

BOOK REVIEWS

Рецензія
на монографію член.-кор. НАН України В. А. Кунаха
«Мобільні генетичні елементи і пластичність геному рослин»
(К.: Логос, 2013. — 298 с.: іл.)



Генетична регуляція розвитку і життєдіяльності організму відбувається за допомогою двох діалектично взаємопов'язаних процесів: спадковості та мінливості. На початкових етапах досліджень генетичних основ життєдіяльності у різних країнах перевагу віддавали першому чи другому факторам. Наприклад, на Заході більше схилилися до строгої детермінації та запрограмованості процесів життєдіяльності (починаючи з дослідів Г. Менделя та досліджень А. Вейсмана і Т. Моргана), тоді як у колишньому Радянському Союзі популярнішою була точка зору, згідно з якою розвиток організму можна змінювати за бажанням дослідника епігенетично, залежно від умов середовища (догми Т. Лисенка, досліді В. Мічуріна).

Згодом стало очевидним, що істина, як завжди, знаходиться посередині. Саме діалектична взаємодія процесів спадковості (наявність стабільних генетичних елементів) та мінливості (зміна умов середовища, наявність мобільних елементів геному) зумовлює той чи інший конкретний шлях розвитку даного організму. Якщо вивчення консервативних елементів геному, його стабільної складової завдяки численним дослідженням молекулярних генетиків та біохіміків сприяло розумінню основних механізмів його функціонування та складання готових генетичних карт для низки організмів, то відкриття та дослідження мобільних генетичних елементів здійснювалося вже на другому, не менш важливому, ніж попередній, етапі розвитку сучасної генетики.

Рослини, на відміну від інших організмів, як правило, прив'язані до конкретного місця свого існування, яке впродовж усього життя вони змінювати не можуть. Отже, можливості адаптації до змін умов довкілля у них певним чином обмежені. Тому в процесі еволюції у рослин розвинулися відмінні від тваринного світу спеціальні механізми компенсації цих обмежень. В останні роки стало зрозумілим, що вони пов'язані передусім з особливою пластичністю їхнього геному, можливістю швидкого та ефективного реагування на зміни умов навколишнього середовища. Численні дослідження доводять, що у рослин дуже розвинутою є система мобільних генетичних елементів, які є відповідальними за швидке епігенетичне реагування на екзогенні та ендогенні впливи. Саме високий ступінь нестабільності геному робить рослини важливою моделлю для вивчення механізмів мінливості.

Зазначеній проблемі й присвячено монографію член.-кор. НАН України, д-ра біологічних наук, проф. Віктора Анатолійовича Кунаха. У ній висвітлено та проаналізовано основний масив даних, що був накопичений на всіх етапах вивчення механізмів генетичної мінливості рослин. Можна без перебільшення стверджувати, що на цей час рецензована монографія є найповнішим відображенням стану досліджень у галузі мобільних генетичних елементів рослин у світі.

Книга складається з трьох частин: «Загальна характеристика мобільних (рухомих) елементів геному»; «Біологічне значення мобільних генетичних елементів»; «Прикладні аспекти». У першій частині охарактеризовано історію відкриття та подано характеристику мобільних генетичних елементів рослин. Серед двох великих груп — ретротранспозонів та ДНК-транспозонів — більшу увагу приділено першій, як доволі представницькій і такій, що має найбільше

значення та розповсюдження. Відзначено, що: «Мобільні генетичні елементи I класу — це мобільні генетичні елементи, які складають значну частину повторюваних послідовностей ДНК евкаріотів. Вони переміщуються за механізмом «скопійою і встав» («copy and paste»), оскільки кодують зворотну транскриптазу і переміщуються за допомогою РНК-інтермедіата, тобто використовують кодовану ними РНК як матрицю для синтезу кДНК, на основі якої будується друга нитка ДНК. У подальшому ця ДНК і включається у хромосому за допомогою інтегрази, що зазвичай кодується тим самим елементом. Саме тому ретротранспозони належать до класу I мобільних генетичних елементів, тобто до зворотно транскрибованих елементів, які мультиплікуються (помножуються) шляхом передачі генетичної інформації від РНК до ДНК подібно ретровірусам і параретровірусам. Ретротранспозони виявлено практично в усіх евкаріотів, що належать до різних таксономічних груп, таких як найпростіші, гриби, тварини і рослини. У рослин вони можуть складати до 50 % і більше всієї геномної ДНК» (розділ 3, с. 30).

