

УДК 577.218

## НЕМК-ПОДОБНЫЕ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ

© 2022 г. Н. С. Бизяев<sup>a</sup>, А. В. Шувалов<sup>a, b</sup>, Е. З. Алкалаева<sup>a, b, \*</sup><sup>a</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия<sup>b</sup>Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Москва, 119991 Россия\*e-mail: [alkalaeva@eimb.ru](mailto:alkalaeva@eimb.ru)

Поступила в редакцию 26.11.2021 г.

После доработки 26.11.2021 г.

Принята к публикации 02.12.2021 г.

Трансляционная метилтрансфераза (метилаза) НЕМК2 человека, ортологи которой обнаружены у множества прокариот и эукариот, метилирует такие разнообразные субстраты, как остатки глутамина и лизина в составе белков, дезоксиаденозин в ДНК, а также соединения мышьяка. Важным субстратом метилазы НЕМК2 является остаток глутамин в инвариантном GGQ-мотиве эукариотического фактора терминации трансляции 1 (eRF1). Метилирование этого остатка ортологами НЕМК2 консервативно у эукариот, архей и бактерий, хотя факторы терминации бактерий имеют другие аминокислотные последовательности и структуру. В данном обзоре рассмотрены особенности функционирования метилазы НЕМК2 человека и ее ортологов как многофункциональных ферментов, регулирующих клеточные процессы, в частности, биосинтез белка.

**Ключевые слова:** НЕМК2, N6AMT1, eRF1, регуляция трансляции, метилирование, посттрансляционные модификации

DOI: 10.31857/S0026898422030028

### ВВЕДЕНИЕ

Метилаза (метилтрансфераза) НЕМК2 человека (известная также, как N6AMT1, или KMT9, или C21orf127) и ее ортологи в других эукариотах и археях, участвует в метилировании широкого спектра субстратов, используя в качестве донора метильной группы S-аденозилметионин (SAM). Предполагается, что этот фермент способен метилировать остатки глутамин в факторе терминации трансляции (eRF1), а также в факторах ремоделирования хроматина CHD5 и NUT [1–6], остатки лизина в гистоне H4 [2, 7], токсичные соединения мышьяка [8], а также, возможно, остатки дезоксиаденозина в ДНК [9].

Остатки глутамин в факторах терминации трансляции *Escherichia coli* также подвергаются метилированию метилазой НЕМК (Protein release factor methylation C, PrmC) и в митохондриях человека метилазой НЕМК1. Обе эти метилазы гомологичны НЕМК2 [4, 5, 10–13]. Ген *HEMK E. coli* входит в состав одного оперона с генами, кодирующими фактор терминации трансляции RF1 и глутамил-тРНК-редуктазу, которая участвует в синтезе гема. Из-за этого некоторое время счита-

лось, что и НЕМК необходима для синтеза гема, что обусловило название фермента (**heme** – гем) [10, 14]. Однако в дальнейшем участия НЕМК в синтезе гема не обнаружили [12].

Все указанные метилазы мы будем далее называть НЕМК-подобными метилазами. Необходимо отметить, что метилирование факторов терминации трансляции не является уникальной модификацией компонентов трансляции. Как способ регуляции трансляции описано также метилирование рибосомных белков, трансляционных факторов, а также рРНК [5, 15].

### СТРУКТУРА, ОРТОЛОГИ И ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕМК- ПОДОБНЫХ МЕТИЛАЗ

Функциональный домен всех НЕМК-подобных метилаз устроен сходным образом (рис. 1). Он образован Россмановской укладкой, состоящей из семи β-тяжей, которые расположены приблизительно в одной плоскости и окружены с обеих сторон группами α-спиралей. Такая структура функционального домена позволяет относить НЕМК-подобные метилазы к самому крупному первому

Сокращения: SAM – S-аденозилметионин; 6mA – N<sup>6</sup>-метил-2'-дезоксиаденозин; eRF1 – эукариотический фактор терминации трансляции 1.

(I) классу метилаз. Функциональный участок содержит консервативные глицин-богатые и NPPY-мотивы, связывающие, соответственно, SAM и метилируемый субстрат (у арсенита и его производных его значение неизвестно). Все они имеют также консервативные остатки пролина (P), участвующего в стабилизации структуры активного центра, и аспартата (D), участвующего в связывании SAM (рис. 1) [9, 10, 13, 16–20]. Точечный мутант метилазы человека N122A с нефункциональным мотивом NPPY не может метилировать ни остаток глутамин еRF1, ни остаток лизина гистона H4 [2]. Точно также дрожжевые точечные мутанты D77A по консервативному остатку аспартата, а также N122A по NPPY-мотиву не способны эффективно метилировать еRF1 [21].

Метилирование белковых субстратов происходит по  $S_N2$ -механизму за счет оптимального позиционирования субстрата в активном центре с помощью водородных связей, а также дестабилизации SAM, что катализирует нуклеофильную атаку неподеленной пары электронов азота на метильную группу SAM [16, 22].

Несмотря на сходство третичной структуры функционального домена и нескольких консервативных мотивов и остатков, бактериальные НЕМК-подобные метилазы довольно сильно отличаются от эукариотических/архейных по первичной структуре. При выравнивании и сравнении последовательностей НЕМК-подобных метилаз эукариотические и архейные метилазы кластеризуются в одну группу, что указывает на их близкое родство, тогда как митохондриальные метилазы кластеризуются с метилазой НЕМК *E. coli* (рис. 1а). Более того, бактериальные НЕМК-подобные метилазы имеют в своем составе дополнительный N-домен, отсутствующий у эукариотических и архейных ортологов НЕМК2 [10, 16, 17] (рис. 1б). Интересно, что N-домен бактериальной НЕМК охарактеризован как один из примеров пептидов, фолдинг которых начинается непосредственно внутри выходного туннеля рибосомы [23–25].

НЕМК2 и его ортологам у архей и эукариот, в отличие от бактериальной НЕМК, для эффективного осуществления метилирования необходимо образовать комплекс с белком TRMT112 [1–3, 8, 17, 26, 27]. По данным изотермической титраци-

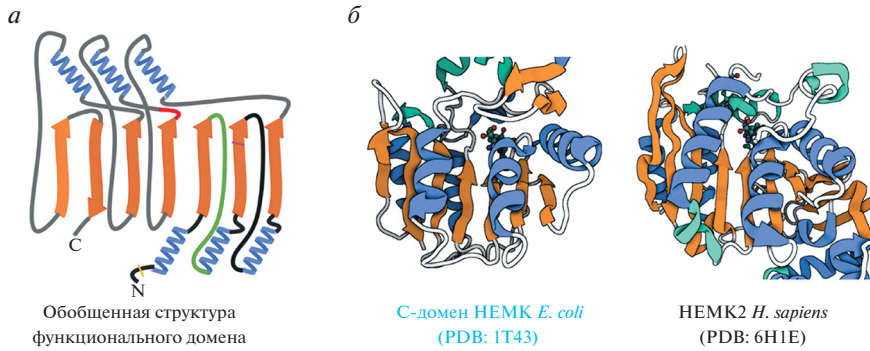
онной калориметрии (ИТС) формирование функционального комплекса НЕМК2-TRMT112, среди прочего, необходимо для того, чтобы метилаза связала SAM [2]. Однако у некоторых архей (Methanobacteriales и Thermococcales) обнаружен только ортолог НЕМК2, но не TRMT112 [28]. Таким образом, не до конца ясно, насколько эффективно у них функционирует метилаза.

Связанный с метилазой TRMT112 стабилизирует конформацию ее  $\beta 3$ – $\beta 4$ -тяжей, необходимую для связывания SAM, а также маскирует гидрофобный регион фермента, что значительно повышает растворимость гетерокомплекса [17, 20, 26]. В отсутствие гомолога TRMT112 метилаза дрожжей MTQ2 (от MethylTransferase glutamine(Q), ортолог НЕМК2) образует нерастворимые агрегаты [26]. В культурах клеток млекопитающих нокдаун *TRMT112* не ведет к резкому уменьшению количества НЕМК2, как в случае другого ее партнера – WBSCR22 [29]. Однако в клетках дрожжей нокдаун гомолога *TRMT112* уменьшает количество MTQ2, снижая, вероятно, ее стабильность [30].

