

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**Методические рекомендации для
самостоятельной работы обучающихся по дисциплине
Б1.В.ДВ.04.02 Генетически модифицированные продукты питания**

Направление подготовки : 36.03.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза

Профиль образовательной программы: Ветеринарно-санитарная экспертиза

Форма обучения: очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Организация самостоятельной работы	3
2. Методические рекомендации по подготовке реферата/эссе	6
2.1 Реферат содержит.....	6
2.2 Оформление работы.....	6
2.3 Критерии оценки реферата.....	6
2.4 Титульный лист реферата.....	6
2.5 Образец оформления содержания.....	8
2.6 Темы рефератов.....	8
3. Методические рекомендации по самостоятельному изучению вопросов	9
4. Методические рекомендации по подготовке к занятиям	29
4.1 Генетика и генетическая информация.....	29
4.2 Генно-модифицированные источники пищевой продукции. Концепция биобезопасности пищевой продукции и питания.....	30
4.3 Общая схема реализации генетической информации.....	31
4.4 Механизмы реализации генетической информации.....	32
4.5 Особенности механизмов трансляции у прокариот и эукариот.....	33
4.6 Хромосомы: строение и функционирование.....	34
4.7 Переработка, передача и изменение генетической информации в ряду поколений.....	35
4.8 Сохранение и защита генетической информации.....	36
4.9 Развитие многоклеточного организма.....	37
4.10 Иммуитет. Некоторые отклонения в работе иммунной системы.....	39
4.11 Получение животных и растительных трансгенных организмов.....	41
4.12 Геномика и геновая терапия.....	44
4.13 Молекулярная биология и возникновение жизни.....	48
4.14 Молекулярная биология и происхождение человека.....	52
4.15 Методологические основы разработки рецептур и технологий генетически модифицированных продуктов питания.....	53
4.16 Степень безопасности трансгенных пищевых продуктов.....	54

1. ОРГАНИЗАЦИЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1.1. Организационно-методические данные дисциплины

№ п.п.	Наименование темы	Общий объем часов по видам самостоятельной работы (из табл. 5.1 РПД)				
		подготовка а курсового о проекта (работы)	подготовка реферата/эссе	индивидуальные домашние задания (ИДЗ)	самостоятельное изучение вопросов (СИБ)	подготовка к занятиям (ПкЗ)
1	2	3	4	5	6	7
1.	Генетика и генетическая информация	-	+	-	4	1
2.	Генно-модифицированные источники пищевой продукции. Концепция биобезопасности пищевой продукции и питания	-	+	-	4	1
3.	Общая схема реализации генетической информации	-	+	-	4	1
4.	Механизмы реализации генетической информации	-	+	-	4	1
5.	Особенности механизмов трансляции у прокариот и эукариот	-	+	-	4	1
6.	Хромосомы: строение и	-	+	-	-	1

	функционирование					
7.	Переработка, передача и изменение генетической информации в ряду поколений	-	+	-	-	2
8.	Сохранение и защита генетической информации	-	+	-	-	1
9.	Развитие многоклеточного организма	-	+	-	4	2
10.	Иммунитет. Некоторые отклонения в работе иммунной системы	-	+	-	4	2
11.	Получение животных и растительных трансгенных организмов	-	+	-	3	1
12.	Геномика и генная терапия	-	+	-	4	1
13.	Молекулярная биология и возникновение жизни.	-	+	-	4	1
14.	Молекулярная биология и происхождение человека	-	+	-	-	2
15.	Методологические основы разработки	-	+	-	-	2

	рецептур и технологий генетически модифицированных продуктов питания					
16.	Степень безопасности трансгенных пищевых продуктов	-	+	-	-	2

2 МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОДГОТОВКЕ РЕФЕРАТА/ЭССЕ

2.1 Реферат содержит:

- титульный лист;
- содержание;
- введение;
- основная часть;
- заключение;
- список использованной литературы;
- приложения.

2.2 Оформление работы.

1. Тематика рефератов разрабатывается преподавателем дисциплины и предоставляется студентам заранее либо самим преподавателем, либо методистом соответствующей кафедры (через старост).