На відміну від ретротранспозонів, які використовують реплікативний принцип переміщення, властиві рослинам мобільні елементи II класу мігрують за рахунок вирізання (ексцизії) та наступного вбудовування (реінтеграції) у геном. В основу такого механізму покладено характерну структуру ДНК-транспозонів, насамперед їхні інвертовані кінцеві повтори TIR (terminal inverted repeats), що потрібні для рухливості окремої копії елемента. Крім того, безпосередньо до інвертованих кінцевих повторів зазвичай прилягають порівняно довгі ділянки, що містять багато разів повторюваний олігонуклеотидний мотив. Із наведеного визначення двох класів мобільних елементів стає зрозумілим, чому перший клас набув набагато більшого поширення порівняно з другим: в основі цього лежить значно простіший молекулярний механізм утворення ретротранспозонів. Наприклад, велику кількість ретротранспозонів групи *Ty1/copia* ідентифіковано у кукурудзи: *B5, G, Hopscotch, Ji, Opie, Stonor, Prem-1, Fourf, Victum* тощо. Кожна високоповторювана родина ретротранспозонів становить значну частину геному кукурудзи. Встановлено, що близько 50% геному кукурудзи складається з послідовностей ретротранспозонів, п'ять великих родин яких становлять майже 25% геномної ДНК. Так, 30 000 копій елемента *Opie* складають близько 10–15% 2 400-мегабазного геному кукурудзи. Усього ретротранспозони групи *Ty1/copia* — *Opie* та *Ji*, а також LTR-вмісні ретротранспозони групи *Ty3/gypsy* — *Cinful, Grande* та *Huck* — становлять понад 25% геному кукурудзи.

Важливість першого класу мобільних генетичних елементів забезпечується реплікативним механізмом їх транспозиції у геномах хазяїв, що зумовлює високу інвазивність. Забезпечення необхідної життєздатності організму хазяїна і, тим самим, власного виживання здійснюється жорстким контролем процесу ретротранспозиції, життєвого циклу транспозонів.

Далі у монографії наведено класифікацію численних представників ретротранспозонів, з якої випливає широка розповсюдженість цього класу мобільних генетичних елементів серед різних представників рослин, а також механізми включення їх у геном. Процес включення нової копії LTR-ретротранспозона в геном відбувається за допомогою інтегрази, яка впізнає і зв'язує кінці елемента (LTRs). Інтеграза робить асиметричний дволанцюговий розрив у сайті-мішені геномної ДНК, який, як правило, має довжину 2–16 пар основ. Природа сайту-мішені (розташування сайту в гетерохроматиновій ділянці, наявність вбудованих у нього раніше інших ретротранспозонів) впливає на вірогідність інтеграції ретроелементів у даний сайт. Утворені дволанцюгові розриви з'єднуються системою репарації клітини хазяїна із формуванням дуплікацій на місці вбудови нового елемента (TSD). Процес вбудовування не потребує додаткової екзогенної АТФ або інших енергетичних інтермедіатів.

Вкрай важливим є той факт, що наявність у геномах рослин великої кількості послідовностей, які є неактивними LTR-вмісними ретротранспозонами, — це результат дії таких механізмів інактивації мобільних елементів:

- метилування ДНК;
- перетворення ділянок вбудовування на гетерохроматин;
- утворення так званих *solo*-елементів за рахунок нерівної рекомбінації всередині елементів;
- накопичення невеликих делецій через неточну рекомбінацію.

Наприкінці розгляду цього блоку питань подано докладний опис розповсюдження ретротранспозонів серед рослин: покрито-, голонасінних і вищих безнасінних. Висунуто цікаву гіпотезу, згідно з якою за своєю структурою і організацією LTR-вмісні ретротранспозони є близькими до інтегрованого генетичного матеріалу ретровірусів і відрізняються від нього лише відсутністю гена *env*, який кодує структурний протеїн вірусної капсиди. Відповідно типові ретротранспозони, ймовірно, є дефектними ретровірусами, які втратили стадію інфекційних позаклітинних часточок і перетворилися на досить своєрідні елементи хазяйського геному. На

користь цього припущення свідчить і реплікативний механізм переміщення ретротранспозонів, що ґрунтується на процесі зворотної транскрипції. Нещодавно висловлено припущення, що еволюційний процес може йти двома напрямками: як перетворенням ретротранспозонів на ретровіруси, так і формуванням ретротранспозонів на базі ретровірусів.

