

А. М. Берестяна, академік НАН України Д. М. Гродзинський

Зміни метилування транскрибованої та сателітної ділянок геному в ході старіння сім'ядольних листків *Linum usitatissimum*, опроміненого рентгенівською радіацією

*Досліджено вплив рентгенівського опромінення на статус метилування ДНК сім'ядольних листків *Linum usitatissimum* в процесі старіння. Встановлено зміни профілю метилування у функціонально різних частинах геному як при опроміненні певними дозами, так і в процесі старіння. Розглянуто гіпотетичні механізми епігенетичної відповіді на дію іонізуючої радіації.*

Процеси метилування та деметилування ДНК еукаріот безпосередньо задіяні не тільки в механізмах регуляції експресії генів у ході росту, диференціювання, старіння клітин, а й у відповідних реакціях на стресові впливи. Вплив абіотичного стресу на епігеном монокарпічних рослин ще належним чином не вивчено. Однак відомо, що абіотичні фактори можуть викликати гіпо- та гіперметилування сайтспецифічних ділянок ДНК, що позначається на активності генів.

Такі абіотичні стреси, як посуха, засоленість ґрунтів, перепади температур, УФ-В, УФ-С, іонізуюча радіація та окислення впливають на різні процеси в клітинах і викликають через ланцюжок метаболічних реакцій зміни експресії генів, а також активують механізми стресової відповіді. Імовірно, це здійснюється за допомогою епігенетичних змін таких, як ацетилювання гістонів, метилування промоторів або кодуючих областей генів. Модифікації структури хроматину впливають на доступність транскрипційного апарату, факторів транскрипції, РНК-полімерази, нуклеосомної ДНК та визначають рівень експресії генів у відповідь на дію стимулу від оточуючого середовища. Відомо, що профіль метилування ДНК, модифікація гістонів, вміст міРНК та активність ДНК-метилтрансфераз відрізняються на різних стадіях онтогенезу рослини і при дії різних видів абіотичного стресу [1, 2].

В умовах глобального порушення клімату, зростання абіотичних стресів, зокрема короткохвильового та іонізуючого випромінювань, актуальним є дослідження онтогенетичних реакцій епігеному рослин у контексті радіаційно-індукованого старіння [3, 4]. Аналіз диференціального метилування ДНК листків опромінених рослин на різних стадіях онтогенезу може привести до більш повного розуміння процесів епігенетичної регуляції старіння.

Матеріали та методи. Досліджували дію рентгенівського опромінення на епігеном сім'ядольних листків *Linum usitatissimum* в процесі їх онтогенезу. Насіння *L. usitatissimum* опромінювали в дозах 10, 20, 50, 100 Гр на рентгенівській установці РУМ-17. Рослини вирощували, відбирали сім'ядольні листки на різних стадіях їх онтогенезу: С1, С2, С3, С4 — умовно позначених як стадії, на яких відбувається морфологічно та біохімічно значущі зміни структури листка, зокрема пожовтіння 0, 5, 25–50, 50–70% відповідно. Біоматеріал використовували для виділення ДНК та подальшого аналізу патернів метилування. ДНК виділяли за допомогою СТАБ-методу. Виділені препарати ДНК, концентрація яких становила 1–3 мкг/мкл, гідролізували рестриктазами *MspI*, *HpaII*, *SmaI*, *EcoRI*.

© А. М. Берестяна, Д. М. Гродзинський, 2015

Рестрикцію сумарної ДНК проводили у два етапи. На першому етапі ДНК досліджуваних зразків інкубували з ферментом рестрикції *EcoRI*, що не містив у складі свого сайту впізнавання CpG-динуклеотиди, а впізнавав та розщеплював послідовність 5'-GAATTC-3', яка зустрічається досить рідко. Рестриктазу брали в реакцію з 10-кратним надлишком (1 мкг ДНК — 10 од. акт. ферменту) та інкубували з ДНК в ампліфікаторі “Терцик” (Росія) у відповідних буферах протягом 16 год при температурах, вказаних виробником реагенту. На другому етапі обробки метилчутливими рестриктазами відбирали половину обробленої ДНК в реакцію з 5-кратним надлишком (1 мкг ДНК — 5 од. акт. ферменту) та інкубували протягом 2–3 год з рестриктазами, чутливими до статусу метилування CpG-динуклеотидів (*MspI*, *HpaII*, *SmaI*). Рестрикцію зупиняли нагріванням до визначеної для кожного ферменту температури. Для кожного ферменту підбирали умови та концентрацію, необхідні для повного гідролізу ДНК. У подальшому аналізі використовували аліквоту рестрикованої ДНК в ампліфікації з відповідними праймерами.

