

Genetické mapování jako nástroj ke studiu evoluce pohlavních chromosomů rodu *Silene*

VLADIMÍRA HYKELOVÁ

Biofyzikální ústav AV ČR, Laboratoř vývojové genetiky rostlin, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 203, e-mail: vladka.hykelova@angelfire.com)

Úvod

Determinace pohlaví je jednou z klíčových otázek vývojové biologie. Různé typy determinace pohlaví, od environmentálního po genetické, byly dopodrobna studovány u široké škály organismů. Stále však nejvíce pozornosti přitahují systémy genetické a to především ty založené na existenci pohlavních chromosomů. Nejlépe charakterizován je Y dominantní typ determinace pohlaví se dvěma chromosomy X přítomnými u samic a X a Y chromosomy u samců. Předpokládá se, že pohlavní chromosomy savců se vyvinuly postupnou diferenciací páru autosomů. Vzájemná diferenciacie páru autosomů začala nejspíš hromaděním antagonistických genů zapojených do procesů sex determinace na jednom či druhém chromosomu, což mělo za následek ztrátu homologie a zástavu rekombinace v určité oblasti původně homologních chromosomů. Tato přechodná stadia ve vývoji pohlavních chromosomů se označují jako proto-X a proto-Y chromosomy (Ellis 1998). Proces diferenciacie byl způsoben i chromosomálními přestavbami - delecemi a inzercemi různých DNA sekvencí, inversemi a translokacemi částí proto-sex chromosomů (Lahn a Page 1999). Tento předpoklad je zřejmě platný i pro evoluci pohlavních chromosomů rostlin. Z analýz srovnávajících strukturu pohlavních chromosomů rostlin a živočichů vyplývá, že pohlavní chromosomy rostlin vznikly daleko později v průběhu evoluce a poskytují tedy jedinečnou příležitost studovat určité kroky vývoje pohlavních chromosomů, ke kterým u živočišných systémů již přístup nemáme.

Model *Silene latifolia*

Jedním z nejlépe prostudovaných rostlinných modelů z hlediska sex determinace je Y aktivní systém *S. latifolia*. Determinace pohlaví u *S. latifolia* přitahuje pozornost vědců už od začátku 20. století, ale teprve posledních 10 let je díky identifikaci molekulárních markerů možné realizovat analýzy pohlavních chromosomů. První aktivní geny lokalizované na rostlinném chromosomu Y byly identifikovány prohledáváním samčí cDNA knihovny. Tímto způsobem bylo izolováno pět genů vázaných na Y chromosom (*SIY1-5*) (Delichere *et al.* 1999). Při podrobnějších analýzách bylo zjištěno, že tři z těchto pěti genů, *SLX1*, *SLX3* a *SLX4* mají své homology také na chromosomu X (Delichere *et al.* 1999; Atanassov *et al.* 2001). Další z genů, gen *DD44*, byl izolován metodou *differential display*. Jeho lokalizace na X a Y chromosomech *S. latifolia* byla prokázána fluorescenční *in situ* hybridizací (Moore *et al.* 2003). Identifikace molekulárních markerů na heteromorfních pohlavních chromosomech *S. latifolia* poskytla příležitost sledovat evoluci pohlavních chromosomů v rámci celého rodu *Silene*. Dosud nejlépe charakterizované geny

mající své homology na chromosomu X - geny *SIY1*, 3, 4 a gen *DD44*, byly vybrány pro naši analýzu.

Srovnávacím mapováním těchto markerových genů na pohlavních chromosomech dvoudomých rostlin (*S. latifolia*, *S. dioica*, *S. diclinis*) a na autosomech gynodioecických (*S. noctiflora*) a hermafroditních (*S. conica*) druhů, můžeme získat informace potřebné k zodpovězení nejčastěji kladených otázek souvisejících s evolucí pohlavních chromosomů. Který z páru autosomů stál na počátku vývoje pohlavních chromosomů? K jakým přestavbám (inzercím, delecím, translokacím, inversím) došlo v průběhu vývoje pohlavních chromosomů? Je původ pohlavních chromosomů v rámci rodu *Silene* monofyletický?

