

## Денатурация ДНК при старении створок бобов сои

Е. Н. Тищенко, С. И. Михальская, Т. М. Даскалюк, В. Ф. Марьюшкин

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

*Выявлено, что в процессе старения створок бобов сои (*Glycine max* L., Merr.) олигонуклеосомной фрагментации не наблюдается и суммарная ДНК представлена высокополимерными фрагментами одинаковой молекулярной массы, которые, однако, по мере дегидратации и разрушения хлоропластов подвергаются частичной денатурации. Полученные данные свидетельствуют в пользу концепции о старении створок бобов сои как формы запрограммированной клеточной гибели (ПГК) и о дифференциальных процессах деградации ДНК при ПГК в онтогенезе растений.*

**Введение.** Программированная гибель клеток (ПГК) — активное их участие в процессах собственного разрушения — является неотъемлемым компонентом онтогенеза многоклеточных организмов. У высших растений в морфогенезе и при реализации ряда физиологических функций запрограммированной гибели специфично и упорядоченным образом могут подвергаться отдельные клетки, слои клеток, целые органы [1—3]. Важнейшая функция ПГК растений состоит в ремобилизации органических и минеральных веществ ради пользы целого организма. Одним из таких примеров является старение створок бобов сои, поставляющих питательные вещества в семядоли развивающихся семян.

Наиболее изученная форма ПГК эукариотов — апоптоз животных, реализация которого связана с активацией каскада каспаз — семейства цистеиновых протеаз, специфически расщепляющих белки [4, 5]. Он происходит вследствие последовательных морфологических, физиологических и биохимических изменений, в том числе деградации ДНК, конденсации хроматина, формирования везикул из содержимого ядра и клетки. К ключевым характеристикам апоптоза относится фрагментация хромосомной ДНК. При этом образование на первоначальном этапе высокомолекулярных фрагментов размером 50—300 тыс. п. н. после эндонуклеолити-

ческого расщепления хроматина приводит к дальнейшему олигонуклеосомному гидролизу ДНК. Другая характерная черта апоптической фрагментации ДНК — индукция  $\text{Ca}^{2+}$ - и  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимыми нуклеазами не только двух-, но и одноцепочных разрывов, причем последние могут происходить в ДНК линкера и кор-нуклеосомы [4, 6]. Следует подчеркнуть, что за высокомолекулярной не всегда следует олигонуклеосомная фрагментация ДНК [4, 5, 8]. Более того, при запрограммированной гибели некоторых типов клеток животных наряду с отсутствием мультимеров, размер которых кратен ~180 п. н., не наблюдается присущих апоптозу морфологических изменений [7]. В связи с этим была высказана гипотеза о существовании дифференциальных путей ПГК животных [7]. Имеются основания для подобного предположения и в случае ПГК растений как результат, в частности, исследования характера деградации ДНК [8—10].

Надо заметить, что на текущий момент механизм осуществления ПГК растений, аналогичный генетически детерминированному каспазному пути животных, не известен, хотя многие морфологические и биохимические признаки гибели клеток у этих эукариотов общие. Установлены, например, межнуклеосомная фрагментация ДНК, конденсация хроматина, сжатие ядра и цитоплазмы, усиление потока  $\text{Ca}^{2+}$  [2, 3, 11, 12]. Однако такие сведения немногочисленны и фрагментарны. Кроме того, в процессе развития растений не все перечисленные выше характерные черты апоптоза прояв-

