

Způsoby detekce polymorfismu homologních DNA a jejich využití při studiu změn ve struktuře rodičovských genomů u modelových allotetraploidních druhů rodu *Nicotiana* a *Tragopogon*

ROMAN MATYÁŠEK, KAMILA SKALICKÁ, ALEŠ KOVAŘÍK

Biofyzikální ústav AV ČR, Laboratoř molekulární epigenetiky, Královopolská 135, 612 65 Brno, tel.: 541 517 230, e-mail: matyasek@ibp.cz

Úvod

Význam studia polyploidie u rostlin spočívá ve zjištění, že až 95 % kaprad'orostů a až 80 % krytosemenných rostlin je polyploidních a navíc mnoho ekonomicky významných plodin a okrasných rostlin jsou přírodní autopolyploidy (vojtěška, brambory) nebo přirozené allopolypleidy (pšenice, ječmen, kávovník, řepka, sója, cukrová třtina, tabák, bavlna, kosatce, růže, jahodník, ostružiník, švestka, atd). Spojené rodičovské genomy procházejí po vzniku allopolypleidu často velmi aktivním procesem genomové reorganizace, pravděpodobně v důsledku vzniku nových mezigenomových interakcí, jež jsou umožněny teprve po spojení původně oddělených diploidních genomů. Tato reorganizace zahrnuje jak genetické (rychlé a v některých případech řízené strukturní změny zahrnující ztrátu a znovuobjevení rodičovských sekvencí, jako i tvorbu nových struktur DNA původně nepřítomných v rodičovských genomech), tak epigenetické (jadérová dominance, umlčování genů, aktivace mobilních elementů) procesy. Tyto změny pravděpodobně stabilizují původně nestabilní hybridní genom tím, že snižují obsah homologních lokusů u homeologních chromosomů, jež mohou narušovat správné párování homologních sekvencí při meiose. Aby mohla být co nejdříve obnovena fertilita allotetraploidy a tím i jeho úspěšnost, musí tento proces proběhnout rychle. Skutečně, u některých modelových allotetraploidních rostlin jako je *Arabidopsis*, *Brassica*, *Aegilops-Triticum* jsou některé tyto změny patrné již v diploidní F1 generaci a většina z nich proběhne v několika málo generacích po tetraploidizaci. Naproti tomu existují allotetraploidní rostliny, jako je *Gossypium* a *Spartina*, jež vykazují i po mnoha generacích téměř úplnou aditivitu rodičovských genomů. Nelze proto dopředu předvídat, co se stane s rodičovskými genomy po vzniku hybridu, zda proběhne rychlá a rozsáhlá reorganizace rodičovských genomů nebo bude hybridní jádro od začátku stabilní. Porození molekulárním mechanismům, zahrnutým jak v rychlých změnách genomu ihned po vzniku nového hybridu, tak i ve stabilizaci polyploidy během následné diploidizace je důležité pro zdokonalení manipulace s jejich genomy. Pro dostatečnou charakterizaci chování obou genomů je často třeba analyzovat co největší část genomu, neboť ne všechny lokusy se chovají stejně. Jak se bude daný lokus (sekvence) chovat záleží zřejmě na mnoha faktorech jako je rodičovský původ lokusu; fylogenetický vztah mezi rodičovskými genomy; charakter sekvence (délka, počet kopií a jejich vzájemné uspořádání, transkripční aktivita, druhová specifita vzhledem k rodičům); poloha na chromosomu jak prostorová (subtelomerická, centromerická) tak i ve vztahu k jejímu molekulárně genetickému okolí (sousedství heterochromatinu, promotorových sekvencí); stupeň ploidie; stádium vývoje rostliny (Wendel 2000). Pro detek-

