

PHÂN TÍCH VAI TRÒ CỦA GỐC METHIONINE TRONG CẤU TRÚC HỌ NHÂN TỐ PHIÊN MÃ Ở ĐẬU TƯƠNG

Chu Đức Hà¹, Lê Minh Tuấn^{1,2}, Phạm Phương Thu², Phạm Thị Lý Thu¹, Phạm Thị Xuân³, La Việt Hồng², Phạm Xuân Hội¹

TÓM TẮT

Methionine (Met) là một axit amin đóng vai trò thiết yếu ở thực vật. Các gốc Met cấu trúc được giả thuyết là bảo vệ protein chống lại bất lợi ôxi hóa nội bào. Trong nghiên cứu này, 21 phân tử protein giàu Met, thuộc ba nhóm nhân tố phiên mã (TF) lần lượt là ‘Basic helix-loop-helix’ (bHLH), ‘Basic leucine zipper’ (bZIP) và ‘Serum response factor’ (SRF) ở đậu tương (*Glycine max*) đã được phân tích nhằm chứng tỏ giả thuyết trên. Kết quả phân tích đã đưa ra 15 MRP có sự phân bố dày đặc của gốc Met trên hai khoảng ngoại biên quanh vùng bảo thủ. Phân tích tin sinh học cho thấy các TF đều ưa nước và hầu như không bền vững trong ống nghiệm. Trong đó, một số TF có thể phân bố trong tế bào chất, ty thể hoặc trên hệ thống bao gói. Dựa trên dữ liệu biểu hiện trong điều kiện thường, phần lớn các gen mã hóa họ bHLH và bZIP đều có xu hướng tăng cường biểu hiện ở ít nhất một cơ quan chính. Phân tích dữ liệu RNA-Seq cho thấy, một số gen mã hóa họ bHLH và SRF có mức độ phiên mã đáp ứng, trong khi các gen mã hóa họ bZIP có đáp ứng tăng ở rễ đậu tương xử lý mặn.

Từ khóa: Bất lợi, đậu tương, Methionine, nhân tố phiên mã, tin sinh học

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dưới tác động của ngoại cảnh bất lợi, sự dư thừa của một số dạng chứa ôxi nguyên tử hoạt động đã gây ra những tổn thương đến các đại phân tử, ảnh hưởng tiêu cực đến sinh trưởng và phát triển của thực vật. Khoảng 68% đại phân tử bị tác động là protein. Trong đó, gốc Methionine (Met) trên protein rất dễ bị ôxi hóa, làm biến đổi cấu trúc dẫn đến thay đổi hoặc gây mất chức năng của protein (Kim *et al.*, 2014). Đây là một axit amin đóng vai trò thiết yếu trong đời sống của thực vật, tham gia vào con đường Yang, liên quan đến nhiều chu trình nội bào quan trọng như hình thành màng tế bào, tổng hợp diệp lục và củng cố thành tế bào. Giả thuyết đặt ra là, liệu rằng các gốc Met cấu trúc có thực sự tham gia vào cơ chế bảo vệ cấu trúc để duy trì chức năng của phân tử protein trong điều kiện bất lợi hay không?

Gần đây, 213 phân tử protein giàu Met (Met-rich protein, MRP) đã được sàng lọc ở đậu tương (*Glycine max*) (Chu *et al.*, 2016). Các MRP này đã được xác định tham gia vào nhiều quá trình quan trọng trong

tế bào, trong đó, 20% MRP liên quan đến điều hòa phiên mã ở đậu tương (Chu *et al.*, 2016). Như đã biết, nhân tố phiên mã (TF) là họ protein tham gia điều hòa sự biểu hiện của gen, vì vậy liên quan đến cơ chế đáp ứng và khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi.

