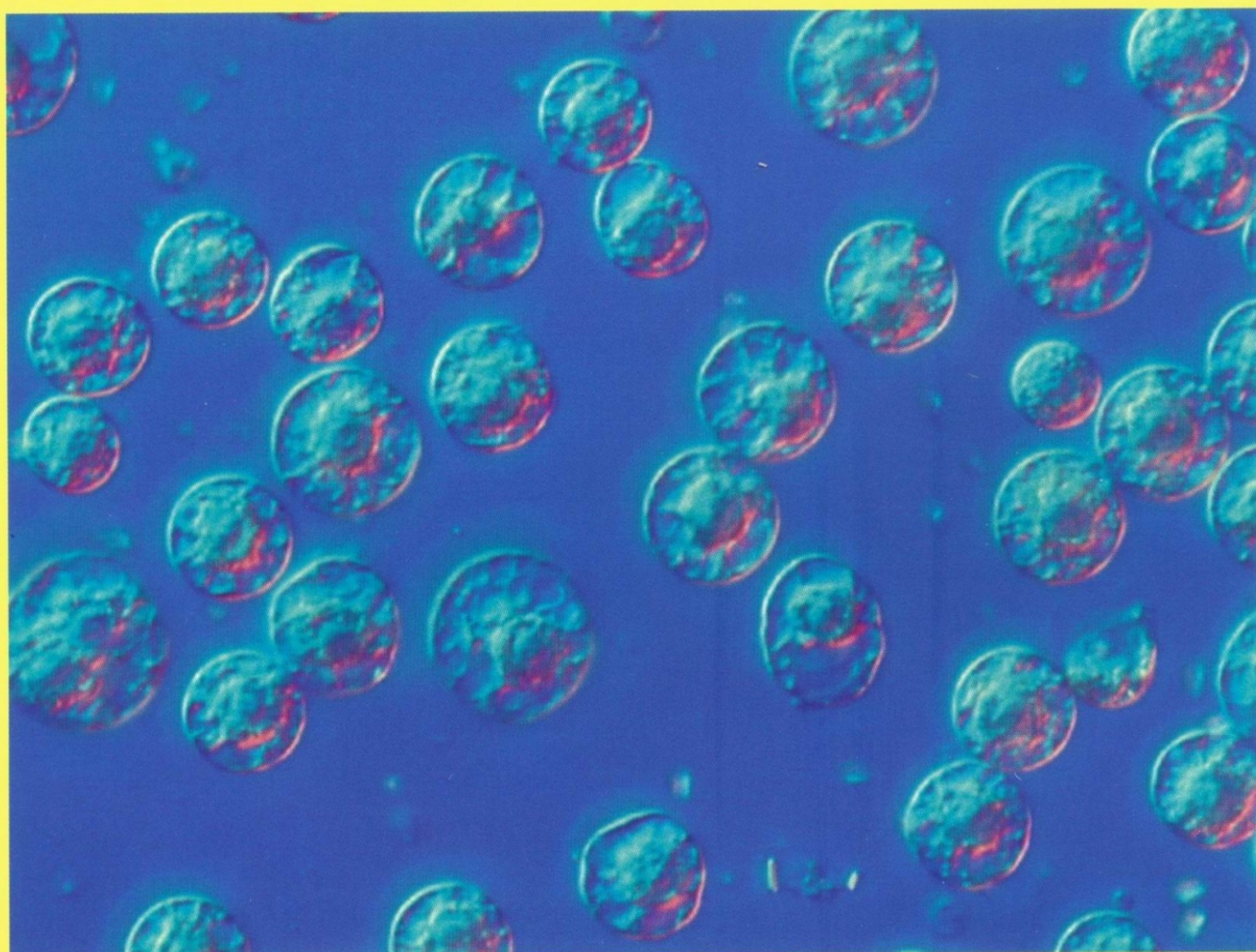


BIOLOGICKÉ LISTY

Ročník 68 2003

3



**Ústav molekulární genetiky
Akademie věd ČR, Praha**

Obsah

P.I. Dobrev, V. Motyka: Stanovení aktivity cytokininoxidas/dehydrogenasy v rostlinách pomocí HPLC spojené s průtokovým radioaktivním detektorem	163
M. Fojtová: Studium transgenní RNA	166
J. Fulneček: Identifikace a izolace cDNA funkčně homologních genů	171
A. Gaudinová, R. Vaňková, P.I. Dobrev, V. Motyka: Extrakce a stanovení aktivity cytokinin <i>N</i> - and <i>O</i> -glukosyltransferas v rostlinných pletivech	176
R. Hobza: Od mikrodisekce k mapování struktury genomu	179
V. Hykelová: Genetické mapování jako nástroj ke studiu evoluce pohlavních chromosomů rodu <i>Silene</i>	183
I. Kejnovská: Strukturní vlastnosti DNA studované pomocí cirkulárního dichroismu	189
E. Kejnovský: Nové metody fyzikálního mapování genomů rostlin	192
O. Krinke, Z. Novotná, O. Valentová, J. Martinec: Fluorometrická metoda pro <i>in vitro</i> měření ligandem otevíraných iontových kanálů pro Ca^{2+} v rostlinách	195
K. Kuchaříková, H. Pivoňková, M. Fojta: Studium interakcí nukleových kyselin s proteiny pomocí piezoelektrického biosensoru	200
Z. Kunická: Studium alternativních rostlinných telomer	203
R. Matyášek, K. Skalická, A. Kovařík: Způsoby detekce polymorfismu homologních DNA a jejich využití při studiu změn ve struktuře rodičovských genomů u modelových allotetraploidních druhů rodu <i>Nicotiana</i> a <i>Tragopogon</i>	207
K. Mlíčková, M. Sedlářová, L. Luhová, P. Peč, A. Lebeda: Histochemické metody stanovení patologických změn v listech rostlin v průběhu patogeneze biotrofních houbových parazitů ..	212
J. Patzak: Porovnání metod izolace RNA pro detekci latentního viroidu chmele (HLVd) pomocí <i>Dot-blot</i> molekulární hybridizace a RT-PCR u chmele (<i>Humulus lupulus</i>)	219
P. Pejchar, O. Valentová, J. Martinec: Stanovení aktivit rostlinných fosfolipas <i>in situ</i> s využitím fluorescenčně značených substrátů	227
H. Pivoňková, K. Němcová, M. Fojta: Sledování interakcí DNA s proteiny pomocí elektroforézy v agarosových gelech s následným <i>western</i> přenosem a imunodetekcí	234
M. Potocký: Použití bioinformatiky v rostlinné biologii – analýza proteinových sekvencí	239
K. Skalická, R. Matyášek, A. Kovařík: Konstrukce syntetického tabáku	247
R. Vaňková, A. Gaudinová: Využití dvourozměrné fluorescenční spektroskopie pro stanovení množství a viability buněk tabáku	250
B. Vyskot: Modely vývojové biologie rostlin	253

Vážení čtenáři,

po tříletém intervalu (*Biologické listy* 65, č. 3 – 4, 2000) Vám nabízíme další číslo časopisu věnované metodice v biologii rostlin, kterou představují rozšířené abstrakty přednášek na specializované metodické konferenci, pořádané v tomto roce Ústavem experimentální botaniky AV ČR a Českou společností pro experimentální biologii rostlin.

Přesto, že se nejedná o tradiční změnu v zaměření *Biologických listů*, jež i nadále zůstávají referátovým časopisem poskytujícím přehledné, odborné a vědecké informace o stavu a pokrocích základního a aplikovaného výzkumu ve všech oblastech biologie, vracíme se k této možnosti na základě zájmu, který shora uvedené specializované číslo mezi Vámi vyvolalo. Tento zájem potvrdil předpoklad, že základem pokroku ve vědě, a v současné biologii zvláště, je metodický rozvoj, a že jakákoliv snadno dostupná informace o metodách, bezpečně zavedených a zvládnutých na našich pracovištích, bude přijímána nejen se spontánním povděkem experimentátorů, ale stane se i stimulem navazování nových kontaktů a vzájemně výhodných spoluprací.

I když všechna dosavadní zaměření představovaných metod na jediný společný modelový organismus – rostlinu, by mohla představovat značnou nevýhodu pro časopis věnovaný celé biologii, nestalo se tak a doufáme, že i v tomto čísle uvedené metodické přístupy budou užitečné pro všechny biology. Utvrzuje nás v tom dobře známý význam a vliv např. molekulární biologie a biochemie na rozvoj všech experimentálních oborů biologie, takže zaujímají z metodického hlediska v biologii určité nadoborové, ale jistě interdisciplinární postavení.

Tak jako v roce 2000 přenecháváme i nyní větší část odpovědnosti, především za obsahovou vhodnost a správnost publikovaných textů, na autorech příspěvků a pořadatelích konference, a i tentokrát bude určitá část nákladu tohoto čísla dostupná také „zájemcům nepředplatitelům“ v redakci časopisu. Budeme Vám vděční za sdělení jakýchkoliv ohlasů, které by ve Vás uveřejnění tohoto čísla, ale i dosavadní uspořádání a zaměření *Biologických listů* jako celku mohla vyvolat.

Redakce

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

vítám Vás na třetím pokračování sympozia, které se „věnuje metodám používaným v rostlinné experimentální biologii“. Uvozovky jsou použity proto, že to není tak úplně pravda, i když takový byl náš cíl. Stejně jako v případě ročníku předcházejícího, i tentokrát jsme se snažili zařadit do programu především přednášky špičkových odborníků bez ohledu na to, pracují-li s rostlinami či s jinými organismy. Je to jeden z přístupů, který zůstal zachován a který se nám zdá dobrý.

I některé další přístupy v organizaci Metodických dnů jsme zopakovali. Plenární přednášky výše zmíněných odborníků jsme doplnili přednáškami z řad účastníků. I tentokrát najdete v programu sekci „Z jiných světů“ a dle stejného schématu bylo vybráno i místo konání. Jen je zase trochu blíže Praze (snad lépe řečeno, je poněkud západněji). Vhodných míst totiž není mnoho (nebo o nich nevíme) a tak, pokud Metodické dny ještě „chvilí“ vydrží, máte vy, kteří se účastníte pravidelně, naději objet časem celou republiku.

Zůstala i řada lidí v organizačním výboru. Toho si velmi vážím. Velkou radost mám též ze skutečnosti, že se našla řada nových kolegů, kteří byli ochotni se na organizaci tohoto sympozia podílet. Obával jsem se totiž, že v dnešním světě, ve kterém nikdo nemá čas, bude organizování takovýchto setkání čím dál tím obtížnější a že lidí, kteří budou ochotni se na takovéto neimpaktované činnosti podílet, bude stále méně. Východiskem by snad bylo vytvoření jakéhosi „sympoziálního kitu“, který by se jen rozbíl a dle příloženého protokolu by se postupovalo vpřed až k pěknému výsledku. Stabilizaci výše zmíněných přístupů v organizaci Metodických dnů vlastně již takovýto kit tvoříme, zatím je však třeba stále ještě spoléhat na jednotlivé lidi.

Jsem tedy velmi rád, že se našlo dostatek lidí, ochotných podílet se na přípravě tohoto setkání, jsem neméně rád, že existuje řada odborníků, kteří bez váhání přislíbili svoji aktivní účast a jsem šťasten, že je dostatek těch, kteří mají o tuto akci zájem a bez kterých by se vůbec nekonala.

Těším se na setkání s Vámi.

Za organizační výbor

Jan Martinec

V Praze dne 31.8.2003

Pozn.: Obsahem tohoto čísla Biologických listů jsou vícestránkové příspěvky, které byly posouzeny vědeckou radou sympozia. Abstrakta ostatních příspěvků jsou součástí knihy abstrakt. Pro získání dalších informací je možné navštívit adresu <http://www.ueb.cas.cz/methods>.

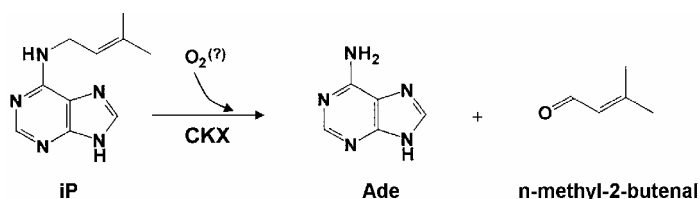
Stanovení aktivity cytokininoxidasy/dehydrogenasy v rostlinách pomocí HPLC spojené s průtokovým radioaktivním detektorem

PETRE I. DOBREV, VÁCLAV MOTYKA

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Laboratoř hormonálních regulací u rostlin, Rozvojová 2/135, 165 02 Praha 6 (tel.: 220 390 444, e-mail: dobrev@ueb.cas.cz)

Úvod

Hladina endogenních cytokininů v rostlinách je ovlivňována různými regulačními mechanismy. Ty zahrnují (1) akumulaci cytokininů na základě jejich přímé nebo autoindukované biosyntézy, (2) jejich inaktivaci konjugací s glykosidy nebo nevratnou degradací na adenin, případně jeho derivát(y). Klíčovým enzymem degradujícím v rostlinných pletivech biologicky aktivní cytokininy je cytokininoxidasa/dehydrogenasa (CKX), která katalyzuje odbourávání postranního řetězce cytokininů na N^6 adeninu (obr. 1).



Obr. 1. Degradace N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adeninu (iP) cytokininoxidasou/dehydrogenasou

Přehled a podstata metod stanovení aktivity cytokininoxidasy/dehydrogenasy v rostlinách

Enzymová aktivita CKX se obvykle stanovuje radioisotopovou metodou po inkubaci přečištěného proteinového extraktu s N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adeninem (iP) radioaktivně značeným v purinovém kruhu, následné chromatografické separaci a měření radioaktivity vzniklého produktu adeninu (Ade). Aktivita CKX se zpravidla vyjadřuje v nanomolech vzniklého Ade na 1 mg bílkovin za hodinu.

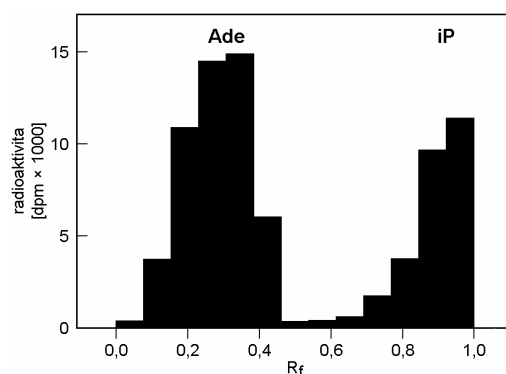
Existují i jiné metody stanovení aktivity CKX, například kolorimetrickým stanovením Schiffovy báze vznikající enzymovou reakcí mezi 3-methyl-2-butenalem a *p*-aminofenolem (Libreros-Minotta a Tipton 1995) nebo formazonu, který je v umělém redoxním systému konečným produktem enzymové oxidoredukční reakce fenazinmethosulfátu (Kulkarni *et al.* 2001, Frébort *et al.* 2002).

Pracovní postup

Stanovení na základě měření konverse [^3H]iP pomocí TLC

V naší laboratoři se aktivita CKX stanovuje běžně radioisotopovou metodou, tj. na základě měření konverse [^3H]iP na [^3H]Ade (Motyka a Kamínek 1994, Motyka *et al.* 1996). Inkubační směs obsahuje 100 mM pufr (TAPS-NaOH nebo H_3BO_3 -KCl-NaOH,

pH 8,5, příp. MOPS-NaOH, pH 7,2), 2 - 10 μM substrát ($[^3\text{H}]\text{iP}$, 1,6 - 7,4 $\text{Bq}\cdot\text{mol}^{-1}$) a enzymový extrakt v celkovém objemu 50 μl . Po skončení inkubace při 37 °C se reakce ukončí 10 μl 200 mM Na_4EDTA a 120 μl studeného ethanolu. Po centrifugaci (5000 rpm, 5 min) se supernatant aplikuje na polyesterové TLC desky mikrokrystalické celulosy (Polygram CEL 300 UV₂₅₄, Sigma Aldrich) a vyvíjí se v horní fázi směsi ethylacetát/*n*-propanol/voda (4 : 1 : 2, v/v/v). Za těchto podmínek se iP poměrně obtížně zachytí (R_f 0,8 - 1), zatímco Ade téměř nemigruje (R_f 0,2 - 0,3, obr. 2). Obdobné rozlišení iP a Ade jsme zjistili rovněž při použití hliníkových silikagelových TLC folií (Silufol, Kavalier, ČR) nebo polyesterových TLC desek silikagelu (Acid washed Silica gel UV₂₅₄, Sigma Aldrich) vyvíjených v soustavě chloroform/methanol (3 : 1, v/v) nebo v methylenchloridové směsi obsahující 15 % methanolu (iP: R_f 0,7 - 0,8, Ade: R_f 0,2 - 0,3). Po separaci se TLC deska rozstříhá na proužky do scintilačního koktejlu (Sigma-FluorTM, Sigma) a kapalinovým scintilačním počítačem (Packard TRI-CARB 2500 TR) se měří radioaktivita vzniklých metabolitů.



Obr. 2. Separace Ade a iP pomocí TLC na mikrokrystalické celulose

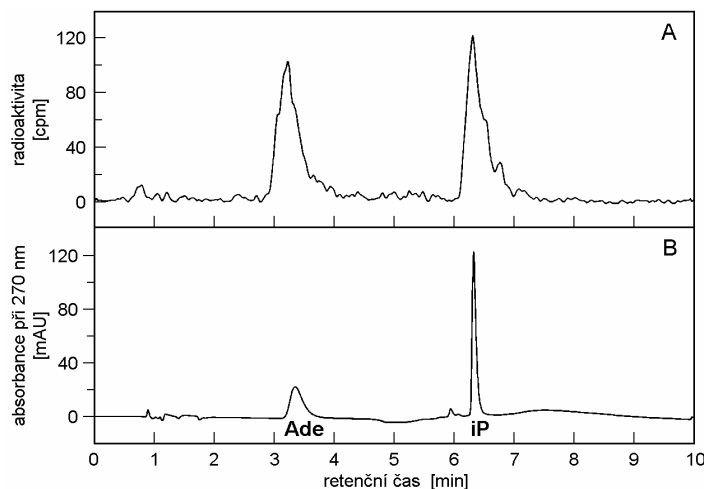
Stanovení konverse $[^3\text{H}]\text{iP}$ pomocí TLC má řadu výhod, zejména možnost současné analýzy většího počtu vzorků, poměrně nízkou spotřebu rozpouštědel a relativně nízké náklady. Na druhé straně má ovšem i některé nevýhody, jako např. nižší rozlišení, pracnost, nutnost manipulace s nebezpečnými chemikáliemi a vyšší rozptyl měřených hodnot. Abychom vyřešili tyto nevýhody, vypracovali jsme metodiku pro stanovení produktu a substrátu reakce katalyzované CKX pomocí HPLC spojené s *on-line* detektorem radioaktivity.

Stanovení na základě měření konverse $[^3\text{H}]\text{iP}$ pomocí HPLC

Sestava HPLC (Perkin Elmer Series 200 LC pumpa) je napojena na průtokový detektor (Diode Array Detector 235C, Perkin Elmer) a na autosampler (Series 200, Perkin Elmer). Eluát z DAD detektoru se měří na detektoru radioaktivity Ramona 2000 (Raytest, kyveta 600 μl). K chromatografické separaci se používá kolona Luna C8 (Phenomenex) o délce 50 mm, vnitřním průměru 4,6 mm a velikosti částic náplně 3 μm . Průtoková rychlost je 0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, teplota kolony 35 °C, UV detekce se provádí při 270 nm. Jako mobilní fáze se používají roztok A (40 mM CH_3COOH + NH_4OH , pH 5,0) a roztok B ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$,

1 : 1, v/v) v gradientu 1 - 70 %B 1 min, 70 %B 1 min, 70 - 1%B 1 min, ekvilibrace 1 %B 10 min.

Pro *on-line* měření radioaktivity detektorem Ramona 2000 se získaný eluát míchá se scintilačním koktejlem v poměru 3 : 1 (v/v). Radioaktivní metabolity jsou identifikovány na základě shody retenčních časů se standardy. Za uvedených podmínek se Ade a iP na HPLC velmi dobře dělí s retenčními časy 3,3 a 6,3 min (obr. 3). Analýza jednoho vzorku trvá 13 minut, lze tedy analyzovat 45 vzorků za 10 hodin.



Obr. 3. Separace Ade a iP pomocí HPLC spojené s průtokovým radioaktivním detektorem. A - signál z detektoru radioaktivity, B - signál z DAD detektoru

Doporučení, omezení, tipy

Substrát (iP) a produkt (Ade) reakce katalyzované CKX se značně liší v hydrofobních vlastnostech. Ade je mnohem hydrofilnější, a proto na TLC desce téměř nemigruje, zatímco iP se pohybuje s čelem (obr. 2). Hodnoty R_f pro Ade a iP při TLC jsou na hranici doporučené pro optimální rozlišení (R_f 0,1 - 0,8). Při těchto hraničních R_f hodnotách je vyšší pravděpodobnost současné migrace interferujících látek.

Pro HPLC s reversní fází je vhodné, aby kapacitní faktory byly 1 - 10 a doba analýzy minimální. Toho lze dosáhnout použitím gradientu, kratší kolony, hydrofilnější stacionární fáze, apod. V našem případě používáme kolonu o délce 50 mm a stacionární fázi s kratší alkylovou skupinou (C8), aby se snížil eluční čas hydrofobního iP. Eluční gradient je zahájen nízkou koncentrací organické fáze (1 %B), při níž dochází k retenci polárního Ade, a prudce zvýšen (na 70 %B), aby se iP eluoval ihned po Ade. Vzorek by měl mít nízký obsah organického rozpouštědla, aby byl vrchol Ade ostrý. Reprodukovatelnost měření je velmi dobrá, relativní standardní odchylka je ≥ 5 %. Navíc je HPLC díky automatizaci a *on-line* měření radioaktivity méně pracná a časově méně náročná.

Zhodnocení metod – výhody a nevýhody

Z výše uvedených údajů je zřejmé, že jak HPLC, tak TLC mají pro stanovení aktivity CKX své výhody i nevýhody. Jejich shrnutí je uvedeno v následujícím přehledu.

	výhody	nevýhody
TLC	možnost současné analýzy více vzorků nízká spotřeba rozpouštědel nízké náklady jednoduché provedení	nižší rozlišení pracnost manipulace s nebezpečnými chemikáliemi vyšší odchylka měřených hodnot
HPLC	vysoké rozlišení nízká odchylka měřených hodnot automatizace 2 - 3 krát rychlejší než TLC	drahé přístrojové vybavení potřeba kvalifikovaných pracovníků

Závěr

Vzhledem k tomu, že za rozhodující faktor pokládáme schopnost rychlého a rutinního měření velkého počtu vzorků s vysokou přesností a spolehlivostí, upřednostňujeme pro stanovení aktivity CKX metodu HPLC.

Literatura

- Frébort, I., Šebela, M., Galuszka, P., Werner, T., Schmülling, T., Peč, P. 2002. - Anal. Biochem. **306**: 1.
- Kulkarni, M.J., Theerthaprasad, D., Sudharshana, L., Prasad, T.G., Sashidhar, V.R. 2001. - Phytochem. Anal. **12**: 180.
- Libreros-Minotta, C.A., Tipton, P.A. 1995. - Anal. Biochem. **231**: 339.
- Motyka, V., Faiss, M., Strnad, M., Kamínek, M., Schmülling, T. 1996. - Plant Physiol. **112**: 1035.
- Motyka, V., Kamínek, M. 1994. - J. Plant Growth Regul. **13**: 1.

Poděkování. Tato práce byla finančně podporována granty udělenými GAČR (206/03/0313) a MŠMT ČR (LN 00A081).

Studium transgenní RNA

MILOSLAVA FOJTOVÁ

Laboratoř molekulární epigenetiky, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65, Brno (tel.: 541 517 230, fax: 541 211 293, e-mail: fojtova@ibp.cz)

Stabilní exprese rostlinného transgenu je kritickým parametrem pro praktické využití geneticky modifikovaných rostlin. Je známo, že rozdíly v expresi transgenu u jednotlivých

vých transformantů jsou až řádové a často pozorovaným jevem je úplné umlčení vnese-
ného genu.

Expres transgenu se měří na úrovni RNA i proteinu a právě metody analýzy RNA jsou velice výmluvné z hlediska poskytnutí informace o způsobu, jakým byl transgen umlčen. V zásadě lze rozlišit umlčení exprese genu na transkripční úrovni, na posttranskripční úrovni, na translační a posttranslační úrovni.

V případě transkripčního umlčení je promotor daného genu neaktivní, nevzniká tedy žádný transkript. Posttranskripčně umlčené geny jsou exprimovány normálně, vzniklý transkript je ale nestabilní, je degradován a nedochází k jeho translaci. V případě posttranslační regulace je RNA správně transkribována, je stabilní, ale proteinový produkt je rychle degradován.

Tento článek je zaměřen především na popis metod umožňujících odlišit regulaci na úrovni transkripční a posttranskripční. Rovnovážnou hladinu mRNA je možno studovat několika metodami, z nichž nejrozšířenější je zřejmě metoda „*northern*“ hybridizace, dále „*primer extension*“, „*RNase protection*“ a kvantitativní RT-PCR. Tyto metody poskytují informaci o množství stabilního transkriptu v buňce, nejsou však schopny odlišit situaci, kdy je nedostatek (případně absence) transkriptu způsoben inaktivitou promotoru (regulace na transkripční úrovni) nebo nízkou stabilitou transkriptu (regulace na posttranskripční úrovni). Metodou, která umožňuje stanovení iniciace transkripce a jejíž výsledek není ovlivněn stabilitou transkriptu, je metoda „*nuclear run-on*“ (viz dále). Pokud transkribovaná část transgenu obsahuje intron, lze tuto sekvenci využít pro analýzu primárního transkriptu pomocí RT-PCR. Významnou metodou studia regulace exprese genů na obou úrovních je analýza siRNA (malé interferující RNA).

Nuclear run-on

Teoretický úvod

Metoda *nuclear run-on* umožňuje stanovení frekvence iniciace transkripce a její výsledek není závislý na stabilitě transkriptu.

Objektem analýzy jsou obvykle buňky vykazující rozdílnou rovnovážnou hladinu mRNA nebo studovaného proteinového produktu. Jádra buněk jsou inkubována s radioaktivně značeným prekursorem RNA (obvykle ^{32}P -UTP - nukleotid obsahuje atom fosforu ^{32}P , který emituje záření beta). Předpokládá se, že během inkubace nedochází k iniciaci nových transkriptů, radioaktivně značený nukleotid je inkorporován do transkriptů, jejichž syntéza byla započata před zmrazením buněk. Počet vznikajících transkriptů existujících v okamžiku zamrazení buněk je úměrný frekvenci iniciace transkripce na studovaném genu. Značená RNA je izolována a použita jako hybridizační sonda, při čemž na membráně jsou imobilizovány konstrukty DNA obsahující studované geny. Intenzita signálu po hybridizaci je pak přibližně úměrná množství vznikajícího transkriptu.

Provedení

Vlastní metoda se skládá ze tří fází: izolace jader, značení vznikajících molekul RNA pomocí radioaktivního prekursoru a hybridizace radioaktivní sondy RNA s cílovou sekvencí DNA imobilizovanou na membráně.

Příprava jader

Metodou *run-on* byla studována jádra izolovaná z transgenní rostliny HeLo2, která vykazuje vysokou hladinu reporterového enzymu neomycinfosfotransferasy (NPTII) a z rostlin HeLo1 a HeLo1E, u nichž je množství proteinového produktu na hranici detekčních možností (viz dále). Jádra byla izolována metodou popsanou v práci van Blokland *et al.* (1994). Mladé tabákové listy byly homogenizovány v tekutém dusíku a re-suspendovány v extrakčním pufru (10 mM NaCl, 10 mM 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina, pH 6,0, 5 mM EDTA, 0,15 M spermidin, 20 mM β -merkapt ethanol, 0,6 % Triton X-100, 0,25 M sacharosa). Jádra byla purifikována v hustotním gradientu Percollu® (Sigma, USA), rozsuspendována v 1,2 ml skladovacího pufru (12 mM Tris-HCl, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM MgCl_2 , 5 mM β -merkapt ethanol) a skladována v 50 % glycerolu při -70°C .

Run-on

Pro vlastní *run-on* bylo použito 800 μl suspenze jader ve skladovacím pufru důkladně promytých, aby byl z preparátu odstraněn glycerol. Reakce byla startována přidávkou směsi nukleosidtrifosfátů (výsledná koncentrace 0,5 mM pro CTP, GTP a ATP) a 100 μCi [α - ^{32}P] UTP (6000 Ci mmol^{-1} , ICN Biomedicals, Irvine, CA) a po 30 minutách inkubace při 27°C zastavena roztokem sodiumdodecylsulfátu - SDS (výsledná koncentrace v reakční směsi 3 %). Ze vzorku byla odstraněna DNA štěpením deoxyribonukleasou I a po extrakci fenolem byla RNA precipitována ethanolem. Sediment byl rozpuštěn ve 100 μl sterilní vody a použit jako sonda pro hybridizaci. Pro kontrolu kvality sondy je vhodné pro každou reakci stanovit množství inkorporovaného radioaktivního prekursoru, které má odpovídat 100 000 - 1 000 000 cpm.

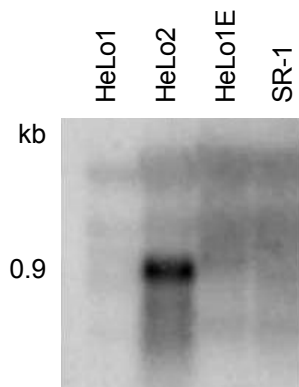
Příprava membrány a hybridizace

Plasmidy nesoucí příslušné inzerty (gen *nptII*, (neomycinfosfotransferasa II) geny *rbcS* (malá podjednotka ribulosobisfosfátcarboxylasy/oxygenasy) a 5SrDNA (gen pro ribosomální 5S rRNA jako pozitivní kontroly) a plasmid pBluescript jako negativní kontrola byly linearizovány, denaturovány a přeneseny na nylonovou membránu (Hybond XL, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). Vlastní hybridizace probíhala v ULTRAhyb pufru (Ambion, Austin, TX) při 42°C , 48 hodin. Membrány byly odmývány v 1xSSPE (standard saline phosphate/EDTA, 0,18 M NaCl, 10 mM NaPi, pH 7,7, 0,1 mM EDTA) + 0,1 % SDS, 15 minut při pokojové teplotě a 30 minut při 60°C . Membrány byly přes noc exponovány a hybridizační signál vizualizován na *PhosphoFluorImager*, STORM (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Použití metody *run-on* při studiu exprese transgenu

Transgenní rostliny *Nicotiana tabacum* HeLo1 a HeLo2 nesoucí gen pro neomycinfosfotransferasu II (*nptII*) se výrazně liší v expresi transgenní DNA. HeLo2 nese jednu kopii transgenu (lokus 2) a obsah proteinu NPTII v extraktu z listů je u ní až tisícinásobně vyšší ve srovnání s rostlinou HeLo1, která obsahuje dvě kopie transgenu vzájemně orientované jako obrácená repetice (lokus 1) (Van Houdt *et al.* 2000, Kovařík *et al.* 2000).

Cílem studie bylo zjistit stabilitu umlčení lokusu 1 ve tkáňové kultuře. Sledovali jsme obsah proteinu, hladinu rovnovážné (*steady-state*) RNA a množství primárního transkriptu. Zjistili jsme, že během dlouhodobé kultivace (24 měsíců) transgenního tabáku HeLo1 v kalusové kultuře a v rostlinách z kalusu regenerovaných (označených HeLo1E) nedochází ke zvýšení exprese transgenu na úrovni proteinu. Metodou „*northern blot*“ byl po hybridizaci s DNA genu *nptII* detegován signál pouze v případě transgenní rostliny HeLo2, což svědčí o nízké hladině stabilního transkriptu v obou liniích HeLo1 i HeLo1E (obr. 1). Avšak rostliny HeLo1E vykazovaly oproti původní rostlině HeLo1 nulovou hladinu primárního transkriptu *nptII* (obr. 2) (Fojtová *et al.* 2003).



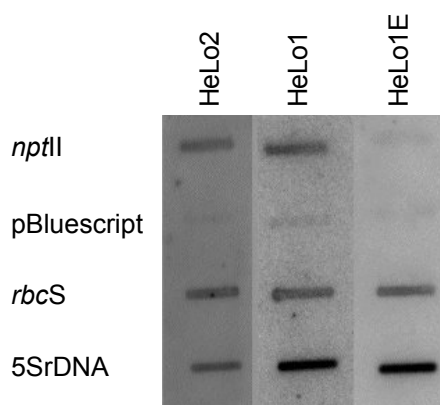
Obr. 1. „*Northern*“ hybridizace. Vzorky RNA byly izolovány pomocí *RNase Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Německo). Denaturační elektroforéza na 1,2 % agarosovém gelu v přítomnosti formaldehydu byla provedena podle Qiagen protokolu. Po elektroforéze byl gel 10 minut promýván ve vodě, aby se odstranil formaldehyd, 15 minut v 0,05 M NaOH a RNA byla přes noc blotována ve 20xSSC (*standard saline citrate*, 150 mM NaCl, 15 mM Na₃-citrát, pH 7,0) na nylonovou membránu (Amersham, Biosciences, Little Chalfont, UK). Hybridizace s radioaktivně značenou sondou (DNA genu *nptII*) probíhala v ULTRAhyb pufru (Ambion, Austin, TX) při 42°C, 24 hodin. Membrána byla odmyta (2 × 15 minut ve 2xSSC + 0,1 % SDS, 50 °C), hybridizační signály byly vizualizovány pomocí *PhosphoFluorImageru* STORM. Jako negativní kontrola byla použita RNA izolovaná z netransgenního tabáku linie SR1.

Praktické poznámky

Pro *run-on* stanovení lze imobilizovat na membránu jedno- nebo dvouvláknovou DNA obsahující sekvenci studovaného genu. Delší fragmenty DNA poskytují po hybridizaci silnější signál než fragmenty kratší, použití krátkých fragmentů zase umožňuje detailnější studium vznikajících transkriptů asociovaných s různými částmi studované genové oblasti.

Nezbytné je použití pozitivní a negativní kontroly; jako negativní kontrola se obvykle používá plasmidový vektor, pozitivní kontrolou bývá konstitutivně exprimovaný gen, v případě zelených rostlinných buněk gen *rbcS*, u ostatních typů buněk se pracuje nejčastěji s β-aktinem.

Běžně se metoda *run-on* používá ke stanovení transkripční aktivity vysoce exprimujících genů a genových rodin a i v těchto případech je nutno pracovat s vysokými dávkami radioaktivity. Pro méně aktivní genové rodiny a jednokopiové geny je obtížné získat reprodukovatelný signál i při použití velmi vysoké dávky radioaktivně značeného prekursoru.



Obr. 2. Analýza metodou „run on“. Jako sondy byly použity radioaktivně značené *in vitro* transkripty připravené z jader transgenní tabákové rostliny HeLo2 (neumlčená linie s vysokou expresí reportérového genu *nptII*) a rostlin HeLo1 a HeLo1E (linie s umlčeným transgenem). Na nylonovou membránu byl imobilizován plasmidový konstrukt obsahující gen *nptII*, dále konstrukty nesoucí geny *rbcS* a 5SrDNA jako pozitivní kontroly a linearizovaný plasmid pBluescript jako negativní kontrola. Podmínky hybridizace byly obdobné jako v případě experimentu na obr. 1. Doba hybridizace byla prodloužena na 48 - 72 hodin.

Tímto způsobem jsme prokázali epigenetické přepnutí potranskripčního umlčení na transkripční během kultivace transgenní rostliny v tkáňové kultuře.

Časté problémy

1. Nízká inkorporace radioaktivně značeného nukleotidu do vznikajícího transkriptu.

Obvyklou příčinou je nekvalitní jaderný preparát. Je dobré zkontrolovat jádra pod mikroskopem, případně použít jinou metodu izolace jader. Dalším problémem může být degradace RNA během purifikačních kroků. V tomto případě je nutné celou proceduru zopakovat, pracovat maximálně čistě a pečlivě a před vlastní hybridizací provést odhad inkorporace ^{32}P -UTP do RNA pomocí precipitace kyselinou trichloroctovou.

2. Vysoké pozadí na odmytých membránách

Signál pozadí lze eliminovat odmyváním za přísnějších podmínek. Existují speciální protokoly pro odmyvání *run-on* membrán, obecně lze ale odmyvat podle zásad uplatňovaných pro „northern“ hybridizace.

Další příčinou vysokého pozadí může být nedostatečná purifikace RNA; zbytky DNA a proteinů v sondě mohou ovlivňovat vazbu RNA na membráně. V tomto případě je možno prodloužit doby štěpení deoxyribonasou I a proteinasou K a samozřejmě používat čerstvé a zaručeně funkční enzymy.

3. Slabý nebo nedetegovatelný signál po hybridizaci

Slabý signál často souvisí s neefektivní hybridizací, v horším případě je odrazem nízkého počtu transkriptů. Je možno testovat různé hybridizační a odmyvací podmínky, zvýšit množství konstruktů DNA imobilizovaného na membráně, použít vyšší množství radioaktivně značeného UTP, snížit objem hybridizačního roztoku atd.

Literatura

- Fojtová, M., Van Houdt, H., Depicker, A., Kovařík, A. 2003. - Plant Physiol. In press.
 Kovařík, A., Van Houdt, H., Holý, A., Depicker, A. 2000. - FEBS Lett. **467**: 47.
 van Blokland, R., van der Geest, N., Mol, J.N., Kooter, J.M. 1994. - Plant J. **6**: 861.
 Van Houdt, H., Kovařík, A., Van Montagu, M., Depicker, A. 2000. - FEBS Lett. **467**: 41.

Poděkování. Práce byla financována granty GAČR 521/01/P042, GAČR 521/01/0037 a Z5004920.

Identifikace a izolace cDNA funkčně homologních genů

JAROSLAV FULNEČEK

Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 230, e-mail: fulnecek@ibp.cz)

Úvod

V molekulární biologii může nastat situace, že potřebujeme izolovat gen, jehož funkční homolog (ortholog) byl již dříve popsán u jiného organismu. Často k této situaci dochází u projektů zaměřených na rostliny, kdy nejjednodušším způsobem řešení je využití poznatků z živočišné říše, jejíž výzkum bývá zpravidla o krok dále. Nejsnazší situace je u *Arabidopsis thaliana* díky známé sekvenci jejího genomu. Zde lze poměrně jednoduše vyhledat orthologní geny a výzkum proteomu je u této rostliny nejdále. *A. thaliana* však není reprezentativní pro celou rostlinnou říši. Existuje řada procesů, které je vhodné studovat u jiných rostlinných druhů, například ty, jež souvisejí s produkcí zemědělských plodin. Studium biologických procesů u více rostlinných modelových systémů nám pomůže odhalit složitost dějů a upozorní na rozdíly, které doplní všeobecný model založený na výsledcích studia *A. thaliana*.

