

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЯРОВИЗАЦИИ

A. B. Щербани¹, E. A. Салина

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;

¹электронный адрес: atos@bionet.nsc.ru

В обзоре рассмотрены механизмы эпигенетической регуляции генов яровизации растений, контролирующих переход к генеративной стадии, в зависимости от действия низкой температуры. На примере гена *FLC* арабидопсиса показано участие в механизме регуляции PR2-репрессирующего комплекса и некодирующей РНК. На основании собственных и других данных авторы предполагают аналогичный механизм регуляции гена *Vrn-1* у злаков.

Ключевые слова: яровизация, ген, пшеница, эпигенетическая регуляция, время колошения.

К эпигенетическим изменениям, как известно, относят такие генетические изменения, которые могут стабильно поддерживаться на протяжении многих делений соматических клеток, но при этом не связаны с изменением первичной структуры ДНК (Ng, Gurdon, 2008; Probst et al., 2009). В основе эпигенеза лежат два основных типа механизмов — транскрипционные и посттранскрипционные. К первому типу относятся механизмы, модифицирующие ДНК, и механизмы, модифицирующие гистоновые белки.

Основным механизмом модификации ДНК является метилирование остатков цитозина (Bird, 2002). У растений метилирование цитозина происходит как симметрично по обеим цепям (на CpG или CpNpG), так и асимметрично лишь на одной из двух цепей (на CpNpNp, где N обозначает любой нуклеотид) (Vanyushin, 2006). Известно, что метилирование цитозина в промоторных областях генов приводит к подавлению их транскрипционной активности, тогда как деметилирование этих областей приводит к увеличению транскрипции (Bird, 2002). Модификации гистоновых белков лежат в основе конформационных изменений хроматина, которые в свою очередь обеспечивают доступность молекулы ДНК для ферментов синтеза РНК (Kouzarides, 2007).

Наиболее частыми модификациями гистонов являются ацетилирование и метилирование аминокислот, при этом выявлены высококонсервативные модификации гистонов по определенным аминокислотам, характерные для активного (неактивного) состояния целого ряда генов из различных организмов (Martin, Zhang, 2005; Kouzarides, 2007). Следует отметить, что работу всех вышеперечисленных механизмов обеспечивают не только специфические белки-ферменты (ДНК-метилтрансферазы, гистонметилтрансферазы, ацетилтрансферазы и др.), но и различные низкомолекулярные некодирующие РНК, относящиеся либо к малым интерферирующими РНК (siRNA), либо к микро-РНК (miRNA) (Zaratiegui et al., 2007; Yang, Kuroda 2007; Carthew, Sontheimer, 2009; Ghildiyal, Zamore, 2009; Mattick et al., 2009). Эти РНК отвечают за сборку специфических белковых комплексов и их заня-

тируют на участках ДНК, подвергающихся тем или иным модификациям. Что касается посттранскрипционных эпигенетических механизмов, то они включают механизмы интерференции мРНК с помощью малой некодирующей РНК, что приводит либо к деградации мРНК, либо к ингибиованию ее трансляции (Tang, 2005; Ruiz-Ferrer, Voinnet, 2009; Hoffer et al., 2011).

Гены яровизации (*Vrn*) контролируют важнейший физиологический процесс перехода растения от вегетативной фазы развития к генеративной. Очевидно, что для выживания и адаптации требуется сопряжение данного момента развития растения с благоприятными климатическими условиями, поэтому в ходе эволюции была создана генетическая система, контролирующая переход к генеративной стадии в зависимости от основных внешних факторов — температуры и длины светового дня (Cockram et al., 2007; Jung, Muller, 2009; Laurie, 2009). Соответствующие этим факторам гены яровизации и фотoperиода тесно взаимосвязаны и образуют единую сеть. Это видно на рис. 1, где представлены схемы регуляции цветения у модельного растительного объекта — *Arabidopsis thaliana* и злаков (пшеницы, ячменя). Наблюдается определенный параллелизм ключевых звеньев регуляции, предполагающий сходный алгоритм функционирования этой системы (см. обзоры: Jung, Muller, 2009; Laurie, 2009). Так, было показано, что основным регулятором является индуктор цветения *FT* (*Vrn-3*), активирующий ген *API* (*Vrn-1*). Последний кодирует транскрипционный фактор, обеспечивающий трансформацию клеток апикальной меристемы стебля в клетки генеративных тканей. Ген-индуктор находится под контролем репрессора *FLC* (*Vrn-2*), который является проводником внешних сигналов (температуры и фотопериода). Гены яровизации представляют собой один из ярких примеров эпигенетической регуляции; ее мишенью в случае арабидопсиса является *FLC*-репрессор, тогда как в случае злаков — ген *Vrn-1* (Jung, Muller, 2009; Laurie, 2009).