2. Реферат выполняется на листах формата А4 в компьютерном варианте. Поля: верхнее, нижнее – 2 см, правое – 3 см, левое – 1,5 см, шрифт Times New Roman, размер шрифта – 14, интервал – 1,5, абзац – 1,25, выравнивание по ширине. Объем реферата 15-20 листов. Графики, рисунки, таблицы обязательно подписываются (графики и рисунки снизу, таблицы сверху) и располагаются в приложениях в конце работы, в основном тексте на них делается ссылка.

3. Нумерация страниц обязательна. Номер страницы ставится в левом нижнем углу страницы.

4. Готовая работа должна быть скреплена папкой скоросшивателем или с помощью дырокола. Работы в файлах, скрепленные канцелярскими скрепками приниматься не будут.

5. Рефераты сдаются преподавателю в указанный срок.

2.3 Критерии оценки реферата:

- правильность и аккуратность оформления;

- актуальность темы;
- соответствие содержания работы выбранной теме;
- степень самостоятельности автора при освещении темы
 - соответствие оформления реферата стандартом.

2.4 Титульный лист реферата

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ**

«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра «ВСЭ и фармакологии»

РЕФЕРАТ

На тему:

Выполнил:

Проверил:

2.5 Образец оформления содержания

Содержание

Введение	2
1. Название раздела:	3
1.1 Название подраздела	3
1.2 Название подраздела	8
2. Название раздела:	12
2.1 Название подраздела	17
2.2 Название подраздела	18
Заключение	23
Список литературы	25
Приложения:	26

2.6 Темы рефератов

1. история развития культивирования тканей и клеток высших растений.
2. Питательные среды, используемые для культивирования изолированных клеток и тканей.
3. Понятие о каллусной ткани. Функции растительных каллусных тканей. Виды каллусных тканей и их особенности.
4. методы культивирования длительно выращиваемых культур каллусных тканей.
5. Получение и культивирование протопластов растительных клеток.
6. Индукция и реализация программы развития от клетки растению.
7. Стабильность и вариабельность геномов растительных клеток.

8. практическое использование клеточной инженерии растений.
9. Образование гибридов растений путем слияния протопластов.
10. Проблемы и перспективы генетической инженерии растений.
11. Векторы, используемые в генетической инженерии растений.
12. Биологическая фиксация азота и генетическая инженерия.
13. Мировоззренческие и социально-этические аспекты генетической инженерии.
14. Способы увеличения продуктивности производственных штаммов микроорганизмов.

3. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО САМОСТОЯТЕЛЬНОМУ ИЗУЧЕНИЮ ВОПРОСОВ

3. 1 Генетика и генетическая информация

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

В хранении, передаче и преобразовании генетической информации центральное место занимают нуклеиновые кислоты. Решающим фактором при этом является способность нуклеиновых, оснований к специфическому (комплементарному) спариванию

А. Реализация и передача генетической информации

Хранение информации. Генетическая информация закодирована в последовательности нуклеотидов ДНК (DNA), организованных в функциональные участки, называемые генами. [РНК (RNA) как носитель генетической информации используется только некоторыми вирусами.] Участки ДНК кодируют белки, т. е. они содержат информацию об аминокислотной последовательности белков. Каждый остаток представлен в ДНК своим кодовым словом (кодоном), состоящим из трех следующих друг за другом оснований. Так, ДНК-кодон для фенилаланина представлен тринуклеотидом TTC (2) На уровне ДНК кодоны образуют ее не кодирующую цепь [последовательность нуклеотидов которой соответствует последовательности мРНК (mRNA)]

Репликация. Во время деления клеток генетическая информация должна перейти в дочерние клетки. Для достижения этого вся ДНК клетки копируется в процессе репликации во время S-фазы клеточного цикла, при этом каждая ее цепь служит матрицей для синтеза комплементарной последовательности.

Транскрипция. Для экспрессии гена, т.е. синтеза закодированных в нем белков, последовательность нуклеотидов кодирующей цепи ДНК должна быть трансформирована в аминокислотную последовательность. Поскольку ДНК не принимает непосредственного участия в синтезе белка, информация, хранящаяся в ядре, должна быть перенесена на рибосомы, где собственно и осуществляется биосинтез белков. Для этого соответствующий участок кодирующей цепи ДНК считывается (транскрибируется) с образованием гетерогенной ядерной РНК [гяРНК (hnRNA)], т. е. последовательность этой РНК комплементарна кодирующей цепи ДНК. Поскольку в РНК вместо тимина содержится урацил AAG триплет ДНК трансформируется в UUC-кодон гяРНК.

