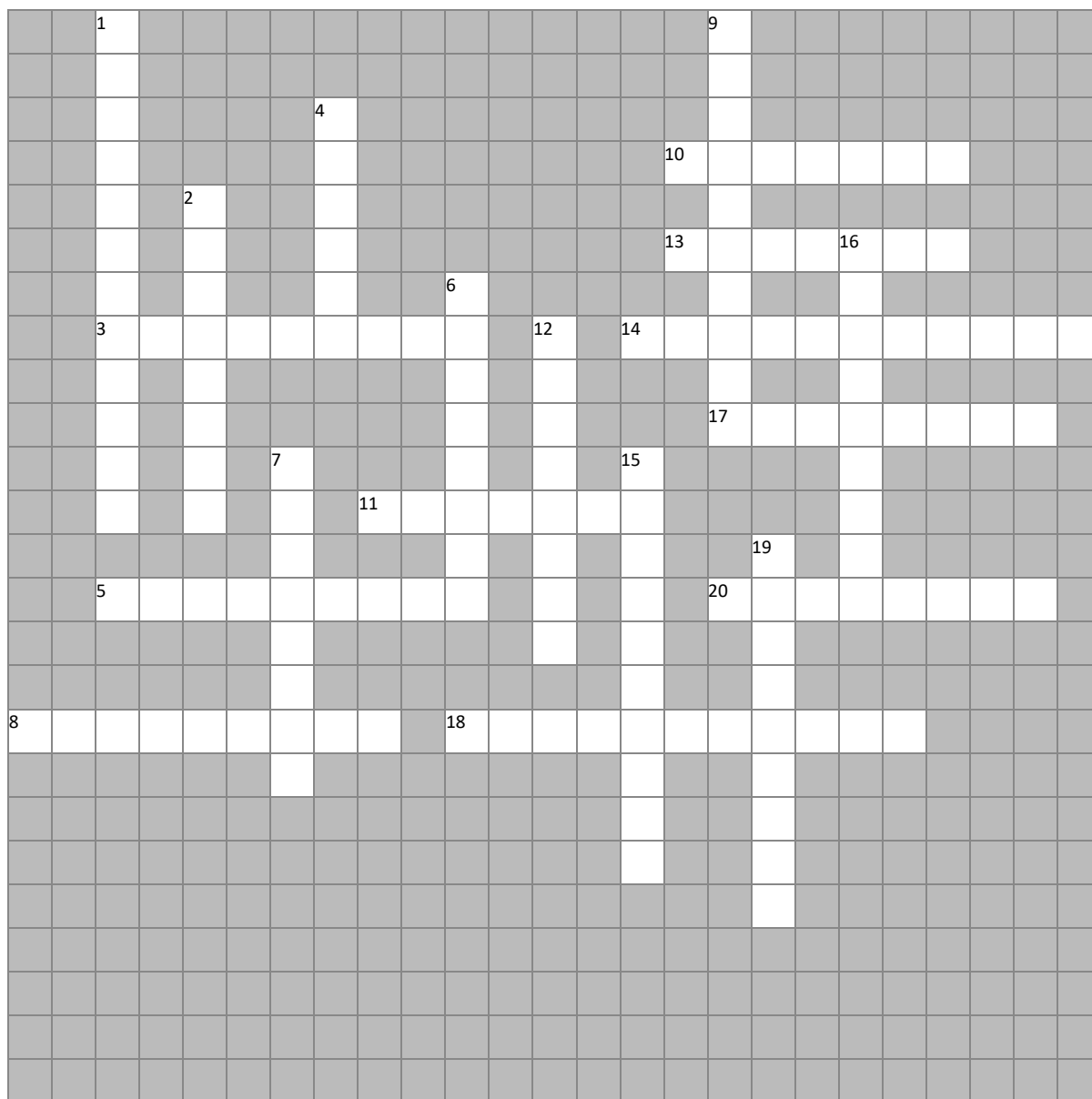




11 класс

«Кроссворд»



По горизонтали:

3. Аминокислота с гидрофобным радикалом.
5. Мох, относящийся классу Печеночники.
8. Тип глиальных клеток.
10. Часть ленточного червя.
11. Деревенская ласточка.





13. Тип взаимодействия генов.

14. Вид стела, характерный для Однодольных.

17. Гормон – производное аминокислоты тирозина.

18. Гормон, оказывающий сосудосуживающее действие.

20. Промежуточные филаменты, входящие в состав эпителиальных клеток.

По вертикали:

1. Полимеры, состоящие из одинокых мономеров.

2. Клетки крови, участвующие в развитии аллергических реакций.

4. Боковая меристема.

6. Вид хромосомной перестройки.

7. Воронья кость.

9. Органоид апикомплексов.

12. Хвостовая косточка бесхвостых земноводных.

15. Наука о плодах.

16. Личинка полихет.

19. Катионные белки – компоненты врожденного иммунитета.



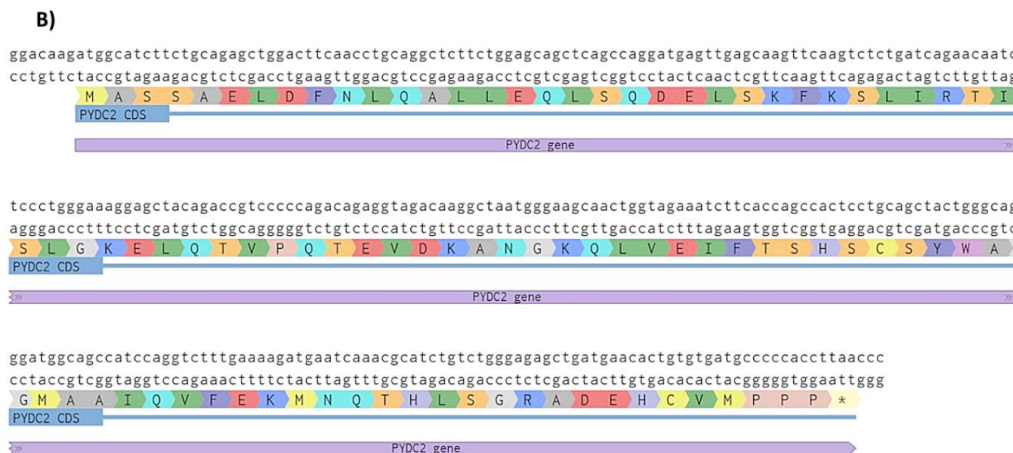
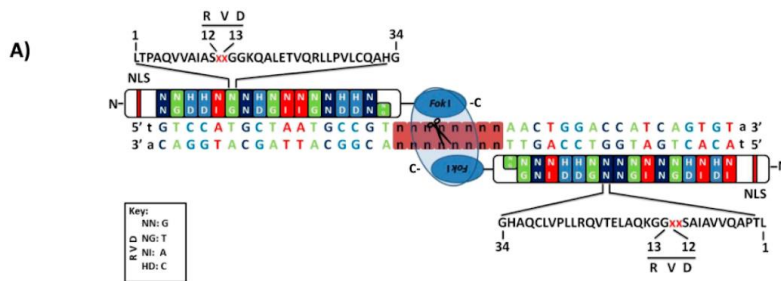


Задание 2

*«В руках мастера
Ножницы становятся
Искусства частью».*

(Неизвестный поэт (ChatGPT))

В настоящее время активно развивается такое направление генной терапии, как геномное редактирование. Предлагаем вам ответить на ряд вопросов, связанных с данной тематикой.



C)

	T			C			A			G		
T	TTT	Phe	F	TCT	Ser	S	TAT	Tyr	Y	TGT	Cys	C
	TTC			TCC			TAC			TGC		
	TTA	Leu	L	TCA			TAA	STOP		TGA	STOP	
	TTG			TCG			TAG			TGG	Trp	W
C	CTT	Leu	L	CCT	Pro	P	CAT	His	H	CGT	Arg	R
	CTC			CCC			CAC			CGC		
	CTA			CCA			CAA	Gln	Q	CGA		
	CTG			CCG			CAG			CGG		
A	ATT	Ile	I	ACT	Thr	T	AAT	Asn	N	AGT	Ser	S
	ATC			ACC			AAC			AGC		
	ATA			ACA			AAA	Lys	K	AGA	Arg	R
	ATG	Met	M	ACG			AAG			AGG		
G	GTT	Val	V	GCT	Ala	A	GAT	Asp	D	GGT	Gly	G
	GTC			GCC			GAC			GGC		
	GTA			GCA			GAA	Glu	E	GGA		
	GTG			GCG			GAG			GGG		

Рисунок 1.





