

ДИСЦИПЛІНА «ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ ТА МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ»

Кількість годин (кредитів): 180 год (6,0 кредити)

Форма контролю – залік.

1. Пояснювальна записка

1.1. Метою викладання навчальної дисципліни «Експресія генів» є дати уявлення студентам про особливості організації генетичного матеріалу та механізми регуляції експресії генів на різних рівнях реалізації генетичної інформації у прокаріотів, еукаріотів та вірусів; ознайомити з ключовими молекулярно-генетичними механізмами, які беруть участь у регуляції розвитку та старіння організму, у адаптації живих організмів до дії несприятливих чинників довкілля та змін харчового раціону, у формуванні імунної відповіді; ознайомити студентів з основними сучасними молекулярно-біологічними методами вивчення структури і функцій нуклеїнових кислот та білків.

1.2. Основними завданнями вивчення дисципліни «Експресія генів» є ознайомлення студентів з сучасними уявленнями про механізми регуляції експресії генів на дотранскрипційному рівні, на етапах транскрипції, посттранскрипційних змін РНК, трансляції та посттрансляційних модифікацій білків; дати студентам теоретичні основи основних методів, якими оперує сучасна молекулярна біологія для вирішення важливих теоретичних завдань таких, як розшифрування геному та встановлення подібності між геномами різних організмів, вивчення експресії генів на різних рівнях реалізації генетичної інформації, та практичних завдань – створення генетично модифікованих організмів з корисними для людини властивостями.

1.3. В процесі навчання студенти мають набути таких компетенцій:

знати визначення поняття «ген» і «експресія гену»; структурно-функціональні особливості організації та локалізації генетичного матеріалу у прокаріотів, еукаріотів і вірусів; регуляторні елементи генів (промотори, термінатори, енхансери, сайленсери, інсулятори); механізми транскрипції та трансляції; рівні, на яких здійснюється регуляція експресії генів: дотранскрипційний (метилування ДНК та ацетилювання гістонів), транскрипційний (позитивний і негативний контроль в прокаріотів, регуляція за участю білків регуляторів транскрипції – транскрипційних факторів та репресорів, деградація РНК), посттранскрипційний (процесинг про-мРНК і механізми альтернативного сплайсингу), трансляційний, посттрансляційний (ковалентна модифікація, активація та інгібування білків), основні методи виділення та очистки нуклеїнових кислот та аналізу експресії генів на рівні транскрипції (ПЛР, використання ДНК-мікрочипів та інгібіторів транскрипції), трансляції (імуноблотінг, електрофорез білків, використання інгібіторів трансляції), посттрансляційних модифікацій (визначення активності білкових продуктів); методи створення і клонування рекомбінантних ДНК з використанням векторів на основі плазмід і бактеріофагів; методи прямого введення генів у клітини; методи клонування ДНК еукаріотів, шляхи оптимізації експресії генів, клонуваних у прокаріотичних системах; методи відбору і аналізу рекомбінантних ДНК; особливості регуляції експресії генів на рівні транскрипції; поняття оперону і регулону, факторів транскрипції; приклади та механізми регуляції на рівні оперонів та регулонів, молекулярно-біологічні особливості відповіді прокаріотів і еукаріотів на несприятливі чинники довкілля (гіпоксія, оксидативний стрес, нестача поживних речовин, дія токсикантів тощо); сигнальні молекули та білки-сенсори, білки-регулятори відповіді та гени-мішені; молекулярні механізми регуляції клітинного циклу, морфогенезу, старіння та апоптозу; особливості функціонування нутрієнт-чутливих сигнальних шляхів; особливості експресії генів у вірусів; типи посттрансляційних модифікацій; *вміти* здійснювати самостійний пошук сучасної інформації за допомогою мережі Інтернет; аналізувати результати сучасних досліджень експресії генів, формувати власну точку зору відносно дискусійних питань щодо експресії генів, проектувати дослідження, яке має на меті з'ясування певних аспектів експресії генів; пояснити механізми відповіді живих організмів на дію несприятливих чинників довкілля; будувати рестрикційні карти геномів організмів на основі даних розщеплення ДНК рестриктазами; характеризувати рівень експресії генів, базуючись на даних кількісної ПЛР у реальному часі та використанні ДНК-мікрочипів; виділяти геномну і плазмідну ДНК, проводити електрофорез

ДНК і білків; здійснювати генетичну трансформацію прокаріотів; проводити ідентифікацію рекомбінантних і нерекомбінантних клонів бактерій шляхом посіву на селективні середовища.

