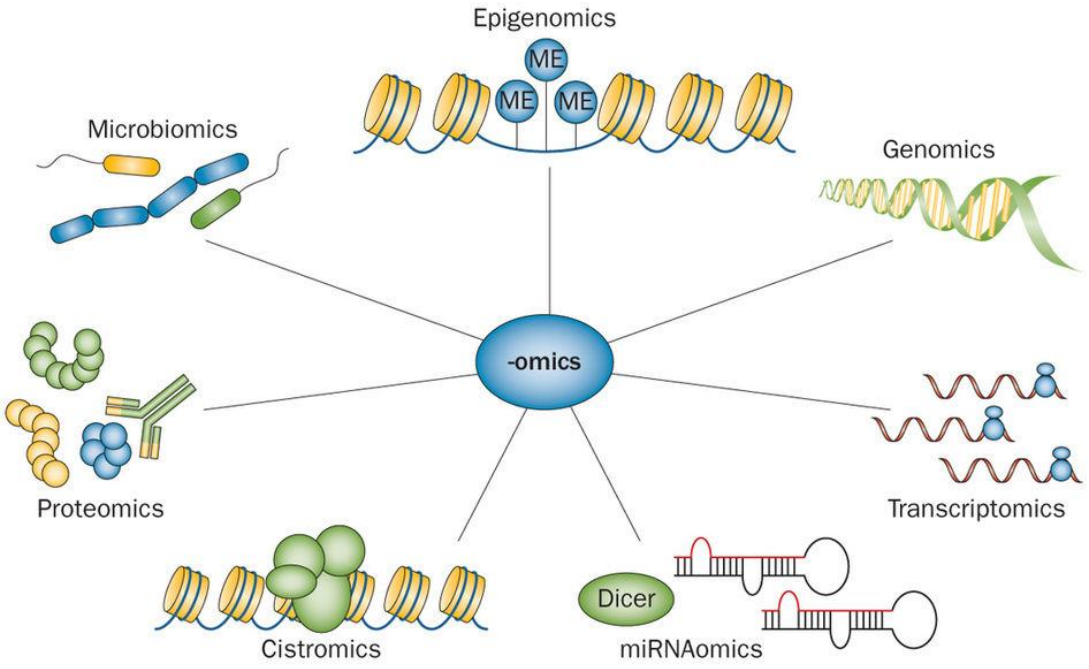
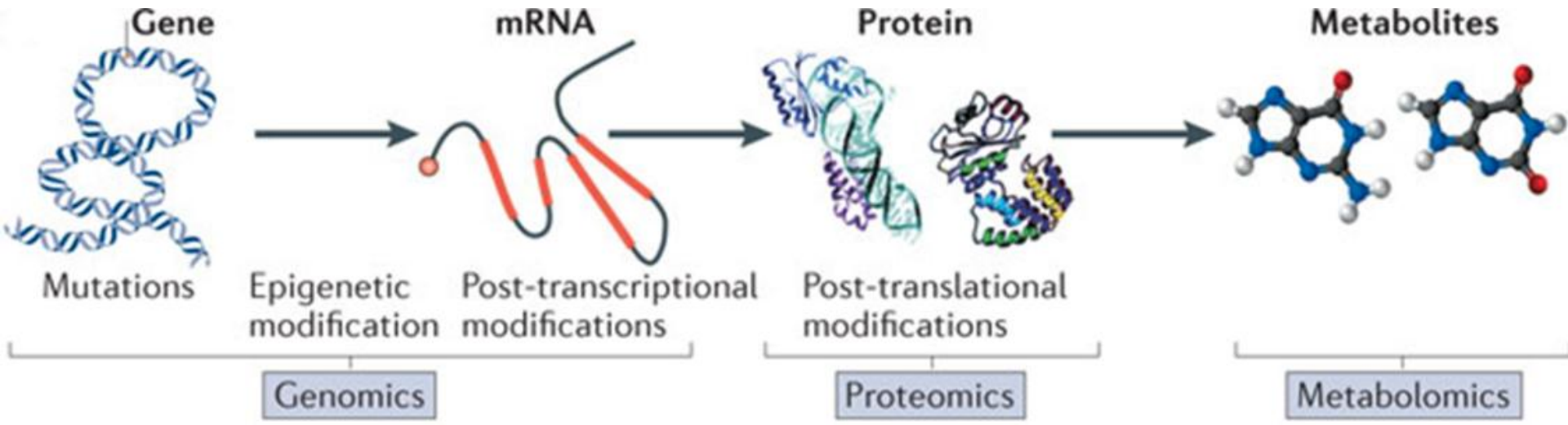
Международная молодежная конференция
СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ РАДИОБИОЛОГИИ, РАДИОЭКОЛОГИИ И АГРОЭКОЛОГИИ
3-4 октября, г. Обнинск

ВНИИРАЭ

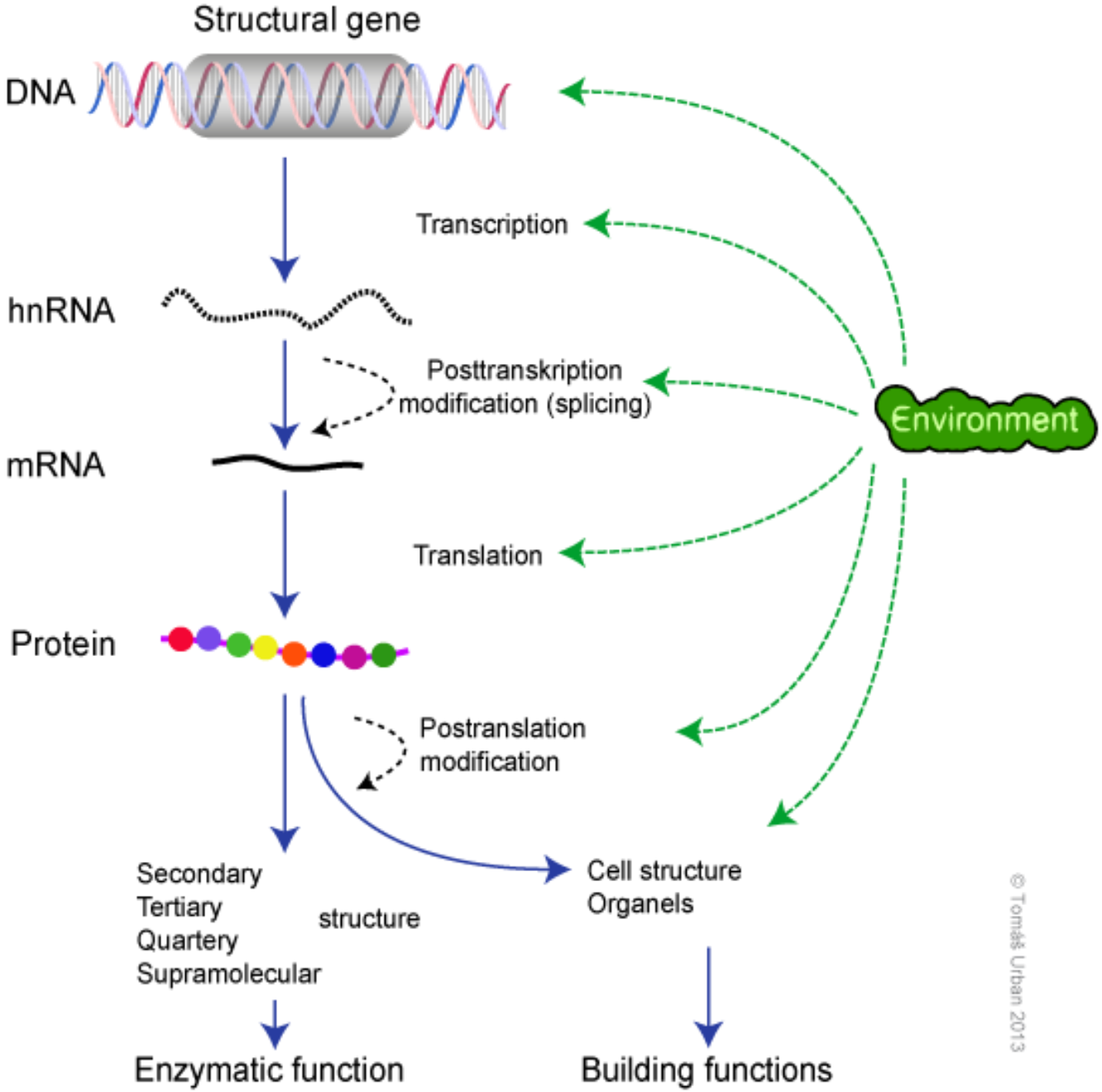
Омикс-технологии в радиобиологии растений



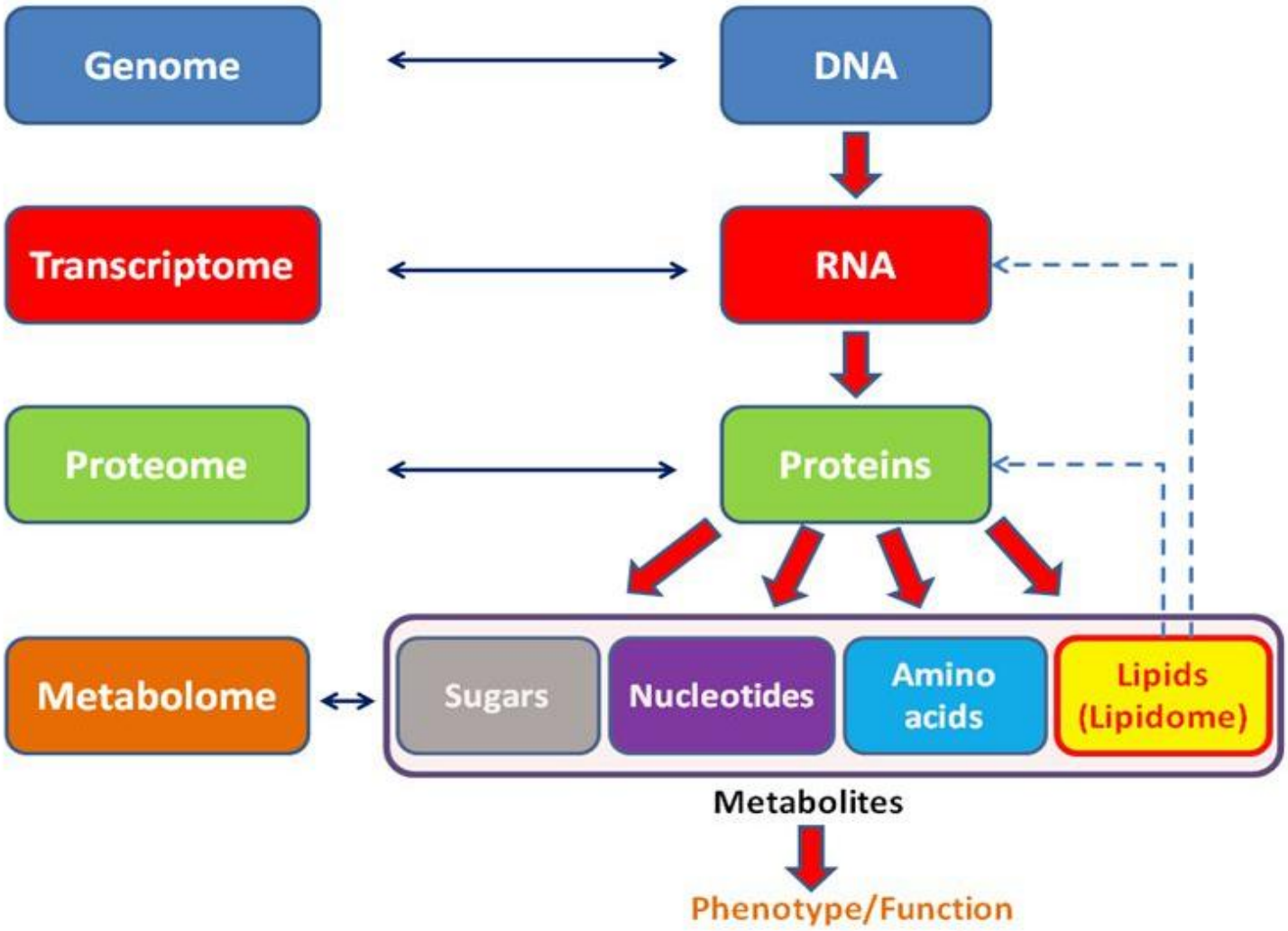
Как формируется функция или фенотип?