Дизайн праймерів, використаних у роботі, був виконаний за допомогою програми Primer3 (v.0.4.0) на основі нуклеотидних послідовностей, зареєстрованих в GenBank. Для оцінки структури праймерів використовувалася програма Oligo 4.1 Primer Analysis Software. Склад праймерів: ITS1 — 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3', ITS4 — 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3', ISSR-(AG)₈T, (AG)₈CT.

Досліджували епігеном методом метилчутливої ПЛР. Використовували попередньо оброблену рестриктазами ДНК. Ампліфікували послідовності рибосомних внутрішніх транскрибованих спейсерів (ITS — internal transcribed spacer) в суміші (25 мкл), яка містила 50 нг ДНК, по 0,2 мкм розчину кожного з праймерів ITS1, ITS4, 2,0 од. акт. Taq ДНК-полімерази (Fermentas), 2,5 мкл 10-кратного буфера для полімерази (Fermentas), 0,1 мМ кожного з dNTP (Fermentas), 2,5 мМ MgCl₂ (Fermentas). Ампліфікацію виконували на ампліфікаторі “Терцик” (Росія). Режим ампліфікації: денатурацію ДНК здійснювали при 94 °С протягом 1,5 хв, після чого проводили 5 циклів ампліфікації в режимі 94 °С — 10 с, 68 °С — 10 с, 72 °С — 20 с та 40 циклів ампліфікації в режимі 94 °С — 5 с, 68 °С — 5 с, 72 °С — 5 с; завершували ампліфікацію при 72 °С протягом 5 хв.

Також досліджували мікросателітні ділянки ДНК з використанням праймерів ISSR (inter-simple sequence repeat). Реакційна суміш для ISSR-ПЛР (50 мкл) містила 1,25 од. акт. Taq ДНК-полімерази, 5 мкл 10-кратного буфера, 4 мМ MgCl₂, 0,2 мМ кожного dNTP, 0,5 мкм праймера, 1,5 мкг сумарної ДНК, обробленої рестриктазами. Режим ампліфікації: денатурацію ДНК здійснювали при 94 °С протягом 5 хв, 40 циклів; подальшу денатурацію проводили при 94 °С — 45 с, відпал — при 52 °С — 45 с, елонгацію — при 72 °С — 90 с, кінцеву елонгацію — при 72 °С 7 хв. ПЛР-продукти розділяли шляхом електрофорезу в агарозному гелі.

З метою виявлення змін епігенетичного патерну в різних у функціональному відношенні одиницях геному під дією опромінення в ході онтогенезу сім'ядольних листків *L. usitatissimum* проведено аналіз статусу метилування ділянок внутрішнього транскрибованого спейсера (ITS) гена рибосомної РНК та сателітної ДНК (ISSR).

Результати та обговорення. Перед постановкою ампліфікації продуктів рестрикції проводили ампліфікацію сумарної ДНК, що дало можливість оцінити її вихідний стан. Як буде зазначено нижче, ампліфікація з продуктами рестрикції дає значущі відмінності між контролем та дослідними варіантами, а також між самими варіантами опромінення різними дозами. Структура нативної ДНК при ампліфікації як з праймерами до транскрибованої області, так і до сателітної ДНК була незмінною, що вказує на відсутність пошкоджень пер-



Рис. 1. Електрофореграма продуктів ПЛР нативної ДНК з ITS- (а) та ISSR-праймерами (б) у зразках, опромінених рентгенівською радіацією.
 М — маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder. К — контроль. Доза опромінення: 1 — 10 Гр; 2 — 20 Гр; 3 — 50 Гр; 4 — 100 Гр

винної структури ДНК. На рис. 1 наведені електрофореграми контролю нативності ДНК опромінених зразків з ITS та ISSR-праймерами. Для всіх варіантів досліду спостерігався однаковий результат. Відмінностей між контролем та опроміненими варіантами не виявлено, що свідчить про відсутність значущої фрагментації ДНК, зумовленої впливом опромінення. Це дає можливість говорити про зміни епігенетичного характеру, що відбуваються в транскрибованій та сателітній ділянках геному на фоні незмінної генетичної структури.

