

Поиск новых потенциальных регуляторов холодового стресса среди MYB-подобных транскрипционных факторов у *Arabidopsis thaliana* L.

Выполнил: Тяпкин Александр Вячеславович,
студент кафедры информационной биологии ФЕН НГУ

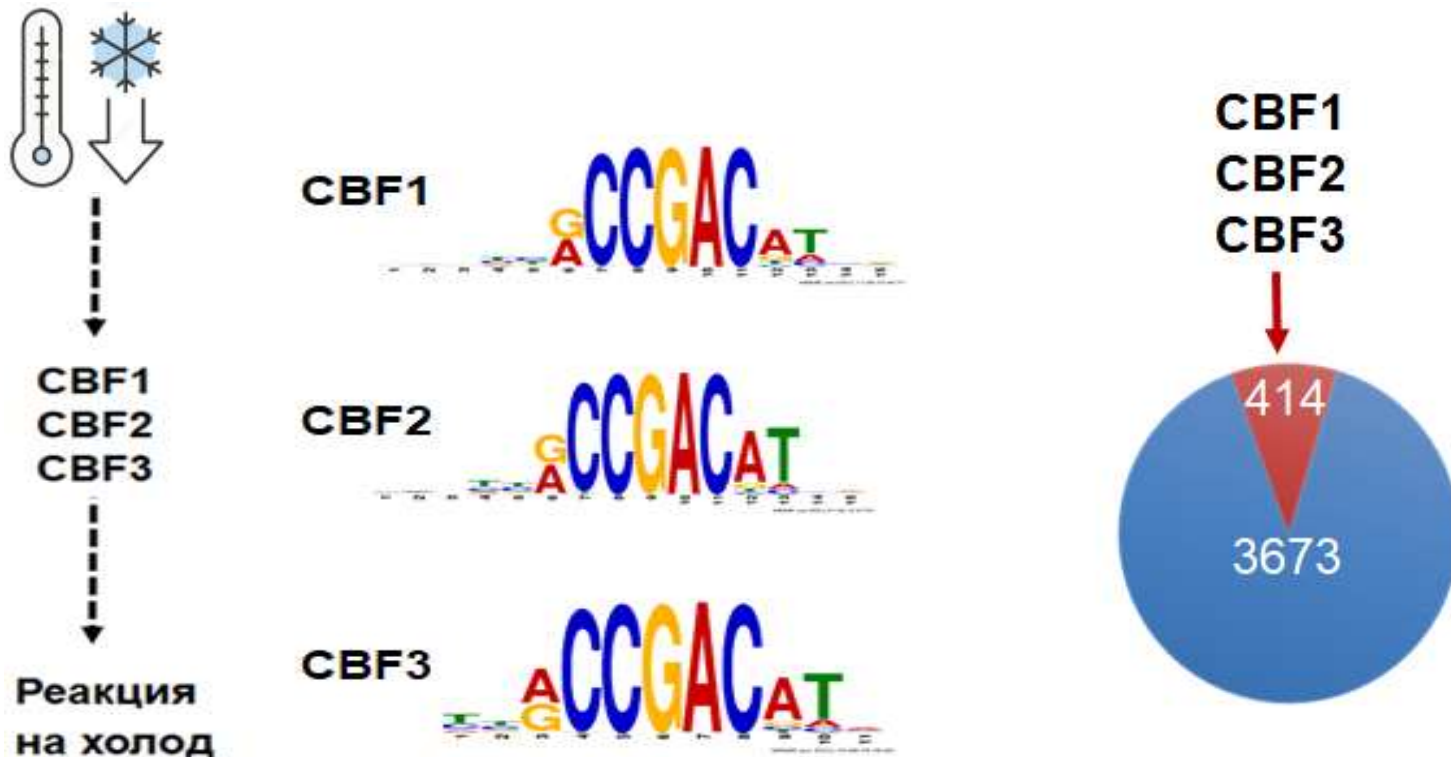
Научный руководитель: к.б.н. Миронова Виктория Владимировна,
в.н.с сектора системной биологии морфогенеза растений

Направление подготовки: 06.03.01

Холодовой стресс - физиологический ответ организма на низкие положительные температуры (от +16°C до 0°C)



CBF транскрипционные факторы – основные регуляторы ответа на холод



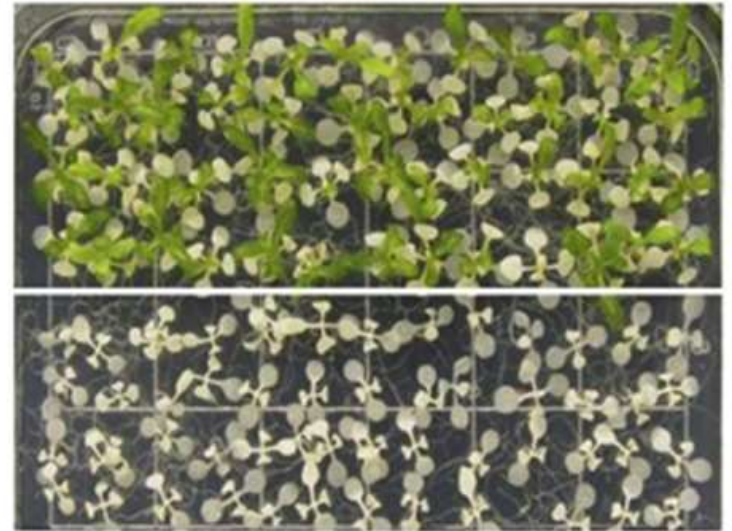
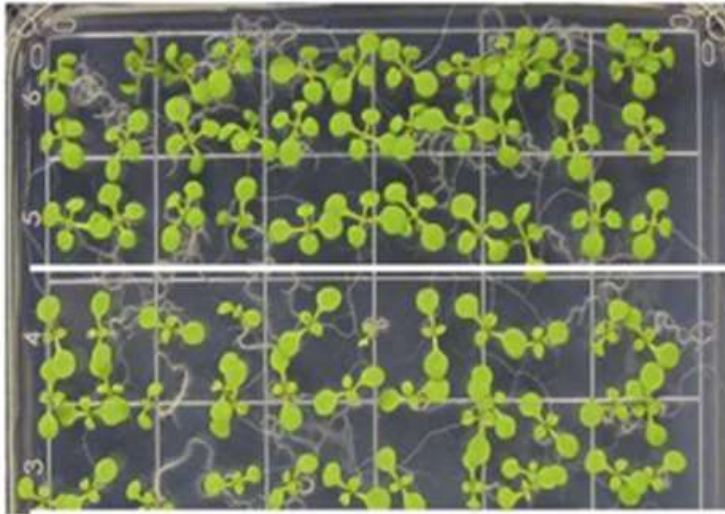
CBF регулируют морозоустойчивость, но не холодоустойчивость

+4 °C

-7 °C

Col-0

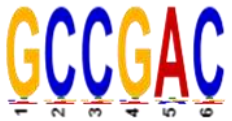




cbf123



Как регулируется холодоустойчивость?

