

Министерство образования и науки РФ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

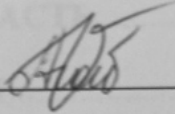
Специальность: 06.04.01 (ОКСО 020400.68) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПУТИ,  
КОНТРОЛИРУЮЩЕГО ДЛИНУ ТЕЛОМЕР В МОДЕЛЬНОМ  
РАСТЕНИИ *ARABIDOPSIS THALIANA*

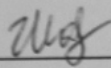
Работа завершена:

« 7 » июня 2018 г.  (И.А. Агабекян)


Работа допущена к защите:

Научные руководители

к.б.н., в.н.с. НИЛ Микробные биотехнологии

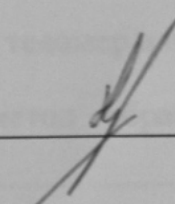
« 7 » июня 2018 г.  (Е.В. Шакиров)

к.б.н., доцент каф. генетики ИФМиБ

« 7 » июня 2018 г.  (О.А. Гимадудинов)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

« 8 » 06 2018 г.  (В.М. Чернов)

Казань – 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

|   |           |
|---|-----------|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....  | 4         |
| ВВЕДЕНИЕ.....   | 5         |
| <b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>   | <b>8</b>  |
| 1.1 Проблема недорепликации ДНК.....  | 8         |
| 1.2 Теории старения.....  | 9         |
| 1.3 Структура и длина теломер.....  | 14        |
| 1.4 Белки, связанные с теломерами.....  | 15        |
| 1.5 Регуляция длины теломер.....  | 18        |
| 1.6 <i>Arabidopsis thaliana</i> как модельное растение для изучения биологии теломер..... | 19        |
| 1.7 Характеристика исследуемых генов.....   | 22        |
| <b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....</b>   | <b>25</b> |
| <b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>  | <b>25</b> |
| 2.1 Объект исследования, условия роста и культивирования.....                             | 25        |
| 2.2 Выделение геномной ДНК.....   | 26        |
| 2.3 Электрофорез ДНК в агарозном геле.....  | 28        |
| 2.4 Генотипирование.....  | 28        |
| 2.5 Полимеразная цепная реакция.....  | 30        |
| 2.6 Анализ длины теломер методом рестрикции концевых фрагментов хромосом (TRF).....       | 31        |
| 2.7 Анализ изменения длины теломер в нескольких поколениях.....                           | 33        |
| 2.8 Биоинформационный метод обработки данных, полученных при помощи TRF анализа.....      | 33        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.9 Цитогенетический анализ анафазных клеток во время митоза .....                         | 34        |
| 2.9.1 Подготовка препаратов для цитогенетического анализа анафаз митоза .....              | 34        |
| <b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ .....</b>   | <b>36</b> |
| 3.1 Генотипирование растений для идентификации гомозиготных по T-ДНК вставке мутантов..... | 36        |
| 3.2 Проверка качества геномной ДНК .....   | 37        |
| 3.3 Анализ длины теломер в растениях -мутантах по исследуемым генам                        | 38        |
| 3.4 Цитогенетический анализ клеток во время анафазы митоза .....                           | 48        |
| <b>ВЫВОДЫ .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>   | <b>52</b> |



## ВВЕДЕНИЕ

Теломеры представляют собой важнейшие структуры на концах эукариотических хромосом, которые состоят из теломерной ДНК и комплекса специфических белков, связывающихся исключительно с теломерными повторами. Теломеры существуют для предотвращения хромосомных слияний, защиты от экзонуклеазных атак, а также для общего поддержания целостности генома. С каждым делением клетки теломеры укорачиваются с 5' - конца дочерней цепи, что в конечном итоге приводит к прекращению деления клетки и к клеточному старению. Длина теломер при рождении определяет количество клеточных делений соматических клеток, и, как следствие, время жизни клетки. Установлено, что длина теломер эволюционно консервативна и находится в определенном диапазоне длин для каждого вида. Нуклеотидная последовательность теломерной ДНК также постоянна и состоит из простых повторов TTTAGGG у растений и TTAGGG у позвоночных [Lamb *et al.*, 2007].

Современные модели регуляции длины теломер предполагают, что длина теломер зависит от теломер-специфичных белков, которые регулируют доступ теломеразы к концам хромосом. Теломераза является важнейшим ферментом эукариотических организмов, который добавляет теломерные последовательности к концам хромосом. Теломеры, которые достигают оптимальной длины, несут полный набор теломер-связанных белков и существуют в закрытой конформации, недоступной для теломеразы. При бездействии теломеразы, длина теломер постепенно сокращается, что приводит к образованию более открытой и доступной для теломеразы конформации [Shakirov and Shippen, 2004]. Несмотря на общее понимание механизма регуляции длины теломер, многие вопросы до сих пор остаются без ответа, например, какие именно гены отвечают за установление правильной длины теломер. За последние два десятилетия значительные успехи в понимании биологии теломер были достигнуты благодаря использованию

различных модельных систем: червей, дрожжей и млекопитающих. Однако информация, полученная от отдельных организмов, не всегда может быть обобщена с другими системами, несмотря на общую эволюционную консервативность структуры теломер. Таким образом важным аспектом изучения регуляции длины теломер является выбор правильной модельной системы.