Розглянемо епігенетичні зміни, що відбуваються в транскрибованій ділянці геному при опроміненні рентгенівською радіацією. Електрофореграми ампліфікації ITS-праймерів з продуктами рестрикції показують відмінності в профілі метилування контрольних та опромінених рентгенівською радіацією зразків. Найбільш явні відмінності спостерігаються між контролем та варіантами опромінення в дозах 50 і 100 Гр (рис. 2). На електрофореграмах видно, що у зразках, які опромінено дозами 50 та 100 Гр, присутня більша кількість продуктів реакції, ніж в інших зразках. Вплив даних доз виражається в появі нових метильованих сайтів. Спрощення спектра ампліконів на стадії С4 свідчить про зменшення числа сайтів метилчутливих рестриктаз у процесі старіння.

Вибір транскрибованого спейсера (ITS) гена рибосомної РНК пов'язаний з тим, що локуси рДНК є типовим прикладом повторюваної послідовності, яка містить гіпо- та гіперметильовані сайти. У нормі рДНК гіпометильована, але в мінливих умовах можуть спостерігатися процеси гіперметилування. Послідовності рибосомних генів є хорошими мішенями для метилування *de novo*. Цим, можливо, пояснюється підвищення статусу метилування у відповідь на дію опромінення, яке ми спостерігали. Під дією стресу може відбуватися компартменталізація рДНК з утворенням інактивованих ділянок. Незрозумілою залишається роль метилування в сателітах, тобто в послідовностях, які ніколи не транскрибуються та беруть участь в утворенні конститутивного гетерохроматину [5–7].

Сателітна ДНК належить до області гетерохроматину та є більш метильованою порівняно з транскрибованою ДНК. Виявляється сателітна ДНК у вигляді тандемно розташованих багаторазово повторюваних послідовностей, довжина її варіює від декількох сотень до двох п. н. Послідовність та кількість повторів варіює навіть усередині одного виду. Сателітна ДНК — найбільш нестабільний компонент геному з високою швидкістю молекулярної еволюції. Значний рівень метилування у рослин обумовлений наявністю великої кількості сателітних послідовностей в гетерохроматині, оскільки саме сателіти найбільше метильовані [8–10].