А) Структура и схема применения TALEN (с изменениями из: Jin-Song Xiong, Jing Ding, Yi Li, Genome-editing technologies and their potential application in horticultural crop breeding, Horticulture Research, Volume 2, 2015, 15019).

В) Целевой локус для разрезания посредством TALEN.

С) Таблица однобуквенного генетического кода.

1. А) Подумайте, что объединяет подходы, используемые в данной области?
Б) Методы геномного редактирования (ГР) могут иметь немало приложений, помимо исправления генетических дефектов. Приведите примеры таких приложений.

2. А) При использовании в медицинской генетике (с целью терапии наследственных заболеваний) в чем заключается принципиальное отличие подхода, характерного для методов геномного редактирования от большинства подходов лекарственной терапии? Б) Традиционно, до активного развития методов геномного редактирования, генная терапия в основном сводилась к так называемой генозаместительной терапии - попробуйте сформулировать, в чем различия этих подходов с точки зрения того, как они осуществляются, длительности эффекта воздействия.

3. А) Из каких живых систем были позаимствованы механизм и основные молекулярные агенты, для CRISPR/Cas систем, используемых в геномном редактировании? В чем состояла их функция там?

Б) Какие еще природные системы со сходными функциями, которые можно обнаружить “по соседству” с CRISPR/Cas, вам известны? В чем их отличие и сходство с системами, используемыми в методах геномного редактирования?

4. А) Каковы компоненты систем на основе CRISPR/Cas, TALEN, ZFN (нуклеазы цинковых пальцев)? Б) Подумайте, какие важные отличия в подходах могут быть при разработке таких систем, связанные с механизмами их функционирования?

5. А) В TALEN (transcription activator like effector nucleases) за узнавание целевой последовательности ДНК отвечает специфический домен в молекуле фермента, составленный из повторов консервативных (за исключением переменных 12й и 13й аминокислот) мономеров, длиной в 34 а.к. Переменные аминокислоты (RVD сайт) определяют специфичность мономера. Кроме этого, при ответе на вопросы задания нужно иметь в виду:

- Переменные аминокислоты и соответствующие нуклеотиды: NI - А, NG - Т, NH - G, HD - С,
- Разрезающие ДНК домены FokI располагаются на С конце TALEN и





функционируют в виде димера. FokI-домены разных TALEN димеризуются при “посадке” на целевую последовательность и вносят двухцепочечный разрыв в цепь ДНК.

– Мономеры “узнающих” доменов молекулы TALEN связывают нуклеотиды в направлении 5’ - 3’.

С учетом вышеперечисленного, подумайте, почему пару TALEN на целевом участке располагают так, как это изображено на рисунке?

Б) На схеме TALEN, на N конце присутствует некий участок “NLS” (nuclear localization signal) - зачем он там нужен, в чем его функция?

6. А) Определите аминокислотную последовательность уникальных сайтов (общие а.к. следует опустить) в составе “узнающих” доменов TALEN для внесения двухцепочечного разрыва в указанном участке представленной на изображении целевой последовательности - необходимо выбрать ближайший к началу гена локус, соответствующий следующим условиям:

– выбранная длина узнаваемых последовательностей - 17 нуклеотидов;
– длина участка, окруженного таргетируемыми последовательностями, в который и будет внесен разрыв (участок называют спейсером) - обычно составляет 14 - 20 нуклеотидов;

– на 5’ конце таргетной последовательности должен предшествовать нуклеотид Т (данное условие связано с особенностями функционирования TALEN).

Ответ дать в виде строки, содержащей пары аминокислот, разделенные запятыми.

Б) Какова длина нуклеотидной последовательности, кодирующей переменную часть каждой из использованных TALEN, приведите нуклеотидные последовательности, кодирующие переменные RVD сайты в виде: пар нуклеотидных триплетов, отделенных запятыми: “ATGGCT,ATGGCT”. Поскольку генетический код является вырожденным - используйте первый из возможных кодонов, в предоставленной таблице при ее просмотре сверху вниз, слева направо:

7. А) В настоящее время в системе CRISPR/Cas “проводником” к месту приложения усилий фермента-эффектора является так называемая направляющая РНК (sgRNA). При этом уникальной, комплементарной целевому локусу (так называемый протоспейсер), является лишь ее часть - crRNA - длиной 20 - 22 нуклеотида. Опишите, как кодируются и транскрибируются такие РНК в природных системах?

Б) В чем разница между двумя основными классами природных CRISPR-систем?





8. А) При осуществлении редактирования с использованием CRISPR/Cas системы, роль эффекторного фермента заключается во внесении разрыва в целевом локусе в обеих, либо в одной из цепей ДНК, в зависимости от варианта системы (другие варианты CRISPR-систем, осуществляющих прямое внесение изменений в нуклеотидную последовательность цепей ДНК и пр., мы здесь не рассматриваем). Далее в действие должны вступать иные механизмы. Поясните, какие механизмы/события в клетках должны быть задействованы? Чем чревата для клетки недостаточность данных функций?

Б) При использовании “классических” вариантов CRISPR/Cas9 системы, события в клетке, следующие за актом разрезания, обычно стараются направить по одному из двух основных путей. Что это за пути? Чем они характеризуются применительно к рассматриваемым процессам (у животных и человека)

9. А) Для того чтобы Cas нуклеаза, ведомая направляющей РНК, могла осуществить искомое воздействие на молекулу ДНК в целевом локусе, помимо очевидно необходимой максимальной комплементарности целевой последовательности и crRNA, необходимо выполнение определенного, вполне конкретного условия, связанного с последовательностью ДНК в области целевого локуса. Укажите, что это за условие?

Б) Подумайте, какие иные факторы, связанные с ДНК хозяина, могут влиять на эффективность CRISPR/Cas системы в клетках животных и человека?

10. А) На последовательности гена PYDC2, представленной на рисунке 1В, подберите по 3 последовательности crRNA для эндонуклеаз SpCas9 (длина crRNA - 20 нуклеотидов) и SaCas9 (длина crRNA - 22 нуклеотида) пригодных для выполнения нокаута этого гена. При выполнении задания считаем, что введение разреза комплексом эндонуклеазы с crRNA равнозначно нокауту *.

При выполнении задания необходимо иметь в виду:

– Необходимо учитывать фактор, упомянутый в вопросе 9А, в случае SpCas9 - NGG, SaCas9 - NNGRR, где N подставляется вместо любого нуклеотида, а R - вместо G или A

– разрез производится за 3 нуклеотида от 3' конца crRNA (т.е. нужно найти по 3 crRNA 3' конец которых ближе всего к началу гена).

* Нокаут осуществляется созданием сдвига рамки считывания с образованием стоп-кодона далее в последовательности - это, однако, к решению задания не относится.

Б) При предварительном дизайне направляющих РНК (точнее, их уникальных частей - crRNA) обычно учитывают два важных фактора, которые





можно оценить численно посредством биоинформатических методов. Укажите, что это за факторы и что они характеризуют.

Ответы:

1 А) Методы геномного редактирования основаны на использовании направляемых (тем или иным способом) ферментов, обычно - эндонуклеаз, для прицельного внесения определенных изменений в предварительно выбранных локусах молекул ДНК. Тип изменений, но не всегда то, какое именно изменение будет осуществлено, также определяется при конструировании системы (**1 балл**).

Б) Помимо использования в медицинской генетике, методы, на которых основаны подходы геномного редактирования, очевидно могут быть использованы в таких областях, как селекция и генная инженерия. Также возможно их применение в контексте борьбы с инфекционными агентами, что, в какой-то степени, является наиболее “естественным” приложением для, например, CRISPR-систем. Например проводятся исследования, связанные с возможностью полной очистки генома пациента от встроенных лентивирусов (**1 балл**).

