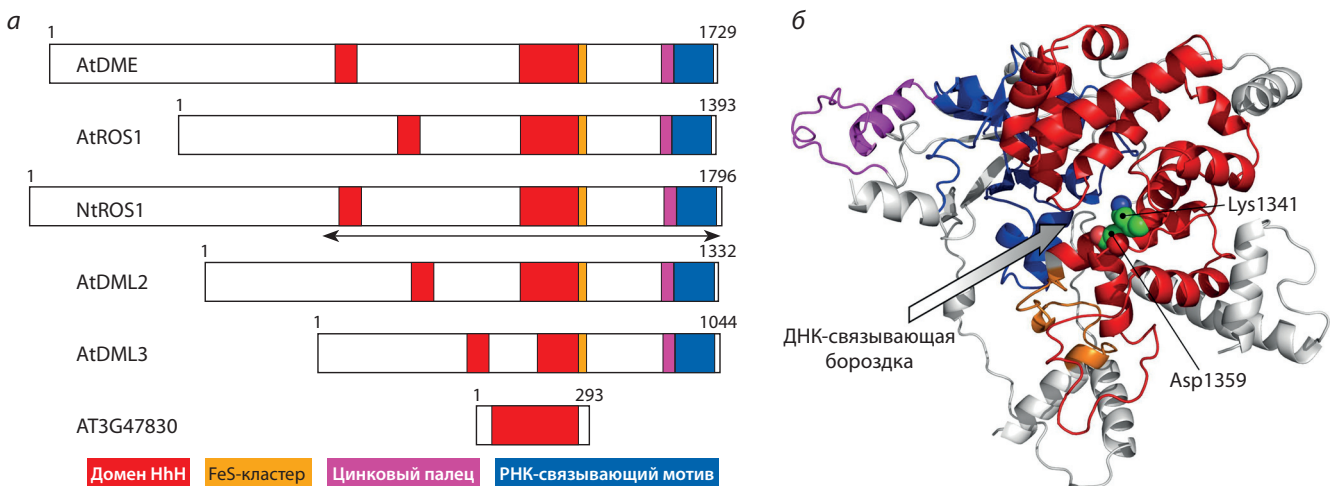


Рис. 1. Структура NtROS1: а – схема организации белков семейства DME/ROS1, стрелки обозначают каталитический фрагмент NtROS1; б – модель каталитического фрагмента NtROS1 (длинные неупорядоченные участки не показаны).

Красным цветом на обоих рисунках обозначен домен HhH, оранжевым – FeS-кластер, фиолетовым – цинковый палец типа CXXC, синим – РНК-связывающий мотив RRM.