Je vhodné zvolit rostlinný druh, jehož genom je ve fázi sekvenování (<http://www.info-biogen.fr/services/deambulium/english/genomes1.html>). V budoucnu nám pak kompletní sekvenční data mohou ušetřit spoustu práce. Můžeme hledat příslušné orthology, identifikovat všechny členy genové rodiny a pseudogeny, studovat regulační oblasti atd. Rostlinný genom se však čte velmi dlouho, a proto zmíněné výhody mohou vyvážit dlouhodobé zkušenosti s jinou modelovou rostlinou. Navíc, jedná-li se o zemědělsky významnou plodinu, můžeme doufat ve snazší získání finančních prostředků.

Ve funkční genomice rostlin se již uplatňují přístupy reversní genetiky. Nejprve je popsán gen a poté se ověřuje jeho funkce. Lze použít několik přístupů k izolaci genu. O konkrétním postupu se zpravidla rozhoduje na základě dostupných informací a materiálu. Pokud chceme studovat jen několik genů, které jsou známy u jiných organismů, lze využít informací z biologických databází pro identifikaci a izolaci příslušných cDNA.

Podstata řešení

Na základě konzervativních oblastí aminokyselinových sekvencí proteinů kódovaných orthologními geny různých organismů můžeme nalézt gen pro podobný protein u jiného organismu. Pokud je naším modelovým organismem rostlina zařazená do sekvenačního projektu nebo pro ni existuje EST databáze (*expressed sequence tags*), lze k vyhledávání nukleotidové sekvence genu využít databáze bez nutnosti vlastního experimentu. K vyhledávání nukleotidových sekvencí na základě známých aminokyselinových sekvencí se používají například programy: TFastA, TFastX (GCG WISCONSIN PACKAGE, http://www.accelrys.com/products/gcg_wisconsin_package/index.html, <http://www.iccbnet.cz/Services.html>, <http://fasta.bioch.virginia.edu/> nebo fastx3, fasty3, (<http://www.ebiac.uk/fasta33/index.html>) nebo tblastn, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Co je potřeba v laboratoři

Tento úkol lze řešit v laboratoři pro molekulární biologii, vybavené PCR cyklérem a aparaturami pro horizontální agarosovou a vertikální polyakrylamidovou elektroforézu. Z gelu izolované produkty PCR budou sekvenovány přímo nebo až po naklonování do bakteriálního vektoru. Oligonukleotidy budou zakoupeny. Bude nutné dodržet základní pravidla pro práci s RNA. Pro izolaci RNA a její reversní transkripci lze využít komerční soupravy. 3' RACE postup (*rapid amplification of cDNA ends*) pro získání 3' konce cDNA je možné provést i bez soupravy, některé 5' RACE postupy lze také provést bez soupravy, avšak pro izolaci 5' konce cDNA založené na využití čepičky mRNA bude vhodné soupravu zakoupit (*Invitrogen GeneRacer Kit* (5) 24 tis. Kč). Velice důležitá je možnost a dovednost prohledávat biologické databáze a pracovat se získanými sekvencemi.

Pracovní postup

Vyhledání známých sekvencí a jejich seřazení za účelem zjištění konzervativních domén vhodných pro návržení degenerovaných oligonukleotidů

Pravděpodobnost zachycení homologního genu roste s počtem již známých sekvencí, proto je velice důležité prohledat biologické databáze a získat co nejvíce informací o daném genu. Snažíme se získat nukleotidové a aminokyselinové sekvence byť i jen částečné nebo předpokládané a to bakteriální, živočišné i rostlinné. Nukleotidové sekvence převedeme na aminokyselinové a ty seřadíme pod sebe na základě homologií s použitím programu např. programy Clustal, (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), PileUp (GCG WISCONSIN PACKAGE, http://www.accelrys.com/products/gcg_wisconsin_package/index.html, <http://www.iccbnet.cz/Services.html>), apod.

Orthologní proteiny obvykle mají ve své aminokyselinové sekvenci vysoce konzervativní oblasti obsahující aminokyseliny, které se aktivně podílejí na plnění funkce proteinu. Mohou to být katalytická centra, domény zabezpečující vazbu s kofaktory nebo substrátem popřípadě s DNA nebo dalšími funkčními proteiny v multiproteinovém komplexu. Porovnáním bakteriálních, živočišných a rostlinných aminokyselinových sekvencí proteinu tyto oblasti zjistíme a sekvence z nejbližších příbuzných druhů využijeme pro návržení degenerovaných oligonukleotidů, které jsou poté použity při amplifikaci prvního vlákna cDNA k zachycení části hledané sekvence.

Navržení degenerovaných oligonukleotidů

Navržení degenerovaných oligonukleotidů je kritická část postupu. Konzervativní oblast proteinů (blok) se přepíše z pořadí aminokyselin zpět do pořadí nukleotidů podle genetického kódu, který je degenerovaný, a proto získáme sadu nukleotidových sekvencí jako výsledek kombinace různých kodonů jednotlivých aminokyselin. Navržený degenerovaný oligonukleotid je tedy ve skutečnosti směsí oligonukleotidů, která obsahuje velice málo molekul se správnou sekvencí. Ty jsou vyčerpány v prvních cyklech amplifikace. Nadbytkem oligonukleotidů s nesprávnou sekvencí dochází k nespecifické amplifikaci, která je navíc podpořena jak nastavením méně přísných podmínek amplifikace, což je na druhou stranu často nutné pro získání neznámého cílového fragmentu, tak použitím krátkých oligonukleotidů navržených podle krátkých bloků. Proto je často výsledkem vysoké pozadí nespecifických produktů, ve kterém nelze rozeznat správný fragment.

Jiným přístupem je použití oligonukleotidu s konsensus sekvencí, tedy oligonukleotidu, jehož jednotlivé nukleotidy odpovídají nejčastěji se vyskytujícím bazím v daném místě nukleotidových sekvencí konzervativního bloku. Ačkoli byla tato strategie s úspěchem použita pro izolaci velice konzervativních orthologních genů, je nevhodná pro izolaci vzdáleně příbuzných genů.

Řešení problémů obou metod spočívá v jejich kombinaci ve strategii CODEHOP (*consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primer*) (Rose *et al.* 1998), která byla zpracována i jako program (<http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>). Hybridní oligonukleotid se skládá z poměrně krátké 3' degenerované aktivní oblasti, která je navržena podle 3 - 4 vysoce konzervativních aminokyselin a z delší nedegenerované 5' konsensus oblasti. Zkrácení degenerované oblasti na minimum sníží počet sekvencí vyskytujících se ve směsi. Její hybridizace s templátem je stabilizována vazbou s nedegenerovanou oblastí, což umožňuje zvýšení teploty nasednutí bez dalšího zvyšování degenerace ve směsi. V prvních cyklech amplifikace nasedá 3' oblast oligonukleotidu přesně, v 5' oblasti se případně mohou vyskytnout nepárované nukleotidy, které DNA polymerase nebrání v prodloužení řetězce. Díky jednotnosti sekvence v 5' oblasti nasedají oligonukleotidy na produkt amplifikace i v dalších cyklech, nepárované nukleotidy v 3' oblasti dále od konce nemusí bránit DNA polymerase v prodloužení řetězce a to v podstatě umožní využití téměř všech oligonukleotidů.

Tímto přístupem navrhne oligonukleotidy podle všech konzervativních oblastí.

Příprava prvního vlákna cDNA

První vlákno cDNA se připraví reversní transkripcí celkové RNA nebo mRNA. Je užitečné si připravit několik cDNA použitím různých primerů např. oligo (dT), náhodných dodekamerů nebo hexamerů, oligo (dT) prodloužené o sekvenci dvou primerů podle 3' RACE protokolu viz. dále. Tyto cDNA se totiž liší vhodností pro amplifikaci různých oblastí. (Upozorňuji, že všechny oligonukleotidy, potenciálně použitelné pro reversní transkripci je nutné rozpouštět v roztocích prostých RNas).

Amplifikace neznámého cílového fragmentu z cDNA pomocí degenerovaných oligonukleotidů

V řadě amplifikací a následných uhnížděných amplifikací vyzkoušíme všechny vhodné kombinace navržených degenerovaných oligonukleotidů. (Zde nemá význam použít

oligo (dT) v kombinaci s degenerovanými oligonukleotidy, jejich T_m se výrazně liší, a proto nezískáme žádné fragmenty). Pokud neobdržíme ani jeden cílový fragment, navrhneme nové sekvence oligonukleotidů. Lze amplifikovat i genomovou DNA. Nedoporučuji ověřovat správnou funkci degenerovaných oligonukleotidů amplifikací genomové DNA nebo cDNA kontrolních druhů dříve než obdržíme cílový fragment. Hrozí totiž nebezpečí, že dojde ke kontaminaci kontrolním fragmentem, který posléze bude příčinou falešně pozitivních výsledků. Délka získaných fragmentů cDNA je dostačujícím vodítkem. Měla by souhlasit s předpokládanou délkou, určenou z homologních aminokyselinových sekvencí proteinů blízkých druhů. Pokud nečekáme délku amplifikovaného fragmentu větší než kilobázi, je jeho detekce citlivější v polyakrylamidovém gelu, protože agarosové gely mají vysoké pozadí vázaného ethidiumbromidu a malá množství fragmentu by v něm zanikla. Změnou podmínek amplifikace, nebo po extrakci fragmentu z gelu jeho reamplifikací, popřípadě uhnížděnou amplifikací s další sadou oligonukleotidů můžeme dosáhnout značného zvýšení množství získaného fragmentu.

Podaří-li se nám získat fragment odpovídající délky, zjistíme jeho sekvenci nukleotidů a převedeme ji do pořadí aminokyselin. Absence stop kodonu znamená, že se pravděpodobně jedná o kódující sekvenci. Porovnáním s odpovídajícími oblastmi orthologních proteinů zjistíme, zda se nám skutečně podařilo zachytit nového zástupce. Pořadí nukleotidů na tomto krátkém úseku využijeme pro navržení specifických oligonukleotidů, které budou dále použity pro zjištění sekvence na 3' konci, tak získáme delší sekvenci a jistotu, že se jedná o hledaný gen. Poté již zbývá jen investovat do odhalení sekvence na 5' konci a naklonování celé cDNA.

3'RACE

Zjištění sekvence na 3' konci provedeme pomocí 3' RACE (Frohman *et al.* 1988). K tomu není třeba kupovat soupravu, stačí použít cDNA připravenou reversní transkripcí celkové RNA nebo mRNA s využitím speciálního delšího oligo(dT). Ten kromě osmnácti T na 3' konci obsahuje na svém 5' konci ještě další sekvenci, v níž jsou sloučeny sekvence dvou speciálních oligonukleotidů, které spolu se dvěma oligonukleotidy specifickými pro hledaný gen slouží při amplifikaci a uhnížděné amplifikaci cDNA sekvence na 3' konci. Sekvenci tohoto oligo(dT) jako i dvou speciálních oligonukleotidů zjistíme v návodech pro 3' RACE soupravy například od firmy Invitrogen a necháme si je připravit na zakázku společně se dvěma oligonukleotidy specifickými pro gen. Po amplifikaci, případně až po uhnížděné amplifikaci, příslušný fragment sekvenujeme. Tímto způsobem často získáme několik různě dlouhých fragmentů, odpovídajících 3' konci mRNA sekvence. Jedná se o běžný jev způsobený výskytem několika motivů podobných klasickému polyadenylačnímu signálu na konci primárního transkriptu, a proto dochází k alternativnímu připojování poly(A) řetězce.

5'RACE

Pro zjištění sekvence na 5' konci cDNA existují v zásadě dvě možnosti. Klasickým vyhledáváním v cDNA knihovně se nám může podařit najít kompletní cDNA. Většinou však zachytíme několik různě dlouhých cDNA bez 5' sekvence a nezbývá než použít 5' RACE. Ta je založena na několika přístupech. Společnost TaKaRa zvolila reversní

transkripci z genově specifického oligonukleotidu, který je předem fosforylován na 5' konci (Maruyama *et al.* 1995). První vlákno cDNA se cirkularizuje T4 RNA ligasou a následuje reversní amplifikace s dalšími gen specifickými oligonukleotidy. 5' RACE systém firmy Invitrogen používá terminální deoxynukleotidyltransferasu, která prodlouží cDNA připravenou z genově specifického primeru o řetězec deoxycytidinmonofosfátů (Frohman 1990, 1993, Loh 1991). Ten slouží k nasednutí speciálního oligonukleotidu obsahujícího deoxyinosiny pro účinnější amplifikaci 5' konce. Avšak pokud dojde k předčasnému ukončení reversní transkripce, vytvoří se zkrácené cDNA a sekvenci na 5' konci stejně nezjistíme. Tento problém řeší systém soupravy GeneRacer firmy Invitrogen (Maruyama a Sugano 1994, Volloch *et al.* 1994, Schaefer 1995). Zde dochází k amplifikaci jen kompletních cDNA, což je docíleno využitím čepičky na 5' konci mRNA, která ochrání fosfátové skupiny na 5' koncích intaktních mRNA, zatímco fosfáty na 5' koncích degradovaných mRNA (bez čepičky) jsou odstraněny fosfatasou. Po odstranění čepičky na intaktních mRNA pomocí kyselé pyrofosfatasy z tabáku zůstává na jejich 5' konci zůstává fosfátová skupina. Ta je nutná při ligaci se speciálním RNA oligonukleotidem pomocí T4 RNA ligasy. Tak získáme známou RNA sekvenci na 5' konci, kterou po reversní transkripci s oligonukleotidem specifickým ke genu využijeme pro amplifikaci 5' konce cDNA.

Klonování a sekvenování kompletní cDNA

V okamžiku, kdy zjistíme kompletní sekvenci cDNA, naklonujeme celý úsek a ověříme jeho sekvenci přečtením několika klonů z alespoň tří nezávislých amplifikací. Poté můžeme s klidným svědomím sekvenci poslat do databází a začít s charakterizací genu a s řadou dalších jistě velice zajímavých studií.

Závěr

Pro úspěch je klíčové nalezení první krátké specifické sekvence v RT-PCR experimentech. S trochou štěstí by to snad nemělo trvat déle než půl roku. Přeji hodně zdaru.

V přednášce bych se chtěl věnovat získaným výsledkům při identifikaci cDNA tří základních typů rostlinných DNA-(cytosin-5)-methyltransferas u *Nicotiana sylvestris*.

Literatura

- | | |
|---|--|
| Frohman, M.A. 1990. - In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds): PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. S. 28. Academic Press, San Diego. | Maruyama, I.N., Rakow, T.L., Maruyama, H.I. 1995. - Nucleic Acids Res. 23 : 3796. |
| Frohman, M.A. 1993. - Meth. Enzymol. 218 : 340. | Maruyama, K., Sugano, S. 1994. - Gene 138 : 171. |
| Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R. 1988. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 8998. | Rose, T.M., Schultz, E.R., Henikoff, J.G., Pietrokovski, S., McCallum, C.M., Henikoff, S. 1998. - Nucleic Acids Res. 26 : 1628. |
| Loh, E. 1991. - Methods 2 : 11. | Schaefer, B.C. 1995. - Anal. Biochem. 227 : 255. |
| | Volloch, V., Schweitzer, B., Rits, S. 1994. - Nucleic Acids Res. 22 : 2507. |

Poděkování. Experimenty, zmíněné v tomto článku byly a jsou podporovány prostředky z grantů GAČR 204/99/D001 a 204/03/P104.

Extrakce a stanovení aktivity cytokinin *N*- a *O*-glukosyltransferas v rostlinných pletivech

ALENA GAUDINOVÁ, RADOMÍRA VAŇKOVÁ, PETRE I. DOBREV, VÁCLAV MOTYKA*

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Laboratoř hormonálních regulací u rostlin, Rozvojová 2/135, 165 02 Praha 6, (tel.: 220 390 437, e-mail: vmotyka@ueb.cas.cz)

Úvod

Cytokiny jsou rostlinné hormony, které se podílejí na řízení mnoha růstových a vývojových procesů rostlin. Široké spektrum jejich biologických účinků v rostlinách zahrnuje např. stimulaci buněčného dělení, odnožování a větvení stonků, inhibici růstu a větvení kořenů, zpomalení senescence listů, stimulaci diferenciaci chloroplastů a následné akumulace chlorofylu, zvýšení odolnosti vůči stresu, urychlení příjmu a asimilace minerálních živin apod. (Kamínek 1992, Mok 1994). Endogenní hladiny cytokininů jsou v rostlinných pletivech regulovány různými mechanismy zahrnujícími jejich biosyntézu, vzájemné metabolické přeměny vedoucí k modifikaci nebo ztrátě biologické aktivity, degradaci, příjem a exkreci do a vně buněk a v neposlední řadě také příjem a přenos hormonálního signálu (*signal transduction*) a transport.

Nadbytek cytokininů v rostlinných buňkách může být účinným způsobem kompenzován jejich konjugací na glykosidy. V rostlinách byly popsány dva typy glykokonjugace cytokininů, a to (1) glykosylace na purinovém jádře (3-, 7- a 9-*N* glukosylace a 9-*N*-konjugace *trans*-zeatinu (*Z*) s alaninem vedoucí ke vzniku kyseliny lupinové) a (2) glykosylace hydroxylové skupiny na isoprenoidním *N*⁶-postranním řetězci (*O*-glukosylace a *O*-xylosylace). Cytokinin 7- a 9-*N*-glukosylkonjugáty a kyselina lupinová jsou charakteristické vysokou metabolickou stabilitou a velmi nízkou nebo zcela chybějící biologickou aktivitou a jsou proto pravděpodobně inaktivačními nebo detoxikačními produkty cytokininů. Naproti tomu *O*-glykosylované cytokiny a 3-*N*-glukosidy představují zřejmě zásobní formy cytokininů, které jsou vysoce biologicky účinné, patrně v důsledku snadné metabolické přeměny na aktivní formy působením β -glukosidas (Brzobohatý *et al.* 1994, Vaňková 1999).

Již před téměř 25 lety byly izolovány z děloh klíčících rostlin ředkvičky dva proteiny s *N*-glukosyltransferasovou aktivitou a jeden z nich, cytokinin-7-glukosyltransferasa, byl dále biochemicky charakterizován (Entsch a Letham 1979, Entsch *et al.* 1979). Později byly izolovány z pletiv fazolu a kukuřice také enzymy a geny podílející se na přeměně *trans*- a *cis*-*Z* na odpovídající *O*-glykosidy a následně deilně studovány (Turne *et al.* 1987, Dixon *et al.* 1989, Martin *et al.* 1999a, b, 2001, Veach *et al.* 2003). Na základě těchto prací jsme se pokusili izolovat a purifikovat enzymy cytokinin *N*-glukosyltransferasu z klíčících rostlin ředkvičky a cytokinin *O*-glukosyltransferasu z listů transgenních rostlin tabáku transformovaných genem *ZOG1*. Postup čištění a stanovení obou enzymových aktivit je popsán v tomto příspěvku.

Podstata metody

Metoda je založena na měření konverse radioaktivně značených substrátových cytokininů (Z pro oba enzymy, N6-benzylaminopurinu - BA a dihydrozeatinu - DHZ pro cytokinin N-glukosyltransferasu) v testech *in vitro*. Aktivita obou enzymů se stanovuje po inkubaci částečně purifikovaného bílkovinného preparátu se značeným substrátem v přítomnosti uridindifosfoglukosy (UDPG - donor glukosy). Vyjadřuje se v procentech radioaktivity vzniklých produktů enzymové reakce (cytokinin N-, resp. O-glukosidy) po jejich oddělení od nezreagovaného substrátového cytokininu vhodnou chromatografickou metodou (HPLC) nebo v přepočtu na 1 mg bílkovin detekovaných v hrubém extraktu.

Postup

Extrakce bílkovinného preparátu

Rostlinný materiál (7 dnů staré klíční rostliny ředkvičky a listy *ZOG1* transgenních rostlin tabáku, à 30 g č. hm.) je předhomogenizován v třecí misce s tekutým dusíkem a po přidání 45 ml vychlazeného extrakčního pufru (50 mM Tris-HCl, pH 7,2 + 5 mM dithio-treitol + 0,5 mM EDTA) zhomogenizován na jemnou suspenzi (sonikátor Vibracell s ultrazvukovou sonikační sondou CV18). Supernatant získaný po centrifugaci homogenátu (27 000 g, 20 min, 4 °C) je frakcionován vysolením práškovým $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Frakce vysrážená při 30 – 60 % nasycení $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ je rozpuštěna ve 2 ml extrakčního pufru a centrifugována (27 000 g, 20 min, 4 °C). Supernatant je nanesen na centrifugační filtr Centriprep 30 (Amicon) a po odsolení extrakčním pufrem (celkový objem 40 – 60 ml) zakoncentrován na cca 0,5 ml centrifugací (925 g, 4 °C). Získaný enzymový extrakt je přefiltrován přes membránový filtr Millex-GP (Millipore, velikost pórů 0,22 μm).

Purifikace enzymového extraktu

Zakoncentrovaný a filtrovaný enzymový extrakt je čištěn afinitní chromatografií na kolumnách AgAMP-agarosy (Sigma) a Blue Sepharosy CL-6B (Amersham Pharmacia Biotech) modifikací metody podle Dixonové *et al.* (1989). AgAMP-agarosa je namočena ve vodě (0,5 ml.g⁻¹ č. hm. pletiva, 1 h, 4 °C), po nabobtnání převedena do kolony (2 × 8,5 cm) a ekvilibrována extrakčním pufrem. Po ekvilibraci je na kolonu nanesen enzymový extrakt a kolona je promyta 3 objemy (45 ml) stejného pufru (průtok 45 - 50 ml.h⁻¹). Eluát je aplikován na centrifugační filtr Centriprep 30, zakoncentrován na cca 10 ml a zfiltrován přes membránový filtr Millex-GP (velikost pórů 0,22 nebo 0,45 μm).

Extrakt je poté nanesen na kolonu předem nabobtnalé Blue Sepharosy CL-6B (1 ml.g⁻¹ č. hm. pletiva), promyt 2 objemy extrakčního pufru a eluován 4 objemy téhož pufru obsahujícího 2,5 mM UDPG. Získaný eluát je zakoncentrován na 0,6 – 0,9 ml centrifugací (925 g, 4 °C) za použití centrifugačního filtru Centriprep 30. Koncentrát je použit buď přímo ke stanovení enzymové aktivity, nebo uchován pod vrstvou glycerolu (20 % obj.) v dobře uzavřených polypropylénových mikrozkrumavkách Eppendorf při -20 °C.

Stanovení enzymové aktivity

Standardní reakční směs obsahuje UDPG (3 mM), ATP (0,5 mM), MgCl_2 (0,05 M), enzymový extrakt (100 μl) a radioaktivně značený substrát ($[^3\text{H}]Z$ pro oba enzymy,

[³H]DHZ nebo [³H]BA pouze pro cytokinin-*N*-glukosyltransferasu, à 1,3 TBq.mmol⁻¹) v 1 mM Tris-HCl pufru, pH 8,0 (celkový objem 200 µl). Po skončení inkubace při 25 °C je reakce zastavena přidáním 1 ml vychlazeného ethanolu a po 15 min při 4 °C je směs centrifugována (27 000 g, 30 min, 4 °C). Vysrážené proteiny jsou odstraněny a získaný supernatant je zakonzentrován ve vakuu (vakuový koncentrátor SpeedVac, Savant) na cca 100 µl.

Radioaktivně značené produkty enzymové reakce v supernatantu jsou odděleny od substrátového cytokininu pomocí HPLC (pumpa Perkin Elmer Series 200) s napojeným průtokovým detektorem radioaktivity (Diode Array Detector 235C, Perkin Elmer) a kolonou Luna C18(2) (150 mm/4,6 mm/3 µm, Phenomenex). Na kolonu jsou nanášeny přefiltrované vzorky o objemu 10 µl, průtoková rychlost je 0,6 ml.min⁻¹, teplota kolony 35 °C, UV detekce se provádí při 270 nm. Jako mobilní fáze jsou použity roztok A (40 mM CH₃COOH + NH₄OH, pH 4,1 - 4,2) a roztok B (CH₃OH/CH₃CN, 1 : 1, v/v), gradient je 10 - 15 %B 2 min, 15 - 20 %B 9 min, 20 - 34 %B 0,1 min, 34 - 45 %B 7,9 min, 45 - 100 %B 2 min, 100 %B 2 min, 100 - 10 %B 2 min. Radioaktivně značené metabolity jsou identifikovány na základě shody retenčních časů se standardy cytokininů.

Zhodnocení metody – výhody a nevýhody

Hlavními výhodami uvedeného postupu jsou jednoduchost, nízká časová náročnost a vysoká specifita. Díky vysoké specifitě metoda umožňuje spolehlivé stanovení aktivity cytokinin *N*- a *O*-glukosyltransferas v relativně hrubých extraktech z rostlinných pletiv stejně jako ve velmi dobře přečištěných bílkovinných preparátech.

Nevýhody lze spatřovat zejména v poměrně značných finančních nárocích, zvláště na radioaktivně značené substrátové cytokininy, chemikálie pro afinitní chromatografii, rozpouštědla a scintilační činidla. Postup vyžaduje rovněž drahé přístrojové vybavení (HPLC s radiodetektem obsluhované kvalifikovaným pracovníkem), jakož i speciální zařízení a povolení pro práci s radioaktivním materiálem.

Závěr

Naše předběžné výsledky ukazují na vhodnost použití uvedené metody pro stanovení aktivity cytokinin *N*- a *O*-glukosyltransferas *in vitro* v různých rostlinných materiálech. Další optimalizace popsaného postupu je v současné době předmětem dalšího výzkumu.

Literatura

- | | |
|--|---|
| Brzobohatý, B., Moore, I., Palme, K. 1994. - Plant Mol Biol. 26 : 1483. | Kamínek, M. 1992. - Trends Biotechnol. 10 : 159. |
| Dixon, S.C., Martin, R.C., Mok, M.C., Shaw, G., Mok, D.W.S. 1989. - Plant Physiol. 90 : 1316. | Martin, R.C., Mok, M.C., Mok, D.W.S. 1999a. - Plant Physiol. 120 : 553. |
| Entsch, B., Letham, D.S. 1979. - Plant Sci. Lett. 14 : 205. | Martin, R.C., Mok, M.C., Mok, D.W.S. 1999b. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 : 284. |
| Entsch, B., Parker, C.W., Letham, D.S., Summons, R.E. 1979. - Biochim. Biophys. Acta 570 : 124. | Martin, R.C., Mok, M.C., Habben, J.E., Mok, D.W.S. 2001. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 : 5922. |
| | Mok, M.C. 1994. - In: Mok |

- D.W.S., Mok M.C. (eds.): Cytokinins. Chemistry, Activity, and Function. S. 155. CRC Press, Boca Raton.
- Turner, J.E., Mok, D.W.S., Mok, M.C., Shaw, G. 1987. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 3714.
- Vaňková, R. 1999. - In: Strnad M., Peč P., Beck E. (eds.): Advances in Regulation of Plant Growth and Development. S. 67. Peres Publ., Prague, Czech Republic.
- Veatch, Y.K., Martin, R.C., Mok, D.W.S., Malbeck, J., Vaňková, R., Mok, M.C. 2003. - Plant Physiol. **131**: 1374.

Poděkování. Tato práce byla finančně podporována granty udělenými GA AV ČR (A6038002), GAČR (206/03/0313) a MŠMT ČR (Kontakt ME 505).

Od mikrodisekce k mapování struktury genomu

ROMAN HOBZA

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 203, e-mail: hobza@ibp.cz)

Podstata metody

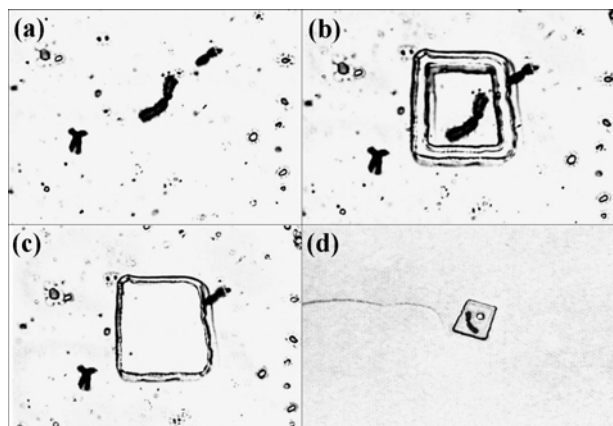
Jedna z možností, jak studovat molekulární strukturu jednotlivých chromosomů je jejich separace pro další analýzy od ostatních chromosomů genomu. Obecně lze užít buď mechanickou mikrodisekcí požadovaného chromosomu, mikrodisekcí prostřednictvím laserového zařízení nebo průtokovou cytometrií. Pro naše účely byla zvolena laserová mikrodisekce, jejíž hlavní výhodou je úplná kontrola nad disektovaným materiálem a nevýhodou omezené množství materiálu (chromosomů), jež lze touto metodou získat. Tuto nevýhodu lze ovšem prakticky obejít pomocí amplifikačního kroku za použití degenerovaných oligonukleotidů, DOP-PCR (Telenius *et al.* 1992). Touto metodou lze získat soubor fragmentů DNA o velikostech řádově od stovek bází až po více jak deset kilobází v závislosti na reakčních podmínkách PCR (Kittler *et al.* 2002).

Dalším krokem k analýze získaných sekvencí je jejich ligace s vhodným vektorem a transformace bakterií legační směsí, čímž získáme chromosomově specifickou knihovnu fragmentů DNA. Pro další charakterizaci této knihovny je vhodné ji přenést pomocí robotického zařízení do mikrotitračních destiček a následně vytvořit *array* bakteriálních kolonií přenesených definovaným způsobem na hybridizační membránu. Po imobilizaci bakteriálních klonů na membráně lze tuto membránu použít k hybridizaci s vhodnou DNA sondou, k následnému dohledání hybridizujících klonů a popřípadě jejich sekvenování a dalším analýzám. Robotická technologie, která umožňuje manipulaci s bakteriemi je v tomto případě nezbytná. Pro pokrytí celého chromosomu je totiž potřeba řádově desetitisíce klonů (v případě, že uvažujeme průměrný chromosom rýže, která má poměrně malý genom).

Pokud nechceme provádět podrobnou analýzu chromosomově specifické knihovny, lze použít DOP-PCR DNA produkt přímo jako komplexní sondu pro FISH (fluorescenční *in situ* hybridizaci). Tímto přístupem je možné zjistit globální zastoupení sekvencí daného chromosomu v celém genomu.

in situ hybridizaci). Tímto přístupem je možné zjistit globální zastoupení sekvencí daného chromosomu v celém genomu.

V naší laboratoři byl pro výše uvedené analýzy zvolen rostlinný dvoudomý model *Silene latifolia* (knotovka bílá), který se vyznačuje přítomností pohlavních chromosomů X a Y (u samečka; samičky mají dva chromosomy X), jež jsou snadno od sebe i od ostatních autosomů odlišitelné a tudíž vhodné k mikrodisekci. Celá procedura začíná samotnou přípravou chromosomů. Buněčné dělení meristému kořenových špiček *Silene latifolia* je synchronizováno a poté zastaveno v metafázi, kdy jsou jednotlivé chromosomy v kondenzované podobě. Kořenový meristém je dále působením enzymů odstraněn a izolované protoplasty fixovány (Hladilová *et al.* 1998). Metafázní protoplasty jsou nakapány na upravenou polyetylenovou membránu, která je umístěna na podložním sklíčku a pro následnou mikroskopickou analýzu obarveny (v našem případě bylo použito Giemsovo barvivo). Takto připravený preparát je umístěn do inverzního mikroskopu, který je spojen s vlastním laserovým mikrodisekčním systémem (The PALM MicroLaser system). Pomocí mikroskopu je dohledán požadovaný chromosom (obr. 1a), který je slabým laserovým paprskem ($1,5 \mu\text{J.puls}^{-1}$) ohraničen (obr. 1b) a pomocí silnějšího laserového paprsku ($2 \mu\text{J.puls}^{-1}$) katapultován do víčka mikrozkušavky (obr. 1c), kde může být úspěšnost procedury mikroskopicky ověřena (obr. 1d). Pro účely DOP-PCR je v podstatě možné použít i jediný chromosom. V našem případě jsme do každé mikrozkušavky takto převedli alespoň deset chromosomů, aby v případě částečného poškození některých z nich, například při laserové manipulaci, byla zachována komplexita vzorku.



Obr. 1. Laserová mikrodisekce chromosomu Y *Silene latifolia*. Metafázní chromosomy byly nakapány na modifikovanou polyetylenovou membránu a obarveny Giemsou. (a) Po nalezení chromosomu Y byl (b) tento chromosom pomocí laserového paprsku ohraničen a následně (c) katapultován do (d) připraveného víčka mikrozkušavky.

Příprava a využití chromosomově specifické bakteriální knihovny *Silene latifolia*

DOP-PCR DNA původem z chromosomu Y byla ligována s pGEM-T *easy* vektorem (Promega) a ligační směsí byly transformovány kompetentní buňky *Escherichia coli* (kmen DH5 α). Bakterie byly vysety na pevné agarové medium a jednotlivé klony roboticky přeneseny do mikrotitračních destiček (jednotlivé jamky destičky obsahovaly tekuté

kultivační medium s glycerolem). Bakterie byly přes noc inkubovány při 37 °C a následně zamraženy (-70 °C). Bakteriální knihovnu lze v této podobě dlouhodobě skladovat a současně každý klon má svoji stálou „adresu“. Jednotlivé klony byly přeneseny roboticky na hybridizační membránu (do předem definovaných seskupení), kde byly imobilizovány alkalickou lyzí. V našem případě bylo na membránu 20 × 20 cm přeneseno 20 000 klonů. Následná hybridizační analýza byla zaměřena na odhalení sekvencí specifických pro samčí chromosom Y. Toho lze dosáhnout dvěma následnými hybridizacemi, kdy se nejdříve jako sonda použije samčí genomická DNA. Pokud je bakteriální knihovna připravena reprezentativně, získáme hybridizací genomové DNA s různými klony signály různé intenzity. Následná hybridizace se samičí DNA již odhalí zajímavé klony ve vztahu k chromosomu Y. Ty, které se samičí sondou hybridizují slabě, či vůbec ne, zatímco se samčí silně, obsahují DNA, která je akumulována na chromosomu Y, popřípadě se na tomto chromosomu vyskytuje unikátně. Izolace takových DNA sekvencí je zásadní pro pochopení evoluce tohoto chromosomu, ale potažmo i pro pochopení obecných mechanismů evoluce nerekombinující DNA vůbec. Tato studie může být dále prohloubena po srovnávací hybridizaci se samčí a samičí cDNA, jež by vedla k odhalení genů specificky exprimovaných v samčích rostlinách, či k přímému dohledání konkrétního genu či sekvence v příslušné knihovně.

Obecné použití metody

Pokud zaměníme samčí a samičí genom knotovky a chromosom X a Y za zdravou a rakovinou buňku, potažmo za standardní a aberantní chromosom, je jasné, že tento přístup má širší uplatnění, než je studium evoluce pohlavních chromosomů rostlin.

FISH s komplexní DOP-PCR sondou

Pokud nás zajímá, jakým způsobem se DNA daného chromosomu podílí na stavbě ostatních chromosomů, či jak je distribuována na chromosomech příbuzného druhu, je jedním z nejrychlejších způsobů provedení fluorescenční *in situ* hybridizace s DOP-PCR (chromosomově specifickou) sondou.

Tento přístup je široce používán u živočichů k odhalování přestaveb genomů během evolučních procesů (Stanyon *et al.* 1999; Kubíčková *et al.* 2002). Zvláště významné uplatnění našla tato metoda v klinické cytogenetice, kde lze tímto způsobem dohledat typy a rozsah aberací, jež vedou k různým chorobným stavům často spojených s karcinogenesí (Pinkel *et al.* 1988). Převzít výše zmíněný přístup a použít ho u rostlinných druhů se ale neosvědčilo (Fuchs *et al.* 2001). Jako hlavní problém je zmiňována vysoká homogenizace rostlinných genomů daná jejich častými přestavbami během evoluce a všudypřítomností různých typů repetitivní DNA.

V našem případě jsme pro FISH s chromosomově specifickou DNA jako sondou opět použili DOP-PCR produkty z chromosomu X a Y knotovky bílé. Poněvadž je u knotovky známo, že se geny nacházejí pouze ve shlucích v oblastech poblíž konců chromosomů a zbytek chromosomu je převážně tvořen repetitivní DNA (Matsunaga *et al.* 2002), bylo nutné pro tzv. „*chromosome painting*“ využít komplexní DOP-PCR sondu bez odstranění této DNA, či její suprese během hybridizace, jak je obecně prováděno. Podmínky hybridizační reakce (DOP-PCR DNA byla značena Cy3-dUTP metodou *nick-translace*) byly

upraveny tak, aby během ní nedocházelo k hybridizacím s oblastmi na chromosomech, jež nemusí být zcela komplementární se sondou. Ukázalo se, že toho lze nejlépe dosáhnout zkrácením vlastní hybridizační reakce (řádově desítky minut místo hodin, či desítek hodin) za současného snížení koncentrace sondy v hybridizačním roztoku (řádově nanogramy místo stovek nanogramů). Přesto se po hybridizaci signál vyskytoval nejenom na chromosomu, ze kterého byla odvozena sonda, ale také na ostatních chromosomech. Pouze chromosom původu sondy byl ale signálem pokryt homogenně, po celé jeho délce. Ostatní chromosomy měly distribuovaný signál nerovnoměrně a slaběji. Tento výsledek byl dosažen jak při použití DOP-X, tak DOP-Y sondy a zvolená metoda se tedy ukazuje jako vhodná pro studium distribuce sekvencí daného chromosomu v rámci rostlinného genomu.

Úskalí a náročnost metody

Výše zmíněné přístupy jsou v porovnání s množstvím dat, které můžeme získat, relativně časově nenáročné, ale závislé na složitém přístrojovém vybavení. Část našich experimentů byla provedena díky technické spolupráci s laboratorii Dr. Doležela (ÚEB, Olomouc) a Dr. Rubeše (VÚVL, Brno).

Při přípravě chromosomů je nutné minimalizovat dobu působení kyseliny octové ve fixáži. Tato kyselina degraduje DNA, což se může negativně projevit při DOP-PCR.

