

Документ подписан простой электронной подписью
Информация о владельце:
ФИО: Таскаев Сергей Валерьевич
Должность: Ректор
Дата подписания: 12.09.2025 08:55:52
Уникальный программный ключ:
04c19ed8bf98f3b6cb77a486b9a8788b8322323

 <p>МИНОБРАЗОВАНИЯ РОССИИ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ЧелГУ»)</p>	Фонд оценочных средств по дисциплине «Проблемные лекции по генетике» по направлению подготовки 06.04.01 «Биология» ФГБОУ ВО «ЧелГУ»	стр. 1
--	--	--------

**Фонд оценочных средств
для промежуточной аттестации
по дисциплине (модулю)**

Проблемные лекции по генетике

Направление подготовки (специальность)
06.04.01 Биология

Направленность (профиль)
Генетика

Присваиваемая квалификация
Магистр

Форма обучения
очная

Год (ы) набора: 2025

Челябинск, 2025 г.

1. ПАСПОРТ ФОНДА ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ

Направление подготовки: **06.04.01 Биология**

Направленность (профили): Генетика

Дисциплина: **Проблемные лекции по генетике**

Семестры изучения: 2

Форма промежуточной аттестации: экзамен

2. ПЕРЕЧЕНЬ ФОРМИРУЕМЫХ КОМПЕТЕНЦИЙ

2.1. Компетенции, закреплённые за дисциплиной

Изучение дисциплины «Проблемные лекции по генетике» направлено на формирование следующих компетенций:

Коды компетенции (по ФГОС)	Содержание компетенций согласно ФГОС	Коды и содержание индикаторов	Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине
1	2	3	4
УК-1	Способен осуществлять критический анализ проблемных ситуаций на основе системного подхода, выработать стратегию действий	УК-1.1. Выполняет поиск информации, определяет критерии системного анализа поставленных задач	Знать: Для достижения индикатора УК 1.1: основные направления развития и нерешённые проблемы современной генетики Для достижения индикатора УК 1.2: основные методы анализа генетических данных, используемых при формировании основополагающих концепций современного естествознания
		УК-1.2. Использует критический анализ, систематизацию и обобщение информации для решения проблемной ситуации	Уметь: Для достижения индикатора УК 1.1: обосновывать и аргументировано отстаивать основные положения современной генетики Для достижения индикатора УК 1.2: получать необходимую информацию из современных источников информации для решения конкретной проблемы в

		УК-1.2 Использует критический анализ, систематизацию и обобщение информации для решения проблемной ситуации	области генетики Владеть: Для достижения индикатора УК 1.1: методами ведения дискуссии по спорным вопросам современной генетики Для достижения индикатора УК 1.2: навыками обобщения комплекса генетических и общебиологических данных, полученных из различных источников
ПК-2	Способен использовать в научной и производственно-технологической деятельности знания фундаментальных и прикладных разделов генетических дисциплин	<p>ПК-2.1 Имеет представление об основных методах генетики и молекулярной биологии</p> <p>ПК-2.2 Рассматривает принципы устройства и работы современных лабораторий</p> <p>ПК-2.3 Анализирует основные методы исследования, применяемые в современной генетике</p> <p>ПК-2.4 Использует принципы методов лабораторной диагностики</p> <p>ПК-2.5 Участвует в работе с лабораторным оборудованием (полуавтоматическим и автоматическим) и с биологическим материалом</p>	<p>Знать: Для достижения индикатора ПК 2.1: теоретические основы, возможности и ограничения современных методов молекулярной биологии Для достижения индикатора ПК 2.2: назначение, стандарты размещения и организационные особенности функционирования генетических лабораторий в РФ и за рубежом Для достижения индикатора ПК 2.3: перспективы развития основных методов исследования. перспективы разработки новых методов Для достижения индикатора ПК 2.4: молекулярно-биологические,</p>

			<p>цитогенетические, биохимические, иммуногенетические и иные методы современной генетики</p> <p>Для достижения индикатора УК 2.5: основные преимущества и ограничения полуавтоматического и автоматического оборудования, используемого в генетике.</p> <p>Уметь:</p> <p>Для достижения индикатора ПК 2.1: правильно интерпретировать данные молекулярно-генетических исследований</p> <p>Для достижения индикатора ПК 2.2: правильно оценивать результаты, полученные в различных лабораториях при использовании различных методологических подходах данных</p> <p>Для достижения индикатора ПК 2.3: сопоставлять и обобщать данные полученные при использовании различных методов генетического анализа</p> <p>Для достижения индикатора ПК 2.4: правильно подбирать методы генетического анализа для решения поставленных исследовательских и практических задач</p> <p>Для достижения индикатора УК 2.5: правильно интерпретировать и оценивать большие</p>
--	--	--	---

			<p>массивы первичных данных</p> <p>Владеть:</p> <p>Для достижения индикатора ПК 2.1: методами статистической обработки и генетической интерпретации результатов молекулярно-биологических исследований</p> <p>Для достижения индикатора ПК 2.2: современными методами калибровки показателей и интерпретации лабораторных данных в зависимости от технических возможностей оборудования и качества расходных материалов</p> <p>Для достижения индикатора ПК 2.3: методами самообразования в области генетики</p> <p>Для достижения индикатора ПК 2.4: простейшими навыками обслуживания основных видов лабораторного оборудования генетической лаборатории</p> <p>Для достижения индикатора УК 2.5: методами системного и математического анализа больших массивов данных, получаемых при работе автоматического оборудования</p>
--	--	--	--

3. СОДЕРЖАНИЕ ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ ПО ДИСЦИПЛИНЕ

3.1 Виды оценочных средств

№ п/п	Код компетенции/планируемые результаты обучения	Контролируемые темы/разделы	Наименование оценочного средства для текущего контроля	Наименование оценочного средства на промежуточной аттестации № задания
1	<p>УК-1</p> <p>Знать: Для достижения индикатора УК 1.1: основные направления развития и нерешённые проблемы современной генетики Для достижения индикатора УК 1.2: основные методы анализа генетических данных, используемых при формировании основополагающих концепций современного естествознания</p> <p>Уметь: Для достижения индикатора УК 1.1: обосновывать и аргументировано отстаивать основные положения современной генетики Для достижения индикатора УК 1.2: получать необходимую информацию и современных источников информации для решения конкретной проблемы области генетики</p> <p>Владеть: Для достижения индикатора УК 1.1: методами ведения дискуссии по спорным вопросам современной генетики Для достижения индикатора УК 1.2: навыками обобщения комплекса генетических и общебиологических данных полученных из различных источников</p>	<p>Раздел 1. История развития эпигенетики</p> <p>Раздел 2. Механизмы эпигенетической регуляции</p> <p>Раздел 3. Комплексы Policomб Triuthorax</p> <p>Раздел 4. РНК-интерференция</p> <p>Раздел 5. Геномный импринтинг</p> <p>Раздел 6. Модельные объекты эпигенетики</p>	<p>Устный опрос, реферат, контрольная работа</p>	<p>Вопросы к экзамену № 1-26</p>

<p>2</p>	<p>ПК-2 Знать: Для достижения индикатор ПК 2.1: теоретически основы, возможности и ограничения современных методов молекулярной биологии Для достижения индикатора ПК 2.2: назначение, стандарты размещения и организационные особенности функционирования генетических лабораторий в РФ и за рубежом Для достижения индикатора ПК 2.3: перспективы развития основных методов исследования. перспективы разработки новых методов Для достижения индикатора ПК 2.4: молекулярно-биологические, цитогенетические, биохимические, иммуногенетические и иные методы современной генетики Для достижения индикатора ПК 2.5: основные преимущества и ограничения полуавтоматического и автоматического оборудования используемого в генетике. Уметь: Для достижения индикатора ПК 2.1: правильно интерпретировать данные молекулярно-генетических исследований Для достижения индикатор ПК 2.2: правильно оценивать результаты, полученные в различных лабораториях при использовании различных методологических подходов к данным Для достижения индикатор ПК 2.3: сопоставлять и обобщать данные,</p>	<p>Раздел 1. История развития эпигенетики Раздел 2. Механизмы эпигенетической регуляции Раздел 3. Комплексы Polcomb Triuthorax Раздел 4. РНК-интерференция Раздел 5. Геномный импринтинг Раздел 6. Модельные объекты эпигенетики</p>	<p>Устный опрос, реферат, контрольная работа</p>	<p>Вопросы к экзамену № 1-26</p>
----------	--	--	--	----------------------------------

<p>полученные при использовании различных методов генетического анализа</p> <p>Для достижения индикатор ПК 2.4: правильно подбирает методы генетического анализа для решения поставленных исследовательских и практических задач</p> <p>Для достижения индикатор УК 2.5: правильно интерпретировать и оценивать большие массивы первичных данных</p> <p>Владеть:</p> <p>Для достижения индикатора ПК 2.1: методами статистической обработки и генетической интерпретации результатов молекулярно-биологических исследований</p> <p>Для достижения индикатора ПК 2.2: современными методами калибровки показателей и интерпретации лабораторных данных в зависимости от технических возможностей оборудования и качества расходных материалов</p> <p>Для достижения индикатор ПК 2.3: методами самообразования в области генетики</p> <p>Для достижения индикатор ПК 2.4: простейшими навыками обслуживания основных видов лабораторного оборудования генетической лаборатории</p> <p>Для достижения индикатора УК 2.5: методами системного и математического анализа больших массивов данных, получаемых при работе автоматического оборудования</p>			
---	--	--	--

Примечание: типовые задания, критерии и показатели оценивания в рамках текущего

контроля представлены в рабочей программе дисциплины (модуля). Полные комплекты оценочных средств и контрольно-измерительных материалов хранятся на кафедре.

3.2 Содержание оценочных средств

Оценочные средства промежуточной аттестации представлены перечнем вопросов для экзамена.

Теоретические вопросы к экзамену по дисциплине "Проблемные лекции по генетике".

1. Понятие о мобильных генетических элементах. Классификация.

Мобильные генетические элементы — участки ДНК, способные к транспозиции внутри одной клетки как внутри одного генома, так и между геномами.

Известно, что МГЭ распространены повсеместно и составляют существенную часть геномной ДНК многих изученных организмов. Например, геном кукурузы наполовину состоит из транспозонов, в геноме человека общий уровень МГЭ 30%. Открытие структуры и функций МГЭ у Дрозофилы и других организмов позволили понять их роль и значение в геноме и эволюции. Транспозиционная активность МГЭ считается основной причиной спонтанного мутагенеза.

