

RNA 介导的植物 DNA 甲基化研究进展

Advances in The RNA-directed DNA Methylation in Plants

付丽娅¹, 刘仲齐², 白艳玲^{1*}

FU Li-Ya¹, LIU Zhong-Qi² and BAI Yan-Ling^{1*}

¹ 南开大学生命科学学院, 天津 300071

² 天津市农业技术研究中心, 天津 300192

¹ College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

² Tianjin Research Center of Agricultural Biotechnology, Tianjin 300192, China

摘 要 RNA 介导的 DNA 甲基化作用(RNA-directed DNA Methylation, RdDM)是首次在植物中发现的基因组表观修饰现象, RdDM 通过 RNA-DNA 序列相互作用直接导致 DNA 甲基化。植物中的 RdDM 和 siRNA 介导的 mRNA 降解现象,都是通过 RNA 使序列特异性基因发生沉默,它们对于植物的染色体重排、抵御病毒感染、基因表达调控和发育的许多过程起到了非常重要的作用。在植物中有很多的文献报道 RdDM 现象,但是对于其具体调控机理还不是很清楚。这里对 RNA 介导的植物 DNA 甲基化的基本特征进行了简要概述,主要对 RdDM 机理的研究进展进行了综述,其中包括 RdDM 过程中的 DNA 甲基转移酶的种类及其作用机理, DNA 甲基化与染色质修饰之间的关系,以及与 RdDM 相关的重要蛋白质的研究等。在植物中,转录和转录后水平都可能发生 RdDM,诱发基因沉默,前者常涉及靶基因启动子的甲基化,后者则牵涉到编码区的甲基化。RdDM 的发生依赖于 RNAi 途径中相似的 siRNA 和酶,如 DCL3、RdR2、SDE4 和 AGO4。植物中至少含有三类 DNA 甲基转移酶 DRM1/2、MET1 和 CMT3,其作用部位是与 RNA 同源的 DNA 区域中的所有胞嘧啶,而组蛋白 H3 第九位赖氨酸的甲基化影响着胞嘧啶的甲基化。

关键词 植物, RNA 介导的 DNA 甲基化(RdDM), RNA 干扰

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-0891-06

Abstract The RNA-directed DNA Methylation (RdDM) is one type of epigenetic modification which was firstly discovered in plant. RdDM can directly cause DNA modifications of the genome through RNA-DNA interactions. In plant, both of RdDM and mRNA degradation induced by siRNA can silence sequence specific genes through RNA. They play very significant roles in chromosome rearrangement, defence of virus invasion, regulation of gene expression and many processes of plant development. However, the mechanisms of RdDM are still unclear. In this paper the basic characteristics of RdDM were briefly summarized and advances in studies on mechanisms of RdDM were reviewed. These include the kinds of DNA methyltransferases and their functional mechanisms in RdDM, the relationships between DNA methylation and chromatin modification, and important proteins involved in the RdDM process. In plants, RdDM may occur at both the transcriptional and post-transcriptional levels, both of which induce gene silencing. Methylation of the target gene promoter correlates with transcriptional gene silencing (TGS) whereas methylation of the coding sequence is associated with post-transcriptional gene silencing (PTGS). RdDM and RNAi all depend on the similar siRNA and enzymes, such as DCL3, RdR2, SDE4 and AGO4. There are at least three kinds of DNA methyltransferases, DRM1/2, MET1 and CMT3, in plants. They can interact with and modifies all cytidines within the DNA

Received: March 28, 2006; Accepted: July 14, 2006.

This work was supported by grant from Tianjin Municipal Science and Technology Commission (No. 043801411).

* Corresponding author. Tel: 86-22-23503340; E-mail: baiyl@nankai.edu.cn

天津市基础研究重点基金资助 (No. 043801411)

regions homologous to RNA sequence. Furthermore, methylation of lysine 9 in Histone H3 can affect the methylation of cytidines.