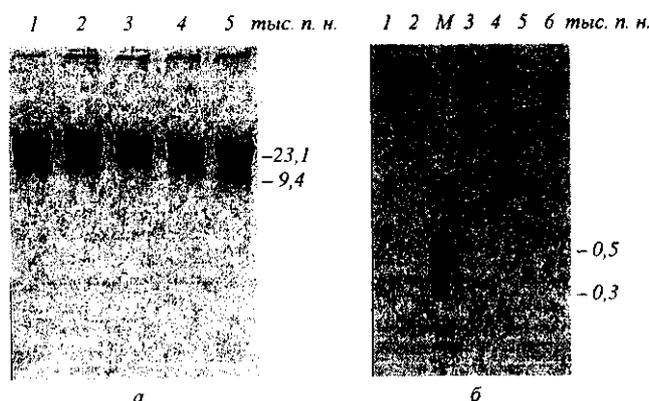


Рис. 1. Электрофореграмма суммарной ДНК створок сои: а — в 0,8 %-м агарозном геле на стадии старения I (1); II (2); III (3); IV (4); V (5) и б — в 1,5 %-м агарозном геле на стадии старения I (1, 2), III (3, 4), V (1, 2); М — маркер молекулярной массы — *pUC19 DNA/MspI* Marker, 23 («Fermentas», Литва)

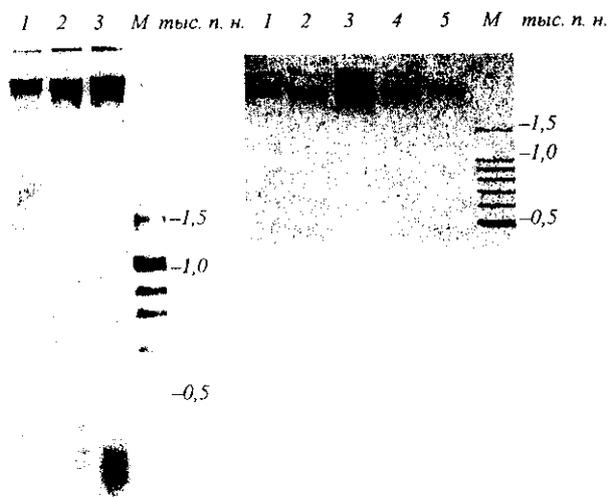


Рис. 2. Электрофореграмма в 1,5 %-м агарозном геле нуклеиновых кислот створок бобов сои на стадии старения I (3); III (2); V (1) (а) и в 1,8 %-м агарозном геле ДНК на стадии старения I (1); II (2); III (3); IV (4); V (5) (б). М — маркер молекулярных масс — 100-bp DNA Ladder («Promega», США)

ляются в разных типах клеток, вступивших на путь программированной гибели.

Целью данной работы было исследование особенностей деградации ДНК при старении клеток створок бобов сои.

**Материалы и методы.** В работе использовали РНКазу А, Polyclar АТ, агарозу, бромистый этидий, трис, ЭДТА, β-меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия (ДСН) («Serva», Германия), ацетат К («Fluka», Швейцария), оксиапатит («BioRAD», Германия), остальные реактивы отечественного производства.

Растения сои (*Glycine max* L., Merr.) сорта Марьяна выращивали в условиях полевого опыта. Процесс старения створок бобов условно разделили на пять стадий по мере изменения их гидратации (от 78 до 1 %) и окраски (от зеленых до темно-коричневых). Общее количество воды рассчитывали по разнице массы створок бобов, находящихся на определенном этапе старения, и их сухого остатка [13]. Растительный материал высушивали в термостате при температуре 105 °С в течение нескольких суток до тех пор, пока величина сухой массы не достигала стационарного уровня.

Суммарную ДНК выделяли модифицированными нами методами Деллапорта и Бриттена [14—16]. Растительные ткани замораживали жидким азотом и добавляли 5—6 % Polyclar АТ для связывания полифенолов. Буфер для экстракции содержал 0,1 М трис-НСl, рН 8,0, 0,1 М ЭДТА, 0,5 М NaCl, 0,1 М аскорбиновую кислоту, 5 %-ю парааминосалициловую кислоту, 1 %-е β-меркаптоэтанол и диэтилдитиокарбомат. После получения гомогенной суспензии добавляли ДСН до конечной концентрации 2 % и инкубировали при температуре 55—60 °С в течение 10 мин. После депротеинизации нуклеиновые кислоты (НК) осаждали 0,54±1 объемом изопропанола при -20 °С и далее инкубировали с 60 мкг/мл РНКазы А при температуре 37 °С в течение 1,5 ч в буфере, содержащем 0,5 М NaCl. Дальнейшую очистку проводили додецилацетатом калия [14] или хроматографией на оксиапатите в присутствии мочевины [15]. В последнем случае в инкубационную среду вносили мочевину (8 М), NaCl (1 М), фосфатный буфер (ФБ, 0,03 М), ДСН (1 %) и наслаивали на оксиапатит при температуре 25 °С. Элюцию вели сначала буфером, содержащим 8 М мочевину, 0,03 М ФБ, 1 М NaCl, затем — 0,03 М ФБ для удаления мочевины.

