



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук

Создание и анализ транскриптомных карт *Arabidopsis thaliana* и *Capsella bursa-pastoris*

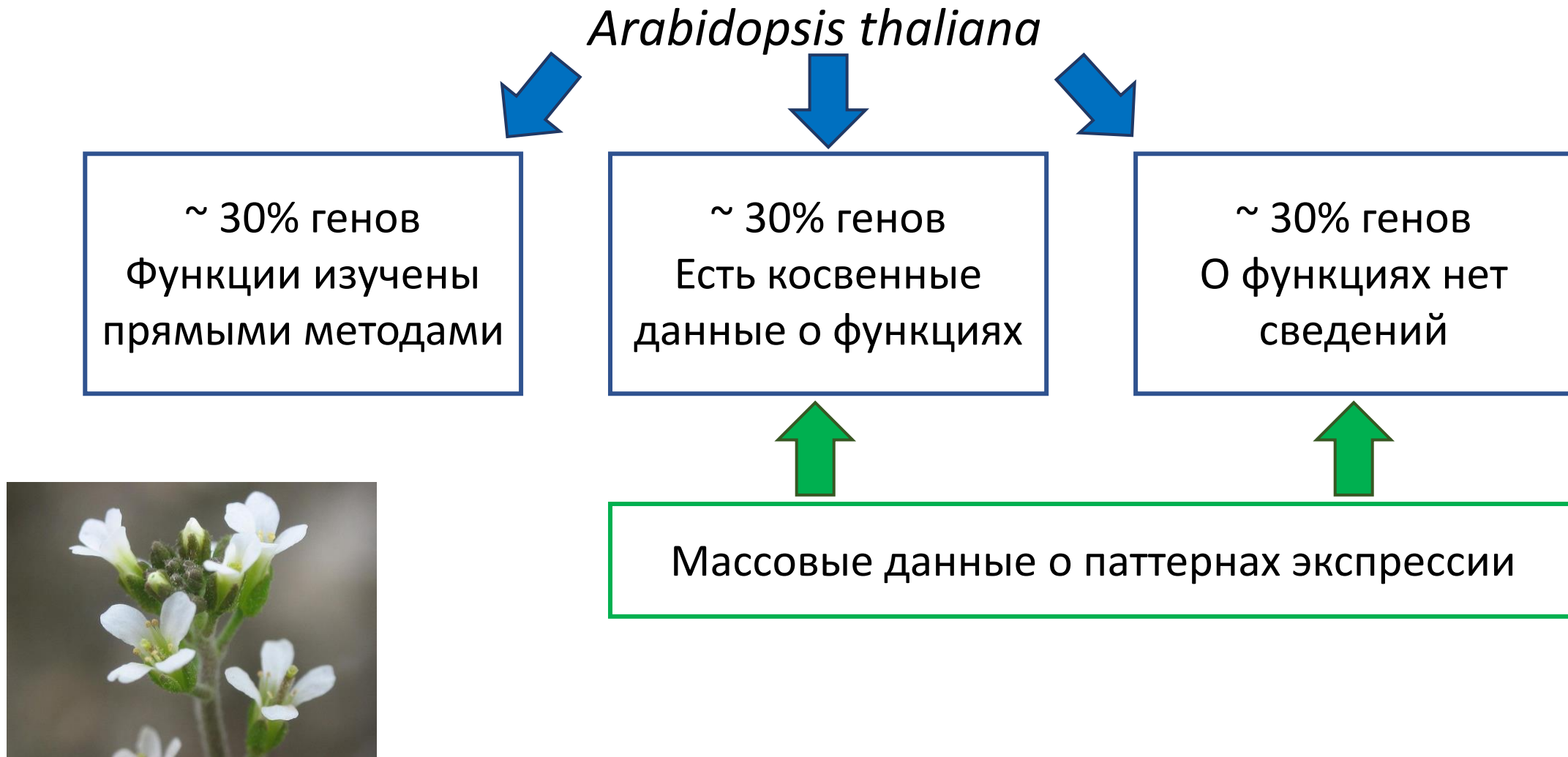
Анна Владимировна Клепикова

Научный руководитель:
к.б.н. Алексей Александрович Пенин

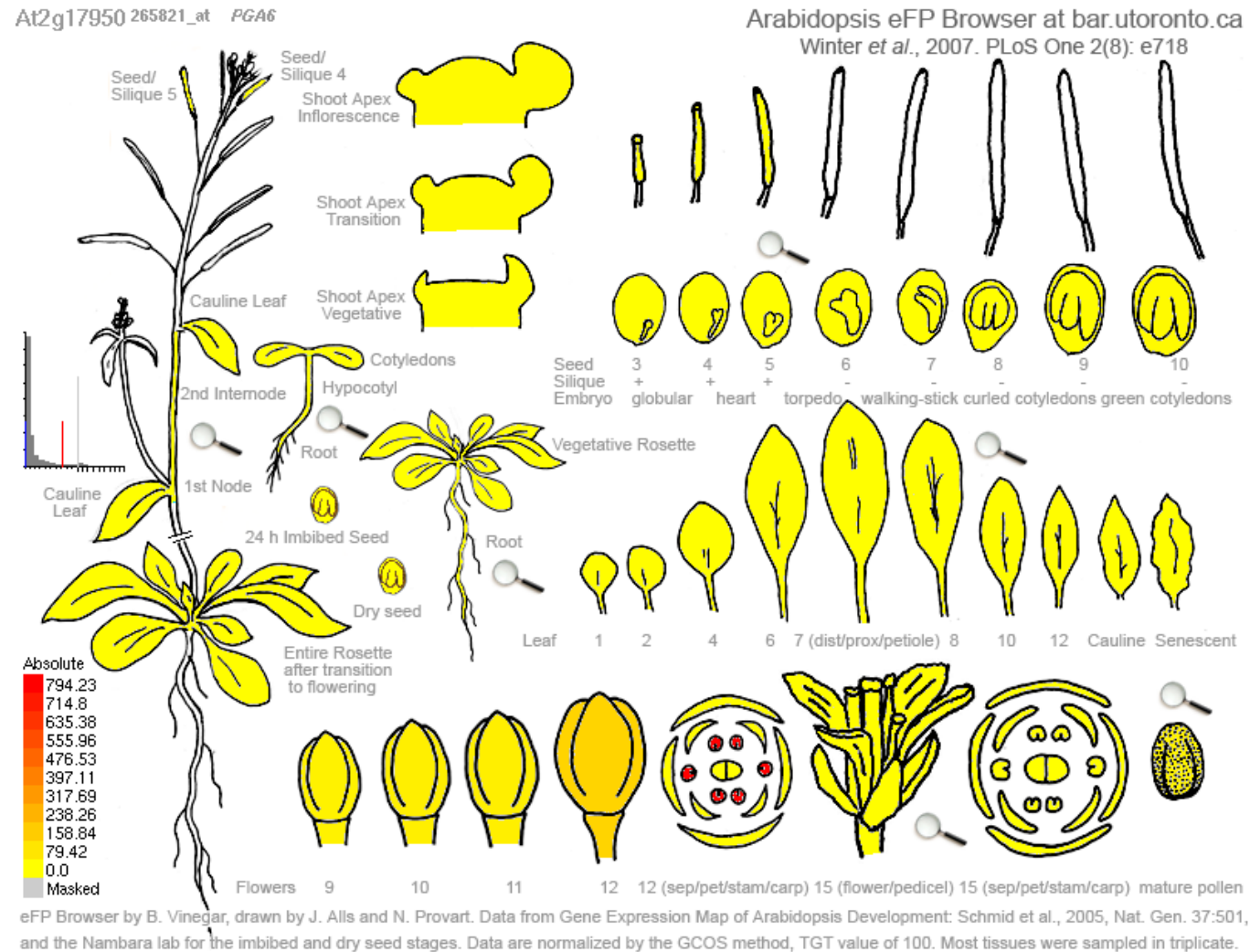
Лаборатория геномики растений
Институт проблем передачи информации РАН

Новосибирск – 2020

Непрямой анализ функции генов



Транскриптомные карты



Schmid et al., 2005

Цель работы

Создание транскриптомных карт модельного объекта генетики растений *Arabidopsis thaliana* и близкого к нему аллотетраплоида *Capsella bursa-pastoris*, а также оценка возможности использования полученных данных для анализа биологических процессов.

Задачи работы

1. Создание и анализ детализированной транскриптомной карты *A. thaliana* с использованием метода RNA-seq
2. Изучение динамики экспрессии генов в меристеме *A. thaliana* при переходе к цветению
3. Изучение органоспецифичности ответа на холодовой стресс у *A. thaliana*
4. Создание транскриптомной карты раннего аллотетраплоида *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik. с использованием метода RNA-seq
5. Анализ механизмов эволюции экспрессии гомеологичных генов на ранних этапах эволюции аллотетраплоида *Capsella bursa-pastoris*

Положения, выносимые на защиту

1. С использованием методов высокопроизводительного секвенирования созданы транскриптомные карты модельного объекта биологии растений *Arabidopsis thaliana* и близкого к нему аллотетраплоида *Capsella bursa-pastoris*, позволяющие упростить функциональный анализ генов
2. Момент перехода к цветению в апикальной меристеме побега *Arabidopsis thaliana* характеризуется изменением динамики клеточных делений, вероятно связанным с сокращением длительности клеточного цикла за счет фаз G_1 и G_2
3. Развитие холодового стресса у *Arabidopsis thaliana* сочетает универсальные для всего растения процессы с тканеспецифичными
4. Различия паттернов экспрессии гомеологичных генов могут возникать из-за возникновения сайтов посадки транскрипционных факторов у одного из гомеологов

Структура работы

Создание транскриптомной
карты *Arabidopsis thaliana*



Анализ экспрессии генов в
процессе перехода к цветению

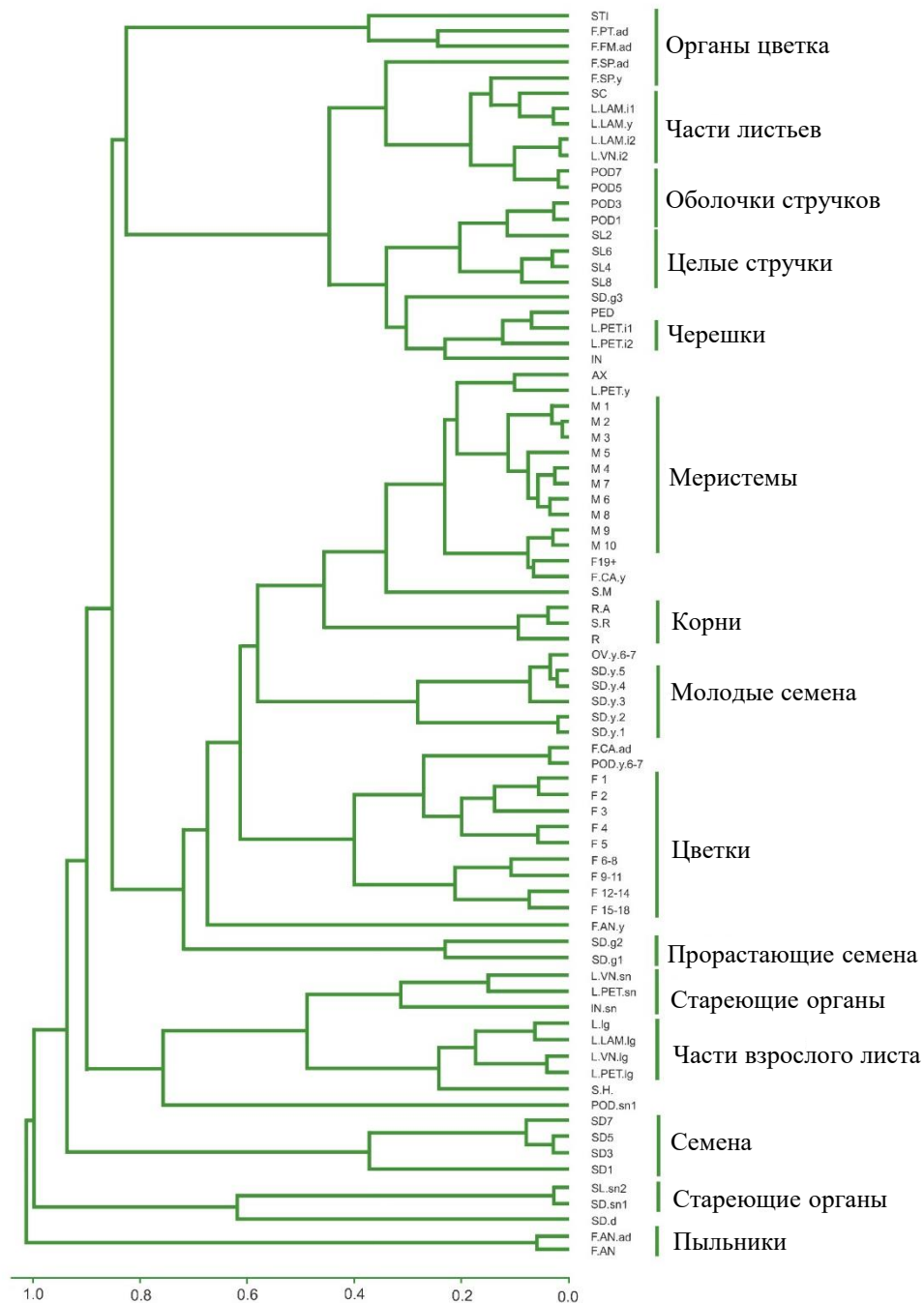


Изучение органоспецифического
ответа на холодовой стресс



Создание карты *C. bursa-pastoris*
и изучение эволюции экспрессии

Транскриптомная карта *A. thaliana*

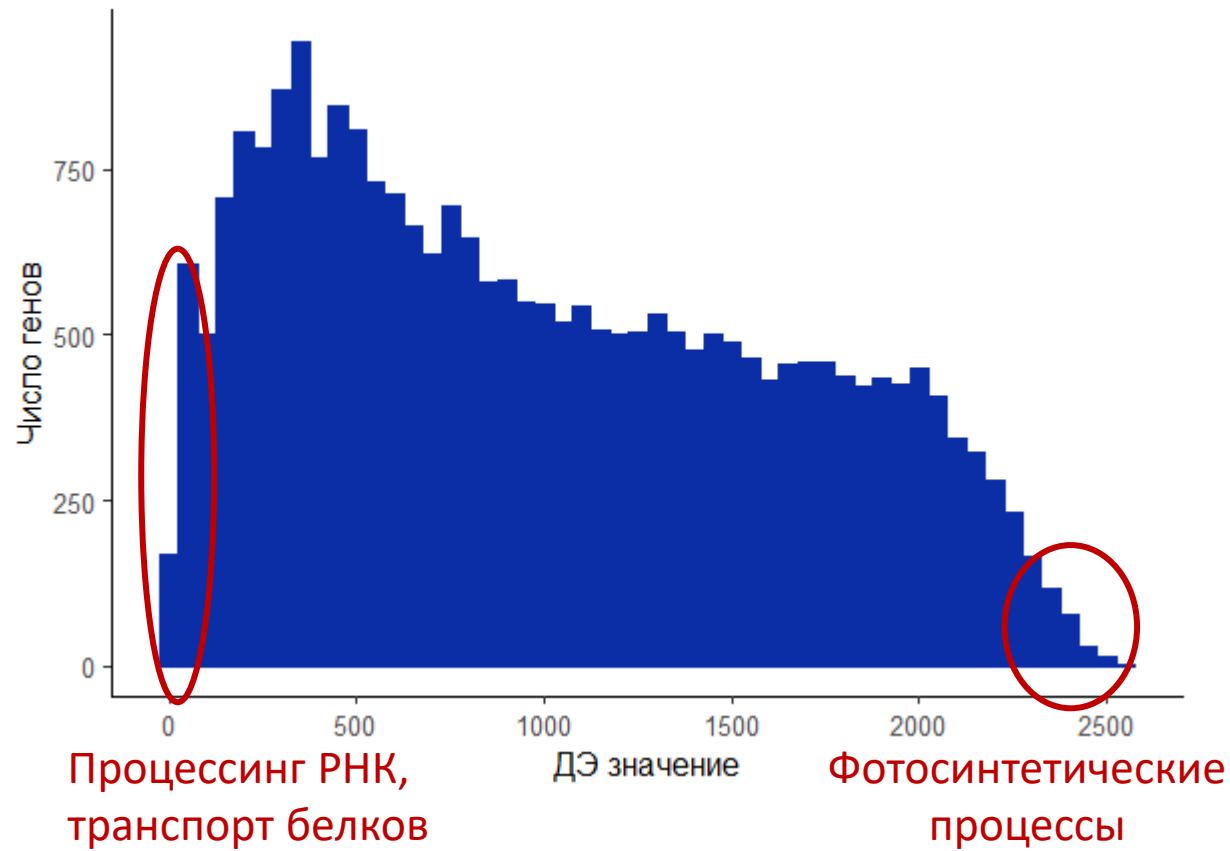


- 79 образцов различных тканей и органов растения
- Все образцы представляют собой пулы из 15 растений и собраны в двух биологических повторностях
- Дополнительные образцы, подвергнутые действию абиотических стрессов (+4°C, +42°C, раневой стресс)

Экспрессионные характеристики карты

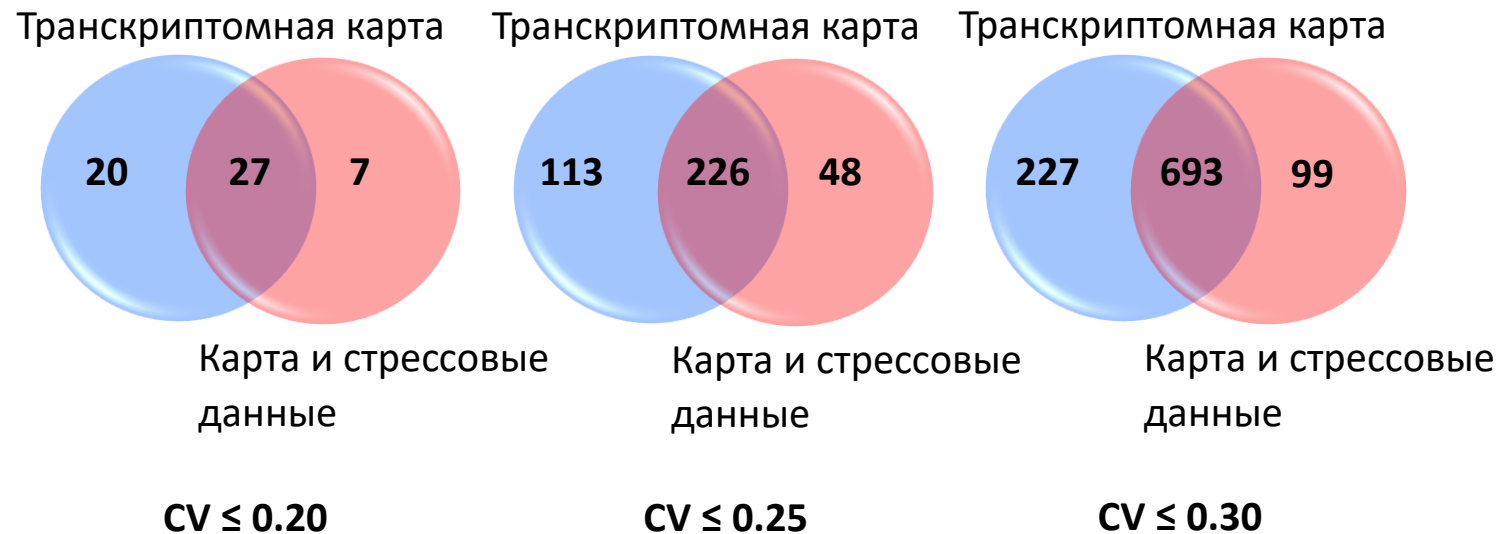
- 90% белок-кодирующих генов экспрессировались хотя бы в одном из образцов
- Транскрипты 40% белок-кодирующих генов были найдены во всех 79 образцах
- Разница между образцами с минимальным и максимальным числом экспрессирующихся генов составляет 20%
- За несколькими исключениями профили экспрессии образцов были схожими