Key words plant, RNA-directed DNA Methylation (RdDM), RNA interference

DNA 甲基化是基因组 DNA 的一种主要表观遗传修饰形式^[1],是调节基因组功能的重要手段。它是在 DNA 甲基转移酶(DNA Methyltransferase, DMT)的作用下,以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,将甲基转移到 DNA 分子的胞嘧啶碱基上进行 DNA 修饰的过程,是造成植物转基因沉默的主要原因之一。植物 DNA 甲基化引起外源基因失活的现象十分类似于细菌的限制修饰系统,这一防御机制可以有效地识别出导入的外源 DNA 序列。

1998 年,Fire 在线虫中发现双链 RNA 能特异性显著抑制特定基因的表达,并首次将该现象称为 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)^[2]。随后的一系列研究表明, RNAi 现象在植物和真菌等真核生物中普遍存在,分别称为转录后水平的基因沉默(Post-Transcriptional Gene Silencing, PTGS)^[3]和基因压制(quelling)^[4]。这类现象在各种生物中虽然名称各不相同,但本质上都是由于同源核酸序列相互作用导致的基因表达在转录后水平上的抑制。

随着 RNAi 现象研究的深入,在植物中发现,由双链 RNA(double-strand RNA, dsRNA)产生的 21 – 25nt 的小干扰 RNA(short interfering RNA, siRNA)不仅可以介导转录后水平的基因沉默,而且可以介导转录水平的基因沉默(Transcriptional Gene Silencing, TGS)^[5]。这就涉及到 RNA 介导的基因组的表观修饰现象,包括发生在 DNA 上的胞嘧啶的甲基化、组蛋白的甲基化和去乙酰化等^[6]。人们很自然的将 RNAi 导致的基因失活与 DNA 甲基化修饰联系起来。已经在多种生物中观察到 RNA 介导的异染色质的形成,其中最常见的是组蛋白 H3 第九位的赖氨酸的甲基化(H3K9^{Me})。而 RNA 介导的 DNA 甲基化(RNA-directed DNA Methylation, RdDM)是基因组表观修饰改变的重要形式^[7]。

到目前为止,植物中 PTGS 机理已经研究的较为清楚。植物中存在的特异性类 RNase III 核酸酶 DCI(Dicer Like)^[8]将 dsRNA 切割成 21 – 25nt 的 siRNA^[9]。siRNA 再与具有核酸酶等酶活性的 RNA 诱导的基因沉默复合物(RNA induced silencing complex, RISC)^[10,11]结合,形成核蛋白体,进而识别与 siRNA 反义链互补的 mRNA,并导致 mRNA 的降解,因而抑制了相关基因的表达。本文主要就 RNA 介导的植物 DNA 甲基化机理的研究进行综述。

1 RdDM 与植物转基因沉默

类病毒是一类可以自主复制的 RNA 分子。1994 年, Wassenegger 等人将类病毒 cDNA 序列通过农杆菌介导的叶圆盘转化法导入烟草基因组中,当类病毒再次感染烟草并进行复制的时候,烟草基因组中与病毒 RNA 同源的 cDNA 序列发生了甲基化,而 cDNA 序列两侧的 T-DNA 序列和烟草基因组 DNA 并没有被甲基化,表明具有复杂的核酸二级结构的类病毒复制中间体可以使同源的 cDNA 甲基化,这是首次在植物中发现的 RdDM 现象^[12]。

