

เอพิเจเนติก-การควบคุมเหนือลำดับดีเอ็นเอ

โชติกา หยกทองวัฒนา

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

E-mail: fscicks@ku.ac.th

บทคัดย่อ

เอพิเจเนติก (epigenetic) คือ การแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปโดยที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอ กระบวนการเอพิเจเนติกในพืชมีหลายประการ โดยมีกระบวนการควบคุมหลัก คือ ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน การดัดแปรฮิสโตน เช่น ฮิสโตนเมทิลเลชัน ฮิสโตนแอซีทิลเลชัน รวมทั้งการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโครมาติน หรือโครมาตินรีโมเดลลิง ซึ่งจะส่งผลต่อการแสดงออกของยีน ควบคุมการเจริญเติบโตและการเจริญพันธุ์ในพืช ในบทความฉบับนี้จะกล่าวถึงการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเอพิเจเนติกประเภทหลักที่สามารถพบได้ในพืช รวมทั้งกล่าวถึงโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเอพิเจเนติก

ABSTRACT

Epigenetic refer to changes of gene expression without any change of the underlying DNA sequences. There are various mechanisms that plants utilize to control gene expression. The main regulation mechanisms are DNA methylation, histone modifications such as histone methylation, histone acetylation and changes of chromatin structure or chromatin remodeling. The alteration of gene expression influences plant growth, development and reproduction. In this review, regulation of gene expression via main epigenetic mechanisms and proteins involved in the epigenetic regulation will be described.

คำสำคัญ: เอพิเจเนติก, ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน, ฮิสโตนเมทิลเลชัน, ฮิสโตนแอซีทิลเลชัน, โครมาตินรีโมเดลลิง

Keywords: epigenetic, DNA methylation, histone methylation, histone acetylation, chromatin remodeling

เอพิเจเนติกและการควบคุมการแสดงออกของยีน

Conrad Waddington นักชีววิทยาชาวอังกฤษ ได้ให้นิยามคำว่า เอพิเจเนติกส์ (epigenetics) ไว้ว่า “ศาสตร์ทางด้านชีววิทยา ว่าด้วยเรื่องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนและผลิตภัณฑ์ของยีน ซึ่งทำให้ลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตปรากฏขึ้น” (Waddington, 1942) ส่วนคำว่า เอพิเจเนติก จะหมายถึง การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ลำดับเบสของดีเอ็นเอ ซึ่งการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปนี้สามารถผันกลับได้ และสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลานได้ (Bird, 2007)

ควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเอพิเจเนติกนั้น มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของการดัดแปรทางเคมีชนิดต่างๆ ที่โครมาติน (chromatin) ซึ่งอาจเรียกรวมๆ กันได้ว่า “การดัดแปรทางเอพิเจเนติก (epigenetic modification)” เช่น การเติมหมู่เมทิล (methyl) ให้แก่เบสบนสายดีเอ็นเอ หรือการดัดแปรโปรตีนฮิสโตน ผลของการดัดแปรนี้เมื่อเกิดขึ้นร่วมกับการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม chromatin remodeling complex จะช่วยรักษาสมดุลให้แก่ยีน เพื่อให้ยีนมีการแสดงออกอย่างถูกต้องในระดับและระยะเวลาที่เหมาะสม (Grewal and Jia, 2007; Yang and Kuroda, 2007; Zaratiegui *et al.*, 2007) การควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเอพิเจเนติกนี้ ถูกค้นพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ในยีสต์พบว่ามียีนและดีเอ็นเอหลายๆ บริเวณที่ถูกควบคุมด้วยกระบวนการนี้ เช่น การไม่แสดงออกของยีนบริเวณ mating type loci (HML และ HMR), rDNA, telomeric repeat และ centromeric repeat (Buhler and Gasser, 2009) การเกิด position-effect variegation

(PEV) ในแมลงหวี่ ซึ่งคือการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนโดยขึ้นกับตำแหน่งของยีนในจีโนม หากยีนมีตำแหน่งอยู่ใกล้กับบริเวณเฮเทอโรโครมาติน (heterochromatin) ยีนนั้นจะมีการแสดงออกในระดับต่ำหรือไม่มีการแสดงออกเลย แต่หากยีนนั้นอยู่ในบริเวณที่เป็นยูโครมาติน (euchromatin) ยีนจะสามารถแสดงออกได้ (Girton and Johansen, 2008) รวมถึงการทำให้โครโมโซมเอ็กซ์เกิดการไม่แสดงออก (X-chromosome inactivation) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Wutz, 2011)

ในพืชนั้นได้มีรายงานที่เกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเอพิเจเนติกเป็นครั้งแรกโดย Alexander Brink นักพันธุศาสตร์ ชาวแคนาดา ในช่วงทศวรรษที่ 1950 กล่าวถึงการควบคุมการแสดงออกของยีนในข้าวโพดที่เรียกว่า พารามิวเทชัน (paramutation) ซึ่งคือการแสดงออกของแอลลีลของยีนตำแหน่งหนึ่งในสภาวะเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ โดยการควบคุมของอีกแอลลีลของยีนตำแหน่งเดียวกัน การแสดงออกของแอลลีลที่เปลี่ยนแปลงไปนี้ สามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลานได้ (Chandler, 2007) นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ถ่ายทอดเข้าสู่พืชอีกด้วย โดยในครั้งแรกได้มีการค้นพบเหตุการณ์นี้ในต้นพิทูเนียที่ได้รับการถ่ายยีน chalcone synthase (*CHS*) ซึ่งถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ 35S cauliflower mosaic virus (35SCaMV) เข้าสู่ต้นพิทูเนียซึ่งมีกลีบดอกสีม่วง วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อให้ยีน *CHS* เกิดการแสดงออกมากกว่าปกติในต้นพิทูเนียที่ได้รับการถ่ายยีน โดยกลุ่มผู้วิจัยคาดหวังว่าจะพบดอกพิทูเนียที่มีกลีบดอกสีเข้มมากขึ้นกว่าเดิม แต่เมื่อคัดเลือกพิทูเนียต้นที่ได้รับการถ่ายยีนกลับพบว่า ดอกพิทูเนียประมาณ 42% กลับมีกลีบดอกสีขาวหรือสีขาวผสมสีม่วง และตรวจพบว่า ยีน *CHS* ที่ใส่เข้าไปใหม่นี้ไม่เกิดการแสดงออก (gene silencing) ยิ่งไปกว่านั้นการที่พบพิทูเนียที่มีดอกสีขาว แสดงว่ายีน *CHS* ซึ่งมีอยู่เดิมในต้นพิทูเนีย ก็ไม่เกิดการแสดงออกไปด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใส่ยีน *CHS* เพิ่มเข้าไปในต้นพิทูเนียที่มียีน *CHS* เดิมอยู่แล้วนั้น ไปกระตุ้นและเหนี่ยวนำให้ยีน *CHS* ที่มีอยู่เดิมไม่เกิดการแสดงออกไปด้วย

