

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: 06.03.01 – Биология
Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
РОЛЬ ПРЕНИЛТРАНСФЕРАЗ В ФОРМИРОВАНИИ ТАЛЛОМА
MARCHANTIA POLYMORPHA

Студент 4 курса
группы 01-806

"31" мая 2022 г.  (Кулаженко М.С.)

Научные руководители
к.б.н., старший научный сотрудник

"31" мая 2022 г.  (Данилова Ю.В.)

к.б.н., старший научный сотрудник

"31" мая 2022 г.  (Валеева Л.Р.)

Заведующий кафедрой
микробиологии

д.б.н., профессор

"31" мая 2022 г.  (Ильинская О.Н.)

Казань – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1 Пренилтрансферазы белков	7
1.1.1 Строение пренилтрансфераз белков	9
1.1.2 Функции пренилтрансераз белков	11
1.1.3 Пренилированные белки и их роль в развитии растений.	13
1.1.4 Rab-геранилгеранилтраснфераза: белки-мишени и роль в сигнальной трансдукции.	19
1.2 <i>Marchantia polymorpha</i> .	23
1.3 Заключение	24
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	
2.1 Культуры растений и условия выращивания	
2.2 Культуры бактерий и условия культивирования	26
2.3 Агробактериальная трансформация растений	27
2.4 Выделение ДНК, генотипирование и отбор мутантов	29
2.5 Выделение РНК, синтез кДНК и ОТ-ПЦР	30
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	
3.1 Получение штаммов агробактерий с интегрированной бинарной	33

плазмидой

3.2 Получение растений-нокаутов по генам Rab-геранилгеранилтрансферазы. 37

3.3 Анализ экспрессии генов-кандидатов белков, регулируемых пренилированием. 41

ВЫВОДЫ 47

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 48

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее важных типов посттрансляционной модификации белковых молекул является пренилирование – присоединение изопренолового остатка (фарнезила C15 или геранилгеранила C20). 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. Большое разнообразие пренилированных белков идентифицировано у многоклеточных животных и растений, однако весь спектр их функций до сих пор остается неизвестным. Тем самым, определение роли пренилирования и участия пренилированных белков в регуляции роста и развития тканей является одним из направлений в исследовании многоклеточности. Изучение пренилтрансфераз и пренилируемых белков бриофитов представляет неподдельный интерес, так как эта группа растений является одной из древнейших многоклеточных наземных растений, а значит, открывает новые возможности для изучения не только процессов развития растений и их многоклеточности, но и филогенетических связей внутри этого царства. В модификации белков участвуют три типа пренилтрансфераз, наиболее специфичной из которых является Rab-геранилгеранилтрансфераза (Rab-GGT. Однако мало известно о функционировании растительных Rab-GGT. Использование печеночного мха *Marchantia polymorpha* – представителя наиболее древней группы наземных растений – в качестве модельного организма в изучении роли пренилирования белков растений дает возможность получить данные также о эволюции регуляторных путей пренилирования.

Цель работы – изучение роли Rab-геранилгеранилтрансферазы в развитии *Marchantia polymorpha* и идентификация белков-кандидатов,

регулируемых пренилированием, участвующих в регуляции многоклеточного таллома растений.

В связи с поставленной целью нами решались следующие задачи:

- 1) Получение штаммов *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 с интегрированной бинарной плазмидой для нокаутирования генов Rab-геранилгеранилтрансферазы методом CRISPR\Cas9 редактирования.
- 2) Получение растений-нокаутов *Marchantia polymorpha* по генам субъединиц Rab-геранилгеранилтрансферазы.
- 3) Анализ экспрессии генов-кандидатов белков, регулируемых пренилированием, *M. polymorpha*

ВЫВОДЫ

- 1) Получены штаммы *A. tumefaciens* GV2026 с интегрированными бинарными плазмидами pMpGE_011::sgRNA для нокаутирования генов Rab-геранилгеранилтрансферазы *M. polymorpha* методом CRISPR/Cas9 редактирования.
- 2) Установлено, что нокаутирование генов α - и β -субъединиц Rab-геранилгеранилтрансферазы *M. polymorpha* приводит к формированию летального фенотипа растений. Показано, что мутация в интронном регионе гена RGTB не оказывает влияния на жизнеспособность и развитие *M. polymorpha*.
- 3) Установлено, что гены-кандидаты VKA7 (Mapoly0037s0115) и XVC8 (Mapoly0001s0098), кодирующие белок с фитоцианиновым доменом и лектин-подобный белок, соответственно, экспрессируются только в растениях-нокаутах, но не в растениях дикого типа.