Сначала рассмотрим, как происходит эпигенетическая регуляция *FLC*-гена арабидопсиса. Под влиянием

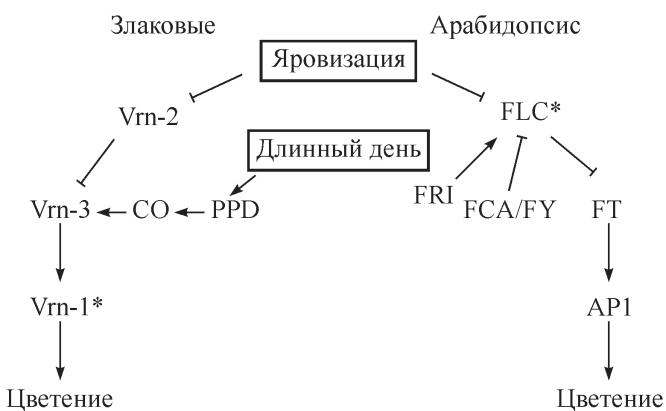


Рис. 1. Регуляция процесса цветения у арабидопсиса и злаковых растений.

Индукрующее влияние показано стрелкой, супрессирующее — линией соперечной чертой на конце. Гены-мишени эпигенетической регуляции отмечены звездочкой. Расшифровка обозначений генов: *Vrn* — *VERNALIZATION*, *FT* — *FLOWERING LOCUS T*, *FLC* — *FLOWERING LOCUS C*, *API* — *APETALA1*, *PPD* — *PHOTOPERIOD*, *CO* — *CONSTANS*, *FRI* — *FRIGIDA*.

низкой температуры или яровизации экспрессия этого гена начинает снижаться (Michaels, Amasino, 1999). На первом этапе эпигенетическая супрессия происходит благодаря посттранскрипционному механизму (Swiezewska et al., 2009). С 3'-конца гена *FLC* в направлении 5'-конца считывается некодирующая антисмысловая РНК, которая далее подвергается процессингу (рис. 2). Механизм последующего замолчания гена с помощью этой некодирующей РНК пока неясен, возможно, он происходит через образование siRNA, которая связывается с комплементарными участками мРНК, что вызывает ее последующую деградацию. Снижение экспрессии гена *FLC* на данном этапе еще не столь значительно, и это состояние является обратимым, так как при прекращении яровизации экспрессия *FLC* восстанавливается (Swiezewska et al., 2009). Для закрепления репрессированного состояния и стабильной его передачи в поколениях соматических клеток требуется второй этап, связанный с модификацией гистоновых белков.

Было показано, что в основе эпигенетической супрессии *FLC* лежит метилирование лизина в положениях 9 и 27 гистона H3 (Bastow et al., 2004; DeLucia et al., 2008). Этот процесс осуществляется комплексом белков, так называемый PR2 (polycomb repressive 2) (DeLucia et al., 2008). Аналогичные белковые комплексы участвуют в поддержании репрессивного состояния целого ряда генов растений, животных и человека (Goodrich, Tweedie, 2002; Ringrose 2007; Schwartz, Pirrotta, 2008). В его состав входит большое количество белков, в том числе гистонметилтрасфераза, белки PHD (plant homeo domain finger), которые отвечают за сайт-специфическое связывание с гистоном H3 (Li et al., 2006), и др. Процесс формирования PR2-комплекса в случае гена *FLC* инициируется под действием яровизации в составе 5'-концевого района первого интрана *FLC* (DeLucia et al., 2008). Важную роль в ориентировании и точной посадке белков комплекса на этот район играет смысловая РНК, синтезируемая внутри интрана 1 (Heo, Sung, 2011) (рис. 2). Следует отметить, что это первый пример у растений, показывающий участие длинных некодирующих молекул РНК в эпигенетической регуляции. В настоящее время неясно, какие факторы активируют транскрипцию обеих некодирующих РНК под действием

холода. К концу периода яровизации комплекс PR2 полностью завершает метилирование гистона H3 на протяжении дискретного района *FLC* (промотор, экзон 1, инtron 1), тем самым закрепляя репрессированное состояние этого гена (Bastow et al., 2004). Данное состояние сохраняется и после прекращения воздействия низкой температуры и обеспечивает снижение уровня экспрессии *FLC*, необходимое для последующего перехода растения в фазу цветения.

