

РНК-(ЦИТОЗИН С5)-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ

Обзор

© 2019 С.А. Кузнецова^{1*#}, К.С. Петрюков^{2*#}, Ф.И. Плетнев^{2,3,4},
П.В. Сергиев^{1,2,3,5}, О.А. Донцова^{2,3,4}

¹ Институт функциональной геномики, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия;
электронная почта: svetlana@belozersky.msu.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия;
электронная почта: kirill-petriukov@mail.ru

³ Сколковский институт науки и технологий,
121205 Московская область, Сколково

⁴ Институт биоорганической химии, 117997 Москва, Россия

⁵ НМИЦ онкологии им. И.И. Петрова, 197758 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 05.03.2019

После доработки 16.04.2019

Принята к публикации 16.04.2019

Обобщены сведения о результатах и достижениях в области исследований про- и эукариотических РНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз. Описываются их структуры, внутриклеточная локализация, РНК-мишени и механизмы каталитического действия, а также функциональная роль метилированных остатков цитозина в РНК и функции РНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз в клетке, не связанные с метилированием. Особое внимание уделено анализу сходства и различий в структуре и механизме действия РНК- и ДНК-метилтрансфераз. Приводятся данные о связи мутаций в генах РНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз с заболеваниями человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: посттранскрипционная модификация РНК, РНК-(цитозин С5)-метилтрансферазы, 5-метилцитозин, метилирование РНК.

DOI: 10.1134/S0320972519080025

Посттранскрипционная модификация РНК является фундаментальным клеточным процессом, занимающим важнейшее место в жизнедеятельности живых организмов. К настоящему времени описано более 160 модификаций РНК, и их количество постоянно увеличивается [1]. Они присутствуют во всех типах РНК, но наиболее часто встречаются в молекулах тРНК и рРНК. В последние годы значительное внимание уделяется изучению модификаций и их функциональной роли в мРНК, поскольку они, подобно модификациям гистонов и ДНК, определяющим структуру хроматина, обуславливают еще один уровень регуляции экспрессии генов. Посттранскрипционная модификация РНК, не изменяя последовательности транскрипта, может принципиальным образом изменять его свойства и функциональную роль. Для соответствующей области молекулярной биологии,

изучающей влияние различных модификаций РНК на регуляцию различных функций организма, был введен специальный термин «эпитранскриптомика».

Модификации в РНК затрагивают как остатки рибозы, так и гетероциклические основания. Одним из распространенных модифицированных оснований РНК является 5-метилцитозин (m^5C). В то время как в ДНК функциональная роль m^5C детально изучена, его роль в РНК ясна не до конца. В бактериях 5-метилцитозин содержится исключительно в рРНК, в археях и эукариотах он встречается также в тРНК, мРНК и различных некодирующих РНК. Несмотря на небольшой размер и гидрофобную природу, метильная группа в 5-ом положении цитозина может кардинальным образом изменять конформацию всей молекулы [2].

Образование 5-метилцитозина в РНК происходит в результате метилирования цитозина особой группой ферментов, названных РНК-(цитозин С5) метилтрансферазами (РНК-С5-

Авторы внесли равный вклад в работу.

* Адресат для корреспонденции.

метилтрансферазами). Аналогичные ферменты, метилирующие цитозин в молекулах ДНК (ДНК-(цитозин С5)-метилтрансферазы), в настоящее время достаточно хорошо изучены. Установлена ключевая роль метилирования ДНК в обеспечении стабильности и целостности генома, регуляции онтогенеза и клеточной дифференцировки, а также в подавлении экспрессии чужеродных последовательностей и мобильных элементов. Показано, что нарушение профиля метилирования ДНК приводит к хромосомным аномалиям, являющимся основными причинами старения и различных патологий, включая комплексные заболевания, болезни геномного импринтинга, нейродегенеративные расстройства и онкологические заболевания [3].

В отличие от ДНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз, ферменты РНК-(цитозин С5)-метилтрансферазы гораздо менее изучены [4]. Известно, что РНК-С5-метилтрансферазы являются консервативными как среди про-, так и эукариотических организмов и проявляют сходство с РНК-(урацил С5)- и ДНК-(цитозин С5)-метилтрансферазами. Сведения об эукариотических РНК-(цитозин С5)-метилтрансферазах, механизме их действия и функциях в клетке приводятся в недавно опубликованной обзорной статье Bohnsack et al. [5].

В данном обзоре обобщены результаты и достижения в области исследования как прокариотических, так и эукариотических РНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз. Описаны их структуры, функции, внутриклеточная локализация, РНК-мишени и механизмы каталитического действия. Особое внимание уделено анализу сходства и различий в структуре и механизме действия РНК- и ДНК-метилтрансфераз. Приводятся данные о связи мутаций в генах РНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз с заболеваниями человека.

5-МЕТИЛЦИТОЗИН В РНК. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ, ФУНКЦИИ И МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ

Одной из распространенных модификаций гетероциклических оснований в РНК является 5-метилцитозин (m^5C). В то время как в ДНК функциональная роль m^5C детально изучена, его роль в РНК ясна не до конца. Существенный прогресс в понимании распределения и функций 5-метилцитозина в РНК произошел после разработки ряда широкомасштабных методов сайт-специфического определения локализации данного минорного основания в транскрипте клетки. К таким методам прежде все-

го относится бисульфитное секвенирование РНК [6], основанное на различной реакционной способности метилированной и неметилированной форм цитозина в реакции дезаминирования, а также иммунопреципитация РНК с использованием антител на m^5C [7]. Кроме того, ряд подходов позволяет идентифицировать мишени РНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз, индуцируя образование ковалентных комплексов соответствующих метилтрансфераз с их РНК-мишенями с последующим выделением ковалентного соединения и секвенированием совыделившихся РНК [8, 9].

В бактериях 5-метилцитозин содержится исключительно в рРНК, в то время как в археях и эукариотах данная модификация встречается также в тРНК, мРНК и различных некодирующих РНК. В рРНК и тРНК 5-метилцитозин, подобно другим модификациям, участвует в формировании третичной структуры РНК, необходимой для точного протекания процесса трансляции. Следует отметить, что, несмотря на небольшой размер и гидрофобную природу, метильная группа в 5-положении цитозина может кардинальным образом изменять конформацию всей молекулы, как это было продемонстрировано на примере тРНК [2].

Наличие 5-метилцитозина в эукариотических мРНК было установлено только с развитием широкомасштабных методов определения данной модификации. Согласно последним данным, в транскрипте клетки до 10 000 оснований цитозина в составе мРНК подвергаются метилированию по 5-положению [10]. Локализация m^5C в транскрипте чаще всего не является случайной: наиболее часто он расположен в области стартового кодона. Эксперименты *in vitro* показали, что наличие m^5C вблизи стартового кодона приводит к уменьшению эффективности трансляции, в то время как наличие m^1A ассоциируют с увеличением эффективности трансляции соответствующих мРНК [11, 12]. Интересно отметить, что существует большое количество мРНК, которые в различных тканях имеют близкий уровень экспрессии, но различную картину метилирования. Так, это было продемонстрировано для ряда транскриптов из культуры эмбриональных стволовых клеток и ткани мозга, как образцов плюрипотентных и высокодифференцированных клеток соответственно [13]. При этом тканеспецифичному метилированию подвергаются транскрипты генов, имеющих отношение к регуляции клеточного цикла, биогенезу мРНК и структуре хроматина в эмбриональных стволовых клетках, а также к внутриклеточному транспорту и развитию нервной системы в мозге. Это свидетельствует в

пользу специфической регуляторной роли метилирования мРНК, точное определение которой остается пока неизвестным.

Кроме того, 5-метилцитозин встречается и в некодирующих РНК. Так, его присутствие описано для широко известных некодирующих РНК HOTAIR и XIST, причем в последней наличие m^5C изменяет ее способность связываться с комплексом PRC2, основная функция которого заключается в репрессии транскрипции путем метилирования гистонов [14]. Для обеих упомянутых некодирующих РНК взаимодействие с комплексом PRC2 является основным способом их функционирования в процессе регуляции структуры хроматина. Новым шагом в понимании биологической функции 5-метилцитозина стало открытие белка-регулятора ядерно-цитоплазматического транспорта ALYREF, специфически узнающего m^5C в составе молекул РНК и способствующего их транспорту в цитоплазму [15]. Таким образом, ядерно-цитоплазматический транспорт становится еще одним процессом, на регуляцию которого оказывает влияние метилирование цитозина в составе РНК.

Образование 5-метилцитозина в РНК происходит в результате метилирования цитозина особой группой ферментов, названных РНК-(цитозин С5)-метилтрансферазами (РНК-С5-метилтрансферазами). РНК-С5-метилтрансферазы являются консервативными как среди прокариотических, так и среди эукариотических организмов и часто проявляют сходство с РНК-(урацил С5)- и ДНК-(цитозин С5)-метилтрансферазами.

Первой детально охарактеризованной РНК-С5-метилтрансферазой, для которой был изучен механизм каталитического действия и получена кристаллическая структура, была бактериальная метилтрансфераза RsmB из *E. coli*. Впоследствии ее первичная и пространственная структура стали основой для отнесения более 55 ее гомологов к гипотетическим РНК-С5-метилтрансферазам, для многих из которых такая активность была впоследствии доказана. Общей чертой данных метилтрансфераз является наличие метилтрансферазного домена, в то время как N- и C-концевые участки могут быть различными [16].

Каталитический механизм действия РНК-С5-метилтрансфераз приведен на рис. 1. В процессе реакции метилирования фермент образует ковалентный конъюгат с РНК, в котором остаток цистеина каталитического центра связан с атомом С6 цитозина-мишени. В составе такого конъюгата нуклеофильность пятого атома углерода гетероциклического основания существенно повышается и как следствие происходит его взаимодействие с метильной группой S-аденозил-L-метионина (SAM), выступающего в качестве кофактора, донора метильной группы, с образованием переходного интермедиата (рис. 1, структуры 2 и 3). На следующем этапе метилирования в результате реакции β -элиминирования происходит депротонирование пятого атома углерода интермедиата и восстановление двойной связи С5-С6 (образование 5-метилцитозина) с регенерацией остатка каталитического

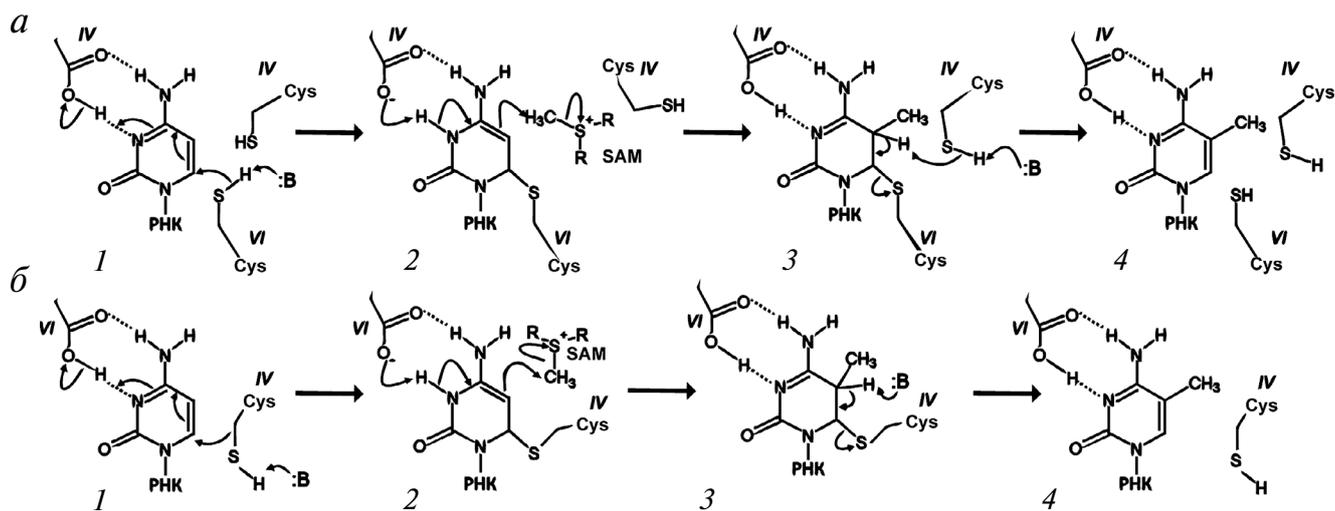


Рис. 1. Каталитический механизм РНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз. *а* – Двухцистеиновый механизм, характерный для белков семейства NOL1/Nop2/Sun; *б* – одноцистеиновый механизм, характерный для ДНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз и РНК-(цитозин С5)-метилтрансферазы DNMT2. Обозначены аминокислоты мотивов IV и VI, участвующие в катализе. 1 – Нуклеофильная атака каталитического цистеина на С6 атом цитозина, 2 – перенос метильной группы кофактора на атом С₅ цитозина, 3 – реакция β -элиминирования, 4 – образование 5-метилцитозина

цистеина (рис. 1, структуры 3 и 4). В пользу такого механизма свидетельствует то, что в случае замены в РНК остатка цитозина на 5-фторцитозин процесс метилирования завершается на стадии образования стабильного ковалентного конъюгата РНК с белком [17].

Общей чертой РНК- и ДНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз является наличие в их структуре до десяти эволюционно консервативных участков (мотивов) (I–X), которые могут располагаться в различном порядке [18]. Так, мотивы I–III и V отвечают за связывание кофактора S-аденозил-L-метионина с помощью гидрофобных и отрицательно заряженных аминокислотных остатков, мотив VIII способствует экспонированию метилируемого нуклеотида. Мотивы IV и VI белков семейства NOL1/Nop2/Sun содержат остатки цистеина, участвующие в катализе, вследствие чего механизм их действия часто называют двухцистеиновым (рис. 1, а). Так, в мотиве VI находится цистеин, участвующий в образовании конъюгата с цитозином-мишенью на первой стадии катализа, а последняя стадия катализа осуществляется при непосредственном участии цистеина из IV мотива. Участие в катализе остатков цистеинов из двух структурных мотивов РНК-метилтрансфераз было неоднократно подтверждено сайт-направленным мутагенезом. Так, замена цистеина в мотиве VI на аланин приводила к потере ферментом каталитической активности, в то время как мутации цистеина в мотиве IV приводили к тому, что процесс метилирования останавливался на стадии образования стабильного ковалентного конъюгата белка с РНК-мишенью [18].

Основное различие между РНК- и ДНК-метилтрансферазами состоит в том, что в ДНК-метилтрансферазах роль VI мотива играет последовательность Glu-Asn-Val, не содержащая цистеина (рис. 1, б). В этом случае основанием, запускающим процесс β -элиминирования, является остаток аспарагиновой кислоты либо молекула воды, определенным образом ориентированная в активном центре фермента [19]. Интересно отметить, что в случае метилтрансферазы DNMT3A образование ковалентного конъюгата не является необходимым для метилирования. Так, замена цистеина в мотиве IV на аланин приводит к снижению, но не исчезновению каталитической активности, однако механизм такой реакции пока не установлен.

