

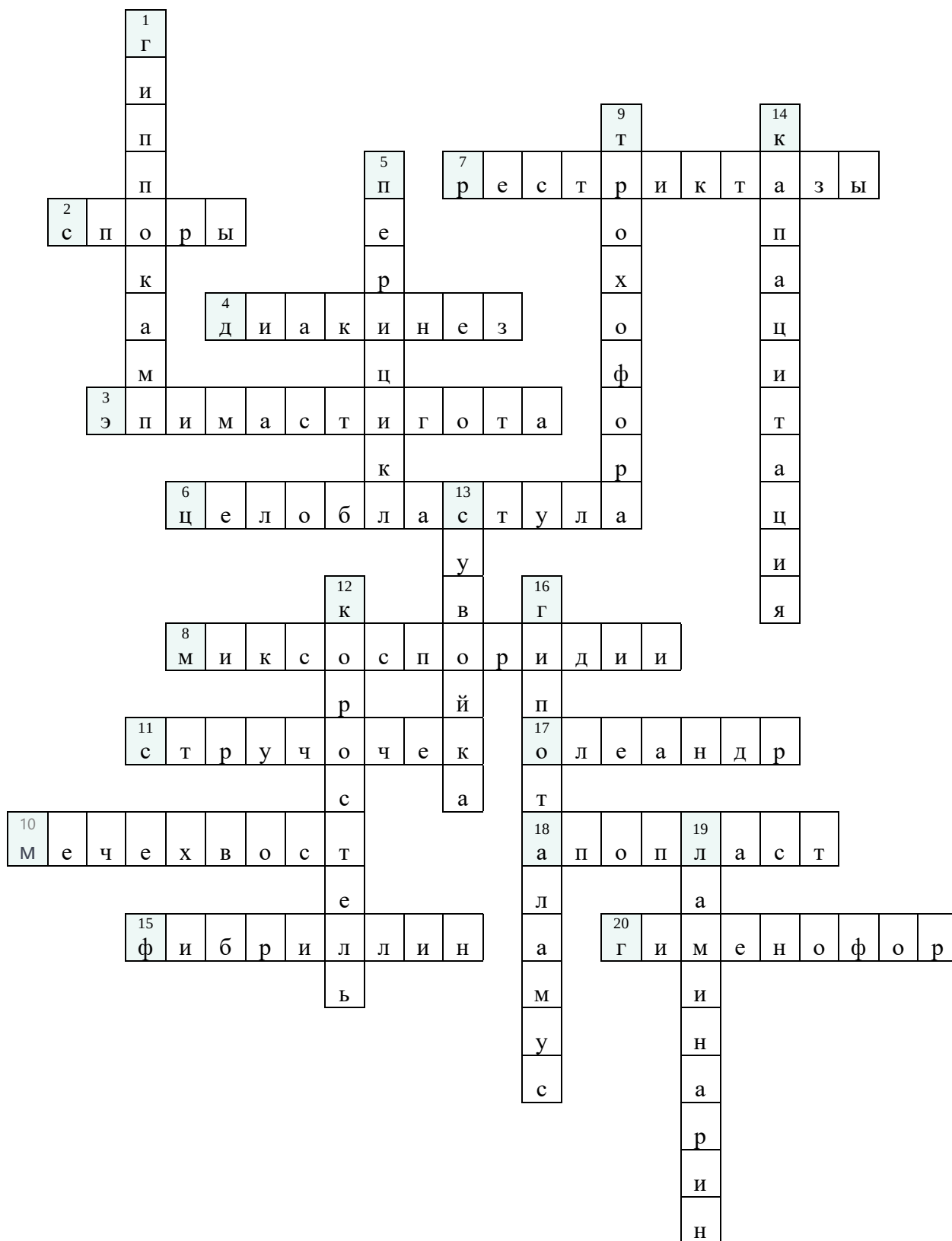


Пироговская олимпиада для школьников по биологии.

Заключительный этап 2024-2025 г.г.

11 класс.

Вопрос 1. Кроссворд 20 баллов, 1 балл за каждый термин





По горизонтали

2. Дипиколиновая кислота входит в состав этих структур у некоторых видов бактерий, обеспечивая их термостойкость – *споры*.
3. Стадия развития трипаносоматид, характеризующаяся короткой ундулирующей мембраной – *эпимастигота*.
4. Стационарная стадия профазы первого деления при овогенезе – *диакинез*.
6. Тип бластулы, формирующийся при полном равномерном дроблении – *целобластула*.
7. Ферменты BamHI и EcoRI относят к этой группе гидролитических ферментов (ответ привести во множественном числе) – *рестриктазы*.
8. Группа животных из стрекающих - паразиты рыб, ранее относившиеся к простейшим – *миксоспоридий*.
10. Из лизатов амебоцитов этого животного выделяют реактив для определения эндотоксина в лекарственных препаратах – *мечехвост*.
11. Плод пастушьей сумки – *стручочек*.
15. Мутация в гене этого белка приводит к синдрому Марфана – *фибриллин*.
17. Листья этого растения имеют крипты – углубления, выстланные устьицами с кроющими трихомами – *олеандр*.
18. Система соприкасающихся клеточных стенок и межклеточного вещества, которая образует непрерывную сеть по всему растению – *апопласт*.
20. Часть плодового тела гриба, несущая на поверхности тонкий спороносный слой – *гименофор*.

По вертикали

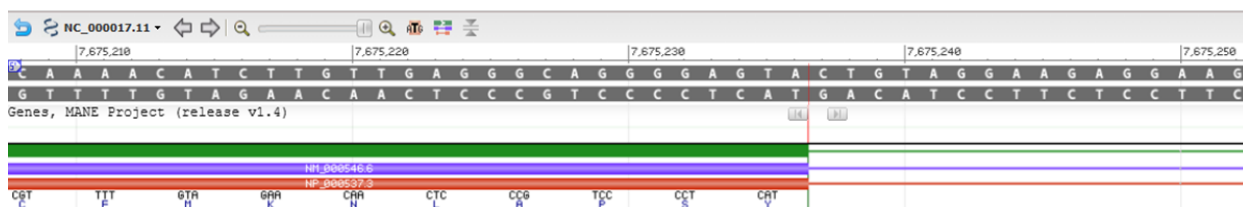
1. Часть лимбической системы – *гиппокамп*.
5. Образовательная ткань растений, в которой закладываются боковые корни – *перицикл*.
9. Личинка полихет – *трохофора*.
12. Птица из семейства пастушковых с альтернативным названием - дергач – *коростель*.
13. Вид инфузории – *сувойка*.
14. Процесс активации сперматозоида – *капацитация*.
16. Структура головного мозга, в которой находятся орексигенные нейроны, участвующие в регуляции повышения аппетита – *гипоталамус*.
19. Полисахарид бурых водорослей, «родственник» крахмала – *ламинарин*.