Ген *HEMK2* человека, расположенный на хромосоме 21, кодирует как функциональную полноразмерную изоформу НЕМК2 $\alpha$ , так и нефункциональную изоформу НЕМК2 $\beta$ , в которой отсутствует NPPY-мотив. Обе эти изоформы транскрибируются [1, 29, 31]. Однако нефункциональная изоформа НЕМК2 $\beta$  не способна взаимодействовать с TRMT112 [29]. Клетки мыши также содержат PRED28 $\alpha$  и PRED28 $\beta$  (ортологи НЕМК2 $\alpha$  и НЕМК2 $\beta$  соответственно) [31]. Локализация гена стала причиной появления альтернативного названия НЕМК2 – C21orf127 (Chromosome 21 Open Reading Frame 127).

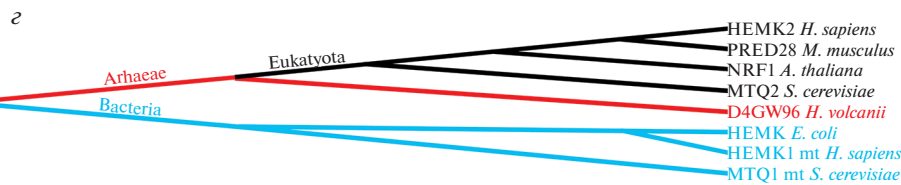
Данные о внутриклеточной локализации белка противоречивы. Методом иммуноокрашивания показана ядерная локализация PRED28 $\alpha$  и PRED28 $\beta$  мыши [31]. На основании этих данных в базе Uniprot (идентификационный номер Q9Y5N5, дата обращения 23.11.2021) по аналогии также указана ядерная локализация НЕМК2 человека. Однако с помощью измерения флуоресценции слитого с GFP белка NRF1 арабидопсиса (ортолог НЕМК2) удалось обнаружить лишь в цитоплазме, но не в ядрах клеток [32]. Можно предположить, что добавление GFP влияет на способность метилазы оставаться в ядре. Воз-

**Рис. 1.** Структуры НЕМК-подобных метилаз. На структуре и в последовательностях желтой линией выделен консервативный остаток пролина, зеленым показан консервативный глицин-богатый участок, фиолетовой линией – консервативный остаток аспартата кислой петли, красным – NPPY-мотив. а – Обобщенная схема функционального домена НЕМК-подобных метилаз, образованного семью  $\beta$ -тяжами (обозначены оранжевым цветом), которые расположены в одной плоскости и окружены с двух сторон  $\alpha$ -спиралями (выделены синим), по данным [16, 19]. б – Структуры функционального домена НЕМК бактерии *E. coli* [22] (PDB: 1T43) и НЕМК2 человека [2] (PDB: 6H1E). Структуры визуализированы с помощью BioRender.com. в – Сравнение аминокислотных последовательностей НЕМК-подобных метилаз. Идентичные, а также сильно и слабо сходные по свойствам остатки выделены темно-серым, серым и светло-серым цветами соответственно. г – Дерево сходства последовательностей НЕМК-подобных метилаз. Голубым выделены бактериальные и митохондриальные НЕМК-подобные метилазы, красным – архейные, черным эукариотические.



6

HEMK2 <i>H. sapiens</i>	1	-----
PRED28 <i>M. musculus</i>	1	-----
MTQ2 <i>S. cerevisiae</i>	1	-----
NRF1 <i>A. thaliana</i>	1	-----
D4GW96 <i>H. volcanii</i>	1	-----
HEMK1 mt <i>H. sapiens</i>	1	MELWGRMLWALLSGPGRGSTRGWAFSSWQPPLAGLSSAIELVSHWTGVF--EKRGLP
MTQ1 mt <i>S. cerevisiae</i>	1	-----MP-----RISTSLIRKAS
HEMK <i>E. coli</i>	1	-----ME-----YQHWLREAISQLQASE
HEMK2 <i>H. sapiens</i>	1	-----MAGE-----
PRED28 <i>M. musculus</i>	1	-----MAAP-----
MTQ2 <i>S. cerevisiae</i>	1	-----
NRF1 <i>A. thaliana</i>	1	-----MADQGLEESNPMDSLKHPGGIVPTPH
D4GW96 <i>H. volcanii</i>	1	-----
HEMK1 mt <i>H. sapiens</i>	59	EARESSEYIVAVHLGAKTFQSLRPAWLT--QPLTSQQLQCIRESLSSRRLQRMVPVQ----
MTQ1 mt <i>S. cerevisiae</i>	14	RIRPGLHLLPECRTL--EQAKLEYKWLTEELP--PKSIRWACLQRVKHVPVLPQ-----
HEMK <i>E. coli</i>	19	SPRRDAEILLEHVTGRGRTF--ILAFGE-TQLTDEQCQLDALLTRRRDGEPIA-----
HEMK2 <i>H. sapiens</i>	5	----NFAT-PFHGHVGRGAFSDVYEPAEDTFLLLDALEAAAAELA-----GVEICLEV
PRED28 <i>M. musculus</i>	5	----SVPT-PLYGHVGRGAFRDVYEPAEDTFLLLDALEAAAAELA-----GVEICLEV
MTQ2 <i>S. cerevisiae</i>	1	----MLPT-P----YVKCDYDKVYEPAEDSFLILDCELEKHDPLK-QKFGNRLAIVCEI
NRF1 <i>A. thaliana</i>	27	SQVIYKMP--RIAAIRLVSSHREVEECDDSFALVDALLADRNLNLI-----EHNPKICMEI
D4GW96 <i>H. volcanii</i>	1	----MT-D--LAERRGMNTSVYQPAEDSGLLAQAAV-----GRVSGRVLV
HEMK1 mt <i>H. sapiens</i>	112	----YILGEWDFQGLSL-RMVPVVFIRPTEELVEWVLEEVQQRSHAVGSPGSPILILEV
MTQ1 mt <i>S. cerevisiae</i>	64	----YILRSQPFGALDI-VCKPGVLIERWETEEMVMAIIRALNNS-MLSRHTIPLHICDT
HEMK <i>E. coli</i>	70	----HLTGVREFWSLPL-FVSPATLIERPDETCLEVEQALARLPEQ-----PCRILD
HEMK2 <i>H. sapiens</i>	53	GSGSGVVSAPFLASM---IGPQALYMCIDINPEAACTLETARCNKV---HIQPVITDLV
PRED28 <i>M. musculus</i>	53	GAGSGVVSAPFLASM---IGPRALYMCIDINPEAACTLETARCNV---HVQPVITDLV
MTQ2 <i>S. cerevisiae</i>	50	GSGSGIVTTFIMQNKIIPQENSIHLAVDINPWALEATLDTAKLNSCK--SSFLEVIQADLN
NRF1 <i>A. thaliana</i>	82	GCGSGVYITSLILLQNEVPGVHYLAIDTNPITRVTKETLEAHGV---NADVICADLA
D4GW96 <i>H. volcanii</i>	40	GTGSGWVAEQATK----TDADVVASDLNPHACRQAAERAAALRADGHRGFEVVRGSL-
HEMK1 mt <i>H. sapiens</i>	167	GCGSCAISLSLSQ----LQSRVIAVDKREAAISLTHENAQRRLQDRIWIHLDMTSE
MTQ1 mt <i>S. cerevisiae</i>	118	FTGTGCTALALSHG----IANCTFAIDVSTRAIKLVKENMLKNKVSGLLVQH-NILSS
HEMK <i>E. coli</i>	117	GTGTGALALALASE----RPDCEIIVDRMPDAVSLAQRNAQHAIKNIH-----ILQS
HEMK2 <i>H. sapiens</i>	106	KGLLPRLTEKVDLLVFNPPYVVTTP--QEVGSHG----IEAAWAGGRNGREVMDRFFPL
PRED28 <i>M. musculus</i>	106	HGLLPRLLKGVVLLVFNPPYVVTTP--EEVGSRG----IEAAWAGGRNGREVMDRFFPL
MTQ2 <i>S. cerevisiae</i>	109	SSI---RNNQVDVLIFFNPPYVPAECVPDVPGRSEADQWLDLALLGGKDGMAITDKLLRQ
NRF1 <i>A. thaliana</i>	138	TGLEKRLAGSVDVIVVFNPPYVTPPE--YEVGMEG----IASAWAGGNGERTVIDKLLPV
D4GW96 <i>H. volcanii</i>	94	--VEFFRDADFADAVFNPPYLPEDL-----EAARDWMEVALTGEGDGREIIDPFLOT
HEMK1 mt <i>H. sapiens</i>	223	RSWTHLPWGFMDLIVSNPPYVFHQDMEQL-APEI-RSYEDPAALDGGEGMDIITHIAL
MTQ1 mt <i>S. cerevisiae</i>	173	KASDE-YPSHIDILTGNPPYIRKRDVFNDRVKTSTV-KLFEPRLALVGELECYINLVN---
HEMK <i>E. coli</i>	167	DWFSALAGQQFAMIVSNPPYIDEQDPHLQ-QGDV--RFEPLTALVAADSGMADIVHITIQ
HEMK2 <i>H. sapiens</i>	159	VPDLSRGLFYLVTKENNPPEELKIM--KTRGLQGT---TALSROAGQETLSVLKFTK
PRED28 <i>M. musculus</i>	159	APELLSRGLFYLVTKENNPPEELFKTM--KTRGLQGT---TALCROAGQETLSVLRFSK
MTQ2 <i>S. cerevisiae</i>	166	LEQIISPDGVAYILFCARNKPKVIRKRV-DTYKWNVK---LIETRKAGWEVLSVYSFTR
NRF1 <i>A. thaliana</i>	191	VDLLSEKQWFLVLTLSNFPAAELCLMM--RKKGYASR---IVVQRSTEENLVILKFWR
D4GW96 <i>H. volcanii</i>	145	VGRVLPKPGCTVFLVSSFTGYDEVLARA--EANGFGHE---VVVQESYPYETLTVLAL-
HEMK1 mt <i>H. sapiens</i>	281	APRLKDSGSI FLEVDPHP--ELVSSWLQSRPDLNLN---VAVRRDFCGRPFLHRRS
MTQ1 mt <i>S. cerevisiae</i>	227	--YWLPKTDSFFYEIGDVEQFNVVERR--IKEDSYLSRISIGLKYDSNGKARVVYGFKA
HEMK <i>E. coli</i>	224	SRNAIVSGFLLLEHGQQG--EAVRQAFIL--AGYHD---VETCRDYGDNERTVTLGRYY
HEMK2 <i>H. sapiens</i>	214	S-----
PRED28 <i>M. musculus</i>	214	S-----
MTQ2 <i>S. cerevisiae</i>	222	-----
NRF1 <i>A. thaliana</i>	246	DKDEESQDKETSSSSVFSQFSKLSLMEKQWR
D4GW96 <i>H. volcanii</i>	199	-----
HEMK1 mt <i>H. sapiens</i>	337	GP-----
MTQ1 mt <i>S. cerevisiae</i>	283	TPKGRILHQIFASFGTIRHLATALSGHKANC-N
HEMK <i>E. coli</i>	277	Q-----