Optimalizace DOP-PCR je klíčový krok pro všechny další experimenty. Při amplifikaci vzniká často PCR produkt i v negativní kontrole bez templátu. To je dáno vzájemným nasedáním degenerovaných oligonukleotidů na sebe během reakce. Tento jev, stejně jako případnou kontaminaci cizorodou DNA lze odhalit pomocí kontrolní Southernovy hybridizace DOP-PCR DNA s vlastní genomickou DNA.

Zmíněných 20 000 bakteriálních klonů přenesených na hybridizační membránu o velikosti 20 × 20 cm je množství přibližně na hranici rozlišitelnosti lidským (autorovým) okem. Přesto je pro rychlejší zpracování lépe použít počítačové programy na analýzu obrazu.

Značení DNA pro hybridizaci na membráně bylo prováděno několika způsoby, ale jednoznačně nejlepší výsledky byly dosaženy při použití radioaktivního nukleotidu (³²P) a *nick*-translační značící reakce.

Literatura

- | | |
|---|--|
| <p>Fuchs, J., Houben, A., Brandes, A., Schubert, I. 1996. - <i>Chromosoma</i> 104: 315.</p> <p>Hladilová, R., Šíroky, J., Vyskot, B. 1998. - <i>Biotech. Histochem.</i> 73: 150.</p> <p>Kittler, R., Stoneking, M., Kayser, M. 2002. - <i>Anal. Biochem.</i> 300: 237.</p> <p>Kubičková, S., Černohorská, H., Musilová, P., Rubeš, J. 2002. - <i>Chrom. Res.</i> 10: 571.</p> <p>Matsunaga, S., Yagisawa, F., Yamamoto, M., Uchida, W., Nakao, S., Kawano, S. 2002. - <i>Genome</i> 45: 745.</p> | <p>Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J., Gray, J. 1988. - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 85: 9138.</p> <p>Stanyon, R., Yang, F., Cavagna, P., O'Brien, P.C.M., Bagga, M., Ferguson-Smith, M.A., Wienberg, J. 1999. - <i>Cytogenet. Cell Genet.</i> 84: 150.</p> <p>Telenius, H., Carter, N.P., Bebb, C.E., Nordenskjöld, M., Ponder, B.A.J., Tunnacliffe, A. 1992. - <i>Genomics</i> 13: 718.</p> |
|---|--|

Poděkování. Tato práce byla podporována GAČR (grant číslo 522/02/1485).

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 stádia 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 homologы 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).

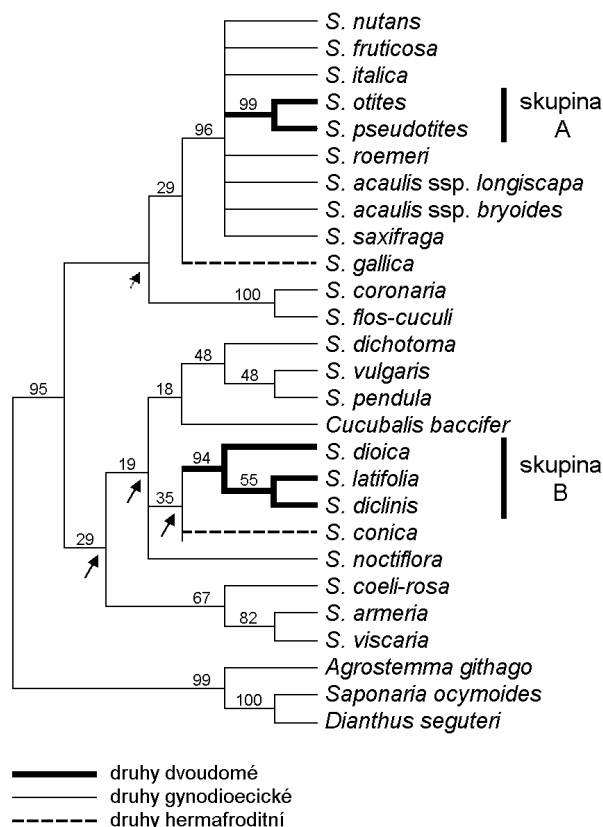
Obecně je možné mapování genů na chromosomech provádět fyzikálně a geneticky. Pro sestrojení fyzikálních map se v naší laboratoři využívá metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Pro genetické mapování čtyř markerových genů na chromosomech vybraných druhů *Silene* jsme se rozhodli využít metody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

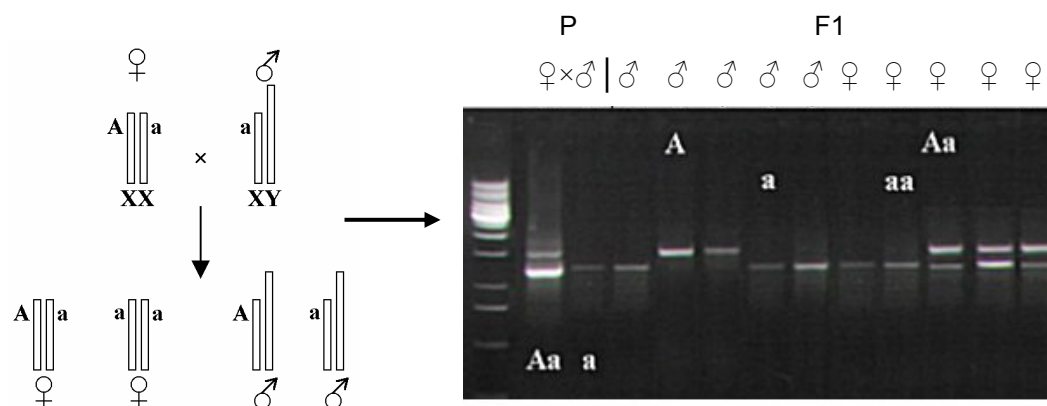
Poté co byly nalezeny vždy dvě alely všech markerových genů a křížením připravena populace potomstva, bylo provedeno vlastní mapování. Pomocí PCR (pro gen *SIX4*) a restrikční analýzy PCR produktů (pro geny *SIX1*, *SIX3* a *DD44*) byly stanoveny genotypy jednotlivých rostlin mapovaného potomstva. Samičí 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 výpočtem standardních odchylek ověřena statistická významnost výsledků.

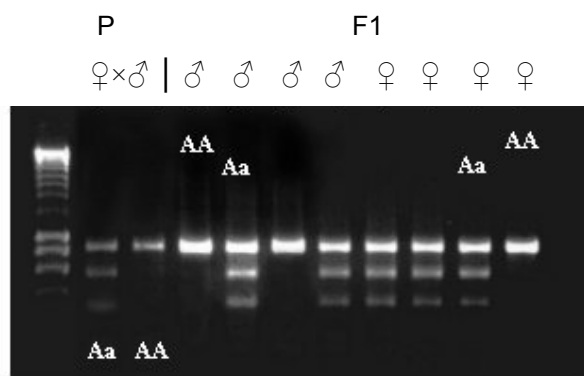
Genetické mapování markerových genů na chromosomech dalších dvoudomých druhů, *S. dioica* a *S. diclinis*

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 samoosprašením, ale kastrací tyčinek hermafroditního jedince připravíme mateřskou rodičovskou rostlinu a opylíme ji pylem jiné rostliny. Pro kontrolu, zda analyzovaní jedinci vznikli skutečně cizosprašením, 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

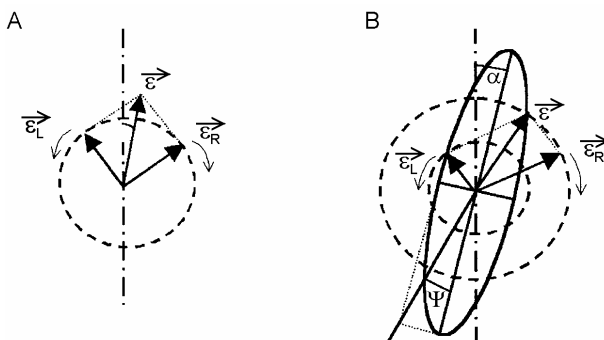
Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 123, e-mail: kejnovska@ibp.cz)

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

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 absorpci 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,

např. retroelementy. Studium celých shluků tandemových repeticí v dlouhých úsecích může vypovídat o mechanismech jejich evoluce.

V naší laboratoři jsme konstruovali částečnou BAC knihovnu *Silene latifolia*. Byly použity samčí rostliny obsahující pohlavní chromosomy X a Y. Při konstrukci knihovny je kritickým faktorem integrity izolované genomové DNA. Osvědčila se nám izolace DNA z jader v agarosových bločcích, v nichž byla DNA rovněž štěpena restriktasami. Restrikční fragmenty byly extrahovány z agarosu elektroelucí a ligovány s vektorem pBeloBAC11. Alternativní přístup izolace DNA pomocí štěpení agarosu enzymem gela-sou vedl k nižším délkám klonovaných fragmentů, což bylo zřejmě způsobeno tvorbou zlomů v DNA během tavení agarosu při vyšší teplotě. Zjistili jsme také, že DNA musí být ligována s vektorem bezprostředně po její izolaci z agarosu, aby nedocházelo k její degradaci v roztoku. Analýza klonů BAC knihovny spočívala především ve stanovení délky inzertů pomocí pulzní elektroforézy. Průměrná délka inzertů naší knihovny byla 125 kb, což v případě rostlinné BAC knihovny svědčí o její dobré kvalitě.

Skríníng BAC knihovny

Jednotlivé BAC klony byly uspořádány na membrány pomocí robotu (spolupráce s dr. Macasem, ÚMBR, České Budějovice) a poté byl proveden skríníng klonů různými sondami pomocí metody hybridizace bakteriálních kolonií (*colony hybridisation*). Byly použity sondy s cílem najít BAC klony obsahující geny (sondou byla cDNA), retroelementy (sondou byla sekvence DNA kódující konzervativní doménu reversní transkriptasy) a sekvence specifické nebo akumulované na pohlavních chromosomech X a Y (hybridizující s DOP-X nebo DOP-Y sondami, nebo silněji se samčí než se samičí genomovou DNA). Sondy DOP-X a DOP-Y byly připraveny pomocí DOP PCR (*degenerate oligonucleotide-primed PCR*) na tříděných chromosomech X (spolupráce s doc. J. Doleželem, ÚEB, Olomouc) a na mikrodisektovaných chromosomech Y (spolupráce s doc. J. Ruběšem, VÚVL, Brno).

Testovali jsme rovněž použitelnost techniky DNA *microarrays* pro skríníng BAC knihovny (spolupráce s prof. Heslop-Harrisonem, Norwich, UK). Pomocí souprav (Oia-gen a Machery Nagel) byla izolována BAC DNA paralelně vždy po 96 vzorcích. BAC DNA byla robotem natištěna na speciálně upravená skla a provedena FISH. Výpovědní hodnota a reprodukovatelnost výsledků získaných technikou DNA *mikroarrays* byla v našich experimentech nižší ve srovnání s hybridizacemi bakteriálních kolonií.

FISH s použitím BAC klonů (BAC-FISH)

Současné studie ukazují, že BAC klony jsou také nadějnými nástroji fyzikálního mapování genomů pomocí FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) umožňující přímou vizualizaci distribuce sekvencí DNA v chromosomech. U rostlin totiž, na rozdíl od živočichů, není FISH se sondami kratšími než 10 kb (jedinečné sekvence) dostatečně spolehlivá. To si vynutilo použití delších sond. Nedávné práce ukázaly použitelnost BAC klonů obsahujících 40 - 100 kb inzerty pro lokalizaci unikátních sekvencí u rostlin pomocí FISH (Lapitan *et al.* 1997). Repetitivní sekvence DNA často přítomné v BAC klonech mohou být suprimovány během hybridizace, což umožní detekci jedinečných sekvencí. Tuto metodu – „BAC-FISH“ – lze použít nejen k lokalizaci genů na chromosomech, ale i k po-

rovnání jejich pořadí na chromosomech u příbuzných druhů (Zweig *et al.* 1998). Protože je pořadí genů na chromosomech často konzervováno (tzv. syntenie či kolinearita), mohou být sondy vytvořené z jednoho druhu použity u druhu jiného. To může urychlit mapování genomů, obzvláště tehdy, pokud jsou použity BAC klony z druhu s malým genomem, např. rýže, k identifikaci homologických oblastí příbuzného druhu s velkým genomem, např. pšenice a ječmen (Keller a Feuillet 2000).

Naše BAC-FISH experimenty ukázaly, že značná část testovaných BAC klonů „malovala“ celé chromosomey, zřejmě v důsledku přítomnosti repetitivních obsažených v těchto BAC klonech a vysoké homogenizace sekvencí DNA v rostlinných genomech ve srovnání s genomem živočichů (Schmidt a Heslop-Harrison 1998). Druhou nejpočetnější skupinu BAC klonů tvořily ty, které hybridizovaly do subtelomerických oblastí všech chromosomech. Zde se nacházejí i tandemové repetice popsané dříve v naší laboratoři (Bůžek *et al.* 1997). Jiné BAC klony naopak hybridizovaly podél celých chromosomech s výjimkou centromerů a konců chromosomech. Několik klonů obsahovalo 45S rDNA a hybridizovalo do míst rDNA klastrů. Podařilo se získat i BAC klony dávající diskrétní FISH signály na pohlavních chromosomech. Zde se nabízí možnost jejich využití jako markerů k identifikaci homologického páru autosomů u hermafroditických druhů rodu *Silene*, které nemají pohlavní chromosomey (ale mají stejný počet chromosomech), a testovat hypotézu vzniku pohlavních chromosomech z páru autosomů. Dva BAC klony hybridizovaly přednostně na chromosomem Y. Jejich analýza vedla k izolaci repetitivních sekvencí akumulovaných na chromosomu Y. Amplifikace sekvencí DNA v nerekombinujících oblastech chromosomu Y zřejmě představuje hlavní mechanismus jeho zvětšování v porovnání s autosomy.

Lokalizace genů pomocí PCR na tříděných chromosomech

K lokalizaci genů na chromosomech lze použít jak genetické tak fyzikální techniky. U genetických metod není lokalizace v případě pohlavních chromosomech jednoznačná, neboť nelze rozlišit mezi jejich lokalizací na autosomech a v pseudoautosomální oblasti pohlavních chromosomech. Fyzikální techniky zahrnují *in situ* hybridizaci a PCR na tříděných nebo mikrodisektovaných chromosomech. *In situ* hybridizace u rostlin však není dostatečně spolehlivá pro mapování krátkých sekvencí DNA, tedy i genů, a mikrodisekce je příliš pracná a vede k získání pouze malého počtu chromosomech. PCR na tříděných chromosomech tak představuje vysoce citlivou a spolehlivou metodu lokalizace genů či jiných sekvencí DNA (Macas *et al.* 1993).

V naší laboratoři využíváme uvedenou techniku k lokalizaci genů na pohlavních chromosomech *Silene latifolia*. Třídění pohlavních chromosomech pomocí průtokové cytometrie u *S. latifolia* je umožněno podstatnými rozdíly ve velikostech pohlavních chromosomech a autosomů, kde pohlavní chromosomey jsou přibližně dvojnásobné oproti autosomům, a chromosom Y je $1,4 \times$ větší než chromosom X. Čistotu tříděných frakcí jsme sledovali tak, že paraleleně s tříděním chromosomech do zkumavek na PCR byly chromosomey tříděny také na podložní skla a prováděna FISH se sondou specifickou pro autosomy, čímž se stanovila míra kontaminace pohlavních chromosomech autosomy. S cílem zvýšit čistotu frakcí jsme prováděli biparametrické třídění, kdy jsme současně sledovali obsah DNA a délku chromosomech a navíc jsme prováděli *resorting*. Takto tříděné chromosomey jsme používali jako templát pro PCR k přímé lokalizaci genů. Po urči-

tých modifikací PCR vedoucích k vyšší citlivosti jsme byli schopni získat specifický PCR produkt již při použití pouhých 5 chromosomů. Zjistili jsme, že geny specificky exprimované v samčích pohlavních orgánech se nacházejí jak na pohlavních chromosomech, tak i na autosomech (Kejnovský *et al.* 2001). Dále jsme prokázali duplikativní přenos homeotického rostlinného genu na chromosom Y u *S. latifolia* (Matsunaga *et al.* 2003).

Literatura

- Bůžek, J., Koutníková, H., Houben, A., Říha, K., Janoušek, B., Šíroky, J., Grant, S., Vyskot, B. 1997. - *Chromosome Res.* **5**: 57.
 Kejnovský, E. 2000. - *Biol. listy* **65**: 181.
 Kejnovský, E., Vrána, J., Matsunaga, S., Souček, P., Šíroky, J., Doležel, J., Vyskot, B. 2001. - *Genetics* **158**: 1269.
 Keller, B., Feuillet, C. 2000. - *Trends Plant Sci.* **5**: 246.
 Lapitan, N., Brown, S.E., Kennard, W., Stephens, J.L., Knudson, D.L. 1997. - *Plant J.* **11**: 149.
 Matsunaga, S., Isono, E., Kejnovský, E., Vyskot, B., Doležel, J., Kawano, S., Charlesworth, D. 2003. - *Mol. Biol. Evol.* **20**: 1062.
 Macas, J., Doležel, J., Lucretti, S., Pich, U., Meister, A., Fuchs, J., Schubert, I. 1993. - *Chromosome Res.* **1**: 107.
 Schmidt, T., Heslop-Harrison, J.S. 1998. - *Trends Plant Sci.* **3**: 195.
 Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiri, Y., Simon, M. 1992. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8794.
 Zweick, M.S., Islam-Faridi, M.N., Czeschin, D.G., Wing, R.A., Hart, G.E., Stelly D.M., Price H.J. 1998. - *Genetics* **148**: 1983.

Poděkování. Tato práce byla finančně podporována GAČR (521/02/0427).

Fluorometrická metoda pro *in vitro* měření ligandem otevíraných iontových kanálů pro Ca^{2+} v rostlinách

ONDŘEJ KRINKE¹, ZUZANA NOVOTNÁ¹, OLGA VALENTOVÁ¹, JAN MARTINEC²

¹Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6, ²Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6, (tel.: 296 780 416, e-mail: martinec@ueb.cas.cz)

Úvod

Přenos signálů založený na změnách cytosolické koncentrace Ca^{2+} je dobře popsán v živočišných (Bootman *et al.* 2001) i v rostlinných buňkách (Sanders *et al.* 1999). Aktivitou enzymů signálních drah vznikají v buňce molekuly druhých posílů, např. *D-myo*-inositol 1,4,5-trisfosfát (InsP_3), který pak otevírá specifické iontové kanály pro Ca^{2+} a zvyšuje tak koncentraci Ca^{2+} v cytosolu, která dále ovlivňuje enzymy v signální kaskádě.

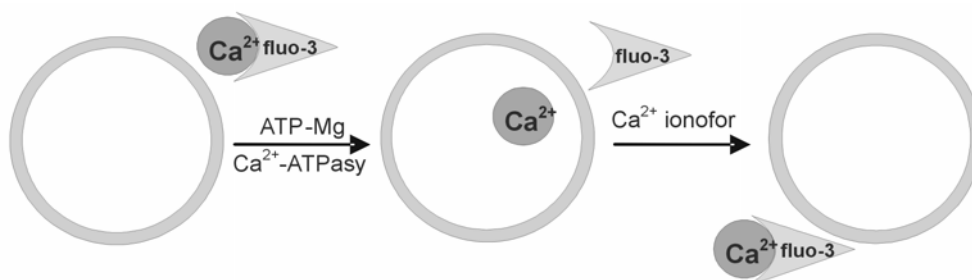
Pro *in vitro* studium iontových kanálů pro Ca^{2+} na rekonstituovaných membránových váčcích existuje několik principiálně odlišných metod. Relativně jednoduchá provedením a nenáročná na vybavení je filtrační radiometrická metoda (Brosnan a Sanders 1990), kde je v odebíraných vzorcích reakční směsi měřen obsah $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uvnitř rekonstituovaných membránových váčků. Velkou nevýhodou tohoto uspořádání je jeho diskontinualita, která

membránových váčků. Velkou nevýhodou tohoto uspořádání je jeho diskontinualita, která neúnosně zvyšuje experimentální chybu. Mezi nejspolehlivější metody patří *patch-clamp* metoda měření vodivosti jednotlivého iontového kanálu (Allen a Sanders 1994) nebo superfuzní komora (Finch *et al.* 1991), která umožňuje převést diskontinuální radio-metrickou metodu s $^{45}\text{Ca}^{2+}$ do semikontinuálního uspořádání. Obě metody vyžadují speciální přístroje a jejich zavedení je tedy finančně náročné.

Poměrně nenáročné a citlivé je měření pomocí fluorescenčních indikátorů pro Ca^{2+} , které je možno snadno provést kontinuálně v kyvetě spektrofotometru.

Experimentální provedení

Princip metody je znázorněn na obr. 1. V přítomnosti ATP-Mg jsou vápenaté ionty nasáty dovnitř rekonstituovaných membránových váčků působením specifických iontových pump (Ca^{2+} -ATPasy) a po dosažení ustáleného stavu mohou být uvolněny přidavkem Ca^{2+} ionoforu nebo přidavkem specifického ligandu, který otevře iontové kanály pro Ca^{2+} . Vně membránových váčků je přítomen fluorescenční indikátor pro Ca^{2+} , který citlivě reaguje na malé změny $[\text{Ca}^{2+}]$ způsobené nasáváním nebo uvolňováním Ca^{2+} .



Obr. 1. Princip fluorometrické metody (vysvětlení v textu).

Vnitřní objem rekonstituovaných membránových váčků tvoří pouze zlomek celkového objemu reakční směsi v kyvetě, a proto Ca^{2+} uvolněné otevřením specifických iontových kanálů zvyšují koncentraci v okolí váčků jen velmi málo. Výhodou proto jsou citlivé fluorescenční indikátory s nízkou K_d ($\sim 10^{-7}$ mol.l $^{-1}$). Další komplikací tohoto uspořádání je nutnost pracovat v poměrně úzkém rozsahu koncentrací volných vápenatých iontů ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$) během celého měření ($10^{-7} - 5 \times 10^{-7}$ mol.l $^{-1}$). Spodní hranice vyplývá z nutnosti zachovat takovou $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$, při které jsou stále dostatečně aktivní Ca^{2+} -ATPasy, které vytváří potřebný koncentrační rozdíl vně a uvnitř váčku. Horní hranice zase plyne z K_d použitého fluorescenčního indikátoru (čím vyšší je měřená koncentrace Ca^{2+} než K_d fluorescenčního indikátoru, tím méně citlivé a přesné je dané měření). Hladinu $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ mohou ovlivnit dva jevy: množství kontaminujících Ca^{2+} v reakční směsi a přítomnost a koncentrace látek chelatujících Ca^{2+} - především samotného fluorescenčního indikátoru, ale také ATP nebo EGTA (kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová).

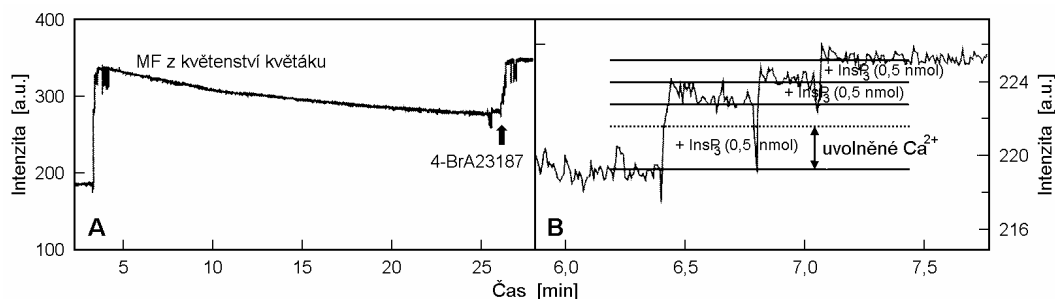
Jako vhodný fluorescenční indikátor pro Ca^{2+} se ukázal fluo-3 (Molecular Probes; Hirota *et al.* 1995; $\lambda_{\text{ex}} = 500$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm), jehož K_d umožňuje použít dostatečnou koncentraci indikátoru, která pak zajišťuje stabilní intensitu fluorescence a dobrý poměr

signálu k šumu. Jeho K_d v daném systému se snadno určí pomocí sady Ca^{2+} -EGTA pufrů připravených v daném reakčním pufru a sestavených např. pomocí volně dostupného programu Sliders (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>).

Celková koncentrace Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}$) v používaných roztocích je většinou příliš velká ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} \sim 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$) a je nutno ji snižovat přečištěním přes specifický ionex. Jako dostatečný pro daný účel se ukázal katex Chelex 100 (BioRad) v 1 ml kolonce. Nejprve je nutno přečistit základní pufr ($0,4 \text{ mol.l}^{-1}$ glycerol, 50 mmol.l^{-1} KCl, 10 mmol.l^{-1} HEPES-KOH pH 7,4). Z tohoto pufru se pak připraví reakční pufr (6 mmol.l^{-1} ATP v základním pufru $2,5 \times$ ředěném deionizovanou vodou, pH upravit na 7,40 pomocí KOH).

Měření probíhá v míchané fluorescenční kyvetě při 25°C a při pH 7,4. Reakční směs obsahuje $2 \times$ ředěný reakční pufr, $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ fluo-3, 3 mmol.l^{-1} MgCl_2 (v případě použití Na_2ATP) a membránové váčky ($60 \mu\text{g}$ (proteinů). ml^{-1}). Přenos Ca^{2+} do membránových váček probíhá do dosažení stacionárního stavu (cca 20 min; obr. 2A). Ligand je nutno přidat v malém objemu $3 \times$ po sobě. 2. a 3. přidavek umožní určit nespecifické zvýšení fluorescence (měly by být stejné či nižší než první a odpovídat množství Ca^{2+} obsažených v zásobním roztoku ligandu), které je pak třeba odečíst od prvního zvýšení (obr. 2B).

Celý systém byl testován na receptoru pro InsP_3 (InsP_3 -R; Krinke 2003). Koncentrace InsP_3 v reakční směsi by v daném případě neměla významně překročit 500 nmol.l^{-1} (100 nmol.l^{-1} pro jeho účinnější funkční analog adenophostin A (APA); Beecroft *et al.* 1999), aby pufování uvolněných Ca^{2+} přítomným ligandem nebylo významné. Zároveň by tato koncentrace měla být dostatečná na to, aby hned prvním přidavkem ligandu byly téměř úplně vyprázdněny membránové váčky citlivé na tento ligand. V případě InsP_3 -R uvedené koncentrace ligandů tuto podmínku splňují.



Obr. 2. Průběh nasávání Ca^{2+} mikrosomální frakcí (MF) z květenství kvěťáku a uvolnění Ca^{2+} přidavkem nefluorescenčního Ca^{2+} ionoforu (A). Efekt přidavku InsP_3 (0,5 nmol) na MF z krysích hepatocytů po ukončení nasávání Ca^{2+} (B).

Celkové uvolnitelné množství Ca^{2+} lze určit přidavkem $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ nefluorescenčního ionoforu 4-Br A23187 (Molecular Probes; $2 \times$ po sobě, 2. přidavek opět pro určení nespecifického zvýšení fluorescence). Na konci každého měření je třeba zjistit, jaká je maximální fluorescence indikátoru v daném vzorku přidavkem $2,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ CaCl_2 . Hodnota maximální fluorescence umožňuje korigovat naměřené hodnoty fluorescence na vnitřní filtrační efekt vzorku (jedná se o suspensi, která sama absorbuje a rozptyluje světlo). Naměřené hodnoty fluorescence je možno použít pro výpočet látkového množství uvolněných Ca^{2+} s pomocí následujících bilančních a rovnovážných vztahů:

$$[Ca^{2+}]_{free} = K_d' (fluo - 3 - Ca) \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F}$$

$$[Mg^{2+}]_{total} = [Mg^{2+}]_{free} + [ATP - Mg] \quad K_d (fluo - 3 - Ca) = \frac{[fluo - 3]_{free} [Ca]_{free}}{[fluo - 3 - Ca]}$$

$$[Ca^{2+}]_{total} = [Ca^{2+}]_{free} + [ATP - Ca] + [fluo - 3 - Ca] \quad K_d (ATP - Mg) = \frac{[ATP]_{free} [Mg]_{free}}{[ATP - Mg]}$$

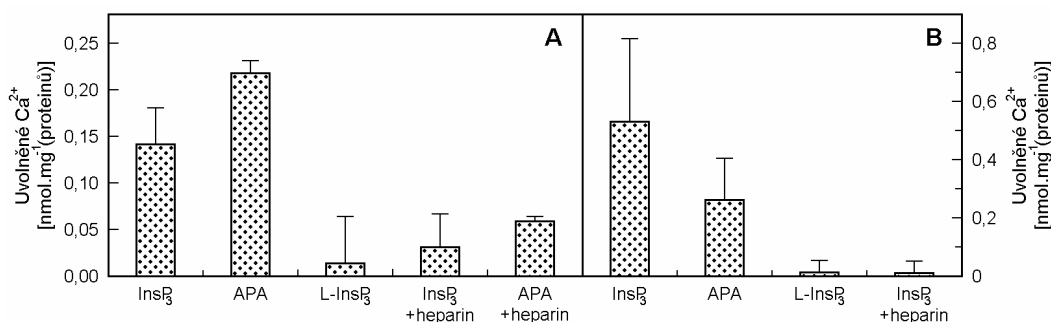
$$[ATP]_{total} = [ATP]_{free} + [ATP - Ca] + [ATP - Mg] \quad K_d (ATP - Ca) = \frac{[ATP]_{free} [Ca]_{free}}{[ATP - Ca]}$$

$$[fluo - 3]_{total} = [fluo - 3]_{free} + [fluo - 3 - Ca]$$

Hodnota fluorescence je nejprve přepočtena na hodnotu $[Ca^{2+}]_{free}$ a ta posléze na $[Ca^{2+}]_{total}$, která teprve odráží skutečné poměry v systému. Rozdíl dvou jejích hodnot před a po přidavku ligandu udává množství Ca^{2+} uvolněných otevřením iontového kanálu.

Použitelnost

Věřitelnost prezentované metody byla ověřena na membránových váčcích MF z krysích hepatocytů, u kterých bylo popsáno uvolňování Ca^{2+} indukované $InsP_3$ (Surroca a Wolff 2000; obr. 3A). Metoda byla dále testována na vybraných rostlinných materiálech, z nichž jako nejvhodnější pro další studie $InsP_3$ -R se ukázalo květenství kvěťáku (Muir a Sanders 1997; obr. 3B).



Obr. 3. Přehled výsledků pro jednotlivé ligandy u MF z krysích hepatocytů (A) a u MF z květenství kvěťáku (B). Ligandy byly přidány v následujících látkových množstvích: $InsP_3$ (0,5 nmol), APA (0,1 nmol), L- $InsP_3$ (0,5 nmol) jako neaktivní strukturní analog $InsP_3$ (Polokoff *et al.* 1988) a nízkomolekulární heparin ($M_r = 3000$) (3 nmol) jako inhibitor vazby $InsP_3$ na $InsP_3$ -R (Bultynck *et al.* 2003). Objem reakční směsi byl 1 ml. Výsledky představují průměr $\pm$ výběrová směrodatná odchylka ze dvou nebo tří paralel. $InsP_3$ - D-*myo*-inositol 1,4,5-trisfosfát, L- $InsP_3$ - L-*myo*-inositol 1,4,5-trisfosfát, APA - adenophostin A.

Praktické postřehy

Pro přípravu reakčního pufru je vhodnější použít dražší MgATP než Na_2ATP , protože se tím sníží počáteční koncentrace Ca^{2+} , čímž se zvýší citlivost metody. Reakční pufr je

vhodné připravit vždy čerstvý, protože ATP v reakčním pufru samovolně hydrolyzuje a tento proces zvyšuje pozadí měření už po 8 hod od přípravy roztoku. Reakční pufr nelze zbavit Ca^{2+} pomocí Chelex 100, protože ATP má v tomto pufru vyšší afinitu k Ca^{2+} než Chelex 100. Na počáteční koncentraci Ca^{2+} má také významný vliv kvalita vody (vhodné je používat dvakrát deionizovanou vodu).

Důležitá pro průběh celého měření je kyveta, která musí být dostatečně účinně míchaná a temperovaná. Vhodná byla 10 mm kyveta s výbrusem pro míchadlo s 1 ml reakční směsí. Kyvetu je nutno před každým měřením důkladně vypláchnout denaturovaným ethanolom pro odstranění zbytků ionoforu, deionizovanou vodou, $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ EGTA pro odstranění zbytků Ca^{2+} z předchozího měření maximální fluorescence a nakonec opět deionizovanou vodou.

Nasávání Ca^{2+} dovnitř membránových váček se v případě použití fluo-3 projevuje poklesem fluorescence, který je zpočátku rychlý a později se zpomaluje. I když není ustáleného stavu dosaženo ani po 20 min, není dobré tuto fázi více prodlužovat, aby se zabránilo případné denaturaci iontového kanálu.

Problémy mohou způsobovat zelené rostlinné materiály, protože fluo-3 fluoreskuje v zelené spektrální oblasti. Množství proteinů v reakční směsi je třeba upravit zvlášť pro každý použitý biologický materiál, vodítkem může být pokles maximální fluorescence, který by neměl přesáhnout 10 % hodnoty maxima pro čirý roztok.

Správnost bilančních výpočtů je možno ověřit přidávkem vnitřního standardu ($1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ CaCl_2) po druhém přidávku ionoforu a podle změřeného zvýšení fluorescence zpětně dopočítat tuto hodnotu.

Literatura

- Allen, G.J., Sanders, D. 1994. - Plant J. **6**: 687.
- Beecroft, M.D., Marchant, J.S., Riley, A.M., van Straten, N.C.R., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., Potter, B.V.L., Taylor, C.W. 1999. - Mol. Pharmacol. **1**: 109.
- Bootman, M.D., Collins, T.J., Peppiatt, C.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Seo, J.T., Berridge, M.J., Ciccolini, F., Lip, P. 2001. - Semin. Cell Dev. Biol. **12**: 3.
- Brosnan, J.M., Sanders, D. 1990. - FEBS Lett. **260**: 70.
- Bultynck, G., Sienaeert, I., Parys, J.B., Callewaert, G., De Smedt, H., Boens, N., Dehaen, W., Missiaen, L. 2003. - Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol. **445**: 629.
- Finch, E.A., Turner, T.J., Goldin, S.M. 1991. - Science **252**: 443.
- Hirota, J., Michikawa, T., Miyawaki, A., Furuichi, T., Okura, I., Mikoshiba, K. 1995. - J. Biol. Chem. **270**: 19 046.
- Krinke, O. 2003. - Diplomová práce. VŠCHT Praha.
- Muir, S.R., Sanders, D. 1997. - Plant Physiol. **114**: 1511.
- Polokoff, M.A., Bencen, G.H., Vacca, J.P., de Solms, S.J., Young, S.D., Huff, J.R. 1988. - J. Biol. Chem. **263**: 11 922.
- Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J.F. 1999. - Plant Cell **11**: 691.
- Surroca, A., Wolff, D. 2000. - J. Membrane Biol. **177**: 243.

Poděkování. Za výbornou technickou spolupráci patří poděkování Olze Štajnrtové. Tato práce byla finančně podporována grantem LN00A081 MŠMT.

Studium interakcí nukleových kyselin s proteiny pomocí piezoelektrického biosensoru.

KATEŘINA KUCHARÍKOVÁ, HANA PIVOŇKOVÁ, MIROSLAV FOJTA

Laboratoř biofyzikální chemie a molekulární onkologie, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 197, e-mail: katka@ibp.cz)

Úvod

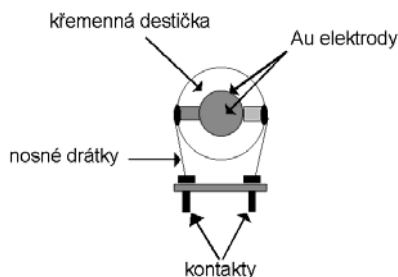
Biosensory jsou analytická zařízení, sloužící ke sledování různých biologických či biochemických dějů. Biologický systém je ve spojení s fyzikálním převodníkem a elektronickým zesilovačem signálu. Jako biologický materiál pro konstrukci biosensoru může sloužit např. enzym, protilátka, antigen, nukleová kyselina, bakterie, celá buňka nebo i část rostliny (Ngeh-Ngwainbi *et al.* 1990).

Podstata metody

Piezoelektrický biosensor je tvořen piezoelektrickým krystalovým výbrusem, na jehož obou stranách jsou kovové elektrody (pro konstrukci biosensorů se používá nejčastěji zlato, někdy také stříbro nebo platina). Jeho schematický náčrtek je uveden na obr. 1. Na povrchu elektrod je imobilizován bioligand selektivně interagující s analytem. Základní charakteristikou piezoelektrického biosensoru je jeho rezonanční frekvence. Změna této veličiny je přímo úměrná změně hmotnosti vrstvy na povrchu krystalu (systém tedy funguje jako velmi citlivé mikrováhy - QCM (*quartz crystal microbalance*), čehož se využívá pro stanovení analytů ve vzorku. Vztah mezi změnou rezonanční frekvence (Δf) a změnou hmotnosti systému (Δm) popsal Sauerbrey (Sauerbrey 1959):

$$\Delta f = -2,3 \cdot 10^6 f_0^2 \frac{\Delta m}{A}$$

kde f_0 je pracovní frekvence krystalu [MHz], A je plocha elektrody [cm²].



Obr. 1. Piezoelektrický krystal

Postup

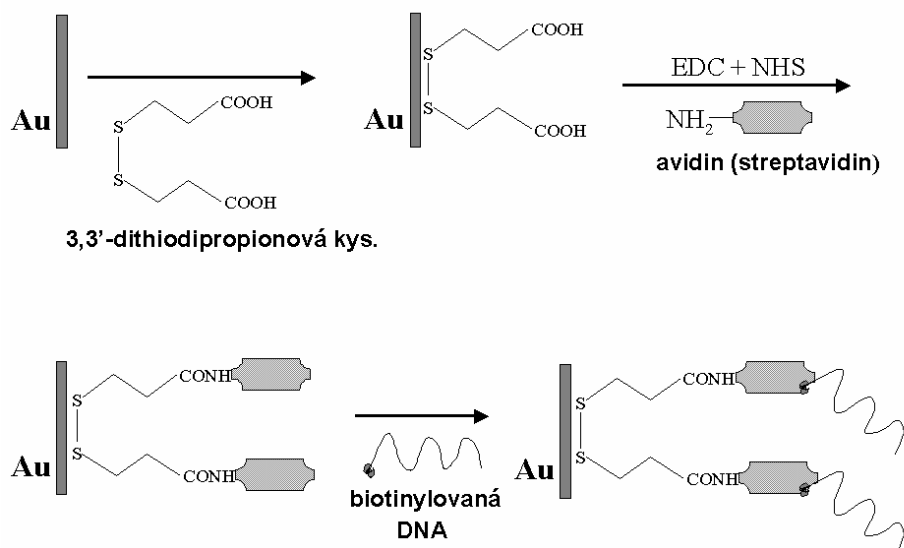
Při sledování bioafinitních interakcí se nejčastěji postupuje tak, že jedna z reagujících látek je imobilizována na povrchu krystalu a druhá je přítomna volně v roztoku, přičemž

se sleduje tvorba afinitního komplexu. Pokud dojde k navázání látky na citlivý povrch, projeví se to snížením frekvence krystalového výbrusu. Experimenty se obvykle provádějí v průtokovém uspořádání, je tedy možné sledovat celý průběh reakce a ze zaznamenaných křivek pak stanovit její rychlostní parametry.

