НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Державна установа
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Директор ДУ «ІХБГ НАН України»
академік НАН України
_____Ярослав БЛЮМ
наказ № 22 від 29 травня 2024 р.

ПРОГРАМА
НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ АУТОФАГІЇ ТА ЗАПРОГРАМОВАНОЇ ЗАГИБЕЛІ КЛІТИН

для здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії
галузь знань 09 «Біологія»

спеціальність 091«Біологія та біохімія»

Шифр за ОНП – ВК 2.4.

КИЇВ – 2024

Робоча програма навчальної дисципліни **«Молекулярні механізми аутофагії та запрограмованої загибелі клітин»** для здобувачів вищої освіти ступеня доктор філософії галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія та біохімія.
«29» травня 2024 року – 21 с.

Розробник:
Ємець А.І., д.б.н., професор, чл.-кор. НАН України.

Робоча програма дисципліни **«Молекулярні механізми аутофагії та запрограмованої загибелі клітин»** схвалена на засіданні вченої ради ДУ «ІХБГ НАН України» (протокол № 7 від «29» травня 2024 року).

Робоча програма дисципліни «Молекулярні механізми аутофагії та запрограмованої загибелі клітин» розглянута на засіданні випускового відділу геноміки та молекулярної біотехнології ДУ «ІХБГ НАН України».

Завідувач відділу, академік НАН України Ярослав БЛЮМ

27 травня 2024 р.

© **Ємець А.І.,** 2024 рік
© _____, 20__ рік
© _____, 20__ рік

ВСТУП

Навчальна дисципліна **«Молекулярні механізми аутофагії та запрограмованої загибелі клітин»** є складовою освітньо-наукової програми підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктор філософії *галузі знань* 09 Біологія за *спеціальністю* 091 Біологія та біохімія.

Дана дисципліна є вибірковою навчальною дисципліною за ***спеціальністю*** 091 Біологія та біохімія.

Викладається у 3 семестрі ІІ року навчання в аспірантурі **в обсязі –** 12**0 год *(4 кредити ЕКТС)*** зокрема: *лекції –* ***20*** *год, практичні роботи -* ***20*** *год, самостійна робота –* ***80*** *год.* У курсі передбачено 2 *змістових модулі*. Завершується дисципліна **заліком.**

Мета дисципліни – вивчення молекулярних механізмів запрограмованої загибелі клітини, практичної можливості їх використання, підготовка фахівців у сфері вивчення механізмів клітинної загибелі.

Завдання:

1. Вивчення ролі запрограмованої загибелі клітини у індивідуальному розвитку і в патології;
2. Розгляд механізмів регуляції запрограмованої загибелі клітини: індукторні і супресорні шляхи;
3. Вивчення морфологічних та біохімічних особливостей апоптозу, аутофагії і некрозоподібної програмованої загибелі клітини;
4. Розгляд методів дослідження та діагностики запрограмованої загибелі клітини;
5. Відпрацювання та вдосконалення навичок проведення наукового експерименту, його планування та обробки результатів;
6. Вивчення значення запрограмованої загибелі клітини для біотехнології та біомедицини.

В результаті вивчення навчальної дисципліни у здобувачів мають бути сформовані:

Інтегральна компетентність (ІК): Здатність розв’язувати комплексні проблеми в галузі біології у процесі проведення дослідницько-інноваційної діяльності, що передбачає глибоке переосмислення наявних та створення нових цілісних знань та професійної практики, оволодіння методологією наукової та науково-педагогічної діяльності, проведення самостійного наукового дослідження, результати якого мають наукову новизну, теоретичне та практичне значення і інтегруються у світовий науковий простір через публікації.

Загальні компетентності (ЗК):

ЗК01. Знання та розуміння предметної області та розуміння професійної діяльності.

ЗК02. Здатність працювати в міжнародному контексті.

ЗК03. Здатність розробляти та управляти проектами.

ЗК04. Здатність мотивувати людей та рухатися вперед.

ЗК05. Здатність оцінювати та забезпечувати якість виконуваних робіт.

ЗК06. Здатність працювати автономно та в команді.

Спеціальні (фахові, предметні) компетентності (СК):

СК01. Здатність аналізувати явища та процеси з точки зору фундаментальних загальнонаукових принципів і знань, адекватно застосовувати концептуальні та методологічні знання в галузі біології.

СК02. Здатність виявляти, формулювати та вирішувати проблеми дослідницького характеру в галузі біології, оцінювати та забезпечувати якість досліджень, зокрема, і міждисциплінарних.

СК03. Здатність критично аналізувати, оцінювати і синтезувати нові ідеї.

СК04. Здатність ініціювати, планувати і здійснювати комплексні оригінальні дослідження, досягати наукових результатів, які мають бути оприлюднені у наукових виданнях.

СК05. Здатність обирати методи та критерії оцінки досліджуваних феноменів та процесів в галузі біології відповідно до цілей та завдань наукового дослідження.

СК06. Здатність застосовувати сучасні інформаційні технології, бази даних, електронні ресурси, спеціалізоване програмне забезпечення у науковій та навчальній діяльності.

СК07. Здатність ініціювати, розробляти, реалізовувати комплексні інноваційні проєкти.

СК08. Здатність оприлюднювати результатів наукових досліджень в усній і письмовій формах відповідно до національних та міжнародних стандартів у академічній спільноті та суспільстві.

СК09. Здатність дотримуватись етичних принципів, академічної доброчесності та авторського права в наукових дослідженнях та науково-педагогічній діяльності.

СК10. Здатність сформувати системний науковий світогляд та загальнокультурний кругозір, навчатись упродовж життя.

СК11. Здатність використовувати закономірності та сучасні досягнення молекулярної генетики, клітинної біології, біотехнології у поєднанні з сучасним інструментарієм для дослідження біологічних систем та процесів.

