

Различные структурные варианты сайта связывания транскрипционного фактора EIN3 опосредуют регуляцию разных биологических процессов в ответе на этилен у *Arabidopsis thaliana* L.

Маслакова А.А.¹, Долгих В.А.^{1, 2}, Землянская Е.В.^{1, 2 *}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* ezemlyanskaya@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: транскрипционный фактор ETHYLENE-INSENSITIVE3 (EIN3); сайты связывания EIN3 (EIN3 binding site; EBS); генная онтология

Мотивация и цель: Транскрипционный фактор ETHYLENE-INSENSITIVE3 (EIN3) играет ключевую роль в реакции растений на фитогормон этилен. Под действием этилена он связывается с определенными участками ДНК в промоторах генов, называемыми EBS (EIN3 binding site), запуская таким образом транскрипционный ответ генов [1]. Ранее нами было показано, что существуют четыре структурных варианта EBS, два из них представляют собой инвертированный повтор классического EBS с перекрыванием копий на 1 и 2 нуклеотида (2EBS[-1] и 2EBS[-2] соответственно) [2]. Предсказано, что свойства этих мотивов с точки зрения регуляции экспрессии генов в ответ на этилен различаются. В данной работе мы исследовали, связаны ли различные структурные варианты EBS с регуляцией специфических признаков под действием этилена.

Методы и алгоритмы: Для определения потенциальных цис-элементов двух типов в промоторах этилен-чувствительных генов мы использовали публично доступные данные экспериментов ChIP-seq для EIN3 и RNA-seq по обработке 3-дневных этиолированных проростков *Arabidopsis thaliana* этиленом в течение 1, 4 и 12 часов [3]. Отбор пиков ТФ EIN3, расположенных в регуляторных районах генов [-1500; +1), проводили с помощью сервиса PAVIS [4]. Распознавание мотивов 2EBS[-1] и 2EBS[-2] в пиках проводили с помощью конвейера SFmotif [5]. Функциональная аннотация списков этилен-чувствительных генов-мишеней EIN3 с различными структурными вариантами EBS в промоторе проводилась с помощью онлайн-сервисов DAVID [6, 7] и AgriGO (v2.0) [8]. Кластеризация и визуализация терминов ГО проводились с помощью онлайн-инструмента REVIGO (v 1.8.1) [9].

Результаты: Было распознано 63 мотива 2EBS[-1] и 33 мотива 2EBS[-2] в регуляторных районах 36 и 25 активируемых этиленом генов-мишеней EIN3 соответственно. Функциональная аннотация списков генов с помощью сервисов AgriGO и DAVID выявила 45 и 158 обогащенных ГО-терминов в списках генов-мишеней с мотивом 2EBS[-1] и с мотивом 2EBS[-2] соответственно. Выявлено 33 общих ГО-термина, которые связаны с ответом на эндогенные стимулы (в том числе ответ на гормоны), регуляцией клеточных процессов (включая клеточные взаимодействия) и передачей сигнала (в том числе сигнальный путь,

активируемый этиленом, и передача сигнала фосфорилирования). Уникальными биологическими процессами для активируемых этиленом генов-мишеней EIN3 с мотивом 2EBS[-1] в промоторе были ответ на биотические стимулы, неорганические вещества, позитивная регуляция процессов развития многоклеточных организмов и регуляция цитокинин-активируемого сигнального пути. Уникальными биологическими процессами для активируемых этиленом генов-мишеней EIN3 с мотивом 2EBS[-2] в промоторе были процессы, связанные с регуляцией метаболизма и биосинтезом, с регуляцией экспрессии генов и процессинга РНК, ответом на абиотические стимулы (в том числе на этилен и снижение уровня кислорода), иммунный ответ на внешние воздействия, с развитием анатомических структур растений (включая постэмбриональное развитие) и процессами размножения и старения (в том числе листьев).

Выводы: Полученные результаты свидетельствуют о том, что различные структурные варианты EBS могут быть связаны с регуляцией специфических признаков под действием этилена.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФ № 20-14-00140.

Structural variants of EIN3 binding site mediate regulation of distinct biological processes in response to ethylene in *Arabidopsis thaliana* L.