МГЭ имеют определенную структурную организацию, благодаря которой они могут перемещаться в геноме как в пределах одной хромосомы, так и между хромосомами. МГЭ имеют способность увеличивать число копий в геноме хозяина, вызывать мутации встраиваясь в гены или окрестности генов, а следовательно служить материалом для хромосомных перестроек влиять на фертильность организма или приводить даже к гибели. МГЭ участвуют в реакциях на стрессовые воздействия.

Класс	МГЭ
I ДНК-транспозоны	IS H-holo- Tc-1 mariner- Helitron- MITEs-
II Автономные ретротранспозоны	
1) ретротранспозоны с LTR, включая ретровирусы	gypsy copia Ty3 Ty5 HIV MLV MDG1 MDG2
2) ретротранспозоны без LTR, ретропозоны	I jokey L1(Line) Alu (siNE) SiNES R1 R2 he-TA

	TART TRAS1 SART1 IAP
3)	PLES
III Пассивные элементы типа фолтбэк (fold-back)	FB TU

К классу I ДНК транспозоны или классические транспозоны относятся МГЭ, кодирующие транспозазу. Транспозаза - это фермент, который способен узнавать концы своего элемента и по этим концам вырезать его из хромосомы или встраивать в хромосомы генома хозяина. Такой механизм перемещения МГЭ получил название ДНК-ДНК-перемещение. ДНК транспозоны впервые были открыты у бактерий и к настоящему времени обнаружены практически во всех геномах. Транспозоны имеют небольшие размеры, ограниченные с двух сторон ограниченными короткими инвертированными повторами ITR. Таким образом, ITR фланкируют открытую рамку считывания определяющие синтез транспозазы, которая необходима для перемещения элемента. ITR сближаются, узнаются транспозазой и точно отрезаются от соседних участках ДНК хозяина.

Первичная структура этих инвертированных повторов у разных семейств ДНК транспозонов различна.

К 2 классу ретротранспозоны относят элементы, которые в процессе своего перемещения сначала синтезируют цепь РНК, с которой затем с помощью фермента обратной транскриптазы, синтезируется комплиментарная цепь ДНК. После удвоения двуцепочечная ДНК способна встраиваться в различные хромосомы хозяина и такой способ связывания получил названия ДНК-РНК-ДНК механизм.

1 подкласс (ретротранспозоны с LTR, включая ретровирусы) входят ретровирусы сходные по строению с LTR ретротранспозонов. Центральные районы элементы этого подкласса с обоих концов фланкированы длинными терминальными повторами.

Для каждого семейства характерны свои терминальные повторы. Они отличаются длиной, которая варьирует в пределах 250-500 пар оснований и нуклеотидной последовательностью, которая обычно консервативна. Основной чертой этих элементов является активная транскрипция РНК. Ретротранспозоны и ретровирусы содержат гены gag и pol, которые кодируют антигены групповой специфичности, обратную транскриптазу, рибонуклеазу и интегразу для обеспечения обратной транскрипции к-ДНК с РНК.

Различия между семействами ретротранспозонами и ретровирусов связано с геном env, который кодирует белок оболочки вирусов, давая возможность вирусам перемещаться между клетками. У ретротранспозонов с LTR имеются только остатки этого гена, что обуславливает их внедрение только в тот геном, из которого они были вырезаны. И LTR-ретротранспозоны распространены в геномах практически всех эукариот.

2 подкласс Ретропозоны. Наиболее распространенные L1 (Line) длинные стройные ядерные элементы, Alu (siNE) и др SiNES это короткие элементы. Известно около 20 семейств элементов группы Line (I, jokey). Длина полноразмерных ретропозонов составляет 3,5-8 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.). Они обладают 2-мя рамками считывания, которые кодируют ферменты, необходимые для их перемещения. Основными продуктами этих рамок считывания являются эндонуклеаза и обратная транскриптаза. У ретропозонов в отличии от LTR ретротранспозонов процесс обратной транскрипции происходит на ядерной ДНК, с использованием сайтов-мишеней в качестве праймеров. Большинство ретропозонов не являются сайт-специфичными и могут мигрировать очень большое число сайтов. У млекопитающих большой кусок

Line1 содержится на X-хромосоме.

Ретроэлементы siNE включают короткие 300 пар нуклеотидов рассеянных по геному последовательностей. Найдены в геноме человека, грызунов, рыб, лягушек, насекомых и растений. Для этого семейства характерно присутствие центрального района, повторяющего 3' нетранслируемый участок элементов Line. Предполагается, что Line могут влиять на подвижность SINE элементов.

3 подкласс PLES. Необычный класс ретротранспозонов, которому присущи характеристики всех ретротранспозонов. Этот подкласс был впервые обнаружен в геноме дрозофилы *Virilis* как элемента играющий роль в процессе гибридного дисгенеза. Сейчас обнаружены в геноме многих эукариот. Как и у ретротранспозонов, у них есть наличие усеченного 5' конца и варьирующих по длине дубликаций сайтов мишеней. Также имеются LTR либо в прямой, либо в ориентированной ориентации. Важной особенностью этого подкласса является то, что есть классический интрон в гене, кодирующую обратную транскриптазу.

4 класс пассивные элементы типа fold-back. Размеры варьируют от несколько сотен до несколько тысяч пар оснований. Длинные инвентированные повторы, расположенные на концах FB транспозонов имеют сложную внутреннюю организацию, состоящую из более мелких повторов, которые представляют собой тандемные копии простых последовательностей разделенных длинными участками различающихся последовательностями. Например, было показано, что некоторые нестабильные мутации у дрозофилы были вызваны инсерциями FB элементов и механизм перемещения FB элементов до сих пор неизвестен.

2. Структура МГЭ.

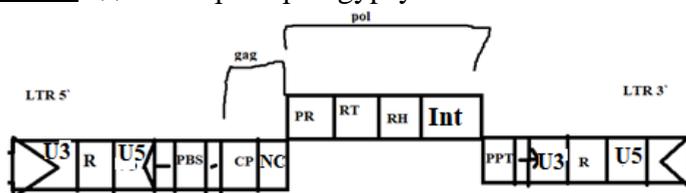
МГЭ оказывают влияние на активность ближайших генов (повысить/понижать активность).

Было выяснено, что в их структуре есть большое количество регуляторных сайтов и сигнальных последовательностей, что означает, что МГЭ может влиять на работу гена, не разрушая его.

Несмотря на то, что многие геномы содержат большое число активных элементов, они остаются довольно стабильными. Возможно, из-за того, что в организмах с высоко активными МГЭ, например, у человека или у мыши, все-таки 10% генома содержат белок-кодирующие и регуляторные последовательности. У кукурузы на кодирующие и регуляторные последовательности приходится 1-3% и возможно именно поэтому он не стабилен.

На примере *hobo* и *NDG2*.

NDG2 один из примеров *gypsy*.

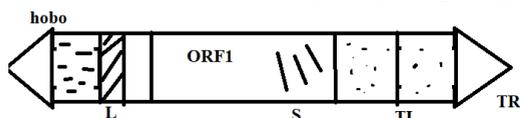


- **LTR 3' 5'** это прямые длинные концевые повторы, содержащие 3 функциональных домена: U3, R, U5.
- **PBS** тРНК-праймер связывающий сайт
- **Gag** первая рамка считывания имеющая гомологию с gag ретровирусов, которая кодирует белковые компоненты нуклеопротеиновой сердцевины вириона.
- **CP** белок супер капсида
- **NC** белок ядерного капсида

- **POL** это вторая открытая рамка считывания, напоминающая вирусный ген pol, который кодирует все белки, необходимые для транскрипции
- **PR** протеаза.
- **PT** это ревертаза.
- **PH** это РНК-аза.
- **Int** интегразы.
- **PPT** обогащенная пуриновая последовательность.

hobo элементы

Hobo это наиболее широко распространенная группа у *Drosophila melanogaster*.



- **ORF** открытая рамка считывания.
- **TL** и **TR** левые и правые инвертированные повторы
- **TI**- усеченная копия концевого повтора
- **S** это 15 копий короткого повтора
- **L** это 2 копии длинного повтора.

3. Функционирование МГЭ в геноме. Транспозиция. Ретротранспозиция.

Мобильные элементы постоянно внедряются в новые геномные сайты и мутации, вызванные инсерциями выявляются с частотами сравнимыми с образованием точковых мутаций (за исключением дрозофилы, кукурузы и пшеницы).

Клетки-хозяина контролируют мобильность ГЭ. Известно 2 таких механизма контроля.

1. По супрессии. С помощью малых интерферирующих РНК.
2. Метилирования.

При ко-супрессии подавляется экспрессия вновь построенных трансгенов и их эндогенных гомологов.

У беспозвоночных животных повторяющихся последовательностей ДНК, включающая многочисленные копии LTR-ретротранспозонов в основном не метилированы. А транскрипционно активные гены метилированы. У мышей LTR-ретротранспозоны при инсерциях в гены часто оказываются причиной заболевания. Существует прямая корреляция между деметилированием этих генов у мышей и повышением их при стрессе.

Известно, что транспозоны у млекопитающих гипометилированы в зародышевых клетках и на самых ранних стадиях развития, тогда они способны к транспозиции. И гиперметилированы в соматических клетках, где не происходит их экспрессии и мобилизации.

4. МГЭ в геноме *Drosophila melanogaster*.

Мобильные генетические элементы были открыты МакКлинток в конце 40-ых годов в зернах кукурузы. Известно, что МГЭ распространены повсеместно и составляют существенную часть геномной ДНК многих изученных организмов. Например, геном кукурузы наполовину состоит из транспозонов, в геноме человека общий уровень МГЭ 30%. Открытие структуры и функций МГЭ у Дрозофилы и других организмов позволили понять их роль и значение в геноме и эволюции.

В открытии мобильных элементов дрозофилы было пять главных действующих лиц, работавших в 1976 г. в двух институтах. В Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта АН СССР: заведующий лабораторией Георгий Павлович Георгиев, его сотрудник Юрий Викторович Ильин и их аспирант Николай Андреевич Чуриков. В Институте атомной энергии им. И.В. Курчатова – Владимир Алексеевич Гвоздев,

заведующий лабораторией в радиобиологическом отделе, и его недавно защитившийся сотрудник Евгений Витальевич Ананьев.