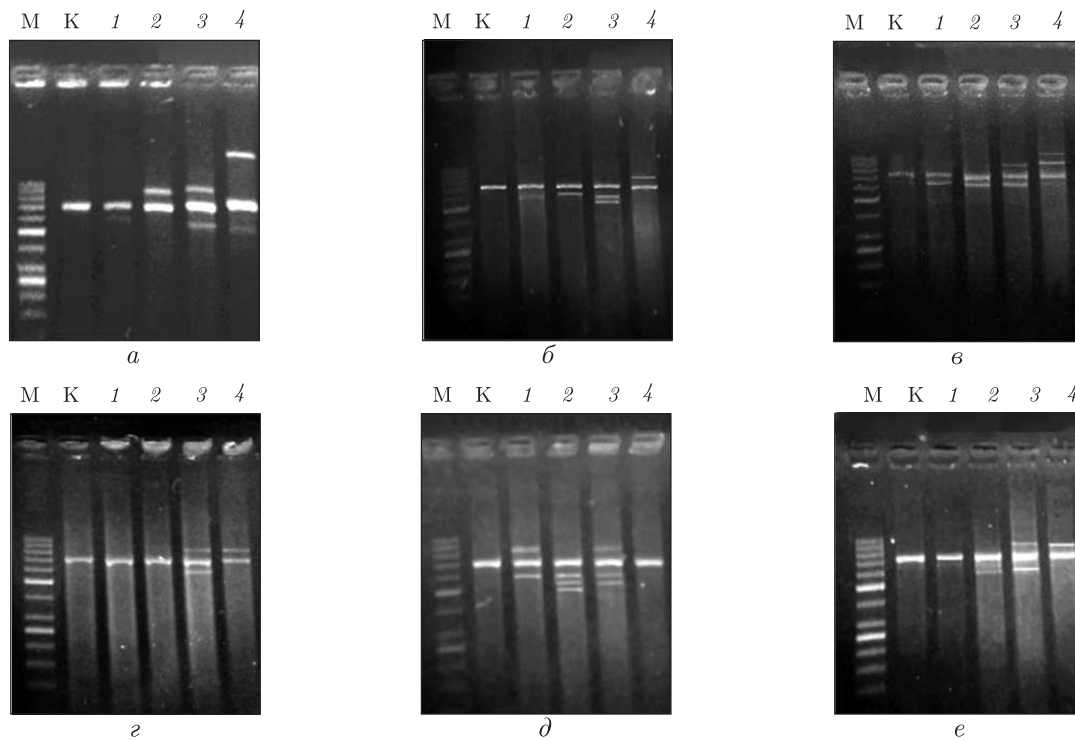


Рис. 2. Електрофореграми продуктів ампліфікації рестриктів ДНК з ITS-праймерами: *a, б* — *HpaII* (*a* — стадія С1; *б* — стадія С4); *в, г* — *MspI* (*в* — стадія С1; *г* — стадія С4); *д, е* — *SmaI* (*д* — стадія С1; *е* — стадія С4).

М — маркер молекулярної маси 100 бр DNA Ladder. К — контроль. Доза опромінення: 1 — 10 Гр; 2 — 20 Гр; 3 — 50 Гр; 4 — 100 Гр

Існує припущення, що високий ступінь метилювання сателітів необхідний для інактивації надлишкового геному. Метилювання сателітів інактивує транспозони, впливає на ДНК-ДНК взаємодії, запобігає рекомбінації між гомологічними сателітами, сприяє утворенню третинної структури хроматину, що обумовлює компактний стан гетерохроматину. У рослин з великим геномом сателіти, представлені сотнями тисяч одиниць, розсіяні по різних хромосомах. Незважаючи на те що сателітна ДНК не кодує білки, не бере участі безпосередньо в регуляції експресії структурних генів, їй приписується роль контролю механізмів генної активності [8].

Розглянемо зміни, що відбуваються в сателітній ділянці ДНК сім'ядольних листків *Linum usitatissimum* при опроміненні рентгеновською радіацією в зазначених вище дозах. Ми досліджували статус метилювання мікросателітних послідовностей, для чого застосовували ISSR-маркери при ампліфікації фрагментів ДНК, рестрикованих метилчутливими ретриктазами. Проводили порівняння за принципом поліморфізму довжин ампліфікованих фрагментів, перевіряли стабільність прояву тих чи інших ампліконів шляхом кілько-разового повторення ампліфікації з тим самим праймером на тому самому опроміненому рослинному матеріалі. Використані ISSR-праймери складаються з тандемних коротких нуклеотидних повторів та одного або декількох селективних нуклеотидів на 3'-кінці праймера. Дані маркери мають високу відтворюваність та точність результатів. Зазвичай у дослідженнях епігенетичного статусу ДНК класичний ISSR-аналіз не застосовується. Проте в поєднанні з метилчутливими рестриктазами метод виявився придатним для аналізу ста-