2. А) Принципиальное отличие методов геномного редактирования, в контексте терапии наследственных заболеваний, - направленность на устранение самой причины заболевания, исправление патологического генетического варианта лежащего в основе патогенеза. Особенно - при моногенных заболеваниях. Лекарственные препараты в случае генетических заболеваний, обычно воздействуют на более поздние звенья патогенетических цепей, и в, любом случае, не могут привести к окончательному излечению (**1 балл**).

Б) Генозаместительная терапия подразумевает введение в клетки и ткани, где отсутствует или нарушена функция какого-либо гена, соответствующего экзогенного функционального гена, экспрессия которого позволяет уменьшить или устранить влияние имеющегося генетического дефекта. Однако, в отличие от геномного редактирования, методы генозаместительной терапии в большинстве случаев не могут привести к окончательному устранению дефекта даже в случае полностью отсутствующей функции внутреннего гена (т.к. экзогенная копия рано или поздно будет удалена из клетки), а в некоторых случаях, когда в основе заболевания лежит влияние “неправильного” белка, синтезирующегося с “неправильного” гена, введение дополнительной копии гена (хотя и “правильной”) может не приводить к значительным улучшениям из-за сохраняющегося влияния внутреннего гена (**1 балл**).

3 А) По одной из основных теорий, система CRISPR является одним из важнейших элементов защитной противофаговой системы бактерий. Короткие направляющие РНК в этой системе синтезируются с фрагментов (спейсеров)





генома “интервентов” (чаще всего - фагов) встраиваемых с помощью белков системы CRISPR (минимум Cas1 и Cas2) в CRISPR-кассету. Эти направляющие РНК в комплексе с эффекторными белками (например, та самая Cas9) “обнаруживают” и разрезают геномные НК тех “патогенов” с которыми клетка уже, соответственно, сталкивалась (1 балл).

Б) К таким системам можно отнести систему эндонуклеаз рестрикции, которая также выполняет защитную функцию в клетках бактерий. Сходство с направляемыми эндонуклеазами очевидно - способность “прицельно” разрезать цепи ДНК в локусах с определенными последовательностями. Однако, в отличие от систем, используемых в геномном редактировании, “перепрограммирование” рестриктаз нетривиально. В качестве дополнительного сходства с TALEN и ZFN и отличия от CRISPR/Cas можно упомянуть то, что последовательность целевого локуса определяется аминокислотной последовательностью и трехмерной структурой молекулы фермента, а не дополнительными элементами, такими как направляющая РНК в CRISPR/Cas (1 балл).

4. Для TALEN и ZFN минимальный набор компонентов системы представлен обычно парой нуклеазы, отличающихся специфичностью в отношении двух лежащих рядом локусов в целевой ДНК. В CRISPR/Cas системе, помимо универсального компонента - нуклеазы Cas, имеется также уникальный - направляющая РНК, которая и осуществляет таргетирование (1 балл).

Б) Важным отличием является именно то, что для систем с использованием TALEN и ZFN приходится разрабатывать эффекторный фермент каждый раз заново для новых локусов, т.к. за узнавание целевой ДНК отвечают домены в составе молекулы эффектора. В системе же CRISPR/Cas за узнавание отвечают достаточно короткие РНК, которую можно синтезировать (либо транскрибировать “по месту действия”, если доставка системы осуществляется в виде кодирующего ее вектора) тогда как сам фермент универсален. Разработка и синтез коротких РНК очевидно значительно менее трудоемкий процесс. Кроме того, это дает возможность использования в экспериментах одновременно множества направляющих РНК, специфичных различным целевым локусам (1 балл).

5. А) На рисунке молекулы TALEN расположены на разных цепях ДНК в противоположном направлении. Так сделано для того, чтобы обеспечить пространственную близость FokI доменов, разрезающих ДНК будучи в форме димера. Т.к. нуклеотиды связываются мономерами узнающих доменов TALEN в направлении 5' -> 3' - молекулы TALEN должны связывать разные цепи ДНК для того, чтобы совместить в пространстве FokI домены, расположенные на С конце TALEN. При “посадке” на одну цепь FokI были бы разделены всей протяженностью одной из TALEN. Размещение TALEN в одном локусе, но на разных цепях также неэффективно из-за того, что связывание нуклеотидов





ограничено направлением 5'-3', так что у TALEN, связывающих один и тот же участок ДНК, FokI домены оказались бы с разных сторон локуса(1 балл).

Б) NLS - сигнал ядерной локализации. В молекуле TALEN NLS необходим для взаимодействия с белками импортинами обеспечивающими поступление фермента в ядро клетки, т.е. именно туда, где должен быть осуществлен акт редактирования (1 балл).

6. А) Итак: последовательность ДНК, подходящая по условиям задания:

t ggcattctctgcagagc tggacttcaacctgcagg ctcttctggagcagctc a

левый целевой сайт: ggcattctctgcagagc - 17 оснований

спейсер: tggacttcaacctgcagg - 18 оснований

правый целевой сайт: gagctgctccagaagag (обратно комплементарен указанной исходной последовательности) - 17 оснований

Аминокислотная последовательность RVD участков соответствующего "узнающего" домена в составе TALEN для левого сайта: NH,NH,ND,NI,NG,ND,NG,NG,ND,NG,NH,ND,NI,NH,NI,NH,ND

для правого сайта: NH,NI,NH,ND,NG,NH,ND,NG,ND,ND,NI,NH,NI,NI,NH,NI,NH (1 балл)

Б) Длина нуклеотидной последовательности, кодирующей вариабельные участки TALEN для обеих составляет $17 \times 34 \times 3 = 1734$. Кодирующая нуклеотидная последовательность:

Для TALEN специфичной левому локусу: AATCAT, AATCAT, CATGAT, AATATT, AATGGT, CATGAT, AATGGT, AATGGT, CATGAT, AATGGT, AATCAT, CATGAT, AATATT, AATCAT, AATATT, AATCAT, CATGAT

правому локусу: AATCAT, AATATT, AATCAT, CATGAT, AATGGT, AATCAT, CATGAT, AATGGT, CATGAT, CATGAT, AATATT, AATCAT, AATATT, AATATT, AATCAT (1 балл)

7. А) После вырезания из генетического материала вторгающихся инфекционных агентов коротких последовательностей ДНК, последние подвергаются встраиванию в геномную ДНК бактерии (или археи) в CRISPR-кассету. Такая кассета представляет собой череду таких вырезанных спейсеров отделенных друг от друга палиндромными повторами, способными формировать стабильные шпилечные структуры. На 5' конце CRISPR-касеты располагается регуляторная лидерная последовательность, также, как правило, содержащая промоторную последовательность. Вставка новых спейсеров осуществляется





после лидерной последовательности, перед всеми остальными звеньями CRISPR-кассеты. Транскрибируется обычно вся кассета целиком как прекурсорная РНК (pre-crRNA), которая, перед тем как связаться с эффекторными Cas белками, подвергается нарезанию на отдельные crRNA (**1 балл**).

Б) Разница между основными классами природных CRISPR-систем заключается, в первую очередь, в количестве эффекторных белков, участвующих в системе. Если в системах I класса эффекторные функции выполняет комплекс из нескольких белков, часть из которых может быть рекрутирована (вовлечена в процесс) уже после “посадки” на целевой локус, то в системах II класса, к которым в основном относятся те системы, которые используются для решения молекулярно-биологических, генно-инженерных и медицинских, задач, эти функции выполняет один крупный белок (**1 балл**).

8. А) После внедрения двухцепочечного (или иногда одноцепочечного) разрыва в цепи ДНК, дальнейшие действия должны быть выполнены системами репарации ДНК в клетке. При отсутствии возможности репарировать двухцепочечный разрыв (ДЦР) клетка обычно погибает. Такие разрывы являются триггерами ухода клетки в апоптоз. Б) Два основных пути репарации, которые обычно полагаются возможными либо предпочтительными при проведении геномного редактирования - это так называемые негомологичное соединение концов (NHEJ) и гомологичная репарация (HDR). Если NHEJ у животных и человека является наиболее активным и частым вариантом репарации ДЦР, действующим на большинстве стадий клеточного цикла, то HDR - малоактивен, его можно наблюдать преимущественно в делящихся клетках. В то же время NHEJ характеризуется частым внедрением в месте разрыва коротких вставок и делеций (что можно использовать для индуцирования сдвига рамки считывания и нокаута генов), тогда как HDR, при котором для восстановления последовательности используется гомологичная матрица (отдельно введенная или, например, гомологичная хромосома), наоборот, практически прецизионно восстанавливает поврежденную молекулу ДНК (**1 балл**).

