

Этап II. Оценка уровня знаний по научной специальности, по которой предполагается подготовить диссертацию.

Научная специальность – 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

Форма проведения этапа - очно в виде ответа на 3 случайных вопроса из приведенных областей знаний.

Содержание этапа - Данный этап предполагает проверку знаний по ключевым аспектам отрасли науки. Абитуриенту будет предложено три вопроса, отобранных из широкого круга тем, охватывающих фундаментальные положения и современные проблемы выбранной научной специальности.

Примерные темы для вступительного испытания
ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

1. Клонирование в бактериальных клетках. Используемые ферменты (рестриктазы, T4 ДНК-полимераза, фрагмент Кленова, полинуклеотидкиназа, нуклеаза S1, фосфатаза, ДНК-лигаза). Плазмиды. Ориджины репликации. Совместимость плазмид. Селективные маркеры. Полилинкер. Бело-голубая селекция. Саузерн, нозерн и вестерн блоты. Гибридизация колоний.
2. ПЦР. Конструирование праймеров. Ферменты (Taq-полимераза, Pfu-полимераза, Pfu-Turbo, обратная транскриптаза). Условия денатурации, отжига и элонгации. Случайный и сайт-направленный мутагенез (точечный, делеционный, инсерционный). Амплификация участка ДНК, окружающего известный ген. RT-PCR. Real-time PCR. Иммуно-ПЦР.
3. Библиотеки генов. Размер библиотеки. Расщепление геномов на фрагменты для конструирования библиотек. Векторы (на основе фага лямбда, космиды, YAC'и, BAC'и) их емкость, особенности работы с ними. Физическая карта генома человека. STS. Прогулка по хромосоме.
4. Библиотеки кДНК (конструирование, нормализация, размер). Методы скрининга библиотек. Дифференциальный скрининг, вычитательная гибридизация. Амплификация библиотек.
5. Экспрессия генов в клетках дрожжей. Виды дрожжевых векторов. Ориджины репликации. Селективные маркеры. Дрожжевые промоторы. Индуцибельные системы. Дрожжевая двугибридная система. Одногибридная, тригибридная, обратная двугибридная система. Необходимые контроли.
6. Получение рекомбинантных белков в бактериальных клетках. Используемые промоторы (lac, tac, trc, T5, T7). Превращение конститутивных промоторов в индуцибельные. Особенности системы с T7 промотором. Способы борьбы с подтеканием промотора. Оптимизация экспрессии. Тэги (6xHis, GST, ZZ). Выделение и очистка рекомбинантных белков. Тельца включения.
7. Белковый сплайсинг (механизм, использование для получения рекомбинантных белков). Трансдуцирующие пептиды.

