

# SEQUENCE ANALYSIS AND ACTIVITY TESTING OF THE GENE FOR 4-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE IN BARLEY

## SEKVENČNÍ ANALÝZA A OVĚŘENÍ AKTIVITY GENU PRO 4-HYDROXYFENYLPYRUVÁT DIOXYGENÁZU V JEČMENI

**Kosar M., Holková L., Ehrenbergerová J.**

Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: [michal.kosar@email.cz](mailto:michal.kosar@email.cz), [ehren@mendelu.cz](mailto:ehren@mendelu.cz)

---

### ABSTRACT

The gene for 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) in barley cultivars with different level of tocopherols (vitamin E) was studied. HPPD is one of the important enzymes involved in the biosynthetic pathway of tocopherols. Up to now, cultivars with the different vitamin E content do not seem to have any dissimilar or less functional allele of this gene. Till now the length polymorphism of 21 cultivars and 7 lines were evaluated. Moreover, restriction enzyme analyses of specific products were carried out in contrast cultivars with different vitamin E content. The gene sequence was found out to be longer than the published cDNA sequence in GenBank (HVAJ693). Therefore, sequencing of the second part of the gene containing intron was performed. The sequence of 816 bp contained 411 bp intron as Falk et al (2002) supposed. The reverse primer in the splicing site was designed based on the the exact exon-intron sequences. This primer will be used for the transcriptional activity analysis of the gene. The influence of this gene on the total vitamin E content and its importance of new varieties breeding will be explained by the consequent quantitative analysis of transcriptional activities in cultivars with the known vitamin E content in tissues.