Zhao et al., 2016

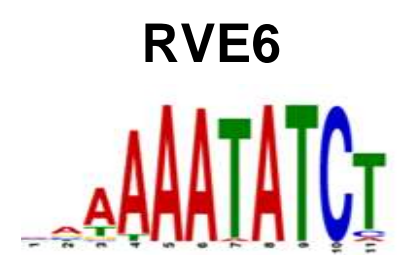
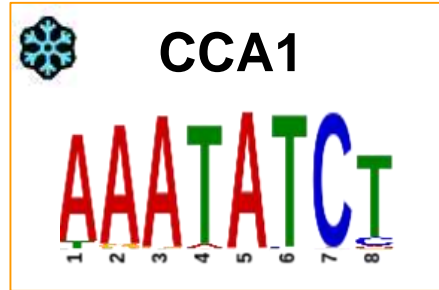
Мета-анализ транскриптомов арабидопсиса выявил цис-элементы, наиболее значимо ассоциированные с холодным стрессом

<u>k-mer</u>	<u>P-value</u>	<u>Семейство</u>	<u>Название</u>
 1 2 3 4 5 6	6.98E-149	AP2/ERF	CBF1-3
 1 2 3 4 5 6	5.54E-137	AP2/ERF	CBF1-3
 1 2 3 4 5 6	1.34E-89	AP2/ERF	CBF1-3
 1 2 3 4 5 6	1.35E-72	MYB-like	?
 1 2 3 4 5 6	1.25E-48	CAMTA	CAMTA1

MYB-подобные ТФ как потенциальные регуляторы ответа на холодовой стресс



ТОМТОМ
аннотация



Сайты связывания
некоторых MYB-подобных белков

Цели и задачи

Цель: поиск новых потенциальных регуляторов холодового стресса среди семейства MYB-подобных белков и изучение их роли в ответе на низкие положительные температуры у *Arabidopsis thaliana*

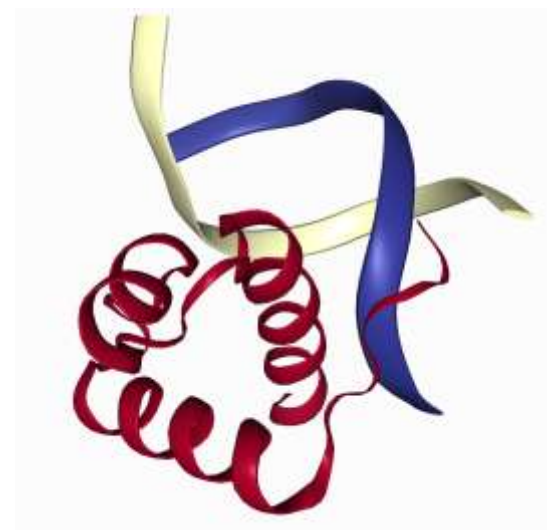
Задачи:

1. Поиск и аннотация паралогов MYB-подобных транскрипционных факторов у *Arabidopsis thaliana*;
2. Выявление чувствительных к изменению температуры MYB-подобных генов на основе биоинформатического анализа свободно доступных данных транскриптомов *Arabidopsis thaliana*, полученных при воздействии низких положительных температур;
3. Поиск MYB-подобных транскрипционных факторов, районы связывания которых обогащены в промоторах регулируемых холодом генов;
4. Оценка влияния мутаций в генах предсказанных регуляторов на развитие корневой системы *A. thaliana* при низких положительных температурах

Семейство MYB-подобных TF включает 66 белков

MYB-подобные белки содержат один ДНК-связывающий MYB-домен:

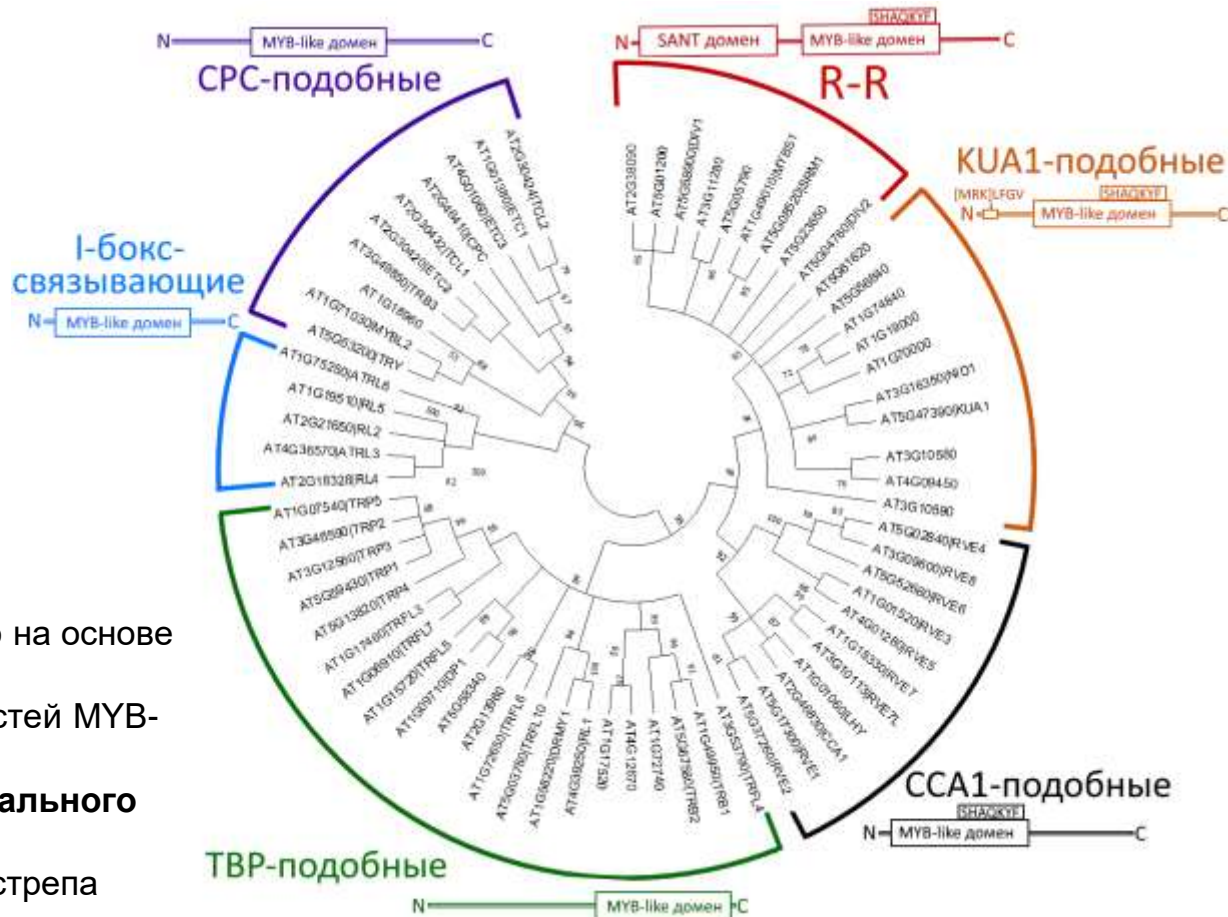
- ~55 аминокислот
- регулярно повторяющиеся 2-3 триптофана
- высоко консервативен