РНК-(урацил С5)-метилтрансферазы, также, как и РНК-(цитозин С5)-метилтрансферазы, используют в качестве каталитического остатка цистеин в мотиве VI, однако они лишены остатка цистеина в мотиве IV, используемого для расщепления ковалентного конъюгата гете-

роциклического основания и каталитического остатка цистеина. Таким образом, РНК-(цитозин С5)-метилтрансферазы занимают промежуточное положение между РНК-(урацил С5)- и ДНК-(цитозин С5)-метилтрансферазами. Согласно одной из теорий, РНК-(цитозин С5)-метилтрансферазы произошли от РНК-(урацил С5)-метилтрансфераз, при этом цистеин в мотиве VI сохранил свою роль каталитического нуклеофила, а в мотиве IV появился цистеин, выполняющий функции основания на завершающей стадии катализа. Последний, в свою очередь, стал нуклеофилом в ДНК-(цитозин С5)-метилтрансферазах, а цистеин в мотиве VI потерял свою каталитическую функцию [18].

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ РНК-(ЦИТОЗИН С5)- МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ

Как уже упоминалось ранее, у бактерий 5-метилцитозин встречается только в рРНК. Ниже будут рассмотрены некоторые структурные и функциональные особенности РНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз из *Escherichia coli* как наиболее изученного модельного организма.

RsmB. Метилтрансфераза RsmB/Fmu – первая детально охарактеризованная РНК-С5-метилтрансфераза, отвечающая за образование 5-метилцитозина m⁵C967 в 16S рРНК *E. coli* [20]. Непосредственно рядом с m⁵C967 в 16S рРНК располагается метилированный по 2-положению гуанин m²G966, за образование которого отвечает метилтрансфераза RsmD [21]. Интересно отметить, что метилирование С967 проходит исключительно в 16S рРНК, находящейся в свободном состоянии в отсутствие связанных с ней рибосомных белков, в то время как метилирование соседнего гуанина идет только в том случае, когда 16S рРНК находится в составе 30S субчастиц рибосомы [22]. Такая особенность является примером конформационного контроля процесса метилирования РНК, поскольку известно, что в процессе сборки малой субчастицы связывание 16S рРНК с рибосомными белками S7 и S19 приводит к изменению ее пространственной структуры, а именно к образованию шпильки, включающей в себя 960–975 нуклеотиды 16S рРНК [23].

RsmB – первая РНК-С5-метилтрансфераза, для которой была получена кристаллическая структура в высоком разрешении как в присутствии, так и в отсутствие связанного кофактора – S-аденозил-L-метионина [24]. По данным PCA, в RsmB можно выделить РНК-связывающий NusB подобный домен и каталитический

C-концевой, принадлежащий семейству доменов NOL1/Nop2/Sun (рис. 2, рис. 3, а). В структуре присутствуют все характерные мотивы C5-метилтрансфераз. Так, мотив I представляет собой жесткую шпильку, координирующую с помощью амидных связей полипептидной цепи карбоксильную группу S-аденозил-L-метионина, мотив II координирует его 2'- и 3'-гидроксильные группы, а мотив III задает правильную ориентацию аденозина благодаря образованию водородных связей с атомами N1 и N6 пуринового кольца. Пространственное расположение цистеинов Cys325 и Cys375 из IV и VI мотивов в каталитическом кармане RsmB (рис. 3, а) согласуется с предложенным двухцистеиновым механизмом образования 5-метилцитозина [23]. Хотя кристаллическая структура комплекса RsmB с РНК до настоящего времени не получена, методом молекулярной динамики было показано, что C967 в составе РНК-шпильки способен эффективно связываться с RsmB [24]. При этом происходит экспонирование C967 и его координация остатком аспарагиновой кислоты из мотива VI.

Известно, что в рРНК минорные основания сгруппированы в функционально значимых областях рибосомы. Для изучения функциональной роли m⁵C967 был детально изучен штамм ΔrsmB/ΔrsmD, в котором отсутствует не только m⁵C967, но и m²G966. Оказалось, что данные модификации выполняют свою функцию на стадии инициации трансляции: они стабилизируют связывание инициаторной аминокислоты с 30S пре-инициаторным комплексом перед процессом узнавания старт-кодона [25]. В работе [26] было показано, что *in vivo* это может приводить к повышенной экспрессии триптофанового оперона даже при наличии триптофана. Экспрессия данного оперона в норме зависит от концентрации триптофана и определяется процессом аттенуации: в зависимости от соотношения скоростей транскрипции и трансляции соответствующая мРНК может образовывать различные типы вторичной структуры. При низкой концентрации триптофана происходит замедление рибосомы на триптофановых кодонах, в результате чего увеличивается расстояние между РНК-полимеразой и рибосомой и образуется вторичная структура мРНК, способствующая продолжению трансляции. При высоких концентрациях триптофана происходит формирование терминаторной шпильки, и наблюдается противоположный эффект. В штамме ΔrsmB/ΔrsmD задержка в инициации трансляции приводит к увеличению расстояния между РНК-полимеразой и рибосомой, и ситуация оказывается аналогичной условиям недостатка триптофана. Таким образом, модификация

m⁵C967, не являясь жизненно необходимой для *E. coli*, по крайней мере, в лабораторных условиях влияет на регуляцию скорости инициации трансляции, что наиболее явно проявляется в процессе аттенуации. Возможно, что в условиях нехватки других метаболитов или конкуренции с другими штаммами или видами бактерий неоправданный расход ресурсов на дорогостоящий биосинтез триптофана может иметь критическое значение.

RsmF. Метилтрансфераза RsmF была идентифицирована как РНК-C5-метилтрансфераза на основании ее гомологии с RsmB (27% идентичности). RsmF катализирует *in vivo* метилирование цитозина C1407 16S рРНК малой субчастицы рибосомы [27]. Поскольку C1407 находится в области межсубчастичного контакта вблизи от Р-сайта, то его метилирование может потенциально влиять на ассоциацию субчастиц рибосомы, связывание тРНК или процесс транслокации. В отличие от метилтрансферазы RsmB, проявляющей свою каталитическую активность, когда 16S рРНК находится в свобод-

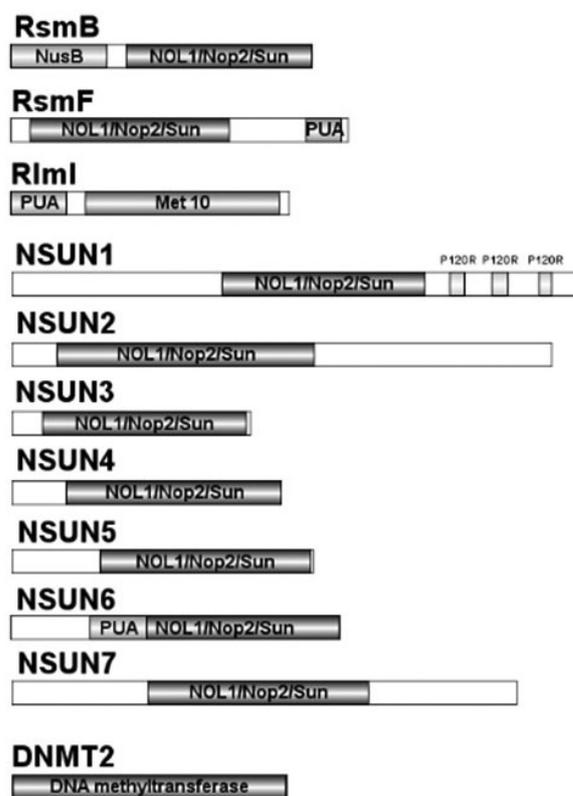


Рис. 2. Доменная организация РНК-(цитозин C5)-метилтрансфераз бактерий (RsmB, RsmF, RlmI) и эукариот (NSUN1-7, DNMT2). Показаны метилтрансферазные и другие домены, принадлежащие к известным семействам

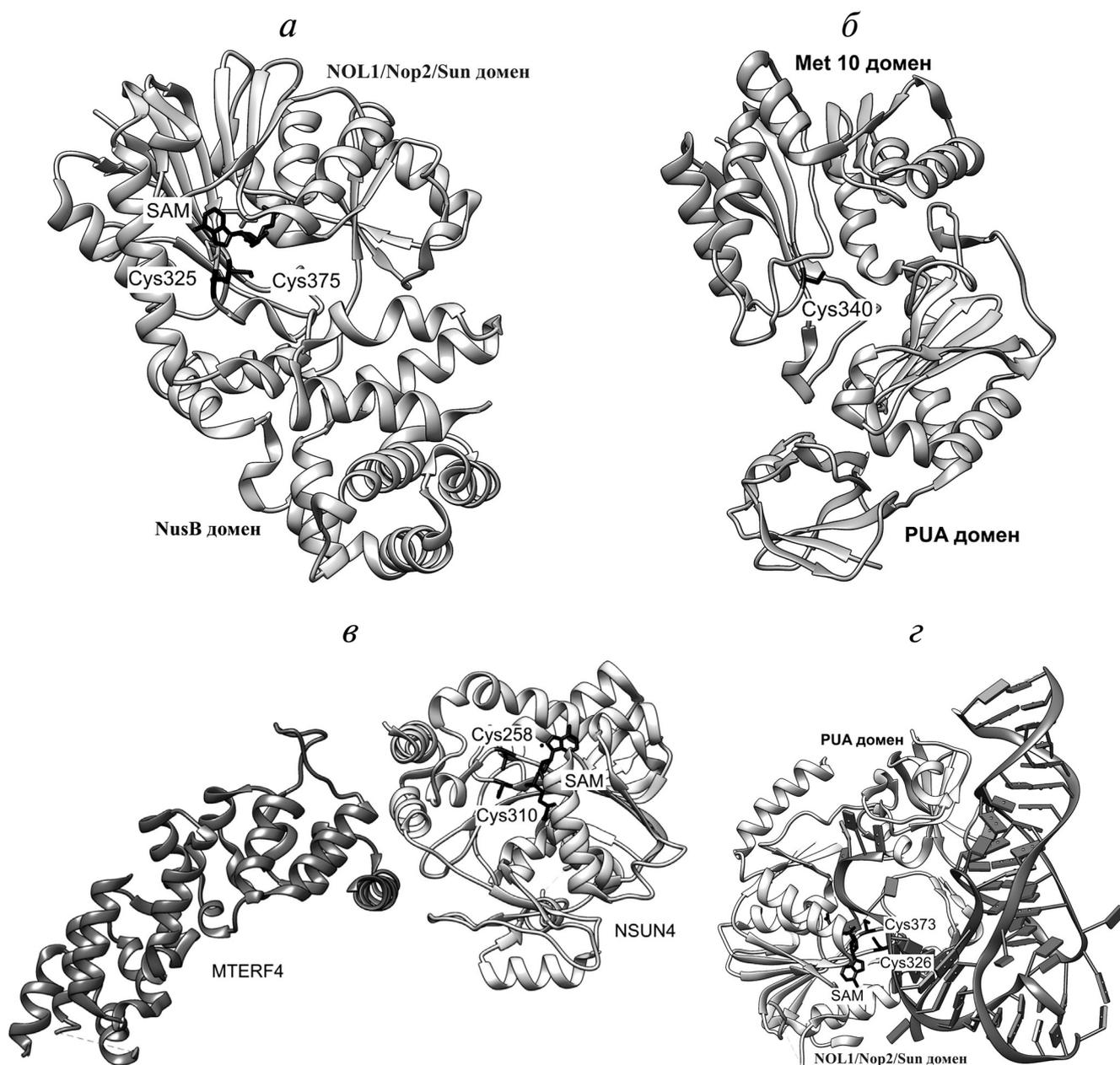


Рис. 3. Структуры представителей РНК-(цитозин C5)-метилтрансфераз. *a* – Кристаллическая структура метилтрансферазы RsmB *E. coli* (код Brookhaven PDB 1SQF) [24]. Отмечены положение каталитически активных цистеиновых остатков, находящихся в мотивах VI и IV, соответственно, и S-аденозил-L-метионина. Обозначены домены NusB и NOL1/Nop2/Sun; *b* – кристаллическая структура метилтрансферазы RlmI *E. coli* (код Brookhaven PDB 3C0K) [28]. Указаны компоненты комплекса и каталитический остаток цистеина. Обозначены домены PUA и Met 10. *в* – Кристаллическая структура комплекса NSUN4-MTERF4-SAM (код Brookhaven PDB 4FZV) [80]. Указаны компоненты комплекса и каталитические остатки цистеина. *г* – Кристаллическая структура комплекса РНК-(цитозин C5)-метилтрансферазы NSUN6 с тРНК по данным рентгеноструктурного анализа (код Brookhaven PDB 5WWR) [87]. Показано принципиальное участие как акцепторного стебля, так и D-петли тРНК в образовании комплекса. Обозначены домены PUA и NOL1/Nop2/Sun, а также остатки цистеина, участвующие в катализе

ном состоянии в отсутствие связанных с ней рибосомных белков, RsmF метилирует 16S рРНК исключительно в составе 30S субчастиц. Как свободная 16S рРНК, так и собранные 70S рибо-

сомы, не подвергаются метилированию RsmF. Взаимодействие 16S рРНК с рибосомными белками в процессе сборки малой субчастицы, как уже отмечалось ранее, сопряжено с ее значи-

тельными конформационными изменениями, что может служить причиной специфичности RsmF. В свою очередь, ассоциация субчастиц приводит к экранированию C1407.

Согласно данным рентгеноструктурного анализа, в структуре RsmF можно выделить *N*-концевой каталитический и *C*-концевой PUA-подобный домены (рис. 2) [28]. Последний напоминает PUA-домены псевдоуридинсинтазы и трансгликозилаз, отвечающие за связывание участков РНК со сложной пространственной структурой. PUA домен в RsmF жестко связан с метилтрансферазным доменом пролин-богатой последовательностью. Непосредственно на *N*-конце RsmF находится еще одна РНК-связывающая последовательность. Следует отметить, что наличие двух пространственно разделенных участков узнавания РНК нехарактерно для большинства известных бактериальных ферментов.

На основании кристаллической структуры RsmF методом компьютерного моделирования была построена модель его связывания с рРНК. Согласно полученным данным, метилтрансферазный домен взаимодействует не только с C1407, но и с двумя β -листами рибосомного белка S12, входящего в состав 30S субчастицы. Такая модель объясняет специфичность RsmF в отношении 30S субчастиц, а также еще раз подчеркивает важность координации различных процессов при сборке рибосомы для обеспечения эффективной модификации рРНК. Моделирование структуры активного центра RsmF в присутствии связанной 16S рРНК находится в согласии с предложенным механизмом каталитической активности РНК-С5-метилтрансфераз: атомы С5 и С6 метилируемого цитозина C1407 располагаются в непосредственной близости как от метильной группы *S*-аденозил-*L*-метионина, так и от входящих в состав IV и VI мотивов цистеинов Cys197 и Cys247.

Функциональная роль m⁵C1407, как и многих других минорных оснований бактериальной рибосомы, до конца не изучена. Ортологи RsmF присутствуют во многих грамположительных и грамотрицательных бактериях, свидетельствуя о возможных преимуществах, которые в определенных условиях дает бактериям данная модификация. Действительно, удаление гена данной метилтрансферазы сопряжено с небольшим, но устойчивым снижением скорости роста, и в стрессовых условиях наблюдается усиление данного эффекта.

RlmI. Идентификация РНК-(цитозин С5)-метилтрансферазы RlmI была сопряжена с рядом сложностей, связанных в первую очередь с отсутствием гомологии с RsmB, а также с тем,

что на основании первичной структуры ее долгое время считали РНК-(урацил С5)-метилтрансферазой. RlmI метилирует цитозин C1962 23S рРНК, расположенный, подобно m⁵C1407, в области межсубчастичного контакта, в участке 23S рРНК, содержащем большое число минорных оснований [29]. Как и в случае RsmB, мишенью для RlmI является свободная 23S рРНК до ее включения в состав 50S субчастицы рибосомы. Интересно, что ближайшим к остатку цитозина C1962 минорным основанием является псевдоуридин Ψ 1917, и соответствующая псевдоуридинсинтаза RluD модифицирует 23S рРНК уже после ее связывания с рибосомными белками.

