

**STUDIUM GENŮ JETELE (*TRIFOLIUM* SPP.) PODÍLEJÍCÍCH SE NA BIOSYNTÉZE FYTOESTROGENŮ****Study of clover genes (*Trifolium* spp.) involved in biosynthesis of phytoestrogens**

Štefková M., Dluhošová J., Ištváněk J., Řepková J.

*Ústav experimentální biologie, Masarykova univerzita Brno***Abstrakt**

S využitím sekvence jaderného genomu jetele lučního (*Trifolium pratense*) byly identifikovány geny kódující důležité enzymy biosyntetické dráhy isoflavonoidů (fytoestrogenů). Byly navrženy specifické primery pro některé z genů kódujících enzymy chalkon syntázu (EC2.3.1.74) a 6'-deoxychalkon syntázu (EC2.3.1.170). Pomocí metody PCR byla charakterizována jejich exprese u vybraného vzorku rostlin rodu *Trifolium*. Výsledky byly porovnány s hladinou fytoestrogenů obsažených v daných rostlinách. Nebyla potvrzena souvislost mezi obsahem fytoestrogenů v rostlinách *T. pratense* odrůdy Pramedí a mírou exprese zkoumaných genů. Větší rozdíly v expresi genů byly pozorovány při srovnání různých odrůd *T. pratense* a při porovnání *T. pratense* s *T. medium* (jetel prostřední). Expresi kandidátních genů je třeba dále kvantifikovat pomocí PCR v reálném čase.

**Klíčová slova:** *Trifolium*, fytoestrogeny, biosyntéza, exprese

**Abstract**

Using the sequence of the nuclear genome of red clover (*Trifolium pratense*) we identified genes encoding essential enzymes of the isoflavonoid (phytoestrogen) biosynthetic pathway. Specific primers were designed for some of the genes encoding enzymes chalcone synthase (EC2.3.1.74) and 6'-deoxychalcone synthase (EC2.3.1.170). Their expression was characterized in a sample of plants of the genus *Trifolium* using PCR method. Results were correlated with the amount of phytoestrogens contained in these plants. Relationship between the amount of phytoestrogens in plants *T. pratense* variety Pramedí and the expression level of studied genes was not confirmed. Larger differences in expression of the genes were observed when comparing different varieties of *T. pratense* and when comparing *T. pratense* with *T. medium* (zigzag clover). Expression of candidate genes needs to be further quantified by real time PCR.

**Key words:** *Trifolium*, phytoestrogens, biosynthesis, expression

**Úvod**

Fytoestrogeny (FE) patří mezi rostlinné sekundární metabolity, chemicky je řadíme mezi isoflavonoidy. Tyto látky mají podobné účinky jako živočišné pohlavní hormony estrogeny, což může mít jak pozitivní tak i negativní dopad na lidský a zvířecí organismus. FE jsou obsaženy především v luštěninách (sójové boby) a v pícninách (jetel, vojtěška). V jeteli je z těchto látek nejvíce zastoupen formononetin a biochanin A, méně pak genistein a daidzein. Vysoký obsah fytoestrogenů v pícninách má negativní vliv na reprodukci u samic přežvýkavců (Beck *et al.*, 2005), jedním ze šlechtitelských cílů je tedy získat genotypy s nízkým obsahem FE. Na druhou stranu genotypy s vysokým obsahem FE by mohly být využity ve farmacii jako potravinové doplňky. Byly pozorovány pozitivní účinky FE např. u žen v období menopauzy, jako jsou snížení rizika rakoviny prsu (Kim *et al.*, 2008) či prevence osteoporózy (Alekel *et al.*, 2000).

Během studie, která byla provedena v naší Laboratoři molekulární genetiky rostlin ve spolupráci s VŠCHT v Praze, byl pomocí metody ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UPLC – MS/MS) zjištěn obsah celkových i jednotlivých FE u některých odrůd *T. pratense* (850 – 3000 mg/kg) a u *T. medium* (5000 – 11 000 mg/kg; nepublikováno, ústní sdělení). Rozdíl mezi *T. pratense* a *T. medium*

byl také v poměru jednotlivých FE, u *T. pratense* je obsaženo více formononetinu ve srovnání s biochaninem A, u *T. medium* je tento poměr opačný.