Вопрос 2. Биоинформатика 20 баллов

*Ante mare undae — причина
непрерывно предшествует
следствию, а целое складывается из
частей.*



На рисунке представлен участок гена А. После секвенирования опухолевого образца имеются короткие последовательности (прочтения, reads), определенные как релевантные данному участку.

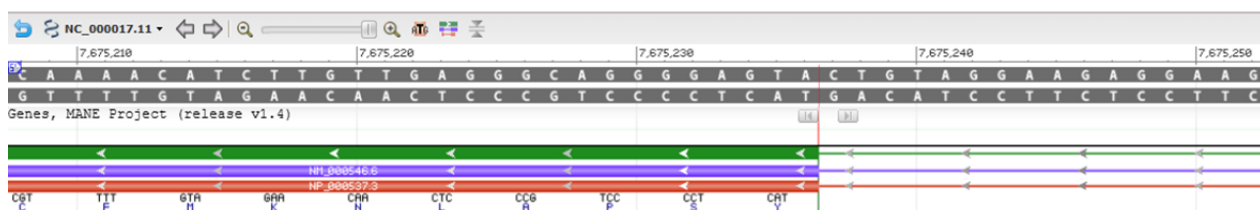
AGAACAAC TCCCGTCCCAT, CGTCCCATGACATCCTTC,
TTGTGAACAAC TCCGTCCCC, GTTTTGTGAACAAC TC, GTTTTGTGAACAAC,
ACAAC TCCCGTCCCTCATGACATCC, TG TAGAACAAC TCCCGTCCCA,
TTGTAGAACAACTACGTCCCCTC, GTTTTGTAGAACAACTCCCGTCCCATGACATC.

Вспомогательная информация: последовательность кодируемого геном белка:
MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDL
LSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPSWPLSSSVPSQKT
YQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTQCPVQLWVDSTPPPGTRVRAM
AIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVV
PYEPPEVGSDCTTIHYNMCMSSCMGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCA
CPGRDRRTEENLRKKGEPRHNPSTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRG
RERFEMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDS
D

Белок кодируется, начиная со 143-й позиции.
Координаты экзонов (транскриптомные): 1..114, 115..216, 217..238, 239..517, 518..701,
702..814, 815..924, 925..1061, 1062..1135, 1136..1242, 1243..2512

Вопросы:

1. Определите ориентацию гена. В каком направлении на рисунке должна идти транскрипция (слева направо или справа налево)?



2. Укажите транскриптомные и геномные координаты экзона.





3. Сопоставьте секвенированные участки референсу. Приведите в формате побуквенного сопоставления.
4. Как должны выглядеть сопоставленные прочтения, если бы в них не было мутаций? Приведите в формате побуквенного сопоставления.
5. Сколько мутаций прочитано на данном участке? Укажите их тип.
6. Какая мутация потенциально оказывает наибольшее влияние на функцию белка и почему?
7. Какой наиболее вероятный эффект вышеуказанной мутации на белок? Если предположить, что такая мутация типична для данного гена в опухоли, какова роль гена в развитии опухоли?
8. Запишите мутации, подтверждённые более чем 1 прочтением, в формате HGVS.
9. Запишите мутации, подтверждённые 1 прочтением, в формате HGVS.
10. Какие возможные причины подтверждения мутаций из пункта 9 только одним прочтением?

Ответы:

1. Обратная (синонимы: минус-стренд, minus strand), справа налево. **1 балл за каждый верный ответ**

2. 518-701, 7675053-7675236 **1 балл за каждый верный ответ**

- 3.

мутации

```

GTTTTGTAGAACAACCTCCCGTCCCCTCATGACATCCTTCTCCTTC
      AGAACAACCTCCCGTCC***CAT
                        CGTCC***CATGACATCCTTC
TTGT*GAACAACCT*CCGTCCCC
GTTTTGT*GAACAACCTC
GTTTTGT*GAACAAC
      ACAACCTCCCGTCCCCTCATGACATCC
TGTTAGAACAACCTCCCGTCC***CA
TTGTAGAACAACCTACGTCCCCTC
GTTTTGTAGAACAACCTCCCGTCC***CATGACATC
  
```

4-7 правильно сопоставленных прочтений – 1 балл, 8-9 прочтений - 2 балла

- 4.

нормальная картина

```

GTTTTGTAGAACAACCTCCCGTCCCCTCATGACATCCTTCTCCTTC
      AGAACAACCTCCCGTCCCCTCAT
                        CGTCCCCTCATGACATCCTTC
TTGTAGAACAACCTCCCGTCCCC
GTTTTGTAGAACAACCTC
GTTTTGTAGAACAAC
      ACAACCTCCCGTCCCCTCATGACATCC
TGTTAGAACAACCTCCCGTCCCCTCA
TTGTAGAACAACCTCCCGTCCCCTC
GTTTTGTAGAACAACCTCCCGTCCCCTCATGACATC
  
```

4-7 правильно сопоставленных прочтений – 1 балл, 8-9 прочтений - 2 балла





5. 3 мутации (2 делеции, 1 миссенс). **Правильно количество мутаций – 1 балл, правильно указаны типы – 2 балла**

6. Делеция 1 основания, так как это мутация со сдвигом рамки считывания. **Правильно указана мутация – 1 балл, правильное объяснение – 2 балла**

7. Мутация со сдвигом рамки считывания обычно приводят к снижению/отсутствию функции белка (это транкирующие, усекающие мутации). **1 балл**

Ген в норме подавляет развитие опухоли. **1 балл**

8. NC_000017.11:g.7675231_7675233del
(эквивалент NC_000017.11:g.7675232_7675234del).

NC_000017.11:g.7675215del

1 балл за каждую верно написанную мутацию

9. NC_000017.11:g.7675231_7675233del
(эквивалент NC_000017.11:g.7675232_7675234del).

NC_000017.11:g.7675224C>A

1 балл за каждую верно написанную мутацию. 1 балл за правильный формат записи генетических вариантов в заданиях 8-9.

Любые другие референсные последовательности, кроме NC_000017.11, будут означать, что использован интернет, 0 баллов.

10. Биологическая: внутриопухолевая гетерогенность(мало представлен клон клеток с данной мутаций).

Техническая: ошибка секвенирования/биоинформатического анализа/малое покрытие образца.

