

Priedes genoma noslēpumi. Transponējami Elementi: savtīgi replikatoru vai izdzīvošanas instruktori?

Dr. biol. Angelika Voronova



PostDoc
Latvia



FLPP
FUNDAMENTĀLO UN
LIETIŠKO PĒTĪJUMU
PROJEKTI

Transponējami elementi jeb Mobilie ģenētiskie elementi



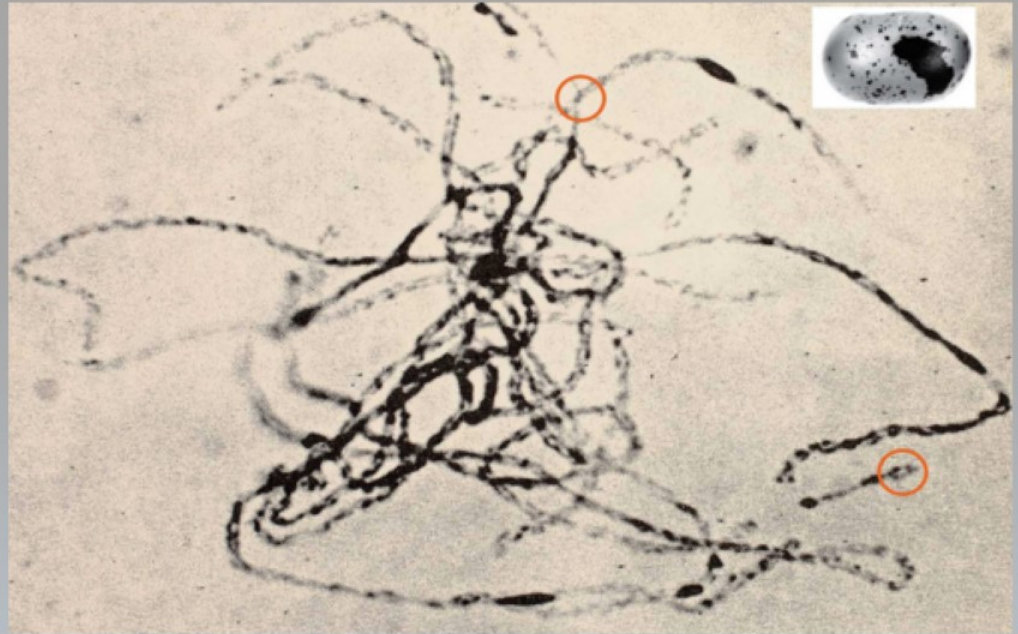
ģēns

savtīgi replikatoru vai izdzīvošanas instruktori?

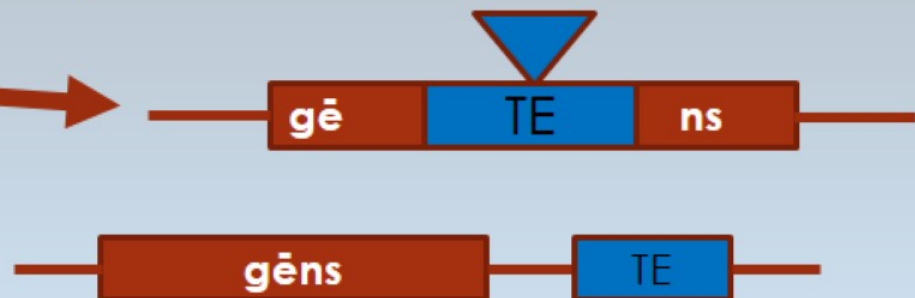
1934-1950 g. Ģenētiskas informācijas stabilitāte vai dinamiskums stresa laikā



Dr. Barbara McClintock



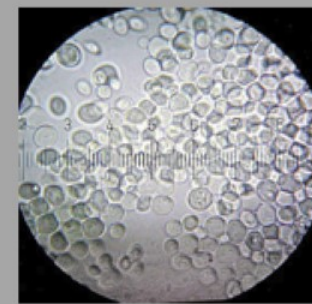
Barbara McClintock, atklāja transpozīciju 1940-1950 gados. Par savu atklājumu viņa saņēma Nobela prēmiju Fizioloģijā un medicīnā 1983. gadā. Viņa nosauca tos par «kontrolējošiem elementiem».



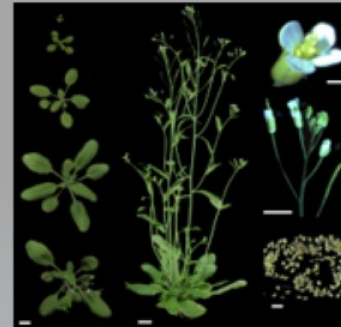
Transpozīcijas fenomens tika uzskatīts par kukurūzas genoma specifiku



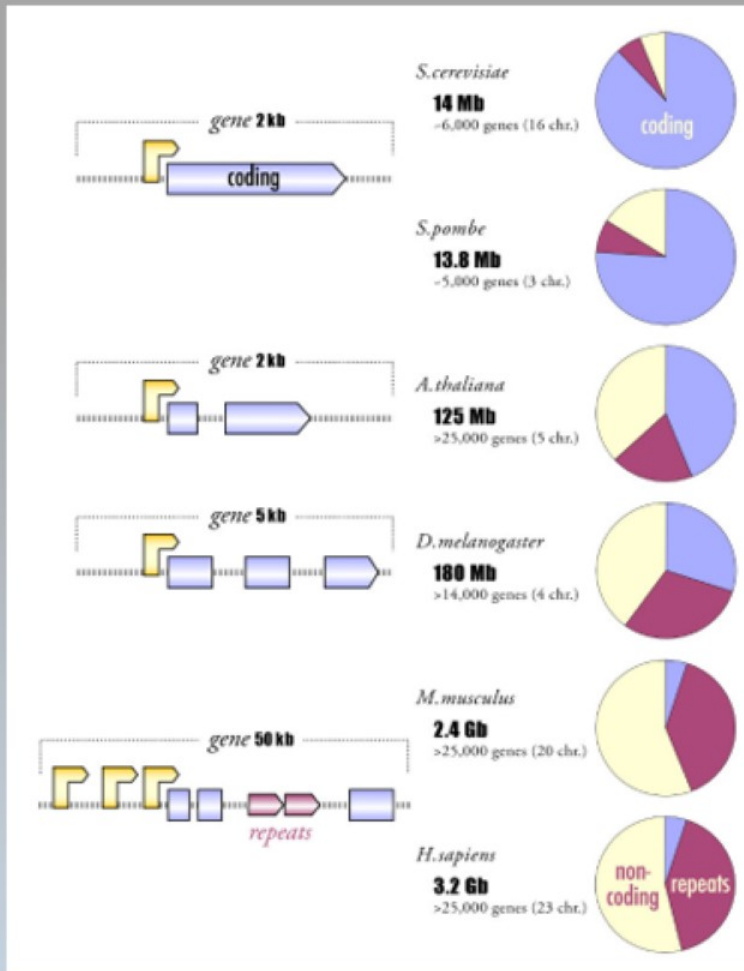
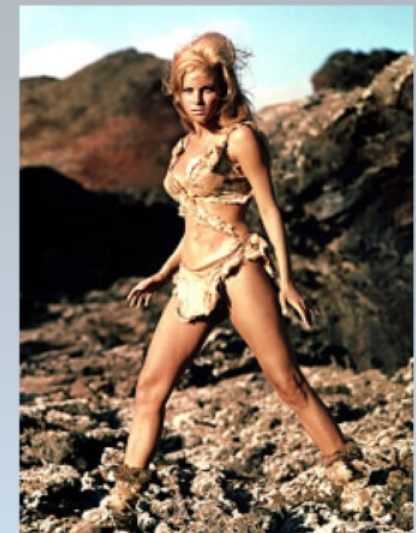
Gēni/ nekodējošs genoms



Bob Blaylock



<http://www-ijpb.versailles.inra.fr/en/arabido/arabido.htm>

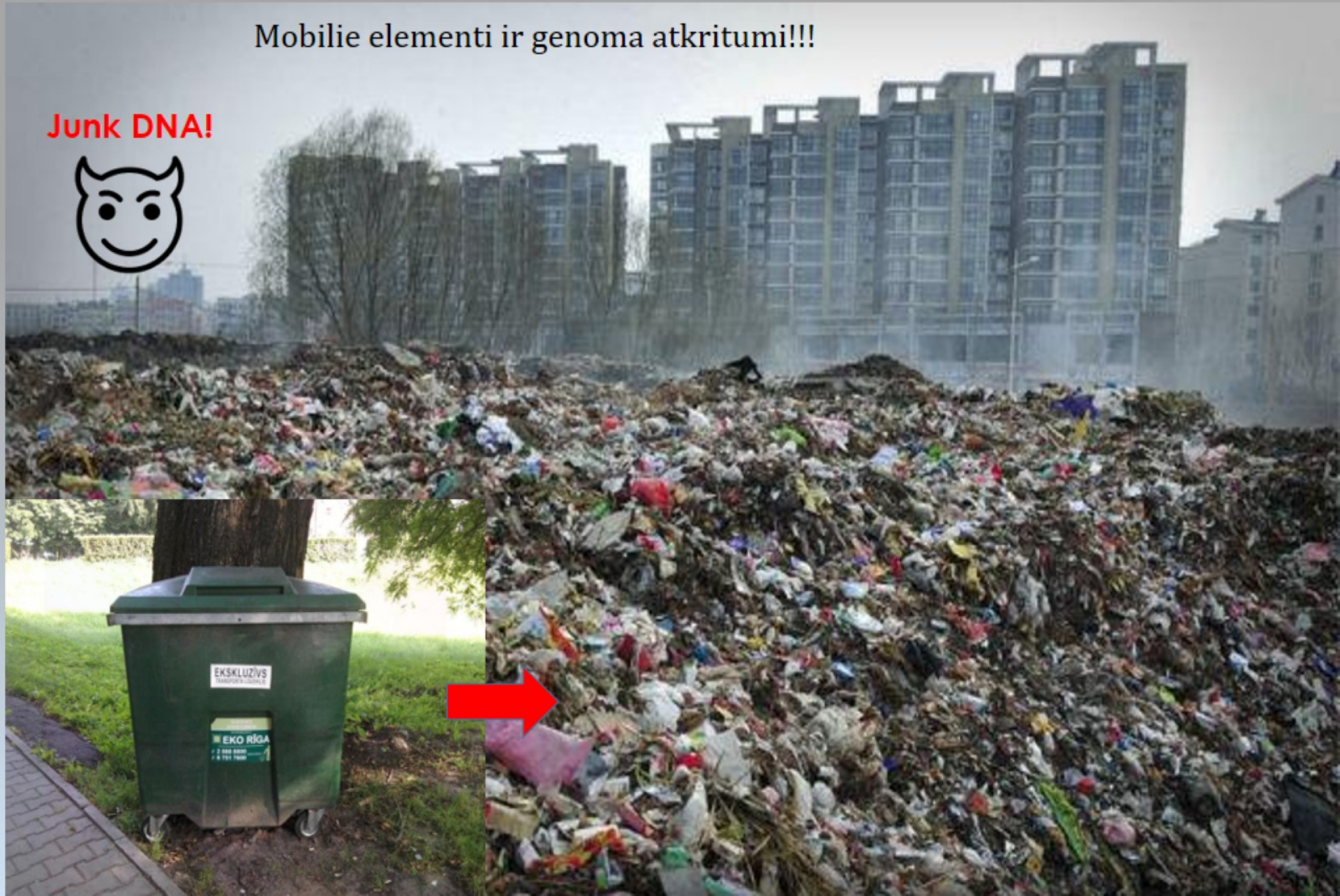


Kosi Gramatikoff

Vai mūsu genoms ir atkritumu poligons?