MYB-подобный домен в комплексе с ДНК

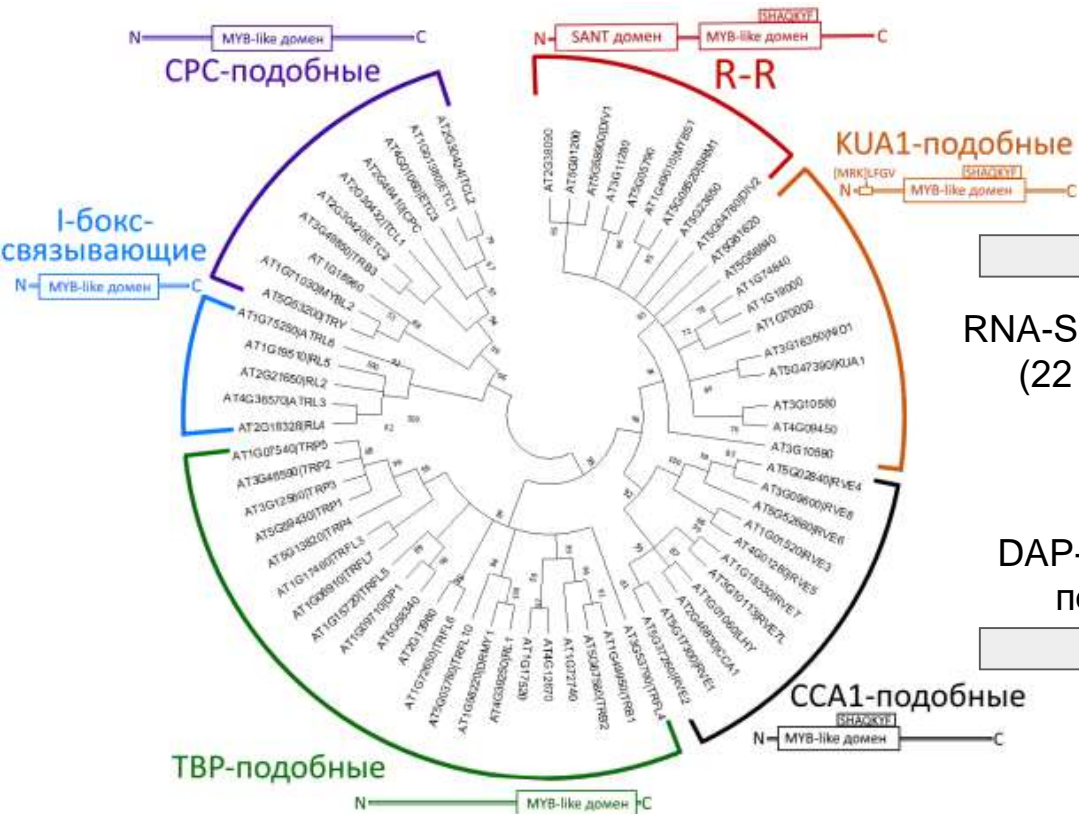
LHY	A	K	A	R	K	P	Y	T	I	T	K	Q	R	E	R	W	T	E	D	E	H	E	R	F	L	E	A	L	R	L	Y	G	R	A	W	Q	R	I	E	E	H	I	G	T	K	T	A	V	Q	I	R	S	H	A	Q	K	F	F	T	K	L
CCA1	I	K	T	R	K	P	Y	T	I	T	K	Q	R	E	R	W	T	E	E	E	H	N	R	F	I	E	A	L	R	L	Y	G	R	A	W	Q	K	I	E	E	H	V	A	T	K	T	A	V	Q	I	R	S	H	A	Q	K	F	F	S	K	V
RVE1	P	K	V	R	K	P	Y	T	I	T	K	E	R	E	R	W	T	D	E	E	H	K	K	F	V	E	A	L	K	L	Y	G	R	A	W	R	I	E	E	H	V	G	S	K	T	A	V	Q	I	R	S	H	A	Q	K	F	F	S	K	V	
RVE2	L	K	T	R	K	P	Y	T	I	T	K	Q	R	E	K	W	T	E	A	E	H	E	K	F	V	E	A	L	K	L	Y	G	R	A	W	R	I	E	E	H	V	G	T	K	T	A	V	Q	I	R	S	H	A	Q	K	F	F	T	K	V	
RVE3	K	K	V	R	K	P	Y	T	I	T	K	S	R	E	N	W	T	E	Q	E	H	D	K	F	L	E	A	L	H	L	F	D	R	D	W	K	K	I	K	A	F	V	G	S	K	T	V	I	Q	I	R	S	H	A	Q	K	Y	F	L	K	V
RVE5	T	K	I	R	K	P	Y	T	I	K	K	S	R	E	N	W	T	D	Q	E	H	D	K	F	L	E	A	L	H	L	F	D	R	D	W	K	K	I	E	A	F	V	G	S	K	T	V	V	Q	I	R	S	H	A	Q	K	Y	F	L	K	V
RVE4	K	K	V	R	K	A	Y	T	I	T	K	S	R	E	S	W	T	E	G	E	H	D	K	F	L	E	A	L	Q	L	F	D	R	D	W	K	K	I	E	D	F	V	G	S	K	T	V	I	Q	I	R	S	H	A	Q	K	Y	F	L	K	V
RVE6	K	K	I	R	K	P	Y	T	I	T	K	S	R	E	S	W	T	E	P	E	H	D	K	F	L	E	A	L	Q	L	F	D	R	D	W	K	K	I	E	A	F	I	G	S	K	T	V	I	Q	I	R	S	H	A	Q	K	Y	F	L	K	V
RVE7	V	K	V	R	K	P	Y	T	V	T	K	Q	R	E	K	W	S	E	E	E	H	D	R	F	L	E	A	I	K	L	Y	G	R	G	W	R	Q	I	Q	E	H	I	G	T	K	T	A	V	Q	I	R	S	H	A	Q	K	F	F	S	K	M
RVE7L	V	K	V	R	K	P	Y	T	V	T	K	Q	R	E	K	W	S	E	E	E	H	D	R	F	L	E	A	I	K	L	Y	G	R	G	W	R	Q	I	Q	E	H	I	G	T	K	T	A	V	Q	I	R	S	H	A	Q	K	F	F	S	K	M
RVE8	K	K	V	R	K	P	Y	T	I	T	K	S	R	E	S	W	T	E	E	E	H	D	K	F	L	E	A	L	Q	L	F	D	R	D	W	K	K	I	E	D	F	V	G	S	K	T	V	I	Q	I	R	S	H	A	Q	K	Y	F	L	K	V

