



УДК 577.24:575.224:581.1

© 2011

А. М. Берестяна, академік НАН України Д. М. Гродзинський,
Г. В. Кріпка

Вікові зміни метилування ДНК сім'ядольних листків *Linum usitatissimum* за умови УФ-В опромінення

*Досліджували вікові зміни метилування ДНК сім'ядольних листків *Linum usitatissimum*, що зазнали впливу УФ-В опромінення в діапазоні доз 4,23–12,69 кДж/м². Рівень метилування визначали за допомогою рестриктного аналізу. Ознак дозової залежності не виявлено, проте встановлені зміни спектра метилування в процесі старіння сім'ядольних листків *Linum usitatissimum*.*

Дослідження епігенетичної складової процесу старіння залишається на сьогодні однією з актуальних проблем. Рослинні та тваринні організми на пізніх стадіях онтогенезу зазнають ряд змін епігеному, зокрема рівня метилування. За однією з гіпотез, старіння супроводжується зменшенням рівня метилування ДНК, за іншою — його збільшенням. Відбувається це на фоні активації гідролітичних процесів у клітині [1, 2].

Відомо, що на онтогенез монокарпічних рослин впливає УФ-радіація, яка залежно від доз, способів опромінення, виду рослини спричиняє як прискорення, так і уповільнення темпів старіння, яке реєструється за змінами гідролітичної активності. Шляхи трансдукції сигналів на даний момент ще не вивчені детально [3]. За оцінками експертів, зниження озонного шару, яке на сьогодні досягло 0,5% на рік, та підсилення короткохвильових випромінювань може призвести до послаблення сформованих у ході еволюції захисних механізмів та порушення біохімічних і фізіологічних процесів [4, 5]. У зв'язку з цим виникає необхідність дослідження впливу УФ-В радіації на механізми епігенетичної ініціації гідролітичних процесів, які визначають темпи старіння рослинного організму.

Ми ставили за мету дослідження змін рівня метилування ДНК в процесі старіння сім'ядольних листків *Linum usitatissimum*, а саме: визначення рівня метилування окремих генів на різних стадіях онтогенезу, встановлення епігенетичних механізмів ініціації старіння та ступеня впливу радіації на цей процес. Епігеномні зміни оцінювали шляхом аналізу спектра метилування ДНК.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження були сім'ядольні листки монокарпічної рослини *Linum usitatissimum*. Сім'ядольні листки є зручними для дослідження, оскільки являють собою орган, який першим зазнає деградаційних змін у процесі старіння [6]. На ста-

дії 15-денного паростка рослини опромінювали джерелом УФ-В опромінення (лампа ДБ-30) у трьох дозах: 4,23, 8,46, 12,69 кДж/м² протягом 1,5 год. Виділення ДНК проводили на кожній стадії онтогенезу, які умовно позначили як: стадія юності (1 доба після опромінення), стадія зрілості (15 діб після опромінення), стадія передстаріння (30 діб після опромінення), стадія старіння (45 діб після опромінення).

Для виділення сумарної ДНК використовували стандартний метод. Листкові пластинки гомогенізували в рідкому азоті з додаванням лізуючого буфера (СТАВ буфера), що складався з 0,1 М трис-НСl (рН 9), 1,4 М NaCl, 20 мМ EDTA, 0,2% меркаптоетанолу, 2% цетилтриамоніум броміду. Після одержання гомогенної суспензії її закладали в пробірки об'ємом 1,5 мл та інкубували 1 год в термостаті при 65 °С, після цього центрифугували протягом 10 хв при 13000 об/хв. Надосадову рідину переносили в інші пробірки, додавали рівний об'єм суміші хлороформ : ізоаміловий спирт (24 : 1), ретельно перемішували та знову центрифугували протягом 10 хв. Після цього отриманий супернатант промивали рівним об'ємом хлороформу та знову центрифугували 5 хв при 13000 об/хв [7].