Созревание РНК. У эукариот гяРНК, прежде, чем покинуть ядро в виде матричной РНК (мРНК, 4), претерпевает существенные изменения: из молекулы вырезаются избыточные (не кодирующие) участки (интроны), а оба конца транскриптов модифицируются путем присоединения дополнительных нуклеотидов.

Трансляция. Зрелая мРНК попадает в цитоплазму и связывается с рибосомами, преобразуя полученную информацию в аминокислотную последовательность. Рибосомы — это рибонуклеопротеидные комплексы, включающие несколько десятков белков и несколько молекул

рибосомной РНК (рРНК (rRNA)). Рибосомные РНК выполняют функцию структурного элемента рибосом, а также принимают участие в связывании мРНК и образовании пептидных связей.

Механизм преобразования генетической информации основан на взаимодействии кодонов мРНК транспортной РНК [тРНК (tRNA)], которая переносит на рибосому аминокислоты, связанные с 3'-концом тРНК, в соответствии с информацией, закодированной в мРНК. Примерно в середине цепи тРНК расположен триплет (например, GAA), называемый антикодоном и комплементарный соответствующему кодону а мРНК. Если транслируется кодон UUC, то с ним взаимодействует антикодон в составе Phe-тРНК (5), несущей на 3'-конце остаток фенилаланина. Таким образом, остаток аминокислоты занимает положение, в котором на него может быть перенесена растущая полипептидная цепь, связанная с соседней тРНК (6).

Активация аминокислот. Прежде чем связаться с рибосомой, транспортные РНК присоединяют соответствующую аминокислоту с помощью специфического «узнающего» фермента обеспечивающего точный перенос (трансляцию) генетической информации с уровня нуклеиновых кислот на уровень белка.

3. 2 Генно-модифицированные источники пищевой продукции. Концепция биобезопасности пищевой продукции и питания

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

Обсуждаются проблемы биобезопасности в биотехнологии и биоинженерии при создании генетически модифицированных организмов (ГМО). Рассматриваются различные аспекты биобезопасности при работе на генетическом, клеточном, тканевом и организменном уровнях. Описаны возможные отрицательные последствия встраивания в ДНК рецилиентной клетки донорского чужеродного гена. Большое внимание уделено критериям, показателям и методам оценки биобезопасности ГМО и качества получаемых из них продуктов. Освещены особенности государственного правового регулирования в России и США генно-инженерной деятельности при создании и использовании ГМО. Предложены способы преодоления отставания по биотехнологии, биоинженерии биобезопасности в России.

Начало дискуссии по проблеме биобезопасности в науке и обществе положили основатели нового направления — биоинженерии. В 1974 году 11 ведущих молекулярных биологов мира во главе с отцом генной инженерии американцем П. Бергом, создавшим первую рекомбинантную молекулу ДНК, обратились к мировому сообществу с письмом через журнал «Science», в котором предложили отказаться от экспериментов с рекомбинантными ДНК до проведения международной конференции по этой проблеме. Однако уже в 1975 году на конференции в Асиломаре (США) ученые пришли к выводу о том, что эксперименты в области генной инженерии — новейшей биотехнологии — не более опасны, чем аналогичные работы в других отраслях, но при этом, как и везде, необходим строгий контроль за соблюдением мер

безопасности (1). В 1976 году в США были приняты первые правила, регламентирующие работу с рекомбинантными микроорганизмами, которые запрещалось выпускать за стены лабораторий. В конце 70-х годов в большинстве стран мира было разработано соответствующее законодательство.

О понятии безопасности. Природные, техногенные и другие факторы оказывают постоянное и значительное воздействие на человека и окружающую его среду обитания. Эти воздействия могут быть положительными и отрицательными. Наука, общество, государство должны разрабатывать и эффективно использовать системы мер по защите человека и окружающей среды от вредных воздействий любых опасных факторов. Из этого важнейшего положения вытекает общее понятие о безопасности человека, общества, государства, цивилизации, под которым понимается устойчивое состояние защищенности жизненно важных интересов личности и самой жизни человека, общества и государства от внешних и внутренних угроз (1-3).

Главнейшим объектом безопасности является человек с его потребностями, правами и здоровьем. Безопасность человека не может быть обеспечена без защиты безопасности среды его обитания и жизнедеятельности, а также общества, в котором он живет. Одним из основных принципов безопасности является взаимная ответственность человека, общества и государства. Достижение безопасности — это результат действия системы, предполагающей приведение в действие мер, адекватных угрозам жизненно важных интересов.