Для RlmI, как и для двух описанных ранее РНК-С5-метилтрансфераз из *E. coli*, была получена кристаллическая структура (рис. 3, б) [30]. Следует отметить, что не только аминокислотная последовательность, но и пространственная структура RlmI резко отличаются от ранее изученных РНК-С5-метилтрансфераз. Так, для нее не характерен двухцистеиновый механизм каталитического действия, поскольку в мотиве IV цистеин отсутствует, а Cys340, который, возможно, ответственен за образование ковалентного соединения с метилируемым остатком, расположен в мотиве VI. На вопрос о том, каким образом осуществляется процесс β -элиминирования, однозначного ответа нет. С одной стороны, согласно кристаллической структуре RlmI, функцию основания в данном процессе может выполнять аспарагиновая кислота Asp300, но также нельзя исключать и возможность генерации основания путем депротонирования связанной в активном центре воды, как это было продемонстрировано методом компьютерного моделирования для ДНК-метилтрансферазы HhaI [19]. Архитектура центрального домена RlmI близка к архитектуре РНК-(урацил С5)-метилтрансферазы RlmD и архейного белка RN0793. Ортолог последнего в *H. sapiens* TYW2 участвует в образовании вайбутозина в тРНК и является SAM-зависимым белком, однако переносу подвергается не метильная, а α -амино- α -карбок-сипропильная группа *S*-аденозил-*L*-метионина [31]. Общим структурным мотивом в каталитических доменах данных трансфераз является так называемый EENEE домен, составленный из четырех β -листов и одной α -спирали и имеющий высокое сродство к РНК. *N*-конец RlmI также предположительно участвует во взаимодействии с РНК за счет наличия PUA-домена.

На основании кристаллической структуры RlmI, а также структуры комплекса RlmD с РНК была построена модель связывания RlmI с 23S рРНК [30]. В рамках данной модели положительно заряженная бороздка на поверхности димера

RlmI предпочтительно связывает одноцепочечную РНК. Так как в отсутствие рибосомных белков рРНК легче подвергается разрушению вторичной структуры с образованием одноцепочечных участков, данный факт согласуется со специфичностью RlmI к свободной 23S рРНК.

Гомологи RlmI распространены как среди бактерий, так и в археях. Отсутствие m⁵C1962 в 23S рРНК, так же, как и отсутствие m⁵C1407 в 16S рРНК *E. coli*, сопряжено с небольшим, но достоверным снижением скорости роста, однако конкретная функциональная роль этого метилированного цитозина до конца не изучена.

ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ РНК-(ЦИТОЗИН С5)- МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ

По сравнению с бактериями, в эукариотах 5-метилцитозин гораздо более распространен и встречается, помимо рРНК, также в тРНК, мРНК и ряде некодирующих РНК. Ниже будут рассмотрены восемь известных в настоящее время эукариотических РНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз. Одна из них – DNMT2 – по структуре и свойствам напоминает ДНК-метилтрансферазы, а семь других содержат общий консервативный мотив NOL1/Nop2/Sun.

DNMT2 – единственная эукариотическая РНК-С5-метилтрансфераза, структура и каталитический механизм которой схожи с известными про- и эукариотическими ДНК-метилтрансферазами. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей более чем 2300 РНК- и ДНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз показал, что эволюция DNMT2 и известных эукариотических ДНК-метилтрансфераз, таких как DNMT1, DNMT3A и DNMT3B, протекала независимо, и что у описанных ферментов есть общий предшественник из семейства прокариотических ДНК-метилтрансфераз [32]. В то же время, DNMT2 имеет гораздо меньшее сходство с известными РНК-метилтрансферазами, поэтому можно полагать, что эволюционным предшественником DNMT2 была ДНК-(цитозин С5)-метилтрансфераза, изменившая свою субстратную специфичность с ДНК на РНК.

Как уже упоминалось ранее, ключевым отличием между РНК- и ДНК-метилтрансферазами является различная функциональная роль их структурных мотивов в процессе образования ковалентного комплекса с цитозин-содержащей мишенью и его последующего разрушения в результате β-элиминирования. Механизм метилирования цитозина РНК-метилтрансферазой DNMT2 аналогичен механизму метилирования

цитозина ДНК-метилтрансферазами (одноцистеиновый механизм, рис. 1, б), и таким образом, DNMT2 в настоящее время является единственной из известных РНК-метилтрансфераз, работающих по типу ДНК-метилтрансфераз.

Практически во всех исследованных организмах, таких как *H. sapiens*, *M. musculus*, *D. melanogaster*, *D. discoideum*, *E. histolytica*, *S. pombe*, мишенью метилтрансферазы DNMT2 является тРНК^{Asp}(GUC), в которой метилируется цитозин С38, находящийся в составе антикодоновой петли [33]. В некоторых организмах мишенью DNMT2 являются тРНК^{Gly} и тРНК^{Val}. Интересно отметить, что гомолог DNMT2 – белок GsDnmt2 был обнаружен в протеобактериях *Geobacter sulfurreducens*. Основной мишенью GsDnmt2 *in vivo* является тРНК^{Glu}, в то время как метилирование тРНК^{Asp} протекает с низкой эффективностью и только в условиях *in vitro* [34]. Детальный анализ субстратной специфичности GsDnmt2, основанный на мутагенезе тРНК с последующей оценкой уровня их метилирования, подчеркивает значительную роль варибельной петли тРНК в процессе узнавания, в частности, она не должна содержать в своем составе динуклеотид GG.

В настоящее время установлено, что m⁵C38 в тРНК^{Asp} выполняет в клетке, как минимум, две различные функции, связанные со стабильностью самой тРНК и ее участием в реакции аминокислотирования. Так, наличие m⁵C38 предотвращает разрезание тРНК ангиогенином – рибонуклеазой, активирующейся при различных видах стресса [35]. Ангиогенин разрезает молекулы тРНК в области антикодоновой петли на фрагменты, обладающие регуляторными функциями и действующие подобно малым интерферирующим РНК [36]. Другая функция m⁵C38 в тРНК^{Asp} состоит в увеличении сродства метилированной тРНК к аспартил-тРНК-синтетазе более чем в четыре раза по сравнению с ее неметилированным аналогом. Таким образом, метилированная форма тРНК эффективнее вступает в реакцию аминокислотирования. В отсутствие m⁵C38 количество аминокислотированной тРНК снижается, что, в свою очередь, приводит к снижению эффективности трансляции, в первую очередь белков, содержащих участки олигоаспартата. Установлено, что белки, содержащие четыре и более остатков аспарагиновой кислоты подряд, имеют преимущественно ядерную локализацию и участвуют в регуляции экспрессии различных генов, а также в структурной организации хромосом [37].

Интересно отметить, что наличие в антикодоне тРНК^{Asp} кьюозина, производного 7-дезагуанозина, присутствие которого в антикодоне

ассоциируют с увеличением точности трансляции [38], приводит к увеличению процента метилирования цитозина C38 с 14% до 100% в условиях *in vivo*. Данный факт был впервые обнаружен в дрожжах *S. pombe* и впоследствии также подтвержден для *D. discoideum* и *E. histolytica* [39]. Таким образом, наличие кьюозина в тРНК^{Asp} влияет на степень метилирования C38 и, следовательно, на ее стабильность. Учитывая, что эукариотические организмы не способны синтезировать кьюозин, а получают его исключительно от бактерий, данный процесс представляет собой один из многочисленных аспектов взаимодействия эукариотических организмов с микробиотой.

Экспрессия, внутриклеточная локализация и каталитическая активность DNMT2 сильно зависят от стадии развития организма, стадии клеточного цикла, а также наличия стрессовых условий. Стабильно высокая экспрессия наблюдается в часто делящихся и метаболически активных клетках. Внутриклеточная локализация DNMT2 динамична на протяжении клеточного цикла и является преимущественно цитоплазматической, но этот белок также обнаруживается и в ядерном матриксе, а его распределение в профазе митоза соответствует расположению формирующегося веретена деления [40]. Таким образом, DNMT2 может иметь еще не изученные функции в процессе митоза, и не исключено, что они могут быть не связаны с метилтрансферазной активностью.

В отсутствие DNMT2 организмы остаются жизнеспособными и фертильными. Возможно, наличие данной метилтрансферазы благоприятно сказывается на выживании организмов в условиях, далеких от лабораторных. Действительно, инактивация DNMT2 у ряда организмов понижает продолжительность их жизни и устойчивость к различным видам стресса, в том числе к окислительному и нитрозному, в то время как суперэкспрессия DNMT2 имеет противоположный эффект [41].

Согласно базе данных соматических мутаций, связанных с различными видами рака (COSMIC), более 120 мутаций в гене DNMT2 человека выявляются в образцах опухолевых тканей различного происхождения [42]. Однако однозначного вывода о том, являются ли эти мутации причиной опухолевой трансформации, сделать пока нельзя.

Кроме того, имеются данные о влиянии DNMT2 на процесс эпигенетического наследования. Непосредственную роль в данном процессе играют малые фрагменты тРНК, однако в настоящее время механизм этого процесса находится в стадии изучения [43].

NSUN1. Эукариотическая РНК-(цитозин C5)-метилтрансфераза NSUN1 (p120, NOL1, Nop2) является представителем семейства NOL1/Nop2/Sun РНК-метилтрансфераз. Партнером Nop2 дрожжей является белок Trm112, партнером NSUN1 млекопитающих – гомологичный белок TRMT112. Белки семейства Trm112 служат адаптором для ряда РНК-метилтрансфераз, модифицирующих как РНК, так и белки, компоненты аппарата трансляции [44, 45]. NSUN1 высококонсервативна и имеет гомологов как в одно-, так и в многоклеточных эукариотических организмах. Для дрожжевого гомолога NSUN1 – метилтрансферазы Nop2 – была построена модель трехмерной структуры, основанная на его гомологии с бактериальной РНК-C5-метилтрансферазой RsmB с известной кристаллической структурой [46]. На N-конце Nop2 расположен РНК-связывающий домен [47], в состав которого также входит аминокислотная последовательность, отвечающая за локализацию в ядрышке [48], а на C-конце – метилтрансферазный домен (рис. 2). Nop2 метилирует цитозин C2870 25S рРНК дрожжей, расположенный в пептидилтрансферазном центре большой субчастицы рибосомы.

Как и в случае других известных РНК-C5-метилтрансфераз, метилирование РНК метилтрансферазой Nop2 протекает с участием двух цистеинов: Cys424 из мотива VI и Cys478 из мотива IV (рис. 1, а). Эксперименты с заменой каталитически активных цистеинов на аланин продемонстрировали одну интересную особенность: замена Cys424, а также одновременно Cys424 и Cys478 не являлись летальными и ожидаемо приводили к ингибированию метилирования, в то время как замена Cys478 на аланин при сохранении Cys424 оказалась летальной для клетки. Причина такого эффекта, вероятно, заключается в том, что в отсутствие каталитического цистеина в мотиве VI не происходит образования ковалентного конъюгата Nop2 с РНК-мишенью, что является необходимой стадией процесса метилирования, а при замене каталитического цистеина в мотиве IV такой конъюгат образуется, но дальнейшего β-элиминирования не происходит. В результате 25S рРНК оказывается ковалентно связанной с Nop2 и, соответственно, не может принимать участие в биогенезе рибосом, что приводит к катастрофическим последствиям для клетки.

У высших эукариот метилтрансфераза NSUN1 метилирует цитозин C4447 спирали H89 пептидилтрансферазного центра 28S рРНК по аналогии с Nop2, которая метилирует цитозин C2870 25S рРНК *S. cerevisiae* [46]. Известно, что NSUN1 человека, содержащая Arg-богатый

участок, образует *in vitro* комплекс с 28S рРНК [47]. В подтверждение теории о гомологии Nop2 и NSUN1 можно привести тот факт, что NSUN1 *H. sapiens* при экспрессии в штамме Δnop2 *S. cerevisiae* метилирует C2870 в 25S рРНК. К такому же результату приводит экспрессия гибридного белка, составленного из дрожжевого N- и человеческого C-доменов [49].

Метилтрансфераза Nop2 *S. cerevisiae* является необходимым фактором для процессинга 27S пре-рРНК и, соответственно, образования зрелых форм 25S и 5,8S рРНК. Отсутствие Nop2 приводит к замедлению процессинга 27S пре-рРНК и уменьшению уровня метилирования ее консервативного участка UmGmΨUC2922 [50]. Наблюдается уменьшение количества 60S субчастиц рибосом и компенсаторное увеличение уровня 40S субчастиц и 43S преинициаторных комплексов. Для нокаутных клеток также характерно значительное снижение скорости роста. Интересно, что данные эффекты нивелируются не только при экспрессии в нокаутном штамме функционального Nop2, но и при экспрессии его каталитически неактивного аналога с заменами каталитических цистеинов на аланины [49]. Таким образом, есть основания полагать, что описанные выше эффекты действительно связаны с Nop2, но не зависят от его метилтрансферазной активности. Функциональная роль самого метилирования 28S рРНК остается пока неизвестной.

В клетках млекопитающих наблюдается локализация NSUN1 в плотном фибриллярном компоненте ядрышка и сильная зависимость экспрессии от стадии клеточного цикла: максимальная экспрессия достигается в поздней G1 и S фазе [51]. Полное удаление гена *NSUN1* является летальным, что говорит о значимости выполняемых им функций. Экспрессия NSUN1 сопряжена с ростом и пролиферацией клеток, а ее чрезмерно высокий уровень наблюдается в злокачественных опухолях. Так, суперэкспрессия NSUN1 в фибробластах мыши NIH3T3 приводит к их злокачественному перерождению, а количество NSUN1 в данном случае напрямую коррелирует со способностью клеток к пролиферации и метастазированию в иммунодефицитных мышцах и, следовательно, с тяжестью прогноза заболевания [52]. Для ряда видов рака, таких как карцинома молочной железы и легких, NSUN1 служит диагностическим маркером, позволяющим оценить состояние опухоли и адекватно выбрать тактику лечения [53]. Активация синтеза NSUN1 также происходит при запуске ряда сигнальных каскадов. Так, например, первый интрон гена *NSUN1* содержит последовательность, способную связывать белки семей-

ства STAT в фосфорилированном состоянии. В клетках костного мозга сигнальный путь, запускаемый гранулоцит-колониестимулирующим фактором G-CSF и приводящий к активации JAK/STAT каскада, является основным путем активации экспрессии NSUN1. Результатом такого процесса является пролиферация и дифференцировка предшественников гранулоцитов [54]. Мутации STAT-связывающего участка гена *NSUN1* приводят к исчезновению стимулирующего действия G-CSF на экспрессию NSUN1.

Следует отметить, что относительно высокая экспрессия NSUN1 в стволовых клетках уменьшается по мере их дифференцировки и в большинстве тканей взрослого организма осуществляется на очень низком уровне. Однако из этой закономерности есть одно интересное исключение: в клетках мозга высокая экспрессия NSUN1 отмечена не только в нейрональных стволовых клетках, но и в зрелых дифференцированных нейронах в определенных областях мозга, прежде всего в супрагранулярных и инфрагранулярных слоях соматосенсорной коры [55]. При этом тип нейронов также имеет значение – высокий уровень экспрессии характерен прежде всего для гигантских пирамидных нейронов, в то время как в олигодендроцитах и клетках микроглии высокого уровня экспрессии NSUN1 не отмечено. В настоящее время нет оснований полагать, что такая экспрессия NSUN1 напрямую обусловлена ее метилтрансферазной активностью в отношении рРНК, так как для многих типов клеток, активно синтезирующих рибосомы, в частности гепатоцитов, экспрессия NSUN1 практически не наблюдается.

