**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: 06.04.01- Биология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

# *РОЛЬ ГЕНОВ TRF-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР БРИОФИТОВ*

Студент 2 курса
группы 01-840-2
"31" мая 2020 г. _____ (А.В. Санникова)

Научные руководители
д.биол.н., профессор,
"31" мая 2020 г. _____ (М.Р. Шарипова)
к.биол.н., с.н.с.,
"31" мая 2020 г. _____ (Л.Р. Валеева)

Заведующий кафедрой
д.биол.н., профессор,
"31" мая 2020 г. _____ (О.Н. Ильинская)

Казань–2020

**СОДЕРЖАНИЕ**


**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** 4

**ВВЕДЕНИЕ** 5

1 **ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ** 7

1.1 Теломеры – защитные структуры в составе хромосом 7

1.1.1 Структура теломер 8

1.1.2 Функциональная значимость теломер 13

1.2 Теломеры растений 15

1.3 Белки теломерного комплекса растений 18

1.3.1 TRF-подобные белки растений 20

1.4 Бриофиты – новые модельные организмы в биологии теломер 23

1.4.1 *Physcomitrella patens* – зеленые дрожжи в биологии теломер растений 25

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ** 28

2 **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ** 28

2.1 Бриофиты и условия их выращивания 28

2.2 Выделение геномной ДНК растений 29

2.3 Анализ длины теломер методом TRF (Terminal Restriction Fragment analysis) 30

2.4 Получение генетической конструкции для гомологичной рекомбинации 31

2.5 Подготовка ДНК для трансформации генома *P. patens* 33

2.6 PEG - опосредованная трансформация протопластов *P. patens* 34

2.7 Генотипирование растений-траснформантов 36

3 **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ** 37

3.1 Определение естественной вариабельности длины теломер у разных представителей бриофитов 37

3.2 Создание генетической конструкции для получения мутантных линий *P. patens* 42

3.3 Получение растений *P. patens* с нокаутированным геном TRFL2 44
3.4 Анализ длины теломер у растений *P.patens* с нокаутированным геном TRFL2 48
**ВЫВОДЫ** 52
**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ** 53

# РЕФЕРАТ

В ходе молекулярной эволюции преобразование кольцевых хромосом в линейные потребовало появления структуры, защищающей их концевые участки от повреждений. Эту функцию выполняют теломеры – нуклео-протеиновые комплексы на концах линейных хромосом эукариот. Однако последовательности теломер постепенно сокращаются с каждым делением клетки, в следствие чего теряют свою защитную функцию. В свою очередь, это коррелирует с клеточным старением. Поддержание сложной структуры и стабильности теломер обеспечивают специфические теломер-связывающие белки. Было показано, что TRF-белки шелтеринового комплекса – играют важную роль в поддержании стабильности теломер у млекопитающих. Среди белков, связывающих растительные теломеры, обнаружены гомологи – это TRF-подобные белки или белки TRFL.

Для изучения теломер-связывающих белков растений новым перспективным модельными организмами являются бриофиты. Они относятся к самой древней дивергировавшей от других наземных растений группе, чьи предки совершили переход из водной среды обитания на сушу примерно 450 миллионов лет назад. Важная особенность бриофитов – это медленная эволюция их геномов, что связано с их жизненным циклов, в котором преобладает гаплоидный гаметофит над диплоидным спорофитом. Использование бриофитов в качестве модельных организмов позволит исследовать функции и эволюцию TRFL белков растений, что расширит фундаментальные знания о биологии теломер растений и эукариот.

В работе были использованы представители класса листостебельных мхов *P. patens* (экотип Gransden, Великобритания; Villersexel, Франция; Reute, Германия; Kaskaskia, США), *C. purpureus* (RW40 (мужское растение), GG1 (женское растение), США), а также представитель класса сфагновых мхов *Sphagnum fallax* (экотип MW, США).

