



УДК 577.24:577.2.043

А. Н. Берестяная

Влияние острого рентгеновского облучения на эпигеном в ходе онтогенеза *Linum usitatissimum*

(Представлено академиком НАН Украины Д. М. Гродзинским)

*Исследованы изменения эпигенома в онтогенезе *Linum usitatissimum*, подверженного действию разных доз острого рентгеновского облучения. Статус метилирования определен методом метилчувствительной полимеразной цепной реакции. Обнаружена зависимость повышения уровня метилирования от дозы облучения, установлены эпигенетические изменения в процессе старения листьев *Linum usitatissimum*.*

Старение как запрограммированный процесс возрастания деградационных изменений организма в ходе онтогенеза обусловлено комплексным взаимодействием генетического аппарата и повреждающих факторов различной природы. Связующим звеном в данном взаимодействии выступает эпигеном, как динамическая система контроля экспрессии генов. Она может как ослаблять, так и усиливать действие повреждающих факторов на геном и выступать в роли регулятора реализации генетической программы возрастной деградации. В процессе старения снижается общий уровень метилирования генома, параллельно ослабляются механизмы репарации, увеличивается число мутаций и хромосомных аномалий, осуществляется экспрессия ряда гидролитических ферментов, все это усиливает негативное действие таких повреждающих факторов, как радиация. Известно, что рентгеновская радиация индуцирует изменения в эпигеноме растений. Биологическая эффективность данного вида радиации во многих случаях выше эффективности других видов радиоактивных излучений и химических мутагенов [1, 2].

На сегодня является актуальным выяснение эпигенетической компоненты в механизмах регуляции старения, обусловленного реализацией генетической программы и действием повреждающих факторов. Исходя из этого, целью исследования было установление влияния радиационного облучения на эпигеном в ходе старения вегетативных органов растения *Linum usitatissimum*.

Материалы и методы. Семена *L. usitatissimum* подвергали воздействию острого рентгеновского облучения в четырех дозах: 10, 20, 50 и 100 Гр. В качестве источника излучения

© А. Н. Берестяная, 2013

использовали рентгеновский аппарат “РУМ-17”. Растения выращивали в условиях вегетационного опыта. Объектом исследования была ДНК семядольных листьев.

Геномную ДНК семядольных листьев *L. usitatissimum* выделяли модифицированным СТАБ-методом, очищали путем фенольной экстракции, осаждали этанолом, растворяли в ТЕ-буфере (10 мМ *tris*-HCl, pH 8,0; 1 мМ ЭДТА), концентрацию доводили до 0,2 мкг/мкл [3, 4]. Исследовали эпигеном методом метилчувствительной полимеразной цепной реакции (МЧ-ПЦР). В основе метода МЧ-ПЦР лежит принцип взаимодействия метилчувствительных рестриктаз со специфическими сайтами узнавания ДНК [5, 6]. Каждый из образцов ДНК в количестве 1 мкг подвергали гидролизу в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 ед. акт. метилчувствительной рестриктазы HpaII в реакционном буфере, рекомендованном производителем, при 37 °С в течение 2 ч. Аналогично рестриктицию осуществляли с рестриктазой SmaI. По окончании инкубации 1 мкл каждой реакционной смеси использовали для последующей амплификации с соответствующими праймерами. Для тотального скрининга статуса метилирования CG-динуклеотидов в геноме использовали CG-богатые праймеры. Метилирование регуляторного фрагмента гена *rrn5*, продуктом которого является 5S рРНК, определяли методом специфической МЧ-ПЦР с праймерами, фланкирующими сайт узнавания фермента в исследуемом участке ДНК. Дизайн праймеров, использованных в работе, был выполнен с помощью программ Primer3 (v.0.4.0) на основании нуклеотидных последовательностей, зарегистрированных в GenBank (табл. 1). Контролем полноты прохождения гидролитической реакции служила ПЦР рестриктов, полученных при идентичных условиях после гидролиза эндонуклеазой рестрикции MspI, не чувствительной к метилированию цитозинов. Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси на приборе “Терцик” (“ДНК-Технология”, Россия) с использованием набора для ПЦР (“МВИ Fermentas”). Условия термоциклирования были оптимизированы для каждого из амплифицируемых фрагментов.

ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в 1,7% агарозном геле (“Sigma”, США). В лунку геля наносили по 10 мкл ПЦР-смеси. Для электрофореза применяли 0,5xTBE-буфер (0,09 Трис, 0,09 М борной кислоты, 2 мМ ЭДТА, pH 8,0). Продукты реакции в геле визуализировали с помощью трансиллюминатора Vilber Lourmat ECX-15M (Франция) с длиной волны 312 нм, фотографировали в УФ-свете фотокамерой Sony DSC-W320.

Результаты и обсуждения. Метод МЧ-ПЦР позволяет анализировать статус метилирования как отдельных фрагментов генов, так и проводить тотальный скрининг дифференциально метилированных CG-динуклеотидов в геноме. На первом этапе МЧ-ПЦР происходит гидролиз ДНК метилчувствительными рестриктазами, на втором — амплификация исследуемых участков путем ПЦР. Присутствие метилированного цитозина в сайте узнавания метилчувствительной рестриктазы блокирует ферментативную реакцию, расщепления по сайту не происходит, следовательно, дальнейшая ПЦР с праймеров, соответст-

Таблица 1. Структура праймеров, использованных в МЧ-ПЦР

Праймеры	Структура праймеров
К регуляторному фрагменту гена <i>rrn5</i>	5'-GCA TGA AGA CGA AGG CGG CC-3' 5'-ACG AGG ACT TCC CAC GCC GG-3'
Для тотального скрининга CG-богатых участков генома	5'-AAC CCT CAC CCT AAC CGC GG-3' 5'-AAC CCT CAC CCT AAC CCG CG-3' 5'-GCA CCT GGG TTG ATG GCC GG-3' 5'-TTA GGG AAT AGT GGT CGG CC-3'

вующих участкам ДНК, вокруг сайта узнавания амплифицирует те фрагменты, в которых есть метилированный цитозин. Если в исследуемом сайте неметилирован цитозин, то метилчувствительная рестриктаза расщепляет его и при последующей ПЦР не образуются продукты амплификации [7, 8]. С помощью метода МЧ-ПЦР мы провели полногеномный анализ CG-участков, а также скрининг метилирования сайтов метилчувствительных рестриктаз HpaII и SmaI в регуляторном участке гена *rrn5* с целью обнаружения изменений эпигенетического статуса под действием облучения в ходе онтогенеза *L. usitatissimum* [9].

Полногеномный анализ CG-участков и отдельного гена позволяет определить статус метилирования в динамике и проследить характер его изменения. Так как задачей исследования было определение эпигенетических изменений в образцах, облученных дозами ионизирующего облучения в ходе онтогенеза, мы строили исследование таким образом, чтобы фиксировать параметры на разных стадиях. Стадии онтогенеза семядольных листьев условно обозначили как: С1, С2, С3, С4, каждая из которых соответствует этапам морфологически и биохимически значимых изменений.

В ходе тотального скрининга CG-богатых участков генома методом МЧ-ПЦР мы установили наличие дозовой зависимости. С увеличением дозы облучения возникали дополнительные продукты реакции, что указывало на появление новых сайтов метилирования под действием облучения острой рентгеновской радиацией (рис. 1, а).

Наличие дополнительных ампликонов в облученных образцах свидетельствует о том, что радиация спровоцировала метилирование сайта метилчувствительной рестриктазы HpaII. Для рестриктазы SmaI картина была аналогичной. Именно данные продукты ПЦР и представляют главный предмет наших поисков. Вероятно, гиперметилированные HpaII-сайты могут выступать в роли эпигенетических маркеров радиационного облучения. Исследование метилирования фрагмента гена *rrn5* также показало наличие дозозависимых изменений, выраженных в появлении дополнительных сайтов метилирования в облученных образцах (см. рис. 1, б).

В процессе старения листьев *L. usitatissimum* наблюдалось снижение уровня метилирования CG-динуклеотидов генома, а также изменение статуса метилирования во фрагменте гена *rrn5* в облученных образцах (см. рис. 1, в, г). Статус метилирования фрагмента гена *rrn5* изменился в сторону уменьшения модифицированных сайтов. Та картина дозовой зависимости повышения уровня метилирования, которая наблюдалась на начальной стадии онтогенеза (см. рис. 1, а, б), нивелировалась в процессе перехода к поздним стадиям онтогенеза.