**Keywords:** barley, tocopherols, vitamin E, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPPD

### ABSTRAKT

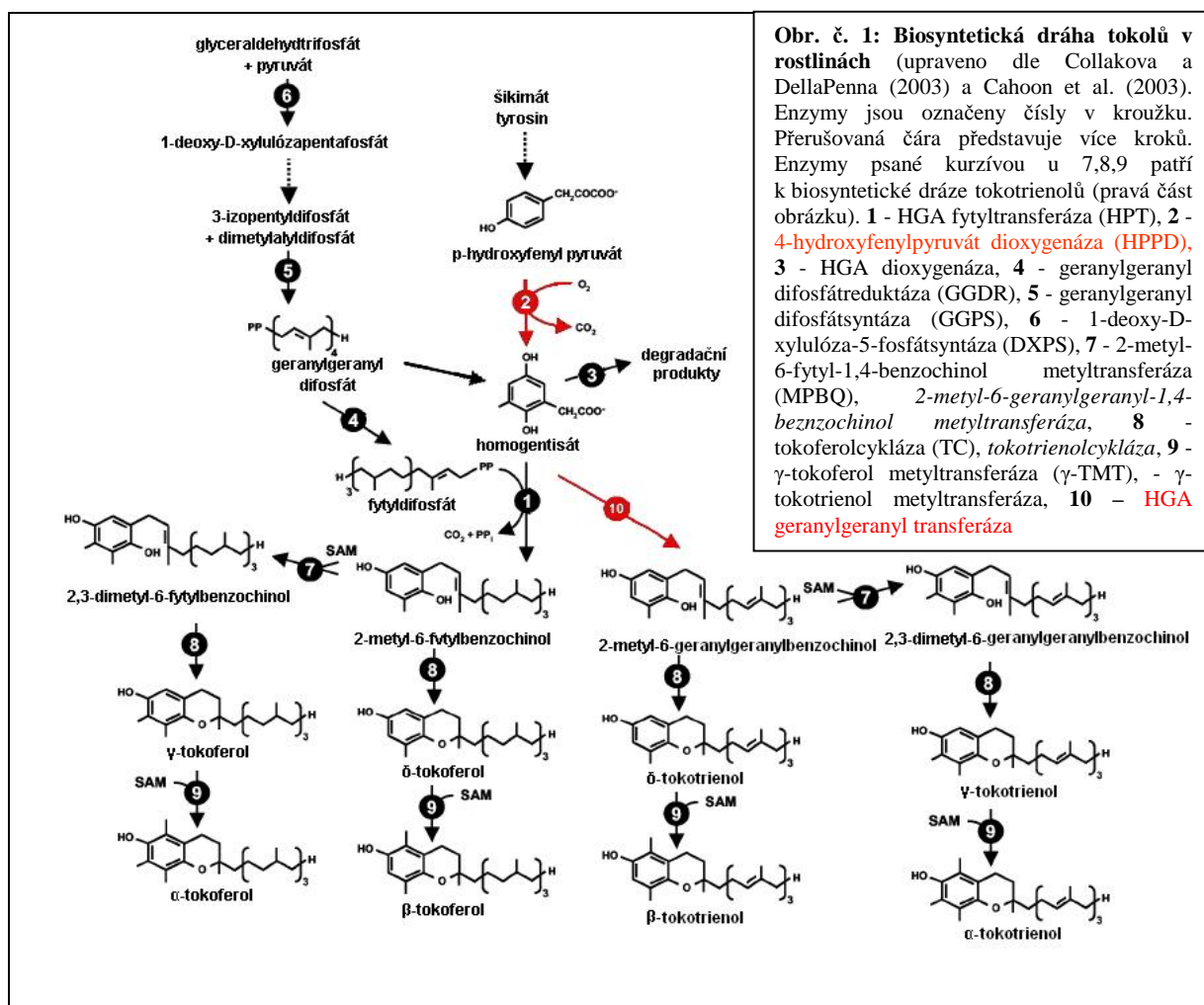
U odrůd ječmene jarního s rozdílnou hladinou tokoferolů (vitamín E) byl studován gen pro 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázu (HPPD), který je jedním z důležitých enzymů zapojených v biosyntetické dráze tokoferolů. Z dosavadních experimentů vyplývá, že linie ječmene s odlišným obsahem vitamínu E pravděpodobně nenesou odlišnou či méně funkční alelu tohoto genu. Zatím byl hodnocen délkový polymorfismus u 21 odrůd a 7 šlechtitelských linií. U kontrastních odrůd v obsahu vitamínu E byly navíc provedeny restriční analýzy specifických produktů. Ukázalo se, že sekvence genu je delší než uváděná sekvence cDNA v GenBank (HVAJ693). Proto jsme přistoupili k sekvenování druhé části genu obsahující intron u odrůd lišících se obsahem tokoferolů. Část sekvence genu o délce 816 pb obsahovala intron o délce 411 pb v místě, kde ho předpokládali Falk et al. (2002). Na základě přesných hraničních sekvencí tohoto intronu jsme navrhli reverzní primer do místa sestřihu, který bude využit při hodnocení aktivity transkripce tohoto genu. Následné kvantitativní hodnocení transkripčních aktivit u odrůd se stanoveným obsahem vitamínu E v pletivech blíže objasní vliv tohoto genu na celkový obsah vitamínu E a jeho význam při šlechtění nových odrůd.

**Klíčová slova:** ječmen, tokoferoly, vitamín E, 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza, HPPD

Tato práce byla financována z grantu VC č. 1M0570

## ÚVOD

Rostlinné látky tokoferoly a tokotrienoly souhrnně označované jako tokoly, tj.  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ - izomery vitamínu E hrají důležitou úlohu jednak přímo v rostlinách (chrání fotosyntetický aparát před poškozením volnými radikály, udržují stabilitu membrán a pomáhají rostlinám překonat stresové podmínky způsobené suchem nebo chladem) ale jsou také důležitou součástí lidské výživy. V lidském organismu chrání vitamín E nenasycené mastné kyseliny před poškozením volnými radikály. Ty napomáhají vzniku aterosklerózy, šedého zákalu, mozkové mrtvice a srdečního infarktu. Dále má vitamín E pozitivní vliv na snižování hladiny cholesterolu v krvi a v poslední době se ukazuje, že by mohl zpomalovat průběh Parkinsonovy choroby.



Zdrojem vitamínu E pro lidskou výživu jsou například rostlinné oleje, obilné klíčky, ořechy, kapusta a v neposlední řadě se k nim řadí i ječmen, výchozí surovina pro kroupy, slad a mouku, která vysokým obsahem vitamínu E obohacuje zejména pečivo vyrobené z celozrnné mouky. To je důvod pro šlechtění nových odrůd obilovin, zejména ječmene s vyšším obsahem vitamínu E v pletivech.