Základem měřicí aparatury je průtoková kyveta, do níž je výbrus vložen. Přítok a odtok kapaliny je řešen pomocí ocelových trubiček vsazených do kyvety a silikonových hadiček, které spojují měřicí kyvetu s peristaltickou pumpou. Při měření je krystal svými kontakty spojen s oscilačním obvodem, tzn. že frekvence oscilace je určována samotným výbrusem (tzv. rezonanční frekvence výbrusu) a jakákoliv změna na jeho povrchu se projeví změnou v oscilaci. Dále je k měření potřebný vhodný detektor frekvence s dobrým rozlišením (min. 0,1 Hz). Vlastní frekvence je zaznamenávána pomocí příslušného softwaru na počítači.

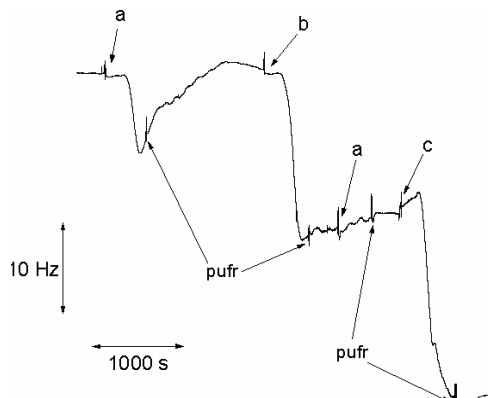
Na počátku měření kyvetou protéká pouze pracovní pufr, přičemž je nutné vyčkat úplného ustálení základní linie. Při průtoku vzorku, kdy dochází k vazbě analytu na povrch sensoru, se zaznamená tzv. asociační fáze křivky. Poté lze do kyvety pustit opět pouze samotný pufr a sledovat případný rozpad komplexu (disociační fáze).

Tento systém lze použít obecně při studiu jakýchkoliv bioafinitních interakcí (protilátka - antigen, avidin - biotin, hormon - receptor, hybridizace nukleových kyselin). V naší laboratoři jsme se rozhodli ho aplikovat jednak na detekci hybridizace (DNA, oligonukleotidy) a jednak na studium vazby nádorového supresoru, proteinu p53, na různé typy DNA. DNA, resp. oligonukleotidu je realizována pomocí silné afinitní reakce mezi streptavidinem a biotinem - streptavidin je imobilizován na povrchu sensoru, biotin je kovalentně navázán na použitý oligonukleotid (komerčně dodávaný). Schéma možného způsobu imobilizace je zobrazeno na obr. 2. Další způsoby imobilizace viz. např. Storri *et al.* 1998 nebo Tombelli *et al.* 2002. Jinou možností je imobilizovat na povrch sensoru nejdříve protein p53 přes protein A a specifickou protilátku (např. DO-1).



Obr. 2. Imobilizace biotinylované DNA na povrch elektrod piezoelektrického krystalu modifikovaný avidinem (streptavidinem); převzato z Caruso *et al.* 1997.

Ilustrační záznam měření s krystalem modifikovaným streptavidinem je uveden na obr. 3. Po ustálení základní linie v pracovním pufru (HEPES, pH 7,5) byl pufr nahrazen roztokem kontrolního oligonukleotidu (bez biotinu), po několika minutách byl pak tento vzorek opět nahrazen pufr. Z obrázku je patrné, že vazba nebyla stabilní, protože došlo pouze k přechodnému snížení frekvence. Naopak, při použití oligonukleotidu značeného biotinem [biotin-(GAA)₁₂], došlo k nevratnému snížení rezonanční frekvence, tedy k navázání biotinu na streptavidin. Dalším krokem byla interakce již navázaného oligonukleotidu s kontrolním oligonukleotidem s obecnou sekvencí. Jak je vidět ze záznamu, k vazbě nedošlo. Při použití oligonukleotidu s komplementární sekvencí [(TTC)₁₂ - A₂₅] však interakce nastala a snížení frekvence oscilace bylo ireversibilní.



Obr. 3. Záznam měření s piezoelektrickým výbrusem modifikovaným streptavidinem. Pracovní pufr: HEPES, pH 7,5; oligonukleotidy: a - kontrolní oligonukleotid s náhodnou sekvencí bez biotinu; b - biotin-(GAA)₁₂, koncentrace 1 µg.ml⁻¹; c - (TTC)₁₂-A₂₅, koncentrace 2 µg.ml⁻¹. Další podrobnosti jsou uvedené v textu.

Zhodnocení metody

Výhodou této metody studia bioafinitních interakcí je možnost sledování reakce v reálném čase bez nutnosti značení. Jiné metody, které se používají pro měření afinitních interakcí, jsou obvykle založeny na smíšení interagujících látek, dosažení rovnovážného stavu, separaci volných a navázaných molekul a kvantifikaci jedné z látek, k čemuž slouží vhodné detekční značky (radioaktivita, fluorescence). U těchto metod je navíc obtížné získat úplná kinetická data, zatímco v případě afinitních biosensorů je možné jednoduché stanovení rychlostních parametrů reakce (asociační, disociační, příp. rovnovážné konstanty) přímo ze zaznamenaných křivek (Skládal 1996). Podobná měření umožňuje ještě optický biosensor, který využívá principu povrchové plasmonové rezonance, nevýhodou tohoto typu sensoru je však jeho cena, která může převyšovat cenu piezoelektrického měřicího systému až o dva řády.

Literatura

- Caruso, F., Rodda E., Furlong D. N. 1997. - *Anal. Chem.* **69**: 2043. Ngeh-Ngwainbi J., Suleiman, A.A., Guilbault G.G. 1990. - *Biosens. Bioelectron.* **5**: 13.

Sauerbrey, G.Z. 1959. - Z. Phys. **155**: 206.

Skládal, P. 1995. - Chem. Listy **89**: 170.

Storri S., Santoni, T., Minnuni M., Mascini M.

1998. - Biosens. Bioelecron. **13**: 347.

Tombelli S., Mascini M., Turner A.P.F. 2002.

- Biosens. Bioelecron. **17**: 929.

Poděkování. Práce byla financována granty GAČR 204/02/0734, IGA MZ NC/7574 – 3 a Z 5004920.

Studium alternativních rostlinných telomer

ZUZANA KUNICKÁ

Laboratoř analýzy biologicky významných molekulových komplexů, Masarykova Univerzita v Brně, Královopolská 135, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 151, kunicka@ibp.cz)

Úvod

Telomery jsou nukleoproteinové struktury na koncích lineárních eukaryotických chromosomů, které mimo jiné chrání chromosomy před účinky nukleas nebo před jejich vzájemnou fúzí při vzniku chromosomálních zlomů. Jsou tvořeny vysoce konzervativními repetitivními sekvencemi, které jsou specifické pro různé typy organismů a zároveň společné pro skupinu organismů (Biessmann a Mason 1994). Typickým zástupcem na poli rostlinném je *Arabidopsis thaliana*, jejíž telomery jsou složeny ze sedminukleotidové repetice (TTTAGGG)_n.

Telomerová DNA je syntetizována pomocí enzymu zvaného telomerasa, který se váže na 3'-jednořetězcový přesah chromosomového konce, k němuž přidává další telomerové repetice. Tímto mechanismem řeší eukaryotické buňky problém replikace konců lineárních chromosomů. Telomerasa je ribonukleoproteinová reverzní transkriptasa, skládající se ze dvou podjednotek - RNA podjednotky, která obsahuje templátovou oblast pro syntézu telomer, a katalytické proteinové podjednotky TERT (*telomerase reverse transcriptase*), přičemž pro její enzymatickou činnost je nutná přítomnost obou podjednotek.

Hlavním rostlinným telomerovým motivem je repetice (TTTAGGG)_n, v poslední době byly v genomech některých rostlin kromě těchto typických telomerických sekvencí popsány i jiné typy (např. lidský, *Tetrahymena*) (Sýkorová *et al.* 2003). Většina těchto poznatků byla dosud získávána pomocí Southernovy hybridizace nebo fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Tyto metody nejsou dostatečně přesné k zodpovězení otázek, jestli jde o důsledek evolučního procesu, zda je v těchto rostlinách přítomna telomerasa, syntetizující odlišné telomerové sekvence, event. zda se u těchto rostlin nevyskytuje více telomeras vedle sebe. Na tyto otázky lze odpovědět pomocí metody TRAP (*telomere repeat amplification protocol*) používané pro stanovení aktivity telomerasy v lidských buňkách (Kim *et al.* 1994). Zatímco v tomto případě jde o takřka „rutinní“ záležitost, stanovení aktivity telomerasy v rostlinách je variabilnější a stále zde „číhají“ mnohá úskalí.

Ačkoli je dnes již jasné, že mnohé rostliny s „netypickými“ telomerami pouze zaměnily *Arabidopsis*-typ telomerické sekvence za lidský typ, stále existují a objevují se i další

rostlinné druhy, u kterých se nevyskytuje rostlinný ani jiný podobný minisatelitní telomerový motiv. První objevenou výjimkou byla *Allium cepa* (Pich *et al.* 1996) a doposud není jisté, čím jsou tvořeny konce jejích chromosomů a jakým způsobem řeší konco vě-replikační problém.

Hlavním úkolem plynoucím z těchto poznatků je zjistit, jestli je v buňkách *Allium cepa* obsažena rostlinná telomerasa nebo jiný typ, který by syntetizoval odlišné telomerové sekvence.

Metoda

Stanovení aktivity telomerasy v rostlinách se provádí pomocí modifikované verze TRAP (Fitzgerald *et al.* 1996), která byla původně vytvořena pro stanovení aktivity telomerasy v lidských buňkách. Telomerasa nemá striktní sekvenční požadavky a je schopná prodlužovat i oligonukleotidy, které nemají zjevnou homologii s telomerovými repetice-mi. Této skutečnosti se využívá právě v pokusech *in vitro*, kde se jako substrát používají syntetické oligonukleotidy.

V první fázi jsou na substrátový netelomerický oligonukleotid telomerasou postupně přisyntetizovávány telomerové repetice a v druhé se pomocí klasické PCR amplifikují produkty přidáním reversního primeru s telomerickou sekvencí. Produkty PCR jsou detegovány pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE), přičemž vzniká charakteristický žebřík produktů lišících se o sedm páru bází, tedy jednu rostlinnou telomerovou repetici.

Přístrojové vybavení

Termocyklér, stolní centrifuga, zařízení pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu, fluorescenční detektor, software pro analýzu dat získaných z detektoru.

Pracovní postup

Příprava telomerasového extraktu (Fitzgerald *et al.* 1996) z dělivých pletiv rostliny (kořínky, kořenové špičky..).

Stanovení koncentrace proteinů (Bradford 1976).

Samotná TRAP se skládá ze dvou kroků: první fáze - extenze, probíhá 45 minut při 26 °C.

Reakční směs obsahuje 46 µl TRAP pufru (Fitzgerald *et al.* 1996), 10 pmol denaturovaného substrátového oligonukleotidu a 5 - 500 ng celkového proteinového extraktu. Po prvním kroku se směs zahřeje 10 minut na 95 °C a po ochlazení na 80 °C se přidá do každé reakce směs obsahující 2 jednotky termostabilní DNA polymerasy (např. *Dynazyme II* DNA polymerase (Finnzymes)) a 10 pmol reversního primeru. Doba této fáze je obvykle úměrná počtu PCR reakcí - asi 5 až 10 minut. Poté jsou amplifikovány produkty reakce v 35 cyklech: 95 °C/30 s, 65 °C/30 s, 72 °C/30 s a na závěr následuje konečná extenze 10 minut při 72 °C.

Separace produktů probíhá pomocí gelové elektroforézy na 12,5 % polyakrylamidovém gelu.

Produkty jsou obarveny Sybr Greenem (Molecular Probes) a následně měřeny na STORM PhosphoFluorImager.

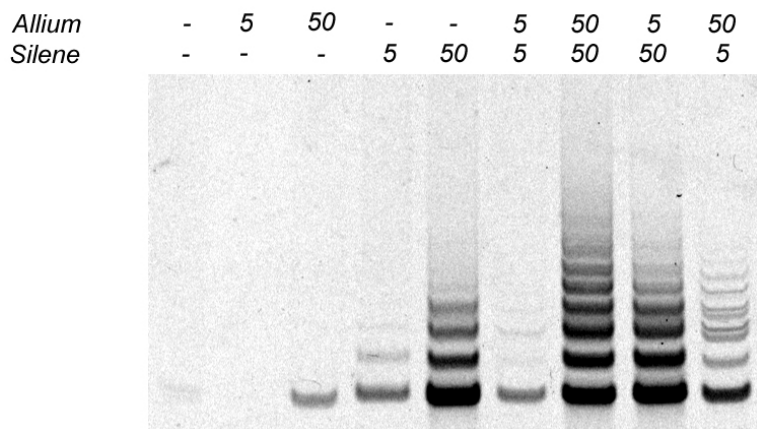
Výsledky TRAP

V první řadě byly provedeny pokusy detegovat rostlinnou telomerasu v *Allium cepa*. V klasickém uspořádání pokusu s rostlinným reversním primerem nebyl získán žádný produkt indikující přítomnost telomerasové aktivity v cibuli. Protože je známa různá preference pro substrátové primery telomerasou různých rostlin (Fitzgerald *et al.* 1996), pokus byl dále modifikován použitím několika různých substrátových primerů. Po získání dalších negativních výsledků bylo nutné zjistit, jestli cibulový extrakt neobsahuje inhibitory telomerasy. V pokusu, kdy se směšoval cibulový proteinový extrakt s telomerasa-pozitivním extraktem ze *Silene latifolia* (viz. obr. 1; čísla udávají koncentraci proteinového extraktu v reakci) bylo prokázáno, že extrakt cibule telomerasu *S. latifolia* neinhibuje, naopak, její aktivita mírně narůstá.

Protože některé rostlinné genomy neobsahují pouze rostlinný telomerový motiv, bylo nutné rozšířit spektrum vyšetřovaných telomerických sekvencí. Použitím sekvenčně specifických reversních primerů pro různé typy telomerických sekvencí (lidský, *Chlamydomonas*, *Tetrahymena*) bylo zjištěno, že v cibulovém extraktu se nenachází telomerasa, která by syntetizovala telomerovou sekvenci žádného z těchto typů. Otázka mechanismu replikace konců chromosomů *Allium cepa* tedy zůstává stále nezodpovězena.

I přes to, že u *Allium cepa* nebyla detegována telomerasová aktivita, díky této „anomálii“ se podařilo vyzkoušet velké množství substrátových a reversních primerů, které mohou být následně využity při výzkumu na dalších rostlinách, především těch, které ve svém genomu obsahují několik variant telomerových sekvencí. Dalším pozitivem je optimalizace rostlinné TRAP a minimalizace chyb.

Časová náročnost metody není vysoká; jedna série stanovení trvá včetně vyhodnocení dva dny.



Obr. 1. Konečný výstup po provedení rostlinné TRAP - typický heptanukleotidový žebříček.

Úskalí metody

Je důležité brát zřetel na nebezpečí kontaminace reakce PCR produkty, které mohou tvořit falešně-pozitivní výsledky. Díky negativní kontrole (samotný extrakční pufr) zařazené do každé PCR řady, můžeme zjistit zda nedochází například k řetězení primerů.

Může docházet i k falešné negativitě v důsledku působení inhibitorů telomerasy nebo degradace proteinů, proto je nutné zařadit kromě negativní kontroly do každé série stanovení i pozitivní kontrolu (proteinový extrakt s telomerasovou aktivitou).

Je nutné používat špičky s filtrem z důvodu možných kontaminací především v kroku přidávání směsi polymerasy a reversního primeru do reakce.

Telomerasový extrakt je velmi citlivý na teplotu, zejména na opakované zmrazování a rozmrazování, po několika použitích aktivita telomerasy v extraktu klesá, proto je vhodné rozdělit zásobní roztok do více alikvotů a z nich potom naředit několik pracovních roztoků o požadované koncentraci proteinů.

Srovnání s alternativními metodami

Telomerasu lze v rostlinách detegovat také přímo (Fajkus *et al.* 1996), tato metoda má ale oproti TRAP více nevýhod, především je pro praktické účely málo citlivá a je nutná velká spotřeba isotopu. Výhodou je ovšem absence artefaktů, které mohou vzniknout při PCR kroku TRAP.

Aktivita telomerasy metodou TRAP byla také původně stanovována radioaktivně, její neradioaktivní modifikace byla poprvé použita BFÚ AV ČR (Ríha *et al.* 1998). Její velkou výhodou je snadná detekce telomerasových produktů a odpadá práce s isotopy.

Literatura

- Biessmann, H., Mason, J.M. 1994. - Chromosoma **103**: 154.
- Fajkus, J., Kovařík, A., Královics, R. 1996. - FEBS Lett. **391**: 307.
- Fitzgerald, M.S., McKnight, T.D., Shippen, D.E. 1996. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 14 422.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L.C., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., Shay, J.W. 1994. - Science **266**: 2911.
- Pich, U., Fuchs, J., Schubert, I. 1996. - Chromosome Res. **4**: 207.
- Ríha, K., Fajkus, J., Siroky, J., Vyskot, B. 1998. - Plant Cell **10**: 1691.
- Sýkorová, E., Lim, K.Y., Kunická, Z., Chase, M.W., Bennett, M.D., Fajkus, J., Leitch, A.R. 2003. - Proc. R. Soc. Lond. B. In press.

Poděkování. Tato práce byla podporována prostředky z Výzkumného záměru MŠMT (MSM143100008) a GA ČR (grant 204/02/0027).

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 allopolyploidy (pšenice, ječmen, kávovník, řepka, sója, cukrová třtina, tabák, bavlna, kosatce, růže, jahodník, ostružiník, švestka, atd). Spojené rodičovské genomy procházejí po vzniku allopolyploidu 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 allotetraploidu 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. Porozumění molekulárním mechanismům, zahrnutým jak v rychlých změnách genomu ihned po vzniku nového hybridu, tak i ve stabilizaci polyploidu 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. aarentsii* 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 restrikční endonukleasy (RE) v dané oblasti genomové DNA, přičemž přítomnost/nepřítomnost restrikčních 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.

Histochemické metody stanovení patologických změn v listech rostlin v průběhu patogenese biotrofních houbových parazitů

KATEŘINA MLÍČKOVÁ^{1,2}, MICHAELA SEDLÁŘOVÁ¹, LENKA LUHOVÁ², PAVEL PEČ² ALEŠ LEBEDA¹

Katedra botaniky¹ a Katedra biochemie² PŘF UP, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc-Holice, (tel.: 585 634 925, e-mail: katrynka@email.cz, sedlarova@prfholnt.upol.cz)

Úvod

Procesy patogenese houbových parazitů rostlin mají řadu společných znaků z hlediska mechanismů pronikání do pletiv, prvních infekčních stádií, ale i obranných reakcí rostlin (Lebeda 1988, Lebeda *et al.* 2001a, Sedlářová a Lebeda 2002). Na druhé straně však existují v těchto procesech i velmi významné rozdíly mezi hlavními trofickými skupinami fytoparazitických hub. Z tohoto pohledu reprezentují biotrofní parazitické houby vysoce specializovanou skupinu, která je charakteristická řadou odlišností (Lebeda a Schwinn 1994, Bélanger *et al.* 2002, Spencer-Phillips *et al.* 2002). Naše práce se v posledních letech zaměřuje na dvě modelové interakce hostitel - biotrofní parazit: *Lycopersicon* spp. - *Oidium neolycopersici* (Lebeda a Mieslerová 2000) a *Lactuca* spp. - *Bremia lactucae* (Lebeda *et al.* 2001b). Histochemické metodické aspekty studia těchto interakcí jsou předmětem této práce.

Oidium neolycopersici L. Kiss, původce padlí rajčat, je biotrofní patogenní houba patřící do řádu Erysiphales (Ascomycota). Její první výskyt na rajčatech byl v Evropě zaznamenán v roce 1986, doprovázený následným epidemickým šířením (Mieslerová a Lebeda 1999). V České republice byl poprvé pozorován v roce 1988 (Lebeda a Rod 1990). Studium hostitelského okruhu ukázalo, že *O. neolycopersici* napadá široké spektrum druhů rostlin nejen z čeledi Solanaceae (Lebeda a Mieslerová 1999), ale i řady dalších čeledí (Whipps *et al.* 1998). Výzkum zdrojů rezistence potvrdil, že všechny odrůdy kulturního rajčete (*Lycopersicon esculentum*) jsou vysoce náchylné, naopak účinné zdroje rezistence existují mezi planými druhy rodu *Lycopersicon* (*L. chmielewski* (LA 2663), středně rezistentní; *L. hirsutum* (LA 2128), vysoce rezistentní) (Mieslerová *et al.* 2000). Kultivace rostlin, patogenu a metodu inokulace popsali Lebeda a Mieslerová (1999).

Druhým modelovým objektem je původce plísně salátové (*Bremia lactucae* Regel, Peronosporales, Oomycota). Tyto houby jsou typické větší vazbou na vodní prostředí (vlhko) a přítomností celulosy v buněčné stěně. Penetrace probíhá přímo a mycelium roste intercelulárně (na rozdíl od padlí, který je ektoparazit a mycelium roste na povrchu rostlinných orgánů a do epidermálních buněk vysílá pouze haustoria). Vztah mezi hostitelem (*Lactuca* spp.) a patogenem (*B. lactucae*) je vysvětlován na základě teorie gen-proti-genu. V současnosti je uváděno více než 40 známých rasově specifických genů, resp. faktorů rezistence (Lebeda a Zinkernagel 2003). V obranných reakcích kulturních, ale i planých *Lactuca* spp. byly kromě rasové specifčnosti popsány nejméně tři další typy rezistence (rasově nespecifická, polní a nehostitelská) (Lebeda *et al.* 2001b). I v rámci

rasově specifické rezistence existují velké rozdíly v jejím projevu (např. hypersenzitivní reakce, reakce subepidermálních buněk, cytoskelet, fenolické látky) (Lebeda a Sedlářová 2003). Kultivace rostlin patogenu a metoda inokulace byly popsány v práci Sedlářová *et al.* (2001).

Během prvních hodin po inokulaci patogenu na listy dochází k syntéze řady nízkomolekulárních antimikrobiálních látek (chinonů, fenolů, alkaloidů) a k expresi proteinů spojených s patogenesí a obrannou reakcí rostlin (Lebeda *et al.* 2001a). Za jeden z významných faktorů v obranných reakcích rostlin je považována přítomnost aktivních forem kyslíku (AOS), které se podílejí na vzniku buněčné smrti (Bestwick *et al.* 1998). Na katabolismu peroxidu vodíku se podílí katalasa (EC 1.11.1.6) a peroxidasa (1.11.1.7), tvořící součást systému stresových reakcí spojených s patogenesí (Siegel 1993, Lebeda *et al.* 2001a). Detekce některých těchto metabolitů (O_2^- , H_2O_2 , POX, lignin) a procesů (buněčná smrt, hypersenzitivní reakce) v rostlinách v průběhu patogenese a obranných reakcích je předmětem tohoto článku.

Podstata metod

Tvorba superoxidového anionu (O_2^-) *in situ* byla detegována pomocí chloridu 2,2'-di-p-nitrofenyl-5,5'-difenyl-3,3'-[3,3'-dimethoxy-4,4'-difenylen]-ditetrazolia (NBT) tvořícího v přítomnosti O_2^- tmavě modrou nerozpustnou sraženinu formazanového komplexu (May *et al.* 1996). *In situ* tvorba peroxidu vodíku (H_2O_2) byla stanovena 3,3'-diaminobenzidín-4HCl (DAB), který reaguje za vzniku tmavě hnědé sraženiny (Thor dal-Christensen *et al.* 1997). Peroxidasa (POX) byla detegována 200 mM Tris-HCl pH 6,0 obsahujícím 1 mM DAB a 10 mM H_2O_2 (Dolores Alcázar *et al.* 1995). Chemikálie byly do listů infiltrovány pod vakuem po dobu 3 h (rajče), respektive 5 h (salát). Reakce byla zastavena varem v ethanolu, který zároveň sloužil k extrakci chlorofylu.

Buněčná smrt (hypersenzitivní reakce) byla lokalizována po odbarvení listu ve směsi ethanol/ledová kyselina octová (3/1) a po inkubaci 24 h v laktoglycerolu pomocí UV excitační fluorescence jako žlutě zbarvené fluoreskující nekrotizované buňky (modifikovaná metoda podle Koga *et al.* 1988).

Pro stanovení ligninu byly listy odříznuty od rostliny a přes noc inkubovány v 70 % ethanolu obsahujícím 1 % (w/v) fluoroglucinol. Po omytí destilovanou vodou listy ponořeny do koncentrované HCl. Lignin se barví oranžově-červeně (Milosevic a Slusarenko 1996).

Pomůcky a chemikálie

0,1 % DAB (3,3'-diaminobenzidín-4HCl) ve vodě; 0,5 % NBT (chlorid 2,2'-di-p-nitrofenyl-5,5'-difenyl-3,3'-[3,3'-dimethoxy-4,4'-difenylen]-ditetrazolia) v 10 mM K-fosfátovém pufru pH 7,8; 200 mM Tris-HCl pH 6,0; ledová kyselina octová; 96 % ethanol; 1 % fluoroglucinol v 70 % ethanolu; laktoglycerol; peroxid vodíku; askorbát; kyselina chlorovodíková; glycerol; 0,5 % Evans blue (tetrasodná sůl 6,6'-[(3,3'-dimethyl[1,1'-bifenylyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[4-amino-5-hydroxy-1,3-naftalendisulfonové kyseliny]).

Eksikátor, vodní lázeň, laboratorní sklo, mikroskop s fluorescenčním nástavcem a kamerou, PC.

Obecný postup

Intaktní tj. neinokulované listy (kontrolní) a listy inokulované padlím resp. plísní, jsou odříznuty od rostliny pod vodou a bezprostředně přeneseny do Petriho misky obsahující nasávaný roztok (NBT, DAB). Listy mohou být šetrně připevněny isolepou ke dnu. Roztok je nasáván do žilek po dobu 3 h (5 h) pod vakuem vytvořeným pomocí eksikátoru. Reakce je ukončena ponořením listu do vroucího ethanolu na cca 10 minut, který zároveň listy odbarví. Pro rehydrataci jsou pletiva ponechána delší dobu v 50 % glycerolu. Při lokalizaci peroxidu vodíku je jako kontrolní roztok použit 0,1 % DAB obsahující 10 mM askorbát, se kterým reakce neprobíhá. Pro lokalizaci buněčné smrti a ligninu jsou listy odbarveny inkubací ve směsi ethanol/ledová kyselina octová (3/1) po dobu 24 h. Pro stanovení hypersenzitivní reakce jsou listy inkubovány dále 4 h ve vodě a poté 24 h v laktoglycerolu (kyselina mléčná/glycerol/voda; 1/1/1). Ke zvýraznění struktur patogenu byla těsně před mikroskopováním přikápnuta pod krycí sklíčko 0,5 % Evans blue. Pro lokalizaci ligninu byly odbarvené listy inkubovány 12 h v roztoku 1 % fluoroglucinolu v 70 % ethanolu, poté propláchnuty destilovanou vodou a ponořeny na 5 min. do koncentrované HCl.

Vyhodnocení výsledků

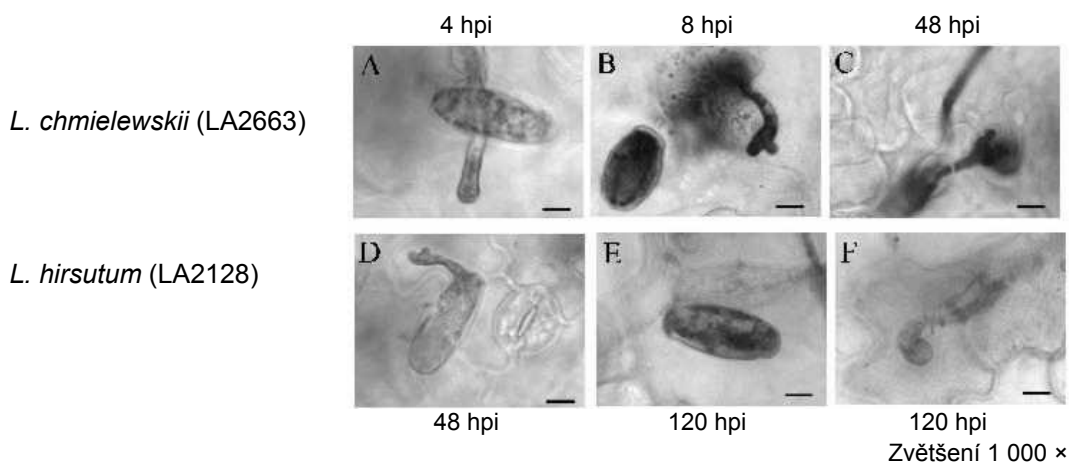
Intenzivní signál potvrzující přítomnost aktivních forem kyslíku (AOS) byl detegován během prvních hodin po inokulaci *O. neolycopersici* na listy (Tab. 1). Superoxidový anion byl prokázán hlavně ve vysoce citlivém genotypu *Lycopersicon esculentum* cv. Amateur, maximální signál 12 hpi (hodin po inokulaci). Peroxid vodíku byl naopak přítomen v listech rezistentních genotypů. Ke vzrůstu peroxidasové aktivity došlo ve dvou fázích, v prvních 4 - 12 hpi byla aktivita dokázána histochemickými metodami, 72 - 168 hpi také biochemickými (spektrofotometrické stanovení aktivity enzymů v listových extraktech) (Angelini *et al.* 1990). Prudký nárůst enzymové aktivity v rezistentních genotypech koresponduje s první expresí hypersenzitivní reakce. Peroxidasová aktivita byla také prokázána uvnitř struktur patogenu (v apikální části prvního klíčícího vlákna a uvnitř neklíčících konidií). K prvním projevům buněčné smrti dochází u *L. chmielewski* a *L. hirsutum* 48 hpi (10 - 15 % buněk), 72 hpi tvoří již mrtvé buňky 44 - 50 %. U vysoce citlivého *L. esculentum* cv. Amateur nebyla hypersenzitivní reakce pozorována. Rovněž se zde projevila velmi nízká produkce peroxidu vodíku odpovídající nízké aktivitě peroxidasy v obou časových intervalech. Tyto metabolické projevy dobře korespondují s náchylností tohoto genotypu. Význam peroxidasové aktivity uvnitř struktur patogenu může být považován za faktor hrající roli v penetraci, ale na druhou stranu může být v neklíčících konidiích spojen se smrtí patogenu. Během prvních 120 hpi nedošlo ke změnám v lignifikaci u žádného ze studovaných genotypů (Lebeda *et al.* 2002).

V žádném ze studovaných genotypů *L. sativa*, *L. serriola*, *L. saligna* a *L. virosa* nebyla detegována přítomnost superoxidu (Tab. 2). Naopak již krátce po inokulaci (6 hpi) je přítomen peroxid vodíku a POX. Byly zjištěny rozdíly v načasování, rozsahu i intenzitě oxidativních procesů, které z velké části korelovaly s dříve studovanými obrannými procesy (exprese HR, změny cytoskeletu, depozice fenolů) (Lebeda a Sedlářová 2003). U náchylných genotypů (*L. sativa*, Cobham Green a UCDM 2; *L. serriola* LSE/18) a dalších genotypů těchto dvou druhů, nedochází do 24 hpi k výraznějším změnám v hladině H₂O₂ a POX. Následuje lehké zvýšení, ale reakce v porovnání s reakcemi planých druhů *L. sa-*

ligna a *L. virosa* je středně silná. Především u posledně jmenovaného druhu je reakce velmi silná již 6 - 12 hpi (souvisí pravděpodobně se zapojením peroxidu vodíku do signalizace), poté dochází ke snížení a výrazný nárůst byl pozorován 30 hpi (počátek programovaných procesů hypersenzitivní reakce, HR). Do HR je většinou zapojena penetrovaná epidermální buňka, případně několik málo buněk sousedních. V genotypech PIVT 1309 (*L. serriola*), CGN 05147 (*L. saligna*) a NVRS 10.001602 (*L. virosa*) se na expresi HR podílí částečně i mesofyl. U těchto genotypů byla zjištěna korelace subepidermální nekrosy s časným (6 hpi) nárůstem přítomnosti POX.

Tab.1. Semikvantitativní hodnocení signálu na AOS a POX v patosystému *Lycopersicon* spp.-*Oidium neolycopersici*.

Genotyp (kultivar) rajčete	AOS	Hodiny po inokulaci							
		4	8	12	16	20	24	48	120
	O ₂ ⁻								
<i>L. esculentum</i> cv. Amateur		++++	++++	+++++	++	+	-	-	-
<i>L. chmielewskii</i> (LA 2663)		++	++	+++	-	-	-	-	-
<i>L. hirsutum</i> (LA 2128)		+	+	-	-	-	-	-	-
	H ₂ O ₂								
<i>L. esculentum</i> cv. Amateur		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. chmielewskii</i> (LA 2663)		++	+++	++	+	+	-	+	++
<i>L. hirsutum</i> (LA 2128)		++	+++	++++	++	+	-	+	+++
	POX								
<i>L. esculentum</i> cv. Amateur		+	+	+	+	-	-	-	-
<i>L. chmielewskii</i> (LA 2663)		++	+++	++++	+	-	-	+	++
<i>L. hirsutum</i> (LA 2128)		+++	+	+	-	-	-	+	++++

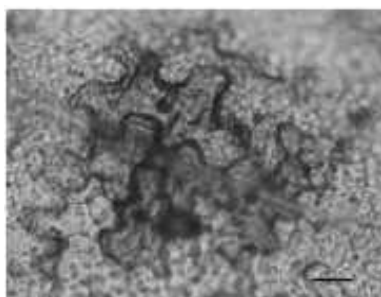


Obr. 1. *Lycopersicon* spp.-*Oidium neolycopersici*: signál potvrzující přítomnost peroxidasy v rostlinném pletivu a uvnitř struktury patogenu. Buněčná smrt u *L. hirsutum* 120 hpi.

Tab. 2. Semikvantitativní hodnocení signálu na AOS a POX v patosystému *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae*

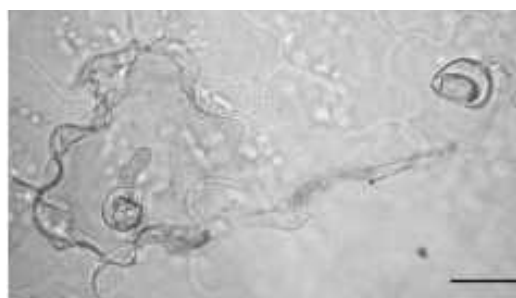
Genotyp (kultivar) lokiky	AOS	Hodiny po inokulaci							
		6	12	18	24	30	36	48	96
O ₂ ⁻									
<i>L. sativa</i> cv. Cobham Green		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. sativa</i> line UCDM 2		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. sativa</i> cv. Mariska		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. serriola</i> (LSE/18)		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. serriola</i> (PIVT 1309)		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. saligna</i> (CGN 05147)		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. saligna</i> (CGN 05271)		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. virosa</i> (NVRS10.001602)		-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ O ₂									
<i>L. sativa</i> cv. Cobham Green		+	-	+	+	-	-	-	+
<i>L. sativa</i> line UCDM 2		+	+	+	+	+	-	-	-
<i>L. sativa</i> cv. Mariska		+	+	+	+	+	+	++	++
<i>L. serriola</i> (LSE/18)		+	+	+	++	+	+	-	+
<i>L. serriola</i> (PIVT 1309)		+	++	++	+++	++	++	+++	++
<i>L. saligna</i> (CGN 05147)		++	+++	+	+	+	+	+	+
<i>L. saligna</i> (CGN 05271)		++	+++	+	+	+	+	+	+
<i>L. virosa</i> (NVRS10.001602)		++++	++++	+++	++	+++++	+++	+	-
POX									
<i>L. sativa</i> cv. Cobham Green		+	+	+	++	+	+	++	++
<i>L. sativa</i> line UCDM 2		+	+	+	++	++	++	+	+
<i>L. sativa</i> cv. Mariska		+	+	+	++	++	+	++	++
<i>L. serriola</i> (LSE/18)		+	+	+	++	+++	+++	+	+
<i>L. serriola</i> (PIVT 1309)		++	+	+	+++	+++	++	+	++
<i>L. saligna</i> (CGN 05147)		++	+	++	++++	+++	+++	+	-
<i>L. saligna</i> (CGN 05271)		+	+	++	+++	+++	++++	++++	-
<i>L. virosa</i> (NVRS10.001602)		++++	++	+++	++	++++	+++	+	-

Z hlediska lokalizace signálu, byla v raných fázích penetrace a vývoje patogenu přítomna POX v cytoplasmě a vázána na plasmatickou membránu hostitelských buněk, ale byla i lokalizována ve sporách patogenu. U H_2O_2 byl signál více difúzní, extracelulárně kolem penetrované buňky, ale i v buňkách sousedních. Tvorba ligninu nebyla studována, ale již dříve byla diskutována nepřítomnost jeho tvorby v interakcích *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae* (Bennet *et al.* 1996, Sedlářová a Lebeda 2001).

*L. virosa* NVRS 10.001 602

30 hpi

peroxid vodíku

*L. sativa* UCDM2

24 hpi

peroxidasa

Zvětšeno 600 ×

Obr. 2. *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae*: příklad lokalizace peroxidu vodíku u *L. virosa* a peroxidasy u *L. sativa*.

