

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Пермский федеральный исследовательский центр
Уральского отделения
Российской академии наук

<p>СОГЛАСОВАН Директор «ИЭГМ УрО РАН» д.м.н. <u>Гейн С.В.</u> «04» <u>апреля</u> 2022 г.</p>	<p>Утверждаю Директор ПФИЦ УрО РАН академик РАН Д.А. Барях <u>04» апреля</u> 2022 г.</p>
--	--



Программа кандидатского экзамена по специальности 1.5.11.
«МИКРОБИОЛОГИЯ»

Пермь, 2022

МЕСТО ПРОКАРИОТОВ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ МЕГАСИСТЕМЕ. БИОРАЗНООБРАЗИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОКАРИОТОВ

Тема 1. Биоразнообразие и современная классификация прокариотов. Глобальная таксономическая инициатива (Global Taxonomic Initiative). Коллекции микробных культур – фундаментальная основа разработки новой методологии и новых концепций в систематике микроорганизмов

Известное микробное разнообразие (состояние, потенциал, стратегия сохранения) в свете Конвенции о биологическом разнообразии (The Convention on Biological Diversity) и Повестки дня на XXI век (Agenda XXI). Глобальная таксономическая инициатива (Global Taxonomic Initiative), способствующая усилению роли таксономии в изучении и охране биологического разнообразия. Проблема детекции некультивируемых организмов в микробных сообществах. Принципы построения филогенетических систем, отражающих эволюционные связи организмов. Внедрение новых хемотаксономических и молекулярно-биологических методов исследования. Формирование широкой сети децентрализованных коллекций микробиологических генетических ресурсов. Значение для развития бактериальной систематики микробных коллекций и создаваемых компьютерных баз данных, позволяющих аккумулировать и анализировать большие массивы различной информации о микроорганизмах.

Тема 2. Вопросы гармонизации используемой терминологии

Формализация понятий "Систематика", "Классификация", "Таксономия", "Идентификация", "Номенклатура". Толкование терминов различными исследователями, как то: Г.А. Заварзин, Г. Шлегель (H.G. Schlegel), Г. Симпсон (G.G. Simpson), Р.Р. Сокол (R.R. Sokal) и др. Естественные (филогенетические) и искусственные классификации. Международный Кодекс номенклатуры бактерий (International Code of Nomenclature of Bacteria) как собрание принципов, правил и рекомендаций, ставящих цель унификации научных названий и разработки точной системы номенклатуры бактерий. Концепция номенклатурного типа. Правила присвоения и изменения названий бактерий. Цитирование названий. Международный Комитет по систематике бактерий (International Committee on Systematic Bacteriology - ICSB). Одобренный список наименований бактерий (Approved Lists of Bacterial Names) и его дополнения. Международный журнал по систематике и эволюционной микробиологии (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology - IJSEM). 01 января 1980 года как новый рубеж в развитии систематики бактерий. Определитель бактерий Берги (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology). Всемирный справочник коллекций культур (World Directory of Collections of Cultures of Microorganisms).

Тема 3. Определение статуса бактериального вида

Хронология международных микробиологических и бактериологических конгрессов. Типовая концепция вида. "Рабочая" концепция вида. Популяционная концепция бактериального таксона. Определение статуса бактериального вида как совокупность штаммов с высоким уровнем сходства последовательностей ДНК, а также фенотипических признаков. Таксономическое определение вида бактерий с использованием полифазного подхода, при котором первостепенную роль играет 70%-ный уровень ДНК/ДНК-сходства.

Тема 4. Иерархический и эколого-трофический принцип конструирования макросистем. Многоцарственные системы

Категория "Царства" в системе организмов. Концепция доменов. Концепция прокариотной и эукариотной клеточной организации. История понятий "Прокариоты" и "Эукариоты". Филогенетический аспект концепции прокариот и эукариот. Таксономический аспект концепции прокариот и эукариот. Иерархический и эколого-трофический принцип конструирования макросистем. Оценка таксономического статуса организмов, причисляемых к мезокариотам. Прото-эукариотный предок. Мегатаксономия Р. Уиттеккера (R.H. Whittaker). Многоцарственные системы А.Л. Тахтаджяна, Н.Н. Воронцова, Л. Маргулис (L. Margulis), Г. Лидейла (G.F. Leedale), Т. Кавалье-Смита (T. Cavalier-Smith). Концепция пространства логических возможностей, предложенная Г.А. Заварзиным.

Тема 5. Открытие архей – крупнейшее достижение современного естествознания XX века

Истоки концепции. Работа Г. Фокса с соавт. "Филогения прокариот" (Fox G.E. *et al.* The Phylogeny of Prokaryotes, 1980). Молекулярные основы организации архей. Фенотип и генотип архей: сравнительно-эволюционный аспект. Проблема анцестора в хронологической последовательности. Прогенотная гипотеза К. Везе (C.R. Woese) и Г. Фокса (G.E. Fox). Гипотезы термоплазменного анцестора Д.Серчи (D.G. Searcy) и О.Кандлера (O. Kandler). Гипотеза универсального анцестора А. Вайса (A. Wais). Гипотеза археобактериального анцестора Д.А. Прангишвили. Альтернативный вариант гипотезы анцестора и макросистемы, предложенный В.Н. Гутиной. Филогенетическая структура домена *Archaea*.

