



УДК 581.144.4.:58.001

А. Н. Берестяная

**Анализ методов оценки метилирования остатков
цитозина на примере ДНК монокарпического растения
*Linum usitatissimum***

(Представлено академиком НАН Украины Д. М. Гродзинским)

*Рассмотрены преимущества и недостатки наиболее распространенных методов анализа эпигенома растений. Проанализированы методы определения метилирования ДНК в контексте радиобиологических исследований. Приведены данные по применению этих методов на примере исследования модификации ДНК монокарпического растения *Linum usitatissimum*, облученного разными дозами ионизирующего излучения.*

Факторы окружающей среды, в частности антропогенные загрязнители, ультрафиолетовая и ионизирующая радиация, могут индуцировать ряд патологических процессов в живом организме. Для оценки восприимчивости генома растений к влиянию повреждающих факторов ведется поиск молекулярных мишеней, ответственных за возникновение патологических состояний. Исследование генотоксических влияний включает анализ статуса эпигенома. Стрессовые сигналы окружающей среды изменяют программу развития растительного организма посредством воздействия на эпигеном. Эпигенетическая регуляция осуществляется путем дифференциального метилирования цитозина в специфических участках ДНК. Учитывая возрастание абиотического стресса, в том числе ионизирующей радиации, актуальным на сегодняшний день является исследование эпигеномных событий в клетках облученных растений и выбор наиболее оптимальных методов для оценки статуса метилирования ДНК [1, 2].

Методы изучения метилирования не универсальны для ДНК разных организмов. Широкий набор подходов в исследовании эпигенома зависит от особенностей организации объекта и целей исследования. Существует несколько наиболее распространенных методов анализа метилирования, одни из которых направлены на учет количества метилцитозина, другие — на оценку статуса модификации специфических участков генома, соответственно, часть методов сосредоточена на отдельных генах, другие — на широких массивах генома.

Весьма популярным методом изучения растительного эпигенома остается метод гидролиза ДНК с помощью чувствительных к метилированию цитозина эндонуклеаз рестрикции.

© А. Н. Берестяная, 2014

Это так называемый метод рестрикционного сканирования генома, основанный на обработке ДНК несколькими рестриктазами, и разделении полученных рестрикционных фрагментов путем электрофореза. Для анализа статуса метилирования CpG-динуклеотидов, находящихся в сайте узнавания, используют пары рестриктаз-изошизомеров, которые распознают один и тот же сайт ДНК, но различаются по чувствительности к метилированию остатков цитозина (HpaII и MspI, TaqI и Sau3AI, SmaI и XmaI). В сочетании с гибридизацией по Саузерну данный метод позволяет установить, модифицирован или нет сайт узнавания соответствующих рестриктаз. Иногда после проведения рестрикции ограничиваются только электрофоретическим анализом различий фрагментов в геле, что позволяет устанавливать наличие метилирования сайта узнавания соответствующих рестриктаз в суммарной ДНК, а не в конкретных генах. Данный метод ориентирован на анализ статуса метилирования больших фрагментов тотальной ДНК и обнаружение множества новых CpG-островков генов. Несмотря на простоту исполнения, недостаток метода состоит в том, что отсутствие надлежащего контроля над прохождением рестрикции может привести к неполному расщеплению ДНК, а неточности в проведении электрофореза могут вызвать неверное истолкование результатов исследования [3].

Применительно к исследованию эпигенома для поиска модифицированных участков ДНК активно используется группа методов, основанная на ПЦР. Существует множество вариаций ПЦР, различающихся по таким параметрам, как концентрация и тип реагентов, температура и время отжига, количество циклов амплификации. Согласно поставленным задачам проводится разработка способов оптимизации условий реакции [4].