Biosyntéza isoflavonoidů je u rostlin součástí dráhy fenylypropanoidů. Vede přes mnoho meziproductů a účastní se v ní mnoho enzymů. Tyto enzymy jsou často kódovány celou rodinou genů s různou expresí. Další vliv mohou mít konkurenční biosyntetické dráhy, které využívají stejné substráty jako dráha biosyntézy isoflavonoidů. V současné době probíhají studie zabývající se polymorfismy v genech kódujících důležité enzymy a také je dávají do souvislosti s obsahem isoflavonoidů (Visnevschi-Necrasov *et al.*, 2013).

Cílem naší práce bylo identifikovat a charakterizovat geny, které se podílejí na biosyntéze isoflavonoidů, pomocí bioinformatických nástrojů a molekulárních metod a najít souvislost mezi expresí těchto genů a obsahem FE. Pro tento postup byla využita sekvence jaderného genomu *T. pratense* (Ištvánek *et al.*, 2014) u které byly predikovány geny kódující proteiny.

#### **Materiál a metody**

Byly použity listy *T. pratense* odrůda Tatra a Amos (2n=4x), dále čtyři skupiny rostlin *T. pratense* odrůdy Pramedi, které byly sestaveny vzhledem k jejich kontrastnímu obsahu FE (Tab. 1). Dále byly analyzovány *T. pratense* odrůda Start (2n=2x) a *T. medium* (2n=8x).

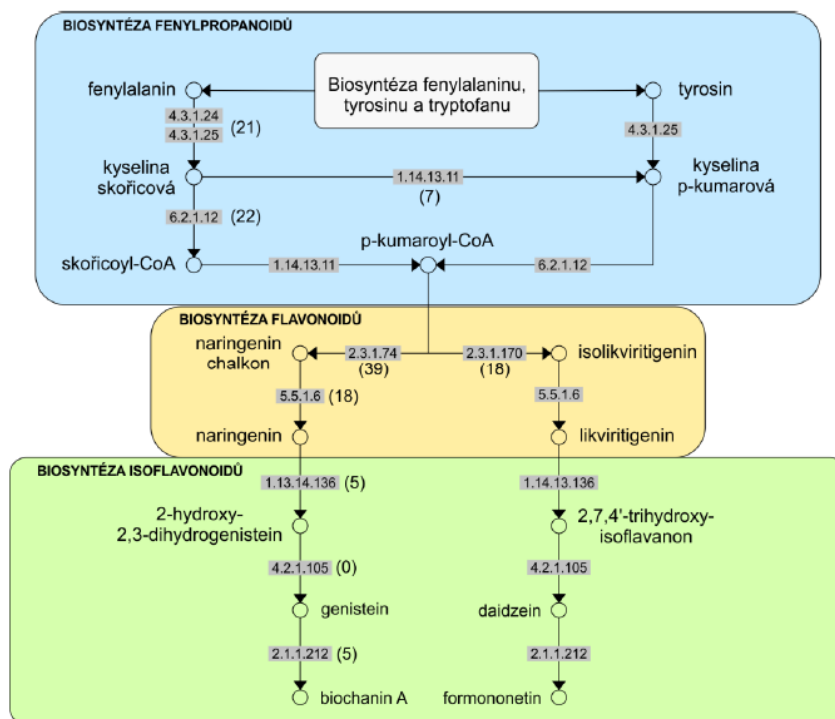
rostlina	celkové FE (mg/kg)	B+G	rostlina	celkové FE (mg/kg)	F+D
EC2.3.1.74			EC2.3.1.170		
3/8/9	2 992	1 315	67/33/28	2 600	1 752
5/6/8	2 400	1 310	3/8/9	2 992	1 674
51/4/20	1 972	1 275	18/1 1F	2 354	1 662
67/3/9	2 035	981	67/33/4	2 187	1 272
67/33/4	2 187	912	67/33/11	2 003	1 173
18/7 1F	1 254	264	9/1/14	867	313
67/3/6	851	339	9/1/10	887	377
67/33/8	929	346	9/1/21	972	429
67/3/23	1 014	350	51/4/10	1 327	444
67/3/4	890	372	67/33/23	1 069	480

Tabulka 1: Kontrastní skupiny rostlin *T. pratense* odrůda Pramedi. B+G skupiny podle obsahu biochaninu A a genisteinu, aktivita enzymu EC2.3.1.74; F+D skupiny podle obsahu formononetinu a daidzeinu, aktivita enzymu EC2.3.1.170.