ci těchto možných potencionálně rychlých změn je tedy vhodné mít k dispozici jednoduché, časově a finančně nenáročné metody, jež jsou schopny odlišit homologní, ale ne tožné sekvence DNA, původem od jednotlivých rodičovských genomů, popřípadě detegovat změny v jejich okolí. V naší laboratoři se zabýváme vývojem repetitivních sekvencí u modelových allotetraploidů rodů *Nicotiana* a *Tragopogon*. Rod *Nicotiana* (tabák) obsahuje přibližně 70 - 100 druhů přičemž přibližně 10 z nich je polyploidního původu a u tří poměrně starých allotetraploidů *N. tabacum*, *N. rustica* a *N. arentsii* jsou s velkou pravděpodobností identifikováni i diploidní rodiče. Rod *Tragopogon* (kozí brada) zahrnuje rovněž několik desítek druhů včetně dvou nedávno (řádově desítky let) vzniklých allotetraploidů *T. mirus* a *T. miscellus*.

Přehled metod vhodných k rychlé detekci polymorfismu v DNA

Jedno z možných základních dělení elektroforetických metod, užívaných k detekci polymorfismu v DNA, je založeno na stupni struktury DNA, jejíž změna je detegována (seznam metod), /výhody/, {nevýhody}:

primární struktura (*restriction fragment length polymorphism* - RFLP, různé typy PCR - *polymerase chain reactions*), /snadno proveditelné/, {ne vždy se podaří detegovat existující polymorfismus};

sekundární a terciární struktura (*single strand conformational polymorphism* - SSCP, *denaturing gradient gel electrophoresis* - DGGE, *heteroduplex analysis* - HDA, *dsDNA conformation analysis* - DSCA, *cleavage fragment length polymorphism* - CFLP), /vyšší pravděpodobnost detekce polymorfismu/, {vyšší požadavky na technické vybavení}

U většiny těchto metod byla vyvinuta řada variant, u nichž nejdůležitější odlišnosti jsou založeny na způsobu detekce (seznam), /výhody/, {nevýhody}:

molekulární hybridizace se specifickou sondou (RFLP, DGGE, SSCP, HDA, DSCA), /vyšší přesnost, reprodukovatelnost a spolehlivost, síla měřeného signálu je víceméně úměrná obsahu studované sekvence - možnost kvantitativního stanovení, možná rehybridizace s více sondami/, {nutnost přenosu na membránu, použití značené sondy}

amplifikace pomocí PCR s použitím specifických (PCR, PCR-RFLP, PCR-SSCP, PCR-DGGE, PCR-HDA, PCR-DSCA, PCR-CFLP), nebo nespecifických (RAPD - *random amplified polymorphic DNA*, AFLP - *amplified fragment length polymorphism*, MSAP - *methylation sensitive amplified polymorphism*) primerů, /jednoduchost tj. není potřeba značit DNA a přenos na membránu a v případě RAPD a AFLP není nutná znalost sekvence, amplifikací cDNA lze analyzovat změny v expresi příslušného lokusu/, {nelze snadno kvantifikovat což může v extrému vést k tomu, že se amplifikuje pouze část homologních sekvencí přítomných v genomu ve více kopiích}. PCR metody, jež využívají nespecifických primerů detekují obecně změny v rozsáhlejší oblasti genomu a tyto je nutno následně dále specifikovat například pomocí sekvenování nebo molekulární hybridizace.

Princip a popis jednotlivých základních metod, náročnost, tipy, triky

RFLP

Je založena na přítomnosti/nepřítomnosti cílových míst pro restriční endonukleasy (RE) v dané oblasti genomové DNA, přičemž přítomnost/nepřítomnost restričních míst je ovlivněna bodovými mutacemi. Metoda je velmi jednoduchá a reprodukovatelná, ale je