Rod *Silene* je velmi vhodným modelem ke studiu evoluce pohlavních chromosomů, zvláště díky přítomnosti druhů s rozdílnými způsoby reprodukce. Předpokládá se, že pohlavní chromosomy dvoudomých druhů mají svůj původ v autosomech druhů hermafroditních. Za přechodné stadium mezi hermafroditismem a dioecií je považována gynodioecie (Westergaard 1958, Degreave 1980, Desfeux *et al.* 1996). Proto jsme pro naše analýzy vývoje pohlavních chromosomů rodu *Silene* vybrali těsně sousedící druhy se zmíněnými reprodukčními systémy - dvoudomé druhy (*S. latifolia*, *S. dioica* a *S. diclinis*) spolu s druhem gynodioecickým (*S. noctiflora*) a hermafroditním (*S. conica*). Fakt, že všechny druhy mají stejný počet chromosomů ($2n=24$) nám tyto analýzy do značné míry usnadňuje. Při výběru druhů jsme vycházeli z fylogenetického stromu rodu *Silene* sestaveného na základě ITS sekvencí rDNA (sekvencí mezerníků v genech pro ribosomální DNA) (Desfeux 1996; Obr.1).

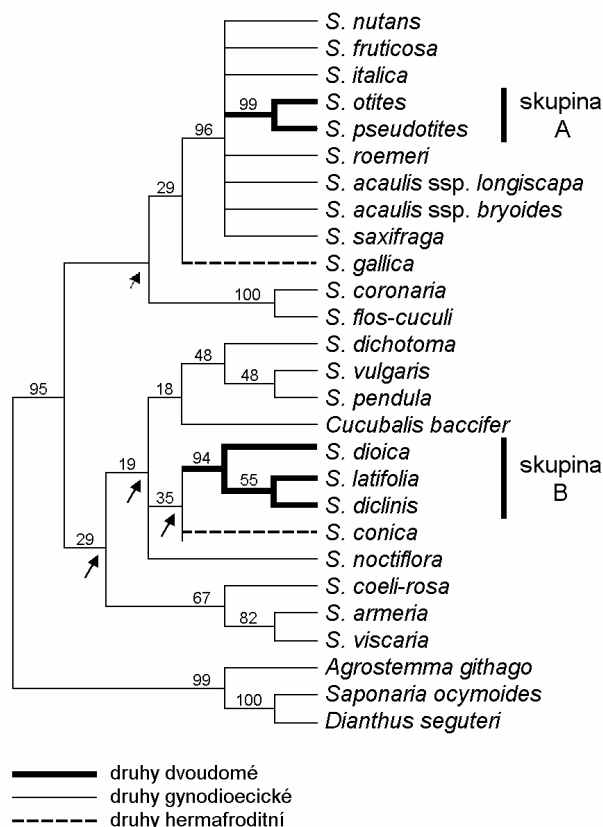
Obecně je možné mapování genů na chromosomech provádět fyzikálně a geneticky. Pro sestrojení fyzikálních map se v naší laboratoři využívá metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Pro genetické mapování čtyř markerových genů na chromosomech vybraných druhů *Silene* jsme se rozhodli využít metody založené na stanovení frekvence rekombinace mezi geny.

Fyzikální mapování markerových genů u *Silene latifolia*

Výhodou FISH jako metody k mapování pohlavních chromosomů je možnost mapovat geny jak na X tak na Y chromosomu. *SIY* - geny, stejně jako gen *DD44* jsou lokalizovány v nerekombinující oblasti Y chromosomu *S. latifolia*, a proto metody založené na sledování frekvence rekombinace pro mapování Y chromosomu u tohoto druhu nemůžeme použít. Dalším přínosem této metody je vizualizace pozice markerových genů, možnost orientace mapy vzhledem k ramenům chromosomů a korekce výpočtů vzdáleností mezi jednotlivými geny, které mohou být genetickým mapováním zkresleny. Komplikovaná příprava vhodných sond pro FISH nám však dosud umožnila lokalizovat touto metodou pouze gen *DD44* (Moore 2003; Lengerova *et al.* in press).

Genetické mapování

Genetické mapování je založeno na stanovení frekvence rekombinace mezi geny. Podstatou rekombinace je meiotický *crossing-over*, probíhající mezi homologními oblastmi chromosomů. Z tohoto faktu vyplývá, že geneticky je možné mapovat pouze geny lokalizované na autosomech, X chromosomech a geny lokalizované v pseudoautosomální oblasti Y chromosomu.



