

Вариабельность метилирования внешнего цитозина CCGG-последовательностей ДНК побегов и каллусов меристем подсолнечника

Е. Н. Тищенко, Л. П. Корж

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
Ул. Васильковская, 31/17, Киев, 03022, Украина

Выявлено интенсивное метилирование внешнего цитозина CCGG-последовательностей ДНК первичных каллусов апикальных меристем побега и корня, а также обширное неометилирование этого сайта ДНК побегов развивающихся проростков Helianthus annuus L. Предположено участие энзиматической модификации цитозина в клеточной дифференцировке подсолнечника, возможно, на уровне экспрессии тканеспецифичных генов.

Введение. Энзиматическое метилирование ДНК рассматривается как один из возможных механизмов клеточной дифференцировки эукариот, реализуемый на разных уровнях функционирования генома, в том числе экспрессии [1]. После получения убедительных доказательств участия энзиматического метилирования цитозина в регуляции экспрессии генов позвоночных [2, 3] выявлена обратная корреляция уровня метилирования ДНК и транскрипции генов высших растений [4–9]. Для многоклеточных организмов имеются сведения о кажущемся отсутствии корреляции метилирования и активности индивидуальных генов [10, 11]. К тому же регуляторные области ряда генов эукариот не содержат потенциально метилируемых CG- и CNG- (N — любой нуклеотид) сайтов ДНК и, следовательно, не способны к подобной модификации *in vivo* [12]. Этот способ регуляции транскрипции генов, видимо, не является универсальным, так как в ДНК некоторых эукариот, например дрозофилы, применяемыми в настоящее время методами вообще не выявлено метилируемых оснований [2, 10]. Для генома растений, который в отличие от генома других эукариот характеризуется избыточностью метилированных оснований цитозина [2, 13], сведений об отсутствии энзиматического метилирования ДНК не имеется.

Ранее нами было показано, что на первых этапах онтогенеза в развивающихся проростках подсолнечника осуществляется дифференциальная экспрессия генов [14]. При анализе состояния метилирования ДНК корней и побегов 5-дневных этиолированных проростков подсолнечника, которым присущи резкие различия в разнообразии яРНК, в том числе и пре-мРНК, а также транслируемых мРНК (в корнях их почти в 4 раза меньше, чем в побегах), нами выявлена органоспецифичность энзиматического метилирования внешнего цитозина тринуклеотида CCG, входящего в сайт узнавания рестриктазы *MspI*. Он сильно метилирован в корнях и интенсивно неометилирован в побегах 5-дневных этиолированных проростков, то есть уровень экспрессии генома как единой организованной структуры обратно коррелировал с уровнем метилирования CCGG-последовательностей ДНК подсолнечника. Исходя из этого было сделано предположение о том, что указанный палиндромный участок ДНК может иметь критическое значение для транскрипции тканеспецифичных генов этого вида. Следовательно, внимания заслуживает и анализ состояния метилирования ДНК органов проростка в ходе их роста и дифференцировки, а также меристем — зон недифференцированных, интенсивно делящихся клеток, в результате непрерывной активности которых формируются все морфологические структуры растений.

Цель данной работы состояла в сравнении состояния метилирования внешнего цитозина CCGG-последовательностей ДНК побегов разного возраста, а также первичных каллусов апикальных меристем корней и побегов подсолнечника.

Материалы и методы. Объектом исследования являлась ДНК 18- и 27-дневных первичных каллусов апикальных меристем побегов и корней, а также побегов 1, 2 и 5-дневных этиолированных проростков подсолнечника сорта Передовик (ВНИИМК, Россия).

