

ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»
(ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)

«ПРИНЯТО»

на заседании Ученого совета
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Протокол № 6
от « 06 » 07 2017 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России,
академик РАН

В.М. Говорун

2017 г.



**ПРОГРАММА
ВСТУПИТЕЛЬНЫХ ЭКЗАМЕНОВ В АСПИРАНТУРУ
по дисциплине
03.01.03 МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ**

Направление подготовки: 06.06.01 биологические науки

Уровень образования: высшее образование - подготовка кадров
высшей квалификации

Квалификация выпускника: Исследователь. Преподаватель-исследователь.

Москва, 2017

Часть 1. Геном – репликация, транскрипция, репарация

1. Клеточные процессы, связанные с хранением и передачей генетической информации.

1.1. Введение

Эксперименты, продемонстрировавшие генетическую роль ДНК, Структура молекулы ДНК: двойная спираль и неканонические структуры. Суперспирализация ДНК и ферменты, контролирующие уровень суперспирализации.

1.2. Репликация, репарация и рекомбинация ДНК

Механизм репликации ДНК в прокариотических клетках. Полуконсервативный характер репликации ДНК и прерывистая репликация отстающей цепи. Сборка мультиферментного комплекса на репликационной вилке. Инициация репликации ДНК у прокариот. Особенности репликационной машины эукариот. Репликоны и участки начала репликации ДНК. Типы повреждений ДНК и стратегии их репарации у эукариот и прокариот. «Черезблочные» полимеразы и SOS-репарация. Различные пути репарации двунитевых разрывов ДНК – гомологичная рекомбинация и негомологичное соединение концов. Рекомбинация ДНК, Rec BCD путь рекомбинации у бактерий. Эукариотические ферменты рекомбинации. Кроссинговер и генная конверсия.

1.3. Эукариотический геном

Структура эукариотического генома. Уникальные и повторяющиеся последовательности. Разные классы повторяющихся последовательностей. Мобильные элементы генома прокариот и эукариот. Механизмы перемещения мобильных элементов. Перестройки иммуноглобулиновых генов.

Проект «Геном человека» и методы современной геномики. Современные подходы к секвенированию ДНК. Пиросеквенсинг. Современные платформы секвенирования. Технология секвенирования 454. Технология секвенирования Solexa. Технология секвенирования SoLid. Проблемы секвенирования полных геномов. Биоинформатические подходы при анализе данных, полученных путем высокопроизводительного секвенирования.

2. Транскрипция и посттранскрипционные преобразования РНК

2.1 Транскрипция у прокариот

РНК полимеразы E.coli: минимальный фермент и холофермент. Промоторы и роль сигма-фактора в узнавании промоторов. Сборка преинициаторного комплекса, освобождение промотора и элонгация. Терминация транскрипции у прокариот. Регуляция транскрипции прокариотических генов. Катаболические и анаболические опероны. Регуляция транскрипции посредством преждевременной терминации и рибопереключателей.

2.2. Транскрипция у эукариот

Эукариотические РНК полимеразы. Промоторы РНК полимеразы II. Сборка преинициаторного комплекса РНК полимеразы II. Общие транскрипционные факторы, необходимые для посадки РНК полимеразы II на промоторы. Эхансеры и сайленсеры. Тканеспецифические транскрипционные факторы. Ядерные рецепторы гормонов, как особый класс транскрипционных факторов. Промоторы РНК полимераз I и III. Сборка преинициаторных комплексов на этих промоторах.

