**Никулин, Алексей Донатович.**

## Структурные принципы взаимодействия белков-регуляторов трансляции с РНК : диссертация ... доктора химических наук : 03.01.03 ; 02.00.10 / Никулин Алексей Донатович; [Место защиты: Моск. гос. ун-т им. М.В. Ломоносова]. - Москва, 2019. - 254 с. : ил.

## Оглавление диссертациидоктор наук Никулин Алексей Донатович

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВВЕДЕНИЕ

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Узнавание белками одноцепочечных участков РНК

1.1. Аминоацил-тРНК-синтетазы

1.2. Домен с РНК-узнающим мотивом RRM

1.3. КН-домен

1.4. Домен «цинковые пальцы» ZnF

1.5. Pum-домен (PUF повторы)

1.6. TRAP

1.7. Домены с укладкой «ОВ-фолд»

1.8. Sm-фолд

2. Узнавание белками двуцепочечных РНК

2.1. Двуцепочечно-РНК связывающий домен dsRBD

2.2. Рибосомные белки

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Материалы

1.1. Химические реактивы, ферменты и другие лабораторные материалы70

1.2. Ферменты и наборы для экспериментов

1.3. Наборы и материалы для кристаллизации

1.4. Хроматографические носители

1.5. Буферы и другие растворы

1.6. Среды для культивирования микроорганизмов

1.7. Бактериальные штаммы, векторы и плазмиды

1.8. Приборы

2. Методы генной инженерии, молекулярной биологии и микробиологии

2.1. Плазмиды, несущие ген рибосомного белка L1

2.2. Плазмиды, несущие гены белков Hfq из E. coli и P. aeruginosa

2.3. Клонирование генов SmAP белков из M. jannaschii, M. vannielii,

S. acidocaldarius

2.4. Полимеразная цепная реакция

2.5. Сайт-направленный мутагенез последовательностей ДНК для получения белка PaeHfq с заменами аминокислотных остатков

2.6. Электрофорез ДНК в агарозном геле

2.7. Получение компетентных клеток E. coli

2.8. Трансформация клеток E. coli плазмидной ДНК методом теплового шока

2.9. Экспрессия генов рекомбинантных белков L1 в клетках Е. coli

2.10. Экспрессия генов белков Hfq дикого типа и их мутантных форм в клетках E. coli

2.11. Экспрессия генов белков SmAP из M. jannaschii, M. vannielii,

S. acidocaldarius в клетках E. coli

3. Биохимические методы при работе с белками

3.1. Препаративное выделение и очистка рекомбинантных белков L1

3.2. Препаративное выделение и очистка белков Hfq дикого типа и мутантных форм из клеток штаммов-суперпрдуцентов E. coli

3.3. Препаративное выделение и очистка белка SmAP M. jannaschii и его мутантных форм из клеток штаммов-суперпрдуцентов E. coli

3.4. Препаративное выделение и очистка белка SmAP M. vannielii из клеток штаммов-суперпрдуцентов E. coli

3.5. Препаративное выделение и очистка белков SmAP S. acidocaldarius из клеток штаммов-суперпрдуцентов E. coli

3.6. Спектрофотометрическое определение концентрации белков

3.7. Электрофорез белков в ПААГ в присутствии ДСН

3.8. Электрофорез белков в ПААГ в «околонативных» условиях

4. Биохимические методы при работе с РНК и нуклеотидами

4.1. Получение специфических фрагментов рРНК

4.2. Электрофорез РНК в ПААГ в денатурирующих условиях

4.3. Спектрофотометрическое определение концентраций нуклеиновых кислот

5. Физико-химические методы исследования белков

5.1. Анализ стабильности вторичной структуры белков с использованием спектров КД

5.2. Анализ термостабильности белков методом микрокалориметрии

6. Анализ взаимодействия белков с РНК и рибонуклеотидами

6.1. Определение сродства исследуемых белков к одиночным рибонуклеотидам по изменению флуоресцентной анизотропии

6.2. Определение констант ассоциации и диссоциации методом поверхностного резонанса плазмонов

6.3. Анализ взаимодействий исследуемых белков с «молекулярным маяком»

7. Кристаллизация белков, нуклеотид-белковых и РНК-белковых

комплексов

7.1. Кристаллизация комплекса SacLl со специфическим фрагментом рРНК длиной 55 нуклеотидов

7.2. Комплексы рибосомных белков L1 со специфическими фрагментами мРНК

7.3. Кристаллизация белка Hfq из P. aeruginosa дикого типа и мутантных форм

7.4. Кристаллизация SmAP белков архей

7.5. Получение кристаллов рибонуклеотид-белковых комплексов

8. Методы рентгеноструктурного анализа

8.1. Сбор и первичная обработка дифракционных данных

8.2. Определение структуры комплекса L1-рРНК методом многоволновой аномальной дифракции (MAD)

8.3. Определение структур комплексов рибосомного белка L1 с регуляторным участком мРНК методом многоволновой аномальной дифракции (MAD)

8.4. Определение структур комплексов рибосомного белка L1 с регуляторным участком мРНК методом молекулярного замещения

8.5. Определение структуры белка Hfq из P. aeruginosa

8.6. Определение структур мутантных форм белка Hfq из P. aeruginosa

8.7. Определение структур белков в комплексе с рибонуклеотидами

8.8. Определение структур SmAP белков

8.9. Анализ и построение изображений исследуемых структур

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Структурные исследования комплексов рибосомного белка L1 с

РНК

1.1. Взаимодействие рибосомного белка L1 с 23 S рРНК

1.2. Взаимодействие рибосомного белка L1 с мРНК

2. Структурные и функциональные исследования бактериального Lsm белка Hfq из Pseudomonas aeruginosa

2.1. Определение пространственной структуры белка Hfq из P. aeruginosa

2.2. Пространственная структура белка Hfq из P. aeruginosa

2.3. Термостабильность гексамера белка Hfq из P. aeruginosa

2.4. Определение вклада водородных связей, образованных консервативными аминокислотными остатками соседних мономеров белка, в стабильность белка Hfq из P. aeruginosa

2.5. Исследование рибонуклеотид-связывающих свойств белка Hfq из

P. aeruginosa

3. Разработка методики получения подходящих для кристаллизации нуклеотид-белковых комплексов

3.1. Кристаллизация и определение структур предполагаемых рибонуклеотид-белковых комплексов

3.2. Измерение равновесных констант диссоциации рибонуклеотид-белковых комплексов

4. Структурные и функциональные исследования архейных белков

SmAP

4.1. Определение пространственных структур SmAP белков

4.2. Определение сродства SmAP белков к флуоресцентно-меченым рибонуклеотидам

4.3. Определение и анализ пространственных структур комплексов SmAP белков с рибонуклеотидами

4.4. Взаимодействие SmAP белков с олиго(У) и олиго(А) РНК

4.5. Заключение

ВЫВОДЫ