

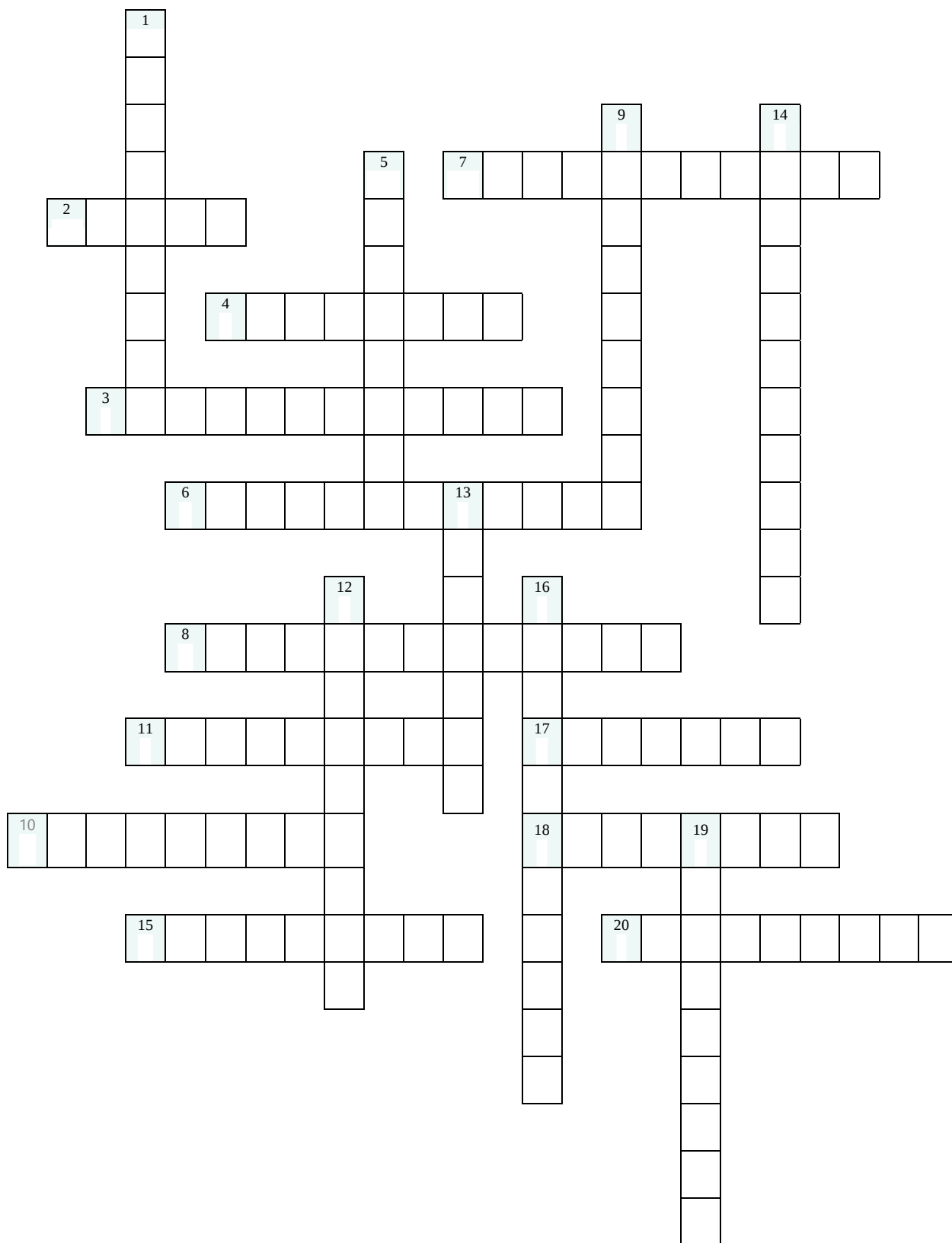


Пироговская олимпиада для школьников по биологии.

