

УДК 577.15;577.21

**цис-ПРЕНИЛТРАНСФЕРАЗЫ *Marchantia polymorpha*:  
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ПЕРСПЕКТИВЫ  
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ РЕГУЛЯТОРОВ СИНТЕЗА  
АНТИМИКРОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

© 2022 г. Л. Р. Валеева<sup>а, \*</sup>, С. М. Джабраилова<sup>а</sup>, М. Р. Шарипова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

\*e-mail: liarvaleeva@gmail.com

Поступила в редакцию 29.03.2022 г.

После доработки 10.06.2022 г.

Принята к публикации 16.06.2022 г.

Синтез вторичных метаболитов играет одну из центральных ролей в выживании растений и их устойчивости к биотическому и абиотическому стрессу. Менее изученными, как с фундаментальной, так и с практической точки зрения, остаются растительные полиизопренолы, хотя их широкое распространение в растениях указывает на важную роль в клеточном метаболизме. Полиизопренолы растений синтезируются цис-пренилтрансферазами (CPTs), поэтому изучение этих ферментов необходимо для понимания путей синтеза, локализации и функций полиизопренолов растений. К уникальной группе растений, обладающей большим потенциалом для проведения исследований CPTs, относятся бриофиты, в том числе печеночный мох *Marchantia polymorpha*. Нами проведен биоинформатический анализ генов CPTs в геноме бриофита *M. polymorpha* и идентифицировано семь, гомологичных генам *AtCPT7* и *AtCPT3 Arabidopsis thaliana*, участвующим в синтезе полиизопренолов. Получены четыре индивидуальные линии растений-мутантов *M. polymorpha* по гену *MpCPT7.37*. Показано, что в трех линиях мутация приводила к сдвигу рамки считывания и нокауту этого гена. Однако нокаут только одной из CPTs типа 7 не оказывал влияния на рост и выживаемость растений. Выявлено, что антибактериальная активность экстрактов тканей растений-мутантов значительно не отличалась от растений дикого типа, что указывает на возможный компенсаторный эффект, обусловленный активностью других CPTs типа 7. Полученные данные предваряют дальнейшие исследования CPTs бриофитов и продуктов их синтеза.

**Ключевые слова:** цис-пренилтрансферазы, полиизопренолы, бриофиты, *Marchantia polymorpha*, вторичные метаболиты, антибактериальная активность, CRISPR/Cas9

**DOI:** 10.31857/S0026898422060234

В ходе эволюции растения выработали множество стратегий адаптации к абиотическим и биотическим стрессам путем изменений в регуляции и формировании новых метаболических путей, включая синтез большого разнообразия вторичных метаболитов [1, 2]. Несмотря на разнообразие, для большинства вторичных метаболитов растений характерны кóровые структуры, составляющие основу новых химических соединений, претерпевающие модификацию путем гликозилирования, ацилирования, метилирования и др. [2]. Один из типов модификаций метаболитов — пренилирование, играющее значимую роль в формировании метаболома. Процесс пренилирования метаболитов заключается в присоединении

изопреноидного остатка к акцепторной молекуле, в качестве которой могут выступать ароматические соединения и сами изопреноиды. К последним относятся такие соединения, как стероидные гормоны, каротиноиды, ароматические метаболиты, убихиноны с изопреноидными боковыми цепями и др. [3]. Также пренилирование играет основную роль в дифференциации ароматических соединений растений, таких как фенилпропаноиды, флавоноиды и кумарины. Кроме того, зачастую пренилированные метаболиты обладают более выраженной противоопухолевой и антимикробной активностью по сравнению с их непренилированными предшественниками. Это объясняет растущий интерес к их изучению как потенциально новых препаратов для медицины и промышленности [4–6]. Однако, в отличие от пренилированных ароматических соединений

Сокращения: CPTs (*cis*-prenyltransferases) — цис-пренилтрансферазы.

растений, практически не изученной, как с фундаментальной, так и практической точки зрения, остается другая группа вторичных метаболитов, обладающих изопреноидной структурой, – полиизопренолы.

Полиизопренолы представляют собой длинноцепочечные молекулы, состоящие из изопреновых остатков, синтезируемые в клетках организмов различных таксонов. Большинство организмов способно синтезировать два типа таких соединений: ненасыщенные полиизопренолы (полипренолы) и насыщенные полиизопренолы (долихолы). Их соотношение в клетках варьирует у разных видов, а их локализация отличается тканеспецифичностью [7, 8]. Многие растения также содержат большое разнообразие коротко- и среднецепочечных полипренолов (C10–C40 и C40–C65), а также долихолы, в состав которых у растений входит от 70 до 100 атомов углерода. В то время как длинноцепочечные долихолы и их полипреноловые предшественники находят в различных тканях растений, молекулы C40–C65 в основном обнаруживают в пластидах, а короткоцепочечные – в основном в клетках корней, а также в трихомах, черешках и тканях листьев [9].

Функции растительных полипренолов малоизучены, однако их широкое распространение в клетках и тканях всех растений предполагает важную роль в жизненном цикле последних [7, 8]. Изменения в метаболизме полиизопренолов происходят в процессе развития клеток и тканей, а также под влиянием различных внешних факторов и стрессовых стимулов [8]. Долихолы, аккумулированные в мембранах клеток эндоплазматического ретикулума (ЭПР) растений, как и большинства эукариот, участвуют в регуляции *N*-гликозилирования белков и последующем направлении белковых молекул по секреторному пути [9]. Тем самым изучение полиизопренолов имеет важное значение для понимания их участия в функционировании организма в целом.

Кроме того, изучение полиизопренолов имеет практическое значение, так как их рассматривают в качестве потенциальных биологически активных соединений, в частности антимикробных агентов. Так, показано, что полипренолы из тканей растений гинкго (*Ginkgo biloba* L.) и шелковицы (*Morus alba* L.) обладают антибактериальным действием в отношении грамположительных и грамотрицательных патогенных бактерий [10].

Основные ферменты, участвующие в метаболическом пути синтеза полиизопренолов растений, – *цис*-пренилтрансферазы (CPTs), присоединяющие изопреноидные остатки по типу “голова к хвосту” [3]. Для растений характерно наличие множества CPTs, классифицированных в семейства, однако в связи с недостаточной изученностью только для некоторых из них подтвер-

ждено участие в синтезе полиизопренолов [11]. Субстратом для синтеза полиизопренолов служат C10-, C15- и C20-углеродные предшественники: геранилдифосфат, фарнезилдифосфат и геранилгеранилдифосфат соответственно [12]. Однако данных о растительных CPTs недостаточно; причем большая часть исследований ограничивается экспериментами на модельном растении *Arabidopsis thaliana*. Более глубокое изучение CPTs с использованием широкого ряда модельных и немодельных растительных организмов позволит получить новые данные для понимания путей синтеза, локализации и функциональной роли полипренолов растений. Такими перспективными модельными растениями считаются бриофиты.

Бриофиты (зеленые и антоцеротовые мхи, печеночники) представляют группу наземных растений, обладающих огромным потенциалом для проведения исследований в области эволюции, генетики, молекулярной биологии и физиологии растений [13]. Кроме того, бриофиты продуцируют широкий спектр уникальных для наземных растений метаболитов, что позволяет их считать ценными объектами в изучении метаболизма растений [14–16]. Представитель бриофитов – печеночник *Marchantia polymorpha* – известен как источник множества соединений, обладающих антимикробной, ранозаживляющей, противоопухолевой, антиоксидантной и многими другими типами активностей. Простота культивирования и небольшие размеры бриофитов сделали их удобными объектами для фундаментальных исследований и перспективными продуцентами для промышленности.

Нами проведен биоинформатический поиск и филогенетический анализ последовательностей генов CPTs *M. polymorpha*. Обнаружено шесть генов CPTs типа 7 и один ген CPTs типа 3, тогда как в геноме растений *A. thaliana* идентифицировано 9 типов CPTs. Для выявления функциональной роли отдельных генов-гомологов CPTs в развитии растений *M. polymorpha* провели нокаут одного из обнаруженных генов – *MpCPT7.37* (Mapoly0142s0037) – и оценили фенотип нокаутированного растения. Показано, что нокаут только одного гена не отражается на жизнеспособности растения, а также на антимикробном потенциале внутриклеточных метаболитов *M. polymorpha*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Биоинформатический поиск и анализ последовательностей генов CPTs.** Биоинформатический поиск последовательностей генов CPTs в геноме растений *M. polymorpha* проводили с использованием баз данных открытого доступа: [marchantia.info](http://marchantia.info), [www.phytozome.net](http://www.phytozome.net), <http://arabidopsis.org/>. Множественное выравнивание белковых последовательностей CPTs *A. thaliana* и *M. polymorpha* проводи-

ли с использованием программного обеспечения MUSCLE на платформе <http://www.phylogeny.fr/>. Для построения дендрограмм использовали программное обеспечение PhyML на платформе <http://www.phylogeny.fr/>.