Указаны биологическая и техническая причина – 2 балла





Вопрос 3. Биотехнология 20 баллов

Скрещенья рук, скрещенья ног,
Судьбы скрещенья.
Б. Пастернак "Зимняя ночь"

Промышленное производство биофармацевтических препаратов — это сложный процесс, который обычно начинается с создания генетической конструкции и ферментации для экспрессии рекомбинантного белка и заканчивается получением активного очищенного белка в конечный продукт. Одним из перспективных применений генетической инженерии являются гибридные белки. Гибридные белки, полученные в результате слияния двух генов, могут выполнять несколько терапевтических функций в одной молекуле. Так, например, в одну белковую молекулу были объединены фактор некроза опухоли (ФНО), обладающий противоопухолевым действием и альфа-тимозин-1, который стимулирует клетки иммунной системы. Полученный гибрид (ФНО-Т), состоящий из 185 аминокислот, используется в РФ в качестве лекарственного препарата для лечения рака молочной железы в комплексной терапии с химиопрепаратами. Аминокислотная последовательность гибридного белка ФНО-Т:

MetSerArgThrProSerAspLysProValAlaHisValValAlaAsnProGlnAla
GlyGluGlnLeuGlnTrpLeuAsnArgArgAlaAsnAlaLeuLeuAlaAsnGly
ValGluLeuArgAspAsnGlnLeuValValProSerGluGlyLeuTyrLeuIleTyr
SerGlnValLeuPheLysGlyGlnGlyCysProSerThrHisValLeuLeuThrHis
ThrIleSerArgIleAlaValSerTyrGlnThrLysValAsnLeuLeuSerAlaIle
LysSerProCysGlnArgGluThrProGluGlyAlaGluAlaLysProTrpTyrGlu
ProIleTyrLeuGlyGlyValPheGlnLeuGluLysGlyAspArgLeuSerAlaGlu
IleAsnArgProAspTyrLeuAspPheAlaGluSerGlyGlnValTyrPheGlyIle
IleAlaLeuIleAspMetSerAspAlaAlaValAspThrSerSerGluIleThrThrLysAsp
LeuLysGluLysLysGluValValGluGluAlaGluAsn

Курсивом выделена последовательность, соответствующая тимозину-альфа1, жирным шрифтом - фактору некроза опухолей-альфа.

Получение рекомбинантного белка в *E. Coli* включает в себя несколько этапов:

- 1) Трансформация экспрессионного штамма *E. Coli* плазмидой, содержащей гены белков
- 2) Культивирование
- 3) Очистка белка
- 4) Проверка первичной последовательности белка
- 5) Оценка активности очищенного белка

Для получения гибридного белка в больших количествах использовалась генетическая плазмидная конструкция, которая несёт два гена одновременно ФНО и тимозина, также в конструкции имеется два гена антибиотирезистентности: один из них ген бета-лактамазы,



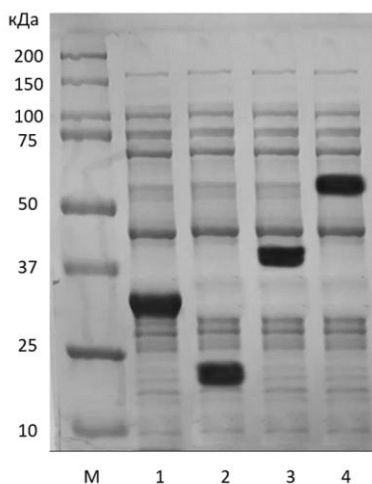


секретируемый фермент, который разрушает антибиотики пенициллинового ряда, например ампициллин, второй - ген аминогликозидфосфотрансферазы - несекретируемый фермент, который инактивирует антибиотики аминогликозидного ряда, например канамицин. Полученную конструкцию необходимо трансформировать в компетентные клетки *E. coli* экспрессионного штамма BL21. Для получения компетентных клеток клетки штамма BL21 растят в течение ночи в жидкой питательной среде. После чего разводят в 100 раз и растят в шейкере-инкубаторе при 37 °C до оптической плотности равной 0,2-0,3 при длине волны 590 нм. Если оптическая плотность более 0,3 культуру разводят свежей питательной средой до 0,1 и подрачивают 30 минут. После чего клетки центрифугируют, собирают и разводят в растворе, содержащем CaCl_2 , для проведения дальнейшей химической трансформации.

После трансформации высевают клетки на твёрдую питательную среду с добавлением антибиотика и производят отбор колоний, содержащих плазмиду. Отобранные трансформанты вносят в питательную среду, содержащую канамицин, и выращивают при оптимальных значениях pH, температуры и аэрации. Для проверки синтеза рекомбинантного белка биотехнолог отбирает пробу с последующим белковым электрофорезом в денатурирующих условиях. При этом содержание целевого рекомбинантного гибридного белка ввиду высокой степени экспрессии может составлять более 20-40 % от суммарного клеточного белка.

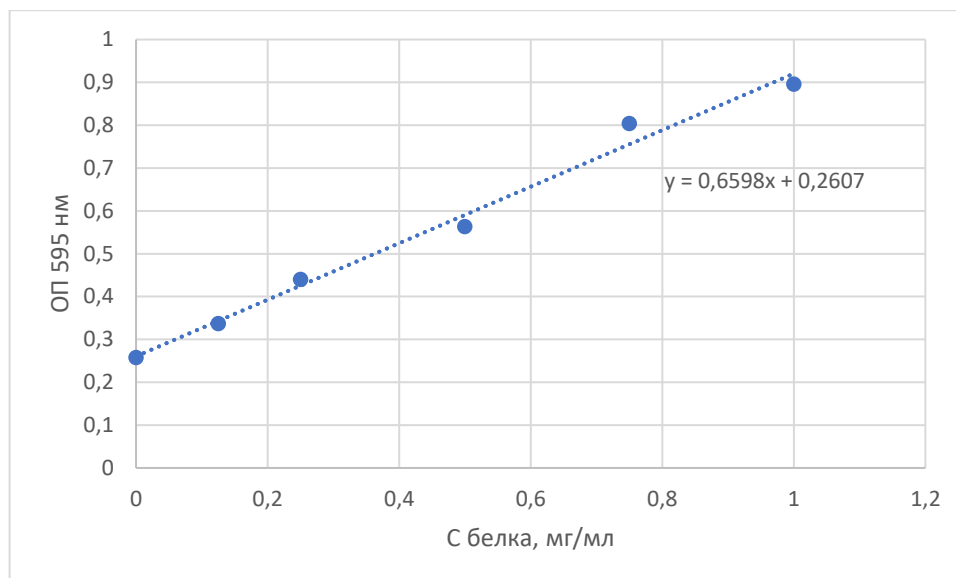
Вопросы:

1. Экспериментатор, получая компетентные клетки, недоглядел и перерастил культуру до оптической плотности 0,45 при длине волны 590 нм. Какой объём свежей питательной среды нужно добавить экспериментатору к выращенному объёму культуры 10 мл, чтобы получить компетентные клетки по инструкции?
2. Зачем необходимо использовать антибиотик в питательной среде для получения рекомбинантных белков в бактериальной системе экспрессии?
3. В чем преимущество использования в качестве антибиотика в среде для культивирования рекомбинантного штамма, продуцирующего белок ФНО-Т, именно канамицина вместо ампициллина?
4. Перед вами изображение электрофореза четырёх белковых образцов различных рекомбинантных штаммов *E. coli*. М – маркер молекулярных весов. Определите на какой дорожке находится образец штамма, экспрессирующий ФНО-Т? Ответ подтвердите расчётом.





