

Молекулярная биология

Программа курса:

1. Клетки прокариот и эукариот. Разнообразие клеток. Особенности строения и упаковки ДНК. Органеллы. Процессы, протекающие в клетках. Биохимические процессы: синтез и распад органических соединений. Цитологические (клеточные) – поддержание строения клетки, механизмы ее деления, передвижения, межклеточное сообщение, построение организма (многоклеточного). Молекулярно-биологические – биосинтез ДНК, РНК и белков, регуляция этого процесса.
2. Объекты изучения – организмы, которые легко выращивать. Наиболее известные “модельные” организмы – *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*. Фенотип – проявление генотипа. Наблюдаемые фенотипы бактерий (и дрожжей)– скорость роста на различных средах, требования к питательным веществам (ауксотрофность), устойчивость к антибиотикам, устойчивость к стрессам. Фенотипы высших эукариот: морфология тела и более сложные.
3. Методы молекулярной и клеточной биологии. Микроскопия видимого света, флюоресцентная, конфокальная сканирующая. Методы окрашивания: красители, антитела, конъюгированные с флюоресцентными группами, рекомбинантные белки, соединенные с флюоресцирующими белками, гибридизация с флюоресцентным зондом (FISH). Клеточный сортер. Электронная микроскопия – сканирующая, теневая, электронная томография, крио электронная микроскопия.
4. Методы выделения и детекции компонентов. Способы разрушения клеток. Центрифугирование. Ультрацентрифугирование. Хроматография. Гель-фильтрация, гидрофобная, катионо- и анионообменная, аффинная. Ультрафильтрация. Обработка ферментами. Фенольная депротенинизация. Осаждение нуклеиновых кислот, белков. Гель-электрофорез ДНК и РНК: агарозный и полиакриламидный. Детекция ДНК и РНК: красители, радиоизотопы, флюоресцентные метки, блоттинг по Саузерну и Нозерн-блоттинг. Разделение белков электрофорезом в ПААГ. Детекция белков окрашиванием кумасси, серебром, иммуноблоттинг. Идентификация белков при помощи масс-спектрометрии MALDI.
5. Методы генной инженерии. Вектор. Плазмидные и интегративные вектора. Ферменты и реакции, применяемые в генной инженерии. Эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигаза, полинуклеотид-киназа, щелочная фосфатаза. ДНК-полимеразы. Обратная транскриптаза. Полимеразная цепная реакция. Химический синтез ДНК. Транскрипция *in vitro*. Сайт-направленный и случайный мутагенез. Рекомбинантные белки. Векторы для экспрессии.
6. Методы определения структуры макромолекул и их взаимодействия. Прямые методы: ядерный магнитный резонанс и рентгеноструктурный анализ. Методы поиска взаимодействующих молекул: аффинная хроматография, ко-иммунопреципитация, двухгибридная система. Методы поиска взаимодействующих участков макромолекул: делеционный анализ, мутации мест связывания, сшивки, химический и ферментативный пробинг, ограниченный протеолиз, тоупринтинг.