RdDM 是依赖于 RNA 的 DNA 甲基化作用,与目前我们所研究的 RNAi 机理有本质的区别。但在拟南芥中, RdDM 的发生依赖于 RNAi 途径中相似的酶,如 DCL3、RNA 依赖的 RNA 聚合酶 2(RNA-dependent RNA polymerase 2, RdR2)、SDE4(Silencing Defective 4, 现为 Pol IV 的大亚基,称为 RPD1)和 AGO4(Argonaute 4),这些与 RNAi 有关的酶的缺失都可以影响 RdDM 的发生^[13,14]。进一步研究发现, RdDM 与 RNAi 依赖于相似的诱发因子 siRNA,两者的不同之处在于, RdDM 的发生依赖于 24 – 25nt 的 siRNA 的存在^[5]。这类 siRNA 在细胞质或细胞核内经过特定的 DCL 加工 dsRNA 而产生,并进入到细胞核内起作用,是植物所特有的。而植物 RNAi 途径中的沉默诱发因子是 21 – 22nt 长度的 siRNA,由细胞核或者细胞质内特定的 DCL 加工 dsRNA 而产生,其发生作用的部位是细胞质^[15,16]。

在植物中, siRNA 介导的 DNA 甲基化作用既可以发生在转录水平,又可以发生在转录后水平。转录水平的沉默(TGS)往往和启动子的甲基化有关,而转录后水平的沉默(PTGS)则牵涉到编码区的甲基化。Jones 认为当与外源 RNA 同源互补的 DNA 区域是编码区的时候,可以引发 PTGS,同时编码区的 DNA 被甲基化,在这个过程中 RNA 的转录水平下降,可能是由于 PTGS 可以延伸至同源区域边缘的区域,进而影响病毒的复制;当与 RNA 同源互补的 DNA 区域是启动子区的时候,可以引发启动子区 DNA 的甲基化,在转录水平抑制基因的沉默,由于甲基化区域仅限于互补配对区,所以病毒可以正常的复制而不受影响^[17]。目前的研究结果虽然表明由 siRNA 引起的 mRNA 降解才是导致 PTGS 发生的

主要原因,但是在发生PTGS的同时,编码区的DNA还是会发生甲基化,其原因未知^[18]。

Aufsatz等在拟南芥中设计了沉默激发序列位点和靶序列位点。沉默激发序列位点包含花椰菜花叶病毒35S启动子引发的章鱼碱合成酶基因启动子的反向重复序列(35Spro-NOSpro-IR),转录后产生的NOSpro dsRNA可在DCL作用下形成21-24nt的siRNA,靶序列位点是章鱼碱合成酶基因启动子分别引发新霉素磷酸转移酶基因和章鱼碱合成酶基因(NOSpro-NPTII-NOSter-NOSpro-NOS-NOSter)。因沉默激发序列中含有潮霉素抗性基因,又称为H位点;靶序列中含有卡那霉素抗性基因,称为K位点^[19]。当H位点不存在时,K位点的基因可以转录,产生的种子表现出卡那抗性,并同时产生章鱼碱。当H位点存在的时候,K位点无转录产物形成,种子表现出卡那敏感性,没有章鱼碱的合成;甲基化敏感的限制性内切酶酶切和Southern杂交分析表明,K位点中的NOSpro序列高度甲基化,从而导致NPTII基因和NOS合成酶基因转录水平的沉默。用杂交育种的方法,在拟南芥各种甲基化酶突变体中引入H/K体系,通过对这些突变体的研究,已经对RNA介导的DNA甲基化的机理有了初步的认识。

2 RdDM与DNA甲基转移酶

RdDM最重要的一个标记就是在DNA甲基转移酶的作用下,胞嘧啶被甲基化。DNA甲基转移酶通过两种方式对DNA进行甲基化修饰。一类是维持甲基化(Maintenance methylation),即在DNA复制过程中,维持甲基化的酶可识别新合成的半甲基化双链,并将甲基加到新链的非甲基化胞嘧啶上;另一类是重新甲基化(de novo methylation)^[20],它不需要甲基化的DNA模板作指导,可以直接使非甲基化的DNA甲基化,在植物中引起DNA重新甲基化的信号涉及到siRNA^[16]。真核生物中绝大多数甲基化发生在CpG二核苷酸对的胞嘧啶上,它是一种保守的DNA修饰,在DNA双链中呈对称分布^[21]。