Náročnost

Peroxid vodíku, superoxidový radikál, peroxidasa, buněčná smrt a lignin byly prokazovány u *Lycopersicon* spp. ve třech různých genotypích, kontrolních a infikovaných rostlinách, a v desíti časových intervalech. V patosystému *Lactuca* spp. - *Bremia lactucae* bylo studováno 8 genotypů v osmi časových intervalech (nebyl sledován lignin). Metody infiltrace DAB do listů jsou nenáročné, stejně jako detekce buněčné smrti a ligninu. Jediným úskalím je tedy zpracování velkého počtu vzorků.

Úskalí, tipy, triky

Někteří autoři uvádějí metodu injekce roztoku DAB (NBT) do listů, jejíž výhodou je oddělení listu od rostliny až po průběhu reakce. Dochází však k lokální destrukci pletiva v oblasti vpichu, které u jemných pletiv locik může dosáhnout většího rozsahu (i díky nízkému pH roztoku DAB). Abychom se co nejvíce vyhnuli mechanickému poškození, které vyvolává tvorbu AOS, zvolili jsme způsob nasávání roztoků přes cévní svazky. Je výhodné odřezávat listy od stonku pod vodou, neboť do žilek nepronikne vzduch bránící infiltraci roztoků. V případě, že list plave na hladině roztoku, lze ho přilepit proužkem isolepy ke dnu Petriho misky. Pokusných listů se přitom co nejméně dotýkáme. Větší množství vzorků lze v glycerolu uchovávat do doby zpracování v lednici (v +4 °C).

Jestliže dochází k destrukci pletiva při stanovení ligninu ponořením do koncentrovaného HCl, pak lze použít pro fixaci před mikroskopováním glycerol okyselený kyselinou sírovou.

Alternativní metody

Injekce roztoků DAB a NBT do pletiv infikované rostliny (Heath 1998).

Peroxidasy:

Stanovení POX metodou otisku na nitrocelulosovou membránu s využitím 4-chloro-1-naftolu (Ray a Hammerschmidt 1998).

Histochemická lokalizace infiltrací guaiakolu a peroxidu vodíku ve fosfátovém pufru (Angelini *et al.* 1990).

Imunohistochemická detekce - sekundární protilátka značená zlatem (Olmos *et al.* 1997).

Peroxid vodíku:

Histochemické stanovení pomocí škrobu a jodidu draselného za vzniku modrofialového komplexu (Olson a Varner 1993, Řepka 1999).

Cytochemická detekce (TEM) reakcí s CeCl₃ za vzniku tmavé sraženiny perhydroxidu ceru (Bestwick *et al.* 1997).

Superoxid:

Histochemická lokalizace superoxidového radikálu pomocí NBT s využitím chlo-ralhydrátu (Vallélian-Bindschedler *et al.* 1998).

Literatura

- Angelini, R., Manes, F., Federico, R. 1990. - *Planta* **182**: 89.
- Bélanger, R.R., Bushnell, W.R., Dik, A.J., Carver, T.L.W. (eds.) 2002. - *The Powdery Mildews. A Comprehensive Treatise*. APS Press, St. Paul.
- Bennett, M., Gallagher, M., Fagg, J., Bestwick, C., Paul, T., Beale, M., Mansfield, J. 1996. - *Plant J.* **9**: 851.
- Bestwick, C.S., Brown, I.R., Bennett, M.H.R., Mansfield, J.W. 1997. - *Plant Cell* **9**: 209.
- Bestwick, C.S., Brown, I.R., Mansfield, J.W. 1998. - *Plant Physiol.* **118**: 1067.
- Dolores Alcázar, M., Egea, C., Espín, A., Candela, M.E. 1995. - *Physiol. Plant.* **94**: 737.
- Heath, M.C. 1998. - *New Phytol.* **138**: 251.
- Koga, H., Zeyen, R.J., Bushnell, W.R., Ahlstrand, G.G. 1988. - *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **32**: 395.
- Lebeda, A. 1988. - *Biol. Listy* **53**: 178.
- Lebeda, A., Luhová, L., Sedlářová, M., Jančová, D. 2001a. - *J. Plant Dis. Protect.* **108**: 89.
- Lebeda, A., Mieslerová, B. 1999. - *Acta Phytopathol. Entom. Hung.* **34**: 15.
- Lebeda, A., Mieslerová, B. 2000. - *Plant Protect. Sci.* **36**: 156.
- Lebeda, A., Mieslerová, B., Luhová, L., Mlíčková, K. 2002. - *Plant Protect. Sci.* **38** (Special Issue 1): 141.
- Lebeda, A., Pink, D.A.C., Mieslerová, B. 2001b. - *J. Plant Pathol.* **83**: 25.
- Lebeda, A., Rod, J. 1990. - *Zahradnictví* **15**: 313.
- Lebeda, A., Sedlářová, M. 2003. - In: *Eucarpia Leafy Vegetables Conference 2003*. S. 55. CGN, Wageningen.
- Lebeda, A., Schwinn, F.J. 1994. - *J. Plant Dis. Protect.* **101**: 225.
- Lebeda, A., Zinkernagel, V. 2003. - *J. Phytopathol.* **151**: 274.
- May, M.J., Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. 1996. - *Plant Physiol.* **110**: 1367.
- Mieslerová, B., Lebeda, A. 1999. - *J. Plant Dis. Protect.* **106**: 140.
- Mieslerová, B., Lebeda, A., Chetelat, R.T. 2000. - *J. Phytopathol.* **148**: 303.
- Milosevic, N., Slusarenko, A.J. 1996. - *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **49**: 143.
- Olmos, E., Piqueras, A., Martínez-Solano, J.R., Hellín, E. 1997. - *Plant Sci.* **130**: 97.
- Olson, P.D., Varner, J.E. 1993. - *Plant J.* **4**: 887.
- Ray, H., Hammerschmidt, R. 1998. - *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **53**: 81.
- Řepka, V. 1999. - *Biol. Plant.* **42**: 599.
- Sedlářová, M., Lebeda, A. 2001. - *J. Phytopathol.* **149**: 1.
- Sedlářová, M., Lebeda, A. 2002. - *Biol. Listy* **67**: 59.
- Sedlářová, M., Lebeda, A., Pink, D.A.C. 2001. - *J. Plant Dis. Protect.* **108**: 477.
- Siegel, B.Z. 1993. - *Plant Growth Regul.* **12**: 303.

- Spencer-Phillips, P.T.N., Gisi, U., Lebeda, A. (eds.) 2002. - *Advances in Downy Mildew Research*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Thordal Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B. 1997. - *Plant J.* **11**: 1187-1194.
- Vallélian-Bindschedler, L., Schweizer, P., Mössinger, E., Métraux, J.P. 1998. - *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **52**: 185.
- Whipps, J.M., Budge, S.P., Fenlon, J.S. 1998. - *Plant Pathol.* **47**: 36.

Poděkování. Výzkum byl podporován projektem MŠMT „Stresová a patologická biologie, biochemie a bioenergetika rostlin“ (MSM 153100010) a GAČR 522/02/D011.

Porovnání metod izolace RNA pro detekci latentního viroidu chmele (HLVd) pomocí *Dot-blot* molekulární hybridizace a RT-PCR u chmele (*Humulus lupulus*)

JOSEF PATZAK

Chmelařský institut s.r.o., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec, (tel.: 415 732 109, Fax: 415 732 150, e-mail: j.patzak@telecom.cz)

Úvod

Viroidy jsou nezávislou třídou rostlinných patogenů, autonomně se replikujících molekul RNA, bez proteinového pláště. Kružnicová, infekční RNA, vysoce stabilní, se sekundární strukturou podobnou tyčince o velikosti 246 až 401 nt, je plně závislá a adaptovaná na metabolismus hostitelské rostliny. Replikace probíhá mechanismem otáčející se kružnice. RNA polymerasa II syntetizuje (-) polymerní řetězce sloužící jako matrice (+) polymerům, jež jsou štěpeny na monomery a ligovány do kroužků. Syntéza je lokalizována v buněčném jádře a jadérku. U molekul viroidů podskupiny viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (PSTVd) můžeme rozlišit pět strukturních domén, charakteristických pro nativní stav: centrální konzervativní oblast (CCR), oblast patogenity, oblast s vysokou sekvenční variabilitou a dvě koncové domény. Do této podskupiny patří i chmelové viroidy (Diener 1999).

Chmel patří svou rozlohou, 80 tisíc hektarů ve světovém měřítku, k minoritním hospodářským plodinám, přesto náleží k plodinám s dlouholetou pěstitelskou minulostí. Jeho pěstování v České republice má nejméně tisíceletou historii a vždy znamenalo vysoký ekonomický podíl na celkovém hospodářství státu. Na chmelu parazitují dva viroidy: viroid zakrslosti chmele (HSVd), o velikosti 297 nukleotidů, a latentní viroid chmele (HLVd), o velikosti 256 nukleotidů. HSVd se na chmelu vyskytuje pouze v Japonsku a Jižní Korei, avšak jednotlivé kmeny HSVd parazitují celosvětově na dalších hostitelských rostlinách trvalých kultur, jako jsou ovocné stromy a réva vinná. HLVd parazituje pouze na chmelu a vyskytuje se celosvětově téměř na všech pěstitelských plochách.

Přestože je HLVd nazýván „latentním“ viroidem, byla u něj v posledních letech zjištěna hospodářská závažnost, projevující se změnou obsahu sekundárních metabolitů ve chmelové hlávce. Tento fakt vedl k experimentům o jeho eliminaci z rostlin chmele, když nejúčinnější bylo použití kultivace meristémů v podmínkách *in vitro* (Patzak *et al.* 2001). K detekci viroidů v rostlinném pletivu nelze využít imunoenzymových metod, proto jsou využívány molekulární metody na bázi nukleových kyselin: *Dot-blot* molekulární hybridizace (Matoušek *et al.* 1994) a RT-PCR (Matoušek a Patzak 2000). Pro obě tyto metody je nutné izolovat viroidní RNA z rostlinného pletiva chmele. Protože tato pletiva obsahují mnoho polyfenolických látek, polysacharidů a dalších sekundárních metabolitů (hořké kyseliny, silice) v hlávkách, kde je i koncentrace H-Vd nejvyšší, je velice problematické izolovat RNA ve vysoké kvalitě a množství. Pro sériovou diagnostiku je též důležitá časová a finanční náročnost použité metody. Hlavním cílem této práce tak bylo porovnat několik různých metod izolace RNA: 7 popsaných, 6 modifikovaných a 5 komerčních izolačních souprav, vhodných pro *Dot-blot* molekulární hybridizaci a RT-PCR. Získané výsledky mohou být aplikovány i u jiných rostlinných druhů s vysokým obsahem sekundárních metabolitů.

Metody izolace RNA

Výchozím materiálem pro objektivní porovnání RNA izolačních metod byla shodná množství (100 mg) homogenizovaného vzorku hlávek z 9 rostlin chmele světového sortimentu Chmelařského institutu s.r.o. v Žatci.

Pro porovnání bylo vybráno celkem 18 metod izolace RNA: 7 popsaných, 6 modifikovaných a 5 komerčních izolačních souprav. Ověření kvality izolované RNA bylo provedeno pomocí *Dot-blot* molekulární hybridizace a RT-PCR.

1. metoda (A) izolace byla metoda podle Matouška *et al.* (1994). Rostlinný materiál (0,4 g) byl homogenizován v třecí misce, společně s pískem a 0,6 ml AMESS pufru (0,5 M octan sodný pH 6,0, 10 mM MgCl₂, 3 % SDS, 20 % ethanol, 1 M NaCl). K homogenizovanému vzorku bylo přidáno 0,8 ml chloroformu a řádně promíseno. Směs byla poté přenesena do 1,5 ml mikrozkuhavky a centrifugována při 14 000 obr.min⁻¹ po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Pro molekulární hybridizaci bylo odebráno 100 µl supernatantu.

2. metoda (B) izolace byla metoda podle Farkase *et al.* (1999). Zmrazený rostlinný materiál (0,1 g) byl homogenizován v třecí misce, společně s 0,4 ml extrakčního pufru (50 mM Tris, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 % SDS, 0,3 % 2-merkaptoethanol, pH 7,6) a 0,4 ml fenolu. Směs byla poté přenesena do 1,5 ml mikrozkuhavky a centrifugována při 14 000 rpm po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Supernatant byl homogenizován se shodným množstvím směsi fenolu a chloroformu (1 : 1) a po centrifugaci bylo vše opakováno se shodným množstvím chloroformu. Supernatant byl srážen dvojnásobným objemem vychlazeného ethanolu (-20 °C). Sraženina byla po 20 minutách oddělena centrifugací při 14 000 obr.min⁻¹ po dobu 20 minut při 4 °C a rozpuštěna v 50 µl destilované vody zbavené ribonukleas.

3. metoda (C) izolace RNA byla metoda podle Kiefera *et al.* (2000). Rostlinný materiál (0,1 g) byl homogenizován s tekutým dusíkem v třecí misce. Vzorek byl poté přenesen do 2 ml mikrozkuhavky obsahující 1 ml extrakčního pufru (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 M NaCl, 25 mM EDTA, 2 % cetylmoniumbromid (CTAB), 2 % polyvinylpyrrolidon (PVP), 0,5 % spermidin, 2 % 2-merkaptoethanol) přehřátého na 65 °C. Poté bylo přidáno 0,5 ml směsi chloroform-isoamylalkohol (24 : 1) a 200 µl *Nucleon PhytoPure DNA extraction resin* (Amersham Life Science, UK). Vzorek byl homogenizován vortexováním 10 min při pokojové teplotě a poté centrifugován při 13 000 obr.min⁻¹ po dobu 5 minut při 4 °C. Supernatant byl v nové mikrozkuhavce homogenizován ve 250 µl směsi chloroform-isoamylalkohol (24 : 1). Po další centrifugaci při 13 000 rpm po dobu 2 minut při 4 °C byl supernatant sražen s dvěma objemy chladného (4 °C) isopropanolu a sraženina RNA byla po 5 minutách na ledu opět oddělena centrifugací (13 000 obr.min⁻¹ po dobu 5 minut při 4 °C) a rozpuštěna v 50 µl destilované vody zbavené ribonukleas.

4. metoda (D) izolace RNA byla metoda podle Salzmana *et al.* (1999). Rostlinný materiál (0,1 g) byl homogenizován s tekutým dusíkem v třecí misce. Vzorek byl poté přenesen do 1,5 ml mikrozkuhavky obsahující 0,5 ml extrakčního pufru (4 M guanidiumthiokyanát, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM citronan sodný, 0,5 % N-laurylsarkosin, 1 % PVP, 2 % 2-merkaptoethanol). Poté bylo přidáno 0,5 ml směsi chloroform-isoamylalkohol (24 : 1), vzorek byl homogenizován vortexováním 10 min při pokojové teplotě a pak centrifugován (14 000 obr.min⁻¹ po dobu 10 minut při 4 °C). Supernatant byl sražen s dvojnásobným objemem ethanolu a 5 M NaCl (v poměru 9 : 1) a po 3 hod při -20 °C opět centrifugován. Sraženina byla rozpuštěna v 0,5 ml destilované vody zbavené ribonukleas. Poté bylo přidáno 0,5 ml směsi fenol (TE saturovaný, pH 8,0) chloroform-isoamylalkohol (25 : 24 : 1), vzorek byl homogenizován vortexováním 5 min při pokojové teplotě a centrifugována (14 000 obr.min⁻¹ po dobu 10 minut při pokojové teplotě). Supernatant byl znovu přesrážen za shora uvedených podmínek a sraženina rozpuštěna v 50 µl destilované vody zbavené ribonukleas.

5. metoda (E) izolace RNA byla metoda podle Lala *et al.* (2001). Rostlinný materiál (0,1 g) byl homogenizován s tekutým dusíkem v třecí misce. Vzorek byl ve 2 ml mikrozkuhavce s 1 ml extrakčního pufru (8 M guanidiumhydrochlorid, 20 mM EDTA, 20 mM morpholinethansulphonová kyselina (MES), 2 % 2-merkaptoethanol, pH 7,0) deproteinován 1 ml směsi fenol-chloroform-isoamylalkohol (25 : 24 : 1), a poté centrifugován při 10 000 obr.min⁻¹ po dobu 20 minut při 7 °C. Supernatant byl homogenizován se shodným množstvím směsi chloroform-isoamylalkohol (24 : 1) a po centrifugaci (10 minut) byl přesrážen s 0,2 objemy 1 M kyseliny octové a 0,7 objemy isopropanolu. Po 3 hod při 20 °C a centrifugaci (10 000 rpm po dobu 10 minut při 4 °C) byla sraženina dvakrát promyta 3 M octanem sodným a následně 70 % ethanolem. Vysušená sraženina byla rozpuštěna v 50 µl destilované vody zbavené ribonukleas.

6. metoda (F) izolace RNA byla metoda podle Chomczynskiho a Sacchiho (1987). Rostlinný materiál (0,1 g) byl homogenizován s tekutým dusíkem v třecí misce. Vzorek byl poté přenesen do 1,5 ml mikrozkuhavky obsahující 0,5 ml extrakčního pufru (4 M guanidiumthiokyanát, 25 mM citronan sodný pH 7,0, 0,5 % N-laurylsarkosin, 0,1 M 2-merkaptoethanol). Poté bylo přidáno 0,1 ml 2 M octanu sodného a 0,9 ml směsi fe

nol-chloroform-isoamylalkohol (25 : 24 : 1), vzorek byl homogenizován vortexováním a ponechán 15 min na ledu. Po centrifugaci ($12\,000\text{ obr.min}^{-1}$ po dobu 10 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) byl supernatant přesrážen se shodným objemem vychlazeného isopropanolu ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) a získaná sraženina 20 minut centrifugována, vysušena a rozpuštěna v $50\text{ }\mu\text{l}$ destilované vody zbavené ribonukleas.

7. metoda (G) izolace RNA byla metoda podle Malnoy *et al.* (2001). Rostlinný materiál ($0,1\text{ g}$) byl homogenizován s tekutým dusíkem a s 25 mg polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) v třecí misce. Vzorek byl poté přenesen do 2 ml mikrozkušavky obsahující $0,5\text{ ml}$ extrakčního pufru ($0,225\text{ M}$ Tris-borate, 5 mM EDTA, 4% dodecylsulfát sodný (SDS), $0,02\%$ 2-merkapt ethanol), bylo k němu přidáno $0,7\text{ ml}$ fenolu nasyceného TBE a po homogenizaci vortexováním byl ponechán 30 s při $75\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po té bylo ke vzorku přidáno $0,7\text{ ml}$ směsi chloroform-isoamylalkohol ($24 : 1$), ten ponechán 30 s na ledu a centrifugován při $14\,000\text{ obr.min}^{-1}$ po dobu 40 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl deproteinován se shodným množstvím směsi chloroform-isoamylalkohol ($24 : 1$) a po další centrifugaci (10 minut) přesrážen s $0,625$ objemy 8 M LiCl (2 hod na ledu). Centrifugovaná sraženina (30 minut) byla promyta 3 M LiCl a 70% ethanol a rozpuštěna v $100\text{ }\mu\text{l}$ NET pufru ($0,1\text{ M}$ NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, $\text{pH } 8,0$). K rozpuštěnému vzorku bylo přidáno $40\text{ }\mu\text{l}$ 2-butoxyethanolu a byl ponechán 20 minut na ledu. Supernatant byl precipitován s $0,625$ objemy 8 M LiCl přes noc při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Získaná sraženina (centrifugace 15 minut) byla promyta 3 M LiCl a následně 70% ethanol a po vysušení rozpuštěna v $50\text{ }\mu\text{l}$ destilované vody zbavené ribonukleas.

Při modifikacích bylo cílem zkrácení, zlevnění či zlepšení použité metody. První modifikovanou metodou byla metoda H, která vycházela z metody A. Místo extrakčního pufru však byla použita pouze voda s $0,1\%$ PEG 20000. Další metodou, modifikující metodu A, byla metoda I, kde opět do extrakčního pufru bylo přidáno $0,1\%$ PEG 20000. Modifikace metod B, C, D a CH spočívaly v homogenizaci rostlinného materiálu bez použití tekutého dusíku v extrakčním pufru s pískem. U těchto metod byly eliminovány i časově náročné precipitační kroky a RNA byla použita pro molekulární hybridizaci přímo ze supernatantu.

Z komerčně nabízených izolačních souprav RNA sestav bylo vybráno 5 určených i pro rostlinná pletiva. Tyto soupravy jednak využívaly speciálně připravené extrakční roztoky: *ConcertTM Plant RNA reagent* (Invitrogen, USA) – metoda CH, *Tri ReagentTM* (Sigma-Aldrich, USA) – metoda TS a *TriPureTM Isolation reagent* (Roche, SRN) – metoda TR, nebo RNA vazebné kolonky: *RNeasy[®] plant total RNA kit* (Qiagen, SRN) – metoda Q a *GeneEluteTM mammalian total RNA purification kit* (Sigma-Aldrich, USA) – metoda S. Izolace RNA byla prováděna podle instrukcí výrobce a uvedeného protokolu.

Dot-blot molekulární hybridizace

Pro *Dot-blot* molekulární hybridizaci bylo ke každému vzorku přidáno stejné množství roztoku směsi 37% formaldehyd a $20\times\text{SSC}$ ($0,3\text{ M}$ citronan sodný, 3 M NaCl) v poměru $2 : 3$. Vzorky byly denaturovány při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut, zchlazeny na ledu a nanášeny na membrány v množství odpovídajícím 20 mg čerstvé rostlinné hmoty. Molekulární hybridizace vycházela z metodiky popsané Matouškem *et al.* (1994). Pro porov-

nání byly připraveny radioaktivní, značená [α - 32 P]dCTP (Amersham Life Science, UK), a neradioaktivní, značená pomocí *AlkPhos Direct* (Amersham Life Science, UK), sondy HLVD. Molekulární hybridizace s radioaktivní sondou byly prováděny v izotopové laboratoři ÚMBR AV ČR v Českých Budějovicích.

RT-PCR

RT-PCR vycházela z metodiky popsané Matouškem a Patzakem (2000). Pro reakci byl využit *Qiagen*[®] *OneStep RT-PCR kit* (Qiagen, SRN) a reakční směs byla připravena podle instrukcí výrobce a uvedeného protokolu. Pro detekci HLVD byly použity primery 5'-₂₀₀CCACCGGGTAGTTTCCAAC₁₈₁3' a 5'-₂₀₁ATACAACTCTTGAGCGCCGA₂₂₀3'. RT-PCR probíhala v termocykleru Genius (Techne, UK) s následujícím protokolem: reversní transkripce 30 min 50 °C, denaturace 15 min 95 °C, PCR - 35 cyklů: denaturace 30 s 94 °C, *annealing* (nasednutí primerů) 30 s 54 °C, *elongace* 1 min 72 °C, závěrečná *elongace* 10 min 72 °C.

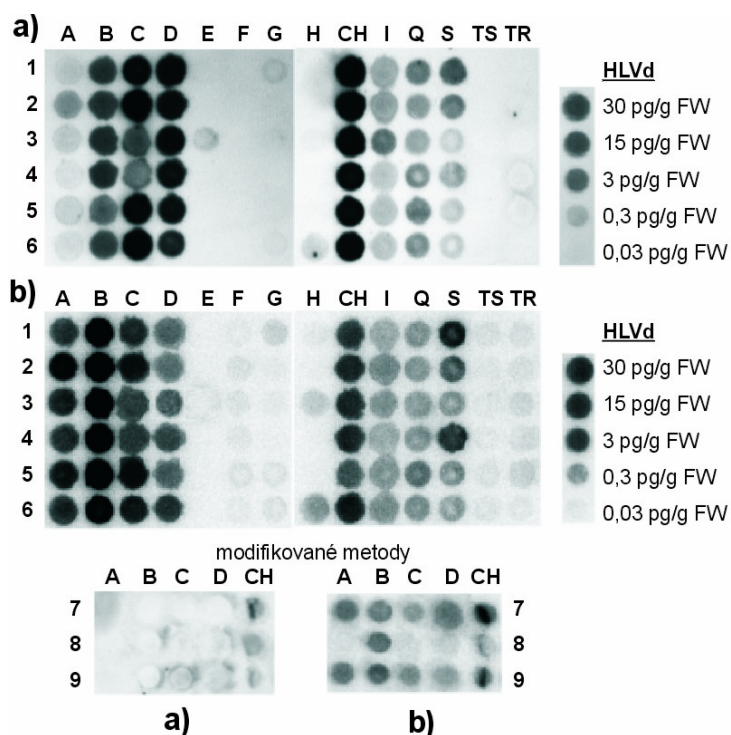
Výsledky

Vyhodnocení experimentálních dat

V našich experimentech jsme se pokusili porovnat několik různých metod izolace RNA vhodných k detekci viroidů v rostlinném pletivu chmele. Detekci viroidů lze provádět pomocí zvolených molekulárních metod: *Dot-blot* molekulární hybridizace a RT-PCR. U *Dot-blot* molekulární hybridizace lze použít jak radioaktivně, tak neradioaktivně značené sondy. Výsledky *Dot-blot* molekulární hybridizace pro jednotlivé metody izolace RNA jsou patrné z obrázku č. 1. Při této analýze se potvrdilo, že námi používaná standardní metoda A je účinnou izolační metodou pro radioaktivní detekci HLVD. U neradioaktivního značení dochází k oslabení hybridizačního signálu vlivem sekundárních metabolitů ve vzorku. Tyto sekundární metabolity se podařilo částečně odstranit využitím PEG 20000 (modifikovaná metoda I), kdy však poklesla intenzita radioaktivních signálů (obr. 1). Shodných výsledků bylo dosaženo pro metody B, C, D a CH, jež byly nejvhodnější izolační metody RNA pro radioaktivní i neradioaktivní *Dot-blot* molekulární hybridizaci. Jejich modifikace, za účelem zkrácení a zlevnění, se výrazně projeví na kvalitě RNA, což značně ovlivnilo hybridizační signály, především s neradioaktivně značenou sondou (obr. 1). Kolonkové izolační metody (Q a S) sice poskytovaly též vhodnou RNA, bohužel při izolaci dochází k výrazným ztrátám RNA na vazebných kolonkách a tím i k oslabení hybridizačního signálu. Ostatní izolační metody (E, F, G, H, TS a TR) neposkytovaly RNA vhodnou pro *Dot-blot* molekulární hybridizaci.

Odlišných výsledků pro jednotlivé metody izolace RNA bylo dosaženo v RT-PCR analýze, jak je patrné z obr. 2. U metod A a I nebyla prováděna RT-PCR, protože se jednalo o metody izolující celkové nukleové kyseliny a nejsou tak vhodné k enzymovým reakcím, shodně jako je tomu u metod B a H (obr. 2). Jelikož RT-PCR není kvantitativní metodou detekce HLVD v rostlinném pletivu, nelze přesně posoudit která z použitých RNA izolačních metod (C, D, G, CH, Q a S) je lepší (obr. 2). Metody E, F, TR a TS neposkytovaly požadující výsledky, a proto není jejich využití pro RT-PCR vhodné (obr. 2). Z našich předchozích experimentů (Matoušek a Patzak, 2000) vyplývá, že kvantita izolované RNA vnesené do RT-PCR neovlivňuje účinnost enzymové reakce, naopak menší

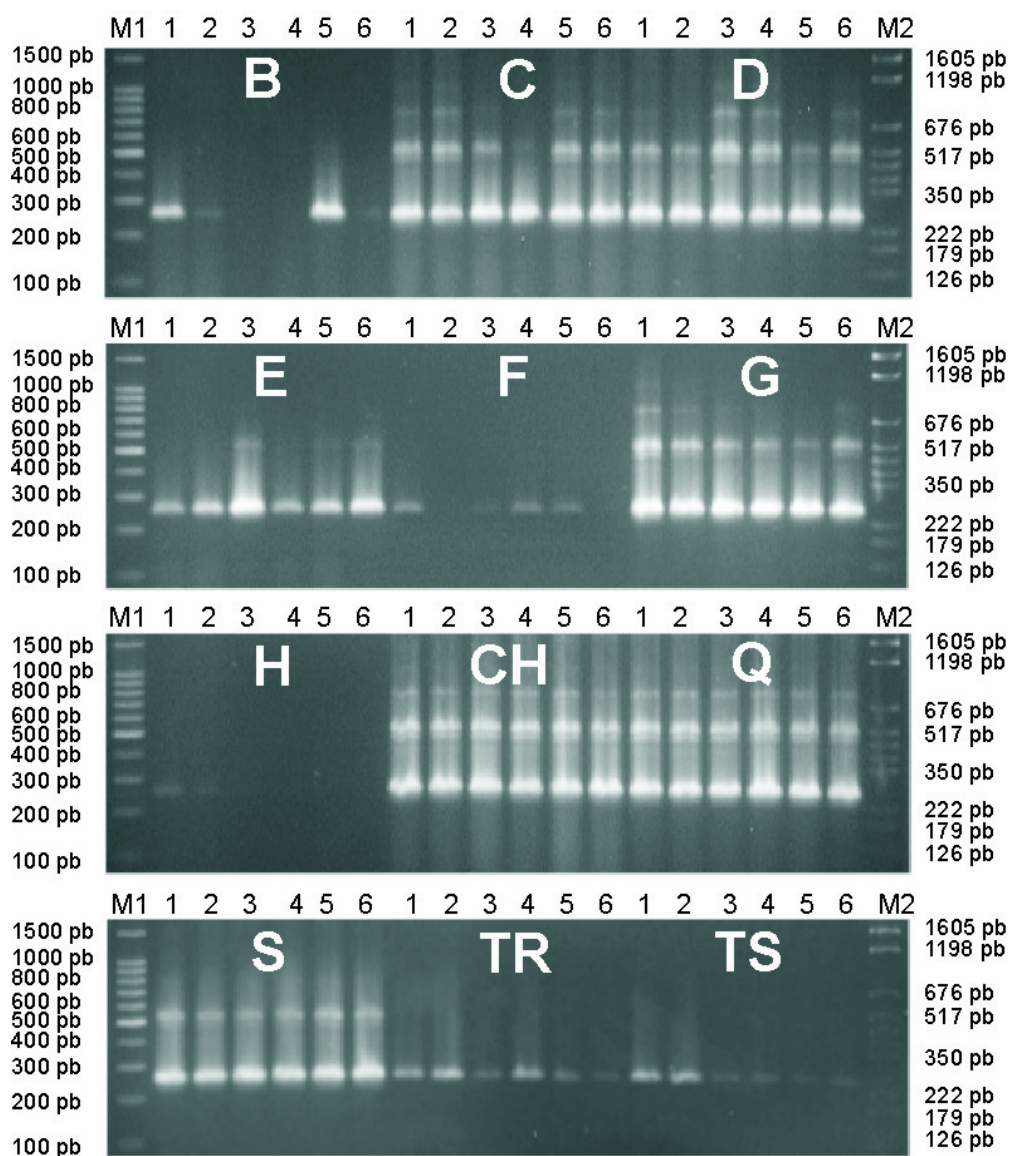
množství RNA poskytuje lepší výsledky u vzorků s vysokým obsahem polysacharidů. Všechny tyto výsledky jsou shrnuty i v tab. 1.



Obr. 1. *Dot-blot* molekulární hybridizace s neradioaktivní a) a radioaktivní b) HLVd sondou vzorků RNA izolovaných různými metodami. Označení vzorků: 1 - Osvaldův klon 72 VF, 2 - Osvaldův klon 31 VF, 3 - Osvaldův klon 72 VF, 4 - Osvaldův klon 72, 5 - Fuggle (UK), 6, 7 - Osvaldův klon 72, 8 - Galena (USA), 9 – Nugget (USA).

Zhodnocení finanční a časové náročnosti

Kvalita izolované RNA a její vhodnost pro *Dot-blot* molekulární hybridizace a RT-PCR je nesporně důležitým faktorem při porovnání různých metod izolace RNA. Neméně důležitým faktorem pro využití jednotlivých metod je jejich časová, finanční a přístrojová náročnost. Co se týče laboratorního vybavení a použitých chemikálií nevy-mykají se všechny použité metody nikterak z požadavků běžně zařízených molekulárních laboratoří (chlazená centrifuga, vodní lázeň, výhřevný blok, mrazicí box, lednice, atd.). Porovnání časové a finanční náročnosti je souhrnně uspořádáno v tabulce č. 1. Nejlevnější a nejméně časově náročná je metoda H, ta však je zcela nepoužitelná pro jakoukoliv další analýzu. Metody A a I patří též k nejlevnějším a nejméně časově náročným (tab. 1). Jejich použití je ovšem omezeno pouze na *Dot-blot* molekulární hybridizace, pro kterou jsou však nejvhodnější řešení. Podobně je na tom i metoda B, která je však výrazněji (5-krát) časově náročnější (tab. 1). Mezi nejméně časově náročné patří i kolonkové izolační kity (Q a S), jejich cena však patří k těm nejvyšším. Izolovaná RNA je sice kvalitní a vhodná pro obě metody, ale dochází na vazebných kolonkách ke značným ztrátám.



Obr. 2. Analýza produktů RT-PCR reakce na 2% agarózovém gelu. Označení vzorků je shodné s obrázkem č.1. M1 - 100 pb Ladder, M2 - pGEM DNA marker (Promega,USA).

Kompromisní metodou, vhodnou pro obě detekční techniky, je metoda CH s dvakrát větší časovou náročností, ale poloviční cenou (tab. 1). Oblíbená, rychlá, nenáročná a standardní izolační RNA metoda F pro většinu živých organismů nebyla vůbec vhodná pro rostlinná pletiva chmele. Naopak velice vhodné izolační metody C a D, byly naopak příliš finančně (C) nebo časově (D) náročné (tab. 1). Ostatní použité metody (E, G, TR a TS) nesplňovaly žádný ze sledovaných parametrů a jejich použití pro izolaci RNA z rostlinných pletiv chmele nedoporučujeme (tab. 1).

Tab. 1. Hodnocení vhodnosti použití, časové a finanční náročnosti jednotlivých použitých izolačních metod

Metoda izolace RNA	Ozna- čení	Vhodnost pro molekulární hybridizaci radioaktivní sonda	neradioaktivní sonda	RT-PCR	Časová náročnost [hod na vzorek]	Finanční náročnost [Kč za vzorek]
Matoušek <i>et al.</i> (1994)	A	ano	omezeně	ne	0,3	3,3
Farkas <i>et al.</i> (1999)	B	ano (omezeně)	ano (ne)*	ne	1,5 (0,7)*	9,5 (5,3)*
Kiefer <i>et al.</i> (2000)	C	ano (ne)*	ano (ne)*	ano	0,75 (0,5)*	99,0 (95,8)*
Salzman <i>et al.</i> (1999)	D	ano (omezeně)*	ano (ne)*	ano	7,5 (0,6)*	25,6 (9,5)*
Lal <i>et al.</i> (2001)	E	ne	ne	ano	4	24,3
Chomczynski a Sacchi (1987)	F	omezeně	ne	ne	0,8	14,2
Malnoy <i>et al.</i> (2001)	G	omezeně	ne	ano	20,3	23
voda + PEG 20000 + CHCl_3	H	ne	ne	ne	0,3	2,3
<i>Invitrogen Concert Plant RNA reagent</i>	CH	ano (ano)*	ano (ano)*	ano	0,75 (0,75)*	79,9 (78,5)*
Matoušek <i>et al.</i> (1994) + PEG 20000	I	ano	ano	ne	0,3	3,3
<i>Qiagen RNeasy Plant Mini kit</i>	Q	ano	ano	ano	0,35	163,5
<i>Sigma Mammalian RNA Kit</i>	S	ano	ano	ano	0,35	103,1
<i>Sigma TriReagent</i>	TS	omezeně	ne	omezeně 1		99
<i>Roche TriPure</i>	TR	omezeně	ne	omezeně 1		77,3

* modifikované metody

Závěr

Z našeho porovnání izolačních metod RNA, vycházejících s odlišných metodických postupů modifikovaných pro rostlinná pletiva, je patrné, že existují výrazné rozdíly mezi jednotlivými použitými izolačními technikami RNA. Nejlepších výsledků bylo dosaženo izolační soupravou *Concert™ Plant RNA reagent* (Invitrogen, USA). Tato metoda (CH) je dobrým kompromisem mezi cenou a časovou náročností. Metody (A a I) izolace nukleových kyselin podle Matouška *et al.* (1994) patřily k nejlevnějším, časově nenáročným a vhodným pro *Dot-blot* molekulární hybridizaci, ne však pro RT-PCR. Metody izolace RNA B, C a D byly též velice účinné, bohužel vždy s určitými nevýhodami: nevhodné pro RT-PCR (B), finanční (C) či časová (D) náročnost. Použití komerčních izolačních souprav u chmele ukázalo, že kolonkové izolační soupravy (Q a S) byly účinnější než použití speciálních roztoků (TR a TS), i když docházelo k výrazným ztrátám na kolonce. Zjištěné výsledky mohou účinně pomoci při izolaci RNA ke specifickým účelům i z jiných rostlinných druhů bohatých na polyfenolické látky, polysacharidy a další sekundární metabolity.

Literatura

- Farkas, E., Palkovics, L., Mikulás, J., Balázs, E. 1999. - Acta Phytopathol. Entomol. Hung. **34**: 7.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. - Anal. Biochem. **162**: 156.
- Kiefer, E. Heller, W., Ernst, D. 2000. - Plant Mol. Biol. Rep. **18**: 33.
- Lal, L., Sahoo, R., Gupta, R.K., Sharma, P., Kumar, S. 2001. - Plant Mol. Biol. Rep. **19**: 181a.
- Malnoy, M. Reynoird, J.P., Mourgues, F., Chevreau, E., Simoneau, P. 2001. - Plant Mol. Biol. Rep. **19**: 69a.
- Matoušek, J., Patzak, J. 2000. - Biol. Plant. **43**: 145.
- Matoušek, J., Trněná, L., Svoboda, P., Růžková, P. 1994. - Rostlinná Výroba **40**: 973.
- Patzak, J., Matoušek, J., Krofta, K., Svoboda, P. 2001. - Biol. Plant. **44**: 579.
- Salzman, R.A., Fujita, T., Zhu-Salzman, K., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. 1999. - Plant Mol. Biol. Rep. **17**: 11.

Poděkování Na závěr bych rád poděkoval Aleně Henychové za její technickou asistenci při zpracování vzorků, laboratoři RNDr. Jaroslavova Matouška, CSc z Ústavu molekulární biologie rostlin AV ČR v Českých Budějovicích za provedení radioaktivních *Dot-blot* molekulárních hybridizací a Národní agentuře pro zemědělský výzkum při MZe ČR za finanční podporu vědeckého projektu QC1183 „Komplexní diagnostika a rozšíření viroidních patogenů chmele, brambor, révy vinné, ovocných a okrasných kultur v ČR“, v rámci jehož řešení byly experimenty provedeny.