З метою очищення отриманої ДНК від рибонуклеїнових кислот до розчину ДНК додавали РНКазу (100 мкл/мл) та інкубували в термостаті при 37 °С протягом 1 год, після чого до суміші додавали 1,5 об'єму ізопропанолу, перемішували та інкубували щонайменше 1 год при -20 °С. Суміш центрифугували протягом 10 хв (13000 об/хв при 4 °С). Осад ДНК відмивали у 200 мкл 70% етанолу, залишаючи зразки висихати на повітрі. Розчиняли ДНК у 100 мкл ТЕ буфера (10 мМ трис-НСl, рН 9, 1 мМ EDTA, рН 8). Зразки зберігали в морозильній камері при -20 °С [7, 8].

Препарати виділеної тотальної ДНК використовували в подальшому для проведення ПЛР. Ампліфікацію здійснювали в суміші (25 мкл), що містила 50 нг ДНК, по 0,2 мкл розчину кожного з праймерів ITS1, ITS4, 2,0 од. акт. Таq ДНК полімерази ("Sigma", США), 2,5 мкл 10-кратного буфера для полімерази ("Promega", США), 0,1 мМ кожного з dNTP ("Perkin Elmer", США) та 2,5 мМ MgCl₂ ("Promega", США). Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі "Терцик" (Росія). Режим ампліфікації: денатурацію ДНК здійснювали при 94 °С протягом 1,5 хв, після чого виконували 5 циклів ампліфікації в режимі 94 °С — 10 с, 68 °С — 10 с, 72 °С — 20 с, 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 [9].

Структура використаних праймерів:

ITS1 — TCCG TAGGTGAACCTGCGG;

ITS4 — TCCTCCGCTTATTTGATATGC.

Ці праймери є комплементарними до генів рДНК, а саме до ділянок рибосомального внутрішнього транскрибуючого спейсера (ITS). Регіони ITS є консервативними послідовностями з високою видоспецифічністю. Завдяки високій багатокопійності їх зручно використовувати для ампліфікації поодинокого гена [10].

Результати ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу. Електрофорез проводили в 1,7% агарозному гелі ("Chemapol", Чехія) з додаванням етидіум броміду при 45 В/199 мА протягом 40 хв. Як електродний буфер використовували 0,089 М трис-боратний (ТВЕ) буфер. Розміри ампліфікованих фрагментів визначали за допомогою набору маркерів молекулярної маси від 100 до 3000 п. н. (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus, MBI Fermentas, Литва). Виявлялася присутність продуктів розміром 500–600 п. н., які є специфічними для *Linum* [11].

Отримані ITS ампліфіканти досліджували шляхом рестриктивного аналізу. Для рестрикції нами були використані ферменти: HpaII, MspI, Sau3A, DpnI, EoRV (MBI Fermentas).

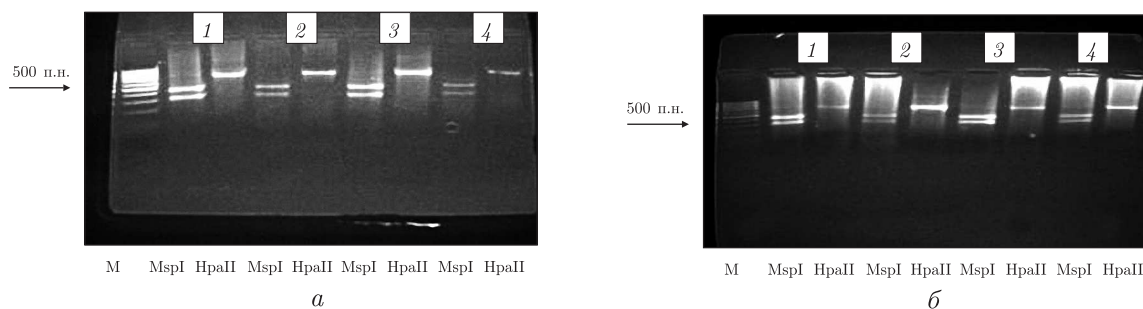


Рис. 1. Аналіз продуктів ампліфікації ДНК сім'ядольних листків льону на стадії молодості (а) і старіння (б) з праймерами ITS1 та ITS4 рестриктазами MspI, HpaII.

