

PLANT TRANSPOSABLE ELEMENTS AS A TOOL FOR GENE LOCALIZATION

TRANSPOZONY ROSTLIN A JEJICH VYUŽITÍ PŘI LOKALIZACI GENŮ

^{1,2}Čegan R., ^{1,2}Hobza R., ^{2,3}Mráček J., ²Kejnovský E., ⁴Widmer A., ²Vyskot B.

¹ Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

² Plant Developmental Genetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, 612 65, Brno, Czech Republic

³ Ústav lesnické botaniky, dendrologie a geobiocenologie, Lesnická a dřevařská fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 3, 613 00 BRNO, Česká republika

⁴ Plant Ecological Genetics, Institute of Integrative Biology, ETH Zurich, 8092 Zurich, Switzerland

E-mail: xcegan@node.mendelu.cz, qqhobza@node.mendelu.cz

ABSTRACT

Transposable elements (TE) and retroelements are frequently co-localized with heterochromatin and non-coding regions of genome. MITE elements (Miniature Inverted-repeats Transposable Elements) is a class of small TE without their own transposase. Surprisingly, MITEs are often found in the vicinity of genes in some model species (rice, maize). Mechanism of transposition of these elements to coding regions is still unclear. Plant genomes have often extremely huge size and are composed of mainly repetitive sequences. Many tools were designed to subtract coding DNA (genes) from rest of genomic DNA. In this paper, we focused on using MITE elements as a tool to find new genes in *Silene latifolia* genome. *S. latifolia* is a model plant for studies concerning sex chromosome evolution. Non-recombining chromosome Y is potentially affected by degeneration processes which reduce expression of Y linked genes. Previous methods used for identification of Y linked alleles enabled to identify only several candidates. We investigated distribution of some MITE elements in genome of *S. latifolia* in context of gene distribution. Based on GenBank data we identified a MITE element in *S. vulgaris*. This species is closely related to *S. latifolia* and enabled us to characterize a homologue of the element in this species. We screened a BAC library of genomic clones with both MITE probe and complex probe containing previously published genes. We found strong co-localization of MITE element and genes in *S. latifolia*. We suggest to use MITE probe as a useful tool to find new genes in genomic libraries in *S. latifolia* and related species.

Key words: Transposable elements, MITEs, *Silene species*, BAC library, gene localization

Acknowledgments: This project was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant 204/05/H505) and Ministry of Education (grant LC06004).

ÚVOD

Transpozony neboli mobilní genetické elementy tvoří pravidelnou součást genomů rostlin. Často navozují mutace genů, jsou odpovědné za přestavby chromozomů a mohou přenášet nové znaky (horizontální genový transfer).

Transpozony obecně dělíme do dvou tříd. První třída jsou retroelementy a retrotranspozony a druhá třída jsou transponovatelné elementy.

Retroelementy jsou transpozony pohybující se (množící se) v genomech systémem „copy and paste“ tzn., že dochází k duplikaci pohybujícího se elementu. Hlavními zástupci této třídy I. jsou LTR (long terminal repeats) a non-LTR retroelementy.

Transponovatelné elementy se dělí do tří skupin na autonomní elementy, neautonomní elementy a MITEs (Miniature Inverted-repeats Transposable Elements). Tyto elementy jsou v genomu přenášeny způsobem „cut and paste“ tzn., že se z původního místa výskytu vystřihnou a včlení se na místo nové.

MITE elementy jsou často hojně zastoupeny v genomech rostlin. Jejich původ je pravděpodobně odvozen od amplifikace neautonomních krátkých elementů, které ztratily schopnost samostatné transpozice, která je řízena transpozázou kódovanou příbuzným autonomním elementem (Zhang *et al.*, 2001). V současnosti je známo několik rodin těchto elementů: Stowaway (Bureau *et Wessler*, 1994a), Tourist (Bureau *et Wessler*, 1992), Spring (Han *et Korban*, 2007), mPing (Nakazaki *et al.*, 2003), Heartbreaker (Casa *et al.*, 2000) a další. V genomu rýže představují největší podíl ze všech TE (Naito *et al.*, 2006). Každý MITE element je tvořen koncovou invertovanou repeticí (TIRs – Terminal Inverted Repeats), interní sekvencí a krátkou sekvencí, kterou je element ohraničen a kterou upřednostňuje ke své inzerci (TSD – Target Site Duplication). Způsob jejich transpozice v genomu zatím nebyl objasněn, nicméně se předpokládá, že jejich transpozice je řízena transpozázou kódovanou příbuzným autonomním elementem, která specificky rozezná jejich koncové repetice (Casacuberta *et Santiago*, 2003). V současnosti jsou známy také aktivní MITE elementy, které se dosud v genomu transponují. Mnoho MITE elementů jsou nalézány v genově bohatých oblastech, nejčastěji v těsné blízkosti genů nebo přímo v intronech či exonech (Bureau *et Wessler*, 1994b; Bergero *et al.*, 2008). MITE elementy ovlivňují transkripci a translaci genů, jejich transpozice může být také aktivována stresem a mají vliv na evoluci genů a genomů (Casacuberta *et Santiago*, 2003). Pokud jsou přítomny v pohlavních chromozomech mohou mít vliv na degeneraci chromozomu Y.