7. ДНК. Химическое строение. Коплементарные пары, типы спиралей. Строение бактериальной и эукариотической хромосомы. Ядро и его области. Хроматин. Нуклеосомы, гистоны и их модификации. Эу- и гетерохроматин. Домены хроматина, участки прикрепления к матриксу. Центромеры и теломеры. Необычные типы ядер: микро и макронуклеусы, их превращения.
8. Репликация ДНК прокариот. ДНК-полимеразы. Полимеризующая и экзонуклеазная активности. Строение ДНК-полимераз. Процессивность, фактор процессивности β . Репликативная вилка. Лидирующая и отстающая цепи. Фрагменты Оказаки. Праймаза, хеликазы и их направленность, SSB-белок. ДНК-лигазы, РНКазы, топоизомеразы I и II. Инициация репликации. Ориджин, DnaA-белок. Регуляция репликации прокариот. Терминация репликации. Разделение бактериальных хромосом по дочерним клеткам.
9. Рестрикция и модификация ДНК. ДНК-метилтрансферазы. Ферменты рестрикции, их типы и функция. Мегануклеазы.
10. Репликация эукариот. Клеточный цикл. Циклины и циклин-зависимые киназы. Контрольные точки (checkpoint). Множественность ориджинов эукариот. Сборка комплекса узнавания ориджина (ORC). Инициация репликации. Координация репликативных процессов. Координация инициации репликации с различных ориджинов. Особенности и ферментативный аппарат репликации эукариот. Сборка хроматина на синтезируемой ДНК. Удлинение теломер. Теломераза.
11. Митоз. Фазы митоза. Разборка ядерной оболочки. Профаза. Конденсация хроматина. Конденсины и когезины. Метафаза. Кинетохоры, centrosомы и организация веретена деления. Регуляция начала анафазы. Телофаза.
12. Стратегии репликации некоторых бактериофагов и вирусов. Репликация фага лямбда, интеграция в геном. Репликация одноцепочечных фагов - ϕ X174. Репликация фага Мю. Репликация ретровирусов. РНК-содержащие вирусы: пикорнавирусы, вирус гриппа.
13. Репарация. Репарация при помощи вырезания основания (BER). ДНК-гликозидазы. Репарация при помощи удаления нуклеотидов (NER). Репарация неспаренных нуклеотидов (Mismatch). Система определения новосинтезированной цепи. SOS-ответ. Репарация двухцепочечных разрывов с помощью соединения концов.
14. Рекомбинация. Гомологичная рекомбинация. Мейоз и мейотическая рекомбинация. Репарация с помощью рекомбинации. Сайт-специфическая рекомбинация. VDJ-рекомбинация, создание разнообразия антител. Интеграция вирусной и фаговой ДНК в геном. Мобильные генетические элементы. Ретровирусы и ретротранспозоны.
15. Транскрипция у бактерий. РНК-полимераза, особенности строения и инициации транскрипции. Отличие РНК- и ДНК-полимераз. Промоторы. Последовательность стадий инициации. Закрытый и открытый комплекс. Сигма факторы. Регуляция транскрипции с помощью замены сигма-фактора. Каскад активации/инактивации NtrC. Активаторы и репрессоры транскрипции. Альфа субъединица РНК полимеразы, ее взаимодействие с UP-элементами и белками-активаторами. Репрессия и активация транскрипции с помощью изменения геометрии ДНК – ртутный репрессор. Примеры регуляции транскрипции – лактозный оперон, *pir*-оперон. Регуляция транскрипции с помощью локализации транскрипционного фактора – пример для прокариот. Реитеративная инициация, регуляция с помощью DksA/ppGpp.
16. Атенуация – регуляция транскрипции с помощью изменения вторичной структуры транскрипта. Механизмы аттенуации, зависящие от скорости трансляции, скорости транскрипции, связывания белков, РНК и низкомолекулярных соединений. Рибопереключатели. Терминация и антитерминация. Регуляция экспрессии генов бактериофагов T4 и лямбда.

17. Транскрипция у эукариот. РНК-полимеразы и их специализация. Синтез рРНК и регуляция РНК полимеразы I. Типы генов, транскрибируемых РНК-полимеразой III. Стадии инициации транскрипции РНК-полимеразой III для различных типов генов. Регуляция активности РНК-полимеразы III.
18. РНК-полимераза II. Стадии инициации транскрипции РНК-полимеразой II. Базальные факторы транскрипции, С-концевой домен РНК-полимеразы II и его фосфорилирование в процессе инициации транскрипции. Белки, связанные с С-концевым доменом, медиатор и его функции. Элонгация транскрипции РНК-полимеразой II.
19. Транскрипция и хроматин. Эухроматин и гетерохроматин. Модификации гистонов: ацетилирование, деацетилирование, метилирование, другие модификации. Связь модификаций и степени компактизации хроматина. Ферменты, модифицирующие хроматин. Гистоновый код. Модификация (метилирование) ДНК, связь метилирования ДНК и транскрипции. Эпигенетика. Ферменты, компактизирующие и декомпактизирующие хроматин. Связь модификаций гистонов, АТФаз, изменяющих структуру хроматина и транскрипционных факторов.
20. Специфические транскрипционные факторы. Репрессоры и активаторы, ко-репрессоры и ко-активаторы. Типы транскрипционных факторов, различающихся структурой ДНК-связывающих доменов. ДНК связывающие домены спираль-поворот-спираль, лейциновые молнии и цинковые пальцы. Способы регуляции активности транскрипционных факторов – связывание лиганда, модификация, изменение локализации.
21. Регуляция процессов внутри клетки с помощью внеклеточных сигналов. Примеры передачи регуляторных сигналов от поверхности клеток в ядро. Ядерные рецепторы – транскрипционные факторы. Рецепторы, действующие через гетеротримерные G-белки. Циклический АМР и другие вторичные посредники передачи сигнала. Рецепторы тирозин – киназы. Белок Ras и MAP-киназный каскад.
22. Регуляция процессов внутри клетки с помощью внеклеточных сигналов (продолжение). Рецепторы, ассоциированные с тирозин-киназами. СТАТ-белки. Рецепторы серин/треонин киназы, Smad-белки. Рецепторы, подвергающиеся протеолизу при связывании лиганда (Delta/Notch). Регуляция дифференцировки с помощью рецептора Toll у дрозофилы. Toll-подобные рецепторы в иммунной системе.
23. Созревание транскрипта. Стадии созревания пре-мРНК. Кепирование. Сплайсинг и малые ядерные РНК. Особенности строения мяРНК. Стадии сплайсинга. Неканонические АТ-АС интроны, транс-сплайсинг. Полиаденилирование. Взаимодействие процессов созревания и транскрипции пре-мРНК.
24. Созревание пре-тРНК. РНКаза Р. Сплайсинг пре-тРНК. Модификации тРНК. Созревание рРНК. Малые ядрышковые РНК С/D и Н/АСА классов. Созревание рРНК прокариот – индивидуальная модификация нуклеотидов. Необычные формы созревания РНК. Рибозимы I и II группы, каталитический механизм и строение. Формирование 3'-конца мРНК гистонов. Редактирование РНК. Связь созревания и транспорта РНК.
25. Биосинтез белка. Генетический код. Принцип декодирования. Аминоацил-тРНК синтетазы. Инициация трансляции у прокариот. Участок связывания рибосом на мРНК – последовательность Шайн-Дальгарно, инициаторный кодон и другие особенности. Факторы инициации – IF1, IF2 и IF3. Пути регуляции инициации трансляции. Регуляция трансляции мРНК рибосомных белков по механизму отрицательной обратной связи (feedback). Регуляция трансляции с помощью связывания белков с участком посадки рибосом (треонил-тРНК синтетаза, S15). Саморегуляция экспрессии гена *infC* (кодирует IF3).