Георгиев был одним из первых в Советском Союзе, кто узнал о методе клонирования ДНК и развернул активную деятельность по клонированию генов мыши и дрозофилы в своей лаборатории.

Дрозофила была особенно привлекательным объектом для Георгиева по двум причинам. Во-первых, гигантские – многократно реплицировавшиеся молекулы ДНК – политенные хромосомы слюнных желез давали возможность видеть линейно организованное расположение генов на хромосоме под микроскопом (чередование дисков и междисков – специфически организованных последовательностей ДНК), во-вторых, уникальная культура клеток, полученная в Институте атомной энергии в лаборатории В.А. Гвоздева, была идеальным источником для выделения ДНК.

В январе 1976 г. у Коли получилось удачное клонирование. Он получил 286 клонов в фаге λ , выделил все ДНК и отобрал несколько клонов, которые пометил тритием для гибридизации на политенных хромосомах. К тому моменту Георгиев договорился с Гвоздевым, чтобы его сотрудники определили местоположение фрагмента на политенных хромосомах с помощью *in situ* гибридизации.

Один такой фрагмент, Dm225 (от лат. *Drosophila melanogaster*), имеет около 40 мест гибридизации. Этот кусочек ДНК гибридизуется примерно с 40 участками на политенных хромосомах. При сравнении одной и той же хромосомы, например, X-хромосомы из разных ядер, можно было видеть, что набор гибридизующихся участков и их местоположение в хромосоме были сходны.

Одно ядро, однако, привлекло внимание Евгения Витальевича. В этом ядре отцовская и материнская хромосомы, составляющие пару гомологичных хромосом, не были тесно сконъюгированы, как обычно наблюдается в большинстве ядер, а несколько разошлись друг от друга. Распределение гибридизующихся участков (так называемых сайтов гибридизации) на этих гомологичных хромосомах оказалось полностью различным. Согласно классической генетике, гомологичные хромосомы содержат идентичный набор генов, расположенных в строго определенном порядке. А в данном случае ген (в то время мы еще не знали настоящую природу этого кусочка ДНК) находился в разных местах гомологичных хромосом, т. е. был способен “перемещаться” по хромосоме.

Для проведения эксперимента использовал особо крупные личинки дрозофилы, которые получал путем скрещивания двух родительских линий этой мушки. Каждая из родительских линий несла мутацию *gt* (от английского giant – гигант), приводящую к увеличению размера личинки и, соответственно, увеличению размеров политенных хромосом. Поэтому асимметричное распределение сайтов гибридизации могло быть связано с изначально существующими различиями в хромосомах родителей. Имелась закономерность: в одной гомологичной хромосоме было 5 сайтов, а в другой – ни одного. Это было первое указание на то, что картина гибридизации на гомологичных хромосомах воспроизводится. Как только заметил, что последовательность генов не совпадает, значит это “прыгающие” гены.

То, что эти элементы представлены многими копиями и “рассыпаны” по геному, вполне укладывалось в гипотезу Георгиева, который полагал, что разные гены могут иметь одинаковые регуляторные элементы. Однако то обстоятельство, что эти элементы могли “прыгать”, лишало их регуляторной функции. Согласно оценкам Коли Чурикова, число копий этих генов (или элементов) должно было быть в 10 раз больше, чем сайтов гибридизации. В.А. Гвоздев предположил, что эти гены образуют группы или локальные кластеры, которые соответствуют особым районам хромосом дрозофилы, так называемым районам интеркалярного гетеро-хроматина. Эти районы имеют ряд особенно-стей, в том числе некоторые из них перестают реплицироваться в процессе формирования политенных хромосом. Владимир Алексеевич предположил, что

наблюдаемое различие между гомологичными хромосомами связано как раз с недорепликацией ДНК в этих районах.

Цитогенетическая карта политенных хромосом дрозофилы в то время имела два вида: рисованная и очень подробная карта Бриджеса 1936 г. и фотографическая карта Лефевра 1976 г. Хромосомы на этих картах были представлены лентами с поперечными полосами.

Существовали существенные различия между родительскими линиями. Две линии дрозофилы, с которыми он работал, имели всего 1 или 2 общих сайта гибридизации. Все остальные сайты, чуть больше 20 в каждой линии, оказались в неродственных участках хромосом. Второе – разные клетки одного и того же организма имели одно и то же расположение сайтов гибридизации. Третье – действительно, часть сайтов гибридизации совпадала с районами интеркалярного гетерохроматина.

В январе 1976 г. Опубликовалась статья «Выделение эукариотических фрагментов ДНК со структурными генами и прилежащими фрагментами». Главная идея статьи была в том, что клонированные фрагменты ДНК дрозофилы подтверждают гипотезу Георгиева о структуре гена. Это было прямо сформулировано в реферате статьи: «структурные гены дрозофилы находятся рядом с умеренно повторяющимися последовательностями». В статье описывались методические приемы для выделения структурных генов из дрозофилы и мыши, которые в дальнейшем не нашли применения, так как были разработаны более эффективные методы. Но самый главный результат – варьирующая локализация фрагментов на политенных хромосомах – был описан очень кратко. И тут возникла новая идея о том, что некоторые фрагменты имеют отношение к «интеркалярному гетерохроматину» и поэтому проявляют индивидуальные различия между линиями дрозофилы. В обсуждении результатов Георгиев написал единственную фразу относительно возможной мобильности новых элементов: «Нестабильная локализация повторяющейся последовательности на политенных хромосомах может быть связана с феноменом миграции генов, который был показан на кукурузе и дрозофиле».

В декабре 1978 года вышла статья В.А. Гвоздева «Повторяющиеся гены с варьирующей локализацией в районах интеркалярного гетерохроматина на политенных хромосомах *Drosophila melanogaster*». Статья содержала подробнейшее описание результатов гибридизации двух фрагментов ДНК – Dm225 и Dm234B, с таблицей всех сайтов гибридизации на двух родительских линиях, схемой распределения их на хромосомах и великолепными цитологическими картинками политенных хромосом.

В 1979 г., Рубин с соавторами опубликовали две статьи в журнале «Cell», в которых они показали, что в культуре клеток число копий элементов многократно увеличено, и они перемещаются по геному (Potter *et al.*, 1979). Чтобы понять, что же происходит на уровне организма, авторы провели *in situ* гибридизацию с политенными хромосомами 4 линий дрозофилы, полученными из отдаленных географических мест (Strobel *et al.*, 1979). На четырех линиях Рубин с соавторами увидели то же, что и Евгений на двух – межлинейную вариацию. Основываясь на полученных результатах, Рубин смело назвал свои элементы «мобильными».

Мистические контролирующие элементы, описанные у кукурузы Б. Мак-Клинтон в 1950-х гг., тоже были клонированы и перестали быть генетической абстракцией.

В 1993 г. была вручена Нобелевская премия Ричарду Робертсу и Филиппу Шарпу за открытие «расщепленных генов», которое было сделано ими в 1977 г. Они разрешили парадокс избыточной ядерной РНК, который так волновал Георгия Павловича в 1970-х гг. Структура гена у животных не соответствовала его модели. Оказалось, все наоборот. К относительно небольшой регуляторной зоне прилегает гигантская структурная часть, которая расщеплена на кодирующие (экзоны) и не кодирующие (интроны) сегменты. Из гигантской ядерной РНК не кодирующие сегменты вырезаются, образуя маленькую цитоплазматическую РНК, которая на рибосомах направляет синтез белка.

Симпозиум 1979 г. в Колд Спринг Харборе уже назывался «Мобильные генетические элементы». На этом симпозиуме из лабораторий Гвоздева и Георгиева были представлены 4 доклада. Георгиев сделал программный доклад, в котором наконец-то назвал открытые новые элементы МДГ – мобильные диспергированные гены (Georgiev *et al.*, 1981). Но в литературе прижились другие, менее формальные наименования, такие, как *copia* и *gypsy* («цыган», первоначально описанный как МДГ4).

5. Инсерционный мутагенез.

Процесс ретротранспозиции начинается с транскрипции полной последовательности Line-1 под контролем его внутреннего промотора, затем мРНК Line-1 транспортируется в цитоплазму где с нее транслируются белки ORF1p, ORF2p они вновь связываются с кодирующей их мРНК Line-1и формирование рибонуклеопротеиновых комплексов. Они обратно мигрируют в ядро вне зависимости от фазы клеточного цикла.

В ядре за счет своей эндонуклеазной активности наносятся одностранные разрывы. Освобождается 3'-ОН остаток, который используется для затравки обратной транскриптазы Line-1. Само формирование инсерции происходит пока по непонятным механизмом, но известно, что количественно встраивание Line-1 сопровождается делециями, а новые инсерции Line-1 содержат внутренние перестройки инверсии и делеции.

В результате встраивания Line-1могут возникать различные геномные нарушения, например транслокации. В 10-20 % случаях ретротранспозиция Line-1 сопровождается 3' трансдукцией, при которой транскрипция донорского элемента пропускает канонический сигнал полиаденилирования Line-1 и использует его дальше по цепи, приводя к ретротранспозиции дополнительной геномной последовательности в новый сайт. Встраивание Line-1 в экзоны это непосредственный инсерционный мутагенез. А если встраивание происходит в интронах, то это может приводить к неправильному сплайсингу или преждевременному полиаденилированию последовательности.

Инсерции в интронах могут влиять на РНК полимеразы генов и это может приводить к нарушению экспрессии в этих генов. Как подтверждение имеются около 65 ассоциированных заболеваний с мутациями вследствие ретротранспозиции с участием Line-1

6. МГЭ в геноме растений. Связь с эволюцией.

Мобильные элементы (МЭ) генома подразделяют на два класса: элементы класса I (ретротранспозоны), которые перемещаются с помощью механизма «копирования-встраивания» с использованием РНК-интермедиатов, и элементы класса II (ДНК-транспозоны), которые используют механизм «вырезания-встраивания», с образованием либо одно-, либо двухцепочечных разрывов ДНК.