Безопасность может быть биологической, экологической, экономической, продовольственной, военной и другой в зависимости от внутренних и внешних факторов, масштабы, направленность и степень воздействия которых угрожают деятельности, существованию и самой жизни объектов (человека, общества, государства, цивилизации в целом). Общее представление о взаимосвязи между видами безопасности и влиянием на них биотехнологии отражено в схеме Поповой (рис., цит. по 1).

Биологически опасные" организмы и их продукты представляют собой угрозу для существования не только человека, но и растений, животных и полезных микроорганизмов, вызывая различную степень их поражения или полную гибель, лишая человека продовольственных и других источников и возможностей существования (1,2, 4-7)

Проблемы биобезопасности существуют в мире давно, так как и в природе, и в производстве в различных необходимых человеку и обществу веществах (продуктах питания, лечения, гигиены и др.) нередко встречаются опасные для здоровья и жизни соединения.

Во всех государствах мира разработаны и применяются различные методы контроля за технологическими процессами и качеством вновь вовлеченных в сферу использования человеком новых биологических объектов и веществ, их токсичностью, аллергенностью и общей безопасностью для здоровья людей и состояния окружающей среды. Большую опасность для здоровья и жизни людей до сих пор представляет употребление в пищу ядовитых грибов как следствие безграмотности и беспечности граждан. Наиболее опасными и часто трагичными являются проблемы алкогольной и наркотической токсикации людей.

3. 3 Общая схема реализации генетической информации

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

Синтез белка - сложный многоступенчатый процесс, в котором участвуют ДНК, иРНК, тРНК, рибосомы, АТФ и разнообразные ферменты. Вначале аминокислоты в цитоплазме активируются с помощью ферментов и присоединяются к тРНК (к участку, где расположен нуклеотид ЦЦА). На следующем этапе идет соединение аминокислот в таком порядке, в каком чередование нуклеотидов с ДНК передано на иРНК. Этот этап называется трансляцией. На нити иРНК размещается не одна рибосома, а группа их - такой комплекс называется полисома.

Синтез белка состоит из двух этапов - транскрипции и трансляции.

I. Транскрипция (переписывание) - биосинтез молекул РНК, осуществляется в хромосомах на молекулах ДНК по принципу матричного синтеза. При помощи ферментов на соответствующих участках молекулы ДНК (генах) синтезируются все виды РНК (иРНК, рРНК, тРНК). Синтезируется 20 разновидностей тРНК, так как в биосинтезе белка принимают участие 20 аминокислот. Затем иРНК и тРНК выходят в цитоплазму, рРНК встраивается в субъединицы рибосом, которые также выходят в цитоплазму.

II. Трансляция (передача) - синтез полипептидных цепей белков, осуществляется в рибосомах. Она сопровождается следующими событиями:

1. Образование функционального центра рибосомы - ФЦР, состоящего из иРНК и двух субъединиц рибосом. В ФЦР всегда находятся два триплета (шесть нуклеотидов) иРНК, образующих два активных центра: А (аминокислотный) - центр узнавания аминокислоты и П (пептидный) - центр присоединения аминокислоты к пептидной цепочке.

2. Транспортировка аминокислот, присоединенных к тРНК, из цитоплазмы в ФЦР. В активном центре А осуществляется считывание антикодона тРНК с кодоном иРНК, в случае комплементарности возникает связь, которая служит сигналом для продвижения (скачок) вдоль иРНК рибосомы на один триплет. В результате этого комплекс "кодон рРНК и тРНК с аминокислотой" перемещается в активный центр П, где и происходит присоединение аминокислоты к пептидной цепочке (белковой молекуле). После чего тРНК покидает рибосому.

3. Пептидная цепочка удлиняется до тех пор, пока не закончится трансляция и рибосома не соскочит с иРНК. На одной иРНК может уместиться одновременно несколько рибосом (полисома). Полипептидная цепочка погружается в канал эндоплазматической сети и там

приобретает вторичную, третичную или четвертичную структуру. Скорость сборки одной молекулы белка, состоящего из 200-300 аминокислот, составляет 1-2 мин. Формула биосинтеза белка: ДНК (транскрипция) --> РНК (трансляция) --> белок.

