

А.П. КРАВЕЦ¹, Т.А. МЮССЕ², А.В. ЛИТВИНЧУК²,
Ш. ОСТЕРМИЛЛЕР², Г.С. ВЕНГЖЕН¹,
Д.М. ГРОДЗИНСКИЙ¹

¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

² Университет Южной Каролины, Коламбия, США
E-mail: kravetsap@yahoo.com

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ γ-ОБЛУЧЕНИИ СЕМЯН



*Исследованы изменения профиля метилирования ДНК у двух сортов пшеницы – Альбатрос одесский и Донецкая-48, семена которых в течение 4 мес подвергали γ-облучению с малой мощностью дозы ($3 \cdot 10^{-7}$ Гр/с). Для анализа использовано шесть рестриктаз. Показано изначальное различие в профиле метилирования ДНК изученных сортов. Установлено, что хроническое облучение приводит к повышению уровня метилирования по сайтам узнавания для ферментов *GluI* и *Sou3AI*, а также к снижению этого показателя по сайтам узнавания эндонуклеаз *GlaI* и *HpaII*. Не выявлено изменений уровня метилирования по сайтам узнавания рестриктаз *MboI* и *MspI*. Показано значимое повышение уровня хромосомных aberrаций при этой же накопленной дозе хронического облучения. Обсуждается роль изменений профиля метилирования ДНК в развитии реакций радиационного повреждения и формирования защитных реакций организма.*

© А.П. КРАВЕЦ, Т.А. МЮССЕ, А.В. ЛИТВИНЧУК,
Ш. ОСТЕРМИЛЛЕР, Г.С. ВЕНГЖЕН, Д.М. ГРОДЗИНСКИЙ,
2010

Введение. В современных условиях широко-масштабного загрязнения окружающей среды долгоживущими радионуклидами чрезвычайно актуальной является оценка биологической эффективности действия на генетический аппарат хронического облучения низкой интенсивности [1, 2]. Существуют доказательства более высокой эффективности хронического облучения по сравнению с острым облучением в той же или более высокой дозе [2]. Эти исследования показали, что отклик системы на хроническое облучение является сложным динамическим процессом, проходящим через ряд этапов, объединяя быстро и медленно протекающие процессы. Одно из объяснений этого феномена может быть связано с отличиями, по сравнению с реакцией на острое облучение, процессов стимуляции и индукции защитных и восстановительных реакций в условиях сверхнизких, но постоянных воздействий.

Известно, что метилирование ДНК является одним из важнейших и полифункциональных механизмов биологической регуляции, играя ключевую роль в ряде эпигенетических процессов: геномном импринтинге, дифференцировке, апоптозе и морфогенезе. Известно также, что метилирование цитозина является природным фактором мутагенеза [4]. Гипометилирование ДНК является показателем канцерогенеза [5], а также наблюдается при остром облучении в больших и малых дозах [6, 7]. В связи с появлением данных о дозовой зависимости феномена гипометилирования [5, 7] было предложено рассматривать этот показатель как биомаркер радиационного поражения [7].

Растения занимают первое место по относительному содержанию метилированного цитозина – до 30 %. Метилирование ДНК растений происходит с участием четырех классов метилтрансфераз [4], обеспечивая большое разнообразие сайтов метилирования. Именно на растительных объектах получены данные о связи гиперметилирования ДНК и адаптации к абиотическому стрессу [8, 9]. Эти факты позволяют предположить существование весьма сложной динамической взаимосвязи процессов метилирования и отклика организмов на абиотический стресс. Особенно это относится к хроническим воздействиям. Для ответа биосистемы на хронические воздействия характерна сложная временная структура, объединяющая развитие реакций повреждения, стимуляции и угнете-

ния [1–3]. Этот переходный процесс может заканчиваться адаптацией или функциональным истощением организма [1, 3].

В последнее время появились данные об участии в процессах метилирования Рiwi-белков и рiRNA, что позволяет предположить существование сложной иерархической связи между возникшими повреждениями биологических макромолекул и химическими модификациями ДНК [10, 11].

Настоящее сообщение отражает первый этап исследования формирования реакций на хроническое воздействие с использованием двух показателей радиационного воздействия — изменений уровня метилирования и выхода цитогенетических аномалий в условиях хронического облучения. Уровень хромосомных aberrаций является общепризнанным маркером радиационного воздействия [12], и последовательное сопоставление этого показателя с изменениями метилирования ДНК может дать ответ на вопрос о связи метилирования с процессом развития радиационного поражения и перепрограммирования метаболизма в связи с активным формированием защитных реакций — восстановительных и адаптивных.