В результаті вивчення навчальної дисципліни аспірант повинен:

РН01. Мати концептуальні та методологічні знання з біології і на межі предметних галузей, а також дослідницькі навички, достатні для проведення наукових і прикладних досліджень на рівні світових досягнень з відповідного напряму, отримання нових знань та/або здійснення інновацій: аналізувати біологічні явища та процеси на молекулярно-генетичному, клітинному, організменому, популяційно-видовому та біосферному рівнях на основі фундаментальних загальнонаучних та спеціальних знань з використанням сучасних методів дослідження.

РН02. Вільно презентувати та обговорювати результати досліджень, наукові та прикладні проблеми біології державною та іноземною мовами, кваліфіковано відображати результати досліджень у наукових публікаціях у наукових виданнях.

РН03. Формулювати і перевіряти гіпотези; використовувати для обґрунтування висновків належні докази, зокрема, результати аналізу джерел літератури, експериментальних досліджень (опитувань, спостережень, експерименту) і математичного та/або комп'ютерного моделювання.

РН05. Планувати і виконувати експериментальні та/або теоретичні дослідження з біології та дотичних міждисциплінарних напрямів з використанням сучасного інструментарію, критично аналізувати результати власних досліджень і результати інших дослідників у контексті всього комплексу сучасних знань щодо досліджуваної проблеми.

РН06. Застосовувати сучасні інструменти і технології пошуку, оброблення та аналізу інформації, зокрема, статистичні методи аналізу даних великого обсягу та/або складної структури, спеціалізовані бази даних та інформаційні системи.

РН07. Розробляти та реалізовувати наукові та/або інноваційні проекти, які дають можливість переосмислити наявне та створити нове цілісне знання та/або професійну практику і розв'язувати важливі теоретичні та практичні проблеми біології з дотриманням норм академічної етики і врахуванням соціальних, економічних, екологічних та правових аспектів.

РН08. Глибоко розуміти загальні принципи та методи біологічних наук, а також методологію наукових досліджень, застосувати їх у власних дослідженнях у сфері біології та у викладацькій практиці.

РН09. Знати міжнародну клітинно-біологічну термінологію; будову клітин, життєвий цикл, механізми регуляції фізіологічних процесів у клітинах; будову тканин та органів; вплив зовнішніх факторів довкілля на структуру та функції клітин, тканин, органів, систем органів та організм; доречність використання у клітинній біології та цитології комплексних методів мікроскопічного, електронно-мікроскопічного, авторадіографічного методів дослідження, світлової мікроскопії високої роздільної здатності, динамічної мікроскопії живих клітин, проточної цитометрії; основи сучасних методів культивування та практичного використання клітинних культур, тощо.

РН10. Мати чіткі сучасні уявлення про структуру, тонку структура генів, еволюцію генетичних систем клітин, біосинтез ДНК, механізми та закономірності передачі генетичної інформації від клітини до клітини, від покоління до покоління, експресію генів, що проявляються в конкретних ознаках і властивостях клітин; методи вивчення нуклеїнових кислот та розроблення нових методів і біотехнологій для практичного використання.

РН11. Володіти знаннями про методи поліпшення функцій та потенціалу живих організмів, експериментальні методи роботи, можливості їхнього використання у виробничих процесах синтезу біологічно-активних речовин, антибіотиків, отримання генетично модифікованих та геномно редагованих організмів.

Місце дисципліни *(в структурно-логічній схемі підготовки фахівців відповідного напряму підготовки)*.

Навчальна дисципліна «Молекулярні механізми аутофагії та запрограмованої смерті клітин» є вибірковою навчальною дисципліною за *спеціальністю* 091 Біологія *спеціальністю* 091 Біологія та біохімія.

Загибель клітини – постійний прояв життєдіяльності організму, і в здоровому стані він збалансований фізіологічною регенерацією клітин. Як структурні компоненти клітин, так і цілі клітини виснажуються, старіють, гинуть і вимагають заміни. Підтримка різних органів і тканин у здоровому стані неможливо без «природного» фізіологічного оновлення, а, отже, без загибелі окремих клітин. Програмована загибель клітин – генетично контрольований і еволюційно консервативний процес. Порушення в регуляції загибелі клітин відіграють важливу роль у патогенезі різних захворювань. Наприклад, наслідки посиленого апоптозу можуть призводити до появи різних нейродегенеративних захворювань, таких як хвороби Паркінсона або Альцгеймера. У разі порушення процесів загибелі клітин в організмі накопичуються потенційно небезпечні клітини, які можуть привести до розвитку пухлини. Прямий зв'язок запрограмованої смерті клітин і багатьох патологічних станів сьогодні вже не викликає сумніву. Дослідження порушення функції багатьох генів, що регулюють запрограмовану смерть клітин, дадуть можливість розробляти цілком нові напрямки в терапії цих захворювань. Розробка лікарських засобів, які зможуть регулювати апоптоз, відкриє нові можливості в лікуванні злоякісних пухлин, вірусних інфекцій, деяких захворювань нервової системи, імунодефіцитів і аутоімунних захворювань.

Але смерть клітини може відбуватися в живому організмі в результаті дій зовнішніх (патогенних) чинників («некроз»). Загибель клітини супроводжується незворотними біохімічними і структурними змінами. Таким чином, смерть клітини може відбуватися шляхом некрозу або апоптозу. У сучасній класифікації розрізняють як мінімум три основні форми загибелі клітини: апоптоз, аутофагія і некроз.

Зв'язок з іншими дисциплінами.

Основою для вивчення навчальної дисципліни «Молекулярні механізми аутофагії та запрограмованої загибелі клітин» є обов'язкові для здобувачів вищої освіти дисципліни «Методологія наукових досліджень», «Архітектура цито- та нуклеоскелету та морфогенез клітин», «Геномна інженерія та синтетична біологія», «Структурна та функціональна геноміка».