NSUN2. Эукариотическая РНК-(цитозин С5)-метилтрансфераза NSUN2 (MISU, MRT5, SAKI, TRM4), принадлежащая семейству NOL1/NOP2/Sun РНК-метилтрансфераз, представлена как в одноклеточных, так и в многоклеточных эукариотических организмах и метилирует удивительно большой набор РНК-мишеней. Согласно результатам широкомасштабного секвенирования с бисульфитной конверсией, основными мишенями NSUN2 являются тРНК, но мРНК и некодирующие РНК также могут метилироваться этим белком [56].

Метилирование тРНК NSUN2 является высококонсервативным и встречается в 80% всех тРНК в клетке. Метилируемые основания в основном располагаются в двух структурных областях тРНК: в области антикодоновой петли (С34, С38) и в области варибельной петли в месте ее соединения с ТΨС-петлей (С48, С49, С51). Как уже упоминалось выше, цитозин С38 может метилироваться также метилтрансферазой DNMT2. Необходимым условием метилиро-

вания цитозина С34 тРНК^{Leu}(CAA) метилтрансферазой NSUN2 является наличие интрона в области варибельной петли, и, таким образом, реакция протекает исключительно на стадии пре-тРНК [57]. Метилирование ряда цитозинов варибельной петли (С48-51) играет важную роль в развитии ответа на окислительный и другие виды стресса, опосредованного рибонуклеазой ангиогенином. В ответ на стресс ангиогенин разрезает молекулы тРНК в области антикодонного участка, генерируя, соответственно 5'- и 3'-фрагменты тРНК [58]. В то время как 3'-фрагменты тРНК подвергаются деградации, 5'-фрагменты, получившие название tsRNA, имеют тенденцию к накоплению в клетке. Накапливающиеся 5'-фрагменты тРНК^{Ala} и тРНК^{Cys} ингибируют трансляцию на стадии ее инициации за счет связывания с инициаторными факторами eIF4G и eIF4A, препятствующего их взаимодействию с мРНК. Метилирование цитозинов варибельной петли тРНК значительно снижает их аффинность к ангиогенину, уменьшая накопление 5'-фрагментов тРНК [58]. Такая роль NSUN2 подтверждается тем, что в клетках с инактивированным NSUN2 наблюдается накопление 5'-фрагментов тРНК и, соответственно, подавление трансляции даже в отсутствие внешних стрессовых факторов.

Другим классом РНК-мишеней NSUN2 являются мРНК, при этом метилируемые основания могут располагаться как непосредственно в кодирующей последовательности, так и в 5'- и 3'-нетранслируемых областях мРНК. Наличие 5-метилцитозина в мРНК может иметь различные последствия для ее стабильности и эффективности трансляции. Так, в Т-лимфоцитах NSUN2 метилирует цитозин С466 в кодирующей области мРНК интерлейкина-17 – ключевого регулятора развития иммунного ответа, ответственного также за развитие аутоиммунных заболеваний [59]. Такая модификация, не изменяя стабильности самой мРНК, непосредственно влияет на процесс ее трансляции, усиливая экспрессию интерлейкина-17. NSUN2 также метилирует еще одну мРНК, необходимую для работы иммунной системы, кодирующую белок межклеточной адгезии ICAM-1 [60]. По результатам изучения метилирования *in vitro*, в мРНК ICAM-1 содержится не менее семи сайтов метилирования NSUN2. Модификация мРНК ICAM-1 вызывает активацию ее трансляции и, следовательно, усиление экспрессии ICAM-1 и увеличение адгезии лейкоцитов к клеткам сосудистого эндотелия. Кроме того, мишенями NSUN2 могут служить мРНК белков-регуляторов клеточного цикла. Например, NSUN2 метилирует мРНК p27 и CDK1, причем в первом слу-

чае такая модификация способствует репрессии трансляции, а во втором – ее активации. В результате данные эффекты согласованно приводят к замедлению репликативного старения [61]. В научной литературе описано, что метилтрансфераза NSUN2 может метилировать экзотическую аминокислотную группу аденина A988 мРНК гена супрессора опухолей p16. Наличие m⁶A988 препятствует образованию шпильки в данной мРНК и способствует увеличению ее стабильности в клетке. В отсутствие NSUN2 образование вторичной структуры в мРНК приводит к ее ассоциации с факторами HuR, AUF1 и комплексом AGO2/RISC с последующей деградацией [62]. Следует отметить, что такая специфичность NSUN2 достаточно неординарна: поскольку каталитические механизмы цитозин- и аденин-метилтрансфераз различны, протекание обеих реакций в одном активном центре маловероятно.

Некодирующие РНК-мишени метилтрансферазы NSUN2 крайне разнообразны, однако в их функциях можно проследить общую закономерность. Для многих из них характерно участие в регуляции процессинга, фолдинга и модификации других некодирующих РНК – к ним относятся РНК-компонент рибонуклеазы Р RPPH1, Y-РНК и малая РНК SCARNA2, участвующая в процессинге малых ядерных РНК в тельцах Кахала. Кроме того, к мишеням NSUN2 относятся также 5S рРНК и 7S L РНК, необходимые для синтеза белков и их транспорта в эндоплазматический ретикулум соответственно [63]. Метилированию NSUN2 подвергаются также РНК-компоненты комплекса Vault – самого крупного из известных рибонуклеопротеиновых комплексов, размер которого приближенно в три раза превышает размер рибосомы. К настоящему времени известно, что комплекс Vault принимает участие во множестве сигнальных каскадов в клетке и участвует в приобретении устойчивости некоторых видов рака к химиотерапии [64]. РНК, входящие в комплекс Vault и подвергающиеся метилированию NSUN2, способны процессироваться белками семейства Argonaute и выполнять функции микроРНК, причем этот процесс напрямую зависит от наличия 5-метилцитозина [65]. Более детально данный механизм, а также роль модификаций РНК в составе Vault комплекса пока не изучены.

Интересной особенностью РНК-метилтрансферазы NSUN2, отличающей ее от всех других известных на настоящий момент метилтрансфераз, является ее различная внутриклеточная локализация на разных стадиях клеточного цикла. В G1 фазе NSUN2 преимущественно сосредото-

чена в ядрышке, в S фазе – в нуклеоплазме, причем именно в S фазе экспрессия NSUN2 в клетке максимальна. При движении далее по клеточному циклу NSUN2 переходит в цитоплазму и в G2 фазе обнаруживается преимущественно в цитоплазматических везикулах. При переходе к митозу наблюдается ассоциация комплекса NSUN2 и 18S рРНК с микротрубочками веретена деления. Таким образом, при движении по клеточному циклу локализация NSUN2 кардинально изменяется, что допускает возможность тесного взаимодействия NSUN2 с белками-регуляторами клеточного цикла [66].

Идея о том, что РНК-метилтрансфераза NSUN2 играет роль в контроле клеточного цикла, подтверждается также тем, что она является непосредственной мишенью для фактора транскрипции Мус и центральной митотической киназы Auroга В [67, 68]. Мус является фактором транскрипции для множества генов, отвечающих за процессинг рРНК и белков, а также за контроль клеточного цикла. Активация Мус вызывает увеличение размера ядрышка и усиление пролиферации клеток, а инактивация NSUN2 ингибирует эти эффекты. Таким образом, NSUN2 является важным посредником в индуцированном Мус функциональном каскаде. Митотическая киназа Auroга В, напротив, фосфорилируя серин Ser139, ингибирует метилтрансферазную активность NSUN2. Таким образом, во время митоза метилтрансфераза NSUN2 находится в каталитически неактивном состоянии. Эксперименты с заменой каталитически активного цистеина на аланин подтверждают, что для стабилизации веретена деления метилтрансферазная активность NSUN2 не является необходимой. Интересно, что на веретене деления NSUN2 находится в комплексе не только с 18S рРНК, но и с ядрышковым белком NuSAP, являющимся важным фактором сборки веретена деления. NuSAP, в свою очередь, является мишенью Мус, что демонстрирует пересечение глобальных функциональных каскадов для регуляции процесса клеточной пролиферации [66].

Многообразие функций, выполняемых в клетке метилтрансферазой NSUN2, сопряжено с таким же многообразием фенотипов, ассоциированных с ее отсутствием или мутациями. На клеточном уровне удаление гена *NSUN2* имеет множество последствий для митоза, таких как построение мультиполярных веретен деления, анеуплоидия и клеточная смерть [66].

У высших эукариот экспрессия NSUN2 наблюдается на низком уровне во всех здоровых тканях и обеспечивает протекание процесса дифференцировки и пролиферации клеток [69, 70]. В то же время, повышение экспрессии

NSUN2 ассоциируется с развитием онкологических заболеваний, и для рака молочной железы была установлена корреляция между уровнем экспрессии NSUN2 и клинической стадией заболевания [71]. Удаление гена *NSUN2* у мышей не является летальным, однако для них характерна значительная задержка в росте, в то же время для плодовой мушки *D. melanogaster* помимо задержки в росте были отмечены нарушения кратковременной памяти [72].

У человека мутации в гене *NSUN2* ассоциированы с умственной отсталостью, а также вызывают синдром Дубовица – редкое генетическое расстройство, при котором наблюдаются мутации в сайте сплайсинга экзона 6 гена *NSUN2* [73]. Помимо задержки в умственном развитии, у подобных пациентов наблюдаются серьезные неврологические аномалии – микроцефалия, заторможенность речи, а также морфологические изменения, такие как задержка роста и дефекты кожных покровов. В настоящее время нет единой картины, каким образом нарушения активности NSUN2 могут приводить к подобным проявлениям. Возможно, одной из причин является нарушение трансляции, вызванное ангиогенин-опосредованным накоплением 5'-фрагментов тРНК, следствием чего могут быть уменьшение размера нейронов и ошибки в формировании синаптических контактов. Подобная теория подтверждается тем, что подавление трансляции и уменьшение размера мозга мышей с инактивированным геном *NSUN2* могут быть нивелированы при применении ингибиторов ангиогенина или окислительного стресса [56].

NSUN3. Метилтрансфераза NSUN3, в отличие от большинства РНК-С5-метилтрансфераз семейства NOL1/NOP2/Sun, имеет близких гомологов, за редким исключением, только у хордовых животных. NSUN3 локализуется в матриксе митохондрий и метилирует С34 митохондриальной тРНК^{Met} (мт-тРНК^{Met}), что соответствует первому, «wobble» положению антикодона. Важно отметить, что в данном случае 5-метилцитозин не является конечным продуктом реакции, идет его дальнейшее окисление Fe(II)-зависимой диоксигеназой ALKBH1/ABH1 до 5-гидроксиметилцитозина, а затем и до 5-формилцитозина (рис. 4) [74].

Следует отметить, что в клетке присутствуют мт-тРНК^{Met} со всеми указанными вариантами модификаций цитозина С34, каждая из которых изменяет способность тРНК узнавать различные кодоны в процессе трансляции.

Так, 5-формилцитозин благодаря наличию формильной группы, способен образовывать Уотсон–Криковские пары не только с гуани-

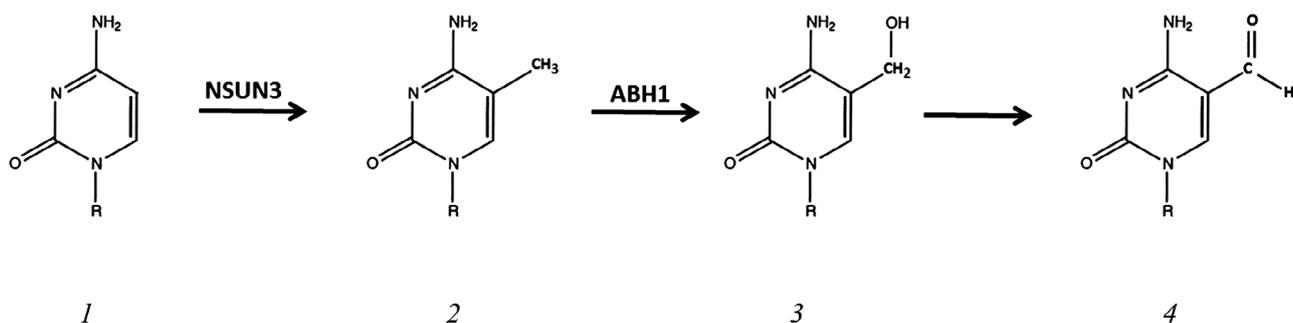


Рис. 4. Последовательность биохимических реакций, катализируемых ферментами NSUN3 и ABH1 в тРНК^{Met}; R – остаток молекулы РНК; 1–4 – остатки цитозина, 5-метил-, 5-гидроксиметил- и 5-формилцитозина соответственно

ном, но и аденином, поскольку формильная группа, не оказывая влияния на стабильность самой тРНК, способствует сдвигу равновесия в сторону образования имино-таутомера цитозина [75]. Таким образом, мт-тРНК^{Met} может узнавать не только AUG, но и AUA кодоны (рис. 5). Кроме того, описано узнавание мт-тРНК^{Met} инициаторного кодона AUU мРНК ND2. Так как в митохондриях человека закодировано 13 белков, и в соответствующих мРНК присутствуют 167 кодонов AUA и 40 кодонов AUG, подобное изменение специфичности антикодона ключевым образом отражается на эффективнос-

ти как инициации, так и элонгации трансляции [76].

Эксперименты на клеточных линиях показали снижение общего уровня трансляции в митохондриях, а также уменьшение интенсивности дыхания в клетках с каталитически неактивной мутантной формой NSUN3. При этом в таких клетках наблюдается усиленный биогенез митохондрий, что вероятно, является механизмом компенсации нарушенной митохондриальной трансляции. Кроме того, NSUN3 принимает непосредственное участие в процессе дифференцировки эмбриональных стволовых клеток [77].

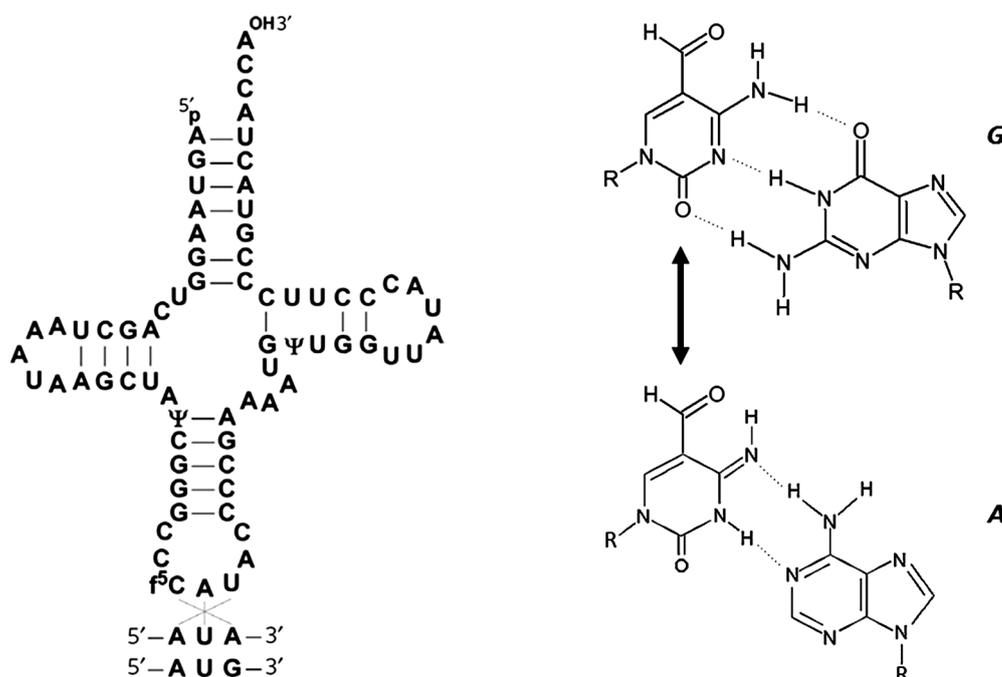


Рис. 5. Узнавание AUG и AUA кодонов митохондриальной тРНК^{Met}. Слева – положение 5-формилцитозина в мт-тРНК^{Met}, справа – комплементарные пары оснований, образующиеся с участием amino- (сверху) и имино- (снизу) таутомерных форм 5-формилцитозина соответственно

Об этом свидетельствует скачкообразное увеличение уровня экспрессии NSUN3 при запуске дифференцировки, а также существенные изменения в экспрессии ряда маркеров дифференцировки в клетках с мутантной формой NSUN3, причем наиболее ярко этот эффект проявлялся для клеток нейроэктодермы.