Материал и метод. Экспериментальное исследование проводили на семенах, а также на 3–10-дневных проростках двух сортов пшеницы — Альбатрос одесский и Донецкая-48. Сухие семена как объект хронического радиационного воздействия имеют определенные преимущества, поскольку их физиологическое и метаболическое состояние изменяется незначительно на протяжении всего периода облучения.

Источником пролонгированного облучения был сосуд с раствором соли $^{137}\text{CsCl}$, расположенный в центре штатива с концентрическими щелями для фиксации пакетов с семенами. Семена проращивали в чашках Петри (по 50 шт.) на увлажненной фильтровальной бумаге, в термостате при температуре 23 °С.

В настоящей работе приведены результаты, полученные при облучении с начальной мощностью дозы $3 \cdot 10^{-7}$ Гр/с. Накопленная сухими семенами доза составляла около 1 Гр. Облучение, как и хранение контрольных семян, происходило при температуре 10–14 °С.

Апексы помещали в фиксатор Бродского (уксусная кислота : этиловый спирт : форма-

лин = 0,3:1:3) на 2 ч. Затем отмывали 70%-ным этиловым спиртом (3–4 смены). Мацерацию проводили с помощью щелочного гидролиза 20 % NaOH на протяжении 2 ч. Потом препараты 15 мин отмывали дистиллированной водой. Окраску осуществляли смесью ацетоорсеина и соляной кислоты (ацетоорсеин : 1 М HCl = 1:1) в течение 16–18 ч. Окрашенный материал промывали 45%-ной CH_3COOH , затем готовили давленные препараты. Использовали по 10 параллельных проб и анализировали по 5–10 тыс. клеток. Учитывая специфику растительных тканей, определение хромосомных aberrаций проводили анафазно-телофазным методом, при этом выборка из клеток в анафазе составляла не менее 200–250.

ДНК выделяли из контрольных и облученных десятисуточных проростков пшеницы, для этого использовали MagaZorb DNA Mini-Prep Plant Kit. Концентрацию ДНК в образцах определяли на BioPhotometer 6131. Электрофорез ДНК проводили в 1%-ном агарозном геле (BioRad) с TAE (1 \times) буфером и этилтиобромином в качестве красителя при напряжении 5 В/см.

Для рестрикции ДНК использовали эндонуклеазы HpaII, Sau3AI, MboI, MspI («Promega Corporation», США), а также GluI и GlaI («SibEnzyme Ltd», РФ). Реакции с рестриктазами HpaII, MboI, Sau3AI, MspI проводили в течение 4 ч (рекомендуемое время реакции 1–4 ч) при 37 °С без последующей остановки реакции.

Реакцию с GluI осуществляли в течение 16 ч при температуре 37 °С, реакцию с GlaI — в течение этого же времени при температуре 30 °С. Реакции с этими двумя эндонуклеазами требовали тепловую инактивацию длительностью 20 мин при температуре 65 °С.

Рестриктазы и сайты узнавания/рестрикции
(N — любое основание, * — сайт рестрикции)

GluI	5'(5mC) G (5mC)*NG (5mC) G...3 3'G (5mC)*GN*(5mC) G (5mC)...5'
GlaI	G(5mC) G (5mC)*AT (5mC)G*(5mC) G
Sou3AI	5'С...*GATC...3'...CTAG*...5'
MspI	5'С...С*CG, С...5'
HpaII	5'...С*CGG...3' 3'G...G С*С...5'
MboI	5'...С*CGC...3' 3'...CT...AG *С...5'

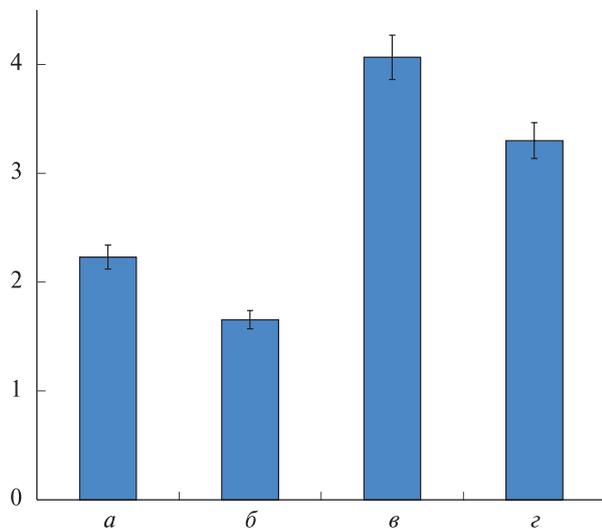


Рис. 1. Выход хромосомных aberrаций в меристеме корней трехдневных проростков сортов пшеницы Донецкая-48 (а) и Альбатрос одесский (б) в контроле и в условиях хронического облучения (в, г)

