

doi 10.18699/vjgb-25-100

Программа PlantReg 1.1: анализ взаимного расположения сайтов связывания транскрипционных факторов в промоторах генов-мишеней для уточнения молекулярных механизмов их активности в регуляторных сетях

В.В. Лавреха ^{1, 2#}, Н.А. Омельянчук ^{1#}, А.Г. Богомолов ¹, Ю.А. Рябов ¹,
П.К. Мукебенова ^{1, 2}, Е.В. Землянская  

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 ezemlyanskaya@bionet.nsc.ru

Аннотация. Развитие высокопроизводительного секвенирования расширило возможности изучения регуляции экспрессии генов, в том числе для реконструкции генных регуляторных сетей и регуляторных сетей транскрипционных факторов (РСТФ). Актуальной задачей остается выявление молекулярных аспектов регуляции данными сетями биологических процессов. Решение этой задачи для растений позволит существенно продвинуться в понимании механизмов формирования хозяйствственно важных признаков. Ранее мы разработали программу PlantReg для реконструкции транскрипционной регуляции биологических процессов у модельного вида *Arabidopsis thaliana* L. Воспроизведимые этой программой связи между РСТФ и генами, обеспечивающими протекание биологических процессов, охарактеризованы по типу регуляции (активация/подавление). Однако программа не позволяла определять, в каких случаях активация/подавление экспрессии гена-мишени обусловлены кооперативным или конкурентным взаимодействием транскрипционных факторов (ТФ). Мы предложили использовать информацию о взаимном расположении сайтов связывания (СС) ТФ в промоторе гена-мишени, а также данные о типе активности трансактивационных доменов ТФ для выявления кооперативного/конкурентного действия ТФ. Мы усовершенствовали программу, создав версию PlantReg 1.1, где обеспечили возможность точной локализации СС ТФ в протяженных районах связывания ТФ, устанавливаемых на основании полногеномных профилей DAP-seq (<https://plamorph.sysbio.ru/fannotf/>). Для демонстрации возможностей программы была исследована регуляция генов-мишеней ранее реконструированных нами РСТФ ответа на ауксин и солевой стресс у *A. thaliana*. В фокусе изучения были гены, кодирующие белки, участвующие в процессах биосинтеза хлорофилла и лигнина, биогенеза рибосом и в передаче сигнала абсцизовой кислоты. В данной работе установлено, что частота случаев конкурентной регуляции под влиянием ауксина и солевого стресса может быть достаточно высока (около 30%). Показано, что конкуренция ТФ семейства bZIP за общие СС является значимым механизмом подавления транскрипции в ответ на ауксин, и что ауксин и солевой стресс могут действовать общие механизмы конкурентной регуляции для модуляции экспрессии некоторых генов сигнального пути абсцизовой кислоты.

Ключевые слова: генная онтология; биологические процессы; генные регуляторные сети; сайт связывания; транскрипционный фактор; *Arabidopsis thaliana*

Для цитирования: Лавреха В.В., Омельянчук Н.А., Богомолов А.Г., Рябов Ю.А., Мукебенова П.К., Землянская Е.В. Программа PlantReg 1.1: анализ взаимного расположения сайтов связывания транскрипционных факторов в промоторах генов-мишеней для уточнения молекулярных механизмов их активности в регуляторных сетях. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(7):940-951. doi 10.18699/vjgb-25-100

Финансирование. Работа выполнена в рамках бюджетного проекта FWNR-2022-0020.

PlantReg 1.1 identifies the mutual arrangement of transcription factor binding sites in the target promoters for the elucidation of molecular mechanisms within regulatory networks

V.V. Lavrekha ^{1, 2#}, N.A. Omelyanchuk ^{1#}, A.G. Bogomolov ¹, Y.A. Ryabov ¹,
P.K. Mukebenova ^{1, 2}, E.V. Zemlyanskaya  

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 ezemlyanskaya@bionet.nsc.ru

Abstract. The development of high-throughput sequencing has expanded the possibilities for studying the regulation of gene expression, including the reconstruction of gene regulatory networks and transcription factor regulatory networks (TFRNs). Identifying the molecular aspects for regulation of biological processes via these networks remains a challenge. Solving this problem for plants will significantly advance the understanding of the mechanisms shaping agronomically important traits. Previously, we developed the PlantReg program to reconstruct the transcriptional regulation of biological processes in the model species *Arabidopsis thaliana* L. The links established by this program between TFRNs and the genes regulating biological processes specify the type of regulation (activation/suppression). However, the program does not determine whether activation/suppression of the target gene is due to the cooperative or competitive interaction of transcription factors (TFs). We assumed that using information on the mutual arrangement of TF binding sites (BSs) in the target gene promoter as well as data on the activity type of TF effector domains would help to identify the cooperative/competitive action of TFs. We improved the program and created PlantReg 1.1, which enables precise localization of TF BSs in extended TF binding regions identified from genome-wide DAP-seq profiles (<https://plamorph.sysbio.ru/fannotf/>). To demonstrate the capabilities of the program, we used it to investigate the regulation of target genes in previously reconstructed TFRNs for auxin response and early reaction to salt stress in *A. thaliana*. The study focused on genes encoding proteins involved in chlorophyll and lignin biosynthesis, ribosome biogenesis, and abscisic acid (ABA) signaling. We revealed that the frequency of competitive regulation under the influence of auxin or salt stress could be quite high (approximately 30%). We demonstrated that competition between bZIP family TFs for common BS is a significant mechanism of transcriptional repression in response to auxin, and that auxin and salt stress can engage common competitive regulatory mechanisms to modulate the expression of some genes in the ABA signaling pathway.

Key words: gene ontology; biological processes; gene regulatory networks; binding site; transcription factor; *Arabidopsis thaliana*

For citation: Lavrekha V.V., Omelyanchuk N.A., Bogomolov A.G., Ryabov Y.A., Mukebenova P.K., Zemlyanskaya E.V. PlantReg 1.1 identifies the mutual arrangement of transcription factor binding sites in the target promoters for the elucidation of molecular mechanisms within regulatory networks. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(7):940-951. doi 10.18699/vjgb-25-100

Введение

Становление и развитие полногеномных методов анализа, таких как RNA-seq (Deshpande et al., 2023), ChIP-seq (Park, 2009), DAP-seq (O’Malley et al., 2016), открыли широкие возможности для системно-биологического исследования механизмов, обеспечивающих транскрипционную регуляцию биологических процессов и формирование фенотипических признаков (Marshall-Colón, Kliebenstein, 2019; Zemlyanskaya et al., 2021). На основе анализа геномных и транскриптомных данных активно развиваются подходы к реконструкции генных регуляторных сетей, а также регуляторных сетей транскрипционных факторов (РСТФ) (Ko, Brandizzi, 2020; Rybakov et al., 2024). РСТФ – это представляемый в виде графа набор регуляторных взаимодействий (связей) между генами, кодирующими транскрипционные факторы (ТФ). Узлы графа соответствуют генам, а направленные ребра – регуляторным взаимодействиям ТФ, кодируемого одним геном, с другим геном. Реконструкция РСТФ и выявление взаимосвязей между этими сетями и биологическими процессами (или конкретными признаками) имеют большое значение для установления центральных регуляторных контуров, управляющих биологическими процессами, а также для создания предсказательных моделей регуляции этих процессов (Huang et al., 2025; Leong et al., 2025; Sun Y. et al., 2025).

К настоящему времени исследователям доступно несколько программных средств для реконструкции РСТФ у разных видов. Например, R-пакет NetAct (Su et al., 2022) позволяет воссоздавать РСТФ млекопитающих на основании транскриптомных данных и компьютерной базы генов-мишеней ТФ, курируемой авторами этого пакета. Ранее нами разработаны программы CisCross-FindTFnet для реконструкции РСТФ у модельного растения *Arabidopsis thaliana* (Omelyanchuk et al., 2024) и PlantReg для установления регуляторных связей между РСТФ и генами,

обеспечивающими протекание биологических процессов, контролируемых этими сетями (Lavrekha et al., 2024). Обе программы осуществляют анализ транскриптомных данных с привлечением презентативной коллекции полногеномных DAP-seq-профилей связывания ТФ, при этом PlantReg использует результаты CisCross-FindTFnet в качестве входных данных.

Важным этапом реконструкции РСТФ является определение типа активности составляющих сеть ТФ (активаторы или репрессоры), так как именно эта характеристика обуславливает топологию и динамику функционирования регуляторных сетей (Dhatterwal et al., 2024). Широко-масштабное определение типов активности трансактивационных доменов (белковых доменов, обеспечивающих активаторную или репрессорную функцию ТФ) у более 400 ТФ *A. thaliana* (Hummel et al., 2023) способствовало решению данной задачи. Однако этого недостаточно для корректной классификации связей в сети, поскольку многие ТФ могут работать и как активаторы, и как репрессоры в зависимости от типа клеток, условий, белковых изоформ ТФ, конкретных промоторов и др. (Boyle, Després, 2010; Martínez et al., 2018; Nagahage et al., 2018; Wang et al., 2020). Именно поэтому при реконструкции РСТФ по транскриптомным данным активность ТФ, как правило, устанавливают на основании анализа профилей экспрессии их генов-мишеней, выделяя их среди дифференциально-экспрессирующихся генов (ДЭГ) (Su et al., 2022; Omelyanchuk et al., 2024).

Ранее мы реконструировали две РСТФ: первая, РСТФ-А, контролирует транскрипционный ответ генов на ауксин, вторая, РСТФ-С, – ранний ответ на солевой стресс у *A. thaliana* (Lavrekha et al., 2024; Omelyanchuk et al., 2024). В этих же работах с помощью алгоритма PlantReg показано, каким образом РСТФ-А вовлечена в регуляцию ауксином четырех различных биологических процессов



Рис. 1. Принципы регуляции биологических процессов ТФ из РСТФ-А (а) и РСТФ-С (б).

Желтые и зеленые прямоугольники – подавляемая и активируемая подсети РСТФ. Толщина стрелок отражает количество соответствующих связей в РСТФ. UA – активируемый активатор; US – активируемый супрессор; DA – подавляемый активатор; DS – подавляемый супрессор.

