

А.П. КРАВЕЦ<sup>1</sup>, Т.А. МЮССЕ<sup>2</sup>,  
А.В. ЛИТВИНЧУК<sup>2</sup>, Ш. ОСТЕРМИЛЛЕР<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт клеточной биологии и генетической инженерии  
НАН Украины, Киев

<sup>2</sup> Университет Южной Каролины, г. Коламбия, США  
E-mail: kravetsap@yahoo.com

## ВЗАИМОСВЯЗЬ ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ Р-МОБИЛЬНОГО ЭЛЕМЕНТА И УРОВНЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЯ *DROSOPHILA MELANOGASTER*



*Исследованы изменения паттернов метилирования ДНК у двух линий *Drosophila melanogaster* (Canton-S и ri), которые в течение 20 поколений на всех стадиях развития подвергались гамма-облучению в лабораторных условиях с малой мощностью дозы ( $1,2 \cdot 10^{-8}$ ,  $0,8 \cdot 10^{-8}$  и  $0,12 \cdot 10^{-8}$  Гр/с). С учетом особенностей метилирования у дрозофилы были использованы две рестриктазы — *GluI* и *GlaI*. Показано различие паттернов метилирования ДНК самок и самцов каждой из исследованных линий в контроле. Выявлено снижение уровня метилирования по сайтам узнавания рестриктазы *GluI* у самцов и самок *ri*-линии, у которых в результате хронического облучения повышается активность Р-мобильного элемента. Отмечено снижение уровня метилирования по сайтам узнавания рестриктазы *GlaI* у самок обеих линий. Обсуждается вопрос взаимосвязи процессов метилирования ДНК и активизации мобильных элементов.*

© А.П. КРАВЕЦ, Т.А. МЮССЕ, А.В. ЛИТВИНЧУК,  
Ш. ОСТЕРМИЛЛЕР, 2010

**Введение.** Эпигенетическое метилирование ДНК является одним из важнейших механизмов биологической регуляции, играя ключевую роль в ряде эпигенетических процессов — геномном импринтинге, дифференцировке, апоптозе и морфогенезе. Установлена ведущая роль этого процесса в эпигенетических изменениях, формировании и стабилизации структуры хроматина [1–3]. Существуют многочисленные, но убедительные данные об изменении паттерна метилирования (гиперметилирования), связанного с перепрограммированием метаболизма при адаптации к абиотическому стрессу [4, 5]. Однако значение процессов метилирования в реакциях на стрессовые факторы у представителей различных систематических групп еще далеко до полного осмысления.

Известно, что относительное содержание метилированного цитозина весьма различно для организмов разных систематических групп, варьируя от 0–3 % у насекомых [6] до 30 % у растений [3, 6]. Только сравнительно недавние исследования показали [6, 7] возможность метилирования у *Drosophila melanogaster* — одного из наиболее удобных модельных объектов для лабораторных исследований разнообразных генетических эффектов. Важной особенностью процесса метилирования у насекомых является участие в этом процессе только одного фермента, принадлежащего к классу Dnmt2 ДНК метилтрансфераз, осуществляющей метилирование по (5mC)\*Т и (5mC)\*А сайтам. Метилирование растений [2] и большинства позвоночных происходит с участием четырех классов метилтрансфераз [2, 5], обеспечивая большее разнообразие сайтов метилирования.

Отмеченное различие в содержании метилированных остатков цитозина привело к представлению о различном биологическом значении этого процесса для разных систематических групп. В одной из обзорных публикаций [9] было высказано предположение: у насекомых метилирование ДНК имеет наибольшее значение для стабилизации структуры хроматина, что в свою очередь снижает активность транспозонов. Предыдущими нашими исследованиями было показано изменение активности Р-мобильного элемента у F<sub>1</sub> потомков от скрещивания *Canton-S* и *ri*-линии [10]. Эти данные подтверждали результаты полевых исследований, которые показали активизацию

P-мобильного элемента у насекомых популяций дрозофилы всех исследованных радиоактивно загрязненных регионов Украины [11]. Явление активизации мобильного элемента является косвенным показателем изменения структуры ядерного хроматина и общего повышения уровня повреждения ДНК. Кинетические особенности переходного процесса изменения активности мобильного элемента позволили высказать предположение, что в данном случае участвуют, по крайней мере, две группы механизмов, определяющих эти изменения и различающихся по скорости действия. Первая группа механизмов может быть связана с конститутивной составляющей реакций, защищающих нативность ДНК. Вторая, более медленная компонента, может затрагивать химическую трансформацию ДНК, связанную с различным уровнем ее метилирования.