Для получения первичного каллуса семянки подсолнечника последовательно стерилизовали 96 %-м этанолом в течение 1 мин и 0,1 %-м раствором сулемы (7—8 мин), промывали трижды стерильной дистиллированной водой, после чего помещали на агаризованную питательную среду Мурасиге и Скуга с половинной минеральной основой без гормонов и выращивали в термостате при 28—30 °С с 14-ч фотопериодом в течение двух недель. Исходным материалом для индукции каллусных культур служили изолированные корневые и стеблевые меристемы размером около 0,5—0,8 мм. Оптимальной для каллусогенеза подсолнечника была модифицированная нами среда Мурасиге и Скуга, содержащая 1 мг/л кинетина, 1 мг/л бензиламинопурина, 2 мг/л α -нафтилуксусной кислоты, 0,6 % агара, 3 % сахарозы, pH 6,0. Для получения побегов разного возраста стерильные семянки выращивали в термостате при 25 °С в рулонах фильтровальной бумаги.

ДНК подсолнечника получали модифицированным нами методом Деллапорта [15]. Анализируемые ткани этого вида замораживали жидким азотом и лизировали в буфере, содержащем 0,1 М трис-HCl («Serva», Германия), pH 8,2, 0,05 М ЭДТА, 0,5 М NaCl, 0,1 М аскорбиновую и 5 %-ю парааминосалициловую кислоты, 1 %-е β -меркаптоэтанол и диэтилдитиокарбомат, а также 2—3 %-й DS-Na и 5—6 %-й Polyclar AT («Serva»). После этого инкубировали при 65 °С в течение 10 мин и центрифугировали при 10 000 g, затем депротеинизировали смесью фенол:хлороформ и повторно центрифугировали при тех же условиях. Нуклеиновые кислоты осаждали изопропиловым спиртом, растворяли в TE-буфере [16], вносили 60 мкг/мл РНКазы А («Serva») и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Далее депротеинизировали смесью фенол:хлороформ, к супернатанту добавляли последовательно ДСН и калий-ацетат до конечных концентраций 1,1 % и 1,2 М соответственно, выдерживали при 0 °С в течение 30 мин, а затем центрифугировали при 10 000 g дважды. ДНК осаждали изопропиловым спиртом, осадок ДНК

трижды промывали 70 %-м этанолом и растворяли в TE-буфере. Препараты ДНК соответствовали принятым спектральным критериям чистоты. Молекулярная масса ДНК в среднем составляла 20—30 тысяч пар нуклеотидов (тыс. п. н.).

Каждую партию очищенной ДНК тестировали на присутствие ингибиторов ферментов рестрикции совместным гидролизом с ДНК фага λ . Препараты ДНК, концентрация которых составляла 1—1,5 мкг/мкл, обрабатывали *MspI* (Диалат ЛТД, Россия). На 1 мкг ДНК подсолнечника брали по 5—8 единиц фермента и инкубировали в L-буфере («Boehringer Mannheim Biochemicals», Германия) в течение 1,5—2 ч при 37 °С. Реакцию рестрикции останавливали инкубацией при 65 °С в течение 5 мин. Как стандарт использовали нативные ДНК побегов и каллусных культур, инкубируемые в одних и тех же условиях с гидролизуемыми ДНК. Электрофорез ДНК проводили в 0,8 %-м агарозном геле (агароза «Serva», США) в 1 \times TBE [12] при напряженности 3—4 В/см в течение 6—8 ч.

Результаты и обсуждение. Для получения каллусных культур подсолнечника испытаны 10 вариантов питательных сред Мурасиге и Скуга, дополненных гормонами в различных сочетаниях и концентрациях. Оптимальной оказалась среда, описанная в разделе «Материалы и методы». Начало каллусообразования наблюдалось на 3—4-й день после вычленения и посадки эксплантов на питательные среды. Быстрорастущие культуры изолированных меристематических тканей подсолнечника были однотипными для стеблевого и корневого происхождения. Они были рыхлые, слабоструктурированные и имели светло-желтую окраску.