(подавление биосинтеза хлорофилла и лигнина, ответа на абсцизовую кислоту (АБК) и активацию биогенеза рибосом) и как контролируется усиление ответа на АБК при раннем солневом стрессе посредством РСТФ-С. В этих сетях ТФ разбиты на четыре класса: активируемый активатор (upregulated activator, UA), активируемый супрессор (upregulated suppressor, US), подавляемый активатор (downregulated activator, DA) и подавляемый супрессор (downregulated suppressor, DS). DA и DS формируют П-подсеть (активна в отсутствие стимула, подавляется под его воздействием), UA и US формируют А-подсеть (активируется стимулом).

И в транскрипционном ответе на ауксин, и в ответе на солневой стресс выявлена важная роль подавления транскрипции. Так, для ответа на ауксин характерно масштабное перепрограммирование обширной П-подсети, функционирующей в норме (до обработки гормоном), путем ее подавления ТФ типа US, входящими в состав А-подсети (рис. 1, а) (Omelyanchuk et al., 2024). В ответе на солневой стресс, напротив, запускается обширная А-подсеть, в том числе благодаря подавлению ее репрессоров типа DS из П-подсети (см. рис. 1, б) (Lavrekha et al., 2024).

Большинство супрессоров обеих РСТФ вовлечено также в регуляцию перечисленных выше биологических процессов в ответ на действие ауксина и солневого стресса (Lavrekha et al., 2024; Omelyanchuk et al., 2024). Однако, согласно литературным данным, основная часть предсказанных супрессоров в обеих РСТФ имеет трансактивационный домен активаторного типа (Hummel et al., 2023; Omelyanchuk et al., 2024). Это может быть следствием того, что подавление экспрессии гена-мишени этими ТФ происходит в результате их кооперативного или конкурентного взаимодействия с другими ТФ. Программа PlantReg позволяет установить регуляторные связи между РСТФ и генами, обеспечивающими протекание биологических процессов, но не выявляет случаи кооперации или конкуренции ТФ в контроле активности генов. В то же время понимание механизмов взаимодействия ТФ в регуляции транскрипции исключительно важно для эффективного использования реконструированных РСТФ и их связей с биологическими процессами в проектах по биоинженерии признаков растений.

Информация о взаимном расположении сайтов связывания (СС) различных ТФ в промоторе конкретного гена-мишени с привлечением данных о типе активности трансактивационных доменов этих ТФ (Hummel et al.,

2023) может быть использована для выявления и характеристики кооперативного или конкурентного действия ТФ в промоторе конкретного гена. Например, в тех случаях, когда СС двух предсказанных репрессоров, работающих в одной подсети, располагаются в непосредственной близости друг от друга, при этом трансактивационный домен только одного из них обладает репрессорной активностью, тогда как другой по своей природе – активатор транскрипции, можно говорить о потенциальном кооперативном взаимодействии ТФ, превращающем ТФ-активатор в ТФ-репрессор (рис. 2, а). Такие примеры широко распространены и подробно описаны в научной литературе (Hanna-Rose, Hansen, 1996; Ahn et al., 2006; Veerabagu et al., 2014; Martínez et al., 2018; Wang et al., 2020).

Аналогично, если СС предсказанного активатора из одной подсети и предсказанного репрессора из другой подсети накладываются друг на друга в промоторе гена-мишени, при этом предсказанная активность одного из ТФ не соответствует установленной активности его трансактивационного домена, можно говорить о потенциальном конкурентном действии ТФ: замещение сильного активатора более слабым проявляется как подавление транскрипции гена-мишени, а замещение сильного репрессора более слабым – как активация гена-мишени (см. рис. 2, б). Снижение промоторной активности при увеличении концентрации слабого активатора по сравнению с сильным, как и обратный переход, показаны в ряде экспериментов (Tamura et al., 2004; Zhang et al., 2006; Chupreta et al., 2007; Ren et al., 2015; Selvaraj et al., 2015; Brackmann et al., 2018).

Для надежной идентификации генов-мишени ТФ программа PlantReg использует пики DAP-seq, что, однако, не позволяет точно локализовать СС ТФ, так как размер пики (более 150 п. н.) существенно превышает длину последовательностей, узнаваемых ТФ (менее 20 п. н.). В настоящей работе мы усовершенствовали программу, создав версию PlantReg 1.1, где обеспечили возможность точной локализации СС ТФ в протяженных районах связывания, устанавливаемых на основании полногеномных профилей DAP-seq (<https://plamorph.sysbio.ru/fannotf/>). Новая версия программы, PlantReg 1.1, была использована нами для выявления генов биосинтеза хлорофилла и лигнина, биогенеза рибосом и сигнального пути АБК, экспрессия которых может подавляться под контролем РСТФ-А или РСТФ-С в результате конкуренции ТФ-активаторов за общие сайты связывания.

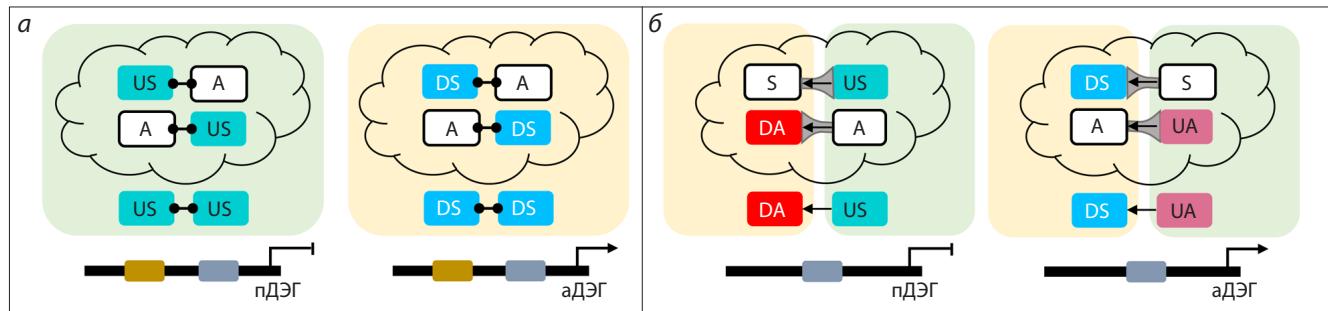


Рис. 2. Кооперативная (а) и конкурентная (б) регуляция гена-мишени парой ТФ из РСТФ.

Желтые и зеленые прямоугольники – подавляемая и активируемая подсети РСТФ. Предсказанные типы активности ТФ представлены внизу, альтернативные типы активности, возможные в реальности, представлены вверху (в облаке). Соединенные линиями точки между прямоугольниками, обозначающими ТФ, на (а) – взаимодействие белков; стрелки на (б) – замещение одного ТФ другим после действия стимула; серые воронки на (б) – соотношение активностей ТФ (большее основание соответствует более высокой активности); пДЭГ – активируемые ДЭГ; пДЭГ – подавляемые ДЭГ; UA – активируемый активатор; US – активируемый супрессор; DA – подавляемый активатор; DS – подавляемый супрессор.

Проведенный анализ позволил установить, что частота случаев конкурентной регуляции под влиянием ауксина и солевого стресса может быть достаточно высока. Помимо этого, мы показали, что конкуренция ТФ семейства bZIP за общие СС – значимый механизм подавления транскрипции в ответ на ауксин у *A. thaliana*, а также, что ауксин и солевой стресс могут задействовать общие механизмы конкурентной регуляции для модуляции экспрессии некоторых генов сигнального пути абсцизовой кислоты.

Материалы и методы

Интеграция данных о СС ТФ в 5'-регуляторных районах генов в программу PlantReg 1.1. Разработанная нами ранее программа PlantReg (Lavrekha et al., 2024) предназначена для реконструкции механизмов транскрипционной регуляции биологических процессов у *A. thaliana* на основании анализа списка ДЭГ и списка ТФ – известных или предполагаемых регуляторов транскрипции этих генов. PlantReg осуществляет функциональную аннотацию входного списка ДЭГ в терминах генной онтологии (ГО),

после чего среди ДЭГ, ассоциированных с обогащенными биологическими процессами, выявляется потенциальные гены-мишени для ТФ из входного списка, используя полногеномные профили связывания ТФ, доступные в веб-версии программы (рис. 3, а). Выходные данные PlantReg представлены пятью блоками, в которых отражены отношения между биологическими процессами, участвующими в них ДЭГ и ТФ, регулирующими экспрессию этих ДЭГ.

Принципиальная схема работы обновленной версии PlantReg 1.1 представлена на рис. 3. Помимо исходного функционала, в ней доступны данные о распознанных СС ТФ в 5'-регуляторных районах генов (см. рис. 3, а), которые добавлены в блоки выдачи 1 и 4, что необходимо для исследования взаимного расположения их в промоторах генов. Исходно в блоке выдачи 1 представлен под список ДЭГ, ассоциированных с обогащенными биологическими процессами (см. рис. 3, б). Каждый ген под списка охарактеризован набором терминов ГО (биологические процессы), которыми аннотирован ген, с кодами обоснования

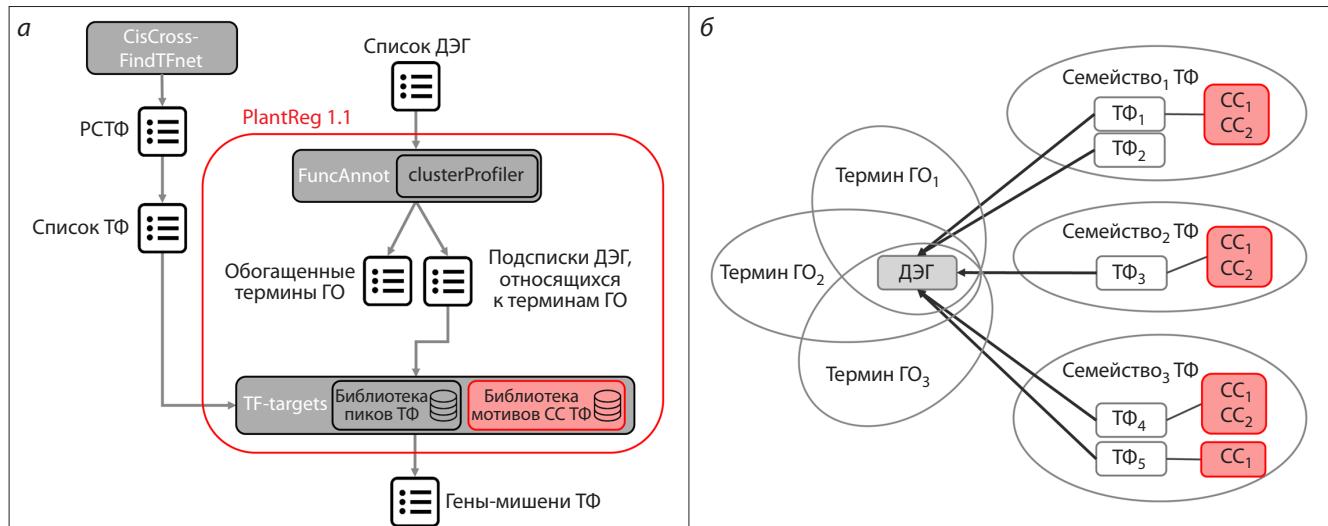


Рис. 3. Схема работы программы PlantReg 1.1 (а) и структура блока выдачи 1 (б).