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
3. Стадия развития трипаносоматид, характеризующаяся короткой ундулирующей мембраной
4. Стационарная стадия профазы первого деления при овогенезе
6. Тип бластулы, формирующийся при полном равномерном дроблении
7. Ферменты BamHI и EcoRI относят к этой группе гидролитических ферментов (ответ привести во множественном числе)
8. Группа животных из стрекающих - паразиты рыб, ранее относившиеся к простейшим –
10. Из лизатов амёбоцитов этого животного выделяют реактив для определения эндотоксина в лекарственных препаратах
11. Плод пастушьей сумки
15. Мутация в гене этого белка приводит к синдрому Марфана
17. Листья этого растения имеют крипты – углубления, выстланные устьицами с кроющими трихомами
18. Система соприкасающихся клеточных стенок и межклеточного вещества, которая образует непрерывную сеть по всему растению
20. Часть плодового тела гриба, несущая на поверхности тонкий спороносный слой

По вертикали

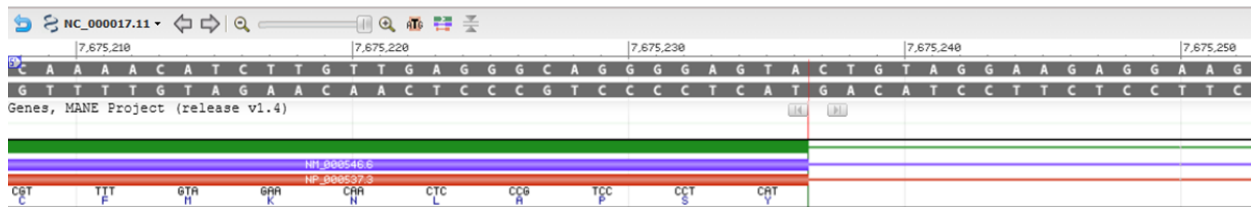
1. Часть лимбической системы
5. Образовательная ткань растений, в которой закладываются боковые корни
9. Личинка полихет
12. Птица из семейства пастушковых с альтернативным названием - дергач
13. Вид инфузии
14. Процесс активации сперматозоида
16. Структура головного мозга, в которой находятся орексигенные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





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:

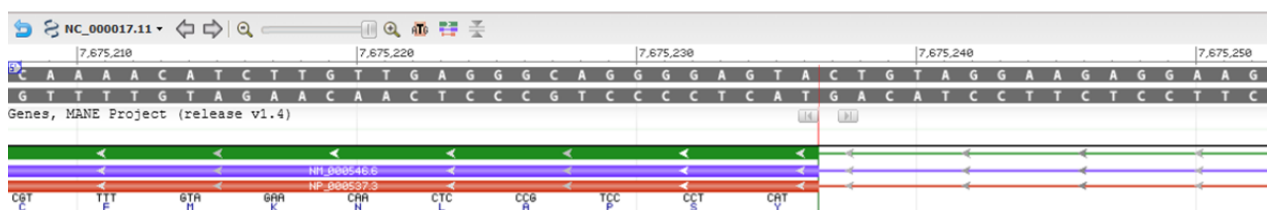
MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDL
LSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPSWPLSSSVPSQKT
YQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTQCPVQLWVDSTPPPGTRVRAM
AIYKQSQHMTDEVVRRCPHHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLLDRNTFRHSVVV
PYEPPEVGSDCTTIHYNMCMSSCMGMNRRPILITITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCA
CPGRDRRTEENLRKKGEPRHNPSTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRG
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:





Вопрос 3. Биотехнология 20 баллов

Скращения рук, скращения ног,
Судьбы скращения.
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,



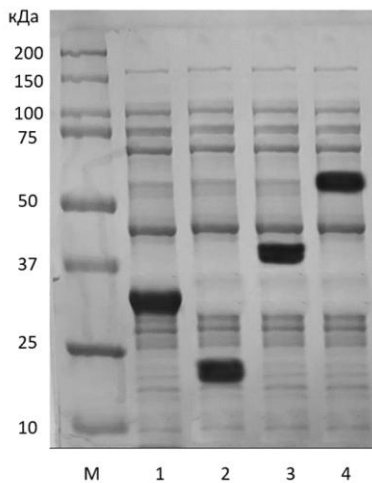


секретируемый фермент, который разрушает антибиотики пенициллинового ряда, например ампициллин, второй - ген аминогликозидфосфотрансферазы - несекретируемый фермент, который инактивирует антибиотики аминогликозидного ряда, например канамицин. Полученную конструкцию необходимо трансформировать в компетентные 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 подращивают 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.

