

# КОНСПЕКТ

за провеждане на изпит за докторантура по професионално направление **4.3 Биологични науки (Генетика – генетика на рака)**

## ОБЩА ЧАСТ

1. Хибридологичен анализ – определение, условия за провеждане и основни термини и понятия. Моногенно унаследяване – експерименти на Грегор Мендел, монохбридни кръстоски и анализиращи кръстоски. Примери за моногенни белези и болести при човек. Клетъчни механизми, стоящи в основата на моногенното унаследяване. Молекулярни основи на моногенното унаследяване – същност на алелите на молекулно ниво, фенотип и генотип от молекулярна гледна точка и алели на молекулно ниво. Доминантност и рецесивност на молекулно ниво.

2. Независимо унаследяване – същност, ди- и полихбридни кръстоски. Приложения на независимото унаследяване. Статистическа обработка на резултатите от генетичен анализ с помощта на метода  $\chi^2$ . Създаване на чисти линии животни и сортове растения. Хибридна мощ. Хромозомни основи на независимото унаследяване. Дихибридни кръстоски, при които единият от белезите е скачен с пола. Полигенно унаследяване. Количествени признаци. Полигени (QTLs). Механизми на унаследяване на полигените.

3. Генетична рекомбинация – същност, мейотична рекомбинация, типове гамети и поколения, честота на рекомбинацията. Генетични карти. Определяне на групи на скаченост. Кросинговър. Картиране на гени на основата на честотата на рекомбинацията. Рекомбинационен анализ на молекулни маркери. Тетраден анализ.

4. Функция на гените. Основни положения. Особености при експресията на гените. Типове гени. Видове алели. Пенетрантност и експресивност. Подходи за изследване на взаимодействието на гените. Въртелокусни взаимодействия - Определение. Видове, примери и разпадания. Плейотропия. Междулукусни взаимодействия - Определение. Видове, примери и разпадания. Изследване на взаимодействията на гените на молекулно ниво. Основни положения. Комплементационен тест. Обяснение на някои видове разпадания – 9:3:3:1, 9:7, 9:3:4 и 12:3:1. Супресорни мутации. Синтетични летали.

5. ДНК като носител на наследствената информация. Структура на ДНК. Доказване на полуконсервативния механизъм на репликация на ДНК. Общ принцип на репликацията на ДНК при *E. coli*. Особености на репликацията на ДНК при еукариоти. Различия с прокариоти. Особености при дрожди. Особености при висши еукариоти. Репликация на краищата на еукариотните хромозоми. Проблеми с репликацията на линейни хромозоми. Теломери и техният синтез. Защита на краищата на еукариотните хромозоми с по-мощта на белтъци. Генетични заболявания, дължащи се на нарушена структура на теломерите и неправилна експресия на теломерата.

6. Свойства на РНК. Класове РНК молекули и техните функции. Общи принципи на синтеза на РНК. Механизъм на транскрипцията при прокариоти (*E. coli*) – инициация, елонгация и терминация. Инициацията на транскрипцията при еукариоти. Елонгация, терминация и зреене на РНК при еукариоти. Редактиране на РНК.

7. Молекулярен механизъм на транслацията при про- и еукариоти. Основни положения в регулацията на генната експресия. Нива на регулация. Видове генна експресия. Оперони. Механизми на контрол над генната експресия при бактерии. Основни механизми, регулиращи

транскрипцията при бактериите. Клетъчни механизми. Типове контрол с помощта на регулаторни белтъци и ефекторни молекули. Примери за регулация на моделни оперони.

8. Особенности на регулацията на генната експресия при еукариоти. Общи положения на регулацията на ниво транскрипция при еукариоти. Регулация на генната експресия при моделната система Gal при дрожди. Регулация на полово-свързаните гени при дрожди. Динамика на хроматина при висшите еукариоти. Краткосрочно активиране на гени при еукариоти. Енхансери – същност и район на действие. Изолатори (инсулатори). Регулация на  $\beta$ -интерферонивия ген. Дългосрочно инактивиране на гени при еукариоти чрез ремоделиране на хроматина. Полово-специфичен сайлънсинг на гени и цели хромозоми при еукариоти. . Пост-транскрипционна регулация на генната експресия при еукариоти, осъществявана с помощта на микроРНК-и.