Rostliny rodu *Silene* patří do čeledi *Caryophyllaceae* sekce *Elisanthe*. V rámci tohoto rodu můžeme mezi nimi najít mnoho zástupců s různým způsobem rozmnožování (asi 300 celkem). Většina druhů z tohoto rodu má 24 chromozomů. *S. latifolia* (Silenka široolistá) i *S. dioica* (Silenka dvoudomá) jsou dvoudomé (dioecické). *Silene latifolia* i *S. dioica* mají heteromorfní pohlavní chromozomy (XY), podobně jako člověk (Vyskot *et Hobza*, 2004). Rostliny *Silene vulgaris* jsou jednodomé (monoecické) nebo hermafroditní. Rod *Silene* je velice vhodný ke studiu: evoluce pohlavních chromozomů, rezistence k těžkým kovům,

cytoplazmatické samčí sterility a speciace.

V dnešní době je známo mnoho metod, pomocí kterých se dají nalézt (identifikovat) nové geny a které byly v minulosti již použity (differential message display (Liang *et al.*, 1992), RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR (Welsh *et al.*, 1992), cDNA-AFLP (Bachem *et al.*, 1996), RDA - Representational Differential Analysis (Lisitsyn *et al.*, 1993; Hubank *et al.*, 1994), SAGE - Serial Analysis of Gene Expression (Velculescu *et al.*, 1995), mikrodisekce chromozomů (Hozier *et al.*, 1996), IMAGE - integrated molecular analysis of genomes and their expression (Lennon, 1996), a další). My v této práci předkládáme další možný (alternativní) způsob jak nalézt nové geny za využití MITE elementů, o kterých je ze starších prací známo, že se nalézají v blízkosti genů či přímo v intronech nebo exonech. Tuto cestu jsme chtěli ověřit u rostlin z rodu *Silene*, speciálně u *Silene latifolia*.

Na začátku této práce jsme si položili několik otázek: Nacházejí se MITE elementy také u rodu *Silene*? Pokud ano, v kterých částech genomu *Silene* se nacházejí? Kolokalizují MITE elementy s geny, podobně jako u jiných druhů? Jaká je hojnost těchto elementů v genomu? Vyskytují se tyto elementy v repetitivních či jedinečných sekvencích? Dají se MITE elementy využít ke hledání genů? A na tyto otázky se pokusíme odpovědět v následujícím příspěvku.

MATERIÁL A METODIKA

Rostlinný materiál a izolace DNA

Rostliny *Silene vulgaris*, *Silene dioica*, *Silene latifolia* byly pěstovány ve skleníku za standardních podmínek. Genomická DNA byla izolována z mladých listů semenáčků pomocí DNAeasy Plant Mini Kitu (Qiagen).

PCR protokol

Standardní PCR podmínky byly 95°C po dobu 4 min, následovány 35 cykly 95°C/45s, 55°C/1 min, 72°C/5 min a finální inkubace 72°C/5 min. Pro amplifikaci MITE elementu byl odvozen primer 5'-TTATACTCCCTCCTATTACCATTTT-3' ze sekvence MITE elementu z genu glutathione-S-transferázy *Silene cucubalus*, který byl nalezen prohledáváním již známých sekvencí genů *Silene* v databázích. Tento primer byl použit pro PCR s genomickou DNA *S. vulgaris*, *S. latifolia* a *S. dioica*.

Klonování PCR produktů a sekvenování

Po gelové elektroforéze (1% agaróza), byly PCR produkty přečištěny pomocí Qiagen PCR Purification Kitu a klonovány do pGEM T-easy vektoru (Promega, Germany). Purifikované vzorky byly sekvenovány v Institutu integrativní biologie v Curychu (ETH Zürich) pomocí 16 kapilárního sekvenátoru ABI 3100-Avant dle manuálu výrobce.