Trong nghiên cứu này, 3 nhóm TF giàu Met cơ bản ở đậu tương, bao gồm ‘Basic helix-loop-helix’ (bHLH), ‘Basic leucine zipper’ (bZIP) và ‘Serum response factor’ (SRF) đã được khai thác để chứng minh giả thuyết về vai trò của Met liên quan đến cơ chế đáp ứng. Đặc tính lý hóa học của protein và khảo sát sự phân bố của các gốc Met trên phân tử đã được xem xét. Mức độ biểu hiện của gen mã hóa các TF được phân tích tại một số cơ quan chính trên đậu tương. Kết quả của nghiên cứu này có thể cung cấp dẫn liệu quan trọng về vai trò của gốc Met liên quan đến chống chịu bất lợi ở đậu tương.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Bảng 1. Thông tin về các TF giàu Met khai thác trong nghiên cứu này (Chu *et al.*, 2016)

TT	Mã định danh	TF	TT	Mã định danh	TF	TT	Mã định danh	TF
01	Glyma01g15930	bHLH	08	Glyma10g04890	bHLH	15	Glyma10g40080	SRF
02	Glyma02g00980		09	Glyma11g17120		16	Glyma11g26260	
03	Glyma03g04000		10	Glyma13g19250		17	Glyma11g30490	
04	Glyma03g32740		11	Glyma20g22280		18	Glyma11g30620	
05	Glyma04g04190		12	Glyma02g01600	19	Glyma18g05930		
06	Glyma05g19920		13	Glyma05g28960	20	Glyma18g05960		
07	Glyma06g04380		14	Glyma08g12170	21	Glyma20g27320		

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp; ² Khoa Sinh - Kỹ thuật nông nghiệp, Đại học Sư phạm Hà Nội 2

³ Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Trình tự protein và mã định danh của 21 TF giàu Met, bao gồm nhóm bHLH, bZIP và SRF được khai thác từ nghiên cứu trước đây (Chu *et al.*, 2016) (Bảng 1).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp phân tích vùng bảo thủ của protein: Các TF được kiểm tra vùng bảo thủ bằng MEGA (Kumar *et al.*, 2016). Trình tự ngoại biên từ đầu 3' và 5' đến vị trí vùng bảo thủ được tách biệt để xác định sự phân bố gốc Met bằng BioEDIT (Hall, 1999).

- Phương pháp xác định đặc tính lý hóa của protein: Trình tự axit amin được phân tích trên ExPASy ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2003) để đánh giá các đặc tính lý hóa của protein. Một số chỉ tiêu được quan tâm, bao gồm điểm đẳng điện (pI), chỉ số bất ổn định (II), độ ưa nước (GRAVY).

- Phương pháp dự đoán vị trí phân bố nội bào của protein: Trình tự axit amin (.fasta) của các TF được sử dụng để tìm kiếm vị trí cư trú trong tế bào thông qua TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2007). Trong đó, mức độ tin cậy của thuật toán được xác định theo thang điểm 5 (Emanuelsson *et al.*, 2007).

- Phương pháp phân tích in silico mức độ biểu hiện gen trong điều kiện thường: Mức độ phiên mã của gen mã hóa các TF được xác định trong điều kiện thường dựa trên dữ liệu microarray đã công bố (Libault *et al.*, 2010). Trong đó, chín mẫu mô, bao gồm lông rể thu ở 84 và 120 h sau nảy mầm (RH 84 HAS, RH 120 HAS), nốt sần (N), mô phân sinh đỉnh