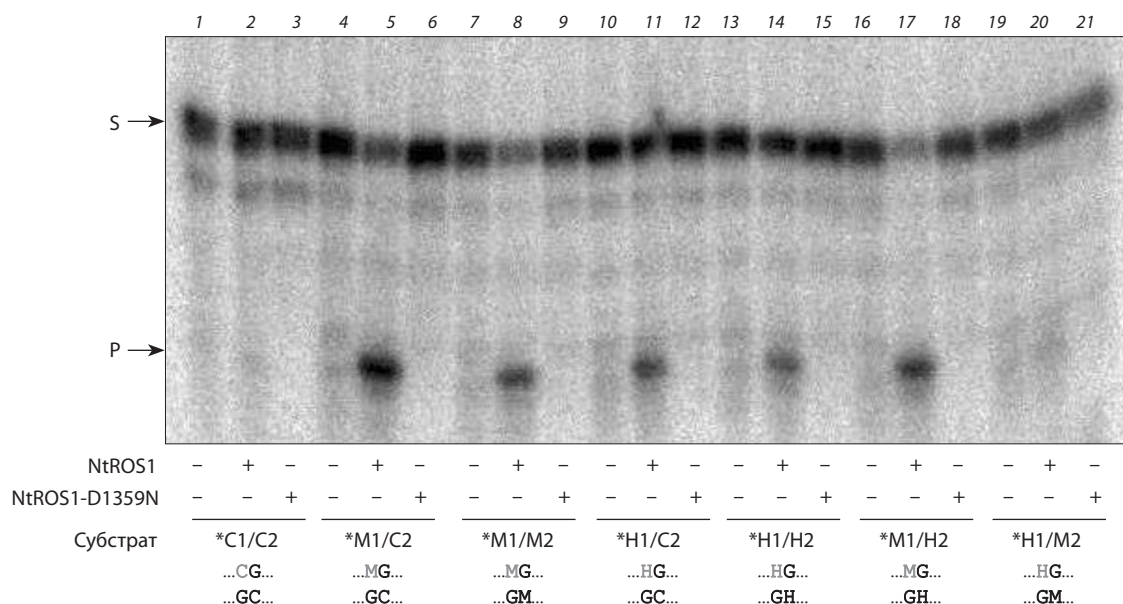


Рис. 2. Радиоавтограф геля после разделения продуктов реакции расщепления субстратов (50 нМ) ферментами NtROS1 дикого типа и D1359N (100 нМ) в течение 60 мин.

В подписи под гелем указан контекст метилирования CpG-сайта в каждом субстрате. Дорожки 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 – субстраты без фермента; дорожки 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20 – обработка ферментом NtROS1 дикого типа; дорожки 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 – обработка ферментом NtROS1-D1359N. S – субстрат, P – продукт расщепления. На схематических представлениях субстратов серым цветом выделено удаляемое основание.

практически идентичны, за исключением структуры длинных негомологичных участков. Разорванный домен HhH укладывается в α -спиральную структуру, характерную для ДНК-гликозилаз этого суперсемейства, в которой выделяется ДНК-связывающая бороздка с каталитическими остатками Lys1341 и Asp1359 (см. рис. 1, б). Помимо этого, несколько периферических α -спиралей плотно прилегают к домену HhH и FeS-кластеру и, очевидно, важны для поддержания их структуры. FeS-кластер, цинковый палец и мотив RRM образуют отдельные структурные элементы, не перекрывающие доступ к ДНК-связывающей бороздке (см. рис. 1, б). Все неупорядоченные участки структуры также располагаются со стороны белковой молекулы, противоположной ДНК-связывающей бороздке.

Для анализа каталитической активности и субстратной специфичности белка NtROS1 проводили реакцию расщепления двуцепочечных олигонуклеотидных субстратов, содержащих CpG-динуклеотид, в котором цитозин был не метилирован, метилирован или гидроксиметилирован в одной или обеих цепях (рис. 2). Расщепляемая цепь была помечена ^{32}P по 5'-концу. NtROS1 практически не проявлял активности по отношению к субстрату, содержащему неметилированный CpG-сайт, что согласуется с литературными данными о необходимости заместителей при C5 цитозина для активности фермента AtROS1 из *A. thaliana* (Morales-Ruiz et al., 2006). Активность по отношению к основаниям mC и hmC наблюдалась, однако ее уровень заметно различался для субстратов обоих типов. Сравнительная эффективность расщепления субстратов M1/C2 и M1/M2 (дорожки 5 и 8) с расщеплением субстратов H1/C2 и H1/H2 (дорожки 11 и 14), можно заметить, что фермент предпочтительно удаляет mC по сравнению с hmC как в

CpG-сайтах, модифицированных по одной цепи, так и в полностью модифицированных. Незначительные различия в расщеплении субстратов M1/C2, M1/M2 и M1/H2 (дорожки 5, 8 и 17) говорят о том, что модификации в комплементарной цепи слабо влияют на удаление mC, а в случае присутствия hmC в комплементарной цепи, возможно, даже повышают процент расщепления. Фермент не показал активности в отношении ДНК-субстратов, содержащих урацил или 8-оксогуанин. Мутантный вариант NtROS1-D1359N, как и ожидалось, не проявлял гликозилазной активности в отношении всех исследованных субстратов с различными комбинациями mC и hmC, что подтверждает важность наличия остатка Asp в каталитическом центре белка ROS1 для удаления модифицированных оснований из ДНК.

По литературным данным, фермент AtROS1 отличается очень низким числом оборотов (Ponferrada-Marín et al., 2009), поэтому использовать стационарную кинетику для количественной характеристики активности NtROS1 не представлялось возможным. Для определения кажущейся константы скорости реакции были проведены эксперименты в условиях, приближенных к условиям кинетики одного оборота ($[E]_0 > [S]_0$). В этих условиях весь ДНК-субстрат быстро связывается с ферментом, и скорость реакции лимитирована не связыванием субстрата или высвобождением продукта, а химической стадией реакции псевдопервого порядка – гидролизом N-гликозидной связи модифицированного нуклеотида (Porello et al., 1998). Таким образом, следя за накоплением продукта со временем (рис. 3, а), можно оценить константу скорости реакции. Графики зависимости концентрации продукта от времени для всех субстратов представлены на рис. 3, б. Из приве-