8. Секвенирование НК. Принципы секвенирования. Метод Максама-Гилберта. Метод Сэнгера. Способы разделения и детекции фрагментов ДНК.
9. Gateway клонирование. Принципы подхода. Att-участки и узнающие их ферменты. Основные стадии клонирования. Векторы: Entry, Destination, Donor. Способы селекции. Экспрессия генов в клетках млекопитающих. Клеточные линии. Методы введения ДНК. Транзитная экспрессия. Репортерные гены. Эпитопы. Методы детекции экспрессии генов. Определение эффективности трансфекции. Исследование внутриклеточной локализации белков. Селективные маркеры. Промоторы. Индуцибельные системы.
11. Получение стабильных клеточных линий, экспрессирующих трансген. Ретровирусные векторы (конструирование, получение вирусных частиц, инфекция). Расширение круга хозяев. Стратегии экспрессии двух генов с одного вектора. Преимущества лентивирусных векторов. Самоинактивирующиеся ретровирусные векторы. Эписомальные векторы.
12. Системы введения трансгенов в клетки млекопитающих, основанные на гомологичной рекомбинации. Негативная и позитивная селекция. Нокаутирование генов. Получение трансгенных животных. Cre-lox и flp-frt рекомбинация. Условный нокаут.
13. Факторы, влияющие на эффективность трансляции в клетках прокариот и эукариот. Метод бицистронных конструкций для идентификации IRES-элементов. Источники артефактов. Получение мРНК in vitro. Метод Toe-print.
14. SELEX. Создание рандомизированных библиотек. Получение РНК и ДНК аптамеров. Методы селекции, количество циклов, тестирование, применение.
15. Интерференция РНК. Механизм. Преимущества и недостатки генетического нокадауна по сравнению с нокаутом. Особенности применения метода в клетках млекопитающих. Способы получения siRNA. Критерии выбора последовательности-мишени. Промоторы для экспрессии shRNA. Методы тестирования степени подавления экспрессии гена-мишени. Источники артефактов. Необходимые контроли.
16. Микрочиповые технологии. Методы изготовления микрочипов (включая сочетание ступенчатого олигонуклеотидного синтеза и фотолитографии). Определение профилей экспрессии генов (кДНК чипы и чипы Affimetrix). Генотипирование. Детекция амплификации генов и делеций фрагментов хромосом. Виды и способы получения белковых микрочипов. Поиск ДНК-связывающих белков. Методы ChIP-on-chip, ДНК-программируемый белковый чип.
17. Генная инженерия растений. Способы ведения чужеродных генов в растения. Агробактериальное заражение и трансформация растений. Ti-плазмида. T-ДНК: что кодирует и как образуется? Белки вирулентности. Бинарные векторы. Селективные маркеры. Получение и анализ трансгенных растений. Вирусные векторы. Сайленсинг. Свойства трансгенных растений.

БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

1. Развитие представлений о механизмах сворачивания и разворачивания белков в клетке как составная часть разработки фундаментальной проблемы сворачивания белков. Общие принципы формирования нативной пространственной структуры белка. Обоснование концепции, согласно которой аминокислотная последовательность полипептидной цепи содержит информацию не только о характере ее пространственной структуры, но и о пути формирования этой структуры.

2. Многообразие механизмов сворачивания белков. Понятие об иерархическом пути сворачивания. Фолдоны. Домены как самостоятельные единицы сворачивания. Роль сворачивания-разворачивания при функционировании нативных белков в клетке.
3. "Естественно-развернутые белки". Высокая пластичность таких белков, определяющая многообразие принимаемых ими конформаций, и их роль в процессах внутриклеточной сигнализации. Множественные циклы локального сворачивания - разворачивания как важная особенность функционирования таких белков в клетке.
4. Участие междоменных взаимодействий в сворачивании белков. Междоменные взаимодействия при сворачивании мономера и их функциональное значение. Вопрос о взаимодействии соседних доменов мультидоменного белка в процессе сворачивания. Междоменные взаимодействия при сворачивании олигомера. Пространственный обмен доменами, обеспечивающий тесное сопряжение между процессами олигомеризации и сворачивания белка.
5. Структурные предпосылки, определяющие способность полипептидной цепи к сворачиванию через стадию обмена доменами. Механизм пространственного обмена доменами; примеры. Функциональные преимущества олигомеров, образованных путем пространственного обмена доменами. Пространственный обмен доменами как механизм образования линейных полимеров и амилоидных структур.
6. Особенности сворачивания белков во внутриклеточном окружении. Макромолекулярный кроудинг. Механизмы, обеспечивающие эффективное сворачивание белков *in vivo*. Котрансляционное сворачивание мультидоменных белков и его преимущества. Проявления котрансляционного сворачивания в клетках прокариот и эукариот. Триггер фактор; его структура и роль на ранних стадиях сворачивания белков, выходящих из канала прокариотической рибосомы.
7. Сигнал-узнающая частица. Ее структура и механизм действия в ходе котрансляционного сворачивания. Котрансляционное сворачивание белков эндоплазматического ретикулума. Механизмы, обеспечивающие контроль качества сворачивания. Шапероны лектиновой природы кальнексин и кальретикулин. Механизмы регуляции скорости и эффективности сворачивания белков в просвете эндоплазматического ретикулума, приводящие к развитию ответа клетки на накопление развернутых белков. Котрансляционное включение белков в мембрану эндоплазматического ретикулума.
8. Два типа молекулярных механизмов ускорения сворачивания белков в клетке.
 - А) Механизмы, направленные на ускорение медленных стадий сворачивания белков, первичная структура, которых содержит полную информацию, необходимую для приобретения нативной пространственной структуры.
 - Б) Механизмы, обеспечивающие сворачивание белков, не способных к самостоятельному сворачиванию, путем передачи им стерической информации, отсутствующей в структуре таких белков.
9. Рассмотрение структуры и каталитических механизмов действия ферментов-фолдаз первого типа – протеин-дисульфид-изомеразы и пептидил-пролил- цис/транс-изомеразы. Реакция цис/транс изомеризации пролиновых пептидных связей как скорость-лимитирующая стадия образования нативной структуры ряда белков и как механизм перехода между их разными конформационными состояниями. Примеры,