Разнообразие экспрессии генов в транскриптомной карте



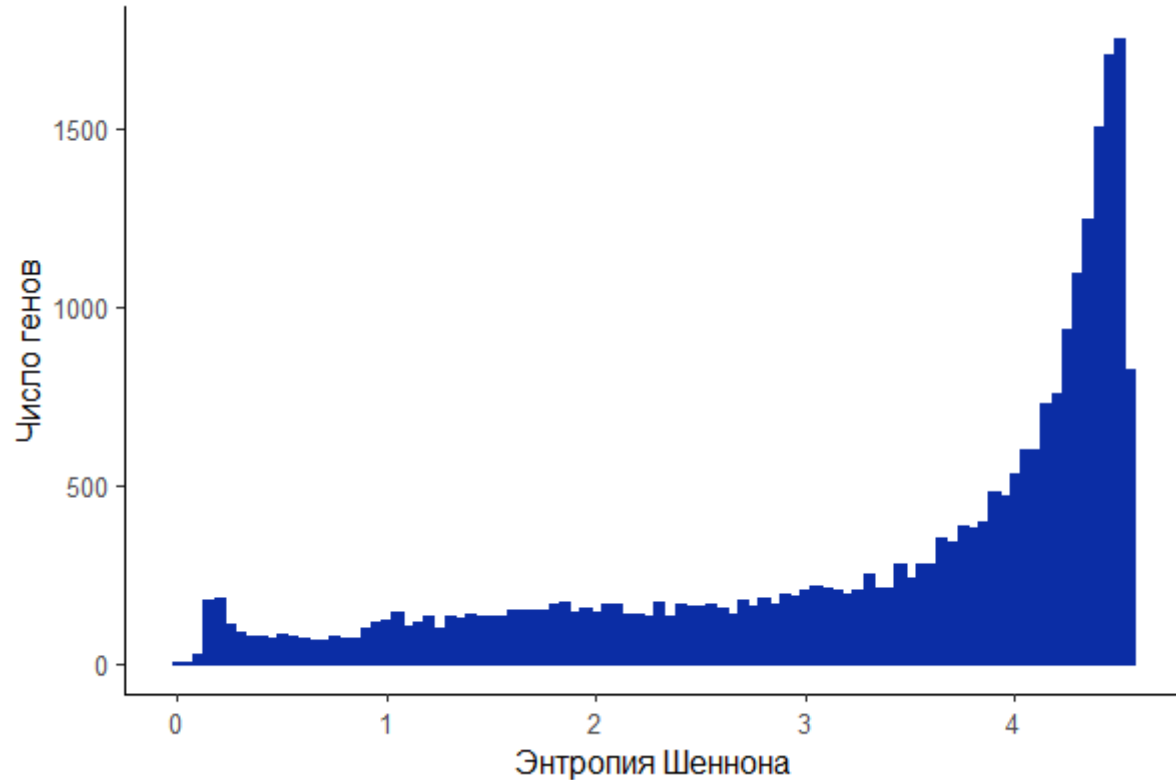
- Сравнение всех образцов против всех (3 081 попарное сравнение)
- От 14 до 15 149 дифференциально экспрессирующихся (ДЭ) генов между разными парами образцов
- ДЭ-значение гена – число парных сравнений, в которых данный ген являлся ДЭ

Стабильно экспрессирующиеся гены



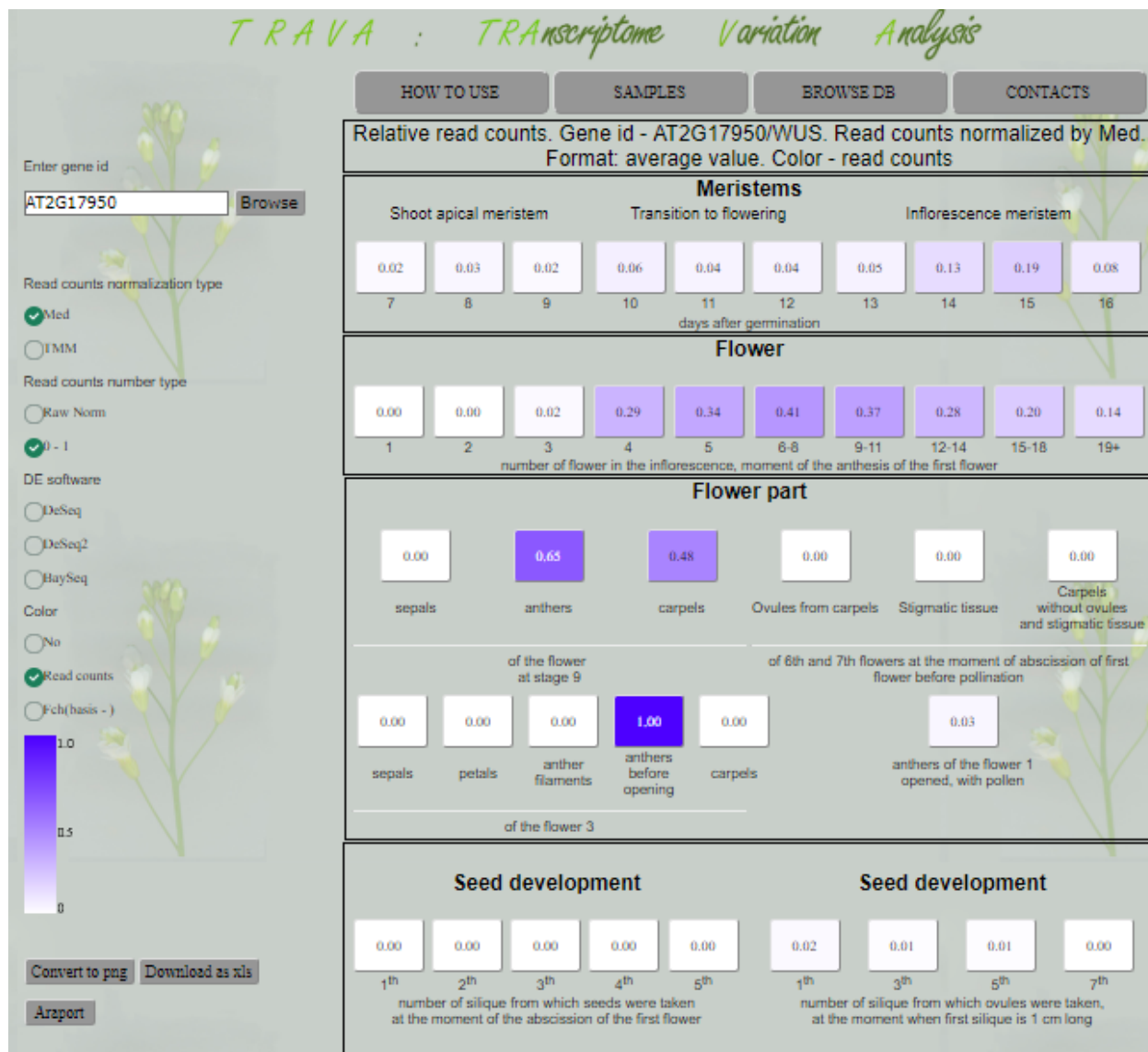
- Гены, имеющие наименьшие коэффициент вариации (CV) и ДЭ-значение, связаны с транспортом нуклеиновых кислот и белков, мембранами и процессингом РНК

Паттерны экспрессии генов



- Энтропия Шеннона используется для определения ширины паттерна экспрессии гена
- Тканеспецифичные гены участвуют в межклеточном сигналинге и имеют пектинэстеразную активность
- Гены с высокой энтропией – стабильно экспрессирующиеся гены

База данных Transcriptome Variation Analysis (TraVA)



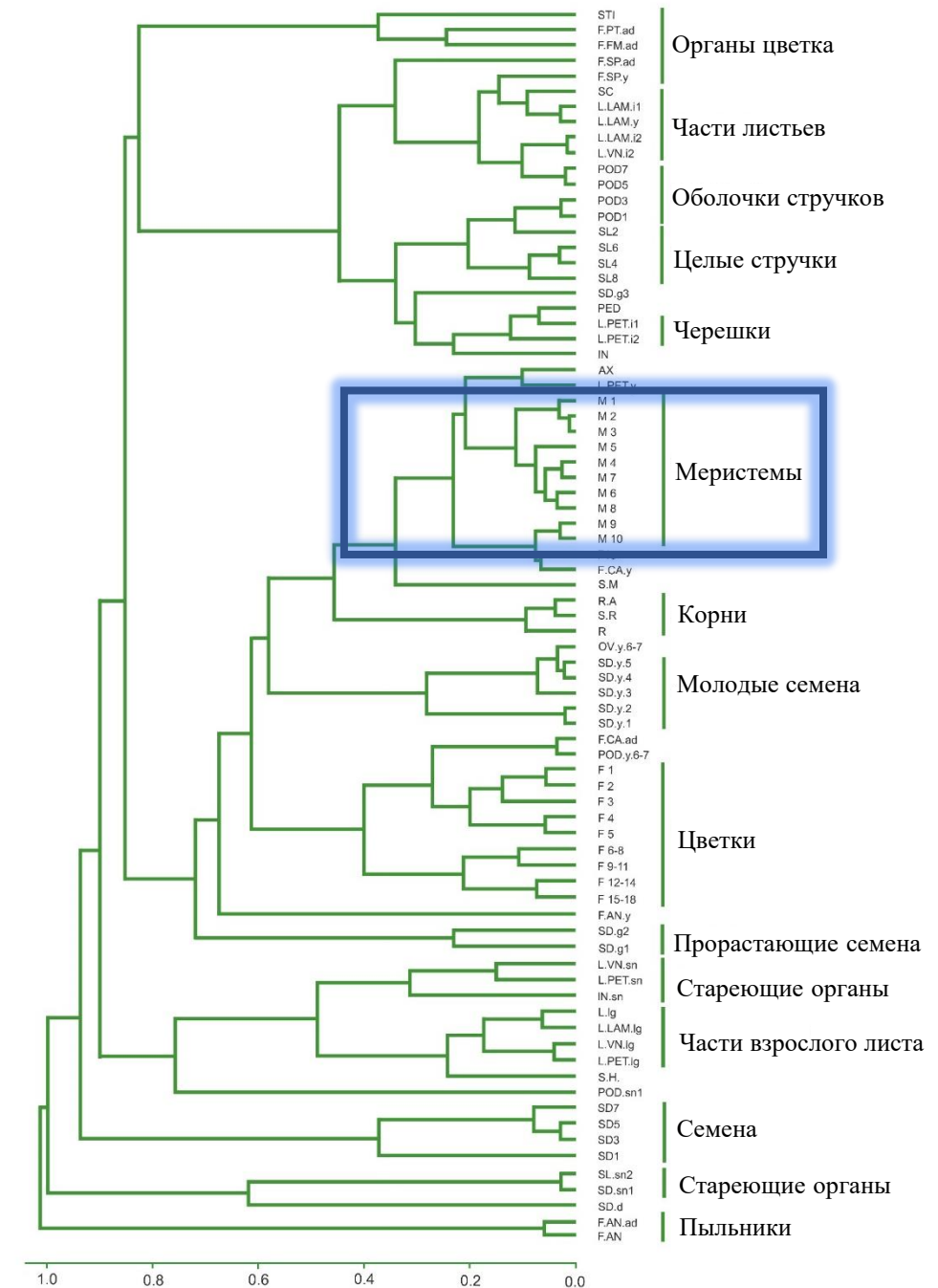
Структура работы

Создание транскриптомной карты *Arabidopsis thaliana*

Анализ экспрессии генов в процессе перехода к цветению

Изучение органоспецифического ответа на холодовой стресс

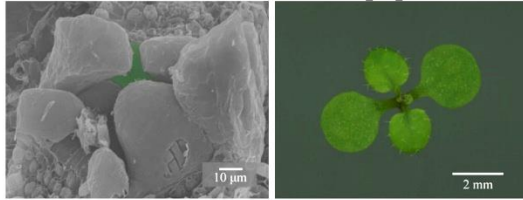
Создание карты *S. bursa-pastoris* и изучение эволюции экспрессии



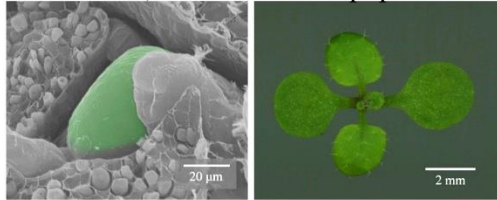
Временная серия апикальных меристем *A. thaliana*

- Ежедневный сбор апикальных меристем (АМ) с 7 по 16 день после прорастания (всего 10 стадий)