Ukazuje se, že jedním z důležitých enzymů, které ovlivňují celkový obsah tokolů v rostlinných tkáních je 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza (HPPD). Zvýšená exprese tohoto

genu vedla k vyššímu obsahu vitamínu E v listech i plodech u některých experimentálních druhů rostlin, např. huseníčku, tabáku nebo sóji (Tsegaye et al., 2002). Vyšší exprese tohoto genu byla nepřímo prokázána zvýšenou odolností vůči herbicidu sulcotrionu. Daleko přesnější hodnocení exprese tohoto genu by umožnilo přímé hodnocení jeho transkripce na molekulární úrovni pomocí RT PCR.

Naším cílem bylo nalézt případné mutace charakteristické pro odrůdy s vysokým obsahem vitamínu E, vyhodnotit sekvenci v oblasti intronu a do místa sestřihu navrhnout primer, který by byl použitelný pro RT PCR transkriptů tohoto genu.

## MATERIÁL A METODIKA

Pro posouzení rozdílů *hppd* u jednotlivých odrůd ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) byly použity obilky 21 odrůd (*Amulet*, *Bojos*, *Jersey*, *KM 1057*, *KM 1910*, *KM 2084*, *KM 2283*, *Malz*, *Merlin*, *Prestige*, *Sebastian*, *Tolar*, *Carina*, *Kompakt*, *Krona*, *KM 1771*, *Wanubet*, *Washonubet*, *Wabet*, *Wapana*) a 7 linií (*Kompakt x Wabet*, *Wabet x Kompakt*, *579*, *Krona x Wanubet*, *Krona x Kompakt*, *Kompakt x Krona*, *Wanubet x Krona*, *Wabet x Washonubet*), u kterých je znám obsah tokolů (viz tab. č. 1).

Tabulka č. 1: Obsah tokolů v zrně ječmene [mg/kg] (Belcrediová et al., 2004)

	$\alpha$ - tokoferoly	$\beta+\gamma$ - tokoferoly	$\delta$ - tokoferoly	$\alpha$ - tokotrienoly	$\beta+\gamma$ - tokotrienoly	$\delta$ - tokotrienoly
Kompakt	7,05	5,75	1,1	24,84	12,25	0,71
Krona	6,96	3,64	0,84	27,59	10,38	0,55
KM 1771	5,87	2,72	0,69	22,79	13,76	0,93
Wanubet	6,17	3,78	1,16	36,32	12,4	0,53
Washonubet	6,56	3,13	0,93	42,09	13,86	0,62
Wabet	7,35	4,08	1,17	34,8	12,45	0,6
Kompakt x Wabet	7,02	5,64	1,36	30,05	13,34	0,75
Wabet x Kompakt	7,41	5,57	1,38	29,4	8,87	0,67
Krona x Wanubet	6,13	5,4	1,09	25,64	10,36	0,37
Krona x Kompakt	6,66	4,45	0,98	27,01	9,61	0,49
Kompakt x Krona	8,08	4,32	0,81	27,95	8,32	0,55
Wanubet x Krona	6,47	4,02	0,94	28,44	10,14	0,42
Wabet x Washonubet	6,18	3,83	1,01	27,41	13,33	0,66

Rostliny byly vysety do perlitu a ve fázi tří pravých listů bylo odebráno cca 100 mg listové hmoty pro izolaci DNA. DNA byla izolována pomocí Dneasy Plant Mini Kit od firmy Qiagen.

Na základě referenční odrůdy Carina a její známé cDNA sekvence (HVAJ693) bylo pomocí programu Primer 3 navrženo šest párů primerů (viz. tab. 2), které byly syntetizovány ve specializované laboratoři na Přírodovědecké fakultě Masarykovy university. Nejprve byla amplifikována sekvence odpovídající takřka celému genu pomocí primerů F<sub>1</sub>R<sub>2</sub>. Poté byly optimalizovány i ostatní reakce. Podmínky vybraných reakcí uvádí tabulka č. 3. Hodnocení PCR produktů probíhalo na 1,5 % agarózovém gelu.

U kontrastních odrůd v obsahu vitamínu E byly navíc provedeny restriční analýzy specifických produktů. Restriční enzymy (Bst2U I, MboII, HgaI) byly zvoleny pomocí programu RestrictionMapper. Reakce probíhaly podle standardních protokolů udávaných výrobcem a do reakce bylo použito 2,5 – 4 ng PCR produktu ohraničeného primery F<sub>3</sub>R<sub>1</sub>, resp. F<sub>6</sub>R<sub>6</sub>. Rozštěpené PCR produkty byly hodnoceny na 5 % akrylamidovém gelu (24:1) a barveny stříbrem (Schumacher et al., 1986).