Mobilie elementi ir genoma atkritumi!!!

Junk DNA!



1985-....TE un cilvēku slimības, iedzimtība, evolūcija



Haig H. Kazazian Jr., M.D



- ▶ 2016: 124 LINE-1-linked diseases (Hemophilia A, B; Cystic Fibrosis; Hereditary Cancer; Coffin–Lowry syndrome; β -thalassemia etc).



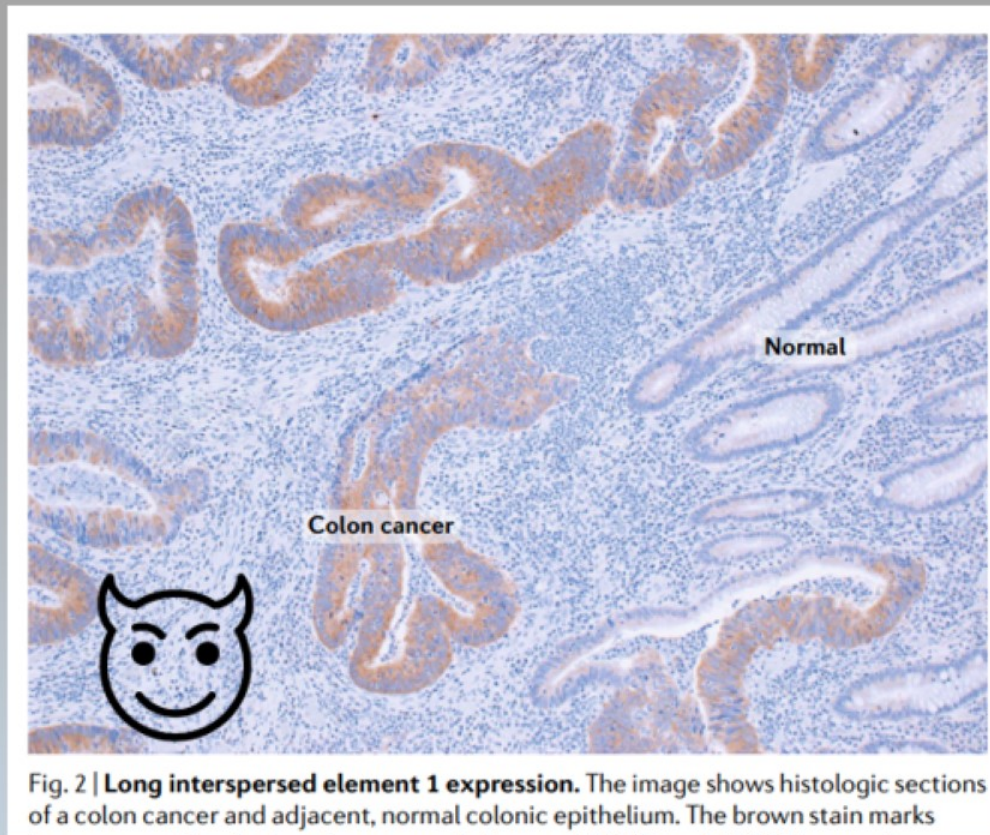
- ▶ Cilvēku un primātu genomu salīdzinājumi atklāj milzīgu variāciju transponējamo elementu un to izraisīto pārkārtojumu rezultātā

98%
CHIMP/HUMAN
DNA
SIMILARITY?



*Humans share
50% of their DNA
with **bananas**.*

L1 aktivizējas vēža šūnās, taču *L1* proteīniem ir vēža šūnu augšanas un dalīšanos inhibējoša iedarbība



Transposable elements in human genetic disease.

Lindsay M. Payer and Kathleen H. Burns. Nature Reviews Genetics volume 20, pages 760–772 (2019)



2000-....TE un cilvēku neironālā attīstība



L1 tiek mobilizēts neironālajās šūnās, kas nodrošina šo šūnu atšķirīgu darbību.

2011-**Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain.** Baillie JK, Barnett MW, Upton KR, Gerhardt DJ, Richmond TA, De Sapio F, Brennan PM, Rizzu P, Smith S, Fell M, Talbot RT, Gustincich S, Freeman TC, Mattick JS, Hume DA, Heutink P, Carninci P, Jeddloh JA, Faulkner GJ
Nature. 2011 Oct 30; 479(7374):534-7.

L1-associated genomic regions are deleted in somatic cells of the healthy human brain. Erwin JA, Paquola AC, Singer T, Gallina I, Novotny M, Quayle C, Bedrosian TA, Alves FI, Butcher CR, Herdy JR, Sarkar A, Lasken RS, Muotri AR, Gage FHNat Neurosci. 2016 Dec; 19(12):1583-1591.



Saistība ar neurodeģeneratīvām slimībām?

Evolucionāra loma

- ▶ 'Gene capture'-



- ▶ **Placentas veidošanās zīdītājiem:** syncytin-1 and -2 (HERV)

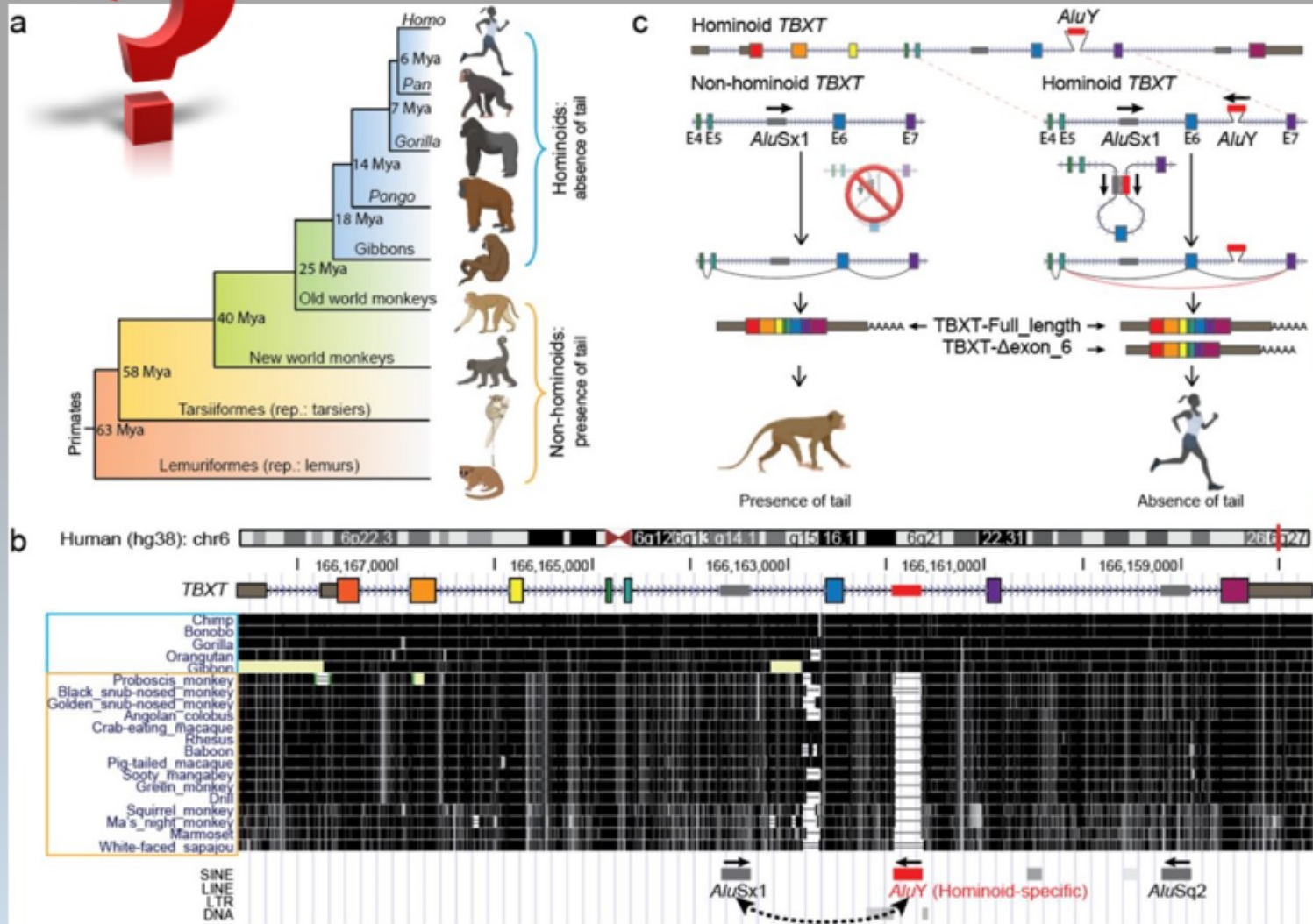


- ▶ **Rag1 and rag2 gēni** ir veidojušies no transpozāzes gēna, proteīns, kurš uzsak V(D)J rekombināciju, somatisks process, kurš savieno gēnu produktus no imūnglobulīniem un B, T šūnu receptoriem, nodrošinot imunitāti.

ncRNS atklājumi: 90% no eikariotu genomem ir transkribēti, tikai 2% -gēni; 98%-ncRNS



2021.g...*Alu* elementi ir atbildīgi par astes izzušanu cilvēkiem?