Семейство MYB-подобных ТФ *A. thaliana* разделяется на шесть клад



Дерево построено на основе аминокислотных последовательностей MYB-домена методом максимального правдоподобия, 100 итераций бутстрапа

Поиск регуляторов холодового стресса *in silico*



RNA-Seq, микрочип-данные
(22 шт.) по обработке
растений 4°C

DAP-Seq данные (20 шт.)
по связыванию ТФ

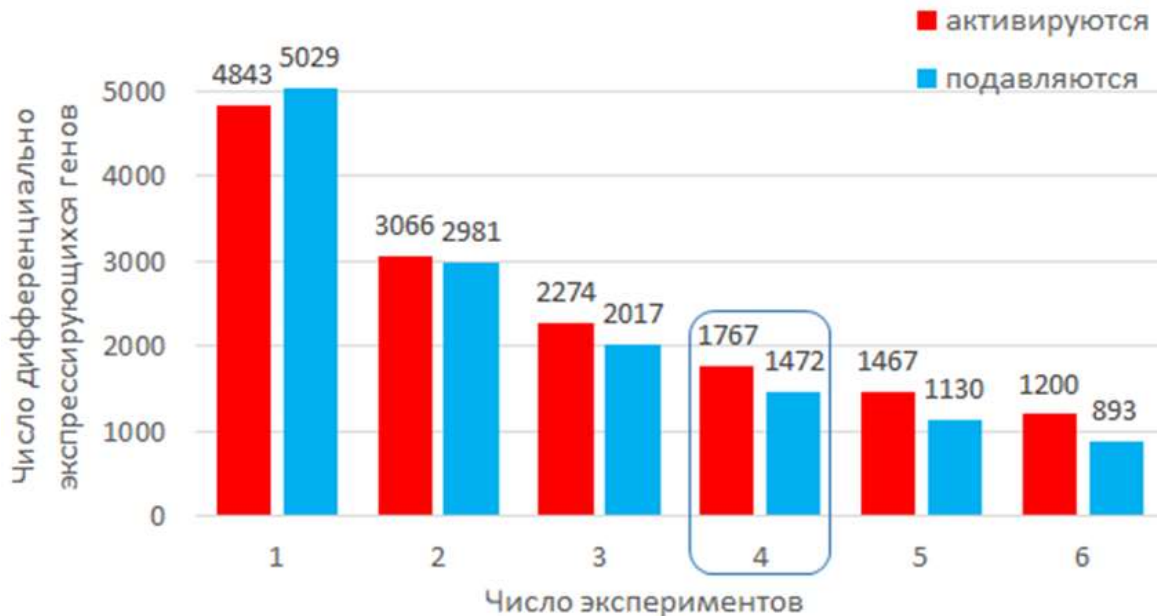
1. Какие MYB-подобные гены меняют экспрессию в ответ на холод?

2. Какие MYB-подобные ТФ связывают промоторы генов, чувствительных к холоду?

В ответ на холод устойчиво изменяется экспрессия 1767+1472 генов

22 транскриптома:

- Время обработки 1 ч – 24 ч;
- Температура 4 - 10°C;
- Ткани: проростки, лист, корень, побег

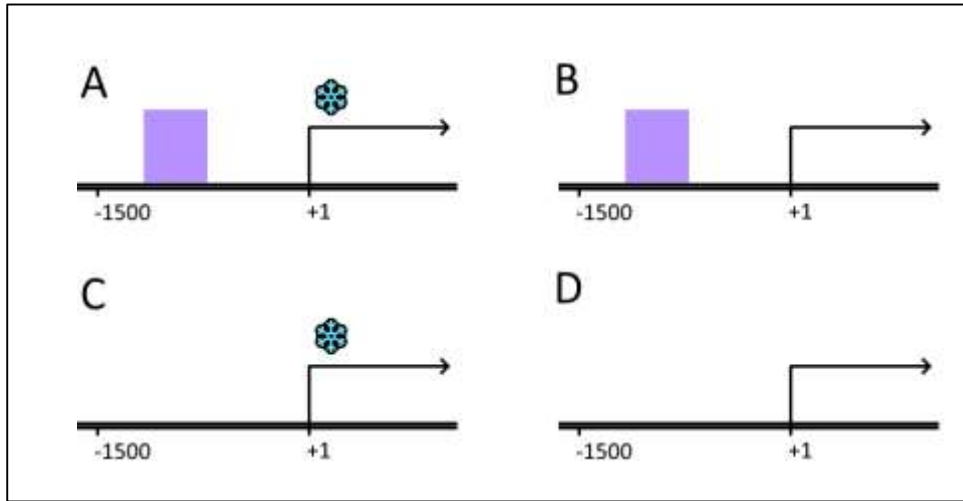



15 из 66 MYB-подобных генов меняют экспрессию в ответ на холод

Из них 7 генов
активируются,
а 8 **подавляются.**

TAIR ID	Название гена	Число экспериментов, где ген	
		активируется	подавляется
AT5G37260	RVE2	14	1
AT2G46830	CCA1	11	0
AT5G17300	RVE1	10	2
AT1G74840	AT1G74840	9	0
AT1G01060	LHY1	8	0
AT5G52660	RVE6	8	0
AT5G58900	DIV1	5	0
AT1G19000	AT1G19000	0	14
AT1G49010	MYSBS1	0	8
AT3G12560	TRP3	0	7
AT5G47390	KUA1	0	6
AT5G53200	TRY	0	6
AT1G72650	TRFL6	0	4
AT1G71030	MYBL2	2	5
AT2G21650	RL2	1	5

Метод поиска транскрипционных факторов, сайты связывания которых обогащены в промоторах регулируемых холодом генов



 - Есть пик связывания транскрипционного фактора

 - Ген является чувствительным к холоду

Точный тест Фишера:

$$\frac{A}{A+C} > \frac{B}{B+D}$$

$$p = \frac{\binom{a+b}{a} \binom{c+d}{c}}{\binom{n}{a+c}} = \frac{(a+b)! (c+d)! (a+c)! (b+d)!}{n! a! b! c! d!}$$