**Культивирование мхов.** Асептические культуры мхов *M. polymorpha* линии Takaragaike-1 (мужское растение) и Takaragaike-2 (женское растение) выращивали на твердой питательной среде 50% Gamborg's B5 (GB5) без добавления витаминов. Состав среды, г/л: KNO<sub>3</sub> – 2.5, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – 0.15, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0.25, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0.134, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O – 0.15, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0.003, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O – 0.01, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0.002, Ferric-EDTA – 0.043, KI – 0.75 × 10<sup>-3</sup>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O – 0.25 × 10<sup>-3</sup>, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 0.025 × 10<sup>-3</sup>, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0.025 × 10<sup>-3</sup>, pH 5.5. Условия роста растений: режим освещения – 16 ч/8 ч день/ночь, температура 22°C/20°C, влажность 65%.

**Культивирование бактерий.** В работе использовали штаммы бактерий *Escherichia coli* DH5α, *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25293. Бактерии растили на жидкой или агаризованной питательных средах LB (Lysis broth), г/л: триптон – 10, хлорид натрия – 5, дрожжевой экстракт – 5. Агаризованная среда содержала 2% бактериального агара. Для культивирования *A. tumefaciens* GV2260 в среду добавляли антибиотик карбенициллин (100 мкг/мл), необходимый для стабильной репликации плазмиды-помощника, несущей *vir*-гены (*vir*-helper plasmid). Штамм *E. coli* DH5α культивировали при температуре 37°C, *A. tumefaciens* GV2260 – при 28°C, *S. aureus* ATCC 25293 – при 35°C.

**Создание гетерологичных векторных конструкций для редактирования генома *M. polymorpha*.** Для нокаутирования гена CPT *M. polymorpha* использовали технологию CRISPR/Cas9 для редактирования генома. Для создания конструкции CRISPR/Cas9 в программе CRISPR 2.0 подбирали последовательность одиночной направляющей РНК (sgРНК), соответствующую целевому геномному участку, в который необходимо внести мутацию. Кодированную sgРНК последовательность синтезировали с добавлением сайтов рестрикции эндонуклеазы BsaI. Полученные олигонуклеотидные последовательности нагревали до 100°C и оставляли при

комнатной температуре для получения двухцепочечной ДНК (дцДНК) с сайтами рестрикции по типу “липких концов”; проводили ее клонирование в вектор pMpGE\_En03 [17, 18] по сайту рестрикции BsaI путем лигирования с использованием T4-лигазы. Далее проводили трансформацию химически компетентных клеток *E. coli* DH5α полученной плазмидой по стандартному протоколу. Результаты клонирования подтверждали генотипированием и секвенированием с использованием специфических праймеров (табл. 1).

Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) по протоколу производителя. Далее проводили субклонирование области, содержащей последовательность sgРНК и промотора, в бинарный вектор pMpGE011 (бинарный вектор для агробактериальной трансформации *M. polymorpha*, содержащий маркерный ген устойчивости к хлорсульфону (*mALS*) [17, 18]) по методу Gateway с использованием смеси ферментов Clonase II и протокола производителя (“Invitrogen”, США). Результаты клонирования подтверждали генотипированием и секвенированием.

Бинарные векторы, содержащие вставки sgРНК, трансформировали в клетки *A. tumefaciens* GV2260 [19]. Результаты трансформации агробактерий подтверждали генотипированием.

Химически компетентные клетки *A. tumefaciens* готовили по протоколу Höfgen & Willmitzer [19] с модификациями. Ночную культуру *A. tumefaciens* GV2260 (1 мл) инокулировали в 200 мл среды LB и инкубировали при 28°C до достижения оптической плотности 0.5–0.8 при длине волны 595 нм (OD<sub>595</sub>). Культуру охлаждали на льду в течение 10 мин и осаждали клетки центрифугированием при 5600 g в течение 10 мин при температуре 4°C. Осадок клеток ресуспензировали в 20 мл ТЕ-буфера (10 мМ Tris, 1 мМ ЭДТА, pH 8.0) и центрифугировали в условиях, указанных выше. Осадок ресуспензировали в 20 мл ТЕ-буфера, содержащего 15% глицерина. Аликвоты бактериальной суспензии (300 мкл) переносили в микропробирки, замораживали в жидком азоте и хранили при –80°C.

**Таблица 1.** Праймеры, использованные в работе

Название праймера	Последовательность, 5' → 3'	Назначение
CPT37_1g_Fwd	CTCGGTGGTGGACAGATGTGTG	Синтез sgРНК
CPT37_1g_Rev	AAACCACACATCTGTCCACCAC	
CPT37_gt_F	TACTATCTGGTGGCTGAAATGTC	Генотипирование/получение ампликонов для секвенирования и выявления мутаций у растений-трансформантов
CPT_gt_R	CTGGCTCATATCTGCACAAC	
M13-Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Генотипирование векторных конструкций

**Трансформация растений *M. polymorpha*.** Т-ДНК интегрировали в геном растений *M. polymorpha* по методу агробактериальной трансформации талломов с модификациями [20]. Выводковые почки маршанции помещали в чашки Петри на среду GB5 и растили в течение двух недель в стандартных условиях. Выросшие талломы разрезали на 4 фрагмента с отсечением апикальных частей и переносили базальные фрагменты на среду GB5 с добавлением 1% сахарозы. Растения инкубировали в течение двух суток при стандартных условиях, после чего фрагменты переносили в колбы со 100 мл среды для трансформации M51C [21], в которую добавляли ацетосирингон до конечной концентрации 100 мкМ и затем культуру агробактерий ( $OD_{595}$  0.9–1.0). Коинкубацию проводили при перемешивании в стандартных для растений условиях роста (режим освещения – 16 ч/8 ч день/ночь, температура – 22°C/20°C, влажность – 65%) в течение четырех суток, после чего талломы растений отмывали от агробактериальных культур, используя для этого стерильную дистиллированную воду (пятикратная отмывка). Селекцию трансформантов проводили в чашках Петри на среде 50% GB5 с добавлением хлорсульфуона (0.5 мкМ) в течение 20 суток. Дополнительно в среду добавляли антибиотик цефотаксим (100 мкг/мл) для подавления роста агробактерий. Прошедшие селекцию ткани растений-трансформантов переносили в отдельные чашки Петри с селективной средой и проводили генотипирование и секвенирование фрагментов, соответствующих целевому участку генома.

**Выделение ДНК растений.** ДНК из тканей растений-трансформантов для проведения генотипирования и секвенирования выделяли по стандартному протоколу с использованием СТАВ-буфера [22] с небольшой модификацией: для отделения водной ДНК-содержащей фракции вместо смеси фенол–хлороформ–изоамиловый спирт использовался 100%-ный хлороформ.

**Выделение растительных экстрактов.** Экстракцию метаболитов из тканей *M. polymorpha* проводили методом мацерации тканей с использованием метанола в качестве растворителя. Ткани растений собирали с поверхности среды, взвешивали и гомогенизировали путем замораживания и растирания в жидком азоте. Полученный мелкодисперсный порошок помещали в растворитель (80%-ный метанол) в соотношении 0.9–1.2 г ткани : 10 мл растворителя. Мацерацию проводили на шейкере при скорости вращения 130 об/мин в течение 24 ч при комнатной температуре, исключая попадание прямых лучей света на образец. Полученную суспензию центрифугировали при 11 200 g в течение 20 мин при 4°C и пропускали через фильтр с размером пор 0.45 мкм. Полученные экстракты высушивали в вакуумном центрифужном кон-

центраторе Concentrator Plus (“Eppendorf”, Германия) при комнатной температуре и взвешивали.

Непосредственно перед проведением анализа антибактериальной активности высушенные образцы растворяли в метаноле в конечной концентрации 100 мкг/мкл. Растворенные экстракты (50 мкл/диск) наносили на стерильные целлюлозные диски (диаметр 5 мм). Диски высушивали в ламинаре при комнатной температуре и хранили в условиях, предотвращающих попадание прямых лучей света.