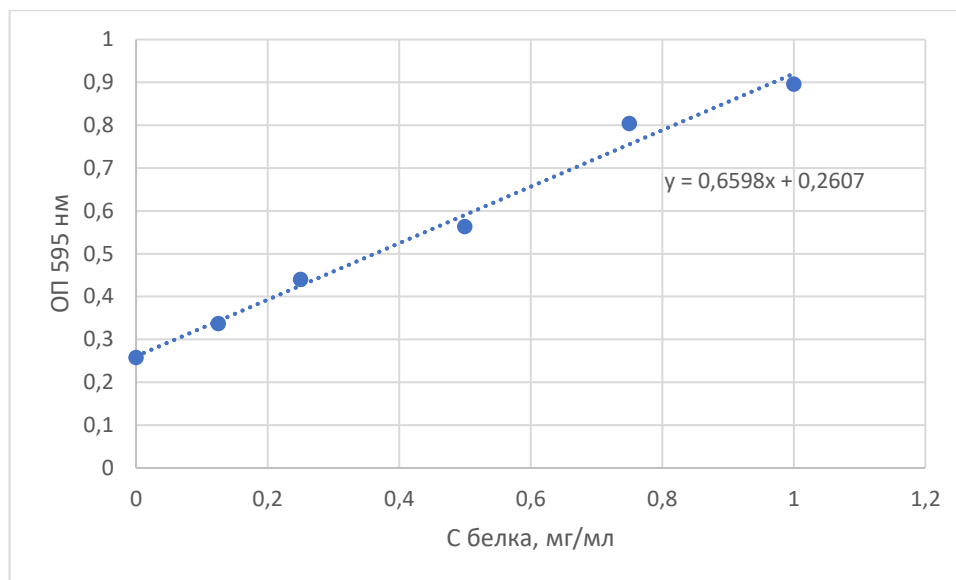
Вопросы:

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.



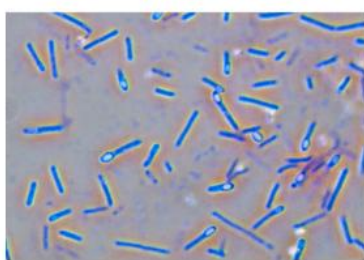


Вопрос 4. Микробиология 20 баллов

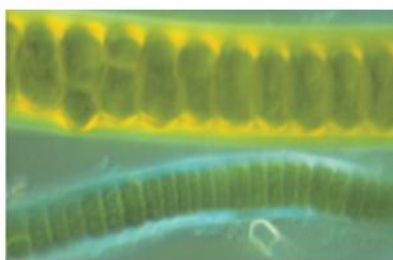
Будильник! Взял, понимаешь, и пошёл!
 — Это мой тифозный час пробил, —
 пошутил Юрий Андреевич
 Б. Пастернак «Доктор Живаго»

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.

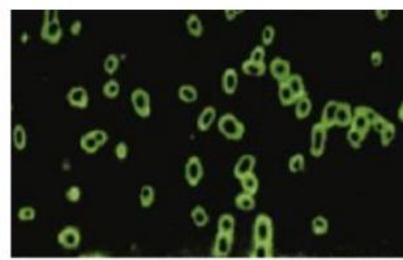
1. В книге иммунолога и вирусолога Франка Бернета «Вирius как организм» (1946) можно прочитать: «Несомненно, что структура риккетсий и более крупных вирусов значительно сложнее структуры мелких вирусов». Предположите почему раньше ученые относили риккетсий к вирусам?
2. Тиф — собирательное название некоторых 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