Выделение ДНК из проростков и каллусных тканей подсолнечника осложнено присутствием в них значительных количеств фенольных соединений, а также активных полифенолоксидаз и нуклеаз. В связи с этим в лизирующий буфер оригинального метода [15] дополнительно ввели антиоксиданты, ингибиторы нуклеаз и поливинилпирролидон в водонерастворимой форме. В результате получены высокомолекулярные препараты ДНК побегов и первичного каллуса меристем подсолнечника удовлетворительной чистоты.

Степень метилирования 5'-цитозина CCGG-последовательностей ДНК каллусных культур и побегов подсолнечника определяли, сравнивая электрофореграммы нативных и обработанных рестриктазой *MspI* ДНК, поскольку известно [17], что этот фермент гидролизует CCGG:С5mCGG (5mC-5-метилцитозин) и не расщепляет 5mCCGG-сайты ДНК. Для каждой пары нативной и гидролизуемой ДНК первичных каллусов апикальных ме-

Нативная ДНК			MspI	Нативная ДНК			MspI	
КП	КК	λ	КП	КП	КК	КК	КК	КК
1	2	3	4	5	6	7	8	



Рис. 1. Метилирование внешнего цитозина CCGG-последовательностей ДНК первичных каллусов апикальных меристем побегов (КП) и корней (КК) подсолнечника. Электрофорез в 0,8 %-м агарозном геле нативных ДНК: 1, 2 — 18-дневных КП и КК соответственно; 3 — фага λ; 5 — 27-дневных КП, а также обработанных рестриктазой *MspI* ДНК: 4, 6 — 18- и 27-дневных КП; 7, 8 — то же КК. ДНК вносили по 3 мкг для 18- и 27-дневных КК (2, 7, 8), по 2 мкг для 18-дневных КП (1, 4), по 1,5 мкг для 27-дневных КП (5, 6)

ристам и побегов разного возраста брали одинаковое количество ДНК, составляющее 1,5—6 мкг. Такой подход дает возможность получить качественную характеристику степени ферментативной модификации 5'-цитозина CCGG-палиндромных участков ДНК. Суть его состоит в том, что для ДНК, подвергающейся ферментативному гидролизу, наблюдается увеличение электрофоретической подвижности и уменьшение интенсивности флуоресценции бромистого этидия в области высокомолекулярных фрагментов ДНК.

На рис. 1 приведены данные по гидролизу ДНК первичных каллусов апикальных меристем корней и побегов подсолнечника рестриктазой *MspI*. Как видно из фотографии геля, при равных количествах нативной и гидролизуемой ДНК в пределах разрешающей способности используемого варианта метода электрофореза различий в подвижностях как 18-дневных, так и 27-дневных каллусных культур побега не наблюдается. По-

движности в агарозном геле для нативной ДНК 18-дневных нативных ДНК каллуса меристем корня и *MspI*-обработанных ДНК 18- и 27-дневных каллусных культур корня также достоверно не отличаются. При этом флуоресценция бромистого этидия нативных и рестрицированных ДНК одинакова. Принимая во внимание тот факт, что ДНК фага λ в присутствии всех четырех анализируемых ДНК расщепляется рестриктазой *MspI* (данные не приведены), можно заключить, что ДНК первичных каллусов апикальных меристем как корней, так и побегов подсолнечника не гидролизуется этой рестриктазой. Следовательно, подавляющее большинство внешних цитозин CCGG-участков ДНК каллусных культур разного возраста подвергается метилированию.

На рис. 2 представлены результаты сравнительного изучения продуктов гидролиза ДНК побегов 1, 2 и 5-дневных этиолированных проростков и

