

PĒTNIECĪBAS PIETEIKUMS NR. 1.1.1.2/VIAA/1/16/094,

“TRANSPONĒJAMO ELEMENTU VARIĀCIJU IZPĒTE PARASTĀS PRIEDĒS (*PINUS SYLVESTRIS* L.) GĒNU RAJONOS”

Latvijas Valsts Mežzinātnes institūtā “Silava” Ģenētisko resursu centra radošajā grupā ir uzsākt pētījums par transponējamo elementu variāciju izpēti parastās priedes gēnu rajonos. Mobilie jeb transponējamie elementi (TE) ir nozīmīgi augu genoma regulatīvie aģenti, kas spēj pārvietoties vai pavairoties genomā, daudziem augiem tie aizņem ievērojamu genoma daļu, taču ierastajos apstākļos pārsvarā tie ir neaktīvi. Krasi mainoties vides apstākļiem vai pārdzīvojot patogēno mikroorganismu vai kukaiņu uzbrukumu, augos tiek novērota transponējamo elementu aktivizēšanās, kas var radīt izmaiņas genomā vai ietekmēt atbildes processus. Šīs izmaiņas var rasties dažādos genoma rajonos, bet, ja TE pārvietojas gēnu tuvumā, tas var vairākos veidos ietekmēt gēnu darbību. Līdz ar to augam ir iespēja nevēlamos apstākļos ātri mainīties, radīt jaunu paauzdi ar daudz vairākām gēnu un regulatīvo sekvenču kombinācijām, bet savukārt dabīgās izlases rezultātā populācijā paliek tikai adaptīvas vai neitrālas izmaiņas.

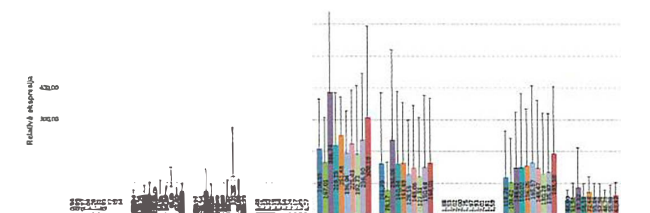
Daži augi evolūcijas procesā ir sakrājuši daudz TE sekvenču genomā, lielākā daļa no kurām patreiz vairs nepilda funkcijas. Pētnieku domas dalās – vai TE ir eikariotu genoma sastāvdaļa, vai arī tās ir invazīvās egoistiskas sekvenču grupas, kas dažos gadījumos netīšām kļūvušas noderīgas saimniekorganismam. Uzskatu, ka TE pasaule ir pārāk daudzveidīga, lai mēģinātu piešķirt konkrētu funkciju vai tās neesamību visai šo sekvenču grupai, bet ir jāizskata katra TE ģimene laikā un telpā, vai pat katra insercija atsevišķi, līdzīgi kā pētnieki to dara gēnu gadījumā. Nefunkcionālo TE sekvenču esamība genomā nenoliedz šo sekvenču nozīmi. Pieņemsim, ka nelabvēlīgu apstākļu ietekmē notiek kādas TE kopijas aktivizēšanās. Tā ievieto savu kopiju 1000 dažādās genoma vietās, kur šīm kopijām nav nekādas ietekmes, tomēr paralēli viena kopija ir radījusi funkcionāli svarīgu izmaiņu, kas dotajam organismam sniedz priekšrocību. Tādā veidā turpmākām paaudzēm tiks nodota šī svarīgā izmaiņa kopā ar citām kopijām, kas ir neitrālas un netraucē augam. Ar laiku, iespējams, zūd nepieciešamība pēc šīs izmaiņas, vai ir radušās citas, un šī sekvenču grupa degradējas, uzkrājot mutācijas. Iztēlojoties, ka līdzīgi procesi notiek ilgstoši, rodas tie degradētie TE sekvenču, pārklājoties ar daudziem citiem genoma pārstrukturēšanas procesiem (rekombinācijas, horizontālā pārnese, genoma duplikācijas, poliploidizācija un starpsuguhybridizācija), varētu izskaidrot kāpēc augu genoms pēc struktūras var būt tik sarežģīts. Kailsēkļi ir interesanti ar to, ka tiem šie procesi ir novēroti ļoti reti salīdzinājumā ar sēkļiem un genoma lielums ir nosacīts ar TE proliferāciju. Novērtējot daudzu pētījumu rezultātus, evolūcionāra loma varētu būt kopīga lielākajai šo sekvenču daļai, kā tas arī pašlaik tiek uzskatīts. Labāk izpētītajiem augiem ir aprakstīti gadījumi, ka TE pārvietojoties ir izjaucis gēna sekvenču, vai arī ar savām regulatīvajām sekvenču vai produktiem ir veicinājis šī gēna aktivitātes izmaiņas, vai palīdzējis veidot atšķirīgus proteīnus no tā paša gēna. Atsevišķas TE ģimenes pat spēj sasaistīt dažādus gēnus vienotās atbildes tīklā, tādējādi paātrinot un optimizējot šūnas atbildi nevēlamajiem apstākļos. Efektīvāk ir sintezēt dažus transkripcijas faktoros, kas var ieslēgt vai izslēgt trausmes gadījumā veselās gēnu kopas; turklāt ir iespējams, sastopoties ar jaunu patogēnu, pievienot šīm gēnu kopām jaunus gēnus, kopēt un pārstrukturēt gēnus, kas sugai palīdzētu pielāgoties jauniem apstākļiem. TE izraisītās strukturālās izmaiņas, kas nosaka auga rezistenci vai cilvēkam noderīgās pazīmes, jau tiek izmantotas labāk izpētīto kultūraugu selekcijā.