2.3. Хроматин и регуляция транскрипции

Структура нуклеосомы. Основные и варианты формы гистонов. Модификации гистонов и гистоновый код. Доменная гипотеза организации эукариотического генома в хроматине. Активные и неактивные хроматиновые домены, механизмы их формирования. Роль CpG метилирования ДНК в инактивации генов. Профили модификаций хроматина в регуляторных участках генома (промоторах, эхансерах, сайленсерах). Ферментные комплексы, вносящие пост-трансляционные модификации в гистоны. Позиционирование нуклеосом по отношению к последовательностям ДНК, «фэйзинг» и «спейсинг»; предпочтительная чувствительность активных генов к нуклеазам и участки гиперчувствительности к ДНКазе I. Комплексы ремоделирования хроматина. Транскрипция «через» нуклеосомы. Репликация хроматина. Пространственная организация эукариотического генома и методы ее изучения (фиксация конформации хромосомы и полногеномные варианты этой процедуры – 4C, Hi-C). Топологически-ассоциированные домены в интерфазных хромосомах. Пространственные контакты между удаленными геномными элементами. Активаторные хроматиновые блоки/компарменты.

2.4 Контроль экспрессии эукариотических генов на уровне деградации РНК и регуляции трансляции

Представление о некодирующих РНК (нкРНК) как регуляторных молекулах. Роль нкРНК в регуляции трансляции, транскрипции, сплайсинга и в эпигеномном наследовании. Геном как машина для синтеза РНК. Классификация нкРНК. НкРНК у прокариот. Роль нкРНК в процессах транскрипции у эукариот. Транскрипция как фактор модификации хроматина и роль нкРНК в этих процессах. Представление об РНКи. Биологическая роль siРНК. Три основных типа коротких РНК (siРНК, микро РНК и piРНК), их биогенез и функции. Транскрипционный сайленсинг с участием коротких РНК, его особенности у растений. Длинные нкРНК в модуляции структуры хроматина. Их роль в модуляции активности X-хромосом у дрозофилы и млекопитающих. Представление о геномном импринтинге у млекопитающих. Его механизмы, связанные с дифференциальным метилированием контролируемых районов и экспрессией нкРНК. Перестройки генома, в основе которых лежит механизм РНК-интерференции.

2.5. Пост-транскрипционные преобразования РНК

Сплайсинг, Типы интронов и механизм вырезания интронов, Малые ядерные РНК и сплайсосома. «Кэппирование» и полиаденилирование РНК. Редактирование РНК.

4. Компартиментализация эукариотического ядра

Ядрышко и другие ядерные компартменты. Транскрипционные и репликационные фабрики. Позиционирование интерфазных хромосом в клеточном ядре (хромосомные территории). Пространственная организация эукариотического генома. Архитектурная роль РНК (платформа для сборки некоторых ядерных компартментов). Изучение динамики ядерных компартментов с использованием флуоресцентных белков.

5. Молекулярные механизмы, координирующие клеточный цикл и репликацию ДНК

Циклины и протеинкиназы. Их строение, разнообразие и роль в регуляции клеточного цикла. Ингибиторы циклин-зависимых киназ. Регуляция размеров клетки: градиенты активированных белков, ядерно-цитоплазматический транспорт. Поток тубулина в веретене деления. Профазное и прометафазное перемещение centrosом и хромосом в клетках: роль митотических кинезинов и динеина. Перемещение кинетохора в анафазе за счет разборки связанной с ним микротрубочки. Сверочная точка митотического веретена (SAC): белки-участники, механизм активации. Строение и активность APC/циклосомы. Актмиозиновые филаменты и септины в образовании перетяжки в телофазе. Неравный и дифференцировочный митоз. Протоонкогены, участвующие в регуляции клеточного цикла. Регуляция на уровне транскрипции и трансляции. Белок p53, его функции и регуляция. Патология прохождения сверочных точек клеточного цикла. Апоптоз.

Часть 2. РНК и биосинтез белка

1. Мир РНК и биосинтез белков

1.1. Введение

Центральная догма молекулярной биологии. Открытие информационной РНК (мРНК). Предсказание и открытие адапторной, или транспортной РНК (тРНК). Кодирование и некодирующие РНК. Разнообразие некодирующих РНК. Общая схема биосинтеза белков. Общие принципы макромолекулярной структуры РНК. Функции РНК. Мир РНК и происхождение жизни.