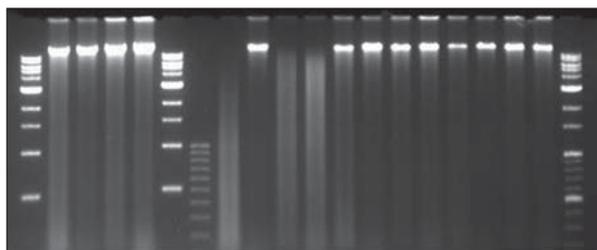


Рис. 2. Электрофореграмма контроля нативности выделенной ДНК из контрольных и облученных образцов, а также продуктов реакции с рестриктазами Sou, MspI, HpaII: M₁ – высокомолекулярный маркер; M₂ – низкомолекулярный маркер; 1 – Донецкая-48, контроль; 2 – Альбатрос одесский, контроль; 3 – Донецкая-48, хроническое облучение; 4 – Альбатрос одесский, хроническое облучение; 5 – Донецкая-48, контроль + рестриктаза Sou3AI; 6 – Альбатрос одесский, контроль + рестриктаза Sou3AI; 7 – Донецкая-48, хроническое облучение + рестриктаза Sou3AI; 8 – Альбатрос одесский, хроническое облучение + рестриктаза Sou; 9 – Донецкая-48, контроль + рестриктаза MspI; 10 – Альбатрос одесский, контроль + рестриктаза MspI; 11 – Донецкая-48, хроническое облучение + рестриктаза MspI; 12 – Альбатрос одесский, хроническое облучение + рестриктаза MspI; 13 – Донецкая-48, контроль + рестриктаза HpaII; 14 – Альбатрос одесский, контроль + рестриктаза HpaII; 15 – Донецкая-48, хроническое облучение + рестриктаза HpaII; 16 – Альбатрос одесский, хроническое облучение + рестриктаза HpaII

Количество рестриктаз в соответствии с сертификатами компаний-производителей брали из расчета 4 ед. акт. GluI и HpaII на 1 мкг ДНК; по 5 ед. акт. Mbol, Sau3AI, MspI и по 8 ед. акт. GluI на 1 мкг ДНК.

Использовали два маркера молекулярных масс ДНК («BioLabs», компания New England). Высокомолекулярный маркер (M₁) содержал фрагменты 10, 8.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.0, 1.5, 1.0 и 0.5 Kb; низкомолекулярный маркер (M₂) – фрагменты на 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 и 0,1 Kb.

В лунки геля вносили по 20 мкл общего объема реакционной смеси, содержащей по 10 мкг ДНК.

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты цитогенетического анализа (рис. 1) свидетельствуют об определенных различиях в уровне цитогенетических аномалий у использованных сортов. При одинаковых условиях хранения и дозе хронического облучения семян в меристеме корней проростков сорта Донецкая-48 формируется как более высокий уровень хромосомных aberrаций в контроле, так и большая частота их формирования при облучении.

Электрофореграмма, приведенная на рис. 2, объединяет результаты контроля нативности выделенной ДНК и результаты при рестрикции тремя эндонуклеазами. Полученные данные свидетельствуют о различии профилей метилирования по сайтам узнавания рестриктазы Sou3AI для контрольных образцов этих сортов. Сорт Альбатрос одесский в контроле имеет более низкое содержание сайтов узнавания этой эндонуклеазы, чем Донецкая-48, однако при хроническом облучении семян этого сорта наблюдается большее по сравнению с сортом Донецкая-48 повышение числа сайтов узнавания этой рестриктазы (гиперметилирование), и результат реакции для обоих сортов оказывается одинаковым.

Реакция с MspI не позволила выявить различия в профиле метилирования ДНК упомянутых сортов по сайтам узнавания этой рестриктазы в контроле, а также появления различий при хроническом облучении.