Тема 6. Основные этапы истории развития систематики бактерий

Морфологический подход к систематике. Классификация бактерий Ф. Кона (F. Cohn). "Естественные" классификации бактерий С. Орла-Йенсена (S. Orla-Jensen), А. Фишера, Э. Клойвера (A. Kluyver), Р. Стениера (R.J. Stanier) и К. Ван-Нила (C.B. Van Niel), К. Биссета (K.A. Bisset), С.Н. Виноградского, М. Бейеринка (M. Beijerinck), основанные на применении морфо-физиологических критериев. Принцип номенклатурных типов в систематике и приоритета в номенклатуре.

Тема 7. Новые направления в бактериальной систематике

Нумерическая или численная таксономия бактерий: история, теоретическая основа. Анализ результатов адансоновых классификаций: преимущества и недостатки. Молекулярно-биологическая оценка систематической близости организмов. Связь нуклеотидного состава ДНК бактерий с их положением в систематике. Метод молекулярной гибридизации ДНК (или ДНК/РНК). Методы анализа рибосомальных генов. Сопоставление разрешающей способности различных методов генетического анализа и уровней рангов таксонов, на которых выявляется родство. Геносистематика бактерий как новая область систематики, базирующаяся на сравнительном анализе геномов по определению нуклеотидного состава ДНК и способности гомологичных ДНК и РНК к гибридизации.

Тема 8. Семантиды в филогении бактерий и перспективы систематики прокариот

Новый принцип изучения филогении: концепция Э. Цукерландля (E. Zuckerlandl) и Л. Полинга (L. Pauling). Семантиды в филогении бактерий. Генетические признаки: нуклеотидный состав ДНК и степень генетической гомологии, выявляемые методом гибридизации ДНК/ДНК или ДНК/рРНК и исследованием нуклеотидных последовательностей в олигонуклеотидах 16S рРНК; сравнение последовательностей 5S рРНК. Перспективы бактериальной систематики. "Экологизация" бактериальной систематики. Протеобактерии (*Proteobacteria* Stackebrandt, Murrey and Truper 1988): экологический принцип в систематике прокариот.

Тема 9. Концепция филогенетического дерева для прокариот

Филогенетические деревья и их интерпретация. рРНК – всеобщий филогенетический маркер. Алгоритмы для построения филогенетических деревьев. Факторы, влияющие на топологию (порядок ветвления) филогенетических деревьев.

Тема 10. Современные методы фенотипического анализа. Техника идентификации

Признаки, используемые для классификации и идентификации. Современные методы их исследования. Приемы фенотипического анализа. Фенотипические признаки: морфологические, культуральные, физиологические. Методология таксономии, получившая наименование "Хемотаксономия". Анализ химических признаков клеток прокариот как инструмент таксономии. Хемотаксономические признаки. Тип строения клеточной стенки в качестве таксономического маркера при выделении таксонов бактерий высокого ранга. Классификация пептидогликанов. Состав и структура пептидогликанов. Состав и структура отдельных липидов бактериальных клеток. Миколовые кислоты. Типы фосфолипидов, характеризующихся присутствием компонентов, имеющих диагностическое значение. Гликолипиды. Простые жирные кислоты. Переносчики электронов как инструмент таксономического и филогенетического анализа: цитохромы, дыхательные хиноны, убихиноны, родохиноны, менахиноны, бензотиофенхиноны. Полиамины как полезные маркеры для химической классификации прокариот. Иммунохимические методы. Иммунодиффузионный анализ в видовой диагностике прокариотных организмов. Метод флуоресцирующих антител и его применение для ускоренной детекции и идентификации эубактерий *in situ*. Техника идентификации: основные правила, практические шаги, постановка дифференцирующих тестов.

Тема 11. Домен *Archaea*

Понятие доминиона (домена от англ. domain). Филогенетическая структура домена *Archaea*. Фила AI *Crenarchaeota* – кренархеоты, креноты (от греч. - ключ, источник и – древний, примитивный), включающее экстремальных термофилов (другие названия – эоциты, термоацидофилы, серные анаэробные археобактерии), обитающих в горячих (55-100° С) кислых (рН 1-3) источниках. Фила AII *Euryarchaeota* – эвриархеоты (от греч. evrus – широкий, обширный и archeos – древний, примитивный): метаногены, образующие метан из углекислого газа и водорода; экстремальные галофилы, живущие в рассолах высокой концентрации; термофил *Thermococcus*. Сульфатредуцирующий термофил *Archaeoglobus fulgidus*. Фантомная фила "*Korarchaeota*" – корархеоты, некультурабельные археи горячих источников, описанные только на основе фило типа (*candidatus*). Новая

фила "*Nanoarchaeota*" (лат. nanus – карлик и греч. archaios – древний, «карликовый археот»).