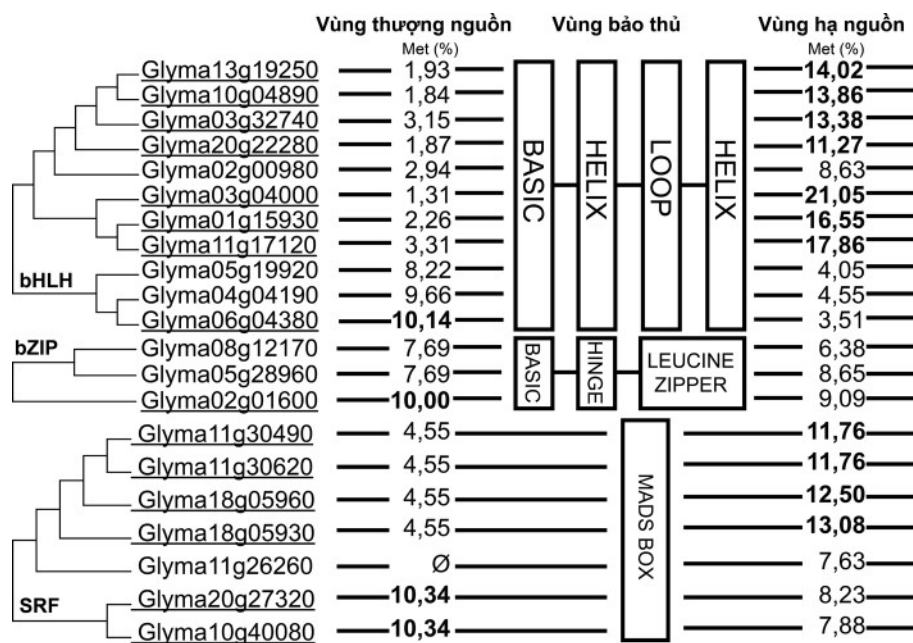
chồi (SAM), hoa (F), vỏ quả xanh (GP), lá (L), rể (R), chóp rể (RT) được khai thác và phân tích (Libault *et al.*, 2010). Mã định danh được truy vấn trên dữ liệu microarray để tìm kiếm biểu hiện của gen tương ứng ở các mô trong điều kiện thường.

- Phương pháp phân tích in silico mức độ biểu hiện gen trong điều kiện bất lợi: Mức độ phiên mã của gen mã hóa TF trong điều kiện mặn được khai thác trên dữ liệu RNA-Seq gần đây (GSE57252) (Belamkar *et al.*, 2014). Trong đó, mẫu rể xử lý với dung dịch NaCl 100 mM trong 0 (đối chứng), 1, 6 và 12 h được thu thập để phân tích RNA-Seq (Belamkar *et al.*, 2014). Mã định danh của gen mã hóa TF được truy vấn để tìm kiếm mức độ biểu hiện của gen tương ứng ở rể trong điều kiện xử lý mặn.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân tích sự phân bố của gốc Met trong các họ TF ở đậu tương

Với giả thuyết đặt ra, vùng thượng nguồn (upstream region) và hạ nguồn (downstream region) của các nhóm TF được chọn lọc để xác định mức độ phân bố của các gốc Met trên protein. Trước tiên, vùng bảo thủ của các TF được xác định bằng công cụ MEGA (Kumar *et al.*, 2016). Vùng bảo thủ của họ TF bHLH giàu Met ở đậu tương có cấu tạo gồm 4 domain, 'basic-helix-loop-helix', trong khi các thành viên của họ TF bZIP chia sẻ cấu trúc bảo thủ gồm 3 vùng, 'basic-hinge-leucine zipper' (Hình 1). Phân tích trình tự tương đồng cho thấy họ TF SRF có vùng bảo thủ 'MADS-box' (Hình 1).



Hình 1. Sự phân bố của gốc Met trên ba nhóm TF ở đậu tương

Khảo sát hai vùng ngoài trình tự bảo thủ của ba nhóm TF đã cho thấy sự mật độ dày đặc của các gốc Met. Cụ thể, phần lớn bHLH (8 trên 11) có vùng thượng nguồn hoặc hạ nguồn quy tụ nhiều gốc Met (> 10%) (Hình 1). Chỉ có một TF thuộc họ bZIP, Glyma02g10600, được xác định có sự phân bố dày đặc của gốc Met ở hai vùng ngoại biên cận bảo thủ (Hình 1). Trong khi đó, hai đoạn trình tự ngoài vùng bảo thủ của hầu hết các thành viên của họ SRF (sáu trên bảy) được ghi nhận sự có mặt của nhiều gốc Met (Hình 1). Trước đây, Luo và cộng tác viên (2009) đã chứng minh vai trò của Met trên protein giúp chống lại bất lợi ôxi hóa bằng cách thay thế Met với Norleucine (Luo and Levine, 2009). Như vậy, kết quả của nghiên cứu này đã tìm ra được 15 TF có sự tập trung nhiều Met quanh vùng bảo thủ, vì thế, các

gốc Met này có thể giúp phân tử protein đáp ứng lại điều kiện ngoại cảnh bất lợi.