Stanovení aktivit rostlinných fosfolipas *in situ* s využitím fluorescenčně značených substrátů

PŘEMYSL PEJCHAR^{1,2}, OLGA VALENTOVÁ¹, JAN MARTINEC²

¹Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6-Dejvice, ²Ústav experimentální botaniky, AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6-Lysolaje, (tel.: 296 780 420, e-mail: pejchar@ueb.cas.cz)

Úvod

Podstatnou část biologických membrán tvoří fosfolipidy, jejichž funkce ve vyšších rostlinách zahrnují mimo jiné zakotvení membránových proteinů, modifikaci mastných kyselin, aktivaci enzymů a zprostředkování signálních kaskád (Chapman 1998).

Přenos signálu přes membránu spočívá obvykle v zachycení signálu receptorem na povrchu membrány. Transmembránová signalizace probíhá ovlivněním propustnosti iontových kanálů nebo pomocí kinasových receptorů a receptorů, jež aktivují efektorové enzymy, které následně produkují intracelulární druhé posly. Ti mohou být odvozeni např. od membránových komponent. Druzí poslové nesou informaci k dalším cílům, například ke kinasám, které aktivují další kaskádu reakcí (Munnik *et al.* 1999).

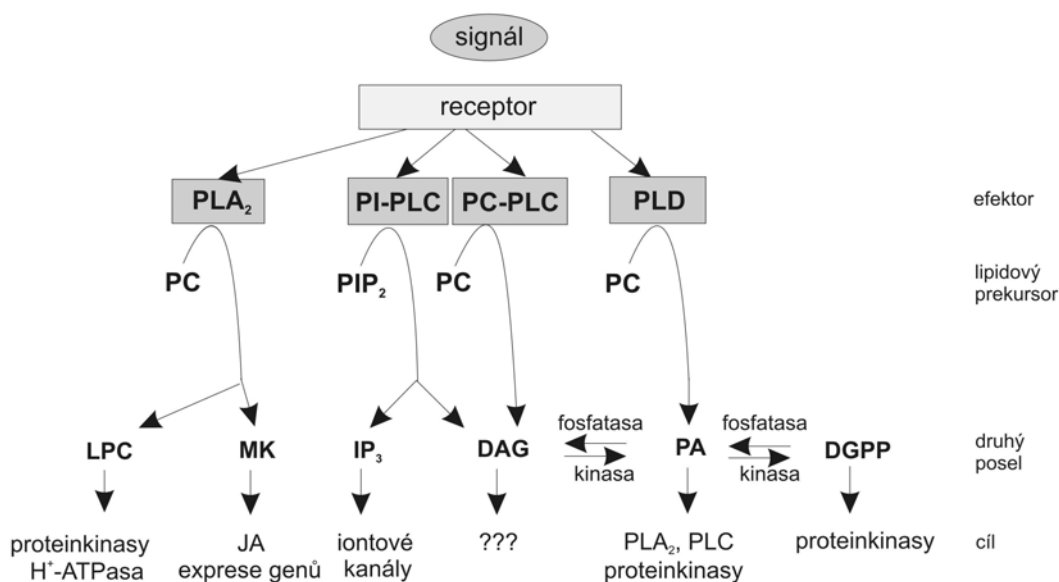
V případě fosfolipidové signální dráhy jsou membránovými komponentami fosfolipidy a efektorovými enzymy fosfolipasy, fosfatasy a kinasy. Tyto enzymy a produkty

jejich reakcí jsou organizovány do složitého systému, schopného specificky reagovat na různé extracelulární podněty. Produkty hydrolysy fosfolipasami se mohou stát reaktanty pro další reakci jako v případě kyseliny fosfatidové (PA), která může být dále přeměněna fosfolipasou A₂ na kyselinu lysofosfatidovou nebo fosfatasou na diacylglycerol (DAG). Zavedením dalšího fosfátu do molekuly PA za katalysy kinasou vzniká v rostlinách nově identifikovaný fosfolipid, diacylglycerolpyrofosfát (DGPP) (Munnik *et al.* 1999). Celkové schéma fosfolipidového signálního systému je uvedeno na obr. 1.

V posledním desetiletí se, vzhledem k vysoké citlivosti a komerčnímu zpřístupnění, rozšířilo používání fluorescenčně značených fosfolipidů pro stanovení aktivit fosfolipas *in vitro* i *in situ*. Detekce fosfolipidů nesoucích fluorescenční značku BODIPY (4,4-difluoro-3a,4a-diasa-s-indacen, firmy Molecular Probes) se objevuje v několika studiích se zaměřením zejména na fosfolipas A₂ (Paul *et al.* 1998, Scherer *et al.* 2000). Žádná z prací se však nevěnuje fosfolipidovému signálnímu systému jako celku. Naším cílem bylo zavedení metody, která by dovolovala sledovat aktivity hlavních fosfolipas pomocí stanovení vznikajících fluorescenčně značených produktů a následně tak usuzovat na možné interakce mezi jednotlivými fosfolipasami, tvořícími komplexní síť fosfolipidového signálního systému.

Podstata metody

Metoda stanovení fosfolipasových aktivit *in situ* je založena na inkorporaci fluorescenčně značeného substrátu BODIPY-fosfatidylcholinu (BPC) (Paul *et al.* 1998) (obr. 2),

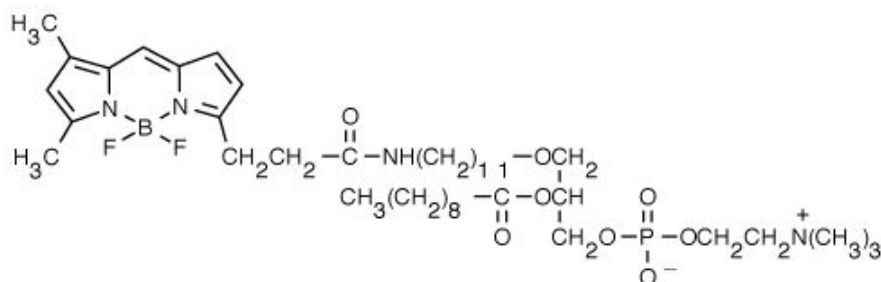


Obr. 1. Fosfolipidový signální systém. DAG - diacylglycerol, DGPP - diacylglycerolpyrofosfát, IP₃ - inositol-1,4,5-trisfosfát, JA - kyselina jasmonová, LPC - lysofosfatidylcholin, MK - mastné kyseliny, PA - kyselina fosfatidová, PC - fosfatidylcholin, PIP₂ - fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, PC-PLC-fosfatidylcholin-specifická fosfolipasa C, PI-PLC - fosfatidylinositol-specifická fosfolipasa C, PLA₂ - fosfolipasa A₂, PLD - fosfolipasa D. (Upraveno podle Munnik *et al.* 1999).

do buněk suspenzních kultur tabáku BY-2 a VBI-0. S výhodou byly použity tři různé typy fluorescenčně značených substrátů, lišících se umístěním fluorescenční značky v molekule; tímto se docílí rozpoznání všech hlavních produktů reakcí katalyzovaných fosfolipasami (tab. 1) (Pejchar 2002).

Většina procesů spojených s přenosem signálů fosfolipidovou signální dráhou probíhá v plasmatické membráně. Nezbytným předpokladem pro využití fluorescenčně značených substrátů ke studiu těchto drah *in situ* je tedy jejich začlenění do membrány.

Po ošetření účinnými látkami jsou produkty reakcí extrahovány do organické fáze a analyzovány tenkovrstevnou chromatografií.



Obr. 2. Struktura eth-BODIPY-fosfatidylcholinu (eth-BPC). Fluorescenční značka v poloze *sn*-1, etherová vazba.

Tab. 1 Produkty vzniklé hydrolýzou jednotlivých fluorescenčních substrátů.

typ substrátu	fosfolipasa	produkty s fluorescenční značkou	neznačené produkty
eth-BPC (fluorescenční značka v poloze <i>sn</i> -1, etherová vazba)	PLA1	neštěpí	neštěpí
	PLA2	lysofosfatidylcholin	mastná kyselina
	PLC	diacylglycerol	fosfocholin
	PLD	kys. fosfatidová	cholin
β -BPC (fluorescenční značka v poloze <i>sn</i> -2, esterová vazba)	PLA1	lysofosfatidylcholin	mastná kyselina
	PLA2	mastná kyselina	lysofosfatidylcholin
	PLC	diacylglycerol	fosfocholin
	PLD	kys. fosfatidová	cholin
bis-BPC (fluorescenční značka v poloze <i>sn</i> -1 i <i>sn</i> -2, esterová vazba)	PLA1	lysofosfatidylcholin, mastná kyselina	x
	PLA2	lysofosfatidylcholin, mastná kyselina	x
	PLC	diacylglycerol	fosfocholin
	PLD	kys. fosfatidová	cholin

Chemikálie, přístroje a rostlinný materiál

Chemikálie:

ethanol (Merck), glycin (Aldrich), chloroform (Merck), inositol (Sigma), hydrolyzát kaseinu (Sigma), kys. 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) (Sigma), kys. α -naftyloctová (NAA) (Sigma), kys. nikotinová (Sigma), MES (Sigma), methanol (Merck), MS (Murashige, Skoog) směs obsahující KNO_3 a NH_4NO_3 (Sigma), pyridoxin (Sigma), SDS (Pharmacia Biotech), sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na_2EDTA) (Sigma), thiamin (Sigma), Triton X-100 (Aldrich), ostatní běžně používané chemikálie čistoty p.a.

Fluorescenční substráty BODIPY-fosfatidylcholin:

eth-BPC (Molecular Probes, D-3771), β -BPC (Molecular Probes, D 3792), bis-BPC (Molecular Probes, B-7701).

Enzymy:

fosfolipasa A_2 z včelího jedu (*Apis mellifera*) (Sigma P-9279), fosfolipasa C z *Bacillus cereus* (Sigma P-6135), fosfolipasa D z kapusty, typ IV (Sigma P-8398).

Rostlinný materiál:

buněčné linie kultury tabáku BY-2 (Nagata *et al.* 1992) a VBI-0 (Opatrný a Opatrná 1976), odvozené z *Nicotiana tabacum* L., cv. Bright Yellow 2, resp. Virginia Bright Italia. Obě linie byly udržovány jako suspenzní kultury pasážováním v týdenním intervalu. Linie BY-2 byla pasážována v poměru 1 : 12,5 (8 ml inokula o hustotě přibližně 2×10^6 buněk. ml^{-1} do 100 ml čerstvého média). Složení média a výsledné koncentrace: základní MS směs (4,492 g. l^{-1}), KH_2PO_4 (0,2 g. l^{-1}), sacharosa (30 g. l^{-1}), myoinositol (50 mg. l^{-1}), thiamin (1 mg. l^{-1}), 2,4-D (0,553 mg. l^{-1}), upraveno na pH 5,8 přidávkem 1M KOH. Linie VBI-0 pak byla pasážována v poměru 1 : 8,3 (hustota inokula přibližně 5×10^4 buněk ml^{-1}) do kapalného média dle Heller (1953), doplněného syntetickými auxiny NAA (1 mg. l^{-1}) a 2,4-D (1 mg. l^{-1}). Růst buněk probíhal v Erlenmayerových baňkách při 27 °C v temnu. Baňky byly umístěny na orbitální třepačce (INR-200, Sanyo-Gallenkamp) při 150 otáčkách za minutu (průměr otáčení 32 mm).

Přístroje:

Digitální kamera Kodak DC120, mikroskop Nikon Eclipse E600, monochromatická integrační kamera COHU 4910, nanášec vzorků pro TLC CAMAG Linomat IV, orbitální inkubátor pro buněčné kultury Sanyo-Gallenkamp, transiluminátor Biometra TI 1, vakuový koncentrátor pro mikrozkuhavky Savant SpeedVac SC100, vymrazovací past Heto CT 60E.

Programové vybavení:

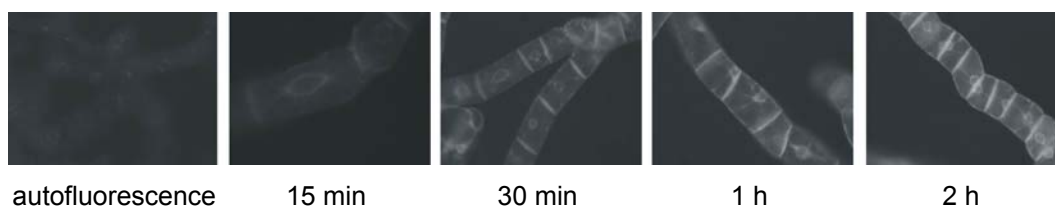
Kodak ds 1D (Kodak), LUCIA GF (Laboratory Imaging).

Pracovní postup

Sledování inkorporace fluorescenčně značeného substrátu

Průběh inkorporace fluorescenčně značeného substrátu byl sledován fluorescenční mikroskopií. K suspenzní kultuře byl přidán BPC (0,66 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ suspenze o hustotě přibližně 1×10^4 buněk. ml^{-1}). V různých časových intervalech byl odebrán 1 ml suspenze. Po filtrování a promytí byly buňky sledovány fluorescenční mikroskopií v oblasti UV-B spektra

(excitace: 450 – 490 nm, emise: 520 nm). Mikroskopické obrázky byly zaznamenány monochromatickou integrační kamerou a uloženy v podobě digitalizovaného snímku (obr. 3).

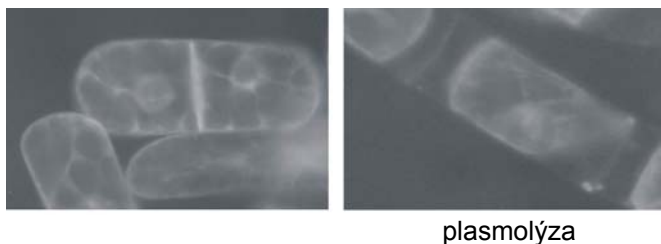


Obr. 3. Průběh inkorporace fluorescenčně značeného substrátu bis-BPC do buněk tabákové linie VBI-0 (2-denní).

Začlenění substrátu probíhalo do buněčných membrán a nikoliv do buněčné stěny, což bylo dokázáno pokusem, kdy byl k buňkám přidán 1 M NaCl, jehož působením došlo k plasmolýze buněk (obr. 4).

Inkubace buněk se substrátem a ošetření účinnými látkami

K suspenzi buněk byl přidán BPC ($0,66 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ suspenze). Suspenze byla inkubována v Erlenmayerově baňce 20 min v temnu za laboratorní teploty na třepačce ($150 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$), aby došlo k inkorporaci substrátu do buněčných membrán. Během inkubace bylo do skleněných zkumavek připraveno $100 \mu\text{l}$ roztoku studovaných látek daných koncentrací (výsledný objem reakce byl 1 ml). Po inkubaci bylo do zkumavek přidáno $900 \mu\text{l}$ suspenze buněk a zkumavky byly umístěny na třepačku v šikmé poloze tak, aby docházelo k účinnému míchání suspenze. Typicky probíhala tato inkubace 90 min při laboratorní teplotě v temnu a při $150 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$.



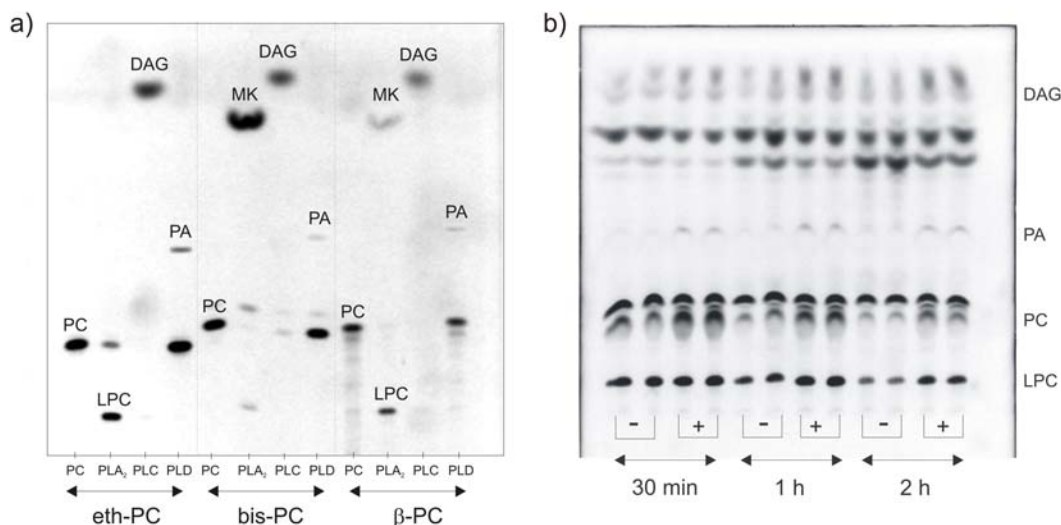
Obr. 4. Plasmolýza buněk tabákové linie VBI-0 (2-denní) po působení NaCl (1 M; 15 min). Substrát eth-BPC.

Extrakce fluorescenčně značených produktů

Inkubace byla zastavena přidáním 4 ml ledového „stop činidla“ (methanol/chloroform/konc. HCl 200 : 100 : 1,5 (obj.)). Vzorby byly promíchány a ponechány 30 min v temnu při laboratorní teplotě. Poté byly přidány 2 ml 0,1 M KCl, vzorky byly opět promíchány a ponechány v temnu při 4°C minimálně 30 min.

Oddělení vodné a organické fáze bylo urychleno centrifugací 15 min při 420 g a 4°C . $950 \mu\text{l}$ spodní organické fáze, obsahující sledované produkty, bylo převedeno do mikrozkušavek, vysušeno vakuovým koncentrátorem a rozpuštěno ve $40 \mu\text{l}$ ethanolu.

Kvantitativní stanovení jednotlivých reakčních produktů byla provedena jejich srovnáním se známými standardy, které byly připraveny štěpením fluorescenčně značených substrátů (BPC) komerčními preparáty jednotlivých fosfolipas (obr. 5).



Obr. 5. Vysokoúčinná tenkovrstevná chromatografie. a) rozdělení produktů štěpení jednotlivých fluorescenčně značených substrátů komerčními preparáty fosfolipas. b) ukázka rozdělení produktů reakcí *in situ*. (+) působení AlCl_3 (0,1 M; 30 min, 1 h, 2 h) na buňky linie BY-2 (2-denní) (-) kontrola. DAG – diacylglycerol, LPC – lysofosfatidylcholin, MK – mastná kyselina, PA – kyselina fosfatidová, PC – fosfatidylcholin.

Příprava standardů

Standard lysofosfatidylcholinu a mastných kyselin

Standards byly připraveny štěpením všech tří typů BPC fosfolipasou A_2 . Výsledné koncentrace v reakční směsi byly: 43,9 mM Mes-NaOH (pH 5,6), 1 % (obj.) Triton X-100, 10 mM CaCl_2 , 3,33 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ BPC, 2,45 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ PLA_2 . Objem reakční směsi byl 1 ml.

Standard diacylglycerolu

Standards byly připraveny štěpením všech tří typů BPC fosfolipasou C. Výsledné koncentrace v reakční směsi byly: 48,9 mM Mes-NaOH (pH 6,0), 0,05 % (obj.) Triton X-100, 5 mM CaCl_2 , 3,33 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ BPC, 0,2 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ PLC. Objem reakční směsi byl 1 ml.

Standard kyseliny fosfatidové

Standards byly připraveny štěpením všech tří typů BPC fosfolipasou D. Výsledné koncentrace v reakční směsi byly: 39,5 mM Mes-NaOH (pH 5,6), 1 % (obj.) Triton X 100, 50 mM CaCl_2 , 8 mM SDS, 3,33 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ BPC, 30 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ PLD. Objem reakční směsi byl 1 ml.

Reakce byla vždy zahájena přidáním enzymu a probíhala 30 min při 30 °C (fosfolipasa D) nebo 37 °C (fosfolipasy A_2 a C). Zastavení reakce a další postup je shodný s postupem popsaným výše. Veškerá spodní fáze byla převedena do mikrozkušavek, vysušena vakuovým koncentrátorem a rozpuštěna v 500 μl ethanolu.

Analýza produktů

Pro vysokoúčinnou tenkovrstevnou chromatografii (HP-TLC) byly použity desky silikagel 60 pro HP-TLC o rozměrech 10 × 10 cm (Merck). Vzorky byly na desku naneseny pomocí nanášecího zařízení Linomat IV 1 cm od spodního okraje desky v objemu 1 - 20 µl podle toho, který produkt měl být kvantifikován. Jako mobilní fáze byla použita směs chloroform/methanol/voda 65 : 25 : 4 (obj.). Deska byla vložena do horizontální vyvíjecí nádoby (CAMAG) a sycena párami mobilní fáze po dobu 10 min. Pak bylo provedeno samotné vyvíjení, dokud čelo mobilní fáze nedosáhlo přibližně 1 cm od horního okraje desky. K dělení látek docházelo po dobu 20 - 25 min v temnu. Jednotlivé fluorescenční produkty byly zviditelněny excitací ultrafialovým světlem transiluminátoru. Obraz desky byl zaznamenán kamerou Kodak a produkty kvantifikovány pomocí programu Kodak *ds 1D*.

Alternativní metody

Vyzkoušen byl i substrát s nitrobenzoxadiazolovou (NBD) fluorescenční značkou. Jak výsledky inkorporace, tak i citlivost metody byly však v tomto případě nižší než u značky BODIPY.

Jako alternativa pro analýzu produktů je vyvíjena metoda s použitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). V současné době probíhá testování různých kolon, složení mobilní fáze a průběhu eluce. Nespornou výhodou HPLC by byla větší možnost automatizace nanášení vzorků ve velkých sériích pomocí automatického dávkovače a také vyšší citlivost, zajištěná fluorescenčním detektorem.

Úskalí metody

Fluorescenční substráty jsou citlivé na světlo. Proto je třeba veškeré úkony provádět v temnu nebo alespoň zabránit přístupu světla např. přikrytím reakční směsi černou látkou.

Fluorescenční značka mění velikost molekuly fosfolipidu, čímž může docházet k ovlivnění interakce substrát - aktivní centrum fosfolipas a tím ke snížení jejich aktivity. Tento jev byl zřejmě příčinou nesnázi při přípravě standardu fosfatidové kyseliny, který se nakonec podařilo připravit, ale jen v omezené míře v porovnání s ostatními standardy. Fosfolipasa D tedy jeví menší ochotu přeměňovat tento typ substrátu. K této skutečnosti je třeba přihlídnout při interpretaci výsledků.

Vzhledem k různému pozadí při zaznamenávání obrazu TLC desky kamerou je porovnání množství jednotlivých fluorescenčních produktů (aktivit jednotlivých fosfolipas) možné pouze v rámci jedné TLC desky (použitím HPLC by byl tento problém odstraněn).

Tipy a triky

Inkubace substrátu může být provedena i v kádince s magnetickým míchadlem jako alternativa k použití Erlenmayerovy baňky. Při práci se suspenzí buněk je třeba používat zastřižené špičky. Výhodné je šikmě položené zkumavky umístěné ve stojanu na třepače vzájemně upevnit např. lepicí páskou tak, aby nedocházelo k otáčení zkumavek během třepání. Tím se zabrání ulpívání buněk na stěnách zkumavek.

Vzhledem k promíchávání suspenze a její tendenci k usazování je třeba nalézt vhodný poměr sklonu zkumavek a rychlosti otáček v závislosti na použité třepačce. Také použití zkumavek s kulatým dnem se ukázalo výhodnější než použití zkumavek se dnem špičatým. Ty jsou ale naopak lepší při pozdějším odebrání spodní organické fáze, obsahující produkty.

Při odebrání spodní organické fáze se s výhodou uplatňuje následující postup: Nejprve se odebere veškeré množství spodní fáze do mikrozukmavky a následně se odebere přesně 950 µl do dalších mikrozukmavky. Přímé odebrání přesného množství spodní fáze je obtížné z důvodu protékání organické fáze.

Pokud není možné provést celý pokus v jednom dni, dá se přerušit po přidání KCl nebo po vysušení vakuovým koncentrátorem (zkumavky se umístí do -20 °C).

Finanční a časová náročnost

Cena jedné desky pro HP-TLC je 160 Kč, přičemž na ni lze nanést až 10 vzorků. Cena fluorescenčního substrátu se pohybuje v rozmezí 3,50 - 35 Kč na vzorek, v závislosti na typu fluorescenčního substrátu. Ostatní investice jsou v rámci běžného laboratorního vybavení.

Celý pokus lze provést během 8 - 9 hodin.

Literatura

- | | |
|--|--|
| Heller, R. 1953. - Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. 14 : 1. | Opatrný, Z., Opatrná, J. 1976. - Biol. Plant. 18 : 381. |
| Chapman, K.D. 1998. - Trends Plant Sci. 3 : 419. | Paul, R.U., Holk, A., Scherer, G.F.E. 1998. - Plant J. 16 : 601. |
| Munnik, T., Irvine, R.F., Musgrave, A. 1999. - Biochim. Biophys. Acta 1439 : 175. | Pejchar, P. 2002. - Diplomová práce. VŠCHT, Praha |
| Nagata, T., Nemoto, Y., Hasezawa, S. 1992. - Int. Rev. Cytol. 132 : 1. | Scherer, G.F.E., Paul, R.U., Holk, A. 2000. - Plant Growth Regul. 32 : 123. |

Sledování interakcí DNA s proteiny pomocí elektroforézy v agarosových gelech s následným *western* přenosem a imunodetekcí

HANA PIVOŇKOVÁ, KATEŘINA NĚMCOVÁ, MIROSLAV FOJTA

Laboratoř biofyzikální chemie a molekulární onkologie, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno; (tel.: 541 517 197, e-mail: hapi@ibp.cz)

Úvod

Interakce bílkovin s DNA hrají klíčové role v regulaci důležitých procesů v buňkách, včetně replikace DNA, transkripce, oprav DNA apod. Mezi významné regulační proteiny interagující specifickým způsobem s DNA patří nádorový supresor protein p53 (El-Deiry 1998, Apella a Anderson 2001). Tento protein, skládající se z 393 aminokyselinových zbytků, se váže na DNA jako tetramer jednak sekvenčně specificky (prostřednictvím své centrální domény), jednak je schopen rozpoznávat určité struktury DNA (C-koncovou

i centrální doménou). Tyto aktivity proteinu p53 jsou regulovány prostřednictvím jeho posttranslačních modifikací (Apella a Anderson 2001, Gohler *et al.* 2002).

Pro sledování interakcí bílkovin s DNA se často používají elektroforetické metody, založené na změně elektroforetické pohyblivosti molekul DNA po jejich vazbě na molekulu proteinu (EMSA - *electrophoretic mobility shift assay*). Obvykle se přitom využívá specificky navržených oligonukleotidů (představujících vazebná místa pro zkoumaný protein), často radioaktivně značených, a elektroforézy v polyakrylamidových gelech. V naší laboratoři byla před několika lety objevena schopnost proteinu p53 vázat se selektivně na nadšroubovicovou DNA (scDNA) (Paleček *et al.* 1997, Brázdová *et al.* 2002). Abychom mohli účinně sledovat interakce proteinu p53 s poměrně velkými molekulami plasmidové scDNA, využíváme horizontální elektroforézu v agarosovém gelu, který má vhodnou velikost pórů. Ukázali jsme, že tato technika je vhodná i pro sledování vazby proteinu p53 na specifické sekvence uvnitř dlouhých lineárních fragmentů DNA (stovky až tisíce párů bází); takovéto molekuly mnohem lépe napodobují situaci v buňkách než krátké oligonukleotidy (obvykle desítky párů bází). Následný *western* přenos a imunodetekce bílkoviny umožňuje spolehlivou identifikaci nukleoproteinových komplexů v gelu.

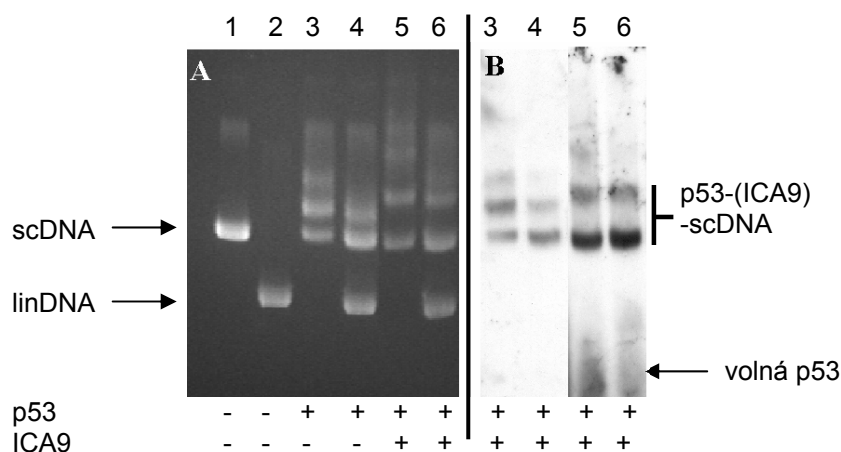
Podstata metody

Podstatou prvního kroku metody je změna elektroforetické pohyblivosti molekul DNA v agarosovém gelu v důsledku tvorby komplexů s bílkovinou (v tomto případě s proteinem p53). Protože nukleoproteinový komplex má vyšší molekulovou hmotnost než samotná DNA, putuje v gelu pomaleji, což se po obarvení DNA ethidiumbromidem projeví vznikem retardovaných proužků (obr. 1, 2). Pokud se může na jednu molekulu DNA navázat více molekul proteinu, objeví se „žebříček“ proužků odpovídajících komplexům o různé stechiometrii p53:DNA (obr. 1). V případě, že se na komplex p53-DNA naváže protilátka rozpoznávající protein p53, ještě více se sníží pohyblivost komplexů (obr. 1, dráhy 5,6). Druhý krok metody je založen na vakuovém přenosu (*blotting*) komplexů z agarosového gelu na nitrocelulóзовou membránu. Molekuly proteinu p53 zakotvené na membráně jsou poté detegovány pomocí protilátek (jako detekční metodu využíváme tzv. zesílenou chemiluminiscenci, kdy sekundární protilátka je značena peroxidasou katalyzující přeměnu substrátu vedoucí k emisi světla, které je zachyceno na fotografickém filmu). Srovnáním polohy proužků DNA (obarvené ethidiumbromidem v gelu) a proužků p53 (zviditelněné imunochemickou metodou) je možno přesně identifikovat komplexy p53-DNA (obr. 1, 2). Přidáním kompetitorové DNA (např. nespecifické lineární DNA) je možno odlišit nespecifickou interakci proteinu s DNA od jeho vazby na specifickou sekvenci (p53CON, obr. 2) či strukturu DNA (scDNA, obr. 1).

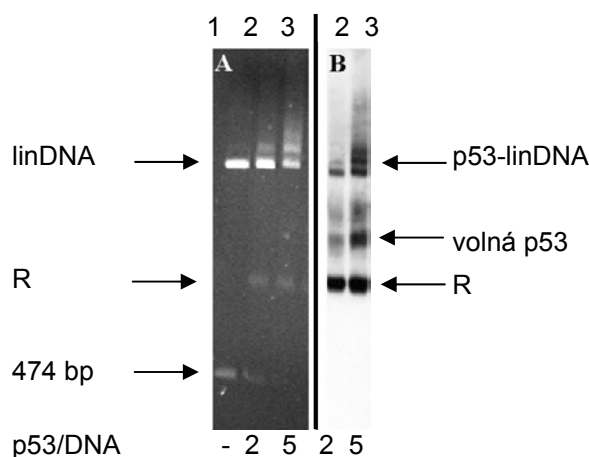
Pracovní postup

Příprava DNA a proteinu p53

Ke studiu interakcí protein-DNA byla využita nadšroubovicová DNA (plasmid pBSK₍₋₎) a fragment DNA z plasmidu pPGM1 o velikosti 474 bp (vyštěpený pomocí restriktasy *Pvu* II, Takara), který obsahuje tzv. specifické vazebné místo pro protein p53 (p53CON) (Paleček *et al.* 1997). Kompetitorová nespecifická lineární DNA byla získána štěpením plasmidu pBSK₍₋₎ restrikční endonukleasou *Sma*I (Takara).



Obr. 1. Vazba proteinu p53 na nadšroubovicovou DNA v přítomnosti kompetitorové lineární DNA a monoklonální protilátky ICA9. (A) Gel barvený ethidiumbromidem a (B) blot gelu: (dráha 1) kontrolní nadšroubovicová DNA (scDNA); (dráha 2) kontrolní lineární DNA; (dráhy 3 - 6) vazba proteinu p53 (*wild type*) na scDNA v přítomnosti kompetitorové lineární DNA (dráhy 4 a 6) a monoklonální protilátky proti p53 ICA9 (dráhy 5 a 6). Poměr p53/DNA byl 5/1. Vzorky byly inkubovány v prostředí 50 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, 0,5 M EDTA, 0,01 % Triton X-100, 2 mM DTT (pH 7,8) při 0 °C po dobu 30 minut. Vzorky s protilátkou ICA9 byly před přidáním DNA inkubovány při 0 °C po dobu 20 minut za stejných podmínek. Pozice proužků proteinu na blotu odpovídá pozici retardovaných proužků v gelu. Více podrobností viz text.



Obr. 2. Vazba proteinu p53 na fragmenty DNA pPGM1 o velikosti 474 bp v přítomnosti kompetitorové lineární DNA. (A) Gel barvený ethidiumbromidem a (B) blot gelu: (dráha 1) kontrolní DNA; (dráha 2) poměr p53/DNA byl 2 : 1; (dráha 3) poměr p53/DNA byl 5 : 1. Vzorky byly inkubovány v prostředí 50 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, 0,5 M EDTA, 0,01 % Triton X-100, 2 mM DTT (pH 7,8) při 0 °C po dobu 30 minut. Pozice proužků proteinu na blotu odpovídá pozici retardovaných proužků v gelu. Více podrobností viz text.

Protein p53 (*wild type*) byl exprimován v bakteriálních buňkách (*Escherichia coli* BL/DE3 obsahující pT7-7 Hup53), které byly pěstovány při 20 °C s využitím dvoustupňové indukce, aby se omezila agregace proteinů, a izolován podle protokolu (Hupp *et al.* 1992). Koncentrace proteinu byla zjištěna denzitometricky z SDS-PAGE obarveného pomocí Coomassie Blue R-250. Jako standard pro určení koncentrace proteinu p53 byl na gel nanesen protein BSA (hovězí sérový albumin).

Tvorba komplexů

200 ng scDNA (obr. 1) nebo 35 ng fragmentu pPGM1 (obsahující p53CON, obr. 2) a 200 ng kompetitorové lineární DNA bylo smícháno s proteinem p53 o různé koncentraci (poměr p53/DNA byl 2 - 5) a směs byla ponechána 30 min na ledové lázni. Protein p53 byl před tím inkubován 15 minut při 0 °C s 2 mM DTT ve vazebném pufru (5 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 0,01 % Triton X-100, pH 7,6). V některých případech byl protein ještě před přidáním DNA 20 minut inkubován s monoklonální protilátkou ICA-9 (10 µg.ml⁻¹).

Elektroforéza

Do vzorků byl přidán nanášecí pufr (0,25 % bromfenolová modř, 0,25 % xylene cyanol, 40 % sacharosa) a vzorky byly naneseny na 1 - 1,3 % agarosový gel v 0,33 × TBE pufru (30 mM Tris, 30 mM H₃BO₃, 0,7 mM EDTA, pH 8,0). Elektroforéza probíhala 3 - 10 hodin při 4 °C při napětí 120 V. Hustota gelu a doba trvání je závislá na typu použité DNA (např. celý plasmid vyžaduje delší elektroforézu než krátký fragment). Gel byl obarven ethidiumbromidem a snímán dokumentačním systémem s CCD kamerou.

Western přenos a imunodetekce

Gel byl zpracován ve vakuovém přenosovém systému (1,5 hodiny, podtlak 80 mPa) nitrocelulosovou membránou BioTrace NT PALL v prostředí 3 M NaCl s 0,3 M citrátem sodným (10×SSC). Membrána byla poté inkubována 45 minut s 5 % mlékem v 1× PBS (0,14 M NaCl, 3 mM KCl, 4 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4). V dalším kroku byla do mléka přidána myší primární monoklonální protilátka proti p53 DO-1 (obr. 2) nebo králičí primární polyklonální protilátka CM1 (obr. 1) zředěné na určitou koncentraci, která byla empiricky zjištěna z kontrolních experimentů. Po 2 hodinách byla membrána 4 × po pěti minutách promyta v PBST (PBS, 0,05 % Tween 20). Komplex protein-primární protilátka byl rozpoznán sekundární protilátkou *anti-mouse* IgG nebo *anti-rabbit* IgG konjugovanou s peroxidasou. Tato protilátka byla ředěna 5% mlékem v PBS v poměru 1 : 1 000 až 1 : 10 000. Následovalo opět promytí v PBST.

Vlastní detekce proteinu byla provedena pomocí zesílené chemiluminiscence (ECL). Membrána byla vložena do filmové kazety, převrstvena ECL detekčními roztoky 1 a 2 (Amersham), smíchanými v poměru 1 : 1, překryta fólií a rentgenovým filmem (v temné komoře). Expozice trvala 1 hodinu. Poté byl RTG film vyvolán v pozitivní vývojce a ustálen v kyselém ustalovači.

Z výsledků je patrné, že protein p53 (*wild type*) se v přítomnosti kompetitorové lineární DNA přednostně váže na nadšroubovicovou DNA (obr. 1) a na fragmenty, které obsahují specifické vazebné místo (p53CON) (obr. 2).

Zhodnocení metody

Tato metoda umožňuje velmi snadno a přesně sledovat interakci různých typů DNA s normálními i mutovanými proteiny, v závislosti na přidavku redukčních činidel (dithiothreitol), oxidačních činidel (diamid) (Fojta *et al.* 1999) nebo specifických monoklonálních protilátek (Brazda *et al.* 2000).

Další výhodou tohoto postupu je, že nemusíme používat radioaktivní značení DNA, čímž šetříme jak své zdraví, tak finanční prostředky.

Experimenty obvykle nevyžadují náročnou optimalizaci.

Časová náročnost závisí na velikosti molekul DNA použité v experimentu (délka elektroforézy) a na vlastnostech primární protilátky (imunodetekční krok; celkem 10 až 48 hodin).