Целью наших экспериментов было исследование взаимосвязи между активизацией P-мобильных элементов при различных мощностях дозы в условиях хронического облучения и уровнем метилирования ДНК этих организмов.

**Материал и метод.** При исследовании взаимосвязи активности P-мобильного элемента и уровня метилирования ДНК использовали самцов и самок *Canton-S* и *ri*-линии, хроническое облучение которых в течение 20 поколений проводили в условиях контролируемой дозиметрии. Активность P-мобильного элемента оценивали по уровню гонадального дисгенеза в F<sub>1</sub> поколении потомков каждого из облучаемых поколений *ri*-линии дрозофилы.

Источником пролонгированного облучения мух был сосуд с раствором соли <sup>137</sup>CsCl, расположенный в центре штатива с концентрическими щелями для фиксации пробирок с мухами. В настоящей работе приведены результаты, полученные при облучении с начальной мощностью дозы 1,2 · 10<sup>-8</sup>, 0,8 · 10<sup>-8</sup> и 0,12 · 10<sup>-8</sup> Гр/с. Мухи находились в стеклянных сосудах 50 мл, объем питательной среды составлял 10 мл. Хроническое облучение проводили в течение 20 поколений при температуре 21–22 °С.

В качестве косвенного показателя изменения стабильности ДНК вследствие хронического облучения рассматривали процесс гибридного дисгенеза у самок и самцов потомков от скрещивания самок *Canton-S* и *ri*-линии

[10], а также процент гонадального дисгенеза в последовательных поколениях *ri*-линии. Асимметрию по размеру гонад оценивали на 50 индивидуумах каждого пола, полученных от облучаемых родителей. Гонадальный дисгенез рассматривался как 0, если обе гонады были полноценны морфологически, как 1, если одна гонада была недоразвита или вообще отсутствовала, и 2, если обе гонады были уменьшены или отсутствовали. Из четырех пробирок отбирали по 50 самцов и самок и оценивали частоту гонадального дисгенеза для каждой популяции. Процент гонадального дисгенеза рассчитывали по формуле

$$\%GD = S \%GD (1) + \%GD (2).$$

Достоверность различий между вариантами опыта оценивали по параметрическому t-критерию Стьюдента при уровне значимости 0,05.

ДНК выделяли из контрольных и облученных особей *Canton-S* и *ri*-линии отдельно для самцов и самок, отбирая по 10 особей каждого пола. Для выделения ДНК использовали QIAGEN Blood&Tissue Kit. Концентрацию ДНК в образцах определяли на BioPhotometer 6131. Электрофорез ДНК проводили в 1%-ном агарозном геле (BioRad) в TAE (1×) буфере с этилтиобромидом в качестве красителя при градиенте напряженности 5 В/см.

Использованы два маркера молекулярных масс ДНК, «BioLabs», компания New England. Высокомолекулярный маркер (M<sub>1</sub>) 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 (M<sub>2</sub>) – фрагменты на 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 и 0,1 Kb.

Для рестрикции ДНК с учетом особенностей метилирования отдельных сайтов для насекомых [6, 9] использовали рестриктазы GluI и GluI SibEnzyme Ltd:

#### Используемые рестриктазы и сайты их рестрикции

Рестриктаза	Сайты рестрикции
GluI	5'(5mC)G(5mC)*WG(5mC)G...3 3'G(5mC)GW*(5mC)G(5mC)...5'
GluI	G(5mC)*G(5mC) (5mC)G*(5mC)G

Примечание. Звездочкой обозначен сайт рестрикции, W – любое основание.

Количество рестриктаз в соответствии с сертификатом компании-производителя брали из расчета 4 единицы активности *GlaI* и 8 единиц активности *GluI* на 1мкг ДНК. Реакцию рестрикции с ферментом *GluI* проводили 16 ч при температуре 37 °С; реакцию с ферментом *GlaI* — при температуре 30 °С также в течение 16 ч. Реакции с обеими эндонуклеазами останавливали тепловой инактивацией в течение 20 мин при температуре 65 °С.