Obr. 1. Fylogenetický strom rodu *Silene* sestavený na základě ITS sekvencí rDNA 22 druhů *Silene* (podle Desfeux *et al.* 1996). Na první pohled je z fylogenetického stromu zřejmé, že v rámci 22 vybraných druhů *Silene* je gynodioecie nejrozšířenější reprodukční strategií. Kromě druhů gynodioecických zde pozorujeme existenci dvou vzdálených skupin dvoudomých druhů (skupina A a B), které sousedí vždy s jedním druhem hermafroditním (*S. gallica* resp. *S. conica*). V naší studii vývoje pohlavních chromosomů jsme se zaměřili na skupinu B dvoudomých druhů – *S. latifolia*, *S. dioica*, *S. diclinis*, hermafroditní druh – *S. conica*, a gynodioecický druh – *S. noctiflora*

Obecně platí, že pravděpodobnost *crossing-over* mezi geny je mírou vzdálenosti mezi geny na chromosomech. Vzdálenosti mezi geny jsou na genetické mapě vyjadřovány pomocí mapových jednotek, přičemž jedna mapová jednotka, označovaná jako centimorgan, odpovídá jednomu procentu rekombinace. V případě, že jsou geny od sebe dostatečně vzdálené, může mezi nimi dojít ke dvěma i více *crossing-over*. Pokud druhý *crossing-over* vrací geny na chromosomech zpět do výchozí pozice, stávají se oba *crossing-over* nedetegovatelnými. Na výsledné genetické mapě se tato skutečnost projeví zmenšením vzdálenosti mezi geny oproti vzdálenosti reálné. Naopak existence oblastí chromosomů, označovaných jako „horká místa“ rekombinace (*hot spots*), ve kterých detegujeme výrazně více *crossing-over* než v oblastech jiných, mapovou vzdálenost mezi geny oproti reálné vzdálenosti zvětšují. Vzdálenost mezi geny stanovená na základě frekvence rekombinace je tedy označována za vzdálenost relativní.

Genetické mapování genů *SIX1*, *SIX3*, *SIX4* a *DD44* na chromosomech druhů *Silene*

Pro srovnávací mapování čtyř vybraných markerových genů, *SIX1*, *SIX3*, *SIX4* a genu *DD44* na X chromosomech *S. latifolia* a chromosomech *S. dioica*, *S. diclinis*, *S. noctiflora* a *S. conica* jsme zvolili výše popsanou metodu založenou na stanovení frekvence rekombinace mezi geny. Před vlastní analýzou bylo nejprve nutné rozlišit dvě alely každého mapovaného genu u všech vybraných druhů tak, aby bylo možné sledovat průběh *crossing-over*. Mapovací populace byly připraveny křížením samičí rostliny heterozygotní pro všechny čtyři markerové geny se samčí rostlinou s náhodnou, avšak známou kombinací alel v těchto genech. U každého jedince z potomstva tohoto křížení byla sledována kombinace alel ve všech čtyřech lokusech, stanovena frekvence rekombinace mezi geny, vypočítány relativní vzdálenosti a sestaveny genetické mapy.

Hledání sekvenčních rozdílů mezi alelami markerových genů

V případě *S. latifolia*, kde již byla metodou Southernovy hybridizace ověřena lokalizace všech markerových genů na chromosomu X, jsme hledali sekvenční rozdíly mezi dvěma alelami genů lokalizovanými na X chromosomech pomocí PCR metody s využitím X-specifických primerů. V případě genu *SIX4* se nám podařilo rozlišit jeho dvě alely pouze touto PCR reakcí, na základě rozdílné velikosti produktů amplifikace. U genů *SIX1*, *SIX3* a *DD44* byly specifické PCR produkty sekvenovány a teprve na základě těchto sekvencí jsme určili rozdíly mezi alelami. Sekvence alel se lišily v místech, která se shodovala s rozpoznávacími místy pro restrikční enzymy. Alely jsme proto detegovali restrikční analýzou.