Скрининг сайтов метилирования с помощью МЧ-ПЦР показал дозозависимое увеличение метилированных последовательностей преимущественно на начальных стадиях онтогенеза, однако на более поздних этапах запускаются процессы возрастного гипометилирования CG-динуклеотидов и в опытных образцах наблюдается картина значительного уменьшения метилированных HpaII-сайтов. Реакция с ферментом MspI не позволила выявить различия в профиле метилирования ДНК на разных стадиях онтогенеза по сайтам узнавания этой рестриктазы в контролях и облученных вариантах, так как с продуктами гидролиза этой рестриктазы, расщепляющей метилированные и неметилированные последовательности, не происходит амплификации в ходе МЧ-ПЦР.

Живые организмы постоянно находятся под воздействием ионизирующего излучения из природных источников. Растения, в отличие от животных, обладают большей устойчивостью к ионизирующей радиации. Тем не менее за счет того, что энергия заряженных частиц значительно превышает энергию внутримолекулярных связей, ионизирующее излу-

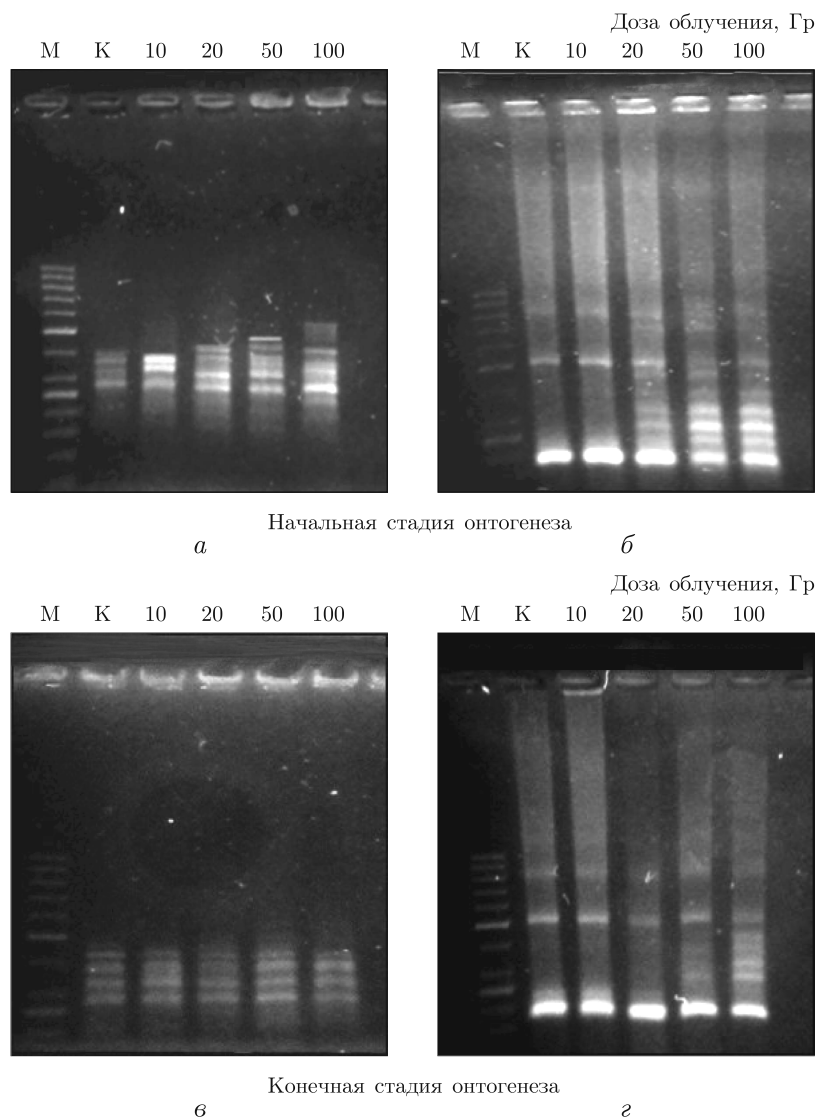


Рис. 1. Результаты скрининга CG-участков генома (а, в) и фрагмента гена *mtn5* (б, г) путем МЧ-ПЦР в образцах, облученных разными дозами рентгеновской радиации

чение способно проникать внутрь объекта и вызывать изменения его структур, повреждать химические связи молекул, входящих в состав клеток, нарушать клеточные структуры, процессы обмена веществ и физиологические функции целостного организма. Все это, в свою очередь, способствует активации деградационных механизмов, сопровождающих старение [10].