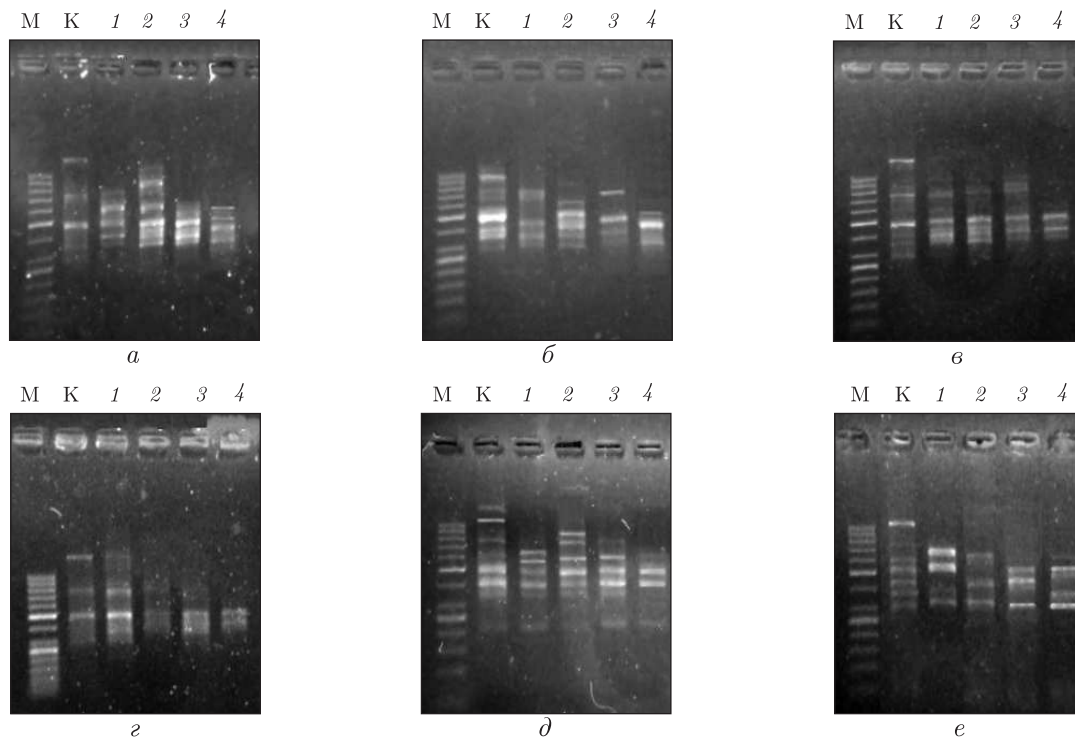


Рис. 3. Електрофореграми продуктів ампліфікації рестриктів ДНК з ISSR-праймерами: *a, б* — *HpaII* (*a* — стадія C1, *б* — стадія C4); *в, г* — *MspI* (*в* — стадія C1; *г* — стадія C4); *д, е* — *SmaI* (*д* — стадія C1; *е* — стадія C4).

М — маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder. К — контроль. Доза опромінення: 1 — 10 Гр, 2 — 20 Гр, 3 — 50 Гр, 4 — 100 Гр

тусу метилування мікросателітних послідовностей досліджуваного нами модельного організму.

Електрофореграма ампліконів сателітної ДНК свідчить про помітну відмінність їх спектра не тільки для контрольних та дослідних зразків, а й у межах варіантів опромінення різними дозами. Зміни пов'язані зі зникненням ампліконів в опроміненіх зразках. Цей результат не суперечить даним про достатній рівень нативності досліджуваної ДНК.

При ампліфікації *HpaII*-рестриктів ДНК з ISSR-праймерами у варіантах опромінення дозами 50 та 100 Гр спостерігається менше продуктів реакції, ніж у варіантах опромінення іншими дозами та контролі (рис. 3 *a, б*). На стадії C4 зменшення кількості ампліконів відбувається рівномірно у всіх зразках. Для *MspI*-рестриктів відмічається зменшення спектра ампліфікації по дозах та стадіях старіння (див. рис. 3, *в, г*). Для *SmaI*-рестриктів маємо аналогічний результат (див. рис. 3, *д, е*). Найбільш явними відмінностями є між контролем та варіантом опромінення 100 Гр.

Порівняння ISSR-спектрів зразків, опроміненіх різними дозами іонізуючого випромінювання, показало зменшення ампліфікованих фрагментів при збільшенні дози опромінення. Це свідчить про зменшення числа метильованих мікросателітних ділянок під дією даних видів опромінення. Ефект, який ми спостерігаємо, імовірно, обумовлений процесами деметилування сателітної ДНК. Одні механізми беруть участь у віковому деметилуванні ДНК, інші — в стресіндукованому деметилуванні. Причому цей процес повинен відбуватися швидше, ніж включення в ДНК нових метильних груп за допомогою ферменту ДНК-метилази.