1. 2. Генетический код, информационная и транспортная РНК

мРНК и генетический код, кодовая таблица. Функциональные участки мРНК, функциональные области цепи эукариотической мРНК. тРНК и ее аминокислотирование. вторичная структура тРНК. Три последовательные химические реакции биосинтеза белка. Рибосомы

и полирибосомы – общая характеристика. Основные типы рибосом. Циркулярные эукариотические полирибосомы.

2. Структура и функционирование рибосомы

2.1. Морфология и структура рибосомы

Четвертичные структуры рибосомных субъединиц. Общие принципы структуры рибосом. Диссоциация рибосомы на две неравные субчастицы, диссоциация – реассоциация рибосом. Структурные превращения рибосомных частиц. Разворачивание рибосомной 50S субчастицы в рибонуклеопротеидный тяж. Разборка и самосборка 30S субчастицы.

2.2. Структура рибосомной РНК, четвертичная структура рибосомы и рибосомные белки

Рибосомные РНК. Вторичная и доменная структура рибосомной 16S РНК. Двойная спираль РНК (А-форма). Канонические (Уотсон-Криковские) пары оснований в РНК. Неканонические пары оснований в спиральных участках РНК. «Дефекты» двойных спиралей и отклонения от двуспиральной структуры. Структура рибосомной 30S субчастицы, третичная структура рибосомной 16S РНК. Вторичная, доменная и третичная структуры рибосомной 23S РНК. Дальние взаимодействия, обеспечивающие компактное сворачивание РНК: Mg-ионный мостик, «рибозная застежка» (ribose zipper), «А-минорное» взаимодействие, тройственные взаимодействия оснований. Межсубъединичные контакты рибосомных субъединиц. Рибосомные белки, их разнообразие и номенклатура. Взаимодействие рибосомных белков с рРНК.

2.3. Функциональные активности и функциональные участки рибосомы

Стадии трансляции: инициация, элонгация и терминация. Химические реакции и общий энергетический баланс биосинтеза белка. Функциональные центры рибосомы, их расположение на рибосомных субъединицах. Гипотеза Крика о «качании» положений азотистых оснований при спаривании положения 1 антикодона с положением 3 кодона (Wobble hypothesis). Правила нестрогого спаривания 1-го основания антикодона с 3-им основанием кодона. Смыкание блоков малой рибосомной субъединицы при связывании антикодонной шпильки аминоацил-тРНК. Участие белкового фактора элонгации в связывании аминоацил-тРНК. Фактор элонгации EF-Tu (EF1A): конформационный переход при связывании ГТФ. Связывание тройственного комплекса Aa-tRNA • EF-Tu • GTP с рибосомой. А/Т позиция Aa-тРНК. Белок EF-Tu (EF1) как молекулярная машина челночного типа. Ошибки связывания аминоацил-тРНК: «ложное кодирование». Факторы, способствующие ошибкам трансляции. Кинетическая основа ложного кодирования, кинетическая коррекция кодирования («редактирование»).

2.4. Транспептидация и рибосомная транслокация

Транспептидация. Расположение пептидилтрансферазного центра на 50S субчастице. Расположение субстратных молекул аминоксил-тРНК (А/а) и пептидил-тРНК (Р/р) на субъединицах рибосомы. Миграция аминоксильного остатка между 2'- и 3'-положениями рибозы 3'-концевого аденозина тРНК. Стереохимия транспептидации. Рибосомная транслокация. Доменная структура фактора элонгации EF-G. EF-G-промотируемая транслокация тРНК и мРНК, Бесфакторная («неэнзиматическая») транслокация, главные следствия из неё. Сценарий бесфакторной транслокации в терминах концепции «смыкания-размыкания» рибосомных субъединиц. «Катализ» конформационных переходов. Необходимость несопряженного гидролиза нуклеозидтрифосфата (НТФ). Крупноблочная подвижность рибосомы и концепция смыкания-размыкания. Экспериментальные свидетельства блочной конформационной подвижности в рибосоме. Источник движения макромолекул и их частей. Ошибки транслокации: сдвиг рамки считывания и «прыжки» рибосомы. «Прыжок» рибосомы с одной матрицы на другую – транс-трансляция.