можно, что локализация метилазы изменяется под действием неких факторов, которые не детектировались в исследованиях. Возможно, что внутриклеточная локализация ортологов в различных организмах не консервативна. Кроме того, предполагается, что малая молекулярная масса метилазы не должна затруднять ее перемещение между ядром и цитоплазмой, и фермент может локализоваться и в ядре, и в цитоплазме [31]. При этом НЕМК1 человека, сходная с бактериальным ферментом, ожидаемо локализуется в митохондриях [13].

## ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ НЕМК-ПОДОБНЫХ МЕТИЛАЗ

### *НЕМК-подобные метилазы бактерий*

Скрининг профиля экспрессии мутантов *E. coli* с нокаутом *НЕМК* предсказывает влияние метилазы на экспрессию 3275 генов. В частности, нокаут *НЕМК* приводит к подавлению экспрессии генов, связанных с аэробным дыханием, но активирует экспрессию генов анаэробного дыхания. Однако нокаут *НЕМК* не влияет на уровень экспрессии фактора терминации RF1 [12] несмотря на то, что кодирующие их гены находятся в одном опероне [10, 14]. Но сверхэкспрессия *НЕМК* супрессирует токсичность, вызванную сверхэкспрессией гена, кодирующего фактор терминации трансляции RF2, что можно рассматривать как доказательство влияния *НЕМК* на RF2 [10]. Кроме того, у бактерий с нокаутом *НЕМК* повышена частота сквозного прочтения на стоп-кодонах UAG и UGA [12, 33]. Такие бактерии плохо растут на богатой среде и совсем не растут на бедной среде [10, 33]. Мутации и делеции гена *НЕМК* в штамме EC958 *E. coli* (подгруппа штамма ST121) вызывают повышение экспрессии генов, связанных с бактериальным жгутиком (флагеллой) и увеличение количества жгутиков, что ведет к увеличению ее подвижности. Комплементация мутаций и делеций этого гена приводят к восстановлению дикого типа клеток [34].

### *НЕМК-подобные метилазы эукариот и архей*

Обнаружено, что ген *НЕМК2* человека, а также его ортологи у эукариот и архей связаны со множеством физиологических процессов, а его присутствие необходимо для нормального роста и развития клеток различных эукариот и архей и устойчивости в различных стрессовых условиях.

Так, у архей *Haloferax volcanii* нокаут по гену, кодирующему ортолог *НЕМК2*, увеличивает в 2 раза время, необходимое для одного раунда деления клеток, и приводит к уменьшению размера колоний [3].

Нокаут гена *MTQ2*, кодирующего цитозольный/ядерный дрожжевой ортолог *НЕМК2*, а равно внесение в него точечных мутаций, инактивирующих метилирующую активность, приводит к замедлению роста на стандартных средах, повышению чувствительности к падению температуры, высоким концентрациям солей, кальция, кофеина, а также к антибиотикам паромомицину, генетицину (регулируют трансляцию) и полимиксин-β-сульфату (влияет на синтез триглицеридов) [4, 21]. Показано, что *MTQ2* ассоциирован с 60S субъединицами рибосом и, вероятно, является фактором их экспорта из ядра. Нокаут гена *MTQ2* или его мутация, вызывающие потерю связывания белка с SAM или белковым субстратом, приводит к нарушению биогенеза 60S рибосом и “застреванию” предшественников 60S субъединиц в ядре. Также метилаза стимулирует созревание 5.8S и 25S рРНК у дрожжей [21] (рис. 2). Более того, отдельно показано, что дрожжевой гомолог TRMT112 необходим для биогенеза обеих субъединиц рибосом [30].

В клетках дрожжей нокаут митохондриального гена *MTQ1*, кодирующего ортолог *НЕМК1*, не приводит к замедлению роста на стандартных средах, однако замедляет его при росте на средах с неферментируемыми источниками углерода, спиртами, а также повышает эффективность сквозного прочтения стоп-кодонов [4].