5. Рассчитайте количество очищенного белка в мг, если его объем составил 8 мл. Концентрация белка измерена при помощи метода Брэдфорда на спектрофотометре при длине волны 595 нм. Для этого была построена калибровочная кривая зависимости оптической плотности от концентрации, представленная на рис. Оптическая плотность очищенного белка $ОП_{595} = 0,85$.



6. Выход продукта в биотехнологии — это отношение реально получаемого количества продукта из использованного сырья к максимальному количеству, которое теоретически можно получить из того же сырья. Рассчитайте выход рекомбинантного белка после очистки (в %), если его доля в общем клеточном белке 25%. Концентрация общего клеточного белка 8 мг/мл, объем 5 мл.

7. После выделения рекомбинантного белка необходимо подтвердить его первичную последовательность. Одним из таких методов является пептидное картирование. Метод включает в себя этапы ферментативного расщепления белков (часто используется трипсин или другие ферменты) до образования фрагментов с последующим разделением и идентификацией этих фрагментов. Составление пептидных карт является сравнительным испытанием, поскольку получаемая информация сравнивается со стандартным образцом, подвергавшимся аналогичному воздействию.

Определите ожидаемое количество фрагментов при пептидном картировании ФНО-Т, учитывая, что трипсин катализирует расщепление пептидных связей, образованных карбоксильными группами аргинина и лизина. За фрагмент считать не только пептидные фрагменты, но также и единичные аминокислоты.

8. Можно ли в качестве стандартного образца использовать смесь отдельных ФНО и тимозина- α ? Объясните почему.

9. Сколько пептидов образуется при обработке ФНО-Т трипсиногеном при pH 8? При обработке смеси трипсиногена и пепсина при pH 8?

10. После получения очищенного белка также необходимо проверить его активность. Предложите каким образом можно проверить активность гибридного белка ФНО-Т?

Для расчетов принять среднюю молекулярную массу аминокислот равной 110,6 Да. При расчетах округляйте ответ до сотых.





Ответы:

1. Общий объем $V = 10 \cdot 0,45 / 0,1 = 45$ мл. **1 балл**
Добавляемый объем $V = 45 - 10 = 35$ мл. **1 балл**
2. Антибиотик используется для поддержания клеток, содержащие плазмиду. Те клетки, которые не содержат плазмиду, не секретируют белок, следовательно в среде для культивирования их не должно быть, так как при их наличии количество белка будет меньше. Чтобы уменьшить количество таких клеток необходимо добавлять антибиотик. В среде с антибиотиком будут расти только клетки, которые экспрессируют белок. **2 балла**
3. Фермент, определяющий устойчивость к ампициллину – секретируемый, следовательно он будет поступать в культуральную среду и будет уменьшать концентрацию антибиотика, что может привести к увеличению клеток, не несущих плазмиду. Это уменьшит количество синтезируемого белка. В отличие от бета-лактамазы аминогликозидфосфотрансфераза – несекретируемый фермент, следовательно он не будет уменьшать количество канамицина в среде. **2 балла**
4. Образец под номером 2. Масса белка составляет $110,6 \times 185 = 20461$ Да = 20,46 кДа. Выбираем дорожку, в котором мажорный белок имеет примерно, такую массу. **2 балла**
5. Определяем по калибровочной кривой концентрацию белка, подставляя значение OD_{595} в уравнении: $(0,85 - 0,2607) / 0,6598 = 0,89$ мг/мл. **1 балл**
Масса белка: $0,89 \text{ мг/мл} \times 8 \text{ мл} = 7,12 \text{ мг}$. **1 балл**
6. Максимальное количество, которое теоретически можно получить из лизата $8 \text{ мг/мл} \times 5 \text{ мл} \times 0,25 = 10,00 \text{ мг}$. **1 балл**
Выход белка равен: $\frac{7,12 \text{ мг}}{10 \text{ мг}} \times 100 \% = 71,20 \%$ **1 балл**
7. 19 фрагментов. **2 балла**
8. Нет, так как при этом образуется разное количество фрагментов и с отличающимися молекулярными массами. **2 балла**
9. 0 в обоих случаях. **2 балла**
10. Для оценки активности гибрида ФНО-Т важно проверить функциональную активность двух составляющих белка (ФНО и тимозина):
 - Оценка противоопухолевой активности на линии раковых клеток
 - Оценка иммуномодулирующей (или пролиферирующей) активности на интактных клетках тимуса, селезенки и лимфатических узлов. **2 балла**



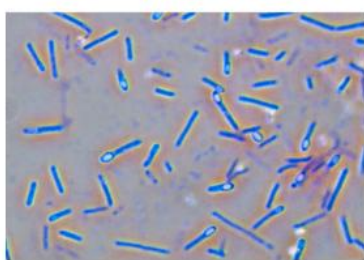


Вопрос 4. Микробиология 20 баллов

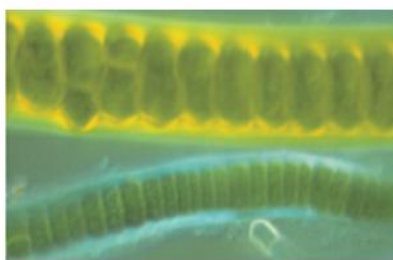
Будильник! Взял, понимаешь, и пошёл!
 — Это мой тифозный час пробил, —
 пошутил Юрий Андреевич
 Б. Пастернак «Доктор Живаго»

Риккетсии (*Rickettsia*) – мелкие ($0,3 \times 2,0$ мкм) грамотрицательные палочковидные, не образующие жгутиков бактерии, которые являются внутриклеточными паразитами. Они передаются различными членистоногими (вши, блохи, клещи) и вызывают такие заболевания как сыпной тиф (*R. prowazekii*, *R. typhi*), пятнистая лихорадка Скалистых гор (*R. rickettsii*), клещевые риккетсиозы (*R. sibirica*, *R. conorii*, *R. parkeri*). Типичное поражение, вызываемое риккетсиями, — васкулит, возникает в эндотелиальном слое сосудистой стенки, где микроорганизм находят чаще всего. Повреждение сосудов кожи приводит к появлению характерной сыпи, отеку и кровоизлияниям, связанным с повышением капиллярной проницаемости. В ходе эволюции риккетсии уменьшили размер своего генома и избавились от многих генов, участвующих в различных метаболических процессах. Для культивирования их выращивают в желточных мешках или в культуре тканей.

