

Vloga transpozonskih elementov v evoluciji in prilagoditvah kmetijskih rastlin

Žana MARIN¹, Nataša ŠTAJNER²

Received August 25, 2016; accepted September 22, 2016.

Delo je prispelo 25. avgusta 2016, sprejeto 22. septembra 2016.

IZVLEČEK

Transpozonski elementi (TE) so odseki DNK, ki predvsem pri rastlinah predstavljajo največji delež genoma. Prav zaradi njihove številčnosti in sposobnosti prehajanja znotraj genoma, lahko ključno vplivajo na fenotipske spremembe in evolucijo rastlinskih vrst, predvsem pa tudi omogočajo prilagoditev rastlin na stresne dejavnike. Preko genetskih in epigenetskih mehanizmov delovanja spreminjajo zgradbo genov, vplivajo na njihovo izražanje in ustvarjajo nova regulatorna omrežja. Delež genoma, ki ga predstavljajo in vpliv, ki ga imajo na letga, se med posameznimi vrstami močno razlikuje, bili pa so odkriti v vseh do sedaj raziskanih rastlinskih genomih. S svojim delovanjem med drugim pogosto povzročijo škodljive mutacije, zato je njihovo izražanje s strani gostitelja navadno dobro nadzorovano. Poznavanje mehanizmov delovanja transpozonskih elementov in njihovo nadaljnje raziskovanje bodo še v večji meri omogočali njihovo uporabo, na primer za namen izboljšanja agronomsko pomembnih lastnosti poljščin, za odpornost na bolezni in škodljivce in za zatiranje invazivnih vrst.

Ključne besede: transpozonski elementi, mobilna DNK, evolucija rastlin, prilagajanje na stres

ABSTRACT

EVOLUTIONARY AND ADAPTIVE ROLE OF TRANSPOSABLE ELEMENTS IN AGRICULTURAL PLANTS

Transposable elements (TE) are stretches of DNA that represent the greatest fraction of genomes, especially in plants. Because of their high copy numbers and ability to mobilize through genome, they are able to influence the phenotypic traits and evolution of plants and also plant adaptation to environmental stress. By genetic and epigenetic mechanisms, they change the gene structure, influence gene expression and create new regulatory networks. The fraction of genome that they represent and the influence they have is variable among species; however they were detected in practically every plant genome researched up to date. Deleterious mutations may be caused by their activity which is also another reason why their expression is tightly regulated by the host organism. Gaining knowledge of TE's mechanisms and research development in the future will allow us to use them, for example for crop improvement purposes, resistance development against diseases and pathogens and suppression of invasive species.

Key words: transposable elements, mobile DNA, plant evolution, stress adaptation

1 UVOD

Vir genetskih sprememb in posledično gonilo evolucije so predvsem mutacije in spremembe v uravnavanju izražanja genov, katerih povzročiteljev je več vrst. Med drugim so to tudi transpozonski ali mobilni elementi, ki ustvarjajo večji del genomske variabilnosti in lahko organizmom omogočajo hitro adaptacijo na stresne razmere. Slednja je še posebej pomembna pri višjih

rastlinah, ki kot odgovor na stresne dejavnike, ne morejo zamenjati svojega življenjskega okolja (Capy in sod. 2000).

Transpozonski elementi (TE) so odseki DNK, ki so se sposobni vključiti na nova mesta v genomu, lahko povečajo število svojih kopij in se pri tem poslužujejo ene ali več encimskih funkcij

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, zanamarin@gmail.com

² prof. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, natasa.stajner@bf.uni-lj.si

avtonomnega elementa (Lisch, 2013). Transpozicijsko aktivnih je zgolj majhen delež TE v genomu. Večina namreč ostaja v neaktivnem, dormantnem stanju, vseeno pa predstavljajo prav ti elementi največji delež večine genomov, predvsem rastlinskih (Kejnovsky in sod., 2012).

Zaradi robustnega načina podvojevanja (amplifikacije), ki izkorišča gostiteljeve celične mehanizme, so bili v preteklosti označeni kot t.i. sebična, parazitska in "odpadna" DNK (Capy in sod. 2000). Poimenovanje transpozonski elementi so privzeli šele desetletja potem, ko se je Barbara McClintock v 1940-ih letih kot prva zavedla njihovega pomena in kontrolne funkcije ter jih

glede na njihovo vlogo ustrezno poimenovala kontrolni elementi in obrazložila, da je pravi pomen njihovega obstoja nadzor, ne pa transpozicija (Comfort, 1999). Pozneje je predpostavila tudi, da so prav okoljske spremembe tiste, ki slednjo izzovejo, ta pa ustvari genetsko raznolikost, ki omogoči preživetje gostitelja v stresnih razmerah (McClintock, 1984). Za večino ostalih raziskovalcev tistega časa je bila njena hipoteza preveč optimistična. Sklepali so, da je aktivacija TE možna zgolj takrat kadar zatajijo gostiteljevi obrambni mehanizmi, ki sicer v normalnih razmerah transpozicijo zavirajo (Casacuberta in González, 2013).

2 TRAN스포ЗОНСКИ ELEMENTI

Transpozonski elementi so prisotni v praktično vseh organizmih, do sedaj odkrite izjeme so le redke (npr. *Plasmodium falciparum* (William H. Welch, 1897)). Velik pomen ima njihova prisotnost predvsem za rastline, pri katerih TE ustvarjajo izjemne razlike v velikosti genomov. Ugotovljeno je bilo, da je število genov v praktično vseh rastlinskih genomih primerljivo, in sicer med 5.000 in 50.000, kar pomeni, da so razlike med vrstami desetkratne, gledano z vidika velikosti celotnih genomov, pa je razlika tudi do 200.000-kratna (za primerjavo – navadni repnjakovec - *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ima 26.200 genov, celoten genom je velik 120 Mbp, koruza - *Zea mays* L. pa ima 30.000 genov v 2.061 Mbp velikem genomu). Nekodirajoči del genomov je v glavnini sestavljen iz ponavljajoče se DNK, kamor uvrščamo tudi TE (Wicker, 2012).