Ряд ПЦР-основанных методов сравнения геномов растений и животных показал, что у тех и у других наиболее метилированы повторяющиеся элементы. Метилированные остатки цитозина неравномерно распределены в ДНК, чаще всего они присутствуют в гетерохроматиновых участках. Модифицированные остатки цитозина сконцентрированы преимущественно в умеренно и часто повторяющихся последовательностях, расположенных в центромерах, теломерах и областях ядрышкового организатора. Самый высокий уровень ферментативной модификации имеют гены рибосомных РНК. Также много метилированных остатков цитозина в ДНК транспозонов и ретроэлементов. Модификация и расположение мобильных генетических элементов в области гетерохроматина делает их транскрипционно неактивными [5, 6]. Предположительно, ферментативно модифицированные остатки цитозина отсутствуют в большинстве экзонов растений. В эндогенных генах модифицируются 5'-области генов. Трансгены, в свою очередь, несут паттерны метилирования как в промоторных, так и в кодирующих областях [7, 8].

Одним из современных наиболее применяемых методов изучения эпигенома считается метод метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР), или, как принято называть его в зарубежных источниках, MSAP-анализ (methylation-sensitive amplification polymorphism). Данный метод является модификацией метода анализа полиморфизма амплифицированных фрагментов, он основан на принципе использования энзиматического гидролиза с помощью рестрикционных эндонуклеаз, чувствительных к метилированию остатков цитозина, и дальнейшей ПЦР со специфическими CG-богатыми праймерами. Когда имеются модифицированные основания во фрагменте ДНК, то гидролиза метилчувствительной рестриктазой не происходит и данный фрагмент будет амплифицироваться экспоненциально. Если исследуемый фрагмент ДНК не содержит метилированных оснований, гидролиз проходит полностью и продукт ПЦР данного фрагмента отсутствует на электрофореграмме (рис. 1). Данный метод эффективен для исследования промоторных CpG-островков, содержащих множество

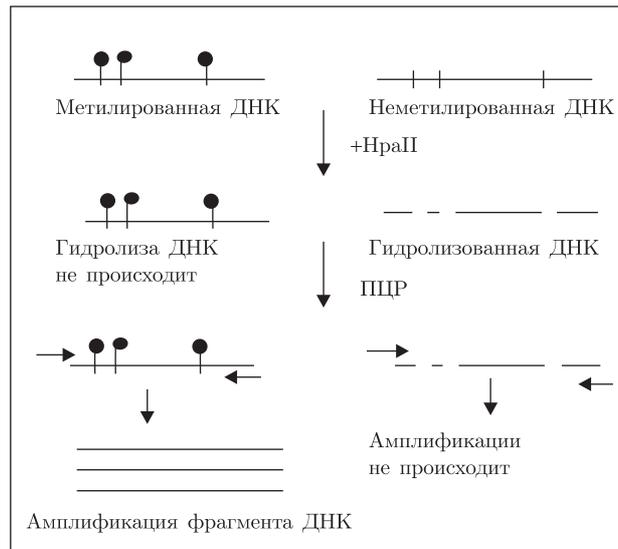


Рис. 1. Схема MSAP-анализа

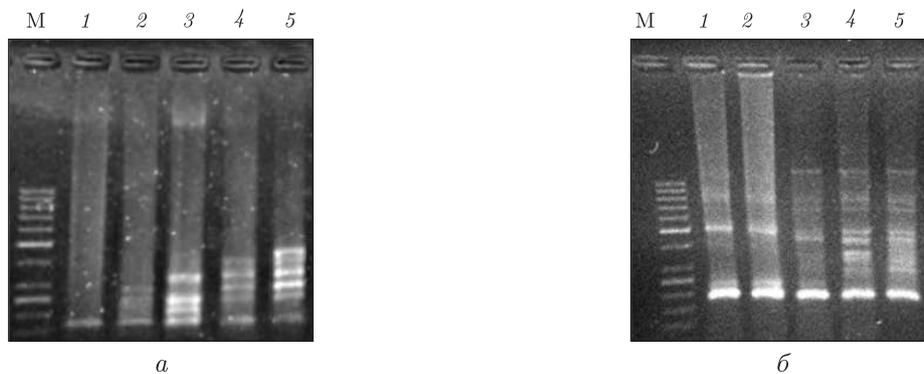


Рис. 2. MSAP-анализ с CG-богатыми праймерами: *а* — анализ неспецифических GC-участков; *б* — анализ GC-участков во фрагменте гена рибосомной РНК.