Розовым цветом выделены обновления в версии 1.1 программы PlantReg по сравнению с исходной версией.

этой функциональной аннотации гена, количеством этих терминов ГО, списком потенциальных транскрипционных регуляторов гена с указанием семейства для каждого ТФ, а также количества транскрипционных факторов.

В блоке выдачи 4 эта же информация представлена в альтернативном формате, в котором списки терминов ГО и транскрипционных регуляторов каждого гена разбиты построчно. В программе PlantReg 1.1 к характеристике каждого гена добавлены нуклеотидная последовательность СС ТФ, распознанного в районе связывания соответствующего ТФ, геномные координаты СС ТФ (блок 4) или координаты СС ТФ относительно точки старта транскрипции (блок 1) и указание цепи ДНК, в которой распознан СС ТФ (см. рис. 3, б). Информация по локализации СС ТФ доступна только при выборе в качестве параметра коллекции полногеномных профилей CisCross-MACS2.

Распознавание СС ТФ в 5'-регуляторных районах генов *A. thaliana*. Частотные матрицы, описывающие СС ТФ *A. thaliana*, реконструировали путем *de novo* поиска мотивов в пиках DAP-seq из коллекции CisCross-MACS2, представленной в веб-версии программы PlantReg (Lavrekha et al., 2024). Коллекция наборов пиков CisCross-MACS2 была получена ранее (Lavrekha et al., 2022) в результате обработки сырых данных полногеномного профилирования сайтов связывания 403 ТФ *A. thaliana* методом DAP-seq (O'Malley et al., 2016). В каждом наборе пиков выбирали лучшие по высоте 2000 пиков, которые использовали для *de novo* поиска мотивов с помощью программы STREME (Bailey, 2021).

Контрольную выборку генерировали с помощью программы AntiNoise (Raditsa et al., 2024). Полагали, что мотив с наилучшей значимостью обогащения в пиках (при *p*-value не более 0.05) описывает сайт связывания целевого ТФ. Для проверки этого предположения устанавливали соответствие выявленных мотивов известным СС ТФ путем их сравнения с мотивами из баз данных JASPAR2024 CORE (Raulusevičiute et al., 2024), CisBP (Weirauch et al., 2014) и ArabidopsisDAPv1 (O'Malley et al., 2016) с помощью программы Tomtom (Gupta et al., 2007).

Поиск потенциальных СС ТФ в 5'-регуляторных областях генов *A. thaliana* (район [-2500; +1] относительно старта транскрипции) осуществляли методом позиционных весовых матриц с помощью функции scan_sequence пакета universalmotif на языке программирования R (Tremblay, 2024). Для извлечения нуклеотидных последовательностей 5'-регуляторных районов использовали версию генома *A. thaliana* TAIR10 (Lamesch et al., 2012) и геномную аннотацию Araport11 (Cheng et al., 2017).

Поиск примеров конкурентного подавления или активации генов в выдаче программы PlantReg 1.1. Установление регуляторных связей между элементами РСТФ-А/С (Lavrekha et al., 2024; Omelyanchuk et al., 2024) и генами, обеспечивающими протекание биологических процессов, изменяющихся под влиянием ауксина и солевого стресса, а также последующее выявление конкурентного подавления или активации генов под действием ауксина и солевого стресса осуществляли с помощью программы PlantReg 1.1. В качестве исходных данных были взяты списки ТФ, которые входили в состав РСТФ-А (39 элементов) и РСТФ-С (19 элементов) (на рис. 4 списки обозначены

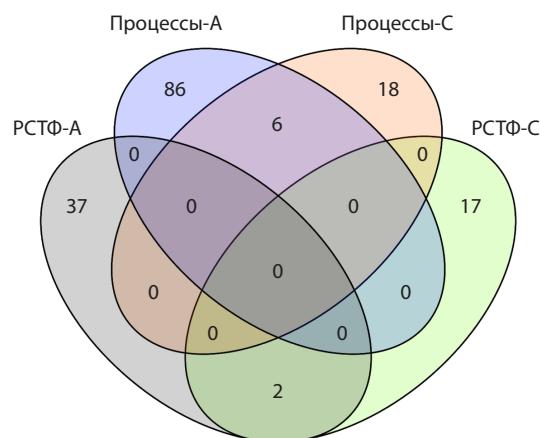


Рис. 4. Количество генов, кодирующих ТФ, которые формируют РСТФ-А и РСТФ-С, а также генов-мишеней, регулируемых этими РСТФ, которые обеспечивают протекание биологических процессов, изменяющихся под влиянием ауксина (Процессы-А) или солевого стресса (Процессы-С).

Множество «Процессы-А» включает в себя гены биосинтеза хлорофилла, биосинтеза лигнина, транспорта, конъюгации и сигнального пути АБК, биогенеза рибосом. Множество «Процессы-С» включает в себя гены транспорта, конъюгации и сигнального пути АБК.

как «РСТФ-А» и «РСТФ-С») (Приложение, табл. S1)¹, а также списки аДЭГ, активируемых (аДЭГ) и подавляемых (пДЭГ) под действием ауксина (5201 аДЭГ и 6704 пДЭГ) или солевого стресса (1476 аДЭГ и 944 пДЭГ), которые ранее использовались для реконструкции РСТФ (De Rybel et al., 2012; Wu et al., 2021; Omelyanchuk et al., 2024).

Списки аДЭГ и пДЭГ из двух транскриптомных экспериментов по отдельности подавали на вход программы PlantReg 1.1 вместе с соответствующим списком ТФ из РСТФ-А или РСТФ-С. Порог на обогащение терминами ГО устанавливали на уровне 0.001, для локализации районов связывания ТФ выбирали коллекцию полногеномных профилей CisCross-MACS2 и длину 5'-регуляторного района 1000 п. н. В результате получали пары «ТФ-регулятор-ген-мишень», где в качестве ТФ-регуляторов выступали ТФ из РСТФ-А или РСТФ-С, а в качестве генов-мишеней – аДЭГ и пДЭГ из соответствующего транскриптомного эксперимента.

Данные DAP-seq, используемые в PlantReg 1.1 для картирования районов связывания ТФ в геноме *A. thaliana*, содержат два типа наборов пиков: в первом случае (наборы пиков “col”) для приготовления библиотек использовалась нативная геномная ДНК из листьев, во втором случае (наборы пиков “colamp”) – геномная ДНК, в которой метилцитозиновые эпигенетические метки были удалены путем ПЦР-амплификации. Из выдачи программы PlantReg 1.1 отбирали пары «ТФ-регулятор-ген-мишень», реконструированные с использованием DAP-seq профилей связывания ТФ группы “col”. Далее среди регулируемых РСТФ-А генов-мишеней были отобраны гены, аннотированные терминами ГО, связанными с биосинтезом хлорофилла (16 генов), биосинтезом лигнина (14 генов), транспортом, конъюгацией и сигнальным путем АБК (34 генов) и био-

¹ Табл. S1–S7 Приложения см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx31.xlsx>

генезом рибосом (28 генов) – процессами, которые мы рассматривали ранее в работе (Omelyanchuk et al., 2024).

Среди генов-мишеней, регулируемых РСТФ-С, были отобраны гены, аннотированные терминами ГО, связанными с сигнальным путем АБК (24 гена), который мы рассматривали ранее в работе (Lavrekha et al., 2024). В результате было выбрано 110 генов (на рис. 4 обозначены как «Процессы-А» и «Процессы-С») (см. табл. S1–S3). Из них в качестве потенциальных объектов конкурентного подавления или активации мы выбирали гены, удовлетворяющие следующим требованиям: а) в регуляции таких генов участвовало более одного ТФ; б) СС этих ТФ существенно (не менее 80 %) перекрывались; в) гены, кодирующие эти ТФ, характеризовались противоположным изменением экспрессии в транскриптомном эксперименте.

Результаты

Коллекция предсказанных СС ТФ в 5'-регуляторных районах генов *A. thaliana*, интегрированная в программу PlantReg 1.1

Чтобы обеспечить возможность прогнозирования кооперативного и конкурентного взаимодействия ТФ в транскрипционной регуляции биологических процессов, в программе PlantReg 1.1 была реализована автоматическая локализация СС ТФ в 5'-регуляторных районах генов. Для этого результаты распознавания СС ТФ в промоторах генов методом позиционной весовой матрицы (см. раздел «Материалы и методы») были систематизированы и интегрированы в программу PlantReg 1.1. Для 300 ТФ (74 %) мотив, реконструированный *de novo* хотя бы по одному набору пиков (“col” или “colamp”), был сходен с известным СС этого ТФ, доступным в базах данных JASPAR, CisBP или ArabidopsisDAPv1 (рис. 5, а). Доля ТФ, у которых СС распознаны более чем в 90 % пиков, картирующихся в 5'-регуляторные районы генов, достаточно высока и

варьирует от 42 % (при длине 5'-регуляторного района 500 п.н.) до 74 % (при длине 5'-регуляторного района 2000 п.н.) (см. рис. 5, б).