Pro expresní analýzu byly vybrány dva enzymy na základě pozice v biosyntetické dráze (Obr. 1). 1) Chalkon syntáza (EC2.3.1.74), která větví biosyntetickou dráhu směrem k produkci genisteinu a biochaninu A. 2) 6'-Deoxychalkon syntáza (EC2.3.1.170), která vede k produkci daidzeinu a formononetinu. Zaměřili jsme se také na enzym flavanon-3-hydroxylázu (EC1.14.11.9), který je jedním z nejdůležitějších enzymů konkurenční biosyntetické dráhy. Byly navrženy sekvenčně specifické primery pro expresní analýzu pomocí on-line nástrojů Primer3 a Primer-BLAST a jejich funkčnost byla ověřena pomocí PCR a elektroforézy na 3% agarózovém gelu na menším vzorku RNA z vybraných rostlin.

RNA byla izolována z rostlinného materiálu kitem Rnaeasy Plant Mini Kit (Qiagen) a purifikována pomocí kitu Turbo DNA Free (Ambion). RNA byla zpětně přepsána do cDNA kitem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Tato DNA byla naředěna na alikvoty o koncentraci 500 ng/μl a byla provedena kvalitativní expresní analýza metodou PCR a elektroforézou na 3% agarózovém gelu.

Probíhá optimalizace podmínek pro relativní kvantitativní analýzu metodou RT-PCR (qRT-PCR) na přístroji 7500 Fast (Applied Biosystems); pro detekci fluorescence je využit systém se SYBR Green. Pro relativní kvantifikaci jsou jako endogenní kontrola stabilní exprese testovány geny pro aktin, 18S RNA a ubikvitin-konjugující enzym E2 (UBC2).



Obrázek 1: Zjednodušené schéma biosyntézy isoflavonoidů. Jsou uvedeny důležité enzymy včetně počtu identifikovaných genů *in silico*, které tento enzym kódují.

### Výsledky a diskuze

Byly identifikovány geny kódující klíčové enzymy biosynthetic dráhy isoflavonoidů *in silico* (Obr. 1). Biosyntézy se účastní 9 hlavních enzymů, z nichž každý je reprezentován genovou rodinou. Navíc byly identifikovány geny pro enzym EC1.14.11.9. Funkce těchto genů u *T. pratense* pak byly ověřeny srovnáním se sekvencemi příslušných enzymů z databáze GenBank, a to na úrovni sekvence nukleotidů i aminokyselin. Počty genů jsou uvedeny na Obr. 1, dodatečně vybraný enzym konkurenční dráhy EC1.14.11.9 je kódován 9 geny.

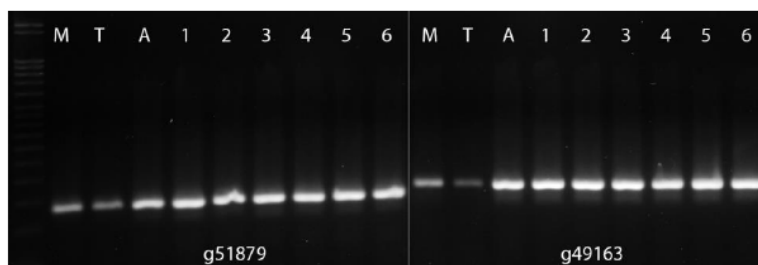
Pro geny z rodiny EC2.3.1.74 bylo navrženo 16 párů primerů, z nichž 12 bylo funkčních. Pro geny z rodiny EC2.3.1.170 bylo navrženo 6 párů primerů, pro geny z rodiny EC1.14.11.9 5 párů primerů a všechny byly funkční. Tímto byla také ověřena správnost sekvenačních dat. K ostatním genům nebylo možné navrhnout primery tak, aby byly specifické, což je způsobeno vysokou sekvenční homologií genů v rámci dané genové rodiny.