เหตุการณ์นี้เรียกว่า “co-suppression” (Napoli *et al.*, 1990)

การไม่แสดงออกของยีนในพืชนั้น กล่าวโดยรวมจะสามารถแบ่งการควบคุมได้เป็น 2 ระดับ คือ การไม่แสดงออกของยีนที่ระดับการถอดรหัส (transcriptional gene silencing, TGS) และการไม่แสดงออกของยีนที่ระดับหลังการถอดรหัส (post-transcriptional gene silencing, PTGS) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้เป็นที่ทราบกันดีว่า ทั้งสองกระบวนการนี้มีความเกี่ยวเนื่องและเชื่อมโยงกัน โดยไม่สามารถแบ่งแยกกันได้อย่างชัดเจน กระบวนการ TGS นั้นเกิดขึ้นเนื่องจากโครงสร้างของโครมาตินอยู่ในรูปที่ขดกันอย่างแน่นหนา โดย TGS จะมีความสัมพันธ์กับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) ซึ่งพบมากที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน ร่วมกับการดัดแปรโปรตีนฮิสโตนอย่างจำเพาะ การไม่แสดงออกของยีนโดยกระบวนการ TGS นี้สามารถถ่ายทอดสู่เซลล์รุ่นต่อไปได้ ซึ่งพบได้ทั้งในการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ นอกจากนี้ TGS ยังทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่มีในเซลล์มาแต่เดิม (endogenous gene) และยีนที่ได้รับการถ่ายเข้าไปใหม่ (transgene) อีกด้วย ตัวอย่างของการควบคุมการไม่แสดงออกของยีนที่มีอยู่แต่เดิมในพืช ได้แก่ การไม่แสดงออกของยีนควบคุมการสังเคราะห์เอ็นไซม์ phosphoribosylanthranilate isomerase (PAI) ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ในวิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนทริปโทเฟน โดยในพืชโมเดล *Arabidopsis thaliana* accession Wassilewskija (Ws) จะมียีนสร้าง PAI ทั้งสิ้น 4 ยีนด้วยกัน (*PAI1-4*) ยีนทั้ง 4 นี้ พบอยู่ใน 3 ตำแหน่งในจีโนม เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน จะพบว่ามียีนเพียงยีน *PAI2* ที่ไม่มีการแสดงออก ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *PAI2* มีระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันสูง (Bender and Fink, 1995) ตัวอย่างของยีนที่มีอยู่เดิมในพืชอีกยีนหนึ่งที่ถูกควบคุมด้วย TGS คือ ยีน *flowering wageningen (FWA)* เมื่อตรวจสอบระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันในทุกๆ เนื้อเยื่อของพืชพบว่า ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FWA* จะมีระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันสูง และมีความสัมพันธ์กับการไม่แสดงออกของยีน *FWA* แต่ในเอนโดสเปิร์ม ยีน *FWA* มีการแสดงออกได้ และ

ระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันพบอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าในเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ ของพืช (Kinoshita *et al.*, 2004) ในส่วนของยีนที่มีการถ่ายเข้าสู่พืชนั้น ได้มีการศึกษาและพบว่า การแสดงออกของยีนเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับจำนวนของยีนที่เข้าไปแทรกอยู่ในจีโนมของพืช หากในจีโนมของพืชได้รับ transgene เข้าไปเป็นจำนวนมาก (มีจำนวน copy number สูง) ยีนเหล่านั้นมักจะเกิดการไม่แสดงออก ทั้งนี้ยังพบความสัมพันธ์กับระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันอีกด้วยเช่นกัน กล่าวคือ โดยส่วนใหญ่แล้วมักจะพบว่ายีนที่ถ่ายเข้าสู่พืชและไม่แสดงออก จะมีระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์สูง เช่น มีการพบการแสดงออกที่แตกต่างกันของยีน luciferase (*LUC*) ใน *Arabidopsis* สองต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *LUC* ที่ถูกควบคุมการแสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ ubiquitin 3 (*UBQ3*) ต้น *LUC26* เป็นต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *LUC* เข้าไป 1 ชุดในจีโนม และมีการแสดงออกของยีนได้ตามปกติ ในขณะที่ต้น *LUC25* เป็นต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *LUC* มากกว่า 1 ชุด และมีการไม่แสดงออกของยีน *LUC* เมื่อตรวจสอบระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ พบว่าโปรโมเตอร์ *UBQ3* ในต้น *LUC26* ไม่มีการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ในขณะที่ต้น *LUC25* มีระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันอยู่สูง (Yokthongwattana *et al.*, 2010)

สำหรับการไม่แสดงออกของยีนโดยกระบวนการ PTGS มักจะมีความสัมพันธ์กับการสลาย mRNA อย่างจำเพาะ ในกรณีนี้อัตราการถอดรหัสจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากการควบคุมนั้นเกิดขึ้นภายหลังจากที่ดีเอ็นเอถูกถอดรหัสเป็นสายอาร์เอ็นเออย่างสมบูรณ์แล้ว ในพืชกระบวนการ PTGS ต้องอาศัยการสะสมของอาร์เอ็นเอขนาดเล็ก ซึ่งมีขนาดประมาณ 21-26 คู่เบส อาร์เอ็นเอเหล่านี้เรียกว่า เอสไออาร์เอ็นเอ (small interfering RNA หรือ siRNA) ซึ่งถูกสังเคราะห์ผ่านวิถีอาร์เอ็นเออินเทอร์เฟียร์เรนซ์ (RNA interference หรือ RNAi) (Brodersen and Voinnet, 2006; Baulcombe, 2007) ในการควบคุมการไม่แสดงออกของยีนโดย PTGS นั้นเชื่อกันว่าจะไม่สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานได้

การดัดแปรทางเอพิเจเนติก (epigenetic modifications)

การดัดแปรทางเอพิเจเนติกสามารถจำแนกออกเป็นชนิดต่างๆ ได้หลายชนิด ซึ่งในการดัดแปรแต่ละประเภทนั้นต้องอาศัยการทำงานของโปรตีนชนิดต่างๆ ในบทความนี้จะกล่าวถึงโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญในการดัดแปรทางเอพิเจเนติก 3 กลุ่ม ได้แก่ โปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โปรตีนที่ทำหน้าที่ในการดัดแปรโปรตีนฮิสโตน และโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครมาติน

โปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นกระบวนการหลักที่สำคัญกระบวนการหนึ่งในการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเอพิเจเนติก ดีเอ็นเอจะถูกเติมหมู่เมทิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโทซีน และได้ผลิตผลเป็น 5-เมทิลไซโทซีน การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นกระบวนการที่มีความอนุรักษ์สูงพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด ตั้งแต่เชื้อรา พืช และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่างๆ (Selker *et al.*, 2003; Bender, 2004; Goll and Bestor, 2005; Bernstein *et al.*, 2007) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันส่วนมากมักจะพบการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโทซีนในลำดับเบสที่เป็น CpG และพบได้น้อยมากในลำดับเบสที่เป็น CpNpG และ CpNpN โดยที่ N คือ เบส A, C, G หรือ T ในขณะที่ในพืชจะมีความแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอย่างเห็นได้ชัด กล่าวคือ การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันจะพบมากที่ลำดับเบส CpG เช่นกัน แต่จะพบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้ในระดับหนึ่งที่ลำดับเบส CpNpG และ CpNpN (Bender, 2004) ทั้งนี้ประมาณ 6-30% ของเบสไซโทซีนในพืชจะถูกเติมหมู่เมทิล ซึ่งปริมาณของดีเอ็นเอที่มีการเติมหมู่เมทิลนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชด้วย เช่น *Arabidopsis thaliana* เบสไซโทซีนประมาณ 19% จะถูกเติมหมู่เมทิล (Chen and Li, 2004) โดยส่วนใหญ่แล้วดีเอ็นเอเมทิลเลชันจะพบมากบริเวณเฮเทอโรโครมาติน ซึ่งเป็นบริเวณที่มียีนที่ไม่แสดงออกอยู่มาก แต่อย่างไรก็ตามประมาณหนึ่งในสามของยีนที่มีการแสดงออก ก็พบดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้ด้วยเช่นกัน (Zhang *et al.*, 2006)

การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันนั้นแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ การเติมหมู่เมทิลเพื่ออนุรักษ์รูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชันไว้ หรือเรียกว่า maintenance methylation และการเติมหมู่เมทิลแบบใหม่ หรือ *de novo* methylation โดยมี เอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA methyltransferase; DNA MTase) ที่จำเพาะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาแต่ละชนิด การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันแบบ maintenance จะเกิดขึ้นบนสายดีเอ็นเอหลังจากที่ดีเอ็นเอเกิดการจำลองตัวหรือการซ่อมแซมดีเอ็นเอ โดยมีดีเอ็นเอคู่สมสายหนึ่งที่มีการเติมหมู่เมทิลอยู่แล้ว เป็นต้นแบบในการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเออีกสายหนึ่ง ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ถูกจำลองตัวขึ้นมาใหม่ จากกระบวนการนี้จึงทำให้สิ่งมีชีวิตสามารถรักษารูปแบบของการเติมหมู่เมทิลในดีเอ็นเอสายใหม่ได้ และทำให้รูปแบบของการเติมหมู่เมทิลนี้คงไว้เช่นเดิม หลังจากการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสและไมโอซิส ในขณะที่การเติมหมู่เมทิลแบบ *de novo* นั้น จะเป็นการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอที่เบสไซโตซีนในตำแหน่งใหม่ โดยไม่ต้องอาศัยดีเอ็นเอซึ่งถูกเติมหมู่เมทิลอยู่แล้วเป็นต้นแบบ การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันแบบนี้ จะทำให้เกิดรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างไปจากเดิม (Vanyushin and Ashapkin, 2011)

เอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรสในพืชถูกจำแนกออกได้เป็น 4 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ และความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนอนุรักษ์ใน motif ต่างๆ โดยเอนไซม์ทั้ง 4 กลุ่มนี้ คือ methyltransferase 1 (MET1), domain-rearranged methyltransferase (DRM), chromomethylase (CMT) และ DNA methyltransferase 2 (Dnmt2) (Finnegan and Kovac, 2000; Zhang *et al.*, 2010)

เอนไซม์ในกลุ่ม MET1 ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมทิลเลชันแบบ maintenance ที่เบสไซโทซีนในลำดับเบส CpG (Finnegan *et al.*, 1996; Ronemus *et al.*, 1996; Kankel *et al.*, 2003; Saze *et al.*, 2003) และที่ตำแหน่งซึ่งเป็น CNG และ CNN ได้อีกด้วย (Lindroth *et al.*, 2001) ในพืชพันธุ์กลายของยีน *MET1* และพืช anti-sense *MET1* นั้น จะมีระดับการแสดงออกของยีน *MET1* ลดลง ส่งผลให้ระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เบส CpG ลดลงจากในพืช wild type

เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะบริเวณเซนโทรเมอร์ 5S rDNA repeats ทรานสโพซอน และลำดับเบสที่มีความคล้ายคลึงกับทรานสโพซอน นอกจากนี้ยังพบว่า transgene ซึ่งเกิดการไม่แสดงออกในพืชที่ได้รับการถ่ายยีนนั้น สามารถกลับมาแสดงออกได้อีกครั้งหนึ่งใน *MET1* และการแสดงออกของยีนนี้ มีความสัมพันธ์กับการลดลงของระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่บริเวณ transgene (Vong *et al.*, 1993; Finnegan *et al.*, 1996; Ronemus *et al.*, 1996; Kankel *et al.*, 2003; Saze *et al.*, 2003; Vaillant *et al.*, 2008) เอนไซม์ในกลุ่ม DRM เป็นเอนไซม์ที่มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ Dnmt3 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Cao *et al.*, 2000; Cao and Jacobsen, 2002a) เอนไซม์ DRM2 เป็นเอนไซม์หลักในกลุ่มของ DRM ใน *Arabidopsis* เอนไซม์ชนิดนี้ ทำหน้าที่ในกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันผ่านวิถี RNA-directed DNA methylation (RdDM) คือ การอาศัยอาร์เอ็นเอขนาดเล็กเป็นตัวนำเอนไซม์ไปยังตำแหน่งที่ต้องเร่งปฏิกิริยา (Cao and Jacobsen, 2002a; Cao and Jacobsen, 2002b; Cao *et al.*, 2003) สำหรับเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรสในกลุ่ม CMT นั้น เป็นเอนไซม์ที่พบเฉพาะในพืชเท่านั้น โดยมีเอนไซม์ CMT3 เป็นเอนไซม์หลักในกลุ่มนี้ เอนไซม์ CMT3 ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมทิลเลชันแบบ maintenance ที่เบสไซโทซีนในลำดับเบส CpNpG (Henikoff and Comai, 1998; Bartee *et al.*, 2001; Pavlopoulou and Kossida, 2007) ส่วนเอนไซม์ในกลุ่ม Dnmt2 ในพืชนั้นยังไม่ได้รับการศึกษามากนัก