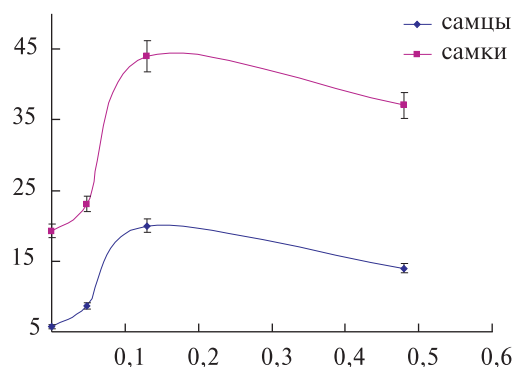
В «карманы» геля вводили по 20 мкл общего объема реакционной смеси, содержащей по 10 мкг ДНК.

**Результаты исследований и их обсуждение.** При изучении эффектов непрерывного облучения последовательных поколений организмов возникает вопрос о принципах оценки накопленных доз. Несомненно, что каждое последующее поколение испытывает на себе влияние облучения, полученного всеми предыдущими поколениями.

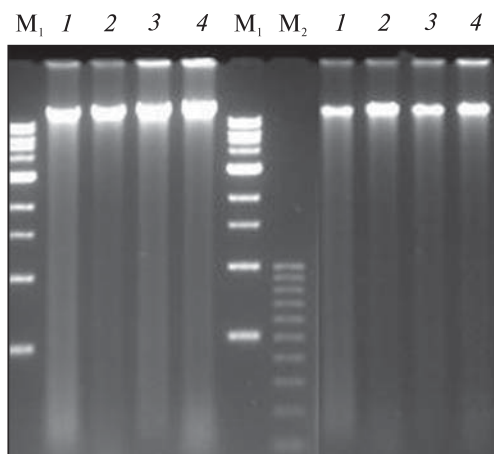
Исследование постепенной, из поколения в поколение, трансформации дозовых зависимостей, проведенное ранее [10], показывает различное изменение радиочувствительности организма в зависимости от предыстории его облучения или, иными словами, накопленной дозы облучения его предков. Таким образом, уже сам характер трансформации дозовых зависимостей несет в себе информацию о накопленной дозе всеми предыдущими поколениями, и в этой связи вполне допустимо построение зависимостей как от дозы, накопленной только текущим поколением, так и от дозы, накопленной текущим поколением и всеми его предками.

В настоящей работе, как и в предыдущей [10], приводятся зависимости от дозы, накопленной текущим поколением. Как следует из рис. 1, зависимость частоты гонадального дисгенеза у 20-го поколения *ri*-линии от дозы, накопленной в течение жизни этого поколения, имеет вид, близкий к монотонной. Это отмечено ранее и для потомков  $F_1$  скрещивания *Canton-S* и *ri*-линии этого же поколения. Существенно, что у самок наблюдается более высокая частота гонадального дисгенеза по сравнению с самцами.

Изложение молекулярно-генетического анализа будет относиться к вариантам с наиболь-



**Рис. 1.** Дозовая зависимость частоты гонадального дисгенеза самок и самцов Р-линии: по вертикали — гонадальный дисгенез, %; по горизонтали — доза, накопленная за 20-е поколение, Гр



**Рис. 2.** Электрофореграмма контроля нативности выделенной ДНК:  $M_1$  — высокомолекулярный маркер;  $M_2$  — низкомолекулярный маркер; 1 — самки, *ri*-линия, контроль; 2 — самцы, *ri*-линия, контроль; 3 — самки, *ri*-линия, хроническое облучение; 4 — самцы, *ri*-линия, хроническое облучение; 5 — самки, *Canton-S*, контроль; 6 — самцы, *Canton-S*, контроль; 7 — самки, *Canton-S*, хроническое облучение; 8 — самцы, *Canton-S*, хроническое облучение

шей накопленной дозой. На рис. 2 приведены электрофореграммы контроля нативности выделенной ДНК *Canton-S* и *ri*-линии.