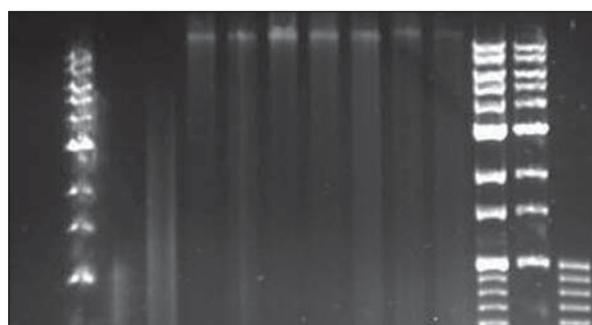
Реакция с HpaII свидетельствует о сходстве изученных сортов по исходному уровню метилирования по сайтам узнавания этой рестрик-

тазы и некотором снижении числа специфических сайтов метилирования для этого фермента при хроническом облучении.

Реакция с рестриктазой *GlaI* (рис. 3) также свидетельствует о различии профиля метилирования по сайтам узнавания этого фермента у исследованных сортов в контроле. При этом, как и для рестриктазы *Sou3A1*, пшеница сорта Донецкая-48 содержит большее количество сайтов метилирования, специфичных для этой эндонуклеазы. У обоих сортов зафиксировано снижение числа сайтов узнавания при хроническом облучении. Наблюдается общность профиля метилирования по сайтам узнавания рестриктазы *GluI* для контрольных образцов и повышение метилирования при хроническом облучении.

Полученные результаты свидетельствуют о различии исходного профиля метилирования у исследованных сортов. При этом можно предположить существование обратной зависимости между уровнем метилирования ДНК и выходом хромосомных aberrаций при хроническом облучении.

Результаты, полученные при проведении реакций рестрикции, свидетельствуют об общих тенденциях изменения метилирования по сайтам узнавания использованных эндонуклеаз. Результаты не показывают однозначного соответствия изменений в уровне хромосомных aberrаций как биомаркера радиационного поражения, а также общего снижения метилирования. Если стать на точку зрения, высказанную в ряде работ [5–7] о том, что облучение ведет к гипометилированию, которое можно рассматривать как биомаркер радиационного поражения, то при повышении уровня хромосомных aberrаций следовало бы ожидать неизбирательного гипометилирования ДНК. Существуют факты, свидетельствующие о повышении метилирования ДНК при адаптации к пролонгированному абиотическому стрессу [8, 9], однако в нашем эксперименте наблюдаются как сайт-специфическое повышение, так и понижение уровня метилирования ДНК. То, что наблюдается в нашем эксперименте, скорее свидетельствует в пользу предположения о формировании активной реакции, направленной на метаболические перестройки, которые свя-



М₁ 1 2 3 4 5 6 7 8 М₁ М₁ М₂

Рис. 3. Электрофореграмма продуктов реакции с рестриктазами *GlaI* и *GluI*: М₁ – высокомолекулярный маркер; М₂ – низкомолекулярный маркер; 1 – Донецкая-48, контроль + рестриктаза *GlaI*; 2 – Альбатрос одесский, контроль + рестриктаза *GlaI*; 3 – Донецкая-48, хроническое облучение + рестриктаза *GlaI*; 4 – Альбатрос одесский, хроническое облучение + рестриктаза *GlaI*; 5 – Донецкая-48, контроль + рестриктаза *GluI*; 6 – Альбатрос одесский, контроль + рестриктаза *GluI*; 7 – Донецкая-48, хроническое облучение + рестриктаза *GluI*; 8 – Альбатрос одесский, хроническое облучение + рестриктаза *GluI*

заны с формированием защитных реакций. Полученные данные являются отражением лишь одного из этапов в этом сложном многофазном процессе.

Авторы выражают глубокую благодарность директору Института физиологии растений и генетики НАН Украины академику В.В. Моргуну за любезно предоставленные семена пшеницы, а также заведующей отделом генетической инженерии этого института Е.Н. Тищенко за помощь в освоении методик и консультаций при обсуждении полученных результатов.

*A.P. Kravets, T.A. Mousseau, A.V. Litvinchuk,
Sh. Ostermiller, G.S. Vengen, D.M. Grodzinskiy*

WHEAT PLANT DNA METHYLATION PATTERN CHANGES AT SEED CHRONIC γ -IRRADIATION

Alterations of DNA methylation patterns of wheat two varieties – Odessa' albatross and Donetsk 48 have been studied. Seeds were irradiated for 4 months with low dose rate ($3 \cdot 10^{-7}$ Gy/s). Six restriction endonucleases were used in the experiments. Primary distinction in DNA methylation patterns of the studied varieties has been demonstrated. The chronic irradiation resulted in the increase of methylation level on the sites of recognition for *GluI* and *Sou3A1* and in the decline of this index for the

sites of recognition of *GlaI* and *HpaII*. The meaningful increase of chromosome aberration levels was demonstrated at the same accumulated dose of chronic irradiation. The role of changes of DNA methylation patterns in development of radiation damage and organism protective reactions is discussed.