26. Биосинтез белка. Цикл элонгации. Связывание аминоксил-тРНК (aa-тРНК) с А-участком рибосомы. EF-Tu – типичный G-белок. Механизм декодирования. Антибиотики, влияющие на декодирование – стрептомицин и паромомицин. Пептидилтрансферазная реакция. Пуромицин. Транслокация. Фактор транслокации EF-G. Терминация трансляции. Стоп-кодона. Факторы терминации. Сходство и различие в узнавании стоп-кодонов и кодонов, кодирующих аминокислоты. Разборка посттерминационного комплекса.
27. Регуляция элонгации и терминации трансляции. Регуляция трансляции с помощью пептидов – secM и traC. Антибиотики, связывающиеся с пептид-проводящим туннелем. Индукция экспрессии ErmC. Необычные события в трансляции. Программируемый сдвиг рамки считывания. Регуляция синтеза RF2, DnaX, сдвиг рамки считывания у ретровирусов. Рибосомные “прыжки”. Вставка селеноцистеина, транс-трансляция.
28. Инициация трансляции у эукариот. Модель Козак. Трансляция мРНК, содержащих IRES-элементы (пикорнавирусные мРНК, мРНК гепатита С и вируса паралича свертка). Регуляция трансляции у эукариот. Фосфорилирование eIF2a. Регуляция трансляции GCN4. 4E-связывающие белки. Регуляция трансляции белком Sxl у дрозофилы.
29. Деградация мРНК. Распад мРНК бактерий - RNКаза E, RNРаза. Распад мРНК эукариот. Деаденилирование, декепирование. Распад “неудачных” мРНК – NMD, non-stop and no-go пути. РНК интерференция. Микро РНК, их функции в развитии нематоды *C. elegans*.
30. Созревание белков. Шапероны и шаперонины. Цис-транс пролин изомеразы и дисульфид изомеразы. Экспорт белков. Бактериальные системы экспорта SRP и SecA зависимые, экспорт через флагеллу. Экспорт белков эукариот. SRP, SRP-рецептор, транслокон. Модификация белков в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР). Гликозилирование и протеолиз. Механизмы коррекции перегрузки ЭПР.
31. Везикулярный транспорт. Части клетки, сообщающиеся при помощи везикулярного транспорта: ЭПР, аппарат Гольджи, лизосомы, эндосомы, цитоплазматическая мембрана. Механизм формирования везикул: рецепторы, клатрин, коатомер, малые GTPазы. Механизм узнавания целевого компартмента везикулами: Rab-белки, c-SNARE, v-SNARE. Транспорт в митохондриях и хлоропласты. Сигналы транспорта. Комплексы TOM и TIM. Вставка белков во внутреннюю мембрану митохондрий, использование трансмембранного потенциала.
32. Транспорт в ядро и из ядра. Импортны и сигналы ядерной локализации. Ядерная пора. Направленность ядерного транспорта – GTPаза Ran. Белки функционального цикла Ran – активатор GTPазы (GAP) и фактор обмена нуклеотидов (GEF). Импорт Ran*GDP в ядро.