Денатурированную ДНК элюировали 0,12 М ФБ при 25 °С, тогда как двухцепочечную — 0,4 М ФБ при 25 °С и 0,12 М ФБ при 96 °С. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм. При расчете доли денатурированной ДНК вводили поправку на гипохромизм нативной ДНК и не учитывали количества олигонуклеотидов, элюируемых 0,03 М ФБ.

Электрофорез суммарной ДНК проводили в 0,8, 1 и 1,5 %-х агарозных гелях, содержащих 0,5 мкг/мл бромистого этидия в 1 × ТВЕ буфере при напряжении 3—4 В/см<sup>2</sup> в течение 3—5 ч [15].

**Результаты и обсуждение.** На клеточном уровне программа старения разворачивается упорядоченным образом, и хлоропласты растительных клеток являются первыми органеллами, в которых

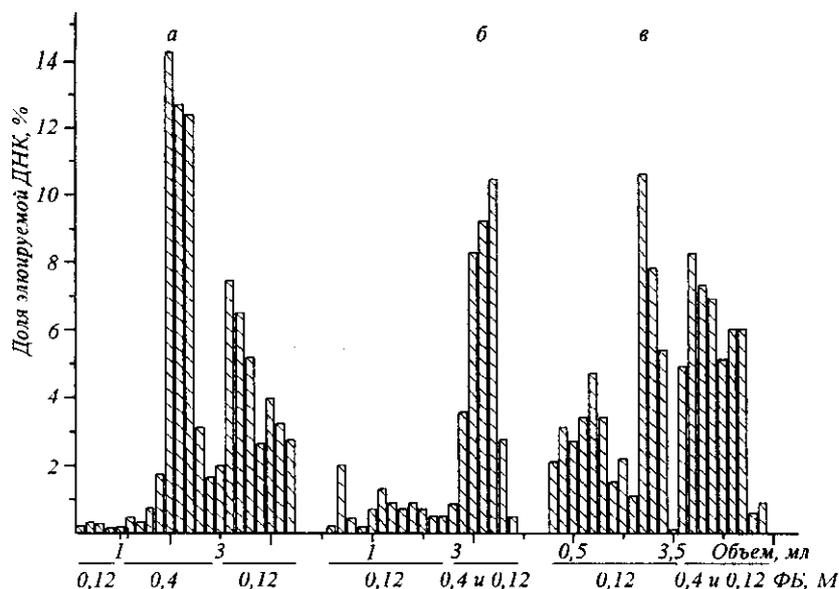


Рис. 3. Хроматография на оксипатите ДНК развивающихся (*а, б* — гидролизованная ДНК) и стареющих (*в*) створок бобов сои (стадия старения V)

происходят связанные с ПКГ биохимические изменения, в том числе визуально наблюдаемая потеря хлорофилла [17]. Ввиду этого, а также учитывая другой показатель — постепенную дегидратацию створок бобов сои, мы условно разделили процесс их старения на стадии, где процент гидратации/окраски составляет соответственно: I —  $78 \pm 5$  (зеленые), II —  $75 \pm 5$  (желто-зеленые), III —  $47 \pm 3$  (желтые), IV —  $30 \pm 3$  (светло-коричневые) и V —  $(1+9) \pm 0,5$  (темно-коричневые). На первых двух стадиях разница в уровнях гидратации была статистически недостоверной.