На завершення автор зазначає, що дослідження ретротранспозонів рослин надає інформацію про роль ретротранспозонів в організації геному вищих еукаріотів. Відмінності у розмірах геномів рослин безпосередньо пов'язані з кількістю ретроелементів. Встановлено, що збільшення розмірів геномів рослин у процесі еволюції пов'язано з активними переміщеннями ретротранспозонів, тимчасом як зменшення розмірів відбувається внаслідок елімінації ретротранспозонів за рахунок рекомбінаційних процесів.

У наступній частині (розділ 4) автор дає детальну характеристику другого класу мобільних елементів рослин: ДНК-транспозонів. Зокрема, йдеться про те, що, на відміну від ретротранспозонів, які використовують реплікативний принцип переміщення, властиві рослинам мобільні елементи II класу мігрують шляхом вирізання (ексцизиї) та наступного вбудовування (реінтеграції) в геном. В основу такого механізму покладено характерну структуру ДНК-транспозонів, насамперед їхні інвертовані кінцеві повтори TIR (terminal inverted repeats), потрібні для рухливості окремої копії елемента. Окрім того, кожен тип ДНК-транспозонів представлений у геномі щонайменше трьома варіантами:

- повноцінні мобільні елементи, здатні переміщуватися навіть у гетерологічній системі;
- неавтономні елементи, мобільність яких може забезпечувати лише функціонально активна транспозаза, що кодується іншими копіями даного транспозона;
- повністю нерухомі елементи, здатні, однак, активувати транспозицію споріднених неавтономних копій.

Головна ідея, що її втілено у монографії, — це аналіз мобільних генетичних елементів як матеріальних носіїв мінливості. Зокрема, наголошується, що найхарактернішими для їхньої дії є соматичні мутації, однак ці елементи індукують мутації також у генах зародкової лінії, призводячи до спадкових генетичних змін. Інтерес до мобільних генетичних елементів зростає і далі в міру того, як ставав відомим склад різних геномів і з'ясувалося, що практично більша частина геномної ДНК складається із мобільних елементів.

Наразі відомо, що наявність мобільних геномних елементів у геномах еукаріотів зумовлює низку різноманітних генетичних наслідків. Найвідомішими серед них на сьогодні є такі.

- *Переміщення і вбудовування мобільних елементів у гени може спричинити мутації.* Величезна, а можливо й переважна, кількість «спонтанних» мутацій — це наслідок інсерцій мобільних генетичних елементів. Вбудовуючись у ген, мобільний елемент може пошкодити екзон, «розірвавши» його. У такому разі ген буде позбавлений можливості кодувати протеїн. Вбудовуючись у ділянку промоторів чи енхансерів, мобільний елемент може ушкодити регуляторну зону гена. Інсерція у ділянку інтрона може виявитися нешкідливою, оскільки вся послідовність інтрона разом із мобільним елементом буде вирізана під час процесингу мРНК, а сусідні екзони безперешкодно сплайсуватимуться. Якщо ж транспозон вбудовується у ділянку інтронів, яка контролює процес сплайсингу, може відбутися мутація. Найтипівіший приклад — розроблення експериментальних схем, які дають змогу отримувати велику кількість мутацій у дрозофіли, індукованих мобільними *P*-елементами, причому інсерція присутня у мутантів у єдиному екземплярі.

- *Зміна стану активності генів.* Довгі кінцеві повтори (ДКП або LTRs) є промоторами ретротранспозона, причому як LTR, так і сам ретротранспозон містять нуклеотидні послідовності, що є енхансерами транскрипції. Тому переміщення цих сигналів у геномі може змінювати регуляцію активності генів. Наприклад, якщо мобільний елемент виявився біля «мовчазного» гена, то результатом може бути його експресія. Стосовно ретротранспозонів особливі можливості для перенесення і зміни регуляторних сигналів виникають тоді, коли сам елемент видаляється через кросинговер між LTR з ідентичними послідовностями, унаслідок чого зберігається лише один ДКП (solo-LTR) на місці вбудовування ретротранспозона. Це явище особливо поширене в клітинах дріжджів. Установлено, що такі поодинокі LTR істотно впливають на регуляторні системи клітини.

- *Формування хромосомних перебудов.* Унаслідок кросинговеру між однаково орієнтованими мобільними елементами виникають делеція і дуплікація матеріалу, розташованого між інсерціями.