Maslakova A.A.¹, Dolgikh V.A.^{1, 2}, Zemlyanskaya E.V.^{1, 2*}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* ezemlyanskaya@bionet.nsc.ru

Key words: ETHYLENE-INSENSITIVE3 (EIN3) transcription factor; EIN3 binding sites; gene ontology

Motivation and Aim: ETHYLENE-INSENSITIVE3 (EIN3) transcription factor plays a pivotal role in the plant response to phytohormone ethylene. Upon ethylene exposure, EIN3 binds to specific regions of DNA in gene promoters designated as EBS (EIN3 binding site), thereby initiating the transcriptional response of genes [1]. Our previous studies have demonstrated the existence of four distinct structural variants of EBS. Two of these variants are inverted repeats of the classic EBS motif with the overlap of 1 and 2 nucleotides between the copies (2EBS [-1] and 2EBS [-2], respectively). It was predicted that the regulatory properties of these motifs in terms of gene expression in response to ethylene differ. The objective of this study was to determine whether various structural EBS variants are associated with the regulation of specific traits in response to ethylene.

Methods and Algorithms: To identify the potential *cis*-elements of each type in the promoters of ethylene-sensitive genes, we used publicly available EIN3 ChIP-seq data and RNA-seq data on the transcriptomes of 3-day-old etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings treated with ethylene for 1, 4, and 12 hours [3]. We identified EIN3 peaks, which fall into the regulatory gene regions [-1500; +1) using the PAVIS service [4]. The recognition of 2EBS[-1] and 2EBS[-2] motifs in the peaks was conducted using SFmotif pipeline [5]. The functional annotation of lists of ethylene-sensitive EIN3 target genes, which possess different structural variants of EBS in their promoters, was performed

using the online services DAVID [6, 7] and AgriGO (v2.0) [8]. The clustering and visualization of Gene Ontology (GO) terms was conducted using the online tool REVIGO (v 1.8.1) [9].

Results: A total of 63 2EBS[-1] and 33 2EBS[-2] motifs were identified in the regulatory regions of 36 and 25 ethylene-activated EIN3 target genes, respectively. The functional annotation of gene lists using the AgriGO and DAVID services revealed 45 and 158 enriched GO terms in the lists of target genes with the 2EBS[-1] motif and with the 2EBS[-2] motif, respectively. A total of 33 common GO terms were identified, which were related to the response to endogenous stimuli (including the response to hormones), regulation of cellular processes (including cellular interactions) and signal transmission (including the ethylene-activated signaling pathway and phosphorylation signal transmission). The unique biological processes for ethylene-activated EIN3 target genes with the 2EBS[-1] motif in the promoter were response to biotic stimuli, inorganic substances, positive regulation of the development of multicellular organisms, and regulation of the cytokinin-activated signaling pathway. The unique biological processes for ethylene-activated EIN3 target genes with the 2EBS[-2] motif in the promoter were those related to the regulation of metabolism and biosynthesis, regulation of gene expression and RNA processing, response to abiotic stimuli (including ethylene and reduction of oxygen levels), immune response to external influences and the development of anatomical features. These processes also included development of plant anatomic structures (including postembryonic development) and reproduction and aging processes (including leaves).

Conclusion: The results obtained indicate that various structural variants of EBS can be associated with the regulation of specific traits under the action of ethylene.

Funding: The study was supported by the RSF grant No. 20-14-00140.

Список литературы/References

1. Solano R., Stepanova A., Chao Q., Ecker J.R. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev.* 1998;12(23):3703-3714. doi 10.1101/gad.12.23.3703
2. Dolgikh V., Levitsky V., Zemlyanskaya E., Oshchepkov D. EIN3 binding site architecture guides transcriptional response to ethylene in Arabidopsis. In: *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2020)*. Novosibirsk, 2020;305
3. Chang K.N., Zhong S., Weirauch M.T. et al. Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in Arabidopsis. *Elife.* 2013;2:e00675. doi 10.7554/eLife.00675
4. Huang W., Loganantharaj R., Schroeder B., Fargo D., Li L. PAVIS: a tool for peak annotation and visualization. *Bioinformatics.* 2013;29(23):3097-3099. doi 10.1093/bioinformatics/btt520
5. Долгих В.А., Землянская Е.В. Программный комплекс для анализа сайтов связывания транскрипционных факторов (АССТФ/SFmotif). Pat. 2023660670. ФГБНУ ФИЦ ИЦиГ СО РАН, 2023
6. Sherman B.T., Hao M., Qiu J., Jiao X., Baseler M.W., Lane H.C., Imamichi T., Chang W. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res.* 2022;50(W1):W216-W221. doi 10.1093/nar/gkac194
7. Huang da W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57. doi 10.1038/nprot.2008.211
8. Tian T., Liu Y., Yan H., You Q., Yi X., Du Z., Xu W., Su Z. agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W122-W129. doi 10.1093/nar/gkx382
9. Supek F., Bošnjak M., Škunca N., Šmuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One.* 2011;6(7):e21800. doi 10.1371/journal.pone.0021800