FISH (Fluorescence in situ hybridization)

Mitotické chromozomy byly připraveny z kořenových špiček ošetřených podle Lengerové *et al.* (2004) s drobnými úpravami. Denaturace prób byla 10 minut při 75°C. Do hybridizační reakce bylo vzato 100-400 ng denaturované próby a hybridizace probíhala 16 hodin při 37°C ve vlhké komůrce. DNA byla značena červeně pomocí Fluorolink Cy3-dUTP (Amersham Pharmacia Biotech) v kombinaci s nick translation mix (Roche) nebo zeleně se Spectrum Green direct-labeled dUTP a Nick Translation kit (obojí Vysis). Chromozomy byly barveny DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole). Pozorování mitotických preparátů bylo provedeno fluorescenčním mikroskopem Olympus AX70 a snímky byly zpracovány pomocí programu ISIS.

Screening BACové knihovny Silene latifolia

Pro screening BACové knihovny *S.latifolia* byly použity PCR produkty 15 genů a PCR produkty našeho MITE elementu a elementů Bergero *et al.* (2008). PCR produkty byly vyříznuty z 1% agaróзовého gelu a přečištěny pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu. Značení sond bylo provedeno pomocí Prime-It II Random Labeling Kitu a jako izotop byl použit α -³²P dATP, podle standardního protokolu. Membrány byly hybridizovány při 60°C po dobu 16 hodin a odmývány v 0,3x SSC/0,1 % SDS 20 minut a 0,1x SSC/0,1 % SDS 20 minut. Signály byly detekovány autoradiografií a vyhodnoceny podle manuálu dodavatele BACové knihovny.

Southernova hybridizace

Southernova hybridizace byla provedena dle Southerna (1975). Vybrané BACové klony, které pozitivně hybridizovaly s próbou obsahující mix 15 genů byly štěpeny restrikním enzymem *HindIII* (NEB). Southernovou hybridizací byly přeneseny na membránu Hybond N+. Pro radioaktivní hybridizaci této membrány byl jako sonda použit PCR produkt MITE elementu. Radioaktivní hybridizace byla provedena stejně jak je uvedeno v odstavci Screening BACové knihovny *Silene latifolia*.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Na počátku této práce u rodu *Silene* nebyl znám žádný MITE element. Proto jsme prohledali databáze sekvencí rodu *Silene* pomocí GenBank. V databázi jsme našli jeden MITE element poblíž 5' konce genu glutathione-S-transferázy u *Silene cucubalus*. Tento gen je pravděpodobně zodpovědný za rezistenci či toleranci k těžkým kovům (Prändl *et* Kutchan, 1992)(*Silene cucubalus* = *Silene vulgaris*). Pracovní název tohoto MITE elementu jsme zvolili MACAS (Mite As Coding Associated Sequence).

Sekvenování a složení MITE elementu

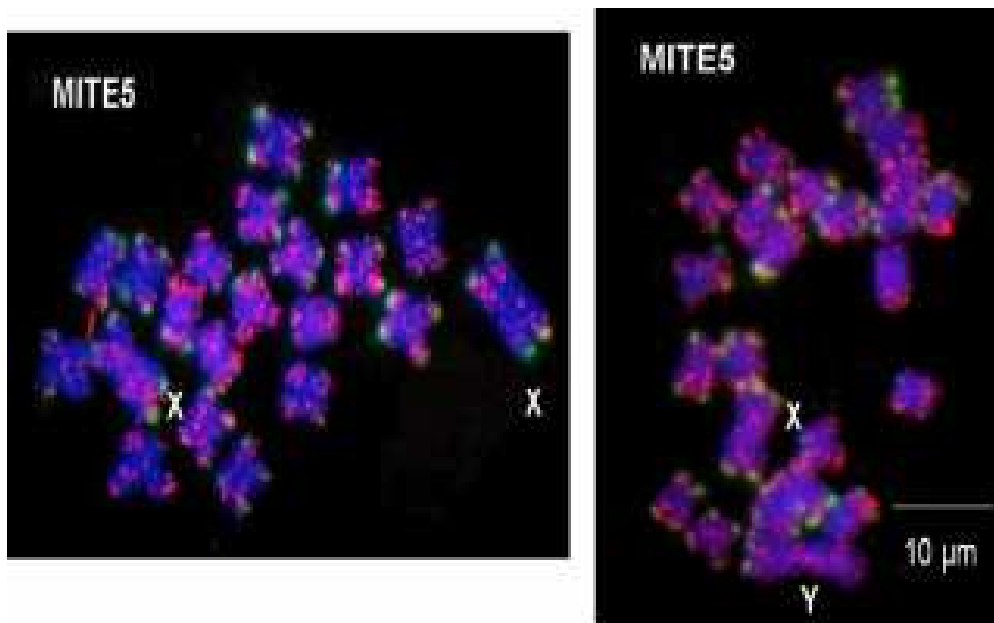
Pomocí PCR a následného sekvenování jsme získali celkem 93 sekvencí MITE elementu ze *S. latifolia*, *S. dioica*, *S. diclinis* a *S. vulgaris*. Mezi jednotlivými druhy nebyl nalezen žádný rozdíl v sekvenci TIRs ani TSD (Tab. 1). Všechny sekvence se liší jen svou vnitřní částí.