- *Формування структури хромосом, включаючи центромери, теломери.* Найвідоміший приклад стосовно теломер — це дрозофіла, у якої відсутня теломеразна «машина», але кінці ДНК подовжуються за рахунок переміщень ретротранспозонів.

• *Участь у горизонтальному перенесенні генів.* Інфекційні ретровіруси здатні заражати організми, що належать до різних видів, і переносити власний генетичний матеріал, утворюючи копії ДНК, що вбудовуються у геном. Саме таким шляхом могли поширюватися ретротранспозони. Цей спосіб передачі генів отримав назву горизонтального, на відміну від вертикального, успадкування із покоління в покоління. Наприклад, поширення транспозона *mariner* серед філогенетично віддалених груп комах може свідчити про повторні переходи цього елемента від виду до виду. Зокрема, один із ретротранспозонів дрозодіфи, а саме *gypsy*, як з'ясувалось, є справжнім ретровірусом: шляхом ін'єкції або згодовування вірусних часточок вдається заразити мух, які не несуть ці транспозони.

• *Регуляція статі і вплив на мейоз. Ці та інші генетичні та епігенетичні ефекти зумовили широке застосування — для трансформації в евкаріотів, клонування генів, пошуку енхансерів тощо.*

Велику увагу у монографії приділено висвітленню біологічного значення та використання мобільних елементів у практиці рослинництва.

Зокрема, важливе значення мають мобільні елементи в епігенетиці рослин. У цьому зв'язку постає питання: які механізми утворення різноманіття геномів? Відповідаючи на нього, автор зазначає, що впродовж тривалого часу основну увагу на рівні послідовностей ДНК приділяли таким змінам, як делеції, дуплікації, інверсії, точкові мутації, хромосомні перебудови, та особливостям розвитку (динаміки) геномів і генофондів популяцій у часовому вимірі. Безперечно, такі зміни є важливими для генерування мінливості, як нейтральної, так і не нейтральної, за якої добір може діяти безпосередньо. Останнім часом відбулася зміна в оцінці мобільних елементів, і погляд на них як на егоїстичних паразитів змінилася на розуміння їх як геномних симбіонтів. Багато з рослинних геномів надзвичайно багаті на такі послідовності, разом з тим в інших евкаріотів розвинулись ефективні механізми, які позбавляють геном цих послідовностей. Загалом одержані дані свідчать про те, що таке співжиття дає організмові певні переваги. Найпереконливіше про це свідчить структура центромерних і теломерних ділянок геномів, які є важливими для цілісності геному і багаті на такі послідовності. На прикладі таких культурних рослин, як кукурудза та ротики садові *Antirrhinum*, показано, що інтеграція рухливих елементів у кодувальні гени чи поряд з ними у рослин генерує нову фенотипову мінливість. Однак є великі відмінності між популяціями культивованих рослин і рослинами у природних популяціях, де природний добір оптимізує геном.

Іншим механізмом участі мобільних елементів у мінливості рослин є те, що епігенетичні системи можуть генерувати нову мінливість у популяціях рослин, індукуючи мутації у генах, що характеризуються великим регуляторним ефектом, зокрема в таких генах, як *MET1* та *DDM1*. Відсутність певної функції не завжди є летальною для рослини. Так, вона може сприяти утворенню стабільних епіалелів генів, що є важливими для розвитку морфології, а також активації рухливих елементів. Велику роль відіграють мобільні елементи у перепрограмуванні зчитування генетичної інформації в онтогенезі. Глобальна реактивація таких елементів у вегетативному ядрі пилку, очевидно, залежить від зниження експресії генів, потрібних як для біогенезу siRNA, так і для формування гетерохроматину. Втрата одного лише шляху 24-нуклеотидної siRNA (*rdr2ldcl3*), принаймні в організмі рослини, не призводить до транспозиції *AtMul*. Вона відбувається лише у мутантів, що втрачають як модифікацію гетерохроматинового гістону, так і метилування ДНК, таких як *ddm1*. Мобільні елементи рослин можуть також реактивуватись у насінні, що розвивається.