На рис. 1 и 2 представлены результаты сравнительного изучения молекулярных масс ДНК и суммарного препарата НК створок бобов сои в ходе их старения. Основную массу молекул суммарной ДНК в 0,8 %-м агарозном геле представляют относительно высокомолекулярные фрагменты, изменений их электрофоретических подвижностей на стадиях старения I—V не наблюдается (рис. 1, *а*). К такому же заключению можно прийти, анализируя результаты электрофореза ДНК в 1,5 %-м агарозном геле при разных количествах (от ~5 до ~10 мкг) вносимой НК на стадиях I, III и V (рис. 1, *б*) и в 1,8 %-м агарозном геле на стадиях I—V (рис. 2, *б*). Поэтому на протяжении всех этапов старения, в том числе при гидратации, составляющей 1 или 9 %, то есть в практически сухих створках, размер фрагментов молекул ДНК в пределах чувствительности применяемых методов исследования не меняется и олигонуклеосомной фрагментации не происходит. По мере старения в препарате НК значительно уменьшается концентрация низкомолекулярной РНК, и на этом фоне

характерной для апоптоза «лестницы» фрагментов ДНК также не наблюдается (рис. 2, *а*).

Для исследования природы изменений, происходящих в геноме при дегидратации клеток створок бобов сои, мы предприняли иную стратегию — хроматографию на оксипатите (ОА) [16, 18]. Мочевина повышает сродство двухцепочечных ДНК к ОА [16], и это дает возможность идентифицировать в молекулах ДНК денатурированные участки. На рис. 3 представлены результаты такого эксперимента для ДНК створок бобов на стадиях I и V. Распределение доли элюируемой ДНК сухих створок имеет неравномерный характер с тремя ярко выраженными пиками при элюции 0,12 М ФБ (25 °С), 0,4 М ФБ (25 °С) и 0,12 М ФБ (96 °С) (рис. 3, *в*). Установлено [18], что двухцепочечные ДНК десорбируются 0,4 и 0,12 М ФБ при 96 °С, тогда как одноцепочечные (денатурированные) — при 0,12 М ФБ и 60 °С. В наших условиях фракционирования (0,12 М ФБ, 25 °С) элюируют денатурированные фрагменты ДНК, в которых водородные и Ван-дер-Ваальсовы связи между элементарными цепочками нарушены частично и/или полностью.

Количество денатурированных фрагментов на стадии старения V составляет около  $30 \pm 5$  %. В то же время ДНК молодых зеленых створок практически полностью (на 99 %) представлена двухцепочечной ДНК (рис. 3, *а*). В качестве положительного контроля для оценки диапазона возможных изменений количества денатурированных ДНК, вызванных сильными гидродинамическими градиентами, раствор ДНК многократно пропускали через шприц и при таких условиях доля денатуриро-

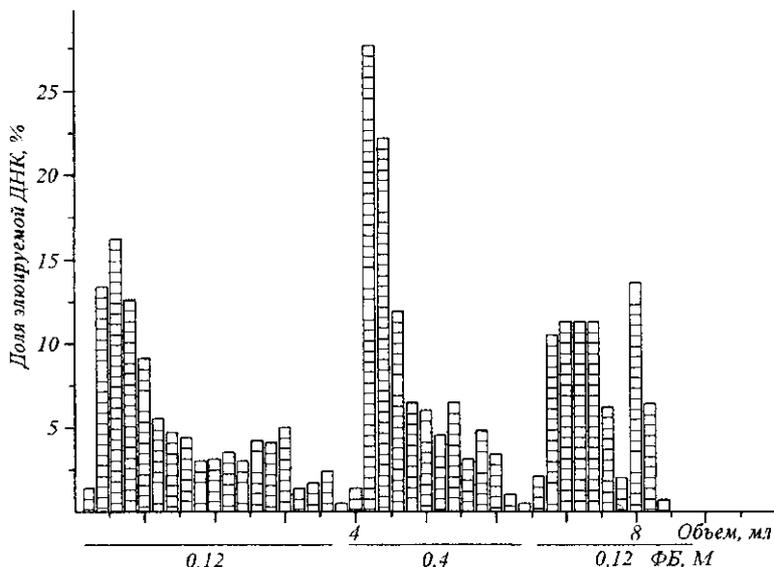


Рис. 4. Хроматография на оксиапатите ДНК створок бобов сои на стадии старения III