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันสามารถเกิดการผันกลับได้ โดยการสูญเสียหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอเกิดขึ้นได้ 2 แบบด้วยกัน คือ การสูญเสียหมู่เมทิลแบบ passive demethylation และแบบ active demethylation ในการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันแบบ passive จะเกิดขึ้นเมื่อปฏิกิริยาเมทิลเลชันแบบ maintenance นั้นเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ระหว่างการจำลองตัวของดีเอ็นเอ ในขณะที่ดีเอ็นเอเมทิลเลชันแบบ active จะเป็นการสูญเสียหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA glycosylase (Zhang *et al.*, 2010) ใน *Arabidopsis* มียีนสำหรับเอนไซม์ DNA glycosylase ทั้งสิ้น 4 ยีนด้วยกัน คือ repressor of silencing 1 (ROS1),

demeter (*DME*), demeter-like 2 (*DML2*) และ demeter-like 3 (*DML3*) (Zhu *et al.*, 2007) จากการศึกษาโดยเทคนิคทางชีวเคมีพบว่าเอนไซม์ DNA glycosylase ทั้ง 4 ชนิดใน *Arabidopsis* สามารถเร่งปฏิกิริยาการตัดหมู่เมทิลแบบ active demethylation ออกจากเบสไซโทซีนได้ โดยผ่านวิถี base excision pathway ซึ่งเป็นปฏิกิริยาหนึ่งที่สำคัญในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (Gong *et al.*, 2002; Agius *et al.*, 2006; Gehring *et al.*, 2006; Morales-Ruiz *et al.*, 2006; Penterman *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007) เมื่อศึกษาระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันใน *Arabidopsis ros1* สายพันธุ์กลาย จะพบระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันสูงขึ้นกว่าระดับที่พบใน wild type และพบความสัมพันธ์ระหว่างระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่สูงขึ้น กับการเกิดการไม่แสดงออกของยีนที่ transgene รวมทั้งยีนบางยีนที่มีอยู่แล้วในพืชก็เกิดการไม่แสดงออกด้วย (Gong *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2007) ส่วนยีน *DME* นั้นเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *medea* (*MEA*), fertilization independent seed 2 (*FIS2*) และ *FWA* ใน *Arabidopsis* (Choi *et al.*, 2002; Kinoshita *et al.*, 2004)

โปรตีนที่ทำหน้าที่ในการตัดแปรโปรตีนฮิสโตน

ฮิสโตนเป็นโปรตีนองค์ประกอบที่สำคัญของโครมาติน โครงสร้างของฮิสโตนประกอบด้วยโดเมนที่เป็นทรงกลมบริเวณส่วนปลายด้านคาร์บอกซี และปลายด้านอะมิโนซึ่งมีลักษณะเป็นสายยาวยื่นออกจากนิวคลีโอโซม ปลายด้านอะมิโนของฮิสโตนนั้นสามารถเกิดการตัดแปรภายหลังการแปลรหัสได้ ตัวอย่างของการตัดแปรที่บริเวณปลายด้านกรดอะมิโนของฮิสโตน ได้แก่ การเติมหมู่เมทิล (methylation) การเติมหมู่แอเซทิล (acetylation), การเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation), การเติมยูบิควิติน (ubiquitination) และการเติมน้ำตาลเอดีพี-ไรโบส (ADP-ribosylation) (Jenuwein and Allis, 2001) การตัดแปรฮิสโตนส่งผลต่อลักษณะโครงสร้างของนิวคลีโอโซม ให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมหรือไม่เหมาะสมต่อการถอดรหัส ซึ่งจะส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน (Strahl and Allis, 2000; Shilatifard, 2006; Kouzarides, 2007) การตัดแปรโปรตีนฮิสโตนได้ถูกนำเสนอว่าเป็น “รหัสฮิสโตน” (histone code) ซึ่งได้กล่าวถึง

การตัดแปรฮิสโตนว่า รหัสฮิสโตนที่แตกต่างกันส่งผลต่อการถอดรหัสแตกต่างกันออกไป (Jenuwein and Allis, 2001; de la Cruz *et al.*, 2005) ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่า การตัดแปรโปรตีนฮิสโตนนั้นมีหลากหลายชนิด แต่ในที่นี้จะกล่าวถึงการตัดแปรโปรตีนฮิสโตนโดยการเติมหมู่เมทิลและหมู่แอเซทิลเท่านั้น

เอนไซม์ฮิสโตนเมทิลทรานสเฟอเรสและดีเมทิลเลส (histone methyltransferase และ demethylase)

การเติมหมู่เมทิลให้กับฮิสโตนหรือฮิสโตนเมทิลเลชันนี้เกิดขึ้นได้ที่กรดอะมิโนไลซีน (K) หรือกรดอะมิโนอาร์จินีน (R) ที่บริเวณปลายด้านอะมิโนของโปรตีนฮิสโตน โดยตำแหน่งที่สามารถเกิดฮิสโตนเมทิลเลชันคือที่ปลายด้านอะมิโนของฮิสโตน H3 ตำแหน่ง K4, K9, K27, K36, K79 ตำแหน่ง R2, R8, R17, R26 และที่ปลายด้านอะมิโนของฮิสโตน H4 ตำแหน่ง K20 และ R3 ในการเติมหมู่เมทิลที่กรดอะมิโนไลซีนสามารถเกิดขึ้นได้ 3 แบบด้วยกัน คือ เติมหมู่เมทิลหนึ่งหมู่ (mono-methylation, me) เติมหมู่เมทิลสองหมู่ (di-methylation, me2) และเติมหมู่เมทิลสามหมู่ (tri-methylation, me3) ในขณะที่การเติมหมู่เมทิลที่กรดอะมิโนอาร์จินีนจะเกิดได้ทั้งสิ้น 3 แบบ คือ เติมหมู่เมทิลหนึ่งหมู่ เติมหมู่เมทิลสองหมู่ แบบสมมาตร (symmetric methylation) และเติมหมู่เมทิลสองหมู่แบบไม่สมมาตร (asymmetric methylation) (Kouzarides, 2007)

การเกิดฮิสโตนเมทิลเลชันมีความสัมพันธ์กับการถอดรหัสของดีเอ็นเอบริเวณนั้นๆ ตัวอย่างเช่น ฮิสโตนเมทิลเลชันที่ตำแหน่งไลซีน 9 ของฮิสโตน H3 (H3K9me2) มีความสัมพันธ์กับยีนที่ไม่แสดงออก ในขณะที่โครมาตินบริเวณที่มียีนซึ่งมีการถอดรหัสมากๆ นั้น จะพบระดับของฮิสโตนเมทิลเลชันที่บริเวณฮิสโตน H3 ตำแหน่งไลซีน 4 (H3K4me2) สูง (Jenuwein and Allis, 2001) ความสัมพันธ์ระหว่างฮิสโตนเมทิลเลชันที่ตำแหน่ง H3K9 กับการไม่แสดงออกของยีนนั้นได้ถูกค้นพบในยีสต์ (Nakayama *et al.*, 2001), *Neurospora crassa* (Tamaru and Selker, 2001), พืช และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Peter *et al.*, 2001)

เอนไซม์ฮิสโตนเมทิลทรานสเฟอเรส (histone methyltransferase, HMT) เร่งปฏิกิริยาเมทิลเลชันที่บริเวณ