Název	TIRs	TSD	délka bp
<i>Silene cucubalus</i> glutathione-S-transferase gene MITE	TACTCCCTCCCATCCTCTATTTTCTTCCCT	TA	317
MITE element (MACAS)	TCCCTCCTATTCACCATTTTCTT (23 bp)	TA	256 - 345
SITO1	GGGGGTGTTTGGTT (14 bp)	TTA	290
EITRI	CTAGGTAGCAC (11 bp)	CTCTTGAG	407

Tab.1 Přehled a porovnání základních vlastností MITE elementů v rodu *Silene*. (Pro srovnání jsou v tabulce zařazeny v současnosti již známé MITE elementy z rodu *Silene* (Bergero et al., 2008).

Distribuce MITE elementu v genomu pomocí FISH

Pomocí fluorescenční in situ hybridizace na metafázových chromozomech *S. latifolia* jsme zjistili, že náš MITE element je lokalizován v subtelomerových oblastech chromozomů (obr. 1). Toto zjištění je v silné korelaci s výsledky získanými v naší laboratoři. Vyskot et al. (1999) zjistili, že genově bohaté oblasti jsou zvláště subtelomery chromozomů. Ve své práci využili tři přístupů. Byly to: studium acetylace histonů H4 metodou imunoprecipitace, studium DNA replikační kinetiky pomocí 5-bromdeoxyuridinu a cDNA FISH.



Obr.1 FISH na metafázových chromozomech *S. latifolia*, červená barva (Cy3) MITE sonda, zelená barva (Spectrum green) sonda X.43.1(subtelomerová próba vhodná k rozlišení X a Y chromozomu), chromozomy barveny DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole)

Screening BAC knihovny (Kolokalizují MITE elementy s geny, podobně jako u jiných druhů? Jaká je hojnost těchto elementů v genomu?)

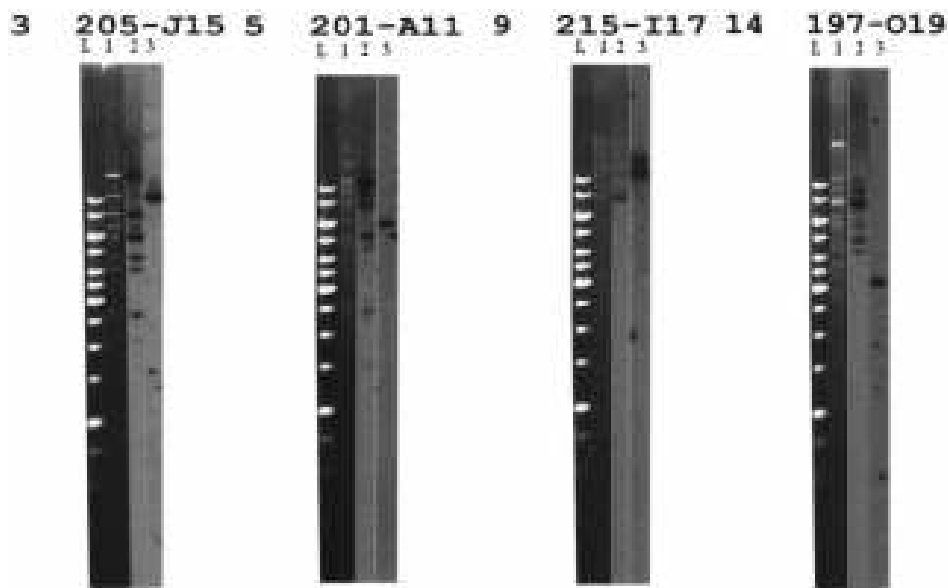
Pomocí prohledání (screening) BAC knihovny *S. latifolia* byly vybrány a izolovány BACy obsahující geny ze sondy (15) a jejich přítomnost ověřena pomocí PCR. Poté byly stejné membrány hybridizovány s MITE sondou. Bylo zjištěno, že MITE element je v genomu *S. latifolia* zastoupen přibližně v 1 000 kopiích. Z 15 BACů obsahujících geny 11 obsahuje i MITE element. Tato skutečnost potvrzuje, že náš MITE element kolokalizuje s většinou námi použitých genů.