植物中存在多种特有的DNA甲基转移酶,这些酶不仅可以使CpG二核苷酸中的胞嘧啶甲基化,而且还可以使非CpG中的胞嘧啶甲基化,它们可能都参与RNA介导的DNA甲基化的发生,根据其作用位点的特异性以及行使功能的不同至少可分为三类^[22,23]。

第一类DRM1和DRM2家族(Domains Rearranged Methylase, DRM)^[16]类似于动物中的Dnmt3a和Dnmt3b^[24],其作用是对与外源siRNA同源的DNA中

所有的胞嘧啶进行重新甲基化^[14]。

第二类MET1家族(cytosine methyltransferase)^[25,26]在甲基转移酶中占统治地位,其编码的蛋白在结构上类似于动物中的Dnmt1,作用是维持CpG二核苷酸中胞嘧啶的甲基化^[27,22]。在拟南芥、胡萝卜、豌豆、西红柿和玉米中均已发现MET1及其同源物。Aufsatz等研究发现在met1突变体中CpG二核苷酸中胞嘧啶甲基化的重新起始和维持都受到了影响,大部分CpG二核苷酸中的胞嘧啶没有甲基化,由此可见,MET1负责一部分CpG二核苷酸中胞嘧啶的重新甲基化,可能与DRM1和DRM2共同作用,使全部CpG二核苷酸中的胞嘧啶重新被甲基化^[28]。由于MET1既能使CpG二核苷酸中胞嘧啶重新甲基化,又能维持其甲基化,推测MET1不仅能与RNA-DNA杂交链相互作用,而且也能与DNA双链相互作用,其酶作用位点可能存在类似于复制叉的结构。

第三类染色质甲基化酶(Chromodomainpossessing Chromomethylase3, CMT3),广泛分布于植物中,为植物所特有,负责维持CpNpN(N是A,T,C或G)三核苷酸中胞嘧啶的甲基化^[29,30]。在植物中还没有发现维持CpNpN(N是A,T,C而非G)核苷酸序列中胞嘧啶甲基化的酶,普遍认为CpNpN核苷酸序列中胞嘧啶的甲基化依赖于重新甲基化酶DRM,若负责重新甲基化的酶受到抑制,则在以后的发育过程中CpNpN核苷酸序列中胞嘧啶的甲基化完全消失。然而Cao在对拟南芥drm和cmt3突变体的研究中发现,CpNpN(N非G)和CpNpG核苷酸序列中胞嘧啶甲基化的维持都依赖于CMT3的存在,drm突变体中CpNpN(N非G)核苷酸序列中胞嘧啶的甲基化几乎损失了大部分,CpNpG核苷酸序列中胞嘧啶的甲基化则部分损失,说明DRM和CMT3共同作用以维持非CpG核苷酸序列中胞嘧啶的甲基化^[14]。

对所有DNA甲基转移酶突变体的研究发现,siRNA的表达水平都有所下降,基因沉默现象得到缓解。由此可见,DNA甲基化的发生与siRNA有关。在有siRNA的条件下,MET1与DRM1、DRM2共同作用,使全部CpG二核苷酸中胞嘧啶重新甲基化。在没有siRNA信号存在的情况下,CpG甲基化的维持依赖于MET1。CpNpG和CpNpN(N非G)核苷酸序列中胞嘧啶甲基化的重新起始和维持均依赖于DRM,植物特有的DNA甲基转移酶CMT3则与DRM一起,共同维持CpNpG和CpNpN(N非G)核苷酸序列中胞嘧啶的甲基化。

3 RdDM 与组蛋白的修饰

siRNA 不仅可以在 DNA 甲基转移酶的作用下介导 DNA 甲基化,而且可以在组蛋白修饰酶的作用下介导组蛋白的修饰,包括组蛋白的去乙酰化和甲基化,发生在植物中的 RdDM 与组蛋白修饰之间有密切的关系。