Gene expression



Омикс-технологии



Преимущества использования «омиков»

• Нет необходимости в предварительных знаниях о системе. Однако это не освобождает от выдвижения рабочей гипотезы!

• «Омики» позволяют получить срезы информации с разных функциональных уровней системы в определённый момент времени.

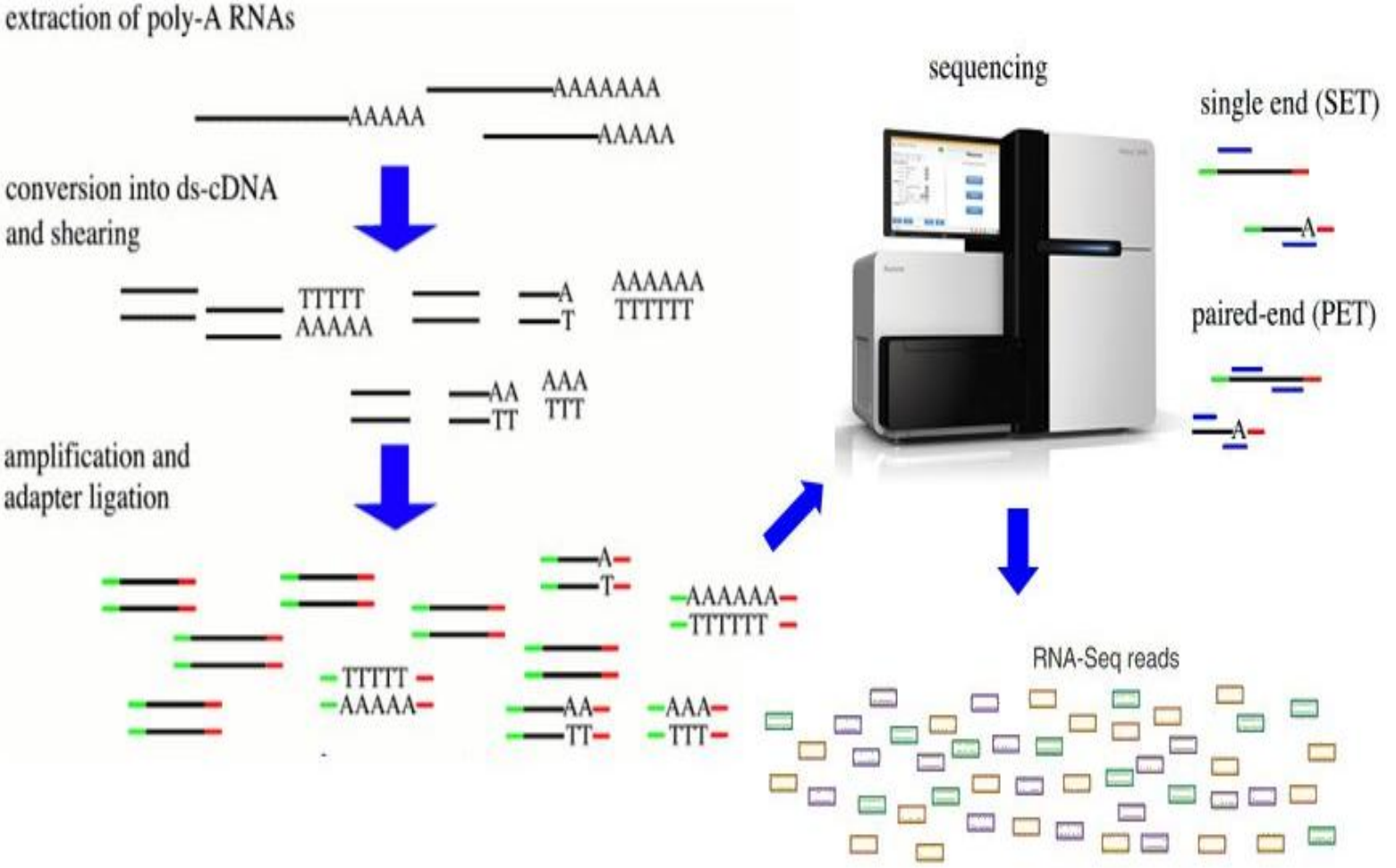
• Полезны при работе с немодельными организмами (особенно метаболомика).

• При необходимости можно скомбинировать информацию, полученную с разных функциональных уровней системы, создать компьютерную модель системы (системная биология в чистом виде) и использовать подходы биоинформатики для поиска биомаркеров радиационного воздействия в исследуемом объекте.

Транскриптомика

Транскриптомика изучает совокупность всех РНК в клетке. Транскриптом представляет собой набор всех молекул РНК, включая мРНК, рРНК, тРНК и другие некодирующие РНК, синтезируемый в данной клетке (ткани, организме, популяции) в данный момент времени.

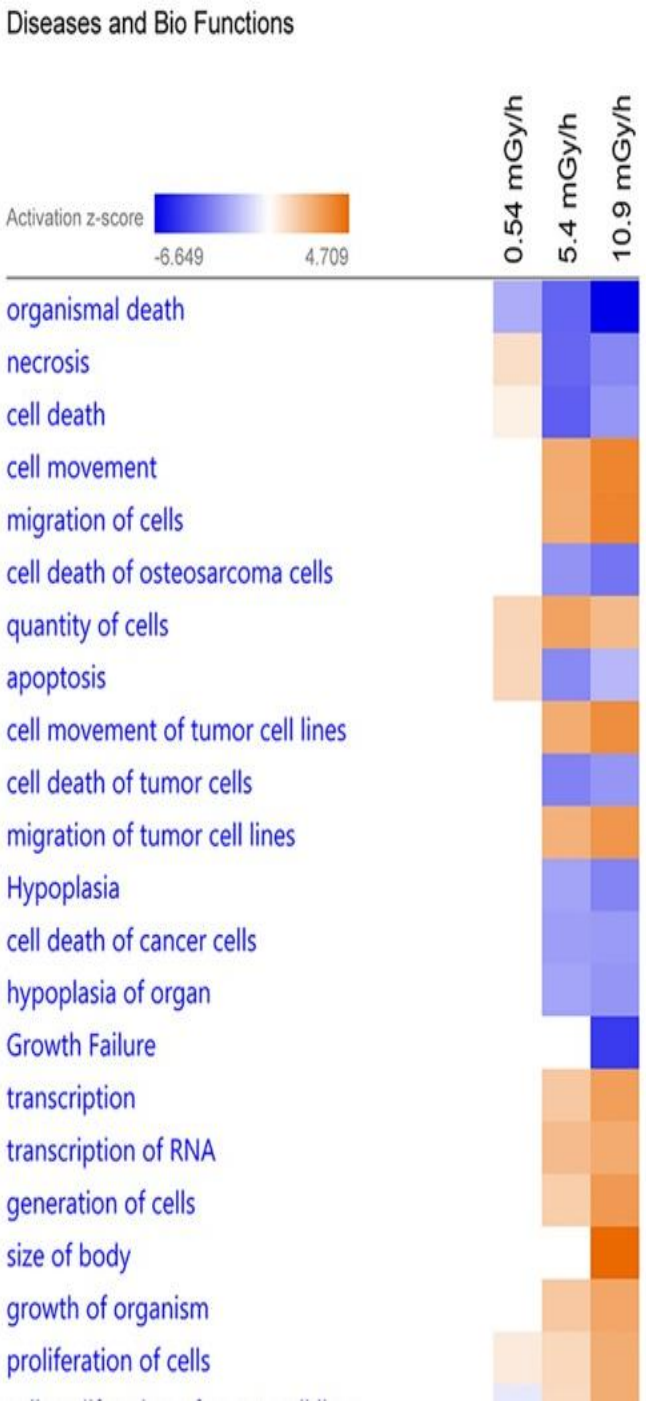
Transcriptome profiling using NGS



О чём может рассказать транскриптом?