Тема 12. Домен *Bacteria*

Филогенетическая структура домена *Bacteria*. Основные эволюционные линии внутри домена, выявленные по результатам анализа 16S-rРНК. Филогенетические взаимосвязи между различными таксонами. Филы бактерий: фила VI *Aquificae*, фила VII *Thermotogae*, фила VIII *Thermodesulfobacteria*, фила XIV "*Deinococcus-Thermus*", фила XV *Chrysiogenetes*, фила XVI *Chloroflexi*, фила XVII *Thermomicrobia*, фила XVIII *Nitrospirae*, фила XIX *Deferribacteres*, фила XX *Cyanobacteria* (оксигенные фототрофные бактерии), фила XXI *Chlorobi* (аноксигенные фототрофные зеленые одноклеточные бактерии), фила-гигант XXII *Proteobacteria* (гетеротрофных грамотрицательных бактерий или дидермных прокариот по R. Gupta, 1998), фила-гигант XXIII *Firmicutes* (фирмикут с низким молярным содержанием ГЦ в ДНК), фила-гигант XXIV *Actinobacteria* (гетеротрофных грамположительных бактерий или монодермных прокариот), фила XXV *Planctomycetes*, фила XXVI *Chlamydiae*, фила XXVII *Spirochaetes*, фила XXVIII *Fibrobacteres*, фила XXIX *Acidobacteria*, фила XXX *Bacteroidetes*, фила XXXI *Fusobacteria*, фила XXXII *Verrucomicrobia*, фила XXXIII *Dictyoglomi*, новая фила "*Gemmatimonadetes*", фантомные филы бактерий.

Литература

Основная:

Пиневиц А.В. Микробиология. Биология прокариотов: Учебник. В 3 т. Том 1. – 2-е изд. – СПб.: Изд-во С.-Петреб. Ун-та, 2007. – 352 с.

Рекомендуемая:

Захарова Н.Г., Вершинина В.И., Ильинская О.Н. Микробиология в определениях и иллюстрациях. Казань: Изд-во "Фэн" Академии наук ТР. 2012. 799 с.

Ившина И.Б., Пшеничных Р.А., Оборин А.А. Пропанокисляющие родококки. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1987. 125 с.

Калакуцкий Л.В., Агре Н.С. Развитие актиномицетов. М.: Наука, 1977. 285 с.

Каталог штаммов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов / Под ред. И.Б. Ившиной. М.: Наука, 1994. 163 с.

Нестеренко О.А., Квасников Е.И., Ногина Т.М. Нокардиоподобные и коринеподобные бактерии. Киев: Наук. думка, 1985. 336 с.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Edition. Garrity G.M. (ed). 2001–2009. The second edition is being published in 5 volumes: V. 1. (2001) The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria. Editor-in-Chief: George M. Garrity. Editors: David R. Boone, Richard W. Castenholz. Vol. 2. (2005) The Proteobacteria. Editor-in-Chief: George M. Garrity. Editorial Board: Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley. Vol. 3. (2008) The low G+C Gram-positive Bacteria. Editors: Paul De Vos, George Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer, William B. Whitman. Vol. 4. (2008) The Planctomycetes, Spirochaetes, Fibrobacteres, Bacteroidetes and Fusobacteria. Editors: Brian Hedlund, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Bruce J. Paster, James T. Staley, Naomi Ward, William B. Whitman. Vol. 5. (2009) The high G+C Gram-positive Bacteria. Editors: Hans-Jürgen Busse, Michael Goodfellow, Peter Kämpfer, Wolfgang Ludwig, James T. Staley, Ken-ichiro Suzuki, William B. Whitman.

Biology of *Rhodococcus*. H.M. Alvarez (ed.). In: Microbiology Monographs. A. Steinbüchel (series ed.). V. 16. 2010. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 365 pp.

Delong E.F., Pace N. Environmental diversity of *Bacteria* and *Archaea* // Syst. Biol. 2001. V. 50 (4). P. 470–478.

Methods in Microbiology. First edition. Vol. 38. Taxonomy of Prokaryotes. Edited by F. Rainey, A. Oren. 2011. Elsevier Ltd.

The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Third Edition. Vol. 3. Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, S. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt. 2006. Springer Science Business. LLC.

Vandamme P.A.R. Taxonomy and classification of bacteria // *In*: Manual of Clinical Microbiology. 10th edition. 2011. V. 1. Section II: Bacteriology. P. 213–227.

«МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ МЕТАБОЛИЗМА МИКРОБНЫХ КЛЕТОК»

Тема 1. Введение в предмет

Химическая микробиология - составная часть микробиологии. Основные этапы развития химии и биохимии микроорганизмов. Вклад российских и зарубежных ученых в изучение биохимических процессов у микроорганизмов. Химическая активность микроорганизмов как основа поддержания равновесия окружающей среды. практического использования в медицине и ветеринарии, развития промышленных биотехнологий.

Тема 2. Молекулярная организация микроорганизмов

Методы изучения состава и молекулярной организации микроорганизмов. Главные и минорные биоэлементы, их источники, свойства и функции в клетках. Химия малых и больших молекул.

Тема 3. Химическое строение и функции основных структур и компартментов микроорганизмов

Структурное разнообразие химических компонентов клеточных стенок. архитектура взаимодействия слоев оболочек бактериальных клеток. Запасные вещества микроорганизмов, особенности строения и локализации в клетках. Электрохимия клеточной поверхности микроорганизмов.