1 — необлученный контроль; 2 — доза 10 Гр; 3 — доза 20 Гр; 4 — доза 50 Гр; 5 — доза 100 Гр

сайтов узнавания метилчувствительных рестриктаз. MSAP позволяет проводить полногеномный анализ статуса метилирования и высокочувствительную детекцию интенсивности модификации CpCpGpG-мотивов в определенных фрагментах генов, а также наблюдать изменения характера метилирования ДНК в динамике [8, 9].

В своих исследованиях мы применяли метод MSAP-анализа (МЧ-ПЦР) для исследования изменения паттернов метилирования под действием облучения ионизирующей радиацией (рис. 2). С целью оптимизации метода на этапе ферментативной обработки использовали несколько типов рестриктаз. Рестриктию суммарной ДНК проводили в два этапа. На первом этапе ДНК исследуемых образцов инкубировали с ферментом рестрикции EcoRI, который не содержал в составе своего сайта узнавания CpG-динуклеотиды, а узнавал и расщеплял редко встречаемую последовательность 5'-GAATTC-3'. Чаще всего на этом этапе используется фермент именно с гексануклеотидным сайтом узнавания ДНК. Смысл этапа — расщепление ДНК на более мелкие фрагменты, что делает их более доступными для действия метилчувствительных рестриктаз. Рестриктазы брали в реакцию с 10-кратным

избытком (1 мкг ДНК — 10 ед. акт. фермента), инкубировали в соответствующих буферах при температурах, указанных производителем реагента, в течение 16 ч. На втором этапе отбирали половину обработанной ДНК и инкубировали с той или иной рестриктазой, чувствительной к статусу метилирования CpG-динуклеотидов в составе своего сайта рестрикции. Добавляли половину исходного количества фермента (1 мкг — 5 ед. акт. фермента) и инкубировали в течение 2–3 ч при температурах, указанных производителем. В дальнейшем анализе использовали аликвоту рестрицированной ДНК в амплификации со специфическими и неспецифическими праймерами. По условиям MSAP-анализа праймеры должны содержать на концах CG-повторы, фланкирующие исследуемый участок, т. е. должны быть обогащены CG-парами. Праймеры подбирали в соответствии с той последовательностью, эпигеном которой хотели проанализировать. В нашем случае это были гены рРНК, имеющие множество вариабельно метилируемых CpG-динуклеотидов. Так, для анализа генома использовали неспецифические CG-богатые праймеры, для анализа фрагмента гена конструировали специфические CG-богатые праймеры. Последующая ПЦР продуктов рестрикции позволяет установить расположение метилированных сайтов в выбранном участке генома. Различия в продуктах реакции объясняются наличием метилирования ДНК по сайту, узнаваемому метилчувствительной рестриктазой.

Метилчувствительная рестриктаза разрезает сайты, в которых отсутствует метилирование, и оставляет неизменными те сайты, в которых присутствует модификация. В дальнейшем делают секвенирование полученных продуктов ПЦР на секвенаторе для подробного описания метилирования каждого сайта исследуемого участка. При отсутствии возможности проводить сиквенс обходятся визуализацией продуктов реакции в агарозном или полиакриламидном гелях на УФ-трансиллюминаторе [10].

На рис. 2 показаны примеры MSAP-анализа со специфическими и неспецифическими CG-богатыми праймерами. Наличие дополнительных продуктов амплификации в облученных образцах указывает на прохождение метилирования под влиянием облучения. О том, как долго длился вызванный облучением эпигенетический эффект, можно определить при дальнейшем исследовании эпигенома на последующих стадиях онтогенеза [11].