Вивчення дисципліни базується на знаннях клітинної біології, біохімії, фізіології людини, фізіології рослин, молекулярної генетики, генетичної інженерії.

ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ

Змістовий модуль 1. Роль запрограмованої загибелі клітини в онтогенезі.

Тема 1. Поняття про запрограмовану загибель клітин ***(12 год)***.

Основні етапи розвитку: клітинний поділ, морфогенез, диференціація. Клітинний цикл. Мітоз, мейоз. Особливості морфогенезу у рослин. Види запрограмованої загибелі

клітин. Загальні особливості програмованої загибелі клітин у безхребетних. Фізіологічне значення запрограмованої загибелі клітин.

Тема 2. Поняття про апоптоз ***(12 год).***

Фази апоптозу. Регуляція апоптозу: інгібітори та активатори його розвитку. Еволюція апоптозу. Роль апоптозу в багатоклітинних організмах. Особливості розвитку апоптозу у рослин. Методи дослідження апоптозу.

Тема 3. Поняття про некроз ***(12 год).***

Особливості розвитку некрозу в клітинах. Фактори, які його викликають некроз. Роль некрозу в багатоклітинних організмах. Методи детекції некрозув таваринах. Методи детекції некрозу в рослинах..

Тема 4. Особливості розвитку запрограмованої загибелі в клітинах рослин ***(12 год).***

Загальні особливості програмованої загибелі клітин у рослин. Види і прояви програмованої загибелі клітин у рослин. Роль протеолітичних ферментів. Фізіологічна роль програмованої загибелі клітин у рослин. Методи її детекції.

Змістовий модуль 2. Особливості аутофагії, перспективи використання у наукових дослідженнях

Тема 5. Типи і механізми аутофагії ***(12 год.).***

Основні типи аутофагії. Механізм розвитку мікроаутофагії. Механізм розвитку шаперон-опосередкованої аутофагії, Механізм розвитку макроаутофагії. Значення аутофагії за нормальних умов в рослинних і тваринних об'єктах.

Тема 6. Аутофагія і стрес ***(16 год)***.

Регуляція аутофагії за нормальних умов. Особливості розвитку аутофагії у рослин. Регуляція аутофагії за стресових умов. Роль аутофагії в опосередкуванні метаболічного стресу у рослин. Роль аутофагії в умовах сольового та осмотичного стресу. Роль аутофагії, як відповідь на опромінення УФ-В у рослин. Роль аутофагії при зміненій гравітації у рослин.

Тема 7. Гени, залучені до розвитку аутофагії ***(12 год)***.

Участь рослинного цитоскелету у регуляції процесів аутофагії. Роль мікротрубочок у регуляції розвитку аутофагії. Роль генів тубуліну в розвитку аутофагії у рослин. Роль генів, асоційованих з аутофагією (autophagy-related genes) у рослин та тварин.

Тема 8. Роль аутофагії за нормальних (фізіологічних) станів ***(9 год)***.

Роль аутофагії за нормальних станів у рослин. Роль аутофагії за нормальних станів у людини. Роль аутофагії в ембріогенезі.

Тема 9. Роль аутофагії за патологічних станів ***(9 год.)***

Роль аутофагії при різних захворюваннях людини. Вплив порушення процесу аутофагії в розвитку хвороб людини.Роль аутофагії при патологічних станах у рослин.

Тема 10. Методи дослідження аутофагії ***(14 год.)***.

Отримання трансгенних ліній, що експресують гени, пов'язані з аутофагією. Використання лазерної конфокальної скануючої мікроскопії для дослідження аутофагії. Флуоресцентна мікроскопія. Електрофорез білків в денатуруючих умовах. Електроперенос білків та Вестерн-блот аналіз. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією. Імуногістохімічний аналіз.

СТРУКТУРА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ
ТЕМАТИЧНИЙ ПЛАН ЛЕКЦІЙ,
ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ, САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

№ з/п	Назва	Кількість годин		
		лекції	практичні	СРС
	Змістовий модуль 1 *Роль запрограмованої загибелі клітини в онтогенезі*			
1	**Тема 1**. *Поняття про запрограмовану загибель клітин.*	2	2	8
2	**Тема 2.** *Поняття про апоптоз*.	2	4	6
3	**Тема 3.** *Поняття про некроз*.	2	-	10
4	**Тема 4**. *Особливості розвитку запрограмованої загибелі в клітинах рослин.*	2	2	8
	Разом за змістовим модулем 1	***8***	***8***	***32***
	Змістовий модуль 2 *Особливості аутофагії, перспективи використання у наукових дослідженнях*			
5	**Тема 5.** *Типи і механізми аутофагії.*	2	2	8
6	**Тема 6.** *Аутофагія і стрес.*	2	4	10
7	**Тема 7.** *Гени, залучені до розвитку аутофагії.*	2	2	8
8	**Тема 8.** *Роль аутофагії за нормальних (фізіологічних) станів*.	2	2	5
9	**Тема 9.** *Роль аутофагії за патологічних станів*.	2	-	7
10	**Тема 10.** *Методи дослідження аутофагії*.	2	2	10
	Разом за змістовим модулем 2	***12***	***12***	***48***
	ВСЬОГО	**20**	**20**	**80**

Загальний обсяг **– *120 год* *(4 кредити ECTS)***, *у* тому числі:
Лекцій **– *20 год.***
Практичні заняття – ***20 год.***
Самостійна робота **– *80 год.***

ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 1

Роль запрограмованої загибелі клітини в онтогенез.