Радиация может вызывать гипо- и гиперметилирование сайт-специфических участков ДНК, что отражается на работе генов. Эпигеномные эффекты напрямую зависят от доз, видов и способов облучения и специфики объектов, подвергшихся воздействию [11]. Так, например, повышение уровня радиации вызывает у *Arabidopsis* и у других монокарпических растений увеличение тотального метилирования генома и гетерохроматиновых гистонов, что может рассматриваться как реакция стрессоустойчивости, необходимая для адаптации растений. Происходит это за счет активации процесса *de novo* метилирования ДНК,

обусловленного ответной реакцией на рост стресс-индуцированной транспозонной активности [12]. Существует гипотеза, что метилирование обеспечивает стабилизацию генома, поддерживая его постоянство в изменяющихся условиях. Это подтверждается тем, что искусственное снижение метилирования ДНК вызывает повышение уровня транспозонной активности и хромосомных перестроек. Под действием абиотического стресса также может происходить деацетилирование гистонов и деметилирование сайт-специфических последовательностей, что ведет к тотальному гипометилированию, сопряженному с ростом геномной нестабильности [13].

Обнаруженное в нашем опыте дозозависимое повышение уровня метилирования под действием рентгеновского облучения может быть обусловлено транспозонной активацией, вызывающей дополнительное метилирование. Вместе с тем картина возрастного снижения числа модифицированных сайтов облученных образцов объясняется процессами гипометилирования, происходящими в геноме стареющих клеток.

Существует предположение, что снижение уровня метилирования с возрастом является общебиологическим процессом, присущим как животным, так и некоторым монокарпическим растениям, у которых можно наблюдать в динамике четкую картину возрастной деградации. Множество экспериментов свидетельствуют о том, что старение животных клеток и уменьшение метилирования являются взаимосвязанными процессами [14]. Однако результаты опытов, проведенных на растительных организмах, не столь однозначны касательно возрастного падения уровня метилирования суммарной ДНК и отдельных функциональных последовательностей. На примере некоторых генов наблюдается обратный возрастному гипометилированию эффект. В процессе старения происходит переменное метилирование цитозина в палиндромах, наблюдается как понижение и повышение, так и поддержание стабильного уровня метилирования в зависимости от специфики изучаемых последовательностей [15]. Тем не менее изучение возрастной динамики метилирования ДНК может служить биологическим маркером определения темпов старения организма.

Метилирование ДНК растений варьирует в ходе онтогенеза, с момента прорастания семян до терминальных стадий развития, как отдельных органов, так и целостного растительного организма. Существуют четкие возрастные изменения паттернов метилирования ДНК у растений. Переход к каждой новой стадии онтогенеза характеризуется изменением эпигенетического статуса, обеспечивающего активацию или репрессию специфического набора генов. Одни гены метилируются по мере старения организма, другие, напротив, теряют метилированные сайты, вследствие деметилирования или вырезания модифицированных участков. При старении происходят изменения метилирования CpG-динуклеотидов. Образование неактивных участков хроматина приводит к инактивации генов в процессе старения [12].

Гипометилирование осуществляется путем уменьшения активности поддерживающих ДНК-метиلاз либо посредством ферментативного удаления метильных групп из ДНК. Последнее играет важную роль в реакциях поддержания эпигеномной пластичности в условиях действия стрессовых факторов. Происходящая в результате деметилирования активация генов супрессорных белков приводит к подавлению гена ДНК-метилазы. Таким образом, возрастное деметилирование запускает каскад реакций дополнительного деметилирования [11]. С возрастом падает метилирование промоторов регуляторных генов, таких как группы SAG (senescence associated genes), в результате чего происходит активация этих генов, ведущая к репрессии клеточных функций.

Вариабельная експрессия генов в онтогенезе растений обусловлена как генетическими, так и эпигенетическими процессами. Стрессовые факторы окружающей среды посредством эпигенома оказывают влияние на реализацию генетических программ растений [14].

В эксперименте получены данные, свидетельствующие о различии профилей метилирования ДНК семядольных листьев *L. usitatissimum* по сайтам узнавания метилчувствительных рестриктаз HpaII и SmaI на начальной и конечной стадиях онтогенеза. В конце онтогенеза листьев наблюдалось более низкое содержание сайтов узнавания этих эндонуклеаз, чем в начале. Воздействие нескольких доз острого рентгеновского облучения вызвало процессы дополнительного метилирования, т. е. повышение числа сайтов узнавания метилчувствительных рестриктаз в органе облученного растения. Это свидетельствует о способности эпигенома изменяться под действием повреждающих факторов внешней среды. Возрастное снижение числа модифицированных HpaII-сайтов во всех образцах объясняется процессами гипометилирования, происходящими в геноме стареющих клеток. Эпигеномный эффект, вызванный облучением на ранней стадии онтогенеза листа, в процессе старения нивелировался под влиянием внутренних деградационных процессов. Хотя особенности изменения эпигенома в процессе старения тканей и органов *L. usitatissimum* еще не выяснены полностью, анализ дифференциального метилирования ДНК на разных стадиях онтогенеза растения под влиянием такого стрессового фактора, как радиация, может привести к более полному пониманию механизмов регуляции старения и поможет определить, какая из компонент — средовая или генетическая — вносит больший вклад в процессы возрастной деградации.