GENEONTOLOGY
Unifying Biology

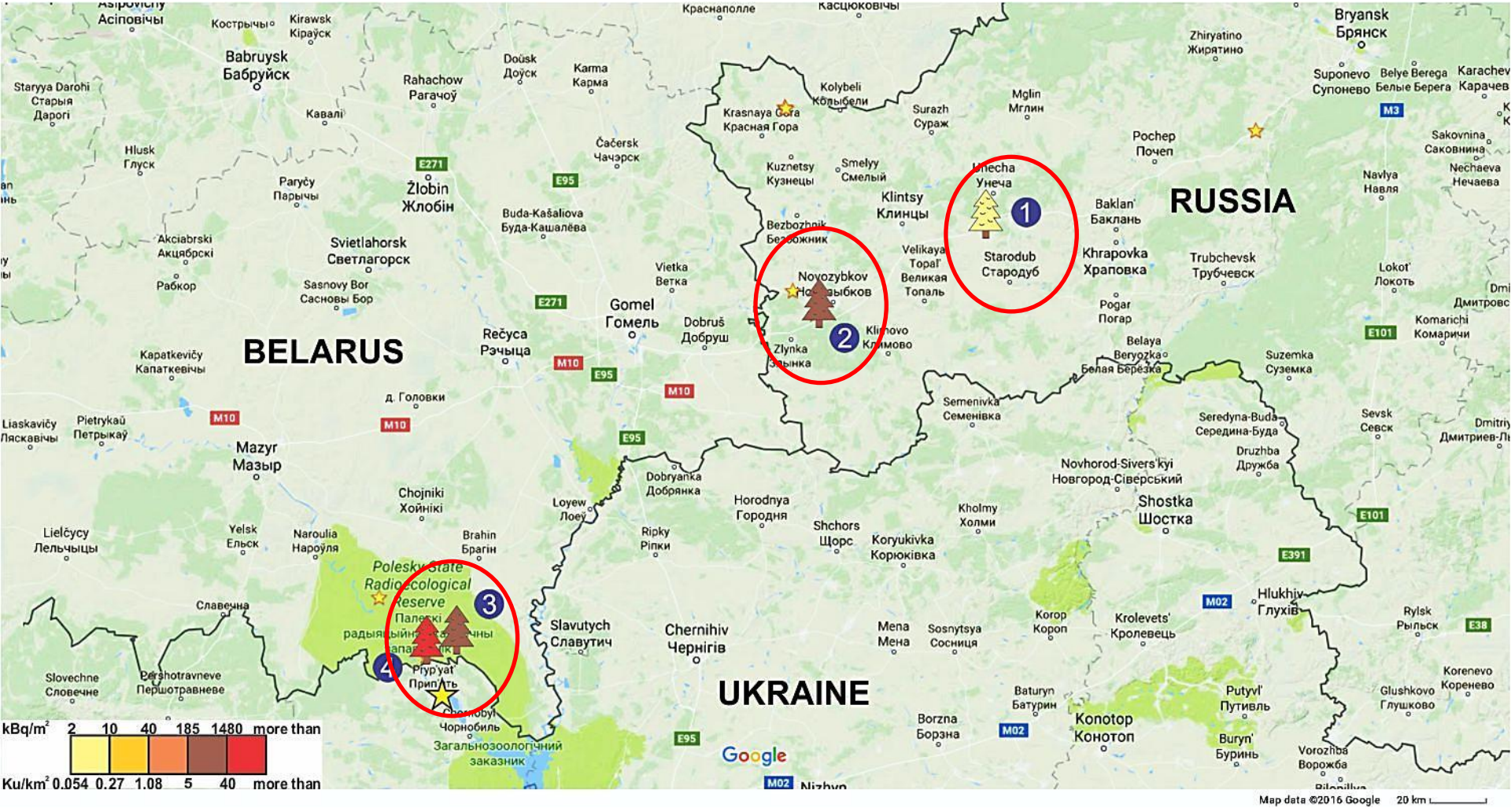
Молекулярная функция
Биологический процесс
Клеточный компартмент



Hurrem et al., 2017. Dose-dependent effects of gamma radiation on the early zebrafish development and gene expression

Сборка транскриптома *Pinus sylvestris*

⇨ *Хвоя с деревьев второго поколения (подвергшихся только хроническому облучению)*



Volkova *et al.*, 2017. *Sci Rep.* 7, 43009.

Сборка транскриптома немодельного организма

Pinus sylvestris

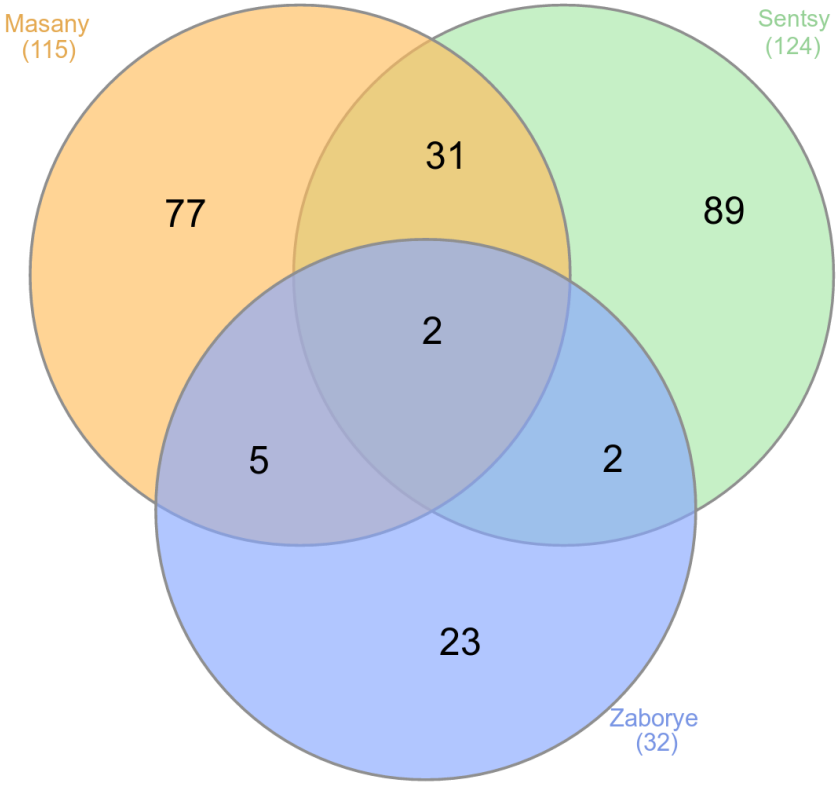
Чернобыльская авария

Дифференциальная экспрессия генов → Адаптация к стрессу

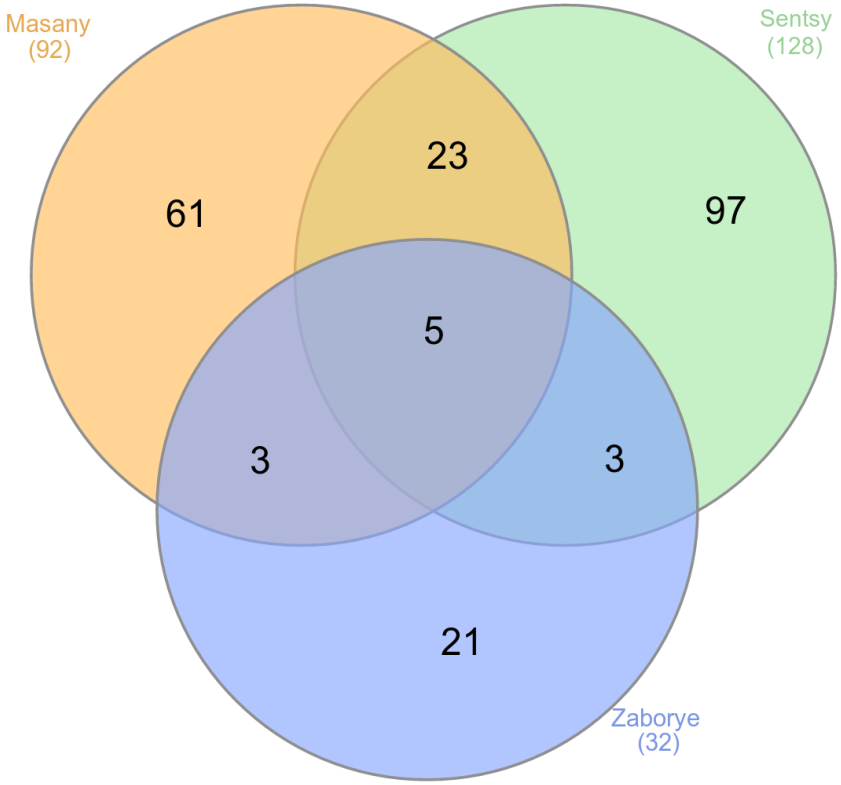
Образцы хвои

Выделение РНК

RNA-SEQ: Illumina HiSeq 2500



Гены с повышенной экспрессией



Гены с пониженной экспрессией

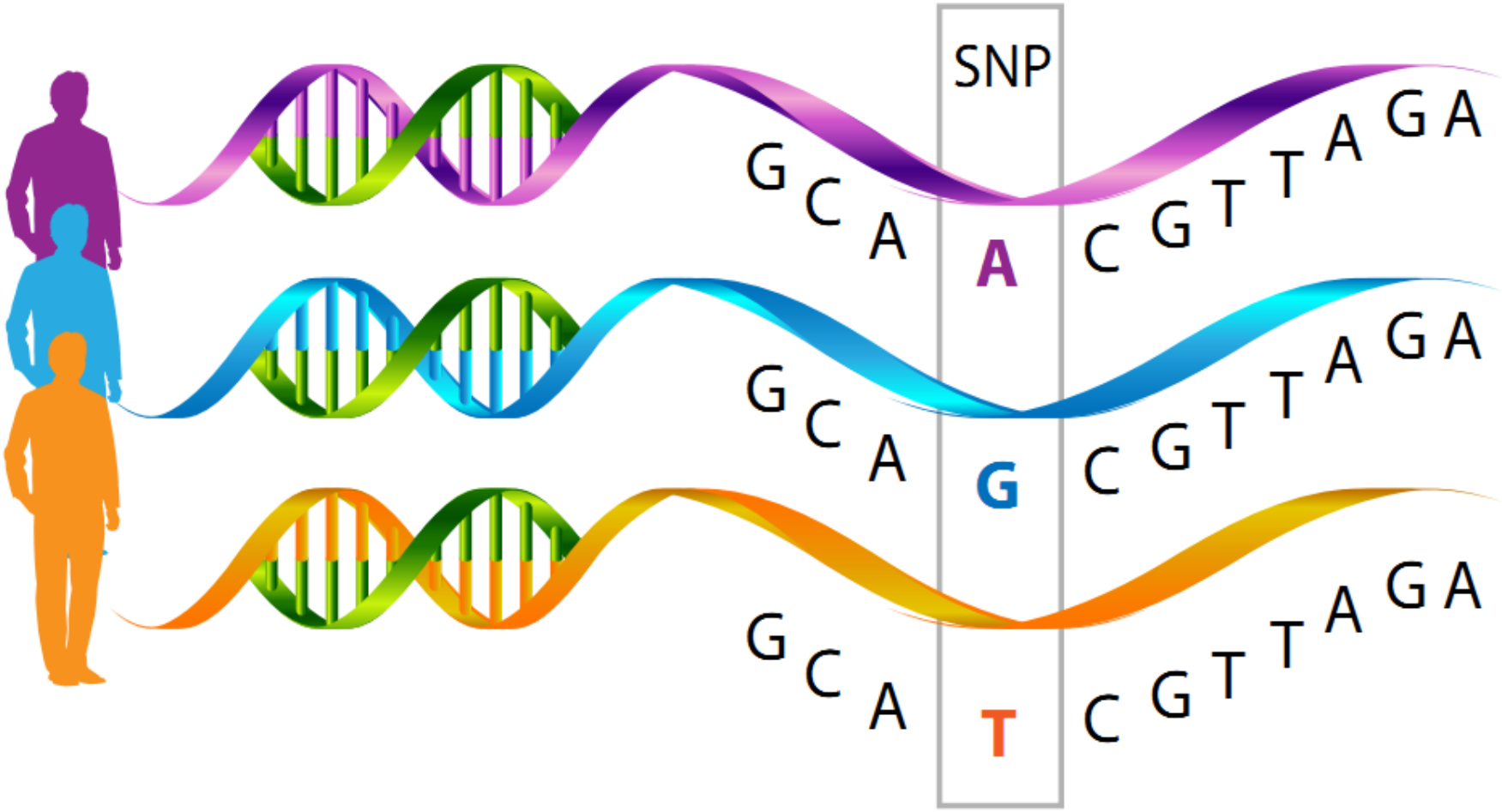
Гены, экспрессия которых регулируется схожим образом на разных участках