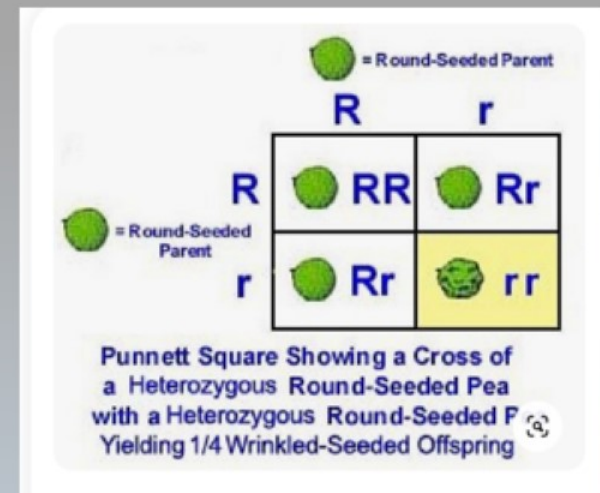


The genetic basis of tail-loss evolution in humans and apes. Bo Xia, Weimin Zhang, Aleksandra Wudzinska, Emily Huang, Ran Brosh, Maayan Pour, Alexander Miller, Jeremy S. Dasen, Matthew T. Maurano, Sang Y. Kim, Jef D. Boeke, Itai Yanai. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.09.14.460388>

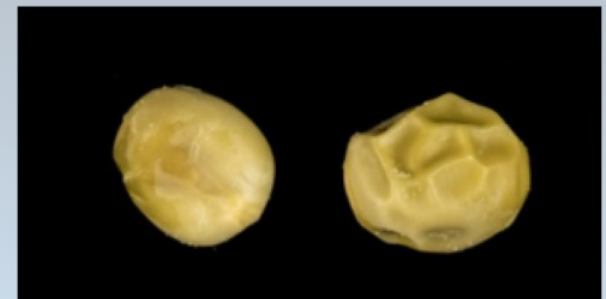
G.Mendelļa petītā zirņu pazīme ir TE izraisītās mutācijas rezultāts cietes zarojoša enzīma (*starch-branching enzyme, SBE1*) gēnā.



- samazināta cietes produkcija;
- augstāks saharozes saturs, kas savukārt veicina krokainības veidošanos pēc izžūšanas;
- augstāks olbaltumvielu saturs; legumīns ar zemāku mitruma saturu;
- samazināta sēklu ilgmūžība;
- ir arī retas līnijas ar citām krokainību izraisošām mutācijām



R-gludi; r- krokaini



Bhattacharyya, M.K., Smith, A.M., Ellis, T.N., Hedley, C., Martin, C. (1990). [The wrinkled-seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(90)90721-P). *Cell*, 60,115-122. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90721-P](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(90)90721-P)



...Vēl ļoti daudz piemēru, kad TE ir saistīts ar saimnieciski nozīmīgām pazīmēm augiem

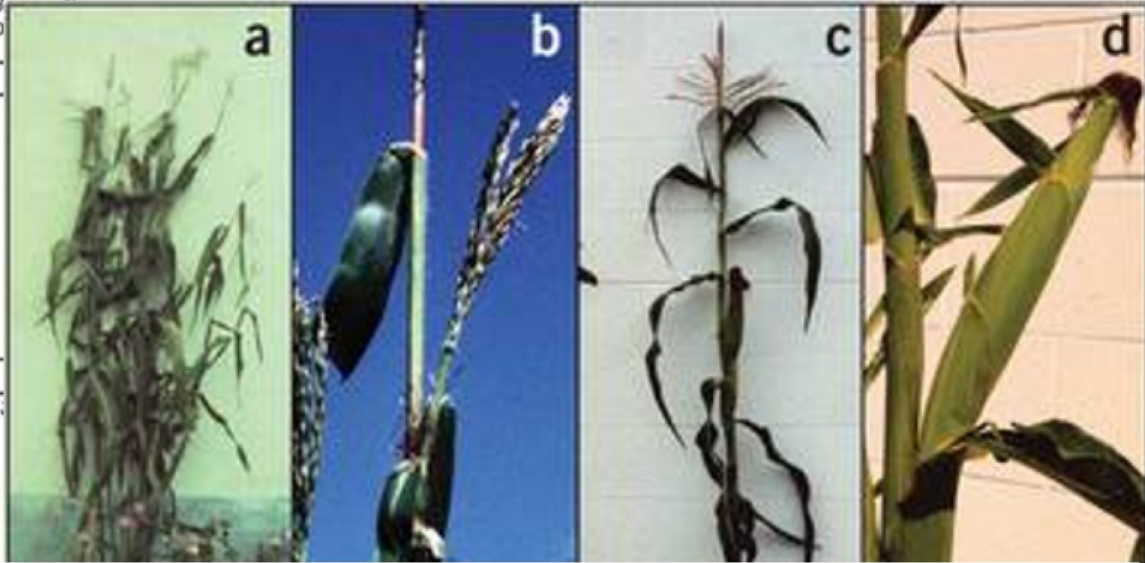
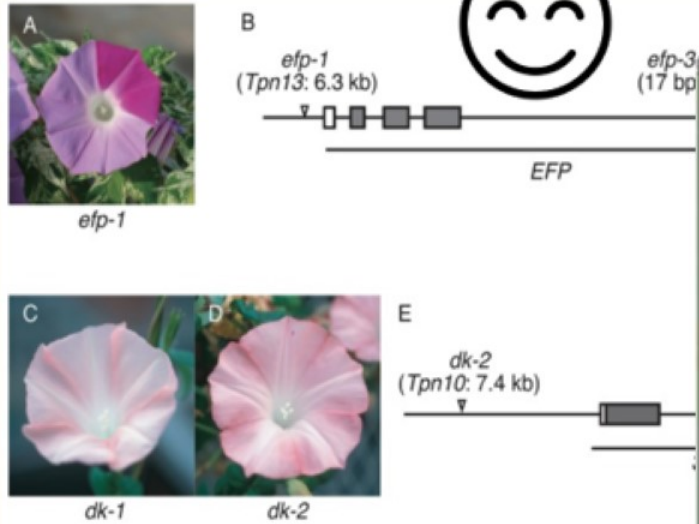


Fig.2

Flower phenotypes of flower hue mutants and the genomic structure of the mutant alleles. The boxes indicate the coding and the untranslated regions, respectively. Flower phenotype of the *efp-1* mutant shows pale-colored flower

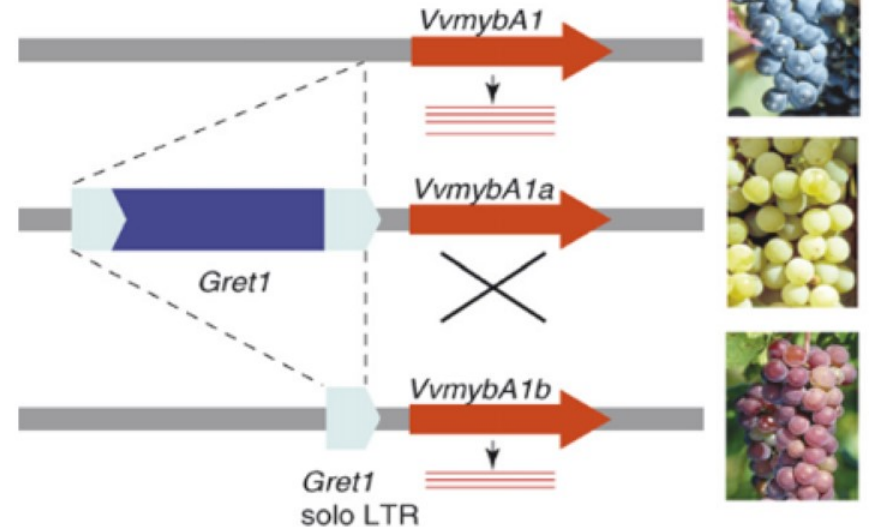
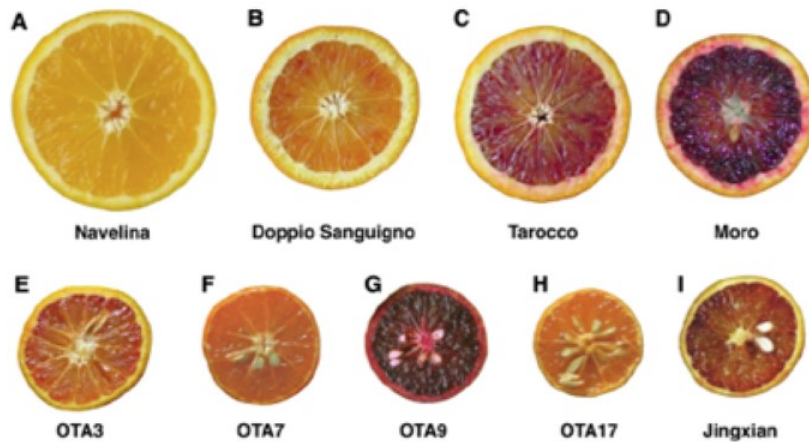
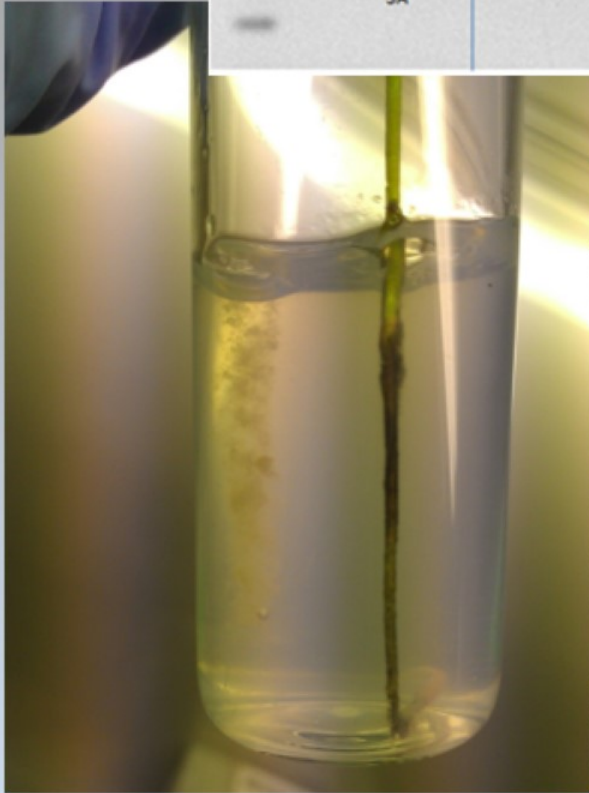
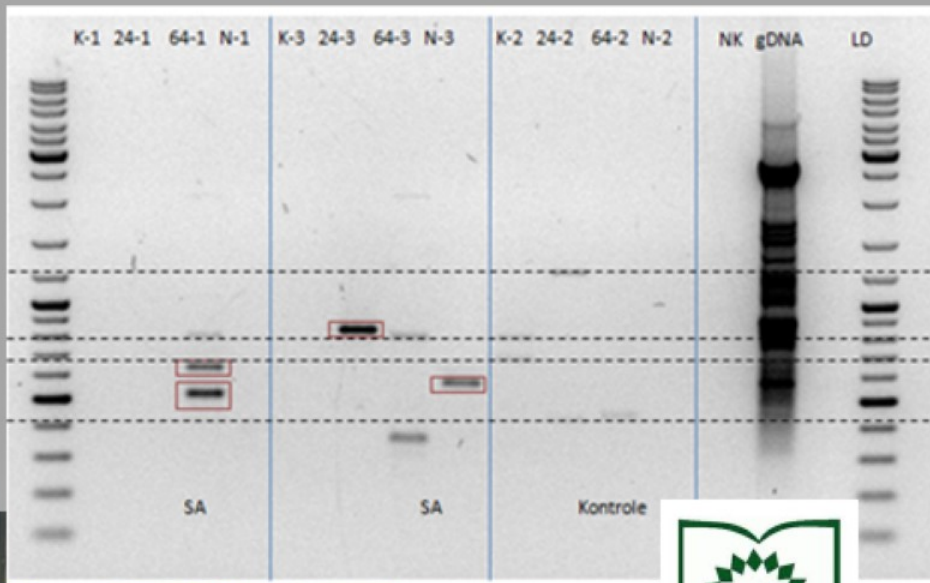


Figure 1. Phenotypes and Genotypes of Orange Varieties and Hybrids.