ТЕМА 1. *ПОНЯТТЯ ПРО ЗАПРОГРАМОВАНУ ЗАГИБЕЛЬ КЛІТИН* ***(12 год)***

Лекція 1. *ПОНЯТТЯ ПРО ЗАПРОГРАМОВАНУ ЗАГИБЕЛЬ КЛІТИН* ***(2 год)***

Практичне заняття 1. *Культивування рослинних об'єктів в умовах* in vitro ***(2 год)***

1. *Особливості культивування суспензійної та калюсної культур.*
2. *Отримання асептичних експлантів для роботи в культурі* in vitro.
3. *Регенерація рослин в умовах* in vitro *та їх укорінення.*

Завдання для самостійної роботи (8 год)

Приготування та стерилізація живильних середовищ для культивування рослинних тканин та клітин

Мікроклональне розмноження модельних рослин з класу однодольних та дводольних.

Експериментальне вивчення впливу фітогормонів ауксинової та цитокінінової природи на ріст та диференціацію клітин.

Фітогормони та синтетичні регулятори росту.

Нові речовини гормональної природи.

Контрольні запитання та завдання:

1. Наведіть джерела отримання експлантів.
2. Поясніть, які є способи стерилізації експлантів та насіння.
3. Умови культивування органів, тканин та клітин in vitro.
4. Специфіка вирощування калюсних тканин.
5. Суспензійні культури, їх отримання та культивування.
6. Протопласти рослин, їх ізолювання та культивування.
7. Специфіка вирощування диких та мутантних ліній *Arabidopsis thalina.*
8. Морфогенез в культурі *in vitro.*
9. Фактори, що визначають ефективність регенерації рослин рослин.
10. Роль фітогормонів в регуляції морфогенезу рослин *in vitro.*

Рекомендована література:

[2, 3, 6, 7]

ТЕМА 2. *ПОНЯТТЯ ПРО АПОПТОЗ* ***(12 год)***

Лекція 2. *ПОНЯТТЯ ПРО АПОПТОЗ* ***(2 год)***

Практичне заняття 2. *Способи індукції аутофагії за допомогою стресових чинників* ***(4 год)***

1. *Моделювання енергетичного стресу для рослинних об'єктів.*
2. *Моделювання сольового стресу.*

3. *Моделювання температурного стресу*.
4. *Моделювання гравітаційного стресу*.

Завдання для самостійної роботи (6 год)

1. *Вивчення впливу температурного стресу (дії низьких і високих температур) на рослинні об'єкти*.
2. *Аналіз впливу високих доз УФ-Б на рослинні клітини*.
3. *Вплив УФ-Б на цитоскелетні структури*.
4. *Моделювання осмотичного стресу.*

Контрольні запитання та завдання:

1. Що таке осмотичний стрес і як його моделюють?
2. Як моделюють стрес, пов'язаний зі зміною гравітації?
3. Як моделюють сольовий стрес у рослин?
4. Які температури (низькі та високі) здатні викликати стрес у рослин?
5. Як моделюють температурний стрес?
6. Які дози опромінення УФ-Б є критичними для рослинних клітин на рівні всього організму?
7. Як моделюють стрес, викликаний опроміненням УФ-Б?
8. Яка роль мікротрубочок у передачі сигналів при опроміненні УФ-Б?
9. Як моделюють сольовий стрес?
10. Як розвивається аутофагія за стресових умов у рослин?
11. Чи відрізняється розвиток аутофагії у різних класів рослин за дії стресу?

Рекомендована література:

[9, 14, 20, 26]

Тема 3. *ПОНЯТТЯ ПРО НЕКРОЗ* ***(12 год)***

Лекція 3. *ПОНЯТТЯ ПРО НЕКРОЗ* ***(2 год)***

Завдання для самостійної роботи (10 год)

1. *Особливості розвиток некрозу у нижчих і вищих рослин.*
2. *Особливості розвитку некрозу у тварин*.
3. *Стрес і некроз у рослин*.
4. *Стрес і некроз у тварин*.

Контрольні запитання та завдання:

1. Що таке некроз?
2. Чим відрізняється некроз від апоптозу?
3. Як розвивається некроз у рослин?
4. Як розвивається некроз у тварин?
5. Чи викликає стрес розвиток некрозу?
6. Яка роль некрозу при стресі у тварин?
7. Яка роль некрозу при стресі у рослин?
8. Яка роль некрозу при патологічних станах у тварин?
9. Яка роль некрозу при розвитку рослин?

10. Яка роль некрозу при розвитку тварин?

Рекомендована література:
[9, 14, 20, 26, 29-32]

ТЕМА 4. *ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ ЗАПРОГРАМОВАНОЇ ЗАГИБЕЛІ В КЛІТИНАХ РОСЛИН* ***(12 год)***

Лекція 4. *ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ ЗАПРОГРАМОВАНОЇ ЗАГИБЕЛІ В КЛІТИНАХ РОСЛИН* ***(2 год)***

Практичне заняття 3. *Візуалізація експресії репортерного гена GFP в трансгенних клітинах (лазерна конфокальна мікроскопія)* ***(2 год)***

1 *Особливості роботи з конфокальним мікроскопом.*
2 *Приготування зразків та тканин для прижиттєвої візуалізації внутрішньоклітинних детермінантів.*
3 *Особливості дослідження флюоресценції білка GFP та химерних білків, «зшитих» з GFP.*

Завдання для самостійної роботи (8 год)

1. Кольорові варіанти GFP та мутації, пов'язані з виникненням кольорових варіантів GFP.
2. Особливості створення генетичних конструкцій, що містять GFP чи його варіанти, для вивчення певних внутрішньоклітинних структур.
3. Дослідження хлоропластів та мітохондрій за використання GFP.
4. Дослідження цитоскелетних структур за використання GFP.