schopna postihnout pouze ty změny, jež postihují cílová místa pro RE. Pro rychlou a úspěšnou detekci polymorfismu je tedy nutno hned ze začátku použít více RE se čtyř-nukleotidovými cílovými místy a teprve na základě těchto výsledků lze lokus jemněji mapovat pomocí RE s více nukleotidovým cílovým místem. Vzhledem k tomu, že rostlinný genom obsahuje vysoký obsah 5-methylcytosinu a mnohé RE jsou citlivé k jeho přítomnosti v cílovém místě, je nutno volit pro genetické analýzy methylačně necitlivé RE. Použitím methylačně citlivých RE, nejlépe v kombinaci s jejich necitlivými isoschisomery (bohužel existuje velmi málo takových dvojic jako jsou *Sau* 3AI-Mbo I, *Bst* NI-*Eco* RII, *Hpa* II-*Msp*I), lze analyzovat změny v methylačním stavu lokusu a tedy sledovat epigenetické změny. Při analýze jinými methylačně citlivými RE je nutné zjistit, zda porovnávané lokusy dané místo obsahují a to nejlépe štěpením příslušného PCR produktu danou RE. Štěpné produkty (genomová DNA, specifický PCR produkt) jsou děleny běžnou horizontální agarosovou elektroforézou a detegovány molekulární hybridizací nebo v případě štěpení specifického PCR produktu přímo barvením.

SSCP (Orita *et al.* 1989)

Využívá skutečnosti, že na rozdíl od dvouvláknové dsDNA, jednovláknové fragmenty ssDNA tvoří snadno terciární strukturu závislou na pořadí nukleotidů v důsledku různého počtu párovaných bází uvnitř vlákna. Tedy, jak navzájem komplementární vlákna, tak homologní vlákna s malými změnami (včetně jediné bodové mutace) v nukleotidové sekvenci mohou, ale nemusí, vykazovat odlišné pohyblivosti při nativní polyakrylamidové gelové elektroforéze (PAGE). Terciální struktura jednovláknové DNA však může být ovlivněna nejrůznějšími fyzikálními podmínkami jako je např. teplota, pH, iontová síla a hydrofobnost prostředí, a proto citlivost SSCP závisí na těchto (a mnoha jiných) podmínkách. I když jsou známá jistá empiricky zjištěná vodítka pro výběr separačních podmínek pro sekvenční varianty daného lokusu, není stále možné s jistotou předpovědět, zda určitá mutace může být za daných podmínek zjištělná a je proto někdy nutné podmínky pro úspěšnou detekci polymorfismu empiricky zjistit. Úspěšnost detekce mutací u PCR-SSCP je obecně vyšší než 80 % pro jeden běh u fragmentu kratšího než 300 pb. Protože úspěšnost není 100 % ní, absence polymorfismu proužků ještě nemusí znamenat, že DNA nejsou polymorfnní. V porovnání s jinými metodami je u této metody relativně nízká citlivost k detekci G-C záměn.

dsDNA fragment určený k analýze se připravuje štěpením genomové DNA pomocí vhodných RE nebo pomocí PCR se specifickými primery. Citlivost SSCP je optimální pro fragmenty v rozmezí 100 až 300 pb, i když i u podstatně delších fragmentů lze v některých speciálních případech polymorfismus úspěšně detegovat (viz. níže), jinak lze příliš dlouhé fragmenty PCR produktů zkrátit štěpením vhodnou RE. ssDNA se pak připraví buď tepelnou denaturací dsDNA v přítomnosti látky zabraňující renaturaci (formamid, DMSO), nebo pomocí asymetrické PCR, kdy jeden primer je přítomen ve velkém nadbytku. Výhodou denaturace dsDNA je jednoduchost, nevýhodou je mnohdy poměrně rychlá renaturace vzorku v počátečních stádiích elektroforézy a tudíž nutnost rychlého nanášení vzorku, dostatečně zředěného a za chladu. Nevýhodou asymetrické PCR je poměrně obtížné stanovení optimálních podmínek. Jako nosiče se pro vlastní elektroforézu používá nejčastěji akrylamidového gelu. Většinou (ale ne vždy) platí, že čím je gel hustší tím jsou relativně větší rozdíly v pohyblivostech jednotlivých konformerů, přičemž rov-