U *S. dioica*, *S. diclinis*, *S. noctiflora* a *S. conica*, u kterých neznáme přesné sekvence markerových genů, nemáme k dispozici ani X-specifické primery. Vycházeli jsme proto z primerů navržených pro *S. latifolia*. U *S. dioica* bylo možné alely genů *SIX* i genu *DD44* odlišit stejně jako u *S. latifolia* sekvenací PCR produktu a restrikční analýzou. U ostatních jmenovaných druhů však musíme nejprve metodou RACE PCR (*rapid amplified cDNA ends*) na samičí cDNA amplifikovat 3' konce mapovaných genů, které jsou obecně považovány za nejvíce polymorfní místa, produkty reakce klonovat do vektoru pGEMT-*easy* a sekvenovat. Získané sekvence jsme srovnávali a hledali rozdíly mezi alelami. V mapovaných populacích rostlin jsme alely opět detegovali restrikční analýzou.

Genetické mapování markerových genů na chromosmu X *Silene latifolia*

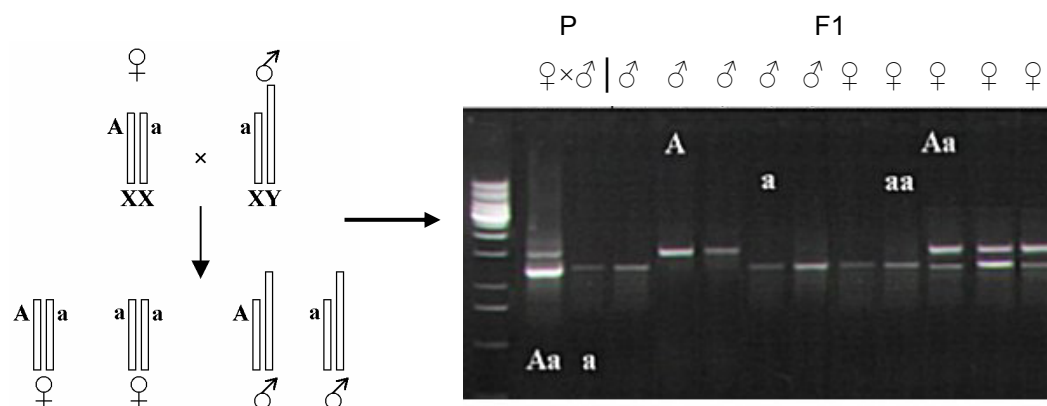
Poté co byly nalezeny vždy dvě alely všech markerových genů a křížením připravena populace potomstva, bylo provedeno vlastní mapování. Pomocí PCR (pro gen *SIX4*) a restrikční analýzy PCR produktů (pro geny *SIX1*, *SIX3* a *DD44*) byly stanoveny genotypy jednotlivých rostlin mapovaného potomstva. Samičí genotypy mohly být přímo použity pro výpočet frekvencí rekombinace, zatímco samčí genotypy, které jsou v důsledku přítomnosti pouze jednoho X chromosomu v hemizygotním stavu, je nutné pomocí zpětného křížení převést do stavu dvou chromosomů X. Takto upravená data byla vložena do programu JoinMap verze 1.4., který pak určil procento rekombinace mezi každým možným párem analyzovaných genů, stanovil pořadí mapovaných genů a vypočítal relativní

vzdálenosti mezi mapovanými geny. Tento program na základě rekombinačních frekvencí geny rozdělí do vazebných skupin a v případě, že jde pouze o jednu vazebnou skupinu, hodnoty procent rekombinace převede na mapovou vzdálenost. Pro výpočet vzdáleností mezi geny používá dvou mapovacích funkcí, Haldanovy a Kossambiho. Funkce se od sebe odlišují způsobem přepočtu mapových vzdáleností na relativní vzdálenost mezi geny. Haldanova funkce na rozdíl od funkce Kossambiho předpokládá absenci interference mezi *crossing-over* během meiosis. Pro většinu vyšších organismů je Kossambiho funkce, uvažující určitý stupeň interference, obecně považována za přesnější. Programem Join-Map 1.4. je zároveň výpočet standardních odchylek ověřena statistická významnost výsledků.