Контрольні запитання та завдання:

1. В чому полягає відмінність між люмінесцентною мікроскопією і лазерною скануючою конфокальною мікроскопією?
2. Як необхідно вирощувати лінії Arabidopsis thaliana, які експресують GFP для мікроскопічного дослідження?
3. Що таке Z-стек, і як виставити параметри для Z-стека?
4. Які особливості існують для дослідження рослинних тканин за допомогою лазерної конфокальної мікроскопії?
5. З яких зон складається корень?
6. Як досліджувати меристематичні клітини кореня?
7. Що таке мікротрубочки і яка їх функціональна роль в клітині?
8. Які побудови утворюють мікротрубочки в рослинних та тваринних клітинах?
9. Що таке актинові філаменти, і які функції вони виконують в клітинах рослин?
10. Чи можна досліджувати одночасно актинові філаменти і мікротрубочки в живих клітинах за допомогою лазерної конфокальної мікроскопії?

Рекомендована література:
[7, 18, 23, 36]

ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 2

Особливості аутофагії,
перспективи використання у наукових дослідженнях

Тема 5. *ТИПИ І МЕХАНІЗМИ АУТОФАГІЇ* ***(12 год)***

Лекція 5. *ТИПИ І МЕХАНІЗМИ АУТОФАГІЇ* ***(2 год)***.

Практичне заняття 4. *Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією* ***(2 год)***

1. *Підготовка зразків для проведення полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ПЛР-ЗВ)*
2. *Проведення ПЛР-ЗВ*

Завдання для самостійної роботи (8 год)

1. *Метод ізолювання мРНК.*
2. *Метод отримання кДНК*
3. *Методологія методу ПЛР-ЗВ*
4. *Використання методу ПЛР-ЗВ*

Контрольні запитання та завдання:

1. Принцип полімеразної ланцюгової реакції.
2. Що визначають за допомогою методу ПЛР в реальному часі?
3. Як ізолюють мРНК з рослин?
4. Що таке зворотна транскрипція, і як вона відбувається?
5. Що таке ДНК-зонди?
6. Які мітки використовують в ПЛР-ЗВ?
7. Що таке флюорогенна шпилька?
8. В чому особливості методу FRET?
9. Як аналізують отримані метод ПЛР-ЗВ дані?
10. Які діагностики проводять за допомогою цього методу?

Рекомендована література:
[1, 7, 24]

Тема 6. *АУТОФАГІЯ І СТРЕС* ***(12 год)***

Лекція 6. *АУТОФАГІЯ І СТРЕС* ***(2 год)***

Практичне заняття 5. Електрофорез білків в денатуруючих умовах ***(2 год)***

1. *Приготування поліакриламідного гелю.*
2. *Приготування зразків для електрофоретичного розділення білків.*
3. *Проведення електрофорезу білків в денатуруючих умовах.*

Завдання для самостійної роботи (8 год)

1.Методи ізолювання білків з рослинних об'єктів.

2.Приготування зразків для електрофоретичного розділення цитоплазматичних і ядерних білків.
3.Візуалізація продуктів розділення.

Контрольні запитання та завдання:

1. Як отримують тотальну фракцію білків з рослинних об'єктів?
2. В чому особливості концентруючого та розділяючих гелів?
3. Який заряд мають поліпептиди?
4. Чому метод потребує використання додецилсулфату натрію та меркаптоетанолу?
5. В чому полягає суть методу фарбування білків в гелі фарбником Кумасі.
6. В чому полягає суть методу фарбування білків в гелі сріблом?
7. Аналіз отриманих даних.
8. Як визначають молекулярну масу білків?
9. Що визначають за допомогою методу SDS-PAGE по Леммлі?
10. Як визначають оптичну щільність розділених зразків за допомогою денситометрії?

Рекомендована література:

[4, 5, 17, 36-44]

ТЕМА 7. *ГЕНИ, ЗАЛУЧЕНІ ДО РОЗВИТКУ АУТОФАГІЇ* **(*16 год)***

Лекція 7. *ГЕНИ, ЗАЛУЧЕНІ ДО РОЗВИТКУ АУТОФАГІЇ* ***(2 год).***

Практичне заняття 6. *Електрофорез ДНК в агарозному гелі* ***(4 год)***

1. *Приготування агарозного гелю.*
2. *Приготування зразків ДНК для електрофорезу*
3. *Нанесення зразків для проведення електрофорезу ДНК.*
4. *Електрофорез ДНК.*

Завдання для самостійної роботи (10 год)

1.Методи ізолювання ДНК.
2.Метод ізолювання плазмідної ДНК.
3.Метод ізолювання рослинної ДНК.
4.Метод ізолювання тваринної ДНК.
5.Електрофорез ДНК в поліакриламідному гелі.
6. Електрофорез ДНК в акріламідному гелі.

Контрольні запитання та завдання:

1. Які існують методи ізолювання ДНК?
2. Чи є різниця в ізолюванні плазмідної ДНК та ядерної ДНК із рослин?
3. В чому особливості ізолювання тваринної ДНК?
4. Як необхідно зберігати ізольовану ДНК?
5. Який барвник додають до зразків при проведенні електрофорезу в агарозному гелі?
6. Що таке «маркери ДНК (DNA ladder)»?

7. В яких випадках проводять електрофорез ДНК в агарозному гелі ?
8. В яких випадках проводять електрофорез ДНК в поліакриламідному гелі?
9. Як зв'язується бромистий етидій з ДНК?
10. Як візуалізують розділені фрагменти ДНК?