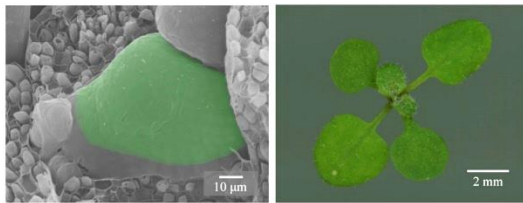
Стадия М1, 7 дней после прорастания



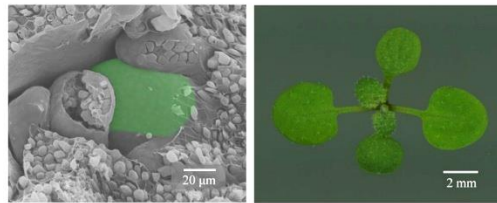
Стадия М2, 8 дней после прорастания



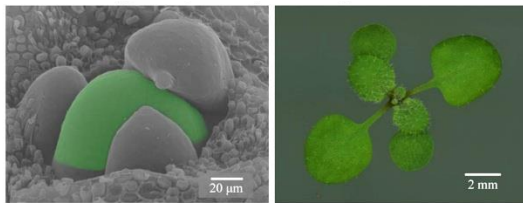
Стадия М3, 9 дней после прорастания



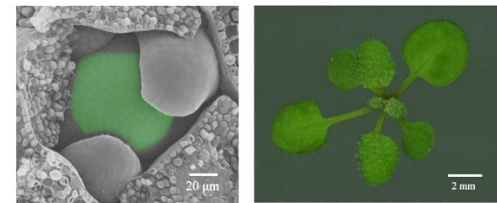
Стадия М4, 10 дней после прорастания



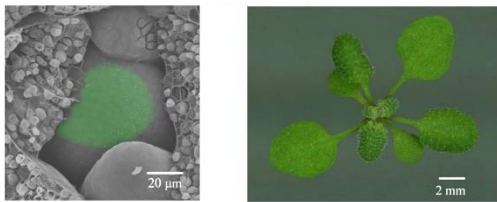
Стадия М5, 11 дней после прорастания



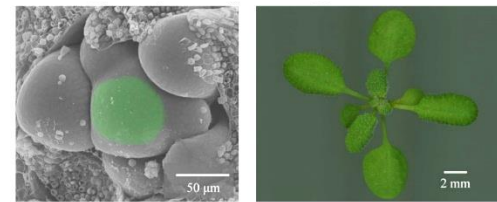
Стадия М6, 12 дней после прорастания



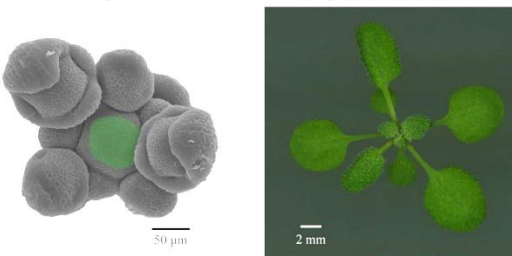
Стадия М7, 13 дней после прорастания



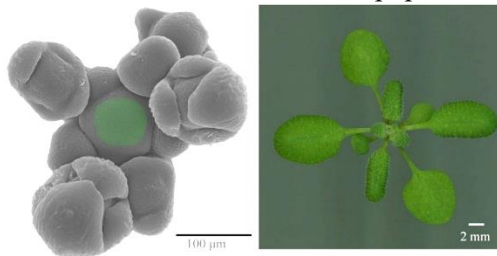
Стадия М8, 14 дней после прорастания



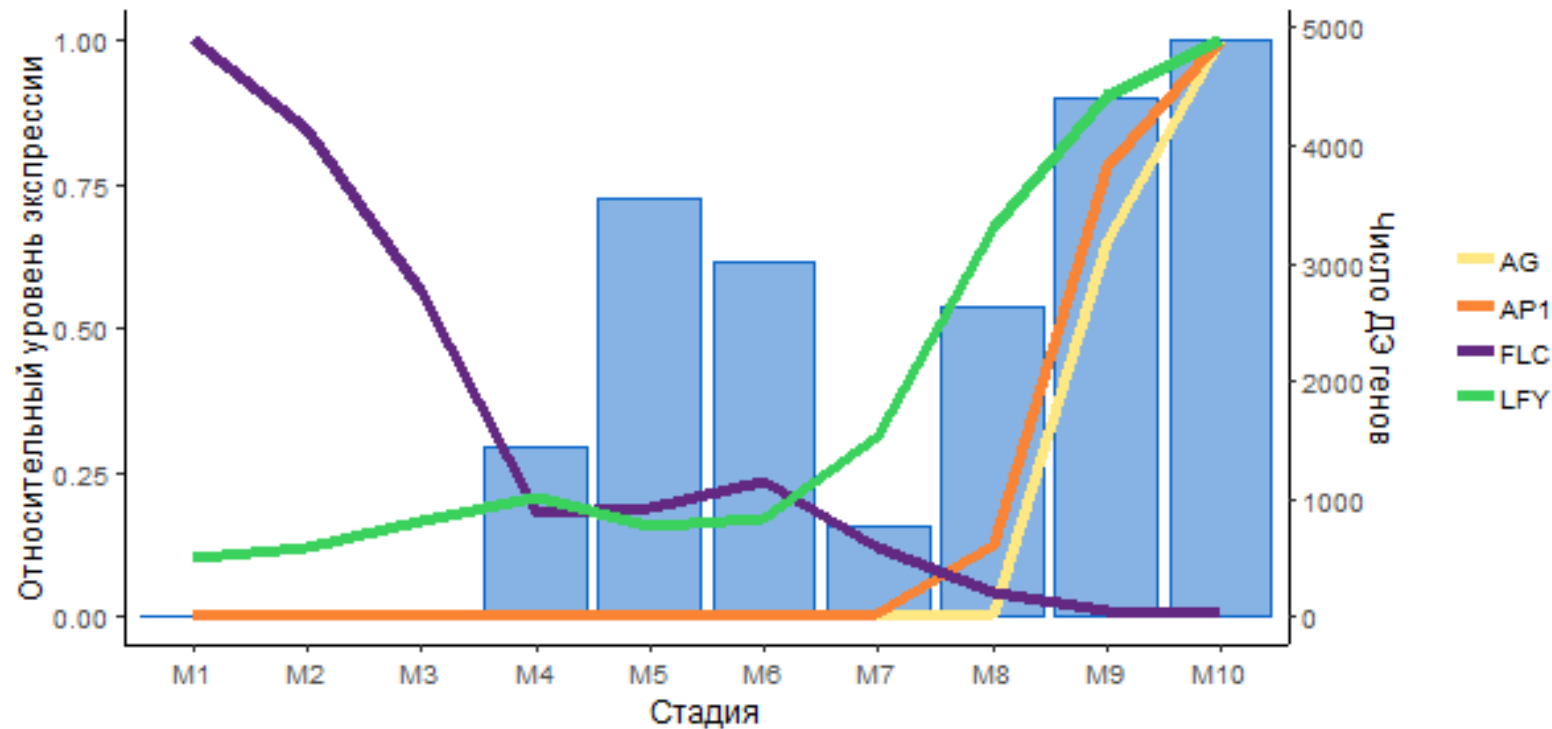
Стадия М9, 15 дней после прорастания



Стадия М10, 16 дней после прорастания

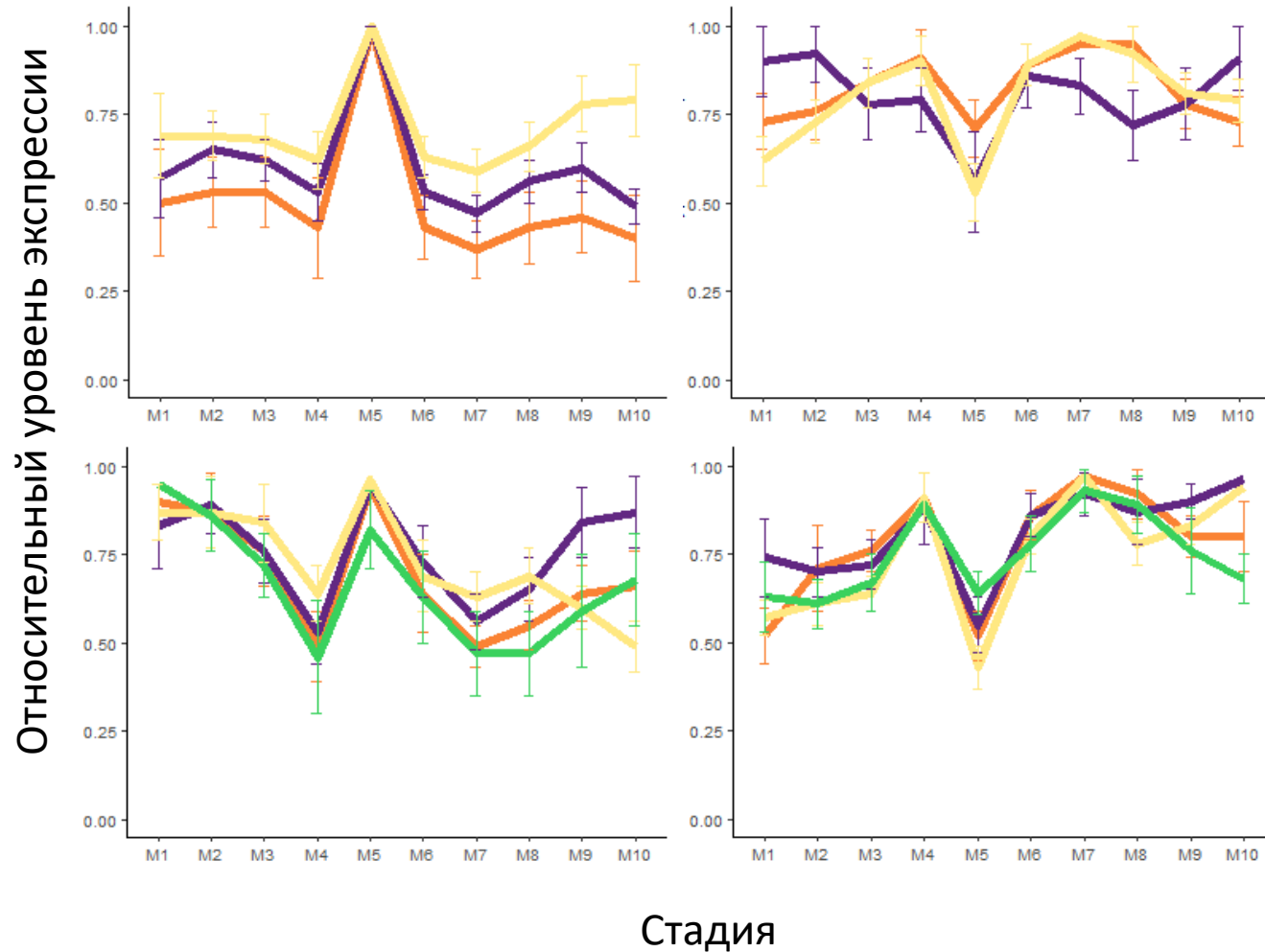


Временная серия апикальных меристем *A. thaliana*



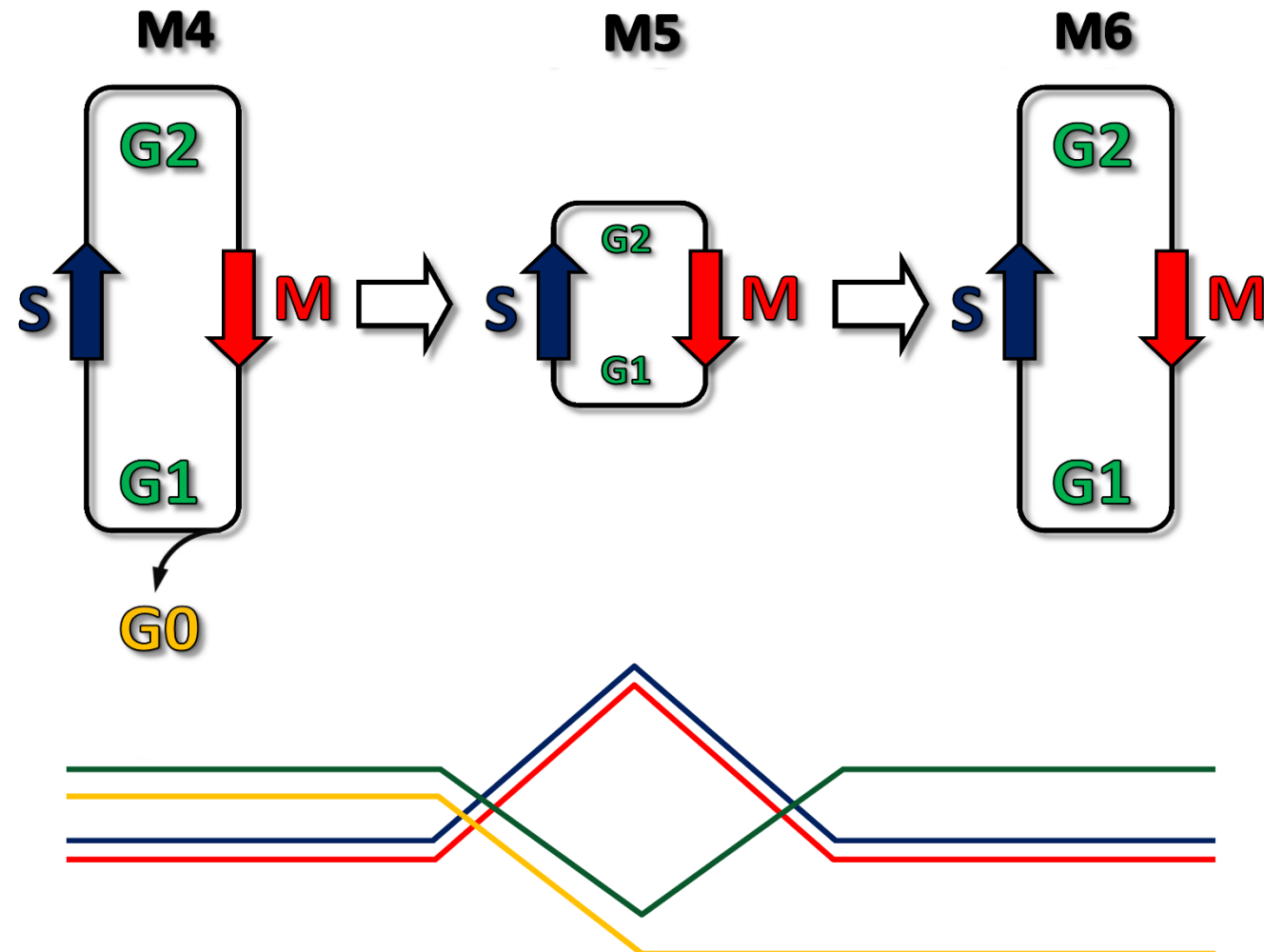
- Поведение основных регуляторных генов перехода к цветению совпадает с известными данными

Характерные профили экспрессии генов



- Экспрессия генов, связанных с клеточным циклом, синхронизована
- На стадии M5 повышена экспрессия генов, маркирующих S-фазу и митоз

Схема, объясняющая полученные результаты



Структура работы

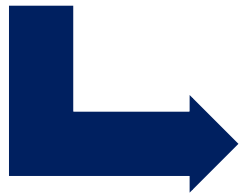
Создание транскриптомной карты *Arabidopsis thaliana*



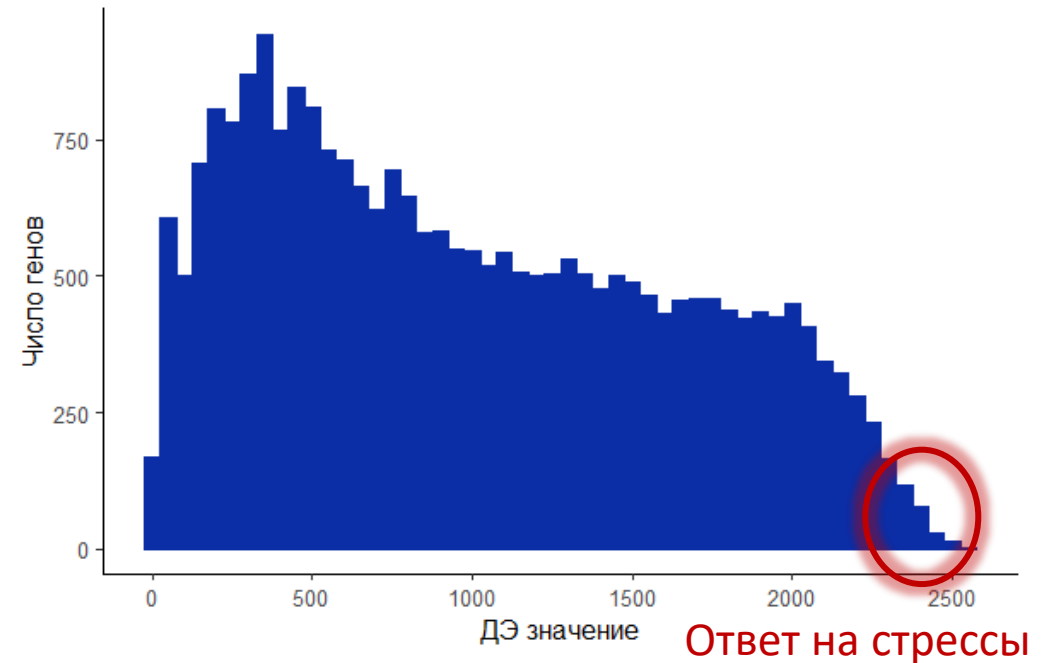
Анализ экспрессии генов в процессе перехода к цветению



Изучение органоспецифического ответа на холодовой стресс

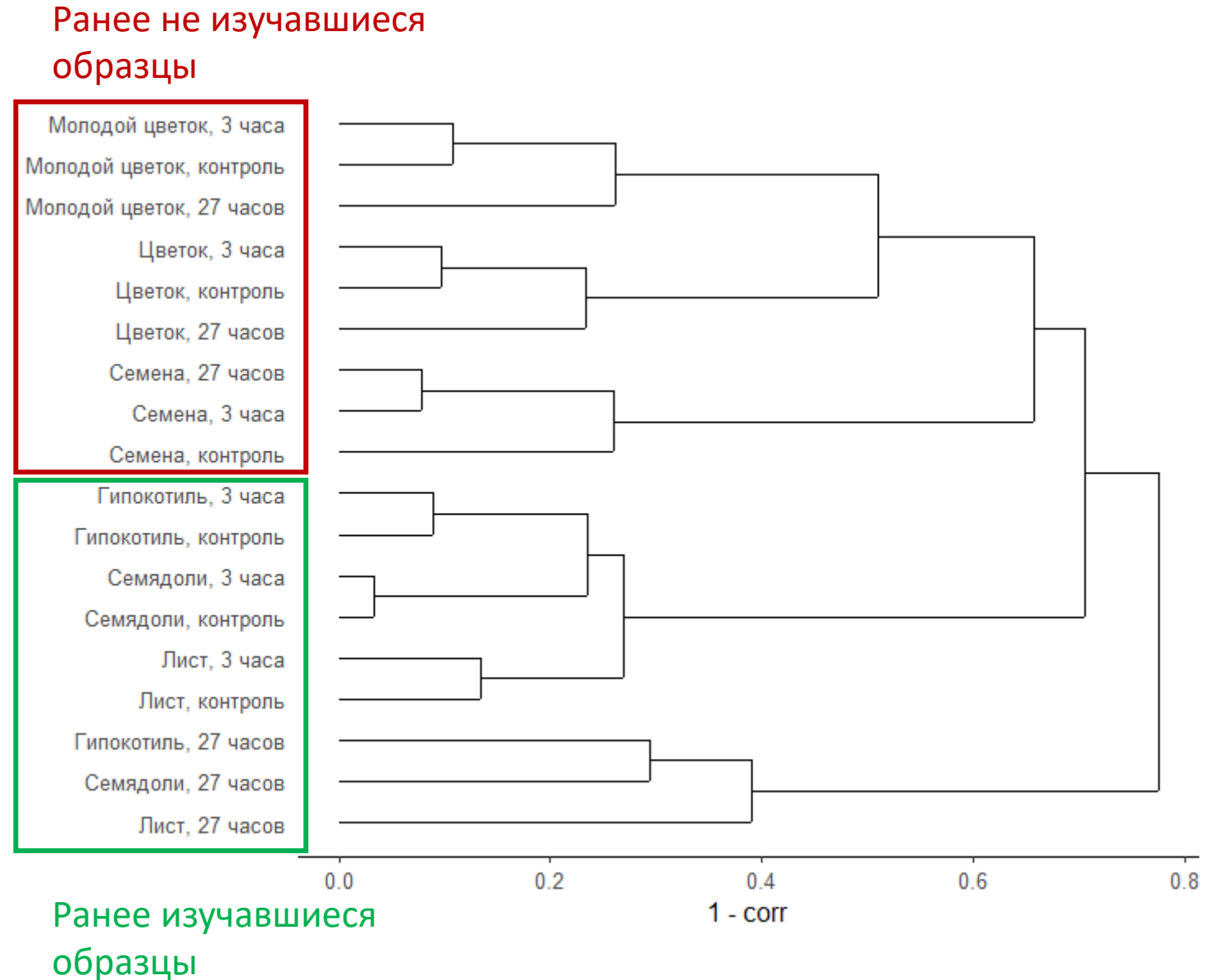


Создание карты *C. bursa-pastoris* и изучение эволюции экспрессии



Органоспецифический ответ на холодовой стресс у *A. thaliana*

- Анализ дифференциальной экспрессии в транскриптомной карте показал, что многие ДЭ гены участвуют в ответе на стресс
- Шесть органов, воздействие холода в течении 3 и 27 часов