О.П. Кравець, Т.А. Мюссе, А.В. Литвинчук,
Ш. Остерміллер, Г.С. Венгжен, Д.М. Гродзинський

ЗМІНИ ПРОФІЛЮ МЕТИЛЮВАННЯ ДНК РОСЛИН ПШЕНИЦІ ПРИ ХРОНІЧНОМУ γ-ОПРОМІНЕННІ НАСІННЯ

Досліджено зміни профілю метилювання ДНК у двох сортів пшениці – Альбатрос одеський та Донецька-48, насіння яких впродовж 4 міс піддавали γ-опроміненню з малою потужністю дози ($3 \cdot 10^{-7}$ Гр/с). Для аналізу використано шість рестриктаз. Показана первинна різниця у профілі метилювання ДНК досліджених сортів. Встановлено, що хронічне опромінення призводить до підвищення рівня метилювання за сайтами пізнавання для ферментів *GluI* та *Sou3AI*, а також до зниження цього показника за сайтами пізнавання ендонуклеаз *GlaI* та *HpaII*. Не виявлено змін рівня метилювання за сайтами пізнавання рестриктаз *MboI* та *MspI*. Показано значне підвищення рівня хромосомних аберацій при такій же накопиченій дозі хронічного опромінення. Обговорюється роль змін профілю метилювання ДНК в розвитку реакцій радіаційного пошкодження та формування захисних реакцій організму.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Шафиркин А.В., Горлов В.Г. Модельное описание кинетики эффективного поражения организма при протяженных и хронических лучевых воздействиях // Радиобиология. – 1978. – 18, № 2. – С. 253–258.
2. Кравець А.П., Гатилова Г.Д., Гродзинский Д.М. Динамика выхода цитогенетических аномалий в меристеме проростков при хроническом облучении семян // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2008. – 48, № 3. – С. 208–219.

3. Васин А.Л., Шафиркин А.В. Количественные критерии перехода от нормы к патологии при хроническом действии физических факторов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2006. – 46, № 4. – С. 498–507.
4. Тищенко Е.Н., Дубровная О.В. Эпигенетическая регуляция. Метилирование ДНК генов и трансгенов растений. – Киев : Логос, 2004. – 232 с.
5. Pogribny I., Koturbash I., Tryndyak V., Hudson D., Stevenson S.M.L., Sedelnikova O., Bonner W., Kovalchuk O. Fractionated low-dose radiation exposure leads to accumulation of DNA damage and profound alterations in DNA and histone methylation in the murine thymus // Mol. Cancer Res. – 2005. – 3. – P. 553–561.
6. Bernal A., Dolinoy D.C., Huang D., Jirtle R.L. Low dose radiation alters the fetal epigenome // https://www.orau.gov/lowdose2009/abstracts/Jirtle_Randy.pdf
7. Kim S.Y., Yun H.J., Kwon Y.Y., Kim E.J., Kang C.M. Possible biomarkers for low dose radiation exposure and/or for old exposure // <http://www.dartmouth.edu/~epctr/biodose2008/pdf/B10.pdf>
8. Dyachenko O.V., Zakharchenko N.S., Shevchuk T.V., Bohnert H.J., Cushman J.C., Buryanov Ya.I. Effect of hypermethylation of CCWGG sequences in DNA // Biochemistry. – 2006. – 71, № 4. – P. 461–465.
9. Kovalchuk O., Burke P., Arkhipov A., Kuchma N., James S.J., Kovalchuk I., Pogribny I. Genome hypermethylation in *Pinus sylvestris* of Chernobyl—a mechanism for radiation adaptation? // Mutat. Res. – 2003. – 529, № 1/2. – P. 13–20.
10. Vagin V.V., Sigova A., Li Ch., Hervé Seitz H., Gvozdev V., Zamore P.D. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline // Science. – 2006. – 313, № 5785. – P. 320–324.
11. Aravin A.A., Sachidanandam R., Girard A., Fejes-Toth K., Hannon G.J. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control // Science. – 2007. – 316. – P. 744–747.
12. Brooks A.L. Biomarkers of exposure, sensitivity and disease // Int. J. Radiat. Biol. – 1999. – 75, № 12. – P. 1481–1503.

Поступила 21.04.09