Недостаток метода состоит в ограниченности только CpG-динуклеотидами. Однако эти динуклеотиды, попадающие в сайт узнавания, могут быть успешно проанализированы с помощью данного метода. Достоинством метода является высокая чувствительность, позволяющая анализировать метилированные аллели при наличии аллелей дикого типа. Кроме того, MSAP-анализ прост и удобен в применении, менее затратен по сравнению с методами, включающими бисульфитную обработку ДНК [12].

Еще одним методом, основанным на ПЦР, является метод метилспецифической ПЦР (МС-ПЦР), позволяющий оценить статус метилирования индивидуальных CpG-островков. В частности, обнаружить в составе отдельных генов и их промоторов те CpG-динуклеотиды, модификация которых способна подавить транскрипцию соответствующего гена. Суть метода заключается в том, что исследуемую ДНК подвергают обработке бисульфитом натрия, который дезаминирует немодифицированный цитозин, превращая его в урацил, в то время как метилированные остатки цитозина остаются неизменными и устойчивыми к данной обработке. Сайты узнавания рестриктаз в неметилированных последовательностях претерпевают модификацию. В ходе последующей ПЦР урацил заменяется на тимин, а неметилированный цитозин конвертируется в тимин [13].

Важным условием метода МС-ПЦР является полная денатурация ДНК, полная конверсия неметилированных остатков цитозина с минимальными потерями ДНК в процессе

многостадийной подготовки образца. Этапы бисульфитной обработки включают рестрикцию, денатурацию, бисульфитную конверсию, очистку, остановку конверсии и осаждение ДНК. Количество суммарной ДНК должно быть в пределах 500 нг – 2 мкг.

Перед подготовкой к бисульфитной обработке суммарную ДНК, как и на первом этапе метода MSAP-анализа, обрабатывают эндонуклеазой рестрикции. Рестриктазу подбирают так, чтобы исследуемая последовательность не содержала сайтов узнавания этой рестриктазы, а была фланкирована ими. Данный этап, так же как и в MSAP, занимает 12–16 ч. Затем продукты рестрикции ДНК очищают от остатков рестриктазы фенол-хлороформной депротеинизацией для предотвращения ингибирования бисульфитной конверсии. Денатурируют ДНК, поскольку конверсия возможна только в одноцепочечной ДНК. Инкубируют 30 мин при 37 °С с NaOH 0,3 М или при 97 °С 5 мин, с последующим резким охлаждением на льду. На этапе бисульфитной конверсии цитозина используют раствор, содержащий бисульфит натрия и гидрохинон в концентрации 3,5 М и 0,5 мМ соответственно. В течение 8 ч инкубируют при 50–60 °С. После этого проводят десульфонацию ДНК, что предотвращает ингибирование в ходе дальнейшей реакции; осаждают этанолом. Затем протравливают ПЦР и секвенирование, что дает возможность точно картировать данные о количестве метилцитозина в геноме.

Секвенирование позволяет определить модификацию всех CpG-динуклеотидов исследуемой области. Однако часто обходятся методами, не уступающими по эффективности секвенированию. Одним из таких методов является метилспецифическая ПЦР, позволяющая достоверно оценить метилирование CpG-динуклеотидов. ПЦР проводят с праймерами, соответствующими метилированной и неметилированной последовательности изучаемого участка ДНК. О метилировании судят исходя из того, с какой парой праймеров прошла амплификация. Специфические праймеры конструируют так, чтобы на 3'-конце каждый содержал хотя бы один CpG-динуклеотид. Преимущество метода состоит в том, что целостность ДНК поддерживается, однако необходимо добиться полноты прохождения конверсии неметилированных остатков цитозина, чтобы свести к минимуму ошибки, ведущие к появлению ложноположительных результатов. Основным недостатком является необходимость строгого подбора условий ПЦР и конструкции множества пар праймеров, которые избирательно амплифицируют последовательности. Данным методом сложно исследовать большие массивы ДНК. Но в сочетании с real-time ПЦР метод позволяет определить метилирование отдельных CpG-пар [14, 15].

