

«Генетическая организация
комплекса лигнолитических
ферментов гриба
Phanerochaete avellanea (Bres.)
J.Erikss. et Hjortstam»

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Козлова Мария Дмитриевна

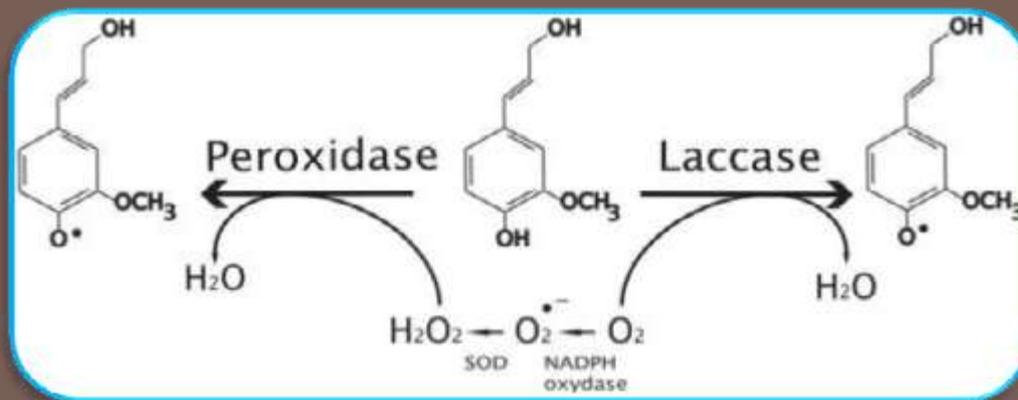
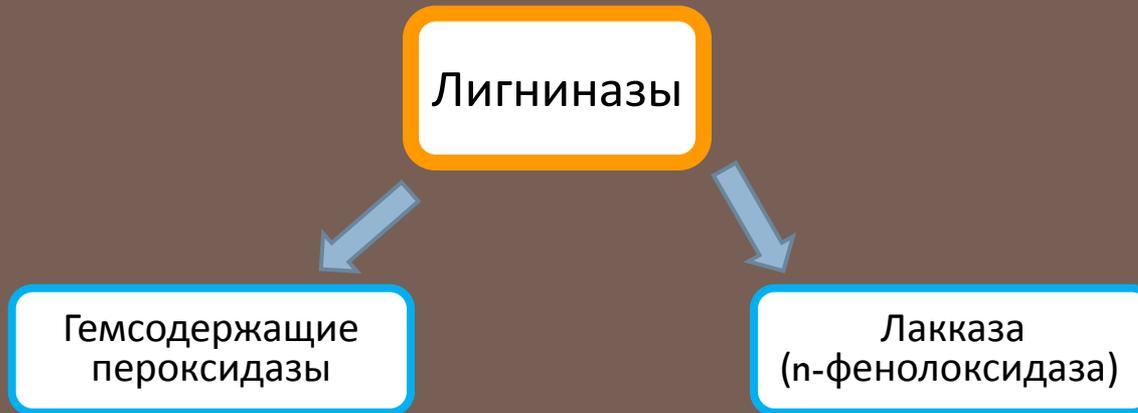


Научный руководитель:
д.б.н. проф. О.В. Королева

Куратор:
к.б.н. И. Д. Инсарова

Москва, 2015

Введение



Введение

Биосенсоры,
иммуноанализ

Биоремедиация

Биотопливные
элементы

Медицина

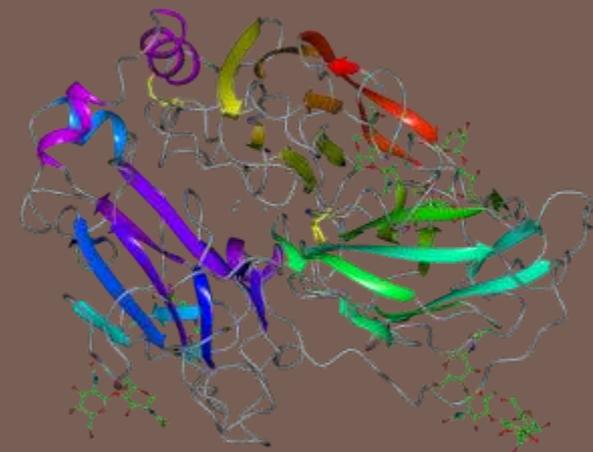
Лакказа

Органический
синтез

Пищевая
промышленность

Текстильная
промышленность

Целлюлозо-бумажная
промышленность



Катализирует реакцию
восстановления молекулярного
кислорода непосредственно до воды,
минуя стадию образования перекиси
водорода