2.1 Značilnosti

Izvor TE še vedno ni popolnoma jasen, njihova prisotnost v organizmih pa nakazuje, da so se pojavili že zelo zgodaj v evlucijskem razvoju evkariontov ali celo v času zadnjega skupnega prednika, še pred pojavom epigenetskih mehanizmov, ki jih sicer uravnavajo (Smith, 2015).

V grobem TE delimo v dva glavna razreda – razred I in II, glede na prisotnost oz. odsotnost RNK kot vmesnika transpozicije.

Elementi razreda I ali retrotranspozoni so najpogostejši elementi v rastlinskih genomih in jih nadalje ločimo na LTR (long terminal repeats) in ne-LTR retrotranspozone. Proces premeščanja LTR retrotranspozonov (slika 1, razdelek a), ki so na obeh koncih zamejeni z dolgimi terminalnimi ponovitvami (LTR-long terminal repeat) in kodirajo Gag proteine, reverzno transkriptazo, proteazo in integrazo, se prične v 5' LTR. Ta vsebuje promotor katerega prepozna gostiteljeva RNK polimeraza II in prepíše TE v mRNK (pomeni prisotnost RNK intermediata TE). V prvem koraku se Gag proteini organizirajo v virusom podobne delce, ki vsebujejo mRNK, reverzno transkriptazo in integrazo. Reverzna transkriptaza prepíše mRNK v dsDNK (double stranded DNA). V drugem koraku nato integraza to cDNK (complementary DNA) vstavi na novo pozicijo v genomu. TE, ki je bil matrica za prepis pa ostane na svoji izvorni lokaciji (Levin in Moran, 2011).

Ne-LTR retrotranspozoni, elementi SINE (short interspersed nuclear elements) in LINE (long interspersed nuclear elements) ne vsebujejo LTR zaporedij in kodirajo enega ali dva odprta bralna okvirja (ORF-open reading frame) (slika 1, razdelek b). Prav tako kot pri LTR retrotranspozonih, tudi v tem primeru pride do tvorbe mRNK, se pa ti elementi premikajo preko TPRT mehanizma (target-site-primed reverse transcription), pri katerem v elementu zakodirana endonukleaza prelomi eno verigo DNK in

izpostavi 3'-OH konec, ki je uporabljen kot začetno mesto za reverzno transkripcijo RNK. Nastala cDNK se nato enako integrira na novo mesto v genomu (Levin in Moran, 2011). Z vsakim premikom se v primeru vseh predstavnikov razreda I ustvari nova kopija elementa, zato govorimo o replikativnem ali t.i. »kopiraj in prilepi« mehanizmu transpozicije (Kejnovsky in sod., 2012).

Transpozicija elementov razreda II ali DNK transpozonov (slika 1, razdelek c) pa poteka preko t.i. »izreži in prilepi« mehanizma, ki predstavlja konzervativen način replikacije, pri katerem ne nastajajo nove kopije elementov (Kejnovsky in sod., 2012). TE se namreč iz prvotnega mesta fizično izreže in vključi na novo lokacijo s pomočjo encima transpozaza, ki je kodiran znotraj elementa in prepozna TIR (Toll/interleukin-1 receptor (TIR) homology domain) domene, ki TE razreda II omejujejo. Dvojni zlom, ki po transpoziciji ostane na prvotni lokaciji, popravijo popravljalni mehanizmi gostiteljskega organizma (Lisch, 2013). Število kopij teh elementov se poveča zgolj izjemoma, v primeru, da izrez in reintegracija nastaneta med DNK podvojevanjem in se TE premakne z že podvojenega dela DNK na še neprepisanega (Grandbastien, 2015).

V rastlinah se najpogosteje pojavljajo TE, ki so predstavniki *hAT* (*hobo*, *Activator*, *Tam3*), *CACTA*

in *MULE* (*Mutator* tipa) superdružin elementov razreda II (Lisch, 2013). Pri vseh razredih ločimo med TE še tiste, ki so avtonomni, kar pomeni, da kodirajo vse potrebne encime za transpozicijo in ne-avtonomne, ki se za potrebe premikanja zanašajo na mehanizacijo avtonomnih TE (Wei in Cao, 2016). Najbolj zastopani neavtonomni TE so MITE (Miniature Inverted-repeat Transposable Elements), ki so večinoma delecijiski derivati avtonomnih elementov ali sekvenc, ki so avtonomnim TE podobne na njihovem terminalnem delu, za transpozicijo pa izkoriščajo prisotnost avtonomnih elementov in encimov, ki jih le-ti kodirajo (Lisch, 2013). Drug podrazred elementov razreda II (Kejnovsky in sod., 2012; Wicker, 2012) oz. dodaten razred glede na alternativni način klasifikacije (Lisch, 2013), predstavljajo *helitroni*. Elemente v razred II združuje odsotnost RNK intermediata, ne pa nujno tudi skupen izvor (Wicker, 2012).

Helitroni se premikajo preko podvojevanja na način kotalečega se kroga (»rolling-circle«) mehanizma transpozicije, ki se začne z zlomom verige DNK na terminalnem delu *helitrona* in v tarčni regiji integracije. Sledijo premestitev sekvence in njena integracija s formacijo heterodupleksa, DNK sinteza na mestu izreza in podvojitev DNK vstavljene sekvence (Lisch, 2013).