В эпигенетике растений метод MS-ПЦР на основе бисульфитной конверсии сыграл важную роль. С помощью бисульфитного секвенирования генома было определено, что метилирование происходит не только в CpG и CpNpG симметричных мотивах, но и в асимметричных CpNpN-мотивах эндогенных генов растений. Метилирование цитозина в асимметричных последовательностях ДНК растений происходит при *de novo* РНК-направленном метилировании. Асимметричные сайты часто метилируются в мобильных генетических элементах. Модификация этих последовательностей сопровождается сайленсингом трансгенов и транспозонов [1].

Дифференциальное метилирование генов определяют также с помощью рестрикционного анализа ПЦР-продуктов. Это метод COBRA (combined bisulfate restriction analysis), основанный на использовании, как и в предыдущем случае, бисульфита натрия для модификации неметилированных остатков цитозина. После бисульфитной обработки ДНК проводят амплификацию гена, эпигенетический статус которого хотят исследовать с праймерами, фланкирующими один или несколько CpG-динуклеотидов. Затем рестрицируют

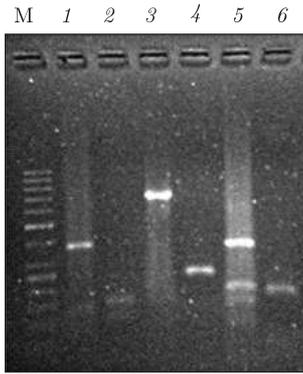


Рис. 3. Пример метода COBRA для анализа продукта амплификации ITS гена рРНК разными метилчувствительными рестриктазами.

1 – MspI; 2 – HpaII; 3 – продукт амплификации; 4 – DpnI; 5 – EcoRV; 6 – SmaI

продукт амплификации метилчувствительными рестриктазами. В зависимости от состояния модификации CpG-динуклеотидов во время бисульфитной обработки образуются или исчезают сайты узнавания различных рестриктаз. Это можно проверить путем электрофоретического анализа продуктов рестрикции ампликонов. Недостатком метода является необходимость подбора рестриктаз для каждой CpG-пары в составе сайта рестрикции. Кроме того, неполная конверсия остатков цитозина отражается на ПЦР, есть угроза получения ложноположительных результатов. Результаты анализа детектируют на секвенаторе или, при отсутствии таковых возможностей, ограничиваются визуализацией продуктов реакции в агарозном геле [3, 14]. На рис. 3 показан пример рестрикционного анализа ПЦР-продукта последовательности ITS (internal transcribed spacer) гена рРНК с помощью метилчувствительных рестриктаз.

Применение того или иного метода основывается на задачах исследования, может обладать как достоинствами, так и недостатками. Методы, ограничивающиеся применением эндонуклеаз рестрикции и электрофоретического анализа, недостаточно точны по причине вероятного неполного расщепления ДНК. Методы, основанные на бисульфитной обработке, плохо воспроизводимы, дают неточности из-за сложностей в проведении полной денатурации, конверсии и очистки геномной ДНК. Некоторые ПЦР-основанные методы, в частности МС-ПЦР, не всегда оправданы из-за затратности, поскольку требуют большого количества разнообразных праймеров, подбора ряда рестриктаз, обязательного использования секвенатора и длительного подбора условий реакции. Наиболее простым и доступным является метод MSAP-анализа. Он не нуждается в бисульфитной обработке ДНК, ограничивается малым набором рестриктаз и праймеров. Данные анализа картируются без секвенатора и вполне воспроизводимы. Согласно результатам нашего исследования, метод MSAP-анализа является наиболее удобным и доступным для определения паттернов метилирования в ДНК растений, облученных ионизирующей радиацией.