Ген, кодирующий NRF1 (ортолог *НЕМК2*), экспрессируется во всех тканях цветкового растения *Arabidopsis thaliana*. Нокаут этого гена приводит к замедлению роста, уменьшению размеров и гиперчувствительности к дефициту железа. Последнее согласуется с тем, что функциональный белок NRF1 необходим для экспрессии большинства генов, индуцируемых недостатком железа, с чем и связано его название (Non-response To Fe-Deficiency 1). Более того, по данным Ribo-Seq нокаут метилазы NRF1 приводит к “зависанию” рибосом около стоп-кодона [32].

Показано, что ортолог *НЕМК2* активно экспрессируется в нервной системе круглого червя *Caenorhabditis elegans* [35]. Этот ген необходим для высвобождения ацетилхолина холинергическими нейронами. У мутантных по данному гену червей нарушены паттерны поведения, кроме того, они менее чувствительны к ингибиторам холинэстераз [35].

Нокаут ортологов генов *НЕМК1* и *НЕМК2* дрожзофилы подавляет деление стволовых клеток кишечника, но не энтероцитов [36].

Ген *НЕМК2* человека и его мышинный ортолог экспрессируются во всех тканях, но данные по относительному уровню экспрессии в разных органах противоречивы [8, 31, 37]. Также показано, что сверхэкспрессия *НЕМК2* и его ортологов обеспечивает устойчивость клеток человека и



**Таблица 1.** Функции НЕМК2 человека и ее ортологов

Функция	Организм	Комментарий	Ссылка
Метилирование остатка глутамина (Q) в факторах терминации трансляции I класса	Бактерии, археи, эукариоты		[4–7, 10–12, 43, 45, 46]
Метилирование остатка глутамина (Q) в факторах ремоделирования хроматина CHD5, NUT	Человек		[20, 45]
Метилирование остатка глутамина (Q) около 50 иных белков-кандидатов, в том числе участвующих в процессах трансляции (RRP1) и сигналинга (TGFB3, ARHGEF10)	Человек	Только биоинформатическое предсказание по аминокислотной последовательности оптимального сайта метилирования [45]	[45]
Метилирование остатка лизина (K) в гистоне H4	Человек		[2, 20]
Метилирование монометиларсенита	Человек, дрожжи	Физиологическое значение не установлено	[8, 27]
Метилирование неорганического трехвалентного арсенита	Дрожжи		[8, 27]
Метилирование остатка дезоксиаденозина	Человек	Подвергается сомнению [7, 22, 31]	[9]
Связывание хроматина в промоторных областях	Человек		[2]
Связывание и влияние на созревание 60S субъединицы	Дрожжи	Не ясна связь с процессом метилирования eRF1, которую обсуждают в [21]	[21]
Влияние на созревание 5.8S и 25S рРНК	Дрожжи	Механизм не показан, только констатация фенотипа мутантов [21]	[21]

ния пептидов, в которых присутствовал каждый возможный аминокислотный остаток в каждом положении от  $-6$  до  $+7$ , по сравнению с последовательностью дикого типа. Так, в положении  $+1$  наблюдается предпочтение остатков серина (S), аргинина (R) и глицина (G), а в  $+7$  – остатка аргинина (R). Эти результаты получены на коротких пептидах [20, 45]. Предполагается, что такое метилирование глутамина необратимо [46].

Наиболее изученным и универсальным субстратом всех НЕМК-подобных метилаз является остаток глутамина в составе ультраконсервативного GGQ-мотива факторов терминации трансляции класса I (RF1, RF2 бактерий, aRF1 архей, митохондриальных mRF (mtRF) и цитоплазматического eRF1 эукариот). Показано, что этот остаток метилирован почти в 100% RF1 и RF2 *E. coli* [12, 43], в 50% митохондриального mRF1 дрожжей [4] и 50–75% цитоплазматических eRF1 дрожжей и человека [6, 39]. Однако в митохондриях человека митохондриальные факторы терминации трансляции и их производные метилированы на уровне всего нескольких процентов [13] (табл. 1, рис. 2).

НЕМК 2 метилирует также CHD5 и NUT, участвующие в ремоделировании хроматина и развитии рака [20, 45] (табл. 1, рис. 2). Анализ доменов белков выявил еще девять потенциальных белков-субстратов НЕМК2, в том числе участвующих в процессах трансляции (RRP1) и сигналинга (TGFB3, ARHGEF10). На возможность метилирования еще более 50 белков указывает анализ биоинформатических данных [45] (табл. 1, рис. 2).

Метилирование бактериальных RF1 и RF2 повышает константу гидролиза пептидил-тРНК ( $k_{cat}$ ) на всех трех стоп-кодонах в 1.1–450 раз [43, 47–50], особенно сильно при гидролизе пептидил-тРНК, оканчивающихся остатками пролина (P) или глицина (G). У *E. coli* найдено 119 и 279 таких белков соответственно; их трансляция может быть наиболее чувствительной к метилированию [47]. Разница в значениях  $k_{cat}$  метилированной и неметилированной форм максимальна при кислых значениях pH (6–7) и минимальна при щелочных (7.0–8.5) [50]. Метилирование обуславливает также увеличение коэффициента специфичности гидролиза пептидил-тРНК ( $k_{cat}/K_M$ ) с участием факторов терминации в 2–14 раз [43, 48, 49]. Интересно, что

различие в значениях  $k_{cat}$  и  $k_{cat}/K_M$  у неметилованных и метилированных форм снижается при увеличении длины пептида в *in vitro* системе [43]. Метилирование RF2 повышает также уровень гидролиза пептидил-тРНК при независимой от стоп-кодона терминации с участием ArfA/RF2 в 20 раз [48, 49]. Однако отсутствие функциональной митохондриальной HEMK1 не оказывает явного влияния на трансляцию белка в митохондриях [13], однако и уровень метилирования митохондриальных факторов значительно меньше, чем у бактерий (несколько процентов против почти 100%) [12, 13, 43].

Рентгеноструктурный анализ как бактериальных [49], так и эукариотических [51] комплексов рибосомы и факторов терминации, а также докинг бактериальных комплексов *in silico* [52] показывают, что метилирование остатка глутамин фактора терминации стабилизирует положение этого остатка и особенно его боковой группы, которая иначе не имеет фиксированного положения, что приводит к облегчению атаки на молекулу воды [49]. Показано также, что метилирование эукариотического eRF1 не влияет на конформацию свободной молекулы белка [53]. Для эффективного метилирования эукариотический eRF1 и архейный aRF1 должны находиться в составе тройного комплекса с GTP и eRF3 (или aRF3=aEF1 $\alpha$ ), а сама метилаза – в гетерокомплексе с TRMT112 [1, 3, 6, 21, 26].

Предполагается, что процесс метилирования eRF1 в ядре с помощью дрожжевого MTQ2, ассоциированного с созревающими 60S субъединицами, может служить частью системы контроля качества рибосом [21].

На молекулярном уровне влияние метилирования eRF1 на его функционирование не показано. Известно лишь, что при нокауте NRF1 арабидопсиса происходит зависание рибосом в районе стоп-кодона, что может указывать на неэффективную терминацию трансляции в отсутствие метилирования eRF1 [32]. Обсуждается также возможность того, что отсутствие холодоустойчивости у клеток дрожжей с нокаутом MTQ2 может быть связано с нарушениями аппарата трансляции [4].

Не обнаружено кросс-реактивности между бактериальными и эукариотическими/архейными HEMK-подобными метилазами. Показано, что HEMK *E. coli* не способна метилировать eRF1, в том числе в присутствии eRF3 и GTP [6]. Однако различные эукариотические ортологи HEMK2 частично кросс-реактивны: в частности, HEMK2 человека эффективно метилирует eRF1 дрожжей и, наоборот, MTQ2 дрожжей эффективно метилирует eRF1 человека [1, 6].