Мобильные элементы класса I образуют несколько порядков: LTR-ретротранспозоны, которые имеют длинные концевые терминальные повторы (Long Terminal Repeats) на концах элемента, *DIRS*-элементы, *Penelope*, *LINE*- и *SINE*-элементы, а также неавтономные варианты LTR-ретротранспозонов *TRIM*- (Terminal-Repeat Retrotransposons In Miniature) и *LARD*-элементы (Large Retrotransposon Derivatives). LTR-ретротранспозоны растений разделяют на два основных надсемейства, *copia* и *gypsy*, у которых отличается порядок относительного расположения доменов, кодирующих интегразу и обратную транскриптазу в гене полипротеина.

Мобильные элементы класса II в геноме растений представлены двумя подклассами: первый объединяет элементы, которые перемещаются с помощью классического механизма «вырезания-встраивания» с образованием двухцепочечного разрыва ДНК, а второй подкласс использует для перемещения механизм «катящегося кольца».

Подкласс 1 представлен порядком TIR (Ter-minal Inverted Repeats), характерной особенностью которого является наличие концевых инвертированных повторов – TIR – на обоих концах элемента. Транспозиция элементов первого подкласса происходит с помощью фермента транспозазы. У растений порядок TIR представлен надсемействами *Tc-Mariner*, *hAT*, *Mutator (MULU)*, *P*, *PIF-Harbinger* и *CASTA*. Наиболее подробно изученные *hAT*-семейства – *Ac-Ds*-элементы кукурузы и *Tam3* львиного зева. *CASTA*-элементы имеют характерную структурную черту: на внешних концах TIR присутствует консервативный мотив *CASTA*. Наиболее хорошо изученным является *CASTA*-транспозон семейства *Spm (Suppressor-Mutator)* кукурузы. Кроме того, к подклассу 1 принадлежит многочисленная и гетерогенная группа неавтономных элементов *MITE (Miniature Inverted-Repeat Transposable Element)*. Эти элементы имеют размер от нескольких десятков до нескольких сотен п.н. Основываясь на нуклеотидной последовательности TIR, *MITE* разделяют на два больших надсемейства: *Stowaway*-подобные и *Tourist*-подобные элементы. В геномах растений эти элементы часто расположены рядом с генами.

Подкласс 2 в геномах растений представлен элементами порядка *Helitron*, которые хорошо описаны в геноме кукурузы.

Значительная часть МЭ представлена в виде неавтономных вариантов, у которых либо полностью, либо частично отсутствуют кодирующие последовательности. Неавтономные элементы не способны к самостоятельной транспозиции, однако их перемещение может происходить за счет трансактивации автономными элементами соответствующего семейства генома.

Некоторые группы ДНК-транспозонов остаются неклассифицированными, поскольку для них известны последовательности только неавтономных вариантов. Такую группу МЭ, малоизученную относительно других надсемейств ДНК-транспозонов, представляют *Foldback*-элементы, которые несут свое название от *Foldback (FB)*-элемента *Drosophila melanogaster*. Эти элементы представлены в широком ряду организмов, в том числе и растений – у риса *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, ржи *Secale cereale*, пасленовых *Solanaceae*.

В геномах растений представлены все классы МЭ, присутствующие в геномах эукариот, однако преобладающими в численном и процентном соотношении являются LTR-ретротранспозоны и *MITE*-элементы.

7. Ретротранспозон Line 1. Строение, участие в онтогенезе млекопитающих.

Семейство ретротранспозонов L1 занимают около 20% генома человека. традиционно ретротранспозоны рассматривались в качестве бесполезных, а благодаря своей способности к рекомбинации и индукции инсерционного мутагенеза, в некоторых случаях и вредных паразитных элементов, способных вызывать наследственные заболевания у человека. Но в последние годы появились исследования, в которых рассматривается значительная роль L1 в транскрипционной регуляции эукариот. Также показано, непосредственное участие L1 в таких физиологических процессах как ранний эмбриогенез, развитие и дифференцировки. Также L1 участвуют в формировании обширных структурных вариаций генома в эволюции.

Участие L1 в этих глобальных процессах возможно благодаря уникальным и разнообразным функциям ретроэлементов.

- 1) На уровне ДНК последовательностей. Ретротранспозоны могут работать в качестве альтернативных сильных промоторов, участвовать в обеспечении моноаллельной экспрессии отдельных генов, и инактивации X-хромосомы у самок.
- 2) На уровне РНК транскриптов. Могут участвовать в активации эмбрионального генома, инактивации X-хромосомы и поддержания плюрипотентного состояния клеток.
- 3) Белки-ретротранспозонов могут способствовать смешению транскрипционных

профилей за счет работы обратной транскриптазы и поддерживать стабильность теломер.

Все эти процессы играют важную роль в индивидуальном развитии организма. Поскольку механизмы регуляции экспрессии L1 носит эпигенетический характер, они тесно связаны с волнами эпигенетического репрограммирования в половых клетках, при оплодотворении и в бластоцисте, и при установлении дифференцированного состояния зародышевого и экстраэмбриональных тканей.

Поэтому любые отклонения в этих процессах могут вызвать существенное нарушение нормальной экспрессии МЭ на каждом этапе развития или аберантные эпигенетические модификации L1, свидетельствуют об глобальных эпигенетических аномалий в геноме.

В секвенированных геномах человека, мыши и крысы обнаружено около 500 тыс. копий повторов L1. Однако подавляющие их число являются не активными из-за многочисленных структурных перестроек.

В составе L1 выявлены 5' и 3' нетранслируемые районы (5'UTR 3'UTR), 2 открытые рамки считывания (ORF1 ORF2) и полиадениновый хвост. В L1 была открыта еще одна рамка считывания ORF0. Она специфичная для приматов и находится в 5'UTR. Также она преимущественно локализуется вблизи ядерных фокусов белка PML – белок промиелоцитарного лейкоза и повышает мобильность Line 1.

Промоторные последовательности располагающиеся в 5'UTR отвечают за транскрипционную активность ретротранспозонов. Смысловая РНК Line 1 является матрицей для построения новой копией ДНК Line 1 и в то же время кодирует белки ORF1p и ORF2p. ORF1p белок способен формировать мультимерные комплексы, связывать однонитевую РНК и участвовать в процессе обмена нити во время обратной транскрипции элемента Line 1. Белок ORF2p обладает активностями эндонуклеазой и обратной транскриптазой.

Одним из основных механизмов регуляции Line 1 является метилирование ДНК. Промоторные регионы ретротранспозона содержат большое число SPG- сайтов, которые обычно характеризуются высоким уровнем метилирования. Повышенный уровень экспрессии МЭ сопровождается частичным деметилированием промоторов Line 1 в 5'UTR, метилированием *in vitro* цитозина, в SG нуклеотидах промоторных регионах Line 1 уменьшает их экспрессию более чем на 70%. Также в контроле экспрессии Line 1 участвуют малые некодирующие РНК (pi-РНК), микроРНК, и малые интерферирующие РНК. малые некодирующие РНК работают главным образом в гаметогенезе и сразу после оплодотворения, когда геном подвергается процессу глобального эпигенетического репрограммирования Line 1.

Роль ретротранспозона Line 1 в онтогенезе.

Половые клетки.

Экспрессия Line 1 и ее регуляция различно в мужских и женских половых клетках млекопитающих. В период эпигенетического репрограммирования генома в мужских первичных половых клетках, когда геном практически деметилирован, транскрипцию Line 1 контролируют pi-РНК, которые с одной стороны являются супрессорами транскрипционной активности, а с другой стороны детерминируют метилирование промоторов Line 1.

В оогенезе скорее всего pi-РНК не участвуют в контроле экспрессии, поскольку потеря piwi белков в оогенезе не приводит ни к каким последствиям. И скорее всего в оогенезе большую роль играет микроРНК и малые интерферирующие РНК.

Такая же ситуация в бластоцисте и в эмбриональных стволовых клетках, где возрастает уровень экспрессии различных типов малых РНК, в том числе некодирующих РНК из транскриптов Line 1.

Регуляция экспрессии Line 1 за счет метилирования ДНК тоже различно в мужских и женских половых клетках. Промотор Line 1 гиперметилирован в зрелых

сперматозоидах, в ооцитах 1-го порядка он гипометилирован на стадии диплотены, ооциты 2-го порядка на стадии овуляции имеют средний уровень метилирования.

О функциях Line 1 в половых клетках почти ничего не известно. Однако уровень его экспрессии должен поддерживаться на определенном уровне, т.к. повышение Line 1 ассоциировано с различными аномалиями в гаметогенезе.

Сверх экспрессия ORF1p приводит к аресту мейоза на стадии 1-го деления и сопровождается нарушением выстраивания хромосом на экваторе клетки и дефектами организации веретена деления (следовательно это приводит к отсеvu овоцитов с повышенной экспрессией ORF1p еще до рождения).

Процесс овогенеза.

Известно, что функционирование рi-РНК в сперматогенезе связано с освобождением от репрессии различных семейств транспозонов и ассоциировано со стерильностью. У мужчин с нарушением продукции сперматозоидов было обнаружено гиперметилирование генов, связанных с процессингом рi- РНК приводящее к снижению уровня метилирования Line 1.

Повышение экспрессии Line 1 напрямую связано с возникновением двунитевых разрывов ДНК.

Имеются убедительные данные о необходимости экспрессии Line 1 в половых клетках. В мышинных ооцитах белок ORF1p присутствует на ранних стадиях гаметогенеза как в цитоплазме, так и в ядре и подавление его синтеза приводит к аресту ооцитов на стадии граафого пузырька (после 1-го мейотического деления), а также подавления циклина B1 и ССД2, которые необходимы для запуска деления. В это же время недостаток белка ORF1p приводит к возникновению повреждений ДНК и нарушению конформации хроматина.

Вблизи акросом сперматозоидов было обнаружено наличие обратной транскриптазы, кодируемой Line 1, ORF2p. Ее присутствие в сперматозоидах указывает на необходимость осуществления обратной транскрипции либо в самом сперматозоиде, либо сразу же после оплодотворения. Снижение экспрессии ORF2p в сперматозоидах напрямую с фенотипическими проявлениями в половых клетках не обнаружено, но гиперметилирование Line 1 ассоциировано со сниженной подвижностью сперматозоидов и низкой качеством спермы.