При анализе функций метилтрансферазы NSUN3 на уровне целого организма следует учитывать, что уровень ее экспрессии и место локализации (митохондриальный матрикс) не зависят от типа ткани, в то время как для диоксигеназы ABH1 характерны как широкий диапазон экспрессии, так и различная внутриклеточная локализация. Таким образом, для различных тканей можно ожидать различную степень модификации цитозина С34 в мт-тРНК^{Met} и, следовательно, различную степень выраженности эффекта. У человека описан ряд мутаций, приводящих к сбою рамки считывания и преждевременным стоп-кодонам в области каталитического домена NSUN3 [78]. Такие мутации вызывают у их носителей симптомы, характерные для нарушений функционирования митохондриальной дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования в клетках скелетной мускулатуры. А именно, у таких пациентов встречаются микроцефалия, умственная отсталость, лактозный ацидоз, потеря слуха и патологическая мышечная слабость. В фибробластах пациентов с мутантными формами NSUN3 наблюдаются дефекты митохондриальной трансляции, которые нивелируются экзогенной экспрессией каталитически активной NSUN3.

К описанному выше фенотипу приводят также мутации в области антикодонной петли мт-тРНК^{Met}, нарушающие формирование двойной спирали РНК и, следовательно, препятствующие узнаванию NSUN3 антикодонного стебля и протеканию метилтрансферазной реакции. Таким образом, мутации как в NSUN3, так и в его мишени приводят к сходным эффектам, что свидетельствует о ключевой роли катализируемого NSUN3 метилирования мт-тРНК^{Met} в процессе трансляции в митохондриях.

NSUN4. Эукариотическая метилтрансфераза NSUN4 представлена в многоклеточных эукариотах и играет важную роль в биогенезе митохондриальных рибосом. Подобно метилтрансферазе NSUN3, белок NSUN4 локализуется в митохондриальном матриксе, и в настоящее время для него известны две функции в процессе созревания рибосом [79]. Так, интересной особенностью NSUN4 является образование прочного ($K_d = 13,3$ нМ) комплекса с белком из семейства факторов терминации митохондриальной транскрипции MTERF4. Гомологи

MTERF4 принимают активное участие в регуляции терминации транскрипции в митохондриях, в то время как для MTERF4 подобная активность на настоящий момент неизвестна. Комплекс NSUN4-MTERF4 необходим для ассоциации рибосомных субчастиц в зрелые рибосомы, и нарушения в его структуре приводят к увеличению эффективности синтеза рибосомных субчастиц без соответствующего увеличения количества зрелых рибосом.

Особенностью метилтрансферазы NSUN4 является отсутствие РНК-связывающего домена, функцию которого выполняет MTERF4. Интересно, что в клетке белок MTERF4 преимущественно связывает 16S рРНК и в значительно меньшей степени, 12S рРНК и 7S РНК. Последний факт указывает на то, что MTERF4 находится в клетке не только в виде комплексов с рРНК, но также может располагаться в непосредственной близости от промотора L-цепи мтДНК и выполнять на настоящий момент еще не известные функции в регуляции митохондриальной транскрипции. Для комплекса NSUN4-MTERF4 показана способность метилировать 16S рРНК *in vitro*, при этом положение модификации пока не определено.

Известно, что сборка рибосом является крайне сложным процессом, в ходе которого рибосомная РНК претерпевает множество конформационных изменений, некоторые из которых стабилизируются исключительно за счет взаимодействия с рибосомными белками или факторами сборки рибосом. Предложенная авторами [79] модель предполагает, что на определенном этапе биогенеза большой субчастицы рибосомы происходит связывание 16S рРНК с комплексом NSUN4-MTERF4, что препятствует ассоциации субчастиц. При дальнейшем созревании большой субчастицы вновь происходит конформационная перестройка, на этот раз с диссоциацией комплекса и активацией большой субчастицы рибосомы. Таким образом, связываясь с 16S рРНК во время ее созревания, NSUN4-MTERF4 участвует в «контроле качества» рибосом, допуская к процессу трансляции только зрелые формы большой субчастицы.

Другой важной функцией NSUN4 является метилирование цитозина С841 в составе 12S рРНК малой субчастицы рибосомы. В отличие от аналогичной ситуации с 16S рРНК большой субчастицы, для протекания данной реакции NSUN4 не требуется партнер MTERF4, и удаление гена *MTERF4* не сказывается на статусе метилирования С841. Функция цитозина m⁵С841, как и многих других минорных оснований в составе рРНК, сейчас еще недостаточно изучена, однако считается, что он, наряду с m⁶А936 и

m⁶A937, принимает участие в стабилизации структуры малой субчастицы рибосомы. На рис. 6 схематично представлены оба описанных пути, по которым NSUN4 регулирует процесс биогенеза рибосом.

Структура комплекса NSUN4-MTERF4 как в присутствии, так и в отсутствии S-аденозил-L-метионина была определена методом рентгеноструктурного анализа независимо двумя группами (рис. 3, в) [80, 81]. В результате анализа данных PCA был подтвержден двухцистеиновый механизм метилирования цитозина. Согласно этим данным, карбоксильная группа S-аденозил-L-метионина расположена в кармане, образованном четырьмя атомами азота, что обеспечивает его жесткую фиксацию в активном центре и корректное расположение метильной группы. Каталитически активные цистеины C258 и C310, находящиеся в пространственно сближенных петлях, расположены в непосредственной близости от донорной метильной группы. Белки NSUN4 и MTERF4 связаны в комплексе как полярными, так и гидрофобными взаимодействиями. Водородные связи между ними ограничивают своеобразную треугольную площадь, внутри которой сосредоточено большинство гидрофобных контактов. Значительная часть аминокислотных остатков, формирующих область взаимодействия белков, являются высококонсервативными, а случаи замен – компенсаторными, то есть происходят одновременно на двух белках без серьезного изменения результирующего взаимодействия. В результате анализа структуры комплекса NSUN4-MTERF4 [80] был предложен механизм связывания и метилирования РНК. Так, на поверхности белка NSUN4, выполняющего функцию связывания РНК, имеется желоб, образованный положительно заряженными аминокислотами, который ведет в активный центр фермента. Этот желоб может представлять собой путь, по которому движется РНК при связывании с комплексом NSUN4-MTERF4. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что белки семейства MTERF являются высококонсервативными, и для MTERF1 доказано сродство к двуцепочечной РНК. Возможно, именно в составе двойной спирали происходит связывание достаточно сложно пространственно организованной рРНК с положительно заряженным желобом на поверхности комплекса NSUN4-MTERF4. К тому же, ширина этого желоба достаточна для связывания двуцепочечной РНК.

Нарушения в описанных выше процессах с участием NSUN4 могут иметь негативные последствия. Так, инактивация гена *NSUN4* в мышцах является летальной на стадии эмбриональ-

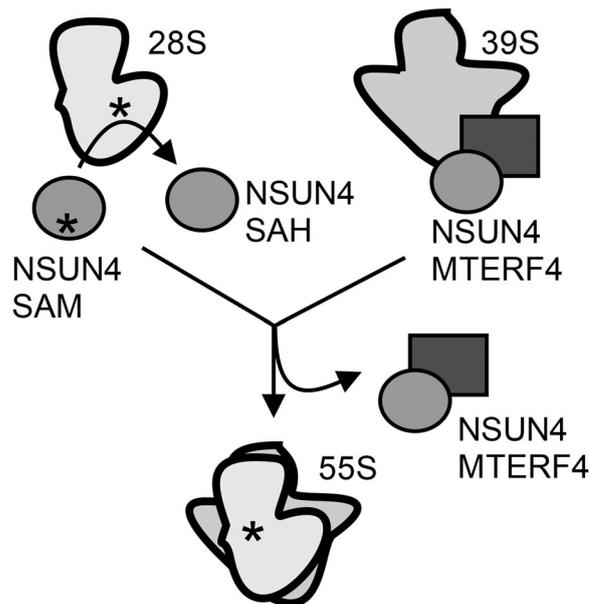


Рис. 6. Роль РНК-(цитозин C5)-метилтрансферазы NSUN4 в созревании митохондриальных рибосом. Слева – NSUN4 независимо от MTERF4 проводит метилирование C841 12S рРНК; справа – ассоциация комплекса NSUN4-MTERF4 с 16S рРНК препятствует ассоциации субчастиц до их полного созревания, внизу – на последнем этапе биогенеза происходит диссоциация комплексов NSUN4-MTERF4 и ассоциация зрелых субчастиц в функционально активные рибосомы

ного развития [82]. В то же время, инактивация данного гена во взрослых особях в кардиомиоцитах и клетках скелетных мышц приводила к резкому снижению продолжительности жизни, которая не превышала 25 недель. Кроме того, у таких мышеч развивается прогрессирующая кардиомиопатия, что ассоциируется с фенотипом, обусловленным нарушениями экспрессии генов, ответственных за протекание окислительного фосфорилирования. В митохондриях резко уменьшалось количество белков, закодированных митохондриальной ДНК, в то время как уровень экспрессии комплекса II дыхательной цепи, кодируемого только ядерной ДНК, не менялся, что свидетельствует об угнетении исключительно митохондриальной трансляции.

Таким образом, эукариотическая РНК-(цитозин C5)-метилтрансфераза NSUN4, подобно метилтрансферазе NSUN3, является важным регулятором процесса митохондриальной трансляции. Принимая независимое участие в процессах созревания обеих рибосомных субчастиц, NSUN4 регулирует их скоординированную сборку в функциональные рибосомы.

NSUN5. Метилтрансфераза NSUN5 встречается как в одно-, так и в многоклеточных эукариотических организмах и проявляет высокую

консервативность первичной структуры. Ее дрожжевой гомолог Rcm1 локализуется в ядрышке и принимает участие в образовании 5-метилцитозина m⁵C2278 в 25S рРНК [46]. По результатам анализа первичной структуры каталитически активными являются Cys404 и Cys330 из VI и IV мотивов соответственно. Установлено, что замена цистеина Cys404 на аланин не имеет критических последствий для жизнедеятельности клеток, в то время как замена Cys330 является летальной, что связано, как уже упоминалось ранее, с образованием непродуктивного ковалентного комплекса РНК-белок с последующим исключением РНК из дальнейшего биогенеза (рис. 1, а). Аналогичный результат был получен при замене каталитического цистеина из IV мотива дрожжевой метилтрансферазы Nor2, также метилирующей 25S рРНК. Результаты *in silico* моделирования 3D структуры Rcm1 подтвердили наличие РНК-связывающего и метилтрансферазного доменов, а также расположение каталитических цистеинов в активном центре.

5-Метилцитозин m⁵C2278 25S рРНК располагается вблизи пептидилтрансферазного центра большой субчастицы рибосомы. Результаты химического зондирования (пробинга) указывают на его влияние на укладку 25S рРНК в условиях окислительного стресса. Отсутствие метилирования C2278 не влияет на скорость роста *S. cerevisiae*, однако вызывает гиперчувствительность к антибиотику анизомизину. Кроме того, установлено, что наличие m⁵C2278 непосредственно влияет на возникновение рибосомного ответа на окислительный стресс. Удаление гена *Rcm1* приводит к усиленной трансляции ряда мРНК стрессового ответа, таких как мРНК факторов регуляции клеточного цикла и компонентов системы репарации ДНК, даже в условиях отсутствия стресса. Таким образом, согласно данным некоторых авторов [83], метилтрансфераза Rcm1 подавляет индукцию стрессовых генов. В клетке присутствуют две субпопуляции рибосом – имеющие и не имеющие минорного цитозина m⁵C2278 [83]. При хроническом стрессе увеличивается доля субпопуляции немодифицированных рибосом, эффективно транслирующих мРНК компонентов стрессового ответа. Для ряда модельных организмов, таких как *C. elegans* и *D. melanogaster*, для которых также было показано участие NSUN5 в образовании 5-метилцитозина в рРНК, удаление NSUN5 приводит к увеличению продолжительности жизни до двух раз, в то время как его суперэкспрессия сокращает продолжительность жизни [83], предположительно из-за большей устойчивости к окислительному стрессу организмов, лишенных

гомологов NSUN5. При этом размер особей и их фертильность остаются неизменными.

Учитывая высокое сходство Rcm1 *S. cerevisiae* и NSUN5 *H. sapiens*, а также соответствующих участков рРНК, предположительной функцией NSUN5 у человека является образование m⁵C3782 в 28S рРНК, что, несомненно, требует подтверждения. Дополнительным указанием на подобную функцию NSUN5 является его коиммунопреципитация с рРНК [84]. Интересно отметить, что *NSUN5* является одним из группы генов, делеция которых у человека ассоциирована с возникновением синдрома Вильямса–Бойрена – редкого генетического заболевания, характеризующегося задержкой умственного развития, а также рядом других системных нарушений. Вероятная роль гена *NSUN5* в возникновении данного синдрома послужила причиной его альтернативного названия – *WBSCR20* (*WBSCR* – *Williams–Beuren syndrome critical region* – участок хромосомы, делеция которого ассоциирована с синдромом Вильямса–Бойрена). Также у человека существуют еще две копии данного гена, возникшие, вероятно, в результате дупликации гена *NSUN5* – *WBSCR20B* (*nsun5P1*) и *WBSCR20C* (*nsun5P2*). Последние кодируют укороченные формы белка NSUN5 (который по аналогии также называют *WBSCR20A*), и, в отличие от полноразмерной формы, не имеют гомологов в других живых организмах.

Таким образом, для гомологов NSUN5 показано участие в образовании 5-метилцитозина в рРНК большой субчастицы рибосомы. Данная модификация влияет на регуляцию ответа на различные виды стресса и является одним из крайне малочисленных примеров, когда модификация единственного нуклеотида рРНК имеет конкретные фенотипические проявления. Для ряда модельных организмов показана связь активности гомологов NSUN5 с продолжительностью жизни, однако функциональная роль NSUN5 у человека и его взаимосвязь с возникновением синдрома Вильямса–Бойрена являются предметом дальнейших исследований.