Оксидоредуктаза

Лакказа

Лигнолитический
фермент

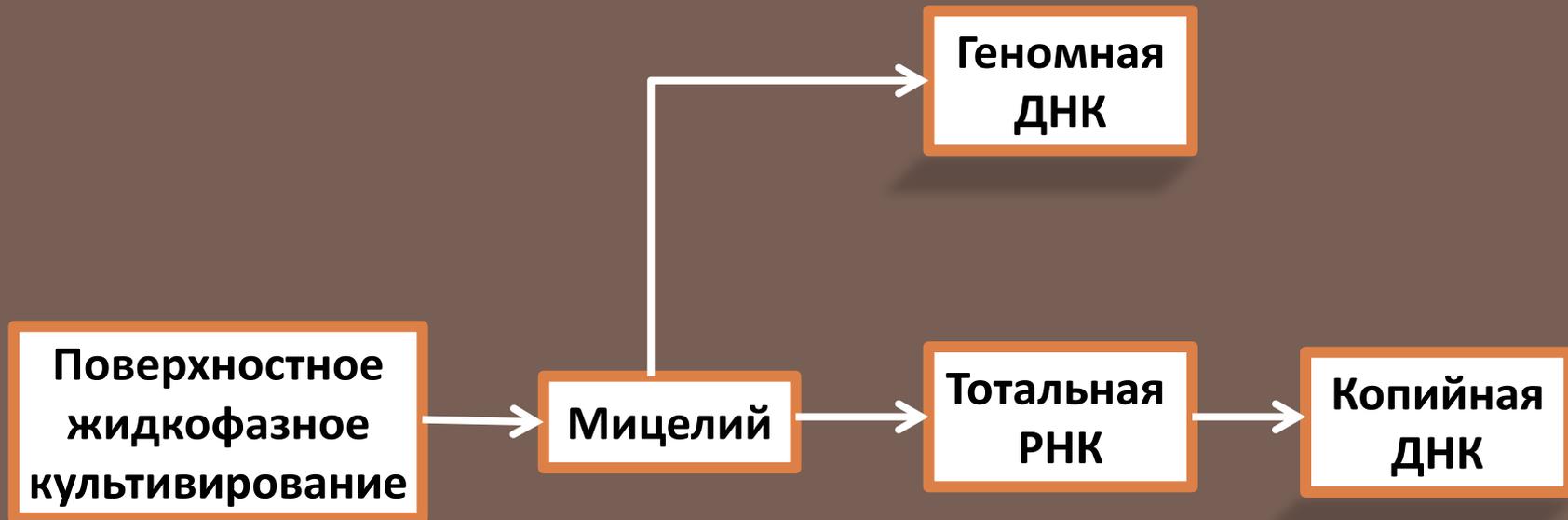
Цель

Целью данной работы было установление полноразмерных последовательностей мРНК для каждой изоформы лакказы гриба *Phanerochaete avellanea*, определение экзон-интронной структуры, а также проведение филогенетического анализа на основании полученных данных.