Эпигенетическая регуляция гена *Vrn-1* у злаков под действием яровизации представляет собой обратный вышеописанному процесс выхода из состояния репрессии, в котором данный ген находится до яровизации (рис. 1). Было показано, что для репрессивного состояния *Vrn-1* характерен высокий уровень метилирования лизина 27 гистона H3, как и в случае аналогичного состояния гена *FLC* (Oliver et al., 2009). В ходе яровизации происходит постепенное деметилирование лизина 27 и увеличение метилирования лизина 4 гистона H3 — маркера генетически активного состояния хроматина. Никаких изменений уровня и характера метилирования гистона H3 не выявлено у генов *Vrn-2* и *Vrn-3*, что позволило предположить, что *Vrn-1* является основной мишенью эпигенетической регуляции генов яровизации у злаков (Oliver et al., 2009). Пока ничего не известно относительно белковых факторов, осуществляющих процесс активации *Vrn-1*, и участия в этом процессе некодирующей РНК. Тем не менее на основе ряда данных можно сделать предположение о том, что процесс активации (супрессии) *Vrn-1* происходит аналогично тому процессу, который более детально описан в случае гена *FLC*.

В частности, во многих работах показано значение 5'-концевого района первого интрана *Vrn-1* в определении чувствительности к яровизации. Делеции в составе этого района (в пределах 2 т. п. н. от начала интрана) в большинстве случаев приводят к потере реакции на яровизацию и яровому типу развития (Fu et al., 2005; Von Zitzewitz et al., 2005; Cockram et al., 2007). Было высказано предположение, что этот район содержит некий сайт, ответственный за поддержание репрессивного состояния хроматина (Trevisakis et al., 2007). Как и в случае гена *FLC*, этот сайт может отвечать за инициацию специфического белкового комплекса, который осуществляет процесс метилирования (деметилирования) гистоновых белков. Для ячменя показано, что делеция в начале первого интрана *Vrn-1* связана с повышенным относительным содержанием активной формы гистона H3 (см. выше) и с более высоким уровнем транскрипции этого гена (Oliver et al., 2009). И наконец, говоря о важном значении первого интрана в регуляции экспрессии *Vrn-1*, следует упомянуть результаты нашего собственного исследования.

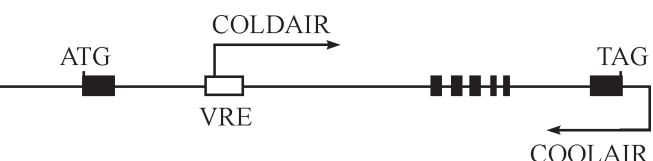


Рис. 2. Схема гена *FLC* с указанием стартовых точек и направлений транскрипции для некодирующих РНК, участвующих в эпигенетической регуляции.

COLEAIR — cold assisted intronic noncoding RNA, COOLAIR — cold induced long antisense intragenic RNA. Экзоны обозначены черными прямоугольниками. VRE (vernalization response element) — скрытый промотор транскрипции COLEAIR. ATG и TAG — старт и терминатор транскрипции *FLC* соответственно.