Tabulka č. 2: Sekvence používaných námi navržených primerů

<b>F<sub>1</sub></b> 5' CTTCCACCACGTCGAGTTCT <sup>3'</sup>	<b>R<sub>1</sub></b> 5' GGCTTGGTGAAGATTTGGAG <sup>3'</sup>
<b>F<sub>3</sub></b> 5' CGAATGGTCCGCTTCAAC <sup>3'</sup>	<b>R<sub>2</sub></b> 5' CTTCATGTGTGAGCCCCTCT <sup>3'</sup>
<b>F<sub>4</sub></b> 5' CGGAGCCAGATACAGACGTT <sup>3'</sup>	<b>R<sub>3</sub></b> 5' CACGCCCTCCGAGTTGTT <sup>3'</sup>
<b>F<sub>5</sub></b> 5' GACGAGAGAGGGGAAGAGTA <sup>3'</sup>	<b>R<sub>5</sub></b> 5' TGAGCCCCTCTACCATCCAT <sup>3'</sup>
<b>F<sub>6</sub></b> 5' CTCCAAATCTTCACCAAGCC <sup>3'</sup>	<b>R<sub>6</sub></b> 5' ACAATGTCAACGCTACATTT <sup>3'</sup>
<b>HPPD-RT</b> 5' GGTCGGCCTGTCCCCTACTGG <sup>3'</sup>	

Tabulka č. 3: Podmínky některých PCR reakcí

Reakce	Poloha sekvence	Očekávaná délka produktu	Skutečná délka produktu	Podmínky reakce
F <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	131 - 1114	983	cca 1000	94°C 3:00, 30 x (94°C 1:30, 58°C 1:30, 72°C 2:00), 72°C 10:00
F <sub>6</sub> R <sub>6</sub>	1095 - 1499	404	cca 850	94°C 3:00, 35 x (94°C 1:30, 58°C 1:30, 72°C 2:00), 72°C 10:00
F <sub>4</sub> HPPD-RT	834 - 1133	299	cca 300	50°C 20:00, 95°C 15:00, 40 x (94°C 1:00, 60°C 1:00, 72°C 1:00), 72°C 10:00

Sekvenování PCR produktů mezi primery F<sub>6</sub>R<sub>6</sub> odrůd Carina, Kompakt a Wabet bylo provedeno formou zakázky na Přírodovědecké fakultě Masarykovy university. Získané sekvence byly hodnoceny programem Clustal W 1.83.

Pro izolaci RNA bylo odebráno 10 obilek z klásků sklizených 8 dní po opylení (rostliny byly pěstovány v polních podmínkách v nezávislém pokusu). Izolace RNA byla provedena pomocí RNAqueous total RNA isolation kit od firmy Ambion. DNA ze vzorku byla rozštěpena pomocí DNazou Turbo DNA free od stejné firmy. Celý postup probíhal podle standardních protokolů.

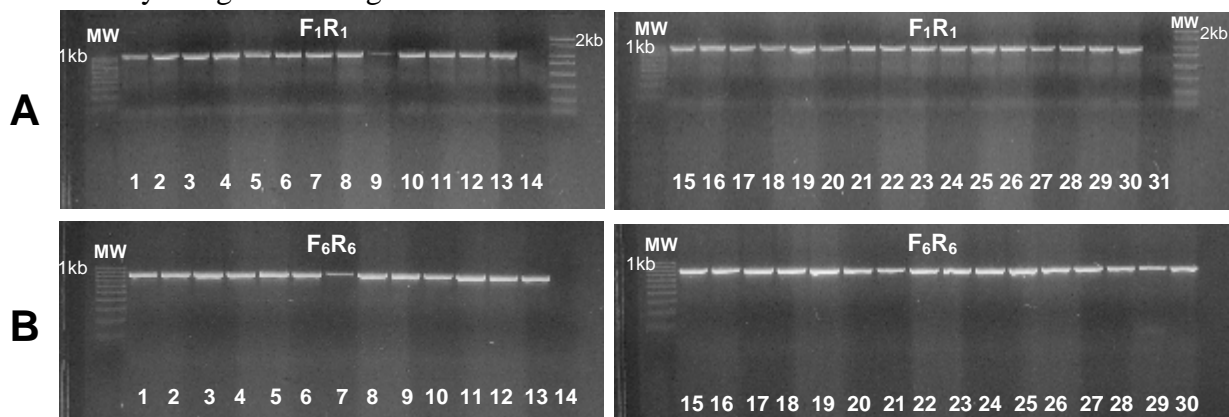
Navržený primer byl použit do „one step“ RT PCR reakce (Qiagen). Podmínky reakce jsou uvedeny v tabulce č. 3.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