Стадия развития	Возможные функции Line 1	Последствия повышения метилирования (снижение экспрессии)	Последствие снижения метилирования (повышения экспрессии)
оогенез	?	арест деления на стадии зародышевого пузырька, повреждение ДНК, нарушение конформации хроматина	арест мейоза, дефекты веретена деления
сперматогенез	?	сниженная подвижность сперматозоидов, низкое качество спермы	нарушение продукции сперматозоидов, стерильность
зигота и дробление	активация эмбрионального генома, образование гетерохроматина, ?поддержание стабильности теломер	арест деления, нарушение экспрессии генов	?

плацента	?Обеспечение функционирования плаценты	?спонтанная прерывание беременности	?возникновение мозаицизма
----------	--	-------------------------------------	---------------------------

Ранний эмбриогенез.

В эмбрионах мыши Line 1 активно экспрессируется на стадии первого деления дробления. Составляет 13% от общего пула кДНК в клетке. Увеличение ретротранскриптазной активности Line 1 в мышинной зиготе на стадии и на первого деления дробления сопровождается увеличением количества копий самого ретротранспозона (независимо от репликации ядерной ДНК).

Амплификация Line 1 наблюдается в обоих пронуклеусах сразу после оплодотворения, что показывает:

- 1) На наличие РНК в Line 1 как в ооцитах, так и в сперматозоидах
- 2) На необходимости активности обратной транскриптазы в зиготе

Высокая транскрипционная активность Line 1 на стадии дробления подтверждается быстрым снижением его метилированием при репрограммировании генома зародыша в геноме и на стадии дробления.

В ходе деметилирования отцовского генома в зиготе мыши наиболее активно снижается индекс метилирования именно Line 1 по сравнению с другими классами транспозонов, в дальнейшем в ходе первого деления зиготы индекс метилирования Line 1 продолжает снижаться в ходе пассивной потери метилирования ДНК, достигая минимума к стадии бластоцисты.

При глобальном деметилировании геномов в ходе репрограммирования экспрессия Line 1 регулируется за счет механизма РНК-интерференции с помощью коротких не кодирующих РНК Line 1. Потенциальная роль Line 1 в раннем эмбриогенезе млекопитающих может реализовываться на уровне последовательности ДНК, экспрессирующихся транскриптов а также синтезируемых на их основе белков.

Наиболее важным событием, происходящим на этапе дробления является активация эмбрионального генома. Предполагается, что ретроэлементы способны играть роль альтернативных сильных промоторов. Обеспечивающих стабильную экспрессию генов эмбрионального генома на начальной стадиях дроблениях бластомеров на фоне событий тотального репрограммирования.

Это подтверждается тем, что подавление активности одного их семейств Line 1 в зиготе бластоцистов приводит к нарушению первых делений, снижением или полным прекращением экспрессии некоторых генов необходимых для деления нормальной бластоцисты например гена p53.

Также Line 1 может способствовать обеспечению открытой конфигурации хроматина на ранних этапах развития эмбриона для протекания процессов эпигенетического репрограммирования и активации эмбрионального генома.

Роль Line 1 может быть связана с индукцией образования гетерохроматина. Примером является предположительное участие Line 1 в инактивации X-хромосомы у самок млекопитающих.

У мыши, крысы и человека X-хромосома содержит примерно в 2 раза больше копий Line 1 по сравнению с другими хромосомами. Интересно, что в большей степени на X-хромосоме представлены полные и эволюционно молодые элементы. Связь между Line 1 и его функцией подавлением транскрипции также следует из эволюционных соображений: эволюционный период в который происходило увеличение числа копий Line 1 на X-хромосоме совпадает с возникновением случайной инактивацией X-хромосомы у плацентарных млекопитающих.

Известное обогащение полных копий Line 1 вблизи генов со случайной моноаллельной экспрессией подтверждает идею о том, что не могут играть определенную роль в инактивации одной из копий гена или даже целых хромосом.

Имеется гипотеза, что Line 1 может участвовать в импринтинге, но

экспериментальных данных не получено.

Участие Line 1 в индукции образования гетерохроматина реализуется через РНК-зависимые механизмы. Например, Line 1 вместе с РНК Xist принимает участие в образовании гетерохроматиновых участков хромосомы X. Известно, что транскрипты Line 1 могут выступать в качестве субстратов для образования малых интерферирующих РНК, такой процесс наблюдается при дифференцировке зародышевых стволовых клеток, когда эволюционно молодые Line 1 транскрибируются в районах неактивной X-хромосомы не подвергаются инактивации и запускают локальную гетерохроматизацию по механизму РНК-интерференции.

Изменение конфигурации хроматина начиная от установления открытой конфигурации в тотипотентных клетках и бластоцисты до селективного подавления экспрессии в отдельных генах при дифференцировке также можно объяснить присутствием РНК Line 1 в этих клетках в эти периоды.

Важным фактором поддержания плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток является обеспечение работы теломеразы. Экспрессия Line 1 в опухолевых клетках ответственна за поддержание активности теломеразы и теломер. Это достигается за счет регуляции Line 1 экспрессии транскрипционных факторов c-Myc и KLF-4 также активируют экспрессию Line-1, что указывает на регуляцию с участием механизма обратной связи. Это протоонкогены, это гены активирующие активность теломеразы.

Экстраэмбриональные ткани.

В течение преимплантационного развития эмбриона индекс метилирования Line-1 постепенно снижается до минимального уровня на стадии бластоцисты. А затем происходит метилирование де ново. В клетках самого эмбриона Line-1 гиперметируется, в экстраэмбриональных тканях (цитотрофобласте и производных эпибласта) уровень метилирования невысокий.

В некоторых работах показано, что в экстраэмбриональных тканях происходит повышение экспрессии Line-1 в ходе внутриутробного развития. Поэтому ученые сделали предположение, что активность Line-1 необходима для нормального развития плаценты (пока точных экспериментов подтверждения нет). Но при этом известно, что гены ретровирусного происхождения играют важную роль в дифференцировке трофобласта плаценты человека. Например, необходим баланс экспрессии двух белков эндогенного ретровируса человека синцитина и супрессина. И это определяет путь дифференцировки клеток трофобласта до синцитиотрофобласта, характеризующегося формированием синцития из клеток со слившейся цитоплазмой или инвазивного трофобласта мигрирующего в децидуальную ткань матки. Белки кодируемые Line-1 могут принимать участие в обеспечении функционирования плаценты.

Гиперметилование Line-1 потенциально связано с нарушениями внутриутробного развития и встречается в трофобласте хориона на фоне аномалия кариотипа.

8. Ретротранспозон Line 1 и хромосомные нарушения, репарация ДНК, анеуплоидия.

Связь Line-1 с репарацией двунитевых разрывов.

Экспрессия Line-1 может вызывать двунитевые разрывы ДНК за счет эндонуклеазной активности обратной транскриптазы, что приводит к активации ответа на повреждение ДНК, в котором важную роль играет белок АТМ, запускает цикл и привлечение генов репарации к ДР.

Есть исследования, что частота ретротранспозиции Line-1 повышена в клетках, дефектных по гену АТМ, следовательно АТМ может подавлять активность Line-1. (возможно, что АТМ быстро привлекает белки репарации которые сшивают двунитевые разрывы и тем самым препятствуя ретротранспозиции).

Также есть исследования которые показывают что если снижать уровень АТМ различными вирусами то это наоборот нарушает ретротраспозицию Line-1.

Также Line-1 может интегрироваться уже в произошедшие двунитевые разрывы.

Связь Line-1 и анеуплоидия.

У некоторых млекопитающих ретротранспозоны выступают в роли интегрального компонента цетромер.

У приматов инсерции ретротранспозона Line-1 расположены между последовательностями мономерных саттелитов по всему перицентромерному району X-хромосомы.

Древние расположены дистально, более молодые и активные ближе к центромере. Эти новые элементы слабо отличаются по своей последовательности и могут сохранять активность своих промоторов, обеспечивая транскрипцию близлежащих последовательностей. Кроме того, обогащенность последовательности генома Line-1 часто ассоциировано с образованием **неоцентромер**. Возможно Line-1 необходим для образования центромер (есть некоторые виды (например чешуекрылые бабочки, тли, осоковые) у которых имеются голоцетрические хромосомы (несколько центромер у хромосомы, особенностью является то что даже если происходит фрагментация хромосом, если хромосома моноцентрическая то образуется ацетрический фрагмент, а у гомо он не образуется),

Line-1 при формировании центромер и кинетохоров может приводить к нарушениям конформации центромерного хроматина и ошибками сегрегации хромосом в ходе деления клеток.

Имеются исследования, в которых показана связь между канцерогенезом и гипометилированием ДНК, что в свою очередь м.б. связано с активацией ретротраспозона.

9. Методы изучения МГЭ.

Экспериментальные подходы: первоначально, МГЭ обнаруживали случайно. Классический пример, ДНК транспозоны были обнаружены Барбарой МакКлинтон, когда она изучала изменчивость окраски зерен кукурузы. Саузерн-блот гибридизация на уже известные мобильные элементы. Анализ при помощи полимеразной цепной реакции с использованием вырожденных праймеров с последующим клонированием и установлением первичной нуклеотидной последовательности клонов.

Биоинформатические подходы: исторически, первым был реализован поиск МГЭ в базах данных последовательностей при помощи BLAST (Basic local alignment search tool). На сегодняшний день NCBI является наиболее полной базой как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей. Кроме того, предлагает все возможные варианты BLAST, разработанные на данный момент.

Обратная транскриптаза (RT) – единственный домен, присутствующий у всех non-LTR ретротраспозонов. Поиск на обратную транскриптазу известных non-LTR ретротранспозонов позволяет обнаруживать non-LTR ретротранспозоны, например, в прочитанных геномах. Однако, эта стратегия не позволяет выявлять поломанные копии элементов, которые уже не содержат домен обратной транскриптазы в том виде, чтобы она могла быть обнаружена при помощи BLAST, алгоритмов на основе цепей Маркова и др. Как и в случае с non-LTR ретротранспозонами, поиск LTR ретротранспозонов может проводиться на домен обратной транскриптазы (RT), кроме того, non-LTR И LTR ретротранспозоны можно выявлять на этот домен совместно. Дополнительной характеристикой для поиска LTR ретротранспозонов могут служить длинные концевые повторы (LTR), а также наличие некоторых доменов, не свойственных другим ME, например – домены интегразы (INT) и протеиназы (PRO).