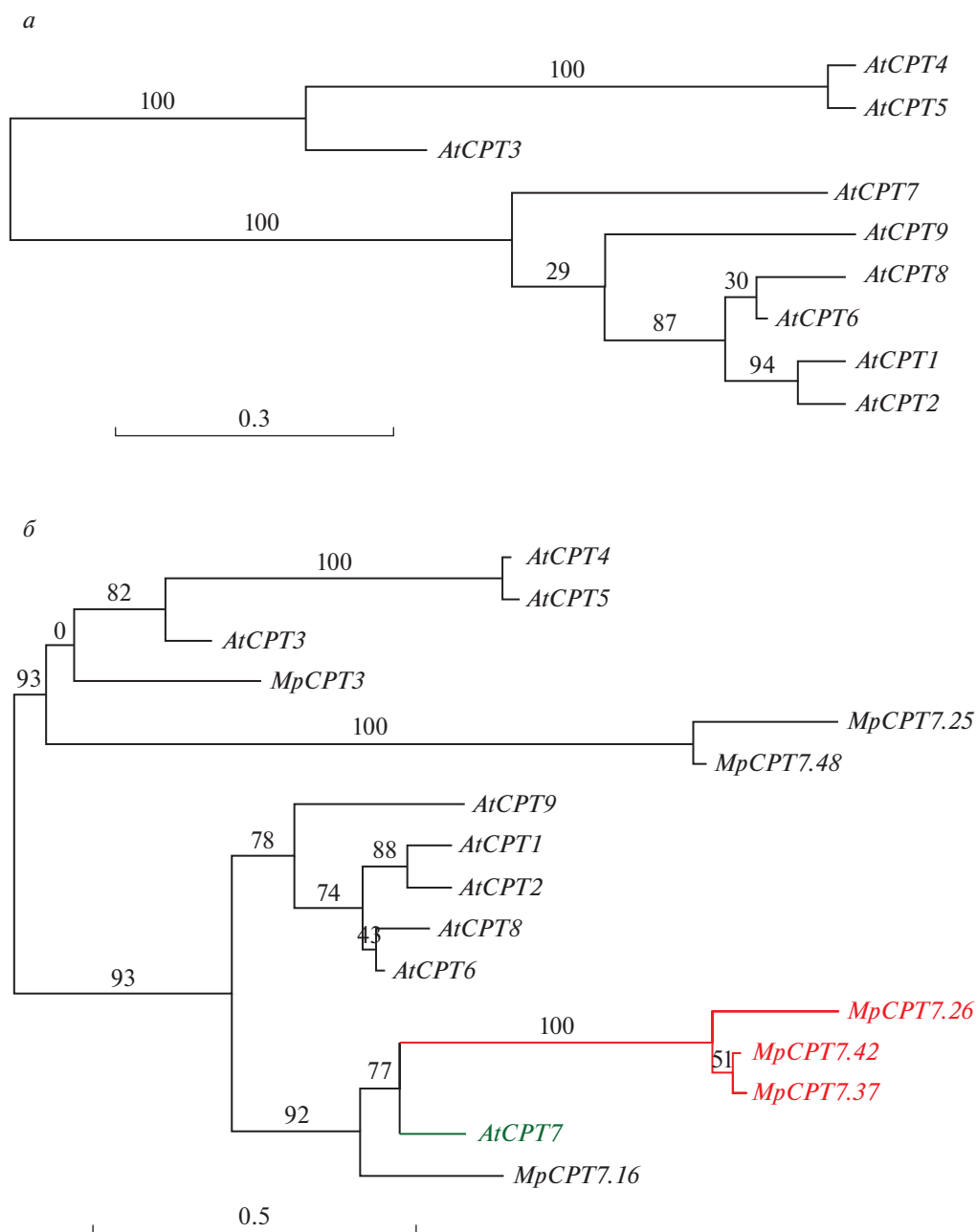
**Анализ антибактериальной активности с использованием диско-диффузионного метода.** Ингибирование роста бактерий экстрактами тканей *M. polymorpha* анализировали с помощью диско-диффузионного метода в соответствии с CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute; www.clsi.org). Бактериальную тест-культуру, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, вносили в 5 мл 0.7%-ного LB-агара в концентрации  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл и распределяли по поверхности 2%-ного LB-агара в чашках Петри. На поверхность агара помещали стерильные целлюлозные диски с растительными экстрактами (см. выше) и наносили на каждый диск по 10 мкл DMSO – для растворения метаболитов. Чашки Петри инкубировали в термостате в течение 18 ч, после чего измеряли диаметр зоны ингибирования роста бактериальной тест-культуры. В качестве контроля использовали диски с нанесенным на них 80%-ным метанолом и 10 мкл DMSO. Для каждой линии растений эксперимент проводили в трех повторах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Поиск и анализ последовательностей цис-пренилтрансфераз *M. polymorpha**

Провели биоинформатический анализ генома *M. polymorpha* с целью обнаружения генов, кодирующих CPTs, с использованием баз данных Arabidopsis.org, marchantia.info и Phytozome. В качестве референсных генов-гомологов использовали последовательности девяти генов CPTs *A. thaliana*, *AtCPT1–AtCPT9* (рис. 1a, база данных Arabidopsis.org; <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=135289&type=locus>), участвующих в синтезе полиизопренолов [8].

Обнаружено, что в геноме *M. polymorpha* содержится семь генов CPTs; причем шесть из них идентифицированы в базе данных Phytozome и marchantia.info как гены CPTs типа 7 (*MpCPT7*), тогда как один ген – как ген CPT типа 3 (*MpCPT3*). Провели выравнивание аминокислотных последовательностей обнаруженных CPTs *M. polymorpha* и CPTs *A. thaliana*. Для белка *MpCPT7.16* выявлена гомология в 49.4% с *AtCPT7*. Невысокая гомология с CPT типа 7 из *A. thaliana*, *AtCPT7*, также обнаружена для трех из шести *MpCPTs*:



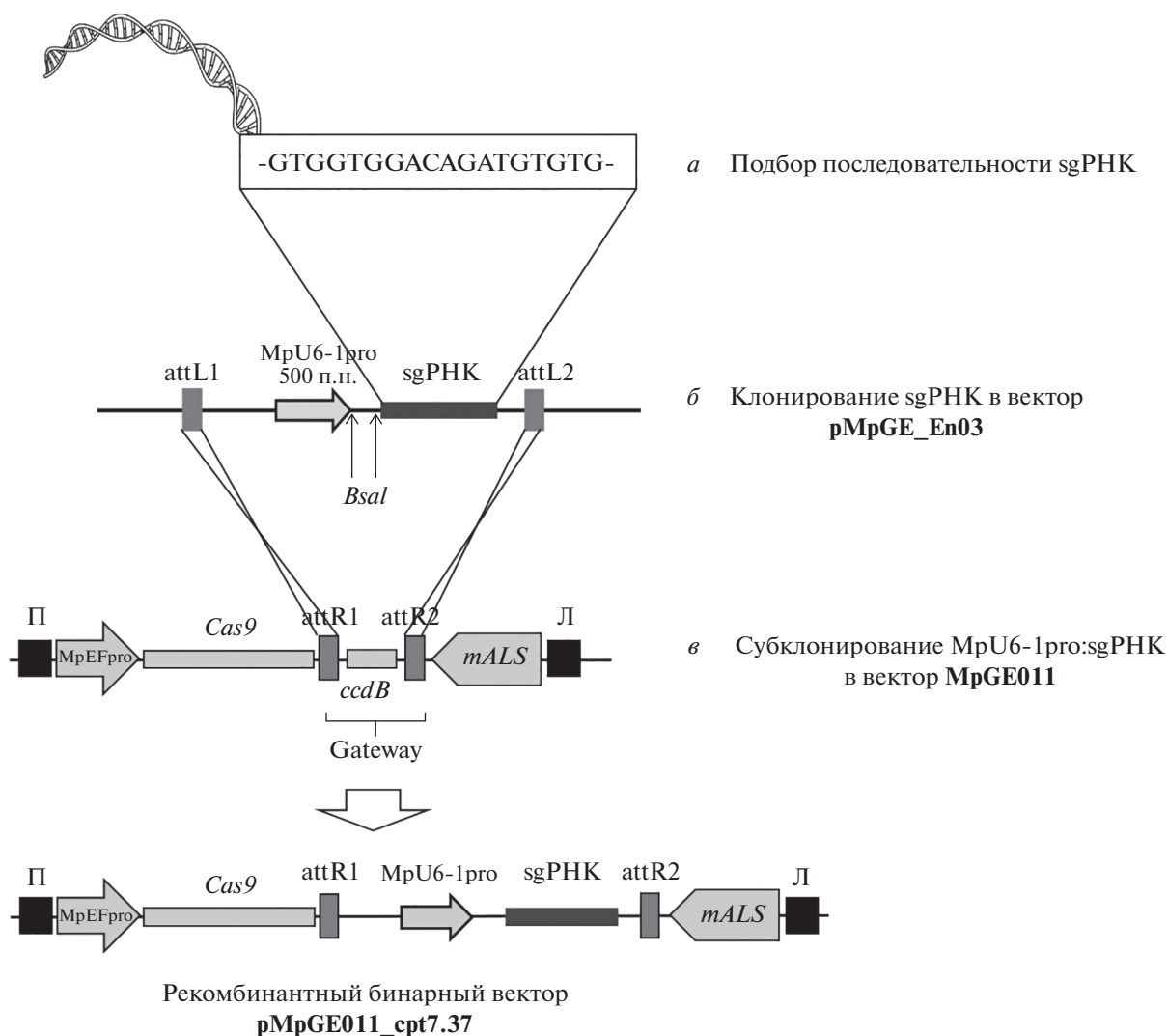
**Рис. 1.** Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей цис-пренилтрансфераз растений. *a* – Дендрограмма цис-пренилтрансфераз растения *Arabidopsis thaliana* (AtCPT). *б* – Дендрограмма цис-пренилтрансфераз растений *Arabidopsis thaliana* и *Marchantia polymorpha* (MpCPT). Зеленым и красным цветом выделены филогенетически близкие CPTs типа 7 *A. thaliana* и *M. polymorpha*.

