

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 (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (магистерская программа): Микробиология и вирусология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ  
TRFL БЕЛКИ В РЕГУЛЯЦИИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР РАСТЕНИЙ  
*MARCHANTIA POLYMORPHA*

Обучающийся 2 курса  
группы 01-240-2



Дядькина И.В.

Научный руководитель  
д-р биол. наук, профессор



Шарипова М.Р.

Научный руководитель  
канд. биол. наук, с.н.с.



Валеева Л.Р.

Заведующий кафедрой микробиологии  
д-р биол. наук, профессор



Ильинская О.Н.

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	7
1.1 Теломерная ДНК .....	7
1.2 Структурные особенности теломер .....	10
1.3 Белки теломерного комплекса .....	11
1.4 Особенности биологии теломер растений.....	15
1.5 TRF белки и их роль в регуляции биологии теломер растений.....	17
1.5.1 Эволюция TRF белков .....	17
1.5.2 Структурные особенности TRFL-белков.....	19
1.5.3 Функции TRF/TRFL белков в регуляции длины теломер .....	20
1.5.4 TRFL белки как регуляторы экспрессии генов .....	22
1.6 Бриофиты - новая модель для изучения эволюции теломерного комплекса растений .....	23
1.6.1 <i>Marchantia polymorpha</i> как новая модель в исследовании биологии теломер растений .....	24
1.6.2 Особенности теломер бриофитов .....	26
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	28
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	28
2.1 Растения и условия их выращивания .....	28
2.2 Штаммы и плазмиды.....	28
2.3 Создание векторных конструкций для трансформации растений .....	29
2.4 Секвенирование плазмид .....	31
2.5 Трансформация <i>A. tumefaciens</i> .....	31
2.6 Трансформация растений .....	31
2.7 Выделение геномной ДНК растений .....	32
2.8 Отбор растений-нокаутов .....	32
2.9 TRF-анализ длины теломер растений.....	34
2.10 Микроскопия растений-нокаутов.....	35

<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Создание рекомбинантных векторов для нокаутирования генов <i>TRB/TRFL</i> растений <i>M. polymorpha</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1.1 Биоинформатический поиск <i>TRB/TRFL</i> генов в геноме <i>M. polymorpha</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1.2 Получение рекомбинантных векторных конструкций .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1.3 Получение рекомбинантных штаммов <i>A. tumefaciens</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2 Получение растений <i>M. polymorpha</i>, одиночных нокаутов по генам <i>TRB/TRFL</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>3.3 Анализ длины теломер у растений-нокаутов по генам <i>TRFL</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>3.4 Анализ морфологии растений-нокаутов по генам <i>TRFL</i> .....</b>	<b>49</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>52</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>53</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Теломеры – важнейшие нуклеопротеиновые структуры, решающие проблемы недорепликации ДНК после каждого деления клетки и защиты концов линейной ДНК эукариот от нежелательной нуклеолитической деградации, рекомбинации, процессов репарации ДНК и летального слияния хромосом [Necasova *et al.*, 2017]. В состав теломер входит концевая область последовательности геномной ДНК, состоящая из тандемно расположенных минисателлитов, и комплекс различных белков, обуславливающих выполнение защитных функций концевых участков хроматина [Jenner *et al.*, 2022; Peska, Garcia, 2020]. Теломеры как эволюционно консервативные структуры обнаруживаются повсеместно у различных представителей эукариот. Однако биология теломер растений до сих пор менее изучена по сравнению с животными, а уже имеющиеся данные о строении и функционировании теломер показывают, что для них характерны особенности, отличающие их от других организмов. В том числе, до сих пор остается нераскрытым полный состав белкового комплекса, связывающего теломеры растений. Одними из наиболее важных белковых компонентов теломер, хорошо изученных в клетках человека, являются белки TRF, связывающие двуцепочечные теломерные повторы ДНК и выполняющие функции защиты и удлинения теломер. В свою очередь, остается не доказанной защитная функция идентифицированных растительных белков-гомологов TRF (TRF-like, TRFL). Кроме того, наличие большого количества паралогов генов *TRFL* внутри генома широко используемого модельного растения *Arabidopsis thaliana* усложняет задачу изучения функций этих генов в биологии теломер [Fulcher, Riha, 2016; Prochazkova Schrupfova *et al.*, 2016].

Изучение теломерного белкового комплекса и идентификация его компонентов возможна благодаря использованию новых модельных растительных организмов - бриофитов. Одним из наиболее перспективных представителей этой группы растений является *Marchantia polymorpha*, что

связано с избыточностью и низкой скоростью эволюции ее генома, доминированию гаплоидной стадии в жизненном цикле и развитым молекулярно-генетическим методам [Bowman *et al.*, 2022]. Кроме того, филогенетическое положение *M. polymorpha* в группе наиболее древних наземных растений делает ее идеальным кандидатом для изучения молекулярной эволюции теломер.

Целью настоящей работы явилось определение роли TRB/TRFL белков в регуляции длины теломер *M. polymorpha*.

В соответствии с поставленной целью, в работе решались следующие задачи:

- 1) Получить рекомбинантные векторные конструкции для нокаутирования генов *TRB/TRFL* в растениях *M. polymorpha*.
- 2) Получить индивидуальные линии растений-нокаутов по генам *MrTRB1*, *MrTBP1* и *MrTRFL* и изучить их морфологию.
- 3) Провести анализ длины теломер у мутантных растений по генам *TRB/ TRFL*.

## ВЫВОДЫ

1) Получены рекомбинантные векторные конструкции для нокаутирования генов *TRB/TRFL* в растениях *M. polymorpha*.

2) Получены девять индивидуальных линий растений-нокаутов по генам *MpTRB1*, *MpTBP1* и *MpTRFL* с различными мутациями в консервативных мотивах связывания теломерной ДНК. Показано, что растения-мутанты по гену *MpTRFL* линии TRFL №1 обладают нехарактерным для дикого типа развитием тканей таллома.

3) Показано, что ген *MpTBP1* является негативным регулятором длины теломер, тогда как ген *MpTRFL* является позитивным регулятором длины теломер *M. polymorpha*.