něž stupeň zesíťování gelu hraje určitou roli. Pro fragmenty kratší než 200 pb doporučuji 15 % gel zesíťovaný 44 : 1, pro delší fragmenty (nad 300 pb) lze doporučit gel 7 - 10 %. Pro stanovení optimální délky elektroforézy je nutno upozornit na fakt, že čím delší fragment DNA tím se ssDNA pohybuje relativně pomaleji vzhledem k dsDNA přičemž platí, že přibližně stejná pohyblivost je u fragmentů délky přibližně 100 pb. Lze použít i jiné gelové matrice jako je MDE (*mutation detection enhancement*), GeneAmp, Hydro-link gels jakožto i agarosových gelů pro speciální případy jako je např. rozlišení minisatelitních isoalel až do délky fragmentu 7 kb. Zdá se, že pro každý fragment DNA o určitém obsahu GC a sekvenci existuje optimální teplota, při níž se nejlépe projeví polymorfismus. Tuto teplotu je však nutno empiricky zjistit a proto se většinou používá nižší teplota (4 - 10 °C) z důvodu větší pravděpodobnosti vzniku stabilní terciární struktury, ale mohou být případy, kdy lepších výsledků dosáhneme při teplotě vyšší. Je vhodné použít co nejvyšší napětí, které ještě nezpůsobuje zahřívání gelu (napěťový gradient by neměl přesáhnout 8 V.cm⁻¹). Změn v pH, iontovém složení, popřípadě permitivitě elektroforetického prostředí může být dosaženo změnou pufru nebo jeho koncentrace a/nebo přidávkem inertních neiontových komponent jako např. glycerolu (5 - 10 %) nebo sacharosy (10 %), které zvyšují citlivost detekce u fragmentů s vysokým obsahem GC. Při přímé analýze genomové DNA se detekce provádí pomocí molekulární hybridizace se značenou specifickou sondou. Detekce PCR produktů se provádí buď barvením gelu ethidiumbromidem (protože ethidiumbromid je interkalační činidlo není barvení ssDNA příliš účinné), stříbrnými ionty apod./, nebo se mohou použít různě značené primery pro PCR a ty detegovat autoradiografií nebo fluorescencí.

Varianty SSCP:

MS-SSCA (*methylation-sensitive single-strand conformation analysis*) umožňuje detekci změn methylace cytosinů v daném lokusu. Bisulfitová modifikace DNA a následná PCR amplifikace za použití primerů specifických pro bisulfitem modifikované sekvence má za následek přeměnu cytosinů na thyminy, kdežto methylované cytosiny zůstávají neměněny. Výsledkem modifikace je vytvoření sekvenčních rozdílů mezi methylovanými a nemethylovanými vzorky, jež mohou být odlišeny pomocí SSCP.

rSSCP (RNA-SSCP). Protože RNA-RNA párování je stabilnější než DNA-DNA párování může ssRNA nabývat většího počtu stabilních konformačních struktur a tedy být citlivější ke změnám sekvence a tudíž může detegovat změny, jež klasická SSCP nebyla schopna detekovat (například lze efektivně jednorázově analyzovat podstatně delší fragmenty DNA). Nicméně metoda je náročnější z důvodu nutnosti přípravy RNA vláken například vnesením RNA polymerasových promotorů a proto se využívá výjimečně.

REF-SSCP (*restriction endonuclease fingerprinting*). Kombinací RFLP a SSCP detekujeme mutace na základě vzniku/ztráty restrikčních míst a/nebo anomální pohyblivosti fragmentů. Tedy jde o elektroforézu několika dsDNA fragmentů v jednom běhu.