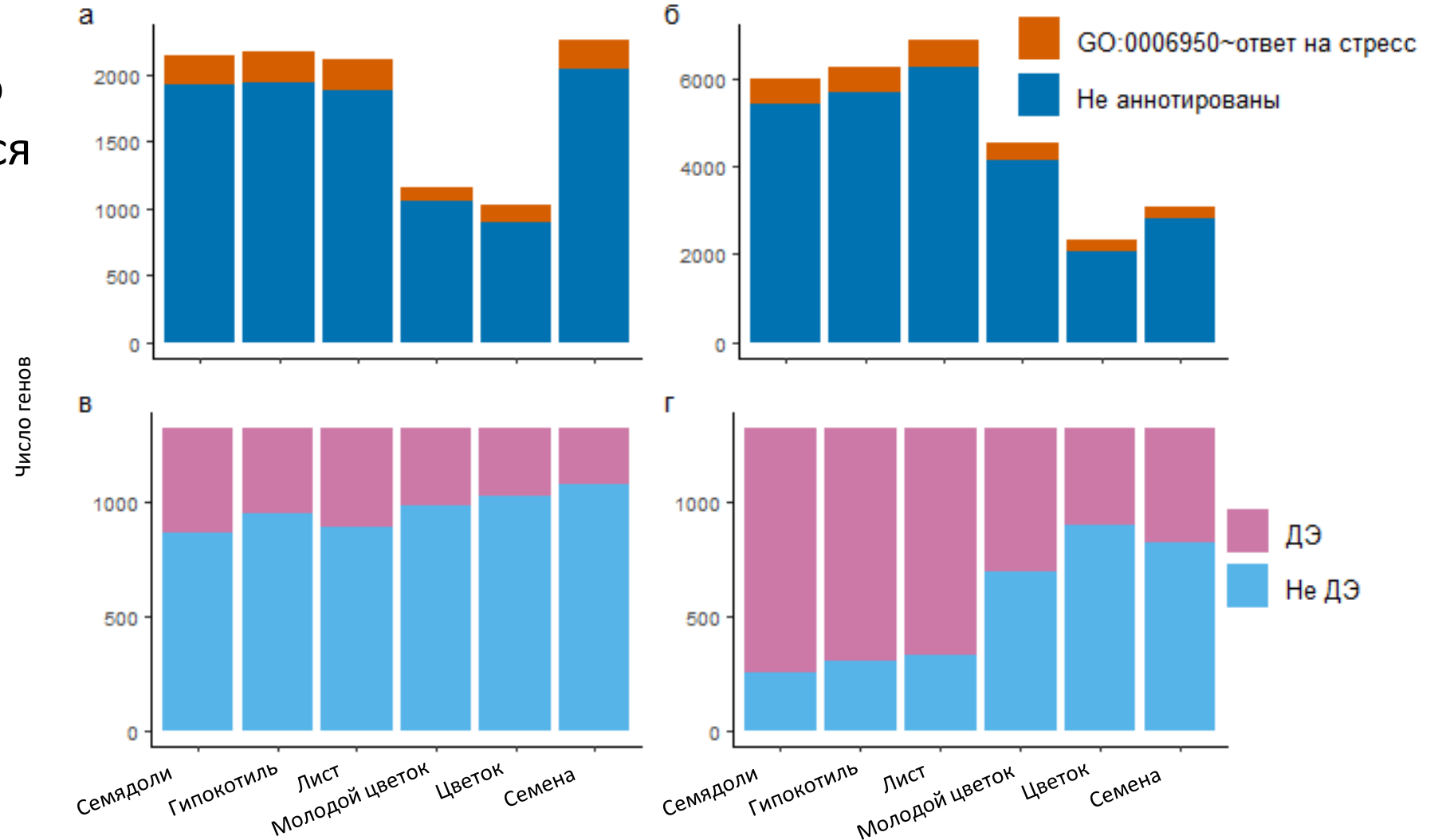


Изученность стрессового ответа

Дифференциально
экспрессирующиеся
гены

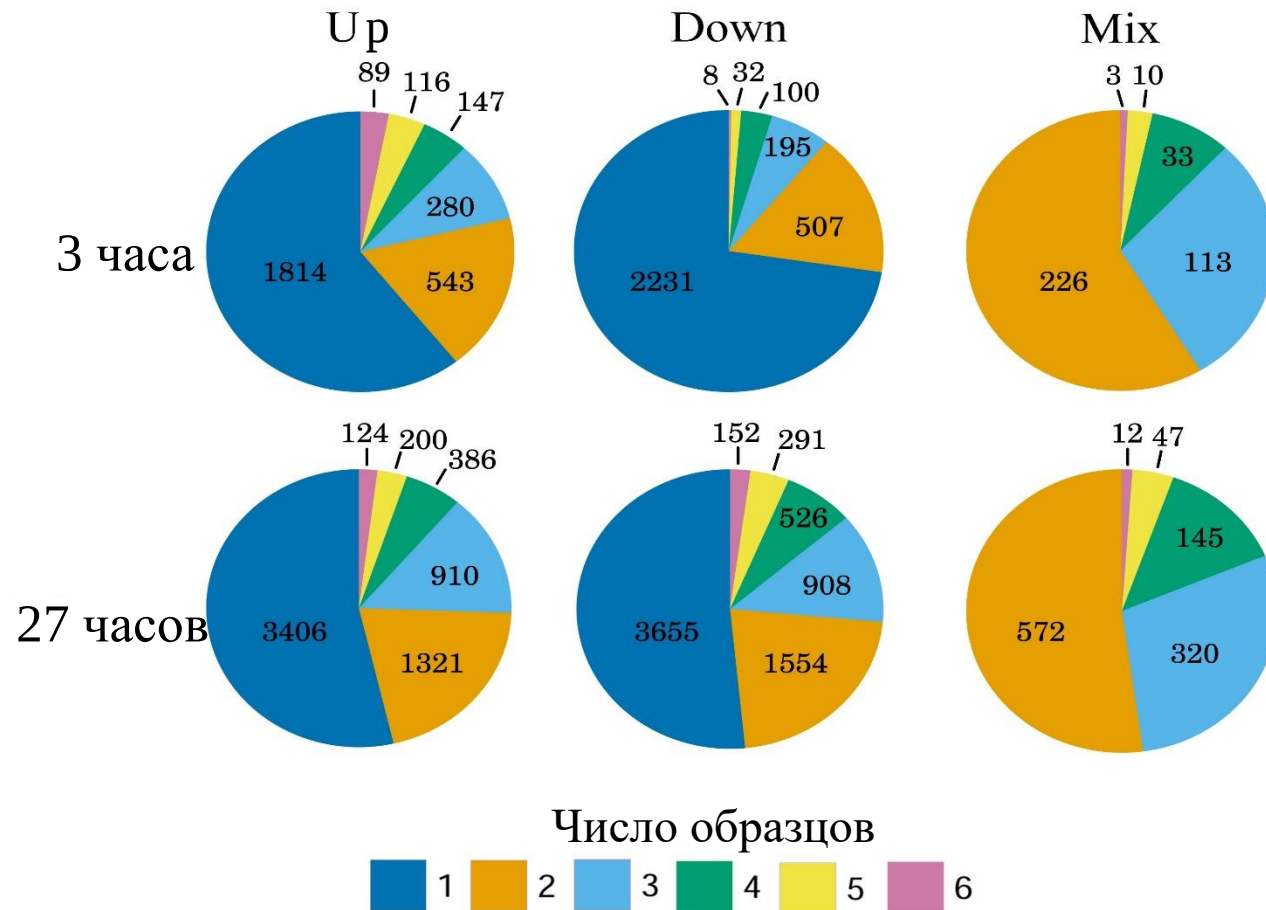
3 часа

27 часов



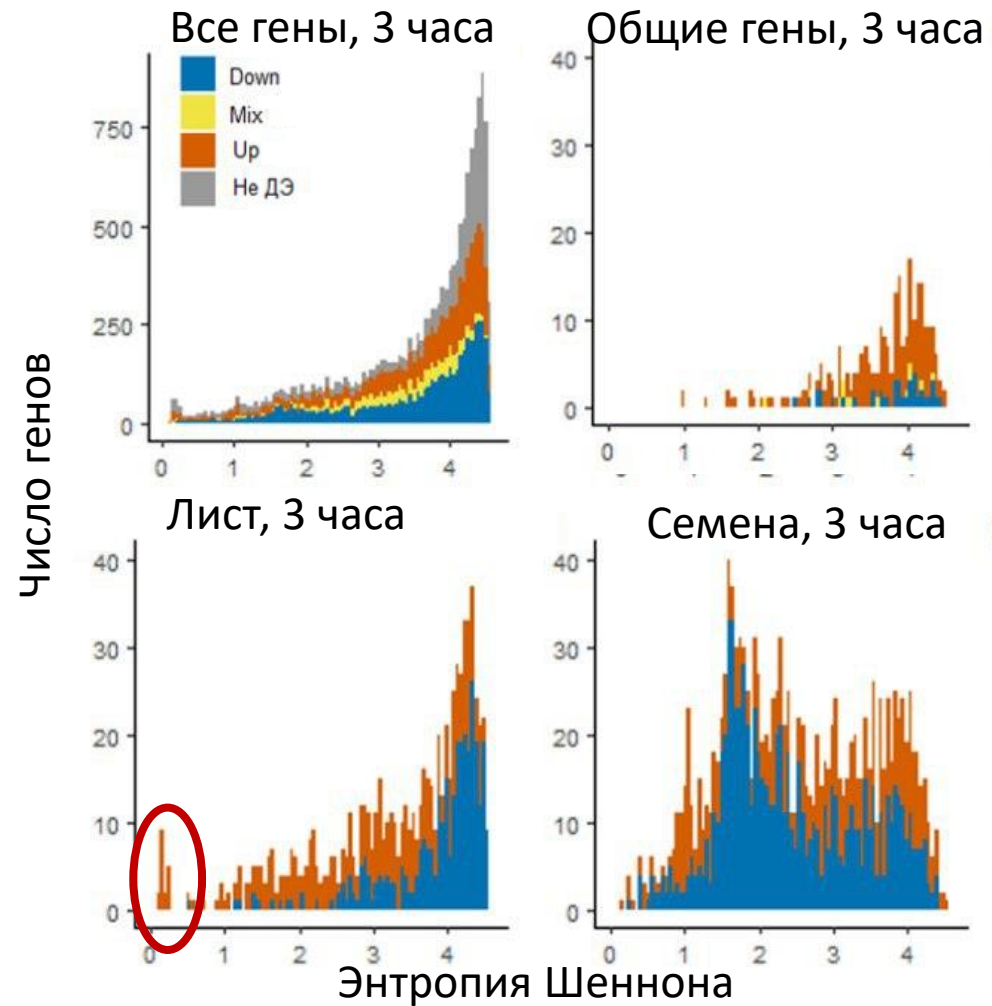
Известные гены,
участвующие в
холодовом ответе

Органоспецифический ответ на холодовой стресс



- 15 459 генов – ДЭ хотя бы в одном образце по сравнению с контролем

Параметры экспрессии генов холодового ответа



Гены, в нормальных условиях специфично
экспрессирующиеся в пыльниках

Органоспецифическая регуляция холодового стресса

- Гены «ядра» стрессового ответа главным образом регулируются ТФ семейства CBF
- Регуляция органоспецифических генов стрессового ответа требует определенного набора ТФ для каждого из органов:
 - в семенах и цветке – bZIP и NAC
 - в листе – ERF/AP2
 - в молодом цветке после 3 часов – ERF/AP2, bZIP и Myb, а после 27 часов –NAC

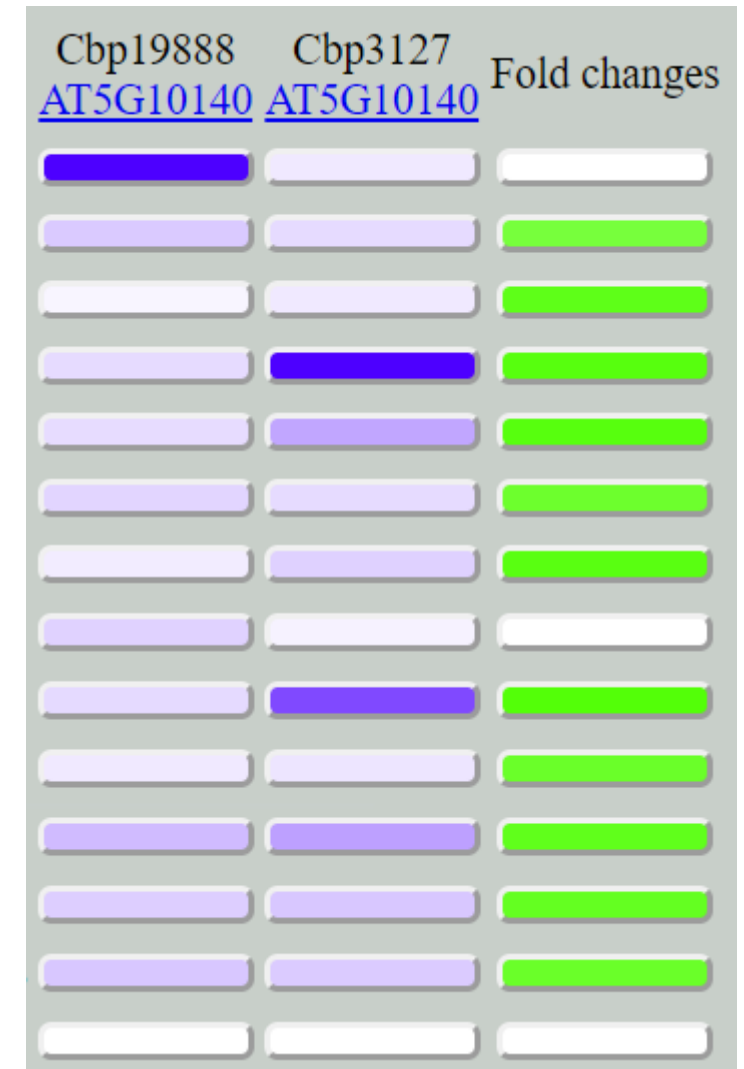
Структура работы

Создание транскриптомной
карты *Arabidopsis thaliana*

Анализ экспрессии генов в
процессе перехода к цветению

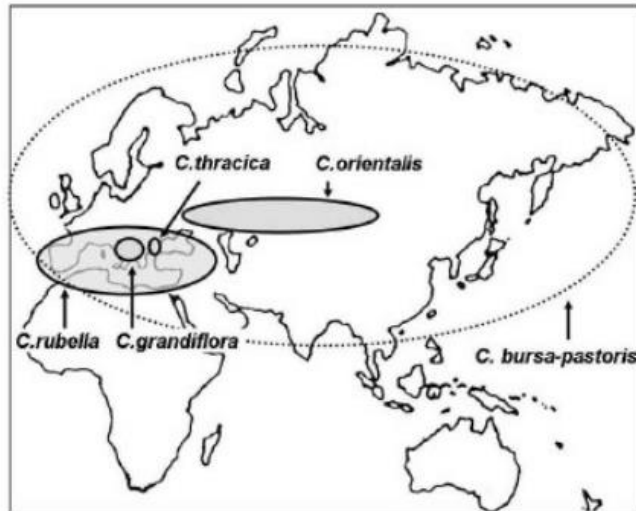
Изучение органоспецифического
ответа на холодовой стресс

Создание карты *C. bursa-pastoris*
и изучение эволюции экспрессии



Аллотетраплоид *Capsella bursa-pastoris*

- Недавний аллотетраплоид (100-300 тыс. л.н.)
- Возник в результате скрещивания видов *C. rubella/grandiflora* (субгеном A) и *C. orientalis* (субгеном B)
- Распространен по всему миру
- Близкий родственник модельного объекта *A. thaliana*



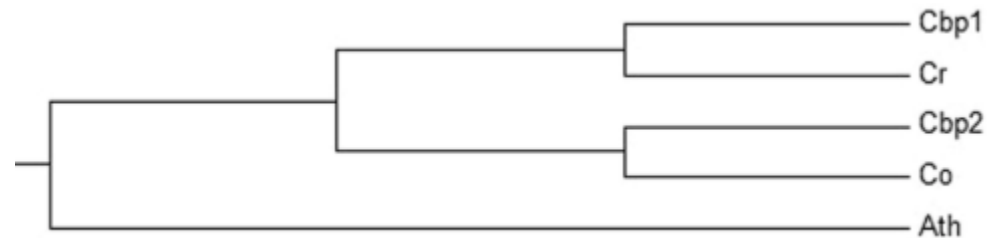
Neuffer B. et al, 2014



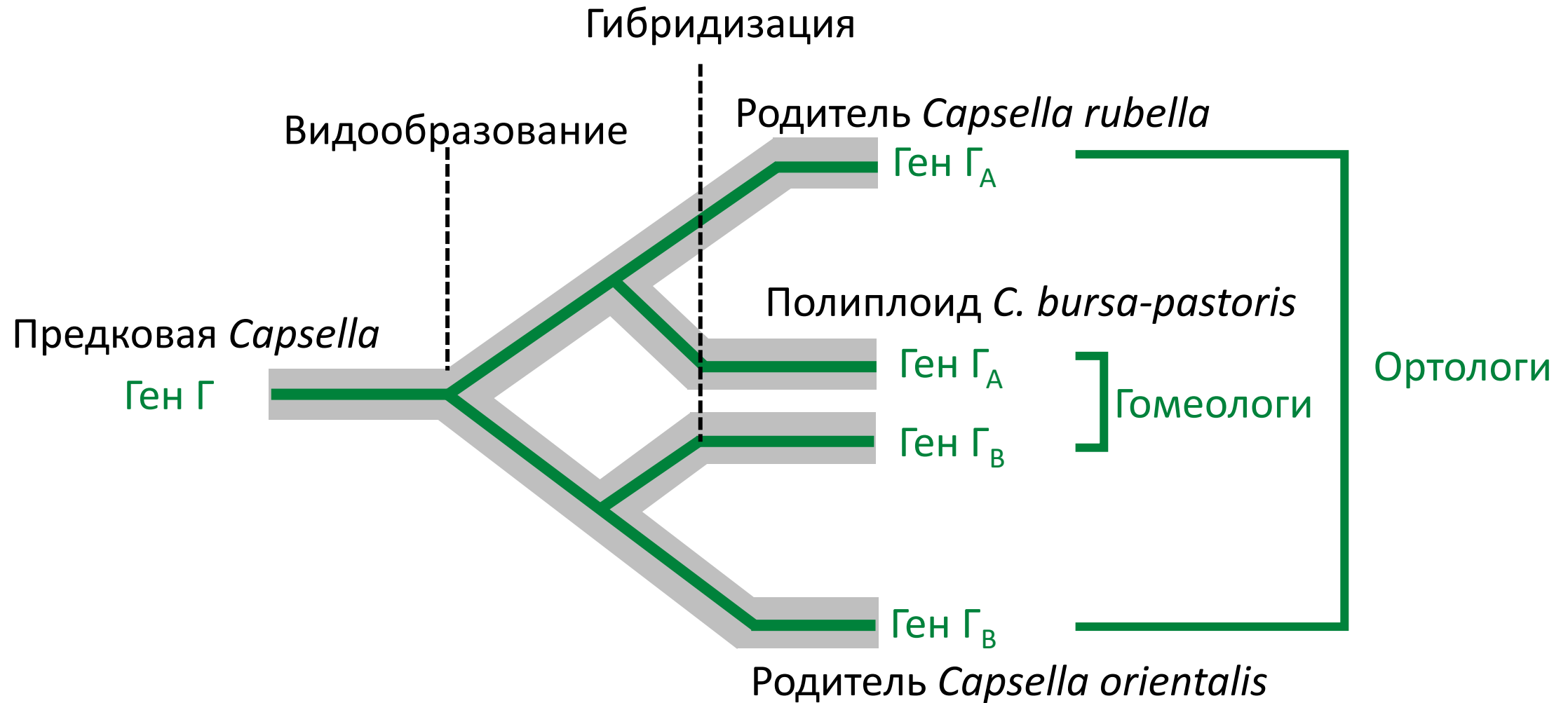
Author: Channeling, CC BY-SA 4.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=79187656>

Геном *Capsella bursa-pastoris*

- Оценка размера генома ~410 Mb
- Размер сборки 268.7 Mbp
- Предсказано 53 502 генов
- 16 798 генов находятся в парах – гомеолог А и гомеолог В