Atkritumi ir jāšķiro, izpratne par lēkājošiem
elementiem mainījās

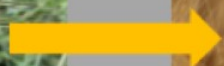
~~TE~~
GARBAGE SORTING





Kultūraugi - savvaļas augi

Savvaļas priekštecis



Mūsdienu šķirnes



- Īss paaudžu nomaiņas laiks
- Zema ģenētiskā daudzveidība
- Cilvēku vadīta selekcija kopš 8500 pr.m.ē.
- Augsta specializācija videi
- Augsta uzņēmība pret slimībām
- Molekulārie marķieri

Aegilops (wheat wild ancestor), <http://www.arcad-project.org>



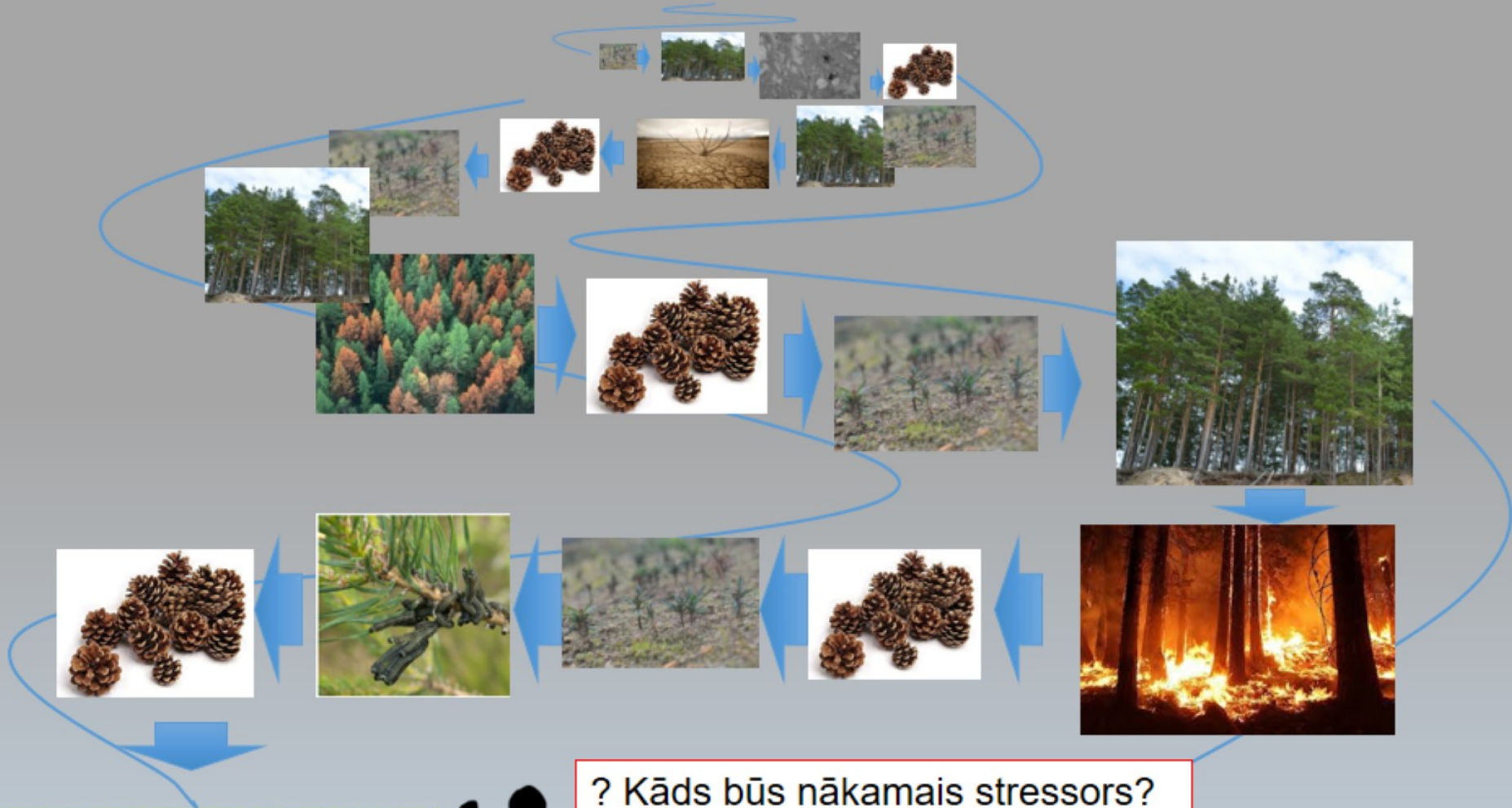
- Ilgs paaudžu nomaiņas laiks
- Augsta ģenētiskā daudzveidība
- Dabiskā izlase
- Augsta pielāgošanas spēja videi
- Paaugstināta izturība pret slimībām
- Fenotipiskas pazīmes un molekulārie marķieri

Slēptā iedzimtība: rīcība stresa situācijā



Lauka/kontrolēti eksperimenti izturības novērtējums



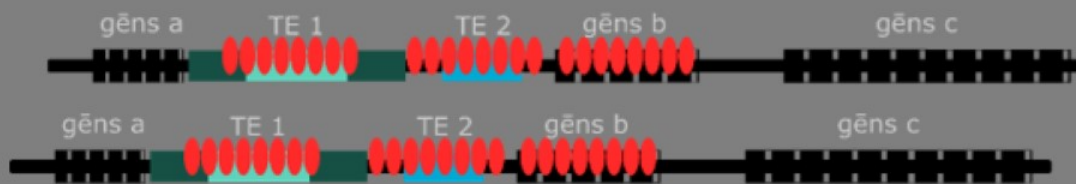


? Kāds būs nākamais stressors?

? Kā atlasīt labākos genotipus nezaudējot ģenētisko daudzveidību?

? Vai ir iespējams atrast molekulāros marķierus augu atlasei ar paaugstinātām aizsardzības spējām?

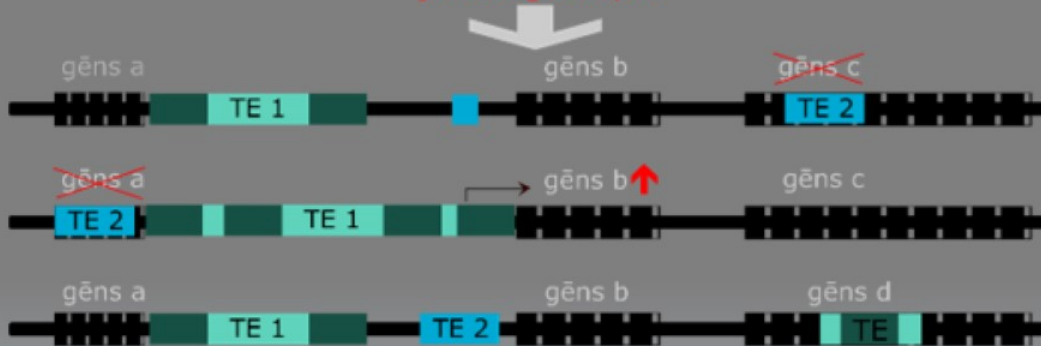




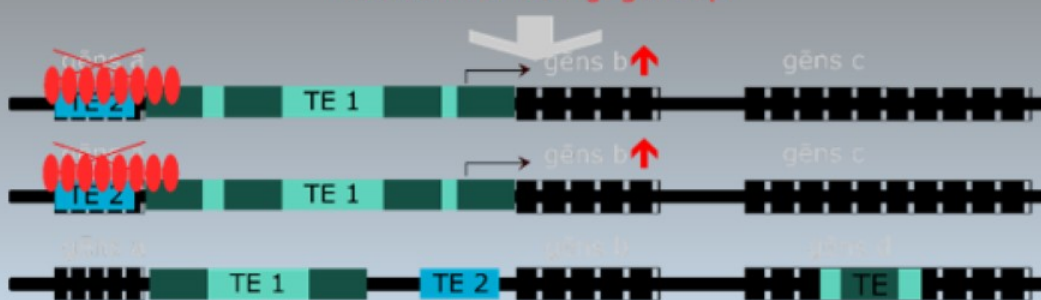
stress/ nelabvēlīgi vides apstākļi



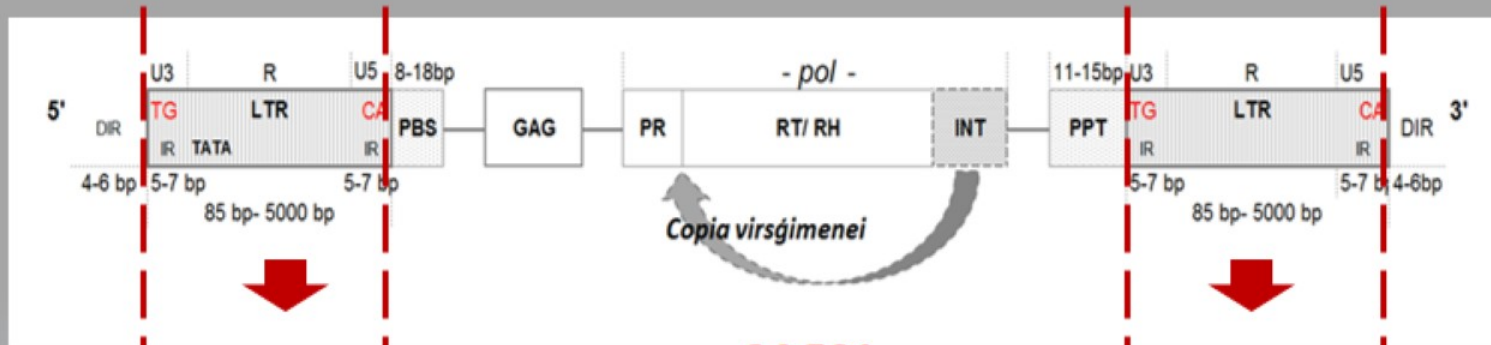
TE pārvietošanas veidojot daudzveidību jaunus genotipus