иллюстрирующие роль цис/транс изомеризации пролинов как молекулярного «переключателя», контролирующего функцию белка в клетке. Катализаторы сворачивания белков второго типа – периплазматический шаперон PapD и про-домен α -литической протеазы. Их структурные особенности и механизмы стабилизации переходных состояний реакций сворачивания белков-субстратов.

10. Основные типы шаперонов.

I. Шапероны, работающие без участия АТФ: предотвращающие агрегацию белков (малые белки теплового шока); доставляющие развернутые белки к месту их постоянной локализации в клетке (SecB); активируемые при экстремальных физиологических состояниях клетки (Hsp33, sp31).

II. Шапероны, работающие с участием АТФ. Шапероны группы Hsp70 и их биологические функции. Структурные характеристики Hsp70 и его ко-шаперонов в клетках прокариот и в разных компартментах эукариотических клеток. Структура и функции разных доменов молекулы Hsp70. Структура ко-шаперонов бактериальных клеток – DnaJ и GrpE и механизм их действия в комплексах с бактериальным шапероном DnaK. GrpE как молекулярный термосенсор, способный «запирать» белок-мишень в прочном комплексе с DnaK. Каталитический цикл системы DnaK – DnaJ – GrpE в процессе спонтанного сворачивания белка.

11. Функции Hsp70 и его ко-шаперонов, выходящие за рамки их роли в сворачивании белков. Участие TPR -домена во взаимодействии Hsp70 с различными белками с образованием комплексов, определяющих дальнейшую судьбу полипептида, связанного с шапероном. Роль Hsp70 в посттрансляционном переносе белков через мембраны внутриклеточных органелл. Механизмы транспорта белков через внешнюю и внутреннюю мембраны митохондрий. Митохондриальный Hsp70 как молекулярный мотор транслокации. Модель, описывающая механизм его функционирования. Участие Hsp70 в процессах, направляющих связанные с ним белки на путь деградации.

12. Шаперон Hsp90 как специализированный инструмент для сворачивания и стабилизации активного состояния определенных групп белков эукариотической клетки. Особенности белков-«клиентов» шаперона Hsp90. Мультидоменная структура Hsp90. Механизм димеризации N - концевых доменов и функциональная роль этого процесса. Каталитический цикл шаперона Hsp90 и его отличие от цикла шаперона Hsp70. Характеристика взаимодействия разных типов ко-шаперонов с Hsp90 и механизмов их регуляторного влияния. Hsp90 как «шаперон передачи внутриклеточных сигналов». Участие Hsp90 в транспорте белков во внутреннюю митохондриальную мембрану. Роль этого шаперона в направлении белков на деградацию.