9. А) Таким условием является наличие прилегающей к протоспейсеру с 3' конца так называемой PAM последовательности (protospacer adjacent motif), различной для разных эффекторных эндонуклеаз CRISPR/Cas систем. Б) К факторам, связанным с ДНК хозяина, и влияющим на эффективность “посадки” комплекса эффекторной эндонуклеазы с направляющей РНК на целевой локус в клетках животных и человека, можно отнести состояние, в котором пребывает целевой участок хромосомы. Эффективность редактирования выше на участках, подвергаемых активной экспрессии. Гетерохроматин представляет собой определенное препятствие для работы системы (**1 балл**).



11.А. (1 балл)

	Position	Strand	Sequence 5' - > 3'	PAM
SaCas9	23	+	caagatggcatcttctgcagag	ctgga
	24	-	tgcaggttgaagtcagctctg	cagaa
	40	-	ctgctccagaagagcctgcagg	ttgaa
Sp Cas9	24	+	gatggcatcttctgcagagc	tgg
	39	+	agagctggacttcaacctgc	agg
	43	-	gctgctccagaagagcctgc	agg

Б) Важные факторы, которые следует учитывать при дизайне crRNA и которые при этом можно оценить расчетным путем - это индексы ожидаемых целевой (ontarget) и нецелевой (off target) активности этих crRNA. Первый индекс очевидно позволяет предварительно оценить эффективность таргетирования комплекса с этой crRNA на целевой локус, тогда как индекс нецелевой активности призван показывать вероятность посадки (и, соответственно, воздействия эффекторного белка на ДНК) в иных локусах, не предусматриваемых исследователем (1 балл).



Задание 3

*«Великая книга природы
написана математическими символами».*

Галилео Галилей

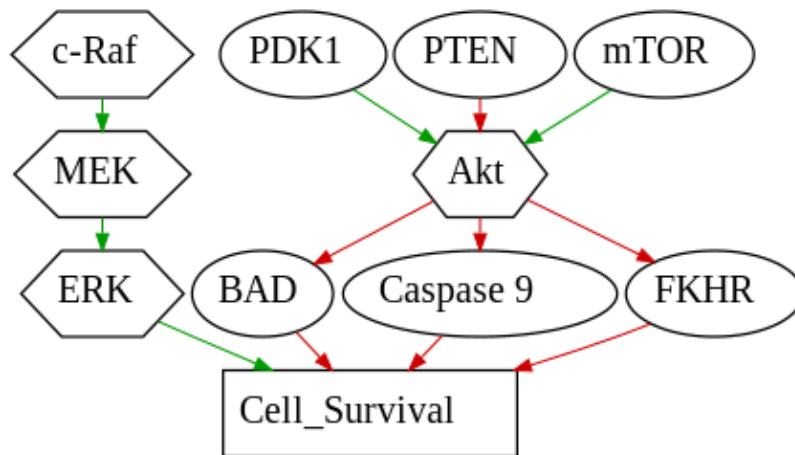


Рисунок 1. Граф молекулярного пути PTEN-опосредованного контроля выживаемости клетки.

Красные стрелки соответствуют ингибированию, зеленые – активации. Вершины графа в виде многоугольника содержат несколько генных продуктов, овалы – только один ген.

Для молекулярного пути на можно определить коэффициенты влияния каждого гена на биологический эффект пути, учитывая тип взаимодействия генных продуктов и их комплексов друг с другом и

выполняя обход графа по следующим правилам. Стартовая вершина – та, из которой можно прийти в наибольшее количество вершин (граф направленный). Вариантов стартовых вершин может быть несколько. Нужно выбрать из них любую, при которой сохраняется биологический эффект пути.

Стартовая вершина в начале обхода имеет коэффициент единицу, остальные равны нулю. При назначении коэффициентов граф считать ненаправленным. При прохождении через стрелку активации следующая вершина наследует коэффициент от предыдущей, а через стрелку ингибирования – наследует с обратным знаком.





Транскриптомную активацию пути можно измерить количественно в виде суммы двоичных

логарифмов отношений уровня экспрессии в опухоли к уровню в норме. При этом, для каждого отношения должен быть учтен коэффициент влияния гена на эффект пути (коэффициент для гена

наследуется от вершины).

При секвенировании РНК получены следующие уровни генной экспрессии:

Таблица 1. Результаты РНК секвенирования для 15 генов. Данные уже нормализованы и готовы к расчетам.

Ген	Уровень в опухоли	Уровень в нормальной ткани
<i>AKT1</i>	20	5
<i>AKT2</i>	1	4
<i>AKT3</i>	12	6
<i>BAD</i>	5	10
<i>CASP9</i>	128	4
<i>FOXO1</i>	20	5
<i>MAP2K1</i>	8	2
<i>MAP2K2</i>	96	3
<i>MAPK1</i>	1	8
<i>MAPK3</i>	20	20
<i>TP53</i>	160	5
<i>MTOR</i>	14	7
<i>PDPK1</i>	17	34
<i>PTEN</i>	11	88
<i>RAF1</i>	20	5

Кроме того, при секвенировании ДНК образца опухоли выявлено, что в генах имеются следующие

мутации:

CASP9 с.520G>T p.E174*,

FOXO1 с.725_726insCTGAG p.E242Dfs*2,

MTOR с.5938_5940del p.S1980del.





Для молекулярного пути на рисунке 1:

1. Какие варианты стартовых вершин возможны?

Ответ: PDK, PTEN, mTOR

(неполный набор вершин или лишняя вершина – 1 балл, полный набор – 2 балла).

2. Какую стартовую вершину (вершины) следует выбрать, учитывая биологический эффект пути (подавление выживаемости клетки)? В какое количество вершин из нее можно прийти в случае направленного графа?

Ответ: PTEN, 5. (Один верный ответ – 1 балл, два верных ответа – 2 балла).

3. Приведите коэффициент для каждой вершины

Ответ: для PTEN, BAD, FKHR, Caspase 9 коэффициенты равны единице, остальные – минус единице. (правильные положительные коэффициенты - 1 балл, все правильные – 2 балла).

ген(генный продукт)	уровень в опухоли	уровень в нормальной ткани	отношение	логарифм отношения	логарифм, умноженный на коэффициент влияния	логарифм, умноженный на коэффициент влияния, с учетом мутации	ген	коэффициент	вершина
AKT1	20	5	4	2	-2	-2	AKT1	-1	Akt
AKT2	1	4	0.25	-2	2	2	AKT2	-1	Akt
AKT3	12	6	2	1	-1	-1	AKT3	-1	Akt
BAD	5	10	0.5	-1	-1	-1	BAD	1	BAD
CASP9	128	4	32	5	5	0	CASP9	1	Caspase 9
FOXO1	20	5	4	2	2	0	FOXO1	1	FKHR
MAP2K1	8	2	4	2	-2	-2	MAP2K1	-1	MEK
MAP2K2	96	3	32	5	-5	-5	MAP2K2	-1	MEK
MAPK1	1	8	0.125	-3	3	3	MAPK1	-1	ERK
MAPK3	20	20	1	0	0	0	MAPK3	-1	ERK
TP53	160	5					TP53	не участвует в пути	
MTOR	14	7	2	1	-1	-1	MTOR	-1	mTOR
PDPK1	17	34	0.5	-1	1	1	PDPK1	-1	PDK1
PTEN	11	88	0.125	-3	-3	-3	PTEN	1	PTEN
RAF1	20	5	4	2	-2	-2	RAF1	-1	c-Raf
				сумма	-4	-11			

4. Приведите коэффициент и соответствующую вершину для каждого гена из Таблицы 1. Ген может не участвовать в пути.