ปลายอะมิโนของฮิสโตน เอนไซม์ HMT ชนิดแรกที่ได้รับการจำแนกนั้น ถูกจำแนกว่าเป็นโปรตีนที่มีโดเมน SET (SET domain) ซึ่งชื่อของ SET นั้นมาจากการที่พบโดเมนนี้ในโปรตีน *Drosophila suppressor of variegation* (Su(var) 3-9) (Tschiersch *et al.*, 1994; Rea *et al.*, 2000), enhancer of Zeste (E(Z)), และ trithorax (Qian and Zhou, 2006) หลังจากนั้นโปรตีนในกลุ่ม HMT จึงได้รับการจำแนกในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ เช่น โปรตีน Clr4p ใน *S. pombe* (Nakayama *et al.*, 2001), Dim-5 ใน *N. crassa* (Tamaru *et al.*, 2001), SUV39H1 และ SUV39H2 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (O'Carroll *et al.*, 2000; Rea *et al.*, 2000) ใน *Arabidopsis* มียีน 37 ยีนที่ได้ถูกทำนายว่า เมื่อถูกแปลรหัสแล้วจะให้โปรตีนในกลุ่มที่มีโดเมน SET (Baumbusch *et al.*, 2001; Naumann *et al.*, 2005; Ebbs and Bender, 2006) โดยเอนไซม์ฮิสโตนเมทิลทรานสเฟอเรสที่ได้รับการศึกษาอย่างลึกซึ้งที่สุดใน *Arabidopsis* คือ เอนไซม์ Kryptonite (KYP/SUVH4) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาฮิสโตนเมทิลเลชันที่ตำแหน่ง H3K9 แบบ mono- และ di-methylation (Jackson *et al.*, 2002; Malagnac *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2004)

หมู่เมทิลที่ปลายด้านอะมิโนของฮิสโตนสามารถถูกตัดออกได้ โดยอาศัยเอนไซม์ฮิสโตนดีเมทิลเลส (histone demethylase) เอนไซม์ฮิสโตนดีเมทิลเลสชนิดแรกนั้นพบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ เอนไซม์ lysine-specific demethylase 1 (LSD1) (Shi *et al.*, 2004) หลังจากนั้นจึงได้มีการศึกษาและจำแนกเอนไซม์กลุ่มนี้อีกหลากหลายชนิดในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ (Shi and Whetstone, 2007)

เอนไซม์ฮิสโตนแอเซทิลทรานสเฟอเรสและดีแอเซทิลทรานสเฟอเรส (histone acetyltransferase and deacetyltransferase)

ฮิสโตนแอเซทิลเลชันหรือการเติมหมู่แอเซทิลที่ปลายอะมิโนของฮิสโตน จะเกิดขึ้นที่กรดอะมิโนไลซีน การเติมหมู่แอเซทิลนี้ จะทำให้การจับกันของดีเอ็นเอและฮิสโตนนั้นเกิดขึ้นได้ไม่แน่นหนาเท่าเดิม ส่งผลให้โครงสร้างของโครมาตินเปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือ การพันเกลียวของโครมาตินจะไม่แน่นเท่าเดิม โครมาตินอยู่ในรูปที่คลายมากขึ้น ทำให้

โปรตีนที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (transcription factor) รวมถึงโปรตีนชนิดอื่นๆ เช่น เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการตัดแปรรีโบมาติน หรือโปรตีนในกลุ่ม chromatin remodeling complex สามารถเข้าจับกับโครมาตินได้ดีขึ้น เหตุการณ์เหล่านี้อาจส่งผลให้ยีนมีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งโดยส่วนมากแล้วมักจะทำให้ยีนมีระดับการแสดงออกสูงขึ้น นอกจากนี้ฮิสโตนที่มีการเติมหมู่แอเซทิลสามารถทำหน้าที่ในการส่งเสริมให้โปรตีนควบคุม (regulatory protein) และทรานสคริปชันแฟกเตอร์ชนิดอื่นๆ มาจับยังดีเอ็นเอบริเวณที่มีการเติมหมู่แอเซทิลได้ด้วย โดยอาศัยการจับกับโปรตีนที่สามารถจดจำหมู่แอเซทิลบนฮิสโตน เช่น โปรตีนที่มี bromodomain (Mujtaba *et al.*, 2007) ตามปกติแล้วการเติมหมู่แอเซทิลที่ฮิสโตนมักจะมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน ในขณะที่การไม่แสดงออกของยีนจะเกี่ยวเนื่องกับการเกิดฮิสโตนดีแอเซทิลเลชัน (histone deacetylation) หรือการตัดหมู่แอเซทิลออกจากปลายอะมิโนของโปรตีนฮิสโตน (Jenuwein and Allis, 2001) เมื่อศึกษาด้วยเทคนิคอิมมูโนโลคัลไลเซชัน (immunolocalization) ในนิวเคลียสของ *Arabidopsis* แสดงให้เห็นว่าฮิสโตน H4 ที่ถูกเติมหมู่แอเซทิลจะพบมากที่บริเวณยูโครมาติน และไม่พบที่บริเวณเฮเทอโรโครมาติน (Jasencakova *et al.*, 2003; Probst *et al.*, 2003) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของยีนที่มีการแสดงออกและไม่แสดงออก กับการเติมหมู่เมทิลที่ฮิสโตน

ฮิสโตนแอเซทิลเลชันและดีแอเซทิลเลชันเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ และสามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ปฏิกิริยาทั้งสองนี้ถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ฮิสโตนแอเซทิลทรานสเฟอเรส (histone acetyltransferase, HAT) และเอนไซม์ฮิสโตนดีแอเซทิลเลส (histone deacetylase, HDAC) ตามลำดับ โดยตำแหน่งกรดอะมิโนไลซีน K9, K14, K18, K23, K56 ของฮิสโตน H3 และ K5, K8, และ K12 ของฮิสโตน H4 เป็นตำแหน่งที่มีการเติมหมู่แอเซทิล (Kouzarides, 2007; Shahbazian and Grunstein, 2007) เอนไซม์ HAT นั้นถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ โดยพิจารณาจากแอเซทิลโดเมนซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ทั้งสิ้น 4 กลุ่มด้วยกัน คือ GNATs (Gcn5 N-acetyltransferase),

MYST, p300/CBP (CREB-binding proteins) และ nuclear receptor co-activator (Lee and Workman, 2007) ส่วนเอนไซม์ HDAC นั้นได้รับการจำแนกออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 3 กลุ่มด้วยกัน คือ RPD3 (reduced potassium dependency 3), HDA1 (histone deacetylase 1), และ Sir2 (silent information regulator 2) (Pandey *et al.*, 2002)