Kromě základního laboratorního vybavení jsou zapotřebí elektroforetické aparatury pro agarosovou a polyakrylamidovou gelovou elektroforézu, chlazená centrifuga, FPLC pro izolaci proteinu, vakuový přenosový (blotovací) systém, kazety na fotografické snímání membrán, UV transiluminátor s detekčním systémem nebo fotoaparát, počítač (s programem Image-Quant umožňujícím kvantitativní vyhodnocení obrázků).

Z nezbytných chemikálií jsou finančně náročnější primární a sekundární protilátky a roztoky pro ECL. Z dalšího potřebného vybavení jsou poměrně drahé nitrocelulosevé membrány a soupravy pro izolaci DNA.

Literatura

- Apella, E., Anderson, C. W. 2001. - Eur. J. Biochem. **268**: 2764.
- Brazda, V., Palecek, J., Pospisilova, S., Vojtesek, B., Palecek, E. 2000. - Biochem. Biophys. Res. Commun. **267**: 934.
- Brazdova, M., Palecek, J., Cherny, D. I., Billova, S., Fojta, M., Pecinka, P., Vojtesek, B., Jovin, T.M., Palecek, E. 2002. - Nucleic Acids Res. **30**: 4966.
- El-Deiry, W. S. 1998. - Cancer J. **11**: 229.
- Fojta, M., Kubicarova, T., Vojtesek, B., Palecek, E. 1999. - J. Biol. Chem. **274**: 25749.
- Gohler, T., Reimann, M., Cherny, D., Walter, K., Warnecke, G., Kim, E., Deppert, W. 2002. - J. Biol. Chem. **277**: 41192.
- Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A., Lane, D.P. 1992. - Cell **71**: 875.
- Palecek, E., Vlk, D., Stankova, V., Brazda, V., Vojtesek, B., Hupp, T. R., Schaper, A., Jovin, T. M. 1997. - Oncogene **15**: 2201.

Poděkování. Práce byla financována granty GAČR 204/02/0734, IGA MZ NC/7574 – 3 a Z 5004920.

Použití bioinformatiky v rostlinné biologii - analýza proteinových sekvencí

MARTIN POTOCKÝ

Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha, (tel.: 221 951 685, e-mail: potockym@vscht.cz)

Úvod

Dokončení kompletní genomové sekvence modelových rostlinných organismů jako *Arabidopsis thaliana* či rýže, a exponenciální nárůst probíhajících i dokončených sekvenčních projektů, přinášející ohromné množství primárních sekvenčních dat, vyžaduje nové postupy a prostředky k jejich zpracování. Zde se pokusím nastínit nejpoužívanější strategie analýzy proteinových sekvencí a možnosti jejich využití pro biologii rostlin. Text je členěn podle pravděpodobného schématu práce a zahrnuje identifikaci homologních proteinů, možnosti analýzy primární sekvence a predikci sekundární a terciární struktury proteinů. Ve výčtu příslušných programů se omezím pouze na software a služby dostupné přes internet, které jsou v akademické sféře volně distribuovatelné.

Databáze proteinových sekvencí

Od roku 1965, kdy Margaret Dayhoff publikovala poprvé slavný *Atlas of Protein Sequence and Structure* (první veřejná kompletní databáze, obsahující údaje o 65 proteinech, Dayhoff *et al.* 1965) se počet položek v proteinových databázích zvýšil na téměř 3 miliony, což kromě sekvenčního úsilí dokumentuje i nárůst redundance. Rovněž je třeba upozornit na fakt, že velká část proteinových sekvencí je výsledkem translace predikovaných kódujících oblastí genů, pro které neexistují žádné experimentální důkazy. Současný trend v proteinových databázích je tedy dvojitý - na jedné straně kompletní databázové projekty odvozené z nukleotidových databází jako jsou GenBank\EMBL\DDBJ, které zároveň zahrnují výše zmíněné nevýhody, a nekompletní specializované, často manuálně redigované, databáze přinášející ověřené, dobře anotované sekvence na straně druhé. Přehled nejpoužívanějších zdrojů přináší tab. 1.

Vyhledávání sekvencí v databázích

Způsobů jak získat požadovaná data z proteinových databází je několik. Každá sekvence má svůj unikátní identifikátor, podle kterého ji můžeme jednoduše vyhledat. Další možností je hledání podle klíčových slov. Asi nejkompletnější databázová rozhraní Entrez (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) a SRS-EBI (<http://srs.ebi.ac.uk>) nabízí řadu dalších vyhledávacích kritérií, jako je druh organismu, autor, rok původu a další.

Nejcitlivějším a nejkomplexnějším přístupem je vyhledávání orthologních sekvencí na základě homologie. Základním přístupem téměř všech metod je konstrukce tzv. „pairwise alignments“, tj. porovnání dvou sekvencí (z nichž jedna je vždy námi zadána), kvantifikace jejich vzájemné podobnosti a odhadnutí statistické významnosti výsledku. Tab. 2 uvádí nejpoužívanější algoritmy a jejich implementace.

Tab. 1. Přehled databází proteinových sekvencí

Název	URL odkaz	Poznámka
Entrez Proteins	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez	+ kompletní, integruje všechny ostatní databáze, provázána s literárními údaji, - redundantní, často špatná anotace
GenomeNet	http://www.genome.ad.jp/htbin/www_bfind?protein-today	+ kompletní, náhrada za Entrez - redundantní, uživatelsky nepříjemná
SWISS-PROT	http://www.expasy.org/sprot	+ ručně anotována, pouze ověřené sekvence, provázána s dalšími zdroji, nízká redundance - nekompletní
TrEMBL	http://srs.ebi.ac.uk/srs6bin/cgi-bin/wgetz?-page+top	+ málo redundantní, předvoj a doplněk pro Swiss-Prot - aktualizována čtvrtletně
PIR	http://pir.georgetown.edu	+ řazení do rodin podle příbuznosti - nekompletní, často špatná anotace
Expasy Links	http://us.expasy.org/alinks.html	odkazy na velké množství specializovaných databází
Arabidopsis Gene Families	http://www.arabidopsis.org/info/genefamily/genefamily.html	odkazy na jednotlivé databáze genových rodin
Aramemnon	http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/	databáze membránových proteinů v <i>Arabidopsis</i>

Tab. 2. Zdroje pro vyhledávání proteinových sekvencí v databázích

Název	URL odkaz	Poznámka
Blast (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	základní rozhraní, nejpoužívanější, uživatelsky nejpříjemnější
PSI-Blast (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	detekce příbuzných sekvencí s nízkou podobností, iterativní, riziko falešně-pozitivních výsledků
Standalone BLAST (NCBI)	ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/executables	program ke stažení na vlastní počítač, uživatelsky nepříjemný, pokročilé funkce (Windows, Linux)
DDBJ Homology Search System	http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology.html	soubor různých algoritmů (Blast, Psi-Blast, Fasta, Smith-Waterman), alternativa k NCBI
WU-Blast (EBI)	http://www2.ebi.ac.uk/blast2/	odlišný algoritmus od NCBI-Blast, někdy citlivější
FastA (EBI)	http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/	vhodný pro dlouhé úseky s nízkou podobností
Smith-Waterman (EBI)	http://www.ebi.ac.uk/searches/blitz_input.html	citlivější než Blast a Fasta, pomalý
Propsearch	http://www.infobiosud.univ-montp1.fr/SERVEUR/PROPSEARCH/propsearch.html	hledání je založeno na aminokyselinovém složení a dalších fyzikálně-chemických vlastnostech proteinu
AA composition (ExPASY)	http://www.expasy.ch/tools/aacomp/aacomp0.html	hledání je založeno na aminokyselinovém složení, pI a molekulové hmotnosti

Vedle volby algoritmu je důležitým krokem volba tzv. substituční matrice, která definuje kritéria kvantifikace jednotlivých pozic v *alignment* (bonus za zachování, penalizace za záměnu). V dnešní době se nejčastěji používají matrice PAM (Dayhoff a Eck 1968) a Blosom (Henikoff a Henikoff 1992). Matrice PAM30 a Blosom80 se používají pro hle-

dání vysoce příbuzných sekvencí, použití matic PAM250 a Blosum45 je vhodné pro hledání vzdálených homologů s předpokládanou nízkou podobností. „Kompromisní“ matrice Blosum62 se používá jako základní nastavení pro většinu vyhledávacích programů. Pro každou matici pak existují experimentálně testované hodnoty tzv. „*gap parameters*“ (penalizace za vytvoření a prodloužení mezery v *alignment*). Dalším prvkem ovlivňujícím citlivost hledání je hodnota parametru word (Blast) či K-tuple (FastA): pro citlivější (a delší) vyhledávání je možno zvolit nabízenou nižší hodnotu. Všechny používané vyhledávací programy také umožňují zapojení algoritmů, které rozpoznají a maskují sekvence s nízkou komplexitou (např. repetitivní či prolin bohaté oblasti); tyto sekvence mohou jinak dávat falešně pozitivní výsledky.

Významné zvýšení citlivosti při hledání vzdáleně příbuzných sekvencí přineslo zavedení tzv. pozičně-specifických matic (PSSM - *position-specific weight matrix*). Čelním algoritmem využívajícím tento přístup je program PSI-BLAST (Altschul *et al.* 1997). PSI-BLAST využívá iterační přístup: po prvním kole hledání se z nalezených sekvencí vytvoří *multiple alignment* (viz níže) a generuje se PSSM (která přičítá vysoké bonusy za zachování pozic konzervovaných v alignmentu a obráceně). Takto vytvořená PSSM je použita k vyhodnocení druhého kola hledání, přidáním nově nalezených sekvencí se vytvoří nová PSSM a celý proces pokračuje po definovaný počet kol či do nasycení.

V případě, že výše popsanými metodami nemůžeme najít k zadané sekvenci žádné homologní sekvence, můžeme zkusit hledat podle aminokyselinového složení a dalších fyzikálně chemických vlastností proteinu (tab 2). Tento způsob může naznačit strukturní a funkční příbuznost mezi novou neznámou sekvencí a sekvencemi v databázích (Hobohm a Sander 1995).

Analýza proteinových rodin – *multiple alignment*

Zatímco metody *pairwise alignment* nacházejí použití především v prohledávání databází, pro simultánní analýzu většího množství homologních proteinů jsou kritické postupy tzv. „*multiple alignment*“, tj. srovnání sady proteinů. Zatímco algoritmy *pairwise alignments* jsou podloženy robustní statistickou teorií a produkují tzv. optimální *alignment* (tj. s maximálním skóre), metody *multiple alignment* jsou pouze aproximační. V tab. 3 uvádím nejčastěji využívané programy využívající rozdílné algoritmy vhodné pro různé konzervované sekvence. Výstupem programu je pak buď globální (algoritmus se snaží srovnat všechny pozice v sekvencích) nebo lokální *alignment* (program vyhledává konzervované, často poměrně krátké úseky, mezi kterými jsou dlouhé úseky nesrovnaných sekvencí). Obecně platí, že pro srovnání dlouhých sekvencí s nízkou mírou podobnosti je lepší použít algoritmy vytvářející lokální *alignment*, zatímco metody globálních *alignments* se lépe hodí pro vysoce konzervované sekvence. Podoba výsledného *alignment* se může výrazně měnit s použitím různých substitučních matic a *gap parameters*, podobně jako u *pairwise alignment*. V praxi je výhodné testovat několik algoritmů a výsledky (s kritickou analýzou) kombinovat.

Existuje rovněž řada softwarů umožňující rychlou manuální editaci *multiple alignments* a přípravu barevně kolorovaných a anotovaných *alignments* k publikaci; výčet nejčastěji používaných je uveden v tab 3.

Tab. 3. Programy pro vytváření a editaci *multiple alignments*

Název	URL odkaz	Poznámka
BCM Multiple Sequence Alignments	http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html	webové rozhraní nabízející několik algoritmů (ClustalW, MAP, PIMA, MSA, Block Maker, MEME)
ClustalW (EBI)	http://www.ebi.ac.uk/clustalw	<u>nejpopulárnější program, globální alignment</u>
T-Coffee	http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/	nejlepší program na alignment vysoce konzervovaných sekvencí, umí i kombinovat alignments produkované jinými algoritmy
Dialign	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/submission.html	nejlepší program na alignment málo konzervovaných sekvencí, lokální alignment
POA	http://www.bioinformatics.ucla.edu/poa/	nejrychlejší, vhodný pro velký počet sekvencí
ClustalX	http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html	verze ClustalX ke stažení a instalaci na vlastní počítač (Windows, Linux)
Macaw	http://www.bris.ac.uk/Depts/PathAndMicro/services/CGR/Common Files/MACAWinstructions.htm	program ke stažení, lokální alignment, vhodný pro málo konzervované sekvence, možnost ručního editování (Windows)
Boxshade	http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html	server pro grafickou úpravu alignments k publikaci
Chroma	http://www.lg.ndirect.co.uk/chroma/index.htm	program ke stažení, umožňuje anotaci a úpravu alignments k publikaci (Windows)
GeneDoc	http://www.psc.edu/biomed/genedoc/	program ke stažení, slouží k manuální editaci a grafické úpravě alignments (Windows)

Detekce proteinových domén a konzervovaných motivů v primární sekvenci proteinu

Identifikace strukturních domén či motivů v neznámé sekvenci je důležitý krok při vytváření hypotézy o biologické funkci zkoumaného proteinu. Realizace tohoto úkolu je však komplikována skutečností, že proteinové domény s podobnou prostorovou strukturou a funkcí často sdílejí jen velmi málo podobnosti na úrovni primární struktury a jejich detekce konvenčními metodami *pairwise* a *multiple alignments* proto není možná. Řešení přineslo zavedení pozičně-specifických maticí PSSM, které umožnilo vybudovat PSSM charakteristické pro konkrétní domény. Příslušné servery (tab. 4.) potom obsahují (pravidelně obnovovanou) databázi jednotlivých PSSM, kterou je možno prohledávat zadanou sekvencí.

Dalším algoritmem umožňujícím detekci málo konzervovaných domén se stalo využití tzv. „*hidden markov models*“ (HMM) v bioinformatice. HMM představuje dynamický statistický profil charakteristický pro určitou doménu či sekvenční motiv (vysvětlit princip HMM přesahuje možnosti tohoto článku, viz Hughey a Krogh 1996). Specializované servery (tab. 4.) opět disponují souborem prohledávatelných HMM profilů, výstup pak obsahuje statistické zhodnocení a grafické znázornění analýzy.

Existují i programy pracující opačným směrem, tj. v uživateli zadaném souboru sekvencí vyhledávají konzervované motivy, případně vytvářejí HMM profily. Dostupná je

rovněž řada programů predikujících potenciální místa posttranslačních modifikací jako jsou fosforylace, acylace apod. (nejznámější je Prosite, <http://www.expasy.ch/prosite/>), díky velmi vágně definovaným sekvenčním motivům je třeba výsledky predikce brát s rezervou.

Tab. 4. Zdroje pro detekci konzervovaných sekvenčních domén a motivů

Název	URL odkaz	Poznámka
SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/	používá metodu HMM, manuálně editován, rychlý, přehledný, výborné grafické rozhraní
Pfam	http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam	používá metodu HMM, pomalejší ale komplexnější a někdy citlivější než SMART
InterPro (EBI)	http://www.ebi.ac.uk/interpro	integruje i data získaná pomocí SMART a Pfam
CDD (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml	založeno na metodě PSSM, integruje i data získaná pomocí SMART a Pfam
Prosite (Expasy)	http://www.expasy.ch/prosite/	kromě domén predikuje i postranlační modifikace
Pratt (EBI)	http://www2.ebi.ac.uk/pratt/	vyhledá konzervované motivy ve skupině sekvencí
Pattinprot (NPS@)	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_pattinprot.html	rozhraní k řadě programů

Analýza směřování a vnitrobuněčné lokalizace proteinů

Stejně jako detekce funkčních domén, je predikce intracelulární lokalizace proteinu nezbytnou součástí charakteristiky neznámé sekvence. Současné znalosti a prostředky dovolují poměrně spolehlivě predikovat tyto charakteristiky: signální peptidy, transmembránové domény a transitní peptidy směřující protein do mitochondrie nebo chloroplastu.

Standardem pro detekci signálních peptidů je program SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>), který umožňuje predikci jak u eukaryot, tak u Gram-positivních i Gram-negativních bakterií s vysokou spolehlivostí.

Tab. 5 ukazuje některé metody používané pro predikci transmembránových segmentů. Ačkoli se jednotlivé algoritmy liší v detailech, základním principem většinou zůstává profil hydropathie podél sekvence proteinu (transmembránové domény jsou většinou α -helixy dlouhé 17 - 33 aminokyselin a obsahují hydrofobní a neutrální aminokyselinové zbytky). Sofistikovanější programy potom profil hydropathie kombinují s predikcí α -helikálních struktur. Autorova osobní zkušenost je taková, že kombinace 2 - 3 programů vede v 95% případů k správné predikci.

Podobně jako predikce signálních peptidů, je přítomnost transitních mitochondriálních/plastidových peptidů predikována programy založenými na bázi neuronových sítí, trénovaných na sadě proteinů s experimentálně ověřenou buněčnou lokalizací (viz tab. 6). Predikce mitochondriálních a plastidových signálních peptidů je však méně spolehlivá; podle autorových zkušeností je třeba kombinovat všechny dostupné algoritmy a i přesto se přesnost predikce pohybuje se jen asi okolo 80 %.

Tab. 5. Programy pro predikci transmembránových domén

Název	URL odkaz	Poznámka			
		Hranice TM	Graf hydrofobicity	Predikce α -helixů	Více sekvencí najednou
TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM	ano	ano	ano	ano
TopPred2	http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html	ano	ano	ano	ano
PhDhtm	http://cubic.bioc.columbia.edu/pp/	ano	ne	ano	ne
DAS	http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/	ano	ano	ne	ne
TMpred	http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html	ano	ano	ano	ne

Tab. 6. Programy pro predikci signálních peptidů a intracelulární lokalizace proteinů

Název	URL odkaz	Poznámka
iPSORT	http://hypothesiscreator.net/iPSORT/	predikce mitochondriálních, plastidových a signálních peptidů a místa štěpení
TargetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/	predikce mitochondriálních, plastidových a signálních peptidů a místa štěpení, možnost zadání více sekvencí, kvantifikace výstupu
ChloroP	http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/	predikce plastidových transitních peptidů
Predotar	http://www.inra.fr/predotar/	predikce mitochondriálních i plastidových TP, kvantitativní vyhodnocení
Mitoprot	http://mips.gsf.de/cgi-bin/proj/medgen/mitofilter	predikce mitochondriálních TP a místa štěpení, kvantitativní vyhodnocení

Predikce strukturních prvků v proteinech

Predikce strukturních prvků v proteinech často nemá přímou návaznost na predikci biologické funkce, ale je důležitým doplňkem analýzy primární sekvence. Jak bylo naznačeno výše, detekce oblastí s nízkou komplexitou je důležitým předpokladem pro hledání v databázích; predikce sekundárních struktur pak obvykle předchází modelování 3D struktury.

Detekce segmentů s nízkou komplexitou často signalizuje přítomnost domén neglobulárního charakteru, tzv. „*coiled-coil*“ domén. *Coiled-coil* domény mají superhelikální strukturu charakterizovanou přítomností periodicky se opakujících hydrofobních aminokyselin, často leucinů. Predikce založená na této periodicitě je základem programu COILS (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html).

Predikce sekundárních struktur sama o sobě dává málo informací o funkci proteinu či o jeho klasifikaci do proteinových rodin, je však důležitým doplňkem dalších metod. Evoluce proteinů často probíhá ve formě insercí neuspořádaných smyček, zatímco segmenty s charakteristickou sekundární strukturou jsou často konzervované. Spolehlivá

predikce těchto elementů pomáhá správnému srovnání vzdálených sekvencí a může odhalit konzervované oblasti, které by jinak unikly pozornosti. Detekce sekundárních struktur je rozvinuté odvětví bioinformatiky s řadou kompetujících algoritmů (tab. 7). Klasické metody jako Chou-Fasmanova nebo Garnierova zpracovávaly tehdy známé 3D struktury a počítaly pravděpodobnosti aminokyselinových zbytků tvořit nejpravděpodobnější sekundární strukturu pro daný úsek sekvence. Moderní metody (tab. 7) využívají neuronových sítí, které jsou trénované na databázích všech známých proteinových 3D struktur. Některé servery umožňují použít *multiple alignment* jako zadání či kombinují výsledky získané různými algoritmy, což významně zvyšuje pravděpodobnost správné predikce.

Tab. 7. Programy predikující sekundární struktury

Název	URL odkaz	Poznámka
Predict Protein	http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/	rozešle zadanou sekvenci dalším programům, které zpracují výsledky zvlášť
NPS@	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_seccons.html	rozešle zadanou sekvenci dalším programům a zpracuje konsensus
PHDsec	http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein	asi nejpoužívanější program, část balíku Predict Protein
PSIpred	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/	se zadanou sekvencí provede tři iterace PSI-BLASTu a z <i>alignments</i> predikuje sekundární strukturu
Target99	http://www.cse.ucsc.edu/research/compbio/HMM-apps/	provede iterační hledání proti HMM profilům z proteinů se známými 3D strukturami
SSPAL, SSP, NNSSP	http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protein	jako zadání umožňují jednu sekvenci i <i>multiple alignment</i>
Jnet	http://www.compbio.dundee.ac.uk/Software/JNet/jnet.html	jako zadání umožňují <i>multiple alignment</i> , HMM profil a PSI-BLAST profil

Predikce a modelování 3D struktury proteinů

„*Sequence-structure threading*“, doslova „navlékání sekvence na strukturu“ zahrnuje rodinu informatických přístupů snažících se určit terciární strukturu zkoumaného proteinu na základě testování „vhodnosti“ různých typů experimentálně zjištěných 3D struktur. Základní myšlenka těchto přístupů tkví ve faktu, že struktura je mnohem více konzervována než sekvence. Obecně je principem většiny metod výpočet zbytkové kontaktní energie zadané sekvence „natažené“ na každou strukturu v databázi - struktura s nejmenší energií je potom prohlášena za nejpravděpodobnějšího kandidáta a dalším iteračním procesem se program snaží energii dále minimalizovat. Bylo navrženo několik statistických modelů, které testují pravděpodobnost, že navržená struktura odpovídá struktuře nativního proteinu. Dále je třeba podotknout, že výsledky získané kombinací „energetických“ metod predikce sekundárních struktur sekvencních profilů jsou významně spolehlivější než data získaná pouze modelováním. Přehled některých z mnoha používaných metod je uveden v tab. 8.

Tab. 8. Programy pro predikci 3D struktury proteinů

Název	URL odkaz	Charakteristika
PDB	http://www.rcsb.org/pdb/	databáze experimentálně stanovených 3D struktur proteinů
SAM-T99	http://www.cse.ucsc.edu/research/compbio/HMM-apps/	provádí iterační hledání proti HMM databázi, z výsledků buduje nový HMM profil a pak prohledává databázi PDB..
InBGU	http://www.cs.bgu.ac.il/~bioinbgu/	porovnává sekvenční profily zadaného proteinu a proteinů s různými 3D strukturami, výsledná predikce je kombinací pěti různých metod
UCLA/DOE Fold Server	http://fold.doe-mbi.ucla.edu/	stejný postup jako InBGU, ale používá jinou knihovnu 3D struktur
GenThreader	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/	se zadanou sekvencí provede tři iterace PSI-BLASTu a s výsledným profilem buduje strukturu, nefunguje, pokud neexistují homology v databázi.
3D-PSSM	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/	porovnává 1D a 3D profily spojené s predikcí sekundární struktury a solvatačního potenciálu

Tipy závěrem

Existuje mnoho formátů pro zpracovávání a uchovávání sekvencí. Autor doporučuje používat nejjednodušší a nejčastější z nich - FASTA formát. Ten je definován tak že začátek každé sekvenční položky začíná znakem '>', za nímž následuje jeden řádek informací o daném proteinu a od dalšího řádku vlastní sekvence. K převodu do dalších formátů lze s výhodou použít například program Readseq z nabídky serveru BCM Searchlauncher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>).

Je výhodné používat jako jeden z identifikátorů sekvence unikátní znak databází Genbank/EMBL/DDBJ.

Kromě zde uvedených programů existují akademické sféře volně dostupné programové balíky. Alternativou oblíbeného (nyní však komerčního) balíku CGC package) může být soubor programů EMBOSS (<http://www.emboss.org>).

Literatura

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997 - *Nucleic Acids Res.* **25**:3389.
- Dayhoff, M.O., Eck, R.V. 1968. - In Dayhoff, M.O. Eck, R.V. (eds): *Atlas of Protein Sequence and Structure* **3**. S. 33. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland.
- Dayhoff, M.O., Eck, R.V., Chang, M.A., Sochard, M.R. 1965. - *Atlas of Protein Sequence and Structure*. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland.
- Henikoff, S., Henikoff, J.G. 1992 - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:10915.
- Hobohm, U., Sander, C. 1995. - *J. Mol. Biol.* **251**: 390.
- Hughey, R., Krogh, A. 1996. - *Comp. Appl. Biosci.* **12**: 95.

Poděkování. Výzkum v laboratoři autora je podporován granty MŠMT LN00A081 a GAUK130/2002/B-BIO/Prf

Konstrukce syntetického tabáku

KAMILA SKALICKÁ, ROMAN MATYÁŠEK, ALEŠ KOVAŘÍK

Biofyzikální ústav AV ČR, Laboratoř molekulární epigenetiky, Královopolská 135, 61265 Brno, (tel.: 541 517 179, e-mail: skalicka@ibp.cz)

V Laboratoři molekulární epigenetiky se zabýváme studiem struktury a funkce repetitivní DNA u allopolyploidních rostlin. Allopolyploidní druhy vznikají křížením dvou a více příbuzných druhů. Potomstvo takového křížení je sterilní, protože v jádře je přítomna jedna sada chromosomů od každého rodiče a v meiose dochází k nondisjunkci. Teprve po zdvojení chromosomových sad se rostlina stává fertilní (každý chromosom má svého partnera) a může dát vznik novému druhu. Zatímco u některých rodů (například *Tragopogon*) dochází v přírodě ke spontánní allopolyploidizaci s relativně vysokou četností (Cook *et al.* 1998), umělá syntéza fertilních rostlinných hybridů bývá zpravidla málo úspěšná.

Nicotiana tabacum L. (tabák virginský) je allotetraploidní druh ($2n=4x=48$), který vznikl před 5 až 6 miliony lety křížením předků diploidních druhů *N. sylvestris* ($2n=24$; donor mateřského genomu) a *N. tomentosiformis* ($2n=24$; donor otcovského genomu). Asi nejvíce prozkoumanou repetitivní sekvencí je rodina genů kódující ribosomální RNA (rDNA). Na genom připadá řádově tisíce rDNA jednotek, které jsou uspořádány v klastrech. Jednotka rRNA genů 35S se skládá z konzervativních sekvencí (geny pro 26S, 18S a 5,8S rRNA) a nekódujících oblastí (intra- a intergenový spacer), jejichž sekvencí variabilita se využívá k odlišení rDNA jednotlivých druhů. Z předchozích prací (Kovarík *et al.* 1996, Volkov *et al.* 1999) vyplývá, že v průběhu evoluce u tabáku došlo k eliminaci mateřských rDNA. Z otcovských jednotek vznikly mechanismem genové konverze (zahrnuje interlokusovou homogenizaci) tabákově specifické jednotky, které se od otcovských liší strukturou a délkou intergenového *spaceru*.

Byl vývoj rDNA u tabáku rychlý nebo probíhal postupně? Jakou roli hraje v evoluci rDNA allopolyploidie? Jaké další faktory řídí nebo ovlivňují směr evoluce rDNA? Odpověď na tyto a mnoho dalších otázek může dát studium časných stádií evoluce rDNA u linií syntetického tabáku. Většina pokusů o rekonstrukci tabákového genomu skončila neúspěšně. Příčinou je patrně velká evoluční vzdálenost rodičovských druhů (předkové *N. sylvestris* a *N. tomentosiformis* divergovali před 70 miliony lety - Okamuro a Goldberg 1985).

Jednou z dostupných linií syntetického tabáku je linie Th37 (křížení ♀ *N. sylvestris* ($2n=24$) × ♂ *N. tomentosiformis* ($2n=24$)). Klíčivá semena byla získána samosprašením jedné rostliny regenerované v kalusové kultuře vzniklé z F1 generace (Burk 1973). Časnou evoluci rDNA jsme sledovali u čtvrté generace této linie. Z dvaceti náhodně vybraných rostlin jsme u sedmnácti identifikovali nejméně tři nové rDNA varianty otcovského typu (odlišná struktura a délka intergenového *spaceru*). Jejich přítomnost byla většinou provázena úplnou eliminací původních otcovských jednotek. U tří rostlin byly otcovské jednotky zachovány. Mateřské jednotky zůstaly v obou případech nezměněny. Evoluce rDNA u linie Th37 byla tedy potvrzena, avšak zatím probíhá jinak než u tabáku.

Přístupy ke konstrukci syntetického tabáku

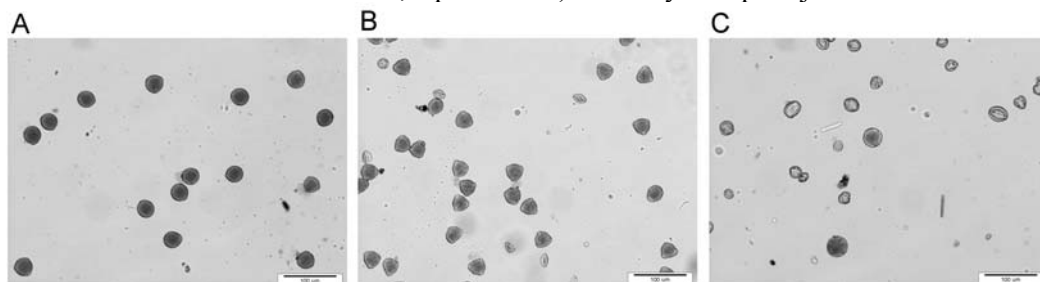
Cílem je získat fertilního křížence s dvěma sadami chromosomů od každého rodičovského druhu.

Námi zvolený přístup kopíruje pravděpodobný vznik tabáku - křížení diploidních rodičovských rostlin (moderní *N. sylvestris* - mateřská rostlina a *N. tomentosiformis* – pylový dárce) a následné zdvojení chromosomových sad u potomků (F1). Další přístup je založen na použití rodičovských rostlin se zdvojeným počtem chromosomů. Křížení tetraploidních rodičů vede k fertilnímu potomstvu. Konečně také křížením tetraploidní *N. sylvestris* a diploidní *N. tomentosiformis* lze získat malé množství fertilních potomků, protože přibližně 1 % pylových zrn má neredukovaný počet chromosomů.

Kromě spontánní diploidizace regenerací kalusových buněk F1 generace můžeme zdvojení chromosomových sad indukovat pomocí inhibitorů dělicího vřeténka (mitotické jedy). Kolchicin, oryzalin, trifluralin, amiprofosmetyl a další látky se přidávají do herbicidů a uplatňují se také ve šlechtitelských programech. Kolchicin a oryzalin byl s úspěchem použit ke zdvojení chromosomových sad například u banánovníku (Hamill *et al.* 1992, vanDuren *et al.* 1996), bramboru (Chauvin *et al.* 2003) nebo cibule (Geoffriau *et al.* 1997). Práce se liší použitím různých vývojových stádií a částí rostlin, koncentrací a dobou působení inhibitorů.

Pracovní postup

1. Křížení. U mateřské rostliny (*N. sylvestris*) zabráníme samosprašení odstraněním tyčinek před otevřením květu (kastrace). Na zralou bliznu (zvlhne 2 až 3 dny po kastraci) aplikujeme dvakrát denně pyl *N. tomentosiformis* až do jejího zaschnutí. Lze použít i pyl zamražený. Semena necháme vyklíčit na MS médiu (Murashige a Skoog 1962) (světelný režim 12 hod tma/12 hod světlo, teplota 26°C). Rostliny dále pěstujeme ve skleníku.



Obr. 1. Pyl *Nicotiana sylvestris* (A), *N. tomentosiformis* (B) a potomka křížení ♀ *N. sylvestris* × ♂ *N. tomentosiformis* ovlivněného oryzalinem (C). Barvení acetokarmínem (vitální pylová zrna jsou šedá, abortovaná jsou bezbarvá). Úsečka = 100 µm.

2. Zdvojení počtu chromosomů u F1 generace – toto je pravděpodobně nejkritičtější fáze experimentu. Lze použít několik následujících metod.
 - 2.1. Regenerace rostlin z kalusové kultury. Kalusovou kulturu založíme ze segmentů listů na MS médiu s přidavkem 2 mg.l⁻¹ kyseliny α-naftyloctové (NAA) a 0,2 mg.l⁻¹ N6-benzyladeninu (BA). Po třetí pasáži (pasáž ~ tři týdny) přemístíme kalus na MS

- médium bez hormonů nebo s obráceným poměrem NAA a BA. Regenerované rostliny po zakořenění přesadíme do skleníku a necháme vykvést.
- 2.2. Působení mitotických jedů. Kromě oryzalinu (v protokolu) se dá použít i kolchicin (pracovní koncentrace 0,01 – 1 %). V porovnání s oryzalinem je však více fyto-toxický.
- 2.2.1. Působení oryzalinu na kalusy. Kalus po třetí pasáži přemístíme na MS médium s oryzalinem. Použijeme více kombinací koncentrace oryzalinu (0,003 - 0,05 %) a doby působení (jeden až sedm dní). Po dobu působení udržujeme médium ve tmě. Pokračujeme regenerací viz. bod 2.1.
- 2.2.2. Působení oryzalinu na vzrostné vrcholy. Použijeme rostliny ze skleníku ještě před vykvetením. Buničitou vatu upevníme na vrchol rostliny nebo do úžlabí listů pomocí parafilmu tak, aby byl zajištěn co největší kontakt s apikálním respektive axilárním meristémem. Vatu prokapáváme dvakrát denně vodným roztokem oryzalinu. Můžeme použít různé kombinace koncentrace oryzalinu (0,003 - 0,05 % vodný roztok) a doby působení (jeden až sedm dní). Po dobu působení rostlinu umístíme do tmavého a vlhkého prostředí. Rostliny pak necháme vykvést.
- 2.2.3. Působení oryzalinu na rostlinné segmenty. Na vrcholové a stonkové segmenty rostlin působíme vodnými roztoky oryzalinu viz. bod 2.2.2. (na třepačce, tma). Po ukončení působení segmenty přemístíme na MS médium a po zakořenění je přesadíme do skleníku.
- 2.2.4. Působení oryzalinu na semena a klíčící rostlinky. Semena necháme klíčit ve vodných roztocích oryzalinu nebo na MS médiu s oryzalinem (viz. body 2.2.1 nebo 2.2.2). Potom klíčící rostlinky přemístíme na MS médium a později do skleníku.
3. Ověření fertility rostlin.
- 3.1. Barvení pylu acetokarmínem. Vitální pylová zrna se barví červeně, abortovaná se nebarví.
- 3.2. Tvar pylových zrn. Vitální pylová zrna jsou větší a kulatá, abortovaná menší a svrasklá.
- 3.3. Produkce semen.

V prezentaci budou uvedeny a diskutovány dosažené výsledky.

Literatura

- Burk, L. G. 1973. - J. Hered. **64**: 348.
- Cook, L.M., Soltis, P.S., Brunsfeld, S.J., Soltis, D.E. 1998. - Mol. Ecol. **7**: 1293.
- Geoffriau, E., Kahane, R., Bellamy, C., Rancillac, M. 1997. - Plant Sci. **122**: 201.
- Hamill, S.D., Sharrock, S.L., Smith, M.K. 1992. - Plant Cell Tissue Organ Cult. **33**: 343.
- Chauvin, J.E., Souchet, C., Dantec, J.P., Ellis-seche, D. 2003. - Plant Cell Tissue Organ Cult. **73**: 65.
- Kovarik, A., Fajkus, J., Koukalova, B., Bezdek, M. 1996. - Theor. Appl. Genet. **92**: 1108.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. - Physiol. Plant. **15**: 473.
- Okamuro, J.K., Goldberg, R.B. 1985. - Mol. Gen. Genet. **198**: 290.
- vanDuren, M., Morpurgo, R., Dolezel, J., Afza, R. 1996. - Euphytica **88**: 25.
- Volkov, R.A., Borisjuk, N.V., Panchuk, I.I., Schweizer, D., Hemleben, V. 1999. - Mol. Biol. Evol. **16**: 311.

Poděkování Tato práce je podporována z grantových projektů 204/01/0313 a 521/01/0037.

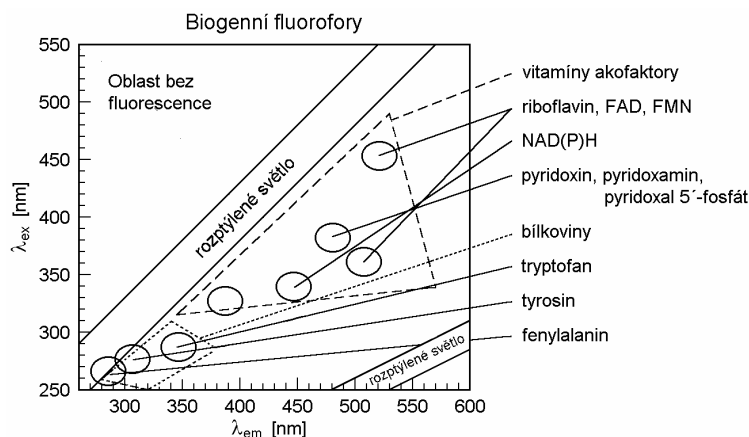
Využití dvourozměrné fluorescenční spektroskopie pro stanovení množství a viability buněk tabáku

RADOMÍRA VAŇKOVÁ, ALENA GAUDINOVÁ

Ústav experimentální botaniky, AV ČR, Rozvojová 2/135, 165 02 Praha 6,
(e-mail: vankova@ueb.cas.cz)

Podstata metody

Podstatou dvourozměrné fluorescenční spektroskopie (2-D FS) je měření intenzity fluorescence v širokém rozmezí excitačních a emisních vlnových délek. Tato metoda umožňuje stanovení excitačního a emisního maxima více fluoroforů zároveň. Poloha excitačního a emisního maxima charakterizuje daný fluorofor, přičemž intenzita fluorescence odpovídá jeho koncentraci. Vzhledem k tomu, že fluorofory nemohou vyzářit větší energii než pohlít, platí pro oblast fluorescence, že emisní vlnová délka (λ_{em}) je větší než excitační vlnová délka (λ_{ex}). Oblast fluorescence je ohraničena diagonálou rozptýleného světla, kdy λ_{em} se rovná λ_{ex} . V oblasti λ_{ex} 250 - 300 nm a λ_{em} 270 - 360 nm fluoreskují aromatické aminokyseliny, zejména tryptofan (obr. 1). Oblast λ_{ex} 310 - 460 nm a λ_{em} 380 - 530 nm je charakteristická pro vitaminy a kofaktory.