В последующих разделах мы проиллюстрировали возможности применения нового функционала PlantReg 1.1 для решения конкретных биологических задач.

Конкурентная регуляция экспрессии генов в ответе на ауксин и солевой стресс у *A. thaliana*

Выше сформулировано предположение о том, что давление транскрипции генов-мишеней при повышении уровня ТФ типа US, а также их активация на фоне снижения уровня ТФ типа DS в ответе на ауксин и под действием солевого стресса могут происходить путем конкурентной регуляции парой ТФ-активаторов. Чтобы проверить это предположение, с помощью программы PlantReg 1.1 были установлены регуляторные связи между РСТФ-А/С и генами, регулирующими биосинтез хлорофилла и лигнина, биогенез рибосом и ответ на АБК. Показано, что 14 генов являются потенциальными объектами конкурентной регуляции транскрипционными факторами из РСТФ-А и РСТФ-С (см. табл. S1, S6, S7).

Примечательно, что 11 генов, кодирующих ТФ в составе РСТФ-А и РСТФ-С, также могут быть подвержены конкурентной регуляции (см. табл. S4, S5). Выявленные 25 генов (12 пДЭГ, 10 аДЭГ и 3 гена, ABCG25 (*ATP-binding cassette family G25*), *GBF3* (*G-box binding factor 3*) и *PYL7/RCAR2* (*PYR1-like 7/Regulatory components of ABA receptor 2*), экспрессия которых под действием ауксина и солевого стресса изменялась разнонаправленно), составляют 32 % от всей выборки генов, регулируемых репрессорами (79 генов, см. табл. S1, S6, S7). Таким образом, частота случаев конкурентной регуляции посредством РСТФ-А и РСТФ-С может быть достаточно высока.

Транскрипционные факторы объединяются в семейства, классы, суперклассы на основании сходства их доменов

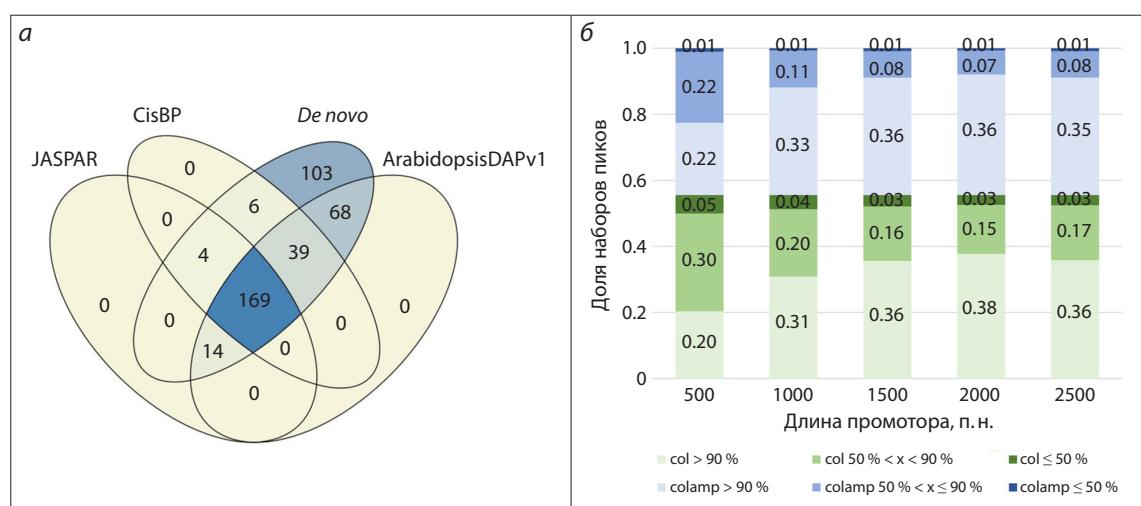


Рис. 5. Характеристика интегрированной в PlantReg 1.1 коллекции предсказанных СС ТФ в 5'-регуляторных районах генов *A. thaliana*.

а – результаты сравнения мотивов, найденных *de novo* в пиках DAP-seq, с известными СС целевых ТФ в базах данных JASPAR, CisBP и ArabidopsisDAPv1; б – доли наборов пиков (col – оттенки зеленого/colamp – оттенки синего), в которых мотив распознан более чем в 90 % пиков (светлый оттенок), в 50–90 % пиков и менее чем в 50 % пиков (темный оттенок), картирующихся в 5'-регуляторных районах генов.

связывания с ДНК (Blanc-Mathieu et al., 2024). ТФ из одного семейства часто распознают схожие последовательности ДНК и, следовательно, могут конкурировать за эти сайты связывания. В 5'-регуляторных областях выявленных нами 25 генов могут конкурировать ТФ внутри шести семейств: AP2/ERF (APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR), bZIP (BASIC LEUCINE-ZIPPER), BZR1/BES1 (BRASSINAZOLE RESISTANT 1/BRI1 EMS SUPPRESSOR 1), HD-ZIP (HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER), MYB (V-MYB AVIAN MYELOBLASTOSIS VIRAL ONCOGENE HOMOLOG), WRKY (см. табл. S6). Кроме этого, выявлены случаи возможной конкуренции ТФ из разных семейств одного суперкласса, а именно: "basic domains" и "Helix-Turn-Helix domains" (см. табл. S6).

Более того, в промоторах аДЭГ *MAPKKK18* (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 18*) и *RRP47* (*Sas10/Utp3/C1D family*) один и тот же СС могут занимать ТФ из семейств двух разных суперклассов: AP2/ERF (суперкласс "Beta-hairpin exposed by an alpha/beta-scaffold") и bZIP (суперкласс "basic domains") в первом случае и AP2/ERF и LBD (суперкласс "Zinc-coordinating DNA binding domains") во втором (см. табл. S6). В дистальном промоторе пДЭГ *GBF3* за СС могут конкурировать ТФ из семейств двух других суперклассов, bZIP ("basic domains") и MYB ("Helix-Turn-Helix domains"). Были обнаружены случаи конкуренции за СС среди ТФ из трех разных семейств,

принадлежащих двум (в промоторах *AFP1* (*ABI five binding protein*), *MYB73* и *PYL7*) и даже трем разным суперклассам (в дистальном промоторе *GBF3*) (см. табл. S6).

Конкуренция ТФ семейства bZIP в промоторах генов, регулируемых РСТФ-А

Чтобы выявить комбинации ТФ-активаторов, которые систематически задействуют РСТФ-А или РСТФ-С для подавления экспрессии генов-мишеней, был проведен сравнительный анализ пар «ТФ-регулятор–ген-мишень», определенных с помощью PlantReg 1.1. Показано, что три ТФ типа DA (bZIP3, bZIP68 и GBF3) и ТФ типа US (bZIP53) имеют общие СС в промоторах целого ряда генов, регулируемых РСТФ-А. К ним относятся гены *CHLG* (*Chlorophyll G*) (рис. 6, а, б), *HEME2* (*AT5G14220*) и *CHI* (*Chlorina I*), кодирующие ферменты биосинтеза хлорофилла, а также *ABCG25*, кодирующий белок, транспортирующий АБК через клеточную мембрану (см. табл. S6 и S7).

Поскольку в литературе bZIP53 описывается как транскрипционный активатор (Alonso et al., 2009; Weltmeier et al., 2009), логично предположить, что подавление экспрессии упомянутых выше генов может быть следствием конкуренции ТФ семейства bZIP за общие СС в промоторах, в результате которой сильный активатор заменяется более слабым. Действительно, активность трансактивационных

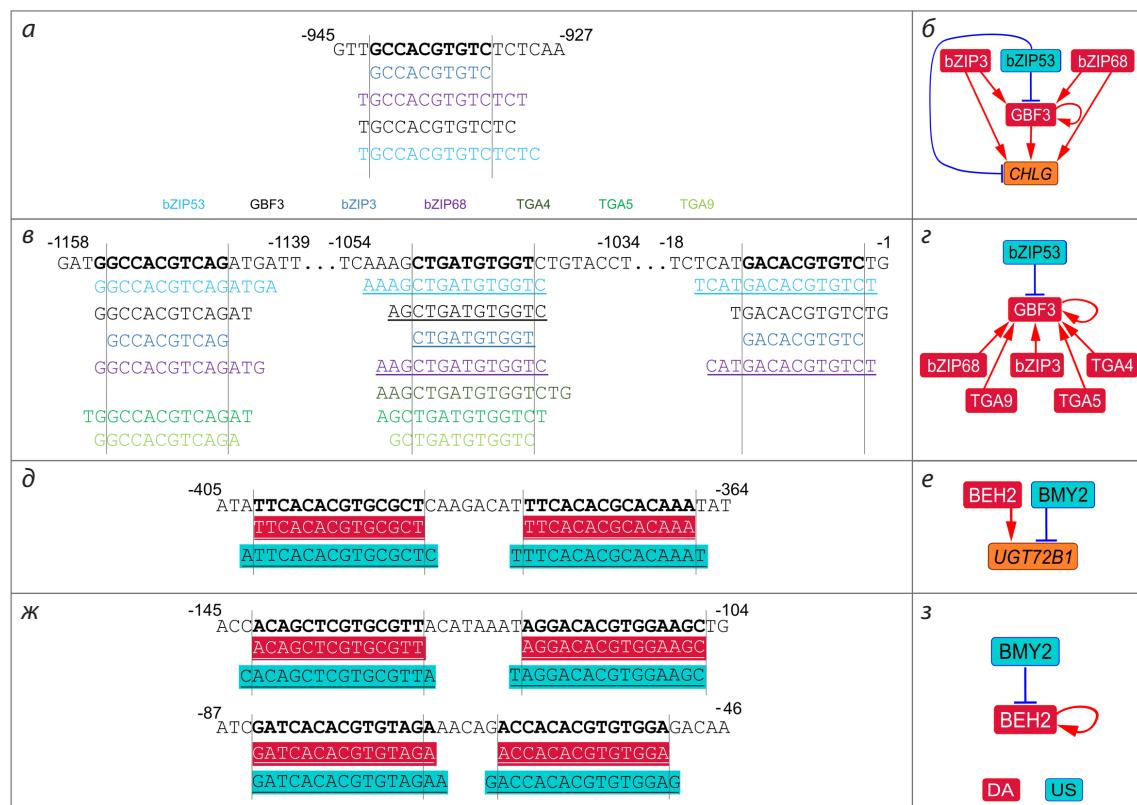


Рис. 6. Перекрывание СС ТФ в промоторах генов-мишеней, выявленное с помощью PlantReg 1.1.