Razin 认为 CpG 二核苷酸中胞嘧啶的甲基化是通过组蛋白去乙酰化导致染色质结构变化而引起转基因沉默的^[31]。Bestor 也提出甲基化导致转基因沉默的原因是一种 DNA 甲基结合蛋白(Methyl DNA Binding Domain, MBD)可与高度甲基化的 DNA 选择性结合,而 MBD 本身又和组蛋白去乙酰化酶(Histone Deacetylase, HDAC)结合在一起,使组蛋白去乙酰化,进而使基因沉默现象得以加强^[32]。Aufsatz 也提出了相似的观点,认为一种组蛋白去乙酰化酶 HDA6,在有 siRNA 信号存在的情况下可以协助 MET1 酶作用,使 CpG 二核苷酸中胞嘧啶的甲基化得以加强^[33]。

Jackson 通过对拟南芥组蛋白甲基化酶 KYP (KRYPTONITE)突变体的研究发现,基因组中 CpNpG、CpNpN 三核苷酸位点的甲基化依赖于组蛋白 H3 第九位的赖氨酸的甲基化(H3K9^{Me}),一种 LHP1 蛋白(Like-chromatin proteins)在连接组蛋白甲基化和 DNA 甲基化之间起了桥梁作用。后又研究发现,即使在组蛋白甲基化酶 KYP 不存在的情况下, CMT3 也可以使 CpNpG 甲基化,从而对 KYP 在 DNA 甲基化中的作用感到了质疑,目前还没有进一步的研究发现其具体作用机理^[34]。随后在对 DNA 甲基转移酶突变体的研究中发现, CpG 位点的甲基化决定组蛋白的甲基化, DNA 甲基化的缺失可以非直接的影响 H3K9^{Me}的形成^[35]。由以上推知,组蛋白甲基化和 DNA 甲基化两者密切相关。一种类似于 SWI2/SNF2 的具有 ATPase 活性的染色质重组蛋白 DDM1(Decrease in DNA Methylation 1)的发现及其研究,进一步证实了以上的推论^[36]。随后 Zilberman 研究表明,联系 DNA 甲基化和组蛋白甲基化的信号因子为 siRNA^[37]。

4 RdDM 相关蛋白质的研究

RdDM 的发生涉及一系列蛋白质因子的相互作用,其中包括 RNAi 途径中的许多蛋白质因子。随着 RdDM 研究的深入,不断有新的蛋白质因子被发现,还有许多以前的蛋白质因子被发现其新的功能。

4.1 对 DCL 的研究

自植物 RNAi 现象发现以来,科学家就对 DCL 进行研究,随着研究的深入,发现植物中含有多种不同的 DCLs,分别介导不同种类的小干扰 RNA 的生成,从而形成多种干扰途径。模式植物拟南芥含有四种 DCL,即 DCL1、DCL2、DCL3 和 DCL4, DCL1 和 DCL4 具有核定位信号(Nuclear Localization Signals, NLSs)^[38]。

病毒中 RNA 沉默抑制蛋白的发现和各种 *dcl* 突变体的形成为研究 siRNA 的产生提供了一个很好的研究思路^[39]。研究表明, DCL1 在细胞核内介导 21-22nt 的 microRNA 的产生^[38]。DCL2 和 DCL3 位于细胞质内,分别负责 22nt 病毒 siRNA 和内源 24nt siRNA 的生成^[40, 39]。DCL4 介导内源的 21-22nt ta-siRNA(trans-acting short interfering RNA, ta-siRNA)的产生,这个过程中需要 RdR6 和 SGS3 的协同作用^[41]。DCL4 可能在细胞核内介导 21-22nt 的 siRNA 的产生^[42],但也不排除 21-22nt 的 siRNA 是在细胞质内产生的,然后运动到细胞核中,这个问题只有当产生 21-22nt 的 DCL 确定之后才可以解决^[38]。