Різні дози випромінювання викликають або епігенетичний сайленсінг шляхом метилування, деацетилювання гістонів, або, навпаки, — деметилювання, що супроводжується зростанням геномної нестабільності. Після гострого або хронічного опромінення відбувається зменшення радіочутливості рослин. Адаптація до іонізуючого випромінювання залежить від структурних та функціональних характеристик рослини, рівня клітинної активності під час опромінення та ступеня експресії ферментів, що запобігають пошкодженню ДНК. Реакції у відповідь на дію радіації включають первинні пошкодження структур клітинних компонентів, вторинні порушення процесів у клітині, запуск адаптаційних механізмів, відновлення пошкоджень. Однак адаптація відбувається тільки за умови радіаційного навантаження, яке не торкається стабільності та життєдіяльності структур рослинного організму [11].

Дослідження транскрибованих та сателітних ділянок геному сім'ядольних листків *L. usitatissimum* також показало зменшення метильованих сайтів у процесі старіння, що узгоджується з відомим феноменом залежного від віку деметилювання геному еукаріот. Залишається невідомим питання про те, який з процесів є первинним — деметилювання ДНК, що індукуює загибель клітин, чи інші процеси, які запускають програму клітинної загибелі, що викликає різке відокремлення метильних груп від ДНК [12]. В останньому випадку падіння рівня метилування можна розглядати як ранній показник апоптозу, при якому активується Mg^{2+} -залежна ендонуклеаза, що вилучає з ДНК сайти, які містять 5-метилцитозин. Виходячи з цього, деметилювання є індукованим процесом у ході апоптотичних реакцій. Однак, як видно на прикладах інших живих організмів, деметилювання являє собою феномен старіння на рівні ДНК. Дослідження зародків *Xenopus* показало, що втрата метилування ДНК в соматичних клітинах запускає механізм апоптозу за допомогою білка p53, який активує каскад протеолітичних ферментів [13].

Концепція вибіркового метилування генів підтверджена низкою літературних даних. Відомо, що під час проростання насіння рослин відбувається диференційне метилування сайтспецифічних послідовностей на фоні глобальної зміни рівня метилування ДНК. Так, наприклад, у геномі пшениці в період проростання спостерігається зниження рівня метилування в унікальних послідовностях ДНК [14]. У геномі *S. latifolia* високий рівень метилування ДНК присутній в апікальних меристемах пагона та кореня, середній — у сім'ядолях. Послідовне деметилювання ДНК починається з клітин ендосперму потім продовжується в клітинах гіпокотила та поширюється на сім'ядолі. За змістом модифікованих цитозинів ДНК генеративних органів достовірно відрізняється від ДНК вегетативних органів таких, як пагін та листя. Так, рівень метилування ДНК кореня моркви вищий, ніж сім'ядоль, метилування сім'ядоль вище, ніж генеративних органів. ДНК томатів у процесі онтогенезу також властива варіабельність метилування в різних органах. При проростанні *Arabidopsis* змінюється рівень метилування повторюваних послідовностей рДНК. Диференціальному метилуванню підпадають внутрішні залишки цитозину в CpCpGpG-сайтах, хоча рівень модифікації зовнішніх не змінюється. На пізніших стадіях відбувається гіперметилування даних повторів та зниження експресії генів 5S рРНК. Є дані, що в центромерних повторах ДНК насіння та проростків *Arabidopsis* рівень метилування менший, ніж у зрілих листках. Гіпометилування, можливо, є наслідком переходу від стану метаболічного спокою насіння до стану активно зростаючих проростків [15].

Таким чином, отримані дані про вплив рентгенівського опромінення на епігенетичний аспект старіння сім'ядольних листків *L. usitatissimum* свідчать про зміну профілю метилування в різних частинах геному як при дії певних доз опромінення, так і в процесі старіння.

Реакція на опромінення транскрибованої та сателітної ділянок геному була різною. Вивчено показники метилування сумарної ДНК, патернів сайтспецифічних послідовностей генів та сателітних ділянок. Встановлено збільшення числа метильованих сайтів у транскрибованій ділянці при дії високих доз рентгенівського опромінення. У сателітній ділянці, навпаки, із збільшенням доз опромінення зменшувалося число модифікованих сайтів. Імовірно, у відповідь на дію опромінення стресові реакції характеризуються процесами тотального гіпометилування сателітної ДНК на фоні оборотного гіперметилування окремих транскрибованих послідовностей. Можливо, це пов'язано з тим, що при гіпометилуванні активуються гени, які в нормі не активні, а при оборотному метилуванні пригнічуються гени, які повинні експресуватися. Отримані дані не суперечать показникам високого рівня нативності ДНК. На кінцевій стадії онтогенезу, як в транскрибованій, так і в сателітній областях геному, відбувалася різка зміна профілю метилування, що виражалось у спрощенні кількості продуктів ампліфікації в контрольних та дослідних зразках. У цьому відношенні реакція функціонально різних областей геному була аналогічною.