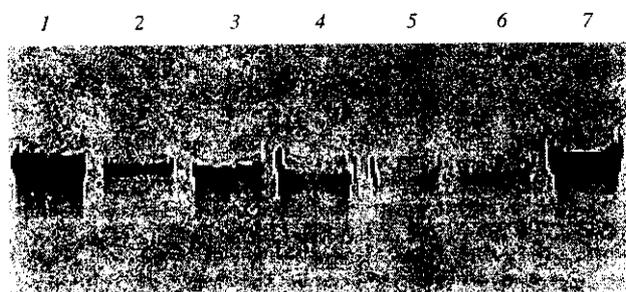


Рис. 5. Электрофорез в 1 %-м агарозном геле одноцепочечной ДНК (4, 6) и двухцепочечной суммарной ДНК (5, 7) створок бобов на стадиях старения III (4, 5) и V (6, 7). Суммарная ДНК на стадиях старения I (1), III (2), V (5)

ванных фрагментов ДНК увеличивалась не более чем на 10 % (рис. 3, б), то есть в 3 раза была меньшей, чем при ее определении на стадии старения V. Следует отметить, что используемым методом сложно дать точную количественную оценку соотношения полностью и частично денатурированной ДНК в клетках *in vivo*. Это, по-видимому, определяется условиями выделения ДНК, так как на стадии инкубации растительного гомогената существует возможность термической денатурации коротких двухцепочечных участков денатурированных молекул.

Анализ хроматограммы ДНК на стадиях III (рис. 4) также показал присутствие денатурированных ДНК, доля которых достоверно не отличалась от таковой на стадии старения V.

На рис. 5 приведены результаты распределения по молекулярным массам отдельных фракций ДНК, элюируемых 0,12 и 0,4 М ФБ, в 1 %-м агарозном геле на стадиях старения III и V. На-

блюдаются незначительные различия в электрофоретических подвижностях денатурированных и двухцепочечных ДНК, которые преимущественно представлены относительно высокомолекулярными фрагментами, сопоставимыми с молекулами ДНК, не фракционированными на оксиапатите.

Старение створок бобов сопровождается частичной денатурацией суммарной ДНК. Такой процесс осуществляется, по крайней мере, на этапе старения створок бобов сои, когда степень гидратации уменьшается почти вдвое и происходит разрушение хлорофилла.

При дальнейшем обезвоживании количество денатурированных фрагментов статистически достоверно не различимо, поэтому изменения могут происходить в хлоропластных (хлДНК) и/или ядерных ДНК. Денатурация хлДНК при разрушении хлоропластов, наиболее вероятно, происходит в результате изменений в белках, стабилизирующих ее структуру, и снижения ионной силы. Дегградация хлДНК при ПГК является слабо изученным процессом, тем не менее, показано, что при индуцируемой вирусом табачной мозаики ПГК повышается уровень мономерных форм хлДНК, которая в норме представлена мультимерной [10].

Что касается ядерного генома, то процессы дегградации могут быть обусловлены прежде всего нарушениями в организации хроматина, для которого показана необходимость присутствия в каждой нуклеосоме при физиологических условиях около 1000 молекул воды и катионов [19]. Поэтому при старении, когда происходит дегидратация и отток минеральных веществ, возможны изменения в белково-белковых и ДНК-белковых взаимодействиях, что повышает вероятность гидролиза и денатура-

ции ДНК. Кроме того, по-видимому, имеет значение, в каком функциональном состоянии находились области хроматина, подверженные действию нуклеаз. В частности, изменения в молекуле ДНК может предопределять сам процесс транскрипции, в ходе которой происходят обратимые модификации и разрушения хроматина [20] и которая еще продолжает осуществляться в ядрах, когда распадаются хлоропласты [17].