MpCPT7.26 (ген *Mapoly0121s0026*) – 39.4%, MpCPT7.37 (ген *Mapoly0142s0037*) – 43.5% и MpCPT7.42 (ген *Mapoly0142s0042*) – 43.4% (<https://marchantia.info/>, аннотации генов даны по версии сборки генома Mp JGI3.1) (рис. 1*a, б*). При построении дендрограммы показано, что в гене, кодирующем MpCPT7, произошла дивергенция, в результате которой образовались две ветви ферментов, одной из которых стал Mp-

CPT7.16. Вторая ветвь включает три фермента: MpCPT7.26, MpCPT7.37 и MpCPT7.42, – наиболее близкие к AtCPT7 (рис. 1*б*). В свою очередь, MpCPT7.25 (ген *Mapoly0087s0025*) и MpCPT7.48 (ген *Mapoly0025s0048*), также аннотированные как MpCPT7, филогенетически близки белкам AtCPT3 (рис. 1*б*).

При выравнивании аминокислотных последовательностей идентифицированных белков CPTs





**Рис. 3.** Схема клонирования и получения рекомбинантного бинарного вектора для трансформации растений *M. polymorpha*. *а* – Последовательность sgPHK к гену *MpCPT7.37*. *б* – Схема вектора pMpGE\_En03: MpU6-1pro – промотор малой ядерной РНК *M. polymorpha*; attL1 и attL2 – области для гомологичной рекомбинации; sgPHK – направляющая РНК системы CRISPR/Cas9 для гена *MpCPT7.37*; BsaI – сайт рестрикции. *в* – Схема бинарного вектора pMpGE011: MpEFpro – промотор *M. polymorpha*; П и Л – правая и левая границы области Т-ДНК; Cas9 – ген эндонуклеазы Cas9; attR1, attR2 – области для гомологичной рекомбинации; Gateway – область рекомбинации; MpU6-1pro::sgPHK – последовательность направляющей РНК, комплементарной таргетному участку в нокаутуемом гене, под контролем промотора MpU6-1pro; mALS – ген устойчивости к хлорсульфону. Нижняя часть рисунка модифицирована из работы Sugano S.S. с соавт. [18, лицензия Creative Commons Attribution License].

чие полноразмерной вставки sgPHK-cpt37 в полученных рекомбинантных векторах подтверждено генотипированием и секвенированием (рис. 4).

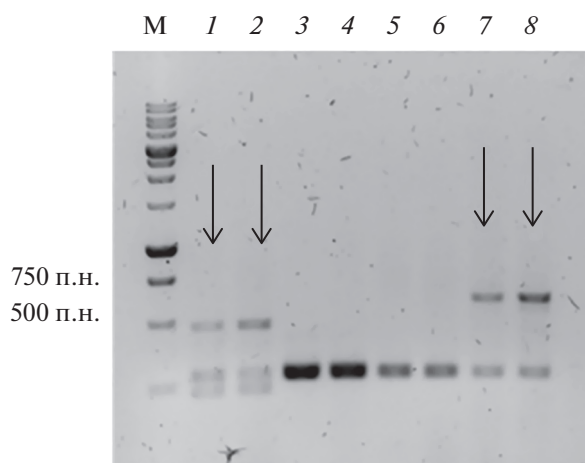
Далее последовательность MpU6:sgPHK\_cpt37 субклонировали в Т-ДНК-область бинарного вектора pMPGE011, содержащей ген устойчивости к хлорсульфону в качестве селективного маркера для растений-трансформантов, и получили бинарный вектор pMpGE011\_cpt37 (рис. 3). Наличие полноразмерной вставки подтвердили генотипированием (рис. 5). Бинарный вектор pMpGE011\_cpt37 трансформировали в клетки *A. tumefaciens* GV2260 и получили агробактери-

альный штамм для последующей трансформации растений.

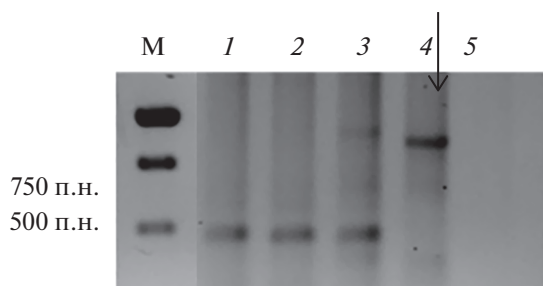
Таким образом, нами сконструирована плазмида pMpGE011\_cpt37 для получения линий растений-мутантов *M. polymorpha* по гену *MpCPT7.37* и получен штамм *A. tumefaciens* GV2260, несущий данную плазмиду, для проведения трансформации растений.

#### Получение растений-нокаутов по гену *MpCPT7.37*

Полученный штамм *A. tumefaciens* GV2260, несущий бинарную плазмиду pMGE011\_cpt37, ис-



**Рис. 4.** Генотипирование колоний-трансформантов на наличие плазмиды рМрGE\_En03 с интегрированной вставкой sgРНК. Искомый размер ПЦР-продукта – 500 п.н. М – маркер длины ДНК. Стрелками показаны положительные клоны.



**Рис. 5.** Генотипирование колоний-трансформантов на наличие плазмиды рМрGE\_011 с интегрированной вставкой МрU6-pro::sgРНК. Искомый размер ПЦР-продукта – около 750 п.н. М – маркер длины ДНК. Стрелкой показан положительный клон.

пользовали для проведения трансформации растений *M. polymorpha* Так-1 и получения линий с нокаутированным геном *MpCPT7.37*. В результате агробактериальной трансформации получено 9 индивидуальных линий растений-трансформантов. Путем секвенирования фрагментов ДНК ампликонов, содержащих последовательность sgРНК, показано наличие мутаций у четырех индивидуаль-

ных растений *M. polymorpha* (см. Дополнительные материалы, рис. S2–S5).

В результате получены линии растений с различными мутациями в последовательности целевого участка гена, которые обусловлены репарацией двунитевых разрывов, вносимых CRISPR/Cas9 системой по механизму негомологичного соединения концов (NHEJ, *non-homologous end joining*) (табл. 2). В целевом гене растения-нокаута № 1 выявлена делеция GA, затрагивающая инициаторный кодон (ATG) мРНК *MpCPT7.37*: 5'-GTG-GTGGACAgATGTGTG-3', – что приводит к сдвигу рамки считывания и, как следствие, к нокауту гена (см. Дополнительные материалы, рис. S2). В линии растений-нокаутов № 2 обнаружена 15-нуклеотидная делеция в гене *MpCPT7.37*: 5'-GTGT-GAGGCTCAGAT-3' (23–37 п.н.) (см. Дополнительные материалы, рис. S3). Эта делеция не приводит к сдвигу рамки считывания, но в продукте трансляции отсутствовала аминокислотная последовательность RCVRL (7–11 а.о.). В гене *MpCPT7.37* растений-нокаутов № 5 обнаружена вставка тими-на: 5'-GTGGTGGACAGATGTTGTG-3', – которая тоже приводит к сдвигу рамки считывания (Дополнительные материалы, рис. S4). В гене *MpCPT7.37* растения-нокаута № 9 обнаружена делеция нуклеотида G в инициаторном кодоне: 5'-GTGGTGGACAGATgTGTG-3' (см. Дополнительные материалы, рис. S5). Все полученные линии растений имели мутации по типу вставки-делеции, что могло приводить к нарушению экспрессии гена *MpCPT7.37* в растениях и к продукции белка с измененной аминокислотной последовательностью.