3.2. Phân tích đặc tính lý hóa của TF giàu Met ở đậu tương

Đặc tính lý hóa của protein, bao gồm pI, II và GRAVY được phân tích trên ExPASy ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2003). Kết quả đã chỉ ra rằng hầu hết các TF, ngoại trừ Glyma02g00980 (một thành viên của họ TF bHLH) có giá trị II lớn hơn 40, cho thấy chúng không ổn định trong điều kiện kiểm tra trong ống nghiệm (Bảng 2). Phân tích từ ExPASy ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2003) cũng ghi nhận tất cả các TF có chỉ số GRAVY nhỏ hơn 0, suy ra 21 phân tử protein này đều ưa nước (Bảng 2).

Bảng 2. Đặc tính lý hóa của 3 nhóm TF giàu Met được tìm thấy ở đậu tương

TT	Tên protein	TF	pI	II	GRAVY	BQ	TT	Tên protein	TF	pI	II	GRAVY	BQ
01	Glyma01g15930	bHLH	8,88	47,61	-0,55	C ⁵	12	Glyma02g01600	bZIP	5,07	55,40	-0,66	C ³
02	Glyma02g00980		9,26	39,46	-0,10	S ⁵	13	Glyma05g28960		5,23	43,56	-0,64	C ²
03	Glyma03g04000		9,14	51,91	-0,69	-	14	Glyma08g12170		5,24	44,66	-0,73	C ²
04	Glyma03g32740		7,20	63,57	-0,51	M ³	15	Glyma10g40080	SRF	9,76	46,27	-0,47	-
05	Glyma04g04190		6,84	68,89	-0,78	-	16	Glyma11g26260		6,84	55,54	-0,65	-
06	Glyma05g19920		8,93	52,30	-0,53	-	17	Glyma11g30490		9,26	57,12	-0,44	-
07	Glyma06g04380		6,63	59,36	-0,72	-	18	Glyma11g30620		9,37	55,52	-0,42	-
08	Glyma10g04890		5,84	65,40	-0,84	-	19	Glyma18g05930		10,0	58,23	-0,64	-
09	Glyma11g17120		8,63	46,28	-0,58	C ⁵	20	Glyma18g05960		9,13	59,28	-0,57	-
10	Glyma13g19250		6,03	65,52	-0,82	M ⁴	21	Glyma20g27320		9,79	55,34	-0,44	-
11	Glyma20g22280		5,92	62,84	-0,66	-							

Ghi chú: TF: Nhân tố phiên mã, pI: điểm đẳng điện, II: chỉ số bất ổn định, GRAVY: độ ưa nước, BQ: bào quan, C: lục lạp, S: hệ thống bao gói, M: ty thể.

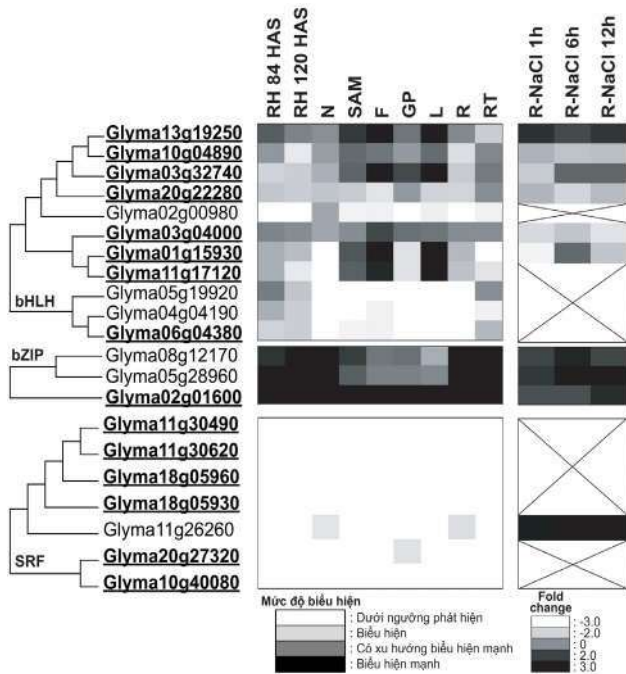
Giá trị pI của các TF dao động từ khoảng 5,07 (tính axit) đến 10,00 (tính bazơ) (Bảng 2). Các protein có tính axit phân bố trong tế bào chất, trong khi protein bám trên màng bào quan thường có tính bazơ. Kết quả phân tích trên TargetP cho thấy 5 TF được tìm thấy ở tế bào chất, 2 TF cư trú ở ty thể, trong khi 1 TF phân bố trên hệ thống bao gói nội bào (Bảng 2).