Obr. 1. Excitační a emisní maxima přirozených fluoroforů.

Pomocí 2-D FS byla měřena hladina tryptofanu, na jejímž základě byl sledován nárůst biomasy u *Saccharomyces cerevisiae* (Marose *et al.* 1998). Hladina NAD(P)H se osvědčila jako nejlepší kritérium při sledování množství biomasy mikrobiálních buněk *Pseudomonas sp.* (Podrazký *et al.* 2003). Dále byla tato metoda použita pro sledování fluorescenčních látek, ať již jejich tvorby (např. ergotových alkaloidů u *Claviceps purpurea*) nebo rychlosti jejich katabolismu (degradace fenantrenu u *Sphingomonas yanoikuyae*) (Marose *et al.* 1998). 2-D FS je možno využít také k měření nejruznějších enzymových aktivit, pokud je k dispozici vhodný fluorogenní substrát.

Stanovení viability buněk

Možnosti stanovení viability

Životnost buněk lze posuzovat podle řady kritérií. Mezi nejběžnější patří stanovení intaktnosti membrány (vitálním barvením trypanovu modří) nebo enzymové aktivity (oxidoreduktasa - pomocí trifenyltetrazoliumchloridu nebo esterasy - pomocí diacetátu fluoresceinu, FDA). Fluorescein, který vzniká z FDA působením esterasy, patří k nejsilněji fluoreskujícím látkám. Obvyklé vyhodnocování podílu živých a mrtvých buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu je ovšem velmi zdlouhavé a namáhavé, navíc je hodnocení založeno na principu „ano/ne“. Stanovení hladiny fluoresceinu pomocí 2-D FS umožňuje kvantifikaci esterasyové aktivity. Protože stanovená hodnota závisí jak na metabolické aktivitě buněk, tak na jejich množství, je při stanovení viability pomocí fluorescence fluoresceinu, jako jediného parametru, nezbytné udržovat ve všech vzorcích stejný počet buněk.

Vlastní postup

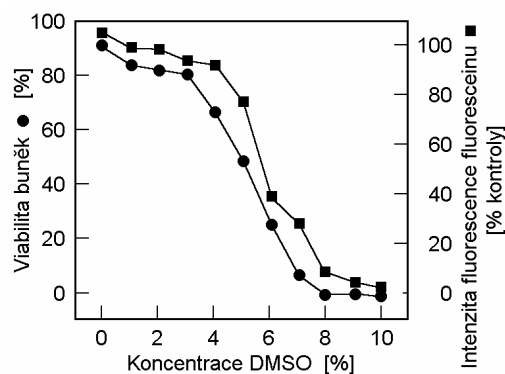
Při měření viability pomocí 2-D FS byly volné buňky nebo alginátové částice s imobilizovanými buňkami odsáty, promyty vodou a inkubovány 10 minut ve vodném roztoku FDA, fluorescence fluoresceinu obvykle narůstá 3 minuty a pak je stabilní asi 40 minut (Vaňková 2000). Zásobní roztok FDA v acetonu (0,5 % w/v) byl uchováván zamražený po malých dávkách a bezprostředně před měřením byl zředěn (1 : 1000) příslušným objemem vody. Fluorescenční spektra byla měřena buď v klasickém uspořádání, kdy je vzorek umístěn v křemenné kyvetě a k měření je použit horizontální paprsek, za použití světlovodných vláken (vnitřní průměr 3 mm, LUMATECH GmbH, Německo) nebo v ploché kyvetě umístěné v úhlu 45 ° vůči excitačnímu paprsku.

Experimentální uspořádání

V případě rostlinných buněk dochází v horizontálním uspořádání při použití hustší suspence ke stínění (nad 2×10^5 buněk.ml⁻¹). Další komplikací jsou změny fluorescence způsobené relativně rychlou sedimentací buněk. Z důvodu minimalizace experimentálních chyb je nutné používat nižší koncentrace buněk a dodržovat standardní postup (rozmíchat a ihned změřit). Použití světlovodných vláken umožňuje odstranit negativní vliv sedimentace (možnost vertikálního uspořádání), ale zase dochází ke značným ztrátám záření, bohužel hlavně v oblasti 200 - 350 nm. Toto uspořádání je možné využít pro měření obsahu fluoresceinu (při vysoké esterasyové aktivitě buněk), ale nikoliv při sledování přirozených fluoroforů. Jako optimální uspořádání se ukázala plochá kyveta umístěná v úhlu 45 ° vůči excitačnímu paprsku. V případě buněk imobilizovaných v lginátu stačí standardní 1 cm kyveta naplněná jednou kompaktní vrstvou alginátových kuliček.

Ověření použitelnosti 2-D FS pro stanovení viability

2D-FS byla použita pro stanovení viability buněk tabáku (BY-2) inkubovaných v DMSO (0 – 10 % v/v) (Vaňková *et al.* 2001). Velmi dobrá korelace výsledků získaných 2-D FS a mikroskopickým stanovením počtu živých a mrtvých buněk po obarvení trypanovou modří prokázala použitelnost 2-D FS pro měření viability buněk (obr. 2).



Obr. 2. Srovnání stanovení viability buněk tabáku pomocí fluorescence fluoresceinu a mikroskopickým vyhodnocením po barvení trypanovou modří (podle Vaňková *et al.* 2001).

Stanovení množství buněk

Nárůst biomasy pomocí 2-D FS může být sledován buď prostřednictvím měření fluorescence fluoresceinu nebo přirozených fluoroforů - proteinů a NAD(P)H. Velmi dobrá korelace fluorescence fluoresceinu a čerstvé hmoty, resp. sušiny, buněk byla získána při měření nárůstu biomasy buněk BY-2 uvnitř částic alginátu při použití ploché kyvety (v oblasti nad 15 mg sušiny/100 kuliček). Čerstvá hmota a sušina buněk byla stanovena po rozpuštění alginátových částic v 0,5 M citrátu. Nezbytným předpokladem je konstantní metabolická aktivita buněk. Viabilita buněk BY-2 během kultivace byla sledována barvením trypanovou modří a pohybovala se v rozmezí $\pm 5\%$.

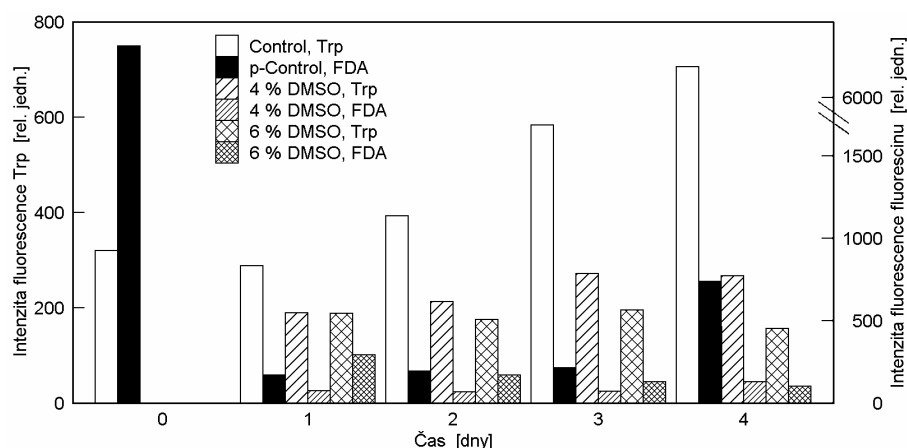
Dobrá korelace mezi fluorescencí a čerstvou hmotou, resp. sušinou, buněk tabáku byla zjištěna při měření fluorescence tryptofanu, ale nikoliv u NAD(P)H, na rozdíl od situace u mikrobiálních buněk *Pseudomonas sp.* U buněk tabáku je hladina NAD(P)H tak nízká, že její změny lze jen obtížně detegovat.

Simultánní stanovení nárůstu biomasy a metabolické aktivity

V řadě experimentů může docházet současně ke změně počtu buněk a jejich metabolické aktivity. V takových případech je nutné měřit fluorescenci fluoresceinu a tryptofanu současně. Průběh fluorescence tryptofanu poskytuje informace o množství biomasy a porovnání průběhu fluorescence fluoresceinu a tryptofanu umožňuje vyhodnotit příspěvek zvýšeného počtu buněk a určit část fluorescence, která odpovídá případné změně metabolické aktivity. Tímto způsobem byl sledován vliv koncentrace DMSO na růst a metabolickou aktivitu buněk tabáku imobilizovaných v pektátu (obr. 3). Zatímco v plném mediu došlo po prodloužené *lag*-fázi k nárůstu množství buněk a jejich aktivity, 4 % DMSO byl buňkami tolerován a 6 % DMSO již měl letální účinky.

Závěr

Pomocí 2-D FS lze současným stanovením hladiny tryptofanu a fluoresceinu sledovat změny viability buněk a jejich množství, a to jak v suspensi, tak i v imobilizovaných buňkách (za předpokladu, že použitý nosič je průhledný nebo alespoň průsvitný).



Obr. 3. Fluorescence tryptofanu a fluoresceinu v buňkách BY-2 imobilizovaných v pektátu a inkubovaných v plném mediu nebo v mediu s přidávkou DMSO (4 % nebo 6 %).

Literatura

- Marose, S., Lindemann, C., Scheper, T. 1998. - *Biotechnol. Prog.* **14**: 63.
 Podrazký, O., Kuncová, G., Krasowska, A. 2003. - *Folia Microbiol.* **48**: (2) 189.
 Vaňková, R. 2000. - *Biol. listy* **65**: 299.
 Vaňková, R., Kuncová, G., Opatrná, J., Šusenbeková, H., Gaudinová, A., Vaněk, T. 2001. - *Plant Cell Rep.* **20**: 41.

Poděkování. Tento projekt vznikl za podpory grantů MŠMT COST OC 840.20 a 840.10.

Modely vývojové biologie rostlin

BORIS VYSKOT

Biofyzikální ústav AV ČR, Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Královopolská 135, 612 65 Brno, (tel./fax: 541 240 500, e-mail: vyskot@ibp.cz, www.ibp.cz/labs/PDG/)

Syntetický charakter a historie vědního oboru

Vývojová biologie (*developmental biology*) je poměrně novým syntetickým oborem, pokud se týká tradice termínu a jeho zařazení mezi ostatními biologickými disciplínami. Vývojem máme na mysli ontogenesi neboli individuální vývoj od splývání gamet, přes embryogenesi a dospívání, po stárnutí až smrt jedince. Individuální vývoj se vymezuje od vývoje historického, či evolučního. Oba tyto distinktní typy vývoje (pro které máme v češtině v podstatě jen tento jediný akceptovaný termín) však spolu zákonitě souvisejí. Reiterací dynamického procesu ontogenese a jeho modifikací v historickém časovém makrozměru můžeme dospět k pochopení evoluční biologie. Určitá, někdy i formální podobnost obou procesů vedla v minulosti k mnohým filosofisujícím úvahám, z nichž nejznámější jsou „rekapitulační“ teze Ernsta Haeckela (1834-1919) a „fylotypové“ zákony Karl Ernsta von Baera (1792-1876). Ještě v nedávné době (zhruba do poloviny 20.

století) se termín vývojová biologie nepoužíval. Za nejdůležitější stádium života byla považována embryogenese (či základní tvorba tvarů), a proto si biologové vystačili s embryologií a ostatní fáze ontogenese (postnatální vývoj, růst, stárnutí a smrt) byly předmětem studia jiných oborů, zvláště pak anatomických či fyziologických. Z hlediska historického byla embryologie zprvu jen popisnou či teoretizující vědou (Aristoteles, 384-382 př.n.l.), s objevem mikroskopu se dostává na buněčnou úroveň (Marcello Malpighi, 1628-1694) a později nastává dlouhé a plodné období chirurgických transplantací či jiných experimentálních zásahů (Hans Spemann, 1869-1941). Ve 20. století se nedílnou součástí vývojové biologie a jejím hlavním modelem stává moucha drosophila a s ní i genetika (Thomas Hunt Morgan, 1866-1945; Ernst Hadorn, 1902-1976) a molekulární biologie (Edward Lewis, Christiana Nüsslein-Volhard, Eric Wieschaus, Walter Gehring, Matthew Scott).

Vývojová biologie rostlin

Dnešní vývojová biologie je širokým polem zastřešujícím anatomii i morfologii, fyziologii i biochemii, cytologii i genetiku a molekulární biologii. Všechny tyto obory totiž analyzují či popisují odlišné stavy či dílčí fáze života jednotlivých organismů, od bakterií, přes rostliny, živočichy až po člověka. Jde o oblasti tak rozsáhlé, že většina monografií či učebnic (jako čestnou výjimku lze uvést například Wolperta *et al.* 1998) se zaměřuje poněkud úžeji a problematiku člení podle fylogeneticky odlišných typů organismů, kde se výrazněji uplatňují principy analogie či podobnosti. Rostliny jsou tradičně považovány za bytosti natolik zvláštní, že v mnoha knihách či dokonce universitních sylabech se s nimi na poli „vývojové biologie“ vůbec nesetkáme. Do dnešního dne jsou však srovnávací studia individuálního vývoje rostlin a živočichů považována za velmi inspirující, což platí zejména po sekvenování řady jejich genomů. Posledních deset let přitom reprezentuje revoluci v chápání rostlinných genů s homeotickou funkcí či homeoboxovou strukturou.

Historické etapy vývojové biologie rostlin

Za otce vývojové biologie rostlin lze považovat slavného polyhistora a básníka Johanna Wolfganga von Goetheho (1747-1832), který jako první pochopil zákonitosti tvorby rostlinného tvaru a význam „náhodných“ změn pro jejich studium. Teprve mnohem později zobecnil smysl homeotických změn jiný slavný botanik, William Bateson (1861-1926). Rostlin jako obecných biologických modelů se ovšem začalo používat už dříve. Carl Linné (1707-1778) zaznamenává pelorickou formu květu lnice, *Linaria vulgaris*, která se stává první historicky doloženou mutací. Teprve asi o 250 let později Enrico Coen dokládá pravděpodobnou příčinu této náhlé změny květní symetrie: epigenetickou modifikaci způsobenou methylací homologu genu *cycloidea* (Cubas *et al.* 1999). Největší slávu rostlinám jako obecně akceptovaným biologickým modelům ovšem přinesli Johann Gregor Mendel (1822-1884) objevem zákonů genetiky u hrachu a Barbara McClintocková (1902-1992) objevem mobilních genetických elementů a funkce telomer u kukuřice. McClintocková také v roce 1983 získala dosud jedinou Nobelovu cenu za práci realizovanou na rostlinách. Za zakladatele české školy vývojové biologie rostlin považujeme významné osobnosti „experimentální morfologie“, které svým dlouholetým a širokým přínosem zaujímají důstojné místo i v historii světové: Bohumil Němec (1873-1966) a jeho žák Rudolf Dostál (1885-1973). Svými empirickými výzkumy nejen objasnili řadu

růstových procesů („růstové korelace“, učení o „celistvosti rostlin“), ale i anticipovali existenci a funkci později objevených růstových hormonů.

Pokud se týká výběru jednotlivých rostlinných druhů jako modelů vývojových procesů, z hlediska historické perspektivy byl velmi rozmanitý. Jednoznačně převažovaly rostliny krytosemenné, a to v širokém spektru modelů, jak to odpovídalo obrovské botanické erudici velkých přírodovědců minulých dob. Platí to zejména o Mendelovi, Němcovi či Dostálovi, jejichž výčet experimentálních modelů by dalece přesáhl rozměr této úvahy. Období „experimentální morfologie“ (asi do 50. let minulého století) bylo v 70. letech vystřídáno generací „explantátových kultur *in vitro*“. Rostlinné buňky se vyznačují vývojovou totipotencí (postuloval Gottlieb Haberlandt, 1854-1945). Každá rostlinná buňka - somatická či generativní - by měla být schopna za optimálních experimentálních podmínek dát opět vznik celé nové rostlině (sporofytu). V praxi toho ovšem bylo dosaženo jen u některých druhů rostlin, které mají vysokou regenerační schopnost. V této době se tak nejvýznamnějšími modely staly rostliny z čeledi *Solanaceae* (především tabák: kalusové kultury, organogenese, androgenese, buněčné kultury, protoplasty), *Daucaceae* (mrkev: model somatické embryogenese) a další. V 80. letech přichází revoluční technologie molekulární biologie a transgenose. Objev schopnosti půdních bakterií rodu *Agrobacterium* vnášet část svého onkogenního plasmidu do rostlinné buňky otevřela možnost testování funkce nových genových konstruktů a hlavní modelovou rostlinou zprvu zůstával opět tabák díky vysoké regenerační schopnosti *in vitro* i citlivosti vůči agrobakteriální infekci.

***Arabidopsis thaliana*: jediný modelový druh molekulární biologie rostlin?**

Další pokroky technik molekulární biologie (zejména sekvenování genomů a konstrukce DNA knihoven) však vedly k dramatické selekci jediného rostlinného modelu - huseníčku rolního - *Arabidopsis thaliana*. Huseníček se díky malému genomu (řádově srovnatelnému s klíčovými živočišnými modely mouchy *Drosophila melanogaster* a hlístice *Caenorhabditis elegans*) stává prvním rostlinným druhem s detailně charakterizovaným jaderným genomem a je základním modelem všech oblastí rostlinné biologie, včetně biologie vývojové. Každý biologický model musí být experimentálně snadno ovladatelný a časově i ekonomicky přijatelný. Ukázalo se, že další vlastnosti modelu *Arabidopsis* jsou taktéž výhodné, a tak se tato bezvýznamná plevel stala takřka výhradním modelem (metodický přehled: Martínez-Zapater a Salinas 1998). Rostlinná říse je ovšem tak mnohotvárná, že jediný model nemůže popsat její širokou diversitu vývojových procesů. Proto se také ve speciálním čísle předního amerického časopisu *Plant Physiology* objevila ediční úvaha: „*Arabidopsis* is ... an immensely important model system in plant biology, ... But *Plant Physiology* is not and never will be the *Journal of Arabidopsis Research*. Clearly, *Arabidopsis* is an inferior, or even an impossible, system for studying many important plant processes. In such instances, plant scientists should not hesitate to seek alternative model organisms even though the molecular biology of these alternative species is less completely known or absent.“ (Raikhel a Minorsky 2001).

Žádný skutečný model nemůže zobrazovat všechna specifika jednotlivých druhů či fylogenetických skupin říse rostlin (Pryer *et al.* 2002). Pokud například zjednodušíme a zobecňujeme strukturu rostlinného meristému a oblasti účinku některých klíčových genů, neuvádí se často konkrétní rostlinný druh, ale tzv. virtuální modelová rostlina. Přehled vybraných modelů rostlinné vývojové biologie uvádí Tab. 1.

Tab. 1. Některé modely vývojové biologie rostlin a jejich stručná charakteristika

Systematická skupina	Druh	DNA pg/C (chromosomy)	Charakteristika modelu	Některé internetové odkazy
<i>Chlorophyta</i> zelené řasy	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> koulenka	0,1 pg (n = 17)	jednobuněčný model fotosyntézy a chemotaxe, haploidní (vegetativní) fáze umožňuje selekci, genom sekvenován, fyzikální i genetické mapy, transgenose	http://www.biology.duke.edu/chlamy/ http://biology.ecsu.ctstateu.edu/ChlamyTeach/chlamymain.htm http://www.genome.ou.edu/chlamy.html
dtto	<i>Volvox carterii</i> váleč		koloniální (evoluční) mnohobuněčný systém, studium asymetrické mitózy, řízení diferenciace somatické a zárodečné dráhy, programovaná buněčná smrt	http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d44/volvox.htm http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/art97b/volvoxms.html http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Chlorophyta/Volvox/
dtto	<i>Acetabularia acetabulum</i> mořská víla	0,92 pg (n = 20)	velká jednobuněčná řasa umožňuje studium morfogenetických potenciálů, Haemmerlingův model úlohy jádra, posttranskripční regulace genové exprese, <i>lamp-brash</i> chromosomy	http://www.accessexcellence.org/AB/GG/hammerling_s.html http://faculty.washington.edu/mandoli/ http://vis-pc.plantbio.ohiou.edu/algaecimage/
<i>Phaeophyta</i> hnědé řasy	<i>Fucus vesiculosus</i> chaluha		jednodomá řasa s rodozměnou, vnější oplození bez zárodečných obalů umožňuje studium polarizace zygoty a vlivu fyzikálních faktorů řídicích embryogenesi	http://www.freakinfucus.co.uk/ http://www.marlin.ac.uk/index2.htm?species/Fucves.htm http://vis-pc.plantbio.ohiou.edu/algaecimage/pages/Fucus.html
<i>Bryophyta</i> mechy	<i>Physcomitrella patens</i> zkrutek	0,5 pg (n = 27)	selektce haploidních (jednodomých) fenotypů <i>in vitro</i> , unikátní schopnost homologní rekombinace (<i>gene targeting</i>), biotechnologické využití (fermentory)	http://www.moss.leeds.ac.uk/ http://www.mpiz-koeln.mpg.de/~muenster/moss.htm http://www.funet.fi/pub/sci/bio/life/plants/bryophyta/bryopsida/

Systematická skupina	Druh	DNA pg/C (chromosomy)	Charakteristika modelu	Některé internetové odkazy
<i>Pterophyta</i> kapradiny	<i>Ceratopteris richardii</i> rohatec	10 pg (n = 39)	jednodomý homosporický model hormonálně řízené determinace po- hlaví, studium buněčné signalizace a polarizace, příliš veliký genom, chybí rutinní metoda genetické trans- formace	http://cfem.bio.utk.edu/ http://chswb.lrl.k12.nj.us/psidelsky/c.fern.htm http://www.sdfem.com/othrlink.htm
<i>Magnoliopsida</i> krytosemenné, dvouděložné	<i>Arabidopsis thaliana</i> huseníček rolní	0,1 pg (n = 5)	nejmenší rostlinný genom, celý sek- venován, databáze genů, anatomické mapy, T-DNA inzerční mutanty, karyologie, techniky <i>microarrays</i> , studium me- thylací DNA a imprintingu	http://www.arabidopsis.org/ http://www.tigr.org/db/e2k1/ath1/ http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/
dtto	<i>Silene latifolia</i> knotovka bílá	2,9 pg (n = 12;X,Y)	historický model studia struktury a evoluce pohlavních chromosomů a dvoudomosti u rostlin, izolace a charakteristika prvních X- či Y-vázaných genů, studium epigenetiky a biasu	http://www.ens-lyon.fr/RDP/SitewebRDP/ http://www.virginia.edu/biology/Fac/Taylor.html http://www.ibp.cz/labs/PDG/
<i>Liliopsida</i> krytosemenné, jednoděložné	<i>Zea mays</i> kukuřice setá	3,0 pg (n = 10)	dokonalé genetické mapy, studium oplození a endospermu, paramutací, imprintingu, akcesorických chromo- somů, homeoboxových genů, determinace pohlavnosti květů	http://www.agron.missouri.edu/ http://www.ncbi.nih.gov/mapview/static/cornsearch.html http://www.plantgdb.org/zea_mays.html
dtto	<i>Oryza sativa</i> ryže setá	0,4 pg (n = 12)	nejvýznamnější plodina, nejmenší genom travin (synténie, asi 50 tisíc genů, z 50% homologů s <i>Arabi-</i> <i>dopsis</i>), genom sekvenován, integro- vány fyzikální a genetické mapy	http://www.genome.washington.edu/UWGC/Rice/ http://rgp.dna.affrc.go.jp/ http://www.plantgdb.org/oryza_sativa.html

Modely nižších systematických skupin

Nejjednoduššími „zelenými“ vývojově-biologickými modely jsou *Cyanobacterie* (např. dusík-fixující *Anabaena*), které ovšem nemají pravé buněčné jádro, a proto je řadíme mezi bakterie. Jednobuněčné zelené řasy (jako jsou *Euglena* či *Chlamydomonas*) jsou tradičně využívány ke studiu fotosyntézy, buněčného cyklu či pohybu a jsou modelem především pro svou relativní jednoduchost (Silflow a Lefebvre 2001). Mnohobuněčné řasy pak představují objekt studia buněčné diferenciaci. Koloniální řasy volvocinního typu (*Eudorina*, *Pandorina*, *Volvox*) představují persistující evoluční odraz vývoje mnohobuněčných rostlin. *Volvox* je přitom zcela unikátním modelem studia morfogenezise a diferenciaci zárodečné dráhy (Kirk 2000). Právě existence zárodečné dráhy je považována za výlučný a charakteristický rys říše živočišné, která se u rostlin nevyskytuje. V průběhu časné embryogenese (obvykle do období gastrulace) dochází u živočichů k oddělení buněčné linie, která se nepodílí na stavbě těla, po většinu ranného vývoje je klidová a v době pohlavní dospělosti dozrává meiosou v gamety. Rostliny jsou naproti tomu charakterizovány „nekonečným“ tělním plánem, kdy apikální meristém (respektive jeho „kmenové“ buňky) dává kontinuálně vznik stále novým tělním strukturám a teprve po zásadním přeprogramování vývojového procesu (způsobeném vnitřními a především vnějšími fyzikálními faktory) dochází k indukci kvetení, na jehož konci vznikají pohlavně rozlišené spory. U váleče se zjevně nejedná o „živočišný typ“ zárodečné dráhy, neboť zákonitá diferenciaci somatické a germinální linie zde nastává v průběhu asexuálního životního cyklu.

Do širšího povědomí biologické obce vstoupily i další řasy. Joachim Haemmerling ve 30. letech minulého století na experimentálním modelu jednobuněčné obří řasy *Acetabularia* prokázal, že genetická informace je uložena v buněčném jádře. Jeho přístup byl „experimentálně morfologický“: odstranění buněčného jádra z rhizoidu řasy mělo za následek ireversibilní ztrátu schopnosti vytvářet dokonalou strukturu regenerantu (Haemmerling 1953). Chalupy rodu *Fucus* vytvářejí poměrně složité mnohobuněčné tělo, u jehož zrodu stojí „nahá“ zygota vznikající fúzí gamet odlišných pohlavních typů. Snadné mikroskopické studium vnějšího oplození a asymetrického dělení zygoty přineslo objasnění vlivu některých fyzikálních faktorů i úlohy buněčné stěny na diferenciaci buněk a pletiv.

Zvláštní skupinu tvoří složitější bezsemenné rostliny, u nichž ještě výraznou roli v životních cyklech hraje existence autotrofního gametofytu. Jatrovky, mechy a kapradiny nejsou modely dosud příliš rozšířenými, avšak některé jejich rysy jsou natolik výhodné, že představují jistou alternativu „zelené revoluce“ nastupujícího století. Jatrovka porostnice mnohotvará, *Marchantia polymorpha*, je nejjednodušší dvoudomou rostlinou s rozlišenými pohlavními chromosomy a mech zkrutek, *Physcomitrella patens*, je vynikajícím molekulárně biologickým modelem (schopnost homologní rekombinace) s možností experimentální i produkční kultivace ve fermentorech *in vitro* (Schafer a Zryd 2001). Oba tyto druhy se vyznačují dominantní haplofází, která poskytuje výhodu selekce. Kapradina rohatec *Ceratopteris richardii* (zvaná „C-fern“ podle slavnějšího modelu hlístice *C. elegans*) je sice jednodomá a homosporická, ale starší prokely vylučují feromon (dosud ne zcela chemicky objasněný ceratopterin), který způsobuje pohlavní reversi z oboupohlavního typu na samčí (tedy suprimuje tvorbu samičích pohlavních orgánů, viz *Caenorhabditis*). Kaskáda genů řídících pohlavnost i buněčnou signalizaci již byla objasněna (Banks 1997).

Alternativní modely krytosemenných rostlin

Rostliny jsou známy nestabilitou genomu i flexibilitou fenotypových projevů. Klasický je příklad environmentálně indukovaných dědičných změn (genotrofů) u lnu, *Linum usitatissimum*. V posledním desetiletí se významným modelem studia abiotických stresů stal unikátní halofytní kosmatec krystalový, *Mesembryanthemum crystallinum* (ř. *Caryophyllales*). Tato rostlina se v průběhu svého individuálního vývoje podrobuje výrazným fyziologickým i morfologickým změnám, které jsou závislé též na podmínkách prostředí. Vzhledem k potenciálnímu významu pro praxi (mechanismy buněčné rezistence vůči soli a suchu) i malému genomu ($C=0,39$ pg) je i kandidátem k sekvenování celého genomu (Bohnert a Cushman 2000). Dalšími zajímavými dvouděložnými modely ke studiu stresů jsou africká bylina *Craterostigma plantagineum* z čeledi *Scrophulariaceae* (odolnost vůči desikaci, Bartels a Salamini 2001) a ostálka z čeledi *Asteraceae*, *Zinnia elegans* (studium buněčných interakcí *in vitro*, McCann *et al.* 2001).

Nezbytnost genové exprese na úrovni haploidního gametofytu rostlin („kontrolní bod“ individuálního i evolučního vývoje) zavádí důležitý selekční prvek v evoluci, čímž činí rostlinné systémy výjimečnými. Gametofyt představuje střídání životních cyklů, rodozměnu. Modelem buněčné biologie je asymetrická první pylová mitosa, ke které dochází v pylovém zrnu. Charakter chromatinových změn je i biochemickým modelem: kondenzované generativní jádro (buňka) je uvnitř buňky vegetativní (analogie se sporulací u *Bacillus subtilis*). Řízený růst a zánik buňky vegetativní (pylová láčka) je studován u *Arabidopsis* a *Lilium*, možné rozdíly dvou funkčně „souřadných“ spermií se sledují u kukuřice, *Zea mays*, a olovence, *Plumbago*.

Rostliny mají nejrozumnější systémy nepohlavního množení, včetně relativně vzácné viviparie (model *Kalanchoe daigremontiana*). Některé druhy rostlin též dovedou spontánně vytvářet semena bez oplození (apomixe, zřejmě prvně pozorována u jestřábníku, *Hieracium*). Apomixe má obrovský potenciální dopad do zemědělské výroby, neboť apomiktické rostliny jsou obvykle diploidní a představují tak vlastně techniku klonování maternálního genomu. U krytosemenných rostlin je dvojí oplození - spermie oplozují nejen oocyt (za vzniku zygoty), ale i (obvykle diploidní) centrální jádro záročného vaku (vznik endospermu). Poměr genomů je významný zejména v endospermu, neboť v něm jsou geny imprintovány (objasněno na kukuřici a *Arabidopsis*). Při studiu parentálních efektů, které ovlivňují vývin endospermu a tím i embrya byla identifikována řada genů (zřejmě nejvýznamnějšími jsou *Medea* a *Fertilization Independent Seed*), které jsou strukturně homologní regulačním genům u živočichů (Koehler a Grossniklaus 2002).

Pohlavně patří krytosemenné rostliny k heterosporickým organismům, kde haploidní spóry vznikají meiosou v bisexuálních (hermafrodité) či unisexuálních květech, které se vytvářejí na jedinech (jednodomé rostliny) či pohlavně odlišných (dvoudomé) jedincích. Nejpropracovanějším jednodomým modelem je kukuřice, kde je popsána genetická i biochemická dráha feminizace a maskulinizace květů (Dellaporta a Calderon-Urrea 1994). I když asi 5% krytosemenných druhů je dvoudomých s převažující genetickou determinací pohlavnosti, jen u několika z nich byly identifikovány heteromorfní pohlavní chromosomy. Knotovka bílá *Silene latifolia* (syn. *Melandrium album*, systém determinace savčího typu s dominantním samčím chromosomem Y) je modelem nejstarším i nejlépe molekulárně charakterizovaným (Negrutiu *et al.* 2001). Alternativním modelem je šťovík *Rumex aceto-*

sa, kde determinace je typu drosophila (X/A) a samčí jedinci mají dva chromosomy Y (Lengerová a Vyskot 2001). Snadné rozlišení pohlavních chromosomů těchto druhů umožňuje jejich izolaci mikrodisekčními technikami a konstrukci chromosomových knihoven.

Vývojová genetika

Které geny hrající významnou úlohu ve vývojových procesech rostlin jsou právě studovány? Lze odpovědět, že jsou to především analogy či homology genů živočišných a kvasinkových, neboť základní procesy řízení vývoje jsou u všech eukaryot velmi podobné. V 90. letech byl na rostlinách huseníčku *Arabidopsis thaliana* a hledíku *Antirrhinum majus* postulován slavný ABC model květního vývoje: tři skupiny genů s konzervativním MADS-boxem specifikují tvorbu květních částí ve čtyřech kruzích (kalich, koruna, tyčinky, pestíky). Tak byl v podstatě definován „florityp“: u rostlin se jako alternativa k živočišným homeoboxovým genům evolučně stabilizovala jiná konzervativní struktura transkripčních faktorů řídících diferenciaci. Posledních deset let minulého století opět tento názor pozměnilo. Na modelech *Arabidopsis thaliana* a *Zea mays* bylo prokázáno, že rostliny mají též homeoboxové geny, které řídí architekturu rostlinného těla ve vegetativním stádiu růstu. U rostlin však nejsou tyto geny uspořádány ve shlucích: neplatí „živočišné“ pravidlo kolinearity, které Edward Lewis popsal poprvé u drosofil. Recentně byly u rostlin identifikovány i regulační proteiny kódované geny skupin *Polycomb* a *trithorax*, které hrají klíčovou roli v epigenetických procesech buněčné paměti. Je zřejmé, že genetické i epigenetické mechanismy řídící vývoj eukaryotických organismů jsou v mnoha směrech podobné, i když v některých rysech (například kaskády transdukce signálů) se odlišují. Rostliny díky svým specifickým životním rysům (neschopnost lokomočního pohybu, nepřítomnost zárodečné dráhy, indefinitní typ regulativního vývoje, rodozměna) představují unikátní model vývojových procesů (Walbot a Evans 2003).

Podobně jsou studovány procesy umlčování genů (methylace cytosinu, modifikace nukleosomálních histonů, RNAi) či specifického parentálního imprintingu (*Medea*). Samozřejmě se při výběru modelů uplatňují i kritéria ekonomická. Zástupcem obilovin, který je právě zcela sekvenován a molekulárně-geneticky charakterizován, se stala nejvýznamnější světová plodina - rýže: její genom se vyznačuje vysokou sytostí s jinými trávami, ale je několikanásobně menší. Z jednoděložných rostlin patří dále mezi perspektivní modely funkční genomiky tráva válečka, *Brachypodium distachyon* (Draper *et al.* 2001), bahnička živorodá, *Eleocharis vivipara* (č. *Cyperaceae*, Ueno 2001) a *Phalaenopsis*, zástupce čeledi *Orchideaceae* s řadou unikátních evolučních rysů v reprodukčním vývoji (Yu a Goh 2001).

Pokud se týká vývojové genetiky rostlin vyšlo v poslední době v zahraničí několik monografií, které uceleně předkládají souhrn recentních informací (Lyndon 1990, Fosket 1994, Steeves a Sussex 1994, Howell 1998, Westhoff *et al.* 1998, Buchanan *et al.* 2002). V české literatuře máme hodně klasiků, současná literatura je však skoupá (Procházka *et al.* 1999, Vyskot 1999, Ondřej a Drobník 2003).

Literatura

- Banks, J.A. 1997. - Trends Plant Sci. **2**: 175.
- Bartels, D., Salamini, F. 2001. - Plant Physiol. **127**: 1346.
- Bohnert, H.J., Cushman, J.C. 2000. - J. Plant Growth Regul. **19**: 334.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. 2002. - Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- Cubas, P., Vincent, C., Coen, E. 1999. - Nature **401**: 157.
- Dellaporta, S.L., Calderon-Urrea, A. 1994. - Science **266**: 1501.
- Draper, J., Mur, L.A.J., Jenkins, G., Ghosh-Biswas, G.C., Bablak, P., Hasterok, R., Routledge, A.P.M. 2001. - Plant Physiol. **127**: 1539.
- Fosket, D.E. 1994. - Plant Growth and Development: A Molecular Approach. Academic Press, San Diego.
- Hammerling, J. 1953. - Int. Rev. Cytol. **2**: 475.
- Howell, S.H. 1998. - Molecular Genetics of Plant Development. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kirk, D.L. 2000. - J. Plant Growth Regul. **19**: 265.
- Koehler, C., Grossniklaus, U. 2002. - Curr. Opin. Cell Biol. **14**: 773.
- Lengerová, M., Vyskot, B. 2001. - Protoplasma **217**: 147.
- Lyndon, R.F. 1990. - Plant Development: The Cellular Basis. Unwin Hyman, Boston.
- Martínez-Zapater, J.M., Salinas, J. 1998. - Arabidopsis Protocols. Humana Press, Totowa,
- McCann, M.C., Stacey, N.J., Dahiya, P., Milioni, D., Sado, P.E., Roberts, K. 2001. - Plant Physiol. **127**: 1380.
- Negrutiu, I., Vyskot, B., Barbacar, N., Georgiev, S., Monéger, F. 2001. - Plant Physiol. **127**: 1418.
- Ondřej, M., Drobník, J. 2003. - Transgenoz rostlin. Academia, Praha.
- Procházka, S. *et al.* (ed.) 1999. - Fyziologie rostlin. Academia, Praha.
- Pryer, K.M., Schneider, H., Zimmer, E.A., Banks, J.A. 2002. - Trends Plant Sci. - **7**: 550.
- Raikhel, N.V., Minorsky, P.V. 2001. - Plant Physiol. **127**: 1325.
- Schaefer, D.G., Zryd, J.P. 2001. - Plant Physiol. **127**: 1430.
- Silflow, C.D., Lefebvre, P.A. 2001. - Plant Physiol. **127**: 1500.
- Steeves, T.A., Sussex, I.M. 1994. - Patterns in Plant Development. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ueno, O. 2001. - Plant Physiol. **127**: 1524.
- Vyskot, B. 1999. - Přehled vývojové biologie a genetiky (skriptum). ÚMG AV ČR, Praha.
- Walbot, V., Evans, M.M.S. 2003. - Nat. Rev. Genet. **4**: 369.
- Westhoff, P., Jeske, H., Juergens, G., Klopstech, K., Link, G. 1998. - Molecular Plant Development, From Gene to Plant. Oxford University Press, Oxford.
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessel, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E. 1998. - Principles of Development. Oxford University Press, Oxford.
- Yu, H., Goh, C.J. 2001. - Plant Physiol. **127**: 1390.

Poděkování. Práce byla podporována GAAV ČR (A6004304) a GA ČR (204/02/0417).