Рекомендована література:
[1, 7, 25, 34, 41-44]

Тема 8. *РОЛЬ АУТОФАГІЇ ЗА НОРМАЛЬНИХ (ФІЗІОЛОГІЧНИХ) СТАНІВ* ***(9 год)****.*

Лекція 8. *РОЛЬ АУТОФАГІЇ ЗА НОРМАЛЬНИХ (ФІЗІОЛОГІЧНИХ) СТАНІВ* ***(2 год)****.*

Практичне заняття 7. Дослідження ролі аутофагії у рослинних об'єктів за нормальних умов ***(2 год)***

1. *Дослідження аутофагії за допомогою конфокальної лазерної мікроскопії.*
2. *Дослідження аутофагії за допомогою методу ПЛР-ЗВ.*
3. *Дослідження проростків трансгенної лінії Arabidopsis thaliana, що стабільно експресує химерний білок Atg8H-GFP, за допомогою лазерної мікроскопії, вирощених за нормальних умов.*
4. *Порівняльний аналіз накопичення аутофагосом в клітинах від віку проростків цієї лінії.*

Завдання для самостійної роботи (5 год)

1. *Роль аутофагії за нормальних станів у тварин та людини.*
2. *Роль аутофагії в ембріогенезі.*
3. *Функціональна роль оксиду азоту в розвитку рослин.*

Контрольні запитання та завдання:

1. Як розвивається аутофагія в рослиних клітинах за нормальних умов?
2. Чи однаково відбувається цей процес в різних типах клітин рослин за нормальних умов?
3. Які на сьогодні існують мутантні лінії рослин для дослідження аутофагії?
4. Як їх можна використовувати для дослідження розвитку аутофагії за нормальних умов?
5. Яка функціональна роль оксиду азоту в розвитку рослин?
6. Які маркери використовують при дослідженні аутофагії в рослинних об'єктах?
7. Які маркери використовують при дослідженні аутофагії у тварин?
8. Які існують модельні тварини для дослідження аутофагії?

Рекомендована література:
[9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 19, 21, 22, 23, 26-28, 33, 37, 38, 42]

Тема 9. *РОЛЬ АУТОФАГІЇ ЗА ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ* ***(9 год.)***

Лекція 9. *РОЛЬ АУТОФАГІЇ ЗА ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ* ***(2 год.)***

Завдання для самостійної роботи (7 год)

1. *Роль аутофагії як адаптивного процесу у відповідь на дію абіотичних чинників у рослин.*
2. *Роль аутофагії як адаптивного процесу у відповідь на дію біотичних чинників у рослин.*
3. *Вплив порушення процесу аутофагії в розвитку хвороб людини.*

Контрольні запитання та завдання:

1. Які патологічні стани бувають у рослин?
2. Які модельні лінії рослин можна використовувати для дослідження розвитку аутофагії за патологічних умов їх розвитку?
3. Яка роль аутофагії при захворюваннях рослин, викликаних різними патогенами?
4. Яка роль аутофагії в протидії дефіциту вуглеводнів у рослин?
5. Яка роль аутофагії у рослин при осмотичному стресі?
6. Яка роль оксиду азоту (NO) у рослин за патологічних умов їх вирощування?
7. Яка роль аутофагії при різних захворюваннях людини?

Рекомендована література:

[9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 19, 21, 22, 23, 26-28, 40, 41]

ТЕМА 10. *МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ АУТОФАГІЇ* ***(14 год)***

Лекція 10. *МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ АУТОФАГІЇ* ***(2 год)***

Практичне заняття 8. Дослідження розвитку аутофагії в клітинах рослин за допомогою барвника LysoTracker Red ***(2 год)***

Завдання для самостійної роботи (10 год)

1. *Отримання лізатів тканин та визначення концентрації білків*
2. *Електроперенос білків та Вестерн-блот аналіз*
3. *Приготування гістологічних зрізів*
4. *TUNEL-аналіз*

Контрольні запитання та завдання:

1. Які барвники використовують для вивчення виживаності клітин?
2. Які флуоресцентні барвники використовують для візуалізації аутофагосом?
3. Як отримують лізати тканин?
4. Як визначають концентрації білків?
5. Для чого проводять Вестерн-блот аналіз?
6. Як можна використати метод Вестерн-блотингу для дослідження аутофагії?
7. Які гени, пов’язані з розвитком аутофагії, Ви пропонуєте досліджувати в першу чергу?
8. Як готують гістологічні зрізи з рослинних тканин?
9. В чому полягає суть TUNEL-аналізу?

10. Як досліджують розвиток аутофагії в рослинних клітинах за допомогою конфокальної лазерної мікроскопії?

Рекомендована література:

[4, 8, 18, 24, 36, 39]

Контроль знань і розподіл балів, які отримують здобувачі

Контроль здійснюється за модульно-рейтинговою системою.

У змістовий модуль 1 (ЗМ1) входять теми 1-4, у змістовий модуль 2 (ЗМ2) – теми 5-10.

Види контролю – поточний і підсумковий.

Поточний контроль здійснюється під час проведення навчальних занять і має на меті перевірку засвоєння аспірантами навчального матеріалу. Форма проведення поточного контролю під час навчальних занять: усне опитування, письмовий контроль, тестовий, самооцінювання, перевірка практичних навичок.

Обов'язковим для заліку є відпрацювання всіх практичних занять. У випадку відсутності аспіранта, він може відпрацювати пропущене заняття у позааудиторний час (пропущених занять не може бути більше половини від загальної кількості занять).

Оцінювання за формами поточного контролю:

Коефіцієнт – 2

	ЗМ1		*ЗМ2*	
	Min. – 12 балів	*Max. – 20 балів*	*Min. – 18 балів*	*Max. – 30 балів*
Практична робота	*„3" х 4 =12*	*„5" х 4 =20*	*„3" х 6 = 18*	*„5" х 6 = 30*
«3/5» – мінімальна/максимальна оцінка, яку може отримати аспірант.				

Для аспірантів, які набрали сумарно меншу кількість балів ніж *критично-розрахунковий мінімум* ***60*** *балів*, для здачі заліку обов'язкове проходження додаткового тестування.