13. Шаперонины и их роль в сворачивании белков. Шаперонины группы

I. Структура молекулы GroEL и его ко-шаперонина GroES. Реакционный цикл системы GroEL/GroES. Конформационные изменения, сопровождающие связывание АТФ и GroES и образование закрытой полости для сворачивания белка. Аллостерические эффекты, обеспечивающие согласованное функционирование цис- и транс- тороидов молекулы GroEL. Рассмотрение механизма, предусматривающего влияние микроокружения закрытой полости GroEL на скорость сворачивания белка. Роль повторных циклов сворачивания-разворачивания в механизме действия шаперонина. Структурные основы температурозависимой регуляции работы GroEL. Шаперонин GroEL как универсальная машина сворачивания умеренной эффективности.

14. Шаперонины группы II. Их структурные отличия от шаперонинов группы I и связанные с этим особенности функциональных циклов. Шаперонин цитозоля эукариотической клетки ССТ. Характеристика его взаимодействия с субстратами. Особенности движения доменов при переходе от открытого к закрытому состоянию. Рассмотрение механизма сворачивания актина и тубулина в полости ССТ. Роль последовательных конформационных изменений, передаваемых внутри кольца, образуемого разными субъединицами, в приобретении белком-субстратом нативного состояния. ССТ как молекулярная машина, приспособленная для решения трудных задач сворачивания белков.

15. Роль префолдина в обеспечении котрансляционного сворачивания определенной группы белков архебактерий и цитозоля эукариотической клетки. Основные характеристики структурной организации молекулы префолдина и их функциональная роль. Префолдин как фактор, обеспечивающий правильную ориентацию белка-субстрата в комплексе с ССТ. Специфичность взаимодействия между префолдином и белком-субстратом с одной стороны, и шаперонином и ССТ, с другой. Функции, выполняемые шапероном Skd периплазмы эубактерий, сходным по структуре с префолдином. Представление о новом типе АТР-независимых молекулярных шаперонов- «холдаз».

16. Разворачивание и деградация белков в клетке. Роль разворачивания белков в реализации жизненно-важных внутриклеточных процессов. Источники энергии для разворачивания. Особенности разворачивания белков при их транслокации через мембраны митохондрий – резкое ускорение процесса по сравнению со спонтанным и изменение механизма разворачивания. Роль N-концевой сигнальной последовательности. Молекулярные шапероны семейства Hsp100 (AAA+). Структура и механизм действия шаперонов, осуществляющих АТР-зависимую дезагрегацию белков. Принципы структурной организации и функционирования молекулярных машин, способных разворачивать стабильные свернутые белки, несущие соответствующую метку, и осуществлять их деградацию (ClpAP, ClpXP прокариот и протеасомы эукариот). Механизмы, направляющие белки на деградацию. Котрансляционная и посттрансляционная модификации, участие шаперонов Hsp70 и Hsp90, а также вспомогательных белков.

17. Разворачивание белков в составе протеасомы как важный элемент процесса их деградации. Структура прокариотической и эукариотической протеасомы. Роль убиквитиновой цепочки в инициации разворачивания. Аналогия между механизмами «протягивания» полипептидной цепочки через канал во внутренней мембране митохондрий и через протеасомный канал. Структура «шаперонного кольца», осуществляющего разворачивание, и взаимосвязь циклов его функционирования с регуляцией открывания входа в канал, образуемый кольцами протеолитически активных субъединиц. Энергетические затраты, сопровождающие разворачивание и деградацию белков в клетке.

ПРИМЕР БИЛЕТА

Вопрос 1. ПЦР. Конструирование праймеров. Ферменты (Taq-полимераза, Pfu-полимераза, Pfu-Turbo, обратная транскриптаза).

Вопрос 2. Котрансляционная и посттрансляционная модификации, участие шаперонов Hsp70 и Hsp90, а также вспомогательных белков.

