

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

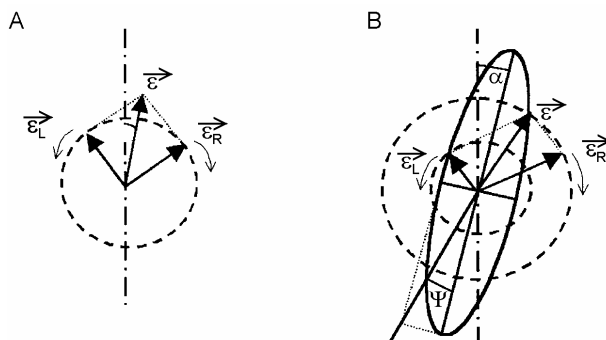
Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 123, e-mail: kejnovska@ibp.cz)

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

aktivitu nevykazují. Příkladem jsou právě nukleové kyseliny. Báze opticky aktivní nejsou, ale po vazbě na opticky aktivní deoxyribosu (ribosu) se takto vzniklý nukleosid a následně i nukleotid stává opticky aktivním. Dalším významným příspěvkem k asymetrii je typ uspořádání molekuly DNA.

Cirkulární dichroismus je jev vznikající v důsledku rozdílné interakce chirálních molekul s elektromagnetickým zářením kruhově polarizovaným vlevo a vpravo. Při průchodu opticky aktivním prostředím mají pravotočivá a levotočivá složka odlišnou rychlost, a tedy index lomu, což má za následek stočení roviny polarizovaného světla o úhel α - optickou rotaci (obr.1 A). Složky kruhově polarizovaného světla jsou zároveň v absorbujícím prostředí rozdílně absorbovány, což dává vznik elipticky polarizovanému světlu. Tento jev se jmenuje cirkulární dichroismus a je charakterizován úhlem ψ (obr.1 B), a nebo v praxi bývá častěji vyjádřen rozdílem $\epsilon_L - \epsilon_R$.



Obr. 1. Průchod polarizovaného světla (A) opticky aktivním prostředím, (B) absorbujícím opticky aktivním prostředím.

Experimentální získávání spekter CD

Spektra CD SE měří na relativně nákladných dichrografech, v našem případě na dichrografu značky Jobin – Yvon model VI řízeném pomocí počítače. Roztok DNA je ozařován vlevo a vpravo kruhově polarizovaným monochromatickým světlem. Rozdíl absorpce obou složek při dané vlnové délce je fotonásobičem přeměněn na elektrický signál, který je zpracován pomocí fázově synchronního detektoru. Výstupem na obrazovce počítače je spektrum CD vyneseno jako závislost rozdílu absorpce vlevo a vpravo kruhově polarizovaného světla na vlnové délce. Nukleové kyseliny absorbují světlo v ultrafialové oblasti, spektra jsou tedy zaznamenávána v rozsahu 190 - 330 nm. Přístroj je třeba kalibrovat za použití chemicky čisté opticky aktivní látky se známým spektrem CD. Používá se isoandrosteron a kyselina kamforsulfonová. Pro optimální poměr signál/šum by měly vzorky mít absorpenci $A \sim 0,8$, což odpovídá koncentraci DNA $\sim 0,7$ mM v kyvetě s optickou dráhou 1 mm. Rozdíl v absorbanci vztahujeme na molární nukleosidový zbytek. Takto můžeme porovnávat různé dlouhé řetězce DNA. Kyvety s optickou dráhou 0,01 mm až 10 cm poskytují široké koncentrační rozmezí ke studiu závislosti jednotlivých struktur na koncentraci DNA. Kyvety jsou křemenné, vysoce kvalitní (od fy Hellma), aby nestáčely polarizované světlo. Jsou umístěny v kyvetovém prostoru dichrografu v kovovém držáku, který je možné temperovat pomocí oběhového

termostatu a lze měřit v rozsahu teplot 0 - 90 °C. Teplotní čidlo je umístěno v kovovém držáku vedle kyvety. Spektra CD jsou většinou zaznamenávána s krokem 0,5 nm za 1 s (doba snímání jednoho spektra je asi 6 minut). Ke zpracování naměřených dat se používá program Dichro dodaný výrobcem spolu s přístrojem.

Výhody a nevýhody metody

Pro měření cirkulárního dichroismu jsou používány speciální válcovité kyvety, různých optických drah, které zajišťují vždy stejnou polohu vzorku v kyvetovém prostoru. Musí být naplněny celé, což umožňuje změřit spektrum jen v daném prostředí. Po sestavení speciálního držáku jsme mohli začít používat kyvety pravoúhlé, ve kterých rovněž stanovujeme koncentraci DNA na UV/VIS spektrofotometru. Tímto jednoduchým způsobem jsme nejen snížili spotřebu materiálu, zjednodušili a urychlili manipulaci se vzorky, ale hlavně dosáhli možnosti přidávat do měřeného vzorku indukující činidla a tak s jedním vzorkem prozkoumat jeho konformační vlastnosti v širokém rozmezí experimentálních podmínek.