HDA (Nagamine CM *et al.* 1989)

Využívá rozdílu v pohyblivostech homoduplexu a heteroduplexu DNA při elektroforéze. Dvě srovnávané DNA jsou smíchány, denaturovány a ponechány renaturovat. Je srovnáván elektroforetická pohyblivost vzniklého heteroduplexu s původními vzorky (homoduplexy). Může se používat v kombinaci s SSCP na jednom gelu čímž lze dosáhnout

nout téměř 100 %-ní úspěšnosti při detekci polymorfismu a v podstatě platí totéž co bylo řečeno u SSCP metody. Pro zvýšení citlivosti je možno u HDA volit mírně denaturační podmínky elektroforézy. Velikostní limit je vyšší než u SSCP (800 pb).

DGGE (Fodde a Losekoot 1994)

Využívá rozdílu v thermodynamické stabilitě dsDNA fragmentů o různých sekvencích a obsahu GC. Krátké (200 - 700 pb) genomové nebo PCR restriční fragmenty jsou podrobeny elektroforéze v denaturačním gradientovém akrylamidovém gelu směrem od nižší k vyšší denaturační účinnosti. Zpočátku se fragmenty pohybují jako dsDNA tedy podle molekulové hmotnosti. V závislosti na sekvenci, každý dosáhne bodu, kdy dsDNA začne denaturovat v jiné síle denaturantu a tudíž i v jiné vzdálenosti od startu. Protože částečná denaturace silně snižuje pohyblivost molekuly a navíc nakonec může dojít k separaci jednotlivých vláken je pozorována různá průměrná (výsledná) pohyblivost jednotlivých fragmentů. Denaturace se dosahuje buď chemicky (přídavek močoviny a formamidu 30 - 70 %) nebo tepelně (TGGE). První způsob je náročnější pokud jde o přípravu gelu kdežto druhý je náročnější na přístrojové vybavení. Lze říci, že můžeme dosáhnout až 99 %-ní úspěšnosti detekce polymorfismu pro fragmenty kratší než 500 pb. Nesnadná analýza GC bohatých fragmentů DNA.

DSCA

dsDNA obsahuje konformační polymorfismy (např. ohyb na sekvencích oligo dA), které lze identifikovat pomocí PAGE kdy stejně dlouhé dsDNA fragmenty, různě ohnuté v závislosti na sekvenci, vykazují při nativní PAGE různou pohyblivost. Lze říci, že tato metoda je nejjednodušší, ale nejméně citlivá. Pro podmínky platí v podstatě totéž co bylo řečeno u SSCP.

CFLP (Fofana *et al.* 1998)

Využívá schopnosti speciálních endonukleás (*cleavase* I) štěpit řetězec DNA na rozhraní mezi ssDNA a dsDNA u vzniklé terciární struktury (závislé na sekvenci nukleotidů) jednotlivých vláken po denuraci dsDNA. Po štěpení vzniká kolekce fragmentů specifická pro dané vlákno. Vhodné jsou fragmenty do velikosti 2 kb. Dělení vzniklých fragmentů probíhá při denaturační PAGE.

Obsahem presentace bude přednést výsledky aplikace popsaných metod a jejich srovnání při analýze vývoje druhově specifických i druhově nespecifických (rDNA) repetitivních sekvencí u přirozených a syntetických allotetraploidních druhů rodu *Nicotiana* a *Tragopogon* ve srovnání s diploidními rodiči.

Literatura

- | | |
|---|--|
| Fodde, R., Losekoot, M. 1994. - Hum. Mutat. 3 (2):83. | Nagamine, C.M., Chan, K., Lau, Y.F. 1989. - Amer. J. Hum. Genet. 45 :337. |
| Fofana, B., Martiat, J.C., Baudoin, J.P., Jardin, P. 1998. - Plant Mol. Biol. Rep. 16 : 271. | Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. 1989. - Genomics 5 : 874. |
| | Wendel, J.F. 2000. - Plant Mol. Biol. 42 : 225. |

Poděkování. Tato práce byla podporována granty GAČR 204/01/0313 a 521/01/0037.