Тема 4. Проницаемость микроорганизмов

Природа, механизмы и особенности процессов переноса растворенных веществ у микроорганизмов. Специфические пермеазы, связывающие белки, активный транспорт, транслокация групп. Роль периплазматического пространства и мембран в организации транспортных процессов. Белки - порины и транспортеры. Семейства систем транспорта веществ внутрь клеток и экспорта в окружающую среду. Энергетические источники трансмембранного перемещения веществ. Симпорт, антипорт, унипорт. Специфические системы транспорта железа у микроорганизмов.

Тема 5. Химические факторы среды, определяющие жизнедеятельность микроорганизмов

Пути утилизации микроорганизмами из окружающей среды соединений углерода, азота, серы и фосфора - источников энергии и пластического материала. Витамины и их производные как важнейшие активаторы метаболизма микроорганизмов.

Тема 6. Факторы негативного влияния на жизнеспособность микроорганизмов

Антибиотические соединения: ингибиторы биосинтетических и энергетических процессов, мембранотропные факторы. Бактериоцины, микроцины и низкомолекулярные

пептидные факторы антагонизма микроорганизмов в конкурентной борьбе за источники питания и пространство. Антиметаболиты.

Тема 7. Химические факторы межклеточного взаимодействия в популяциях микроорганизмов

Рецепция химических сигналов на поверхности прокариотических клеток и механизмы ответных реакций в двухкомпонентных сигналтрансдуцирующих системах микроорганизмов. Химическая природа феромонов микроорганизмов. Динамика окружающей среды под влиянием микроорганизмов.

Тема 8. Формирование микроорганизмами пластического материала для биосинтеза клеточных полимеров

Пути биосинтеза аминокислот у азотфиксаторов. Образование пулов аммиака и "активной" серы, предшественники и синтез синтез аминокислот различных семейств. Цепи синтеза мононуклеотидов пиримидинового и пуринового ряда. Система тиоредоксина в биосинтезе дезоксирибонуклеотидов. Пути биосинтеза липидов, синтаза жирных кислот. Ферменты десатурации и ветвления жирных кислот. Синтез фосфатидов и липоконъюгатов.

Тема 9. Биогенез углеводов, изопреноидов и резервных соединений у микроорганизмов

Образование глюкозы у автотрофных (фотосинтез) и гетеротрофных (глюконеогенез) микроорганизмов. Глиоксилатный шунт как донор оксалоацетата для биосинтетических процессов. Особенности структуры и биосинтеза гликогена. Эпимеризация глюкозы при синтезе полисахаридов. Биосинтез гликана и хитина у дрожжей. Биосинтез изопреноидов и их роль в образовании гликопротеидов, пептидогликанов, липополисахаридов и тейхоевых кислот, участие долихофосфата в синтезе дрожжевого маннана. Биохимия полифосфатов: реакции утилизации пирофосфата и биосинтеза различных видов полифосфатов, разнообразие путей утилизации энергии полифосфатов. Реакции образования поли-β-та-оксиалканоатов. Биохимия пигментов микроорганизмов. Кометаболиты.

Тема 10. Аэробное расщепление веществ микроорганизмами

Ключевые ферменты распада углеводов по путям Эмбдена-Мейергофа-Парнаса, Варбурга-Диккенса-Хорекера, Энтнера-Дудорова. Функционирование полного и разорванного цикла Кребса. Комплексы дегидрогеназ альфа-кетокислот. Цикл дикарбоновых кислот. Метилцитратный цикл. Окисление оксалата. Пути окисления свободных и разветвленных жирных кислот. Расщепление азотистых оснований нуклеиновых кислот до глиоксилата, углекислоты, аммиака, ацетил- и малонил-КоА. Процессы вне- и внутриклеточного протеолиза, пути дезаминирования и декарбоксилирования аминокислот, подготовки их углеродных цепей для утилизации в реакциях трикарбонового цикла. Производные коэнзима ацилирования и кетокислоты как промежуточные продукты превращений аминокислот.

Тема 11. Расщепление веществ микроорганизмами в анаэробных условиях

Пируват как центральный продукт анаэробных превращений веществ в микроорганизмах: дисмутация пирувата пируватоксидазой, системы лактат-оксидазы, пируват: ферредоксин-оксидоредуктазы, пируват:формиат-лиазы, метилмалонил-КоА: пируват-транскарбоксилазы. Структура и биологические функции ферредоксина.

Фумаратредуктаза. Реакции субстратного фосфорилирования, опосредованные ацильными производными коэнзима А. Коферментные функции биотина, тетрагидрофолата и кобамидных производных в анаэробных процессах. Межвидовая передача водорода. Лактат-сульфатное брожение. Метановое брожение. Диссимиляционное восстановление сульфата. Анаэробное расщепление аминокислот. Реакции Стиклэнда. Сбраживание азотистых оснований.

Тема 12. Генетический контроль метаболических процессов

Индивидуальность ДНК микроорганизмов. Факторы, влияющие на строение, степень спирализации и функциональную активность ДНК. Структура регулонов. Индукция и репрессия синтеза ферментов продуктами метаболических цепей. Ферментативно активные РНК. Плазмидные детерминанты процессов кометаболизма и резистентности к факторам среды.