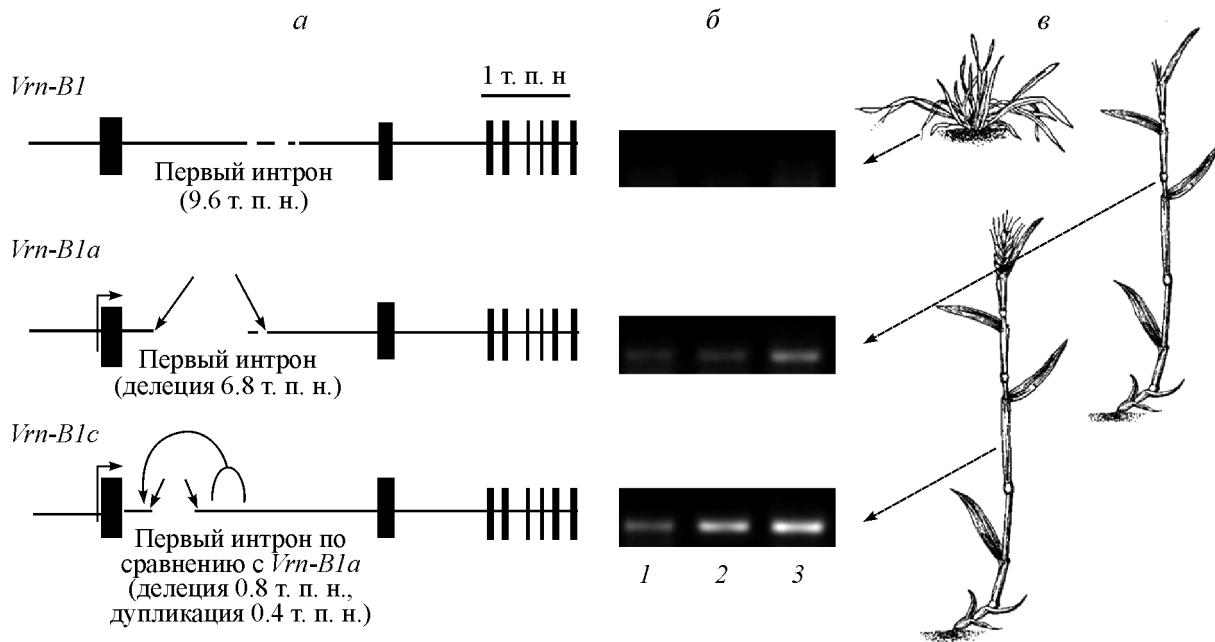


Рис. 3. Влияние структурных изменений в первом инtronе *Vrn-B1* на транскрипцию и фенотип растения.

a — схема структурной организации различных аллельных вариантов: *Vrn-B1*, *Vrn-B1a* и *Vrn-B1c*; черные вертикальные прямоугольники обозначают экзоны; показана крупная делеция в составе первого интрана *Vrn-B1a* относительно рецессивного аллеля *vrn-B1*, а также изменения внутри первого интрана *Vrn-B1c* относительно доминантного аллеля *Vrn-B1a*. *b* — транскрипция аллелей: *Vrn-B1* у сорта пшеницы Безостая 1; *Vrn-B1a* и *Vrn-B1c* в изогенных линиях сорта Безостая 1 на различных стадиях развития (1—3 — соответственно 3, 4 и 5 листьев). *c* — схематическое изображение фенотипа пшениц с рецессивным *Vrn-B1* и доминантными аллелями гена *Vrn-B1* на 8-й нед. развития.

Мы изучали два различных аллеля гена *Vrn-B1* в составе изогенных линий мягкой пшеницы *T. aestivum* (геном BBAADD, 2n = 42), различающихся по времени колошения (Efremova et al., 2011). Данные линии имеют генотип *vrn-A1 Vrn-B1a(Vrn-B1c) vrn-D1*, следовательно, сдвиг фазы колошения с большой вероятностью обусловлен различным аллельным состоянием доминантного гена *Vrn-B1*. Анализ первичной структуры этих аллелей показал, что они различаются только по структуре первого интрана: аллель *Vrn-B1c* содержит делецию 0.8 т. п. н. и дупликацию 0.4 т. п. н. в начале интрана по сравнению с аллелем *Vrn-B1a* (Shcherban et al., 2012b) (рис. 3). На стадии, предшествующей колошению, транскрипция *Vrn-B1c* на порядок превышает транскрипцию *Vrn-B1a*, что, по-видимому, определяет более раннее (на 7—14 сут в зависимости от условий) наступление фазы колошения у соответствующей изогенной линии (Efremova et al., 2011; Shcherban et al., 2012a). Исходя из этих данных мы предположили, что структурные изменения в начале первого интрана у аллеля *Vrn-B1c* приводят к увеличению уровня его транскрипции по сравнению со вторым аллелем и более раннему началу генеративной фазы. Увеличение транскрипции *Vrn-B1*, возможно, обусловлено нарушением связывания препрессирующего белкового комплекса в результате делеции (дупликации) в соответствии с эпигенетическим механизмом, описанным выше.

Таким образом, исследование генов яровизации важно не только потому, что затрагивает один из основных физиологических и селекционных признаков, но и в связи с тем, что эти гены представляют собой уникальную модель для изучения наиболее общих механизмов и закономерностей эпигенетической регуляции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-00178).

Список литературы

- Bastow R., Mylne J. S., Lister C., Lippman Z., Martienssen R. A., Dean C. 2004. Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature*. 427 : 164—167.
- Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Develop.* 16 : 6—21.
- Carthew R. W., Sontheimer E. J. 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 136 : 642—655.
- Cockram J., Jones H., Leigh F. J., O'Sullivan D., Powell W., Laurie D. A., Greenland A. J. 2007. Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. *J. Exp. Bot.* 58 : 1231—1244.
- De Lucia F., Creville P., Jones A. M., Greb T., Dean C. 2008. A PHD-Polycomb Repressive Complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 105 : 16831—16836.
- Efremova T. T., Arbuzova V. S., Leonova I. N. 2011. Multiple allelism in the *Vrn-B1* locus of common wheat. *Cereal Res. Commun.* 39 : 12—21.
- Fu D., Szucs P., Yan L., Helguera M., Skinner J. S., von Zitzewitz J., Hayes P. M., Dubcovsky J. 2005. Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol. Gen. Genomics*. 273 : 54—65.
- Ghildiyal M., Zamore P. D. 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* 10 : 94—108.
- Goodrich J., Tweedie S. 2002. Remembrance of things past: Chromatin remodeling in plant development. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 18 : 707—746.
- Heo J., Sung S. 2011. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science*. 331 : 76—79.
- Hoffer P., Ivashuta S., Pontes O., Vitins A., Pikaard C., Mroczka A., Wagner N., Voelker T. 2011. Posttranscriptional gene silencing in nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 108 : 409—414.
- Jung C., Muller A. E. 2009. Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends Plant Sci.* 14 : 563—573.
- Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 128 : 693—705.