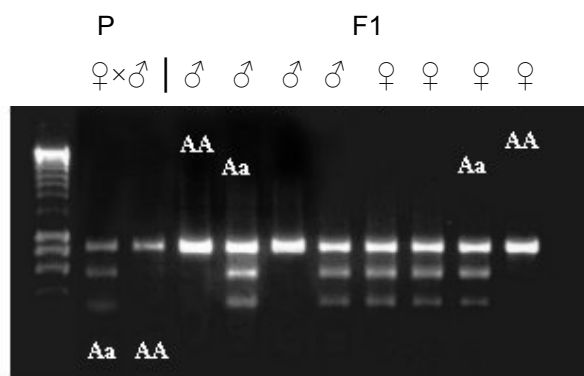
Genetické mapování markerových genů na chromosomech dalších dvoudomých druhů, *S. dioica* a *S. diclinis*

Analýzy markerových genů u dvoudomých druhů, *S. dioica* a *S. diclinis*, komplikuje fakt, že nevíme, zda jsou lokalizovány na pohlavních chromosomech nebo na autosomech. Proto je nutné po nalezení alel pro každý markerový gen provést segregační analýzu. Segregačními analýzami zjistíme zda geny segregují jako geny vázané na chromosom X (obr. 2) nebo jako geny vázané na autosomy (obr. 3). Jako reprezentativní vzorek mapované populace analyzujeme mateřskou rostlinu, otcovskou rostlinu a 10 potomků křížení, z toho 5 potomků samčího a 5 samičího pohlaví.

Na základě segregačních analýz jsme zjistili, že markerové geny segregují v populacích těchto dvou druhů jako geny vázané na pohlavní chromosomy, analýzy jsme proto prováděli stejným způsobem jako u *S. latifolia*.



Obr. 2. Segregační analýza genů lokalizovaných na X chromosom. Sekvenční rozdíl mezi alelami genu je v tomto případě detegován metodou PCR a gelovou elektroforézou na základě rozdílné velikosti PCR produktů. V potomstvu samčích rostlin, vzniklých křížením heterozygotní samičí rostliny se samčí rostlinou nesoucí alelu *a*, nacházíme vždy jen jednu alelu, *A* nebo *a*, nesenou jediným chromosomem X. V potomstvu samičích rostlin jsou vždy alely dvě, od otce dostávající alelu *a*, od matky *A* nebo *a*. Samičí potomstvo je tedy buď heterozygotní (*Aa*) nebo homozygotní (*aa*) pro alelu nesenou samčím rodičem.



Obr. 3. Segregační analýza genů vázaných na autosomy. Sekvenční rozdíl mezi alelami genu je v tomto případě detegován metodou PCR a následně restrikční analýzou produktů. V samčím potomstvu nacházíme též heterozygotní konstituce alel (Aa), což není v případě lokalizace genu na X chromosomu možné, kvůli přítomnosti pouze jediného X chromosomu.

Genetické mapování markerových genů na autosomech gynodioecické *S. noctiflora* a hermafroditní *S. conica*

Mapování genů na autosomech *S. noctiflora* a *S. conica* se od mapování na X chromosomu *S. latifolia* liší přípravou mapovacích populací, tedy křížením rodičovské generace. U *S. noctiflora* připravujeme mapovací populace rostlin opylením samičí (mateřské) rostliny pylem rostliny hermafroditní (otcovské). V případě hermafroditní *S. conica*, kvůli zajištění dostatečného stupně polymorfismu, nevycházíme z populací vzniklých samooprášením, ale kastrací tyčinek hermafroditního jedince připravíme mateřskou rodičovskou rostlinu a opylíme ji pylem jiné rostliny. Pro kontrolu, zda analyzovaní jedinci vznikli skutečně cizosprášením, jsme k mapovaným genům přidali ještě jednu kontrolní markerovou sekvenci. Každá z rodičovských rostlin bude homozygotní pro jednu ze dvou alel tohoto markeru. Potomstvo křížení takových rodičů, a tedy potomstvo vhodné pro mapování markerových genů, musí být v tomto kontrolním markeru heterozygotní. Sekvenční rozdíly mezi alelami u těchto dvou druhů hledáme pomocí RACE PCR, tak jak již bylo popsáno v předcházejícím paragrafu, a genotypy jednotlivých rostlin potomstva stanovujeme restrikční analýzou. Výhodou mapování genů na autosomech oproti mapování genů X chromosomu je, že odpadá problém hemizygotního stavu X chromosomu u samčích rostlin dvoudomých druhů. Genotypy samičího i hermafroditního potomstva mohou být přímo analyzovány programem JoinMap verze 1.4. Stanovení frekvence rekombinace a výpočet vzdáleností mezi geny se u těchto dvou druhů od genetického mapování *S. latifolia*, *S. dioica* a *S. diclinis* neliší.