При изучении морфологии нокаутированных растений установлено, что все они жизнеспособны, морфологически не отличаются от растений дикого типа, а также формируют ризоиды и образуют выводковые почки (рис. 6).

#### Изучение антибактериальной активности экстрактов мутантных линий *M. polymorpha*

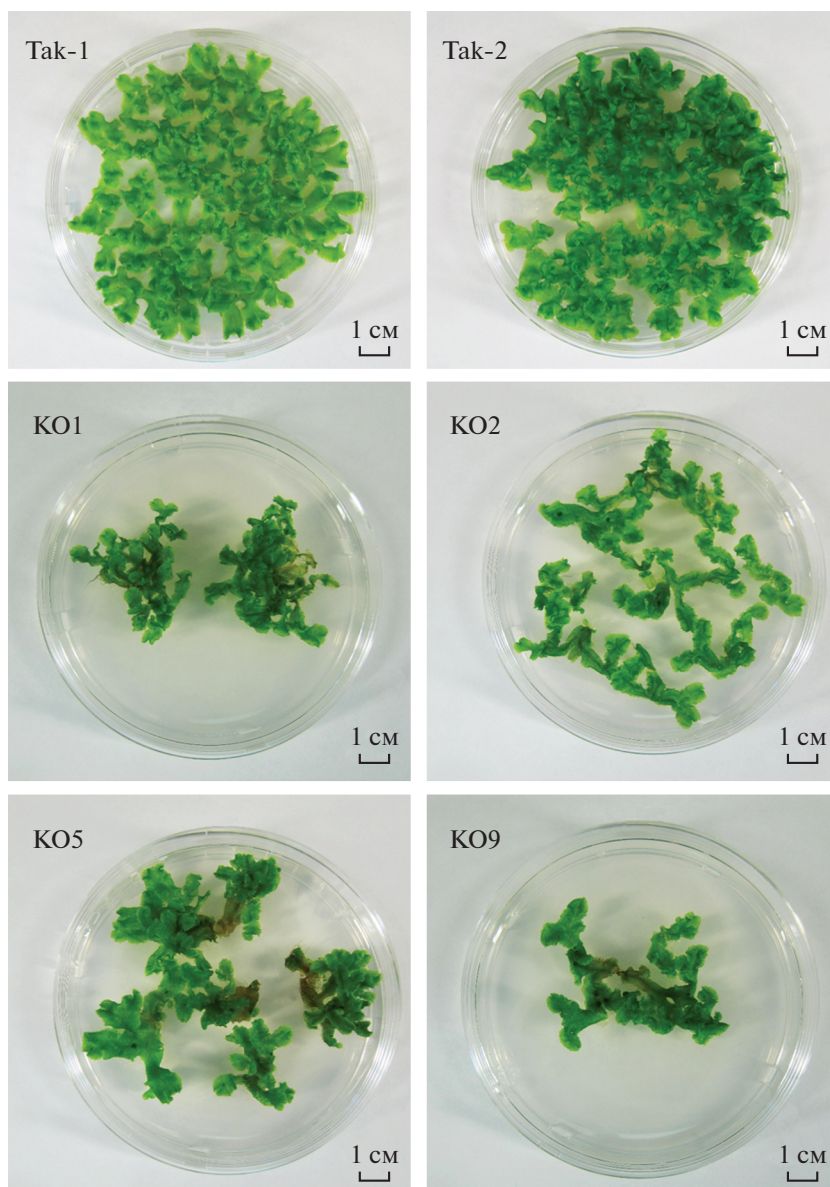
Нами проанализирована антибактериальная активность экстрактов тканей растений *M. polymorpha* дикого типа (Так-1 и Так-2) и нокаутов KO1, KO2, KO5 по отношению к тест-культуре бактерий грамположительного морфотипа *S. au-*

**Таблица 2.** Растения *M. polymorpha* Так-1, мутантные по гену *MpCPT7.37*

Линия растений	Мутация <sup>а</sup>
KO1	Делеция GA: 5'-GTGGTGGACAgATGTGTG-3'
KO2	Делеция: 5'-gtgtgaggctcagat-3' (23–37 п.н.)
KO5	Вставка T: 5'-GTGGTGGACAGATGTTGTG-3'
KO9	Делеция G: 5'-GTGGTGGACAGATgTGTG-3'

<sup>а</sup>Последовательность, кодирующая инициаторный кодон мРНК, выделена подчеркиванием; строчными буквами обозначены делеции; жирным шрифтом – вставка нуклеотида.





**Рис. 6.** Растения *M. polymorpha*. Tak-1, Tak-2 – дикий тип, мужское и женское растение соответственно. KO1, KO2, KO5, KO9 – линии растений-нокаутов по гену *MpCPT7.37*.

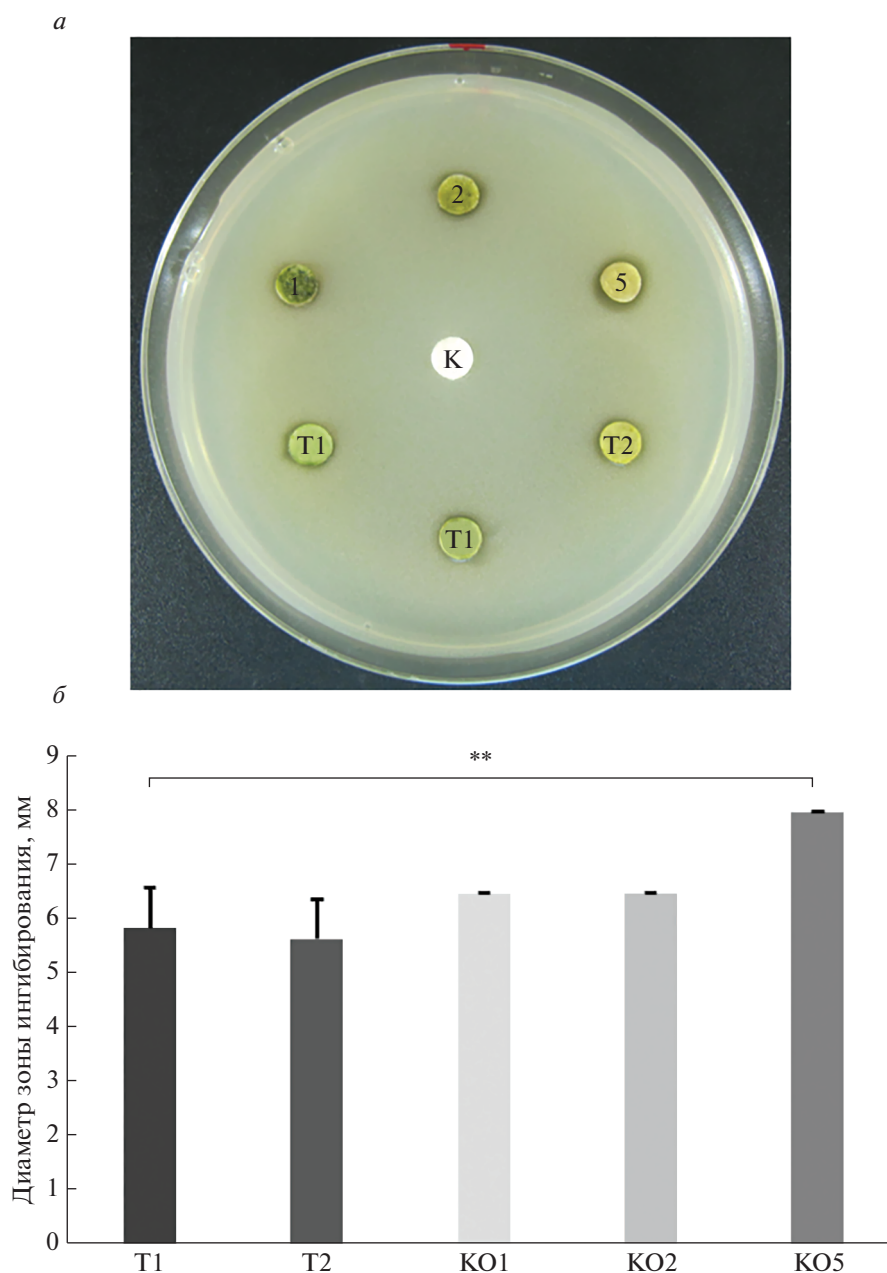
*reus* ATCC 25293. Антибактериальная активность выявлена как для растений дикого типа, так и нокаутов (рис. 7).