1. Sklensky D., Davies P. Resource partitioning to male and female flowers of *Spinacia oleracea* L. in relation to whole-plant monocarpic senescence // J. Exp. Bot. – 2011. – **62**, No 12. – P. 4323–4336.
2. 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.
3. Downen R., Pelizzola M., Schmitz R. Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress // Proc. Nat. Acad. Sci. – 2012. – **109**, No 32. – P. 12858–12859.
4. Koturbash J., Rugo R., Hendricks C. et al. Irradiation induces DNA damage and modulates epigenetic effectors in distant bystander tissue in vivo // Oncogene. – 2006. – **25**. – P. 4267–4275.
5. Chen S., Yao H., Han J. et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species // PLoS One. – 2010. – **5**, No 1. – e8613.
6. Schultz J., Maisel S., Gerlach D. et al. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota // RNA. – 2005. – **11**. – P. 361–364.
7. Rogers S. O., Bendich A. J. Ribosomal RNA genes in plants: Variability in copy number and in the intergenic spacer // Plant Mol. Biol. – 1987. – **9**. – P. 509–520.
8. Хемлебен В., Беридзе Т. Г., Бахман Л. Сателлитные ДНК // Успехи биол. химии. – 2003. – **43**. – С. 267–306.
9. Гостимский С. А., Кокаева З. Г., Боброва В. К. Использование молекулярных маркеров для анализа генома растений // Генетика. – 1999. – **35**. – С. 1538–1549.
10. Ugarkovic D. Functional elements residing within satellite DNAs // Eur. Mol. Biol. Organiz. – 2005. – **6**, No 11. – P. 1035–1039.
11. Mazzi E. A., Soliman K. F. Basic concepts of epigenetics. Impact of environmental signals on gene expression // Epigenetics. – 2012. – **7**, No 2. – P. 119–130.
12. Бердишев Г. Д., Коротаев Г. К., Ванюшин Б. Ф. и др. Исследование нуклеотидного состава ДНК в соматических тканях нерестующей горбуши // Цитология и генетика. – 1967. – **1**, № 3. – С. 56–60.
13. Vanyushin B. F., Ashapkin V. V. DNA Methylation in Plants. – New York: Nova Science, 2011. – 152 p.
14. Юсуфов А. Г. Биология старения цветковых растений. – Махачкала: Изд-во ДГУ, 1992. – 201 с.
15. Ming C., Shaolei L., Meng Y. Epigenetic performers in plants // Development, Growth and Differentiation. – 2010. – **52**, No 6. – P. 555–566.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

Надійшло до редакції 08.08.2014

А. Н. Берестяная, академик НАН Украины Д. М. Гродзинский

Изменения метилирования транскрибируемого и сателлитного участков генома в ходе старения семядольных листьев *Linum usitatissimum*, облученного рентгеновской радиацией

*Исследовано воздействие рентгеновского облучения на статус метилирования ДНК семядольных листьев *Linum usitatissimum* в процессе старения. Установлены изменения профиля метилирования в функционально разных частях генома как при определенных дозах облучения, так и в процессе старения. Рассмотрены гипотетические механизмы эпигенетического ответа на действие ионизирующей радиации.*

A. M. Berestyana, Academician of the NAS of Ukraine D. M. Grodzinsky

Changes in methylation of transcribed and satellite areas of the genome during aging the cotyledon leaves of *Linum usitatissimum* exposed to X-ray radiation

*The effect of X-irradiation on the DNA methylation status of cotyledon leaves *Linum usitatissimum* in the aging is studied. The changes in the methylation profile of functionally different parts of the genome at certain doses and in the process of aging are found. Hypothetical epigenetic mechanisms of response to ionizing radiation are considered.*