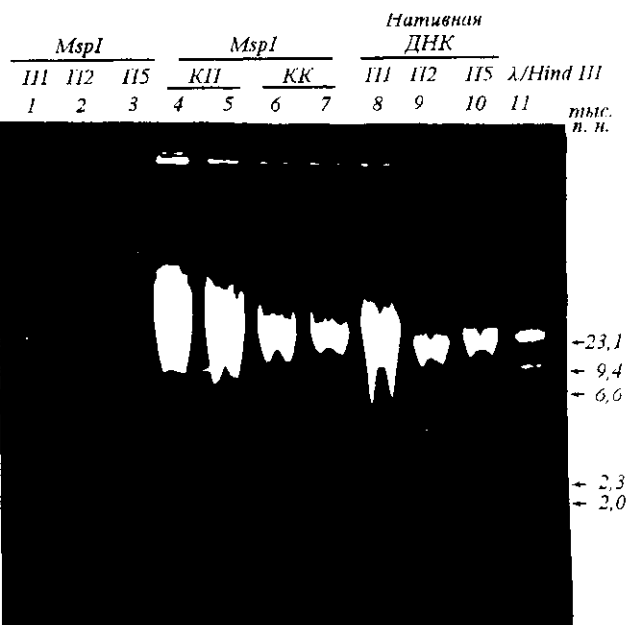


Рис. 2. Недометилирование внешнего цитозина CCGG-последовательностей ДНК побегов развивающихся этиолированных проростков подсолнечника. Электрофореграмма в 0,8 %-м агарозном геле *MspI*-гидролизатов ДНК побегов: 1 — 1-дневных (П 1); 2 — 2-дневных (П 2); 3 — 5-дневных (П 5) и их нативных ДНК (8, 9, 10) соответственно, а также ДНК 18- и 27-дневных первичных каллусов апикальных меристем: 4, 5 — побегов (КП); 6, 7 — корней (КК) соответственно после обработки рестриктазой *MspI*. ДНК вносили: для П 1 — по 5 мкг (1, 8), П 2 — по 2 мкг (2, 9), П 5 — по 2,5 мкг (3, 10), КП — по 6 мкг (4, 5) и КК — 3 и 4 мкг (7, 6). Дорожка 11 — *HindIII*-гидролизат фага λ. Справа приведен размер их фрагментов

18- и 27-дневных каллусных культур. Интенсивность флюоресценции бромистого этидия высокомолекулярных фрагментов намного выше для всех нативных ДНК побегов по сравнению с *MspI*-рестрицированными ДНК побегов при одинаковых их количествах. *MspI*-обработанные ДНК первичных каллусов апикальных меристем побегов и корней, которые, как описано выше, не расщепляются этим ферментом, также имеют более высокий уровень флюоресценции и наряду с нативными ДНК побегов показывают меньшую электрофоретическую подвижность. Различия в характере мигрирующих обработанных *MspI* ДНК каллусных культур, представленных на рис. 1 и 2, вызваны увеличением количества внесенных ДНК в последнем эксперименте. Приведенные данные свидетельствуют о том, что в отличие от ДНК каллусных культур ДНК побегов 1, 2 и 5-дневных этиолированных проростков гидролизует *MspI*, вследствие чего внешние остатки цитозина CCGG-последовательностей ДНК неметилированы. Тот факт, что интенсивность флюоресценции нативных ДНК побегов значительно выше их *MspI*-гидролизатов, подтверждает наличие у большинства нативных ДНК (средний их размер составляет 20—30 тыс. п. н.) сайтов узнавания этой рестриктазы, преобладающее количество которых подвергается ферментативному гидролизу. То есть ДНК побегов в ходе роста и дифференцировки проростков обширно неметилирована.

Учитывая высокий уровень метилирования анализируемого палиндромного участка ДНК корней 5-дневных этиолированных проростков и первичного каллуса меристем корней, можно заключить, что в разных органах проростка внешний цитозин CCGG-сайтов начинает подвергаться дифференциальному метилированию при прорастании семян подсолнечника в период гетеротрофного роста в темноте. Не исключено, однако, что вариabельность метилирования ДНК проявляется в процессе эмбриогенеза в завершающей фазе формирования семян подсолнечника. Для высших растений показано, что прорастание сопровождается изменением уровня и характера метилирования ДНК [13], однако сведений о природе энзиматически модифицированных оснований ДНК немного. Так, для рДНК пшеницы показано дифференциальное метилирование *HpaII*-сайта, локализованного выше промотора в позиции -160 пар нуклеотидов относительно точки инициации транскрипции [18].