3.3. Phân tích biểu hiện của gen mã hóa nhân tố phiên mã giàu Met ở đậu tương trong các điều kiện

Trong nghiên cứu này, mức độ biểu hiện của các gen mã hóa 3 nhóm TF ở đậu tương được phân tích *in silico* dựa trên dữ liệu phiên mã trong điều kiện thường (Libault *et al.*, 2010) và khi xử lý mặn

(Belamkar *et al.*, 2014). Biểu hiện của một gen trong điều kiện thường được chia làm bốn mức độ, dưới ngưỡng phát hiện, biểu hiện, có xu hướng biểu hiện mạnh và biểu hiện mạnh (Libault *et al.*, 2010). Kết quả phân tích được minh họa ở hình 2.

Trong điều kiện thường, phần lớn các gen mã hóa bHLH và bZIP có xu hướng biểu hiện mạnh ở ít nhất một bộ phận chính, trong khi mức độ phiên mã của 7 gen mã hóa họ SRF ở 9 mẫu mô cơ quan dưới ngưỡng phát hiện (Hình 2). Cụ thể, *Glyma13g19250*, *Glyma03g32740*, *Glyma01g15930* và *Glyma11g17120* có biểu hiện mạnh ở hoa và lá, nhưng không biểu hiện mạnh ở các cơ quan dưới đất, chứng tỏ 4 gen này có thể tham gia vào sinh trưởng và phát triển của hoa và lá trong điều kiện thường.



Hình 2. Mức độ biểu hiện của gen mã hóa TF giàu Met trong các điều kiện

Đáng chú ý, Glyma03g32740 và Glyma12g19250 có thể phân bố ở ty thể (Bảng 2), các gen mã hóa 2 TF này biểu hiện đặc thù ở hoa và lá (Hình 2), gợi ý rằng chúng có thể liên quan đến đáp ứng bất lợi ở lá hoặc hoa. Bên cạnh đó, gen mã hóa 2 thành viên của nhóm bZIP biểu hiện đặc thù ở tất cả các bộ phận dưới mặt đất, trong khi *Glyma02g01600* có mức độ phiên mã mạnh ở tất cả mẫu mô (Hình 2). Kết quả này chứng tỏ *Glyma02g01600* có thể đóng vai trò thiết yếu liên quan đến quá trình sinh trưởng và phát triển của cây trong điều kiện thường.

Trong stress mặn (Belamkar *et al.*, 2014), kết quả đã tìm thấy dữ liệu của 10 gen, bao gồm 6 gen mã hóa bHLH, 3 gen mã hóa bZIP và 1 gen mã hóa SRF. Trong đó, 5 gen đã được xác định có đáp ứng phiên mã tăng mạnh ở rễ khi xử lý mặn (Hình 2). Đặc biệt, họ bZIP được tăng cường biểu hiện ở rễ trong điều kiện thường và khi xử lý mặn (Hình 2), chứng tỏ các gen này có thể tham gia vào quá trình đáp ứng bất lợi ở rễ. Trước đó, khi xem xét dữ liệu phiên mã khi xử lý lá cây đậu tương V6 và R2 trong điều kiện hạn, Chu và cộng tác viên (2016) đã chỉ ra ba gen có đáp ứng (Chu *et al.*, 2016). Cụ thể, *Glyma01g15930* và *Glyma03g32740* bị giảm biểu hiện, *Glyma20g22280* có mức độ phiên mã tăng ở cả mẫu lá khi xử lý hạn (Chu *et al.*, 2016). Những kết quả này phù hợp với nhận định về vai trò của gen *Glyma03g32740* trong đáp ứng bất lợi ở lá.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Đã xác định được 15 trên tổng số 21 protein thuộc ba họ TF có sự tập trung nhiều Met quanh vùng bảo thủ, đặt ra giả thuyết về vai trò của gốc Met trong việc giúp phân tử protein đáp ứng bất lợi.