#### Остаток лизина в гистоне H4

Комплекс HEMK2–TRMT112 осуществляет монометилирование остатка лизина 12 в гистоне H4 (H4K12), что подтверждено как *in vitro*, так и *in vivo*. Это привело к появлению альтернативного названия HEMK2 – KMT9 (от Lysine (K) N-methyltransferase 9). В культурах клеток человека доля монометилированного гистона H4 составляет 0.04–0.12%, что сравнимо с долей иных модификаций гистоновых белков *in vivo* [2]. Метилирование остатков лизина и глутамин происходит в одном и том же активном центре, более того, метилируемый атом азота в обоих случаях расположен практически в одном и том же месте. Однако различаются некоторые аминокислотные остатки метилазы, важные для связывания, а также позиционирование белковой цепи субстрата. К примеру, HEMK2 с мутацией Y125A в NPPY-мотиве способна метилировать гистон H4, но не eRF1 [2, 20]. При этом, в отличие от eRF1, связывание гистона H4 происходит лишь в присутствии второго субстрата – SAM [2]. При pH 8.0 HEMK2–TRMT112 метилирует гистон H4 *in vitro* значительно хуже, чем eRF1. Эффективность метилирования остатка лизина повышается при защелачивании реакционной смеси вследствие депротонирования аминогруппы [7].

Этой модификацией остатка лизина гистона H4 обогащены промоторы генов, связанных с регуляцией клеточного цикла. Считается, что именно нарушение монометилирования H4K12 приводит к развитию рака предстательной железы при нарушении нормальной экспрессии HEMK2 [2].

#### Соединения мышьяка

Соединения мышьяка токсичны для человека, они вызывают развитие рака, болезней нервной, эндокринной, сердечно-сосудистой, дыхательной, пищеварительной, половой и выделительной систем. Предполагается, что они участвуют в повреждении молекул ДНК, изменении профиля репарации и метилирования, хромосомных перестройках, нарушении клеточного цикла. В организме неорганические арсенаты восстанавливаются до трехвалентного состояния (арсениты) и подвергаются моно- и диметилированию. При этом физиологическая роль данного процесса окончательно не ясна и остается дискуссионной, так как метилированные арсениты считаются более токсичными, чем неметилованные [54, 55].

В клетках человека метилирование трехвалентного неорганического арсенита до моно- и диметильных производных осуществляется специализированной метилазой AS3MT [54], HEMK2 же участвует лишь в метилировании наиболее токсичного монометиларсенита до диметиларсенита (табл. 1, рис. 2). Уровень экспрессии AS3MT в

клетках человека значительно выше, чем *HEMK2* [8]. Показано, что сверхэкспрессия *HEMK2* обеспечивает устойчивость клеточной культуры UROtsa человека к неорганическому арсениту и монометиларсениту [8]. На подобную функцию *in vivo* указывает корреляция между различными полиморфизмами *HEMK2* и содержанием монометиларсенита в выделениях жительниц Аргентинских Анд [56]. Предполагается, что *HEMK2* может метилировать монометиларсенит параллельно с AS3MT, что функционально значимо только при определенных условиях или в определенных тканях [8].

В отличие от *HEMK2* человека, *MTQ2* дрожжей метилирует не только монометиларсенит, но и неорганический трехвалентный арсенит с образованием монометиларсенита, что ведет к активации *Hog1* в *NOG*-сигнальном пути (табл. 1). Это, по-видимому, блокирует возможность дальнейшего проникновения соединений мышьяка в клетку. Нокаут гена данного фермента повышает устойчивость дрожжей к неорганическому арсениту, но не к монометиларсениту. Для нормального функционирования в данном процессе метилаза должна находиться в комплексе с *TRMT112* [8, 27].

#### Остаток дезоксиаденозина в ДНК

$N^6$ -метил-2'-дезоксиаденозин (6mA) — распространенная модификация остатка дезоксиаденозина в ДНК бактерий, связанная с функционированием систем рестрикции-модификации, репарации, репликации и сегрегации хромосом. В ДНК различных групп эукариот в последнее время также выявляют 6mA, уровень которого значительно ниже, чем у прокариот. Показано, что эта модификация может участвовать в регуляции хроматина, активации и подавлении экспрессии генов, в процессах эмбрионального развития. При этом физиологическая роль 6mA и его доля в различных группах эукариот отличаются. Наименьшая доля (порядка  $10^{-2}$ – $10^{-4}$ %) характерна для позвоночных [9, 57–59]. Стоит отметить, что остаток аденозина в РНК бактерий и эукариот также подвергаются этой модификации, что важно для функционирования многих тРНК и рРНК, но данный процесс осуществляют иные ферменты [60].

$N^6$ -метилирование дезоксиаденозина в ДНК эукариот катализируют разные ферменты. Согласно биоинформатическим данным, метилазы  $N^6$ -аденозина и  $N^6$ -дезоксиаденозина независимо появлялись в разных группах эукариот не менее 13 раз [58].

Предполагается, что в метилировании остатка дезоксиаденозина до 6mA в ДНК инфузорий, дрожифил, зеленых водорослей участвуют *MTA70*-по-

добные метилазы. У зеленых водорослей в этом могут участвовать и *Dams*-подобные метилазы [58]. Найдена и описана *MTA70*-подобная метилаза *DAMT-1*, катализирующая эту реакцию у *C. elegans* [61]. Однако у человека фермент, метилирующий остаток дезоксиаденозина до 6mA, не обнаружен. Предполагается, что эту реакцию может осуществлять *HEMK2* (табл. 1, рис. 2). Во-первых, *HEMK*-подобные метилазы по структуре своего функционального домена близки к группе  $\gamma$   $N^6$ -аденин-ДНК-метилаз [62]. Во-вторых, по некоторым данным, *HEMK2*, содержащая *NPY*-мотив, необходима для появления 6mA в ДНК *in vivo* и *in vitro* [9]. Доля 6mA в геномной ДНК человека положительно коррелирует с уровнем экспрессии *HEMK2*, а их уровень понижен в опухолевых клетках. Обратные эффекты вызывает деметилаза *ALKBH1*. Доля 6mA в образцах крови человека составляет около 0.056%. Большая абсолютная доля метилирования приходится на межгенные участки, а относительная — на экзоны [9]. Исходя из этого, *HEMK2* имеет еще одно (альтернативное) название — *N6AMT1* (от  $N^6$  Adenine-Specific DNA Methyltransferase 1).

Однако эти данные не подтверждены результатами других исследователей. Так обнаружено, что идентичный натуральному (свободный от тагов и дополнительных аминокислот) рекомбинантный *HEMK2*–*TRMT112*, полученный в клетках *E. coli*, способен метилировать как остаток глутамина в *eRF1*, так и остаток лизина в гистоне H4, но не мог метилировать остаток дезоксиаденозина в ДНК [7]. Это согласуется с данными, также не подтверждающими возможность *HEMK2* катализировать реакцию метилирования остатка дезоксиаденозина [22, 31]. Кроме того, известен и другой потенциальный кандидат на роль метилазы остатка дезоксиаденозина — *METL-4* — гомолог метилазы *DAMT-1* *C. elegans* [58]. Таким образом, функция метилирования остатка дезоксиаденозина в ДНК с помощью *HEMK2* остается спорной.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя все имеющиеся на сегодняшний момент данные, можно заключить, что *HEMK2* человека и ее ортологи у других эукариот и архей представляет собой необычный пример многофункциональной метилазы, катализирующей несколько различных реакций. Обычно многофункциональность фермента достигается за счет нескольких структурно обособленных доменов, каждый из которых катализирует собственную реакцию, аллостерически контролирует другой домен или взаимодействует с клеточным окружением, как это происходит у белков, обладающих дополнительными (moonlighting) функциями [63–66]. Однако известны и многофункциональные ферменты, в которых один и тот же домен (и даже один актив-



ный сайт) в зависимости от условий может катализировать несколько различных реакций, как это наблюдается у неразборчивых (promiscuous) ферментов. Часть этих реакций, вероятно, побочные, но другая часть может иметь физиологическое значение [65, 67–69]. HEMK2 можно отнести как раз к неразборчивым ферментам. Несмотря на то, что не ясно, насколько физиологически равнозначны реакции метилирования ее многочисленных субстратов, делаются попытки разработать цельную модель физиологической функции HEMK2 и ее эукариотических ортологов. Предложена модель, в которой SAM, в том числе через HEMK1 и HEMK2, служит основным регулятором трансляции в стволовых клетках кишечника, что влияет на активность их деления [36].