2. 5. Молекулярные машины

Определение термина «молекулярные машины». Структурные особенности молекулярных машин по сравнению с механическими макро-машинами. Ректификация броуновского движения, молекулярный «храповик с собачкой». Принципы работы молекулярных машин. Принципы работы молекулярных машин конвейерного типа. Транслирующая рибосома как молекулярная машина конвейерного типа. Бесфакторная транслокация через размыкание субъединиц и спонтанный поворот малой субъединицы относительно большой.

3. Инициация и регуляция трансляции

3. 1. Инициация трансляции у прокариот и её регуляция

Инициация трансляции у прокариот (эубактерий). Участники процесса прокариотической инициации. Первичная и вторичная структуры инициаторной и элонгаторной метиониновых тРНК бактерий. Аминоацилирование и формилирование инициаторной тРНК. ГТФ-зависимое связывание инициаторной тРНК с белком IF2. Инициаторные кодоны у прокариот. 3'-концевые нуклеотидные последовательности прокариотической и эукариотической рибосомных РНК. Последовательность Шайна-Дальгарно. Белковые факторы инициации, их локализация на рибосоме и функции. Этапы инициации у прокариот. Конститутивный контроль трансляции. Факторы, определяющие «силу» мРНК. Независимая инициация на цистронах полицистронных мРНК. Реинициация. Регуляция инициации трансляции предшествующими открытыми рамками считывания. Регуляция трансляции аптамерными модулями мРНК («рибопереключения»). Механизм выключения и включения

трансляции мРНК метаболитами. Регуляция трансляции антисмысловыми и комплементарными РНК («риборегуляция»).

3. 2. Инициация трансляции у эукариот

Особенности инициации трансляции у эукариот. Эукариотические мРНК-связывающие белки. Основные белковые факторы инициации трансляции у эукариот. Модель инициаторного 43S рибосомного комплекса. Связывание фактора eIF4F с экзпированным 5'-концом мРНК, с фактором eIF3 на иницирующей 40S и с РABP на 3'-поли(А)-хвосте мРНК. АТФ-зависимое сканирование 5'-нетранслируемой области. Диффузионно-храповиковый механизм однонаправленного движения инициаторного 43S комплекса. Особенности инициации на вирусных РНК: внутренняя инициация трансляции на пикорнавирусной РНК и на РНК вируса паралича сверчка

3. 3. Регуляция трансляции у эукариот

мРНК-специфическая негативная регуляция (трансляционная репрессия) у эукариот. Киназы фактора eIF2: фосфорилирование Ser51 а-субъединицы. Тотальное подавление инициации трансляции eIF2-киназами. Фосфорилирование/дефосфорилирование eIF4E-связывающего белка (4E-ВР). 3'-концевые инициаторы и усилители инициации. Поли(А)-хвост как усилитель инициации трансляции. Нековалентная циркуляризация эукариотической мРНК путем образования белковых мостиков. Реинициация трансляции в циркуляризованной полирибосоме. Маскирование – демаскирование мРНК. Особенности маскированных мРНК. Регуляция трансляции посредством микро-РНК.

4. Терминация трансляции посттерминационные процессы биосинтеза белка

4. 1. Терминация трансляции

Терминация трансляции, этапы. Белковые факторы терминации, их «кодоны». Третичная и доменная структуры бактериального фактора терминации первого класса. Третичная структура эукариотического фактора терминации первого класса. Механизм реакции терминации трансляции в рибосоме. Фактор терминации 2-го класса (eRF3). Последовательность событий в процессе терминации трансляции у про- и эукариот.

4. 2. Посттерминационные процессы биосинтеза белка

Вторичная и третичная структура «фактора повторного использования рибосом», его функция и расположение на поверхности 50S рибосомной субъединицы. Трансляционные паузы, неравномерность элонгации трансляции. Пути растущей полипептидной цепи в клетке. Котрансляционное сворачивание белков. Шапероны и шаперонины. Связывание растущего пептида с шаперонами. Трансмембранная транслокация растущего полипептида. Сигнальный пептид. Последовательность событий в процессе котрансляционного при-

крепления растущего полипептида к мембране эндоплазматического ретикулума. Последовательность событий инициации трансмембранной транслокации.

