

РАЗЛИЧИЯ В УРОВНЯХ МЕТИЛИРОВАНИЯ И ПАРАМЕТРАХ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК В СУХИХ И ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ ЗЛАКОВЫХ

Л.А. МИНАСБЕКЯН, И.С. ДАНИЕЛЯН, Дж.В. ГАРИБЯН,
П.О. ВАРДЕВАНЯН, Г.А. ПАПОСЯН

Ерванский государственный университет, кафедра биофизики, 375049

Структурные изменения ДНК при прорастании семян злаков свидетельствуют, что изменение степени метилирования ДНК может быть показателем функциональной активности растительных клеток и определенным образом коррелирует с формулой генома злаковых.

Մեթիլացիայի և ԴՆԹ-ի կառուցվածքային ինֆորմացիոնների հասցագրիների սերմերի ճգնման ժամանակ վերաբերյալ էկ, որ ԴՆԹ-ի մեթիլացման աստիճանը կարող է լինել որպես ցուցանիս բջիջների ֆունկցիոնալ ակտիվության ցուցանիշ, և այն որոշակի ձևով կապված է հասցագրիների գենոմի բաղադրիչ հետ:

DNA structural changes during germination of cereals seeds testify that change of DNA methylation degree may be factor of functional activity of plant cells and definitely correlates with cereals genome formula

ДНК - дифференциальная кривая плавления (ДКП) - температура плавления (T_m) - 5-метилцитозин (m^5C) - уровень метилирования ДНК - ГЦ - содержание.

Метилирование ДНК существенно влияет как на структуру самой ДНК, так и на ее взаимодействие с различными белками. Несмотря на отсутствие четкого представления о функциональной роли этой эпигенетической модификации генома у эукариотических организмов, тем не менее предполагается, что одним из механизмов обеспечения регуляции и транскрипции ДНК у животных и растений является метилирование цитозина в ДНК [6], хотя данные о закономерности и регуляции этого процесса в делящихся и дифференцирующихся клетках довольно противоречивы [1,15].

Примечательно, что у видов в пределах отдельных классов, семейств и родов однодольных растений имеются заметные различия в содержании m^5C в ДНК [3]. Обнаружено, что уровень метилирования изменяется при прорастании семян хлопчатника и пшеницы [1,3,8]. В связи с этим интересно было изучить структуру ДНК и характер ее метилирования в процессе онтогенеза растительных клеток, в частности, при прорастании семян, в зависимости от формулы генома злаковых.

Материал и методика. Объектами исследования служили зародыши сухих семян пшеницы сорта Воскесак (гексаплоидной мягкой пшеницы, геном AABBDD), полбы сорта Арни (культурная шведская, тетраплоидная, AABB) и тритикале сорта Сис-1 (гексаплоидный гибрид ржи с пшеницей, AABBRR), а также трехдневные проростки семян этих видов. Эмбрионы из семян злаков изолировали по методу Джонстона - Штерна [16], предварительно отобрав крупные и здоровые семена. Для проращивания и получения проростков отобранные семена промывали спиртом, а затем отмывали от спирта проточной водой и проращивали в темном термостатируемом шкафу при 26° 72 часа. Семена любезно предоставлены проф. П.А. Гандилянгом, Арм.СХИ.

Выделение ДНК. ДНК из сухих, предварительно охлажденных эмбрионов получали, измельчая их в ступке. Для получения ДНК из проростков последние замораживали при температуре жидкого азота и затем измельчали в ступке до получения тонкого порошка, который суспендировали в растворе, содержащем 0,15М NaCl, 0,015М нитрат Na, 0,01М ЭДТА и 0,1М трис ("Реал", Венгрия), а также 0,1 %-ный Тритон X-100 (Serva, Германия) и предварительно прогревом до 60°, затем добавляли SDS ("Serva", Германия) до конечной концентрации 2,5%, прогревали смесь при 80° - 2-3 мин и инкубировали далее при 55°. Дальнейшие процедуры проводили по Мармуру [17] с небольшими модификациями [9]. В дальнейшем ДНК инкубировали ферментами РНК-азой, диастазой и пропазой при 39° 2-3ч, просветляли ацетатом Na и пересаждали в равном объеме ледяного этанола. Растворяли в 0,1-SSC, очищали растворами 5% SDS и 4М NaCl, после центрифугирования и пересадки в равном объеме ледяного этилового спирта получали препараты ДНК, которые по спектральным характеристикам соответствуют таковым по Мармуру:

$$\Lambda_{230} / \Lambda_{260} = 0,45 ; \Lambda_{280} / \Lambda_{260} = 0,515 ; \Lambda_{170} / \Lambda_{260} = 0,1$$