а – дистальная область промотора *CHLG* с перекрыванием СС ТФ семейства bZIP (bZIP3, bZIP53, bZIP68 и GBF3); в – дистальная и коровая области промотора *GBF3* с перекрыванием СС ТФ семейства bZIP (bZIP3, bZIP53, bZIP68, TGA4/5/9 и GBF3), цветовая кодировка ТФ для (в) такая же, как для (а); ж – проксимальные части промоторов *UGT72B1* и *BEH2* соответственно, с перекрыванием СС ТФ BEH2 (красный цвет заливки) и BMY2 (синий цвет заливки); б, г, е, з – схемы транскрипционной регуляции генов *CHLG*, *GBF3*, *UGT72B1* и *BEH2* соответственно. Нижнее подчеркивание – СС лежит на антисмысловой цепи по отношению к цепи гена. Координаты приведены относительно точки старта транскрипции. US – активируемый супрессор; DA – подавляемый активатор.

доменов этих ТФ исследована ранее в работе (Hummel et al., 2023), где показано, что bZIP53 – транскрипционный активатор, однако гораздо более слабый, чем представители этого же семейства bZIP3, bZIP68 и GBF3.

Примечательно, что аналогичная комбинация транскрипционных регуляторов, конкурирующих за общие СС (bZIP3, bZIP68 и GBF3 в качестве DA, bZIP53 в качестве US), обнаружена нами в промоторах подавляемых ауксином генов *ERF15*, *GFB3* (см. рис. 6, в, г) и *AT1G19000*, кодирующих ТФ из РСТФ-А (см. табл. S6 и S7). Таким образом, конкуренция ТФ семейства bZIP за общие СС, вероятно, является значимым механизмом подавления транскрипции в ответ на ауксин.

Заслуживает внимания тот факт, что замена активаторов bZIP3, bZIP68 и GBF3 более слабым bZIP53 обнаружена нами и в промоторе гена *GFB3*, кодирующемого одного из участников конкурентной регуляции (см. рис. 6, в, г). Сходная ситуация выявлена для пары ТФ BEH2 (BES1/BZR1 HOMOLOG 2) (DA) и BMY2 (BETA-AMYLASE 2, известен также как BETA-AMYLASE 8/BAM8) (US), принадлежащих семейству BZR1/BES1. Эти ТФ регулируют экспрессию не только *DFB* и *UGT72B1* – генов, контролирующих уровень лигнина, но и *BEH2* (см. рис. 6, д–з).

Теоретически такая обратная связь может выступать «спусковым механизмом» для широкомасштабного конкурентного подавления экспрессии генов-мишеней парой ТФ-активаторов: повышение представленности более слабого транскрипционного активатора ведет к конкурентному подавлению экспрессии гена, кодирующего более сильный активатор транскрипции (и являющегося общей мишенью обоих ТФ), в результате чего ингибирование остальных общих мишеней будет увеличиваться. Следует также отметить, что некоторые ТФ типа DA могут конкурировать между собой за общий СС в рамках функционирования П-подсети до обработки ауксином (см. рис. 6, а–г), что, вероятно, обеспечивает дополнительную регуляторную гибкость РСТФ-А.

Конкурентная регуляция генов сигнального пути АБК в рамках РСТФ-А и РСТФ-С

В рассматриваемых нами примерах и ауксин, и солевой стресс модулируют ответ на АБК, в первом случае он ослабляется, во втором – усиливается (Lavrekha et al., 2024; Omelyanchuk et al., 2024). Сопоставление регуляторных связей, реконструированных на основании данных из разных экспериментов, позволяет более полно охарактеризовать потенциальные механизмы транскрипционной регуляции отдельных генов. С помощью программы PlantReg 1.1 мы показали, что три гена пути передачи сигнала АБК (*PYL7*, *AFP1* и *ABCG25*) находятся под контролем обеих регуляторных сетей транскрипционных факторов.

В снижение активности гена *PYL7* ауксином и повышение его активности солевым стрессом вовлечены разные ТФ, которые связываются с разными сайтами в его промоторе (рис. 7, а, б). Это позволяет предположить, что ответы на ауксин и солевой стресс используют различные молекулярные механизмы конкурентной регуляции для модуляции экспрессии *PYL7*. В регуляции *AFP1* и *ABCG25*, напротив, оба стимула могут действовать один

и тот же блок конкурирующих активаторов, но по-разному. Так, в норме экспрессию гена *AFP1* обеспечивает среди прочих bZIP68. Под действием ауксина он замещается BMY2 (вероятно, более слабым активатором), в условиях солевого стресса, напротив, его заменяет BIM2 (BES1-interacting Myc-like protein 2), который, согласно работе (Hummel et al., 2023), является более сильным активатором, чем bZIP68 (см. рис. 7, в, г). В промоторе *ABCG25* под действием ауксина слабый активатор bZIP53 замещает более сильные активаторы семейства bZIP, что вносит вклад в уменьшение количества транскриптов (см. рис. 7, д, е). Солевой стресс модулирует соотношение этих же активаторов, но в этом случае на фоне падения экспрессии *bZIP3* увеличивается количество транскриптов *GFB3*.

Интересно, что в промоторе гена *GFB3*, кодирующем ТФ, который входит в состав обеих РСТФ, наблюдается аналогичная картина. При солевом стрессе, в результате которого *GFB3* активируется, ТФ *GFB3* замещает bZIP3 на трех сайтах в проксимальном (-116; +1) (рис. 8, а, б) и семи сайтах связывания в дистальном (-1312; -701) районах промотора *GFB3* (см. рис. 8, в–е), тем самым, судя по всему, усиливая свою самоактивацию. Под действием ауксина происходит другое перераспределение ТФ семейства bZIP на этих же сайтах (см. рис. 8). Эти результаты хорошо согласуются с представлениями о важной роли конкуренции ТФ семейства bZIP за сайты связывания в модуляции экспрессии генов (Schindler et al., 1992; Foster et al., 1994; Ko, Brandizzi, 2022). В то же время ответ на ауксин включает и специфические механизмы регуляции *GFB3*, которые не задействованы в ответе на солевой стресс. Так, MYB3R1 после обработки ауксином может замещать сайты MYB70 и MYB73.

Обсуждение

В нашей работе собрана, систематизирована и интегрирована в программу PlantReg 1.1 информация о потенциальных СС ТФ в промоторах генов *A. thaliana*. Это позволяет, опираясь на данные о типе активности трансактивационных доменов ТФ (Hummel et al., 2023), прогнозировать кооперативное и конкурентное взаимодействие ТФ, входящих в состав РСТФ, при транскрипционной регуляции биологических процессов. Ранее мы реконструировали две РСТФ, контролирующие ответ на ауксин и солевой стресс у *A. thaliana*, и показали, что в обоих случаях важную роль играет подавление транскрипции (Lavrekha et al., 2024; Omelyanchuk et al., 2024). Однако, согласно литературным данным, большинство предсказанных супрессоров в составе РСТФ имеет трансактивационный домен активаторного типа (Hummel et al., 2023; Omelyanchuk et al., 2024). Мы применили PlantReg 1.1 для определения молекулярных механизмов, обеспечивающих функционирование ТФ-активаторов в качестве транскрипционных репрессоров.

Удалось обнаружить, что более трети генов-мишеней ТФ, предсказанных в РСТФ как репрессоры, потенциально могут быть объектами конкурентной регуляции парой ТФ, один из которых является сильным активатором транскрипции, другой – слабым. Таким образом, конкурентная регуляция экспрессии генов, вероятно, – универсальный механизм, позволяющий модулировать уровень экспрессии

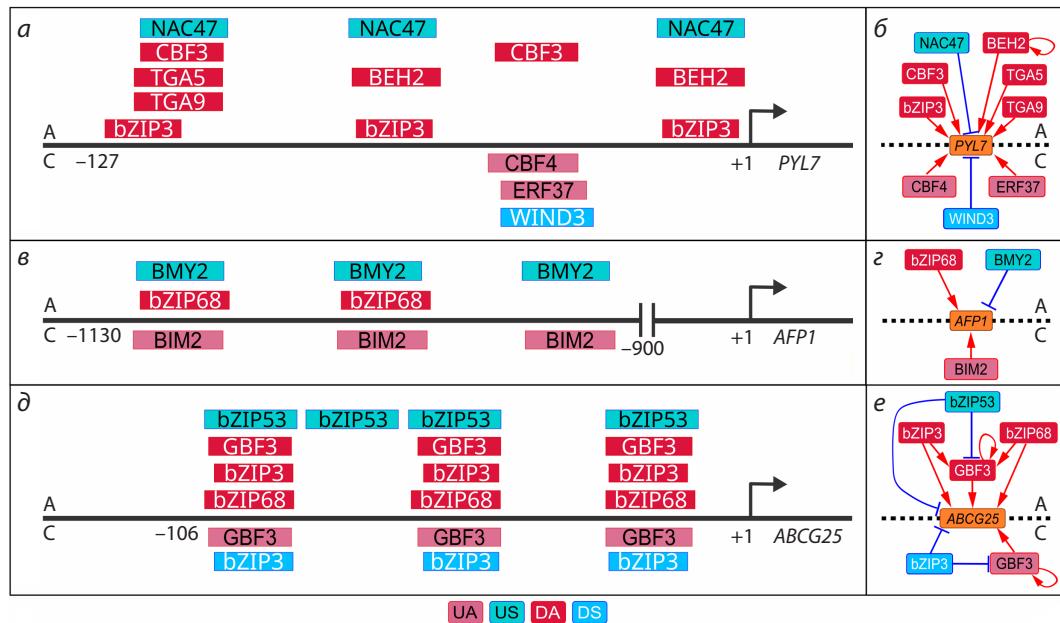


Рис. 7. Перекрывание СС ТФ в промоторах генов-мишений при обработке ауксином и при раннем солевом стрессе, выявленное с помощью PlantReg 1.1.

a – проксимальная часть промотора *PYL7*; *b* – дистальная часть промотора *AFP1*; *δ* – проксимальная часть промотора *ABCG25*; *b, g, e* – схемы транскрипционной регуляции генов *PYL7*, *ATF1* и *ABCG25* соответственно. Для каждой панели детали регуляции в ответ на ауксин (*A*) расположены вверху, а реакции на ранний солевой стресс (*C*) – внизу. ССТФ представлены прямоугольниками в соответствии с цветовой кодировкой типа регуляции: UA – активируемый активатор; US – активирующий супрессор; DA – подавляемый активатор; DS – подавляемый супрессор.