Часть 3. Структура и функция белка

1. Биологические функции белков и пептидов

Представления о белках как о биополимерах. Общие свойства белков и принципы их организации. Основные функции белков. Принципы классификации белков, их разнообразие. Белки, включающие небелковые компоненты: металлопротеиды, хромопротеиды, гликопротеиды, липопротеиды. Уровни структурной организации белковой молекулы.

2. Аминокислоты как строительные блоки белковой молекулы

Классификация, строение и физико-химические свойства аминокислот. Оптическая изомерия. Физико-химические свойства боковых радикалов (боковых цепей) аминокислот. Свойства боковых радикалов аминокислот в составе белков, важные для формирования молекулы. Биохимические методы определения аминокислот и белков. Принципы выделения и очистки белков.

3. Методы исследования структуры белков

Методы определения аминокислотного состава и первичной структуры белков. Масс-спектрометрия белков. Методы изучения молекулярных комплексов. Методы и задачи протеомики.

4. Пептидная связь

Химическое строение пептидной связи. Цис-транс-изомерия. Стехиометрические параметры пептидной связи, стерические ограничения. Карты Рамачандрана. Регулярная и нерегулярная структура белка.

5. Вторичная структура белка

Роль водородных связей в формировании вторичной структуры. α -Спираль как важнейший элемент регулярной вторичной структуры белка. Основные свойства α -спиралей. Виды спиральных структур. β -Структура: параллельное и антипараллельное расположение цепей при формировании слоев. Петли, их локализация на поверхности белков. β -шпилька как элемент вторичной структуры белков. Топологические диаграммы.

6. Принцип модульной организации белковой молекулы

Основные мотивы, формируемые элементами вторичной структуры белков. Мотив греческого ключа, β - α - β -мотив, цинковые "пальцы", β -шпилька и т.д. Структурные модули белковой молекулы: Россман-фолд, бета-баррель, бета-пропеллер и др. Биологические функции структурных модулей. Домены, их формирование и значение.

7. Третичная структура белка

Стабильность пространственной структуры белка. Формирование третичной структуры белка в процессе синтеза. Гидрофобное ядро. Форма, компактность и динамика молекулы белка. Роль дисульфидных связей в стабилизации третичной структуры некоторых белков и пептидов. Взаимосвязь элементов вторичной структуры в составе белковой глобулы. Консенсусные последовательности аминокислот в предсказании третичной структуры. Понятие структурной классификации белков.

8. Четвертичная структура белка

Стехиометрия и геометрия четвертичной структуры. Взаимодействия между субъединицами, стабилизирующие четвертичную структуру. Структурная организация контактов между субъединицами. Методы исследования четвертичной структуры. Биологическое значение четвертичной структуры. Основные классы белков.

9. Посттрансляционные модификации белков

Дисульфидные связи. Йодирование и сульфирование остатков тирозина. Образование остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты. N- и O-гликозилирование белков, Ацетилирование и метилирование гистонов. Гликопротеины. Протеогликаны. Муцины. Физиологическое значение углеводного компонента. Белки-антифризы. Обратимое гликозилирование цитоплазматических белков. Фосфорилирование белков. АДФ-рибозилирование белков. Липопротеины.

10. Белковый сплайсинг

Механизм белкового сплайсинга. Процессы N-O- и N-S-ацильных перестроек, трансэтерификация. Образование пируваильных остатков в ферментах азотного обмена и другие процессы. Структура интееинов. Биологическое значение белкового сплайсинга.

11. α -Спиральные белки

Взаимодействие между двумя α -спиралями. Суперспираль - способ упаковки составляющих спиралей. Гептады аминокислот. Лейциновые "молнии". Формирование олигомеризационного домена из 4х α -спиралей. Семейства альфа-спиральных белков: глобины, цитохромы, циклины, аннексины.