Phân tích đặc tính lý hóa cho thấy các TF giàu Met đều ưa nước, hầu hết đều không ổn định trong điều kiện *in vitro*. Các TF này có thể cư trú trong tế bào chất, ty thể hoặc trên các hệ thống bao gói trong tế bào.

Hầu hết các gen mã hóa bHLH và bZIP biểu hiện mạnh ở ít nhất một bộ phận chính, trong khi SRF hoạt động yếu trong điều kiện thường. Trong điều kiện mặn, một số thành viên của họ bHLH và SRF có đáp ứng ở rễ, trong khi các gen mã hóa bZIP đều được tăng cường biểu hiện ở rễ.

4.2. Đề nghị

Nghiên cứu này sẽ tiếp tục phân tích thực nghiệm về mức độ đáp ứng của các gen mã hóa TF trong điều kiện bất lợi ở đậu tương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Belamkar, V., Weeks, N. T., Bharti, A. K., Farmer, A. D., Graham, M. A. Cannon, S. B., 2014. Comprehensive characterization and RNA-Seq profiling of the HD-Zip transcription factor family in soybean (*Glycine max*) during dehydration and salt stress. *BMC Genomics*, 15(1): 1-25.
- Chu, H. D., Le, Q. N., Nguyen, H. Q., Le, D.T., 2016. Genome-wide analysis of genes encoding methionine-rich proteins in *Arabidopsis* and soybean suggesting their roles in the adaptation of plants to abiotic stress. *Int J Genomics*, 2016: e5427062.
- Emanuelsson, S., Brunak, G., Heijne, H., 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc*, 2(4): 953-971.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., Bairoch, A., 2003. ExpASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, 31(13): 3784-3788.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*, 41: 95-98.
- Kim, G., Weiss, S. J., Levine, R. L., 2014. Methionine oxidation and reduction in proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1840(2): 901-905.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 33(7): 1870-1874.

- Libault, M., Farmer, A., Joshi, T., Takahashi, K., Langley, R. J., Franklin, L. D., He, J., Xu, D., Stacey, G., 2010. An integrated transcriptome atlas of the crop model *Glycine max*, and its use in comparative analyses in plants. *Plant J*, 63(1): 86-99.
- Luo, S., Levine, R. L., 2009. Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB J*, 23(2): 464-472.

Analysis of the role of methionine residues in the transcription factor families in soybean

Chu Duc Ha, Le Minh Tuan, Pham Phuong Thu, Pham Thi Ly Thu, Pham Thi Xuan, La Viet Hong, Pham Xuan Hoi

Abstract

Methionine (Met) is considered as an important amino acid residue in the plant. The structural Met residues were hypothesized to protect the structure of protein against the cellular oxidative stresses. In this study, 21 Met-rich proteins, belonging to three transcription factor (TF) families, namely 'Basic helix-loop-helix' (bHLH), 'Basic leucine zipper' (bZIP) and 'Serum response factor' (SRF), were analyzed to demonstrate this hypothesis. As a result, the high accumulation of Met residues has been recorded in the upstream and downstream regions close to the conserved domains of 15 MRPs. Our *in silico* analyses revealed that these TFs were hydrophilic and most unstable in the test tube. Interestingly, several TFs might localize on the cytosol, mitochondrial or the secretory pathways. According to the public microarray database, the majority of genes encoding TF bHLH and bZIP was up-regulated in at least one major organ in soybean plant in the normal condition. By retrieving the previous RNA-Seq database, several genes encoding bHLH and SRF were significantly altered, while all genes encoding bZIP were also induced in root under the high salt stress.

Keywords: Stress, soybean, Methionine, transcription factor, bioinformatics

Ngày nhận bài: 7/4/2019
Ngày phản biện: 10/4/2019

Người phản biện: TS. Trần Danh Sửu
Ngày duyệt đăng: 15/4/2019