

Цель программы: создать у докторанта четкую систему знаний в области геномики для использования их в сфере профессиональной деятельности.

Задачи программы: сформировать у докторанта комплекс научных знаний по основным вопросам геномики, и методам геномных исследований.

Требования к уровню знаний докторанта: иметь четкие представления о структуре и свойствах нуклеиновых кислот и белков; об основах геномики и генетической инженерии, знать молекулярные механизмы основных генетических процессов. Докторант должен владеть основами геномного анализа, быть подготовленным теоретически к использованию различных методов анализа геномов для решения задач современной генетики и практическому применению полученных результатов; развить способность четко формулировать цель и излагать свою точку зрения по проблеме, планировать и достигать результатов в научной деятельности, проявлять готовность к различным формам и видам научной деятельности.

Понятие о геноме. Геномика как наука о структуре и функционировании генома. Цели и задачи геномики. Разделы геномики (структурная, функциональная, сравнительная, эволюционная, медицинская геномика). История геномики (первый просеквенированный организм, первая просеквенированная бактерия, геном человека). Особенности геномов (размеры, эволюция). Достижения геномики (какие геномы расшифрованы, имеющиеся базы данных геномов и т.д.)

Методы геномики. Анализ генома на уровне ДНК. GWAS- Полногеномный поиск ассоциаций, как метод исследования генома человека и других организмов. Цели GWAS исследований на примере человека, для разработки новых стратегий профилактики и лечения болезней. Факторы и предпосылки разработки метода GWAS (проект Геном человека, базы данных, проект NapMap). Области применения GWAS (заболевания, фармакогенетика). Выборка групп геномов для исследования. Молекулярные методы при проведении полногеномных ассоциаций. Выявление однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs)(DNA-Chip, SNaPshot, SNPLexи т.д.). Успешные примеры исследования полногеномных ассоциаций. Примеры применения результатов GWAS на практике. Преимущества и недостатки GWAS. Альтернатива метода GWAS.

Анализ генома на уровне РНК (профилирование транскриптома). Измерение экспрессии мРНК (Northern blot, RT-PCR и др.). Высокопроизводительные методы анализа геномной экспрессии (Microarrays, cDNA-chip).

SAGE. Серийный анализ генетической экспрессии как метод качественной и количественной характеристики экспрессии транскриптов (анализ транскриптом). Два основных принципа SAGE (кДНК-метки, конкатамеризация). История создания метода. Примеры применения метода. Достоинства и недостатки метода SAGE. SuperSAGE и другие разновидности.

SSH. Вычитающая гибридизация, как метод выявления уникальных экспрессирующихся генов в сравниваемых геномах.

Differential display. Изучение дифференциально экспрессирующихся генов в сравниваемых геномах.

Редактирование геномов. Цели, задачи и возможности. Сайт специфические нуклеазы (FokI и др.). Метод "Цинковых пальцев" (Zink Finger). Принцип метода. Метод TALEN. Принцип метода, функция белков TAL (transcription activator-like effectors), особенность домена RVD (repeat-variable di-residue). CRISPR — Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, как новейший метод редактирования ДНК посредством РНК зависимых нуклеаз (самые точные ножницы генома). История обнаружения и особенность. Встречаемость в геномах организмов. Cas белки, crРНК и т.д.

Секвенирование генов и геномов. Цели, задачи и возможности. Классические методы секвенирования. Исторические предпосылки метода расшифровки нуклеотидных последовательностей (метод Максама-Гилберта, метод Сэнгера, Шотган секвенирование, BridgePCR). Метод Сэнгера модифицированный (флуоресцентные дидеоксинуклеотиды). Инструменты, технология, возможности. De novo секвенирование, Genomewalking. Ограничения и недостатки метода. Успехи, достигнутые в геномике человека и других организмов.