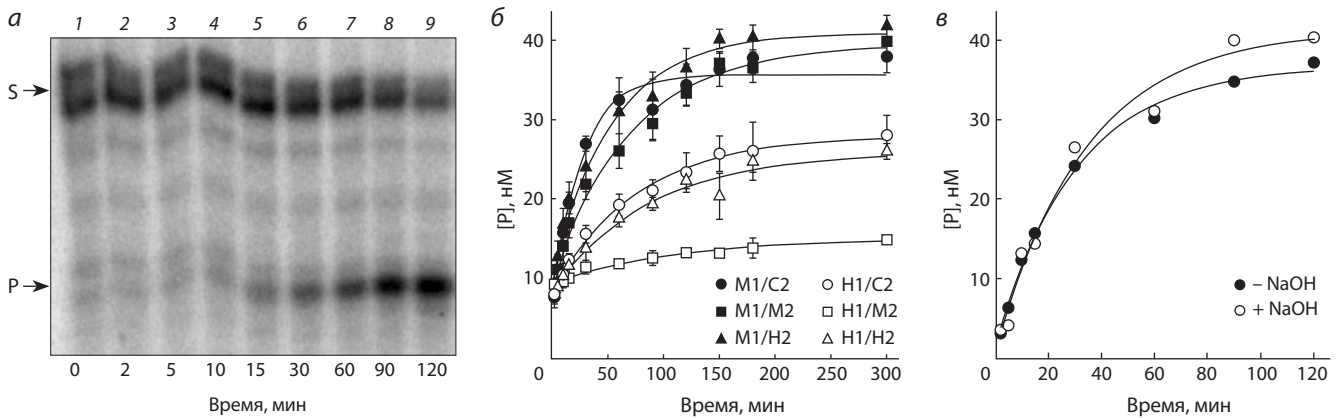


Рис. 3. Зависимость накопления продукта реакции от времени при гидролизе разных субстратов ферментом NtROS1.

a – репрезентативный радиоавтограф продуктов реакции после расщепления субстрата M1/M2 в течение 0–120 мин; *б* – субстраты M1/C2, M1/M2, M1/H2, H1/C2, H1/M2, H1/H2 (показаны средние значения и стандартное отклонение по трем-четырем экспериментам); *в* – субстрат M1/M2 с обработкой и без обработки NaOH для полного расщепления АП-сайта.

денных данных были рассчитаны значения констант скорости реакции для субстратов с разным статусом метилирования и гидроксиметилирования CpG-динуклеотидов:

Субстрат	$k \cdot 10^4, c^{-1}$
*M1/C2	6.5 ± 1.1
*M1/M2	2.4 ± 0.5
*M1/H2	3.0 ± 0.7
*H1/C2	1.9 ± 0.3
*H1/M2	1.6 ± 0.6
*H1/H2	2.0 ± 0.3
*C1/C2	Нет расщепления

* Цепь, меченная ^{32}P .

Во всех случаях hmC был худшим субстратом для NtROS1 по сравнению с mC. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что фермент NtROS1 эффективнее всего катализирует расщепление полуметилированного CpG-сайта, а hmC в контексте HG/GM, напротив, представляет собой наихудший субстрат для этого фермента. Эти результаты согласуются с качественными данными об относительной эффективности расщепления разных субстратов (см. рис. 2).

Многие ДНК-гликозилазы с низким числом оборотов характеризуются более низкой АП-лиазной активностью по сравнению с ДНК-гликозилазной активностью. В этом случае после удаления модифицированного основания часть продукта реакции долго существует в виде АП-сайта, и истинное количество продукта можно выявить только при обработке щелочью либо нуклеофильными аминами (Porello et al., 1998). Однако в случае NtROS1 дополнительная обработка NaOH не приводила к заметному увеличению накопления продукта реакции (см. рис. 3, в). Повидимому, скорость реакции, катализируемой NtROS1, лимитируется гидролизом *N*-гликозидной связи, что предполагалось и для фермента из *A. thaliana* (Hong et al., 2014).