Ответ: см скриншот (правильные коэффициенты - 1 балл, правильные вершины - 1 балл).

5. Рассчитайте уровень активности молекулярного пути (число) по экспрессионным данным из Таблицы 1. Также приведите для каждого гена двоичный логарифм отношения опухоль/норма.-4. (Числа простые, расчет доступен без калькулятора).





Ответ: см. скриншот (двоичный логарифм отношения опухоль/норма правильные – 1 балл, итоговое число совпало – 1 балл).

6. Предполагая, что мутации, относящиеся к loss-of-function типам, приводят к синтезу нефункционального белка, скорректируйте уровень активации пути. Объясните числовые изменения.

Ответ: -11.

Объяснение: учитываем только CASP9 с.520G>T p.E174*(nonsense, относится к loss-of-function типам мутаций) и FOXO1 с.725 726insCTGAG p.E242Dfs*2 (инсерция со сдвигом рамки считывания, относится к loss-of-function типам мутаций). Если белок нефункциональный, не имеет значения уровень его экспрессии, поэтому принимаем его нулевым. MTOR с.5938 5940del p.S1980del – делеция, которая не сдвигает рамку считывания, поэтому не относится к loss-of-function типам мутаций.

(см. скриншот – желтые отметки, число совпало, объяснения нет или неправильное – 1 балл, число совпало, объяснение есть – 2 балла).

7. Рассчитайте процент идентичности для фрагментов белков MAP2K1 и MAP2K2. Процент идентичности равен доле совпавших аминокислот в одинаковых позициях. Предоставьте результаты выравнивания.

фрагмент MAP2K1:

MAVGRYPIPPDAKELELMFGCQVEGDAAETPPRPRTTPGRPLSSYGMDSRPPM
AIFELLDYIVNEPPPK

LPSGVFSLE

фрагмент MAP2K2:

LAVGRYPIPPDAKELEAIFGRPVDGEEGEPHSISPRPRPPGRPVS GHGMDSRP
AMAIFELLDYIVNEPP

PKLPNGVFTP

Вариант ответа:

70,7% (58 совпавших аминокислот из 82)

Sequence 1	MAVGRYPIPPDAKELELMFGCQV---- EGDAAETPPRPRTTPGRPLSSYGMDSRPPMAIF
Sequence 2	LAVGRYPIPPDAKELEAIFGRPVDGEEGEPHSISPRPRPPGRPVS GHGMDSRP SRPAMAIF
Sequence 1	ELLDYIVNEPPPKLPSGVFSLE
Sequence 2	ELLDYIVNEPPPKLPNGVFTP





(0 баллов – не предоставлен результат выравнивания, числовой ответ любой.

1 балл – меньший % идентичности, чем в варианте ответа; сопоставление не полных последовательностей, а только наибольшей части.

2 балла – сопоставлены полные последовательности, % идентичности не менее указанного в варианте ответа).

8. Для расчета уровня активации нескольких путей у нескольких пациентов написан следующий код на языке R:

```
#create gene - pathway coefficients table
gene_pathway_coefficients <-
data.frame(
  pathway1 = c(1, 0, 1, 0, 1, 1),
  pathway2 = c(1, -1, -1, 0, 0, 1),
  pathway3 = c(1, 0, 1, 0, 0, 0)
)
rownames(gene_pathway_coefficients) <-
  paste("Gene", 1:nrow(gene_pathway_coefficients))
print(gene_pathway_coefficients)
#create gene expression table
log2expression_table <- data.frame(matrix(1:12, ncol = 6))
colnames(log2expression_table) <- paste("Gene", 1 :ncol(log2expression_table))
rownames(log2expression_table) <-
  paste("Patient", 1:nrow(log2expression_table))
print(log2expression_table)
#calculate pathway activation
pathway_activation <- log2expression_table %*% gene_pathway_coefficients
print(pathway_activation)
#sum of activation levels for all pathways and patients
sum(pathway_activation)
```





Где ошибка, что надо исправить для верной работы кода? Поясните словами и приведите исправленный код. Числовые данные исправлять нельзя. Исправление надо выполнить в пределах 1 существующей строки. Задание выполнять без запуска кода.

Ответ: Надо исправить класс переменных с датафреймов на матрицы, так как используется матричное умножение.

```
pathway_activation <- as.matrix(log2expression_table) %*%  
as.matrix(gene_pathway_coefficients) #исправленная строка
```

(1 балл - есть пояснение ошибки, 1 балл - исправленный код верный).

9. Какой будет уровень активации пути pathway3 для пациента Patient 1? Какое число напечатает правильный код после последней строчки (сумма уровней активаций всех путей)? Задание выполнять без запуска кода. Активацию путей считать аналогично заданию 5 или так, как указано в коде.

Ответ: 6 ; 78. (1 балл – одно верное число, 2 балла – 2 верных числа).

10. Являются ли мутации в генах CASP9 и FOXO1 связанными, то есть возникающими у одних и тех же пациентов? Известно, что CASP9 мутирован у 90 пациентов, ген FOXO1 у 23 пациентов. Всего 345 пациента. При этом у 5 пациентов отмечается наличие мутаций обоих генов одновременно. Дайте ответ на основании χ^2 теста (с пояснением). Приведите ожидаемое количество пациентов с мутациями в обоих генах одновременно.

Ответ: нет, не являются, так как наблюдаемое значение меньше ожидаемого. 6 человек.

Ответ: «нет», пояснение дано. Без пояснения ответ не засчитывается. (1 балл). Ожидаемое значение указано верно ($6=90*23/345$). (1 балл).

Расчет p-value не нужен (и таблицы для него), так как ответ уже следует из того, что наблюдаемое значение меньше ожидаемого (чтобы считать гены статистически значимо связанными требуется, чтобы наблюдаемое значение было больше ожидаемого и $p\text{-value} < 0.05$)





Задание 4

*«Там, где похоронен старый маг,
Где сияет в мраморе пещера,
Мы услышим робкий, тайный шаг,
Мы с тобой увидим Люцифера».*

Н. Гумилев

Толчками к исследованиям в области X и его применением оказались гибель «Титаника», который при первом рейсе в 1912 году столкнулся с айсбергом и затонул, а также необходимость в обнаружении подводных лодок во время Первой Мировой войны. До 40-50 хх годов считалось, что X мало встречается в природе, однако позднее выяснили, что человек буквально живет в мире X. Некоторые, например, представители парафилетической группы животных Z, используют X для своего существования.

кажите, что такое X и Z.

риведите примеры использования X в медицине.

бьясните каким образом используется X для получения рекомбинантных белков из бактериальных клеток.

очему животные используют X? Укажите не менее трех причин.

таблице приведена информация о генах у различных видов Z, ответственные за некоторую общую функцию. За что в целом отвечают представленные гены? Объясните наличие псевдогенов у видов 2 и 3.

ля каких из 4 видов с большой вероятностью использование X является жизненной необходимостью? Ответ объясните.