При ПГК животных одноцепочечные разрывы в сайтах комплементарных цепочек ДНК, расположенные на близком расстоянии, приводят к ее диссоциации [6], и уже идентифицированы нуклеазы с такой активностью [4]. Эндонуклеазы клеток растений, функционирующие при ПГК, изучены недостаточно, хотя показано, что как двухцепочечные, так и одноцепочечные ДНК являются их субстратами [8, 9]. Можно предположить, что частичную денатурацию ДНК при старении сои преимущественно инициируют одноцепочечные разрывы. Интересно отметить, что в процессе старения растений деградация ДНК может осуществляться в ядрах не всех, а лишь специфично расположенных клетках органов [3]. Не исключено, что это имеет место и в отдельных клетках створок бобов сои, так как происходит частичная денатурация молекул ДНК.

В процессе старения необратимый переход клеток створок бобов на путь гибели не сопровождается олигонуклеосомной фрагментацией, которая является критерием ПГК растений, и она часто [3, 21, 22], но не всегда [9, 10] происходит в ответ на биотические и абиотические факторы. При онтогенезе эта характеристика ПГК исследована в меньшей степени, однако и здесь при наличии апоптозоподобной морфологии в ряде случаев не выявлена «лестница» ДНК [3, 8, 23]. Что касается сои, то в ее культуре клеток при изучении поли(ADP-рибозо)-полимеразы — одной из первых мишеней, специфически расщепляемой каспазами, при индуцированной перекисью ПГК олигонуклеосомная фрагментация не обнаружена [24]. Вместе с тем при старении створок сои не происходит и неупорядоченной деградации ДНК — образования непрерывного спектра ее фрагментов, что присуще гибели клеток при некрозе. Представленные в этой работе данные позволяют рассматривать старение створок бобов сои как форму ПГК. Они также свидетельствуют в пользу гипотезы о дифференциальных путях ПГК в онтогенезе растений.

Денатурация молекул ДНК описана нами ранее и при старении листьев сахарной свеклы и сои [25]. Это позволяет предположить, что программированная гибель клеток может сопровождаться не

только фрагментацией по межнуклеосомным спейсерам, но и дестабилизацией двойной спирали ДНК. Возможно, это свойственно растительным клеткам, так как в отличие от апоптоза животных старение органов растений как форма ПГК является относительно длительным процессом, при котором деградация ДНК и морфологические изменения проявляются на завершающих этапах его выполнения [2].

Таким образом, в процессе старения створок бобов сои изменений в размере высокомолекулярных фрагментов ДНК не наблюдается, вместе с тем отмечена их частичная денатурация, которую в отсутствие олигонуклеосомной фрагментации можно рассматривать как один из показателей необратимого перехода клеток на путь их программированной гибели.

E. N. Tishchenko, C. I. Mychalskaya, T. M. Daskaluk,  
V. F. Mar'yushkin

DNA denaturation during senescence of soybean pod valve

#### Summary

*During senescence of pod valve of soybean (*Glycine max* L., Merr.) no oligonucleosomal DNA fragmentation is observed and total DNA is present as high polymeric fragments with an equal molecular mass, which, nevertheless, are subjected to partial denaturation in the course of dehydration and chlorophyll disruption. These data are in favour of a conception that senescence of soybean pod valve may be considered as some form of programmed cell death (PCD). Also, they evidence the differential processes of DNA degradation during the plant ontogenesis PCD.*

O. M. Тищенко, С. І. Михальська, Т. М. Даскалюк,  
В. Ф. Мар'юшкін

Денатурація ДНК при старінні створок бобів сої

#### Резюме

*Виявлено, що у процесі старіння створок бобів сої (*Glycine max* L., Merr.) олигонуклеосомної фрагментації не спостерігається і сумарна ДНК представлена високополімерними фрагментами однакової молекулярної маси, які, однак, по мірі дегідратації і руйнування хлоропластів частково денатурують. Отримані дані свідчать на користь концепції про старіння створок бобів сої як форми програмованої загибелі клітин (ПЗК), а також про диференційні процеси деградації ДНК при ПЗК в онтогенезі рослин.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Greenberg J. R. Programmed cell death: a way of life for plants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1996.—93.—P. 12094—12097.
2. Jones A. M. Programmed cell death in development and defense // Plant Physiol.—2001.—125, N 1.—P. 94—97.
3. Orzaez D., Granell A. DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in *Pisum sativum* // Plant J.—1997.—11, N 1.—P. 137—144.
4. Yoshida A., Shao R.-G., Pommier Y. Assessment of DNA damage in apoptosis // Apoptosis. A practical approach.—Oxford: Univ. press, 1999.—P. 41—55.
5. Самуилов В. Д., Олексин А. В., Лагунова Е. М. Програм-