Для оценки способности белка NtROS1 функционировать в качестве деметилазы при экспрессии в клетках млекопитающих были сконструированы плазмиды на основе вектора pIRES-eGFP-puro, кодирующие белок дикого типа NtROS1 и каталитически неактивный вариант NtROS1-D1359N. С использованием антител к mC была

проведена оценка уровня этого эпигенетического основания в клетках HEK293 после трансфекции плазмидами. При наблюдении за клетками в период после трансфекции выяснилось, что пролиферация клеток с плазмидой pIRES-eGFP-puro-NtROS1 снижалась примерно на 30 % по сравнению с контрольными клетками, трансфицированными плазмидой без вставки, и клетками, трансфицированными плазмидой, кодирующей каталитически неактивный белок. При этом доля живых клеток во всех случаях была одинакова, что говорит о возможном замедлении клеточного цикла в присутствии активного фермента NtROS1 из-за необходимости репарировать большое число внесенных в ДНК разрывов по остаткам mC. Анализ уровня mC выявил его падение примерно в два раза относительно контрольных образцов при экспрессии NtROS1 дикого типа и отсутствие статистически значимых изменений при экспрессии NtROS1-D1359N (рис. 4). В целом можно считать, что временная экспрессия каталитического домена 5-метилцитозин-ДНК-гликозилазы NtROS1 в клетках человека действительно приводит к глобальному удалению эпигенетической метки mC. Количество hmC в клетках не удалось измерить при помощи иммуноанализа, вероятно потому, что оно примерно на порядок ниже, чем количество mC (Yu et al., 2012; Zahid et al., 2016).

Таким образом, можно заключить, что белок NtROS1 представляет собой ДНК-гликозилазу, специфичную по отношению к 5-метилцитозину и в меньшей степени к 5-гидроксиметилцитозину. По всей видимости, его биологические функции, как и в случае AtROS1, состоят в регуляции статуса метилирования и экспрессии генов в ходе эмбрионального развития (Yamamoto et al., 2014) или в ответ на инфекции и абиотический стресс (Gong et al., 2002; Le et al., 2014) и в регуляции сайленсинга трансгенов и мобильных элементов (Gong et al., 2002; Kapoor et al., 2005; Zhu et al., 2007). Крайне интересен не выясненный до сих пор механизм РНК-зависимой адресации белков семейства DME/ROS1 к сайтам деметилирования. Мотив RRM в составе этих полипептидов гомологичен мотивам, отвечающим за неспецифические взаимодействия с РНК во многих других белках (Cléry et al., 2008), и по своему положению в структуре (см. рис. 1, б) мог бы связывать

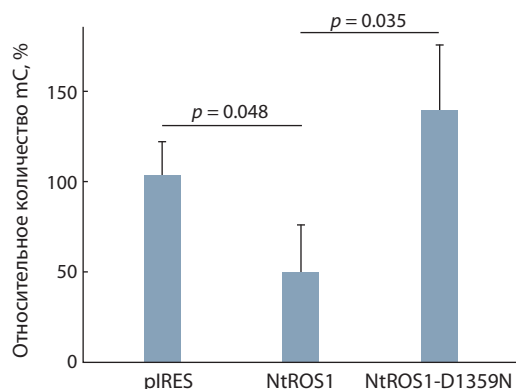


Рис. 4. Относительное количество 5mC в ДНК клеток HEK293 Phoenix, трансфицированных плазмидой pIRES-eGFP-puro, не несущей вставки либо несущей вставку, кодирующую каталитический фрагмент NtROS1 или его неактивный вариант NtROS1-D1359N.

Приведено среднее и стандартное отклонение по результатам трех экспериментов.

малые РНК, комплементарные последовательности ДНК с 5'-стороны от удаляемого остатка 5mC. Цинковые пальцы типа СХХС используются многими белками, узнающими 5mC, но они преимущественно связывают именно неметилированную ДНК и предположительно необходимы для точного позиционирования фермента при наличии нескольких расположенных на небольшом расстоянии сайтов метилирования (Iyer et al., 2011).

Перспективы использования NtROS1 и других белков семейства DME/ROS1 как инструментов для генетических технологий во многом зависят от возможности уменьшения размера каталитического фрагмента. Известно, что при удалении длинной вставки между двумя частями домена HhN каталитического фрагмента AtROS1 активность фермента сохраняется в полном объеме, однако делеция С-концевого участка после FeS-кластера вызывает потерю активности (Hong et al., 2014). Судя по структурным моделям AtROS1 и NtROS1, домены HhN и RRM взаимодействуют друг с другом, и, вероятно, уменьшение размера белка в этой части возможно лишь за счет сокращения длины вставки между ними. В любом случае белки DME/ROS1, в том числе NtROS1, представляют собой многообещающую основу для инженерии ферментов с целью анализа статуса эпигенетического метилирования и управления активностью генов.