UniProt ID	Функция	Описание	log_2 FC		
			Мас	Кул	ЗК
WUN1_SOLTU	Апоптоз	Белок, индуцир. ранением 1	2.8	2.4	1.8
HY5_SOLLC	Фотоморфогенез	Транскрипц. фактор HY5	2.2	1.7	1.1
CIPK5_ORYSJ	Сигналинг абсцизовой кислоты	CBL-взаимод. протеинкиназа 20	-1.3	-2.3	-1.3
CIPKI_ORYSJ		CBL-взаимод. протеинкиназа 10	-3.2	-4.7	-1.9
SLAC1_ARATH	Закрытие устьиц	Анионный канал S-типа SLAC1	-1.6	-2.0	-1.7
P2B11_ARATH	Убиквитинирование белка	F-box белок PP2-B11	-4.0	-4.2	-3.1
-	Неизвестный белок	-	-2.0	-2.3	-1.5

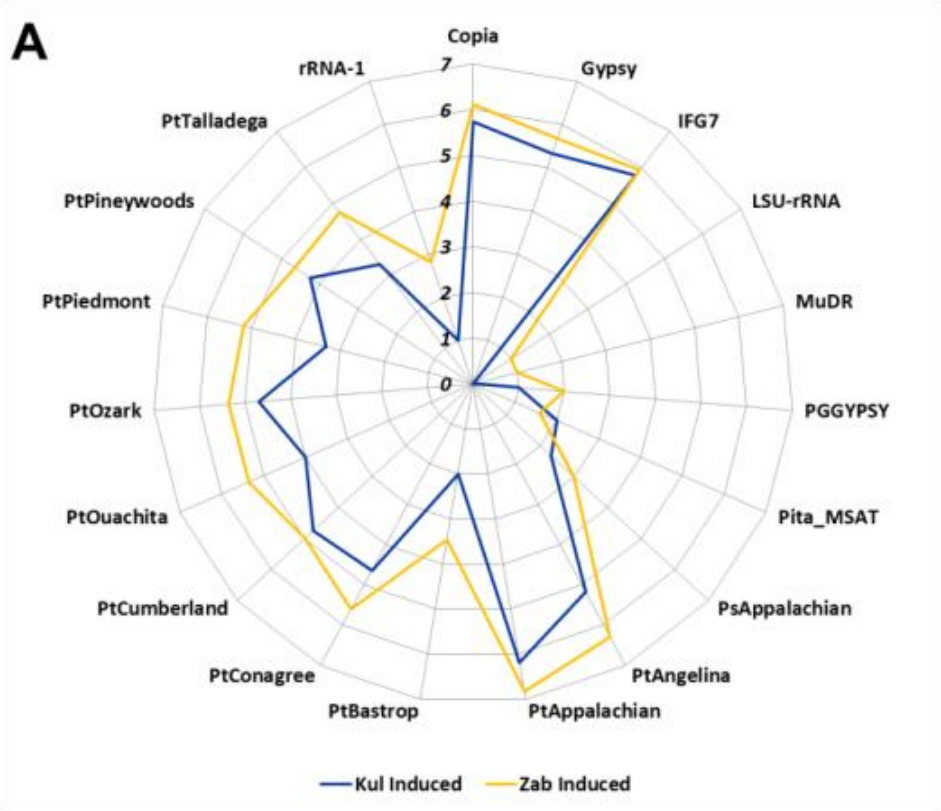
Относительные значения экспрессии приведены в виде порога изменения log2 по сравнению с контрольной популяцией

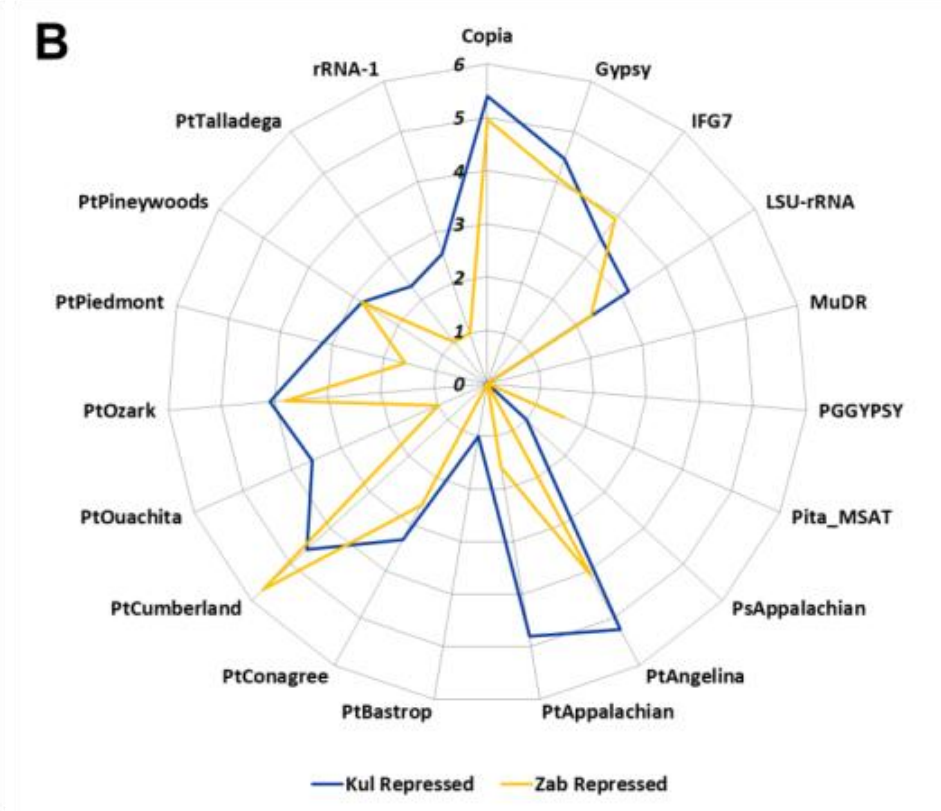
Duarte *et al*., 2019. EnvPoll. 250: 618-626.

Микроэволюционные процессы



Антиоксидантная система и окислительно-восстановительный гомеостаз

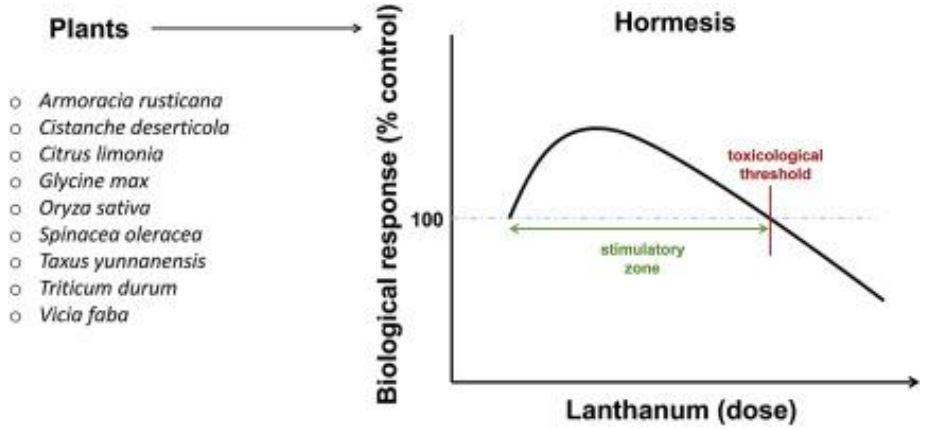




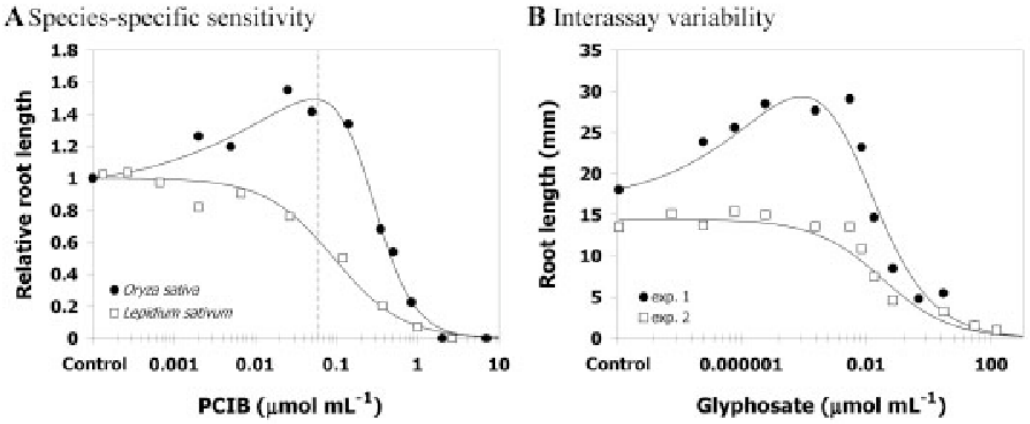
Относительная активность транспозонов в сильно- и слабозагрязнённой популяциях сосны. **(A)** Число представителей семейств транспозонов, индуцированных радиационным воздействием. **(B))** Число представителей семейств транспозонов, дезактивированных радиационным воздействием. Данные приведены в логарифмической шкале.

Duarte *et al*., 2019. EnvPoll. 250: 618-626.