12. α/β -Структурные белки

Способы упаковки параллельных β -структур в белковом домене. α/β -баррели. Роль α/β -структур в формировании гидрофобного ядра, активных центров ферментов. Расположение α -спиралей в открытых изогнутых α/β -слоях. Возможность предсказания места расположения активных центров ферментов в α/β -структурах.

13. β -Структурные белки

Антипараллельные β -тяжи как основной структурный элемент β -белков. Типы образуемых доменов. Белки, связывающие гидрофобные лиганды. Мотив греческого ключа в

структуре γ -кристаллинов. Строение и биологические функции фибронектина. Иммуноглобулиновый и фибронектиновый фолды.

14. Транскрипционные факторы прокариот

Роль структурного мотива "спираль-поворот-спираль" в узнавании белками нуклеотидной последовательности. Факторы, обуславливающие высокую специфичность узнавания ДНК белками. Аллостерический контроль связывания белков с ДНК.

15. Транскрипционные факторы эукариот

Структура ТАТА-бокс-связывающего белка, его взаимодействие с ДНК. Гомеодоменные белки, формирование гетеродимеров. Транскрипционные факторы, содержащие мотив цинковых "пальцев". Димеризация транскрипционных факторов с участием "лейциновых молний". Трансактивационные домены. Формирование гомо- и гетеродимеров, взаимодействие с факторами модификации хроматина.

16. Белки в клеточной сигнализации

Классы рецепторов. Организация рецепторов, способы их закрепления в мембране. Структура белков, принимающих участие в клеточной сигнализации. G-белки: структура, функции ($G\alpha, G\beta, G\gamma$). Малые G-белки, их разнообразие и функции. Строение пептидных гормонов. Фермент-ассоциированные рецепторы, тирозин-киназные рецепторы. Интегрины - доменная организация, взаимодействие с фибронектином и компонентами внеклеточного матрикса, каскадная передача сигнала.

17. Мембранные белки

Биологические функции интегральных мембранных белков, их структурное разнообразие. Принципы закрепления белков внутри или на поверхности мембраны. Трансмембранные домены рецепторов гормонов. Порины и родственные им по структуре белки внешней мембраны бактерий. Аквапорины. Основные типы ионных каналов. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы и другие лиганд-управляемые каналы. Калиевые каналы, строение, механизм обеспечения селективности.

18. Фибриллярные белки

Коллаген, эластин, кератины, фибронектин, ламинин.

19. Белки, организующие транспортные системы клетки

Микротрубочки и микрофиламенты. Структурные единицы полимеров. Процесс полимеризации актина и тубулина. Особенности полимеров, важные для осуществления направленного транспорта. Генерация силы в процессе полимеризации-деполимеризации. Моторные белки, осуществляющие транспорт по микротрубочкам и микрофиламентам. Взаимодействие моторных белков с линейными треками. Направленность и процессивность моторного белка.

20. Флуоресцентные белки и их применение в биологии и биотехнологии

Флуоресцентные белки. Особенности структуры. Флуоресцентные белки как репортерные молекулы. Дальне-красные флуоресцентные белки. Использование флуоресцентных белков для локализации белков в живых клетках. Технологии многоцветного мечения. Использование флуоресцентных белков при скрининге лекарственных препаратов. Флуоресцентный таймер.

Функциональный анализ белков, белковых молекул и комплексов *in vivo*. Методы анализа белок-белковых взаимодействий с использованием флуоресцентных белков. Использование резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). Фотоактивируемые флуоресцентные белки. Основные механизмы фотоактивации и ее использование для наблюдения за динамическими процессами в живых системах. Определение скорости деградации белков. Биосенсоры, общий принцип их устройства.

Д.х.н., профессор Г.Е. Позмогова, зав. лабораторией искусственного антителогенеза
ФНКЦ ФХМ ФМБА России