Підсумковий контроль проводиться на останньому практичному занятті і складається із суми балів усіх змістових модулів.

При простому розрахунку отримаємо:

	Змістовий модуль 1	Змістовий модуль 2	Залік (підсумкова оцінка)
Мінімум	24	36	60
Максимум	**40**	**60**	**100**

При цьому, кількість балів:

- **1-34** відповідає оцінці «незадовільно» з обов'язковим повторним вивченням дисципліни;
- **35-39** відповідає оцінці «незадовільно» з можливістю повторного складання;
- **40-60** відповідає оцінці «задовільно» («достатньо»);
- **61-69** відповідає оцінці «задовільно»;
- **70 - 80** відповідає оцінці «добре»;
- **81 - 89** відповідає оцінці «добре» («дуже добре»);

- **90 - 100** відповідає оцінці «відмінно».
-

Шкала оцінювання академічної успішності аспіранта

Рівень досягнень, % /Marks, (бали за освітню діяльність)	Оцінка ЄКТС/ECTS	Оцінка за національною шкалою (National grade)	Залік
90 – 100	**A**	**відмінно** (Excellent)	**зараховано**
82 – 89	**B**	**добре** (Good)	
74 – 81	**C**		
64 – 73	**D**	**задовільно** (Satisfactory)	
60 – 63	**E**		
35 – 59	**FX**	**незадовільно** (Fail) з можливістю повторного складання	**незараховано**
1 – 34	**F**	**незадовільно** (Fail) з обов'язковим повторним вивченням дисципліни	

Методи навчання

Пояснювально-ілюстративні, частково-пошукові, проблемного навчання, дослідницькі.

Технічні засоби навчання

Проектор мультимедійний Epson EMP-S42, 2 , рік введення в експлуатацію – 2004; ноутбук, екран, Zoom/Google Meet — сервіси для дистанційного навчання та он-лайн консультацій.

Матеріальне забезпечення дисципліни

Аудиторії, лабораторії відділу клітинної біології та біотехнології, Центр колективного користування приладами ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», реагенти, обладнання, прилади, тощо.

Рекомендована література

1. Glick B.R., Pasternak J.J., Patten C.L. Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA, 4th edition. ASM Press, Washington DC, 2010.
2. Lal R., Lal S. Genetic Engineering of Plants for Crop Improvement. CRC Press, 2017, 256 p.
3. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. – Київ: Наукова думка, 2005. 270 с.
4. Westermeier R. Electrophoresis in Practice. A Guide to Methods and Application of DNA and Protein Separations, 3rd ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2001, 368 p.
5. Hanada K. DNA Electrophoresis. Methods and Protocols, Humana Press, 2020, 228 p.
6. Рудишин С., Негрецький В. Новожилов О. Фітогормонологія в України: генеза і досягнення – Київ: ВЦ «Академія», 2020. 144 с.

7. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular Biology of the Cell. Sixth Edition. Garland Science: New York and Abingdon, UK. 2014. 1464 p.
8. Apoptosis Detection Using Terminal Transferase and Biotin-16-dUTP (TUNEL Enzyme Method) http://www.ihcworld.com/_protocols/apoptosis/tunel_enzyme. htm
9. Avin-Wittenberg T. Autophagy and its role in plant abiotic stress management. Plant Cell Environ. 2019. V 42, N 3, P. 1045-1053.
10. Blume Y.B., Krasylenko Y.A., Demchuk O.M., Yemets A.I. Tubulin tyrosine nitration regulates microtubule organization in plant cells. Frontiers in Plant Science, 2013, V. 4:530. doi.org/10.3389/fpls.2013.00530
11. Yemets A.I., Krasylenko Yu.A., Lytvyn D.I., Sheremet Ya.A., Blume Ya.B. Nitric oxide signalling via cytoskeleton in plants. Plant Science, 2011, V. 181, N 5, P. 545-554. doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.017
12. Yemets A.I., Karpets Y.V., Kolupaev Y.E., Blume Y.B. (2019) Emerging Technologies for Enhancing ROS/RNS Homeostasis. In: Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants (Eds. M. Hasanuzzaman, V. Fotopoulos, K. Nahar, M. Fujita), Wiley-Blackwell, 2019, V.2, Chapter 39, P. 873-922. DOI 10.1002/9781119468677.ch39
13. Yemets A.I., Krasylenko Yu.A., Blume Ya.B. (2015) Nitric Oxide and UV-B Radiation. In: Nitric Oxide Action in Abiotic Stress Responses in Plants. (Eds. Khan M.N., Mobin M., Mohammad F., Corpas F.J.), Springer-Verlag, 2015, P.141-154. DOI 10.1007/978-3-319-17804-2_9
14. Han S., Yu B., Wang Y., Liu Y. Role of plant autophagy in stress response. Protein Cell. 2011. V. 2, N 10. P. 784–791.
15. Krasylenko YA, Yemets AI, Blume YB Nitric oxide synthase inhibitor L-NAME affects Arabidopsis root growth, morphology, and microtubule organization Cell biology international 2019. V. 43 (9), P. 1049-1055.
16. Krasylenko Yu.A., Yemets A.I., Sheremet Ya.A., Blume Ya.B. (2012) Nitric oxide as a critical factor for Arabidopsis microtubules perceptions of UV-B irradiation. Physiologia Plantarum, 2012, V.145, N4, P.505-515. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01530.x
17. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 1970; V.227, P. 680–685
18. LSM 510 Laser Scanning Microscope. Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany. 1998. 330 p. https://mcb.illinois.edu/microscopy/manuals/LSM_510_Manual. pdf
19. Lytvyn D.I., Raynaud C., Yemets A.I., et al., (2016) Involvement of inositol biosynthesis and nitric oxide in the mediation of UV-B induced oxidative stress. Frontiers in Plant Science, 2016, V.12; 7:430. doi: 10.3389/fpls.2016.00430
20. Mosab N.M.H. Autophagy: fasting to be healthy. LAP LAMBERT Acad. Publishing, 2018. 72 p. https://www.researchgate.net/publication/323880580_Autophagy_fasting_to_be_healthy
21. Pandey G.K. Mechanism of Plant Hormone Signaling Under Stress. Wiley-Blackwell, 2017, V. 1. 473 pages.
22. Pandey G.K. Mechanism of Plant Hormone Signaling Under Stress. Wiley-Blackwell, 2017, V. 2. 571 p.
23. Plohovska S.H., Krasylenko Y.A., Yemets AI Nitric oxide modulates actin filament organization in *Arabidopsis thaliana* primary root cells at low temperatures Cell Biology International 2019. V. 43 (9), p. 1020-1030.