Не до конца понятен точный спектр субстратов HEMK2 и ее ортологов. Так, спорным выглядит метилирование ими остатка дезоксиаденозина [7, 22, 31]. Напротив, можно ожидать, что HEMK2 способна метилировать аспарагин так же, как глутамин. Обнаружено N-4-метилирование аспарагина в C-фикоцианине *Anabaena variabilis*. При этом остаток аспарагина находится после двух остатков глицина (GGN), что напоминает метилируемый мотив GGQ в факторах терминации. Замена аспарагина на глутамин приводит к *in vivo* метилированию глутамина, поэтому было выдвинуто предположение, что либо метилазы, осуществляющие данную реакцию, способны использовать в качестве субстрата оба аминокислотных остатка, либо за это ответственны два разных фермента [70, 71]. Однако показано, что HEMK2 не способна метилировать пептид, содержащий такую замену [45]. Таким образом, метилирование аспарагина в GGN-мотиве осуществляют, вероятно, близкие гомологи HEMK2.

HEMK2 это многофункциональный фермент, поэтому нельзя однозначно связать физиологические эффекты, вызываемые их нокаутом и нокдауном, с метилированием конкретных молекул, так как механистическую роль одновременного метилирования всех субстратов HEMK2 и ее ортологов до настоящего времени не изучали. Для того, чтобы научиться адресно контролировать процессы, зависящие от метилируемых молекул, требуется тщательное изучение механизмов модификации каждого субстрата на молекулярном уровне.

Помимо влияния на эффективность трансляции посредством метилирования eRF1, MTQ2 (дрожжевой ортолог HEMK2) участвует в биогенезе и экспорте созревших 60S субъединиц из ядра, а также в созревании 5.8S и 25S рРНК. Однако не очень понятно, почему такая функция ортолога связана с присутствием в нем отдельных аминокислот, участвующих в метилировании. Предполагается, что либо для правильного биогенеза 60S субъединиц и рРНК необходима проверка ка-

чества собранных рибосом с участием метилированного eRF1, либо в этот процесс вовлечены иные субстраты метилазы [21]. Также можно предположить, что эти аминокислотные остатки важны для поддержания правильной структуры метилазы, необходимой для ее функционирования в процессе созревания 60S субъединиц рибосомы. Остается непонятным, насколько этот процесс консервативен и касается других групп живых существ, включая человека.

Известно также, что некоторые факторы трансляции выполняют многочисленные функции вне трансляции. К примеру, eEF1 $\alpha$  слизевика *Dictyostelium* может связывать и модулировать актин [72, 73], eEF1 $\alpha$  человека и лягушки – связывать и участвовать в разрывании микротрубочек [74], растительный eEF1 $\alpha$  – активировать фосфатидилинозитол-4-киназу [75]. А изучение дрожжей, мутантных по факторам терминации трансляции eRF1 и eRF3, указывает на то, что их нормальное функционирование связано не только непосредственно с осуществлением терминации, но и с многочисленными клеточными процессами [76]. Все это поднимает вопрос о значении взаимного влияния процесса терминации и иных клеточных процессов, в том числе и у рассматриваемых HEMK-подобных метилаз.

Мы предполагаем, что комплекс HEMK2–TRMT112 активен как в цитоплазме, где он метилирует монометиларсенит и eRF1, так и в ядре, где метилирует гистон H4, регуляторы хроматина CHD5 и NUT. В ядре этот комплекс может регулировать созревание рРНК и 60S субъединиц по аналогии с дрожжами. Более того, HEMK2 может быть вовлечена в метилирование ДНК. Однако множество аспектов этого процесса остаются не раскрытыми. В частности, не ясно, каким образом происходит и как регулируется транспорт HEMK2, TRMT112 или их комплекса через ядерную мембрану (табл. 1, рис. 2).

Работа по анализу влияния HEMK-подобных метилаз на терминацию трансляции проведена при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 14-14-00487), физиологическое значение HEMK-подобных метилаз изучали при поддержке гранта Российского научного фонда (19-14-00349).

В настоящей работе не использовали людей или животных в качестве объектов исследования

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Figaro S., Scrima N., Buckingham R.H., Heurgué-Hamard V. (2008) HemK2 protein, encoded on human chromosome 21, methylates translation termination factor eRF1. *FEBS Lett.* **582**, 2352–2356.