2. Інформаційний обсяг навчальної дисципліни

Змістовий модуль 1. Регуляція експресії генів

Тема 1. ЗАГАЛЬНІ РИСИ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ У ЖИВИХ ОРГАНІЗМІВ. Відкриття хімічної природи генів (досліди Гріффіта, Херші та Чейза). Докази напівконсервативного способу реплікації ДНК (експеримент Мезельсона-Сталя). Історія розвитку уявлень про гени та особливості їх експресії в клітинах бактерій та еукаріотів. Структурно-функціональна організація генів прокаріотів та еукаріотів. Транскриптази. Неядерні гени. Мобільні генетичні елементи (транспозони). Рівні регуляції експресії генів.

Тема 2. РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ НА РІВНІ ТРАНСКРИПЦІЇ. Сучасні дані щодо ініціації транскрипції ДНК. Особливості будови РНК-полімерази. Регуляторні елементи, які контролюють експресію генів (промотори, термінатори, енхансери, сайленсери, інсулятори). Транскрипція у бактерій та еукаріотів. Загальні уявлення про оперони. Загальні уявлення про регулони. Особливості транскрипції у вірусів.

Тема 3. ФАКТОРИ ТРАНСКРИПЦІЇ ТА ЇХНЯ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ. Способи активації факторів транскрипції. Функціональні домени факторів транскрипції. Типи ДНК-зв'язувальних доменів: helix-turn-helix та helix-loop-helix. Типи ДНК-зв'язувальних доменів: «цинковий палець» та лейцинова блискавка. Роль рецепторів в активації факторів транскрипції. Цис-регуляторні елементи ДНК. Використання факторів транскрипції у з'ясуванні функцій генів.

Тема 4. ПОСТТРАНСКРИПЦІЙНИЙ РІВЕНЬ РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ ГЕНІВ. Механізми процесингу: кепування та поліаденілювання. Будова зрілих інформаційних РНК. Механізм сплайсингу РНК за допомогою рибозимів (на прикладі сплайсингу 26S рРНК у *Tetrahymena*). Сплайсинг у еукаріотів за допомогою рибонуклеопротеїдів U1–U6. Загальні уявлення про альтернативний сплайсинг, його типи; значення альтернативного сплайсингу для організмів. Роль альтернативного сплайсингу при визначенні статі у дрозозфіли. Генетичні хвороби, пов'язані з порушеннями сплайсингу та альтернативного сплайсингу.

Тема 5. ТРАНСЛЯЦІЙНИЙ РІВЕНЬ РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ. Будова та функції малої і великої субодиноць рибосом. Особливості будови транспортних РНК. Механізм активації амінокислот при трансляції інформаційних РНК. Послідовності нуклеотидів, які оточують кодон ініціації трансляції у прокаріотів та еукаріотів; їх значення в регуляції трансляції. Регуляторні послідовності на 5'-нетрансльованій ділянці: IRES – internal ribosomal entry site (внутрішній сайт взаємодії з рибосомою). Ініціація трансляції. Елонгація та термінація трансляції інформаційних РНК. Білки-фактори трансляції. Інгібітори трансляції; їх роль у медицині.

Тема 6. ЕПІГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ. Поняття про епігенетику. Роль метилювання азотистих основ у регуляції експресії генів у еукаріотів. Особливості метилювання у прокаріотів та еукаріотів. Види ДНК-метилтрансфераз у різних організмів. Роль модифікацій білків хроматину у регуляції експресії генів. Роль ДНК-метиляз, гістон-ацетилаз та гістон-деацетилаз в регуляції експресії генів.

Змістовий модуль 2. Відповідь організмів на дію несприятливих чинників навколишнього середовища.

Тема 7. ОПЕРОНИ ТА РЕГУЛОНИ. Оперони. Позитивний контроль (на прикладі *lac*-оперону *Escherichia coli* за допомогою CAP-білка). Негативний контроль експресії генів (на прикладі *lac*-оперону кишкової палички). Регуляція експресії генів триптофанового оперону у бактерій. Фактори транскрипції. Сенсорна роль сульфгідрильних груп та залізо-сірчаних кластерів. Регуляція шляхом зміни локалізації фактору транскрипції.