Данные рестрикционного анализа приведены на рис. 3 и 4. Они свидетельствуют о том, что исходный паттерн метилирования ДНК различен для самцов и самок обеих линий по сайтам узнавания обеих рестриктаз. Это различие больше выявлено для самцов и самок *ri*-линии по сайтам узнавания *GlaI*. Сопоставление ва-

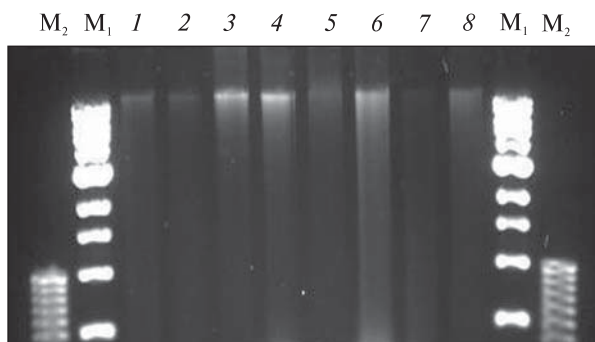


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов реакции ДНК с GluI рестриктазой. Обозначения см. на рис. 2

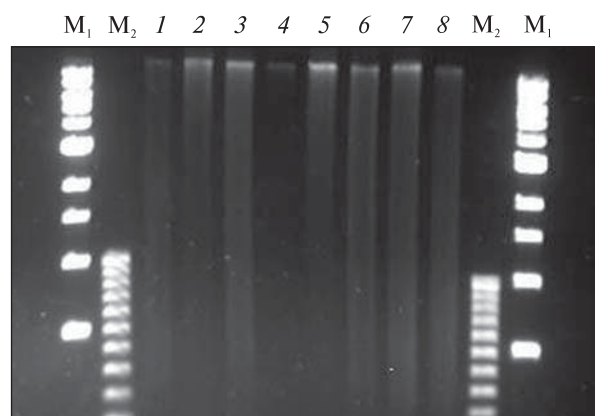


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов реакции ДНК с GluI рестриктазой. Обозначения см. на рис. 2

риантов хронического облучения показывает снижение числа сайтов узнавания рестриктазы GluI для самок и некоторое повышение для самцов *ri*-линии.

Возможно, это связано с тем, что активность Р-мобильного элемента проявляется больше у самок. Повышение уровня метилирования по сайтам узнавания рестриктазы GluI после воздействия хронического облучения фиксировали также для самцов линии *Canton-S*, для которой отсутствует сопоставление с активизацией мобильного элемента.

По сайтам рестрикции GluI наблюдали значительное снижение метилирования как для самцов, так и для самок *ri*-линии, у линии *Canton-S* — незначительное снижение уровня метилирования по сайтам узнавания этой рестриктазы для облученных самцов и самок.

Таким образом, на основании полученных данных трудно судить об общей тенденции из-

менения уровня метилирования у самцов и самок в результате действия хронического облучения. Оценка биологического значения выявленных изменений также не может быть вполне содержательной. Существуют убедительные свидетельства о том, что повышение уровня метилирования ведет к сайленсингу генов, а в случае мобильных генетических элементов — к снижению их мобильности.

Однако помимо ведущей регуляторной роли метилирования в регуляции эпигенетических процессов, известно, что 5mC является мутагенным фактором в связи со спонтанным его дезаминированием и превращением в тимин. Этот эффект наряду с активизацией мобильных элементов может усиливать геномную нестабильность.

Не исключено, что между снижением уровня метилирования и активизацией мобильных элементов отсутствует причинно-следственная связь, а выявленные ранее взаимосвязи являются лишь автокорреляцией, т.е. следствиями одной и той же причины.

В последнее время появились данные о новом механизме изменения активности мобильных элементов, который реализуется при сперматогенезе [13]. Они свидетельствуют о том, что регуляция активности мобильных генетических элементов происходит при помощи Piwi-белков и piRNA. Это явление было впервые обнаружено именно у дрозофилы [13], но впоследствии установлено и для млекопитающих [14].

В связи с этим возникает сомнение о стохастическом механизме активизации мобильных элементов, связанном с повышением вероятности двойных разрывов в условиях действия стрессовых факторов. Вместе с тем характеристики макромолекулы ДНК могут также обуславливать неслучайное распределение двойных разрывов, и в этом случае можно допустить, что регуляция активности мобильных элементов находится под многоуровневым контролем, включая и пассивные структурные механизмы.