Плавление ДНК. Плавление ДНК проводили на SP 8-100 спектрофотометре Pye Unicam (England) при концентрациях 20-30 мкг/мл в 0,1-SSC в кварцевых кюветках, снабженных тefлоновыми пробками. Нагревание регулировали температурным программным устройством с линейной скоростью 0,25 град/мин. Поглощение Λ_{260} одновременно регистрировали на программируемом калькуляторе HP-97P. Первую производную поглощения, а также ГЦ-содержание вычисляли по ранее описанному методу [9]. Вычисления и построение кривых производили на компьютере "Электроника П-5".

Определение пуклотидного состава ДНК. Высушенные препараты ДНК гидролизовали 87%-ной муравьиной кислотой в запаянных ампулах. Основания разделяли с помощью двукратной одномерной восходящей хроматографии на бумаге Filtrak в системе n-бутанол-вода-25% NH₄OH в соотношении 60:10:0,1 и определяли спектрофотометрически [4]. Оптическую плотность элюатов m⁵C измеряли при 290 и 320 нм и рассчитывали количество в соответствии с формулой (мкмоль): 0,1136 ($\Lambda_{290} - \Lambda_{320}$) [4].

Результаты и обсуждение. Данные, приведенные в таблице, показывают, что все изученные ДНК в основном относятся к ГЦ-типу. Гиперхромность ДНК всех исследованных нами препаратов составляла 33-35 %. В таблице также представлены средние значения ГЦ-пар и m⁵C в сухих эмбрионах семян и трехдневных проростках изучаемых видов. Наблюдается достоверное увеличение содержания ГЦ-пар в ДНК 3-дневных проростков, за исключением пшлбы, по сравнению с ДНК сухих эмбрионов. Заметно возрастало содержание m⁵C при прорастании семян, причем у сортов Воскесак и Сис-1 оно почти одинаково (5,3 и 4,7 мол % соответственно), а в ДНК пшлбы - выше (6,8 мол %).

Воскесак и тритикале, представляющие собой гексаплоидную пшеницу и гибрид твердой пшеницы с рожью соответственно (о близком родстве которых известно [14]), отличаются по содержанию m⁵C в ДНК от пшлбы, особенно трехдневные проростки пшеницы, хотя из полученных нами данных следует, что все они различаются по уровню метилирования ДНК и в сухих эмбрионах семян. В то же время надо отметить, что все три вида имеют общую часть генома, подобную таковой твердой пшеницы (AABB).

Приведенные в таблице данные о количественном содержании m⁵C в ДНК зародышей свидетельствуют и о таксономическом значении этой эпизиматической модификации. Кроме того, видно, что суммарная ДНК проростков как по уровню метилирования, так и по ГЦ-содержанию резко отличается от ДНК сухих семян.

Таким образом, уровень метилирования ДНК в сухих эмбрионах пшеницы ниже, чем в прорастающих семенах, хотя данные противоречивы [3,8,20]. И эти изменения в степени метилирования ДНК в процессе онтогенеза могут быть обусловлены

различными причинами. Можно предположить, что повышение уровня метилирования в ДНК 3-дневных проростков вызвано, во-первых, интенсификацией синтеза в прорастающих семенах, поскольку наибольшее количество делящихся клеток и самое высокое содержание ДНК (в пересчете на 100 г зародышей) наблюдается именно через 72ч после прорастания семян [10]. Во-вторых, по мере прорастания в семенах происходит, по всей вероятности, активирование и синтез ДНК-метилаз, тем более, что это связано с возможной множественностью ядерных ДНК-метилаз у высших растений [7,11], а также резко различным уровнем метилирования вновь синтезируемой и сформированной ДНК [2]. Наконец, гиперметилирование ДНК при прорастании семян может рассматриваться в качестве механизма дифференциальной транскрипции, поскольку метилирование ДНК у животных и растений может быть вовлечено в регуляцию репликации и транскрипции ДНК [5,12] в дифференцирующихся растительных клетках, являясь одним из условий включения и выключения отдельных генов.

Известно также, что при прорастании во фракции уникальных последовательностей ДНК пшеницы максимальным содержанием m^1C обладают блоки, содержащие четыре и более пиримидиновых нуклеотидов подряд, что не отмечается ни в одной из фракций ДНК сухих семян. Из этого следует, что при прорастании в геноме пшеницы, по-видимому, начинают метилироваться иные нуклеотидные последовательности, не метилирующиеся в семенах [3].