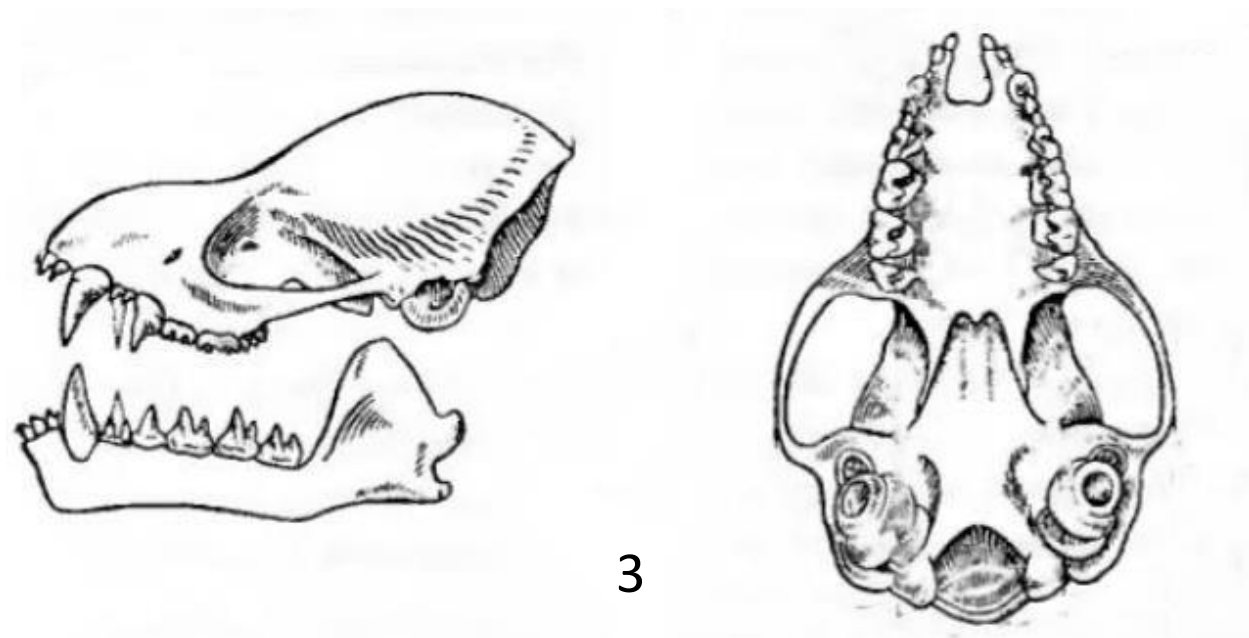
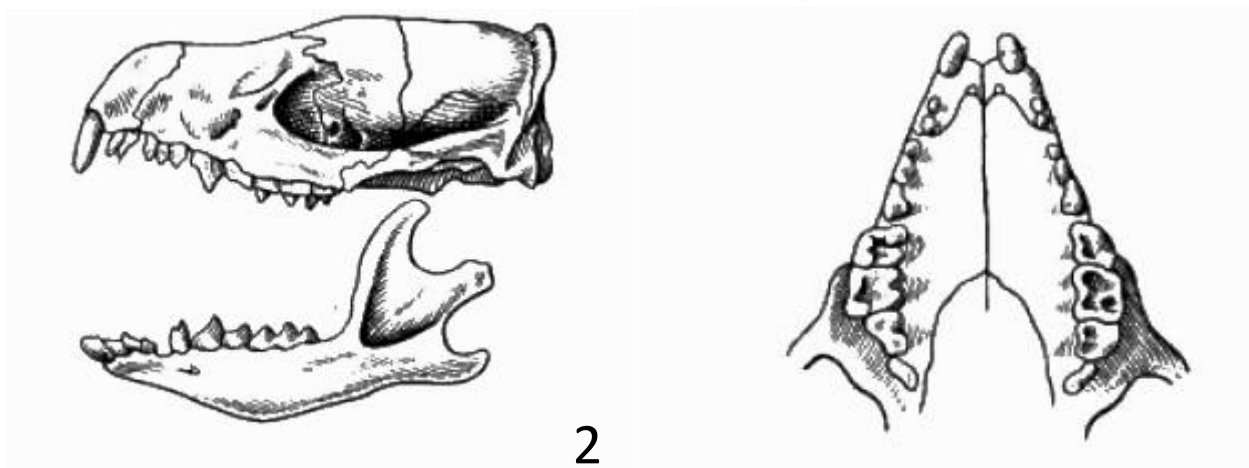
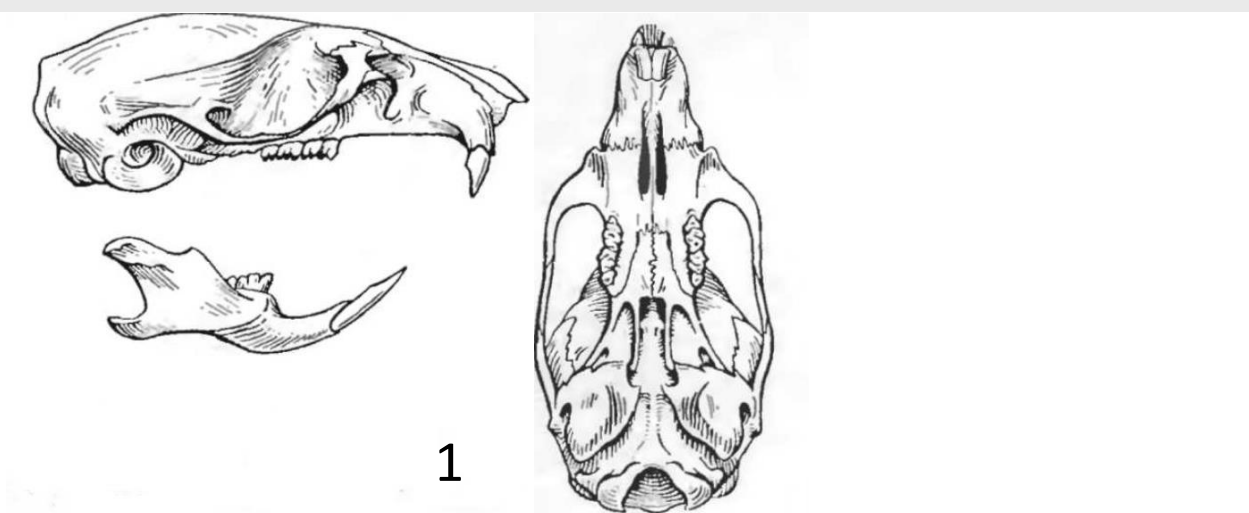
Вид	1	2	3	4
<i>ARR3</i>	●	⊗	⊠	●
<i>CNGB3</i>	●	⊗	⊗	●
<i>EYS</i>	⊠	⊠	⊠	●
<i>GJA10</i>	⊠	⊠	⊠	●
<i>GRK7</i>	●	⊠	⚠	●
<i>GUCA1C</i>	●	⊠	⊗	●
<i>GUCY2F</i>	●	⊠	⊠	●
<i>MYO3B</i>	●	⊗	⊗	●
<i>PAX6</i>	●	⊗	⊗	●
<i>PDE6D</i>	●	⊗	⊗	●
<i>OPN1SW</i>	●	⊠	⚠	●
<i>RBP3</i>	⚠	⊠	⚠	●

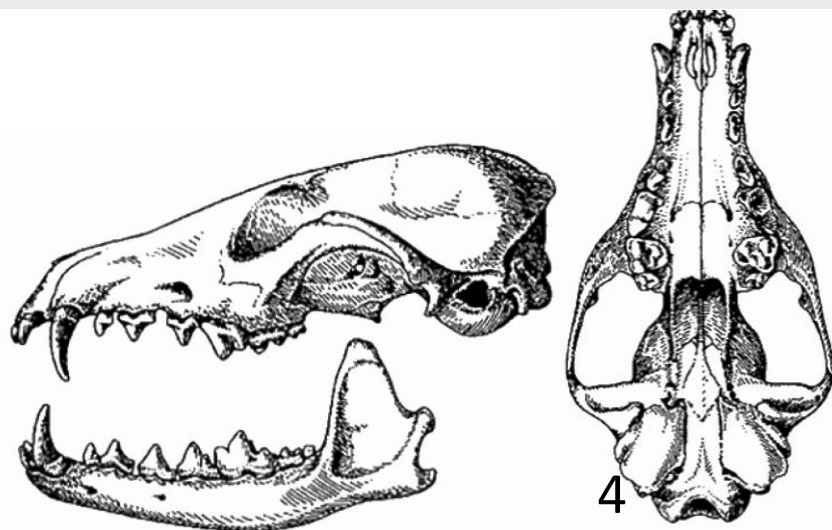
● Putative function ⚠ Containing frameshifts
 ⊗ Containing stop codons ⊠ Stop codons + frameshifts

- * *GUCY2F* – ген гуанилатциклазы фоторецепторов
- * *OPN1SW* - ген опсина, чувствительного к коротким волнам
- * *CNGB3* - ген цГМФ-зависимого катионного канала в фоторецепторах

7. Из четырех черепов выберите один, принадлежащий представителю Z. В чем особенность черепа Z в сравнение с другими черепами млекопитающих?