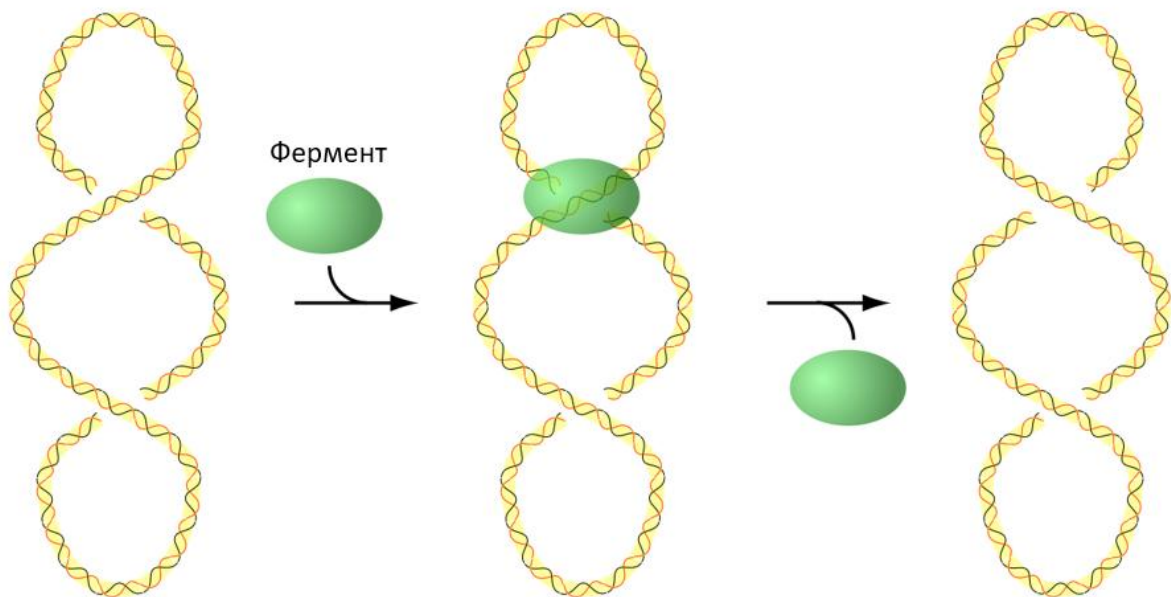


6

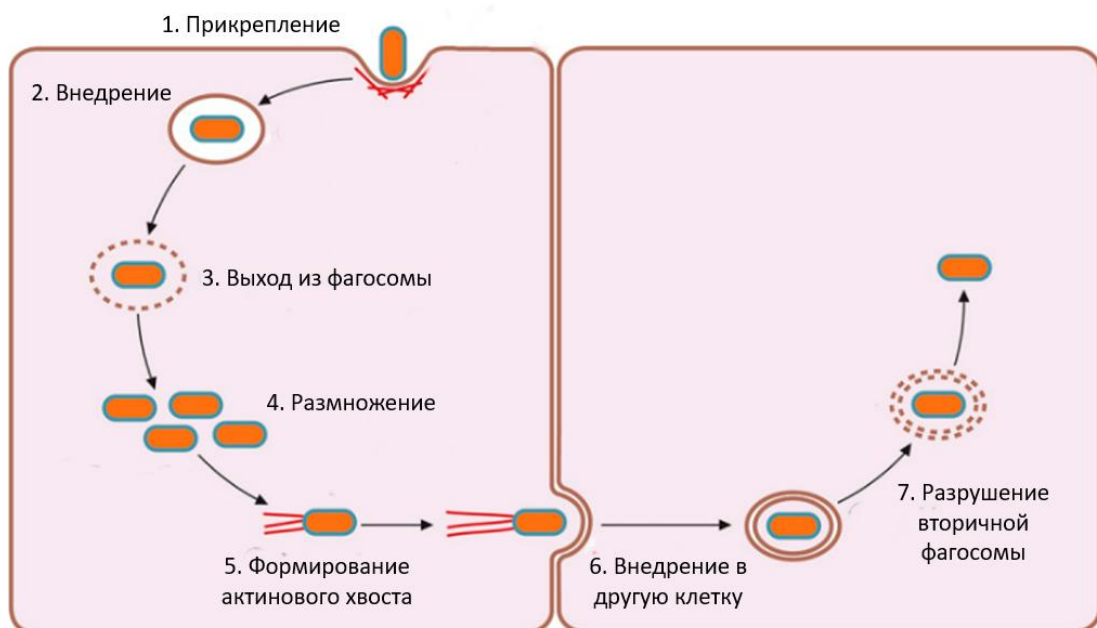




3. На каких из рисунков находятся возбудители брюшного и возвратного тифа. Ответ объясните.
4. Укажите название методов микроскопии, при помощи которых были получены изображения возбудителей брюшного и возвратного тифов.
5. Для борьбы с заболеваниями, вызванными риккетсиями, используют различные антибиотики. 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.





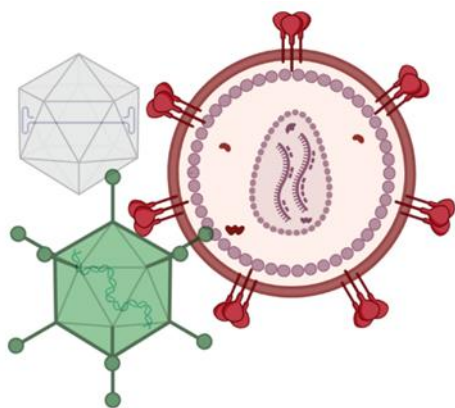
Вопрос 5. Вирусология / биотехнология 20 баллов

*...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?