Модельное растение *Arabidopsis thaliana*, чей геном хорошо аннотирован и содержит множество генов, гомологичных генам других организмов, содержит сотни доступных экспериментально - картированных популяций, библиотеки тысяч точечных мутантов и линий нокаутов, обеспечивая уникальную возможность для анализа естественной вариации длины теломер и для идентификации генов, устанавливающих генотип - специфичный полиморфизм длины теломер [Riha and Shippen, 2003].

Так, в частности, ранее было установлено, что ген *OLI2* – гомолог человеческого и дрожжевого гена *NOP2a* является важным локусом, контролирующим длину теломер растений *A. thaliana* [Нигматуллина, 2018]. Помимо этого, он играет важную роль в регуляции роста клеток и клеточной пролиферации вместе с генами *AN3*, *OLI5*, *OLI7* [Fujikura *et al.*, 2009], влияние которых на биологию теломер еще неизвестно.

Таким образом, целью данной работы являлось изучение влияния генов *AN3*, *OLI5*, *OLI7* на регуляцию длины теломер в *Arabidopsis thaliana*.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

- 1) Получить гомозиготные линии мутантных растений по изучаемым генам.
- 2) Изучить изменение длины теломер в исследуемых мутантных линиях в нескольких поколениях растений.

3) Оценить количество хромосомных aberrаций, возникающих при делении клеток исследуемых мутантных линий.

Теломеры - это нуклеотидные структуры, которые защищают концы хромосом от деградации, надзорных процессов дублирования и т.д. ДНК. Существование этих концевых частей хромосом было впервые предложено в 1938 г. Миллером [Miller, 1938]. В 1961 году Хэйфлик предложил дождливую среду времени, представляя убедительные доказательства того, что первичные клетки не являются бессмертными, а могут осуществлять лишь ограниченное число клеточных делений. Это явление, в настоящее время называемое пределом Хэйфлика [Hayflick and Moorhead, 1961], представляло существование внутреннего клеточного механизма защиты клеток. После этого открытия российский ученый Александр Олеников впервые описал утрату концов хромосом фрагментами хромосом с останками клеточного деления [Олеников, 1971]. Термин «проблема недорепликации ДНК» описывает то, что линейные хромосомы не могут полностью реплицировать свои концы и, следовательно, сокращаются с каждым митотическим циклом. При каждом делении клетки несколько нуклеотидов 5'-конца дочерней цепи, которая синтезируется по механизму встраивания в цепь, будут утрачены. Теломеры также могут укорачиваться за счет окислительной деградации [Marrinella and Lyall, 2002; Hackett and Oelzel, 2003]. При отсутствии эффективного механизма восстановления продолжается процесс укорачивания хромосомы до тех пор, пока один конец хромосомы не начнет синтезировать цепочку повторенной ДНК, что приводит к истощению клеточного цикла. Соматические клетки, которые избегают укорачивания теломер, могут в подлинном смысле восстановить длину теломер [Hackett et al., 2001]. В отличие от большинства соматических клеток, в нейронах, стволовых и некоторых других типах клеток организма, которым необходимо постоянно делиться для правильного функционирования определенных тканей, существует механизм, который способен обойти





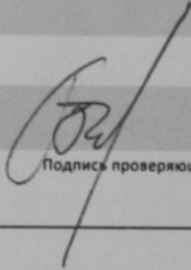
**АНТИПЛАГИАТ**  
ТВОРИТЕ СОБСТВЕННЫМ УМОМ

Казанский (Приволжский)  
федеральный университет

## СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа  
на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе  
Антиплагиат.ВУЗ

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| Автор работы                        | Агабекян Инна Андроникововна   |
| Факультет, кафедра,<br>номер группы | Институт фундаментальной медицины и биологии, генетика, 01-640-1   |
| Тип работы                          | Магистерская диссертация   |
| Название работы                     | Идентификация нового генетического пути, контролирующего длину теломер в модельном растении <i>A. thaliana</i>   |
| Название файла                      | Магистерск дисс. Агабекян И.А. для антиплагиата.docx   |
| Процент заимствования               | 2,07%  |
| Процент цитирования                 | 0,90%  |
| Процент оригинальности              | 97,03%   |
| Дата проверки                       | 17:07:32 30 мая 2018г.   |
| Модули поиска                       | Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Коллекция Медицина; Модуль поиска "КПФУ"; Модуль поиска Интернет; Коллекция ГЭОТАР; Коллекция ГАРАНТ; Коллекция Библиотека МГМУ им. Сеченова; Коллекция eLIBRARY.RU; Цитирование; Коллекция РГБ; Сводная коллекция ЭБС |
| Работу проверил                     | Бабынин Эдуард Викторович<br>ФИО проверяющего  |
| Дата подписи                        | <br>Подпись проверяющего  |

Чтобы убедиться  
в подлинности справки,  
используйте QR-код, который  
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.