Завершив один цикл, полисомы могут принять участие в синтезе новых молекул белка.

Отделившаяся от рибосомы молекула белка имеет вид нити, которая биологически неактивна. Биологически функциональной она становится после того, как молекула приобретает вторичную, третичную и четвертичную структуру, т. е. определенную пространственно специфическую конфигурацию. Вторичная и последующие структуры белковой молекулы предопределены в информации, заложенной в чередовании аминокислот, т. е. в первичной структуре белка. Иначе говоря, программа образования глобулы, ее уникальная конфигурация определяются первичной структурой молекулы, которая в свою очередь строится под контролем соответствующего гена.

3. 4 Механизмы реализации генетической информации

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

Результатом экспрессии генов, кодирующих белки или нуклеиновые кислоты, должно быть образование полноценных в функциональном отношении макромолекул, сопровождаемое формированием определенного фенотипа организма. В соответствии с основным постулатом молекулярной биологии генетическая информация передается односторонне от нуклеиновых кислот к белкам по схеме: ДНК \leftrightarrow РНК \rightarrow белок, т.е. в ряде случаев возможна передача генетической информации от РНК к ДНК с использованием механизма обратной транскрипции. Не обнаружена передача генетической информации от белков к нуклеиновым кислотам.

На первом этапе экспрессии генов происходит переписывание генетической информации на матричные (информационные) РНК (мРНК - messenger RNA, mRNA), которые являются местом промежуточного хранения информации. В некоторых случаях сами РНК являются конечным результатом экспрессии генов, и после ряда ферментативных модификаций они непосредственно используются в клеточных процессах. Это относится, прежде всего, к рибосомным и транспортным РНК (рРНК и тРНК). К таким РНК принадлежат и малые ядерные РНК (мяРНК), участвующие в процессинге предшественников мРНК эукариот, РНК, входящие в состав ферментов, и природные антисмысловые РНК.

Синтез РНК происходит в результате сложной последовательности биохимических реакций, называемой транскрипцией. На втором этапе реализации генетической информации, называемой трансляцией, последовательность нуклеотидов мРНК определяет последовательность аминокислотных остатков синтезируемых белков.

Таким образом, экспрессию генов определяют два глобальных молекулярно-генетических механизма: транскрипция генов и трансляция синтезированных мРНК рибосомами, которая завершается образованием полипептидных цепей, кодируемых генами. Однако процесс экспрессии генов не ограничивается их транскрипцией и трансляцией.

Существенными моментами экспрессии генов являются посттранскрипционные и посттрансляционные модификации мРНК и белков, которые включают процессинг их предшественников (удаление избыточных последовательностей и другие ковалентные

модификации последовательностей РНК и белков). Посттранскрипционные модификации предшественников мРНК обеспечивают подготовку мРНК к трансляции рибосомами и определяют продолжительность ее существования в цитоплазме. Посттрансляционные модификации белков необходимы для их полноценного функционирования.

3. 5 Особенности механизмов трансляции у прокариот и эукариот

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

Одной из особенностей трансляции у прокариот является включение в пептидную цепь в качестве первой аминокислоты модифицированного метионина - формилметионина, с которого начинаются все вновь синтезированные пептиды. Даже в том случае, когда роль стартового кодона выполняет кодом ГУГ, в обычных условиях шифрующий валин, в первом положении пептида оказывается формилметионин. Стартовый кодон АУГ или ГУГ следует за лидерным участком, который экранируется рибосомой в момент инициации трансляции.

Соединение рибосомы с мРНК обусловлено комплементарным взаимодействием нуклеотидов одной из рРНК с нуклеотидной последовательностью лидера мРНК.

Эта последовательность (Шайна-Дальгарно) располагается на расстоянии 4-7 оснований перед кодоном АУГ и обнаруживается повсеместно в лидерных участках у прокариот.

При соединении 5'-конца мРНК с малой субчастицей рибосомы стартовый кодон обычно оказывается почти в середине экранированного рибосомой фрагмента мРНК, в области, соответствующей ее П-участку.