24. Real-time PCR hand book. Applied Biosystems® https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf
25. Sambrook J., David W.R. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, 2001. Vol. 2. 763 p.
26. Ustun S., Hafren A., Hofius D. Autophagy as a mediator of life and death in plants. Curr. Opin. Cell Biol. 2017. V 40. P. 122-130.
27. Su T., Li X., Yang M., Shao Q., Zhao Y., Ma C., Wang P. Autophagy: an intracellular degradation pathway regulating plant survival and stress response. Front. Plant Sci. 2020. 11:164. doi: 10.3389/fpls.2020.00164
28. Qi H., Xia F.-N., Xiao S. Autophagy in plants: physiological roles and post-translational regulation. J. Integr. Plant Biol. 2021. V. 63. P. 161-179 https://doi.org/10.1111/jipb.12941
29. Minina E.A., Filonova L.H., Sanchez-Vera V., Suarez M.F., Daniel G., Bozhkov P.V. Detection and measurement of necrosis in plants. Methods Mol Biol. 2013;1004:229-48. doi: 10.1007/978-1-62703-383-1_17
30. Teixeira da Silva J.A., Nezami-Alanagh E., Barreal M.E., Kher M.M., Wicaksono A., Gulyás A., Hidvégi N., Magyar-Tábori K., Mendler-Drienyovszki N., Márton L., Landín M., Gallego PP., Driver J.A., Dobránszki J. Shoot tip necrosis of in vitro plant cultures: a reappraisal of possible causes and solutions. Planta, 2020, V 252(3):47. doi: 10.1007/s00425-020-03449-4
31. Festjens N., Vanden Berghe T., Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenergetics, 2006, V. 1757 (9–10), p. 1371-1387. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2006.06.014
32. Park W., Wei S., Kim B.S. *et al.* Diversity and complexity of cell death: a historical review. Exp. Mol. Med., 2023, V. 55, p. 1573–1594. https://doi.org/10.1038/s12276-023-01078-x
33. Wang P, Wang T, Han J, Li M, Zhao Y, Su T and Ma C (2021) Plant autophagy: an intricate process controlled by various signaling pathways. Front. Plant Sci. 12:754982. doi: 10.3389/fpls.2021.754982
34. Yamamoto, H., Zhang, S., Mizushima, N. Autophagy genes in biology and disease. Nat. Rev. Genet., 2023, V. 24, p. 382–400. https://doi.org/10.1038/s41576-022-00562-w
35. Yang, Y., Klionsky, D.J. Autophagy and disease: unanswered questions. Cell Death Differ, 2020, V. 27, p. 858–871. https://doi.org/10.1038/s41418-019-0480-9
36. Yemets A., Shadrina R., Blume R., Plokhovska S., Blume Ya. Autophagy formation, microtubule disorientation, and alteration of ATG8 and tubulin gene expression under simulated microgravity in *Arabidopsis thaliana.* npj Microgravity, 2024, V.10(1), 31, p. 1-16 doi: 10.1038/s41526-024-00381-9
37. Li Y., Xu X., Qi G.,, Cui D., Huang C., Sui X., Li G., Fan Q. Mechanisms of autophagy function and regulation in plant growth, development, and response to abiotic stress. Crop J., 2023, Vol. 11 (6), p. 1611-1625, https://doi.org/10.1016/j.cj.2023.09.005
38. Magen S., Seybold H., Laloum D., Avin-Wittenberg T. Metabolism and autophagy in plants - a perfect match. FEBS Lett. 2022, V. 596(17), p. 2133-2151. doi: 10.1002/1873-3468.14359
39. Qi, H., Wang, Y., Bao, Y. *et al.* Studying plant autophagy: challenges and recommended methodologies. Adv. Biotechnol., 2023, V. 1**:**2. https://doi.org/10.1007/s44307-023-00002-8

40. Sedaghatmehr M., Balazadeh S. Autophagy: a key player in the recovery of plants from heat stress. J. Exp. Botany, 2024, V. 75 (8), p. 2246–2255. https://doi.org/10.1093/jxb/erae018
41. Yagyu M., Yoshimoto K. New insights into plant autophagy: molecular mechanisms and roles in development and stress responses. J. Exp. Botany, 2024, V. 75(5), p. 1234–1251 https://doi.org/10.1093/jxb/erad459
42. Wang S., Hu W., Liu, F. Autophagy in the lifetime of plants: from seed to seed. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23: 11410. https://doi.org/10.3390/ijms231911410
43. Bordi, M., De Cegli, R., Testa, B. *et al.* A gene toolbox for monitoring autophagy transcription. Cell Death Dis. 2021, V.12: 1044. https://doi.org/10.1038/s41419-021-04121-9
44. Dai, M., Li, K., Sacirovic, M. *et al.* Autophagy-related genes analysis reveals potential biomarkers for prediction of the impaired walking capacity of peripheral arterial disease. BMC Med**.,** 2023, V. 21, 186. https://doi.org/10.1186/s12916-023-02889-5