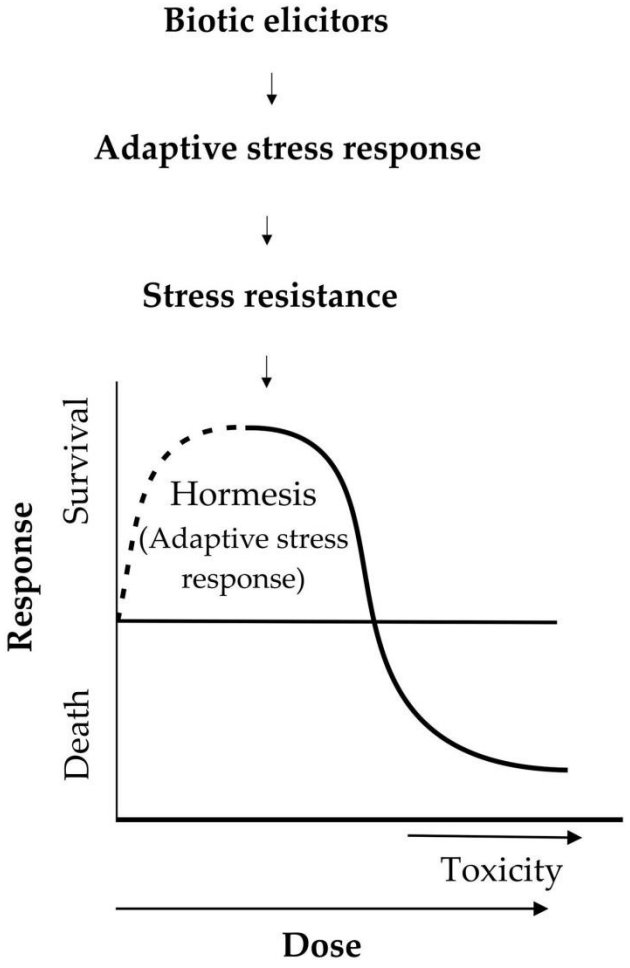
Гормезис



Agathokleous et al., 2018

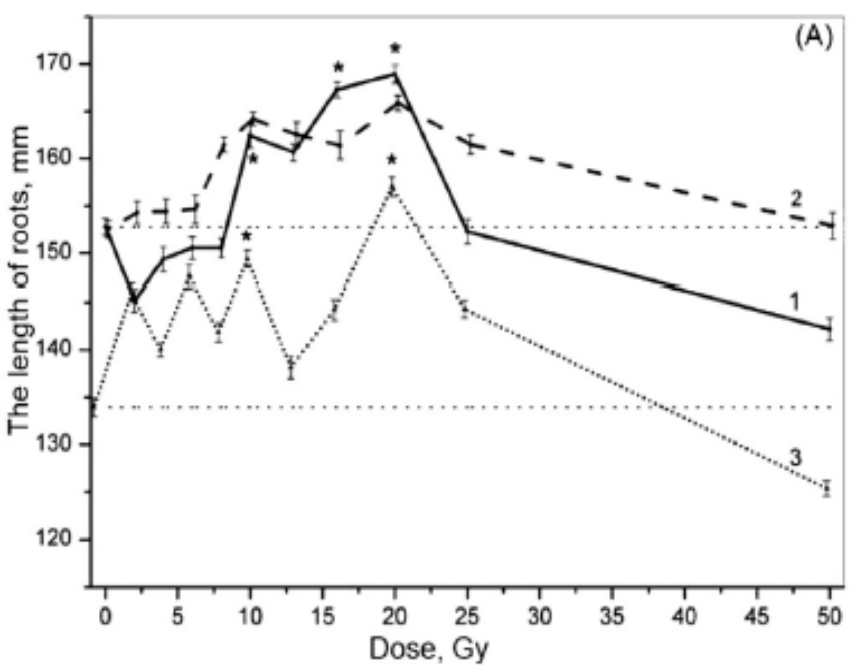


Belz, Duke, 2014



Vargas-Hernandez et al., 2017

Гамма-облучение семян ячменя ведёт к увеличению длины корней и побегов растений



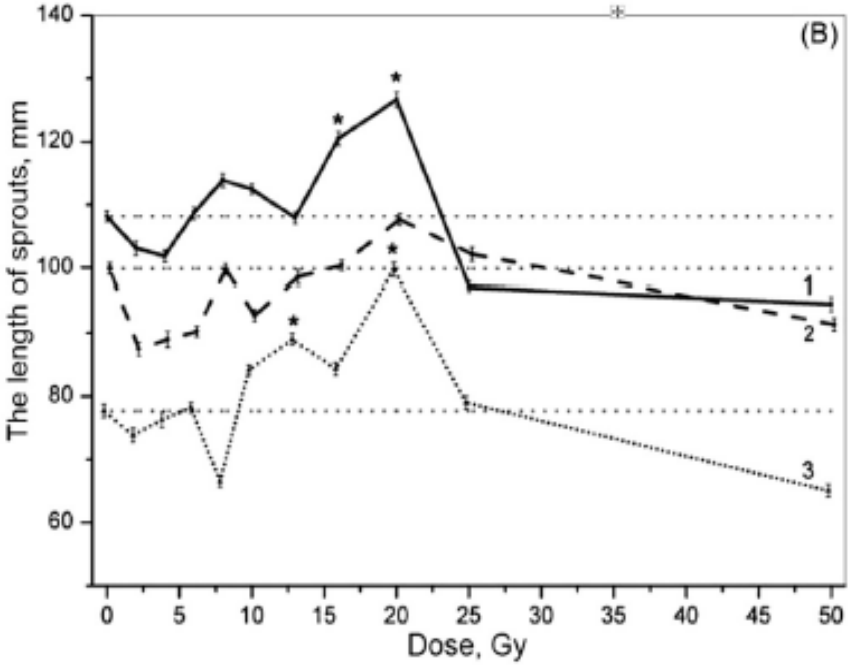
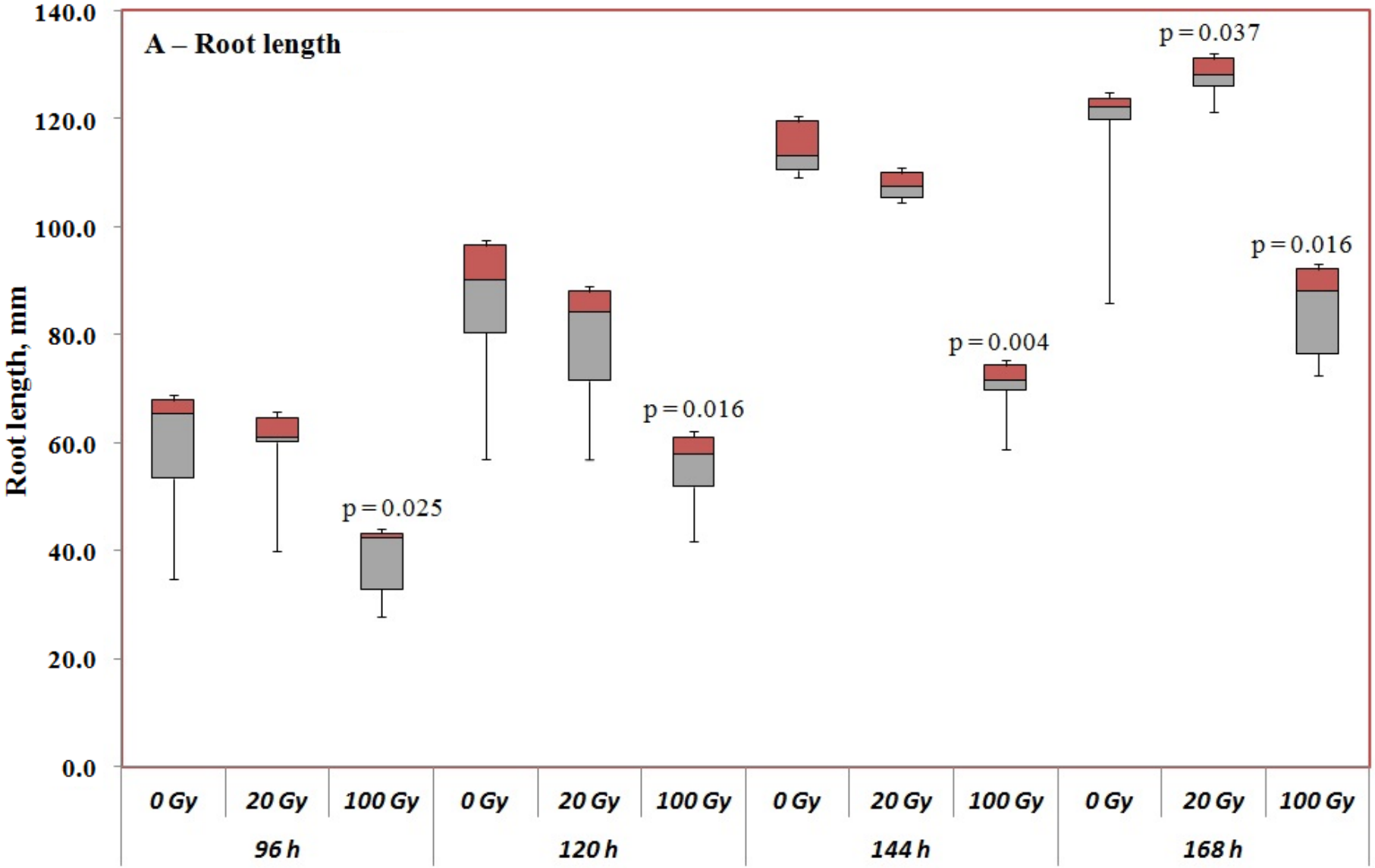
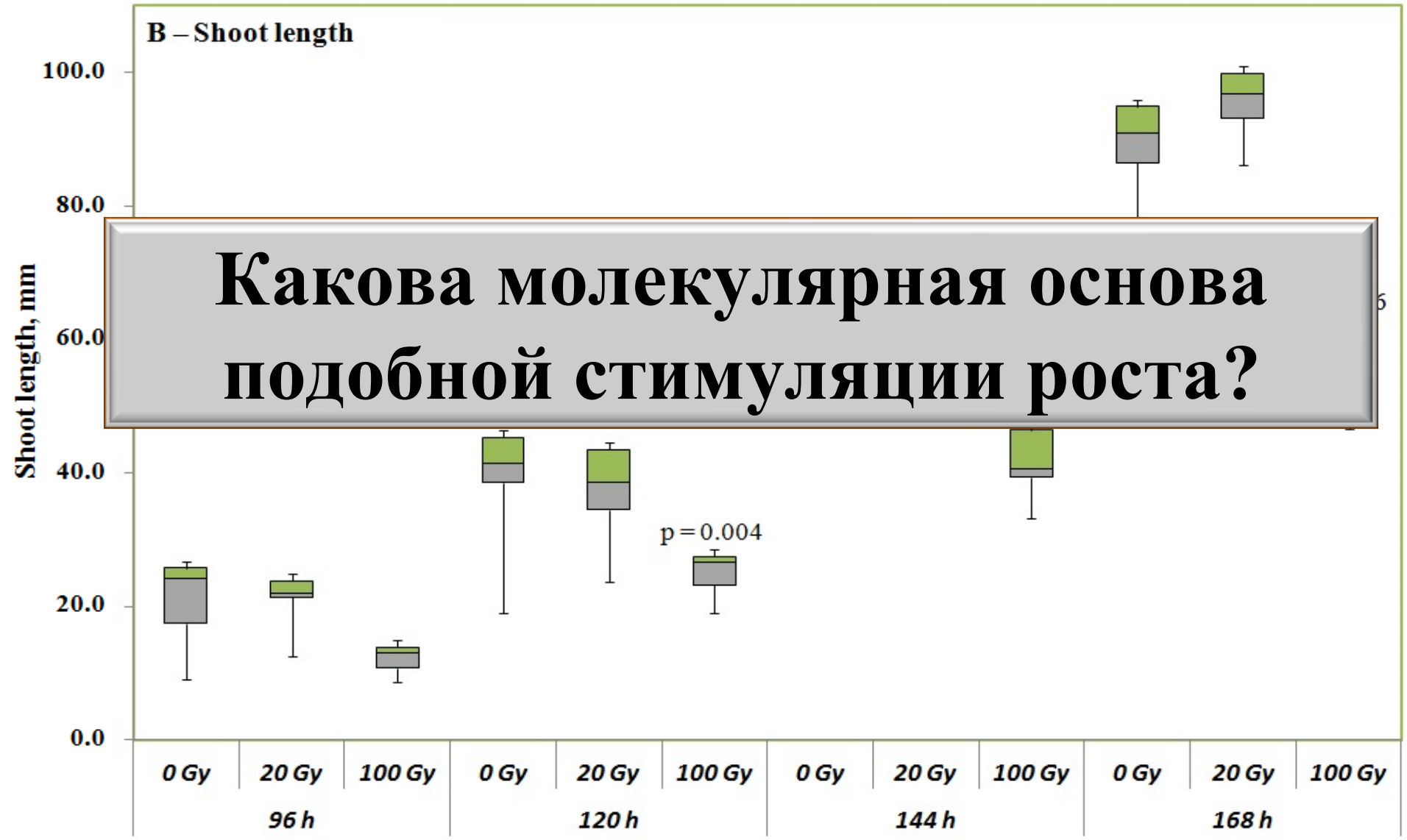