Алгоритм: Shi D., ... Levitsky V., Mironova V., ...
The Plant Cell, 2020

Выявлено 20 MYB-подобных TF, районы связывания которых обогащены в промоторах регулируемых холодом генов

Plant Cistrome
Database

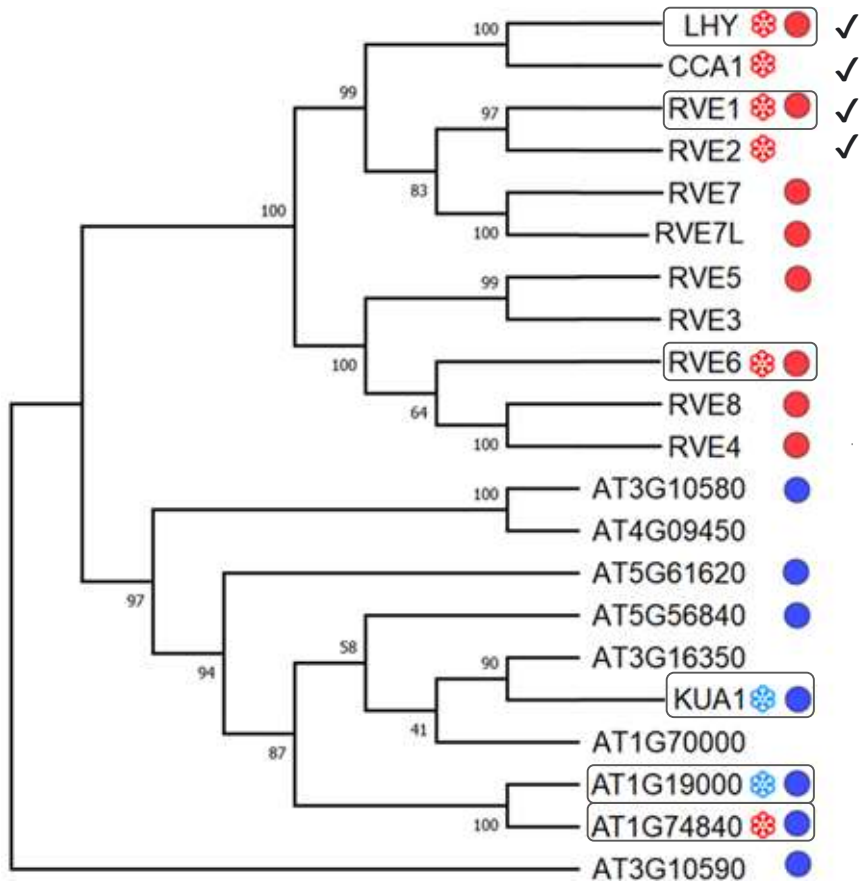


Пики связывания
23 MYB-подобных
TF



TAIR ID	Название гена	Обогащение в промоторах активизирующихся ДЭГ		Обогащение в промоторах подавляющихся ДЭГ	
		Обогащение	adj. P-value	Обогащение	adj. P-value
AT5G02840	RVE4	3.33	1.10E-44	0.88	1.00E+00
AT1G18330	RVE7	2.03	1.17E-44	1.01	1.00E+00
AT1G01060	LHY1	2.00	3.09E-40	1.05	1.00E+00
AT3G09600	RVE8	2.12	2.95E-39	1.03	1.00E+00
AT5G52660	RVE6	2.67	2.35E-38	0.87	1.00E+00
AT4G01280	RVE5	2.15	2.78E-37	0.98	1.00E+00
AT3G10113	RVE7L	1.87	1.78E-35	1.09	9.66E-01
AT5G17300	RVE1	1.82	1.34E-32	1.09	9.21E-01
AT3G46590	TRP2	2.21	4.90E-10	0.65	2.61E-01
AT5G59430	TRP1	2.84	4.92E-07	0.41	2.61E-01
AT5G56840	AT5G56840	1.21	2.24E-03	1.92	5.30E-32
AT5G47390	KUA1	1.27	1.77E-04	1.88	3.76E-27
AT1G19000	AT1G19000	1.16	7.60E-02	1.81	1.68E-23
AT1G49010	MYBS1	1.15	7.60E-02	1.66	1.29E-17
AT1G74840	AT1G74840	1.22	3.92E-02	1.83	1.64E-17
AT5G61620	AT5G61620	1.19	4.00E-02	1.67	1.55E-14
AT5G08520	SRM1	1.12	8.54E-01	1.90	1.18E-12
AT5G58900	DIV1	1.09	6.37E-01	1.49	8.24E-11
AT3G10580	AT3G10580	1.02	1.00E+00	1.59	6.15E-07
AT5G05790	AT5G05790	1.14	8.54E-01	1.74	3.78E-06
AT1G72740	AT1G72740	1.11	5.32E-01	0.74	8.75E-05
AT3G11280	AT3G11280	1.21	8.54E-01	1.69	1.33E-03
AT5G67580	TRB2	1.04	1.00E+00	0.83	5.02E-01

Среди KUA1- и CCA1-подобных ТФ выявлены новые потенциальные регуляторы ответа на холодовой стресс



CCA1-
подобные ТФ



RVE6

KUA1-
подобные ТФ



KUA1
AT1G19000
AT1G74840

- Ген активируется в ответ на холод
- Ген подавляется в ответ на холод
- Обогащение в промоторах активирующихся генов (↑)
- Обогащение в промоторах подавляющихся генов (↓)

Получены две чистые линии *A. thaliana*, несущие T-инсерцию в экзонах генов *RVE1* и *AT1G19000*