NSUN6. Метилтрансфераза NSUN6 представлена в большинстве многоклеточных эукариот. В результате анализа аминокислотной последовательности, в NSUN6 можно выделить метилтрансферазный домен, а также непосредственно связанный с ним PUA домен, отвечающий у многих РНК-метилтрансфераз за связывание РНК (рис. 2). Доказанными мишенями для NSUN6 являются тРНК^{Cys} и тРНК^{Thr} (как UGU, так и AGU) [85]. Метилтрансфераза NSUN6 метилирует цитозин C72, находящийся в акцепторном стебле тРНК. Известно, что

тРНК, будучи одними из наиболее модифицированных молекул РНК в клетке, проходят сложный путь биогенеза от момента транскрипции до зрелой формы. После транскрипции РНК-полимеразой III пре-тРНК подвергаются процессингу 5'- и 3'-концов, сплайсингу, модификации оснований, нуклеотидилтрансферазной реакции с образованием ССА тринуклеотида на 3'-конце и только после этого экспорту в цитоплазму. Таким образом, подавляющее большинство модификаций тРНК происходят в ядре и ответственные за них ферменты имеют преимущественно ядерную локализацию. Однако для NSUN6 данная закономерность не характерна. Этот белок локализуется в цитоплазме, причем значительная его доля сосредоточена в аппарате Гольджи и перичентриолярном пространстве. Таким образом, имеются основания полагать, что мишенями NSUN6 являются экспортированные в цитоплазму молекулы тРНК, уже имеющие большинство необходимых модификаций и правильно сформированную третичную структуру.

Метилтрансфераза NSUN6, в отличие от NSUN2, имеет узкую субстратную специфичность, метилируя лишь тРНК^{Cys} и тРНК^{Thr}. Это может свидетельствовать о том, что данные тРНК имеют ряд структурных особенностей, которые отличают их от остальных тРНК. Путем мутагенеза различных тРНК и анализа способности их метилирования метилтрансферазой NSUN6 *in vitro* и *in vivo*, был определен ряд свойств, которыми должна обладать тРНК для успешного протекания каталитической реакции [86]. Так, было установлено, что метилирование подвергаются исключительно полноразмерные и правильно свернутые тРНК, что подтверждает действие NSUN6 на позднем этапе биогенеза тРНК. Обязательным условием является наличие ССА тринуклеотида на 3'-конце и уридина в положении 73. Кроме того, вторая комплементарная пара акцепторного стебля (2:71) должна формироваться двумя водородными связями, а третья комплементарная пара (3:70) – тремя водородными связями. Также в непосредственное взаимодействие с NSUN6 вовлечены пары 11:24 и 12:23, находящиеся в области D-петли тРНК. Авторами [86] была предложена модель связывания NSUN6 с тРНК^{Cys}(GCA). В дальнейшем с помощью PCA была определена структура апофермента NSUN6 и его комплекса с тРНК^{Cys} и S-аденозил-L-метионином (рис. 3, з), в значительной степени улучшено понимание как процесса узнавания тРНК, так и катализа [87]. Так, при связывании NSUN6 с молекулой тРНК^{Cys} отсутствовали принципиальные изменения структуры фермента, за исключением того, что

происходило упорядочивание нескольких ранее неструктурированных участков полипептидной цепи. Наиболее интересными оказались те изменения, которые при связывании претерпела сама молекула тРНК. На первом этапе ее взаимодействия с NSUN6 происходит расплетание терминального участка акцепторного стебля, ведущее к разрушению комплементарных пар 1:72 и 2:71. При этом образующийся одноцепочечный фрагмент РНК (U71-A76) приобретает структуру U-поворота, который взаимодействует с местом соединения PUA и каталитического доменов в NSUN6 и способствует сближению C72 с активным центром. Такой механизм объясняет, почему для успешного каталитического процесса необходимо наличие двух водородных связей в паре 2:71 и трех водородных связей в 3:70. Действительно, разрушение пары 2:71 в таком случае произойдет с меньшими энергетическими затратами, а прочная связь в паре 3:70 препятствует дальнейшему расплетанию акцепторного участка, которое может привести к значительным конформационным изменениям в молекуле тРНК. Кроме того, данные рентгеноструктурного анализа свидетельствуют о двойственной роли PUA домена в процессе образования комплекса. Во-первых, PUA домен отвечает за связывание мотива ССА 3'-конца тРНК с помощью сложной системы взаимодействий, где узнавание каждого нуклеотида обеспечивается одновременно несколькими аминокислотами. Во-вторых, происходит специфическое связывание участка D-петли тРНК бороздкой PUA домена, сформированной положительно заряженными аминокислотными остатками (рис. 3, з).

Детальное изучение активного центра NSUN6 позволило установить важную роль в катализе высококонсервативных аминокислотных остатков Lys248, Asp323, Cys326 и Cys373 и подтвердить роль Cys373 как нуклеофила на первой стадии катализа, а Cys326 – как основания в последующей реакции β-элиминирования. Кроме того, ряд экспериментальных данных указывает на возможность существования дисульфидной связи Cys373-Cys326, что требует дальнейшего подтверждения.

К настоящему времени нет данных о том, как отсутствие или функциональные нарушения в структуре NSUN6 могут влиять на жизнедеятельность организмов, однако существуют данные о его участии в развитии метастазов в костях при раке молочной железы [88]. Также известно, что NSUN6 в составе рибонуклеопротеидного комплекса LLGL2-MAYA РНК-NSUN6 принимает участие в метилировании лизина Lys59 киназы MST1, подавляющего ак-

тивность этой киназы и таким образом влияющего на активность фактора транскрипции YAP и экспрессию генов, ответственных за развитие опухоли. Таким образом, NSUN6 может иметь в клетке функции, отличные от РНК-метилтрансферазной активности и делающие его перспективным кандидатом для разработки противоопухолевых препаратов.

NSUN7. РНК-(цитозин С5)-метилтрансфераза NSUN7 является седьмым и последним представителем семейства NOL1/Nop2/Sup РНК-метилтрансфераз у млекопитающих. К настоящему времени мишени и функциональная роль этого белка плохо изучены. Согласно данным транскриптомного анализа тканей *M. musculus* и *H. sapiens*, мРНК NSUN7 находится в семенниках. В пределах семенников она ограничена сперматоцитами и сперматидами и практически отсутствует в сперматогониях и клетках Сертоли [89]. У мышей описана мутация *Ste5Jcs1*, индуцированная воздействием *N*-нитрозэтилмочевины и приводящая к возникновению преждевременного стоп-кодона перед метилтрансферазным доменом [90]. Особи, обладающие подобной мутацией, являются стерильными либо субфертильными. Сперматозоиды таких мышей имеют характерный фенотип: вследствие повышенной жесткости среднего сегмента они двигаются по круговой траектории. Кроме того, на электронной микрофото-

графии заметна аномалия структуры спирали митохондрий. Подобная взаимосвязь мутаций в гене *NSUN7* и структуры сперматозоидов описана и для человека. Так, с астеноспермией ассоциированы делеция A11337 в экзоне 4, а также замена T26248G в экзоне 7 [91, 92].

В клетках гепатомы Нера 1-6 белок NSUN7 был охарактеризован как компонент комплекса с коактиватором транскрипции PGC-1 α [93]. Последний является ключевым регулятором различных метаболических путей в клетке, включая биогенез митохондрий. Для ряда генов-мишеней PGC-1 α , таких как ген 6-фосфофруктокиназы *PFKL*, сиртуина *SIRT5*, изоцитратдегидрогеназы *IDH3b* и гемоксигеназы *HMOX2* была показана ассоциация PGC-1 α не только с сайтами инициации транскрипции, но и с энхансерными последовательностями соответствующих генов. В последнем случае PGC-1 α способствует транскрипции энхансерных участков, результатом которой являются короткие некодирующие энхансерные РНК, участвующие в *in cis* активации транскрипции соответствующих генов. В составе энхансерных РНК упомянутых выше генов были обнаружены остатки 5-метилцитозина, а нокаун NSUN7 с помощью РНК интерференции приводил к снижению степени их метилирования. Кроме того, наблюдалось резкое снижение количества метилируемых энхансерных РНК и мРНК соответ-

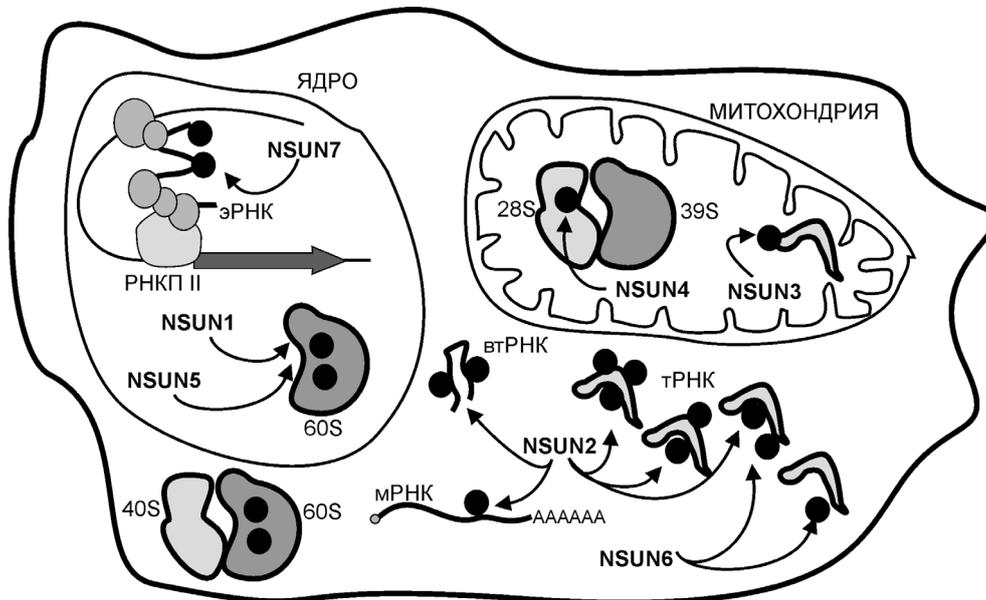


Рис. 7. РНК-мишени и внутриклеточная локализация эукариотических РНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз. 40S и 60S – обозначение малой и большой субъединиц рибосомы соответственно; 28S и 39S – обозначение малой и большой субъединиц митохондриальной рибосомы, эРНК – энхансерная РНК, втРНК – РНК-компонент рибонуклеопротеиновой частицы Vault, РНКП II – РНК-полимераза II. Черным кружком обозначены остатки 5-метилцитозина

ствующих им генов, что может свидетельствовать о положительном влиянии 5-метилцитозина на их стабильность.

Несмотря на широкую распространенность 5-метилцитозина в РНК эукариотических организмов, к настоящему времени известно только восемь эукариотических РНК-С5-метилтрансфераз. Они функционируют в ядре, цитоплазме и митохондриях клетки, поддерживая профиль метилирования РНК и обеспечивая (наряду с другими ферментами нуклеинового обмена) формирование фенотипа клеток и организма в целом (рис. 7). В подавляющем большинстве их РНК-мишенями являются компоненты трансляционного аппарата (рРНК и тРНК), в том числе митохондриального (NSUN3, NSUN4) (рис. 7). Значительная часть метилированных остатков цитозина находится в непосредственной близости от функционально значимых центров рибосомы, что влияет на эффективность и точность прохождения различных этапов трансляции и тем самым на регуляцию клеточных механизмов, основанных на трансляции.

Помимо функций, связанных непосредственно с метилированием цитозина в РНК, РНК-(цитозин С5)-метилтрансферазы выполняют многочисленные функции, не связанные с метилированием. Так, DNMT2 оказывает влияние на продолжительность жизни ряда организмов и устойчивость к различным видам стресса [41], а также на процесс эпигенетического наследования [43]. Метилтрансферазы NSUN1, NSUN2 и NSUN3 участвуют в дифференцировке и пролиферации клеток [52–54, 69, 70, 77], NSUN3 – в регуляции работы митохондриальной дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования в клетках скелетной мускулатуры [78], NSUN4 – в биогенезе митохондриальных рибосом [79], гомологи NSUN5 в *C. elegans* и *D. melanogaster* – в модуляции продолжительности жизни организма [83].

Нарушение функций РНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз у человека сопряжено с различными заболеваниями. Так, NSUN6 участвует в развитии метастазов в костях при раке молочной железы [88] и в экспрессии генов, ответственных за развитие опухоли. Мутации в гене *NSUN2* ассоциированы с умственной отста-

лостью, а также вызывают синдром Дубовица [73]. Делецию гена *NSUN5* ассоциируют с возникновением синдрома Вильямса–Бойрена – редкого генетического заболевания, характеризующегося задержкой умственного развития, а также рядом других системных нарушений. Установлено, что мутации в области каталитического домена NSUN3 вызывают микроцефалию, умственную отсталость, лактозный ацидоз, потерю слуха и патологическую мышечную слабость [78]. Делецию A11337 в экзоне 4 и замену T26248G в экзоне 7 гена *NSUN7* ассоциируют с астеноспермией [91, 92]. Все эти данные подтверждают исключительную важность РНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз для обеспечения нормальной жизнедеятельности организмов.

Таким образом, достижения структурной и молекулярной биологии последнего десятилетия существенно расширили наши знания об РНК-(цитозин С5)-метилтрансферазах – ферментах, участвующих в посттранскрипционной модификации РНК. Стало возможным получать детальную информацию об этих сложно организованных биологических объектах, что является важным шагом на пути к пониманию их молекулярной функции и роли в эволюции и развитии болезней человека. Эти достижения совместно с достижениями биоорганической химии, экспериментальной и клинической медицины позволяют надеяться, что со временем появятся новые эффективные и доступные методы диагностики и терапии ассоциированных с нарушениями работы РНК-(цитозин С5)-метилтрансфераз заболеваний, что приведет к увеличению продолжительности и улучшению качества жизни человека.