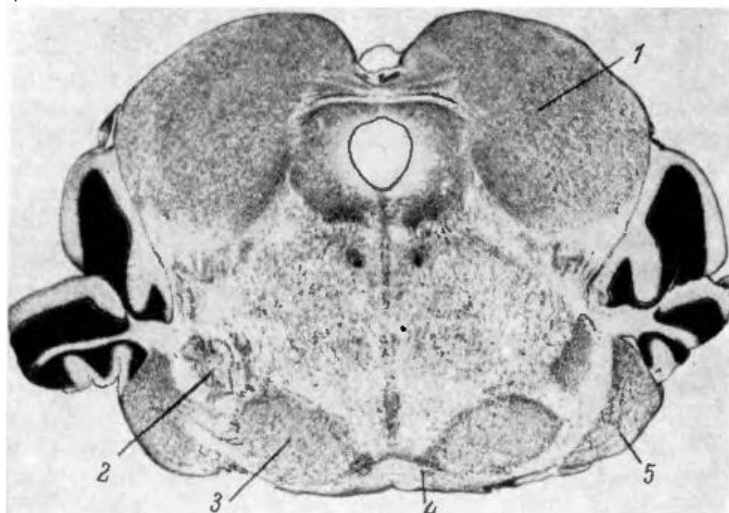






8. Эта часть отдела мозга у Z отличается густотой клеточных элементов и большим количеством ассоциативных нейронов по сравнению с другими млекопитающими и даже представителями родственного семейства, которые не используют X в своей жизнедеятельности. Назовите описанную структуру мозга. За что она отвечает?

9. К какому отделу мозга принадлежит эта структура? Объясните причину отличительных признаков этого отдела у животных, использующих X.



10. Строение каких органов еще отличается у Z от других животных, не использующих X? Объясните почему.

Ответ

1. Ультразвук и летучие мыши (2 балла)
2. В ультразвуковой диагностике и для ускорения регенерации тканей (2 балла).
3. Рекомбинантные белки часто экспрессируются в прокариотических клетках внутриклеточно. Ультразвук необходим для разрушения клеток и извлечения целевого белка. (2 балла)





4. Определять положение добычи, маневрировать во время полета, **(2 балла)**

5. В таблице указана информация о двух генах. Так как *OPN1SW* - ген опсина, чувствительного к коротким волнам, *GUCY2F* – ген гуанилатциклазы фоторецепторов, то речь идет о генах, ответственных за зрительное восприятие. Летучие мыши - ночные млекопитающие. Глаза большинства эхолокационных летучих мышей относительно малы и слабо развиты. Гены, участвующие в зрительном восприятии подвергаются давлению отбора **(2 балла)**.

6. Виды 2 и 3 используют ультразвук, так как все гены ответственные за зрительное восприятие являются псевдогенами. **(2 балла)**.

7. Череп летучих мышей изображен на рис. 3. Особенностью черепа является – передняя небная вырезка. Она необходима для лучшей фокусировки пучка ультразвука. **(2 балла)**

8. Нижнее (заднее) двуххолмие. Заднее двуххолмие – важнейший подкорковый слуховой центр. **(2 балла)**

9. Средний мозг. Увеличение количества ассоциативных нейронов в заднем двуххолмии указывает на сложную деятельность и функциональную активность этого отдела мозга в связи с использованием ультразвука. **(2 балла)**

10. Гортань и ухо. Гортань издает ультразвук (У подковоносых – нос), ухо воспринимает ответный сигнал. **(2 балла)**.





Задание 5

Физиология человека. Ситуационные задачи.

*«Если я рассуждаю логично,
это значит только то,
что я не сумасшедший,
но вовсе не доказывает,
что я прав.»*

Иван Петрович Павлов

1. Жидкие ткани организма.

А) Двое однояйцевых близнецов проживали в детском доме до 23 лет. В рамках плановых осмотров, братья периодически сдавали кровь на анализы, в том числе, производилось определение количества эритроцитов. На протяжении последних лет жизни в детском доме, эта величина у обоих братьев колебалась в районе $4.7E+12$ - $5.0E+12$ на литр. После 23 лет братья были вынуждены разъехаться по разным местам жительства. Так получилось, что они по прежнему продолжают сдавать кровь на определение числа эритроцитов. Но теперь, у одного из них количество эритроцитов в его крови достигало $6.5E+12$ на литр. Если считать, что причина связана с окружающей средой, подумайте, чем теперь отличаются места проживания близнецов?

Б) Опишите кратко, цепь событий в организме, приведших к увеличению эритропоэза у одного из близнецов.

2. Физиология возбудимых тканей.

А) Почему, при использовании препаратов, механизм действия которых связан с блокировкой натриевых каналов (таких как например бупивакаин или лидокаин) изменяется мембранный потенциал покоя у нейронов?

Б) Как скажется на МПП сдвиг баланса катионов Na^+ в сторону поступления в нейрон если баланс K^+ не останется неизменным





3. Физиология возбудимых тканей.

А) А) Каково специфическое действие цианидов в области мембраны нейрона?

Б) Почему гиперполяризация мембраны нервной клетки может вести к снижению и утрате возбудимости?

4. Физиология возбудимых тканей.

А) Какой раздражитель поможет отличить друг от друга морфологически сходные фрагменты скелетной и гладкомышечной тканей внутренних органов?

Б) Если один из образцов гладкомышечных тканей взят из стенки кишечника, по какому функциональному признаку, без дополнительных внешних воздействий, возможно его определение в условиях, обеспечивающих временное сохранение жизнедеятельности (например физиологический раствор)?

5. Физиология дыхания.

А) Каким образом лихорадка, характерная для различных воспалительных процессов, влияет на оксигемоглобин? Что происходит с кривой диссоциации оксигемоглобина? Как это влияет на газообмен в тканях и внешнее дыхание?

Б) Пациента, доставленного в больницу на "скорой" с пожара, срочно поместили в барокамеру. Объясните, что за процедура необходима пациенту, чем обусловлена эта необходимость?

6. Обмен веществ.

А) Какое количество белка должно распасться для того, чтобы с мочой выделилось 20 г мочевины?

Б) В норме количество синтезируемого и распадающегося белка в организме взрослого человека совпадают - "азотистое равновесие". Какое количество белка необходимо потреблять взрослому человеку с массой тела 80 кг. для сохранения такого азотистого баланса, если известно, что "коэффициент изнашивания" у здорового взрослого человека лежит в диапазоне от 0,028 до 0,075 г азота на 1 кг.?





7. Терморегуляция.

А) При стремительно развивающейся гипоксии, пациентов могут вводить в состояние искусственной гипотермии, при которой потребление O_2 тканями значительно снижается из-за замедления в них метаболических процессов. При этом физические факторы часто сочетают с химическими. Объясните, для чего могут применяться в этом случае миорелаксанты.

Б) Какова роль адренолитиков (симпатолитиков)?

8. Выделение.

А) При гидростатическом давлении в капиллярах клубочков (порядка 55 мм. рт. ст.) и нормальном онкотическом давлении белка в плазме и давлении в капсуле Боумена-Шумлянского порядка 12 мм. рт. ст., фильтрационное давление в капиллярах клубочка составит - ? Находится ли это значение в пределах нормы?

Б) Какие внепочечные факторы приведут к полному прекращению фильтрации без изменения химического состава крови?

9. Физиология пищеварения.

А) У пациентов, страдающих от такого наследственного заболевания, как целиакия, которое сопровождается повреждением ворсинчатого слоя кишечника, часто наблюдаются анемические явления. Объясните, какая связь между наследственным заболеванием и анемией.

Б) Поражения каких отделов пищеварительной системы, помимо кишечника, также могут быть причиной такого рода анемий?

10. Стресс.