Средние значения зон ингибирования роста бактерий образцами экстрактов из тканей линий KO1 и KO2 превышали показания для экстрактов растений дикого типа, хотя статистической разницы не обнаружено (рис. 7б). Линия KO5 проявляла наиболее высокую антибактериальную активность ( $p \leq 0.01$ ) среди всех проанализированных растений (рис. 7б). Не исключено, что это обусловлено или индивидуальными особенностями растения, или возможными нетаргетными мутациями в его геноме, произошедшими под

действием CRISPR/Cas9. На основании полученных результатов мы предполагаем, что нокаут гена *MpCPT7.37* не оказывает значимого влияния на пул вторичных метаболитов, обладающих антибактериальной активностью по отношению к грамположительным бактериям.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение вторичных метаболитов растений и путей их синтеза относится к направлениям, имеющим как фундаментальное, так и прикладное значение. Одна из малоисследованных групп вторичных метаболитов растений, в частности бриофитов, – полиизопренолы, а основной фермент,



**Рис. 7.** Антибактериальная активность экстрактов тканей *M. polymorpha* по отношению к штамму *S. aureus* ATCC 25293. *a* – Рост культур; *б* – диаметр зоны ингибирования роста бактерий. T1, T2 – дикий тип *M. polymorpha*, линии Tak-1 и Tak-2 соответственно. 1 – KO1, 2 – KO2, 5 – KO5 – линии растений-нокаутов. К – отрицательный контроль (диск с метанолом). \*\* $p \leq 0.01$ .

ответственный за их синтез, – *цис*-пренилтрансфераза.

*Геном M. polymorpha содержит семь генов цис-пренилтрансфераз*

В отличие от клеток животных для растений характерно наличие множества генов СРТs, группируемых в семейства, что связано с дупликацией генов и геномов в ходе эволюции. Так, у томата

(*Solanum lycopersicum*) обнаружено 7 генов СРТs (*SICPT1–SICPT7*), у тропического растения гевеи (*Hevea brasiliensis*) – два гена (*HPT1* и *HPT2*), у одуванчика (*Taraxacum kok-saghyz*) – три гена (*TkCPT1–TkCPT3*), в геноме лилии (*Lilium longiflorum*) – только один (*LAA66*) [11]. Дупликации участков генов и полногеномные дупликации, приводящие к неофункционализации, вносят основной вклад в метаболическое разнообразие растений. Известно, что дупликация генов чаще встре-

чается именно в царстве растений. Скорее всего, это связано с прикрепленным образом жизни и необходимостью быстро адаптироваться к изменениям окружающей среды. Также дупликация и кластеризация генов в основном связана со вторичным метаболизмом, хотя появление изоформ можно наблюдать и для ферментов первичного метаболизма [1].

Геном модельного растения *A. thaliana* содержит 9 генов СРТs (*AtCPT1–AtCPT9*), экспрессия которых тканеспецифична [8]. Проведенный нами биоинформатический анализ генома *M. polymorpha* позволил идентифицировать 7 генов, гомологичных генам СРТs *A. thaliana*. Шесть генов аннотированы как гены СРТs типа 7 соответственно гомологии с *AtCPT7 A. thaliana*. При выравнивании аминокислотных последовательностей нами показано, что филогенетически близки *AtCPT7* белки *MrCPT7.26*, *MrCPT7.37* и *MrCPT7.42*. Гены двух других ферментов: *MrCPT7.25 (Mapoly0087s0025)* и *MrCPT7.48 (Mapoly0025s0048)* – имели более высокую гомологию с генами *A. thaliana* СРТs типа 3 (*AtCPT3*), чем типа 7 (*AtCPT7*). На основании высокой гомологии идентифицированных *MrCPTs* только с *AtCPT3* и *AtCPT7* логично предположить, что эти два типа СРТs филогенетически наиболее древние у наземных растений и в процессе эволюции могли дивергировать в другие семейства. Вероятно, большое разнообразие СРТs необходимо растениям для синтеза полиизопренолов не только различной длины, но и различной внутриклеточной локализации, что, в свою очередь, может быть связано со специфичными функциями полиизопренолов разной длины [8, 23].

Известно, что СРТ3 и СРТ7 характеризуются конститутивной экспрессией в большинстве тканей растений. В *A. thaliana* *AtCPT7* и *AtCPT3* локализируются соответственно в мембранах хлоропластов и цитозоле клеток. Локализация *AtCPT7* в тилакоидах пластид *A. thaliana* объясняет широкое распространение этого белка в тканях растений. СРТs типа 7 участвуют в синтезе полипренолов, причем *AtCPTs* других семейств (цитозольные и митохондриальные) также синтезируют полипренолы [8]. В *A. thaliana* функциональная активность *AtCPT3* зависит от другого белка – LEW1: их гетеромер катализирует синтез долихолов. Обнаружено, что мутация в гене белка LEW1 приводит к снижению содержания долихолов в тканях *A. thaliana* на 85% [8, 24]. Скорее всего, в *M. polymorpha* не только *MrCPT3*, гомологичный *AtCPT3*, но и *MrCPT7.25* и *MrCPT7.48* могут принимать участие в синтезе долихолов.

Отсутствие в *M. polymorpha* генов других типов СРТs, имеющих в геноме *A. thaliana*, может быть обусловлено тем, что различные *MrCPTs* типа 7 синтезируют полиизопренолы разной дли-

ны, как в *A. thaliana* это делают СРТs нескольких семейств. Возможно, что в растении *M. polymorpha*, как представителе бриофитов [25], имеющих более простое строение, чем *A. thaliana*, *MrCPT7* и *MrCPT3* взаимозаменяемы или функционально вырождены.

Стоит заметить, что наличие трех высокоомологичных генов у *M. polymorpha* (*MrCPT7.26*, *MrCPT7.37* и *MrCPT7.42*) нехарактерно для бриофитов, так как геномы растений этой группы неизбыточны в отличие от сосудистых растений. Так, при анализе генома *M. polymorpha* установлено, что он не подвергался дупликации [25]. Тем не менее вероятны локальные дупликации, которые привели к появлению нескольких гомологичных генов СРТs у *M. polymorpha*.

Кроме того, при анализе аминокислотных последовательностей нами показано, что в структуре *AtCPTs* и *MrCPTs* присутствует шесть высококонсервативных областей, что также подтверждает высокую консервативность СРТs. Kharel и Коуама [26] идентифицировали консервативные последовательности в структуре СРТs, характерные как для эукариот, так и прокариот. В последовательностях СРТs из бактерий: *Micobacterium tuberculosis*, *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* – и из архей *Sulfolobus acidocaldarius* картировано 5 консервативных регионов, присутствующих в СРТs *A. thaliana*. В структурах *MrCPTs* и *AtCPTs*, кроме этих пяти консервативных областей, обнаружен еще один общий участок – между четвертым и пятым (Дополнительные материалы, рис. S1), идентифицированными Kharel & Коуама [26]. Кроме того, по сравнению с последовательностями СРТs бактерий и архей, в белках растений мотив YxGxx(D/E/K)(V/I)(L/V/M/S)xA (204–214 а.о.) отличается большей вариабельностью.

#### *Потеря функциональной активности MrCPT7.37 не влияет на жизнеспособность растения*

Данные по исследованиям функций СРТs бриофитов отсутствуют. В геноме *M. polymorpha* нами обнаружено семь генов *MrCPTs*, гомологичных генам *AtCPT7* и *AtCPT3 A. thaliana*. Мы провели нокаут одного из генов *MrCPT7* и проанализировали его влияние на рост и развитие растений. С использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9 получено четыре индивидуальные линии растений-нокаутов по гену *MrCPT7.37* с различными мутациями. В трех линиях растений-мутантов (КО1, КО5 и КО9) обнаружен сдвиг рамки считывания, что может приводить к полному “выключению” экспрессии *MrCPT7.37* и к появлению преждевременных стоп-кодонов. В растениях линии КО2 идентифицирована 15-членная делеция в гене *MrCPT7.37*, которая приводит к изменению первичной струк-

туры продукта трансляции: отсутствию пептида CVRLR. Этот мотив не входит в высококонсервативные участки CPTs, но его отсутствие может влиять на посттрансляционную укладку белка и формирование его функционально активной формы.