ในจีโนมของ *Arabidopsis* นั้นมีเอ็นไซม์สำหรับการสร้างเอนไซม์ HAT อย่างน้อย 12 ยีนและเอ็นไซม์สำหรับการสร้างเอนไซม์ HDAC ทั้งหมด 18 ยีนด้วยกัน (Pandey *et al.*, 2002) โดยเอนไซม์ HAT สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม general control non-derepressible (GCN5)-related N-terminal acetyltransferase (GCN5) กลุ่ม MYST (มาจาก MOZ, YbF2, Sas2, Tip60-like) กลุ่ม CREB-binding protein (CBP) และกลุ่ม TAF-II-250 (Kim *et al.*, 2010) สำหรับเอนไซม์ในกลุ่ม HDAC นั้นสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม RPD3/HDA1 กลุ่ม SIR2 และกลุ่ม HD2 ซึ่งพบเฉพาะในพืชเท่านั้น ได้มีการศึกษาเพื่อตรวจสอบหน้าที่ของยีน รวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ เช่น *AtHAC1* ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมระยะเวลาในการออกดอกของ *Arabidopsis* (Deng *et al.*, 2007) โปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกับยีสต์ Gcn5 ใน *Arabidopsis* นั้นทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนด้วยแสง (Benhamed *et al.*, 2006) การยับยั้งหรือลดระดับการแสดงออกของยีน *histone deacetylase 1 (HD1)* โดย antisense *HD1* ส่งผลให้พืช antisense *HD1* มีระดับของฮิสโตนที่ถูกเติมหมู่เอซิติลสูงขึ้น นอกจากนี้ในพืชดังกล่าว จะพบการแสดงออกของยีนบางยีน ที่แต่เดิมนั้นไม่มีการแสดงออกอีกด้วย (Tian and Chen, 2001; Tian *et al.*, 2005) ในขณะที่มีวเทชันที่ยีน *AtHDA6* ใน *Arabidopsis* ส่งผลให้การควบคุมการไม่แสดงออกของ transgene และ rRNA ผิดปกติไป โดยยีนทั้งสองกลุ่มนี้จะเกิดการแสดงออกได้ใน *athad6* mutant (Murfett *et al.*, 2001; Probst *et al.*, 2004; Earley *et al.*, 2006)

โปรตีนที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครมาติน (chromatin remodeling complex)

นอกเหนือไปจากการตัดแปรทางเคมีของดีเอ็นเอ และฮิสโตน ซึ่งส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วนั้น ลักษณะโครงสร้างของโครมาตินที่เปลี่ยนแปลงไป ก็ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนบริเวณนั้นได้เช่นกัน ซึ่งการปรับเปลี่ยนโครงสร้างโครมาตินนี้ต้องอาศัยโปรตีนในกลุ่มที่เรียกว่า ATP-dependent chromatin remodeling complex (Narlikar *et al.*, 2002; Smith and Peterson, 2005; Reyes, 2006; van Vugt *et al.*, 2007) ซึ่งเป็นโปรตีนเชิงซ้อนประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยหลายหน่วย และต้องอาศัย ATP ในการทำปฏิกิริยา (Tsukiyama, 2002) โปรตีนเชิงซ้อนเหล่านี้มีความอนุรักษ์สูง เมื่อพิจารณาจากมอทิฟที่มีความอนุรักษ์ในหน่วยย่อยที่เป็น ATPase จะสามารถแบ่ง ATP-dependent chromatin remodeling complex ออกเป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม คือ SWI2/SNF2 (mating type switching 2/ sucrose nonfermenting 2), ISWI (imitation switch), Mi-2/CHD (chromodomain helicase DNA binding) และ INO80 (inositol auxotroph 80) (Eberharther and Becker, 2004; Smith and Peterson, 2005) นอกจากนี้ยังพบโดเมนซึ่งทำหน้าที่จดจำการตัดแปรฮิสโตนชนิดต่างๆ ในเอนไซม์ ATPase แต่ละกลุ่ม ดังนี้ ATPase ในกลุ่ม SWI2/SNF2 จะพบ bromodomain ที่สามารถจดจำไลซีนที่มีการเติมหมู่เอซิติล (Narlikar *et al.*, 2002; Hassan *et al.*, 2007; van Vugt *et al.*, 2007) ส่วนกลุ่ม ISWI นั้นจะพบโดเมน SANT (Swi3, Ada2, N-Cor, และ TFIIIB) และ SLIDE (SANT-Like ISWI Domain) ในหน่วยย่อย ATPase ซึ่งโดเมนเหล่านี้ได้ถูกทำนายว่า สามารถจับกับปลายด้านอะมิโนของฮิสโตนได้ (Boyer *et al.*, 2004; Dang and Bartholomew, 2007; Horton *et al.*, 2007) สำหรับ chromodomain จะพบใน ATPase ของโปรตีนเชิงซ้อนกลุ่ม Mi-2/CHD chromodomain นี้สามารถจับกับฮิสโตนที่ถูกเติมหมู่เมทิลได้ (Hall and Georgel, 2007; Marfella and Imbalzano, 2007; Kunert and Brehm, 2009) และกลุ่มสุดท้าย คือ ATPase ของโปรตีนเชิงซ้อนกลุ่ม INO80 จะพบโดเมน DBINO ซึ่งคาดว่าน่าจะสามารถจับดีเอ็นเอได้ (Bakshi *et al.*, 2004) ได้มีการศึกษาถึงหน้าที่ของโปรตีนในกลุ่มของ

chromatin remodeling complex ในพืชเช่นกัน โดยโปรตีนเหล่านี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของพืช ตั้งแต่การพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญ ระยะเวลากการออกดอก รวมไปถึงการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมจากภายนอก (Jarillo *et al.*, 2009) ตัวอย่างเช่น โปรตีน ATBRM จำเป็นสำหรับการพัฒนางวดอก เนื่องจากส่งผลต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่ม floral homeotic gene ใน *Arabidopsis* ที่มีกรกลายของยีน *AtCHR12* ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม SWI2/SNF2 นั้นพบว่าพืชมีการเจริญเติบโตได้เหมือนพืช wild type ในสภาวะเพาะเลี้ยงตามปกติ แต่เป็นที่น่าสนใจว่า *AtCHR12* นั้นสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าพืช wild type ภายใต้สภาวะเครียดจากความแล้งและความร้อน (Mylne *et al.*, 2007)

กระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเอพิเจเนติกส์ มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ หลายกระบวนการในพืช เช่น การเจริญของพืช การพัฒนาทั้งในระหว่างการเจริญของลำต้นและระยะการพัฒนาของดอก รวมไปถึงการตอบสนองของพืชอย่างรวดเร็ว ต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมในการปลูก ดังนั้นการศึกษาถึงหน้าที่ของยีนและโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญในการดัดแปรทางเอพิเจเนติกส์ จะทำให้เข้าใจถึงกระบวนการต่างๆ เหล่านี้ได้ยิ่งยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Agius, F., Kapoor, A. and Zhu, J.K. 2006. Role of the *Arabidopsis* DNAGlycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 11796–11801.
- Bakshi, R., Prakash, T., Dash, D. and Brahmachari, V. 2004. *In silico* characterization of the INO80 subfamily of SWI2/SNF2 chromatin remodeling proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 197–204.
- Bartee, L., Malagnac, F. and Bender, J. 2001. *Arabidopsis* cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes Dev* 15: 1753-8.
- Baulcombe, D.C. 2007. Molecular biology: Amplified silencing. *Science* 315: 199–200.
- Baumbusch, L.O., Thorstensen, T., Krauss, V., Fischer, A., Naumann, K., Assalkhou, R., Schulz, I., Reuter, G. and Aalen, R.B. 2001. The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Res* 29: 4319–4333.
- Bender, J. 2004. DNA methylation and epigenetics. *Annu Rev Plant Biol* 55: 41–68.
- Bender, J. and Fink, G.R. 1995. Epigenetic control of an endogenous gene family is revealed by a novel blue fluorescent mutant of *Arabidopsis*. *Cell* 83: 725–734.
- Benhamed, M., Bertrand, C., Servet, C. and Zhou, D.X. 2006. *Arabidopsis* GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. *Plant Cell* 18: 2893–2903.
- Bernstein, B.E., Meissner, A. and Lander, E.S. 2007. The mammalian epigenome. *Cell* 128: 669–681.
- Bird, A. 2007. Perception of epigenetics. *Nature* 447: 396–398.
- Boyer, L.A., Latek, R.R. and Peterson, C.L. 2004. The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 158–163.
- Brodersen, P. and Voinnet, O. 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* 22: 268–280.
- Buhler, M. and Gasser, S.M. 2009. Silent chromatin at the middle and ends: lessons from yeasts. *EMBO J.* 28: 2149–2161.

- Cao, X., Springer, N.M., Muszynski, M.G., Phillips, R.L., Kaeppler, S. and Jacobsen S.E. 2000. Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4979–4984.
- Cao, X. and Jacobsen, S.E. 2002a. Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr Biol* 12: 1138–1144.
- Cao, X. and Jacobsen, S.E. 2002b. Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 Suppl 4: 16491–16498.
- Cao, X., Aufsatz, W., Zilberman, D., Mette, M.F., Huang, M.S., Matzke, M. and Jacobsen, S.E. 2003. Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol* 13: 2212–2217.
- Chandler, V.L. 2007. Paramutation: from maize to mice. *Cell* 128: 641–645.
- Chen, T. and Li, E. 2004. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr. Top. Dev. Biol.* 60: 55–89.
- Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Jacobsen, S.E. and Fischer, R.L. 2002. DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis*. *Cell* 110: 33–42.
- Dang, W.W. and Bartholomew, B. 2007. Domain architecture of the catalytic subunit in the ISW2-nucleosome complex *Mol Cell Biol.* 27: 8306–8317.
- de la Cruz, X., Lois, S., Sanchez-Molina, S. and Martinez-Balbas, M.A. 2005. Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* 27: 164–175.
- Deng, W., Liu, C., Pei, Y., Deng, X., Niu, L. and Cao, X. 2007. Involvement of the histone acetyltransferase AtHAC1 in the regulation of flowering time via repression of FLC in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143: 1660–1668.
- Earley, K., Lawrence, R.J., Pontes, O., Reuther, R., Enciso, A.J., Silva, M., Neves, N., Gross, M., Viegas, W. and Pikaard, C.S. 2006. Erasure of histone acetylation by *Arabidopsis* HDA6 mediates large-scale gene silencing in nucleolar dominance. *Genes Dev* 20: 1283–1293.
- Ebbs, M.L. and Bender, J. 2006. Locus-specific control of DNA methylation by the *Arabidopsis* SUVH5 histone methyltransferase. *Plant Cell* 18: 1166–1176.
- Eberharter, A. and Becker, P.B. 2004. ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions. *J Cell Sci* 117: 3707–3711.
- Finnegan, E.J., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. 1996. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8449-8454.
- Finnegan, E.J. and Kovac, K.A. 2000. Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol.* 43: 189–201.
- Gehring, M., Huh, J.H., Hsieh, T.F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J.J., Goldberg, R.B. and Fischer, R.L. 2006. DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell* 124: 495–506.

- Girton, J.R. and Johansen, K.M. 2008. Chromatin structure and the regulation of gene expression: the lessons of PEV in *Drosophila*. *Adv. Genet.* 61: 1–43.
- Goll, M.G. and Bestor, T.H. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74: 481–514.
- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T., David, L. and Zhu, J.K. 2002. ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* 111: 803–814.
- Grewal, S.I. and Jia, S. 2007. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8: 35–46.
- Hall, J.A. and Georgel, P.T. 2007. CHD proteins: a diverse family with strong ties. *Biochem Cell Biol* 85: 463–476.
- Hassan, A.H., Awad, S., Al-Natour, Z., Othman, S., Mustafa, F. and Rizvi, T.A. 2007. Selective recognition of acetylated histones by bromodomains in transcriptional co-activators. *Biochem J* 402: 125–133.
- Henikoff, S. and Comai, L. 1998. A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics* 149: 307–318.
- Horton, J.R., Elgar, S.J., Khan, S.I., Zhang, X., Wade, P.A. and Cheng, X. 2007. Structure of the SANT Domain from the *Xenopus* Chromatin Remodeling Factor ISWI. *Proteins* 67: 1198–1202.
- Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X. and Jacobsen, S.E. 2002. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416: 556–560.
- Jackson, J.P., Johnson, L., Jasencakova, Z., Zhang, X., PerezBurgos, L., Singh, P.B., Cheng, X., Schubert, I., Jenuwein, T. and Jacobsen, S.E. 2004. Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma* 112: 308–315.
- Jarillo, J.A., Pineiro, M., Cubas, P. and Martinez-Zapater, J.M. 2009. Chromatin remodeling in plant development. *Int. J. Dev.Biol.* 53: 1581–1596.
- Jasencakova, Z., Soppe, W.J., Meister, A., Gernand, D., Turner, B.M. and Schubert, I. 2003. Histone modifications in *Arabidopsis*- high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *Plant J* 33: 471–480.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. 2001. Translating the histone code. *Science* 293: 1074–1080.
- Kankel, M.W., Ramsey, D.E., Stokes, T.L., Flowers, S.K., Haag, J.R. and Jeddeloh, J.A. 2003. *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* 163: 1109–1122.
- Kim, J.-M., To, T.K., Nishioka, T. and Seki, M. 2010. Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses. *Plant Cell Environ.* 33: 604–611.
- Kinoshita, T., Miura, A., Choi, Y., Kinoshita, Y., Cao, X., Jacobsen, S.E., Fischer, R.L. and Kakutani, T. 2004. One-way control of FWA imprinting in *Arabidopsis* endosperm by DNA methylation. *Science* 303: 521–523.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693–705.
- Kunert, N. and Brehm, A. 2009. Novel Mi-2 related ATP-dependent chromatin remodelers. *Epigenetics* 4: 209–211.