Analýza genetických map

Posledním krokem analýz je srovnání získaných genetických map *S. latifolia*, *S. dioica*, *S. diclinis*, *S. noctiflora* a *S. conica*. Srovnáváme vzájemné pozice markerových genů a vzdálenosti mezi těmito geny u jednotlivých druhů. Na základě vzdáleností mezi geny můžeme usuzovat na případné inserce nebo delece v oblastech mezi jednotlivými geny a na základě vzájemných pozic genů odvodíme k jakým přestavbám, inversím či

translokacím mohlo v průběhu evoluce pohlavních chromosomů dojít. Stanovením počtu vazebných skupin u druhů hermafroditních pak můžeme definovat, zda na počátku vývoje pohlavních chromosomů stál jeden nebo více párů autosomů.

Procesy sex determinace u rostlin, nebyly dosud přesně prozkoumány. Analýzami pohlavních chromosomů dvoudomých rostlin a autosomů rostlin gynodioecických a hermafroditních jsme schopni sledovat mechanismy, kterými vývoj probíhal v rámci tohoto rodu. Fylogenetické analýzy sekvencí *SLX* a *SIY* genů probíhající paralelně s mapováním jejich pozice na chromosomech, poskytnou další informace potřebné ke stanovení doby, kdy došlo ke ztrátě rekombinace mezi geny a tedy k diferenciaci X a Y chromosomu. Spojením těchto dvou studií vzniká komplexní analýza evoluce pohlavních chromosomů rodu *Silene*, která může ověřit, zda obecné hypotézy vypracované pro savčí systémy platí také u rostlin.

Literatura

- Atanassov, I., Delichere, C., Filatov, D.A., Charlesworth, D., Negrutiu, I., Moneger, F. 2001. - Mol. Biol. Evol. **18**: 2162.
- Degraeve, N. 1980. - Bol. Soc. Brot. Ser. **53**: 595.
- Delichere, C., Veukens, J., Hernould, M., Barbacar, N., Mouras, A., Negrutiu, I., Moneger, F. 1999. - EMBO J. **18**: 4169.
- Desfeux, C., Maurice, S., Henry, J.P., Lejeune, B., Gouyon, P.H. 1996. - Proc. R. Soc. Lond. B **263**: 409.
- Ellis, N.A. 1998. - Nat. Genet. **20**: 9.
- Lahn, B.T., Page, D.C. 1999. - Science **286**: 964.
- Lengerova, M., Moore R.C., Grant, S.R., Vyskot, B. - Genetics - in press.
- Moore, R.C., Kozyreva, O., Lebel-Hardenac, S., Siroky, J., Hobza, R., Vyskot, B., Grant, S.R. 2003. - Genetics, **163**: 321.
- Westergaard, M. 1958.-Adv. Genet.,9: 217-281.

Poděkování. Tato práce byla podporována GA ČR (grant 204/02/0417).

Strukturní vlastnosti DNA studované pomocí cirkulárního dichroismu

IVA KEJNOVSKÁ

Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 123, e-mail: kejnovska@ibp.cz)

Cirkulárně dichroická (CD) spektroskopie

Cirkulární dichroismus DNA vyplývá z asymetrického vrstvení nukleotidů do šroubovicového uspořádání. Proto je CD spektroskopie citlivá ke změnám ve vzájemné orientaci bází v DNA, a proto je vhodná ke studiu konformačních změn dvojité šroubovice (Johnson *et al.* 1981). Nukleové kyseliny se stejně jako řada jiných biologicky aktivních látek vyznačují chiralitou, která je způsobena přítomností asymetrických prvků v těchto molekulách. Makromolekuly mohou být chirální, i když jejich nízkomolekulární složky tuto