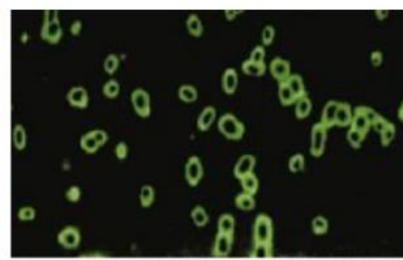
1. В книге иммунолога и вирусолога Франка Бернета «Вирius как организм» (1946) можно прочитать: «Несомненно, что структура риккетсий и более крупных вирусов значительно сложнее структуры мелких вирусов». Предположите почему раньше ученые относили риккетсий к вирусам?
2. Тиф — собирательное название некоторых инфекционных заболеваний, сопровождающихся нарушениями сознания на фоне сильной лихорадки и интоксикации. Помимо сыпного тифа (переносчики – вши) существуют брюшной тиф с алиментарным путем заражения (возбудитель – подвижная бактерия *Salmonella Typhi*) и возвратный тиф с трансмиссивным путем заражения (возбудитель – спирохеты рода *Borrelia*). Определите на каком рисунке представлен возбудитель сыпного тифа? При помощи какого метода микроскопии было получено это изображение?



1



2



3



4



5

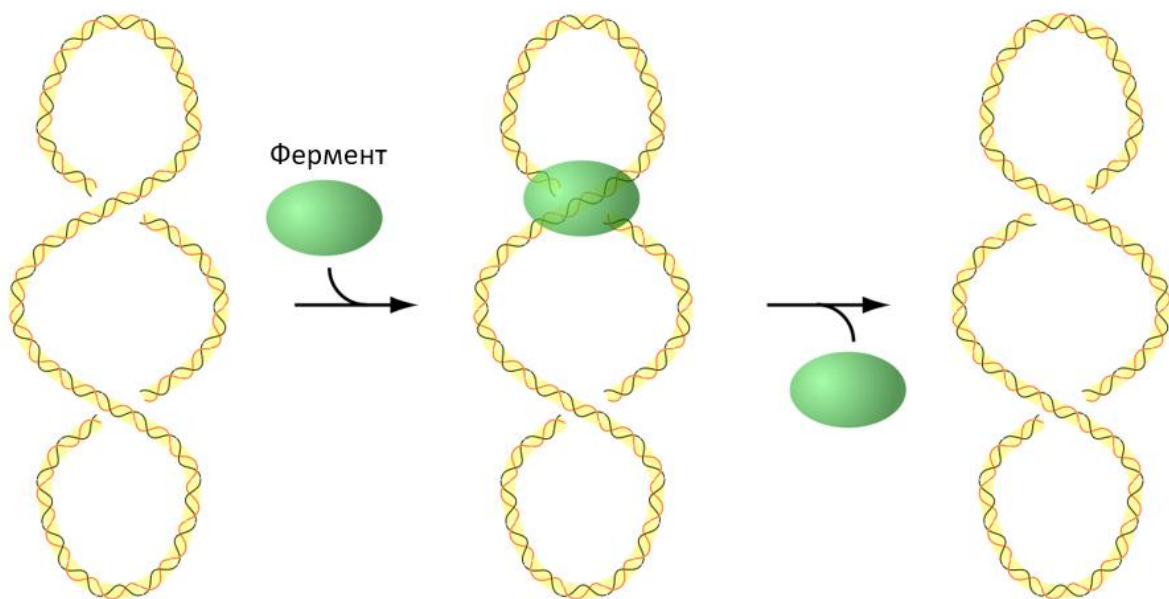


6

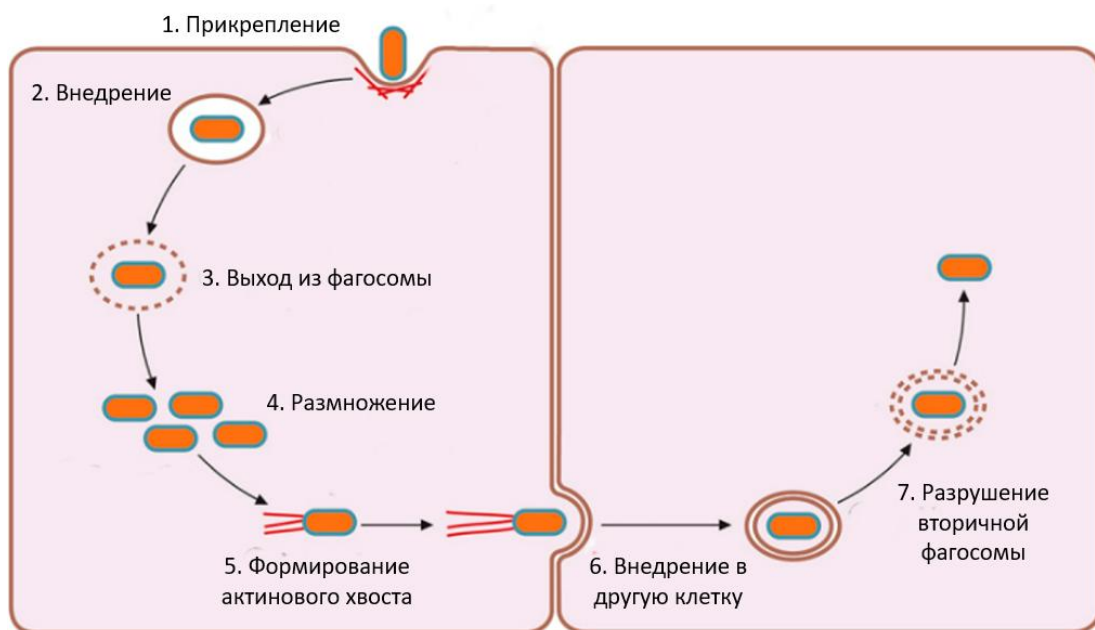




3. На каких из рисунков находятся возбудители брюшного и возвратного тифа. Ответ объясните.
4. Укажите название методов микроскопии, при помощи которых были получены изображения возбудителей брюшного и возвратного тифов.
5. Для борьбы с заболеваниями, вызванными риккетсиями, используют различные антибиотики. Перед вами схема действия бактериального фермента, активность которого блокирует один из антибиотиков. Назовите этот фермент и процесс.



6. Напишите название как минимум двух составляющих клеточных покровов риккетсий.
7. Известно, что, находясь внутри клетки хозяина, они используют хозяйский пируват. Ферменты какого процесса отсутствуют у риккетсий? Какое соединение не могут утилизировать риккетсии при отсутствии этого метаболического пути?
8. Перед вами схема жизненного цикла *R. rickettsii* внутри клетки хозяина.