Для всех трех линий мутантных растений (KO1, KO5, KO9), несмотря на нокаут гена *MpCPT7.37*, выявлено, что их фенотип близок таковому для дикого типа. Они формировали дорсо-вентральный дихотомически ветвящийся таллом, образовывали ризоиды и давали выводковые почки. Морфологических дефектов в развитии растений-мутантов не обнаружено. На основании данных проведенного нами биоинформатического анализа генов *MpCPTs* можно предположить, что отсутствие морфологических изменений и сохранение жизнеспособности растений обусловлено компенсацией функций *MpCPT7.37* двумя другими CPTs типа 7 – *MpCPT7.26* и *MpCPT7.42*.

В большинстве случаев нокаут генов CPTs у растений приводит не к морфологическим изменениям, а к изменениям в содержании полиизопренолов. Показано, что при инактивировании гена *AtCPT7* в *A. thaliana* снижается содержание полипренолов C45–C55 в мембранах тилакоидов [12]. Это приводит к повышению проницаемости мембран и снижению активности электронтранспортной цепи; при этом растения-мутанты сохраняли жизнеспособность. Растения, мутантные по гену *AtCPT6*, накапливали меньше долихолов C35 и короткоцепочечных долихолов [27]. При изучении роли *AtCPT1* показано, что в растениях *A. thaliana*, нокаутированных по гену *AtCPT1*, снижено содержание долихолов с длиной углеродной цепи от 18 до 23 [11]. Несмотря на то, что в большинстве случаев “выключение” генов, кодирующих *AtCPTs*, приводило к изменению в содержании полиизопренолов в мутантных растениях *A. thaliana*, а для мутантов по гену *AtCPT1* наблюдали сильную задержку роста и развитие укороченных корней [11]. По-видимому, CPTs могут влиять на рост и развитие растений, хотя изменения или не критичны, или, как в случае с *M. polymorpha*, компенсируются за счет функций гомологичных белков.

*Мутации в гене MpCPT7.37 не влияют на антибактериальную активность экстрактов M. polymorpha*

Вторичные метаболиты растений обладают большим потенциалом в качестве биологически активных соединений для промышленности и фармакологии. Например, длинноцепочечные соединения изопреноидной природы могут быть использованы в качестве антибактериальных и противоопухолевых препаратов. Так, показано,

что комплекс полипренолов из хвои сосны *Picea abies* L. и сосны *Pinus sylvestris* L. оказывает антиканцерогенный эффект в отношении простатической интраэпителиальной неоплазии и рака предстательной железы у крыс [28]. Полиизопренолы *Gingko biloba* обладают антибактериальной активностью по отношению к *E. coli* и *S. aureus*, а также цитотоксическим действием на линии раковых клеток A549 и HepG2 [10]. Для полипренолов и долихолов, экстрагированных из листьев мангровых деревьев, выявлена антибактериальная активность по отношению к *E. coli* и *S. aureus* [29]. Долихолы из мангровых деревьев *Ceriops tagal* и *Rhizophora mucronata* также проявляли противоопухолевую активность [30].

Мы провели первичный анализ антибактериальной активности общего пула внутриклеточных метаболитов растений *M. polymorpha* дикого типа и мутантов по гену *MpCPT7.37* и показали, что экстракты тканей всех линий ингибируют рост бактерий *S. aureus*, причем сходным образом. Только для одного растения, KO5 – с делецией в гене *MpCPT7.37*, – зарегистрировано значимое повышению антибактериальной активности экстракта. Нельзя исключить, что этот эффект обусловлен нетаргетной мутацией, появление которой возможно при редактировании генома растений с использованием системы CRISPR/Cas9 [31]. Кроме того, различия в антибактериальной активности между линиями растений могут быть связаны с индивидуальными особенностями конкретного растения и вызваны в том числе спонтанными мутациями. Так, у растений *A. thaliana* мутации накапливаются из поколения в поколение [32, 33].

Полученные нами данные по идентификации генов CPTs в *M. polymorpha* – первый и важный шаг в изучении этих ферментов в бриофитах. Дальнейшие исследования в этой области позволят лучше понять пути эволюции, а также роль *cis*-пренилтрансфераз в росте и развитии растений и их устойчивости к абиотическому и биотическому стрессу. Кроме того, глубокие знания о ферментах, участвующих в синтезе полиизопренолов, необходимы для понимания метаболизма последних и разработки способов их получения.

Мы благодарим профессора Такаюки Кочи (Prof. Takayuki Kohchi, Graduate School of Bio-studies, Kyoto University, Япония) за предоставление плазмид pMpGE\_En03 и pMpGB011.

Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда (№ 22-16-00138) и стипендии президента Российской Федерации (№ СП-3391.2021.4) в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Настоящая статья не содержит исследований с использованием животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Дополнительная информация для этой статьи доступна по <https://doi.org/10.31857/S0026898422060234> для авторизованных пользователей.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fang C., Fernie A.R., Luo J. (2019) Exploring the diversity of plant metabolism. *Trends Plant Sci.* **24**, 83–98.
- Wang S., Alseikh S., Fernie A.R., Luo J. (2019) The structure and function of major plant metabolite modifications. *Mol. Plant.* **12**, 899–919.
- Chang H.-Y., Cheng T.-H., Wang A.H.-J. (2020) Structure, catalysis, and inhibition mechanism of prenyltransferase. *IUBMB Life.* **73**, 40–63.
- Yazaki K., Sasaki K., Tsurumaru Y. (2009) Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. *Phytochemistry.* **70**(15–16), 1739–1745.
- De Bruijn W.J.C., Levisson M., Beekwilder J., van Berkel W. J.H., Vincken J.-P. (2020) Plant aromatic prenyltransferases: tools for microbial cell factories. *Trends Biotechnol.* **38**(8), 917–934. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.02.006>
- Osorio M., Carvajal M., Vergara A., Butassi E., Zaccchino S., Mascayano C., Montoya M., Mejías S., Cortez-San Martín M., Vásquez-Martínez Y. (2021) Prenylated flavonoids with potential antimicrobial activity: synthesis, biological activity, and *in silico* study. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 5472. <https://doi.org/10.3390/ijms22115472>
- Khodanovich M.Y., Pishchelko A.O., Glazacheva V.Y., Pan E.S., Krutenkova E.P., Trusov V.B., Yarnykh V.L. (2019) Plant polyprenols reduce demyelination and recover impaired oligodendrogenesis and neurogenesis in the cuprizone murine model of multiple sclerosis. *Phytother. Res.* **33**, 1363–1373.
- Kopcsayova D., Vranova E. (2019) Functional gene network of prenyltransferases in *Arabidopsis thaliana*. *Molecules.* **24**, 4556. <https://doi.org/10.3390/molecules24244556>
- Van Gelder K., Virta L.K.A., Easlick J., Prudhomme N., McAlister J.A., Geddes-McAlister J., Akhtar T.A. (2021) A central role for polyprenol reductase in plant dolichol biosynthesis. *Plant Sci.* **303**, 110773. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110773>
- Tao R., Wang C.-Z., Ye J.-Z., Zhou H., Chen H.-X., Zhang C.-W. (2016) Antibacterial, cytotoxic and genotoxic activity of nitrogenated and haloid derivatives of C50–C60 and C70–C120 polyprenol homologs. *Lipids Health Dis.* **15**, 175. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0345-x>
- Surowiecki P., Onysk A., Manko K., Swiezewska E., Surmacz L. (2019) Long-chain polyisoprenoids are synthesized by AtCPT1 in *Arabidopsis thaliana*. *Molecules.* **24**, 2789. <https://doi.org/10.3390/molecules24152789>
- Akhtar T.A., Surowiecki P., Siekierska H., Kania M., Van Gelder K., Rea K.A., Virta L.K.A., Vatta M., Gawarecka K., Wojcik J., Danikiewicz W., Buszewicz D., Swiezewska E., Surmacz L. (2017) Polyprenols are synthesized by a plastidial *cis*-prenyltransferase and influence photosynthetic performance. *Plant Cell.* **29**, 1709–1725.
- Zimmer A., Lang D., Richardt S., Frank W., Reski R., Rensing S.A. (2007) Dating the early evolution of plants: detection and molecular clock analyses of orthologs. *Mol. Genet. Genomics.* **278**, 393–402.
- Asakawa Y., Ludwiczuk A., Nagashima F. (2013) Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry.* **91**, 52–80.
- Asakawa Y., Ludwiczuk A. (2018) Chemical constituents of bryophytes: structures and biological activity. *J. Nat. Prod.* **81**, 641–660.
- Commisso M., Guarino F., Marchi L., Muto A., Piro A., Degola F. (2021) Bryo-activities: a review on how bryophytes are contributing to the arsenal of natural bioactive compounds against fungi. *Plants* (Basel). **10**(2), 203. <https://doi.org/10.3390/plants10020203>
- Sugano S.S., Shirakawa S., Takagi J., Matsuda Y., Shimada T., Hara-Nishimura I., Kohchi T. (2014) CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol.* **55**(3), 475–481.
- Matsuda Y., Ishida S., Shimada T., Hara-Nishimura I., Osakabe K., Kohchi T. (2018) Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha*. *PLoS One.* **13**(10), e0205117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205117>
- Höfgen R., Willmitzer L. (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9877.
- Tsuboyama-Tanaka S., Nonaka S., Kodama Y. (2015) A highly efficient AgarTrap method for genetic transformation of mature thalli of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Biotechnol.* **32**(4), 333–336. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.15.0813a>
- Takenaka M., Yamaoka S., Hanajiri T., Shimizu-Ueda Y., Yamato K.T., Fukuzawa H., Ohya K. (2000) Direct transformation and plant regeneration of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Transgenic Res.* **9**, 179–185, 2000.
- Tamari F., Hinkley C.S., Ramprasad N. (2013) A comparison of DNA extraction methods using *Petunia hybrida* tissues. *J. Biomol. Tech.* **24**, 113–118. <https://doi.org/10.7171/jbt.13-2403-001>
- Grabinska K.A., Park E.J., Sessa W.C. (2016) *cis*-Prenyltransferase: new insights into protein glycosylation, rubber synthesis, and human diseases. *J. Biol. Chem.* **291**(35), 18582–18590.
- Surmacz L., Swiezewska E. (2011) Polyisoprenoids – secondary metabolites or physiologically important superlipids? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **407**, 627–632.
- Bowman J. L., Kohchi T., Katsuyuki Y., Jenkins J., Shu S., Ishizaki K., Yamaoka S., Nishihama R., Nakamura Y., Berger F., Adam C., Aki S. S., Althoff F.,