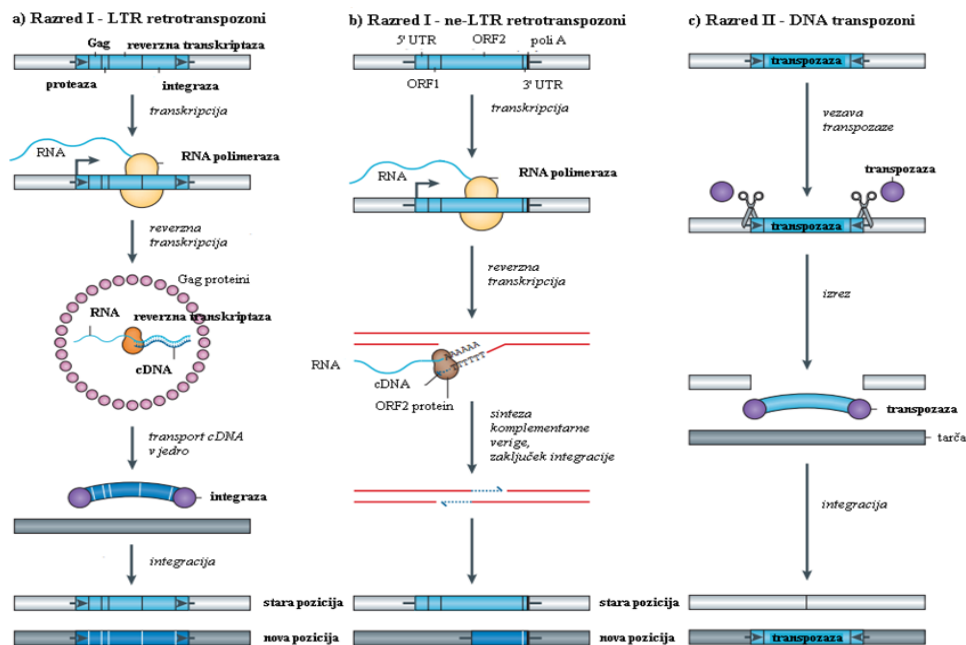


Figure 1: Zgradba in mehanizmi transpozicije različnih TE (Levin in Moran, 2011: 617)

2.2 Vloga in delovanje TE v rastlinskem genomu

TE so bili v preteklosti večinoma obravnavani kot negativni elementi genoma. Zaradi pozitivne selekcije na ravni DNK, ki je bila posledica sposobnosti hitrejše replikacije TE sekvenc kot gostiteljevih, so bili pogosto okarakterizirani kot sebična DNK. Po drugi strani pa je bila na ravni gostiteljskega organizma prisotna negativna selekcija zaradi TE insercij, ki so vodile v za gostitelja škodljive mutacije, osnova za hipotezo o »odpadni« DNK (Kidwell in Lisch, 2001). Zanimarjena in predvsem nerazumljena je bila njihova vloga v uravnavanju izražanja genov in spreminjanja fenotipov (slika 2) (Wei in Cao, 2016).

Dinamičnost mehanizmov TE in njihovo delovanje na različne načine prispevata k izražanju genov ter s tem variabilnosti fenotipov in evoluciji rastlin. Lahko pa TE tudi vplivajo na nova ali preusmerijo delovanje obstoječih regulatornih omrežij preko genetskih in epigenetskih mehanizmov, kar vodi v fenotipsko plastičnost ter dalje v adaptacijo in s tem naravno selekcijo (Wei in Cao, 2016).

Veliko število raziskanih in v literaturi opredeljenih primerov opisuje posledice delovanja TE in njihov vpliv na spreminjanje fenotipskih lastnosti rastlin. Mehanizme, preko katerih TE vplivajo na evolucijo rastlin in njihovo prilagoditev na stresne dejavnike, Wei in Cao (2016) delita na genetske in epigenetske.

2.2.1 Genetski mehanizmi

2.2.1.1 Insercijska inaktivacija

Delovanje TE se najbolj očitno kaže v inaktivacijah genov (slika 2, razdelek a) zaradi insercij elementov v protein kodirajoča območja, največkrat zaradi predčasnega pojava terminacijskega kodona ali prekinitve bralnega okvirja (Smith, 2015).

Insercija TE je tako pri žlahtni vinski trti (*Vitis vinifera* L.) povzročila spremembo barve plodu. Vstavitev *Gret1* LTR retrotranspozona, ki je pri temno rdeči sorti 'Cabernet' odsotna, je pri beli sorti 'Chardonnay' vodila v izgubo funkcije

Vvmy1A gena in s tem posledično tudi do izgube rdeče barve (Lisch, 2013).

2.2.1.2 Domestikacija TE in vpliv na regulacijo ekspresije gostiteljevih genov

Določeni TE so lahko udomačeni (slika 2, razdelek b) zaradi prispevka njihovih kodirajočih sekvenc in regulatornih elementov. To še posebej velja za LTR retrotranspozona, katerih LTR deli lahko delujejo kot promotorji in viri regulatornih sekvenc (*cis*-regulatorni elementi itd.) (Bui in Grandbastien, 2012).