Выберите два верных утверждения:

- 1) При внедрении в клетку *R. rickettsii* необходимы фосфолипазы
 - 2) На этапе внедрения риккетсии используют элементы цитоскелета хозяина
 - 3) Для репликации ДНК риккетсии используют ДНК-полимеразу эукариот
 - 4) Фосфолипазы риккетсии необходимы для того, чтобы разрушить фагосому
 - 5) Для проникновения в новую клетку риккетсии используют микротрубочки хозяина
 - 6) *R. rickettsii* обладают подвижностью вне клетки хозяина
9. На страницах произведений русской литературы можно встретить многочисленные упоминания о сыпном тифе. Это связано с тем, что наибольшее распространение заболевания отмечается во время войн, социальных и природных потрясений, на фоне которых происходят действия произведений. Например, в романе Бориса Пастернака «Доктор Живаго» при описании подготовки главных персонажей к поездке на поезде есть следующие строки: «От них сильно пахло керосином, которым, ..., были густо смазаны у них щиколотки, запястья и шеи». Поясните с какой целью герои использовали керосин и смазывали именно эти места?
10. В какое время года чаще всего происходили эпидемии сыпного тифа? Объясните почему.

Ответы:

1. Риккетсии не способны размножаться вне клеток хозяина, из-за отсутствия некоторых метаболических путей, которые есть у обычных бактерий. По этой причине для их выращивания используют желточный мешок или культуры тканей, так же, как и для вирусов. Маленький размер. **2 балла**
 2. Рисунок 3. Иммунофлуоресцентная микроскопия. **2 балла**
 3. Возбудитель брюшного тифа – рисунок 6. Бактерия, обладающая жгутиками, то есть является подвижной. **1 балл**
- Возбудитель возвратного тифа- рисунок 4. Спирохеты – бактерии со спирально закрученными клетками. **1 балл**
4. Электронная микроскопия (рисунок 6) и микроскопия в темном поле (рисунок 4). **2 балла**
 5. ДНК-гираза (топоизомераза). Репликация. **2 балла**
 6. Муреин, липополисахариды (ЛПС), внешняя мембрана. **2 балла**
 7. Гликолиз. Глюкоза. **2 балла**
 8. 2 и 4. **2 балла**
 9. Керосин, обладая сильным запахом, действует на переносчиков сыпного тифа – вшей как репеллент. Смазывая перечисленные **открытые** места, герои защищались от перемещения вшей от других людей. **2 балла**
 10. Эпидемии сыпного тифа происходили в холодное время года (конец осени, зима, начало весны). Это связано, во-первых, с большой скученностью людей, во-вторых, с использованием тёплой одежды, в которой могут развиваться вши, в-третьих, со снижением санитарной гигиены. **2 балла**

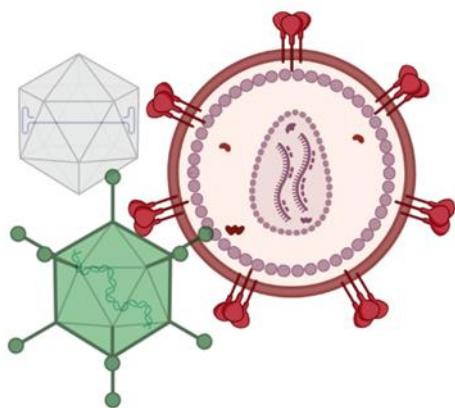




Вопрос 5. Вирусология / биотехнология 20 баллов

*...и как-то без непрошенных советов ведь жили,
да и дальше проживём.
У каждого из нас внутри есть вектор,
и по нему мы мыслим и идём.*
© Анна Островская 419

Вирусные векторы



В.1. В современной биотехнологии, в научных лабораториях, в фармакологии и медицине все шире используются так называемые вирусные векторы.

1. Есть ли принципиальные отличия вирусного вектора от вируса как такового?
2. Какие составные части позволяют отнести молекулярно-биологические объекты к вирусным векторам и использовать их в этом качестве?

В.2. Очевидно, что смысл использования вирусных векторов в том, чтобы использовать преимущества вирусов, такие как эволюционно оптимизированная способность эффективно проникать в целевые клетки и доставлять туда свой геном, с последующей экспрессией кодируемых генов, но при этом избежать развития продуктивной инфекции. Однако, мы уже достаточно давно используем в лабораториях и в медицине вирусы (для создания вакцин), неспособные вызывать заболевание, хотя и сохраняющие способность размножаться в клетках хозяина.

1. О каких вирусах идёт речь и чем они отличаются от большинства используемых при создании вакцин вирусных векторов?
2. Почему в качестве вакцин последние могут быть более предпочтительным вариантом*?

**в контексте вакцин речь идёт только о не-интегрирующихся вир. Векторах*

В.3

1. Один из удобных векторов, используемых повсеместно в биологических научных лабораториях, - это плазмиды. Это удобный и достаточно безопасный инструмент, позволяющий в том числе экспрессировать различные генетические конструкции в клетках эукариот (при наличии соответствующих промоторов). Однако *in-vivo* они используются мало, уступая вирусным векторам. Чем Вы можете это объяснить?





2. В последние годы популярность получают так-называемые РНК-вакцины. В чем состоят основополагающие различия с рекомбинантными векторными вакцинами (на основе вирусных векторов)? Какое (функциональное) сходство можно указать?

В.4. В вирусологии, как и в других биологических науках, применяют такое понятие, как тропизм.

1. Какое значение вкладывается в этот термин применительно к вирусам?
2. Чем может определяться тропизм вирусов и вирусных векторов?

В.5. Одной из характеристик, различающих разные группы вирусов, является наличие и отсутствие у них способности встраивать собственный геном в геном хозяина. Некоторые из применяемых вирусных векторов по данному параметру не отличаются от базового вируса.

1. Попробуйте привести примеры типов (по исходному вирусу) вирусных векторов, которые НЕ ОТЛИЧАЮТСЯ по данному параметру от "родительских" вирусов? Примеры обратной ситуации?
2. Как это свойство сказывается на использовании вирусного вектора по назначению в целевых клетках?

В.6. В продолжение предыдущей темы:

1. Какие потенциальные риски могут быть связаны с использованием вирусных векторов, способных к интеграции в геном клетки?
2. Как может повлиять интеграция вирусного генома на экспрессию клеточных генов?

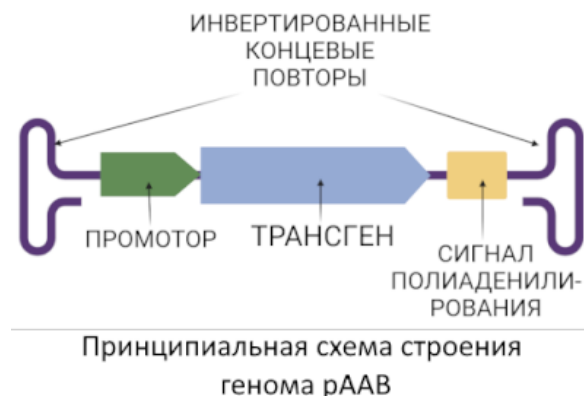
В.7. Итак, обычно вирусные векторы лишены некоторых (в ряде случаев - почти всех) генов и различных других генетических элементов базового вируса. Поскольку реплицироваться такие конструкции обычно уже не могут, для сборки большинства вирусных векторов используют плазмиды, содержащие будущий "геном". В специализированных клетках продуцируются белки вирусных оболочек, капсида и пр., в которые упаковывается геном вирусного вектора, тем или иным способом извлекаемый или преобразовываемый из соответствующей плазмиды.