U fenotypově kontrastních skupin rostlin *T. pratense* odrůdy Pramedi se většina testovaných genů exprimuje, míra exprese je však nezávislá na obsahu fytoestrogenů (Obr. 2). Výraznější rozdíly v expresi byly pozorovány při porovnání *T. medium* a jednotlivých odrůd *T. pratense* mezi sebou, kvantitativní expresní analýzu tedy budeme směřovat do této skupiny vzorků.

Pro kontrolu stabilní exprese u metody qRT-PCR byl vybrán gen pro UBC2 (Khanlou a Van Bockstaele, 2012), jehož stabilita exprese byla ověřena na vybraném souboru rostlin *T. pratense* odrůdy Tatra, Start a *T. medium* rovněž pomocí PCR v reálném čase. Komplikací pro expresní analýzu je skutečnost, že míra exprese genů, které se podílejí na biosyntéze FE



není závislá pouze na sekvenčních polymorfismech, ale je také do značné míry ovlivněna faktory prostředí, např. působením UV záření, poraněním nebo napadením rostliny patogenem (Dao *et al.*, 2011). Exprese se také mění v závislosti na vývojovém stádiu rostliny.



Aktivita těchto enzymů může být rovněž regulována na úrovni proteinu kdy je enzym v neaktivní formě.

Obrázek 2: Ukázka expresní analýzy dvou genů kódujících enzym EC2.3.1.74. M – *T. medium*, T – odrůda Tatra, A – odrůda Amos, 1-3 – odrůda Pramedi rostliny s vysokým obsahem FE, 4-6 - odrůda Pramedi rostliny s nízkým obsahem FE.

### Závěr

Byly identifikovány geny biosyntetické dráhy FE a byla ověřena jejich exprese na vzorku rostlin rodu *Trifolium*. Nebyla potvrzena souvislost mezi expresí vybraných genů a obsahem FE. U různých druhů a odrůd *T. pratense* byly pozorovány rozdíly v expresi, které je třeba dále kvantifikovat.

### Dedikace

Tato práce je řešena s finanční podporou Programu rektora MU pro rok 2015 a projektu NAZV - QI111A019.

### Použitá literatura

- Alekel D. L., St Germain A., Peterson C. T., Hanson K. B., Stewart J. W., Toda T. 2000. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 844-852
- Beck V., Rohr U., Jungbauer A. 2005. Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? *J. Steroid Biochem.* 94: 499-518.
- Dao T. T. H., Linthorst H. J. M., Verpoorte R. 2011. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochem. Rev.* 10: 397-412.
- Ištvánek J., Jaroš M., Křenek A., Řepková J. 2014. Genome assembly and annotation for red clover (*Trifolium pratense*; *Fabaceae*). *Am. J. Bot.* 101(2): 327-337.
- Kim M. K., Kim J. H., Nam S. J., Ryu S., Kong G. 2008. Dietary intake of soy protein and tofu in association with breast cancer risk based on a case-control study. *Nutr. Cancer* 60(5): 568-576
- Khanlou K. M., Van Bockstaele E. 2012. A critique of widely used normalization software tools and an alternative method to identify reliable reference genes in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Planta* 236: 1381-1393
- Visnevschi-Necrasov T., Faria M. A., Cunha S. C., Harris J., Meimberg H. W. E., Curto M. A. C., Pereira M. G., Oliveira M. B. P. P., Nunes E. 2013. Isoflavone synthase (IFS) gene phylogeny in *Trifolium* species associated with plant isoflavone contents. *Plant Syst. Evol.* 299: 357-367.

### Kontaktní adresa:

Bc. Marie Štefková, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Laboratoř molekulární genetiky rostlin, Kamenice 5, 625 00 Brno, [393976@mail.muni.cz](mailto:393976@mail.muni.cz)