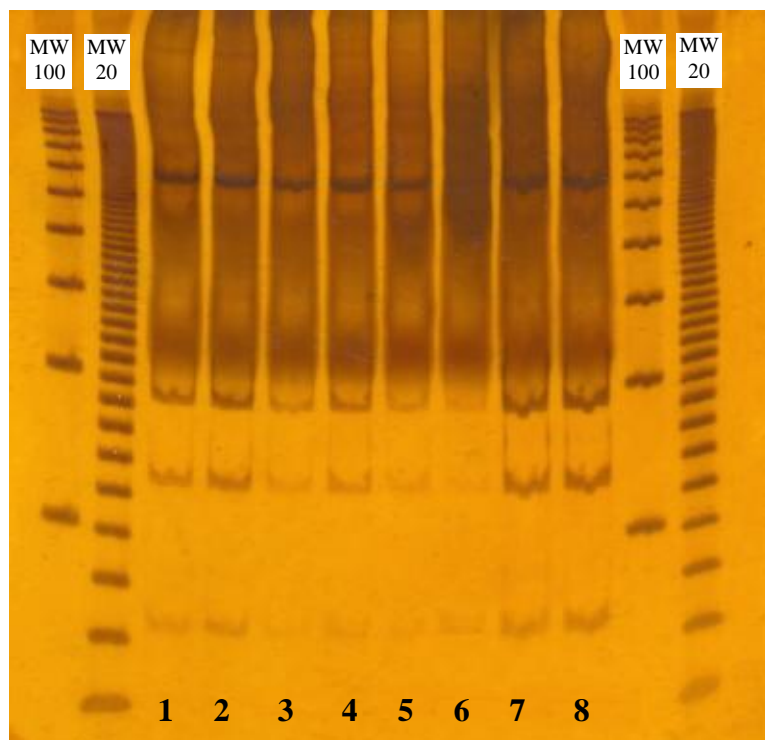
PCR produkty reakce ohraničené primery F<sub>1</sub>R<sub>2</sub> byly o cca 400 pb delší než odpovídalo uváděné sekvenci cDNA v GenBank (HVAJ693). V další části výzkumu jsme se proto zaměřili na přesnější lokalizaci intronu, jehož délka byla známa, ale v literatuře nebyla uvedena jeho přesná poloha.

Zmíněná sekvence byla lokalizována mezi primery  $F_6R_6$  (1095 a 1499 pb). Byl proto navržen primer  $R_1$  tak, abychom měli celou sekvenci genu rozdělenou na dva úseky –  $F_1R_1$  a úsek obsahující intron ( $F_6R_6$ ).

Hodnocení PCR produktů všech odrůd ( $F_1R_1$  a  $F_6R_6$ ) (viz. obr. č. 2) ukazuje, že v daných oblastech nebyl detekován výraznější délkový polymorfismus, který by byl rozlišitelný na agarózovém gelu.



**Obr. č. 2: Hodnocení délkového polymorfismu *hppd* specifických PCR produktů. A: První část sekvence genu *hppd* mezi primery  $F_1R_1$ , B: Druhá část sekvence genu obsahující intron (mezi primery  $F_6R_6$ ). Čísly jsou označeny jednotlivé odrůdy a linie. 1. Amulet, 2. Bojos, 3. Jersey, 4. KM 1057, 5. KM 1910, 6. KM 2084, 7. KM 2283, 8. Malz, 9. Merlin, 10. Prestige, 11. Sebastian, 12. Tolar, 13. Carina, 14.  $K^-$  (kontrolní vzorek neobsahující DNA), 15. Kompakt, 16. Krona, 17. KM 1771, 18. Kompakt x Wabet, 19. Wabet x Kompakt, 20. 579, 21. Krona x Wanubet, 22. Krona x Kompakt, 23. Kompakt x Krona, 24. Wanubet x Krona, 25. Wabet x Washonubet, 26. Wanubet, 27. Washonubet, 28. Wabet, 29. Wapana, 30. Carina, 31.  $K^-$ .**