*Авторы статьи выражают глубокую благодарность И.А. Козерецкой, доценту Национального университета имени Т.Г. Шевченко, за предоставленные линии Drosophila melanogaster.*



A.P. Kravets, T.A. Mousseau,  
A.V. Litvinchuk, S. Ostermiller

ASSOCIATION OF P-MOBILE ELEMENT ACTIVITY  
AND DNA METHYLATION PATTERN CHANGES  
AT THE CONDITIONS OF *DROSOPHILA*  
*MELANOGASTER* PROLONGED IRRADIATION

Association of the radiosensitivity and epigenetic pattern DNA changes at the conditions of prolonged irradiation was investigated. Two laboratory *Drosophila melanogaster* strains (*Canton-S* and *ri*) irradiated for 20 generations to low doses rate ( $1,2 \cdot 10^{-8}$ ,  $0,8 \cdot 10^{-8}$  and  $0,12 \cdot 10^{-8}$  Gy/s) were used as experimental objects. DNA for the analysis was extracted separately for the flies of males and females. Restriction endonucleases GluI, GluI were used. Restriction analysis has shown that there are different DNA methylated patterns for males and females as for control and exposed variants. At the chronic irradiation there was the decline of methylation level at the enzymes GluI, GluI sites recognition.

О.П. Кравець, Т.А. Мюссе,  
А.В. Литвинчук, Ш. Остермиллер

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ЗМІН АКТИВНОСТІ  
Р-МОБІЛЬНОГО ЕЛЕМЕНТА ТА РІВНЯ  
МЕТИЛЮВАННЯ ДНК В УМОВАХ ХРОНІЧНОГО  
γ-ОПРОМІНЕННЯ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Досліджено зміни патернів метилювання ДНК у двох ліній *Drosophila melanogaster Canton-S* та *ri*, які впродовж 20 поколінь на всіх стадіях розвитку підлягали гамма-опроміненню в лабораторних умовах з малою потужністю дози ( $1,2 \cdot 10^{-8}$ ,  $0,8 \cdot 10^{-8}$  and  $0,12 \cdot 10^{-8}$  Гр/с). З врахуванням особливостей метилювання у дрозофіли були використані дві рестриктази – GluI та GluI. Показано відмінності патернів метилювання ДНК самиць та самців кожної з досліджених ліній в контролі. Виявлено зниження рівня метилювання за сайтами пізнавання рестриктази GluI у самців та самок *ri*-лінії, в яких у результаті хронічного опромінення підвищується активність Р-мобільного елемента. Зазначено зниження рівня метилювання за сайтами пізнавання рестриктази GluI у самиць обох ліній. Обговорюється питання взаємозв'язку процесів метилювання ДНК та активізації мобільних елементів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ванюшин В.Ф. ДНК у еукариот – новий механізм регуляції експресії генів і клітинної дифференцировки // Усп. биол. химии. – 1983. – 24. – С. 170–193.
2. Adams R.L.P. DNA methylation // Principles of Medical Biology. – New York, 1996. – 5. – P. 33–66.
3. Тищенко Е.Н., Дубровная О.В. Эпигенетическая регуляция. Метилирование ДНК генов и трансгенов растений. – К.: Логос, 2004. – 232 с.
4. 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.
5. 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.
6. Field L.M., Lyko F., Pranter G. DNA methylation in insects // Insect Mol. Biol. – 2004. – 13, № 2. – P. 109–115.
7. Lyko F., Ramsahoye B.H., Jaenisch R. Development DNA methylation in *Drosophila melanogaster* // Nature. – 2000. – 408. – P. 538–540.
8. Garcia R.N., Fantinel D'A., Vila Robe L.J., Lu E., Loreto S. Panzera Y., Heredia F.O., Lu V., Valente S. First evidence of methylation in the genome of *Drosophila Willistoni* // Genetica. – 2007. – 131. – P. 91–105.
9. Kunert N., Marhold J., Stach D., Lyko F.A. Dnmt2 – like protein mediates DNA methylation in *Drosophila* // Development. – 2003. – 130. – P. 5083–5090.
10. Кравець А.П., Мюссе Т.А., Омельченко Ж.А., Венгжен Г.С. Динамика частоты гибридного дисгенеза *Drosophila melanogaster* в контролируемых условиях хронического облучения // Цитология и генетика. – 2010. – 44, № 3. – С. 21–26.
11. Козерецкая И.А., Проценко О.В., Афанасьева Е.С., Рушковский С.Р., Чуба А.И., Мюссе Т.А., Меллер А.П. Мутационные процессы в природных популяциях *Drosophila* и *Hirundo rustica* с радиационно-загрязненных территорий Украины // Цитология и генетика. – 2008. – 42, № 4. – С. 63–68.
12. Robertson K.L., Jones P. DNA methylation: past, present and future direction // Cancinogenesis. – 2000. – 21, № 3. – P. 461–469.
13. 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.
14. 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.

Поступила 01.04.09