Анализ кривых плавления и определение температуры плавления T_m (таблица) показывает, что изменение содержания m^1C в ДНК трехдневных проростков отражается на параметрах плавления. Обнаружено заметное увеличение T_m с ростом m^1C в ДНК при прорастании семян Воскедек и Сис-1 и понижение температуры плавления у семян полбы в аналогичных условиях. Эти результаты показали, что не всегда имеется прямая корреляция между изменениями во вторичной структуре ДНК и увеличением степени ее метилирования при прорастании (у трехдневных проростков

Содержание 5-метилцитозина и температура плавления ДНК сухих и прорастающих семян злаковых.

Наименование злаковых	Формула генома	Условие опыта	m^1C , мол %	ПН-ш 1C	T_m , °C
Пшеница	AABBDD	сухие	4,6±0,7	47,1	73,0
		проростки	5,3±0,32	50,0	76,5
Гречиха	AABRRR	сухие	3,7±0,6	47,0	72,8
		проростки	4,7±0,5	50,3	74,0
Полба	AABB	сухие	2,3±0,39	50,1	74,1
		проростки	6,8±0,6	44,1	71,1

семян), и, вопреки ожиданию, у прорастающих семян полбы снижается T_m .

Остается предположить, что гиперметилирование в трехдневных проростках полбы может привести к дезаминированию m^1C с его трансформацией в тимин и исчезновением динуклеотида ГЦ, в результате чего, вероятно, произойдет образование дестабилизированных областей в АТ-богатых участках ДНК. В эти дестабилизированные области входят некомплементарные ГТ-пары [13]. Плавление этих областей, возможно, приводит к понижению температуры плавления ДНК у трехдневных прорастающих семян полбы.

Полученные нами данные о структурных изменениях ДНК при прорастании семян

злаков свидетельствуют о том, что степень метилирования ДНК может быть показателем функциональной активности растительных клеток и определенным образом связана с клеточной дифференцировкой. Не исключено, что такое специфическое изменение метилируемых последовательностей на разных стадиях онтогенеза может носить регуляторный характер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ванюшин Б.Ф., Кадырова Д.Х., Каримов Х.Х. Научные доклады высшей школы, биол. науки, 1, 85-88, 1972.
2. Ванюшин Б.Ф., Башките Е.А., Фридрих А., Хвойка Л.А. Биохимия, 46, 1, 47-55, 1981.
3. Ванюшин Б.Ф., Кирнос М.Д. В кн: Геном растений, Киев, 1988.
4. Васильев В.К., Гарибян Д.В., Захарян Р.А., Галоян А.А., Ванюшин Б.Ф. ДАН СССР, 205,3, 721-724, 1972.
5. Демидкина Н.П., Кирьянов Г.И., Ванюшин Б.Ф. Биохимия, 44, 8, 1416-1425, 1979.
6. Зиньковская Г.Г., Бердышев Г. Д., Ванюшин Б.Ф. Биохимия, 43, 10, 1883-1892, 1978.
7. Дохиев М., Сулимова Г.Е., Ванюшин Б.Ф. Биохимия, 43, 7, 1312-1318, 1978.
8. Дрожденюк А.П., Сулимова Г.Е., Ванюшин Б.Ф. Мол. биология, 10, 6, 1378-1385, 1976.
9. Минасбекян Л.А., Вардеванян П.О., Симонян А.Г., Паносян Г.А. Биолог. журн. Армении, 42, 6, 551-555, 1979.
10. Никитина Е.И., Кокшарова Т.Н., Агамалова С.Р. и др. Изв. АН СССР, 2, 232-242, 1969.
11. Сулимова Г.Е., Дрожденюк А.П., Ванюшин Б.Ф. Мол. биология, 12, 4, 846-852, 1978.
12. Adams R.L., Burdon R.H., Fulton J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 113, 695-702, 1983.
13. Adams R.L., Eason R. Nucleic Acids Res., 12, 5869-5877, 1984.
14. Bendich A.J. Genetics, 65, 545-565, 1970.
15. Cedar H. Cell, 53, 3-4, 1988.
16. Johnston F.B., Stern H. Nature, 179, 160-161, 1957.
17. Marmur J. Mol. Biol., 3, 208-218, 1961.

Поступила 2.V.1991.