Fig. 1. The root (A) and sprout length (B) depending on γ-radiation dose (dose rate of 60 Gy/h). 1 -Nur; 2-Nur; 3– Grace; ..... - control. *- significant difference ($p < 0.05$) from the control level. Means of four replicates of 400 seeds for each dose ± SE.

Geras'kin *et al*., 2017. J. Env. Radioact. 171: 71-83.

Выраженный стимулирующий эффект возникает на более поздних стадиях онтогенеза



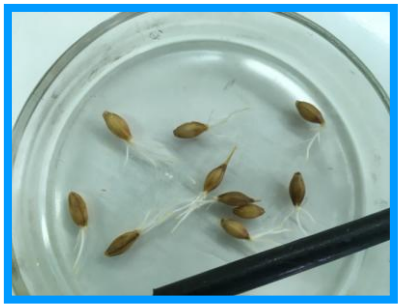


Какова молекулярная основа подобной стимуляции роста?

Схема эксперимента по изучению профиля экспрессии генов на ДНК-микрочипах

	20 Гр, 2 ч	20 Гр, 24 ч	20 Гр, 48 ч	100 Гр, 24 ч
Контроль, 2 ч	+			
Контроль, 24 ч		+		+
Контроль, 48 ч			+	

4plex_Barley array, AMADID 021623, Agilent Technologies, Inc.



Обогащение терминами GO (Биологический Процесс) через 48 часов прорастания после облучения семян в дозе 20 Гр. Выявлена сильная супрессия процессов фотосинтеза.

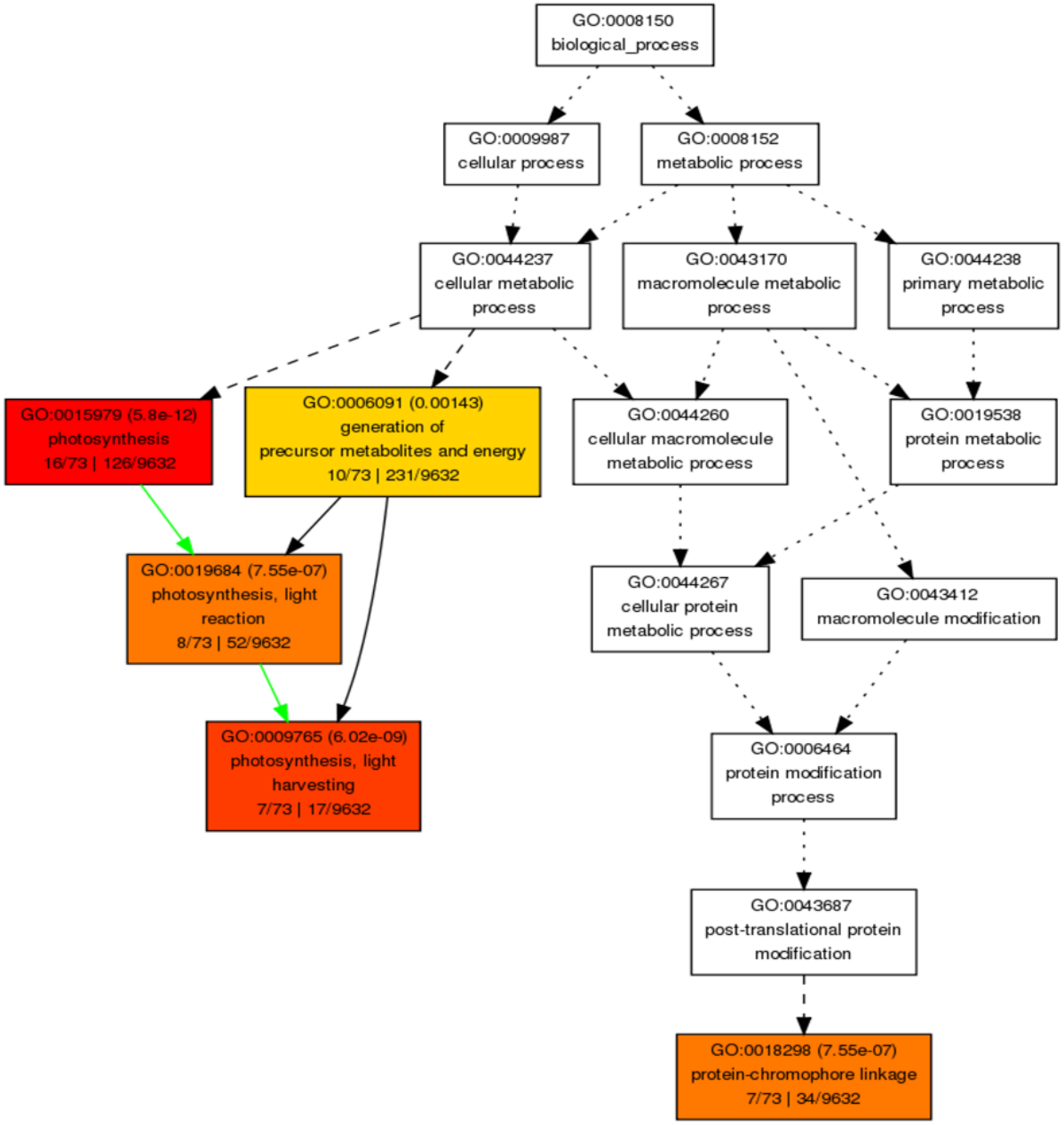
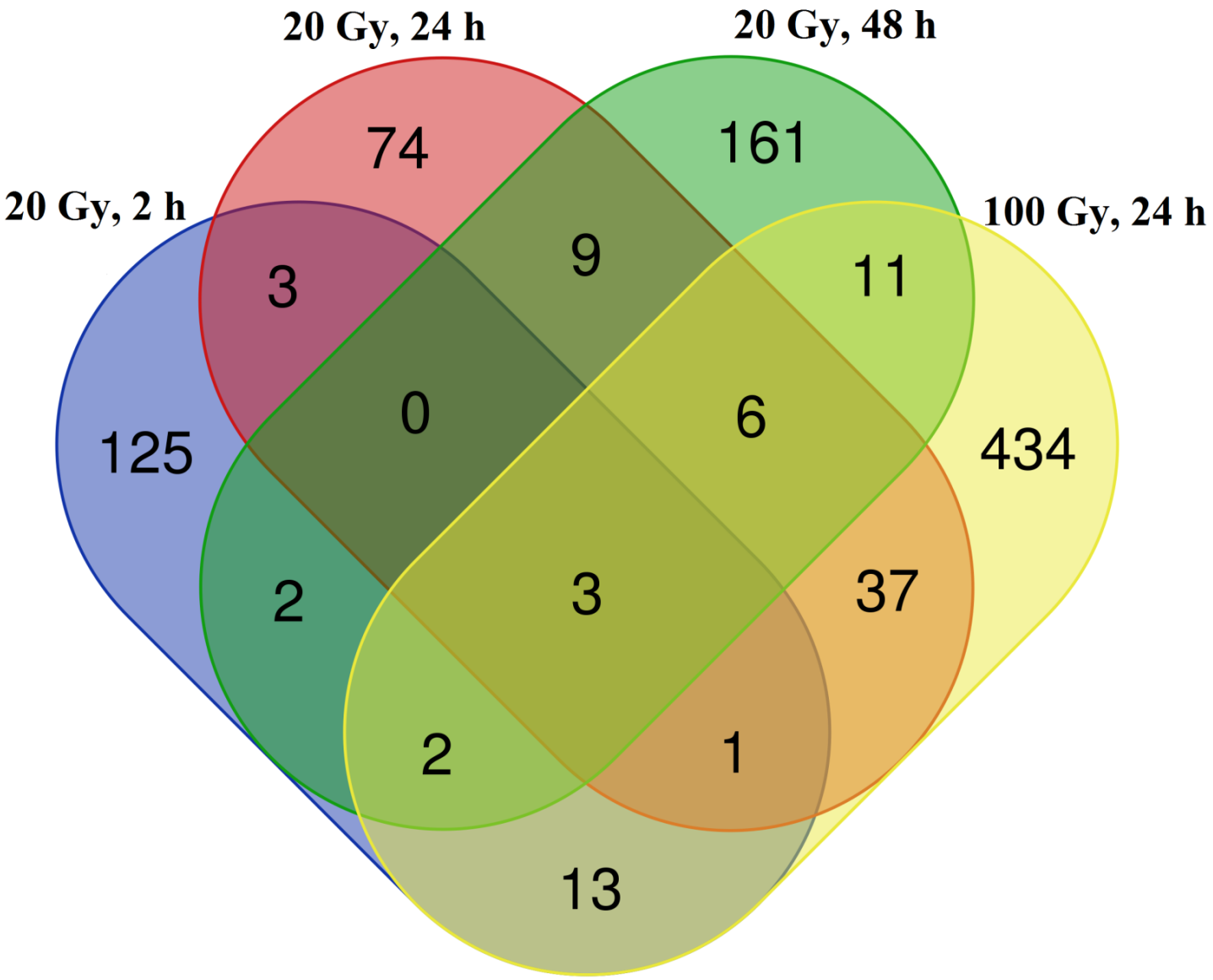