Dabiskā izlase izdzīvo tikai izturīgi genotipi



References genomeu pētījumi



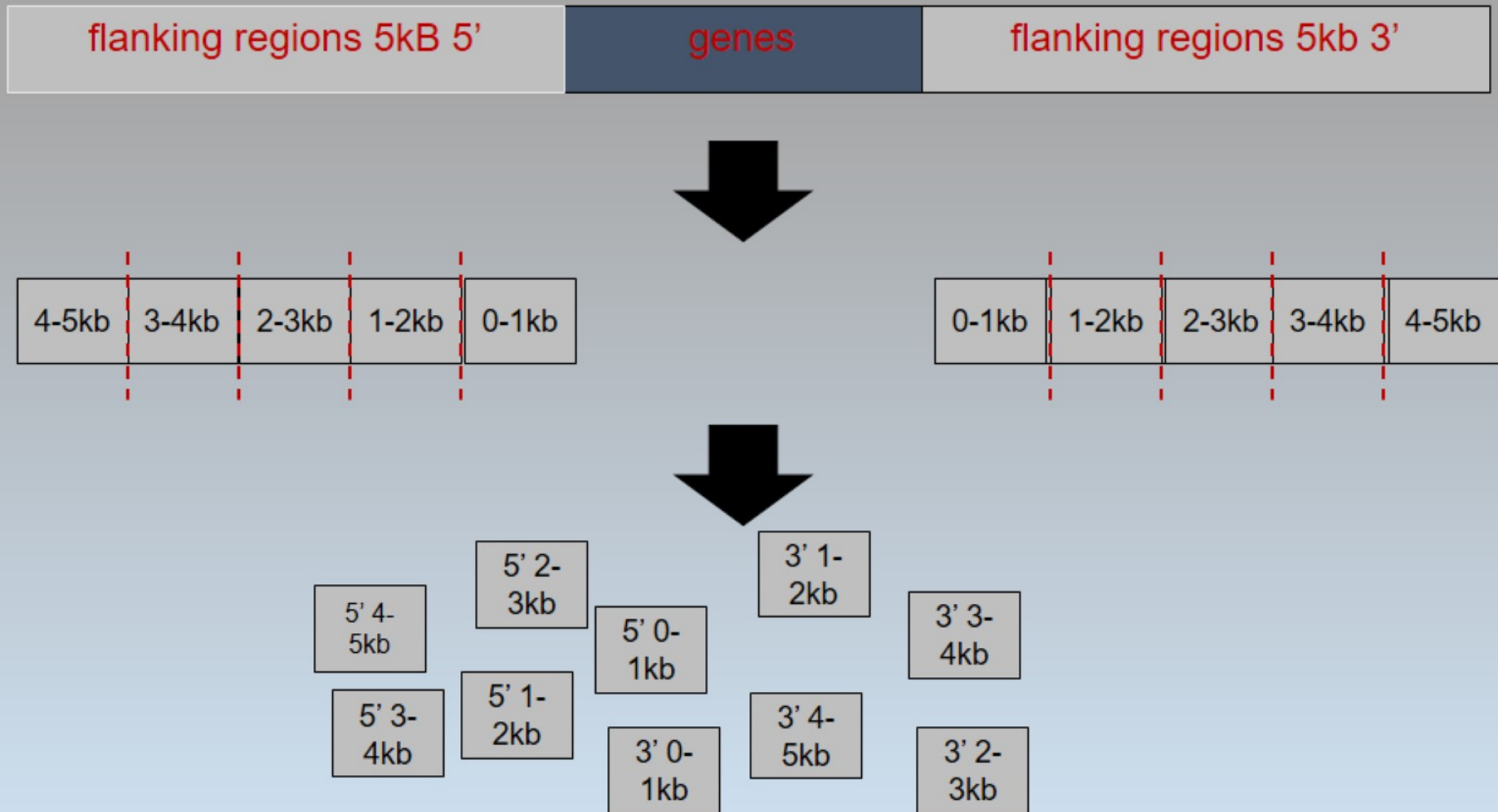
24 591

9 659

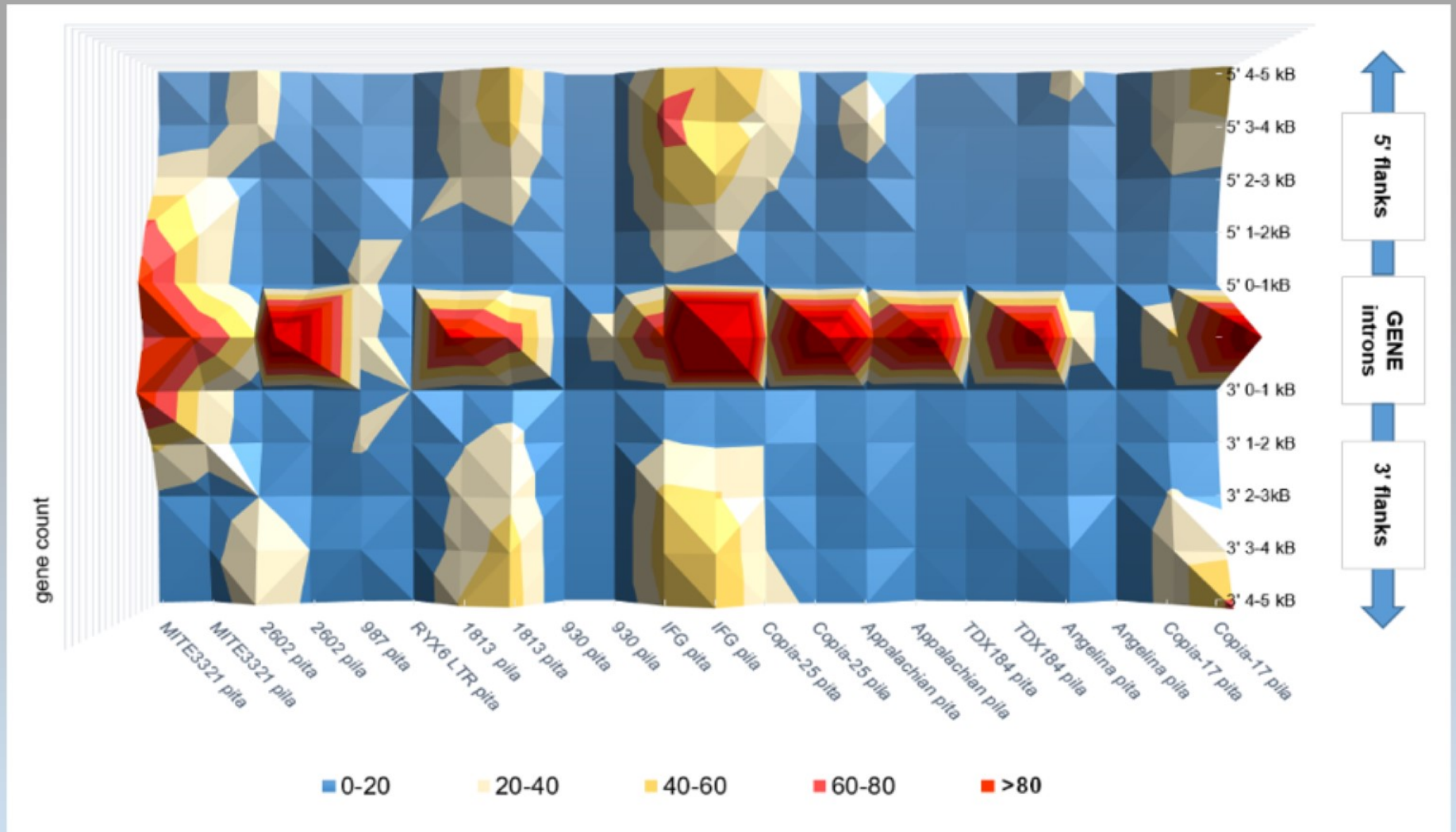
9 107

Not only
LTRs!!!

Flankējošo rajonu analīze

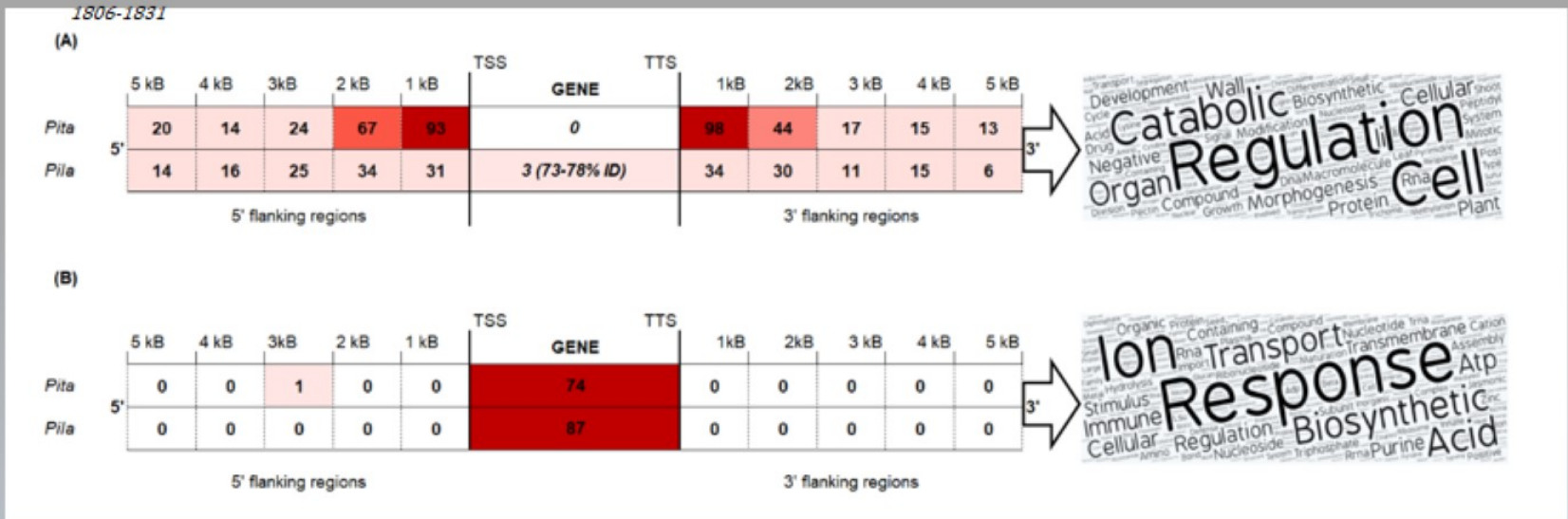


Kā TE ir izplatīti gēnu tuvumā?