**Obr. č. 3 : Štěpení PCR produktů  $F_3R_1$  enzymem Bst2U I na 5% akrylamidovém gelu (24:1): 1. Bojos, 2. KM 1771, 3. Kompakt x Wabet, 4. Krona x Wanubet, 5. Krona x Kompakt, 6. Kompakt x Krona, 7. Wanubet x Krona, 8. Carina.**

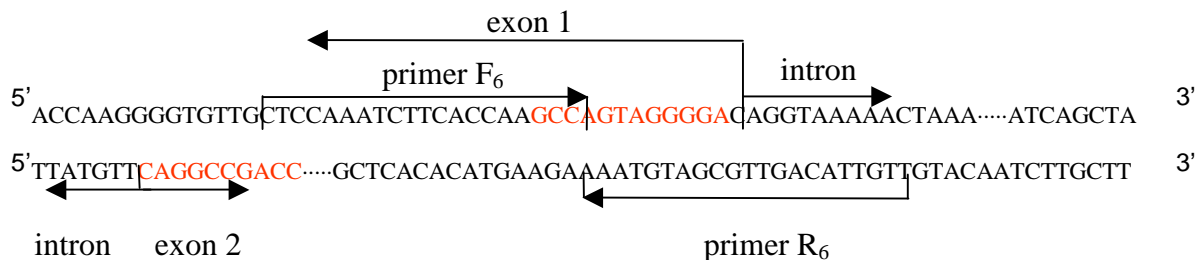
Z těchto analýz nelze vyloučit přítomnost mutací, které neovlivňují nebo málo ovlivňují délku těchto PCR produktů. Proto bylo přistoupeno k analýze založené na restrikním štěpení PCR produktů enzymy Bst2U I, Mbo II a Hga I, které byly zvoleny na základě očekávaného spektra štěpných produktů. Ani tyto analýzy však neodhalily rozdíly mezi testovanými odrůdami. Příklad reakce je uveden na obrázku č. 3.

Proto byly vybrány tři kontrastní odrůdy (Carina, Kompakt, Wabet) a úseky mezi primery  $F_6R_6$  byly

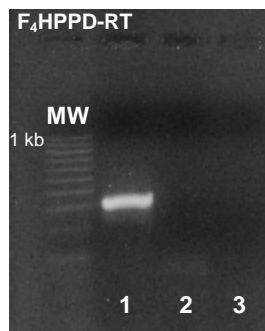
osekvenovány (viz. příloha). Získané sekvence byly porovnány se sekvencí odrůdy Carina (HVAJ693) a byla přesně určena poloha intronu mezi 1123 a 1124 pb. Uvnitř intronu byla nalezena jedna bodová mutace (záměna C → T), kterou se odlišuje odrůda Wabet od odrůd Carina a Kompakt. Velikost intronu byla 411 pb na rozdíl od uvedené velikosti 413 pb, kterou uvádí Falk et al. (2002). Zjištěná mutace zatím nebyla v literatuře popsána. Protože byl hodnocen produkt pouze z jedné PCR reakce nemůžeme vyloučit, že záměna u genotypu Wabet byla způsobena chybou při PCR reakci, nicméně bodové mutace v intronech bývají často pozorovány.

Hraniční sekvence intronu byly použity při navržení reverzního primeru do místa sestřihu, který bude využit při hodnocení aktivity transkripce tohoto genu (viz. obr.č. 4).

Obr. č. 4: Znázornění místa sestřihu, červeně je znázorněna sekvence v místě primeru HPPD-RT



Výhodou takto umístěného primeru je, že nenasedá na sekvence genomové DNA, které mohou kontaminovat vzorky RNA z aktivované tkáně i po enzymatickém štěpení Dnázou. S tímto primerem (reakce F<sub>4</sub>HPPD-RT) byla úspěšně optimalizována reakce u RNA izolované z obilí klásků odebraných osm dní po opylení (obr. č.5). RT-PCR produkty byly hodnoceny na 1,5 % agarózovém gelu a vizualizovány ethidiumbromidem.