1. Берестяна А. М., Гродзинський Д. М. Роль мутагенних факторів в процесі старіння живих організмів // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Серія Біологія. – 2011. – № 30. – С. 118–127.
2. Галицкий В. А. Эпигенетическая природа старения // Цитология. – 2009. – 51, № 5. – С. 388–397.
3. Остроумов Л. А., Просеков А. Ю., Мудрикова О. В. Метод выделения растительной ДНК из растений и продуктов питания на их основе // Изв. Самар. науч. центра РАН. – 2010. – 12, № 4. – С. 722–724.
4. Azmi K., Schonian G., Abdeen Z. Methods incorporating a polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism and their use as a gold standard in diagnosing Old World cutaneous leishmaniasis // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2011. – 71, No 2. – P. 151–155.
5. Benhattar J., Clement G. Methylation-sensitive. Single-strand conformation analysis: a rapid method to screen for and analyze DNA methylation. Methods // Mol.-Biol. – 2004. – 287. – P. 181–193.
6. Keyte A. L., Percifield R., Liu B. et al. Intraspecific DNA Methylation Polymorphism in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // J. Heredity. – 2006. – 97, No 5. – P. 444–450.
7. Guo W. L., Wu R., Zhang Y. F. et al. Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f // Plant Cell Rep. – 2007. – 26, No 8. – P. 1297–1307.
8. Кузнецова Е. Б., Стрельников В. В. Методы анализа метилирования ДНК // Мед. генетика. – 2006. – 11. – С. 3–11.
9. Берестяна А. М., Гродзинський Д. М., Крипка Г. В. Вікові зміни метилування ДНК сім'ядольних листків *Linum usitatissimum* за умови УФ-В опромінення // Доп. НАН України. – 2011. – № 7. – С. 143–147.
10. Косаковская И. В. Стрессовые белки растений. – Киев: Вид-во фітосоціол. центру, 2008. – 154 с.
11. Viswanathan C., Zhu J. RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants // Sci. China. Ser. C: Life Sci. – 2009. – 52, No 4. – P. 331–343.
12. Kalisz S., Purugganan M. Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution // Trends Ecol. and Evolut. – 2004. – 19. – P. 309–314.
13. Kapazoglou A., Tsiftaris A. Epigenetic Chromatin Regulators as Mediators of Abiotic Stress Responses in Cereals // Agricultural and Biological Sciences. Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations. – 2011. – Ch. 17. – P. 395–414.
14. Vanyushin B. F., Ashapkin V. V. DNA Methylation in Plants. – New York: Nova Science, 2011. – 152 p.

15. Brown J. C., Decker M. M., Fieldes M. A. A comparative analysis of developmental profiles for DNA methylation in 5-azacytidine-induced early-flowering flax lines and their control // Plant Sci. – 2008. – 175. – P. 217–225.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 21.02.2013

А. М. Берестяна

Вплив гострого рентгенівського опромінення на епігеном у ході онтогенезу *Linum usitatissimum*

*Досліджено зміни епігеному в онтогенезі *Linum usitatissimum*, що зазнав дії різних доз гострого рентгенівського опромінення. Статус метилування визначено методом метилчутливої полімеразної ланцюгової реакції. Виявлено залежність підвищення рівня метилування від дози опромінення, встановлено епігенетичні зміни в процесі старіння листків *Linum usitatissimum*.*

A. N. Berestyanyaya

Effects of hard X-ray radiation on the epigenome during ontogenesis of *Linum usitatissimum*

*The ontogenesis changes of the epigenome of *Linum usitatissimum* are investigated. This object was subjected to the action of different irradiation doses. Methylation status was determined by methylsensitive PCR. The study found the increasing dependence on the dose of methylation, and the epigenetic changes during the aging leaves of *Linum usitatissimum* are established.*