Gadījumā, ja populārākām augu sugām ir pieejamas vairāku indivīdu genoma sekvenču, tad priedes ģinti pašlaik pilnīgi sekvenētas tikai divas sugas (*Pinus taeda*, *Pinus lambertiana*), abas no tām nav raksturīgas Ziemeļeiropai. Līdzīgi kā citi priedes ģinti pārstāvji, Latvijai raksturīgās parastās priedes genoms satur ļoti daudz dažādu TE ģimeņu, bet, pētīt šo elementu variāciju gēnu rajonos, ir iespējams atrast funkcionāli un saimnieciski nozīmīgus pārkārtojumus. Tas arī ir projekta galvenais mērķis. TE pētījumi tika uzsākti mana promocijas darba “Retrotranspozonu struktūra parastās priedes (*Pinus sylvestris* L.) genomā un to ekspresija” izstrādes laikā. Tajā tika apkopoti sākotnējie dati par šo sekvenču aktivitāti priedes veģetatīvi pavairotos klonos abiogēno un biogēno stresa faktoru ietekmē. Pētīt atrastās sekvenču priedes dabīgajā populācijā, kas aug atšķirīgos biotopos, atklājās, ka koki, kas ilgstoši aug ūdens deficīta apstākļos, ir paaugstināta TE frekvence. Šie rezultāti tika pārbaudīti un apstiprināti arī ar precīzāku reālā laika Polimerāzes ķēdes Reakcijas metodi, bet atrastā tendence sakrīt arī ar citu augu genomu līdzīgiem pētījumiem. Vēlāk, pārslēdzos uz konkrēto TE analīzi, nosakot to kopiju skaitu un variāciju kailsēkļu genomos, jo šī informācija nebija iepriekš zināma. Tas ir svarīgi turpmākiem pētījumiem, kā arī praktiskiem nolūkiem, jo to var izmantot mazāk izpētīto kailsēkļu populāciju daudzveidības pētījumos. Šī projekta pirmais posms ir veltīts priedes references genomu bioinformātikai analīzei ar mērķi identificēt gēnus, kas satur TE un to potenciāli funkcionālos struktūrelementus. Izmantojot projektā paredzētās mobilitātes un tīklošanās iespējas, esmu bijusi Zviedrijas Lauksaimniecības zinātņu universitātes Augu bioloģijas laboratorijā, kur viena no grupām nodarbojas ar egles genoma analīzi. Esot viespētniece, apguvu bioinformātikas analīzes metodes, kas man sniedza pilnīgi jaunu pieredzi un zināšanas. Esmu radusi pie darba laboratorijā, bet atklāju, ka laboratorija var atrasties arī datorā. Tajā ir iekārtas (programmas), receptes (komandrindas) un paraugi (dati), kas atrodas dažādos stobriņos (noteiktos formātos un kopās). Tāpat kā laboratorijā ir jāsaprot, kā ar esošajiem rīkiem atrisināt sev interesējošo jautājumu. Galvenais, – nesajaukt komponentus. Šādā laboratorijā analizēju vairākus priežu references genomus: *Pinus taeda* v.1.01, v2.01, *Pinus lambertiana* v.1.01. un *Pinus sylvestris* nepabeigto genomu, kurš nav publiski pieejams. Kailsēkļu genomus raksturo milzīgs izmērs. Tādēļ, lai veiktu šo genomu analīzi, ir nepieciešami augstas veiktspējas skaitļošanas klāsteri, kas arī bija pieejami Zviedrijā. Turklāt šie klāsteri saturēja virkni instalētu un darba kartībā esošu programmu. Mobilitātes laikā ieguvu informāciju par gēniem, kas satur TE intronos vai gēnu flankējošās sekvenču priedes references genomus Atgriežoties Latvijā, joprojām turpinu iegūto datu analīzi, patstāvīgi meklējot risinājumus un pārbaudot datus dažādos kontekstos. Izmantojot zināmu priedes gēnu funkcionālu raksturojumu, atradu iespēju konstruēt saistīto gēnu tīklus. Tādā veidā var nojaust, vai gēni, kas satur vienādu TE, ir saistīti arī funkcionāli. Priedēm gēnu funkcionālā analīze pamatojas uz homoloģiju ar labāk izpētītiem augu gēniem, tāpēc vairāk nekā puse no priežu gēniem nav anotēta un to funkcija nav zināma. Iespējams, ka tieši šie, sugai specifiskie gēni ir iesaistīti pielāgošanās procesos. Tomēr arī ar šo informāciju ir izdevies atrast: 1) gēnu kopas, kas piedalās signālu pārnēsē, signālmolekulu piesaistē un sintēzē, 2) gēnus, kas producē rezistencē nozīmīgas vielas vai regulē šūnas augšanu. Statistiska datu analīze palīdz noprast, kuru gēnu grupu pārstāvēniecība ir