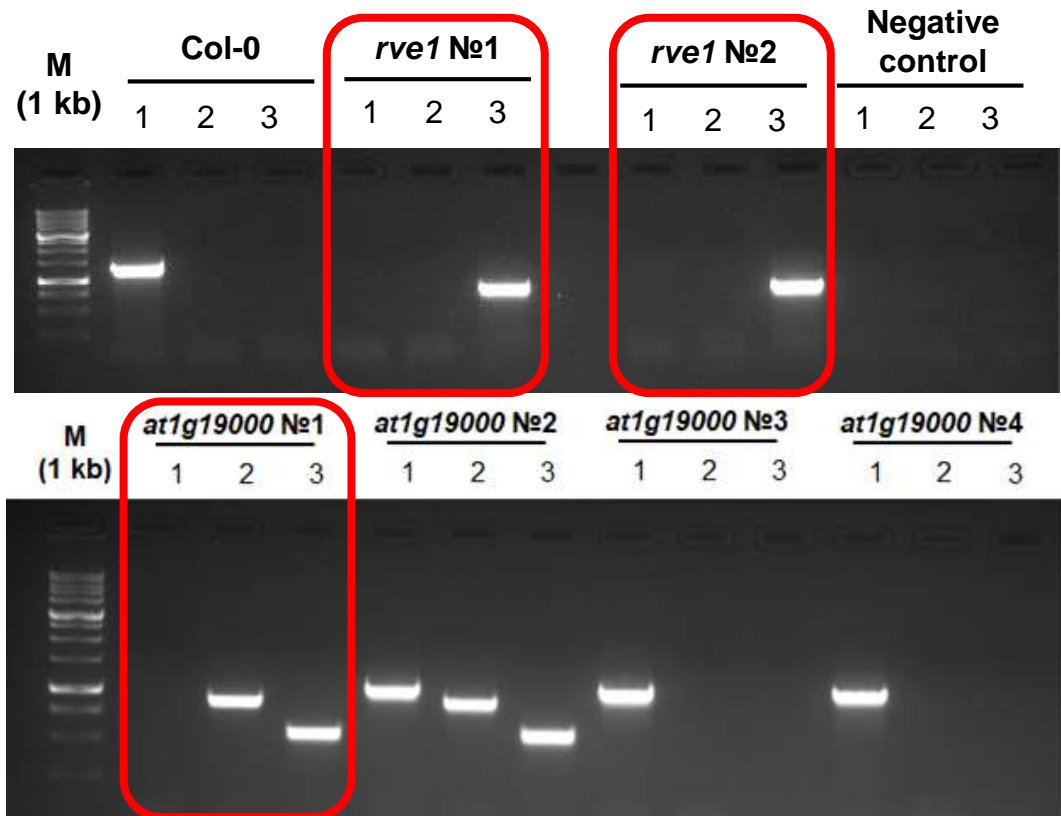
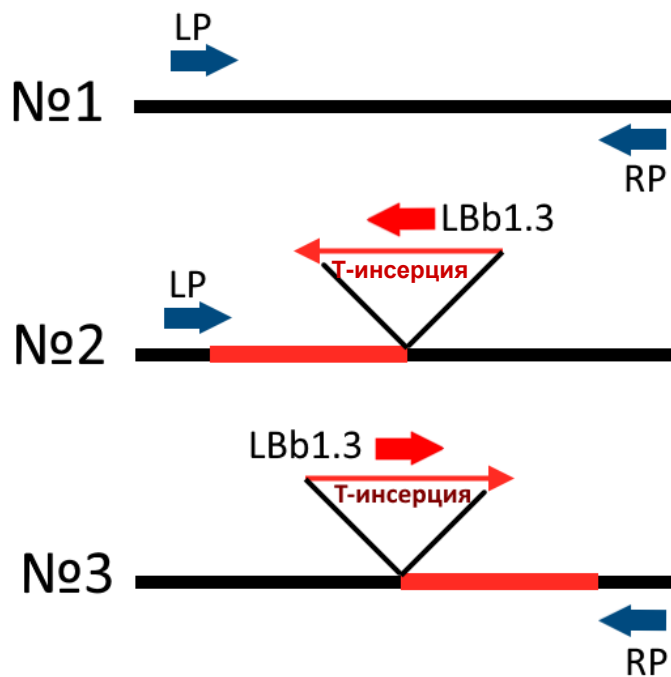
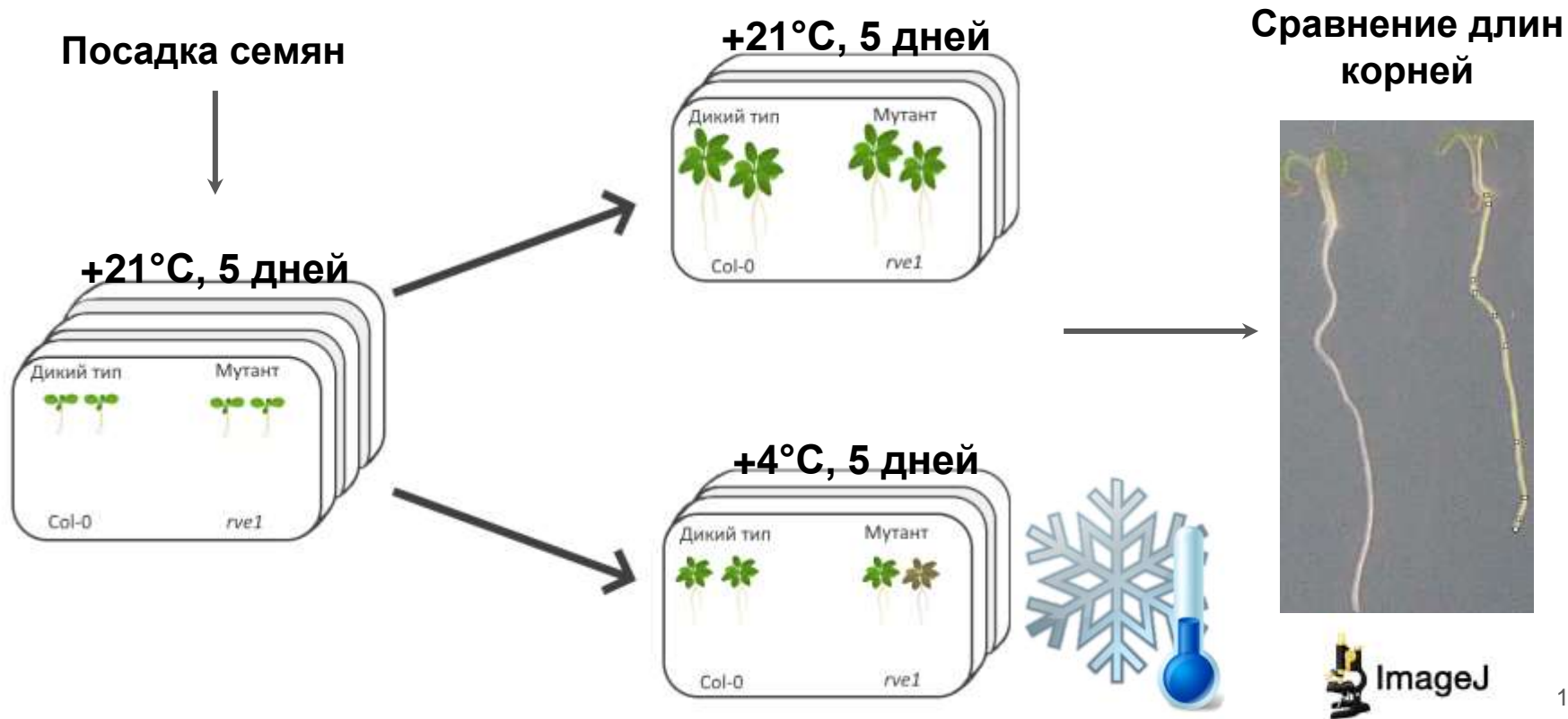
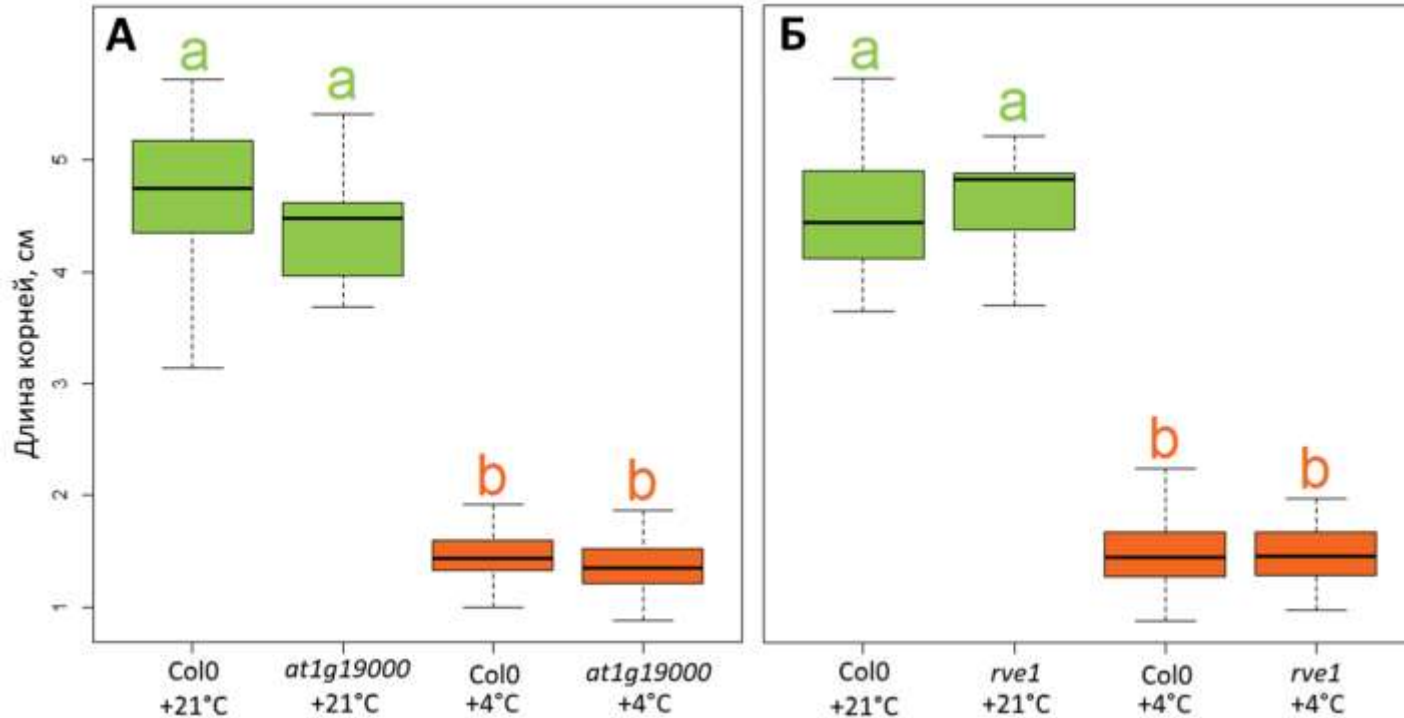