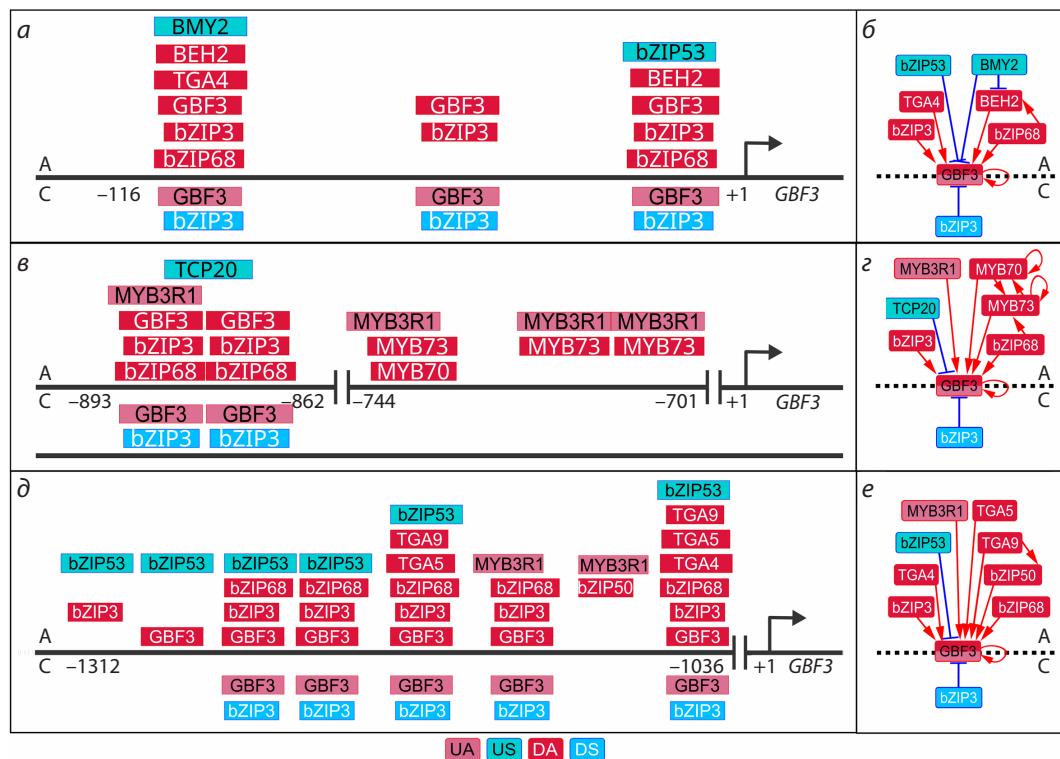


Рис. 8. Перекрывание СС ТФ в промоторе *GBF3* при обработке ауксином и при раннем солевом стрессе, выявленное с помощью PlantReg 1.1.

a, b, d – проксимальная ($-116; +1$) и дистальная ($-1312; -701$) части промотора *GBF3* с перекрыванием СС ТФ; *b, g, e* – схемы транскрипционной регуляции *GBF3* в проксимальной и дистальной областях промотора. Для каждой панели детали регуляции в ответ на ауксин (A) расположены вверху, а реакции на ранний солевой стресс (C) – внизу. СС ТФ представлены прямоугольниками в соответствии с цветовой кодировкой типа регуляции: UA – активируемый активатор, US – активируемый супрессор, DA – подавляемый активатор, DS – подавляемый супрессор.

ции генов при реализации ответа на ауксин и солевой стресс у *A. thaliana*.

Ауксин – важнейший регулятор большинства процессов в растении, вовлечен в регуляцию переключения программ развития (Vanneste et al., 2025). Наиболее стандартным представлениям о регуляции переключения процессов соответствует замещение репрессора активатором, как, например, замещение репрессорного комплекса E2F ТФ на E2F активаторы перед началом клеточного цикла в промоторах многих генов растений и животных (van den Heuvel, Dyson, 2008; Sánchez-Camargo et al., 2021) или наоборот замещение транскрипционного активатора репрессором (Berlow et al., 2017). Однако результаты, полученные с помощью PlantReg 1.1, свидетельствуют о том, что в ответе на ауксин для подавления транскрипции вместо канонической смены активатор–репрессор может активно использоваться замена сильного активатора более слабым.

Как минимум некоторые предсказанные с помощью PlantReg 1.1 случаи замены сильного активатора более слабым поддерживаются ранее опубликованными результатами научных исследований. К ним относятся, например, замещение трех активаторов, bZIP3, bZIP68 и GBF3, более слабым активатором bZIP53 при подавлении ауксином экспрессии генов биосинтеза хлорофилла *CHLG*, *HME2* и *CH1* (Hummel et al., 2023). Конкуренция между ТФ семейства bZIP за общий сайт связывания и ее влияние на экспрессию гена-мишени ранее описаны для многих ТФ из этого семейства (Schindler et al., 1992; Foster et al., 1994; Ko, Brandizzi, 2022). Известно также, что ряд ТФ семейства bZIP взаимозаменяется и комплексно регулирует биосинтез хлорофилла. В частности, у тройного мутанта *gbf1 gbf2 gbf3* биосинтез хлорофилла нарушен, что демонстрирует важную роль GBF факторов в этом процессе (Sun T. et al., 2025). Сверхэкспрессия другого представителя семейства, *bZIP1*, приводит к уменьшению уровня хлорофилла, а менее выраженное снижение уровня хлорофилла и снижение уровня транскрипта *CHLG* по сравнению с диким типом ($p_{adj} = 0.03$) наблюдаются у двойного мутанта *bzip1 bzip53* (Wildenhain et al., 2025).

Специфичное для растений семейство ТФ BZR1/BES1 опосредует транскрипционный ответ на брацисностероиды (стероидные гормоны растений). В этом семействе наряду с ТФ BZR1 и BES1 представлены еще четыре ТФ, называемые гомологами BES1: BEH1, BEH2, BEH3, BEH4 (Shi et al., 2022). Сравнительно недавно к семейству BZR1/BES1 добавились еще два необычных ТФ, BAM7 и BMY2, сходных с β -амилазами, но демонстрирующих также очень слабую гомологию с BES1 (Reinhold et al., 2011). Эти ТФ не обладают амилазной каталитической активностью, но имеют домены типа BZR1, связывающиеся с сайтами, узнаваемыми ТФ семейства BZR1/BES1. BMY2 является активатором транскрипции, в то время как BAM7 регулирует его активность.

Ранее было высказано предположение, что BMY2 контролирует транскрипцию генов-мишней, противодействуя их регуляции другими ТФ семейства BZR1/BES1 посредством конкуренции с ними за сайты связывания (Reinhold et al., 2011). Согласно результатам, полученным с помощью PlantReg 1.1, именно это может происходить в про-

моторах ряда подавляемых ауксином генов, в том числе гена *UGT72B1* (*UDP-glucose-dependent glucosyltransferase 72 B1*), кодирующего фермент, конъюгирующий монолигнолы, где BMY2 (вероятно, как более слабый активатор) конкурирует с BEH2 (см. рис. 6, *d*, *e*; табл. S6 и S7).

Более детальный анализ генов-мишней пары ТФ BEH2 и BMY2, предсказанных с помощью PlantReg 1.1, позволяет добавить в описание механизма регуляции ауксином биосинтеза лигнина несколько важных деталей. Ауксин, активируя BMY2, препятствует самоактивации BEH2 путем конкурентного замещения ТФ BEH2 менее активным BMY2 на их общих сайтах связывания (см. рис. 5, *ж*, *з*). Это приводит к снижению уровня BEH2 в ядре, что в свою очередь способствует замещению этого ТФ на его сайтах в промоторе гена *UGT72B1* более слабым активатором BMY2 (см. рис. 5, *д*, *е*) и, как следствие, обусловливает снижение количества транскрипта *UGT72B1*. То, что BMY2 активирует экспрессию *UGT72B1*, было показано ранее по повышению уровня его транскрипта при сверхэкспрессии BMY2 и его снижению в двойном мутанте *bmy2 bam7* (Reinhold et al., 2011).

Примечательно, что ауксин подавляет транскрипцию большинства генов, кодирующих ферменты биосинтеза лигнина (Omelyanchuk et al., 2024), снижая таким образом биосинтез монолигнолов. Одновременно ауксин подавляет экспрессию *UGT72B1* и, как следствие, ингибирует конъюгацию монолигнолов, частично компенсируя таким образом снижение уровня монолигнолов. Интересно отметить, что брацисностероиды также модулируют уровень лигнина через ТФ BEH2. Брацисностероиды усиливают биосинтез лигнина через активацию большинства ферментов его биосинтеза (Percio et al., 2025). Одновременно они подавляют BEH2 с помощью GSK3 (GLYCOGEN SYNTHASE KINASE 3) подобных киназ и BES1 (Otani et al., 2022). Поскольку BEH2 стимулирует транскрипцию *UGT72B1*, который конъюгирует монолигноловы, брацисностероиды препятствуют оттоку монолигнолов из биосинтеза лигнина, тем самым дополнительно повышая уровень лигнина.