Следует подчеркнуть, что внешний цитозин CCGG-последовательностей ДНК каллусов меристем интенсивно метилирован. То есть недифференцированные, активно делящиеся, неорганизо-

ванно растущие клетки первичного каллуса апикальных меристем как корня, так и побега имеют одинаковый уровень энзиматической модификации цитозина в этом палиндромном участке ДНК. Такой же уровень его метилирования поддерживается и в ДНК дифференцированных клеток корней 5-дневных этиолированных проростков. Тогда как в ДНК дифференцированных клеток побегов этиолированных проростков, где экспрессируется намного больше тканеспецифичных генов, чем в корнях, осуществляется обширное неметилирование внешнего цитозина CCGG-последовательностей ДНК при прорастании семян. Вариabельность метилирования меристематических и дифференцированных тканей побега подсолнечника может свидетельствовать в пользу положения о том, что энзиматическая модификация цитозина является одним из механизмов клеточной дифференцировки [1], который реализуется при функционировании генома подсолнечника, вероятно, на уровне регуляции экспрессии тканеспецифичных генов. Это возможно в случае, если в ДНК меристем проростков подсолнечника так же, как и в ДНК каллусных культур меристем, будет сохраняться аналогичный характер метилирования. Подобное условие является следствием того, что в литературе имеются противоречивые сведения о влиянии сред культивирования на характер метилирования генома растений [19—21]. Так, в листьях и каллусах *Pennisetum purpureum* уровень метилирования ДНК не меняется, тогда как в пролиферирующих клетках культур моркови наблюдается положительная корреляция между метилированием цитозина и концентрацией экзогенного ауксина. В отличие от этого при низкой концентрации ауксинов в культуральной среде мы наблюдали практически полное метилирование анализируемого сайта ДНК подсолнечника, что служит подтверждением полученных нами данных в предлагаемой интерпретации. Таким образом, можно предположить, что на ранних этапах онтогенеза реализация генетической программы развития *H. annuus* сопровождается сайт-специфическим дифференциальным метилированием цитозина.

О. М. Тищенко, Л. П. Корж

Вариabельність метилювання зовнішнього цитозину CCGG-последовательностей ДНК пагонів і калюсів меристем соняшнику

Резюме

Зовнішній цитозин CCGG-последовательностей ДНК недиференційованих клітин первинних калюсів меристем як пагонів, так і коренів соняшнику (*Helianthus annuus* L.) є інтенсивно метильованим. У процесі росту і диференціювання пагонів етіюльованих паростків здійснюється широке неметильован-

ня цього паліндромного сайту ДНК, яке супроводжується транскрипцією тканиноспецифічних генів. Варіабельність метилювання CCGG-последовательностей ДНК передбачає участь цієї ензиматичної модифікації цитозину в клітинному диференціюванні соняшнику, можливо, на рівні експресії генів.

E. N. Tishchenko, L. P. Korzh

Methylation variability of external cytosine of CCGG-sequences in DNA of sunflower shoots and meristem callus