1 — неопромінений контроль; 2 — опромінення 4,23 кДж/м²; 3 — опромінення 8,46 кДж/м²; 4 — опромінення 12,69 кДж/м²

Рестриктний аналіз проводили в суміші (10 мкл), що містила 8 мкл ПЛР-продукту, 1 мкл рестриктоного буфера, 1 мкл ферменту, в такому режимі: з ферментами HpaII, MspI, Sau3A, DpnI, EcoRV — 37 °C 1 год; потім 65 °C — 5 хв [12]. Результати рестрикції аналізували методом електрофорузу.

Результати та обговорення. У зв'язку з тим, що передбачається можлива участь метильованого цитозину в утворенні неактивних ділянок хроматину, що призводить до ін-активації генів під час старіння, а для рослин частка метильованих залишків цитозину в ДНК в онтогенезі майже не відома, проводили дослідження ферментативної модифікації цитозину в складі ампліфікантів ДНК сім'ядольних листків різного віку та різних варіантів опромінення чутливими до метилування рестриктазами.

За допомогою рестриктоного аналізу визначали рівень метилування ампліфікантів ДНК сім'ядольних листків *Linum usitatissimum* на стадії молодості та старіння. Ступінь метилування цитозину оцінювали за допомогою рестриктаз HpaII та MspI. Це ізошизимери, що розрізають одну й ту саму послідовність ДНК, але по-різному реагують на її метилування. Рестриктуючий фермент MspI розрізає усі послідовності CCGG незалежно від того, метильовані вони чи ні, а HpaII розрізає тільки неметильовані CCGG-тетрамери [10].

Рестриктний аналіз проводили на кожній з чотирьох стадій онтогенезу, для трьох доз та контролю. На рис. 1 наведено результати рестриктоного аналізу продуктів ампліфікації ДНК за допомогою праймерів MspI та HpaII. Змін виявлено не було. Це може свідчити про відсутність варіабельності метилування за даною послідовністю.

Метилування залишків аденіну в ДНК виявляли за допомогою ізошизимерів: Sau3A (розщеплює як метильовані, так і неметильовані послідовності GATC); DpnI (розщеплює лише метильовані послідовності GMeATC); EcoRV (розщеплює лише неметильовані послідовності GAT^ATG) [12]. При використанні для рестриктоного аналізу продуктів ампліфікації ДНК праймерів Sau3A та DpnI були зафіксовані такі зміни (рис. 2). З'явилися нові сайти для рестриктази, яка впізнає метильований аденін. Рівень метилування даного гена збільшився у старих рослин по відношенню до молодих. Це може свідчити про вимикання певних послідовностей у процесі старіння рослини (див. рис. 2).

Таким чином, згідно з одержаними результатами, старіння листків льону супроводжується змінами характеру метилування ДНК, які виявляються на етапі старіння і пов'язані з вибірковою метилуванням чи деметилуванням залишків аденіну в рибосомних внутрішніх транскрибуючих спейсерах. Поряд з варіабельним метилуванням у процесі ста-

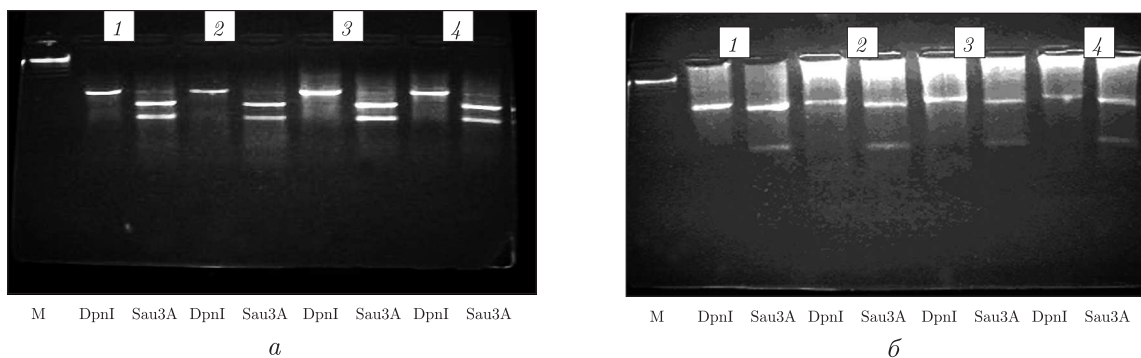


Рис. 2. Аналіз продуктів ампліфікації ДНК сім'ядольних листків льону на стадії молодості (а) і старіння (б) з праймерами ITS1 та ITS4 рестриктазами Sau3A, DpnI.