利用绿色荧光蛋白瞬时表达的方法检测到 DCL3 位于细胞核内,也具有核定位信号。DCL3 与 RdR2、Pol IV 协同作用,介导 24nt siRNA 的产生,产生的 siRNA 在 AGO4 的作用下介导染色质的修饰。RNAi 中也有 AGO 的参与,甲基化与 RNAi 需要不同的 AGO,分别具有与 DNA、RNA 结合的能力。在 *dcl3* 突变体中, siRNA 数量减少, CpG、CpNpG 甲基化程度没有改变,非对称 CpG 的甲基化程度都降低了^[39]。

各 DCL 之间的作用并不是孤立的,而是相互联系的, *dcl1* 突变体既可以影响 microRNA 的产生也可以影响 ta-siRNA 的产生^[41], DCL2 和 DCL3 都参与了病毒 siRNA 的形成^[40],但是各蛋白因子之间的作用机制还不是很清楚,有待于进一步的实验来证实。

4.2 对 Pol IV 的研究

在对拟南芥基因组进行分析的时候,发现一类植物特有的依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶 Pol IV,该酶的大亚基由 *RPD1* 编码(以前称为 *SDE4*,曾认为编码 RNAi 途径中一个重要的酶 SDE4),与 Pol I-III 的大亚基相似,含有一个独特的 C 末端和 RNA 聚合酶亚基保守的区域^[43, 44]。

遗传研究表明, Pol IV 在 siRNA 介导的 DNA 甲基化过程中起到了非常重要的作用,与 RdR2、DCL3 和 AGO4 一起负责 24-25nt siRNA 的产生并指导 DNA 甲基转移酶对 DNA 进行甲基化。在拟南芥基因组中还发现了编码 Pol IV 其他亚基的基因,通过同源

dsRNA 将这些基因敲除后,突变体产生的表型与敲除大亚基后的表型一样,对这些突变体的研究发现,其内源的 siRNA 消失、所有胞嘧啶的甲基化消失,最终导致的结果是 RdDM 的紊乱^[43, 44]。

Pol I-III 可以介导常染色质上基因的转录,Pol IV 则与异染色质区域有很强的亲和力,异染色质区的 DNA 可以在 Pol IV 的作用下进行转录,其转录物在 RdRp 的作用下产生 dsRNA,以上实验结果正好可以解释在共抑制过程中沉默信号得以放大的原因^[43, 44]。

5 RdDM 可能的作用机制

以上所述,植物中 RdDM 的发生与 RNAi、DNA 甲基化、组蛋白的修饰三者密切相关,最终导致的结果是使基因沉默,但是 RdDM 中三者之间如何协调作用,其机理尚不清楚。推测 RdDM 的作用机制为:在 DCL3 的作用下,通过各种途径产生的 dsRNA 被切割成 24-25nt 长的 siRNA,siRNA 随即整合入 RNA 诱导的转录水平的基因沉默复合物中(RNA-induced initiation of transcriptional silencing, RITS)^[45]。带有 siRNA 和 AGO 的 RITS 复合体与染色质相互作用,使 DNA 甲基转移酶 DRM 和 MET1 聚集在 DNA 甲基化作用位点处,介导 DNA 的重新甲基化:DRM1、DRM2 导致 CpNpG 和 CpNpN 位点的重新甲基化,MET1、DRM1、DRM2 导致 CpG 位点的重新甲基化^[14, 28]。甲基化了的胞嘧啶通过 MBD 间接的与 HDAC 和组蛋白甲基化酶(Histone Methyltransferases, HMT)相互作用,在 HDAC 的作用下,组蛋白 H3 第九位赖氨酸残基上的乙酰基被除去,使得组蛋白易于被 HMT 甲基化,基因沉默进一步加强^[37]。DNA 甲基转移酶 CMT3 可识别甲基化的组蛋白,并和 DRM1、DRM2 一起维持 CpNpN 和 CpNpG 位点的甲基化,MET1 则负责 CpG 位点甲基化的维持。植物特有的类 SWI2/SNF2 的染色质重排蛋白 DRD1(Defective in RNA directed DNA methylation 1)也参与了 RdDM 过程,它通过改变 DNA 的空间结构,使 DNA 甲基化作用位点暴露出来易于甲基化的发生^[46, 47]。