Транспозаза – домен, на который возможен поиск ДНК транспозонов, кроме того, инвертированные концевые повторы, являясь характеристикой ДНК транспозонов, могут

быть использованы не только для поиска полных копий, но и для выявления нарушенных ДНК транспозонов в целом геноме или части последовательности.

На сегодняшний день не существует алгоритмов, позволяющих вести целенаправленный поиск SINE элементов. В первую очередь это связано с тем, что SINE элементы не несут какие бы то ни было кодирующие участки. Единственное, что объединяет все SINE элементы – наличие *rol III* промотора в 5' части элемента. Один из методов, который применяется сегодня, для выявления SINE элементов заключается в поиске всех повторенных последовательностей, с последующим вычленением ДНК транспозонов, non-LTR и LTR ретротранспозонов. Оставшаяся фракция анализируется “в ручную”. Большинство известных на сегодняшний день SINE элементов имеют *rol III* промотор tRNA, который состоит из, так называемых, A и B боксов. Предполагается, что на A и B боксы можно вести поиск SINE элементов, при задании дополнительных параметров, например – наличие polyA последовательности на 3' конце. Копийность SINE элементов, чаще всего, на порядки выше, чем у других МГЭ, более того, SINE элементы, обычно, высокогомогенны, что может облегчить их целенаправленный поиск.

Для чего необходимы исследования МГЭ?

МГЭ являются многокопийными и могут составлять значительную часть генома, а значит влияние, которое МГЭ могут оказывать на функционирование всего генома трудно переоценить. На сегодняшний день, мы обладаем разрозненными данными о влиянии МГЭ на функционирование тех или иных генов, однако, накопление этих данных приведет к более глубокому пониманию не только процессов, происходящих в конкретном геноме, но и эволюции геномов. Интересный факт: увеличение размера генома неразрывно связано с увеличением количества МГЭ. Наиболее ярким примером влияния МГЭ на геном является гибридный дисгенез у *Drosophila*. Известны случаи заболеваний у человека, вызванные перемещением МГЭ. Несколько примеров участия МГЭ в формировании геномов: Теломераза – фермент необходимый для формирования теломер, показано, что теломераза филогенетически связана с ретротранспозонами; Так называемая V(D)J рекомбинация, которая необходима для формирования рецепторов иммунокомпетентных клеток происходит по механизму вырезания-встраивания, что говорит о филогенетической связи с транспозонами. МГЭ имеют практическое применение: МГЭ используются для получения трансгенных организмов. МГЭ используются для обнаружения и извлечения из генома новых генов, так называемый insertional mutagenesis – особенно активно применяется на растениях.

Все больше появляется информации о применении МГЭ при генной терапии для лечения заболеваний. МГЭ могут использоваться как филогенетические маркеры, для построения эволюционных деревьев.

10. Программируемая элиминация хроматина.

Это избирательное удаление хромосомных фрагментов или целых хромосом из предшественников соматических клеток у различных организмов.

Впервые запрограммированную элиминацию у паразитических нематод обнаружил Теодор Бовели (конец 19в). Тогда он предположил, что такая элиминация происходит во всех организмах и отвечает за дифференцировку тканей. Однако в дальнейшем его гипотеза не подтвердилась. При более подробном изучении этого феномена было установлено, что селективное удаление хроматина встречается не только у нематод, но и у других, не родственных друг другу организмов. Запрограммированная элиминация генетического материала является высокоспецифичной по отношению к определённым последовательностям ДНК, и, как правило, происходит на определённых стадиях онтогенеза. У многоклеточных организмов элиминация ДНК происходит на предшественниках соматических клеток во время развития, у простейших – во время формирования макронуклеуса.

Кроме удаления отдельных последовательностей ДНК есть данные об удалении из ядра целых хромосом. Например, так происходит удаление сверхнормативных B-хромосом.

Их наличие отмечается у певчих птиц, некоторых насекомых и растений. Элиминация B-хромосом из соматических клеток происходит в процессе эмбрионального развития, однако, в половых клетках они не удаляются. Роль B-хромосом в онтогенезе до конца не понятна, но предполагается, что их последовательность ДНК необходима для гаметогенеза и эмбрионального развития.

Так же существует инактивация и элиминация половых хромосом у самцов и самок. Т.о. в некоторых организмах происходит определение пола и компенсация дозы гена.

Элиминация целого генома наблюдается у некоторых беспозвоночных, самцы которых имеют гаплоидный набор, а самки – диплоидный. Например, у представителей отрядов Паразитиформас, Хемиптера, Калиоптера, Диптера самцы изначально могут быть диплоидными, но в результате полного удаления отцовского генома стать гаплоидными. Некоторые паразиты, например, бактерии из рода Бальбахия способны влиять на элиминацию генома своих хозяев и обеспечивать своё распространение в популяции таким образом.

Удаление хромосом также часто происходит и у межвидовых гибридов. Это было замечено при первых экспериментах по слиянию клеток разных видов и межвидовой селекции. Удаление одного из родительского генома на ранних этапах развития, как правило, приводит к гибели организма, а в селекции растений эти проблемы решают удвоением гаплоидного набора путём ингибирования веретена деления.

У гибридов животных с клональным способом репродукции наблюдается элиминация целого генома. Элиминация одного или части родительских геномов у гибрида может происходить во время гаметогенеза или сразу после оплодотворения (гиногенез, андрогенез и клептогенез).

11. Механизмы программируемой элиминации хроматина.

Механизмы элиминации различны. Это могут быть отдельные последовательности генов, целой хромосомы или генома. Исключаться могут конкретные гены, тандемные повторы, МГЭ или другие последовательности.

Для элиминации генетического материала необходимо, чтобы он был сначала особым образом распознан, а после – удалён из ядра. У инфузорий элиминация обычно сопровождается эпигенетической маркировкой. Хромосомы подвергаются реорганизации, которая включает в себя: их фрагментацию, амплификацию и удаление определённых генетических последовательностей. Большую роль при этом играют короткие некодирующие РНК (сканирующие РНК), которые у одного класса Инфузорий привлекают гистоновые метилтрансферазы к участкам, которые должны быть удалены. Это приводит к образованию гетерохроматина, который вырезается специальными белками *piggyBac*, а у другого класса инфузорий пиРНК маркирует те последовательности, которые не должны быть удалены.

У других организмов особая роль эпигенетических модификаций и некодирующих РНК тех последовательностей, которые должны быть удалены, изучены недостаточно, но её описали и изучают.

Например, у *Ascaris* (аскариды) элиминированные регионы демонстрируют аномальную конденсацию хроматина и обладают более доступной структурой хроматина. У циклопов элиминированная ДНК образует кольцевые структуры, которые заключены в гранулы. У *Pertromyzon marinus* гетерохроматиновые модификации накапливаются в элиминированных районах хромосом, а затем – в микроядрах, которые, в последствии, деградируют.

Если говорить о механизмах элиминации целых хромосом, то их удаление связано с изменениями в области их центромер. Например, теряется белок – аналог белка гистона H3 (CenH3), что приводит к неспособности хромосомы прикрепиться к веретену деления и к закономерному отставанию в анафазе. Например, это происходит при элиминации B-хромосом у козлятника. У *Bengalese finch* хромосома которая ограничена зародышевой линией, накапливает различные гистоновые модификации на разных стадиях мейоза, которые приводят к нарушению работы кинетохора и центромеры. В результате элиминации

образуются микроядра с признаками высокой фрагментации ДНК. У насекомых *Sciara* элиминация сверхнормативных и отцовских половых хромосом происходит не только путём отставания во время клеточных делений, но и путём отпочковывания микроядер в зародышевых клетках. В половых клетках одна из двух отцовских X-хромосом и некоторые другие хромосомы находятся в полуконденсированном состоянии, они соединяются с ядерной мембраной, предположительно, через рецептор ламина-Б, и выводятся из ядра в цитоплазму при формировании почки. У чешуекрылых элиминация всегда предшествует гетерохроматизации. Хромосомы накапливают маркёры, характерные для генотипа. У некоторых организмов во время мейоза половых клеток происходит сортировка отцовских и половых хромосом путём образования монополярного веретена, в результате чего возникают сперматиды только с материнскими хромосомами.

У межвидовых гибридов растений и гибридов соматических клеток, как правило, всегда происходит элиминация 1 из родительских генов. Хроматин, который направлен на элиминацию, пространственно разделён в интерфазном ядре и локализуется на ядерной периферии. Однако, механизмы, которые приводят к распознаванию генома и последующему отпочковыванию пока не ясны.

12. Незапрограммируемая элиминация хроматина. Роль микроядер в функционировании клеток.

В литературе описано три общие причины образования микроядер. Первая связана с отставанием ацентрических фрагментов. Вторая – с отставанием хромосом или хроматид с центромерой. Третья – с почкованием ядра.

Ацентрические фрагменты образуются в результате невозможности восстановления двунитевых разрывов при действии пластогенных факторов. Разрывы так же могут быть связаны с нарушением процесса репликации. Это подтверждается исследованиями, в которых различные факторы, которые приводят к нарушению репликации, способствуют формированию МЯ с ацентрическими фрагментами. Так же показано, что образование полицентрических хромосом часто сопровождается образованием ацентрических фрагментов.

1. Полицентрические хромосомы могут разорваться на несколько частей (что приводит к МЯ и незащищённым концам хроматид). Незащищенные концы хроматид могут запускать циклы «разрыв–слияние–мост», которые также приводят к образованию МЯ. Это процесс рассматривается, как один из механизмов хромосомной нестабильности раковых клеток.

Факторы, ответственные за отставание хромосом: неисправные центромеры, кинетохоры, дефекты в сборке митотического веретена. Например, при дефектах киназин–связывающих белков происходит нарушение движения и выравнивания митотических хромосом, уменьшение длины веретена деления, что, в конечном счёте, выражается в нарушении сегрегации хромосом и образовании МЯ.

Есть результаты, что в процессе правильной сегрегации хромосом важную роль играют лизосомы. Умеренная активность лизосомальных ферментов обеспечивает правильную работу целого набора белков, участвующих в изменении упаковки хроматина, его движения в процессе клеточного цикла (например, на уровне деградации гистона H3 или компонентов адгезивного механизма).

Имеются исследования на культурах клеток, которые показывают, что митотическое веретено не требуется для формирования единого ядра из набора индивидуализированных митотических хромосом. Предполагается, что для образования единого ядра необходимы некоторые белки, истощение которых и приводит к образованию МЯ. Например, один из таких белков является барьерный фактор автоинтеграции ВАФ. Так же показано, что на отстающих хромосомах нарушается правильная сборка ядерной оболочки (отсутствие в ядрах ламина-Б).