1. Некоторые элементы, кодируемые в геноме исходного вируса, обычно сохраняют во всех вирусных векторах. Подумайте, какие элементы являются минимально необходимыми.
2. Как вы полагаете, какие соображения определяют выбор элементов генома исходного вируса, которые необходимо сохранить в вирусном векторе?

В.8. Одним из популярных типов вирусных векторов являются аденовирусные векторы. Эти векторы часто используются при создании, например, противовирусных вакцин.

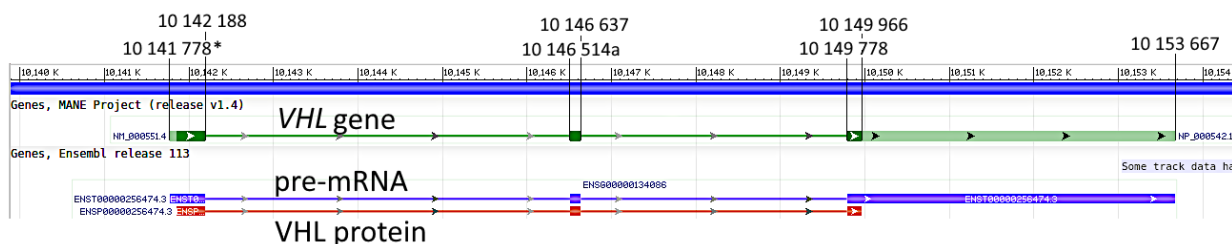
1. Чем Вы можете объяснить их популярность в данной области?
2. Какие сложности возникают и какие способы их преодоления Вам известны?





В.9. Аденоассоциированные вирусы (ААВ) способны интегрировать свой геном в локус AAVS1 (19q13.42) на 19-й хромосоме человека. В интеграции принимают участие продукты гена REP вируса ААВ, не входящие в состав вириона.

1. Подумайте, почему ААВ может встраиваться в геном хозяина, а векторы на его основе (рААВ) такой способностью не обладают?
2. Как Вы можете видеть на схеме, в геноме рААВ отсутствуют гены, кодирующие белки капсида. Однако вирусный вектор должен обладать капсидом, чтобы быть функциональным. Откуда могут браться эти белки при сборке вирионов рААВ?



* Положение относительно начала хромосомы в основаниях

В.10. Попробуем решить небольшую ситуационную задачу. Вам дано задание осуществить эксперимент по дополнительной экспрессии (оверэкспрессии) гена VHL (von Hippel-Lindau tumor suppressor) в одной из линий эукариотических клеток под управлением CMV-промотора и соответствующего энхансера (в сумме - около 500 оснований). В качестве "доставщика" решено использовать вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (рААВ). Максимальная длина последовательности, которую можно вставить в такой вектор, составляет около 4700 оснований. При превышении этой длины эффективность упаковки вирионов критически снижается вплоть до невозможности собрать полноценные вирионы в сколько-нибудь значимом проценте. Посмотрите на схему гена на изображении и попробуйте ответить на следующие вопросы:

1. Почему данный ген нельзя поместить в рААВ? Каким образом можно было бы уменьшить длину последовательности, которую нужно внедрить в вектор без изменения продукта этого гена?
2. Позволило бы изменение длины последовательности, упомянутое в первом пункте, поместить ее в рААВ? Как на ответ повлияло бы дополнительное условие - в векторе будет использован уже имеющийся там собственный сигнал полиаденилирования, добавляющий 480 оснований к длине вставляемой последовательности, а из последовательности гена сигнал полиаденилирования можно не использовать.





Ответы:

1.1. Принципиальных отличий, по сути, нет. Любой вирус также можно считать вирусным вектором. Обычно вирусные вектора отличаются тем, что не содержат факторов патогенности исходных вирусов, а также, часто, урезанный геном вируса, лишенный генов, необходимых для развития продуктивной инфекции. Помимо этого, вирусные векторы обычно содержат какие-либо привнесенные генетические конструкции, которые необходимо доставить в целевые клетки. **1 балл**

1.2. Для функционирования в качестве вирусного вектора, объект должен как-минимум содержать вирусные факторы проникновения в клетку - внешняя оболочка вируса (для оболочечных), капсид для безоболочечных. Кроме того, обычно необходимо сохранение исходных или наличие модифицированных рецептор-связывающих элементов вируса (белки, гликопротеины). Необходим собственно геном - состоящий обычно из вирусных и привнесенных генетических элементов. **1 балл**

2.1. Речь об аттенуированных вирусах, традиционно получавшихся последовательными пассажами вирусов дикого типа в маловосприимчивых организмах. В результате такие вирусы приобретали случайные мутации, снижающими патогенность для обычного хозяина. Однако, в отличие от большинства вирусных векторов, целенаправленно лишенных возможности размножаться в клетках путем удаления ключевых генов, они обычно сохраняют способность реплицироваться в целевых клетках и инфицировать новые клетки. **1 балл**

2.2. Вирусные векторы могут быть предпочтительнее в качестве вакцин т.к. 1) не могут реинфицировать окружающие клетки, что позволяет лучше контролировать иммунный ответ 2) практически не могут спонтанно приобрести вирулентность, в отличие от аттенуированных вирусов, для которых вероятность этого ненулевая (отбирающиеся в результате повторного инфицирования клеток хозяина мутации, возвращающие вирулентность (с низкой вероятностью), события рекомбинации с вирусами дикого типа при совместном инфицировании клеток хозяина и пр.) **1 балл**

3.1. В отличие от векторов на основе вирусов, плазмиды не имеют активных механизмов проникновения в клетку, что резко снижает их эффективность *in vivo*. К тому же время их персистирования в большинстве клеток (соответственно, экспрессии трансгена), невелико (для справки: за исключением специально модифицированных клеток, где некоторые плазмиды с доп. *ori* могут реплицироваться в эписомальном состоянии). У вирусных векторов, в первую очередь, интегрирующихся оно значительно больше. **1 балл**

3.2. К основополагающим различиям следует отнести различия в кодируемой информации (в РНК-вакцинах обычно кодируется только целевой антиген, тогда как "геном" вирусных векторов всегда содержит дополнительные вирусные элементы, плюс управляющие элементы для регуляции экспрессии трансгена), а также различия в химическом составе (у РНК-вакцин обычно имеются липиды в виде липидных наночастиц, внутри которых инкорпорирована собственно мРНК, тогда как вирусные векторы в составе имеют сложно структурированные нуклеопротеиновые капсиды, некоторые - липидно-белковые внешние мембраны). К тому же у вирусных-векторов имеется такое свойство, как тропизм - специфичность в отношении клеток, в которые осуществляется доставка, которого очевидно нет у РНК-вакцин. Морфофункциональное сходство можно увидеть в наличии у тех и у других внешней оболочки, позволяющей более эффективно проникать в клетку - собственно липидная оболочка у РНК-вакцин и вирусные оболочки у вирусных векторов. **1 балл**





