

Влияние ионов тяжелых металлов на длину теломер у *Marchantia polymorpha*

А.В. Санникова^{1*}, М.Р. Шарипова¹, Е.В. Шакиров^{1,2}, Л.Р. Валеева^{1,2}

¹ Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

² Department of Biological Sciences, College of Science, Marshall University, USA

* anastasya.sannikova@bk.ru

Цель: Определить влияние абиотического стресса, в частности ионов тяжёлых металлов на длину теломер бриофита *Marchantia polymorpha* дикого типа и линиях, мутантных по генам-кандидатам теломерного белкового комплекса и нарушению развития таллома.

Материалы и методы: В работе использовали культуру модельного печеночника *M. polymorpha* Takaragaike-1 (Tak-1, мужское растение; Япония) и Takaragaike-2 (Tak-2, женское растение; Япония). Мутантные линии *M. polymorpha* по генам-кандидатам белков теломерного комплекса *MpTRFL* (Tak-1) и *MpTBP* (Tak-2), а также мутантные растения по гену α -субъединицы пренилтрансфераз белков *MpPLP* были получены методом CRISPR/Cas9 редактирования генома. Для анализа изменения ответных реакций растений дикого типа и растений-нокаутов на абиотический стресс ткани дикого типа и ткани мутантов выращивали на среде GB5 в стандартных условиях: дикий тип и мутантные линии *MpTRFL* и *MpTBP* – в течение 14 дней, ткани мутантов *MpPLP* – за 28 дней к началу эксперимента. Переносили растения на среду GB5 с добавлением 2 mM $ZnCl_2$ и выращивали в течение 7 дней. Далее ткани отбирали для анализа длины теломер методом TRF analysis (анализ терминальных рестрикционных фрагментов) совместно с Саузерн-блот анализом. Среднюю длину теломер рассчитывали с помощью программы WALTER.

Результаты: 1) Нами были получены растения-нокауты по генам *MpTRFL* и *MpTPB*, гомологичным генам *AtTRFL6* и *AtTBP2* *A. thaliana*, которые, в свою очередь, являются гомологами TRF белков шелтеринового комплекса теломер человека. Было показано, что растения-нокауты по гену *MpTRFL* имеют нарушения в развитии таллома. Также были получены растения-нокауты по гену *MpPLP* α -субъединицы пренилтрансфераз белков, регулирующих многочисленные процессы в растениях, в том числе ответ на абиотический стресс и клеточную адгезию. Мутанты *MpPLP* имели серьезные нарушения в развитии таллома. На среде с $ZnCl_2$ растения оставались жизнеспособными в течение 8 суток. На 6–7-е сутки у всех растений на среде с $ZnCl_2$ на поверхности таллома образовывалась влага, растения замедлялись в росте, визуально наблюдалось появление некротических зон на краевых участках талломов дикого типа, а также в тканях растений-нокаутов.

2) Мы сравнили распределение длин теломер у дикого вида печеночника *M. polymorpha*. TRF-анализ показал, что среднее значения длины теломер у мужского растения (Tak-1) составляет $2,15 \pm 0,25$ т.п.о. у женского растения (Tak-2) длина теломер составляет $2,45 \pm 0,25$ т.п.о. Женская линия имела более длинные теломеры, в связи с чем, длину теломер мутантных линий растений сравнивали с соответствующим диким типом. В свою очередь, рост в присутствии ионов Zn^{2+} приводил к небольшому уменьшению среднего значения длины теломер у растений дикого типа примерно на 100 т.п.о.

3) Было показано, что средняя длина теломер растений-нокаутов *MpTRFL*, в исследуемом гене которых произошла инсерция 12 п.о., примерно на 300 т.п.о. меньше, чем в диком типе и составляет ~ 1750 т.п.о. Как у растений-нокаутов по гену *MpTRFL*, так и у растений дикого типа при росте на среде с добавлением ионов Zn^{2+} среднее значение длины теломер увеличивалось на 100–200 т.п.о., и составляло ~ 2000 и ~ 2200 т.п.о. соответственно.

4) Средняя длина теломер растений-нокаутов *MpTBP* в исследуемом гене которых произошла делеция основания, составляет ~ 2000 т.п.о., что на 450 т.п.о. меньше, чем в диком типе, однако, рост в присутствии ионов Zn^{2+} также приводил к небольшому увеличению среднего значения длины теломер примерно на 125 т.п.о., и составлял ~ 2125 т.п.о.

5) Мы также проанализировали длину теломер в мутантном растении Tak-1 *MpPLP*. Средние значения TRF составляет ~ 1650 т.п.о., что на 500 т.п.о. меньше, чем в диком типе. Однако в отличие от растений дикого типа у растений-нокаутов по гену *MpPLP* при росте на среде с добавлением ионов Zn^{2+} среднее значение длины теломер не изменялось.

Выводы: Нами показано, что два обнаруженных гена-кандидата белков теломерного комплекса участвуют в регуляции длины теломер *M. polymorpha*. Кроме того, было показано, что тяжелые металлы ($ZnCl_2$) влияют на длину теломер: стрессовые условия приводили к удлинению теломер как дикого типа, так и нокаутов по теломерным генам. Кроме того, было показано, что мутация в гене пренилтрансферазы белков *MpPLP* приводит не только к нарушению формирования таллома и дифференцировки клеток, но также к изменению в регуляции стабильности хроматина, в частности поддержания длины теломер. При этом в условиях стресса от ионов цинка мутанты *MpPLP* сохраняют стабильную длину теломер.

Финансирование: Работа выполнена в рамках программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».