Obr. č. 5: One-step RT PCR reakce s primery F<sub>4</sub> a HPPD-RT

1. RT PCR produkt F<sub>4</sub>HPPD-RT
2. Kontrola na příměsí DNA ve vzorku (bez reverzní transkripce)
3. Negativní kontrola bez templátu

Tato reakce bude použita k hodnocení transkripční aktivity genu *hppd* v různých pletivech u odrůd s rozdílným obsahem vitamínu E. Tyto analýzy by mohly objasnit vliv tohoto genu na celkový obsah vitamínu E a jeho význam při šlechtění nových odrůd.

## ZÁVĚR

- 1) Mezi testovanými odrůdami nebyl nalezen délkový polymorfismus na úrovni DNA. Žádné specifické mutace nebyly zjištěny ani pomocí restrikčních analýz.
- 2) Byla přesně stanovena sekvence intronu mezi 1123 a 1124 pb (číslování dle sekvence cDNA odrůdy Carina (HVAJ693).
- 3) Byly navrženy vhodné primery o ověřeny podmínky pro RT PCR reakci, kterou lze hodnotit expresi tohoto genu.

## LITERATURA

Belcrediová, N., Ehrenbergerová, J., Prýma, J., Šerhantová, V.: Factors influencing content of vitamin E and its isomers in grain of spring barley. In HORNA, A. Vitamins 2004 Targeted Nutritional Therapy. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2004.

Cahoon, E.B., Hall, S.E., Ripp, K.G., Ganzke, T.S., Hitz, W.D., Coughlan, S.J.: Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature Biotech.*, 2003, Vol. 21.

Collakova, E., DellaPenna, D.: Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2003a, Vol. 131.

Falk, J., Krauß, N., Dähnhardt, D., Krupinska, K.: The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress. *J Plant Physiol*, 2002, Vol. 159.

Schumacher, J., Meyer, N., Riesner, D., Wiedmann, H.L.: Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by „return“-gel electrophoresis. *Journal of phytopatology*, 1986, Vol. 115 – 332-343.

Tsegaye, Y., Shintani, D.K., DellaPenna, D.: Overexpression of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in *Arabidopsis* and its relation to tocopherol biosynthesis. *Plant Physiol Biochem*, 2002, Vol. 40.

Tato práce byla financována z grantu VC č. 1M0570

## PŘÍLOHA

**Sekvence ohraničená primery F<sub>6</sub>R<sub>6</sub> odrůdy Carina. Sekvence intronu (411 pb) je znázorněna modře.**

*CTCCAAATCTTACCAAGCCAGTAGGGGACAGGTAAAACTAAAGACACAAGCTTTCTCCACTTTGATTTTGGCT  
TATACATTACATGATCCATGTGTGATGCTGCAGAAAAGTACGAGTATGAAAGTTGGTGTAGGATACAGAGTT  
GAATCATAAGATAGTGAGTGCCATGATCCTATTGGAAGTATTTTAGTTCAAATGCATGATGCACCTTTATGAAG  
ATTGCCAGAATAAAAAGGGGAATAAAGTTCCCTGTGCATAGAGGAAAAGCCAACGTATATTCCCAATTCGCGCC  
ATAGATTAGCACAGGATTAGGTTTCAGGAGGTAGTATCAGTTATGCTATAAATTCAGTAATGTGAGGTTTCAGTGCT  
CTAATACATTCTAGCTGCATCTTTGCTCTACTCCCGTGCTTCCAAATCTAACTGCATCAGCTATTATGTTTCAGG  
CCGACCTTGTTCCCTGGAGATGATCCAGAGGATCGGGTGTCATGGAGAAGGACGAGAGAGGGGAAGAGTACCAG  
AAGGGTGGCTGCGGCGGGTTCGGCAAAGGCAACTTCTCCGAGCTGTTCAAGTCCATTGAAGATTACGAGAAAGT  
CCCTTGAANNCAAGCAATCTGCTGCAGTTCAGGGATCATAGGATAGAAGCTGGTCCTTGTATCATGGTCTCATG  
GAGCAAAGAAAACAATGTTGTTTGAATATGCGTCGCACAATTATATCAATGTTATAAATGGTGAAGCTGAA  
GACAGATGTATCCTATGTATGATGGGTGTAATGGATGGTAGAGGGGCTCACACATGAAGAAAATGTAGCGTTGT*