Схема эксперимента по верификации предсказанных регуляторов ответа на холодовой стресс *RVE1* и *AT1G19000*



Мутации в генах *RVE1* и *AT1G19000* не оказывают заметного эффекта на развитие корня по сравнению с растениями дикого типа в нормальных условиях (+21°C) и под воздействием холода (+4°C).



Выводы

1. Филогенетический анализ MYB-подобных транскрипционных факторов показал, что семейство MYB-подобных белков разбивается на шесть клад: CCA1-подобные, KUA1-подобные, TWR-подобные, I-бокс-связывающие, CPC-подобные и R-R белки.
2. Биоинформатический анализ транскриптомных данных продемонстрировал, что значительная часть генов, кодирующих MYB-подобные транскрипционные факторы (15 из 66 гомологов) устойчиво изменяет экспрессию в ответ на низкие положительные температуры. Восемь MYB-подобных генов активировались и семь генов подавлялись в ответ на холод более чем в четырех из 22 независимых экспериментах.
3. Анализ обогащения промоторов холодочувствительных генов районами связывания MYB-подобных транскрипционных факторов выявил значимую ассоциацию с ответом на холод у 20 из 23 MYB-подобных транскрипционных факторов с публично доступными полногеномными профилями связывания. При этом обнаружено, что восемь из них являются дифференциально экспрессирующимися в ответ на холод и принадлежат к кладам CCA1-подобных, KUA1-подобных и R-R белков. Шесть из них не были ранее описаны как связанные с ответом на холод.
4. Низкие положительные температуры ингибируют рост корня у *A. thaliana*. Наличие T-инсерции в генах *RVE1* и *AT1G19000* не оказывает заметного эффекта на развитие корня у гомозиготных линий *A. thaliana* по сравнению с растениями дикого типа при нормальных условиях (+21°C) и под воздействием холода (+4°C).

Сайты связывания KUA1-подобных ТФ ближе к сайтам связывания R-R ТФ, чем ССА1-подобных ТФ.