4.1. Тропизм применительно к вирусам - свойство последних избирательно инфицировать определенные типы клеток определенных организмов. **1 балл**

4.2. В первую очередь тропизм вирусов и вирусных векторов определяется рецептор-связывающими структурами на их поверхности, специфичными в отношении тех или иных поверхностных клеточных рецепторов. В случае вирусных-векторов свой вклад могут вносить, например, ткане-специфичные промоторы. **1 балл**

5.1. Очевидными примерами вирусных векторов, сохраняющих способность к интеграции, являются ретровирусные вектора в общем (например, векторы на основе MLV и др.) и векторы на основе лентивирусов, в частности. Также как и базовые вирусы, сохранили неспособность к интеграции аденовирусные векторы, большинство вариантов герпесвирусных векторов (*для справки: кроме специально модифицированных гибридных векторов и некоторых из векторов на основе герпесвирусов человека шестого типа*). **1 балл.**

5.2 Помимо невозможности использовать некоторые типы вирусов, например в клинике, это свойство в первую очередь влияет на продолжительность экспрессии генетической конструкции, которую внесли в вектор. Интегрирующиеся вирусы/векторы в состоянии провируса реплицируются вместе с "хозяйской" ДНК и сохраняются после многочисленных делений клетки, что позволяет им продолжительное время экспрессировать "трансген" на более или менее неизменном уровне. Наоборот, вирусы/векторы не интегрирующиеся (например, сохраняющиеся в эписомальном состоянии) сравнительно быстро "разводятся" с делениями клетки и их концентрация падает, из-за чего общий уровень экспрессии целевой конструкции достаточно быстро снижается. **1 балл**

6.1. Главный риск – инсерционный мутагенез, когда интеграция вирусного генома может нарушать структуру и функцию клеточных генов или каких-либо экспрессируемых последовательностей, что может привести, например, к инактивации генов, серьезному нарушению их структуры со сдвигом рамки, инсерциям и делециям, другим проблемам. **1 балл**

6.2. Встраивание вирусного генома, например, в области регуляторных участков перед геном или поблизости от оных может приводить к изменению уровня экспрессии клеточных генов (в том числе - потенциальных онкогенов и пр.), например, из-за влияния промотора и/или энхансера из привнесенной с вектором генетической конструкции. **1 балл**

7.1. Минимально необходимыми являются элементы, обеспечивающие избирательную упаковку генома вирусного вектора в капсид. Таковые элементы должны присутствовать в любых таких векторах. Например, инвертированные терминальные повторы аденоассоциированных вирусов и т.п. **1 балл**

7.2. В ранних вирусных векторах оставляли многие гены исходных вирусов, удаляя только те, без которых вирус не мог реплицироваться в целевых клетках и реинфицировать новые клетки. В дальнейшем стараются удалить максимум возможного из генома исходного вируса, чтобы сделать вектор не только неспособным к репликации, но и максимально снизить вероятность любой рекомбинации с вирусом дикого типа, возвращающей вектору свойства вируса. Оставляют только те элементы, без которых невозможна сборка вирусных частиц, способных инфицировать целевые клетки. В специализированных случаях могут быть сохранены регуляторные или кодирующие элементы генома базового вируса, позволяющие, например, управлять экспрессией трансгена. **1 балл**





8.1. Популярность аденовирусных векторов при создании вакцин связана в высокой эффективностью трансдукции целевых клеток (доставки в клетку), безопасностью (помимо, прочего, они не являются интегрирующимися, а значит не вызывают инсерционного мутагенеза), довольно высокой иммуногенностью - аденовирусные частицы стимулируют врожденный и адаптивный, как гуморальный, так и клеточный иммунные ответы, в результате чего иммунная система быстро и эффективно обучается распознавать и атаковать не только сам вектор, но и кодируемые в векторе антигены. Имеет значение и относительно невысокая сложность получения. **1 балл**

8.2. Однако высокая иммуногенность может одновременно создавать определенные сложности: может снижаться эффективность повторного использования вектора в том же организме из-за развития выраженных иммунных реакций против белков самого аденовируса, препятствующих его функционированию в качестве вектора. К тому же, у многих людей уже есть "опыт" взаимодействия (а значит имеется и иммунитет) с природными аденовирусами. В качестве простого решения можно использовать относительно более редкие серотипы (Ad26, ChAdOx1) или аденовирусы других видов (шимпанзе и пр.), различные серотипы аденовируса для повторных введений. **1 балл**

9.1. Встраивание ААВ обеспечивается действием продуктов кодируемого вирусом гена REP. Эти продукты не входят в состав вириона и должны быть синтезированы в целевой клетке. Поэтому рААВ, геном которых лишен этого гена, оказываются лишены любого источника этих белков и не могут быть встроены. **1 балл**

9.2. Для ответа на этот вопрос необходимо указать, что сборка рААВ проводится обычно с использованием плазмид, содержащих в себе копию генома будущего рААВ. В эти плазмиды, соответственно, также не включена последовательность генов CAP, последние предоставляются в транс-положении на дополнительных плаزمиде. **1 балл**

10.1. Если мы обратим внимание на координаты начала и конца гена, то легко определим, что его общая длина составляет чуть менее 12 кб, что заведомо превышает максимальную "емкость" капсида рААВ.

Уменьшить последовательность, подлежащую вставке, без изменения кодируемого белка можно, практически, единственным способом - "удалив" из состава гена интроны. **1 балл.**

10.2. Учитывая указанные координаты экзонов, мы можем подсчитать, что длина сплайсированной мРНК составит всего чуть более 4400, что уже вполне могло бы подойти для рААВ вектора если бы не необходимость добавить к этой длине еще 0.5 кб - промотор + энхансер. Суммарная длина последовательности опять превышает максимально допустимую для эффективной упаковки.

Тем не менее, если мы посмотрим на карту гена, то можем увидеть, что большую часть от длины его мРНК составляет 3' НТО (нетранслируемая область гена) - порядка 3.7 кб. Учитывая, что по дополнительному условию в векторе уже присутствует собственный сигнал полиаденилирования, то мы вполне можем не добавлять 3' НТО в вектор, ограничив вставляемую последовательность на 3' конце терминирующим кодоном (он расположен около точки 10 149 966). В этом случае, мы будем вставлять в вектор только кодирующую последовательность гена (за исключением короткой последовательности перед стартовым кодоном). Длина кодирующей последовательности менее 0.7 кб, что в сумме с 0.5 кб от промотора/энхансера и 0.5 кб от сигнала полиаденилирования из вектора составляет порядка 1.7 кб. Эта длина уже с большим запасом помещается в выбранный вирусный вектор. **1 балл**