MITE Plater family distribution among gene regions of reference species



Reference genomes:

Pinus taeda

Pinus lambertiana

Pinus sylvestris - ???



ARR1AT-pita-10; pila-7;
 CAATBOX1-4; 2;
 DOFCOREZM-4; 5;
 GT1CONSENSUS -3; 3

TE tiek iesaistīti gēnu tīklu veidošanā un sniedz priekšrocību savvaļas augiem- koordinētu gēnu atbildi stresa laikā



Gēnu grupa I

aizsardzību nosakošie gēni- TE intronos piesaista metilēšanas faktoros, gēni nav aktīvi normālos apstākļos

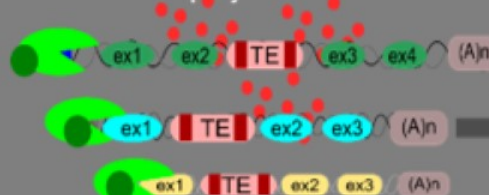


pēc trauksmes signālu mazināšanos - abas gēnu grupas atgriežas sākotnējā darba režīmā

nekodējošais RNS piesaistas identiskām sekvencēm, kas atrodas gēnu grupas II flankos piesaista metilēšanas signālus un aptur šo gēnu darbību

Stress

DNS demetilēšana
transkripcijas iniciēšana



ncRNA

I grupas gēnu mRNA nobriešanas laikā no TE tiek kopražots nekodējošs RNS

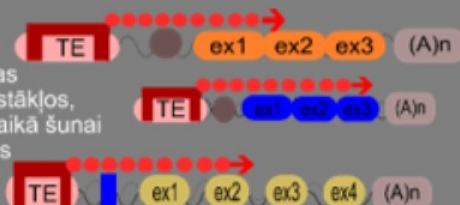
Aizsardzības atbildes homeostāzes uzturēšana receptoru veidošana

gēnu tīkla I aktivizēšana

ar TE inserciju dažādos gēnos un to rajonos, tiek ātri koordinēta atšķirīgo gēnu tīklu darbība

Gēnu grupa II

attīstības & šūnu augšanas gēni ir aktīvi normālos apstākļos, taču tiek klusināti stresa laikā šunai pārslēdzoties aizsardzības režīmā



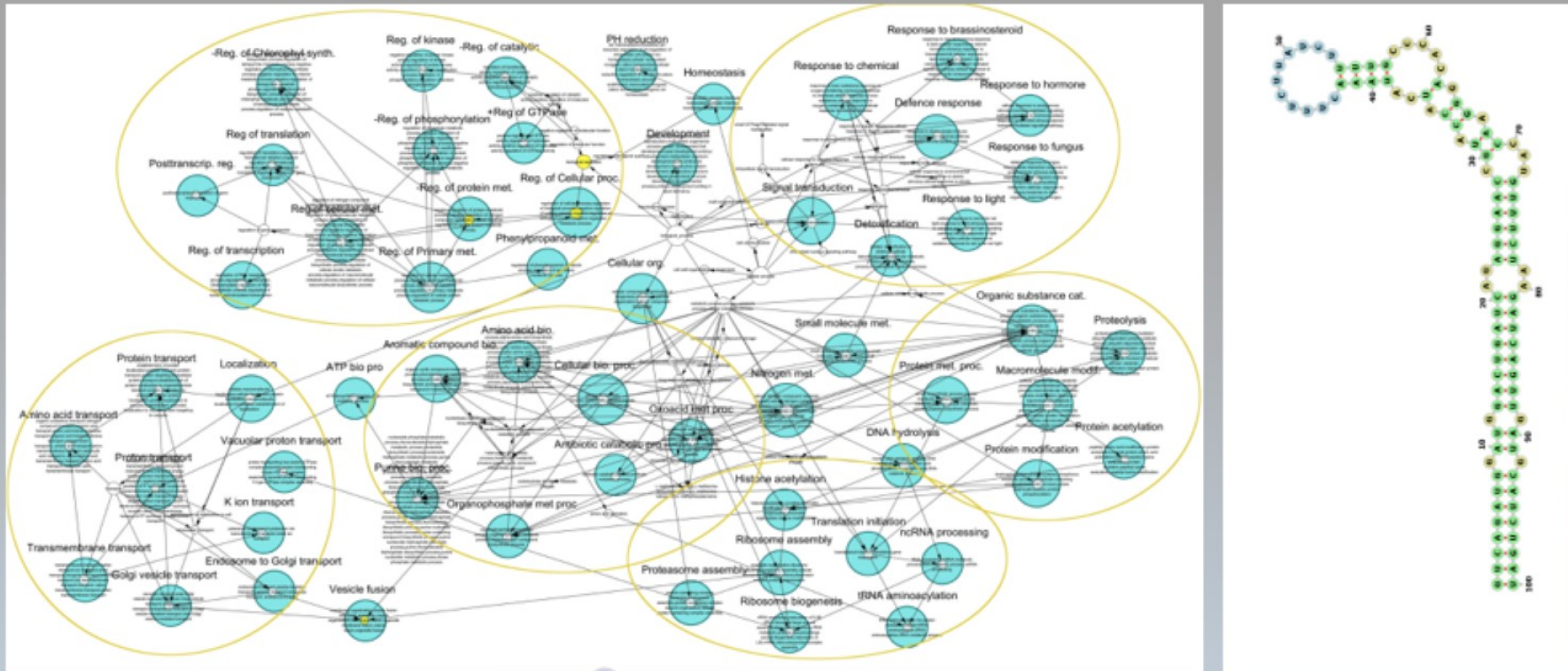
Augšanas, attīstības, krājumu veidošanas procesu apturēšana

gēnu tīkla II inhibēšana

Attēls: Angelika Voronova



DNS transposons *Irbe* atrodas gēnu intronos, kas ir iesaistīti atbildē uz stresu, satur mikroRNS



NPR1 (Nonexpresser of Pathogenesis-related proteins-1);
histone-binding PHD1 finger protein ALFIN-like 4 coding gene;
COPII-coated ER to Golgi transport vehicle SNARE-like 13 gene
eukaryotic translation initiation complex 2B
PSMD4, a 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit gene

Satur microRNA sly-miR9472-3p
līdzīgu sausumam toleranās
tomātu šķirnē esošajam (Candar-
Cakir et al., 2016; Liu et al.,
2017).

IFG RE insercijas proteīnkināzes gēnos

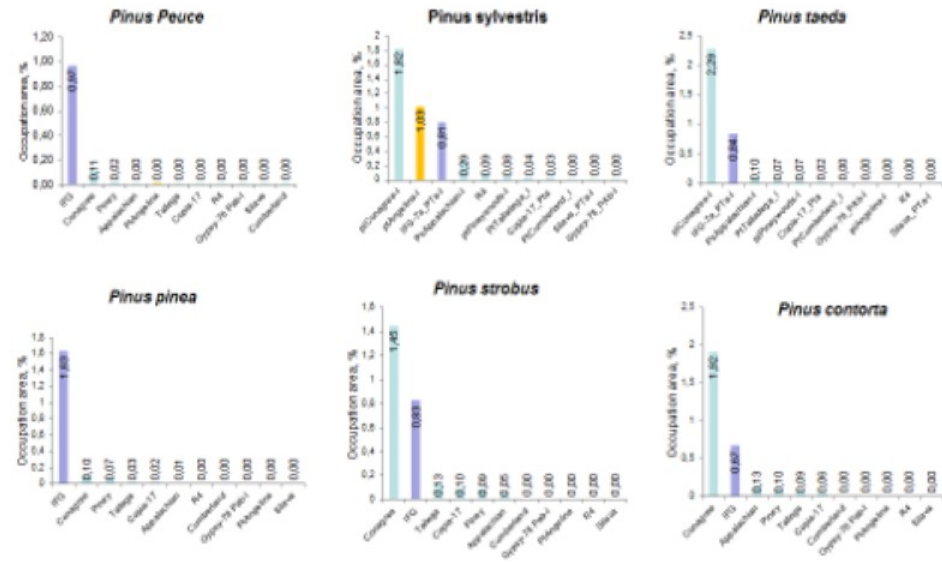
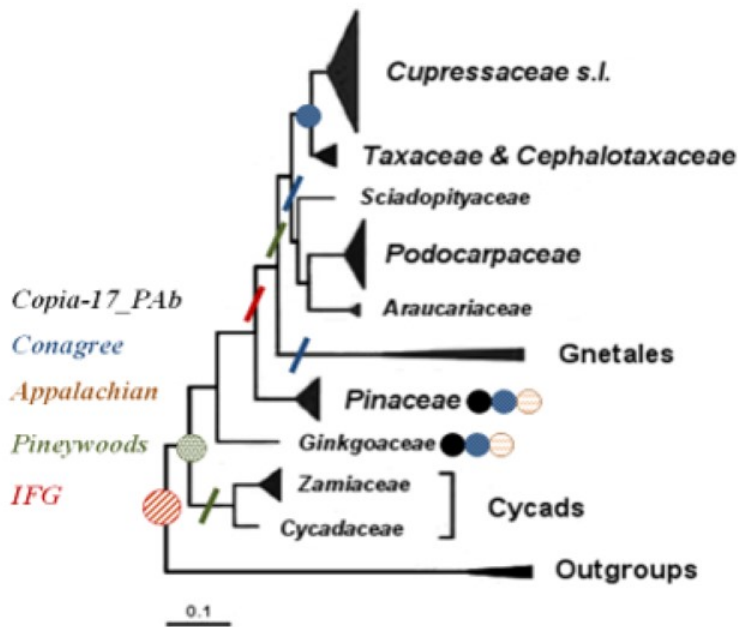


Figure 1. Occupation area (%) of RE families relative to species average genome size.
 It was assumed that each estimated copy represents full-length element. Estimation of the copy number of eleven REs was performed using Real-time PCR absolute quantification with Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) reagents and StepOne software v2.2.2 (Applied Biosystems). Plasmids with cloned RE sequences were used for standard curves (6 dilutions 1:10, 3 replicates), for plasmid with a known insert sequence, molecular weight was calculated using the Sequence Manipulation Suite: DNA Molecular Weight (Stothard, 2000). Plasmid copy number was calculated using the formula: copy nb. = (amount, ng) * Avogadro nb. (6.022*10²³) / 1*10⁹*(mol weight, Da). Copy number of each RE was calculated relative to the amount of DNA analysed and the genome size (2C) of the various species.