Abychom pokryli celý genom *S. latifolia* jehož velikost je zhruba 3×10^9 bp potřebujeme alespoň 30.000 BACů. Vezmeme-li v úvahu, že *S. latifolia* má přibližně 20 000 genů a počet kopií našeho MITE elementu jsme stanovili na základě hybridizace na 1 000, tak to znamená, že jeden MITE element se nachází v každém 30 BACu. A uvědomíme-li si skutečnost, že více než polovina BACů obsahuje geny i MITE element, můžeme tvrdit, že geny jsou „klastrovány“.

Vyskytují se tyto elementy v repetitivních či jedinečných oblastech genomu?

Pro zodpovězení otázky, ve kterých oblastech genomu se náš MITE element nachází, zda to jsou repetitivní nebo jedinečné sekvence jsme provedli následující experiment. Vybrané BACy, u kterých bylo hybridizací zjištěno, že obsahují geny i MITE jsme štěpili restričními

enzymem *Hind*III a následně provedli Southernovu hybridizaci. Tato membrána byla nejprve hybridizována s genomickou DNA *S. latifolia* a poté s MITE elementem. Z obrázku 2 je zřejmé, že MITE elementy se nacházejí v nerepetitivních oblastech genomu a představují tak vhodný nástroj pro identifikaci unikátních markerů.



Obr.2 Southernova hybridizace štěpených BACů a radioaktivní hybridizace s genomickou sondou a MITE elementem (L – ladder 1kb, 1 – štěpený BAC, 2 – hybridizace s genomickou DNA *S. latifolia*, 3 – hybridizace s MITE elementem)

Další MITE elementy u rodu *Silene*

V letošním roce byly publikovány a popsány první dva MITE elementy nalezené u rodu *Silene* (Bergero *et al.* 2008). V jejich práci jsou charakterizovány SITO1 (*Silene latifolia* Tourist-like element) a EITRI element. Pomocí našich přístupů jsme provedli některé experimenty zatím jen s SITO1 elementem a zjistili jsme, že v genomu *Silene latifolia* má přibližně 400 kopií a nekolokalizuje s žádným genem, který byl použit ve výše uvedené studii přesto, že se nachází v intronu pohlavně vázaného genu *SlCypX/Y* (Bergero *et al.*, 2007), který jsme v našich analýzách nepoužili, protože nebyl znám. Při FISH experimentech jsme získali pouze slabé signály na metafázových chromozomech *Silene latifolia*. Z těchto experimentů usuzujeme, že tento MITE element není tak hojný v genomu *Silene latifolia*, a není významně kolokalizován s genovými sekvencemi.

ZÁVĚR

MITE elementy se v genomech rostlin často nacházejí v blízkosti genů. V této práci jsme identifikovali nový MITE element u druhu *S. latifolia*. Pomocí FISH jsem ukázali, že se tento element nachází v subtelomerách všech chromozomů. V dřívějších publikacích bylo ukázáno, že subtelomerické oblasti jsou u *S. latifolia* tvořeny převážně euchromatinem a jsou replikovány během buněčného cyklu jako první v pořadí. Výše uvedená data ukazují, že identifikovaný MITE element se v širším měřítku nachází poblíž genů. Přesnější určení vzdálenosti MITE elementů a genů bylo určeno pomocí paralelního prohledání BACové knihovny genomových fragmentů pomocí MITE sondy a směsné sondy obsahující geny. Bylo ukázáno, že MITE elementy jsou vzdáleny maximálně desítky kilobází od kandidátních genů (kolokalizace MITE a genů v jednom BACu) a jsou inzerovány do unikátních (ne-repetivních) sekvencí (na základě Southernovy hybridizace štěpené BAC DNA s MITE a komplexní genomovou sondou). Výše uvedená data ukazují na vhodnost použití identifikovaného MITE elementu jako nástroje pro hledání nových markerů pro genetické mapování a hledání nových genů.