Технологии высокопроизводительного секвенирования. Пиросеквенирование (платформа Roche 454). Возможности, точность, преимущества и недостатки. Секвенирование путем синтеза (платформа Illumina). Возможности, точность, преимущества и недостатки. Секвенирование путем лигирования (платформа SOLiD). Возможности, точность, преимущества и недостатки. Ионные полупроводники (платформа IonTorrent). Возможности, точность, преимущества и недостатки. Новейший метод - Секвенирование молекулы в реальном времени (технология SMRT). Возможности методов (De novo секвенирование, ресеквенирование, выявление метилирования, Invitro диагностика). Анализ черновых последовательностей с применением алгоритма Phred и Phrap, программы обрезки черновых последовательностей на алгоритмах Window-based (ConDeTri, FASTX quality trimmer, PRINSEQ, Trimmomatic, SolexaQA) и Running sum (Cutadapt, ERNE-FILTER, SolexaQA-BWA).

Суперсовременные методы секвенирования ожидаемые в ближайшем будущем. Секвенирование ДНК при помощи нанопор (Nanopore DNA sequencing). Секвенирование ДНК при помощи туннельного тока (Tunnelling currents DNA sequencing). Секвенирование при помощи масс-спектрометрии. Секвенирование при помощи микроскопии. Другие методы.

Международные проекты по изучению геномов. HGP-HUGO, ENCODE, Map, TIGR Rice genome project, CGB. Другие геномные проекты. Компьютерные ресурсы по изучению геномов. R Project. Real Time Genomics (rtgVariant, rtgMetagenomics). Genomatix (Genome Analyzer, Mining Station, Gene Grid). National Center for Genome Analysis Support (ABYSS, ALLPATHS-LG, AMOS, Arachne, BEDTools, Bowtie, CD-HIT, GMap). The Genome Analysis Centre. Суперкомпьютеры для геномных исследований. Платформа SGI UV 100. Платформа Cray XE6. knoSYS 100.

Понятие об эпигеноме и эпигенетике. Цели и задачи эпигенетики. Проект «Эпигеном человека». Типы регуляции работы генов (на уровне транскрипции, пост-транскрипционная, пост-трансляционная). Типы эпигенетической модификации. Метилирование ДНК. Метилирование участков генома. Метилирование генов, CpG островки. Примеры метилирования. «Эпигенетические часы». Факторы, участвующие в метилировании ДНК (DNMT, SAM). Методы изучения метилирования ДНК. Анализ метилирования при помощи метил-чувствительных рестриктаз и Саузерн блотинга.

Бисульфитная обработка геномной ДНК. Бисульфитное секвенирование (BS). Метилспецифичная ПЦР (MSP). Фрагментный анализ на основе Methylation Sensitive Mobility Shift Assay. Секвенирование нового поколения в детекции метилирования генома. Ремоделирование хроматина (модификация гистонов). Гистонацетилтрансферазы (HATs), гистондеацетилазы (HDAC).

Виды модификаций гистонов (ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, убиквитинилирование, SUMOлирование, АДФ-рибозилирование, деаминарование, измеризация пролина). Методы изучения ремоделирования хроматина. Метод с использованием DNase I. Методы иммунопреципитации хроматина (ChIP-Chip ChIP-SAGE ChIP-PET and ChIP-Seq).

Метагеномика. Понятие об метагеномике и метагеноме. Цели и задачи метагеномики. Проект «Микробиома человека». Методы определения бактериального, вирусного, грибкового и дрожжевого состава. Типы метагеномного секвенирования. Секвенирование при помощи маркерных генов (16SrRNA и т.д.). Полногеномное секвенирование (shotgun = whole-genome = WGS). По Сенгеру (метод «обрыва цепи»). Высокопроизводительное (high-throughput sequencing) – Illumina, SOLiD, 454, Ion Torrent.

Анализ микробного состава. Работа с референсным каталогом секвенированных геномов. Метаболическая реконструкция.