Данные, получаемые с помощью PlantReg 1.1, позволяют сформулировать конкретные гипотезы для планирования дальнейших экспериментальных исследований. Необходимо отметить, что прогноз может содержать ложноположительные результаты. Например, в паре ТФ HB21 (DA) и HB40 (US) из РСТФ-А, связывающих одни и те же сайты в промоторе подавляемого ауксином гена *bZIP50*, именно HB40 – более сильный активатор. Это значит, что конкуренция за СС с HB21 не может объяснить подавление экспрессии гена-мишени при повышении представленности HB40. Не исключено, что HB21 и HB40 экспрессируются в разных тканях или на разных стадиях развития. Чтобы объяснить, почему HB40, являющийся по природе активатором, может функционировать как репрессор, нужно исследовать возможности привлечения корепрессоров этим транскрипционным фактором.

Заключение

Программа PlantReg 1.1 предназначена для установления регуляторных связей между РСТФ и генами, которые обеспечивают протекание биологических процессов,

контролируемых этими сетями. В обновленной версии программа имеет функционал, позволяющий точно локализовать СС ТФ в промоторах генов-мишеней. Благодаря этому можно осуществлять анализ взаимного расположения СС ТФ и, привлекая данные о типе активности транскрипционных доменов этих ТФ, выявлять потенциальные случаи кооперативного или конкурентного действия ТФ в промоторе конкретного гена.

Программа PlantReg 1.1 была успешно использована для реконструкции транскрипционных механизмов регуляции биосинтеза хлорофилла и лигнина, биогенеза рибосом и ответа на АБК под действием ауксина и солевого стресса. Анализ взаимного расположения СС ТФ показал, что активность целого ряда генов, регулирующих эти процессы, может подавляться в результате конкуренции пары ТФ-активаторов за общий СС, когда более слабый активатор приходит на место более сильного. Часть полученных результатов поддержана литературными данными.

Таким образом, результаты, получаемые с помощью PlantReg 1.1, позволяют сформулировать гипотезы для планирования экспериментальных исследований. Следует, однако, подчеркнуть, что прогноз может содержать ложноположительные результаты. Сокращение их количества – одно из возможных направлений дальнейшего развития программы.

Список литературы / References

- Ahn J.H., Miller D., Winter V.J., Banfield M.J., Jeong H.L., So Y.Y., Henz S.R., Brady R.L., Weigel D. A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO J.* 2006;25(3):605-614. doi [10.1038/sj.emboj.7600950](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600950)
- Alonso R., Oñate-Sánechez L., Weltmeier F., Ehlert A., Diaz I., Dietrich K., Vicente-Carbajosa J., Dröge-Laser W. A pivotal role of the basic leucine zipper transcription factor bZIP53 in the regulation of *Arabidopsis* seed maturation gene expression based on heterodimerization and protein complex formation. *Plant Cell.* 2009;21(6): 1747-1761. doi [10.1105/tpc.108.062968](https://doi.org/10.1105/tpc.108.062968)
- Bailey T.L. STREME: accurate and versatile sequence motif discovery. *Bioinformatics.* 2021;37(18):2834-2840. doi [10.1093/bioinformatics/btab203](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab203)
- Berlow R.B., Dyson H.J., Wright P.E. Hypersensitive termination of the hypoxic response by a disordered protein switch. *Nature.* 2017; 543(7645):447-451. doi [10.1038/nature21705](https://doi.org/10.1038/nature21705)
- Blanc-Mathieu R., Dumas R., Turchi L., Lucas J., Parcy F. Plant-TFClass: a structural classification for plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 2024;29(1):40-51. doi [10.1016/j.tplants.2023.06.023](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.06.023)
- Boyle P., Després C. Dual-function transcription factors and their entourage: unique and unifying themes governing two pathogenesis-related genes. *Plant Signal Behav.* 2010;5(6):629-634. doi [10.4161/psb.5.6.11570](https://doi.org/10.4161/psb.5.6.11570)
- Brackmann K., Qi J., Gebert M., Jouannet V., Schlamp T., Grünwald K., Wallner E.-S., Novikova D.D., Levitsky V.G., Agustí J., Sanchez P., Lohmann J.U., Greb T. Spatial specificity of auxin responses coordinates wood formation. *Nat Commun.* 2018;9(1):875. doi [10.1038/s41467-018-03256-2](https://doi.org/10.1038/s41467-018-03256-2)
- Cheng C.Y., Krishnakumar V., Chan A.P., Thibaud-Nissen F., Schobel S., Town C.D. Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *Plant J.* 2017;89(4):789-804. doi [10.1111/tpj.13415](https://doi.org/10.1111/tpj.13415)
- Chupreta S., Brevig H., Bai L., Merchant J.L., Iñiguez-Lluhí J.A. Sumoylation-dependent control of homotypic and heterotypic synergy by the Krüppel-type zinc finger protein ZBP-89. *J Biol Chem.* 2007;282(50):36155-36166. doi [10.1074/jbc.M708130200](https://doi.org/10.1074/jbc.M708130200)
- De Rybel B., Audenaert D., Xuan W., Overvoorde P., Strader L.C., Kepinski S., Hoye R., Brisbois R., Parizot B., Vanneste S., Liu X. A role for the root cap in root branching revealed by the non-auxin probe naxillin. *Nat Chem Biol.* 2012;8(9):798-805. doi [10.1038/ncchembio.1044](https://doi.org/10.1038/ncchembio.1044)
- Deshpande D., Chhugani K., Chang Y., Karlsberg A., Loeffler C., Zhang J., Muszyńska A., ... Eskin E., Zhao F., Mohammadi P., Labaj P., Mangul S. RNA-seq data science: from raw data to effective interpretation. *Front Genet.* 2023;14:997383. doi [10.3389/fgene.2023.997383](https://doi.org/10.3389/fgene.2023.997383)
- Dhatterwal P., Sharma N., Prasad M. Decoding the functionality of plant transcription factors. *J Exp Bot.* 2024;75(16):4745-4759. doi [10.1093/jxb/erae231](https://doi.org/10.1093/jxb/erae231)
- Foster R., Izawa T., Chua N.H. Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. *FASEB J.* 1994;8(2):192-200. doi [10.1096/fasebj.8.2.8119490](https://doi.org/10.1096/fasebj.8.2.8119490)
- Gupta S., Stamatoyannopoulos J.A., Bailey T.L., Noble W.S. Quantifying similarity between motifs. *Genome Biol.* 2007;8(2):R24. doi [10.1186/gb-2007-8-2-r24](https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r24)
- Hanna-Rose W., Hansen U. Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *Trends Genet.* 1996;12(6):229-234. doi [10.1016/0168-9525\(96\)10022-6](https://doi.org/10.1016/0168-9525(96)10022-6)
- Huang W., Quan M., Qi W., Xiao L., Fang Y., Zhou J., Ren T., Li P., Chen Y., El-Kassaby Y.A., Du F., Zhang D. Phylostratigraphic analysis revealed that ancient ohnologue *PtoWRKY53* innovated a vascular transcription regulatory network in *Populus*. *New Phytol.* 2025;248:2295-2315. doi [10.1111/nph.70403](https://doi.org/10.1111/nph.70403)
- Hummel N.F.C., Zhou A., Li B., Markel K., Ornelas I.J., Shih P.M. The trans-regulatory landscape of gene networks in plants. *Cell Syst.* 2023;14(6):501-511.e4. doi [10.1016/j.cels.2023.05.002](https://doi.org/10.1016/j.cels.2023.05.002)
- Ko D.K., Brandizzi F. Network-based approaches for understanding gene regulation and function in plants. *Plant J.* 2020;104(2):302-317. doi [10.1111/tpj.14940](https://doi.org/10.1111/tpj.14940)
- Ko D.K., Brandizzi F. Transcriptional competition shapes proteotoxic ER stress resolution. *Nat Plants.* 2022;8(5):481-490. doi [10.1038/s41477-022-01150-w](https://doi.org/10.1038/s41477-022-01150-w)
- Lamesch P., Berardini T.Z., Li D., Swarbreck D., Wilks C., Sasidharan R., Muller R., ... Nelson W.D., Ploetz L., Singh S., Wensel A., Huala E. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(D1): D1202-D1210. doi [10.1093/nar/gkr1090](https://doi.org/10.1093/nar/gkr1090)
- Lavrekha V.V., Levitsky V.G., Tsukanov A.V., Bogomolov A.G., Grigorovich D.A., Omelyanchuk N., Ubogoeva E.V., Zemlyanskaya E.V., Mironova V. CisCross: a gene list enrichment analysis to predict upstream regulators in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.* 2022;13: 942710. doi [10.3389/fpls.2022.942710](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.942710)
- Lavrekha V.V., Omelyanchuk N.A., Bogomolov A.G., Zemlyanskaya E.V. PlantReg: the reconstruction of links between transcription factor regulatory networks and biological processes under their control. *Vavilov J Genet Breed.* 2024;28(8):950-959. doi [10.18699/vjgb-24-102](https://doi.org/10.18699/vjgb-24-102)
- Leong R., He X., Beijen B.S., Sakai T., Goncalves J., Ding P. Unlocking gene regulatory networks for crop resilience and sustainable agriculture. *Nat Biotechnol.* 2025;43(8):1254-1265. doi [10.1038/s41587-025-02727-4](https://doi.org/10.1038/s41587-025-02727-4)
- Marshall-Colón A., Kliebenstein D.J. Plant networks as traits and hypotheses: moving beyond description. *Trends Plant Sci.* 2019;24(9): 840-852. doi [10.1016/j.tplants.2019.06.003](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.06.003)
- Martínez C., Espinosa-Ruiz A., de Lucas M., Bernardo-García S., Franco-Zorrilla J.M., Prat S. PIF 4-induced BR synthesis is critical to diurnal and thermomorphogenic growth. *EMBO J.* 2018;37(23): e99552. doi [10.15252/embj.201899552](https://doi.org/10.15252/embj.201899552)
- Nagahage I.S.P., Sakamoto S., Nagano M., Ishikawa T., Kawai-Yamada M., Mitsuda N., Yamaguchi M. An NAC domain transcription factor ATAF2 acts as transcriptional activator or repressor dependent on promoter context. *Plant Biotechnol.* 2018;35(3):285-289. doi [10.5511/plantbiotechnology.18.0507a](https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.18.0507a)