Тема 8. РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ, ПОВ'ЯЗАНИХ З ТРАНСПОРТОМ ТА УТИЛІЗАЦІЄЮ ІОНІВ МЕТАЛІВ. Фактори транскрипції Aft1 та Aft2 та їхні мішені. Фактори транскрипції Zap1, Ace1 та Mac1. Регуляція транспорту та утилізації іонів заліза і міді клітинах ссавців. Подвійна функція білка IRP1 як ферменту та фактора транскрипції. MRE elements.

Тема 9. РЕАКЦІЯ НА ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС У ПРОКАРІОТІВ та ЕУКАРІОТІВ. Загальні уявлення про оксидативний стрес. Антиоксидантні та пов'язані з ними ферменти. Бактерії: Регулони OxyR та SoxRS. Дріжджі: фактори Yap1, Skn7, Nap1, Msn2 та Msn4. Рослини: NRP1 і Rap2/4a. Тварини: фактори Nrf2, NF-κB.

Тема 10. РЕАКЦІЯ НА ДІЮ СТРЕСОРІВ ДОВКІЛЛЯ. Реакція на гіпоксію: фактор транскрипції HIF1. Реакція на температурний шок: фактор Hsf1, білки теплового шоку. Відповідь на підвищення осмотичного тиску: Hog1-регулон. Реакція на нестачу поживних речовин. Загальні уявлення про катаболітну репресію. Регулон Mig1. Відповідь на нестачу біогенних елементів. σ^S -фактор у *Escherichia coli*.

Тема 11. РЕГУЛЯЦІЯ СИНТЕЗУ ІНТЕРФЕРОНУ В ІМУННИХ КЛІТИНАХ: механізм активації та ключові фактори транскрипції.

Змістовий модуль 3. Регуляція клітинного циклу, запрограмованої загибелі та тривалості життя.

Тема 12. ІНСУЛІНОВА СИГНАЛІЗАЦІЯ: фактори FOXO, PGC-1 α , SREBP. Механізм блокування інсуліном дії фактора транскрипції FoxO у еукаріотів. Механізми активації фактору FoxO і підконтрольних йому генів.

Тема 13. СИГНАЛЬНИЙ ШЛЯХ, ЗАЛЕЖНИЙ ВІД TOR-КІНАЗ: активатори, механізми активації та репресії TOR-кіназ, будова комплексів, до яких входять TOR-кінази, ефекторні білки та їхні функції, зв'язок з регуляцією експресії генів.

Тема 14. РЕГУЛЯЦІЯ АПОПТОЗУ: фактори транскрипції, механізми їх регуляції та ефектори.

Тема 15. РЕГУЛЯЦІЯ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ: роль ростових факторів як сигнальних молекул, рецептори до факторів росту, сигнальний механізм та ефект. Регуляція морфогенезу (на прикладі розвитку плодової мушки): ключові білки та їх функції. Участь фактора AP-1 у регуляції процесів розвитку у тварин: цис-регуляторні елементи, будова фактору, механізм активації. Механізми регуляції експресії генів за участю циклінів та циклін-залежних кіназ.

Змістовний модуль 4. Методи вивчення структури нуклеїнових кислот процесів реалізації та передачі генетичної інформації. Технологія рекомбінантних ДНК.

Тема 16. ВИДІЛЕННЯ ТА ЕЛЕКТРОФОРЕЗ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ. МЕТОДИ СЕКВЕНУВАННЯ. Загальні положення. Виділення НК. Седиментаційний і фенольний метод екстракції НК. Гель-електрофорез ДНК. Секвенування ДНК за Максамом-Гілбертом. Секвенування ДНК за Сенгером. Сучасні підходи до секвенування ДНК. «Прогулянка про хромосомі» або праймер-опосередкована прогулянка.

Тема 17. ФЕРМЕНТИ, ЯКІ ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ У МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ. Полімерази. Рестриктази. Лігази. Термігальні трансферази

Тема 18. ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ: ПРИНЦИП І ГАЛУЗІ ЗАСТОСУВАННЯ. Загальні принципи та етапи ПЛР. Кількісна ПЛР у реальному часі. Використання ПЛР у молекулярній біології та медицині.