Гомеологи и ортологи

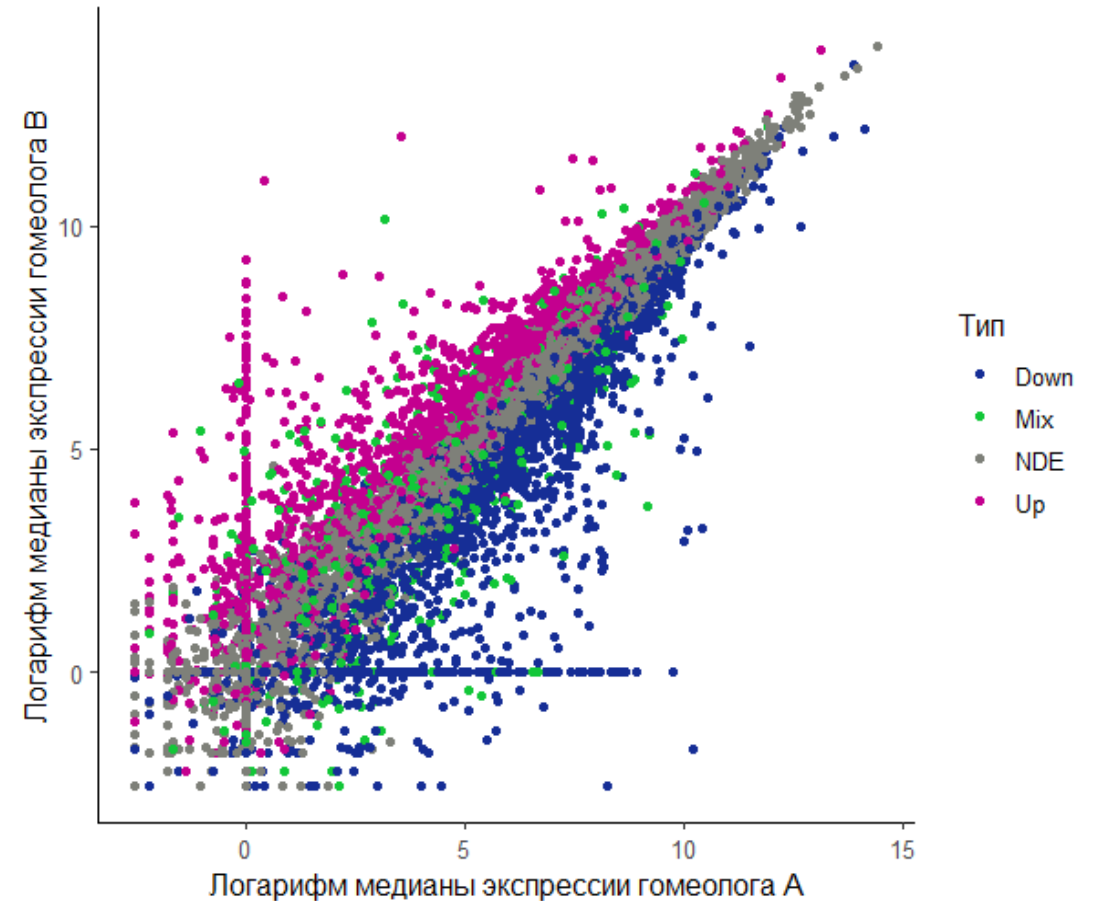


Транскриптомная карта *Capsella bursa-pastoris*

- Сбор образцов с опорой на экспрессионную карту *A. thaliana*
- 10 образцов органов и тканей
- Три образца семядолей, подвергнутых холодовому воздействию, и соответствующий контроль

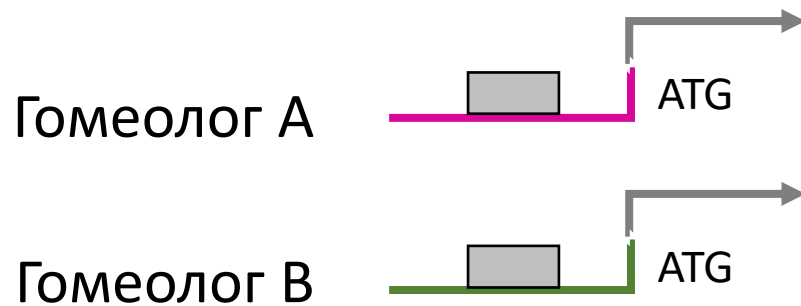
Дифференциальная экспрессия гомеологов

- В каждом образце уровень экспрессии гомеолога В сравнивался с гомеологом А
- Пары, в которых гомеолог В экспрессируется на более высоком/низком уровне, чем гомеолог А – ДЭАВ пары
- Половина из пар гомеологов – ДЭАВ хотя бы в одном из образцов

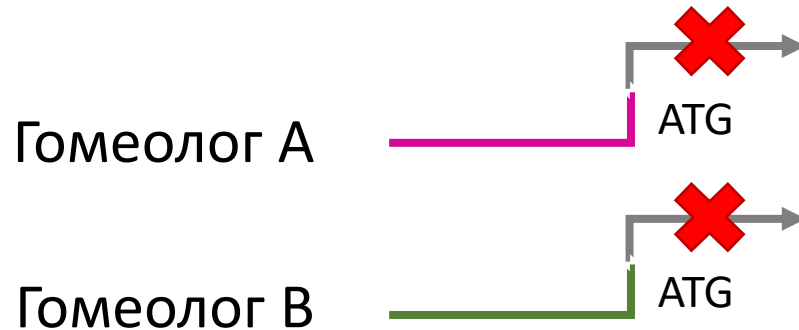


Возможная причина дифференциальной экспрессии гомеологов

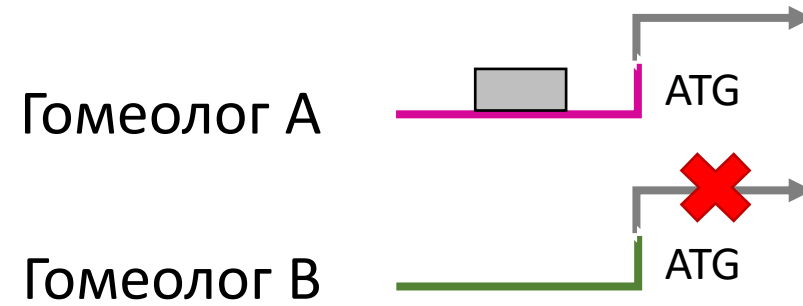
Симметрия



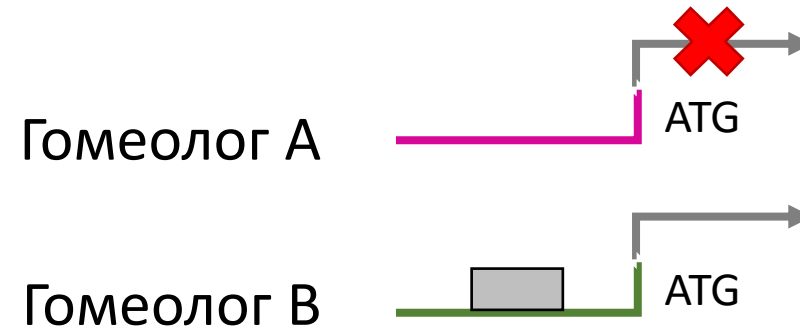
Промотор



Асимметрия

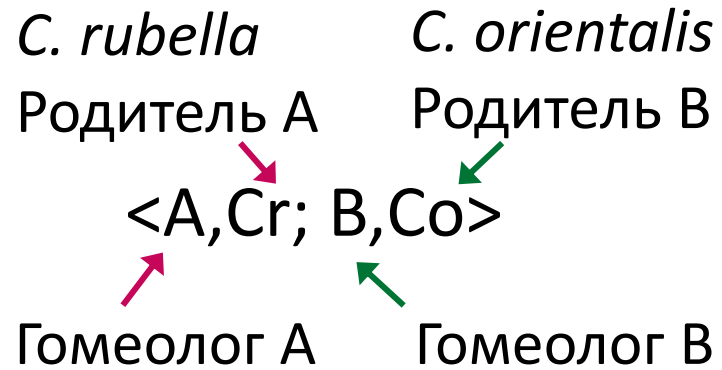


Промотор

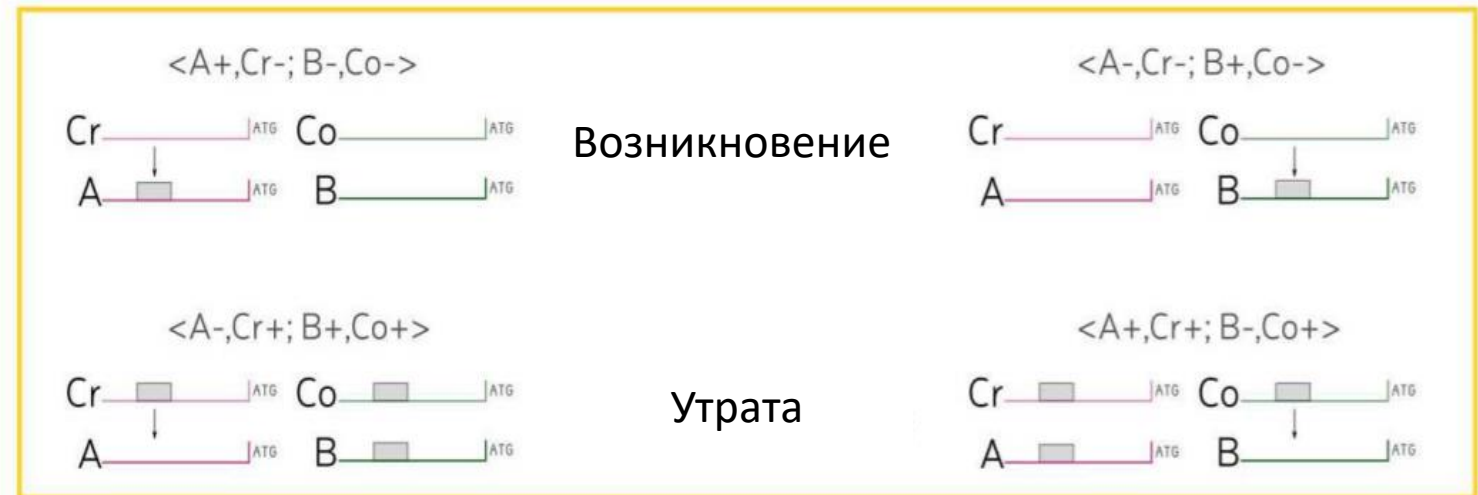


Возникновение асимметрии и симметрии

Четверки промоторов



Асимметрия



Анализ сайтов связывания ТФ

Для каждого сайта связывания

Точный тест Фишера

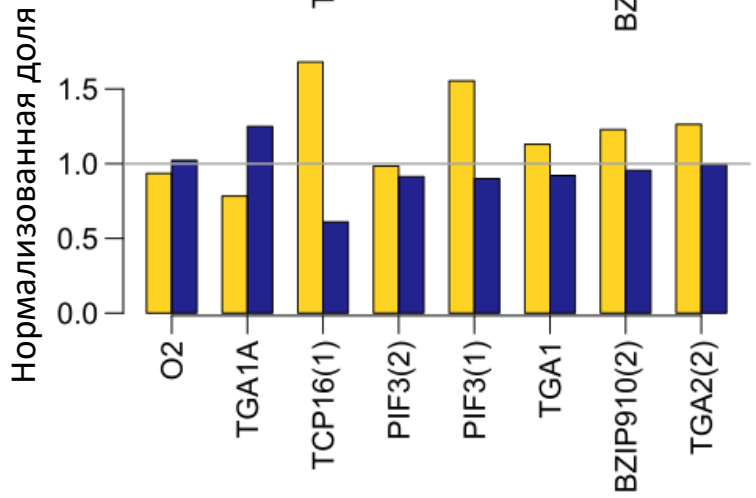
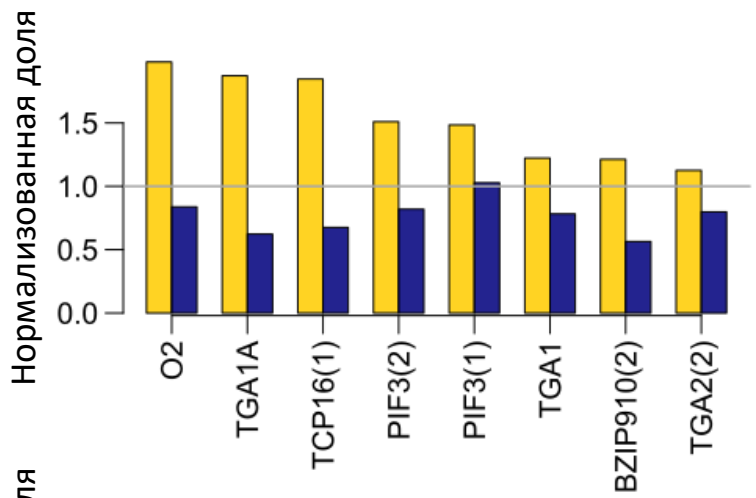
DEAB, асимметрия	DEAB, симметрия
He-DEAB, асимметрия	He-DEAB, симметрия

Возникновения сайта



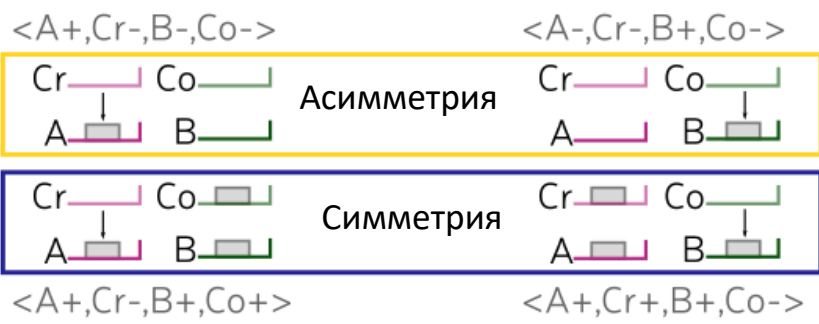
Различия в сайтах связывания ТФ

Транскриптомная карта

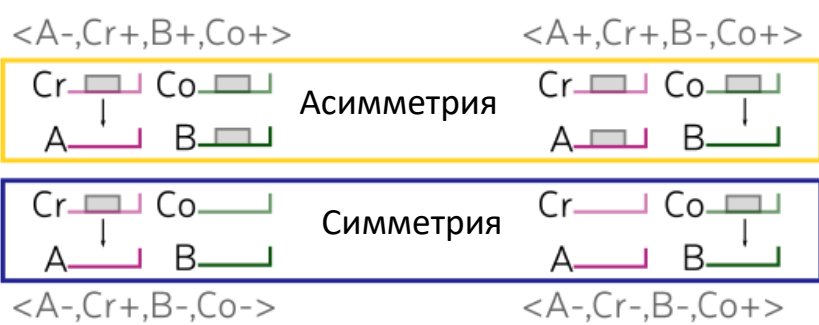


Мотивы связывания ТФ

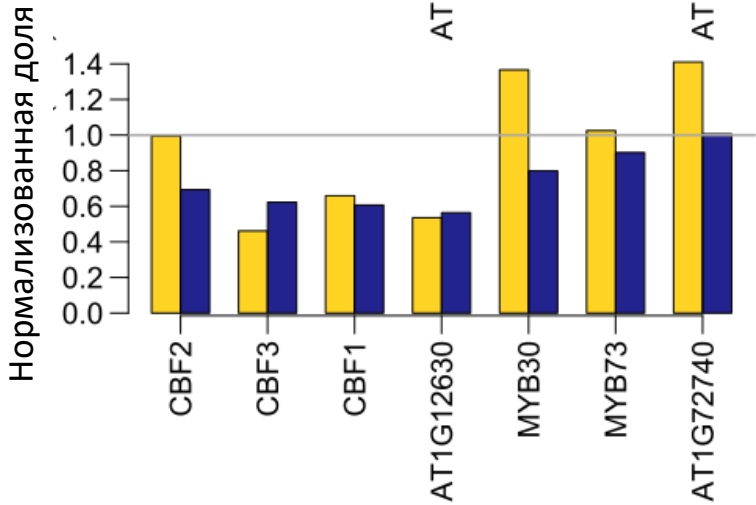
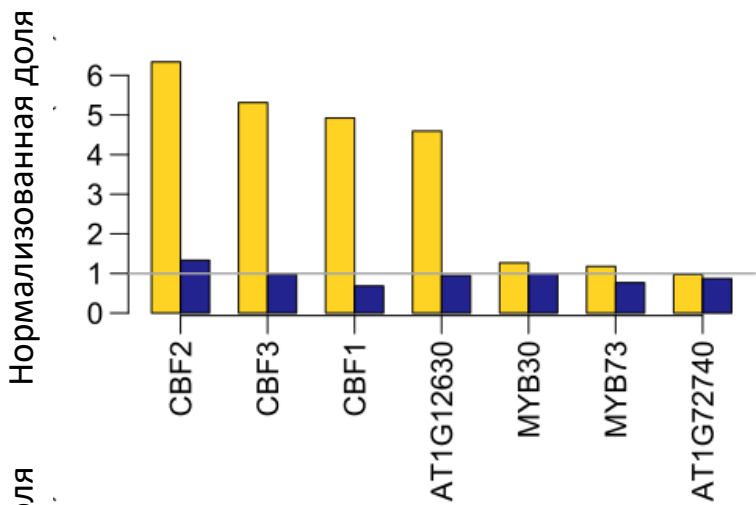
Возникновение сайта