- Lee, K.K. and Workman, J.L. 2007. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 284–295.
- Lindroth, A.M., Cao, X., Jackson, J.P., Zilberman, D., McCallum, C.M., Henikoff, S. and Jacobsen, S.E. 2001. Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation *Science* 292: 2077–2080.
- Malagnac, F., Bartee, .L and Bender, J. 2002. An Arabidopsis SET domain protein required for maintenance but not establishment of DNA methylation. *Embo J* 21: 6842–6852.
- Marfella, C.G.A. and Imbalzano, A.N. 2007. The Chd family of chromatin remodelers. *Mutat Res* 618: 30–40.
- Morales-Ruiz, T., Ortega-Galisteo, A.P., Ponferrada-Marin, M.I., Martinez-Macias, M.I., Ariza, R.R. and Roldan-Arjona, T. 2006. DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 6853–6858.
- Mujtaba, S., Zeng, L. and Zhou, M.M. 2007. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* 26: 5521–557.
- Murfett, J., Wang, X.J., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J. 2001. Identification of *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 mutants that affect transgene expression. *Plant Cell* 13: 1047–1061.
- Mylne, J.S., Nap, J.P. and Bisseling, T. 2007. The SWI/SNF chromatin remodeling gene AtCHR12 mediates temporary growth arrest in *Arabidopsis thaliana* upon perceiving environmental stress. *Plant J.* 51: 874–885.
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D. and Grewal, S.I. 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292: 110–113.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279–289.
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y. and Kingston, R.E. 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108: 475–487.
- Naumann, K., Fischer, A., Hofmann, I., Krauss, V., Phalke, S., Irmeler, K., Hause, G., Aurich, A.C., Dorn, R., Jenuwein, T. and Reuter, G. 2005. Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in *Arabidopsis*. *Embo J* 24: 1418–1429.
- O'Carroll, D., Scherthan, H., Peters, A.H., Opravil, S., Haynes, A.R., Laible, G., Rea, S., Schmid, M., Lebersorger, A., Jerratsch, M., Sattler, .L, Mattei, M.G., Denny, P., Brown, S.D., Schweizer, D. and Jenuwein, T. 2000. Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol* 20: 9423–9433.
- Pandey, R., Muller, A., Napoli, C.A., Selinger, D.A., Pikaard, C.S., Richards, E.J., Bender, J., Mount, D.W. and Jorgensen, R.A. 2002. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 30: 5036–5055.

- Pavlopoulou, A. and Kossida, S. 2007. Plant cytosine-5 DNA methyltransferases: structure, function, and molecular evolution. *Genomics* 90: 530–541.
- Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J.H., Ballinger, T., Henikoff, S. and Fischer, R.L. 2007. DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6752–6757.
- Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S. and Schofer, C. 2001. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107: 323–337.
- Probst, A.V., Fransz, P.F., Paszkowski, J. and Scheid, O.M. 2003. Two means of transcriptional reactivation within heterochromatin. *Plant J* 33: 743–749.
- Probst, A.V., Fagard, M., Proux, F., Mourrain, P., Boutet, S., Earley, K., Lawrence, R.J., Pikaard, C.S., Murfett, J., Furner, I., Vaucheret, H. and Mittelsten Scheid, O. 2004. *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 is required for maintenance of transcriptional gene silencing and determines nuclear organization of rDNA repeats. *Plant Cell* 16: 1021–1034.
- Qian, C. and Zhou, M.M. 2006. SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. *Cell Mol Life Sci* 63: 2755–2763.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. and Jenuwein, T. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406: 593–599.
- Reyes, J.C. 2006. Chromatin modifiers that control plant development. *Curr Opin Plant Biol* 9: 21–27.
- Ronemus, M.J., Galbiati, M., Ticknor, C., Chen, J. and Dellaporta, S.L. 1996. Demethylation induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis*. *Science* 273: 654–657.
- Saze, H., Scheid, O.M. and Paszkowski, J. 2003. Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nat Genet* 34: 65–69.
- Selker, E.U., Tountas, N.A., Cross, S.H., Margolin, B.S., Murphy, J.G., Bird, A.P. and Freitag, M. 2003. The methylated component of the *Neurospora crassa* genome. *Nature* 422: 893–897.
- Shahbazian, M.D. and Grunstein, M. 2007. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 76: 75–100.
- Shilatifard, A. 2006. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* 75: 243–269.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A. and Casero, R.A. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119: 941–953.
- Shi, Y. and Whetstone, J.R. 2007. Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell* 25: 1–14.
- Smith, C.L. and Peterson, C.L. 2005. ATP-dependent chromatin remodeling. *Curr Top Dev Biol* 65: 115–148.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41–45.

- Tamaru, H. and Selker, E.U. 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414: 277–283.
- Tian, L. and Chen, Z.J. 2001. Blocking histone deacetylation in *Arabidopsis* induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 200–205.
- Tian, L., Fong, M.P., Wang, J.J., Wei, N.E., Jiang, H., Doerge, R.W. and Chen, Z.J. 2005. Reversible histone acetylation and deacetylation mediate genomewide, promoter-dependent and locus-specific changes in gene expression during plant development. *Genetics* 169: 337–345.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G. and Reuter, G. 1994. The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *Embo J* 13: 3822–3831.
- Tsukiyama, T. 2002. The *in vivo* functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 422–429.
- Vaillant, I., Tutois, S., Jasencakova, Z., Douet, J., Schubert, I. and Tourmente, S. 2008. Hypomethylation and hypermethylation of the tandem repetitive 5S rRNA genes in *Arabidopsis*. *Plant J* 54: 299–309.
- van Vugt, J.J., Ranes, M., Campsteijn, C. and Logie, C. 2007. The ins and outs of ATP-dependent chromatin remodeling in budding yeast: Biophysical and proteomic perspectives. *Biochim Biophys Acta* 1769: 153–171.
- Vanyushin, B.F. and Ashapkin, VV. 2011. DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 1809: 360–368.
- Vongs, A., Kakutani, T., Martienssen, R.A. and Richards, E.J. 1993. *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science* 260: 1926–1928.
- Waddington, C. 1942. The epigenotype. *Endeavour* 1: 18–20.
- Wutz, A. 2011. Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation. *Nat. Rev. Genet.* 12: 542–553.
- Yang, P.K. and Kuroda, M.I. 2007. Noncoding RNAs and intranuclear positioning in monoallelic gene expression. *Cell* 128: 777–786.
- Yokthongwattana, C., Bucher, E., Caikovski, M., Vaillant, I., Nicolet, J., Mittelsten Scheid, M. and Paszkowski, J. 2010. MOM1 and Pol-IV/V interactions regulate the intensity and specificity of transcriptional gene silencing. *EMBO J.* 29: 340–351.
- Zaratiegui, M., Irvine, D.V. and Martienssen, R.A. 2007. Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell* 128: 763–776.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S.W., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E. and Ecker, J.R. 2006. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 126: 1189–1201.
- Zhang, M., Kimatu, J.N., Xu, K. and Lui, B. 2010. DNA cytosine methylation in plant development. *J. Genet. Genomics* 37: 1–12.
- Zhu, J., Kapoor, A., Sridhar, VV., Agius, F. and Zhu, J.K. 2007. The DNA glycosylase/lyase ROS1

functions in pruning DNA methylation patterns
in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 17: 54–59.