Тема 13. Механизмы посттрансляционного формирования функциональной активности белковых молекул

Пострибосомальные модификации синтезированных полипептидных цепей. Наведение функциональной активности белковых молекул в системе сопровождающих белков. Энергоемкость функционирования шаперонов. Роль циклического 3,5-АМФ в реализации феномена катаболитной репрессии. Аллостерическая регуляция активности ключевых ферментов метаболизма. Изоферменты. Ковалентная обратимая модификация белков и ферментов. Каскадные переходы обратимого изменения структуры ферментов в системе регуляции активности глютаминсинтетазы. Энергетический заряд клеток как интегральный регулятор метаболизма и жизнеспособности микроорганизмов.

Литература

Основная:

Микробиология: Учебник для студ. биол. специальностей вузов/ М.В.Гусев, Л.А. Минеева. – 4-е изд., стер. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 464 с.

Биологическая химия. Учеб. для хим., биол. и мед. спец. вузов/ Кнорре Д.Л., С. Д. Мызина; - М., «Высш. Шк.», 2003. - 480 с.

Дополнительная:

Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений/ Нетрусов А.И., М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; под ред. А. И. Нетрусова – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

«МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА ПРОКАРИОТ С ОСНОВАМИ МУТАГЕНЕЗА»

Тема 1. Предмет курса.

Основные понятия: геном, хромосомальная и плазмидная ДНК; оперон. структурные и регуляторные гены, промоторные и операторные участки ДНК. транскрипция, регуляция экспрессии генов; репликация ДНК, мутации и генетические рекомбинации, механизмы репарации ДНК; транспозоны; молекулярно-генетические методы (клонирование ДНК, гибридизация, полимеразная цепная реакция, секвенирование ДНК, и др.).

Тема 2. Строение и свойства нуклеиновых кислот.

Компоненты ДНК. Структура А, В, С и Z формы ДНК, которые обеспечивают им выполнение главной биологической роли - хранение и перенос информации.

Сопряженность процессов наследования признаков, рекомбинации и инициации транскрипции с изменением топологической структуры ДНК. Биологическая роль суперспирализации ДНК. Участие комплекса ферментов в формировании структуры ДНК. Способ хранения информации в дублированном виде, который позволяет репарировать повреждения ДНК и унифицировать механизм репликации. Денатурация и ренатурация ДНК.

Тема 3. Синтез ДНК.

Репликон - единица репликации. Единство и разнообразие механизма репликации ДНК вирусов и бактериофагов, бактерий и эукариот. Моно-, бинаправленная репликация. Структура *ori*-района, механизм блокирования репликации. Репликация генома *E. coli*. Ферментативные активности ДНК-полимераз прокариот. Полунепрерывный синтез ДНК (фрагменты Оказаки). Образование праймосомы - важный момент инициации синтеза ДНК.

Тема 4. Мутации. Системы защиты ДНК.

Молекулярная основа мутаций. Точечные мутации - транзиции и трансверсии. Мутации сдвига рамки считывания, делеции, инсерции. Природа "горячих точек". Реверсии и супрессорные мутации. Комплиментация, цис, транс, доминантная и рецессивная мутация. Генетическая рекомбинация. Генетические характеристики штаммов микроорганизмов, использующихся в молекулярно-биологических и генетических исследованиях. Краткое описание генотипов модифицированных штаммов *E. coli*. Генетическая селекция, прототрофы, ауксотрофы. Принципы регистрации мутаций. Спонтанный мутагенез. Индуцированный мутагенез. Системы рестрикции и модификации у бактерий. Системы репарации *E. coli*. Механизмы репарации повреждений ДНК. SOS-ответ.

Тема 5 Синтез РНК (транскрипция).

РНК-полимераза *E. coli*. Субъединицы РНК-полимеразы. Физиологическая роль разных типов сигма субъединицы РНК-полимеразы. Структура бактериальных промоторов, взаимодействие сигма субъединиц с районами промотора. Консервативная последовательность в промоторах *E. coli*. Стадии инициации процесса транскрипции. Роль дополнительных факторов транскрипции. Расплавление ДНК в месте присоединения РНК-полимеразы. Транскрипционная единица. Специфический район терминации транскрипции РНК. Состав терминаторных последовательностей. ρ -зависимые и ρ -независимые терминаторы. Фактор ρ - продукты гена *rho*. Механизмы действия РНК-полимеразы и фактора ρ в процессе терминации.

Тема 6 Организация генетического материала у бактерий.

Классическая модель оперона Жакоба и Моно. Оперон, как система отношений между регуляторными белками и их сайтами мишенями. Регуляторная система *lac*-оперона. Белок-репрессор лактозного оперона. Индуцибельные и репрессибельные опероны (*lac*- и *trp*-опероны). Синтез триптофана и его регуляция в клетках *E. coli*. Индукция *trp*-оперона. Гиперсинтез триптофана. Взаимосвязь трансляции и терминации. Вторичная структура РНК и механизм аттенуации. Системы позитивного и негативного контроля. Катаболитная репрессия. БАК-белок, как фактор положительного контроля иницирования транскрипции в зависимых от него промоторах.