Právě zmíněná skutečnost, že můžeme pomocí CD spektroskopie studovat konformační přechody DNA v mnoha prostředích je hlavní výhodou CD spektroskopie. Další výhodou je její extrémní citlivost. Možnost měřit nízké koncentrace DNA předchází případným agregacím, které často vznikají v DNA za extrémních podmínek. Spektra CD jsou velmi dobře reprodukovatelná.

Nevýhodou metody je složitost vztahu mezi spektry DNA a její konformací. Dodnes neexistují spolehlivé explicitní vztahy, pomocí kterých by bylo možné z naměřeného spektra zjistit přesnou konformaci daného vzorku. Proto se spektra CD vyhodnocují především empiricky.

Optimální experimentální přístup představuje kombinace spektroskopie CD s nukleární magnetickou rezonancí, takřka absolutní metodou pro určení konformace DNA v roztoku. Pracuje s vysokou koncentrací DNA a příprava vzorků k měření je náročná, v některých prostředích nemožná.

Strukturní vlastnosti trinukleotidových opakování

V naší laboratoři se v poslední době zabýváme studiem konformačních vlastností trinukleotidových motivů $(CCG)_n$, $(CGG)_n$, $(CAG)_n$, $(CTG)_n$, $(GAA)_n$, $(GAC)_n$ aj. Tyto motivy se vyskytují zejména u vyšších eukaryot a vyznačují se délkovým polymorfismem (Tautz *et al.* 1986). Význam studia vlastností těchto motivů vyplývá ze skutečnosti, že jejich expanze stojí v pozadí některých neurodegenerativních onemocnění člověka (Ashley a Warren 1995). U zdravého jedince se většinou vyskytuje počet opakování v desítkách, u nemocných pak ve stovkách až tisících. Prodlužování opakujících se motivů velice pravděpodobně souvisí s jejich zvláštními konformačními vlastnostmi (Wells 1996, Kypr a Vorlíčková 1997). Motiv $(CAG)_n$ tvoří velmi stabilní vlásenku, $(GAC)_n$ isomerizuje mezi vlásenkou a homoduplexy s paralelním i antiparalelním uspořádáním řetězců a rovněž přechází v levotočivou formu Z (Kejnovská *et al.* 2001, Vorlíčková *et al.* 2001). $(CCG)_n$ tvoří v závislosti na experimentálních podmínkách vlásenku a dva typy tetraplexů a $(CGG)_n$ kromě vlásenky tvoří G-tetraplex (Fojtík a Vorlíčková 2001). Studované trinukleotidové motivy tedy mohou nabývat různých uspořádání výrazně odlišných

od klasického modelu Watsona a Cricka. Studium konformačních vlastností trinukleotidových opakování přispívá k poznání mechanismu jejich expanze v genomech.

Literatura

- Ashley, C.T., Jr., Warren, S.T. 1995. - *Annu. Rev. Genet.* **29**: 703.
Fojtík, P., Vorlíčková M. 2001. - *Nucleic Acids Res.* **29**: 4684.
Johnson, B.B., Dahl, K.S., Tinoco, I., Jr., Ivanov, V.I., Zhurkin, V.B. 1981. - *Biochemistry* **20**: 73.
Kejnovská, I., Tůmová, M., Vorlíčková, M. 2001. - *Biochim. Biophys. Acta* **1527**: 73.

Poděkování. Tato práce byla podporována granty A 4004201 GA AVČR a 204/01/0561 GAČR.

Nové metody fyzikálního mapování genomů rostlin

EDUARD KEJNOVSKÝ

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 194, e-mail: kejnovsk@ibp.cz)

Úvod

Potřeba účinnější analýzy vysoce komplexních genomů rostlin a živočichů, představovaná často genomovými projekty, vede k zavádění stále nových sofistikovaných metod umožňujících sledovat genomy jako celek a v širších souvislostech, především evolučních. Zde bude pojednáno o některých moderních technikách používaných v naší laboratoři při studiu struktury a evoluce pohlavních chromosomů rostlin, které jsou však použitelné obecně při studiu genomů rostlin. Jedná se o (i) konstrukci a využití BAC knihoven a dále techniky fyzikálního mapování genomů pomocí (ii) FISH s využitím BAC klonů a (iii) lokalizaci genů pomocí PCR na tříděných chromosomech.

Rostlinné BAC knihovny

Pilířem současné stukturní genomiky je existence systémů umožňujících klonování dlouhých fragmentů DNA. Patří sem jednak kosmidové vektory dovolující klonovat fragmenty o délce desítek kb, jednak vektory typu YAC (*yeast artificial chromosome*), BAC (*bacterial artificial chromosome*) a PAC (*P1-derived artificial chromosome*) s fragmenty o velikosti stovek kb. V současné době se staly klonovacím systémem první volby vektory typu BAC (Schizuya *et al.* 1992), vyznačující se oproti dříve používaným vektorům YAC řadou výhod vyšší stabilitou inzertu, nízkým chimerismem, snadnější manipulací. Většina současných genomových projektů je na bázi BAC knihoven. Základní kroky při konstrukci a využití rostlinných BAC knihoven jsme popsali dříve (Kejnovský 2000). BAC klony umožňují studovat organizaci sekvencí DNA v širším kontextu, např. geny s jejich regulačními oblastmi. Lze izolovat často dlouhé intaktní elementy,