**Зверева, Мария Эмильевна.**

## Теломераза : механизмы функционирования и регуляции : диссертация ... доктора химических наук : 03.01.03, 02.00.10 / Зверева Мария Эмильевна; [Место защиты: Моск. гос. ун-т им. М.В. Ломоносова]. - Москва, 2018. - 289 с. : ил.

## Оглавление диссертациидоктор наук Зверева Мария Эмильевна

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

5

ВВЕДЕНИЕ

1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ТЕЛОМЕРАЗА: СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ,

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ

1.1. Введение в обзор литературы

1.2. Поддержание длины теломер - основная функция теломеразы

1.3. Тестирование теломеразной активности

1.4. Структура теломер

1.4.1. Теломерная ДНК

1.4.2. Белки теломерного комплекса

1.4.3. TERRA - РНК, синтезирующаяся на теломерах

1.5. Компоненты теломеразы и ее структура

1.5.1. Теломеразная обратная транскриптаза

1.5.2. Теломеразная РНК

1.5.3. Дополнительные компоненты и особенности сборки теломеразного комплекса

1.5.4. Пространственная структура теломеразного комплекса

1.6. Функции теломеразного комплекса и ее компонентов,

не связанные с поддержанием длины теломер

1.6.1. Альтернативные функции теломеразной РНК

1.6.2. Альтернативные функции каталитической субъединицы теломеразы

1.7. Направленное ингибирование теломеразной активности

1.7.1. Ингибиторы теломеразы на основе аналогов нуклеотидов или нуклеозидов

1.7.2. Низкомолекулярные соединения ненуклеозидной природы как ингибиторы теломеразы

1.7.3. Олигонуклеотидные ингибиторы

1.8. Активация теломеразы

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Реактивы и препараты

2.1.1. Таблица 1. Растворы, буферы, гели, использовавшиеся в работе

2.1.2. Таблица 2. Олигонуклеотиды, использованные в работе

2.1.3. Таблица 3. Штаммы, использовавшиеся в работе

2.1.4. Таблица 4. Генно-инженерные конструкции и вектора, использованные в работе

2.2. Методы молекулярного клонирования

2.2.1. ПЦР

2.2.2. Приготовление векторов и вставок

2.2.3. Лигирование

2.2.4. Трансформация клеток E. coli

2.2.5. Определение первичной структуры ДНК

2.2.6. Выделение плазмидной ДНК

2.3. Общие методы работы с дрожжами

2.3.1. Трансформация клеток дрожжей

2.3.2. Анализ фенотипа дрожжей на ограниченность количества делений методом разбавлений

2.4. Общие методы работы с НК и белками

2.4.1. Выделение НК фенольной экстракцией

2.4.2. Очистка и концентрирование НК осаждением в спирте

2.4.3. Электрофоретическое разделение НК

2.4.4. Выделение геномной ДНК S. cerevisiae и H. polymorpha

2.4.5. Определение концентрации НК в растворе

2.4.6. Определение концентрации белков

2.4.7. Электрофоретическое разделение белков

2.4.8. Метод иммунного блотинга в модификации «Вестерн»

2.4.9. Введение [32Р]-метки в олигонуклеотиды

2.4.10. Выделение суммарной РНК с помощью горячей фенольной экстракции

2.4.11. Выделение суммарной РНК клеток с помощью коммерческих наборов

2.4.12. Получение РНК из РНК-белковых комплексов с помощью обработки протеиназой K

2.4.13. Удаление ДНК из смеси ДНК и РНК

2.4.14. Т7-транскрипция in vitro для синтеза РНК

2.4.15. Детекция РНК методом сопряженной с ПЦР обратной транскрипции

2.4.16. Тонкослойная хроматография

2.4.17. Выделение суммарного белка

2.5. Методы исследования НК-белковых комплексов и белков in vitro

2.5.1. Получение рекомбинантных белков теломеразного комплекса

2.5.2. Определение взаимодействия Est3 с олигонуклеотидами

2.5.3. Анализ диссоциации НК-дуплексов в присутствии белка Est3

2.5.4. Исследование гидролиза GTP и АТР белком Est3

2.5.5. Изучение димеризации Est3

2.5.6. Тест in vitro на функциональность рекомбинантного hpTERT

2.6. Методы, использованные при исследовании теломеразы в дрожжевых системах

2.6.1. Создание генно-инженерных конструкций и штаммов дрожжей

2.6.2. Создание штаммов дрожжей

2.6.3. Получение клеточного экстракта дрожжей

2.6.4. Выделение теломеразы методом аффинной хроматографии на стрептавидин-сефарозе

2.6.5. Выделение теломеразы дрожжей с помощью анионообменной хроматографии

2.6.6. Детекция теломеразной активности дрожжей in vitro

2.6.7. Фракционирование теломеразы в градиенте плотности глицерина

2.6.8. Анализ длины и последовательности теломерных концов

2.6.9. Оценка влияния повышенной температуры среды на длину теломер

2.7. Методы, использованные при поиске новых способов ингибирования активности теломеразы человека

2.7.1. Культивирование линий клеток и получение клеточных экстрактов

2.7.2. Методы определения in vitro активности теломеразы, добавляющей теломерный повтор человека

2.7.3. Проверка ингибирования ПЦР при тестировании теломеразной активности

2.7.4. Метод определения ингибирования активности теломеразы ex vivo

2.7.5. Определение количества теломеразной РНК человека с помощью метода обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР в реальном времени

2.7.6. Определение эффективности сборки теломеразного комплекса

2.7.7. Определение относительного уровня TER человека в клетках

2.7.8. Анализ цитотоксичности препаратов (МТТ-анализ)

2.7.9. Анализ олигонуклеотидов методом кругового дихроизма (КД)

2.7.10. Анализ ингибирования активности полимераз

2.7.11. Измерение деградации ДНК в присутствии медного комплекса тиогидантоинов

2.7.12. Анализ локализации медного комплекса тиогидантоинов в клетке

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. ТЕЛОМЕРАЗА: ДЕТАЛИ

ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ

3.1. Особенности функционирования теломеразного комплекса и его компонентов у дрожжей

3.1.1. Исследование свойств белка Est3 — компонента теломеразного комплекса дрожжей

3.1.2. Исследование взаимосвязи димеризации теломеразной РНК и синтеза теломерного повтора дрожжей S. cerevisiae

3.1.3. Белок, ковалентно связанный с биотином, компонент теломеразы

S. cerevisiae

3.1.4. Дрожжи H. polymorpha — модельная система для исследования теломеразы

3.2. Новые подходы к ингибированию теломеразы

3.2.1. Новые подходы к ингибированию теломеразы человека

3.2.2. Создание соединений, нацеленных на нарушение димеризации теломеразной РНК и блокирование сборки теломеразного комплекса

3.2.3. Изучение ингибирования активности теломеразы соединениями, моделирующими структуру НК

3.3. Заключение

ВЫВОДЫ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

БЛАГОДАРНОСТИ