Тема 7 Синтез белка (трансляция).

Стадии белкового синтеза. Строение и функционирование транспортных РНК. Строение рибосом. Участок связывания рибосомы и мРНК. Белковые факторы элонгации.

Образование пептидной связи. Терминирующие кодоны на мРНК. Белковые факторы терминации.

Тема 8 Плазмиды как независимые репликоны.

Плазмиды: размеры и структура. Число копий плазмид в бактериальной клетке. Свойства плазмид. Значение плазмид в медицине и биотехнологии. Группы несовместимости плазмид. Поверхностное исключение и плазмидная несовместимость – два независимых механизма регуляции присутствия плазмид в клетке бактерии.

Тема 9 Мобильные генетические элементы - транспозоны.

Транспозоны, как основные участники эволюции генома. IS-элементы бактерий - простейший класс транспозонов. Tn-элементы, их структура и свойства. Инвертированные сегменты ДНК. Основные этапы транспозиции. Белки, участвующие в транспозиции. Использование транспозонов в исследовании ДНК. Конъюгативные транспозоны.

Тема 9 Основные методы исследования ДНК (Методы молекулярной генетики)

Основные этапы клонирования ДНК. Выделение тотальной и плазмидной ДНК. Очистка и анализ ДНК. Агарозный гель-электрофорез. Ферменты рестрикции. Рестрикция ДНК. Изоляция фрагментов ДНК из агарозных гелей. Векторные плазмиды (pBR322, pUC19). Включение ДНК в плазмидные векторы. Лигирование фрагментов ДНК. Приготовление и трансформация компетентных клеток. Высоко-эффективный метод трансформации бактериальных клеток путем электропорации. Получение геномных библиотек.

Исследование рекомбинантных ДНК. Скрининг библиотек рекомбинантных ДНК. Идентификация клонов: гибридизационный анализ, иммунологический анализ. Экспрессия клонированных генов. Методы секвенирования ДНК. Дидезоксинуклеотидный метод. Анализ последовательностей ДНК и РНК. Банки генов в системе Internet. Полимеразная цепная реакция - новый, высокоэффективный метод исследования ДНК. Прикладные аспекты генетической инженерии.

Литература

Основная:

Жимулев И.Ф. – Общая и молекулярная генетика. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во. – 2003.

Дополнительная:

Глик Б., Дж. Пастернак. Молекулярная биотехнология: Принципы и применение. - Москва: Мир. -2002.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. -1984. - 480 с

«ФИЗИОЛОГИЯ РОСТА И РАЗВИТИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ»

Введение в курс. Основные понятия.

Предмет курса и задачи физиологии микроорганизмов, значение фундаментальных закономерностей роста и развития микроорганизмов для решения биотехнологических задач. Предмет и задачи биоэнергетики, ее значение для изучения скорости и направления метаболических процессов у микроорганизмов, а также образования конечных продуктов обмена и продуктивности биосинтетических процессов в меняющихся условиях среды. История развития основных экспериментальных подходов к определению

энергетического состояния клетки. Взаимосвязь физиологии микроорганизмов и биоэнергетики, ее значение для более полного понимания структуры и функции микробной клетки.

Тема 1. Физиологические константы роста

Природные и лабораторные культуры микроорганизмов, их сходство и различие. Способы выделения чистых культур. Потребности микроорганизмов в основных питательных компонентах, питательные среды. Методы стерилизации. Классификация микроорганизмов по типу питания. Рост и культивирование микроорганизмов. Периодические культуры микроорганизмов, фазы роста, изменение состава клетки в различных фазах периодической культуры. Методы определения численности микроорганизмов в культуре. Понятие об удельной скорости роста. Основные параметры, характеризующие рост микроорганизмов (μ_{max} , время генерации, K_s , X_{max} , $Y_{x/s}$, Y_{ATP} , длительность лаг-фазы), методы их определения. Цикл деления бактериальной клетки, его регуляция. Синхронные культуры микроорганизмов как метод изучения жизненного цикла микроорганизмов. Способы получения синхронных культур.

Тема 2. Непрерывное культивирование

Непрерывное культивирование микроорганизмов. Теория хемостата, уравнения, описывающие рост микроорганизмов. Понятие о лимитирующем компоненте питательной среды. Закономерности, описывающие зависимость удельной скорости роста микроорганизмов от концентрации субстрата. Зависимость глубины лимитирования от скорости протока питательной среды. Значение констант роста микроорганизмов для правильного управления ростом микроорганизмов в условиях непрерывного культивирования. Основные принципы турбидостатного культивирования. Физиологическое состояние клеток в условиях турбидостата.

Тема 3. Структурно-функциональная организация бактериальной клетки

Морфология и строение микроорганизмов. Основные формы бактерий: кокки, палочковидные (бактерии, бациллы и клостридии), вибрионы и спириллы. Влияние факторов среды (температура, влажность, биологические факторы, состав питательной среды) на морфологию бактерий.