- Araki T., Arteaga-Vazquez M.A., Balasubramanian S., Barry K., Bauer D., Boehm C.R., Briginshaw L., Caballero-Perez J., Catarino B., Chen F., Chiyoda S., Chovatia M., Davies K.M., Delmans M., Demura T., Dierschke T., Dolan L., Dorantes-Acosta A.E., Eklund D.M., Florent S.N., Flores-Sandoval E., Fujiyama A., Fukuzawa H., Galik B., Grimanelli D., Grimwood J., Grossniklaus U., Hamada T., Haseloff J., Hetherington A.J., Higo A., Hirakawa Y., Hundley H.N., Ikeda Y., Inoue K., Inoue S.-i., Ishida S., Jia Q., Kakita M., Kanazawa T., Kawai Y., Kawashima T., Kennedy M., Kinose K., Kinoshita T., Kohara Y., Koide E., Komatsu K., Kopischke S., Kubo M., Kyozuka J., Lagercrantz U., Lin S.-S., Lindquist E., Lipzen A.M., Lu Ch.-W., De Luna E., Martienssen R.A., Minamino N., Mizutani Ma., Mizutani M., Mochizuki N., Monte I., Mosher R., Nagasaki H., Nakagami H., Naramoto S., Nishitani K., Ohtani M., Okamoto T., Okumura M., Phillips J., Pollak B., Reinders A., Rovekamp M., Sano R., Sawa S., Schmid M.W., Shirakawa M., Solano R., Spunde A., Suetsugu N., Sugano S., Sugiyama A., Sun R., Suzuki Y., Takenaka M., Takezawa D., Tomogane H., Tsuzuki M., Ueda T., Umeda M., Ward J.M., Watanabe Y., Yazaki K., Yokoyama R., Yoshitake Y., Yotsui I., Zachgo S., Schmutz J. (2017) Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell*. **171**, 287–304.
26. Kharel Y., Koyama T. (2003) Molecular analysis of *cis*-prenyl chain elongating enzymes. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 111–118.
27. Surmacz L., Plochocka D., Kania M., Danikiewicz W., Swiezewska E. (2014) *cis*-Prenyltransferase AtCPT6 produces a family of very short-chain polyisoprenoids in planta. *Biochim. Biophys. Acta*. **1841**, 240–250.
28. Муразов Я.Г., Нюганен А.О., Артемьева А.С. (2021) Оценка химиопрофилактического потенциала полипrenoлов из хвои *Picea abies* L. и *Pinus sylvestris* L. на модели канцерогенеза предстательной железы у самцов Wistar. *Вопросы питания*. **90**(3), 104–115.
29. Sumardi S., Basyuni M., Wati R. (2018) Antimicrobial activity of polyisoprenoids of sixteen mangrove species from North Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas*. **19**(4), 1243–1248.
30. Istiqomah M.A., Hasibuan P.A.Z., Nuryawan A., Sumaiyah S., Siregar E.S., Basyuni M. (2021) The anti-cancer compound dolichol from *Ceriops tagal* and *Rhizophora mucronata* leaves regulates gene expressions in WiDr colon cancer. *Sains Malaysiana*. **50**(1), 181–189.
31. Hahn F., Nekrasov V. (2018) CRISPR/Cas precision: do we need to worry about off-targeting in plants? *Plant Cell Rep.* **38**(4), 437–441. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2355-9>
32. Ossowski S., Schneeberger K., Lucas-Lledo J.I., Warthmann N., Clark R.M., Shaw R.G., Weigel D., Lynch M. (2010) The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Science*. **327**(5961), 92–94.
33. Lu Z., Cui J., Wang L., Teng N., Zhang S., Lam H.-M., Zhu Y., Xiao S., Ke W., Lin J., Xu C., Jin B. (2021) Genome-wide DNA mutations in *Arabidopsis* plants after multigene rational exposure to high temperatures. *Genome Biol.* **22**, 160.

## ***cis*-Prenyltransferases of *Marchantia polymorpha*: Phylogenetic Analysis and Perspectives for Use as Regulators of Antimicrobial Agents' Synthesis**

L. R. Valeeva<sup>1, \*</sup>, S. M. Dzhabrailova<sup>1</sup>, and M. R. Sharipova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

\*e-mail: [liarvaleeva@gmail.com](mailto:liarvaleeva@gmail.com)

The synthesis of secondary metabolites plays one of the central roles in the survival of plants and their resistance to biotic and abiotic stress. Nevertheless, fundamental and applied studies of plant secondary metabolites, polyisoprenols, remain less developed. However, a wide distribution of polyisoprenols in plants shows their important role in cellular metabolism. Plant polyisoprenols are synthesized by *cis*-prenyltransferases (CPTs), the study of which is necessary to understand the synthesis pathways, localization, and functions of plant polyisoprenols. Bryophytes, including liverwort *Marchantia polymorpha*, are a unique group of plants with great potential for the study of CPTs. We analyzed the genome of *M. polymorpha* and identified seven CPTs genes homologous to *AtCPT7* and *AtCPT3* genes of *Arabidopsis thaliana*, which involved in the synthesis of polyisoprenols. Four individual lines of *M. polymorpha* plants with mutations in *MpCPT7.37* gene were obtained. It was shown that in three lines the mutation led to a translational frameshift and gene knockout. However, knockout of only the type 7 of CPTs had no effect on plant growth and survival. Analysis of the antibacterial activity of mutant plant tissue extracts did not reveal significant changes compared to wild-type tissue extracts that could be related to a compensatory effect of the activity of other CPTs. These data give us the necessary base for the further studies of bryophyte CPTs and their products.

**Ключевые слова:** *cis*-prenyltransferases, polyisoprenols, bryophytes, *Marchantia polymorpha*, secondary metabolites, antibacterial activity, CRISPR/Cas9