Диаграмма Венна для дифференциально экспрессирующихся генов



Облучение в стимулирующих дозах влияет на метаболизм лигнина и других компонентов клеточной стенки, а также вторичных метаболитов

Uniprot ID	Условие				Описание
	20 Гр, 2 ч	20 Гр, 24 ч	20 Гр, 48 ч	100 Гр, 24 ч	
Клеточная стенка, лигнин, вторичные метаболиты					
FDFT_NICBE					Squalene synthase
FOMT2_WHEAT					Tricetin 3',4',5'-O-trimethyltransferase
DIR1_ARATH					Dirigent protein 1
RIP6_ORYSJ					Putative ripening-related protein 6
GT7_ORYSJ					Probable glycosyltransferase 7
CCDP_MAIZE					Cortical cell-delineating protein
ERLI1_ARATH					Lipid transfer protein EARLI 1
XTH16_ARATH					Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein

Облучение в высокой дозе вызывает выраженный транскрипционный ответ на повреждения ДНК и запуск систем репарации

Повреждение ДНК, репарация ДНК, репликация					
K7UBM9_MAIZE					DNA replication complex GINS protein PSF3
MCM2_ORYSI					DNA replication licensing factor MCM2
MCM4_ORYSJ					DNA replication licensing factor MCM4
DDI1_ARATH					DNA damage-inducible protein 1
DDB1_ORYSJ					DNA damage-binding protein 1
A0A2U1P799_ARTAN					NADH-ubiquinone reductase complex 1 MLRQ subunit
PARP2_MAIZE					Poly [ADP-ribose] polymerase 2
RPB2_SOLLC					DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2
R51A2_MAIZE					DNA repair protein RAD51 homolog B
RAD16_YEAST					DNA repair protein RAD16
MCM2_ORYSI					DNA replication licensing factor MCM2
PDS5_SCHPO					Sister chromatid cohesion protein pds5
RFC1_DROME					Replication factor C subunit 1
TOP2_ARATH					DNA topoisomerase 2
NAC8_ARATH					SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1

Меняется экспрессия компонентов антиоксидантной системы и модуляторов концентраций АФК в клетке

АФК, антиоксидантная система, окислительно-восстановительный гомеостаз					
GSTU1_ORYSJ					Probable glutathione S-transferase GSTU1
MTEFH_ARATH					Transcription termination factor MTEF18, mitochondrial
PV42B_ARATH					SNF1-related protein kinase regulatory subunit gamma-like
GSTX1_TOBAC					Probable glutathione S-transferase
GSTU1_ORYSJ					Probable glutathione S-transferase GSTU1
GSTU6_ORYSJ					Probable glutathione S-transferase GSTU6
PER1_ORYSJ					Peroxidase 1
PER9_ARATH					Peroxidase 9
PER2_MAIZE					Peroxidase 2
PER15_IPOBA					Peroxidase 15
SRC2_ARATH					Protein SRC2 homolog
NQR1_ORYSJ					Probable NADPH:quinone oxidoreductase 1
C7D55_HYOMU					Premnaspirodiene oxygenase
ASMT1_ORYSJ					Acetylserotonin O-methyltransferase 1
PER2_ORYSJ					Peroxidase 2
POP3_ARATH					Stress-response A/B barrel domain-containing protein HS1
LRK92_ARATH					L-type lectin-domain containing receptor kinase IX.2

Белки позднего эмбриогенеза реагируют на облучение, при этом в первые 24 часа после облучения экспрессия их генов снижена, а через 48 часов – индуцирована.

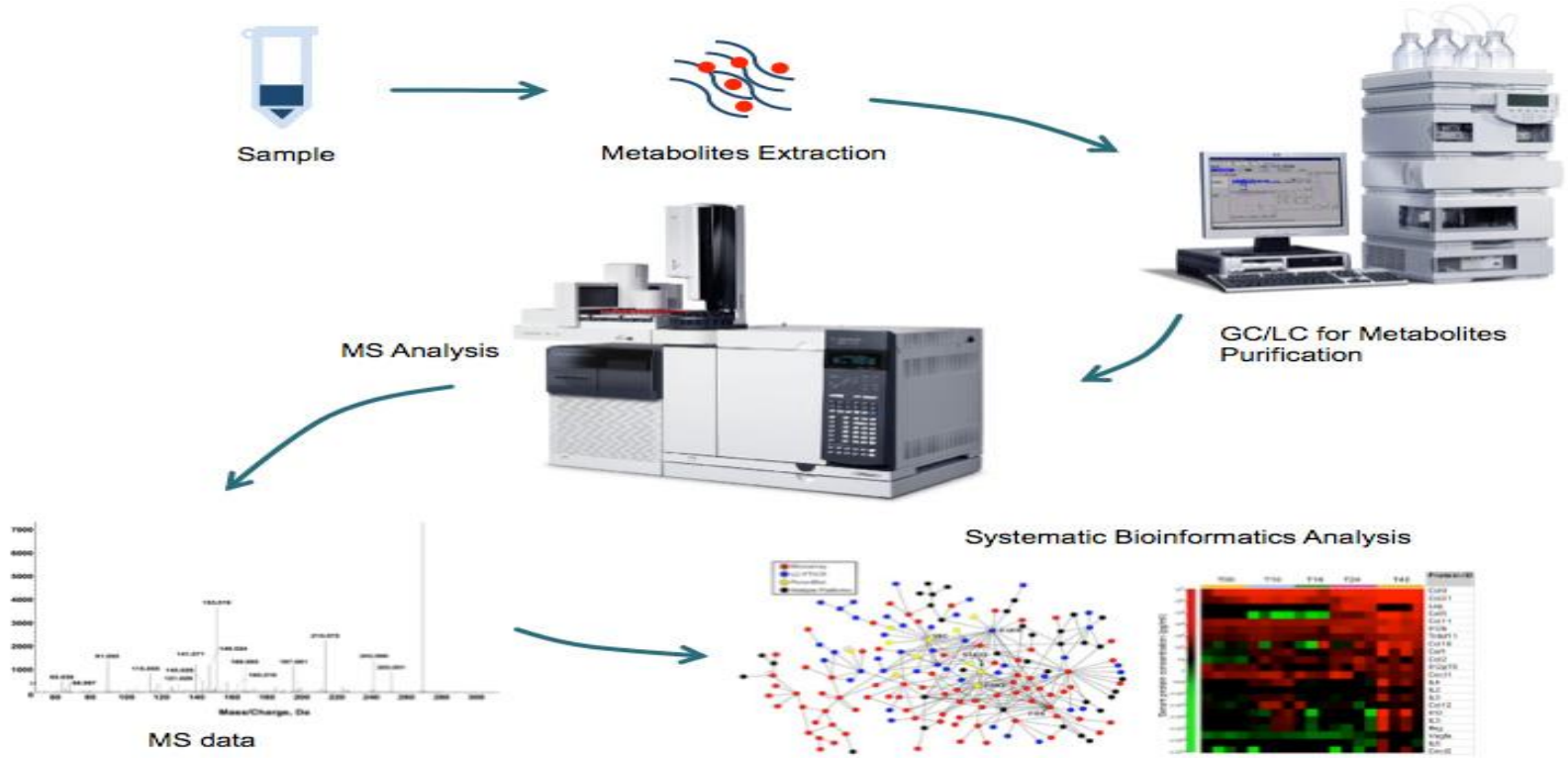
Белки позднего эмбриогенеза (Late embryogenesis abundant proteins)					
LEA14_ORYSJ					Late embryogenesis abundant protein 14
LEA6_ARATH					Late embryogenesis abundant protein 6
LEA18_ARATH					Late embryogenesis abundant protein 18
LEA31_ARATH					Late embryogenesis abundant protein 31
Q68HV3_ORYSJ					Late embryogenesis abundant protein 12

Выявлена дифференциальная экспрессия генов, связанных с сигналингом фитогормонов

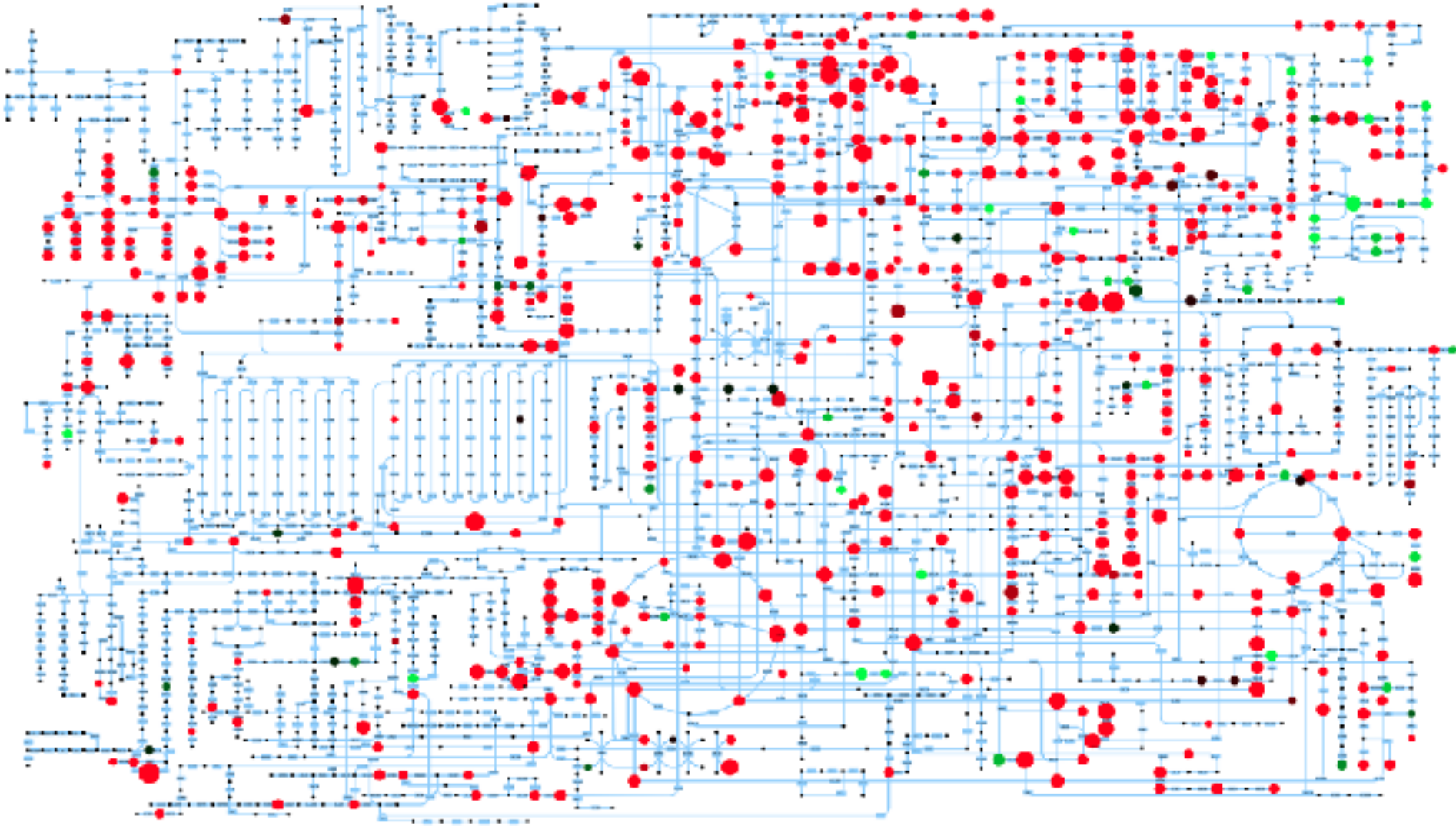
Фитогормоны					
JI23_HORVU					23 kDa jasmonate-induced protein
Q43490_HORVU					Jasmonate induced protein
DIOX6_ARATH					Probable 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase
OPR1_ORYSJ					12-oxophytodienoate reductase 1
C74A2_ORYSJ					Allene oxide synthase 2
ASR1_SOLLC					Abscisic stress-ripening protein 1
DHN4_HORVU					Dehydrin DHN4
40G3_ORYSJ					Ricin B-like lectin R40G3
PM19L_ORYSJ					Membrane protein PM19L
ATP1_ARATH					Probable pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase, chloropl.
ORR22_ORYSI					Two-component response regulator ORR22
ENO1_MAIZE					Enolase 1