Утрата сайта

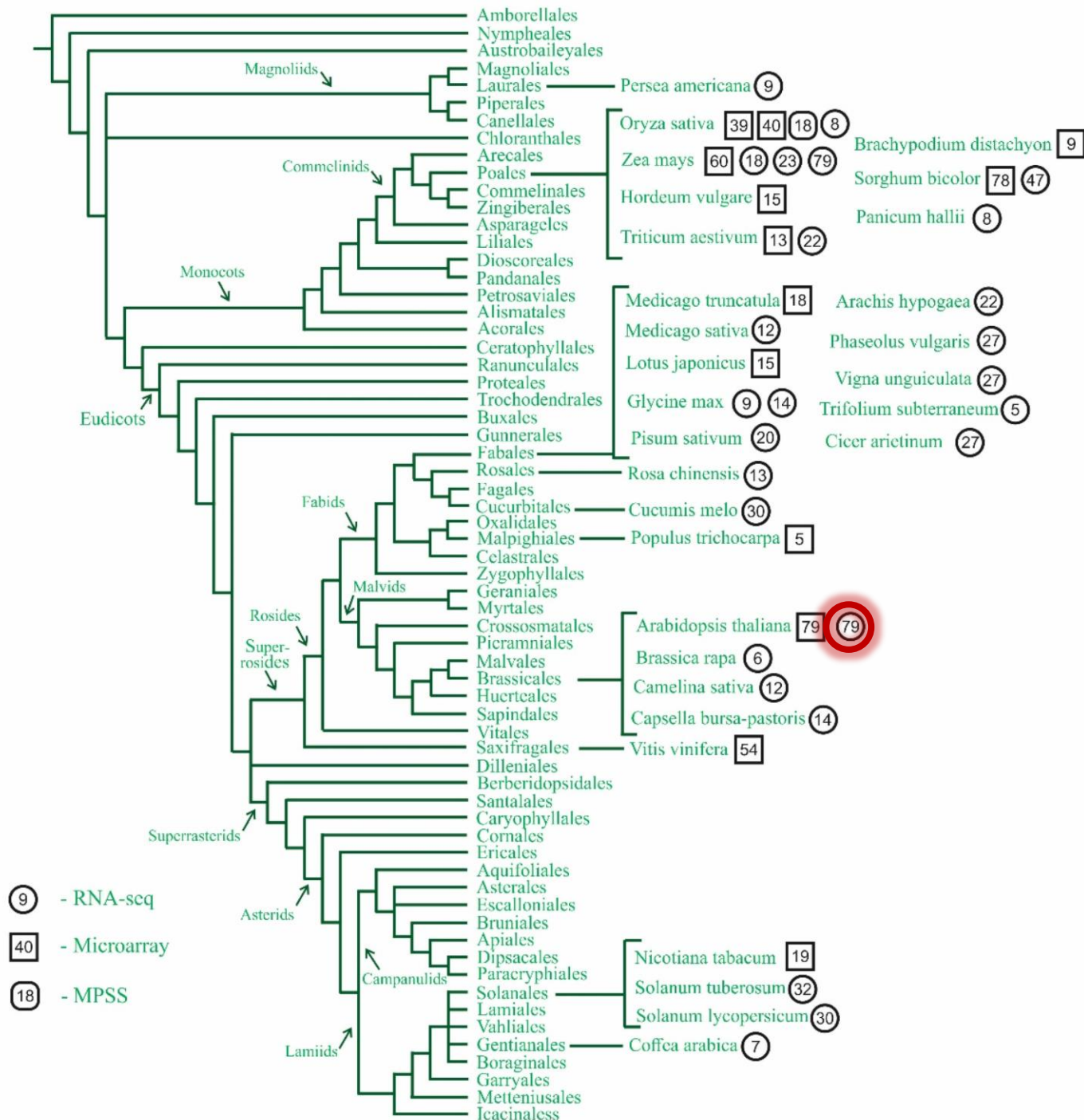


Холодовой стресс



Мотивы связывания ТФ

Транскриптомные карты растений



- Транскриптомные карты могут использоваться в широком круге функциональных и эволюционных анализов
- Число таксонов, для представителей которых есть атласы экспрессии, остается ограниченным
- Создание большего числа транскриптомных карт позволит интенсифицировать межвидовые исследования

ВЫВОДЫ

1. С использованием методов высокопроизводительного секвенирования создана транскриптомная карта модельного объекта биологии растений *Arabidopsis thaliana*, включающая 79 органов и тканей на разных стадиях развития. Анализ транскриптомной карты:
 - подтвердил, что только небольшая часть (1,8%) генов обладает узким паттерном экспрессии, указывая на их вероятное участие в определении тканевой специфичности, тогда как большая часть генов экспрессируются во всех или большинстве тканей растения;
 - продемонстрировал, что гены, обладающие равномерной экспрессией во всех образцах, участвуют в разных биологических процессах, но чаще связаны с функционированием мембран;
 - показал, что различные семейства транскрипционных факторов обладают разным уровнем тканевой специфичности: для семейств MADS, LOB, LIM и MYB характерны более узкие паттерны экспрессии, тогда как SWI/SNF SWI3, SNF2, CAMTA, DDT и FAR, как правило, присутствуют во всех или в большинстве органах и тканях *Arabidopsis thaliana*.

Выводы

2. Проведенный с помощью атласа экспрессии генов *Arabidopsis thaliana* анализ биологических процессов показал, что:
 - в момент перехода к цветению в апикальной меристеме побега *Arabidopsis thaliana* происходит критическое изменение динамики клеточных делений, которое, вероятно, связано с сокращением длительности клеточного цикла за счет фаз G_1 и G_2 ;
 - развитие холодового стресса у *Arabidopsis thaliana* сочетает универсальные для всего растения процессы с тканеспецифичными; в том числе показано, что в некоторых случаях тканеспецифичный ответ на стресс происходит с помощью рекрутирования генов, в нормальных условиях отвечающие за развитие других частей растения.
3. Создана транскриптомная карта *Capsella-bursa pastoris* – аллотетраплоидного вида, эволюционно и морфологически близкого к *Arabidopsis thaliana*. Показано отсутствие геномного доминирования, то есть преимущественной экспрессии генов, принадлежащих одному из субгеномов, и случайный характер инактивации одного гена из пары гомеологов на ранней стадии эволюции полиплоидов. Сравнение профилей экспрессии гомеологов с известными данными о функциональной эволюции генов показало, что изменение паттерна и/или уровня экспрессии является свидетельством изменения функции гена. Разница в уровнях экспрессии гомеологов вероятно вызывается возникновением нового сайта посадки транскрипционного фактора в промоторе одного из гомеологов.

Список публикаций по теме диссертации

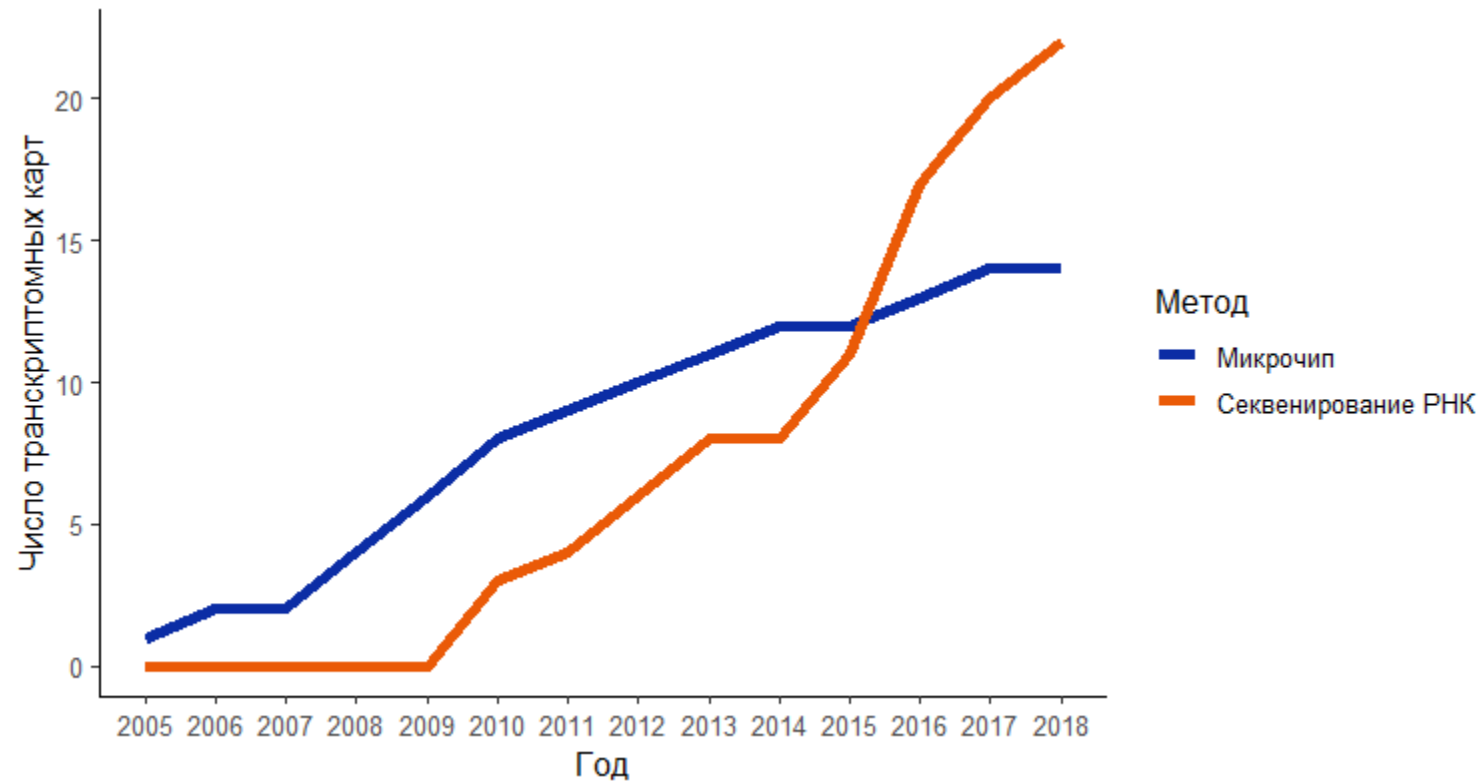
1. **Klepikova AV**, Logacheva MD, Dmitriev SE, Penin AA. RNA-seq analysis of an apical meristem time series reveals a critical point in *Arabidopsis thaliana* flower initiation. BMC Genomics. 2015 Jun 18;16:466. doi: 10.1186/s12864-015-1688-9. (WoS, IF = 3.86)
2. **Klepikova AV**, Kasianov AS, Gerasimov ES, Logacheva MD, Penin AA. A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. Plant J. 2016 Dec;88(6):1058-1070. doi: 10.1111/tpj.13312. (WoS, IF = 5.46)
3. Kasianov AS*, **Klepikova AV***, Kulakovskiy IV, Gerasimov ES, Fedotova AV, Besedina EG, Kondrashov AS, Logacheva MD, Penin AA. High-quality genome assembly of *Capsella bursa-pastoris* reveals asymmetry of regulatory elements at early stages of polyploid genome evolution. Plant J. 2017 Jul;91(2):278-291. doi: 10.1111/tpj.13563. (WoS, IF = 5.46)
4. **Klepikova AV**, Kulakovskiy IV, Kasianov AS, Logacheva MD, Penin AA. An update to database TraVA: organ-specific cold stress response in *Arabidopsis thaliana*. BMC Plant Biol. 2019 Feb 15;19(Suppl 1):49. doi: 10.1186/s12870-019-1636-y. (WoS, IF = 3.93)
5. **Klepikova AV**, Penin AA. Gene Expression Maps in Plants: Current State and Prospects. Plants (Basel). 2019 Aug 28;8(9). pii: E309. doi: 10.3390/plants8090309. Review. (WoS, IF = 2.63)

* Equal contribution

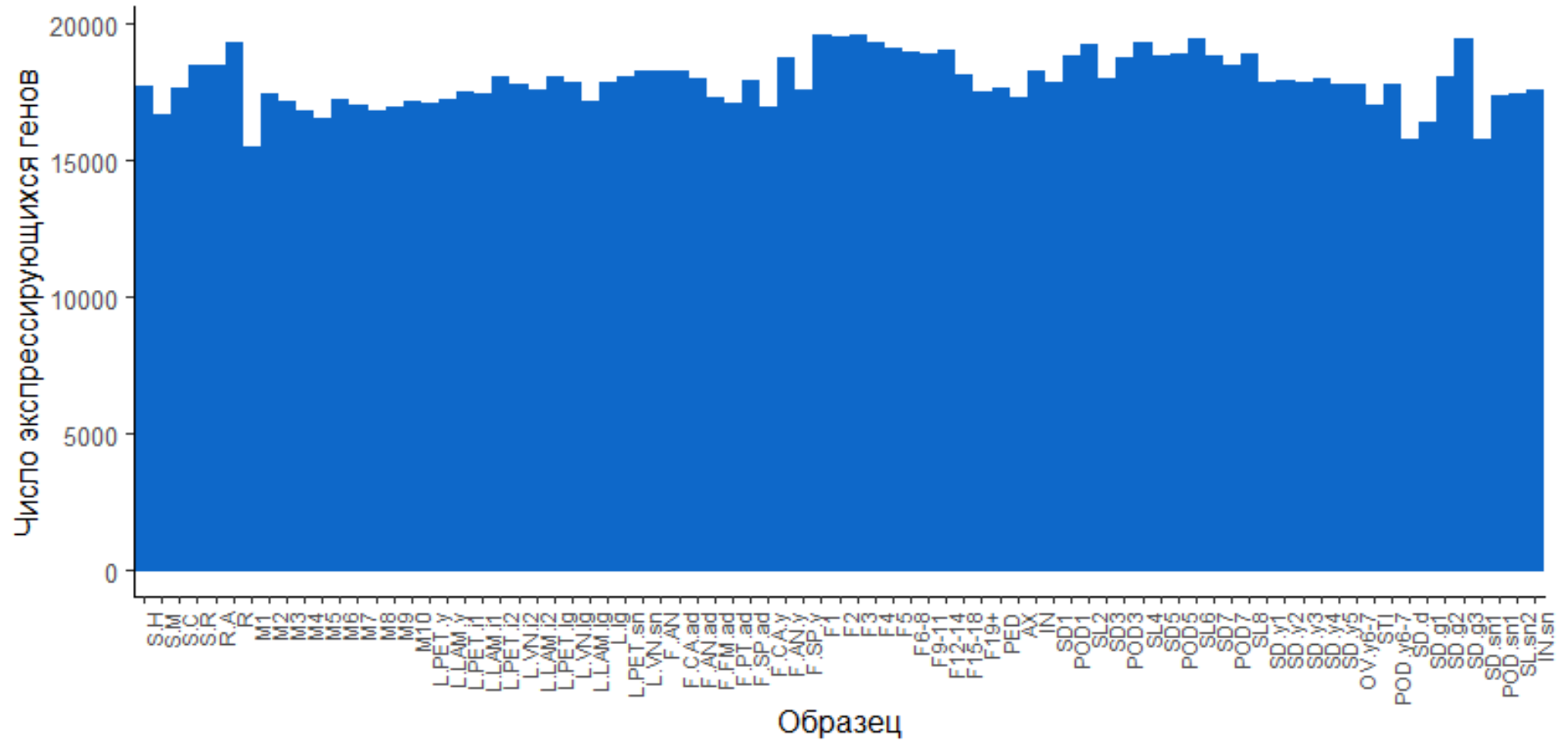
Прочие публикации

1. Larskaya I, Gorshkov O, Mokshina N, Trofimova O, Mikshina P, **Klepikova A**, Gogoleva N, Gorshkova T. Stimulation of adventitious root formation by the oligosaccharin OSRG at the transcriptome level. *Plant Signal Behav.* 2020;15(1):1703503. doi: 10.1080/15592324.2019.1703503. Epub 2019 Dec 18. (IF = 1.64)
2. Penin AA, **Klepikova AV**, Kasianov AS, Gerasimov ES, Logacheva MD. Comparative Analysis of Developmental Transcriptome Maps of *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum*. *Genes (Basel).* 2019 Jan 15;10(1). pii: E50. doi: 10.3390/genes10010050. (IF = 3.19)
3. Potashnikova DM, Golyshev SA, Penin AA, Logacheva MD, **Klepikova AV**, Zharikova AA, Mironov AA, Sheval EV, Vorobjev IA. FACS Isolation of Viable Cells in Different Cell Cycle Stages from Asynchronous Culture for RNA Sequencing. *Methods Mol Biol.* 2018;1745:315-335. doi: 10.1007/978-1-4939-7680-5_18.
4. Putlyaeva LV, Schwartz AM, **Klepikova AV**, Vorontsov IE, Kulakovskiy IV, Kuprash DV. The Minor Variant of the Single-Nucleotide Polymorphism rs3753381 Affects the Activity of a SLAMF1 Enhancer. *Acta Naturae.* 2017 Jul-Sep;9(3):94-102.
5. **Klepikova AV**, Kasianov AS, Chesnokov MS, Lazarevich NL, Penin AA, Logacheva M. Effect of method of deduplication on estimation of differential gene expression using RNA-seq. *PeerJ.* 2017 Mar 16;5:e3091. doi: 10.7717/peerj.3091. (IF = 2.20)
6. Naumenko SA, Logacheva MD, Popova NV, **Klepikova AV**, Penin AA, Bazykin GA, Etingova AE, Mugue NS, Kondrashov AS, Yampolsky LY. Transcriptome-based phylogeny of endemic Lake Baikal amphipod species flock: fast speciation accompanied by frequent episodes of positive selection. *Mol Ecol.* 2017 Jan;26(2):536-553 doi: 10.1111/mec.13927. (IF = 5.94)
7. Schwartz AM, Putlyaeva LV, Covich M, **Klepikova AV**, Akulich KA, Vorontsov IE, Korneev KV, Dmitriev SE, Polanovsky OL, Sidorenko SP, Kulakovskiy IV, Kuprash DV. Early B-cell factor 1 (EBF1) is critical for transcriptional control of SLAMF1 gene in human B cells. *Biochim Biophys Acta* 2016 Oct 1859(10):1259-68. doi: 10.1016/j.bbagr.2016.07.004. (IF = 5.08)
8. Baranova MA, Logacheva MD, Penin AA, Seplyarskiy VB, Safonova YY, Naumenko SA, **Klepikova AV**, Gerasimov ES, Bazykin GA, James TY, Kondrashov AS. Extraordinary Genetic Diversity in a Wood Decay Mushroom. *Mol Biol Evol.* 2015 Oct;32(10):2775-83. doi:10.1093/molbev/msv153. (IF = 13.64)
9. Evstafieva AG, Garaeva AA, Khutornenko AA, **Klepikova AV**, Logacheva MD, Penin AA, Novakovsky GE, Kovaleva IE, Chumakov PM. A sustained deficiency of mitochondrial respiratory complex III induces an apoptotic cell death through the p53-mediated inhibition of pro-survival activities of the activating transcription factor 4. *Cell Death Dis.* 2014 Nov 6;5:e1511. doi: 10.1038/cddis.2014.469. (IF = 5.37)
10. Seplyarskiy VB, Logacheva MD, Penin AA, Baranova MA, Leushkin EV, Demidenko NV, **Klepikova AV**, Kondrashov FA, Kondrashov AS, James TY. Crossing-over in a hypervariable species preferentially occurs in regions of high local similarity. *Mol Biol Evol.* 2014 Nov;31(11):3016-25. doi: 10.1093/molbev/msu242. (IF = 13.64)