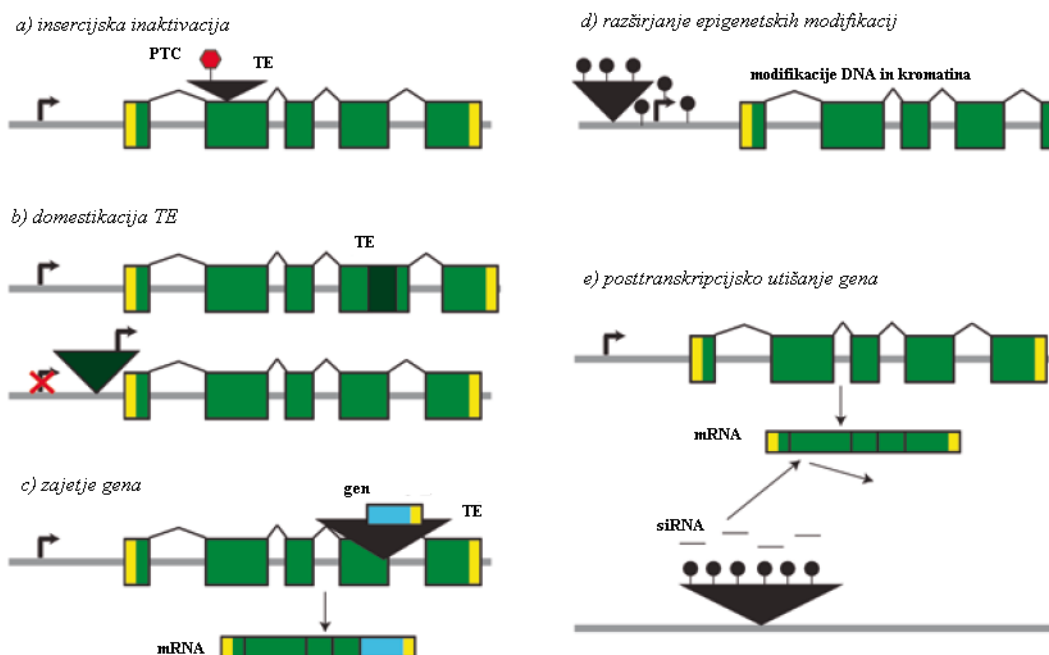
Primer domestikacije *Copia* tipa elementa, ki je vstavljen v *RPP7* gen za odpornost na oomiceto *Hyaloperonospora parasitica* (Pers.) Constant., je poznan pri navadnem repnjakovcu (Tsuchiya in Eulgem, 2013), podoben pojav pa je bil raziskan tudi pri vrsti tobaka *Nicotiana glutinosa* L., kjer MITE domestikacija v *N* genu povzroči alternativno izrezan ekson in tako omogoča odpornost na mozaični virus tobaka (Smith, 2015).

Drug primer opisuje toleranco na aluminij (Al) pri različnih vrstah trav in tudi žitih, ki je povezana z insercijo LTR retrotranspozona. Ta nadzoruje povečanje in relokalizacijo ekspresije citratnih transporterskih genov v koreninski vršiček. Ti geni kodirajo proteine, ki Al odstranjujejo iz rastline in jim omogočajo rast tudi v onesnaženih tleh (Grandbastien, 2015).

2.2.1.3 Zajetje gena

TE lahko zajamejo, podvojijo in mobilizirajo tudi gene in genske fragmente gostitelja (slika 2, razdelek c), ki jih retrotranspozoni podvojijo preko reverzne transkripcije njihove mRNK in tako nastane retrogen, DNK gen kopiran nazaj iz RNK z reverzno transkripcijo. Fragmenti retropoziranih genov so lahko združeni z gostiteljevimi in tako povzročijo nastanek himernih proteinov (Contreras in sod., 2015).

TE za katere je omenjena aktivnost najbolj značilna so *helitroni*, ki s svojim mehanizmom pomnoževanja pogosto zajamejo gostiteljske gene. Tako več kot ena tretjina *helitronov* koruze vsebuje vsaj en genski fragment gostitelja in s premeščanjem genskih sekvenc potencialno generirajo nove genske strukture z različnimi funkcijami (Contreras in sod., 2015).



Slika 2: Vpliv delovanja TE (Smith, 2015: 147)

2.2.2 Epigenetski mehanizmi

Navkljub mnogim primerom potencialnih prednosti insercije TE, je najbolj pogost učinek njihove vstavitve v bližino promotorja gostiteljevega gena, njegova inaktivacija s strani epigenetskih mehanizmov (Contreras in sod., 2015). Utišanje vstavljenih TE gostitelji največkrat dosežejo z DNK metilacijo, histonskimi modifikacijami in RNK interferenco, ki pa lahko hkrati vplivajo tudi na bližnje gene, najpogosteje z zmanjšanjem njihove ekspresije ali utišanjem (slika 2, razdelek d) (Wei in Cao, 2016).

Koruza in soja sta dve kratkodnevni rastlini, katerih določeni kultivarji so se kot posledica insercije TE uspeli prilagoditi na rast tudi v drugih, manj optimalnih geografskih območjih, v katerih vladajo razmere za rast dolgodnevnih rastlin. Gen

GmphyA2 za fitokrom A v soji je zaradi vstavitve *Copia* tipa retrotranspozona hipermetiliran in se posledično veliko manj prepisuje. V koruzi se podobno insercija *CACTA* tipa elementa v *ZmCCT* promotor odraža v epigenetskem uravnavanju občutljivosti na fotoperiodo. Zaradi manjše občutljivosti na dolžino dneva, so specifični kultivarji teh dveh poljščin sposobni uspevati v neoptimalnih svetlobnih razmerah (Wei in Cao, 2016).

Bolj zapletene prerazporeditve TE lahko vodijo v produkcijo miRNK (microRNA), ki izvirajo iz TE in lahko uravnavajo protein-kodirajoče gene preko post-transkripcijskih genskih utišanj. Vpliv na izražanje genov pa lahko TE dosežejo tudi preko utišanja genov, ki niso v neposredni bližini (slika 2, razdelek e).