Summary

External cytosine of CCGG-sequences in DNA of undifferentiated cells of meristems primary calluses in sunflower (*Helianthus annuus* L.) shoots and roots is highly methylated. During the growth and differentiation of shoots of etiolated seedlings the extensive undermethylation of this palindromic site in DNA, correlating with the transcription of tissue-specific genes, has been observed. The variability of methylation of CCGG-sequences of DNA assumes that enzymatic modification of cytosine takes part in cell differentiation, perhaps, on the level of gene expression.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ванюшин В. Ф. Метилювання ДНК у еукариот — новий механізм регуляції експресії генів і клітинної диференціювання // Успехи біол. хімії.—1983.—24.—С. 170—193.
2. Doerfler F. DNA methylation and gene activity // Ann. Rev. Biochem.—1983.—52.—Р. 93—124.
3. Бурьянов Я. И., Кирьянов Г. И. Структурно-функциональные основы энзиматического метилирования ДНК // Итоги науки и техники.—М: ВИНТИ, 1987.—С. 3—220 (Молекуляр. биология; Т. 23).
4. Bianchi M. W., Viotti A. DNA methylation and tissue-specific transcription of the storage protein genes of maize // Plant Mol. Biol.—1988.—11, N 2.—Р. 203—214.
5. Riggs C. D., Chrispeels M. J. The expression of phytohemagglutinin genes in *Phaseolus vulgaris* is associated with organ-specific DNA methylation patterns // Plant Mol. Biol.—1990.—14, N 4.—Р. 629—632.
6. Kunze R., Starlinger P., Schwartz D. DNA methylation of the maize transposable element Ac interferes with its transcription // Mol. and Gen. Genet.—1988.—214, N 2.—Р. 325—327.
7. Wang Z., Heinlein M., Kunze R. Methylation pattern of Activator transposase binding sites in maize endosperm // Plant Cell.—1996.—8, N 4.—Р. 747—758.
8. Martin-Tanquy J., Sun L.-Y., Burtin D., Vernoy R., Rossin N., Tepfer D. Attenuation of the phenotype caused by the root-inducing left-hand, transferred DNA and its *rol A* gene // Plant Physiol.—1996.—111, N 1.—Р. 259—267.
9. Кирьянов Г. И., Кинцурашвили Л. Н., Манамшиян Т. А., Носков В. А., Смирнова Т. А. Структура хроматина и энзиматическое метилирование ДНК генов-амилаз клеток алейронового слоя ячменя при индукции их экспрессии // Биохимия.—1996.—61, № 1.—С. 55—64.
10. Хоуксис Дж. Структура и экспрессия гена / Пер. с англ. С. Б. Серебряного.—К.: Наук. думка, 1991.—168 с.
11. Walbot V., Warren C. DNA methylation in the alcohol dehydrogenase-1 gene of maize // Plant Mol. Biol.—1990.—15, N 1.—Р. 121—125.
12. Мазин А. Л. О роли энзиматического метилирования регуляторных элементов в контроле активности генов разных групп организмов // Молекуляр. биология.—1992.—26, № 2.—С. 244—263.
13. Ванюшин В. Ф., Киринос М. Д. Метилювання ДНК вищих рослин і клітинна диференціювання // Генетика рослин.—Київ: Наук. думка, 1988.—С. 105—130.
14. Тищенко Е. Н., Куцєвич В. И., Билинская А. Т., Лобов В. П. Ядерные РНК вегетативных органов *Helianthus annuus* // Физиология растений.—1996.—43, № 2.—С. 213—219.
15. Дрейнер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений // Генная инженерия растений: Лаб. руководство / Пер. с англ.—М.: Мир, 1991.—С. 248—253.
16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—480 с.
17. Rasin A., Cedar H. DNA methylation in eukaryotic cell // Plant Mol. Biol. Manual.—1988.—В3.—Р. 1—28.
18. Савельев С. В., Ашапкин В. В., Ванюшин В. Ф. Рибосомная ДНК гексаплоидной пшеницы: характер метилирования и временная организация репликации в развивающихся проростках // Молекуляр. биология.—1990.—24, № 4.—С. 1042—1056.
19. Lo Schiavo F., Pitto L., Giuliano G., Torti G., Nuti-Ronchi V., Marazziti D., Vergara R., Orselli S., Terzi M. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs // Theor. and Appl. Genet.—1989.—77, N 3.—Р. 325—331.
20. Morrish F. M., Vasil I. K. DNA methylation and embryogenic competence in leave and callus of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) // Plant Physiol.—1989.—90, N 1.—Р. 37—40.
21. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. Изменчивость в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 4.—С. 298—319.

УДК 547.963.32

Поступила в редакцию 24.02.99