在 RdDM 过程中,siRNA 如何识别 DNA 甲基化作用位点并引导 DNA 甲基化,这之间是否产生 siRNA 与 DNA 结合的三链结构,还是 RNA 不与 DNA 相互作用,而与其同源互补的 DNA 转录产物 RNA 相互作用,这些问题还有待于进一步的研究。虽然有研究表明 RNA 介导的 DNA 启动子甲基化的发生依赖于少量的完整转录产物的存在,但 siRNA 究竟与 DNA 还是 RNA 相互作用,似乎与所处的环境有

关^[48, 23]。

RdDM 的发生涉及一系列蛋白因子的相互作用,不同真核生物中 RdDM 的发生机制和影响因素均有不同,siRNA 沉默抑制蛋白的发现为研究 RdDM 的机理以及 RNAi 与 RdDM 的关系提供了一个很好的途径^[49]。近年来发展起来的生物信息学,为研究 DNA 甲基化提供了一个高通量和快捷的方法。尽管目前还有诸多的未知因素,相信在不久的将来,RdDM 的机理研究将会取得很大的进展。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Wu C, Morris JR. Genes, genetics and epigenetics: a correspondence. *Science*, 2001, **293**: 1103 - 1105
- [2] Fire A, Xu S, Montgomery MK *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, **391**(6669): 806 - 811
- [3] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen RA. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 1990, **2**(4): 279 - 289
- [4] Cogoni C, Macino G. Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. *Current Opinion Microbiology*, 1999, **2**: 657 - 662
- [5] Hamilton A, Voinnet O, Chappell L *et al.* Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO JOURNAL*, 2002, **21**(17): 4671 - 4679
- [6] Mette MF, Aufsatz W, Kanno T *et al.* Analysis of double-stranded RNA and small RNAs involved in RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Methods in Molecular Biology*, 2005, **309**: 61 - 82
- [7] Castanotto D, Tommasi S, Li MJ *et al.* Short hairpin RNA-directed cytosine (CpG) methylation of the *RASSF1A* gene promoter in HeLa cell. *Molecular Therapy*, 2005, **12**(1): 179 - 183
- [8] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001, **409**: 363 - 366
- [9] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development*, 2001a, **15**: 188 - 200
- [10] Hammond SM, Bernstein E, Beach D. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cell extracts. *Nature*, 2000, **404**: 293 - 296
- [11] Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 2001, **107**: 309 - 321
- [12] Wassenegger M, Heimes S, Riedel L *et al.* RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, 1994, **76**(3): 567 - 576
- [13] Chan SW, Zilberman D, Xie ZX *et al.* RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science*, 2004, **303**: 1336
- [14] Cao X, Aufsatz W, Zilberman D *et al.* Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Current*