3 VLOGA TE V GENOMU RASTLIN

Posledice prisotnosti TE v genomih so raznolike in precej zapletene (primeri v preglednici 1), saj so neposredno odvisne od mesta insercije elementa, odziva gostiteljskega organizma in njegovih obrambnih mehanizmov na vključitev, interakcij med njima, pomembno pa je tudi trenutno stanje gostitelja in morebitni okoljski vplivi. Delovanje

TE je kompleksno in zelo specifično, organizmu pa lahko omogočijo selekcijsko prednost ali pa v njem povzročijo celo uničujoče mutacije (Tsuchiya in Eulgem, 2013).

Kot primer koristne prisotnosti TE je v nadaljevanju opisan primer rdeče pomaranče, ki so

ga preučevali Butelli s sod. (2012), pri katerem gre za insercijo *Copia* tipa retrotranspozona v bližino

gena *Ruby*, ki je transkripcijski aktivator tvorbe antocianinov.

Preglednica 1: Primeri vpliva TE na variabilnost pri rastlinah (povzeto po Wei in Cao, 2016: 27-28)

Regulatorni mehanizem	TE klasifikacija	Reguliran gen	Rastlinski fenotip
Insercijska mutageneza	Razred II, Ac/Ds	SBEI	nagubana semena graha – odziv na osmotski stres
	Razred I, <i>Gret1</i>	<i>Vmby1A</i>	spremembe v barvi grozdja
	Razred II, Ac/Ds	<i>C</i>	različno obarvanje koruznih semen
Regulatorni elementi	Razred I, LTR, <i>Pit Renovator</i>	<i>Pit</i>	odpornost na glivo <i>M. oryzae</i> (T.T. Hebert) M.E. Barr. pri rižu
	Razred II, MITE	<i>AltSB</i>	toleranca na aluminij pri sirku
	Razred II, MITE, <i>mPing</i>	Os01g0299700, Os02g0135500, Os02g0582900	odziv na stres pri rižu
	Razred I, <i>Copia</i> -like, <i>COPIA-R7</i>	<i>RPP7</i>	odziv na prisotnost oomicete <i>H. parasitica</i> pri n. repnjakovcu
Epigenetska regulacija	Razred II, MITE	<i>MAIFI</i>	ABA signaliziranje in odziv na abiotski stres pri rižu
	Razred II, MITE	<i>ZmNAC111</i>	vpliv na toleranco na sušne razmere pri koruzi
	Razred I, <i>Copia</i> -like, <i>SORE-1</i>	<i>GmphyA2</i>	neobčutljivost na fotoperiodo pri soji

3.1 Vloga TE pri sintezi antocianinov

Rdeče pomaranče so sadje za katero so dokazali, da njihovo uživanje pripomore k izboljšanju zdravja, pozitivno vpliva na stanje kardiovaskularnega sistema, predvsem zaradi velike vsebnosti vitamina C, karotenoidov in antocianinov, ki omogočajo antioksidativno delovanje. Kljub velikem povpraševanju, tudi zaradi vizualne pestrosti, pa je oskrbovanje trga z njimi omejeno zaradi nezanesljive proizvodnje, pri kateri je polna tvorba barve pomaranč odvisna od nizkih temperatur (Butelli in sod., 2012).

Večina modernih sort rdečih pomaranč se je razvila iz starih italijanskih, taka je npr. 'Doppio Sanguigno', med novejši pa spadata 'Tarocco' in 'Moro' (Butelli in sod., 2012).

Antocianini so naravni pigmenti, ki jih lahko zasledimo v rdečem, vijoličnem in modro obarvanem sadju, cvetovih in tudi vegetativnih organih rastlin. Njihova sinteza je v večji meri regulirana na ravni transkripcije. Regulatorni kompleks, ki ga sestavljajo predvsem Myb proteini in družina transkripcijskih faktorjev z WD ponovitvami, uravnava izražanje strukturnih genov, ki so potrebni za sintezo antocianinov, njihovo modifikacijo in transport. V rdečih pomarančah je ekspresija določenih antocianin biosinteznih genov močno povečana v primerjavi z navadnimi pomarančami, ki imajo oranžno obarvana tkiva plodu. Raznolikost v intenzivnosti pigmenta in tkivni specifičnosti je odvisna pretežno od aktivnosti R2R3 Myb transkripcijskih faktorjev v omenjenem kompleksu. Delni cDNK fragment, ki kodira ohranjeno Myb DNK (MYB-myeloblastosis) vezavno domeno tipično za R2R3 Myb transkripcijski faktor, so izolirali iz pomaranč

sorte 'Moro' s pomočjo degenerativnega PCR in ga poimenovali *Ruby* (Butelli in sod., 2012).

Gen *Ruby* so nato klonirali iz treh sort rdečih pomaranč ('Sanguinelli', 'Maltaise Sanguine' in 'Moro') ter iz treh sort navadnih ('Navalina', 'Salustiana' in 'Cadenera'). Primerjava sekvenc je pokazala popolno ujemanje nukleotidnega zaporedja v treh eksonih in dveh intronih, ki sestavljajo gen, zato so sklepali, da se razlika v izražanju gena pojavi zaradi različnega uravnavanja na ravni *Ruby* transkripcije. Pri navadnih pomarančah se ta gen namreč ne izraža. Z izolacijo in raziskavo regulatornih regij gena so ugotovili, da se pri sortah rdečih pomaranč pojavlja insercija TE, ki pripada družini *Copia* tipa TE in ga opredelili kot Tcs1 (Butelli in sod., 2012).