- O'Malley R.C., Huang S.C., Song L., Lewsey M.G., Bartlett A., Nery J.R., Galli M., Gallavotti A., Ecker J.R. Cistrome and epicistrome features shape the regulatory DNA landscape. *Cell.* 2016; 165(5):1280-1292. doi [10.1016/j.cell.2016.04.038](https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.038)
- Omelyanchuk N.A., Lavrekha V.V., Bogomolov A.G., Dolgikh V.A., Sidorenko A.D., Zemlyanskaya E.V. Computational reconstruction of the transcription factor regulatory network induced by auxin in *Arabidopsis thaliana* L. *Plants.* 2024;13(14):1905. doi [10.3390/plants13141905](https://doi.org/10.3390/plants13141905)
- Otani Y., Kawanishi M., Kamimura M., Sasaki A., Nakamura Y., Nakamura T., Okamoto S. Behavior and possible function of *Arabidopsis* BES1/BZR1 homolog 2 in brassinosteroid signaling. *Plant Signal Behav.* 2022;17(1):2084277. doi [10.1080/1592324.2022.2084277](https://doi.org/10.1080/1592324.2022.2084277)
- Park P.J. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat Rev Genet.* 2009;10(10):669-680. doi [10.1038/nrg2641](https://doi.org/10.1038/nrg2641)
- Percio F., Rubio L., Amorim-Silva V., Botella M.A. Crucial roles of brassinosteroids in cell wall composition and structure across species: new insights and biotechnological applications. *Plant Cell Environ.* 2025;48(3):1751-1767. doi [10.1111/pce.15258](https://doi.org/10.1111/pce.15258)
- Raditsa V.V., Tsukanov A.V., Bogomolov A.G., Levitsky V.G. Genomic background sequences systematically outperform synthetic ones in de novo motif discovery for ChIP-seq data. *NAR Genomics Bioinform.* 2024;6(3):lqae090. doi [10.1093/nargab/lqae090](https://doi.org/10.1093/nargab/lqae090)
- Rauluseviciute I., Riudavets-Puig R., Blanc-Mathieu R., Castro-Mondragon J.A., Ferenc K., Kumar V., Lemma R.B., ... Lenhard B., Sandelin A., Wasserman W.W., Parcy F., Mathelier A. JASPAR 2024: 20th anniversary of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* 2024;52(D1):D174-D182. doi [10.1093/nar/gkad1059](https://doi.org/10.1093/nar/gkad1059)
- Reinhold H., Soyk S., Simková K., Hostettler C., Marafino J., Maiñero S., Vaughan C.K., Monroe J.D., Zeeman S.C. β -amylase-like proteins function as transcription factors in *Arabidopsis*, controlling shoot growth and development. *Plant Cell.* 2011;23(4):1391-1403. doi [10.1105/tpc.110.081950](https://doi.org/10.1105/tpc.110.081950)
- Ren G., Cui K., Zhang Z., Zhao K. Division of labor between IRF1 and IRF2 in regulating different stages of transcriptional activation in cellular antiviral activities. *Cell Biosci.* 2015;5(1):17. doi [10.1186/s13578-015-0007-0](https://doi.org/10.1186/s13578-015-0007-0)
- Rybakov M.A., Omelyanchuk N.A., Zemlyanskaya E.V. Reconstruction of gene regulatory networks from single cell transcriptomic data. *Vavilov J Genet Breed.* 2024;28(8):974-981. doi [10.18699/vjgb-24-104](https://doi.org/10.18699/vjgb-24-104)
- Sánchez-Camargo V.A., Romero-Rodríguez S., Vázquez-Ramos J.M. Non-canonical functions of the E2F/DP pathway with emphasis in plants. *Phyton.* 2021;90(2):307-330. doi [10.32604/phyton.2021.014967](https://doi.org/10.32604/phyton.2021.014967)
- Schindler U., Beckmann H., Cashmore A.R. TGA1 and G-box binding factors: two distinct classes of *Arabidopsis* leucine zipper proteins compete for the G-box-like element TGACGTGG. *Plant Cell.* 1992;4(10):1309-1319. doi [10.1105/tpc.4.10.1309](https://doi.org/10.1105/tpc.4.10.1309)
- Selvaraj N., Budka J.A., Ferris M.W., Plotnik J.P., Hollenhorst P.C. Extracellular signal-regulated kinase signaling regulates the opposing roles of JUN family transcription factors at ETS/AP-1 sites and in cell migration. *Mol Cell Biol.* 2015;35(1):88-100. doi [10.1128/mcb.00982-14](https://doi.org/10.1128/mcb.00982-14)
- Shi H., Li X., Lv M., Li J. BES1/BZR1 family transcription factors regulate plant development via brassinosteroid-dependent and independent pathways. *Int J Mol Sci.* 2022;23(17):10149. doi [10.3390/ijms231710149](https://doi.org/10.3390/ijms231710149)
- Su K., Katebi A., Kohar V., Clauss B., Gordin D., Qin Z.S., Karuturi R.K.M., Li S., Lu M. NetAct: a computational platform to construct core transcription factor regulatory networks using gene activity. *Genome Biol.* 2022;23(1):270. doi [10.1186/s13059-022-02835-3](https://doi.org/10.1186/s13059-022-02835-3)
- Sun T., Hazra A., Lui A., Zeng S., Wang X., Rao S., Owens L.A., Fei Z., Zhao Y., Mazourek M., Giovannoni J.G., Li L. GLKs directly regulate carotenoid biosynthesis via interacting with GBFs in plants. *New Phytol.* 2025;246(2):645-665. doi [10.1111/nph.20457](https://doi.org/10.1111/nph.20457)
- Sun Y., Li J., Huang J., Li S., Li Y., Lu B., Deng X. Architecture of genome-wide transcriptional regulatory network reveals dynamic functions and evolutionary trajectories in *Pseudomonas syringae*. *eLife.* 2025;13:RP96172. doi [10.7554/eLife.96172](https://doi.org/10.7554/eLife.96172)
- Tamura T., Sakata T., Igarashi H., Okumura K. Transcription factor HUB1 represses SP1-mediated gene expression through the CACCC box of HTLV-I U5RE but not the GC box. *J Health Sci.* 2004;50(4):417-422. doi [10.1248/jhs.50.417](https://doi.org/10.1248/jhs.50.417)
- Tremblay B.J.M. universalmotif: an R package for biological motif analysis. *J Open Source Software.* 2024;9(100):7012. doi [10.21105/joss.07012](https://doi.org/10.21105/joss.07012)
- van den Heuvel S., Dyson N.J. Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(9):713-724. doi [10.1038/nrm2469](https://doi.org/10.1038/nrm2469)
- Vanneste S., Pei Y., Friml J. Mechanisms of auxin action in plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2025;26(9):648-666. doi [10.1038/s41580-025-00851-2](https://doi.org/10.1038/s41580-025-00851-2)
- Veerabagu M., Kirchler T., Elgass K., Stadelhofer B., Stahl M., Harter K., Mira-Rodado V., Chaban C. The interaction of the *Arabidopsis* response regulator ARR18 with bZIP63 mediates the regulation of PROLINE DEHYDROGENASE expression. *Mol Plant.* 2014;7(10):1560-1577. doi [10.1093/mp/ssu074](https://doi.org/10.1093/mp/ssu074)
- Wang L., Ko E.E., Tran J., Qiao H. TREE1-EIN3-mediated transcriptional repression inhibits shoot growth in response to ethylene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117(46):29178-29189. doi [10.1073/pnas.2018735117](https://doi.org/10.1073/pnas.2018735117)
- Weirauch M.T., Yang A., Albu M., Cote A.G., Montenegro-Montero A., Drewe P., Najafabadi H.S., ... Bouget F.Y., Ratsch G., Larondo L.F., Ecker J.R., Hughes T.R. Determination and inference of eukaryotic transcription factor sequence specificity. *Cell.* 2014;158(6):1431-1443. doi [10.1016/j.cell.2014.08.009](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.009)
- Weltmeier F., Rahmani F., Ehler A., Dietrich K., Schütze K., Wang X., Chaban C., Hanson J., Teige M., Harter K., Vicente-Carbajosa J., Smeekens S., Dröge-Laser W. Expression patterns within the *Arabidopsis* C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development. *Plant Mol Biol.* 2009;69(1):107-119. doi [10.1007/s11103-008-9410-9](https://doi.org/10.1007/s11103-008-9410-9)
- Wildenhain T., Smacziak C., Marsell A., Draken J., Maag D., Kreisz P., Krischke M., Müller M.J., Kaufmann K., Weiste C., Dröge-Laser W. A subset of group S₁ bZIP transcription factors controls resource management during starvation and recovery in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2025;37(7):koaf149. doi [10.1093/plcell/koaf149](https://doi.org/10.1093/plcell/koaf149)
- Wu T., Goh H., Azodi C.B., Krishnamoorthi S., Liu M.J., Urano D. Evolutionarily conserved hierarchical gene regulatory networks for plant salt stress response. *Nat Plants.* 2021;7(6):787-799. doi [10.1038/s41477-021-00929-7](https://doi.org/10.1038/s41477-021-00929-7)
- Zhang X., Li L., Fourie J., Davie J.R., Guarcello V., Diasio R.B. The role of Sp1 and Sp3 in the constitutive DPYD gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1759(5):247-256. doi [10.1016/j.bbapap.2006.05.001](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.05.001)
- Zemlyanskaya E.V., Dolgikh V.A., Levitsky V.G., Mironova V. Transcriptional regulation in plants: using omics data to crack the cis-regulatory code. *Curr Opin Plant Biol.* 2021;63:102058. doi [10.1016/j.pbi.2021.102058](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102058)