

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Казанский (Приволжский) Федеральный  
Университет»**

**Институт фундаментальной медицины и биологии  
Кафедра микробиологии**

Направление подготовки (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (магистерская программа): Микробиология и вирусология

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ  
РОЛЬ ПРЕНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ И  
ОТВЕТА НА СТРЕСС У РАСТЕНИЙ *MARCHANTIA POLYMORPHA***

Обучающийся 2 курса  
группы 01-240-2



Кулаженко М.С.

Научный руководитель  
к.б.н., доцент



Данилова Ю.В.

Научный руководитель  
к.б.н., старший научный сотрудник



Валеева Л.Р.

Заведующий кафедрой микробиологии  
д-р биол. наук, профессор



Ильинская О.Н.

Казань – 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	<b>4</b>
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>6</b>
1.1 Пренилирование как важнейший механизм посттрансляционной модификации белков	6
1.2 Пренилированные белки растений в ответной реакции на стресс	20
1.2.1 Роль пренилирования белков в ответе на абиотический стресс	20
1.2.2 Абиотический стресс и стабильность хроматина растений	24
1.3 Модельное растение <i>Marchantia polymorpha</i>	26
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	<b>31</b>
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	<b>31</b>
2.1 Культуры растений <i>Marchantia polymorpha</i> и условия роста	31
2.2 Штаммы бактерий и плазмиды	31
2.3 Создание генетической конструкции	34
2.3.1 Получение векторных конструкций	34
2.3.2 Трансформация штаммов <i>E.coli</i>	36
2.4 Трансформация и селекция растений	36
2.4.1 Подготовка растений к трансформации	36
2.4.2 Подготовка культуры <i>A. tumefaciens</i>	36
2.4.3 Трансформация	37
2.5 Отбор линий растений-мутантов	38
2.5.1 Выделение ДНК из растений	38
2.5.2 ПЦР	38
2.6 Анализ роста растений в присутствии ионов тяжелых металлов	39
2.8 Измерение концентрации пероксида водорода в тканях растений	40
2.9 TRF-анализ длины теломер	41
2.10 Статистическая обработка данных	41
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	<b>42</b>
3.1 Получение векторной конструкции на основе CRISPR/Cas9 редактирования генома для нокаутирования гена <i>MrPLP</i> в <i>M. polymorpha</i>	42
3.3 Анализ роли пренилирования белков в защитных механизмах растений в условиях абиотического стресса	51
<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>60</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	<b>61</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Пренилирование является одним из важнейших видов посттрансляционной модификации белков большинства живых организмов, обуславливающий локализацию и функциональное разнообразие белков. Пренилированные белки задействованы в большом разнообразии различных клеточных механизмов, в первую очередь связанных с плазматической и внутриклеточными мембранами, включая сигнальную трансдукцию, модификацию мембран и клеточной стенки, адгезию и полярный рост клеток, а также участвуют в регуляции ответа на биотические и абиотические факторы стресса. Большое разнообразие пренилированных белков идентифицировано у многоклеточных растений, однако весь спектр их функций до сих пор остается неизвестным. В модификации белков участвуют три типа пренилтрансфераз: фарнезилтрансфераза (PFT), геранилгеранилтрансфераза-I (PGGT) и Rab-геранилгеранилтрансфераза (Rab-GGT), нарушение функционирования которых напрямую влияет на рост и развитие растений. Использование *Marchantia polymorpha* – представителя наиболее древней группы наземных растений, бриофитов, – в качестве модельного организма в изучении роли пренилирования белков растений дает возможность получить новые данные о роли пренилирования белков в развитии многоклеточных тканей растений и ответных реакциях на стресс.

Цель работы – изучение роли пренилирования белков в регуляции развития и ответа на стресс у растений *M. polymorpha*.

В связи с поставленной целью нами решались следующие задачи:

- 1) Получение векторной конструкции для нокаутирования гена *MpPLP*  $\alpha$ -субъединицы пренилтрансфераз MpPFT/MpPGGT растений *M. polymorpha* методом CRISPR/Cas9 редактирования генома.

- 2) Получение растений-нокаутов *M. polymorpha* по гену *MrPLP* .
- 3) Определение влияния тяжелых металлов на рост, стабильность геномной ДНК и развитие оксидативного стресса в растениях-нокаутах по гену *MrPLP*.
- 4) Анализ длины теломер у растений-нокаутов по гену *MrPLP* как маркера повреждений ДНК в условиях стресса.

## ВЫВОДЫ

- 1) Получены рекомбинантные плазмиды pMpGE\_Ep03:plp1g и 2 pMpGE\_Ep03:plp2g для нокаутирования гена  $\alpha$ -субъединицы пренилтрансфераз белков *MpPLP* *M. polymorpha* методом CRISPR\Cas9 редактирования.
- 2) Получены пять индивидуальных линий растений-нокаутов *M. polymorpha* по гену *MpPLP*. Показано, что мутация в гене *MpPLP* приводит к формированию дефектного таллома, характеризующегося отсутствием дорсо-вентральной симметрии и нормальной дифференциации клеток.
- 3) Установлено, что нокаутирование гена *MpPLP* не приводит к изменению жизнеспособности клеток растений в условиях стресса, вызванных ионами тяжелых металлов. Выявлено изменение концентрации перекиси водорода в клетках растений дикого типа и линий-нокаутов в зависимости от присутствия в среде ионов цинка.
- 4) Показано, что растения-нокаутов по гену *MpPLP* обладают более длинными теломерами по сравнению с диким типом растений и менее чувствительны к стрессу, вызванному ионами тяжелых металлов. Установлена корреляция между длиной теломер и концентрацией АФК.