Финансирование. Обзор подготовлен при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 17-75-30027) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 17-00-00366).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boccaletto, P., Machnicka, M.A., Purta, E., Piatkowski, P., Baginski, B., Wirecki, T.K., de Crécy-Lagard, V., Ross, R., Limbach, P.A., Kotter, A., Helm, M., and Bujnicki, J.M. (2018) MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 303–307, doi: 10.1093/nar/gkx1030.
2. Chen, Y., Sierzputowska-Gracz, H., Guenther, R., Everett, K., and Agris, P. (1993) 5-Methylcytidine is

- required for cooperative binding of Mg²⁺ and a conformational transition at the anticodon stem-loop of yeast phenylalanine tRNA, *Biochemistry*, **32**, 10249–10253, PMID: 8399153.
3. Gowher, H., and Jeltsch, A. (2018) Mammalian DNA methyltransferases: new discoveries and open questions, *Biochem. Soc. Trans.*, **46**, 1191–1202, doi: 10.1042/BST20170574.
 4. Trixl, L., and Lusser, A. (2019) The dynamic RNA modification 5-methylcytosine and its emerging role as an epitranscriptomic mark, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **10**, e1510, doi: 10.1002/wrna.1510.
 5. Bohnsack, K.E., Höbartner, K., and Bohnsack, M.T. (2019) Eucaryotic 5-methylcytosine (m5C) RNA methyltransferases: mechanisms, cellular functions, and links to disease, *Genes*, **10**, 102, doi: 10.3390/genes10020102.
 6. Schaefer, M., Pollex, T., Hanna, K., and Lyko, F. (2009) RNA cytosine methylation analysis by bisulfite sequencing, *Nucleic Acids Res.*, **37**, e12, doi: 10.1093/nar/gkn954.
 7. Edelheit, S., Schwartz, S., Mumbach, M., Wurtzel, O., and Sorek, R. (2013) Transcriptome-wide mapping of 5-methylcytidine RNA modifications in bacteria, archaea, and yeast reveals m(5)C within archaeal mRNAs, *PLoS Genet.*, **9**, e1003602, doi: 10.1371/journal.pgen.1003602.
 8. Khoddami, V., and Cairns, B. (2013) Identification of direct targets and modified bases of RNA cytosine methyltransferases, *Nat Biotechnol.*, **31**, 458–464, doi: 10.1038/nbt.2566.
 9. George, H., Ule, J., and Hussain, S. (2017) Illustrating the Epitranscriptome at Nucleotide Resolution Using Methylation-iCLIP (miCLIP), *Methods Mol. Biol.*, **1562**, 91–106, doi: 10.1007/978-1-4939-6807-7_7.
 10. Squires, J., Patel, H., Nusch, M., Sibbritt, T., Humphreys, D., Parker, B.J., Suter, C.M., and Preiss, T. (2012) Widespread occurrence of 5-methylcytosine in human coding and non-coding RNA, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 5023–2033, doi: 10.1093/nar/gks144.
 11. Hoernes, T., Clementi, N., Faserl, K., Glasner, H., Breuker, K., and Lindner, H. (2016) Nucleotide modifications within bacterial messenger RNAs regulate their translation and are able to rewire the genetic code, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 852–862, doi: 10.1093/nar/gkv1182.
 12. Dominissini, D., Nachtergale, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Peer, E., Kol, N., Ben-Haim, M.S., Dai, Q., Di Segni, A., Salmon-Divon, M., Clark, W.C., Guanqun Zheng, G., Pan, T., Solomon, O., Eran Eyal, E., Hershkovitz, V., Han, D., Doré, L.C., Amariglio, N., Rechavi, G., and He, C. (2016) The dynamic N1-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA, *Nature*, **530**, 441–446, doi: 10.1038/nature16998.
 13. Amort, T., Rieder, D., Wille, A., Khokhlova-Cubberley, D., Riml, C., Trixl, L., Jia, X.Y., Micura, R., and Lusser, A. (2017) Distinct 5-methylcytosine profiles in poly(A) RNA from mouse embryonic stem cells and brain, *Genome Biol.*, **18**, 1, doi: 10.1186/s13059-016-1139-1.
 14. Amort, T., Soulière, M., Wille, A., Jia, X., Fiegl, H., Wörle, H., Micura, R., and Lusser, A. (2013) Long non-coding RNAs as targets for cytosine methylation, *RNA Biol.*, **10**, 1003–1008, doi: 10.4161/rna.24454.
 15. Yang, X., Yang, Y., Sun, B., Chen, Y., Xu, J., Lai, W., Li, A., Wang, X., Bhattarai, D.P., Xiao, W., Sun, H.-Y., Zhu, Q., Hai-Li Ma, H.-L., Adhikari, S., Sun, M., Hao, Y.-J., Bing Zhang, B., Chun-Min Huang, C.-M., Huang, N., Jiang, G.-B., Zhao, Y.-L., Wang, H.-L., Sun, Y.-P., and Yang, Y.-G. (2017) 5-Methylcytosine promotes mRNA export – NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m5C reader, *Cell Res.*, **27**, 606–625, doi: 10.1038/cr.2017.55.
 16. Reid, R., Greene, P., and Santi, D. (1999) Exposition of a family of RNA m(5)C methyltransferases from searching genomic and proteomic sequences, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 3138–3145, PMID: 10454610.
 17. Walbott, H., Husson, C., Auxilien, S., and Golinelli-Pimpaneau, B. (2007) Cysteine of sequence motif VI is essential for nucleophilic catalysis by yeast tRNA m⁵C methyltransferase, *RNA*, **13**, 967–973, doi: 10.1261/rna.515707.
 18. Liu, Y., and Santi, D. (2000) m⁵C RNA and m⁵C DNA methyltransferases use different cysteine residues as catalysts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8263–8265, PMID: 10899996.
 19. Zhang, X., and Bruice, T. (2006) The mechanism of M.HhaI DNA C5 cytosine methyltransferase enzyme: a quantum mechanics/molecular mechanics approach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 6148–6153, doi: 10.1073/pnas.0601587103.
 20. Gu, X., Gustafsson, C., Ku, J., Yu, M., and Santi, D. (1999) Identification of the 16S rRNA m⁵C967 methyltransferase from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **38**, 4053–4057, doi: 10.1021/bi982364y.
 21. Lesnyak, D.V., Osipiuk, J., Skarina, T., Sergiev, P.V., Bogdanov, A.A., Edwards, A., Savchenko, A., Joachimiak, A., and Dontsova, O.A. (2007) Methyltransferase that modifies guanine 966 of the 16 S rRNA: functional identification and tertiary structure, *J. Biol. Chem.*, **282**, 5880–5887, doi: 10.1074/jbc.M608214200.
 22. Tscherne, J., Nurse, K., Popienick, P., Michel, H., Sochacki, M., and Ofengand, J. (1999) Purification, cloning, and characterization of the 16S RNA m⁵C967 methyltransferase from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **38**, 1884–1892, doi: 10.1021/bi981880l.
 23. Weitzmann, C., Tumminia, S., Boublik, M., and Ofengand, J. (1991) A paradigm for local conformational control of function in the ribosome: binding of ribosomal protein S19 to *Escherichia coli* 16S rRNA in the presence of S7 is required for methylation of m²G966 and blocks methylation of m⁵C967 by their respective methyltransferases, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 7089–7095, PMID: 1766869.
 24. Foster, P., Nunes, C., Greene, P., Moustakas, D., and Stroud, R. (2003) The first structure of an RNA m⁵C methyltransferase, Fmu, provides insight into catalytic mechanism and specific binding of RNA substrate, *Structure*, **11**, 1609–1620, doi: 10.1016/j.str.2003.10.014.
 25. Burakovsky, D., Prokhorova, I., Sergiev, P., and Milyan, P. (2012) Impact of methylations of m²G966/m⁵C967 in 16S rRNA on bacterial fitness and translation initiation, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 7885–7895, doi: 10.1093/nar/gks508.
 26. Prokhorova, I., Osterman, I., Burakovsky, D., and Serebryakova, M. (2013) Modified nucleotides m²G966/m⁵C967 of *Escherichia coli* 16S rRNA are required for attenuation of tryptophan operon, *Sci. Rep.*, **3**, 3236, doi: 10.1038/srep03236.
 27. Andersen, N., and Douthwaite, S. (2006) YebU is a m⁵C methyltransferase specific for 16 S rRNA nucleotide 1407, *J. Mol. Biol.*, **359**, 777–786, doi: 10.1016/j.jmb.2006.04.007.
 28. Hallberg, B., Ericsson, U., Johnson, K., Andersen, N., Douthwaite, S., Nordlund, P., Beuscher A.E., and Erlandsen, H. (2006) The structure of the RNA m⁵C methyltransferase YebU from *Escherichia coli* reveals a C-terminal RNA-recruiting PUA domain, *J. Mol. Biol.*, **360**, 774–787, doi: 10.1016/j.jmb.2006.05.047.
 29. Purta, E., O'Connor, M., Bujnicki, J., and Douthwaite, S. (2008) YccW is the m⁵C methyltransferase specific for 23S rRNA nucleotide 1962, *J. Mol. Biol.*, **383**, 641–651, doi: 10.1016/j.jmb.2008.08.061.
 30. Sunita, S., Tkaczuk, K., Purta, E., Kasprzak, J., Douthwaite, S., Bujnicki, and J., Sivaraman, J. (2008)

- Crystal structure of the *Escherichia coli* 23S rRNA:m5C methyltransferase RlmI (YccW) reveals evolutionary links between RNA modification enzymes, *J. Mol. Biol.*, **383**, 652–666, doi: 10.1016/j.jmb.2008.08.062.
31. Rodriguez, V., Vasudevan, S., Noma, A., Carlson, B., Green, J., Suzuki, T., and Chandrasekharappa, S.C. (2012) Structure-function analysis of human TYW2 enzyme required for the biosynthesis of a highly modified Wybutosine (yW) base in phenylalanine-tRNA, *PLoS One*, **7**, e39297, doi: 10.1371/journal.pone.0039297.
 32. Jurkowski, T., and Jeltsch, A. (2011) On the evolutionary origin of eukaryotic DNA methyltransferases and Dnmt2, *PLoS One*, **6**, e28104, doi: 10.1371/journal.pone.0028104.
 33. Goll, M., Kirpekar, F., Maggert, K., Yoder, J., Hsieh, C., Zhang, X., Golic, K., Jacobsen, S., and Bestor, T. (2006) Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2, *Science*, **311**, 395–398, doi: 10.1126/science.1126104.
 34. Shanmugam, R., Aklujkar, M., Schaefer, M., Reinhardt, R., Nickel, O., Reuter, G., Lovley, D.R., Ehrenhofer-Murray, A., Nellen, W., Ankri, S., Helm, M., Jurkowski, T.P., and Jeltsch, A. (2014) The Dnmt2 RNA methyltransferase homolog of *Geobacter sulfurreducens* specifically methylates tRNA-Glu, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 6487–6496, doi: 10.1093/nar/gku256.
 35. Schaefer, M., Pollex, T., Hanna, K., Tuorto, F., Meusburger, M., Helm, M., and Lyko, F. (2010) RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage, *Genes Dev.*, **24**, 1590–1595, doi: 10.1101/gad.586710.
 36. Haussecker, D., Huang, Y., Lau, A., Parameswaran, P., Fire, A., and Kay, M. (2010) Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing, *RNA*, **16**, 673–695, doi: 10.1261/rna.2000810.
 37. Shanmugam, R., Fierer, J., Kaiser, S., Helm, M., Jurkowski, T., and Jeltsch, A. (2015) Cytosine methylation of tRNA-Asp by DNMT2 has a role in translation of proteins containing poly-Asp sequences, *Cell Discov.*, **1**, 15010, doi: 10.1038/celldisc.2015.10.
 38. Zaborske, J., Vanessa, L., DuMont, B., Wallace, E., Pan, T., Aquadro, C., and Drummond, A. (2014) A nutrient-driven tRNA modification alters translational fidelity and genome-wide protein coding across an animal genus, *PLoS Biol.*, **12**, e1002015, doi: 10.1371/journal.pbio.1002015.
 39. Muller, M., Hartmann, M., Schuster, I., Bender, S., Thuring, K., Helm, M., Katze, J., Nellen, W., Lyko, F., and Ehrenhofer-Murray, A. (2015) Dynamic modulation of Dnmt2-dependent tRNA methylation by the micronutrient queuine, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 10952–10962, doi: 10.1093/nar/gkv980.
 40. Schaefer, M., Steringer, J., and Lyko, F. (2008) The *Drosophila* cytosine-5 methyltransferase Dnmt2 is associated with the nuclear matrix and can access DNA during mitosis, *PLoS One*, **3**, e1414, doi: 10.1371/journal.pone.0001414.
 41. Lin, M., Tang, L., Reddy, M., and Shen C. (2005) DNA methyltransferase gene *dDnmt2* and longevity of *Drosophila*, *J. Biol. Chem.*, **280**, 861–864, doi: 10.1074/jbc.C400477200.
 42. Forbes, S., Beare, D., Gunasekaran, P., Leung, K., Bindal, N., Boutselakis, H., Ding, M., Bamford, S., Cole, C., Ward, S., Kok, C.Y., Jia, M., De, T., Teague, J.W., Stratton, M.R., McDermott, U., and Campbell, P.J. (2015) COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 805–811, doi: 10.1093/nar/gku1075. Epub 2014 Oct 29.
 43. Chen, Q., Yan, M., Cao, Z., Li, X., Zhang, Y., Shi, J., Feng, G., Peng, H., Zhang, X., Zhang, Y., Qian, J., Duan, E., Zhai, Q., and Zhou, Q. (2016) Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder, *Science*, **351**, 397–400, doi: 10.1126/science.aad7977.
 44. Sardana, R., and Johnson, A. (2012) The methyltransferase adaptor protein Trm112 is involved in biogenesis of both ribosomal subunits, *Mol. Biol. Cell.*, **23**, 4313–4322, doi: 10.1091/mbc.E12-05-0370.
 45. Vasilieva, E.N., Laptev, I.G., Sergiev, P.V., and Dontsova, O.A. (2018) The common partners of several methyltransferases modifying components of the eukaryotic translation apparatus, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **52**, 975–983, doi: 10.1134/S0026898418060174.
 46. Sharma, S., Yang, J., Watzinger, P., Kutter, P., and Entian, K. (2013) Yeast Nop2 and Rcm1 methylate C2870 and C2278 of the 25S rRNA, respectively, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 9062–9076, doi: 10.1093/nar/gkt679.
 47. Gustafson, W., Taylor, C., Valdez, B., Henning, D., Phippard, A., Ren, Y., Busch, H., and Durban E. (1998) Nucleolar protein p120 contains an arginine-rich domain that binds to ribosomal RNA, *Biochem. J.*, **331**, 387–393, PMID: 9531475.
 48. Valdez, B.C., Perlaky, L., Henning, D., Saijo, Y., Chan, P.K., and Busch, H. (1994) Identification of the nuclear and nucleolar localization signals of the protein p120 interaction with translocation protein B23, *J. Biol. Chem.*, **269**, 23776–23783, PMID: 8089149.
 49. Bourgeois, G., Ney, M., Gaspar, I., Aigueperse, C., Schaefer, M., Kellner, S., Helm, M., and Motorin, Y. (2015) Eukaryotic rRNA modification by yeast 5-methylcytosine-methyltransferases and human proliferation-associated antigen p120, *PLoS One*, **10**, e0133321, doi: 10.1371/journal.pone.0133321.
 50. Hong, B., Brockenbrough, J., Wu, P., and Aris, P. (1997) Nop2p is required for pre-rRNA processing and 60S ribosome subunit synthesis in yeast, *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 378–388, PMID: 8972218.
 51. Fonagy, A., Swiderski, C., Wilson, A., Bolton, W., Kenyon, N., and Freeman, J. (1993) Cell cycle regulated expression of nucleolar antigen P120 in normal and transformed human fibroblasts, *J. Cell. Physiol.*, **154**, 16–27, PMID: 8419402.
 52. Perlaky, L., Valdez, B., Busch, R., Larson, R., Jhiang, S., Zhang, W., Brattain, M., and Busch, H. (1992) Increased growth of NIH/3T3 cells by transfection with human p120 complementary DNA and inhibition by a p120 antisense construct, *Cancer Res.*, **52**, 428–436, PMID: 1728415.
 53. Fonagy, A., Swiderski, C., Ostrovsky, A., Bolton, W., and Freeman, J. (1994) Effect of nucleolar P120 expression level on the proliferation capacity of breast cancer cells, *Cancer Res.*, **54**, 1859–1864, PMID: 8137301.
 54. Khanna-Gupta, A., Sun, H., Zibello, T., Lozovatsky, L., Ghosh, P., Link, D., McLemore, M., and Berliner, N. (2006) p120 Nucleolar-proliferating antigen is a direct target of G-CSF signaling during myeloid differentiation, *J. Leukoc. Biol.*, **79**, 1011–1021, doi: 10.1189/jlb.0205066.
 55. Kosi, N., Alić, I., Kolačević, M., Vrsaljko, N., Jovanov, Milošević, N., Sobol, M., and Mitrečić, D. (2015) Nop2 is expressed during proliferation of neural stem cells and in adult mouse and human brain, *Brain Res.*, **1597**, 65–76, doi: 10.1016/j.brainres.
 56. Blanco, S., Dietmann, S., Flores, J. V., Hussain, S., Kutter, C., Humphreys, P., Lukk, M., Lombard, P., Treps, L., Popis, M., Kellner, S., Hölter, S. M., Garrett, L., Wurst, W., Becker, L., Klopstock, T., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Hrabě de Angelis, M., Kárádyttir, R.T., Helm, M., Ule, J., Gleeson, J.G., Odom, D.T., and Frye, M. (2014). Aberrant methylation of tRNAs links cellular stress to