Почкование интерфазных ядер с последующим образованием МЯ является плохо изученным процессом, особенно, в клетках человека. Известно, что почкованием образуются

ядра из дабл-минус хромосом. Это нехромосомные элементы, которые представляют собой многократно амплифицированные копии генов (предположительно, онкогены). Во время G1–фазы деления клетки дабл–минус располагаются на периферии ядра, а затем образуется почка. Часто такие микроядра не содержат ядерную ламину или имеют дефект в ней. Помимо амплификации онкогенов, отпочковывание хроматина может происходить в результате большого числа двуцепочечных разрывов. При этом, такой хроматин перемещается на периферию ядра и способен образовать почки.

Результаты исследования дрозофилы и клеток мышей показывают, что на процесс почкования ядер могут влиять белки–сателлиты ДНК D1 и Prod, которые контролируют правильную комплектацию перед центромерной спутниковой ДНК в хромоцентре.

Аберрантная функция этих белков приводит к почкованию хроматина и к выраженному увеличению повреждения микроядер. Изучение механизмов образования М вследствие почкования ДНК актуален, поскольку этот процесс характерен и для стареющих клеток.

Роль МЯ в функционировании клеток

1. Клетки с МЯ могут элиминироваться путём апоптоза или аутофагии.
2. Хроматин МЯ может возвращаться обратно в ядерный геном (n–p у дрозофиллы отстающие ацентрические хромосомы включаются в ядро через ядерный поровый комплекс. Этот процесс зависит от VAF, который у млекопитающих участвует в восстановлении ядерной оболочки).

3. Накопились доказательства, что МЯ являются активаторами нестабильности генома. В результате того, что ядерная оболочка МЯ собирается с нарушениями, хроматин в МЯ характеризуется нарушениями репликации ДНК. Хромосомы МЯ из–за этого накапливают сниженные уровни важных факторов сборки кинетохор в течение нескольких делений, что приводит к повторяющейся неправильной сегрегации этих хромосом в течение нескольких клеточных циклов.

В настоящее время исследуется роль МЯ в отношении хромотрипсиса (вызывается фрагментация хроматина МЯ, нарушается целостность МЯ и ошибочная репарация при встраивании в ядро или МЯ при следующем клеточном цикле). Хромотрипсис – одномоментное хромосомное критическое событие, которые связывают с массовым разрушением и перестройкой хромосом.

4. МЯ, имеющие разрывы ядерной оболочки, воспринимаются, как цпДНК, что приводит к их обнаружению циклической гуанозинмонофосфатной аденозинмонофосфатной синтазы (сGAC). Через ряд промежуточных стадий активируются врождённые иммунные реакции, что приводит в выработке интерферона первого типа, провоспалительной продукции цитокинов, а также усиленной экспрессии лигандов натуральных киллеров и T–цитотоксических. Так же считается, что активация этого пути через сGAC способствует клеточному старению и связанному со старением секреторному фенотипу, что приводит к развитию хронического воспаления. Т.е. МЯ могут быть ключевыми компонентами в инициации клеточных и генетических изменений, связанных со старением.

13. Влияние химических факторов на элиминацию хроматина.

Некоторые химические вещества способны оказывать влияние на ядерный геном, что может приводить к незапрограммированной элиминации хроматина.

К таким веществам относятся, например, цитостатические препараты. Есть данные о том, что они способны повышать частоту образования МЯ у принимающих их пациентов. Наличие большого числа микроядер может вызвать остановку клеточного деления и в дальнейшем привести к гибели клетки путем апоптоза. Механизмы работы цитостатиков различаются. На основе этого их можно разделить на кластогенные (циклофосамид, карбоплатин, доксорубин, блеомицин и митомицин), и анеугенные (винкристин и винбластин). Кластогенные цитостатики вызывают фрагментацию хроматина, а анеугенные вызывают

нарушение сборки веретена деления тем, что ингибируют полимеризацию субъединиц тубулина в микротрубочки.

Чтобы установить какие хромосомы или их участки включаются в состав микроядер используется флуоресцентная гибридизация *in situ*. Для анализа могут быть использованы красители к каким-то конкретным хромосомам или для всего хромосомного набора (метод mFISH). Данный метод часто применяется при исследовании состава микроядер.

Известно, что бензол является токсичным веществом, обладающим канцерогенным эффектом. При исследовании действия бензола и его метаболитов было отмечено его влияние на хромосомы группы C и X -хромосому. Эта закономерность частично подтверждается и в других работах, посвященных исследованию генотоксичности бензола. Например, в другой работе обработка метаболитами бензола и гидрохиноном лимфоцитов человека *in vitro* вызвало анеуплоидию хромосом #5 и #7. Также для изучения особенностей образования микроядер в одной из работ проводилась флуоресцентная гибридизация *in situ* с использованием центромерных и хромосомных окрашивающих зондов для хромосом #3, #4, #6, #7, #9, #16, #17, #18 и #X в лейкоцитах человека, индуцированных митомицином C. Митомицин C - представляет собой цитостатический препарат, применяемый в химиотерапии раковых заболеваний. Согласно результатам данной работы все исследуемые хромосомы оказались вовлечены в образование микроядер, что указывает на кластогенный эффект данного вещества. При этом авторами не было обнаружено корреляции между интерфазным положением, размером и плотностью генов изученных хромосом, и их миграцией в МЯ. Тем не менее было показано, что хромосомы #9 и #16 или их хромосомные фрагменты встречались чаще в микроядрах, индуцированных митомицином C. В другой работе, где сравнивался эффект митомицина и диэтилстильбоэстрола (ДЭС), который раньше применялся для лечения раковых заболеваний половых желёз, было выявлено, что митомицин вызывает деконденсацию перичентромерного гетерохроматина хромосом 9 и 1, а ДЭС не вызывает деконденсацию гетерохроматина, но в составе микроядер обработанных ДЭС чаще встречался материал из хромосом #14, #19 и #21. Авторы предполагают, гетерохроматиновый участок в составе хромосомы #9 может быть специфической мишенью для митомицина C. Есть химические препараты, механизм действия которых не связан с нарушением конденсации хромосом. Например, в работе антигипертензивный препарат атенолол вызывает образование микроядер с преимущественным вовлечением хромосом #7, #11, #17 и X в микроядра пациентов. Авторы связывают это с феноменом хрупкости хромосом. Хромосомные хрупкие сайты — это специфические локусы, которые часто демонстрируют разрывы на метафазных хромосомах. Данные из этого исследования свидетельствуют о корреляции между хромосомной хрупкостью и содержанием в МЯ #7 и #11 хромосомы у пациентов. Так же среди химических веществ, влияние которых на образование МЯ широко освещено в литературе можно выделить активаторы/ингибиторы метилирования ДНК. Например, в одном из исследований на культурах лимфоцитов авторы продемонстрировали, что 5-азациитидин вызывает значительную недоконденсацию гетерохроматических районов хромосом и это приводит к увеличению образования МЯ [58]. В другой работе была продемонстрирована индукция МЯ четырьмя аналогами цитидина: 5-фтор-2'-дезоксцитидином, 5,6-дигидро-5-азациитидином, 5-азациитидином и 6-азациитидином. Все четыре вещества индуцировали МЯ, при этом большинство МЯ было центромер-положительными, что указывает на то, что все эти соединения обладают анеугенным эффектом. Кроме того, если говорить о связи образования микроядер и недостатке определенных веществ, то существуют многочисленные исследования, показывающие связь между уровнем фолатов и образованием МЯ. Фолиевая кислота - важный витамин группы B, участвующий в фолатном цикле, в результате которого образуется S-аденозилметионин (SAM) - ключевой донор метила для метилтрансфераз ДНК. Таким образом, фолиевая кислота имеет огромное значение для метилирования ДНК. Исследования в этой области показали, что дефицит фолатов связан с повреждением генома и образованием МЯ и других ядерных аномалий в лимфоцитах человека. Более того, добавление фолатов приводило к

выраженному снижению повреждений ДНК и образованию МЯ. Это указывает на связь эпигенетических механизмов с механизмами формирования микроядер.

На основании всех вышеперечисленных фактов можно сделать вывод, что формирование МЯ может индуцироваться эпигенетически в основном за счет потери метилирования ДНК. В частности, гипометилирование гетерохроматина в перичентромерных областях связано с деконденсацией хроматина, что приводит к неправильной сегрегации хромосом и их исключению из ядра; глобальное гипометилирование связано с более расслабленным хроматином, повышенной экспрессией генов, а следовательно, и повышенным уровнем повреждений ДНК, и хромосомными разрывами, которые формируют МЯ с ацентрическими фрагментами хромосом. Таким образом можно заключить, что гипометилирование связано как с анеугенными, так и с кластогенными механизмами формирования МЯ. Также нельзя не упомянуть о вреде веществ входящих в состав курительных смесей. Удивительно, но большинство исследований отрицают их способность вызывать увеличение числа МЯ. В проекте Human MicroNucleus у 1409 нынешних курильщиков и 800 бывших курильщиков было оценено число микроядер в лимфоцитах. Анализ подтвердил, что у курильщиков не наблюдается общего увеличения частоты МЯ. Но в тоже время при учете взаимодействия с профессиональным воздействием неблагоприятных факторов курильщики, выкуривавшие более 30 сигарет в день, были единственной группой, демонстрирующей значительное увеличение генотоксических повреждений.

14. Влияние ионизирующего излучения на элиминацию хроматина.

Среди физических факторов ведущих к образованию МЯ огромное число работ посвящено действию ионизирующего излучения (ИИ). Известно, что ИИ приводит к образованию большого числа двухцепочечных разрывов ДНК, которые в свою очередь могут приводить к образованию различных хромосомных aberrаций (ХА). Тем не менее не все ХА приводят к образованию микроядер, но несмотря на это МЯ являются хорошим маркером радиационно-индуцированной нестабильности хромосом. Количество радиационно-индуцированных МЯ коррелирует с дозой излучения и зависит от качества излучения при остром воздействии. Считается, что взаимосвязь между увеличением частоты МЯ и увеличением дозы острого облучения (0-4 Гр) соответствует линейно-квадратичной модели. При сравнении действия гамма- (^{137}Cs) и рентгеновского излучений в дозах от 0 до 3 Гр, с шагом в 0,3 Гр также было показано, что частота МЯ увеличивается с ростом дозы по линейно-квадратичной зависимости, коэффициенты которой практически совпадают для этих типов излучений. По мнению большинства исследователей, в целях биологической дозиметрии использование микроядерного теста ограничено в области низких доз (до 0,1-02, Гр) ввиду широкой вариабельности фоновых значений частоты встречаемости клеток с микроядрами.