9. Изменчивост на организмите – класификация на видовете изменчивост. Обща характеристика и класификация на мутациите. Генни мутации. Хромозомни мутации. Геномни мутации (плоидии). (аберации). Отклонения от разпаданията при хромозомни и геномни мутации. Модификационна изменчивост.

10. Репарационни системи – обща характеристика и класификация. Механизми за директна поправка на ДНК. Ексцизионни репарационни механизми. Mismatch репарации. Транслезионен синтез на ДНК. Поправка на двойноверижни разкъсвания.

11. Полимеразна верижна реакция. Принцип на основната реакция. LA-PCR. Hot start PCR. Други варианти на PCR - Мултиплексна ПВР, прегната ПВР (Nested PCR), Обратна ПВР (Inverse PCR), In situ ПВР, Асиметрична ПВР, ПВР в емулсия, Метилационно специфична ПВР, Изотермална ПВР - LAMP (loop-mediated isothermal amplification) с Bst поли-мераза от *Bacillus stearothermophilus*, Амплифициране in vitro на цели геноми – MDA метод (multiple displacement amplification)

12. Количествена ПВР (quantitative PCR, qPCR или Real-Time PCR). Предпоставки. Класически вариант. Принцип на количественото определяне и основни понятия. qPCR системата TaqMan™. qPCR с молекулни маяци. qPCR със скорпионови сонди. RT-qPCR. Принцип на апаратурата за qPCR. RT-PCR. Видове обратни транскриптази. Варианти за праймери – random, oligo-dT и 3'-ген-специфични. Класически вариант на обратна транскрипция. Съвременни схеми за RT-PCR. Едноензимни системи, базирани на Tth и Tfl полимерази

13. Плазмиди. Биология на плазмидите. Определение за плазмид. Структура на плазмидите. Брой на копията в клетка. Характеристики придавани на гостоприемника от природните плазмиди. Класификация на плазмидите. Репликация на плазмидите. Организация на генома на плазмидите. Особенности на репликация на плазмидите. Репликация на плазмиди с тесен кръг гостоприемници – ColE1. Репликация на плазмиди с широк кръг гостоприемници – pSC101. Фактори, регулиращи стабилното унаследяване. Плазмидни вектори. Желани качества на плазмидните вектори. Номенклатура. Примери за често използвани плазмидни вектори за клониране на фрагменти. pBR322. pUC – семейство. Често използвани маркери за селекция. Класификация на плазмидите вектори

14. Секвениране на ДНК. Първи опити. Метод на Maxam и Gilbert. Принцип на chain terminator метод на Sanger. Оригинален метод. Подобрения на оригиналния метод. Методи за автоматично секвениране, базирано на Sanger. Общи принцип на автоматичните секвенатори. “Four dyes system” на Applied Biosystems. ALF система на Pharmacia – маркиран праймер, 4 реакции. LI-COR two dye near infrared система – едновременно секвениране и на двете вериги. Автоматични секвенатори базирани на капилярна електрофореза. Basecalling.

15. Други методи за секвениране. Пиросеквениране. Секвениране чрез microarray хибридизация. Приложения. Новогенерационно секвениране. Същност. Платформи за NGS - Illumina (Solexa) NGS, Roche 454, Ion torrent, SOLiD, Сравнение на отделните платформи.