būtiskāka, salīdzinot ar visu priedes genoma anotēto gēnu grupu sadalījumu. Protams, visus atrastos tīklus nevarēšu pārbaudīt, bet pašus interesantākos gēnus atlasīšu un veikšu to izpēti, pārbaudot: 1) vai *in silico* atrastie pārkārtojumi references genomos ir atrodami arī mūsu priedes genomā, 2) kā šie pārkārtojumi variē populācijā, 3) vai gēni ar vienādiem pārkārtojumiem darbojas atbildot un līdzīgiem apstākļiem utt.

Nenoliedzami, bez savu kolēģu atbalsta, es nebūtu uzdrošinājusies uzsākt pētījumus tik sarežģītā un mūsu laboratorijai jaunā jomā. Tāpēc esmu pateicīga *Dr.chem.* Ilzei Veinbergai un *Dr.biol.* Dainim Ruņģim par iespēju darboties un attīstīties profesionāli. Šajā jomā ir tik daudz neatrisinātu jautājumu, un pastāv arī perspektīva atrast jaunu, interesantu, kā arī noderīgu informāciju.

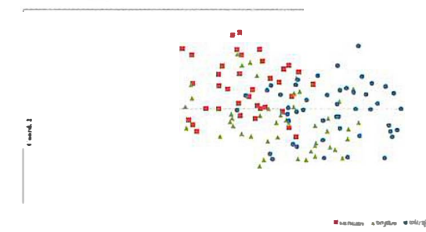
Dr.biol. Angelika Voronova,
Latvijas Valsts Mežzinātnes institūta “Silava” pētniece



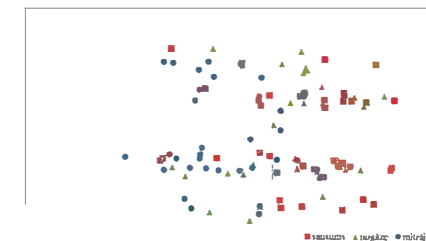
1. attēls. a) *in vitro* inokulēšana ar H.annosum, patogēnu izraisīto sakņu trūpi. b) Parastās priedes sēņi kontrolē un 21 dienas pēc inokulēšanas.



2. attēls. Viens no identificēto gēnu saistības tīkliem, kas tika veidots pamatojoties uz TE Pt184 esamību šo gēnu rajonā un bioloģiskajos procesos iesaistīto gēnu klasifikāciju.



3. attēls. Molekulāro marķieru dati priedes populācijai augoši dažādos biotopos. a) Uz TE balstīto datu analīze; b) Mikrosatelītu marķieru datu analīze tiem pašiem augiem.



4. attēls. TE ģimeņu ekspresija skujās salīdzinot priedes klonus (JA3, Sm3 un Sm9) pēc inokulēšanas ar *Lophodermium seditiosum*, izraisīto skujbīri.