1. *Ming C., Shaolei L., Meng Y.* Epigenetic performers in plants // *Development, Growth and Differentiation*. – 2010. – **52**, No 6. – P. 555–566.
2. *Nawkar G. M., Maibam P., Park L. H. et al.* UV-Induced Cell Death in Plants // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – **14**, No 1. – P. 1608–1628.
3. *Brownstein M. J., Khodursky A.* Functional genomics (methods and protocols). – Totowa: Humana Press, 2003. – 500 p.

4. Lee T., Zhai J., Meyers B. Conservation and divergence in eukaryotic DNA methylation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2010. – **107**, No 20. – P. 9027–9028.
5. Yang C., Zhang M., Niu W. et al. Analysis of DNA Methylation in Various Swine Tissues // Plos One. – 2011. – **6**, No 1. – P. 1–9.
6. Wu R., Wang X., Lin Y. et al. Inter-Species Grafting Caused Extensive and Heritable Alterations of DNA Methylation in Solanaceae Plants // PloS One. – 2013. – **8**, No 4. – P. 1–11.
7. Keyte A., Percifield R., Liu B. et al. Intraspecific DNA Methylation Polymorphism in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // J. Heredity. – 2006. – **97**, No 5. – P. 444–450.
8. Lu Y., Rong T., Cao M. Analysis of DNA methylation in different maize tissues // J. genet. and genom. – 2008. – **35**. – P. 41–48.
9. Wojdacz T. K., Dobrovic A., Hansen L. L. Methylation-sensitive high-resolution melting // Nature Protocols. – 2008. – **3**, No 12. – P. 1903–1908.
10. Shen L., Waterland R. A. Methods of DNA methylation analysis // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. – 2007. – **10**. – P. 576–581.
11. Берестяная А. Н. Влияние острого рентгеновского облучения на эпигеном в ходе онтогенеза *Linum usitatissimum* // Доп. НАН України. – 2013. – № 9. – С. 158–164.
12. Cao D., Xiang G., Liu J. Methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) reveals that alkali stress triggers more DNA hypomethylation levels in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) roots than salt stress // African J. Biotechnol. – 2011. – **10**, No 82. – P. 18971–18980.
13. Claus R., Wilop S., Hielscher T. et al. A systematic comparison of quantitative high-resolution DNA methylation analysis and methylation-specific PCR // Epigenetics. – 2012. – **7**, No 7. – P. 772–780.
14. Fouse S. D., Nagarajan R. P., Costello J. F. Genome-scale DNA methylation analysis // Epigenomics. – 2010. – **2**, No 1. – P. 105–117.
15. Колупаев В. Е. Преимущества методов ПЦР в реальном времени // Лаб. медицина. – 2002. – № 5. – С. 110–112.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 04.10.2013

А. М. Берестяна

Аналіз методів оцінки метилування залишків цитозину на прикладі ДНК монокарпічної рослини *Linum usitatissimum*

*Розглянуто переваги та недоліки найбільш поширених методів аналізу епігеному рослин. Проаналізовано методи визначення метилування ДНК у контексті радіобіологічних досліджень. Наведено дані щодо застосування цих методів на прикладі дослідження модифікації ДНК монокарпічної рослини *Linum usitatissimum*, опроміненої різними дозами іонізуючого випромінювання.*

A. N. Berestyanyaya

The analysis of methods for assessing the methylation of cytosine residues in the DNA sample of monocarpic plant *Linum usitatissimum*

*The advantages and disadvantages of the most popular methods of analyzing the epigenome of plants are considered. The methods of determination of the DNA methylation in the context of radio-biological researches are analyzed. Data on applications of the methods described to the study of a DNA modification of monocarpic plant *Linum usitatissimum* irradiated with different doses of ionizing radiation are presented.*