Заключение

В работе исследована деметилирующая ДНК-гликозилаза ROS1 из *Nicotiana tabacum*, что делает этот фермент вторым изученным на биохимическом уровне белком ROS1 после его гомолога из *Arabidopsis thaliana*. Помимо 5-метилцитозина, NtROS1 показал способность удалять из ДНК 5-гидроксиметилцитозин, однако эффективность этой реакции была ниже, чем для 5-метилцитозина. Очевидно, это связано с тем, что растения практически не используют 5-гидроксиметилцитозин в качестве эпигенетической метки. Наблюдаемое снижение глобального метилирования при продукции NtROS1 в клетках человека дает основание надеяться, что этот белок или его оптимизированные варианты можно будет применять как ин-

струмент для эпигенетической регуляции либо самостоятельно, либо в качестве активного модуля в конструкциях, адресуемых к определенным участкам генома.

Список литературы / References

- Федорова О.С., Кузнецов Н.А., Коваль В.В., Кнорре Д.Г. Конформационная динамика и предстационарная кинетика ДНК-гликозилазы. *Биохимия*. 2010;75(10):1377-1394.
- [Fedorova O.S., Kuznetsov N.A., Koval V.V., Knorre D.G. Conformational dynamics and pre-steady-state kinetics of DNA glycosylases. *Biochemistry (Moscow)*. 2010;75(10):1225-1239. DOI 10.1134/S0006297910100044.]
- Agius F., Kapoor A., Zhu J.-K. Role of the *Arabidopsis* DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103(31):11796-11801. DOI 10.1073/pnas.0603563103.
- Ballestar E., Wolffe A.P. Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur. J. Biochem*. 2001;268(1):1-6. DOI 10.1046/j.1432-1327.2001.01869.x.
- Baubec T., Ivánek R., Lienert F., Schübeler D. Methylation-dependent and -independent genomic targeting principles of the MBD protein family. *Cell*. 2013;153(2):480-492. DOI 10.1016/j.cell.2013.03.011.
- Bochtler M., Kolano A., Xu G.-L. DNA demethylation pathways: additional players and regulators. *Bioessays*. 2017;39(1):1-13. DOI 10.1002/bies.201600178.
- Branco M.R., Ficiz G., Reik W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat. Rev. Genet*. 2011;13(1):7-13. DOI 10.1038/nrg3080.
- Choi C.-S., Sano H. Identification of tobacco genes encoding proteins possessing removal activity of 5-methylcytosines from intact tobacco DNA. *Plant Biotechnol*. 2007;24(3):339-344. DOI 10.5511/plantbiotechnology.24.339.
- Choi W.L., Mok Y.G., Huh J.H. Application of 5-methylcytosine DNA glycosylase to the quantitative analysis of DNA methylation. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22(3):1072. DOI 10.3390/ijms22031072.
- Choi Y., Gehring M., Johnson L., Hannon M., Harada J.J., Goldberg R.B., Jacobsen S.E., Fischer R.L. DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis*. *Cell*. 2002;110(1):33-42. DOI 10.1016/s0092-8674(02)00807-3.
- Cléry A., Blatter M., Allain F.H.-T. RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2008;18(3):290-298. DOI 10.1016/j.sbi.2008.04.002.
- Devesa-Guerra I., Morales-Ruiz T., Pérez-Roldán J., Parrilla-Doblas J.T., Dorado-León M., García-Ortiz M.V., Ariza R.R., Roldán-Arjona T. DNA methylation editing by CRISPR-guided excision of 5-methylcytosine. *J. Mol. Biol*. 2020;432(7):2204-2216. DOI 10.1016/j.jmb.2020.02.007.
- Gong Z., Morales-Ruiz T., Ariza R.R., Roldán-Arjona T., David L., Zhu J.-K. ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell*. 2002;111(6):803-814. DOI 10.1016/s0092-8674(02)01133-9.
- Gruber D.R., Toner J.J., Miears H.L., Shernyukov A.V., Kiryutin A.S., Lomzov A.A., Endutkin A.V., Grin I.R., Petrova D.V., Kupryushkin M.S., Yurkovskaya A.V., Johnson E., Okon M., Bagryan-skaya E.G., Zharkov D.O., Smirnov S.L. Oxidative damage to epigenetically methylated sites affects DNA stability, dynamics, and enzymatic demethylation. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(20):10827-10839. DOI 10.1093/nar/gky893.
- Hong S., Hashimoto H., Kow Y.W., Zhang X., Cheng X. The carboxy-terminal domain of ROS1 is essential for 5-methylcytosine DNA glycosylase activity. *J. Mol. Biol*. 2014;426(22):3703-3712. DOI 10.1016/j.jmb.2014.09.010.
- Iyer L.M., Abhiman S., Aravind L. Natural history of eukaryotic DNA methylation systems. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci*. 2011;101:25-104. DOI 10.1016/B978-0-12-387685-0.00002-0.
- Jang H., Shin H., Eichman B.F., Huh J.H. Excision of 5-hydroxymethylcytosine by DEMETER family DNA glycosylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2014;446(4):1067-1072. DOI 10.1016/j.bbrc.2014.03.060.

- Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Zidek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S.A.A., Ballard A.J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A.W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583-589. DOI 10.1038/s41586-021-03819-2.
- Kapazoglou A., Drosou V., Argiriou A., Tsaftaris A.S. The study of a barley epigenetic regulator, *HvDME*, in seed development and under drought. *BMC Plant Biol.* 2013;13:172. DOI 10.1186/1471-2229-13-172.
- Kapoor A., Agarwal M., Andreucci A., Zheng X., Gong Z., Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.-K. Mutations in a conserved replication protein suppress transcriptional gene silencing in a DNA-methylation-independent manner in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 2005; 15(21):1912-1918. DOI 10.1016/j.cub.2005.09.013.
- Le T.-N., Schumann U., Smith N.A., Tiwari S., Au P.C.K., Zhu Q.-H., Taylor J.M., Kazan K., Llewellyn D.J., Zhang R., Dennis E.S., Wang M.-B. DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* 2014;15(9):458. DOI 10.1186/s13059-014-0458-3.
- Lee T.-F., Zhai J., Meyers B.C. Conservation and divergence in eukaryotic DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107(20): 9027-9028. DOI 10.1073/pnas.1005440107.
- Li X., Qian W., Zhao Y., Wang C., Shen J., Zhu J.-K., Gong Z. Antisilencing role of the RNA-directed DNA methylation pathway and a histone acetyltransferase in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012;109(28):11425-11430. DOI 10.1073/pnas.1208557109.
- Li Y., Kumar S., Qian W. Active DNA demethylation: mechanism and role in plant development. *Plant Cell Rep.* 2018;37(1):77-85. DOI 10.1007/s00299-017-2215-z.
- Liu R., How-Kit A., Stammiti L., Teyssier E., Rolin D., Mortain-Bertrand A., Halle S., Liu M., Kong J., Wu C., Degraeve-Guibault C., Chapman N.H., Maucourt M., Hodgman T.C., Tost J., Bouzayen M., Hong Y., Seymour G.B., Giovannoni J.J., Gallusci P. A DEMETER-like DNA demethylase governs tomato fruit ripening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015;112(34):10804-10809. DOI 10.1073/pnas.1503362112.
- Morales-Ruiz T., Ortega-Galisteo A.P., Ponferrada-Marín M.I., Martínez-Macías M.I., Ariza R.R., Roldán-Arjona T. DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;103(18):6853-6858. DOI 10.1073/pnas.0601109103.
- Ono A., Yamaguchi K., Fukada-Tanaka S., Terada R., Mitsui T., Iida S. A null mutation of *ROS1a* for DNA demethylation in rice is not transmissible to progeny. *Plant J.* 2012;71(4):564-574. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2012.05009.x.
- Ortega-Galisteo A.P., Morales-Ruiz T., Ariza R.R., Roldán-Arjona T. Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol. Biol.* 2008;67(6):671-681. DOI 10.1007/s11103-008-9346-0.
- Parrilla-Doblas J.T., Roldán-Arjona T., Ariza R.R., Córdoba-Cañero D. Active DNA demethylation in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(19):4683. DOI 10.3390/ijms20194683.
- Pastor W.A., Aravind L., Rao A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013;14(6):341-356. DOI 10.1038/nrm3589.
- Pastor W.A., Pape U.J., Huang Y., Henderson H.R., Lister R., Ko M., McLoughlin E.M., Brudno Y., Mahapatra S., Kapranov P., Tahiliani M., Daley G.Q., Liu X.S., Ecker J.R., Milos P.M., Agarwal S., Rao A. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature*. 2011;473(7347):394-397. DOI 10.1038/nature10102.