Вопрос 3. Библиотеки генов. Размер библиотеки. Расщепление геномов на фрагменты для конструирования библиотек. Векторы и их емкость, особенности работы с ними.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. ОСНОВНАЯ

1. А.В. Финкельштейн и О.Б. Птицын Физика белка Москва 2002.
2. Molecular Mechanisms of Protein Folding (ed. By R.H. Pain). Oxford University Press, 2000, New York.
3. A. Fersht Structure and Mechanism in Protein Science. A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding. W.H. Freeman & Co., 1999.
4. Molecular Chaperones in the Cell (Ed. By P. Lund). Oxford University Press, 2001, New York.
5. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. Сибирское университетское издательство. Новосибирск, 2010.
6. Глик Б., Пастернак Дж Молекулярная биотехнология. М. Мир, 2002.

2. ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ

1. Н.К. Наградова Пространственный обмен доменами в гомоолигомерных белках и его функциональное значение. Биохимия т. 67, с.1013-1025, 2002.
2. Н.К. Наградова Сворачивание белков в клетке. О механизмах его ускорения. Биохимия т. 69, с. 1021-1037, 2004.
3. F.U. Hartl and M. Hayer-Hartl Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science, v. 295, pp. 1852-1858, 2002.
4. J.C. Young, V.R. Vishwas, K. Siegers and F.U.Hartl Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. Nature Reviews | Molecular Cell Biology v.5, pp.781-791, 2004.
5. J.D. Wang, J.S. Weissman Thinking outside the box: new insights into the mechanism of GroEL-mediated protein folding. Nature Struct. Biol. v. 6, pp.597-600, 1999.
6. S. Normark Anfinsen comes out of the cage during assembly of the bacterial pilus. PNAS, v. 97, pp. 7670-7672, 2000.
7. S. Prakash and A. Matouschek Protein unfolding in the cell. Trends in Biochemical Sciences, v. 29, pp. 593-600, 2004.
8. Z. Kostova and D.H. Wolf For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. EMBO J., v. 22, pp. 2309-2317, 2003.
9. Современные обзоры из научных журналов молекулярно-биологического профиля (BioTechniques, Nature Methods и т.д.)

Критерии и показатели оценивания ответа

	0	Отсутствуют ответы на три заданных теоретических вопроса, отказ от ответа.
Минимальный уровень знаний	1	Отсутствуют ответы на два заданных теоретических вопроса, фрагментарный ответ третий теоретический вопрос, значительные трудности в сопоставлении и анализе сведений из различных разделов программы.
	2	Отсутствует ответ на один из заданных теоретических вопросов, фрагментарный ответ на второй и третий теоретический вопросы, значительные трудности в сопоставлении и анализе сведений из различных разделов программы.
Низкий уровень знаний	3	Отсутствует ответ на один из заданных теоретических вопросов, фрагментарный ответ на второй и неполный ответ на третий теоретический вопросы, значительные трудности в сопоставлении и анализе сведений из различных разделов программы.
	4	Отсутствует ответ на один из заданных теоретических вопросов, неполный ответ на второй заданный теоретический вопрос, полный ответ на третий заданный теоретический вопрос, значительные трудности в сопоставлении и анализе сведений из различных разделов программы.
Средний уровень знаний	5	Отсутствует ответ на один из заданных теоретических вопросов, полный ответ на два заданных теоретический вопроса, значительные трудности в сопоставлении и анализе сведений из различных разделов программы.
	6	Полный ответ на один заданный теоретический вопрос, неполные ответы на два заданных теоретических вопроса, значительные трудности в сопоставлении и анализе сведений из различных разделов программы.
Достаточный уровень знаний	7	Полные ответы на два заданных теоретических вопроса, неполный ответ на один заданный теоретический вопрос, незначительные трудности в сопоставлении и анализе сведений из различных разделов программы.
	8	Полные ответы на три заданных теоретических вопроса, незначительные трудности в сопоставлении и анализе сведений из различных разделов программы.
Высокий уровень знаний	9	Исчерпывающие ответы на все заданные вопросы, свободное владение материалом, имеются недочеты при сопоставлении и анализе сведений из различных разделов программы.
	10	Исчерпывающие ответы на все заданные вопросы, свободное владение материалом, грамотные сопоставление и анализ сведений из различных разделов программы.