- neuro-developmental disorders, *EMBO J.*, **33**, 2020–2039, doi: 10.15252/embj.201489282.
57. Brzezicha, B., Schmidt, M., Makalowska, I., Jarmolowski, A., Pienkowska, J., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2006) Identification of human tRNA:m5C methyltransferase catalysing intron-dependent m5C formation in the first position of the anticodon of the pre-tRNA^{Leu}(CAA), *Nucleic Acids Res.*, **34**, 6034–6043, doi: 10.1093/nar/gkl765.
 58. Ivanov, P., Emará, M., Villen, J., Steven, P., Gygi, S., and Paul Anderson, P. (2011) Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation, *Mol. Cell.*, **43**, 613–623, doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.022.
 59. Wang, N., Tang, H., Wang, X., Wang, W., and Feng, J. (2017) Homocysteine upregulates interleukin-17A expression via NSun2-mediated RNA methylation in T lymphocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **493**, 94–99, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.069.
 60. Luo, Y., Feng, J., Xu, Q., Wang, W., and Wang, X. (2016) NSun2 deficiency protects endothelium from inflammation via mRNA methylation of ICAM-1, *Circ. Res.*, **118**, 944–956, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307674.
 61. Tang, H., Fan, X., Xing, J., Liu, Z., Jiang, B., Dou, Y., Gorospe, M., and Wang, W. (2015) NSun2 delays replicative senescence by repressing p27 (KIP1) translation and elevating CDK1 translation, *Aging*, **7**, 1143–1155, doi: 10.18632/aging.100860.
 62. Zhang, X., Liu, Z., Yi, J., Tang, H., Xing, J., Yu, M., Tong, T., Shang, Y., Gorospe, M., and Wang, W. (2012) The tRNA methyltransferase NSun2 stabilizes p16INK4 mRNA by methylating the 3'-untranslated region of p16, *Nat. Commun.*, **3**, 712, doi: 10.1038/ncomms1692.
 63. Khoddami, V., and Cairns, B. (2013) Identification of direct targets and modified bases of RNA cytosine methyltransferases, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 458–464, doi: 10.1038/nbt.2566.
 64. Berger, W., Steiner, E., Grusch, M., Elbling, L., and Micksche, M. (2009) Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity, *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 43–61, doi: 10.1007/s00018-008-8364-z.
 65. Hussain, S., Sajini, A., Blanco, S., Dietmann, S., Lombard, P., Sugimoto, Y., Paramor, M., Gleeson, J., Odom, D., Ule, J., and Frye, M. (2013) NSun2-mediated cytosine-5 methylation of vault noncoding RNA determines its processing into regulatory small RNAs, *Cell Rep.*, **4**, 255–261, doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.029.
 66. Hussain, S., Benavente, S.B., Nascimento, E., Dragoni, I., Kurowski, A., Gillich, A., Humphreys, P., and Frye, M. (2009) The nucleolar RNA methyltransferase Misu (NSun2) is required for mitotic spindle stability, *J. Cell. Biol.*, **186**, 27–40, doi: 10.1083/jcb.2008.10180.
 67. Frye, M., and Watt, F. (2006) The RNA methyltransferase Misu (NSun2) mediates Myc-induced proliferation and is upregulated in tumors, *Curr. Biol.*, **16**, 971–981, doi: 10.1016/j.cub.2006.04.027.
 68. Sakita-Suto, S., Kanda, A., Suzuki, F., Sato, S., Takata, T., and Tatsuka, M. (2007) Aurora B regulates RNA methyltransferase NSun2, *Mol. Biol. Cell.*, **18**, 1107–1117, doi: 10.1091/mbc.E06-11-1021.
 69. Blanco, S., Kurowski, A., Nichols, J., Watt, F., Benitah, S., and Frye, M. (2011) The RNA-methyltransferase Misu (NSun2) poises epidermal stem cells to differentiate, *PLoS Genet.*, **7**, e1002403, doi: 10.1371/journal.pgen.1002403.
 70. Hussain, S., Tuorto, F., Menon, S., Blanco, S., Cox, C., Flores, J., Watt, S., Kudo, N., Lyko, F., and Frye, M. (2013) The mouse cytosine-5 RNA methyltransferase NSun2 is a component of the chromatoid body and required for testis differentiation, *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 1561–1570, doi: 10.1128/MCB.01523-12.
 71. Yi, J., Gao, R., Chen, Y., Yang, Z., Han, P., Zhang, H., Dou, Y., Liu, W., Wang, W., Du, G., Xu, Y., and Wang, J. (2017) Overexpression of NSUN2 by DNA hypomethylation is associated with metastatic progression in human breast cancer, *Oncotarget*, **8**, 20751–20765, doi: 10.18632/oncotarget.10612.
 72. Abbasi-Moheb, L., Mertel, S., Gonsior, M., Nouri-Vahid, L., Kahrizi, K., Cirak, S., Wiczorek, D., Motazacker, M., Esmaeeli-Nieh, S., Cremer, K., Weijmann, R., Tzschach, A., Garshasbi, M., Abedini, S., Najmabadi, H., Ropers, H., Sigrist, S., and Kuss, A. (2012) Mutations in NSUN2 cause autosomal-recessive intellectual disability, *Am. J. Hum. Genet.*, **90**, 847–855, doi: 10.1016/j.ajhg.2012.03.021.
 73. Martinez, F., Lee, J., Lee, J., Blanco, S., Nickerson, E., Gabriel, S., Frye, M., Al-Gazali, L., and Gleeson, J. (2012) Whole exome sequencing identifies a splicing mutation in NSUN2 as a cause of a Dubowitz-like syndrome, *J. Med. Genet.*, **49**, 380–385, doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100686.
 74. Nakano, S., Suzuki, T., Kawarada, L., Iwata, H., Asano, K., and Suzuki, T. (2016) NSUN3 methylase initiates 5-formylcytidine biogenesis in human mitochondrial tRNA^{Met}, *Nat. Chem. Biol.*, **12**, 546–551, doi: 10.1038/nchembio.
 75. Cantara, W., Murphy, V., Demirci, H., and Agris, P. (2013) Expanded use of sense codons is regulated by modified cytidines in tRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 10964–10969, doi: 10.1073/pnas.1222641110.
 76. Haag, S., Sloan, K., Ranjan, N., Warda, A., Kretschmer, J., Blessing, C., Hübner, B., Seikowski, J., Dennerlein, S., Rehling, P., Rodnina, M., Hübner, C., and Bohnsack, M. (2016) NSUN3 and ABH1 modify the wobble position of mt-tRNA^{Met} to expand codon recognition in mitochondrial translation, *EMBO J.*, **35**, 2104–2119, doi: 10.15252/embj.201694885.
 77. Trixl, L., Amort, T., Wille, A., Zinni, M., Ebner, S., Hechenberger, C., Eichin, F., Gabriel, H., Schoberleitner, I., Huang, A., Piatti, P., Nat, R., Troppmair, J., and Lusser, A. (2018) RNA cytosine methyltransferase Nsun3 regulates embryonic stem cell differentiation by promoting mitochondrial activity, *Cell. Mol. Life Sci.*, **75**, 1483–1497, doi: 10.1007/s00018-017-2700-0.
 78. Van Haute, L., Dietmann, S., Kremer, L., Hussain, S., Pearce, S., Powell, C., Rorbach, J., Lantaff, R., Blanco, S., Sauer, S., Kotzaeridou, U., Hoffmann, G., Memari, Y., Kolb-Kokocinski, A., Durbin, R., Mayr, J., Frye, M., Prokisch, H., and Minczuka, M. (2016) Deficient methylation and formylation of mt-tRNA^{Met} wobble cytosine in a patient carrying mutations in NSUN3, *Nat. Commun.*, **7**, 12039, doi: 10.1038/ncomms12039.
 79. Metodiev, M.D., Spehr, H., Loguercio Polosa, P., Meharg, C., Becker, C., Altmueller, J., Habermann, B., Larsson, N.G., and Ruzzenente, B. (2014) NSUN4 is a dual function mitochondrial protein required for both methylation of 12S rRNA and coordination of mitoribosomal assembly, *PLoS Genetics*, **10**, e1004110, doi: 10.1371/journal.pgen.1004110.
 80. Yakubovskaya, E., Guja, K.E., Mejia, E., Castano, S., Hambardjievá, E., Choi, W.S., and Garcia-Diaz, M. (2012) Structure of the essential MTERF4:NSUN4 protein complex reveals how an MTERF protein collaborates to facilitate rRNA modification, *Structure*, **20**, 1940–1947, doi: 10.1016/j.str.2012.08.027.
 81. Spehr, H., Habermann, B., Gustafsson, C., Larsson, N., and Hallberg, B. (2012) Structure of the human MTERF4-NSUN4 protein complex that regulates mitochondrial ribosome biogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 15253–15258, doi: 10.1073/pnas.1210688109.

82. Cámara, Y., Asin-Cayuela, J., Park, C., Metodiev, M., Shi, Y., Ruzzenente, B., Kukut, C., Habermann, B., Wibom, R., Hultenby, K., Franz, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hallberg, M., Gustafsson, C.M., and Larsson, N.-G. (2011) MTERF4 regulates translation by targeting the methyltransferase NSUN4 to the mammalian mitochondrial ribosome, *Cell. Metab.*, **13**, 527–539, doi: 10.1016/j.cmet.2011.04.002.
83. Schosserer, M., Minois, N., Angerer, T.B., Amring, M., Dellago, H., Harreither, E., Calle-Perez, A., Pircher, A., Gerstl, M. P., Pfeifenberger, S., Brandl, C., Sonntagbauer, M., Kriegner, A., Linder, A., Weinhäusel, A., Mohr, T., Steiger, M., Mattanovich, D., Rinnerthaler, M., Karl, T., Sharma, S., Entian, K.D., Kos, M., Breitenbach, M., Wilson, I.B., Polacek, N., Grillari-Voglauer, R., Breitenbach-Koller, L., and Grillari, J. (2015) Methylation of ribosomal RNA by NSUN5 is a conserved mechanism modulating organismal lifespan, *Nat. Commun.*, **6**, 6158. doi: 10.1038/ncomms7158.
84. Ramani, A.K., Li, Z., Hart, G.T., Carlson, M.W., Boutz, D.R., and Marcotte, E.M. (2008) A map of human protein interactions derived from co-expression of human mRNAs and their orthologs, *Mol. Systems Biol.*, **4**, 180, doi: 10.1038/msb.2008.19.
85. Haag, S., Warda, A., Kretschmer, J., Gönningmann, M., Höbartner, C., and Bohnsack, M. (2015) NSUN6 is a human RNA methyltransferase that catalyzes formation of m⁵C72 in specific tRNAs, *RNA*, **21**, 1532–1543, doi: 10.1261/rna.051524.115.
86. Long, T., Li, J., Li, H., Zhou, M., Zhou, X., Liu, R., and Wang, E. (2016) Sequence-specific and shape-selective RNA recognition by the human RNA 5-methylcytosine methyltransferase NSun6, *J. Biol. Chem.*, **291**, 24293–24303, doi: 10.1074/jbc.M116.742569.
87. Liu, R., Long, T., Li, J., Li, H., and Wang, E. (2017) Structural basis for substrate binding and catalytic mechanism of a human RNA:m⁵C methyltransferase NSun6, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 6684–6697, doi: 10.1093/nar/gkx473.
88. Li, C., Wang, S., Xing, Z., Lin, A., Liang, K., Song, J., Hu, Q., Yao, J., Chen, Z., Park, P.K., Hawke, D.H., Zhou, J., Zhou, Y., Zhang, S., Liang, H., Hung, M.C., Gallick, G.E., Han, L., Lin, C., and Yang, L. (2017) A ROR1-HER3-LncRNA signaling axis modulates the Hippo-YAP pathway to regulate bone metastasis, *Nat. Cell Biol.*, **19**, 106–119, doi: 10.1038/ncb3464.
89. Chalmel, F., Rolland, A.D., Niederhauser-Wiederkehr, C., Chung, S.S., Demougin, P., Gattiker, A., Moore, J., Patard, J.J., Wolgemuth, D.J., Jügou, B., and Primig, M. (2007) The conserved transcriptome in human and rodent male gametogenesis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **104**, 8346–8351, doi: 10.1073/pnas.0701883104.
90. Harris, T., Marquez, B., Suarez, S., and Schimenti, J. (2007) Sperm motility defects and infertility in male mice with a mutation in *Nsun7*, a member of the Sun domain-containing family of putative RNA methyltransferases, *Biol. Reprod.*, **77**, 376–382, doi: 10.1095/biolreprod.106.058669.
91. Khosronezhad, N., Colagar, A., and Mortazavi, S. (2015) The *Nsun7* (*A11337*)-deletion mutation, causes reduction of its protein rate and associated with sperm motility defect in infertile men, *J. Assist. Reprod. Genet.*, **32**, 807–815, doi: 10.1007/s10815-015-0443-0.
92. Khosronejad, N., Colagar, A., and Jorsarayi, S. (2015) T26248G-transversion mutation in exon7 of the putative methyltransferase *Nsun7* gene causes a change in protein folding associated with reduced sperm motility in asthenospermic men, *Reprod. Fertil. Dev.*, **27**, 471–480, doi: 10.1071/RD13371.
93. Aguilo, F., Li, S., Balasubramanian, N., Sancho, A., Benko, S., Zhang, F., Vashisht, A., Rengasamy, M., Andino, B., Chen, C.H., Zhou, F., Qian, C., Zhou, M.M., Wohlschlegel, J.A., Zhang, W., Suchy, F.J., and Walsh, M.J. (2016) Deposition of 5-methylcytosine on enhancer RNAs enables the coactivator function of PGC-1 α , *Cell Rep.*, **14**, 479–492, doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.043.

RNA-(CYTOSINE C5)-METHYLTRANSFERASES

S. A. Kuznetsova^{1*#}, K. S. Petrukov^{2*#}, F. I. Pletnev^{2,3,4},
P. V. Sergiev^{1,2,3,5}, and O. A. Dontsova^{2,3,4}

¹ Lomonosov Moscow State University, Institute of Functional Genomics,
119234 Moscow, Russia; E-mail: svetlana@belozersky.msu.ru

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119991 Moscow, Russia

³ Skolkovo Institute of Science and Technology, 121205 Skolkovo, Moscow Region, Russia

⁴ Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia

⁵ Petrov National Medical Research Center of Oncology, 197758 St. Petersburg, Russia

Received March 5, 2019

Revised April 16, 2019

Accepted April 16, 2019

The review summarizes published results of studies of pro- and eukaryotic RNA-(cytosine C5)-methyltransferases. Their structures, intracellular localization, RNA-targets and catalytic mechanisms, as well as the functional role of methylated cytosine residues in RNA and the RNA-(cytosine C5)-methyltransferases' functions not related to methylation are discussed. Special attention is given to the analysis of similarities and differences in the structure and mechanism of action of RNA- and DNA-methyltransferases. Finally, data on the relationship of mutations in the genes of RNA-(cytosine C5)-methyltransferases with human diseases are presented.

Keywords: posttranscriptional modification of RNA, RNA-(cytosine C5)-methyltransferases, 5-methylcytosine, RNA methylation