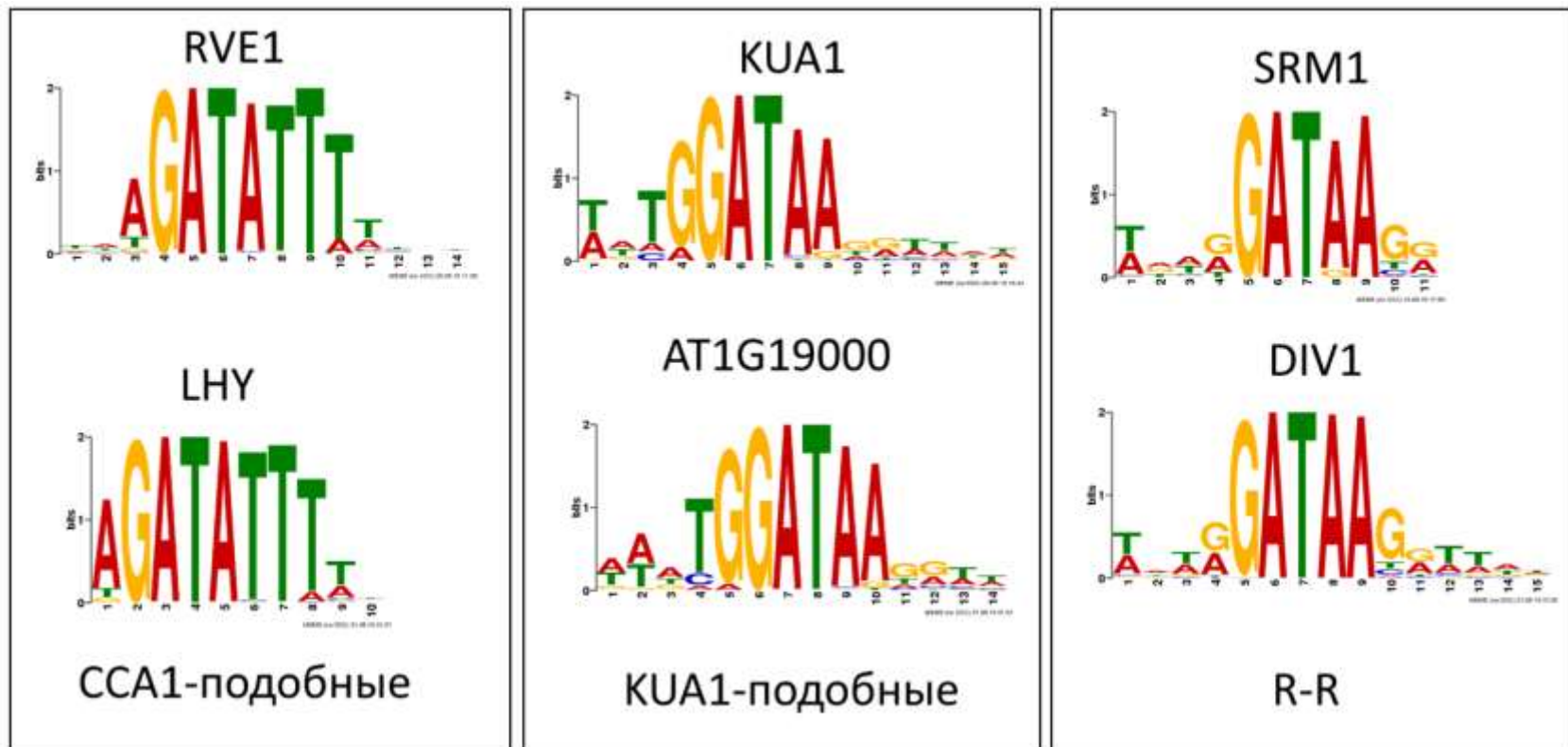
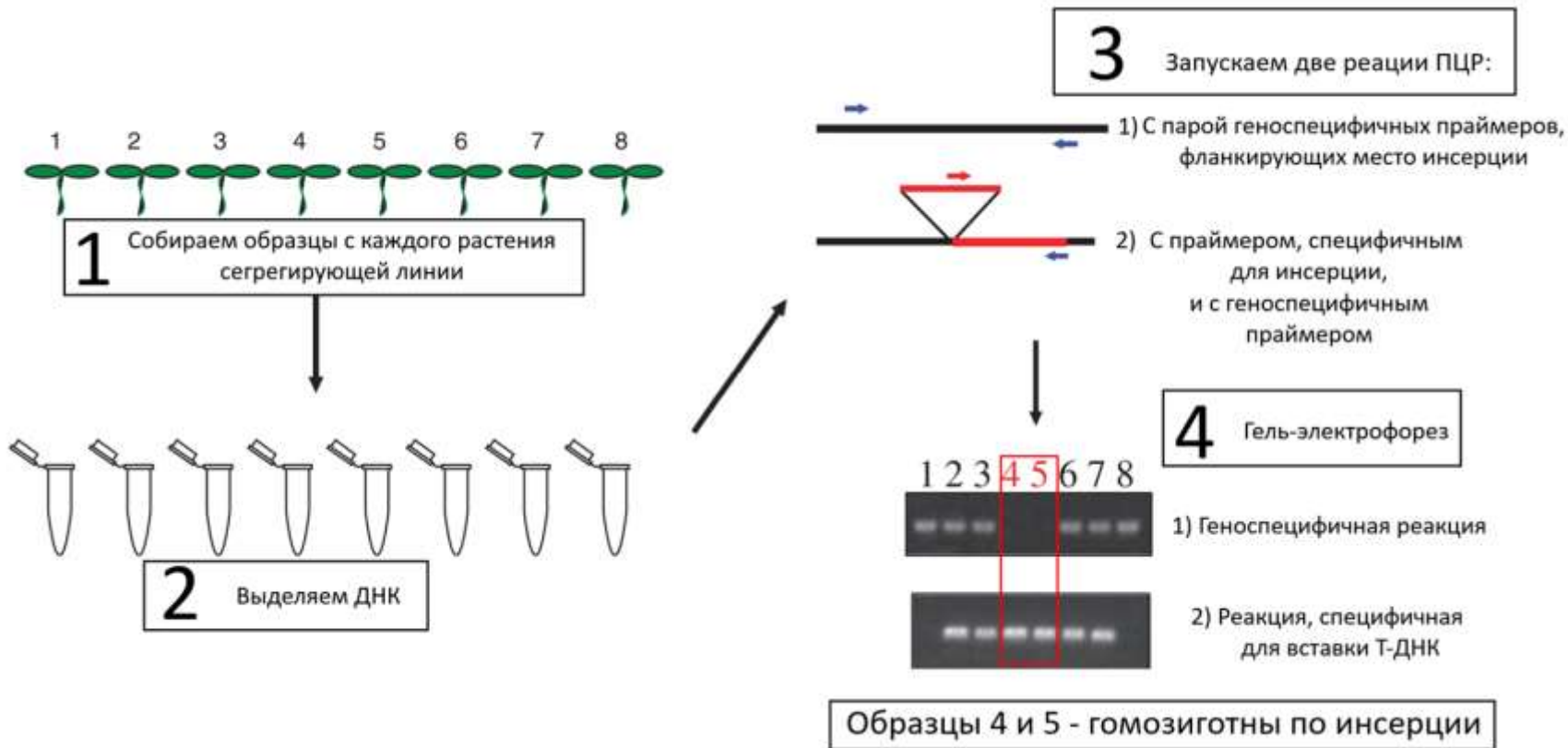


Схема генотипирования



Благодарности
сотрудникам сектора системной биологии
морфогенеза растений ИЦиГ

к.б.н. Виктории Владимировне Мироновой,
Яне Геннадьевне Сизенцовой,
Зульфире Зиннуровне Багаутдиновой,
к.б.н. Елене Васильевне Землянской