16. Мутагенеза. Необходимост от изучаване на биологичните механизми посредством мутанти. Методи за неспецифична мутагенеза. Място-специфична мутагенеза. Място-специфична мутагенеза посредством метода на удължаване на праймера. Класически вариант – single primer method – Принцип, Варианти, Нюедобства и недостатъци. Място-специфична мутагенеза посредством удължаване на праймера чрез използване на няколко праймера. Касетна мутагенеза - Общ принцип, особености, Касетна мутагенеза с изродени бази

17. Методи за място-специфична мутагенеза, бази-рани на PCR. Метод на Higuchi. Метод на Sarkar и Sommer (1990). PCR методи за MCM на фрагменти носени от плазмид. Методи за случайно въвеждане на мутации посредством PCR

18. Трансфекция на животински клетки. Приложения на трансфекцията на животински клетки. Стратегии за включване на ДНК в животински клетки. Методи за химическа трансфекция- Калциево-фосфатен метод, Трансфекция с помощта на полиплекси, Трансфекция с помощта на липозоми и липоплекси. Физични методи за трансфекция – Електропорация, Ултразвукова трансфекция, Пряк пренос, Биолистика при животински клетки. Съдба на ДНК след навлизането ѝ в клетката

19. Маркери за селекция при животински клетки. Ендогенни маркери за селекция – принцип и принцип на селекцията на NAT. Примери за някои от най-често използваните ендогенни маркери. Доминантни маркери. Амплификационни маркери

20. Получаване на трансгенни животни. Принципна схема. Пронуклеарно микроинжектиране при мишки. Инфектиране на миши ембриони с ретровируси. Трансфекция на ембрионални стволови клетки. Насочена трансгенеза (gene targeting). Същност. Вектори. Механизми на интегриране. Селекция. Механизми за въвеждане на фини мутации (subtle mutations). Приложения на насочената трансгенеза. Трудности при животни и птици. Клонирание на животни чрез ядрен пренос. Трансформация на овоцити от Xenopus. Генен пренос при риби. Трансгенеза при Drosophila с помощта на P-елементи.

#### *СПЕЦИАЛНА ЧАСТ*

21. Естество на туморния растеж. Основни характеристики на рака

22. Онкогенни вируси

23. Протоонкогени и онкогени

24. Растежни фактори, рецептори и рак

25. Основни вътреклетъчни сигнални пътища в онкогенезата

26. Тумор супресорни гени

27. Контрол на клетъчния цикъл. Роля на pRb в онкогенезата

28. Апоптоза и p53 в онкогенезата

29. Теломери и теломераза в онкогенезата
30. Еволюция на туморния растеж
31. Генетична и епигенетична нестабилност на раковата клетка
32. Ангиогенеза и туморна неоангиогенеза
33. Основи на метастатичното разпространение. Епително-мезенхимна транзиция
34. Основи на туморната имунология
35. Рационални подходи за лечение на рака

**ПРЕПОРЪЧИТЕЛНА ЛИТЕРАТУРА:**

1. **Griffiths et al.**, "An Introduction to Genetic Analysis", 10th edition. *W. H. Freeman and Company*, 2012
2. **Griffiths et al.**, "An Introduction to Genetic Analysis", 11th edition. *W. H. Freeman and Company*, 2015
3. **Klug et al.**, "Concepts of Genetics", 10th edition, *Pearson*, 2012
4. **Snustad and Simmons**, "Principles of Genetics", 6th edition, *John Wiley & Sons, Inc.*, 2012
5. **Primrose, S.B. and Twyman, R.M.**. "Principles of Gene Manipulation and Genomics." 7th Ed. 2006. *Blackwell Publishing*
6. **Brown, T. A.** "Gene Cloning and DNA Analysis. An Introduction." 5th/6th Ed. 2006/2011. *Blackwell Publishing*
7. **Reece, R.J.** "Analysis of Genes and Genomes." 2004. *John Wiley & Sons*
8. **Chung, D.C. and Haber, D.A.** "Principles of Clinical Cancer Genetics" 2010. *Springer*
9. **Pasche, B.** "Cancer Genetics" 2010. *Springer*

София, м. декември 2018 г.

Изготвил:

/доц. д-р Светослав Димов/