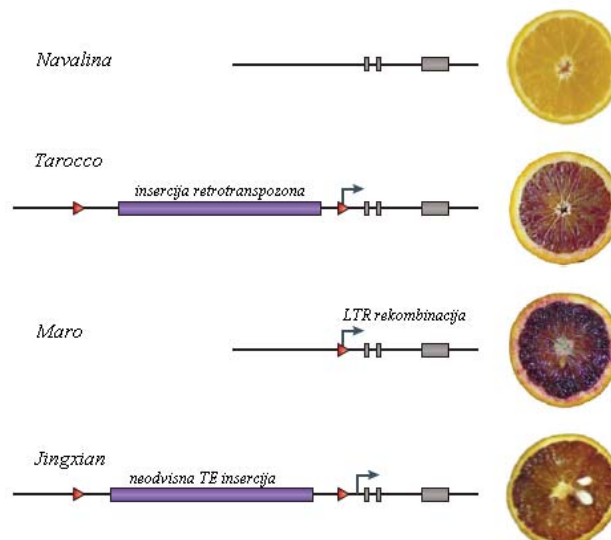
Tcs1 je 5413 nukleotidov dolg TE z vsemi tipičnimi značilnostmi elementov, ki spadajo v družino *Copia* – prisotni so odprti bralni okvir, ki kodira Gag in Pol proteina za reverzno transkripcijo in integracijo ter dva enaka LTR. Glede na prisotnost potrebnih proteinov in identičnost obeh LTR so sklepali, da gre za insercijo do katere je prišlo šele nedavno (Butelli in sod., 2012).

Med nadaljnjim raziskovanjem rdeče pomaranče sorte 'Moro' so našli zaporedje TATA 32 baznih parov (bp) nad začetnim mestom transkripcije, in sicer znotraj LTR elementa. LTR prav tako vsebuje

izrezovalno mesto za prvi intron *Ruby* transkripta. Dognali so, da insercija Tcs1 na mestu *Ruby* deluje kot promotor, ki nadzoruje povečano izražanje gena in omogoča, da se transkripcija prične prav v LTR (Butelli in sod., 2012).

Različne študije so potrdile, da so TE lahko zelo občutljivi na stresne dejavnike, kot je npr. velika slanost, nizke ali visoke temperature, poškodbe in bakterijske ter virusne infekcije. Ta odzivnost na stres se je z insercijami različnih TE v regije na 5' strani gostiteljevih genov v mnogih primerih prenesla tudi na te gene. TE aktivnost lahko torej poveča celotno število genov, ki jih inducira stres, poleg tega pa nagnjenost k reprogramiranju izražanja genov razumemo tudi kot selekcijsko prednost. TE bi namreč lahko predstavljali mehanizem preko katerega se genom z reorganizacijo samega sebe odzove na stres (Lisch, 2013).

Transkripcija aktivnih TE je navadno s strani gostitelja zatirana, a se lahko kot odgovor na različne stresne razmere ponovno aktivira, kar je McClintockova (1984) v svoji teoriji razložila kot strategijo organizma, da v neoptimalnih razmerah z ojačano transkripcijo poveča svoje možnosti za preživetje. Tako je tudi s TE Tcs1, ki je aktiviran, kadar so sadeži rdeče pomaranče izpostavljeni mrazu in s svojim delovanjem povzroči od nizkih temperatur odvisno akumulacijo antocianinov (Butelli in sod., 2012).



Slika 3: Shematski prikaz območja gena pri različnih sortah pomaranč (Lisch, 2013: 53-54)

Pri sorti 'Navalina' (slika 3) je torej prisotna funkcionalna, nativna oblika *Ruby* gena, ki se v plodu izraža omejeno, kar se odraža v oranžni barvi plodu. Pri sorti 'Tarocco' se ta zaradi insercije TE izraža bolj, pri 'Maro' pa je rekombinacija med LTR zaporedjema povzročila še povečano izražanje, ki se odraža kot še intenzivnejše rdeče obarvanje plodu (Lisch, 2013).

Večina sort rdečih pomaranč izvira iz omenjenih sicilijanskih genotipov, na Kitajskem pa so pri sorti 'Jingxian' potrdili, da je prišlo do neodvisnega dogodka, pri katerem je soroden, podobno velik LTR retrotranspozon, ki so ga poimenovali Tsc2, prav tako povzročil odziv na nizke temperature in

tkivno specifično obarvanje s spodbujanjem ekspresije *Ruby* gena preko aktivatorske sekvence v regiji na 5' strani gena (slika 3) (Butelli in sod., 2012).

V svoji študiji so Butelli s sod. (2012) dokazali razvoj pomaranč iz pomela in manadarin, pri katerih je tudi prisoten *Ruby* alel, ter izvor rdečih pomaranč iz starih mediteranskih oz. omenjene kitajske sorte zaradi insercije TE. Prav tako so razložili vlogo TE kot promotorja in regulatorja genske ekspresije ter podal priložnost za nadaljnjo evolucijo rdečih pomaranč s pomočjo genskega inženiringa, ki bi lahko omogočil pridelavo tudi na podnebno manj primernih območjih.

4 3HH H4 POTENCIALNO IZKORIŠČANJE TE

4.1 Vpliv na izboljšanje poljščin

Predvsem poljščine, na čelu s koruzo, so rastline, katerih genomi so v veliki meri sestavljeni iz TE.

Za proizvodnjo koruze so podnebni dejavniki, predvsem razpoložljivost vode, izjemno pomembni. Suša bistveno vpliva na pridelavo po svetu, razumevanje genetske osnove za naravno variabilnost tolerance na sušo pri tej poljščini, pa bi lahko močno pripomoglo k izboljšanju njenega gojenja. Odziv rastlin na sušo je kompleksen in odvisen od časovne periode ter jakosti stresa s katerim se rastlina srečuje. Mao in sod. (2015) so v svoji študiji ugotovili, da MITE insercija v promotor *NAC* gena negativno vpliva na toleranco koruze na sušne razmere.