А) Рассмотрим две ситуации. Иванов устраивается на работу в компанию А, прошел сложное и ответственное собеседование. После собеседования Иванов ощущает особую ясность мышления, приподнятое настроение, даже начинавшаяся легкая простуда куда-то делась. Петров, напротив, уже давно работает в этой компании. У постоянные переработки, нарушения сроков завершения проектов, проблемы с начальством - повседневная реальность для Петрова, он уже длительное время испытывает постоянный стресс. Соответственно у него наблюдается повышенная раздражимость и, часто,





подавленное настроение, снижение работоспособности, памяти и концентрации внимания, нарушение сна и пр. Иммуитет у Петрова, похоже, тоже снизился - он часто болеет. Какие эндокринные регуляторные механизмы задействованы в развитии наблюдающихся эффектов?

Б) Чем обусловлена разница в проявлениях и длительных эффектах стресса в этих двух случаях?

Ответы:

1А Брат, у которого повысилось содержание эритроцитов на литр крови по-видимому переехал в местность с пониженным парциальным давлением кислорода в воздухе. Вероятнее всего новое место жительства расположено где-то в высокогорных регионах (**1 балл**).

1Б В связи с пониженным парциального давления кислорода в воздухе у человека развилась гипоксия. Из-за того, что он остается в этой местности длительное время, гипоксия спровоцировала снижение распада гипоксического индуцибельного фактора (HIF), который, соответственно, способствовал усилению синтеза эритропоэтина и, далее, эритропоэза (**1 балл**).

2А Действие данных препаратов приведет к увеличению МПП, т.к. из-за блокировки натриевых каналов ток ионов из клетки не будет компенсироваться "перекачиванием" катионов натрия в обратном направлении, что приведет к гиперполяризации мембраны (**1 балл**).

2Б В норме при работе "натрий-калиевого насоса" на 2 поступающих в клетку катиона K^+ приходится 3 выводимых из клетки Na^+ , из-за чего внутренняя сторона мембраны имеет отрицательный заряд. При увеличении поступления Na^+ в клетку (снижение вывода их из клетки) будет происходить снижение разности потенциалов и деполяризация мембраны (**1 балл**).

3А Воздействие цианидов приводит к блокировке дыхательных ферментов и прекращению синтеза новых АТФ, что в свою очередь приведет к остановке натрий-калиевого насоса, деполяризации мембраны и утрате возбудимости (**1 балл**).





3Б Возрастание разницы между мембранным потенциалом и критическим уровнем деполяризации с возникновением потенциала действия. Соответственно возникновение возбуждения требует более высокой силы раздражителя (**1 балл**).

4А Таким раздражителем могут быть например ацетилхолин и адреналин. Подведение первого вызовет ритмические сокращения образца гладкомышечных тканей, тогда как раствор адреналина вызовет спастическое сокращение образца из скелетной мускулатуры (**1 балл**).

4Б В данном случае таким признаком может служить наличие автоматии, которая характерна более всего для гладкомышечных тканей ЖКТ (**1 балл**).

5А Повышение температуры крови приводит к снижению сродства гемоглобина к кислороду, что приводит к увеличению диссоциации оксигемоглобина и облегчению газообмена в тканях. В то же время частота дыхания увеличивается в связи со снижением эффективности оксигенации крови в легких. Кривая диссоциации сдвигается вправо (**1 балл**).

5Б В данному случае пациенту очевидно потребовалась гипербарическая оксигенация крови. Эта процедура может помочь при снижении способности гемоглобина переносить кислород, т.к. позволяет насытить кислородом сыворотку крови и таким образом обеспечить его доставку к тканям. Учитывая, что пациент доставлен с пожара, - вероятнее всего у него произошло отравление продуктами горения (угарным газом) (**1 балл**).

6А В среднем 95% азота, выделяющегося при после распада белка, выделяется в виде мочевины. Формула мочевины $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, $MW = 60.06$, MW атомарного азота (в данном случае именно он будет лимитирующим фактором) = 14.0067, соответственно в 60.06 г (1 Моль) мочевины - 28.0134 г. азота, а в 20 г. мочевины - 9.328 г. азота. Учитывая, что в белке содержится в среднем 16% азота, 9.328 г. азота содержится в $100 * 9.328 / 16 = 58.3$ г. белка. Но нужно учесть, что 5% азота, полученного от распада белка, выделяется иными путями. То есть при распаде 58.3 г белка на самом деле с мочевиной выделится $0.95 * 9.328 = 8.8616$ г азота, а для 9.328 г. азота потребуется 61.37 г. белка (61.4 г.) (**1 балл**).





6Б Коэффициент изнашивания - количество белка, распадающегося в организме в норме в состоянии покоя, выраженное через экскрецию эндогенного азота, образовавшегося независимо от поступления с пищей. Таким образом, в человеческом организме с массой 80 кг. будет ежедневно распадаться столько белка, что экскреция азота составит 2.24 - 6 г. Для восполнения этой потери, минимальное потребление белка составит от $2.24 * 6.25 = 14$ до $6 * 6.25 = 38$ г (**1 балл**).

7А Миорелаксанты - препараты, нарушающие прохождение нервного импульса через нервно-мышечные синапсы к мышцам и, таким образом, провоцирующие расслабление мускулатуры, обездвиживание и, как следствие, сократительного термогенеза. Соответственно баланс смещается в сторону преобладания теплоотдачи (**1 балл**).

7Б Адренолитики снижают симпатические влияния, в том числе, на кровеносные сосуды снижая количество нейромедиаторов в области окончаний постганглионарных адренергических волокон и, таким образом, провоцируют расширение периферических сосудов, что, опять-таки, приводит к повышению теплоотдачи (**1 балл**).

8А Фильтрационное давление напрямую зависит от гидростатического давления в капиллярах, а также от противодействующих онкотического давления и давления в капсуле Боумена-Шумлянского. Нормальное онкотическое давление составляет 20 - 28 мм. рт. ст. Таким образом фильтрационное давление в данном случае составит от $55 - (28 + 12) = 15$ мм. рт. ст. до $55 - (20 + 12) = 23$ мм. рт. ст. Эти значения в пределах нормы (**1 балл**).

8Б Таким фактором является артериальное давление, от которого зависит гидростатическое давление в капиллярах. Последнее остается неизменным при общем системном давлении в пределах 70 - 180 мм. рт. ст. Считается, что падение артериального давления ниже 50 мм. рт. ст. приводит к полной остановке фильтрации (**1 балл**).

9А Одна из функций пищеварительной системы - гемопоэтическая. Ткани кишечника служат депо железа, всасывание железа происходит в 12-перстной





кишке, начальной области тощей кишки, в области подвздошной кишки происходит всасывание витамина В12. При целиакии повреждение ворсинчатого слоя может приводить к нарушению всасывания железа и витамина В12. Последний необходим в процессе созревания и деления ядер эритроидных клеток в кроветворных тканях. При недостатке В12 в костном мозге происходит замедление образования эритроцитов, при этом образуются крупные эритроциты - мегалоциты с резко укороченным сроком жизни. Замедленное поступление в кровяное русло эритроцитов и быстрое их разрушение ведет к анемии. В данном случае анемия (чаще всего) железodefицитная, либо В12-дефицитная (**1 балл**).

9Б Другим отделом может стать желудок, т.к. "внутренний фактор" (фактор Касла), участвующий в усваивании витамина В12, синтезируется париетальными клетками желудка (**1 балл**).

10А При стрессовых реакциях эндокринная регуляция выражается в выделении мозговым веществом надпочечников катехоламинов (адреналин), корковым веществом надпочечников - глюкокортикоидов(кортизол) (**1 балл**).

10Б Для острого стресса более характерна активизация выделения катехоламинов, а для хронического - глюкокортикоидов. Выброс первых способствует улучшению кровоснабжения всех органов и тканей, и в первую очередь - мозга, сердца, мышц, улучшению иммунитета и подавлению воспалительных реакций и пр. При этом катехоламины после высвобождения из клеток быстро распадаются на физиологически нейтральные соединения. Длительное же воздействие глюкокортикоидов чревато серьезными проблемами со здоровьем: метаболические нарушения - обмен липидов и ожирение, повышение толерантности к инсулину и, как следствие, повышение глюкозы в крови и повышение вероятности сахарного диабета (II типа). Постоянно высокие уровни кортизола негативно влияют на клетки иммунной системы - снижение иммунитета, повышается риск таких заболеваний как атеросклероз и ишемическая болезнь сердца и пр. (**1 балл**).