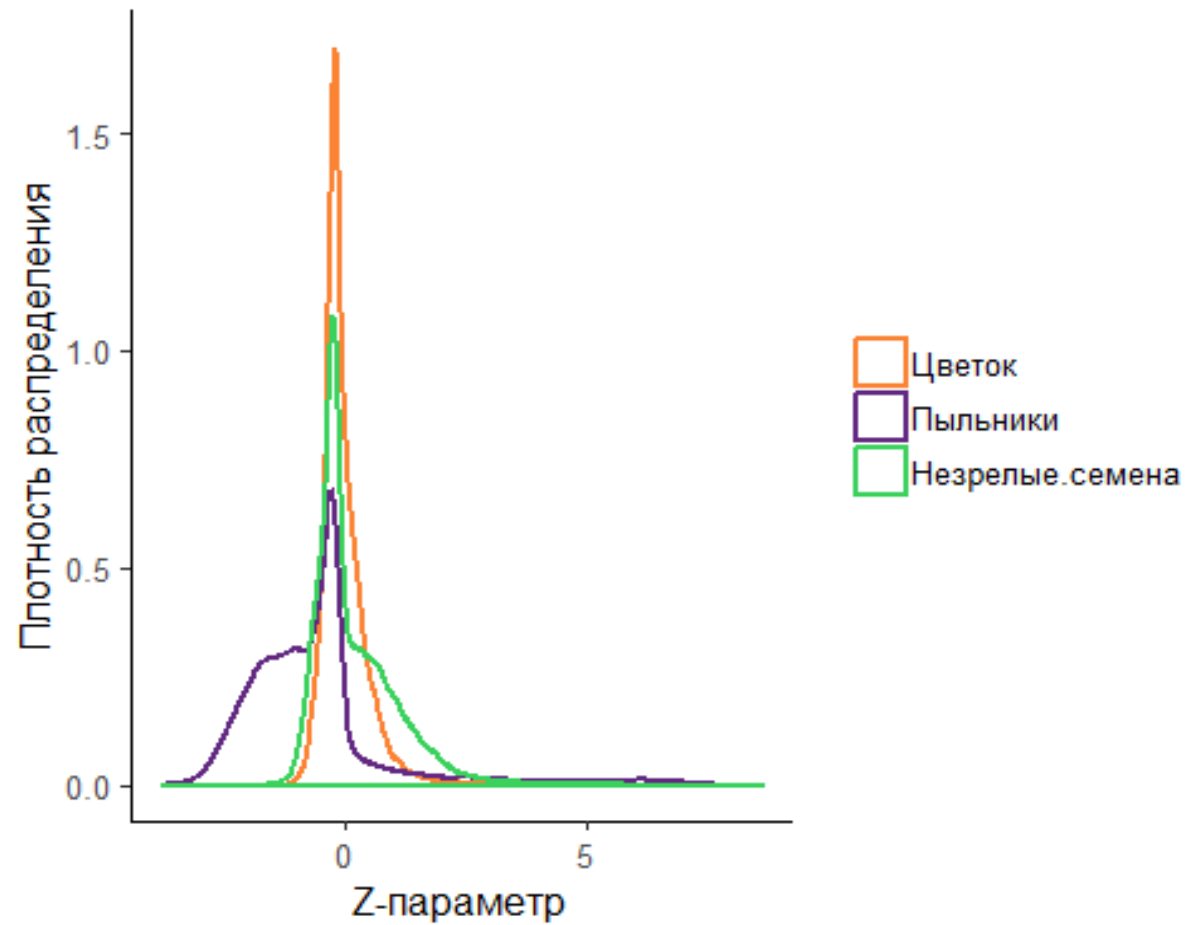
Появление транскриптомных карт растений



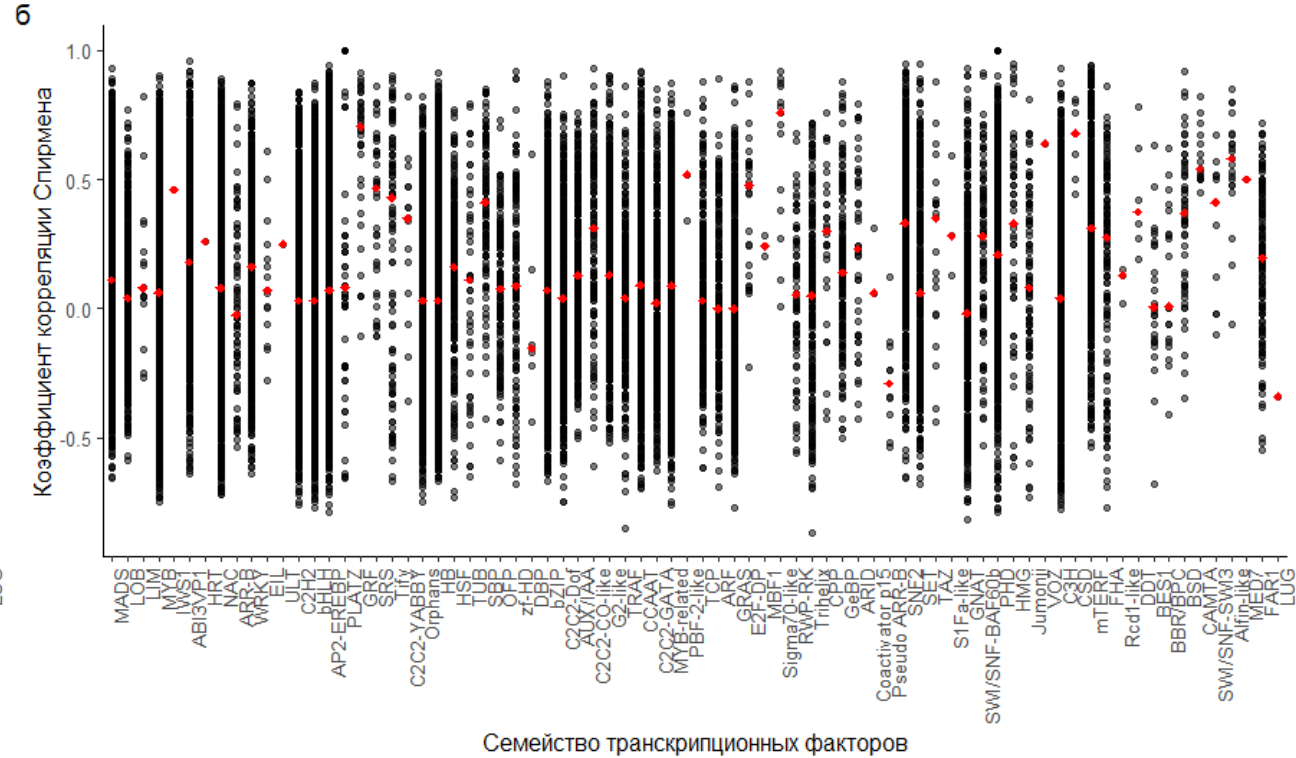
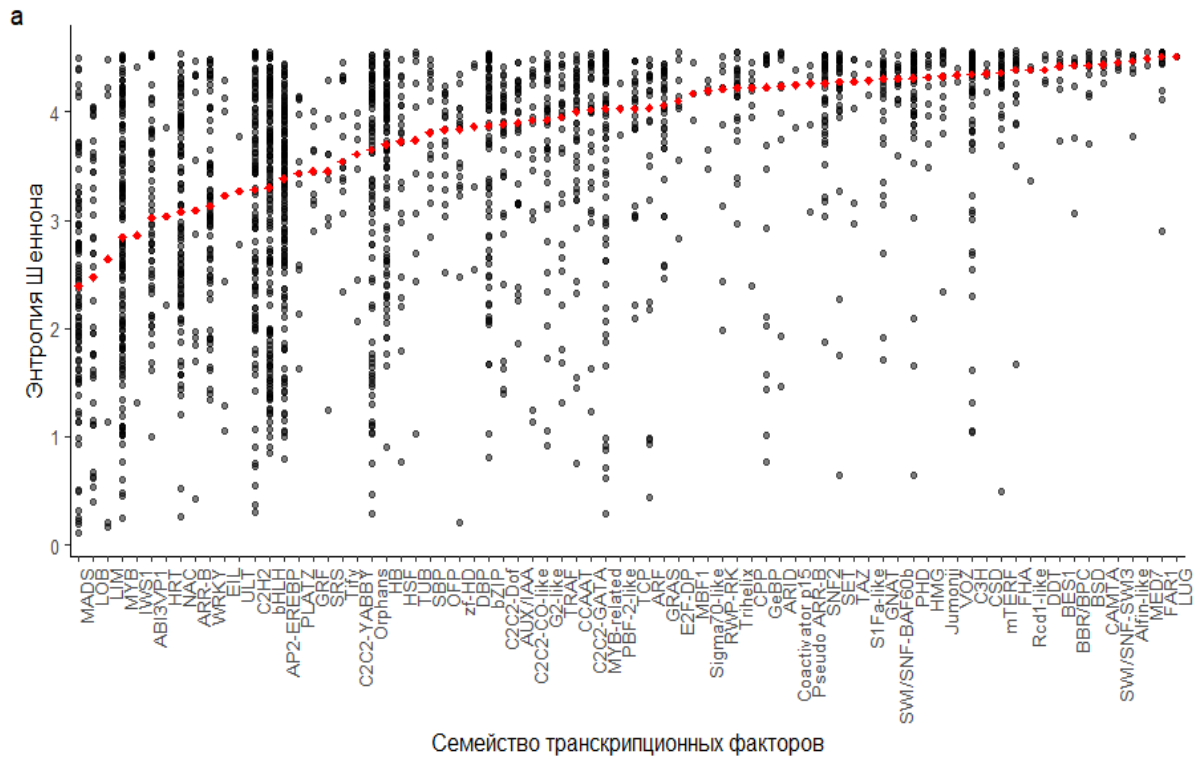
Число экспрессирующихся генов в каждом образце



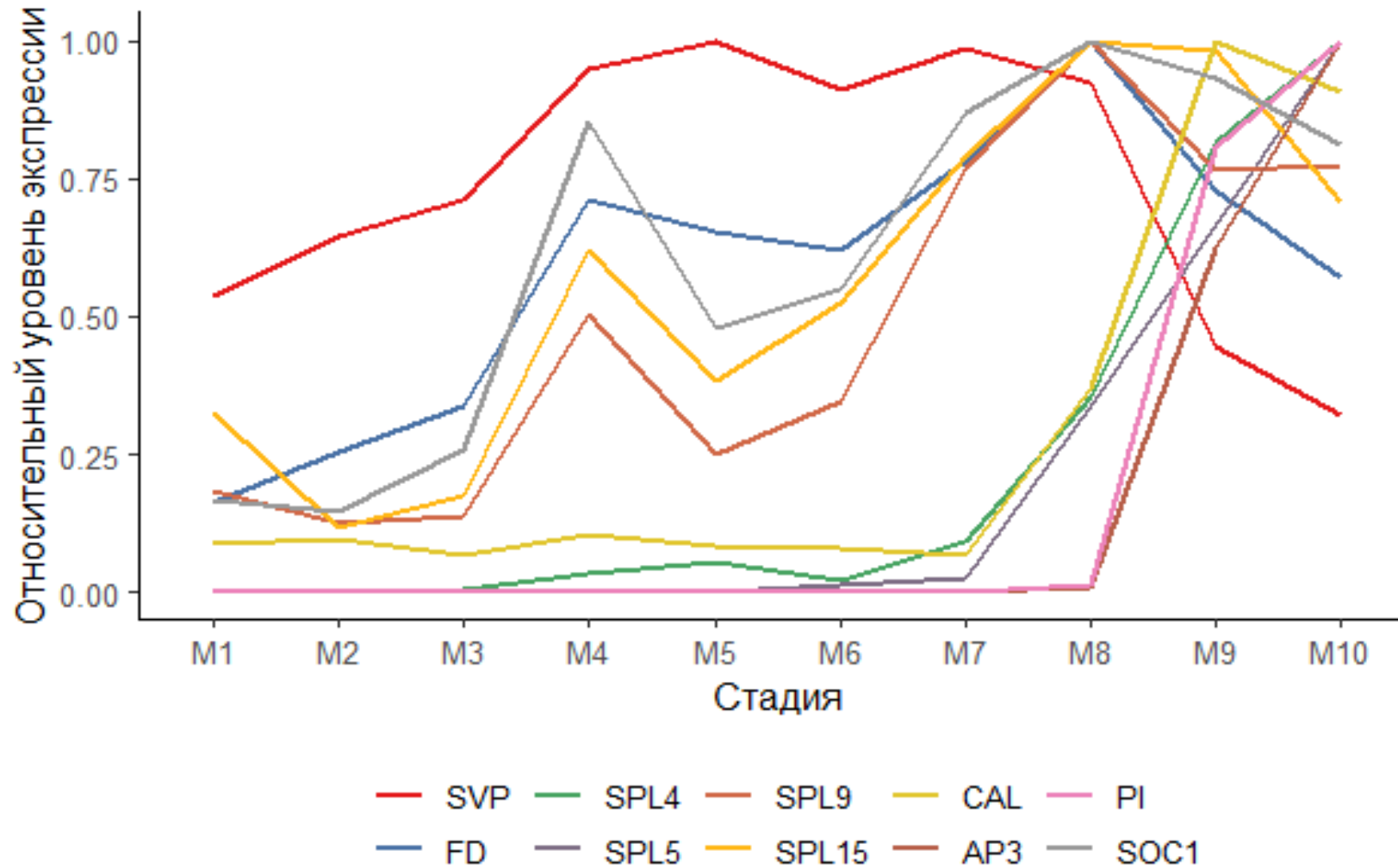
Сравнение профилей экспрессии образцов



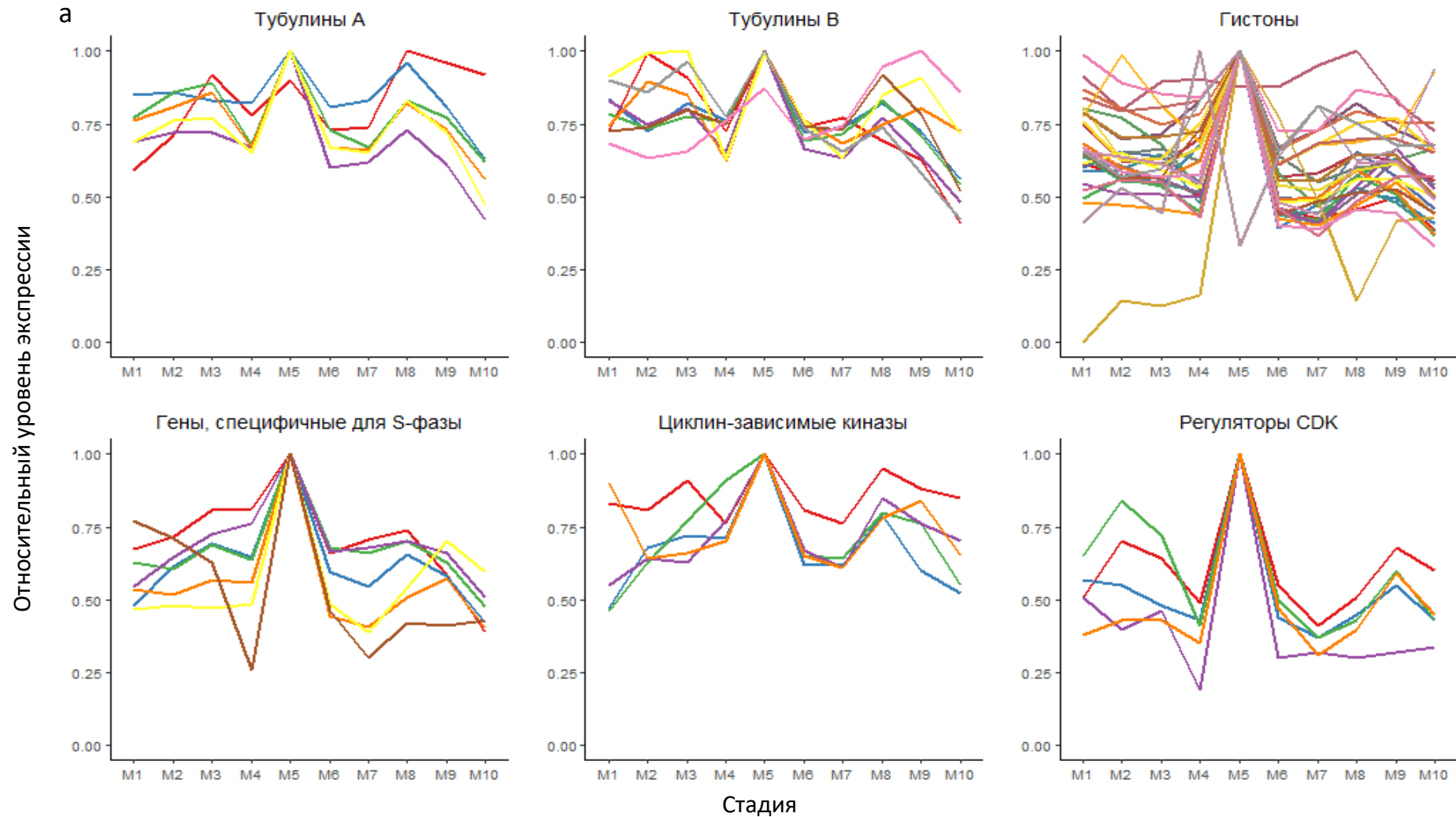
Транскрипционные факторы в атласе экспрессии



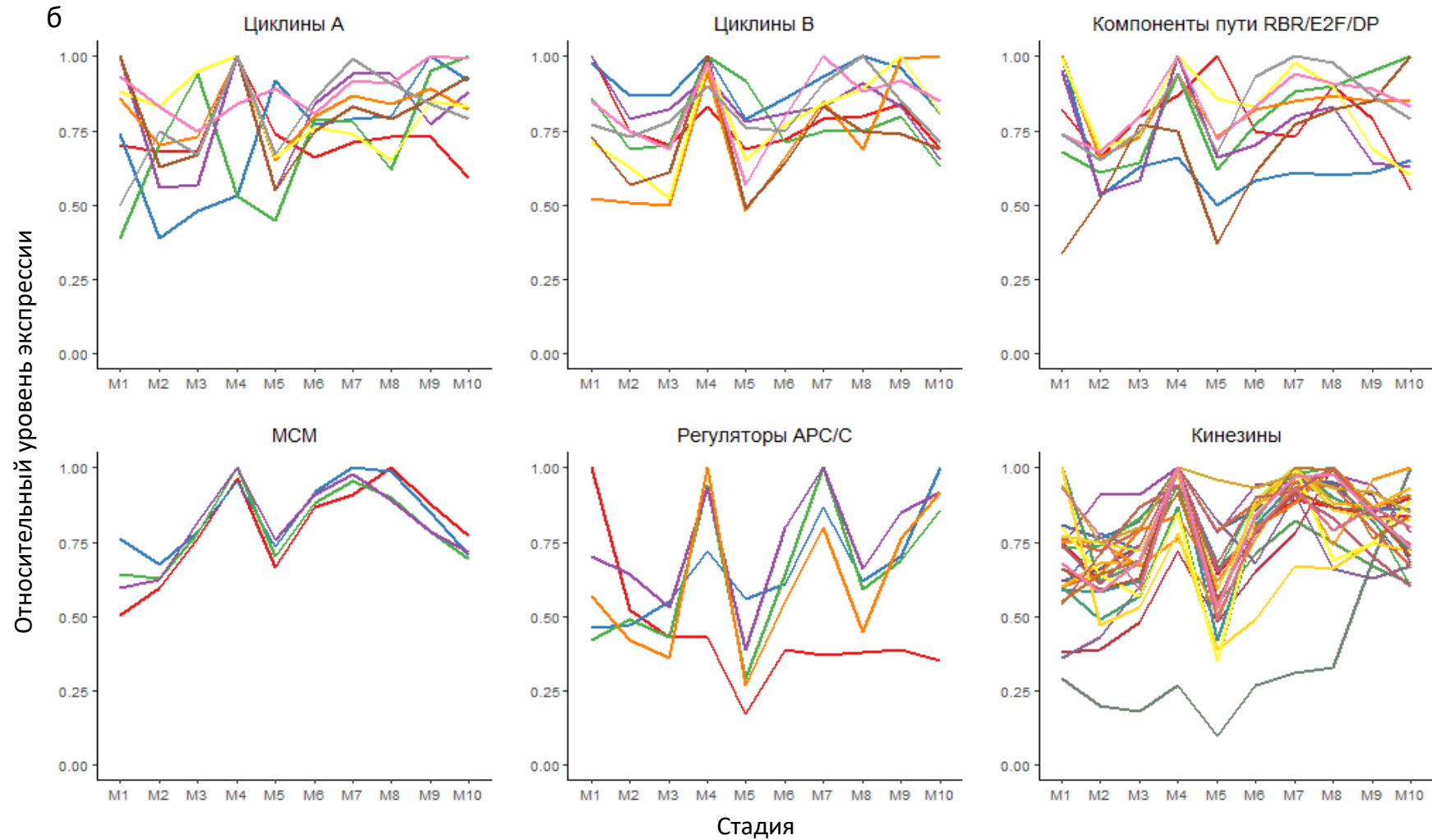
Профили экспрессии генов, регулирующих переход к цветению и морфогенез органов цветков