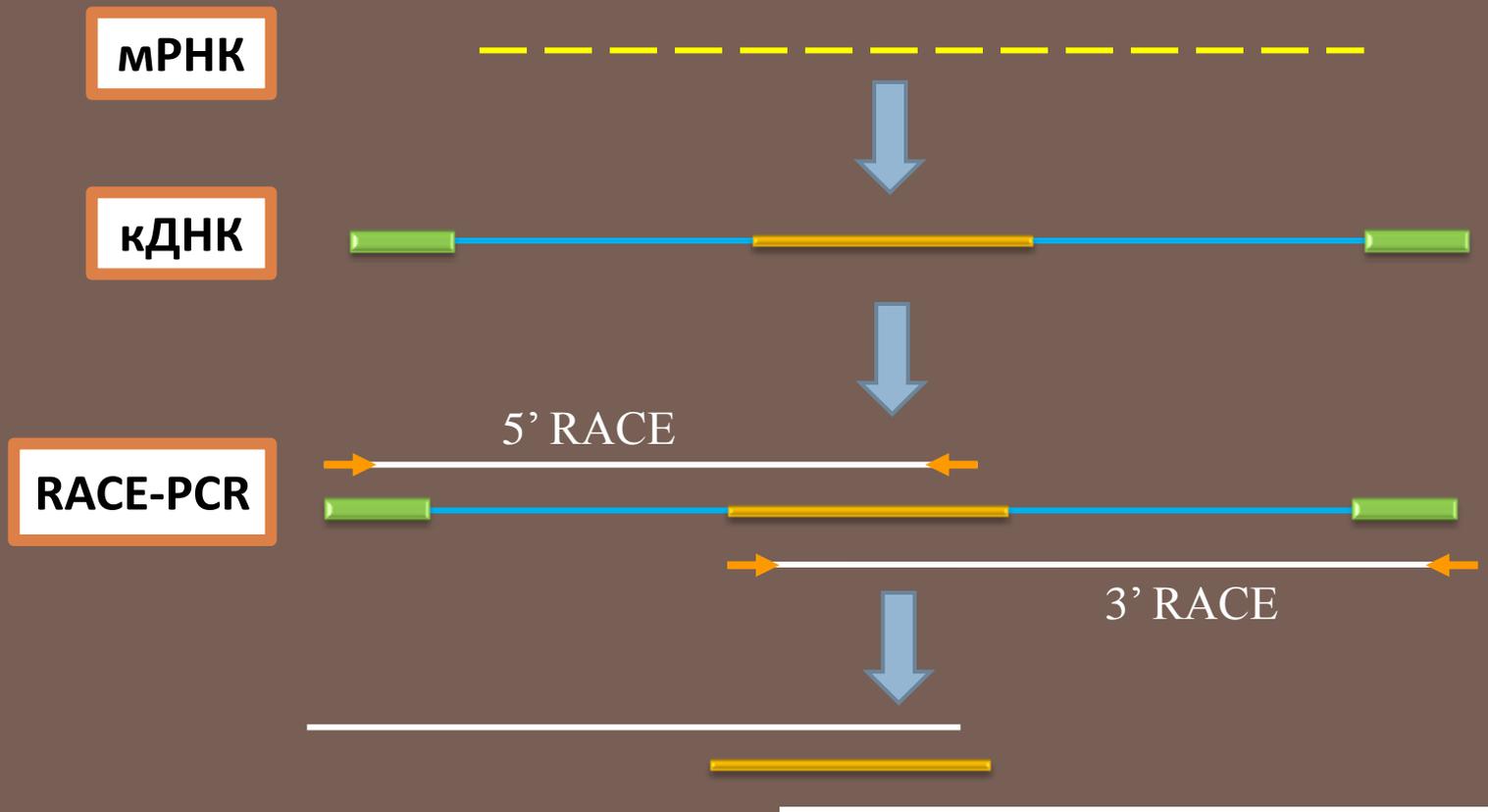
Задачи

- ❖ подбор геноспецифичных (для каждой изоформы) праймеров для анализа транскриптов мРНК и для анализа геномных локусов, содержащих эти гены
- ❖ установление полноразмерной последовательности мРНК для каждой изоформы с использованием технологии RACE-PCR с последующим секвенированием по Сэнгеру
- ❖ установление экзон-интронной структуры

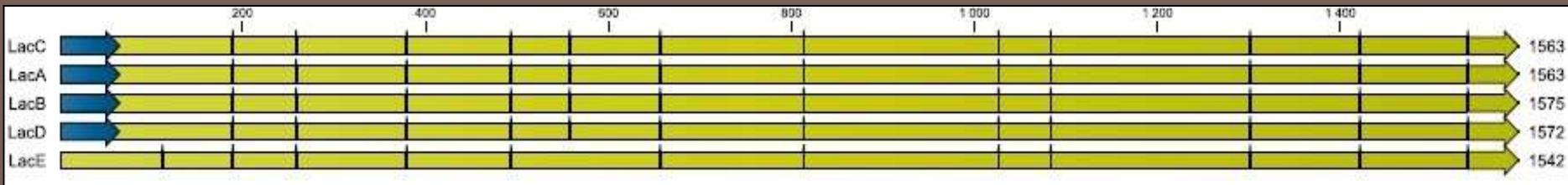
Ход работы: получение тотальной и копийной ДНК