Тема 19. МЕТОДИ НА ОСНОВІ ГІБРИДИЗАЦІЇ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ з використанням радіоактивних і флуоресцентних міток: Southern-блотінг, Northern-блотінг. Використання ДНК-мікрочипів для аналізу експресії генів. Перенесення білків на мембрани (Western blotting). Імунологічний блотінг.

Тема 20. МЕТОДИ СТВОРЕННЯ ГЕНЕТИЧНО-МОДИФІКОВАНИХ ОРГАНІЗМІВ ІЗ ЗАДАЛЕГІДЬ ЗАДАНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ. Конструювання та клонування рекомбінантних ДНК з використанням векторів. Клонування ДНК еукаріотів. Методи введення гену у клітини бактерій, дріжджів, тварин та рослин; шляхи оптимізації експресії репортерних генів у еукаріотів. Використання систем UAS/GAL4 у дрозофіли для з'ясування функції генів. Зелений флуоресцентний білок як маркер експресії генів. Відбір та аналіз рекомбінантних ДНК на основі фенотипових відмінностей рекомбінантних та нерекомбінантних клонів; методи імунологічного скринінгу. Направлений мутагенез.

Практичні заняття

1. Особливості транскрипції у прокариотів, еукаріотів та вірусів.
2. Регуляція експресії на посттранскрипційному рівні
3. Фактори транскрипції та їхня роль в регуляції експресії генів
4. Методи аналізу експресії генів на рівні транскрипції
5. Методи аналізу експресії генів на рівні трансляції
6. Технологія рекомбінантних ДНК
7. Відповідь клітини на оксидативний стрес (на прикладі клітин дріжджів та бактерій): визначальні білки, фактори транскрипції та механізм їх активації.
8. Реакція на дію несприятливих факторів довкілля
9. Інсуліновий та залежний від Тог кінзи сигнальні шляхи.
10. Регуляція апоптозу: фактори транскрипції, механізми їх регуляції та ефектори

Лабораторні заняття

Тема 1. Виділення ДНК методом фенол-хлороформної екстракції.

Тема 2. Гель-електрофорез ДНК.

Тема 3. Виділення плазмід та трансформація клітин *Esherichia coli*

Тема 4. Перенесення білків на мембрани (Western blotting).

Тема 5. Імуноферментний аналіз. Використання тест-систем для виявлення антигенів та антитіл до збудників поширених захворювань.

3. Рекомендована література

Основна література

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применения. М: Мир, 2002
2. Сингер М., Берг М. Гены и геномы: у 2 томах. М: Мир, 1998
3. Шевелуха В.С., Калашника Е.А., Дегтеров С.В и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М: Высшая школа, 1998 – 416 с.
4. Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. Molecular Cell Biology, 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000.
5. Маниатис Т., Фрич З., Сэмбрук Дж., Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984.
6. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж., Молекулярная биология клетки. В 3-х т. 2-е изд. перераб. и доп. М.: Мир, 1994
7. Turner P.C., McLennan A.G., Bates A.D., White M.R.H., Molecular Biology Second edition, School of Biological Sciences, University of Liverpool, Liverpool, UK, 2000.

Додаткова література

1. Гонський Я.І., Максимчук Т.П., Калинський М.І. Біохімія людини. Тернопіль: Укрмедкнига, 2002.
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая биохимия. М.: Медицина, 1990. – 528 с.
3. Луцак В.І., Редокс-сенсори мікроорганізмів, Укр. біохім. журн., 2008, 80(4), 25–33.
4. Луцак, В. И., Окислительный стресс у дрожжей: обзор, Биохимия. – 2010. – Т. 75, №3. – Р. 346-364.
5. Lushchak V.I., Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. – 2011. – Vol. 153, N 2. – P. 175-190.
6. Наукові статті у мережі Інтернет.

Інтернет-ресурси

1. http://www.biotechnolog.ru/ge/ge1_2.htm - Кузьмина Н. Биотехнология
2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/> - Cooper G.M. The cell: a molecular approach. – 2th edition. – 2000.
3. <http://www.whfreeman.com/Catalog/Product.aspx?isbn=9780716743828> - Griffiths A. J.F.; Gelbart W.M.; Lewontin R.C.; Miller J. H. Modern Genetic Analysis