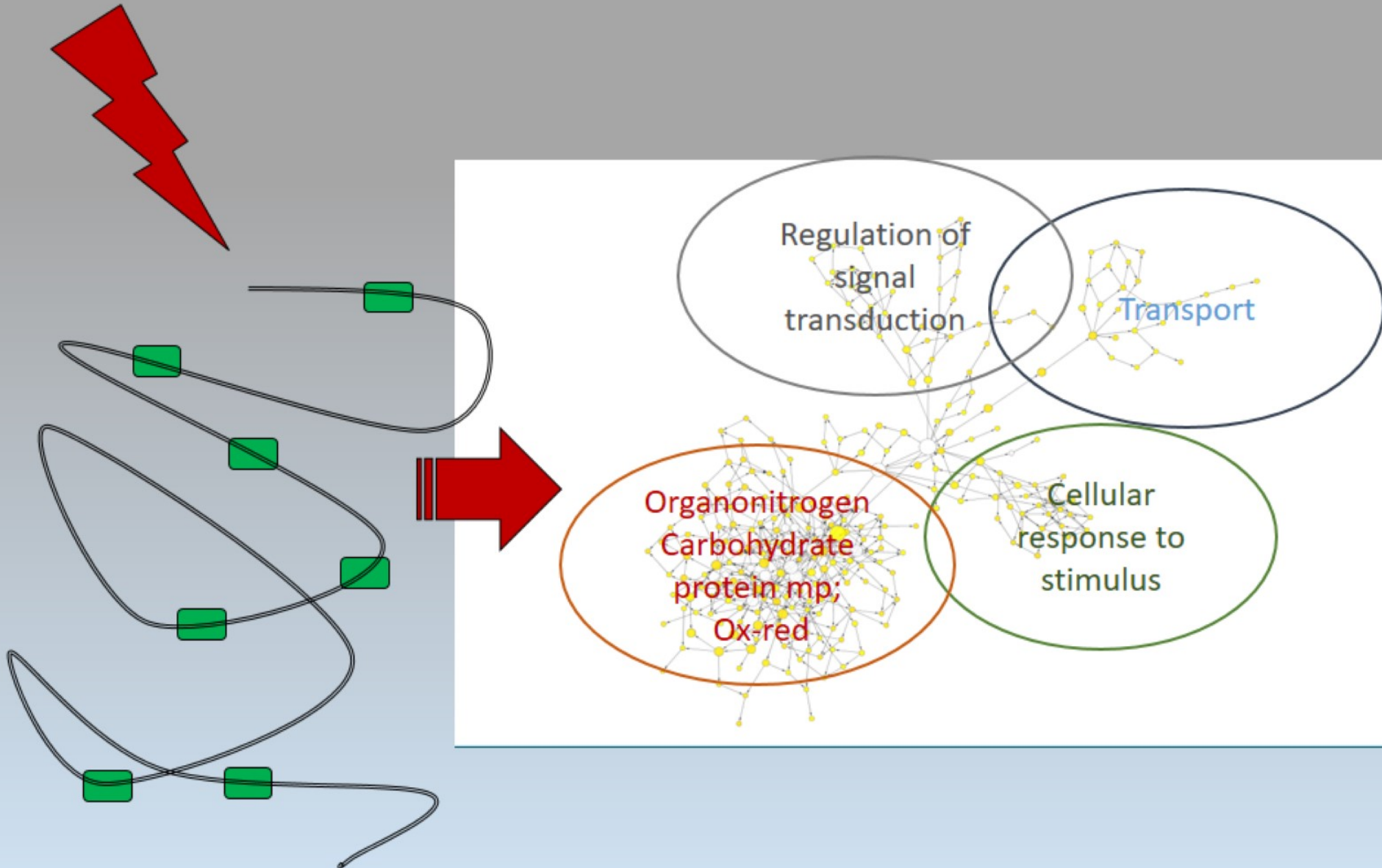
Three homologous protein kinase genes with *IFG* insertions were identified: plastidial pyruvate kinase coding gene, PTI1-like tyrosine protein kinase gene, and putative receptor-like protein kinase gene.

Daugava RLC satur gaismas-sensitīvus motīvus

- *P.taeda*: (AGNN)₃(**AG**)₃(NNAG)₂ and (AGNN)₂(AGN)₄.
- *P.lambertiana*: AA(AGG)₂A₃(AGG)₂GA₃AGG and GAG(AGG)₃AGA(AG)₃.
- The (**AG**)₄**A** motif is one of the most common TFBS for plant promoters (Liu et al., 2013), that regulate light-responsive phototransduction processes in plants (Parida et al., 2009).



Gēnu tīklošanās



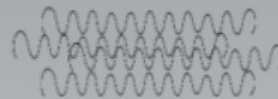
TE-mērķēta atlase un jaunās paaudzes sekvenēšana



RNA extraction from inoculated seedlings



RNA purification from dsDNA



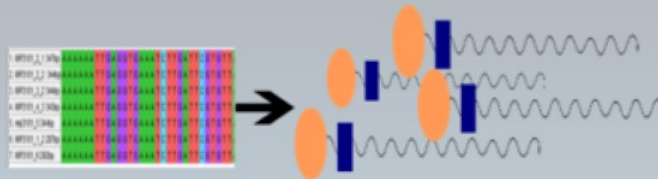
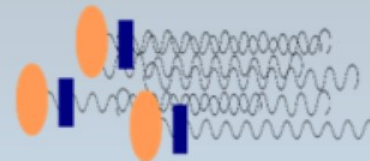
Reverse transcription with random hexamers producing ds-cDNA



Selection of transcripts with biotinylated TE-probes

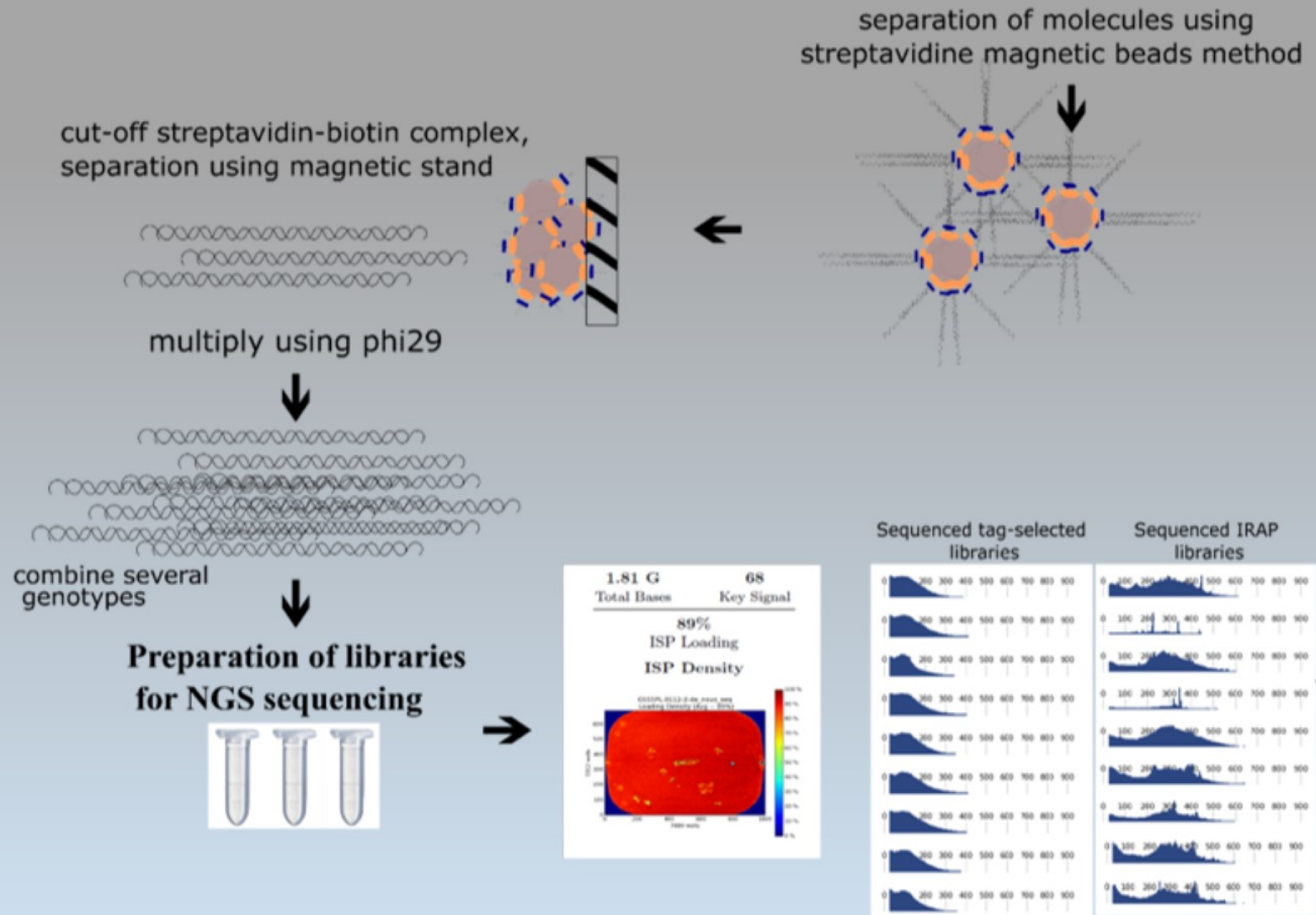


denaturation/
renaturation with tag



Genome analysis of reference species
TE selection, oligonucleotide design ~120bp
with 5'-biotin modification; restriction site