Цитоплазматическая мембрана, структура и физико-химические свойства фосфолипидов, полярная и неполярная области, особенности структуры жирнокислотных остатков у различных видов микроорганизмов, зависимость от температуры окружающей среды. Липидный бислой, монослой архебактерий. Клеточные стенки: строение и химический состав. Особенности строения клеточной стенки грам-положительных и грам-отрицательных микроорганизмов, механизм окраски по Граму. Пептидогликановый слой, его структурные особенности у грам-положительных и грам-отрицательных микроорганизмов, механизм действия антибиотиков на пептидогликан, сферопласты, протопласты. Периплазматическое пространство грам-отрицательных микроорганизмов, различные классы периплазматических белков, их функции, физиологическое значение периплазматического пространства. Внешняя мембрана грам-отрицательных микроорганизмов, структурные особенности. Липид А, липопротеиды, липополисахариды, строение, функции. Белки внешней мембраны, структура и транспортные функции поринов, их различные классы, зависимость соотношения различных поринов от условий культивирования. Рибосомы и полирибосомы: строение и функции. Строение жгутика. Классификация микроорганизмов по принципу расположения жгутиков. Флагеллярный мотор, структура и функции белков

флагеллярного мотора. Виды таксиса. Механизм хемотаксиса, белки, участвующие в рецепции и проведения сигнала, роль метилирования и фосфорилирования в регуляции направления вращения жгутика. Механизм септообразования у микроорганизмов, белки участвующие в этом процессе, роль Fts Z кольца в септообразовании, механизм локализации септы во время деления, спорообразования. Протопласты и сферопласты. Капсулы. Споры. Бактериальные эндоспоры, процесс спорообразования. Другие покоящиеся формы бактерий.

Структура нуклеоида микроорганизмов, его доменная организация, метаболически активная и инертная зоны нуклеоида, его динамические изменения при изменении условий культивирования. ДНК. Строение и функции. Особенности укладки нуклеоида микроорганизмов, роль гистоноподобных белков и суперскрученности ДНК в этом процессе. Кольцевая структура ДНК микроорганизмов, особенности репликации, инициация репликации, структура точки "origin", роль белка DnaA в регуляции инициации, механизм, ограничивающий репликацию. Механизм формирования репликативной вилки, синхронизация репликации и септообразования. Элонгация, лидирующая и отстающая нити ДНК, процессивность репликации, роль различных классов ДНК-полимераз в репликации и исправлении ошибок. Терминация, различные ее типы.

Световая, флуоресцентная и электронная микроскопия.

Строение эукариотических микроорганизмов. Ядро и митохондрии, строение и функции.

Получение клеточных фракций. Методы разрушения клеток, фракционирование. Выделение ДНК, РНК и мембран.

Тема 4. Механизмы транспорта веществ у микроорганизмов

Простая диффузия, зависимость процесса от энергии градиента, осмос. Облегченная диффузия, специфические транспортные белки, насыщающий характер зависимости скорости транспорта от концентрации субстрата, классы транспортируемых веществ. Первичный и вторичный активный транспорт, сходство и различие, молекулярные механизмы, энергетическое обеспечение транспорта, унипорт, симпорт, антипорт. Транслокация групп изменение химического строения транспортируемых субстратов. Фосфоенолпируват: сахар фосфотрансферазная система, механизмы функционирования, первичные и вторичные функции. Катаболитная репрессия, роль цАМФ и CAP белка в этом процессе, роль фосфорилирования белков ФТС в регуляции активности аденилатциклазы. Механизм исключения индуктора.

Тема 5. Понятие об основных видах обмена веществ у микроорганизмов

Катаболизм, амфиболизм, анаболизм, характеристика биохимических реакций, лежащих в их основе. Определение энергетического и конструктивного типов метаболизма, понятие об их сопряженности. Механизмы сопряжения энергетического и конструктивного обмена в нормальных и стрессовых условиях, роль АТФ и энергетического заряда Аткинсон в этом процессе. Роль полиаминов в сопряжении двух типов обмена в условиях стресса.

Тема 6. Особенности катаболизма углеводов у микроорганизмов

Путь Энтнера-Дудорова. Окислительный пентозофосфатный цикл. Метилглиоксальный шунт. Анаэробные реакции. Глиоксилатный цикл. Оценка энергетической "стоимости" различных путей катаболизма. Брожение. Реакции субстратного фосфорилирования. Основные механизмы регенерации пиридиновых нуклеотидов. Спиртовое брожение у дрожжей. Сравнение путей образования этанола у дрожжей и бактерий. Гомоферментативное и гетероферментативное молочнокислое брожение, характеристика микроорганизмов, вызывающих этот тип брожения. Пропионовокислое брожение, характеристика микроорганизмов, вызывающих этот тип брожения. Муравьиновокислое брожение, характеристика микроорганизмов, вызывающих этот тип брожения. Масляновокислое брожение, характеристика микроорганизмов, вызывающих этот тип брожения. Выход энергии при различных типах брожения, зависимость от условий культивирования.

Тема 7. Основные термодинамические закономерности превращения энергии у микроорганизмов

Понятие о термодинамической системе, окружающая среда, обмен энергией между системой и окружающей средой. Свободная энергия системы, изменение стандартной свободной энергии Гиббса. Зависимость направления биохимической реакции от величины стандартной свободной энергии. Понятие о сопряженных биохимических реакциях, подсчет свободной энергии сопряженных биохимических процессов в организме. Роль АТФ как основной сопряженной реакции биосинтетических процессов в организме. Основные виды энергии в клетках микроорганизмов и пути их превращения, понятие об электрохимическом потенциале протонов, условия его образования и сохранения. Хемосмотическая гипотеза Митчелла.