Метаболомика

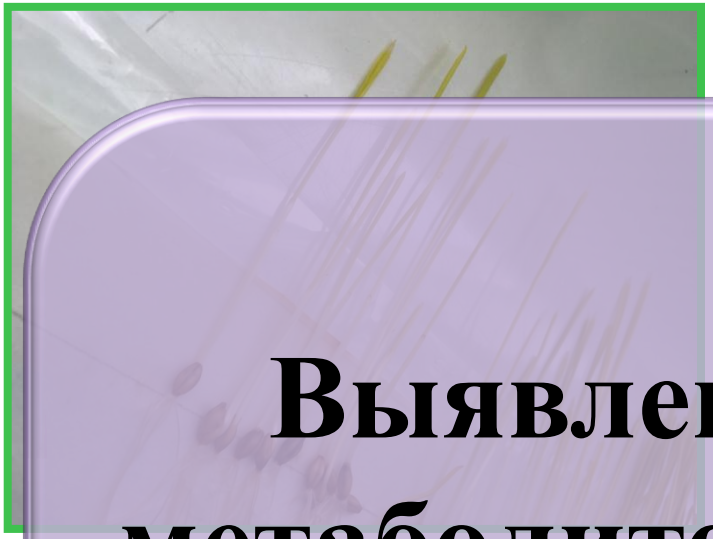
Метаболомика изучает совокупность всех метаболитов в клетке, ткани, органе или организме в данный момент времени и их взаимодействия с другими функциональными уровнями живого. Метаболом представляет собой совокупность всех метаболитов, являющихся конечным продуктом обмена веществ в клетке, ткани, органе или организме.



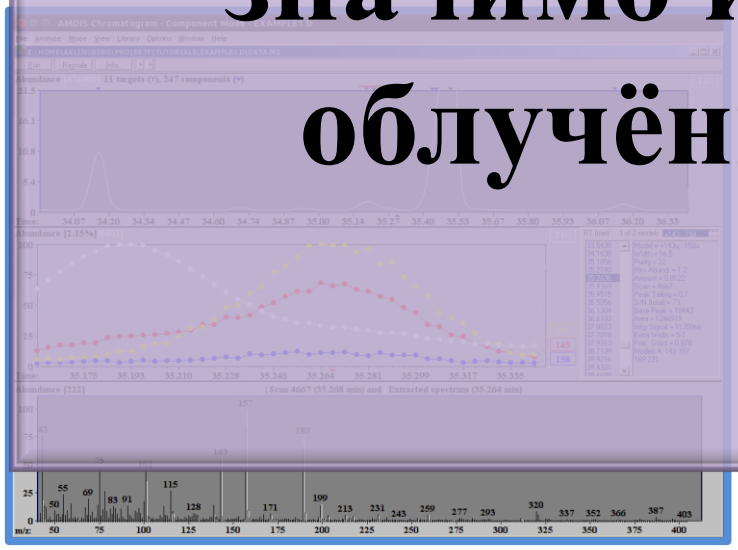
Метаболомика

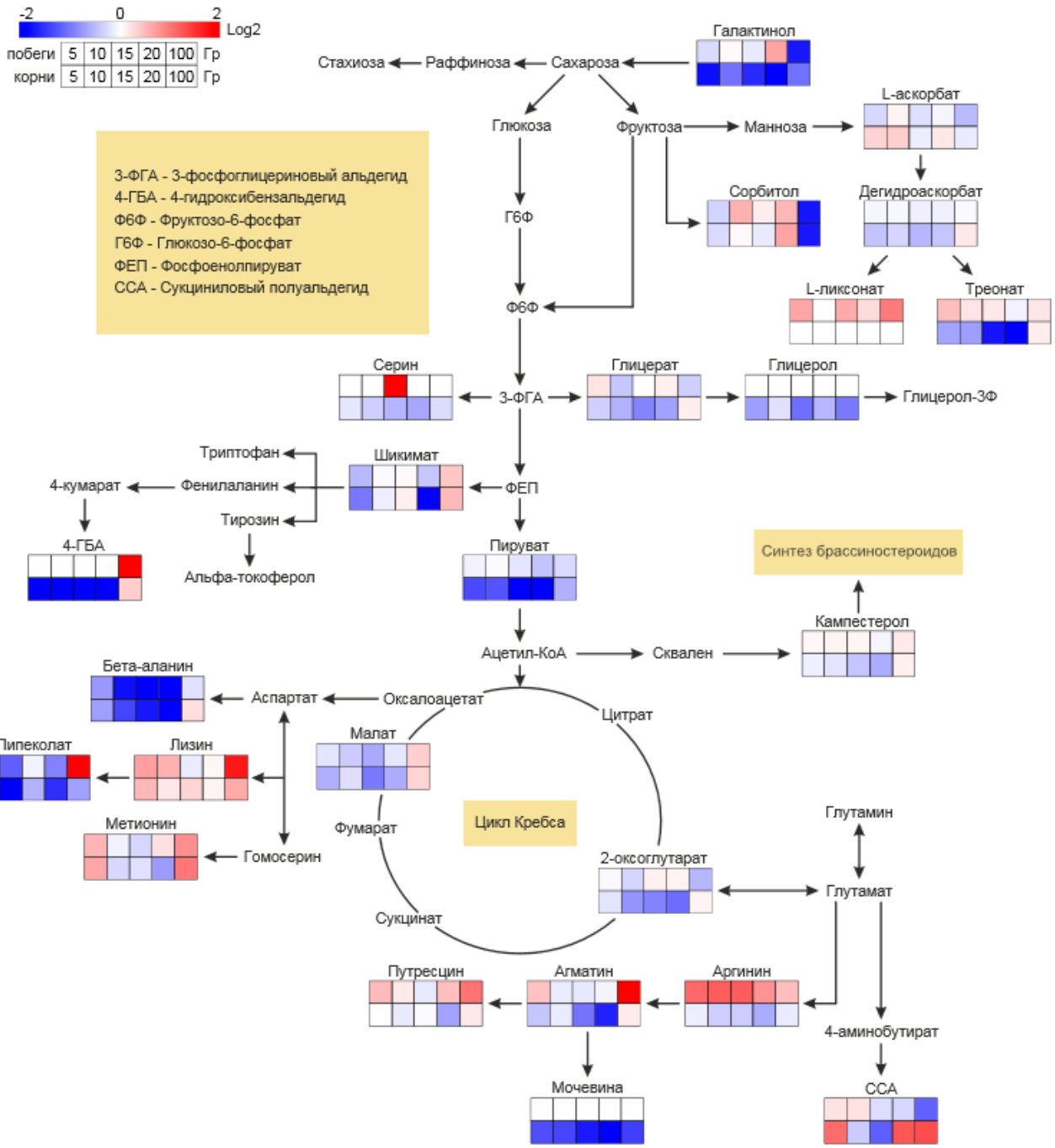


http://www.imsb.ethz.ch



Выявлено около тысячи метаболитов, из них выбраны значимо изменяющиеся в облучённых растениях




-2
0
2
Log2
побеги 5 10 15 20 100 Гр
корни 5 10 15 20 100 Гр
3-ФГА - 3-фосфоглицериновый альдегид
4-ГБА - 4-гидроксибензальдегид
Ф6Ф - Фруктозо-6-фосфат
Г6Ф - Глюкозо-6-фосфат
ФЕП - Фосфоенолпируват
ССА - Сукциниловый полуальдегид
Галактинол
Стахиоза
Раффиноза
Сахароза
Глюкоза
Фруктоза
Манноза
L-аскорбат
Сорбитол
Дегидроаскорбат
Г6Ф
L-ликсонат
Треонат
Ф6Ф
Серин
3-ФГА
Глицерат
Глицерол
Глицерол-3Ф
Триптофан
Шикимат
4-кумарат
Фенилаланин
ФЕП
Тирозин
4-ГБА
Альфа-токоферол
Пируват
Синтез брассиностероидов
Кампестерол
Ацетил-КоА
Сквален
Бета-аланин
Аспартат
Оксалоацетат
Цитрат
Малат
Пипеколат
Лизин
Фумарат
Цикл Кребса
Глутамин
Метионин
Гомосерин
2-оксоглутарат
Глутамат
Сукцинат
Путресцин
Агматин
Аргинин
4-аминобутират
Мочевина
ССА

Take-home идеи:

• Омикс-технологии позволяют проводить быстрый скрининг в поисках молекулярных путей, связанных с ответом на облучение (и любой другой стрессор).

• Омикс-технологии позволяют получить срезы информации с разных функциональных уровней системы в определённый момент времени и интегрировать их при помощи системной биологии.

•Стремительное удешевление омикс-технологий делает их обязательным инструментом любого молекулярного биолога и биохимика, а также предлагает новые подходы к получению и анализу данных во всех областях биологических наук, включая радиобиологию и радиоэкологию.

Благодарю за внимание!

Волкова П.Ю.,
заведующая лабораторией № 8 ФГБНУ ВНИИРАЭ
volkova.obninsk@gmail.com