Ход работы: получение полноразмерных транскриптов



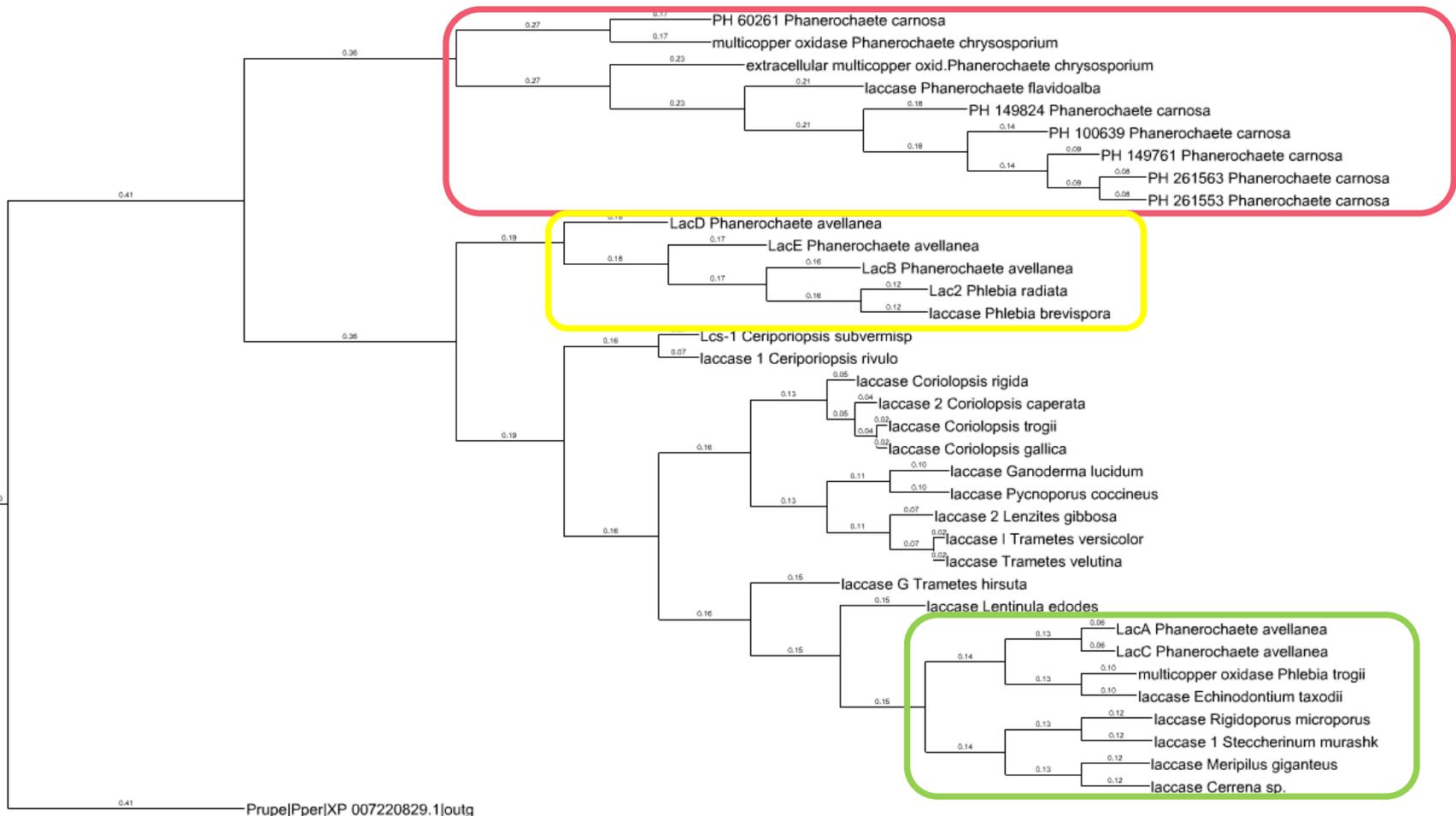
Результаты



| lac | L1 | | | | L2 | | | | L3 | | | L4 | | | | | | | | | | | | |
|-------|---------------------------|----|---|---|----|----|---|---|----|----|----|----|---|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | T2 | T3 | | | T3 | T3 | | | T1 | T2 | T3 | T3 | | T3 | T1 | | | | | | | | | |
| lac A | H | W | H | G | L | F | Q | H | G | T | N | W | A | D | G | P | A | F | V | N | Q | C | P | I |
| lac C | H | W | H | G | L | F | Q | H | G | T | N | W | A | D | G | V | A | F | V | N | Q | C | P | I |
| lac B | H | W | H | G | L | F | Q | H | G | T | A | W | A | D | G | P | A | F | V | T | Q | C | P | I |
| lac D | H | W | H | G | L | T | Q | H | G | S | N | W | A | D | G | P | A | F | V | T | Q | C | P | I |
| lac E | H | W | H | G | E | K | Q | H | D | S | N | W | A | D | G | V | A | W | V | T | Q | C | P | I |
| | HWHGLFQHG TNWADGPAFVNQCPI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | GTFWYHSHLATOYCDGLRGPL | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | HPFHLHGH | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | GPWFLHCHIDWHLQAGFAIVL | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | GPWFLHCHIDFHLNAGFAVVM | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | GPWFLHCHIDWHLQAGFAIVL | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | GPWFLHCHIDFHLQAGFAVVM | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | HPFHLHGH | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | GPWFLHCHIDWHLQAGFAIVX | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | lacA | lacC | lacB | lacD | lacE |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| lacA | | 88,08 | 61,74 | 60,57 | 59,92 |
| lacC | 88,08 | | 62,50 | 61,70 | 60,68 |
| lacB | 61,74 | 62,50 | | 62,81 | 62,62 |
| lacD | 60,57 | 61,70 | 62,81 | | 61,67 |
| lacE | 59,92 | 60,68 | 62,62 | 61,67 | |

Результаты: филогенетический анализ



Выводы

- ❖ Получены транскрипты пяти предполагаемых генов лакказ. Для каждого идентифицированного транскрипта установлены последовательности соответствующих аминокислот.