Найважливішим внутрішнім джерелом змін генетичної структури популяції вважають мобільні генетичні елементи — вони здатні індукувати мутації, змінювати експресію генів, спричинювати хромосомні аберації, істотно впливають на організацію (структуру) і функцію геному. Генетична теорія популяцій припускає, що динаміка транспозонів у природних популяціях відображає баланс між тенденцією цих елементів до зростання кількості шляхом транспозиції і зменшення завдяки природному добору, що діє проти особин з великою кількістю їхніх копій. На різних об'єктах було встановлено, що представники однієї і тієї самої родини мобільних генетичних елементів характеризуються як внутрішньовидовою варіабельністю, так і змінами в часі. Саме дослідження внутрішньовидової динаміки мобільних генетичних елементів, особливо в крайових (маргінальних) популяціях, де мікроеволюційні процеси інтенсифіковані, може істотно поліпшити розуміння процесів видоутворення. Одним із найефективніших шляхів вивчення динаміки транспозонів у часовому і просторовому вимірах є екологічний підхід, за допомогою якого досліджують кілька поколінь рослин у природних популяціях.

Також важливою є роль мобільних генетичних елементів у формуванні статевих хромосом і генетичного різноманіття. Як уже зазначено вище, мобільні генетичні елементи поши-

рені скрізь і є суттєвим компонентом більшості рослинних геномів. Вони становлять щонайменше 45% геному людини і 50–90% геному деяких рослинних видів. Вплив їх на розмір геному очевидний. Так званий «парадокс С-розміру», під яким розуміють значне варіювання розміру геному за відсутності очевидної варіації числа генів, наразі сприймається як результат різної представленості численних повторів, серед яких велику питому вагу мають мобільні генетичні елементи, особливо ретротранспозони. При цьому надлишкова ДНК взагалі й мобільні генетичні елементи зокрема тією чи іншою мірою можуть сприяти збільшенню розміру Y-хромосоми рослин з гетероморфними статевими хромосомами. Окрім того, особливості впливу мобільних генетичних елементів на перебіг мейозу як ключовий елемент статевого процесу можуть бути зумовлені великими відмінностями у розмірах геному різних рослин. Очевидно, при цьому розмір геному може мати велике значення для структурно-функціональної організації хромосоми, упаковки ДНК у хроматині й розподілу генів та повторюваних послідовностей ДНК, які, у свою чергу, впливають на механізм спарювання та вибору сайту рекомбінації. Було виявлено кілька мобільних генетичних елементів, специфічних стосовно статі та статевих хромосом рослин. Відповідно до математичних моделей та експериментальних даних у нерекомбінантних частинах Y-хромосоми накопичуються повторювані послідовності ДНК — як мобільні генетичні елементи, так і тандемні повтори. Зокрема, ці приклади охоплюють LTR-невмісні ретротранспозони у конопель *Cannabis sativa*, тандемні повтори у щавлю *Rumex acetosa*, унікальні повтори у печіночника *Marchantia polymorpha*, ретротранспозони у чоловічо-специфічній ділянці примітивної Y-хромосоми папаї, а також мобільні генетичні елементи, тандемні повтори, мікросателіти і хлоропластну ДНК у смілки *Silene latifolia*. Мобільні генетичні елементи, що діють як безперервні мутагенні агенти внаслідок своєї здатності до ампліфікації та рухомості, імовірно, є головним джерелом генетичного різноманіття.

Значну увагу в монографії приділено таким питанням, як роль мобільних елементів у розмноженні рослин, організації хромосом, горизонтальному перенесенні генів, використанню ретротранспозонних векторних систем у генетичній інженерії, транспозиції та клонуванні генів у трансгенних рослинах тощо.

На наш погляд, поряд із зазначеними вище позитивними моментами монографія містить декілька неістотних недоліків. По-перше, не висвітлено таке важливе питання, як роль мобільних елементів у селекції рослин. «Перекидання містка» між сучасними даними про мобільні генетичні елементи та дослідями відомих селекціонерів допомогло б більш цілеспрямовано проводити експерименти із селекції культурних рослин. По-друге, використання терміна «стрес» у виданні, в якому розглядаються біохімічні та молекулярні аспекти даного питання, є не зовсім доречним. Цим терміном послуговуються деякі вчені-біохіміки, але його «притягнуто за вуха» із фізіології, і потреби використовувати його у біохімії та молекулярній біології, які мають свою специфічну термінологію, немає.

Однак ці незначні, скоріш не зауваження, а побажання жодним чином не применшують значення монографії, вихід якої у світ можна без перебільшення назвати визначною подією у біохімії та молекулярній біології рослин. Книга слугуватиме ґрунтовним посібником для дослідників, викладачів, аспірантів, студентів та всіх спеціалістів, які працюють у зазначеній галузі досліджень.

Доктор біологічних наук

Є. Л. Левицький,

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України