Актуальным вопросом в настоящее время остается радиочувствительность хроматина при воздействии малых доз или излучений с малой интенсивностью облучения. Результаты некоторых исследований свидетельствуют о том, что длительное хроническое воздействие низких доз приводит преимущественно к анеугенным эффектам. Это может свидетельствовать, что низкие дозы радиации влияют на эпигенетические изменения клеток. Цитогенетическое исследование, проведенное на лимфоцитах работников больниц, профессионально подвергавшихся воздействию рентгеновского и гамма излучения в малых дозах (средние значения для группы 11,25 мЗв за последние 10 лет), с использованием микроядерного центромерного анализа показало значительное увеличение количества центромеро-положительных микроядер у работников, подвергшихся облучению по сравнению с группой работников не подвергавшейся облучению. При этом частота микроядер была на 40% выше у женщин, чем у мужчин. При изучении состава МЯ фибробластов, индуцированных острым гамма-излучением, наблюдалось включение в МЯ #2 и #7 хромосом, выше ожидаемых расчетных значений. Авторы предположили, что это

связано с наличием большого числа не транскрибируемых областей в этих хромосомах, которые репарируются хуже, чем транскрибируемые регионы. В нашем исследовании состава микроядер у облученных женщин также было замечено, что в микроядрах часто встречается 2 хромосома, что не соответствует гипотезе равновероятного попадания хромосом в микроядра, и не коррелирует с длиной хромосом. Также в работе указывается на повышенную склонность #2-хромосомы включаться в МЯ у отдельных индивидуумов или совместно с другими хромосомами по общим критериям (например, усталость когезии #1 и #2 хромосомы). Также есть результаты, показывающие большую радиочувствительность #2 хромосомы по сравнению с #1 по критерию участия их в обменных процессах, так #2 хромосома более склонна к образованию дицентриков и ацентрических фрагментов. Также была высказана гипотеза о том, что высокая частота включения #2 хромосомы связана с тем, что она представляет собой теломерное слияние двух предковых хромосом и поэтому участок слияния может быть подвержен частым радиационно-индуцированным разрывам. Поскольку образование радиационно-индуцированных микроядер может быть связано с образованием хромосомных aberrаций, то изучение качественных характеристик ХА может дополнить уже имеющуюся информацию. При изучении частоты aberrаций различных хромосом методом mFISH в клетках периферической крови человека в работе, после облучения рентгеновскими лучами в дозе 3 Гр были показаны отклонения от случайного ожидаемого значения для некоторых хромосом. Хромосомы #2 и #3 показали значительно меньше симметричных транслокаций чем ожидалось, а хромосома 4 - больше. Хромосомы #15 и #22 показали больше симметричных транслокаций, чем ожидалось. Для хромосом #2, #3 и #18 выявлено меньше дицентриков, чем ожидалось, а для хромосом #15, #16 и #17 - больше.

15. Методы изучения элиминации хроматина.

Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Флуоресцентная гибридизация *in situ*, или метод FISH (от: англ. fluorescence *in situ* hybridization) — метод, который применяют для детекции и определения положения специфической последовательности ДНК. Для создания ДНК-зондов используют: клонированные последовательности ДНК, ДНК, полученную при помощи микродиссекции, меченые олигонуклеотиды, продукты ПЦР. Мечение зонда может осуществляться либо путем нуклеотидной транскрипции или при помощи ПЦР с мечеными нуклеотидами. Мечение ДНК-зондами: прямое мечение В состав ДНК-зондов входят нуклеозиды, уже заранее меченные флюорохромами. Непрямое мечение В состав ДНК-зондов входят биотин или диоксигенин. Требуется дополнительная обработка флюорохромами. Поскольку последовательность оснований ДНК зонда и соответствующий участок хромосомы взаимно комплементарны, зонд присоединяется к хромосоме. В этом участке происходит ренатурация ДНК. Варианты ДНК зондов: центромерные, теломерные, локус специфичные, на всю хромосому.

Иммунофлуоресцентное окрашивание - набор иммунологических методов для качественного и количественного определения поверхностных и внутриклеточных антигенов в образцах клеточных суспензий (культур клеток, бактерий, микоплазм, риккетсий, вирусов), образцов крови, костного мозга, альвеолярных смывов, тонких тканевых срезов. Метод позволяет детально анализировать биологические образцы на присутствие определенных антигенных детерминант. Сущность метода заключается в визуализации антигена специфическими антителами с флуоресцентными маркерами. Метод конъюгации глобулинов с органическими флюорохромами разработан в 1942 году А. Кунсом. В настоящее время метод использует как антитела к различным антигенам, так и специфические красители к ДНК (к примеру, DAPI), РНК (к примеру, Sybr Green II), липидам и белкам.

4. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ И КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ

4.1. Порядок проведения промежуточной аттестации

В рамках **текущего контроля** в течение семестра для оценки знаний, умений, навыков, получаемых в ходе изучения дисциплины, учитываются устные вопросы,

реферативные сообщения.

Критерием успешности освоения учебного материала **по окончании учебного семестра** (промежуточная аттестация) является экспертная оценка преподавателя, учитывающая: текущую успеваемость в течение семестра (устные вопросы, реферат, контрольная работа). Кроме того, экспертная оценка преподавателя может основываться на регулярности посещения обязательных учебных занятий, успешности выполнения установленных на данный семестр объемов рабочей программы.

Промежуточная аттестация проводится в форме экзамена по билетам. Билет содержит два теоретических вопроса.

4.2. Критерии оценивания промежуточной аттестации по видам оценочных средств

4.2.1. Критерии оценивания теоретического вопроса

Отлично

Студент глубоко и полно владеет содержанием учебно-программного материала; исчерпывающе, последовательно, корректно и логически стройно его излагает не затрудняясь с ответом при видоизменении задания, свободно справляется с поставленными задачами, показывает знания монографического материала. правильно обосновывает принятие решения; владеет навыками и приёмами выполнения практических работ; обнаруживает умение самостоятельно ставить задачи, обобщать и излагать материал, формулировать выводы; при изложении материала осуществляет межпредметные связи; владеет понятийным аппаратом и уяснил взаимосвязь основных понятий дисциплины и их значение для приобретения профессии.

Хорошо

Студент твердо знает учебно-программный материал, грамотно и по существу излагает его; ответ отличается меньшей обстоятельностью, глубиной и полнотой; в ответе на вопрос не допускает существенных неточностей; может правильно применить теоретические положения и владеет необходимыми навыками при выполнении практических задач.

Удовлетворительно

Студент усвоил только основной материал, но не знает отдельных деталей, допускает неточности, не достаточно правильные формулировки, нарушает последовательность в изложении материала и испытывает затруднения в выполнении практических заданий. Ответ отличается низким уровнем самостоятельности.

Неудовлетворительно

Студент не знает значительной части программного материала, допускает существенные ошибки, отсутствует логика в изложении материала, с большими затруднениями выполняет практические задания, отсутствуют межпредметные связи

4.3. Результаты промежуточной аттестации и уровни сформированности компетенций

При подведении итогов учитываются результаты текущей аттестации.

Особенности проведения процедуры оценивания результатов обучения инвалидов и лиц с ограниченными возможностями здоровья обозначены в рабочей программе дисциплины (модуля).

«1 уровень» - ознакомление (иметь общее представление, узнавать);

«2 уровень» - понимание учебного материала, излагаемого в учебнике, методической разработке или преподавателем;

«3 уровень» - умение логично, последовательно, достаточно полно и точно излагать изученный материал;

«4 уровень» - творчески использовать полученные знания.

Для удовлетворительной (положительной) оценки знаний требуется минимум 3-й уровень усвоения учебного материала.

Требования (критериальные показатели) к уровню освоения дисциплины

Оценка	Требования к знаниям

Отлично	Студент глубоко и полно владеет содержанием учебно-программного материала; исчерпывающе, последовательно, корректно и логически стройно его излагает. не затрудняясь с ответом при видоизменении задания, свободно справляется с поставленными задачами, показывает знания монографического материала. правильно обосновывает принятие решения; владеет навыками и приёмами выполнения практических работ; обнаруживает умение самостоятельно ставить задачи, обобщать и излагать материал, формулировать выводы; при изложении материала осуществляет межпредметные связи; владеет понятийным аппаратом и уяснил взаимосвязь основных понятий дисциплины и их значение для приобретения профессии.
Хорошо	Студент твердо знает учебно-программный материал, грамотно и по существу излагает его; ответ отличается меньшей обстоятельностью, глубиной и полнотой; в ответе на вопрос не допускает существенных неточностей; может правильно применить теоретические положения и владеет необходимыми навыками при выполнении практических задач.
Удовлетворительно	Студент усвоил только основной материал, но не знает отдельных деталей, допускает неточности, не достаточно правильные формулировки, нарушает последовательность в изложении материала и испытывает затруднения в выполнении практических заданий. Ответ отличается низким уровнем самостоятельности.
Неудовлетворительно	Студент не знает значительной части программного материала, допускает существенные ошибки, отсутствует логика в изложении материала, отсутствуют межпредметные связи.

**06.04.01 Биология, ОПОП Генетика, ФОС РПД Проблемные лекции по генетике,
год набора 2025, форма обучения очная**

Проректор по учебной работе утверждено 24.02.2025 А.А. Саламатов

Ученым советом биологического факультета

Протокол заседания № 6 от 21.02.2025

Председатель Ученого совета

биологического факультета согласовано Д.С. Сташкевич

Заседанием кафедры радиационной биологии

Протокол заседания № 7 от 21.02.2025

Заведующий кафедрой согласовано А.В. Аклеев

Автор (составитель) Ю.Р. Ахмадулина

**Структура рабочей программы соответствует приказу ректора ФГБОУ ВО
«ЧелГУ» от «13» апреля 2021 г. № 247-1**