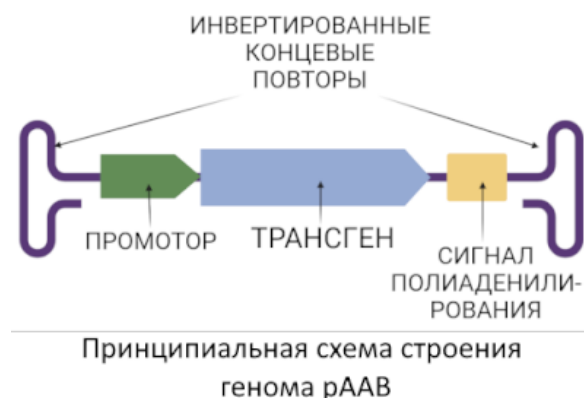
В.7. Итак, обычно вирусные векторы лишены некоторых (в ряде случаев - почти всех) генов и различных других генетических элементов базового вируса. Поскольку реплицироваться такие конструкции обычно уже не могут, для сборки большинства вирусных векторов используют плазмиды, содержащие будущий "геном". 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.

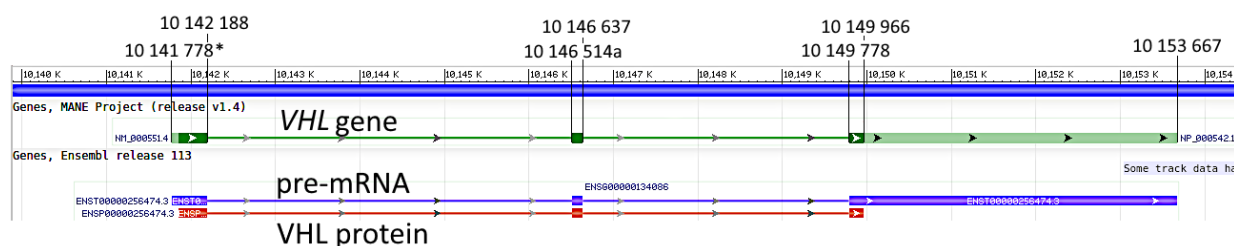
1. Чем Вы можете объяснить их популярность в данной области?
2. Какие сложности возникают и какие способы их преодоления Вам известны?





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.