- мированная клеточная смерть // Биохимия.—2000.—65, № 8.—С. 1029—1046.
6. Peitsch M. C., Muller C., Tschopp J. DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts // Nucl. Acids Res.—1993.—21, N 18.—P. 4206—4209.
  7. Schwartz L. M., Smith S. W., Jones M. E. E., Osborne B. A. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1993.—90.—P. 980—984.
  8. Fath A., Bethke P. C., Jones R. L. Barley aleurone cell death is not apoptotic: characterization of nuclease activities and DNA degradation // Plant J.—1999.—20, N 3.—P. 305—315.
  9. Mittler R., Lam E. Identification, characterization, and purification of a tobacco endonucleases activity induced upon hypersensitive response cell death // Plant Cell.—1995.—7.—P. 1951—1962.
  10. Mittler R., Simon L., Lam E. Pathogen-induced programmed cell deaths in tobacco // J. Cell Sci.—1997.—110.—P. 1333—1344.
  11. Кирнос Д. М., Александрюшкина Н. И., Шорнинг Б. Ю., Кудряшова И. Б., Ванюшин Б. Ф. Межнуклеосомная фрагментация и синтез ДНК в проростках пшеницы // Физиология растений.—1999.—46, № 1.—С. 48—57.
  12. Xu Y., Hanson M. R. Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia // Plant Physiol.—2000.—122, N 4.—P. 1323—1333.
  13. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям (Метод. руководство).—Ленинград: ВИР, 1988.—С. 10—24.
  14. Дрейпер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений // Генная инженерия растений. Лаб. руководство / Пер с англ.—М.: Мир, 1991.—С. 248—252.
  15. Лобов В. П., Тищенко Е. Н. Характеристика генома подсолнечника методом кинетики реассоциации // Физиология и биохимия культур растений.—1984.—16, № 3.—С. 256—261.
  16. Britten R. J., Pavich M., Smith J. A new method for DNA purification // Carnegie Inst. Wash. Year Book.—1970.—68.—P. 400—402.
  17. Quirino B. F., Noh Y.-S., Himelblau E., Amasino R. M. Molecular aspects of leaf senescence // Elsevier Sci.—2000.—5, N 7.—P. 278—282.
  18. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот.—М.: Наука, 1985.—С. 221—248.
  19. Bjorklund S., Almouzni G., Davids I., Nightingale K. P., Weiss K. Global transcription regulation of eukaryotes // Cell.—1999.—96.—P. 759—767.
  20. Wolffe A. P., Hayes J. J. Survey and summary chromatin disruption and modification // Nucl. Acids Res.—1999.—27, N 3.—P. 711—720.
  21. Navarre D. A., Wolpert T. J. Victorin induction of an apoptotic/senescence-like response in oats // Plant Cell.—1999.—11, N 2.—P. 237—249.
  22. Koukalova B., Kovarik A., Fajkus J., Siroky J. Chromatin fragmentation associated with apoptic changes in tobacco cells exposed to cold stress // FEBS Lett.—1997.—414.—P. 289—292.
  23. Stein J. C., Hansen G. Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells // Plant Physiol.—1999.—121, N 1.—P. 71—79.
  24. Danon A., Delorme V., Mailhae N., Galloise P. Plant programmed cell death // Plant Physiol. and Biochem.—2000.—38.—P. 647—655.
  25. Тищенко Е. Н., Даскалюк Т. М., Михальская С. И. Деградация ДНК при старении листьев сои // Доп. НАН України.—2003.—№ 2.—С. 182—184.

УДК 577.24

Надійшла до редакції 22.07.03