Glede na predvideno možno vlogo *NAC*-tipa genov v odzivu na sušne razmere, so sekvencirali gen *ZmNAC111* v 262 inbridiranih koruznih linijah. Detektiranih je bilo 157 mutacij tipa SNP ter 119 tipa InDel (insercij in delecij). Še posebej obetavna je bila novo identificirana mutacija InDel velika 82 bp (InDel-572), locirana 572-bp nad start kodonom *ZmNAC111* gena.

InDel-572 je MITE insercija v *ZmNAC111* promotorju. Analiza sekvence InDel-572 v promotorski regiji *ZmNAC111* je pokazala, da je insert sestavljen iz dolgih terminalnih invertiranih ponovitev (vsaka velikosti 38 bp), 4 bp velikih zank in dveh dodatnih »TA« nukleotidov na koncu

in enega neposredno pred insercijo. Opis predstavlja tipično strukturo MITE insercije v genomu, ki je navadno kratka, velikosti približno nekaj sto bp in je sestavljena iz TIR zaporedij, tarčnih mest direktnih ponovitev in se preferenčno vstavi pri TA oz. TAA nukleotidnem zaporedju. BLAST primerjava podatkovne baze koruznih TE je pokazala, da gre za *Tc1/Mariner* superdružino MITE elementov.

Z RT-qPCR analizo so ugotovili, da je ekspresija *ZmNAC111* veliko večja v primerkih, ki MITE insercije nimajo, torej vstavitev TE v promotor zavre ekspresijo gena in s tem poveča občutljivost koruze na pomanjkanje vode.

Genomski fragment, ki vsebuje *ZmNAC111* so prenesli tudi v repnjakovec (*Arabidopsis*) in tako dokazali, da je molekularni mehanizem tolerance na sušo ohranjen med vrstami. Dodatne transgene študije pri tej vrsti in koruzi so dokazale, da lahko prekomerna ekspresija *ZmNAC111* gena izboljša toleranco na sušo v transgenih rastlinah.

Ob dodatnih raziskavah bi se *ZmNAC111* gen lahko izkazal za potencialnega kandidata v genskem inženiringu, alel, ki TE ne vsebuje, pa bi lahko postal selekcijska tarča za gensko izboljšanje rastlin za odpornost na sušo (Mao in sod., 2015). Kljub temu, da v omenjenem primeru vstavitev TE ne pomeni prednosti, ampak nasprotno, bi lahko enak pristop ubrali v primerih, ko ima vstavitev TE

potencialno izboljšavo pri prilagajanju na stresne dejavnike.

4.2 Zatiranje invazivnih vrst

Kritičen dejavnik uspeha invazivnih vrst je njihova sposobnost hitre prilagoditve na novo okolje, ki navadno zanje pomeni nenaden in intenziven stres. Količina in narava genetske variabilnosti, ki je na voljo za selekcijo med invazijo v veliki meri določa prilagoditveni potencial (Stapley, 2015).

Presenetljivo sposobnost invazivnih vrst, da se prilagodijo in naselijo nove habitate kljub ozkemu grlu, ki ga predstavlja pomanjkanje alelnih oblik genov, so opredelili kot t.i. genetski paradoks invazivnih vrst. Za ta pojav obstaja več možnih razlag, ena izmed njih pa vključuje TE, ki naj bi generirali genetsko variabilnost kot odgovor na okoljske in genetske spremembe in s tem pospešili prilagoditev. Pogostost pojava potencialno koristnih alelov je kot rezultat delovanja TE veliko večja od možnosti pojava naključnih mutacij, kar pomeni, da je zaradi TE aktivnosti hitra

prilagoditev veliko bolj verjetna. V svoji študiji je Stapley (2015) tako predpostavila, da s TE posredovana prilagoditev omogoči preživetje in uspeh invazivnih vrst v novem okolju. V tem primeru gre predvsem za tiste TE, ki se odzivajo na okoljski stres, so še vedno ali pa so bili do nedavnega transkripcijsko aktivni, se nahajajo v evkromatinskih regijah ter se vstavljajo v regije v bližini genov, kot so regulatorne regije in introni. Navaja tudi več primerov TE, ki so podvrženi selekciji in so prilagojeni biotskemu, abiotskemu ali genomskemu stresu, npr. divji ječmen (*Hordeum vulgare* L.) pri katerem število kopij TE variira glede na nadmorsko višino in navadni repnjakovec, pri katerem so TE pod vplivom pozitivne selekcije, če se nahajajo v bližini genov.

Z napredkom v poznavanju TE in regulaciji njihovega delovanja bi lahko z zaviranjem s TE posredovane prilagoditve našli pristop, ki bi omogočal nadzor in omejitev invazivnih rastlin v okolju v katerem povzročajo škodo.

5 ZAKLJUČEK

TE predstavljajo pomemben vir genetske in epigenetske variabilnosti in imajo vpliv na gensko regulacijo ter posledično tudi fenotipsko variabilnost.

V svojih študijah je Barbara McClintock prva predpostavila, da genomske spremembe, ki jih v stresnih razmerah povzroči delovanje TE pripomorejo k prilagoditvi in celo speciaciji. S prepoznavanjem specifičnih stresnih dejavnikov, ki vodijo v nastanek novih regulatornih omrežij, ki se odzivajo na določen stres, bi morda lahko izkoriščali možnost aktivacije nativnih TE in s tem pridobivanje novih varietet poljščin, ki bi bile bolj odporne na okoljske spremembe (Smith, 2015).