LITERATURA

- Bergero R., Forrest A., Kamau E. *et* Charlesworth D. (2007): Evolutionary strata on the X chromosomes of the dioecious plant *Silene latifolia*: evidence from new sex-linked genes. *Genetics* 175: 1945-1954
- Bergero R., Forrest A. *et* Charlesworth D. (2008): Active miniature transposons from a plant genome and its non-recombining Y chromosome. *Genetics*, 178: 1085-1092
- Bachem, C. W. B., Van der Hoeven S.R., de Bruijn S.R., Vreugdenhil D., Zabeau M. *et* Visser R.G.F. (1996): Visualisation of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during tuber development. *Plant J.*, 9: 745-753.
- Bureau, T.E., Wessler, S.R. (1992): Tourist: A large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes. *Plant Cell*, 4: 1283-1294
- Bureau, T.E., Wessler, S.R. (1994a): Stowaway: A new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Cell*, 6: 907-916
- Bureau, T.E., Wessler, S.R. (1994b): Mobile inverted-repeat elements of the Tourist family are associated with the genes of many cereal grasses. *PNAS*, 91 (4): 1411-1415
- Casacuberta J. M., Santiago N. (2003): Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes. *Gene*, 311: 1-11.
- Casa M.A., Brouwer C., Nagel A., Wang L., Zhang Q., Kresowich S. *et* Wessler S.R. (2000): The MITE family Heartbreaker (Hbr): Molecular markers in maize. *PNAS*, 97 (18): 10083-10089.
- Han Y., Korban S.S. (2007): Spring: A novel family of miniature inverted-repeat transposable elements is associated with genes in apple. *Genomics*, 90: 195-200.
- Hozier J.C., Hall B.K., Sims K.R., Liechty M.C., Chen-Liu L. *et* Davis M.L. (1996): Chromosome Microdissection-Based Techniques for Genome Analysis. *Methods*, 9 (1): 74-83.
- Hubank M., Schatz D.G. (1994): Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res.* 22: 5640–5648.
- Lengerová M., Kejnovský E., Hobza R., Macas J., Grant S.R. *et* Vyskot B. (2004): Multicolor FISH mapping of the dioecious model plant *Silene latifolia*. *Theor Appl Genet*, 108: 1193-1199.
- Lennon G., Auffray C., Polymeropoulos M. *et* Soares M.B. (1996): The I.M.A.G.E. consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics*, 33: 151-152.
- Liang P., Pardee A.B. (1992): Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257: 967-971.

Lisitsyn N., Lisitsyn N. *et* Wigler M. (1993): Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, 259: 946-951.

Naito K., Cho E., Yang G., Campbell M.A., Yano K., Okumoto Y., Tanisaka T. *et* Wessler S.R.. (2006): Dramatic amplification of a rice transposable element during recent domestication. *PNAS*, 103 (47): 17620-17625.

Nakazaki T., Okumoto Y., Horibata A., Yamahira S., Teraishi M., Nishida H., Inoue H. *et* Tanisaka T. (2003): Mobilization of a transposon in the rice genome. *Nature*, 421: 170-172

Prändl R., Kutchan T. M. (1992): Nucleotide Sequence of the Gene for a Glutathione S-Transferase from Cell Suspension Cultures of *Silene cucubalus*. *Plant Physiol.*, 99, 1729-1731.

Southern E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.*, 98 (3):503-517.

Velculescu V.E., Zhang L., Vogelstein B. *et* Kinzler K.W. (1995): Serial analysis of gene expression. *Science*, 270: 484-487.

Vyskot B., Siroky J., Hladilova R., Belyaev N.D. *et* Turner B.M. (1999): Euchromatic domains in plant chromosomes as revealed by H4 histone acetylation and early DNA replication. *Genome*, 42, (2): 343-350.

Vyskot B., Hobza R. (2004): Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog. *Trends in Genetics*, 20: 432-438.

Welsh J., Chada K., Dalal S.S., Cheng R., Ralph D. *et* McClelland M. (1992): Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acid Res.*, 20: 4965-4970.

Yang G., Zhang F., Hancock C.N., *et* Wessler S.R. (2007): Transposition of the rice miniature inverted repeat transposable element mPing in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, 104 (26): 10962-10967.

Zhang X., Jiang N., Feschotte C. *et* Wessler S.R. (2001): P instability factor: An active maize transposon system associated with the amplification of Tourist-like MITEs and a new superfamily of transposases. *PNAS*, 98 (22): 12572-12577.