2. Metzger E., Wang S., Urban S., Willmann D., Schmidt A., Offermann A., Allen A., Sum M., Obier N., Cottard F., Ulferts S., Preca B.-T., Hermann B., Maurer J., Gerschik H., Hornung V., Einsle O., Perner S., Imhof A., Jung M., Schüle R. (2019) KMT9 monomethylates histone H4 lysine 12 and controls proliferation of prostate cancer cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 361–371.
3. van Tran N., Muller L., Ross R.L., Lestini R., Létoquart J., Ulryck N., Limbach P.A., de Crécy-Lagard V., Cianféroni S., Graille M. (2018) Evolutionary insights into Trm112-methyltransferase holoenzymes involved in translation between archaea and eukaryotes. *Nucl. Acids Res.* **46**, 8483–8499.
4. Polevoda B., Span L., Sherman F. (2006) The yeast translation release factors Mrf1p and Sup45p (eRF1) are methylated, respectively, by the methyltransferases Mtt1p and Mtt2p. *J. Biol. Chem.* **281**, 2562–2571.
5. Polevoda B., Sherman F. (2007) Methylation of proteins involved in translation. *Mol. Microbiol.* **65**, 590–606.
6. Heurgué-Hamard V., Champ S., Mora L., Merkoulova-Rainon T., Kisselev L.L., Buckingham R.H. (2005) The glutamine residue of the conserved GGQ motif in *Saccharomyces cerevisiae* release factor eRF1 is methylated by the product of the *YDR140w* gene. *J. Biol. Chem.* **280**, 2439–2445.
7. Woodcock C.B., Yu D., Zhang X., Cheng X. (2019) Human HemK2/KMT9/N6AMT1 is an active protein methyltransferase, but does not act on DNA *in vitro*, in the presence of Trm112. *Cell Discov.* **5**, 50.
8. Ren X., Aleshin M., Jo W.J., Dills R., Kalman D.A., Vulpe C.D., Smith M.T., Zhang L. (2011) Involvement of N-6 adenine-specific DNA methyltransferase 1 (N6AMT1) in arsenic biomethylation and its role in arsenic-induced toxicity. *Environ. Hlth Perspect.* **119**, 771–777.
9. Xiao C.-L., Zhu S., He M., Chen D., Zhang Q., Chen Y., Yu G., Liu J., Xie S.-Q., Luo F., Liang Z., Wang D.-P., Bo X.-C., Gu X.-F., Wang K., Yan G.-R. (2018) N6-methyladenine DNA modification in the human genome. *Mol. Cell.* **71**, 306–318.e7.
10. Heurgue-Hamard V. (2002) The *hemK* gene in *Escherichia coli* encodes the N5-glutamine methyltransferase that modifies peptide release factors. *EMBO J.* **21**, 769–778.
11. Ishizawa T., Nozaki Y., Ueda T., Takeuchi N. (2008) The human mitochondrial translation release factor HMRF1L is methylated in the GGQ motif by the methyltransferase HMPrmC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **373**, 99–103.
12. Nakahigashi K., Kubo N., Narita S., Shimaoka T., Goto S., Oshima T., Mori H., Maeda M., Wada C., Inokuchi H. (2002) HemK, a class of protein methyl transferase with similarity to DNA methyl transferases, methylates polypeptide chain release factors, and *hemK* knockout induces defects in translational termination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 1473–1478.
13. Fang Q., Kimura Y. (2021) Mammalian HEMK1 methylates glutamine residue of the GGQ motif of mitochondrial release factors. *Research Square.* 1–21. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1049003/v1>
14. Nakayashiki T., Nishimura K., Inokuchi H. (1995) Cloning and sequencing of a previously unidentified gene that is involved in the biosynthesis of heme in *Escherichia coli*. *Gene.* **153**, 67–70.
15. Sergiev P.V., Aleksashin N.A., Chugunova A.A., Polikanov Y.S., Dontsova O.A. (2018) Structural and evolutionary insights into ribosomal RNA methylation. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 226–235.
16. Schubert H.L., Phillips J.D., Hill C.P. (2003) Structures along the catalytic pathway of PrmC/HemK, an N5-glutamine AdoMet-dependent methyltransferase. *Biochemistry.* **42**, 5592–5599.
17. Liger D., Mora L., Lazar N., Figaro S., Henri J., Scrima N., Buckingham R.H., van Tilbeurgh H., Heurgué-Hamard V., Graille M. (2011) Mechanism of activation of methyltransferases involved in translation by the Trm112 ‘hub’ protein. *Nucl. Acids Res.* **39**, 6249–6259.
18. Martin J.L., McMillan F.M. (2002) SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 783–793.
19. Schubert H.L., Blumenthal R.M., Cheng X. (2003) Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 329–335.
20. Gao J., Wang B., Yu H., Wu G., Wan C., Liu W., Liao S., Cheng L., Zhu Z. (2020) Structural insight into HEMK2-TRMT112-mediated glutamine methylation. *Biochem. J.* **477**, 3833–3838.
21. Lacoux C., Wacheul L., Saraf K., Pythoud N., Huvelle E., Figaro S., Graille M., Carapito C., Lafontaine D.L.J., Heurgué-Hamard V. (2020) The catalytic activity of the translation termination factor methyltransferase Mtt2-Trm112 complex is required for large ribosomal subunit biogenesis. *Nucl. Acids Res.* **48**, 12310–12325.
22. Yang Z., Shipman L., Zhang M., Anton B.P., Roberts R.J., Cheng X. (2004) Structural characterization and comparative phylogenetic analysis of *Escherichia coli* HemK, a protein (N5)-glutamine methyltransferase. *J. Mol. Biol.* **340**, 695–706.
23. Holtkamp W., Kokic G., Jager M., Mittelstaet J., Komar A.A., Rodnina M.V. (2015) Cotranslational protein folding on the ribosome monitored in real time. *Science.* **350**, 1104–1107.
24. Mercier E., Rodnina M.V. (2018) Co-translational folding trajectory of the HemK helical domain. *Biochemistry.* **57**, 3460–3464.
25. Liutkute M., Maiti M., Samatova E., Enderlein J., Rodnina M.V. (2020) Gradual compaction of the nascent peptide during cotranslational folding on the ribosome. *ELife.* **9**, e60895.
26. Heurgué-Hamard V., Graille M., Scrima N., Ulryck N., Champ S., van Tilbeurgh H., Buckingham R.H. (2006) The zinc finger protein Ynr046w is plurifunctional and a component of the eRF1 methyltransferase in yeast. *J. Biol. Chem.* **281**, 36140–36148.
27. Lee J., Levin D.E. (2018) Intracellular mechanism by which arsenite activates the yeast stress MAPK Hog1. *Mol. Biol. Cell.* **29**, 1904–1915.
28. Bourgeois G., Létoquart J., van Tran N., Graille M. (2017) Trm112, a protein activator of methyltransferases modifying actors of the eukaryotic translational apparatus. *Biomolecules.* **7**, 7.

29. Leetsi L., Öunap K., Abroi A., Kurg R. (2019) The common partner of several methyltransferases TRMT112 regulates the expression of N6AMT1 isoforms in mammalian cells. *Biomolecules*. **9**, 422.
30. Sardana R., Johnson A.W. (2012) The methyltransferase adaptor protein Trm112 is involved in biogenesis of both ribosomal subunits. *Mol. Biol. Cell*. **23**, 4313–4322.
31. Ratel D., Ravanat J.-L., Charles M.-P., Platet N., Breuillaud L., Lunardi J., Berger F., Wion D. (2006) Undetectable levels of N6-methyl adenine in mouse DNA: cloning and analysis of *PRED28*, a gene coding for a putative mammalian DNA adenine methyltransferase. *FEBS Lett*. **580**, 3179–3184.
32. Kailasam S., Singh S., Liu M., Lin C., Yeh K. (2020) A HemK class glutamine-methyltransferase is involved in the termination of translation and essential for iron homeostasis in *Arabidopsis*. *New Phytol*. **226**, 1361–1374.
33. Mora L., Heurgué-Hamard V., de Zamaroczy M., Kervestin S., Buckingham R.H. (2007) Methylation of bacterial release factors RF1 and RF2 is required for normal translation termination *in vivo*. *J. Biol. Chem*. **282**, 35638–35645.
34. Kakkanat A., Phan M.-D., Lo A.W., Beatson S.A., Schembri M.A. (2017) Novel genes associated with enhanced motility of *Escherichia coli* ST131. *PLoS One*. **12**, e0176290.
35. Nordquist S.K., Smith S.R., Pierce J.T. (2018) Systematic functional characterization of human 21st chromosome orthologs in *Caenorhabditis elegans*. *G3 Genes Genomes Genet*. **8**, 967–979.
36. Obata F., Tsuda-Sakurai K., Yamazaki T., Nishio R., Nishimura K., Kimura M., Funakoshi M., Miura M. (2018) Nutritional control of stem cell division through S-adenosylmethionine in *Drosophila* intestine. *Dev. Cell*. **44**, 741–751.e3.
37. Fagerberg L., Hallström B.M., Oksvold P., Kampf C., Djureinovic D., Odeberg J., Habuka M., Tahmasebpour S., Danielsson A., Edlund K., Asplund A., Sjöstedt E., Lundberg E., Szgyarto C.A.-K., Skogs M., Takanen J.O., Berling H., Tegel H., Mulder J., Nilsson P., Schwenk J., Lindskog C., Danielsson F., Mardinoglu A., Sivertsson A., von Feilitzen K., Forsberg M., Zvalhen M., Olsson I., Navani S., Huss M., Nielsen J., Ponten F., Uhlén M. (2014) Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell. Proteom*. **13**, 397–406.
38. Arroyo J.D., Jourdain A.A., Calvo S.E., Ballarano C.A., Doench J.G., Root D.E., Mootha V.K. (2016) A genome-wide CRISPR death screen identifies genes essential for oxidative phosphorylation. *Cell Metabolism*. **24**, 875–885.
39. Liu P., Nie S., Li B., Yang Z.-Q., Xu Z.-M., Fei J., Lin C., Zeng R., Xu G.-L. (2010) Deficiency in a glutamine-specific methyltransferase for release factor causes mouse embryonic lethality. *Mol. Cell. Biol*. **30**, 4245–4253.
40. Liang B., Shao Y., Long F., Jiang S.-J. (2016) Predicting diagnostic gene biomarkers for non-small-cell lung cancer. *BioMed Res. Internat*. **2016**, 1–8.
41. Spitali P., Hettne K., Tsonaka R., Charrout M., van den Bergen J., Koeks Z., Kan H.E., Hooijmans M.T., Roos A., Straub V., Muntoni F., Al-Khalili-Szigyarto C., Koel-Simmelink M.J.A., Teunissen C.E., Lochmüller H., Niks E.H., Aartsma-Rus A. (2018) Tracking disease progression non-invasively in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *J. Cachexia, Sarcopenia Muscle*. **9**, 715–726.
42. Wagner P., Yin T., Brügemann K., Engel P., Weimann C., Schlez K., König S. (2021) Genome-wide associations for microscopic differential somatic cell count and specific mastitis pathogens in Holstein cows in compost-bedded pack and cubicle farming systems. *Animals*. **11**, 1839.
43. Dincbas-Renqvist V. (2000) A post-translational modification in the GGQ motif of RF2 from *Escherichia coli* stimulates termination of translation. *EMBO J*. **19**, 6900–6907.
44. Desai N., Yang H., Chandrasekaran V., Kazi R., Minczuk M., Ramakrishnan V. (2020) Elongational stalling activates mitoribosome-associated quality control. *Science*. **370**, 1105–1110.
45. Kusevic D., Kudithipudi S., Jeltsch A. (2016) Substrate specificity of the HEMK2 protein glutamine methyltransferase and identification of novel substrates. *J. Biol. Chem*. **291**, 6124–6133.
46. Schubert H.L. (2006) 14 modification of glutamine residues in proteins involved in translation. *Enzymes*. **24**, 437–453.
47. Pierson W.E., Hoffer E.D., Keedy H.E., Simms C.L., Dunham C.M., Zaher H.S. (2016) Uniformity of peptide release is maintained by methylation of release factors. *Cell Rep*. **17**, 11–18.
48. Zeng F., Jin H. (2016) Peptide release promoted by methylated RF2 and ArfA in nonstop translation is achieved by an induced-fit mechanism. *RNA*. **22**, 49–60.
49. Zeng F., Jin H. (2018) Conformation of methylated GGQ in the peptidyl transferase center during translation termination. *Sci. Rep*. **8**, 2349.
50. Indrisiunaite G., Pavlov M.Y., Heurgué-Hamard V., Ehrenberg M. (2015) On the pH dependence of class-1 RF-dependent termination of mRNA translation. *J. Mol. Biol*. **427**, 1848–1860.
51. Li W., Chang S.T.-L., Ward F.R., Cate J.H.D. (2020) Selective inhibition of human translation termination by a drug-like compound. *Nat. Commun*. **11**, 4941.
52. Trobro S., Åqvist J. (2007) A model for how ribosomal release factors induce peptidyl-tRNA cleavage in termination of protein synthesis. *Mol. Cell*. **27**, 758–766.
53. Andér M., Åqvist J. (2009) Does glutamine methylation affect the intrinsic conformation of the universally conserved GGQ motif in ribosomal release factors? *Biochemistry*. **48**, 3483–3489.
54. Thomas D.J., Li J., Waters S.B., Xing W., Adair B.M., Drobna Z., Devesa V., Styblo M. (2007) Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals. *Exp. Biol. Med*. **232**, 3–13.
55. Kapaj S., Peterson H., Liber K., Bhattacharya P. (2006) Human health effects from chronic arsenic poisoning – a review. *J. Env. Sci. Hlth. Part A*. **41**, 2399–2428.
56. Harari F., Engström K., Concha G., Colque G., Vahter M., Broberg K. (2013) N6-adenine-specific DNA methyltransferase 1 (N6AMT1) polymorphisms and