Napredek v fenomiki, genomiki in mapiranju lastnosti s pomočjo raziskovanja celotnega genoma čedalje bolj omogoča določanje števila mutacij, ki so bile pomembne za domestikacijo in naknadno modifikacijo lastnosti ter so bile povzročene zaradi aktivnosti TE. Določena orodja, ki so bila uporabljena za kartiranje lastnosti v udomačenih rastlinah pa bodo verjetno pripomogla tudi pri raziskovanju naravnih rastlinskih populacij, npr.

divjih sorodnikov kulturnih rastlin, kar nam bo dalo boljši vpogled tudi v naravno selekcijo (Lisch, 2013).

Velik izziv, ki ga ponujajo TE je med drugim v njihovi ponovljivi naravi in vsesplošnem prepričanju, da je njihova prisotnost v genomih organizmov brez večjega pomena. Prav zaradi tega v sklopu različnih analiz največkrat sploh niso obravnavani, njihova vloga pa je zato še težje določljiva. Transpozonske elemente bi tako morali natančno anotirati in jih vključevati v raziskave kot potencialen vir funkcionalne variabilnosti. Še posebej je to pomembno pri TE za katere je znano, da prenašajo regulatorne informacije (Lisch, 2013).

V prihodnosti bo verjetno potrebnih še veliko raziskav na področju transpozonskih elementov, da bomo zares lahko razumeli njihovo vlogo in namen. Do sedaj se je že izkazalo, da njihov obstoj ni samo sebične narave in da ti elementi vendarle niso zgolj odpadni deli genoma, kljub temu, da bistvo njihove obsežne prisotnosti še ni popolnoma jasno.

6 VIRI

- Butelli E., Licciardello C., Zhang Y., Liu J., Mackay S., Bailey P., Reforgiato-Recupero G., et al. (2012). Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood orange. *The Plant Cell*, 24, 1242-1255. Doi: 10.1105/tpc.111.095232
- Bui Q. T., Grandbastien M.-A. (2012). LTR retrotransposons as controlling elements of genome response to stress? In M.-A. Grandbastien, J. M. Casacuberta (Eds.), *Plant transposable elements, Topics in current genetics*. (pp. 273-296). Berlin, Heidelberg: Springer. Doi: 10.1007/978-3-642-31842-9_14
- Capy P., Gasperi G., Biémont C., Bazin C. (2000). Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity*, 85, 101-106. Doi: 10.1046/j.1365-2540.2000.00751.x
- Casacuberta E., González J. (2013). The impact of transposable elements in environmental adaptation. *Molecular Ecology*, 22, 1503-1517. Doi: 10.1111/mec.12170
- Comfort N. C. (1999). »The real point is control«: the reception of Barbara McClintock's controlling elements. *Journal of the History of Biology*, 32, 133-162. Doi: 10.1023/A:1004468625863
- Contreras B., Vives C., Castells R., Casacuberta J. M. (2015). The impact of transposable elements in the evolution of plant genomes: From selfish elements to keyplayers. In P. Pontarotti (Ed.), *Evolutionary biology: Biodiversification from genotype to phenotype*. (pp. 93-105). Switzerland, Springer. Doi: 10.1007/978-3-319-19932-0_6
- Grandbastien M.-A. (2015). LTR retrotransposons, handy hitchhikers of plant regulation and stress response. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1849, 403-416. Doi: 10.1016/j.bbagr.2014.07.017
- Kejnovsky E., Hawkins J. S., Feschotte C. (2012). Plant transposable elements: biology and evolution. *Plant Genome Diversity*, 1, 17-34. Doi: 10.1007/978-3-7091-1130-7_2
- Kidwell M. G., Lisch D. R. (2001). Perspective: Transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *International Journal of Organic Evolution*, 55, 1-24. Doi: 10.1111/j.0014-3820.2001.tb01268.x
- Levin H., Moran J. (2011). Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nature Reviews*, 12, 615-627. Doi: 10.1038/nrg3030
- Lisch D. (2013). How important are transposons for plant evolution? *Nature Reviews*, 14, 49-61. Doi: 10.1038/nrg3374
- Mao H., Wang H., Liu S., Li Z., Yang X., Yan J., Li J., et al. (2015). A transposable element in a NAC gene is associated with drought tolerance in maize seedlings. *Nature Communications*, 6, 1-13. Doi: 10.1038/ncomms9326
- McClintock B. (1984). The significance of responses of the genome to challenge. *Science*, 226, 792-801. Doi: 10.1126/science.15739260
- Smith L. M. (2015). Mechanism of transposable element evolution in plants and their effects on gene expression. In O. Pontes, H. Jin (Eds.), *Nuclear function in plant transcription, signaling and development* (pp. 133-164). New York, Springer. Doi: 10.1007/978-1-4939-2386-1_8
- Stapley J. (2015). Transposable elements as agents of rapid adaptation may explain the genetic paradox of invasive species. *Molecular Ecology*, 24, 2241-2252. Doi: 10.1111/mec.13089
- Tsuchiya T., Eulgem T. (2013). An alternative polyadenylation mechanism coopted to the *Arabidopsis RPP7* gene through intronic retrotransposon domestication. *PNAS*, 110, E3535-E3543. Doi: 10.1073/pnas.1312545110
- Wei L., Cao X. (2016). The effect of transposable elements on phenotypic variation: insights from plants to humans. *Science China – Life Sciences*, 59, 24-37. Doi: 10.1007/s11427-015-4993-2
- Wicker T. (2012). So many repeats and so little time: How to classify transposable elements. In M.-A. Grandbastien, J. M. Casacuberta (Eds.), *Plant transposable elements* (pp. 1-15). Berlin, Heidelberg: Springer. Doi: 10.1007/978-3-642-31842-9_1