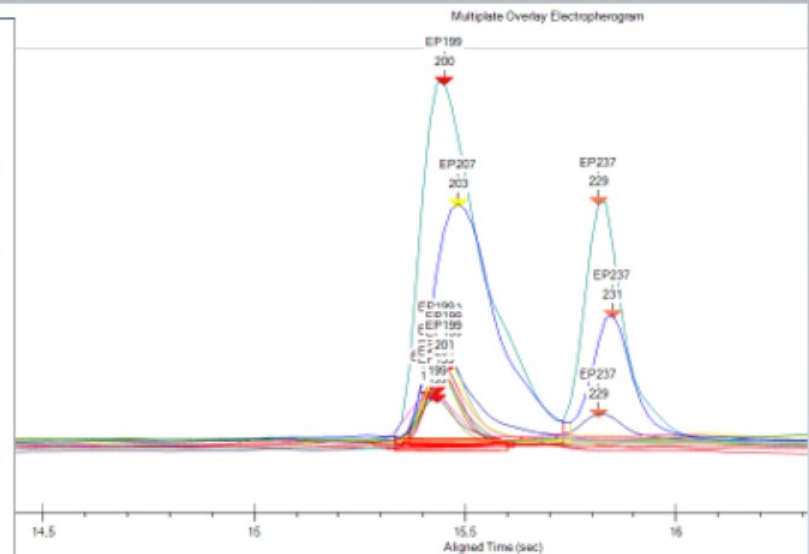
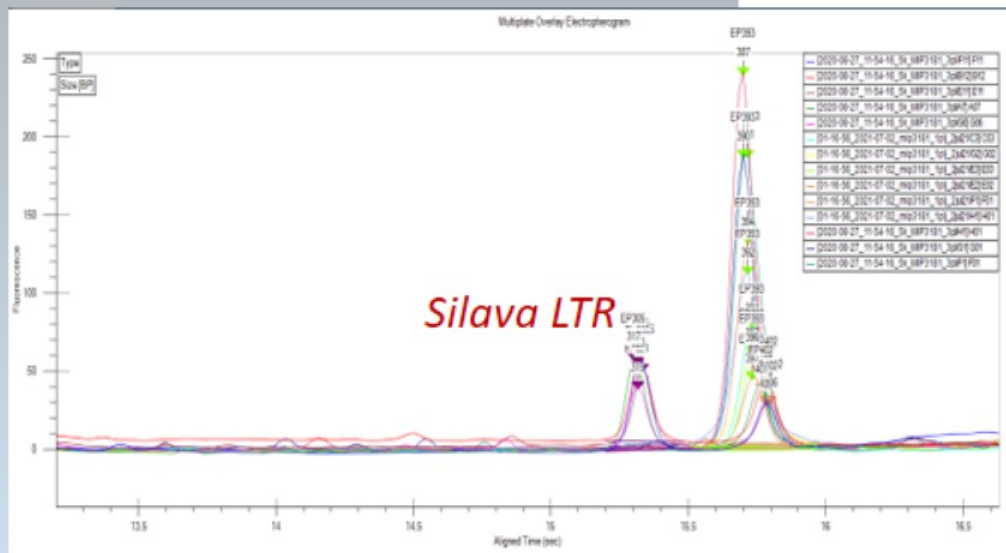
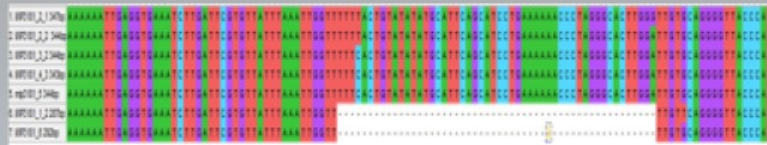
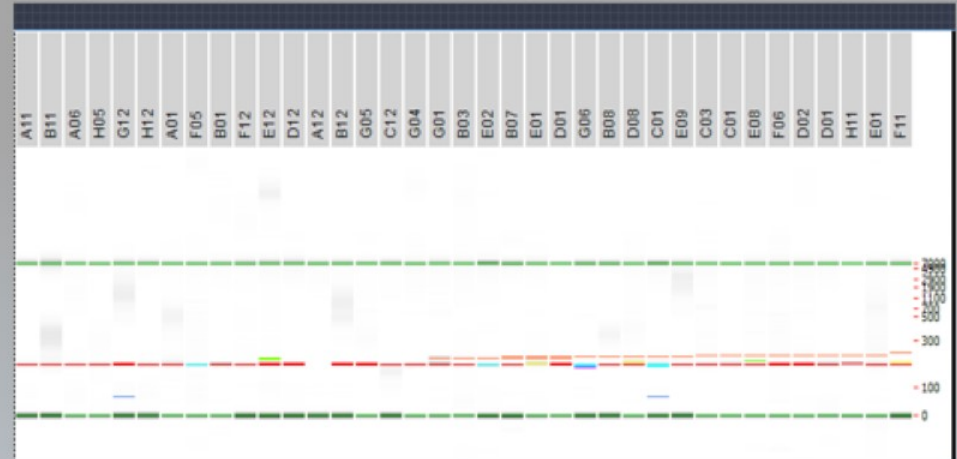
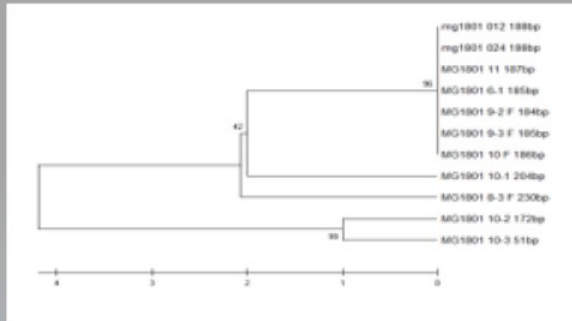
TE-mērķēta atlase un jaunās paaudzes sekvenēšana



Molekulāro marķieru veidošana

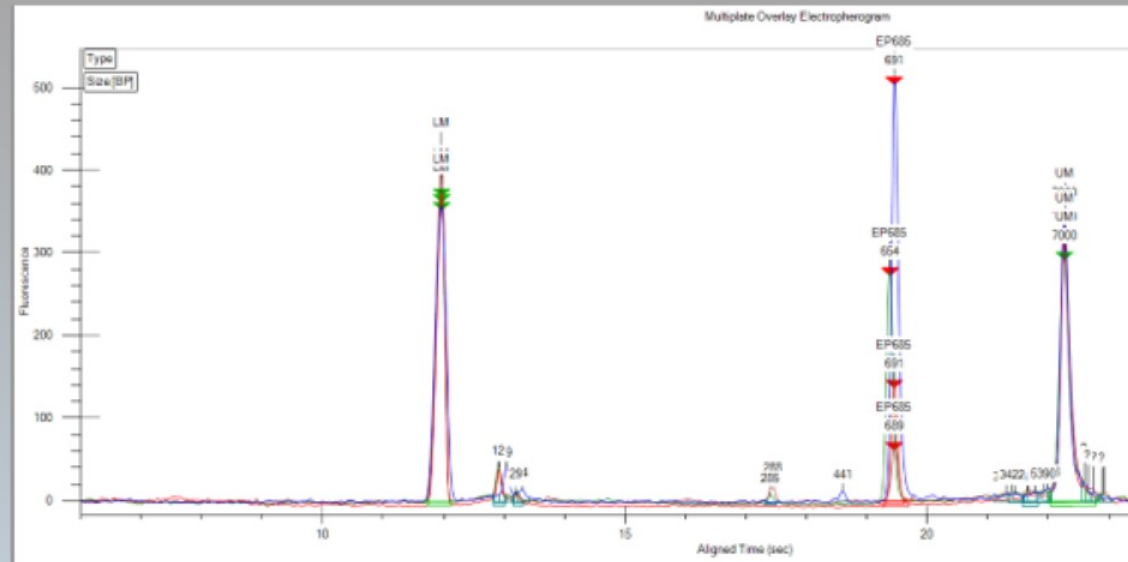
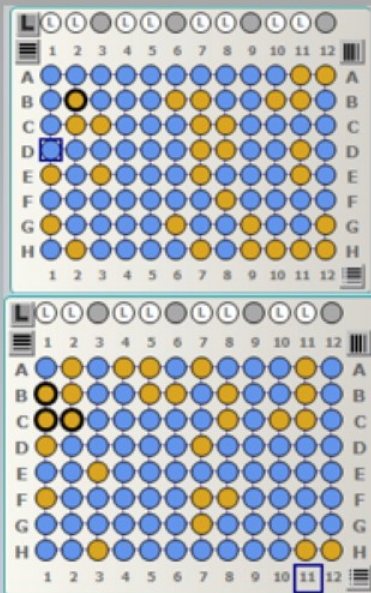
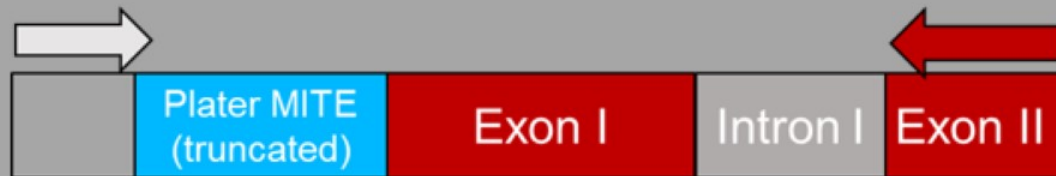
-retās aleles satur citu TE daļas

-polimorfisms MITE sekvencē



Molekulāro marķieru veidošana

-apstiprināti gēni, kas satur *Pater* MITE



More resistant-pop1	Low damage-pop2	more damage-pop3	nat-pop-1	nat-pop2	average fq
0,27	0,21	0,33	0,19	0,42	0,29

Transponējami elementi ir funkcionāla genoma sastāvdaļa



Paldies kolēģiem, kas dažādā laikā man palīdzēja!



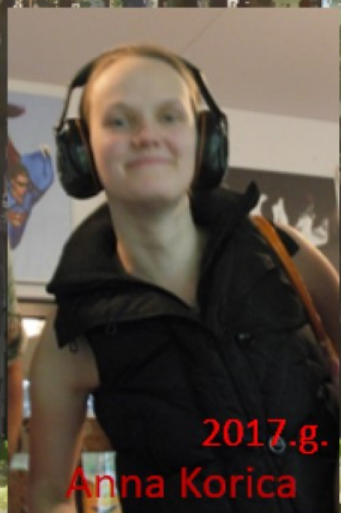
Dainis Ruņģis



2021.g.
Vendija Lazdiņa



Angelika Voronova
2019.g.
Rita Bandariavičiūtė



2017.g.
Anna Korica



2015.g.
Viktorija Sirsniņa




PostDoc
Latvia



FLPP
FUNDAMENTĀLO UN
LIETIŠKO PĒTĪJUMU
PROJEKTI

Paldies par uzmanību!



Don't stress: save your genome for the future