- arsenic methylation in Andean women. *Environ. Health Perspect.* **121**, 797–803.
57. Parashar N.C., Parashar G., Nayyar H., Sandhir R. (2018) N6-adenine DNA methylation demystified in eukaryotic genome: from biology to pathology. *Biochimie.* **144**, 56–62.
  58. Iyer L.M., Zhang D., Aravind L. (2016) Adenine methylation in eukaryotes: apprehending the complex evolutionary history and functional potential of an epigenetic modification. *BioEssays.* **38**, 27–40.
  59. Ratel D., Ravanat J.-L., Berger F., Wion D. (2006) N6-methyladenine: the other methylated base of DNA. *BioEssays.* **28**, 309–315.
  60. Sergiev P.V., Golovina A.Y., Osterman I.A., Nesterchuk M.V., Sergeeva O.V., Chugunova A.A., Evfratov S.A., Andreianova E.S., Pletnev P.I., Laptev I.G., Petriukov K.S., Navalayeu T.I., Koteliansky V.E., Bogdanov A.A., Dontsova O.A. (2016) N6-methylated adenosine in RNA: from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* **428**, 2134–2145.
  61. Greer E.L., Blanco M.A., Gu L., Sendinc E., Liu J., Aristizábal-Corrales D., Hsu C.-H., Aravind L., He C., Shi Y. (2015) DNA methylation on N6-adenine in *C. elegans*. *Cell.* **161**, 868–878.
  62. Bujnicki J.M., Radlinska M. (1999) Is the HemK family of putative S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases a “missing” zeta subfamily of adenine methyltransferases? A hypothesis. *Internat. Union Biochem. Mol. Biol. Life.* **48**, 247–249.
  63. Kirschner K., Bisswanger H. (1976) Multifunctional proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 143–166.
  64. Jeffery C.J. (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 8–11.
  65. Copley S. (2003) Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 265–272.
  66. Moore B.D. (2004) Bifunctional and moonlighting enzymes: lighting the way to regulatory control. *Trends Plant Sci.* **9**, 221–228.
  67. O’Brien P.J., Herschlag D. (1999) Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chem. Biol.* **6**, R91–R105.
  68. Hult K., Berglund P. (2007) Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends Biotechnol.* **25**, 231–238.
  69. Seelig B. (2017) Multifunctional enzymes from reduced genomes – model proteins for simple primordial metabolism? *Mol. Microbiol.* **105**, 505–507.
  70. Thomas B.A., McMahon L.P., Klotz A.V. (1995) N5-methylasparagine and energy-transfer efficiency in C-phycocyanin. *Biochemistry.* **34**, 3758–3770.
  71. Clarke S. (2002) The methylator meets the terminator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 1104–1106.
  72. Demma M., Warren V., Hock R., Dharmawardhane S., Condeelis J. (1990) Isolation of an abundant 50000-dalton actin filament bundling protein from *Dictyostelium amoebae*. *J. Biol. Chem.* **265**, 2286–2291.
  73. Edmonds B.T., Murray J., Condeelis J. (1995) pH regulation of the F-actin binding properties of *Dictyostelium* elongation factor 1 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **270**, 15222–15230.
  74. Shiina N., Gotoh Y., Kubomura N., Iwamatsu A., Nishida E. (1994) Microtubule severing by elongation factor 1 $\alpha$ . *Science.* **266**, 282–285.
  75. Yang W., Burkhardt W., Cavallius J., Merrick W.C., Boss W.F. (1993) Purification and characterization of a phosphatidylinositol 4-kinase activator in carrot cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 392–398.
  76. Inge-Vechtomov S., Zhouravleva G., Philippe M. (2003) Eukaryotic release factors (eRFs) history. *Biol. Cell.* **95**, 195–209.

## HEMK-LIKE METHYLTRANSFERASES IN THE REGULATION OF CELLULAR PROCESSES

N. S. Biziaev<sup>1</sup>, A. V. Shuvalov<sup>1, 2</sup>, and E. Z. Alkalaeva<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

<sup>2</sup> Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: alkalaeva@eimb.ru

Methylation is one of the most common modifications of proteins and nucleic acids. In particular, such modification is widely used to control translation. HEMK2 stands out among all human translational methyltransferases (methylases). Its orthologs have been found in many prokaryotes and eukaryotes. The substrates methylated by HEMK2 are glutamine and lysine residues in proteins, deoxyadenosine in DNA, and arsenic compounds (arsenicals). One of the important substrate of HEMK2 methylase is a glutamine residue in the GGQ ultra-conservative motif of the eukaryotic release factor 1 (eRF1). The process of release factor methylation, carried out by HEMK2 orthologues, is conservative among eukaryotes, archaea, and bacteria, although release factors in bacteria have different sequences and structure. In this review, we consider the features of human HEMK2 methylase and its orthologs as multifunctional enzymes that regulate cellular processes, in particular, protein biosynthesis.

**Keywords:** HEMK2, N6AMT1, eRF1, translation regulation, methylation, post-translational modifications