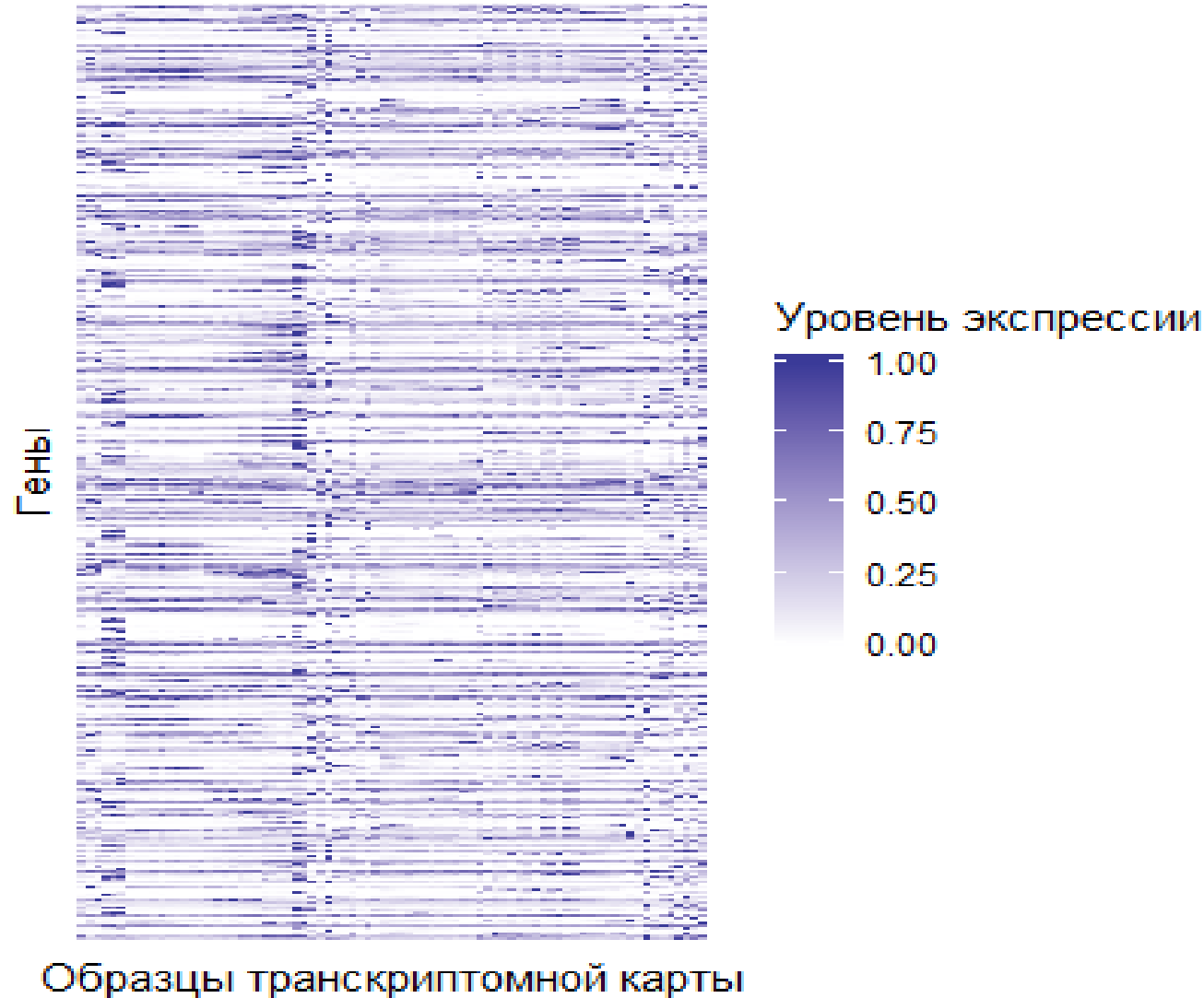
Профили экспрессии генов, связанных с клеточным циклом



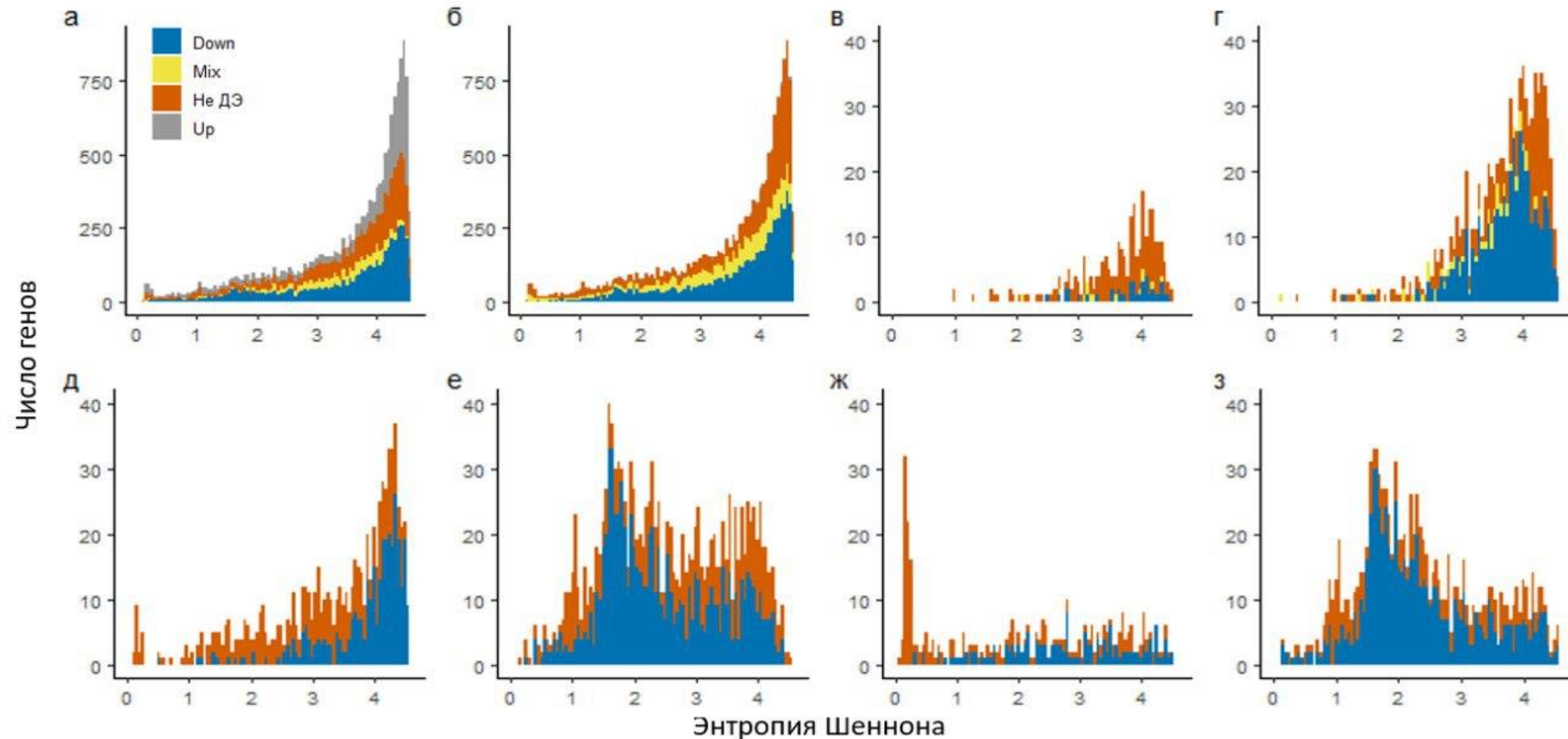
Профили экспрессии генов, связанных с клеточным циклом



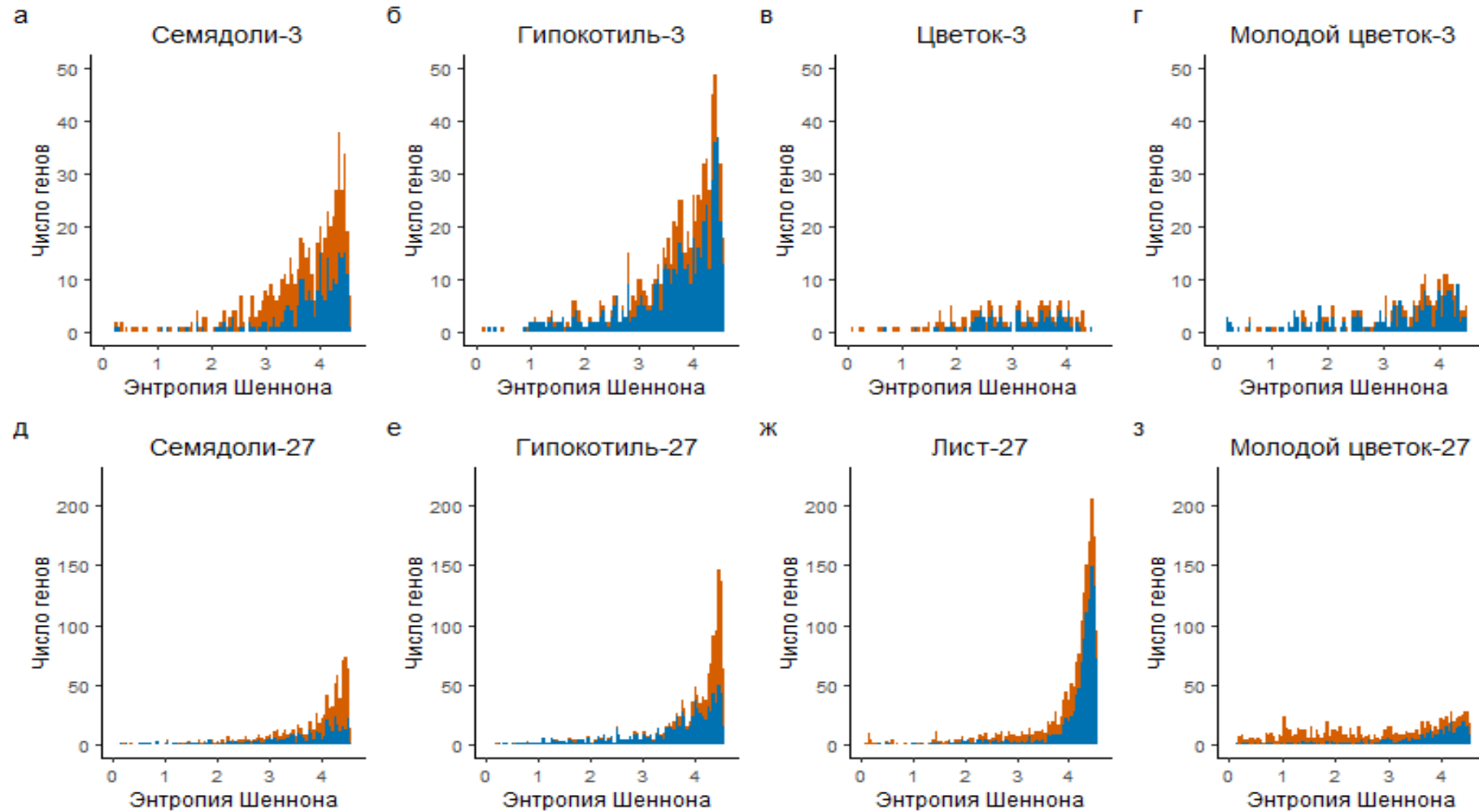
Профили экспрессии известных генов, участвующих в ответе на стресс



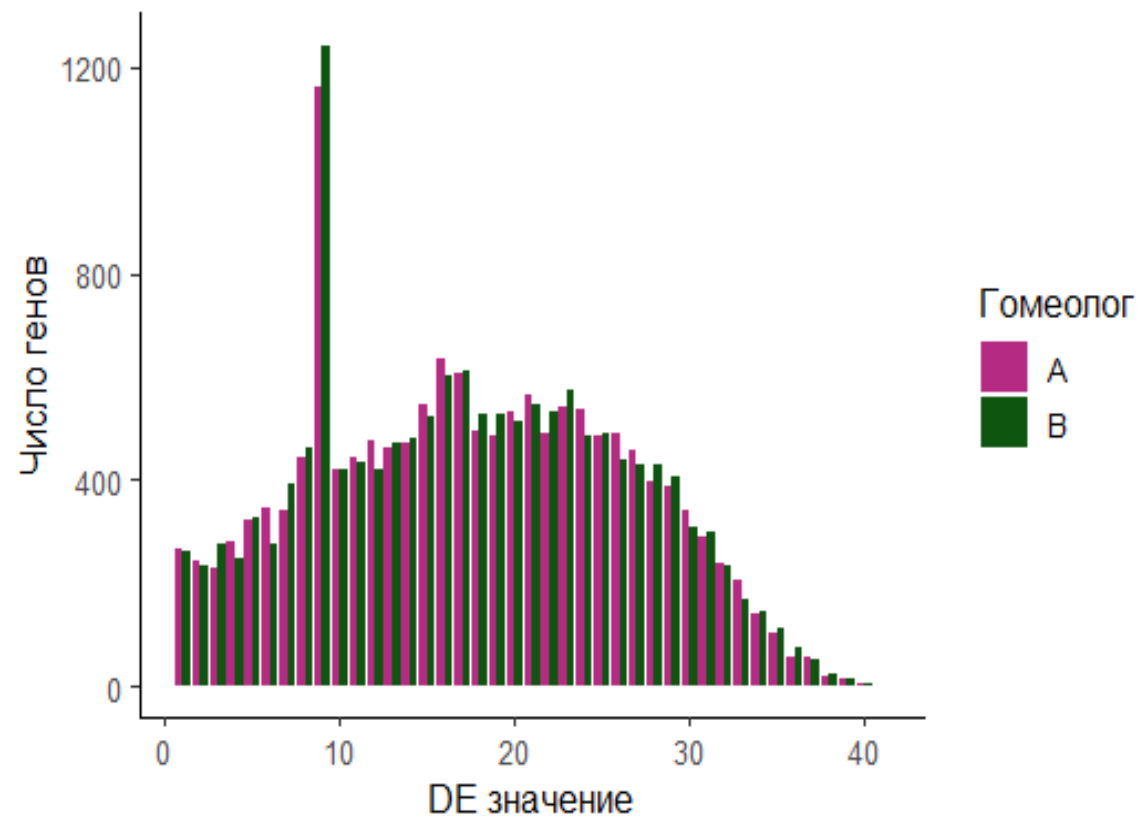
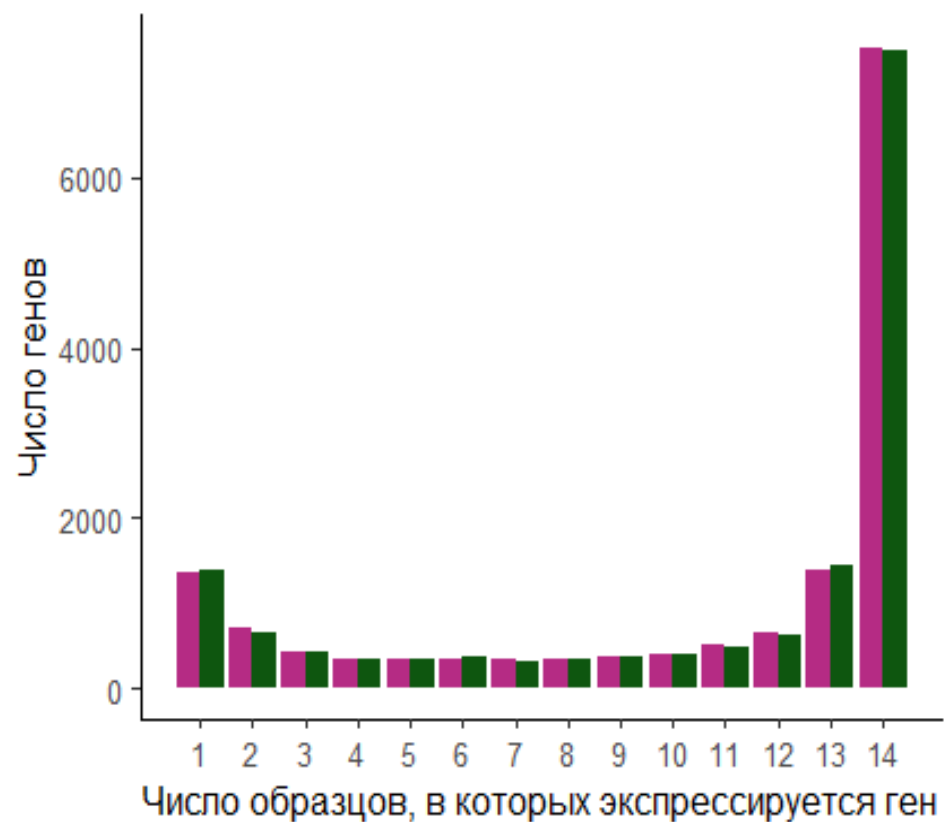
Паттерны экспрессии генов стрессового ответа в нормальных условиях



Паттерны экспрессии генов стрессового ответа в нормальных условиях



Транскриптомные характеристики гомеологов



Ортологи гена *A. thaliana* FLC