- [15] Xie Z, Johansen L, Gustafson A *et al.* Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, 2004, **2**(5): 0642 – 0652
- [16] Matzke M, Aufsatz W, Kanno T *et al.* Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, **1677**: 129 – 141
- [17] Jones L, Hamilton A, Voinnet O *et al.* RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell*, 1999, **11**(12): 2291 – 2301
- [18] Jean BM, Philippe M, Christophe B *et al.* DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 2000, **10**: 1591 – 1594
- [19] Aufsatz W, Mette MF, van der Winden J *et al.* RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *PNAS*, 2002 a, USA**99**(suppl 4): 16499 – 16506
- [20] Pelissier T, Thalmeir S, Kempe D *et al.* Heavy *de novo* methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27**(7): 1625 – 1634
- [21] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development*, 2002, **16**(1): 6 – 21
- [22] Finnegan EJ, Kovac KA. Plant DNA methyltransferases. *Plant Molecular Biology*, 2000, **43**(2-3): 189 – 201
- [23] Chan SW, Henderson IR, Jacobsen SE. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics*, 2005, **6**: 351 – 360
- [24] Okano M, Bell D, Haber D *et al.* DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell*, 1999, **99**(3): 247 – 257
- [25] Kankel M, Ramsey D, Stokes T *et al.* *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics*, 2003, **163**: 1109 – 1122
- [26] Saze H, Mittelsten SO, Paszkowski J. Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nature Genetics*, 2003, **34**(1): 65 – 69
- [27] Howell C, Bestor T, Ding F *et al.* Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the *Dnmt1* gene. *Cell*, 2001, **104**(6): 829 – 838
- [28] Aufsatz W, Mette MF, Matzke AJ *et al.* The role of MET1 in RNA-directed *de novo* and maintenance methylation of CG dinucleotides. *Plant Molecular Biology*, 2004, **54**(6): 793 – 804
- [29] Lindroth A, Cao X, Jackson J *et al.* Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*, 2001, **292**(5524): 2077 – 2080
- [30] Bartee L, Malagnac F, Bender J. *Arabidopsis* cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes and Development*, 2001, **15**(14): 1753 – 1758
- [31] Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing: a three-way connection. *EMBO Journal*, 1998, **17**(17): 4905 – 4908
- [32] Bestor TH. Gene silencing: Methylation meets acetylation. *Nature*, 1998, **393**(6683): 311 – 312
- [33] Aufsatz W, Mette MF, van der Winden J *et al.* HDA6, a putative histone deacetylase needed to enhance CG methylation induced by double stranded RNA. *EMBO Journal*, 2002b, **21**(24): 6832 – 6841
- [34] Jackson J, Lindroth A, Cao X *et al.* Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 2002, **416**(6880): 556 – 560
- [35] Johnson LM, Cao X, Jacobsen SE. Interplay between two epigenetic marks: DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Current Biology*, 2002, **12**: 1360 – 1367
- [36] Lippman Z, May B, Yordan C *et al.* Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biology*, 2003, **1**(3): e67
- [37] Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE. *ARGONAUTE4* control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, 2003, **299**: 716 – 719
- [38] Papp I, Mette MF, Aufsatz W *et al.* Evidence for nuclear processing of plant microRNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiology*, 2003, **132**(3): 1382 – 1390
- [39] Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM *et al.* Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, 2004, **2**(5): 0642 – 0652
- [40] Akbergenov R, Ammour AS, Blevins T *et al.* Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucleic Acids Research*, 2006, **34**(2): 462 – 471
- [41] Xie Z, Allen E, Wilken A *et al.* DICER-LIKE4 functions in transacting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, 2005, **102**(36): 12984 – 12989
- [42] Schauer SE, Jacobsen SE, Meinke DW *et al.* DICER-LIKE1: Blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends in Plant Science*, 2002, **7**(11): 487 – 491
- [43] Herr AJ, Jensen MB, Dalmay T *et al.* RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science*, 2005, **308**: 118 – 120
- [44] Onodera Y, Haag JR, Ream T *et al.* Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell*, 2005, **120**: 613 – 622
- [45] Noma K, Sugiyama T, Cam H *et al.* RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nature Genetics*, 2004, **36**(11): 1174 – 1180
- [46] Chan SW, Henderson IR, Zhang X *et al.* RNAi, DRD1, and Histone methylation actively target developmentally important non-CG DNA methylation in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 2006, **2**(6): 0791 – 0797
- [47] Huettel B, Kanno T, Daxinger L *et al.* Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in *Arabidopsis*. *EMBO Journal*, 2006, **25**: 2828 – 2836
- [48] Klenov MS, Gvozdev VA. Heterochromatin formation: role of short RNAs and DNA methylation. *Biochemistry (Moscow)*, 2005, **70**(11): 1187 – 1198
- [49] Mallory AC, Ely L, Smith TH *et al.* HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell*, 2001, **13**(3): 571 – 583