Протеомика, разделы, протеомика как постгеномная технология. Цель и задачи протеомики. Каталогизация белков. Атлас белков человека. Структурная, функциональная и регуляторная протеомика. Объекты протеомных исследований. Роль протеомики в развитии современной биологии. Классификация белковых семейств. Ферменты и полиферментные системы. Регуляция активности протеома путем изменения количественного и качественного состава белков. Роль структуры белков в контроле активности протеома. Протеомная стратегия идентификации белков и анализа их структуры.

Технические средства протеомики, двумерный гель-электрофорез в полиакриламидном геле, масс-спектрометрия пептидов и белков, MALDI и Q-TOF-масс-спектрометрия. Методы разделения белков. Принципы идентификации белков из двумерного геля. Подготовка образца белка к масс-спектрометрии. Трипсинолиз белков в геле, масс-спектрометрия триптических пептидов и идентификация белка по первичной структуре фрагментов с использованием базы данных белковых структур. Принцип триптических пептидных карт и идентификация по пептидным картам. Поиск аналогов белка в базах данных, критерии идентичности экспериментальных данных с данными протеомной базы данных, критерии достоверности.

Фолдинг и созревание белков. Возможности и закономерности пространственной организации полипептидных цепей белков. Белки-шапероны, шаперонины, их структура и механизм действия биологическое значение. Компьютерный анализ белков. Белковые базы данных. Сравнение последовательностей. Ортологи. Паралоги. Ксенологи. Стандартные методы и алгоритмы предсказания белков. Протеогеномный подход к проверке предсказаний белков, программы предсказания вторичной структуры белка по аминокислотной последовательности (Pfam и др).

Филогенетические деревья. Построения филогенетических деревьев на основании полинуклеотидных и полипептидных последовательностей, использование программ Clustal W и Phylip. Выявление минимального набора жизненно важных функций, вторичные, третичные и четвертичные структуры белков. Анализ конформаций при поиске мишеней. База структур PDB. Понятие доменов в структуре белков. Моделирование структуры белка по гомологии с использованием интернет-ресурсов (SwissProt), а также различных программ (Coffee). Перспективы метаболомики. Метаболиты в клетке. Оценка достоверности данных о метаболитах. Использование баз данных по метаболитам и метаболические реконструкции. Сравнительная метаболомика.

Предмет биоинформатики и его задачи. Обработка, анализ, упорядочивание и систематизация геномных данных. Создание удобной базы данных для корректного и эффективного пользования и манипуляции геномными, белковыми и метаболомными структурами. Основы геномных анализов, разработки алгоритмов и биостатистических методов для анализа, систематизации и упорядочивания геномных и протеомных последовательностей. Нуклеотидные и белковые базы данных (GenBank, EMBL, TAIR, OMIM, EMBL, HGMD, UniGene, Ensembl, TAIR, UniProt, Swiss-Prot). Базы данных биочипов (SMD, YMD). Геномные браузеры GBrowse и JBrowse. Поиск гомологов белков и нуклеиновых кислот: BLAST. Компьютерное моделирование белков. Молекулярное взаимодействие и базы данных метаболических путей (KEGG, MetaCyc, SPAD, MPW, EMP, BRITE, EcoCyc, BioCyc). Анализ молекулярно-генетических сетей (Network Analysis) и -ОМИКс данных. Инструменты молекулярно-генетических сетей: Cytoscape. Предсказание и анализ некодирующих РНК. Платформа Galaxy Bioinformatics. Инструменты для аннотации генома: DAVID, MAKER и MAKER-P. Онтология генов (GO).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, et al. (Jun 1991). "Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project". *Science* 252 (5013): 1651–6.
2. Altmüller J, Palmer LJ, Fischer G, Scherb H, Wjst M (November 2001). «Genomewide Scans of Complex Human Diseases: True Linkage Is Hard to Find». *Am. J. Hum. Genet.* 69 (5): 936–50. DOI:10.1086/324069. PMID 11565063.
3. Andersson AF, Banfield JF (2008). «Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities». *Science* 320: 1047. DOI:10.1126/science.1157358. PMID 18497291.
4. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. (2007). «CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes». *Science* 315 (5819): 1709. DOI:10.1126/science.1138140. PMID 17379808.
5. Barski, Artem, Cuddapah, Suresh, Cui, Kairong, Roh, Tae-Young, et al. (2007). High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. "Cell", 129 (4): 823-837.
6. Bird, Adrian (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. "Genes Dev." 16: 6-21
7. Bodnar, J. W. and M. K. Bradley (1996). "A chromatin switch." *J TheorBiol* 183(1): 1-7.

8. Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, Van der Oost J (2008). «Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes». *Science* 321: 960. DOI:10.1126/science.1159689. PMID 18703739.
9. Bush WS, Moore JH (2012). «Chapter 11: genome-wide association studies». *PLoS Comput Biol* 8 (12)
10. Cartwright, I. L. (1987). "Developmental switch in chromatin structure associated with alternate promoter usage in the *Drosophila melanogaster* alcohol dehydrogenase gene." *EMBO J* 6(10): 3097-3101.
11. Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., and Kim, J.-S (2013) Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* doi:10.1038/nbt.2507
12. Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819—823
13. Couzin-Frankel J (June 2010). «Major heart disease genes prove elusive». *Science* 328 (5983): 1220–1. DOI:10.1126/science.328.5983.1220. PMID 20522751. Шаблон:Closed access
14. Crick, Francis (1970). Central Dogma of Molecular Biology. “*Nature*”, 227: 561-563.
15. Dodd IB, Micheelsen MA, Sneppen K, Thon G. (2007). "Theoretical analysis of epigenetic cell memory by nucleosome modification.". *Cell* 129 (41): 813–22. doi:10.1016/j.cell.2007.02.053. PMID 17512413.
16. Eads, Cindy A., Danenberg, Kathleen D., Kawakami, Kazuyuki, Saltz, Leonard B. (2000). *MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation*. “Oxford University Press” 28 (8): 1-7
17. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB (September 2009). «Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance». *Nature* 461 (7262): 399–401. DOI:10.1038/nature08309. PMID 19684573.
18. Gibson, Greg. Muse, Spencer V. “A primer of Genome Science”. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2009, p229-232.
19. GiedriusGasiunas, VirginijusSiksnys (2013) RNA-dependent DNA endonuclease Cas9 of the CRISPR system: Holy Grail of genome editing? *Trends in Microbiology*, 21(11), 562—567, doi: 10.1016/j.tim.2013.09.001

20. Greely HT (2007). «The uneasy ethical and legal underpinnings of large-scale genomic biobanks». *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8: 343–64. DOI:10.1146/annurev.genom.7.080505.115721. PMID 17550341.
21. Gross, David S., Garrard, William T. (1988). Nuclease Hypersensitive Sites in Chromatin. “*Ann. Rev. Biochem.*” 57: 159-97
22. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE (2005). «A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes». *PLoS Comput Biol.* 1 (6): e60. DOI:10.1371/journal.pcbi.0010060. PMID 16292354.
23. Hale, C. R., Zhao, P., Olson, S., et al. & Terns, M. P. (2009). RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*, 139(5), 945-956, doi: 10.1016/j.cell.2009.07.040
24. Hou, Z., Zhang, Y., Propson, N. E., et al. & Thomson, J. A. (2013). Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *PNAS*, 110(39), 15644-15649 doi: 10.1073/pnas.1313587110
25. Houa, Z; Zhangb,Y; Propsona, N; Howdena, S; Chua, L; Sontheimerb, E; and Thomson, J. (2013) Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *PNAS*. doi:10.1073/pnas.1313587110
26. Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., et al. and Joung, J.K. (2013) Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* ,doi:10.1038/nbt.2501
27. Iadonato SP, Katze MG (September 2009). «Genomics: Hepatitis C virus gets personal». *Nature* 461 (7262): 357–8. DOI:10.1038/461357a. PMID 19759611.Шаблон:Closed access