Тема 8. Окислительно-восстановительные реакции в микробной клетке

Понятие об окислительно-восстановительных реакциях, восстановительный потенциал, его значение в определении направления окислительно-восстановительных реакций. Пиридинзависимые дегидрогеназы, их основные свойства и функции в клетке, примеры окислительно-восстановительных реакций, катализируемых пиридинзависимыми дегидрогеназами. Баланс окисления глюкозы в цикле трикарбоновых кислот по углероду, фосфору и водороду. Флавинозависимые дегидрогеназы, их функции в клетке, примеры окислительно-восстановительных реакций, катализируемых флавиновыми дегидрогеназами. Цитохромы, строение и функции в клетке.

Тема 9. Дыхательные цепи

Сходство строения дыхательных цепей аэробных микроорганизмов и митохондрий. Структура дыхательных цепей аэробных микроорганизмов, *Paracoccus denitrificans*. Редоксцентры и переносчики первого сегмента дыхательной цепи, железо-серные белки, флавинонуклеотид. Коэнзим Q, его роль в функционировании дыхательной цепи, протонный Q-цикл. Сукцинатдегидрогеназа как второй сегмент дыхательной цепи. Коэнзим Q – цитохром C редуктаза. Цитохром оксидаза. Гипотеза петель Митчелла как механизм генерации протонного градиента. Точки сопряжения в дыхательной цепи. Отношение H/e как способ оценки энергетической эффективности работы дыхательной цепи. Дыхательные цепи факультативных анаэробов на примере *E. coli*, разветвленность на уровне первичных дегидрогеназ и конечных оксидаз и редуктаз, множественность субстратов и акцепторов. Типы хинонов, функционирующих в дыхательных цепях факультативных анаэробов, зависимость от условий среды. Основные классы переносчиков по количеству и характеру расположения субъединиц по отношению к цитоплазматической мембране. Энергетическая эффективность переносчиков, механизм

петель и протонных помп как способ генерации протонного градиента. Специфичность строения дыхательной цепи факультативных анаэробов в зависимости от субстрата и конечного акцептора электронов, энергетическая эффективность.

Тема 10. Протонные АТФазы

История открытия протонной АТФазы, ранние работы Рэкера. Электронно-микроскопическая структура АТФазы микроорганизмов, размеры комплекса. F_1 и F_0 как сегменты, представляющие каталитическую и протонпроводящую части фермента. Кинетические характеристики протонных АТФаз из различных источников, ингибиторы, используемые для изучения фермента, механизмы действия. Субъединичное строение F_1 и F_0 , характеристика отдельных субъединиц по молекулярному весу, аминокислотному составу и функциональной роли отдельных сегментов. Характер связывания нуклеотидов в каталитических некаталитических центрах. Кинетика многосайтового катализа, принципы положительной кооперативности катализа и отрицательной кооперативности связывания субстрата. Механизм энергетического сопряжения, современные представления об АТФазе как о «роторном моторе». Пути экспериментального доказательства вращения γ субъединицы в центре гексагонального $\alpha_3\beta_3$ комплекса. Субъединичный состав «ротора» и «статора». Строение с-кольца, субъединица а как протонный канал, механизм вращения с-кольца, путь прохождения протонов. Генетическая структура *unc* оперона, гены, кодирующие различные субъединицы. Принцип дифференциального использования кодона в регуляции количества субъединиц, соответствующего стехиометрии комплекса. Последовательность сборки и очередность включения отдельных субъединиц в комплекс.

Тема 11. Энергетическое сопряжение

Понятие о сопряжении дыхания, разобщители хлор-с-ср, фтор-с-ср, механизм действия, сопрягающие сегменты дыхательной цепи, дыхательная цепь как генератор энергии. Протонная АТФаза как основной потребитель протонного градиента, механизм окислительного фосфорилирования. Протонный цикл, сходство с электрической цепью. Эффективность окислительного фосфорилирования, ингибиторы АТФазы как разобщители дыхания и фосфорилирования.

Литература

Основная

1. Гусев М.В. Микробиология: Учебник для студ. биол. специальностей вузов / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 6-е изд., стер. – М.: Издательский центр «Академия», 2006. – 464 с.
2. Ян Кольман, Клаус-Генрих Рем. Наглядная биохимия: Пер. с нем. — М.: Мир, 2000. – 469 с.
3. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами Под ред. Е.С. Северина. А.Я. Николаева – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 448 с.
4. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ./Под ред. Й. Ленгеллера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. – 656 с.: ил., 16 с. цв. ил. – (Лучший зарубежный учебник)
5. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 2. Пер. с англ./Под ред. Й. Ленгеллера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. – 496 с.: ил., 24 с. цв. ил. – (Лучший зарубежный учебник)

Дополнительная

1. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. М.: Мир, 1982.
2. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978
3. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. М.: Наука, 1989
4. Николс Д.Дж. Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию. М.: Мир, 1985