1 — неопромінений контроль; 2 — опромінення 4,23 кДж/м²; 3 — опромінення 8,46 кДж/м²; 4 — опромінення 12,69 кДж/м²

ріння залишків аденіну в сайтах специфічних послідовностей ДНК спостерігається сталий рівень метилування при різних дозах опромінення. Це свідчить про те, що в застосованому діапазоні доз УФ-В опромінення не впливає на характер епігенетичних змін у процесі старіння сім'ядольних листків льону.

На відміну від геному тварин, для яких характерне поступове зниження рівня метилування ДНК під час старіння, у складі ДНК рослин може здійснюватись як гіпометилування, так і гіперметилування [13]. На користь цього припущення свідчить те, що рівень метилування ITS вищий у більш старих листках.

Результати дослідження показали, що в онтогенезі сім'ядольних листків льону відбувається зміна спектра метилування ДНК, яка виявляється на етапі старіння і пов'язана з вибірковою метилуванням залишків аденіну в ділянках рибосомального внутрішнього транскрибуючого спейсера. Впливу різних доз УФ-В опромінення на епігеном монокарпічної рослини не виявлено.

1. Осивац Х. Д., Хаманн А. П. Реорганизация ДНК и биологическое старение // Биохимия. – 1997. – № 11. – С. 1491–1502.
2. Гвоздев В. А. Регуляция активности генов, обусловленная химической модификацией (метилированием) ДНК. – Москва: Наука, 1999. – 260 с.
3. Гродзинський Д. М., Шиліна Ю. В., Міхеев О. М. Механізми регуляції монокарпічного старіння рослин // Физиология и биохимия культ. растений. – 2003. – **35**, № 3. – С. 187–199.
4. Costas A. V. Global total ozone dynamics // Environ. Sci. and Pollut. Res. – 2000. – **3**, No 3. – P. 153–157.
5. Кузнецов В. В., Дмитриева Г. А. Физиология растений. – Москва: Высш. шк., 2005. – 736 с.
6. Гродзинский Д. М. Старение у растений // Надежность и элементарные события процессов старения биологических объектов: Сб. науч. тр. – Киев: Наук. думка, 1986. – 208 с.
7. Dellaporta S., Wood J. A plant DNA minipreparation // Plant Mol. Biol. Rep. – 1983. – **1**. – P. 19–21.
8. Varma A. Mycorrhiza manual. – Berlin; Heidelberg; New York: Springer, 1998. – 412 p.
9. White T., Bruns T., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PSR Protocols. A guide to methods and applications / Eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky. – San Diego: Academic Press, 1990. – P. 315–322.
10. Bruns T., Taylor J. Fungal molecular systematics // Annu Rev. Ecol. Syst. – 1991. – **22**. – P. 525–564.
11. Маниатис Т., Фроч Э. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – Москва: Мир, 1984. – 480 с.
12. Redecker D., Thierfelder H., Walker C. Restriction analysis of PCR – Amplified Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA as a Tool for Species Identification in Different Genera of the Order Glomales // Appl. and Environ. Microbiol. – 1997. – **63**, No 5. – P. 1756–1761.

13. Strid A., Chow W. S., Anderson J. M. UV-B damage and protection at the molecular level in plants // Photosynth. Res. – 1994. – **39**. – P. 475–489.

*Інститут клітинної біології
та генетичної інженерії НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 04.11.2010

A. M. Berestyana, Academician of the NAS of Ukraine **D. M. Grodzinsky**,
G. V. Kripka

**Age-related changes of DNA methylation in cotyledonous leaves of
Linum usitatissimum under UV-B radiation**

*The age-related changes of DNA methylation in cotyledonous leaves of *Linum usitatissimum* subjected to UV-B radiation in the interval 4.23–12.69 kJ/m² have been studied. The level of methylation is determined by the restriction analysis. Although the study showed no dose-dependence, some methylation spectrum changes in the process of aging of the *Linum usitatissimum* cotyledonous leaves occurred.*