Для анализа длины теломер использовали протонему (ткань мхов в виде цепочек клеток, образующаяся на ранней стадии развития) мхов *P. patens* и *C. purpureus* и гаметофоры *S. fallax*. Выделяли геномную ДНК из растений. Концентрацию геномной ДНК измеряли на спектрофотометре. Качество выделенной ДНК (отсутствие деградированных молекул) проверяли электрофоретически. Анализ длины теломер проводили методом TRF (Terminal Restriction Fragment analysis, рестрикционный анализ терминальных фрагментов) совместно с Саузерн-блот анализом (Southern blotting).

Для получения линий растений-нокаутов по гену TRFL2 химически синтезированные последовательности 5'- и 3'- нетранслируемых областей гена 5'-UTR и 3'-UTR клонировали в ТА-вектор. Затем проводили химическую трансформацию компетентных клеток бактерий *E. coli* DH5α. Наличие полноразмерной вставки анализировали секвенированием.

Для трансформации использовали протонему *P. patens* экотипа Reute. Трансформация проходила в три этапа: 1) получение протопластов мха; 2) трансформация протопластов; 3) регенерация и селекция.

Далее провели генотипирование отобранных растений. В результате, было получено 2 стабильных трансформанта растений *P. patens*.

# ВВЕДЕНИЕ

Теломеры – это специализированные нуклеопротеиновые структуры, составляющие концевые участки эукариотических хромосом и обеспечивающие их полную репликацию, стабильность и защиту. Структура теломер консервативна и сохраняется во всех эукариотах, однако в то же самое время существует естественная вариация состава теломерной нуклеотидной последовательности, что указывает на возможные различия в регуляторных механизмах поддержания теломер у разных организмов. Однако изучение теломер и их регуляции на клетках животных осложнено такими факторами, как различие длин теломер и теломеразной активности в разных тканях, а также этическими нормами. В свою очередь, использование растений в качестве объектов исследований дает больше новых возможностей в области исследования биологии теломер. Уникальными организмами для исследования развития и эволюции растений являются бриофиты, что связано с их принадлежностью к одной из самых древних групп наземных растений. Кроме того, такие новые модельные растения, как мох *Physcomitrella patens*, обладают меньшим геномом и наличием однокопийных генов, что является преимуществом в проведении экспериментов обратной генетики.

Белки TRFL, связывающие двухцепочечную теломерную ДНК, были обнаружены у большинства исследованных растений. Тогда как в клетках животных их гомологи – TRF-белки – играют важнейшую роль в поддержании стабильности теломер, многие растения способны нормально развиваться при повреждении генов данных белков. Использование бриофитов в качестве модельных организмов позволит детально исследовать функции и эволюцию TRFL белков растений. Таким образом, изучение теломер в ранних наземных растениях позволит получить ранее неизвестные данные о функционировании теломер, что позволит расширить фундаментальные знания о биологии теломер растений и эукариот в целом.

Целью работы было определение роли генов TRF-подобных белков в регуляции длины теломер бриофитов.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1) Определить естественную вариабельность длин теломер у разных представителей бриофитов.
2) Создать генетическую конструкцию для получения растений-нокаутов *Physcomitrella patens no* гену TRFL2.
3) Получить растения-нокауты *Physcomitrella patens* по гену TRFL2.
4) Определить длину теломер у растений-нокаутов *Physcomitrella patens* по гену TRFL2.

## ВЫВОДЫ

1) Определена естественная вариабельность длин теломер у разных представителей бриофитов. Длина теломер у четырех различных экотипов мха *Physcomitrella patens* варьирует в диапазоне от 700 до 1200 п.о. Длина теломер мха *Ceratodon purpureus* у мужского растения составила в среднем 2500 п.о., женского растения в среднем 500 п.о. Длина теломер *Sphagnum fallax* составила в среднем 2400 п.о.
2) Создана генетическая конструкция для получения растений-нокаутов *Physcomitrella patens* по гену TRFL2.
3) Получены два индивидуальных растения-нокаута *Physcomitrella patens* по гену TRFL2.
4) Показано, что растения *Physcomitrella patens* с нокаутированным геном TRFL2 обладают более длинными теломерами по сравнению с диким типом. Установлено, что белок TRFL2 у мха *Physcomitrella patens* отвечает за негативную регуляцию длины теломер.