- ❖ Полученные аминокислотные последовательности фрагментов пяти генов лакказ содержат структурные гистидиновые мотивы, характерные для всех генов лакказ (L1-L4). Во всех транскриптах обнаружены потенциальные сайты N-гликозилирования. Таким образом, данные фрагменты лакказ содержат необходимые для формирования активного центра аминокислотные остатки, т.е. полученные в ходе исследования нуклеотидные последовательности являются фрагментами генов, потенциально кодирующих функционально активные ферменты.
- ❖ Для всех последовательностей, кроме *lacE*, были найдены сигнальные пептиды.

Выводы

- ❖ Самой высокой степенью идентичности аминокислотных и нуклеотидных последовательностей обладают лакказы *lacA* и *lacC*.
- ❖ Для каждой последовательности предполагаемых генов лакказ установлена экзон-интронная структура. Позиции интронов идентичны во всех транскриптах, кроме *lacE*, в котором был обнаружен дополнительный интрон, но один из общих для всех отсутствует.
- ❖ С помощью множественного выравнивания аминокислотных последовательностей построено предполагаемое филогенетическое дерево лакказ базидиальных грибов. Гены *lacB*, *lacC* и *lacD* формируют общую кладу с лакказами из грибов рода *Phlebia*. *lacA* и *lacC* принадлежат к смешанной клade различных базидиальных грибов. Интересен факт, что гены грибов рода *Phanerochaete* формируют отдельно стоящую кладу, которая не содержит ни одного из идентифицированных в данной работе генов.

Благодарности

Хочу выразить свои благодарности

- ❖ Тяжеловой Татьяне Владимировне
- ❖ Моисеенко Константину Валерьевичу
- ❖ Мосуновой Ольге Владировне
- ❖ Васиной Дарье Владимировне

И остальным сотрудникам лаборатории молекулярных основ биотрансформаций института биохимии им. А.Н. Баха РАН

Публикации по теме работы

- ❖ Результаты работы были представлены в виде постерного доклада на конференции «Dead wood meeting» (Lammi Biological Station of University of Helsinki, Finland on 24 – 27 May 2015).
- ❖ По результатам данной работы готовится к печати статья «Characterization of the multicopper oxidase gene family in white-rot fungi *Phanerochaete avellanea* (Bres.) J.Erikss. et Hjortstam.»
- ❖ Полученные нуклеотидные последовательности пяти полноразмерных транскриптов, кодирующих лакказы были забанкированы в системе GenBank®

Спасибо за внимание!