- Laurie D. A. 2009. Developmental and reproductive traits in the *Triticeae*. In: Genetics and genomics of the *Triticeae*. Plant genetics and genomics: crops and models. 7. New York: Springer Science & Business Media, LLC. 591—609 p. [ISBN 978-0-387-77488-6].
- Li H., Ilin S., Wang W. et al. 2006. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature*. 442 : 91—95.
- Martin C., Zhang Y. 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 : 838—849.
- Mattick J. S., Amara P. P., Dinger M. E., Mercer T. R., Mehler M. F. 2009. RNA regulation of epigenetic processes. *Bioessays*. 31 : 51—59.
- Michaels S. D., Amasino R. M. 1999. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*. 11 : 949—956.
- Ng R. K., Gurdon J. B. 2008. Epigenetic inheritance of cell differentiation status. *Cell Cycle*. 7 : 1173—1177.
- Oliver S. N., Finnegan E. J., Dennis E. S., Peacock W. J., Trevaskis B. 2009. Vernalization-induced flowering in cereals is associated with changes in histone methylation at the VERNALIZATION gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 106 : 8386—8391.
- Probst A. V., Dunleavy E., Almouzni G. 2009. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 : 192—206.
- Ringrose L. 2007. Polycomb comes of age: genome-wide profiling of target sites. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19 : 290—297.
- Ruiz-Ferrer V., Voinnet O. 2009. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60 : 485—510.
- Schwartz Y. B., Pirrotta V. 2008. Polycomb complexes and epigenetic states. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20 : 266—273.
- Shcherban A. B., Efremova T. T., Khlestkina E. K., Salina E. A. 2012a. A new *Vrn-B1* allele of wheat, *T. aestivum*: gene structure, transcription and geographical distribution. In: Proceedings of the 15th International EWAC Conference. 7—11 November 2011. Novi Sad, Serbia. 127—130.
- Shcherban A. B., Efremova T. T., Salina E. A. 2012b. Identification of a new *Vrn-B1* allele using two near-isogenic wheat lines with difference in heading time. *Mol. Breeding*. 29 : 675—685.
- Swiezewski S., Liu F., Magusin A., Dean C. 2009. Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature*. 462 : 799—802.
- Tang G. 2005. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem. Sci.* 30 : 106—114.
- Trevaskis B., Hemming M. N., Dennis E. S., Peacock W. J. 2007. The molecular basis of vernalization induced flowering in cereals. *Trends Plant Sci.* 12 : 352—357.
- Vanyushin B. F. 2006. DNA methylation in plants. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 301 : 67—122.
- Von Zitzewitz J., Szucs P., Dubcovsky J., Yan L., Francia E., Pecchioni N., Casas A., Chen T. H., Hayes P. M., Skinner J. S. 2005. Molecular and structural characterization of barley vernalization genes. *Plant Mol. Biol.* 59 : 449—467.
- Yang P. K., Kuroda M. I. 2007. Noncoding RNAs and intranuclear positioning in monoallelic gene expression. *Cell*. 128 : 777—786.
- Zaratiegui M., Irvine D. V., Martienssen R. A. 2007. Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell*. 128 : 763—776.

Поступила 26 XI 2012

EPIGENETIC REGULATION OF EXPRESSION OF VERNALIZATION GENES

A. B. Shcherban,¹ E. A. SalinaInstitute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk; ¹ e-mail: atos@bionet.nsc.ru

We reviewed the mechanisms of epigenetic regulation of vernalization genes of plants which control the transition to the generative stage, depending on the low temperatures. Based on the example of *FLC*-gene of *Arabidopsis*, the involvement of the PR2 repression complex and non-coding RNAs in these mechanisms has been shown. On the basis of our own and other data, the authors suggest a similar mechanism of regulation of *Vrn-1* gene of cereals.

Key words: vernalization gene, wheat, epigenetic regulation, heading time.