- Penterman J., Uzawa R., Fischer R.L. Genetic interactions between DNA demethylation and methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2007;145(4):1549-1557. DOI 10.1104/pp.107.107730.
- Ponferrada-Marín M.I., Parrilla-Doblas J.T., Roldán-Arjona T., Ariza R.R. A discontinuous DNA glycosylase domain in a family of enzymes that excise 5-methylcytosine. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(4): 1473-1484. DOI 10.1093/nar/gkq982.
- Ponferrada-Marín M.I., Roldán-Arjona T., Ariza R.R. ROS1 5-methylcytosine DNA glycosylase is a slow-turnover catalyst that initiates DNA demethylation in a distributive fashion. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(13):4264-4274. DOI 10.1093/nar/gkp390.
- Porello S.L., Leyes A.E., David S.S. Single-turnover and pre-steady-state kinetics of the reaction of the adenine glycosylase MutY with mismatch-containing DNA substrates. *Biochemistry.* 1998;37(42): 14756-14764. DOI 10.1021/bi981594+.
- Roldán-Arjona T., Ariza R.R., Córdoba-Cañero D. DNA base excision repair in plants: an unfolding story with familiar and novel characters. *Front. Plant Sci.* 2019;10:1055. DOI 10.3389/fpls.2019.01055.
- Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W296-W303. DOI 10.1093/nar/gky427.
- Wen S., Wen N., Pang J., Langen G., Brew-Appiah R.A.T., Mejias J.H., Osorio C., Yang M., Gemini R., Moehs C.P., Zemetra R.S., Kogel K.-H., Liu B., Wang X., von Wettstein D., Rustgi S. Structural genes of wheat and barley 5-methylcytosine DNA glycosylases and their potential applications for human health. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012;109(50):20543-20548. DOI 10.1073/pnas.1217927109.
- Wu X., Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 2017;18(9):517-534. DOI 10.1038/nrg.2017.33.
- Yamamuro C., Miki D., Zheng Z., Ma J., Wang J., Yang Z., Dong J., Zhu J.-K. Overproduction of stomatal lineage cells in *Arabidopsis* mutants defective in active DNA demethylation. *Nat. Commun.* 2014;5:4062. DOI 10.1038/ncomms5062.
- Yu M., Hon G.C., Szulwach K.E., Song C.-X., Zhang L., Kim A., Li X., Dai Q., Shen Y., Park B., Min J.-H., Jin P., Ren B., He C. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell.* 2012;149(6):1368-1380. DOI 10.1016/j.cell.2012.04.027.
- Zahid O.K., Zhao B.S., He C., Hall A.R. Quantifying mammalian genomic DNA hydroxymethylcytosine content using solid-state nanopores. *Sci. Rep.* 2016;6:29565. DOI 10.1038/srep29565.
- Zemach A., Zilberman D. Evolution of eukaryotic DNA methylation and the pursuit of safer sex. *Curr. Biol.* 2010;20(17):R780-R785. DOI 10.1016/j.cub.2010.07.007.
- Zharkov D.O. Base excision DNA repair. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008; 65(10):1544-1565. DOI 10.1007/s00018-008-7543-2.
- Zhu J., Kapoor A., Sridhar V.V., Agius F., Zhu J.-K. The DNA glycosylase/lyase ROS1 functions in pruning DNA methylation patterns in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 2007;17(1):54-59. DOI 10.1016/j.cub.2006.10.059.

ORCID ID

N.V. Permyakova orcid.org/0000-0001-9291-1343
I.R. Grin orcid.org/0000-0002-5685-1248
D.O. Zharkov orcid.org/0000-0001-5013-0194

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках проекта № 20-44-540007. Часть работы, посвященная моделированию структуры NtROS1, поддержана государственным заданием 121031300056-8. Секвенирование ДНК выполнялось сотрудниками ЦКП «Геномика» СО РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.11.2021. После доработки 24.02.2022. Принята к публикации 06.04.2022.