У эукариот трансляция осуществляется в цитоплазме, куда попадает из ядра зрелая мРНК. Копированный конец мРНК распознается малой субчастицей рибосомы, затем лидирующая последовательность, содержащая до 100 нуклеотидов, взаимодействует с рРНК. При этом стартовый кодон АУГ оказывается в недостроенном П-участке рибосомы. После присоединения к стартовому кодону аминоацил-тРНК, несущей метионин, происходит воссоединение двух субчастиц рибосомы и формируются ее А - и П-участки. Синтез белка в эукариотической клетке, осуществляемый на моноцистронной мРНК, завершается после прохождения рибосомой по всей мРНК, вплоть до узнавания ею кодона-терминатора, прекращающего образование пептидных связей.

3. 6 Развитие многоклеточного организма

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

Развитие оплодотворенного яйца начинается с его дробления на ряд клеток — бластомеров. В зависимости от количества желтка в яйце этот процесс протекает у разных животных различно. Дробление яйца бывает полным и неполным . Полное дробление яйца происходит в тех

случаях, когда в нем мало желтка и он распределен в цитоплазме яйца более или менее равномерно; такие яйца именуются гомолецитальными.

При полном дроблении все яйцо делится на 2 части, затем на 4, 8, 16 и т. д. В результате такого дробления яйца образуется комочек клеток — морула. Позднее в центре зародыша возникает полость и морула превращается в бластулу. Неполное дробление наблюдается в яйцах с большим содержанием желтка. При этом типе дробления на бластомеры распадается не все яйцо, а только часть его, в которой содержится ядро, окруженное цитоплазмой (так называемая образовательная плазма).

В яйцах птиц, рыб и некоторых других животных образовательная плазма расположена на одном из их полюсов в виде небольшого диска (такие яйца называются телолецитальными). При развитии зародыша этот диск дробится на ряд бластомеров, расположенных в один слой, лежащий на массе желтка. В яйцах других животных (например, насекомых) желток обычно занимает среднюю часть (так называемые центролецитальные яйца). Дробление окружающей желток образовательной плазмы приводит к возникновению периферического слоя бластомеров, к образованию однослойного зародыша — бластулы, внутри которого имеется первичная полость — бластоцель (иногда заполненная желтком).

Следующий этап развития многоклеточного животного — гастрюляция — заключается в превращении однослойной бластулы в двухслойную гастрюлу. Гастрюляция у разных животных протекает неодинаково (рис. 26). У форм, яйца которых проходят полное и равномерное дробление, бластула имеет вид пузырька с клеточной стенкой примерно одинаковой толщины. В этом случае гастрюляция идет путем впячивания нижней части бластулы. В результате образуется зародыш с двумя зародышевыми листками: наружными — эктодермой и внутренним — энтодермой.

У животных, яйца которых проходят полное, но неравномерное дробление, верхняя часть бластулы сложена мелкими, а нижняя — более крупными бластомерами. В этом случае образование двухслойного зародыша (гастрюлы) происходит путем обрастания нижних крупных бластомеров более быстро делящимися верхними мелкими. Внутренний слой гастрюлы у некоторых животных образуется вселением (иммиграцией) отдельных клеток нижней части бластулы в ее полость (бластоцель).

Как бы ни шел процесс гастрюляции, он приводит к образованию зародыша, состоящего из двух слоев клеток: эктодермы и энтодермы. Пространство между ними остается первичной полостью тела, а гастроцель (кишечная полость гастрюлы) в дальнейшем становится полостью кишечника взрослого животного. Отверстие гастроцели — бластоиор (первичный рот) у большинства беспозвоночных животных сохраняется и становится ртом взрослых особей. Такие животные называются первичоротыми. У другой группы животных (иглокожих, хордовых) бластоиор зарастает или становится заднепроходным отверстием, рот же впоследствии образуется вновь (вторичпоротые).

Для низших многоклеточных животных — губок и кишечнополостных — характерно двухслойное строение тела. Но у более высокоорганизованных животных между эктодермой и энтодермой образуется средний зародышевый листок — мезодерма. Ее образование происходит различно. Низшие трехслойные животные в течение всей жизни

сохраняют первичную полость тела, и их именуют первич-нополостными. В развитии ряда хордовых мезодерма закладывается в виде парных карманообразных выпячиваний стенки кишечника зародыша. Они отшнуровываются от кишки, располагаясь по бокам от нее. Внутри каждого мезодермального мешочка — сомита имеется полость, называемая вторичной полостью тела — целомом. Сомиты располагаются между экто- и энтодермой в первичной полости тела и, разрастаясь, вытесняют ее.

Наружные стенки сомитов соприкасаются с эктодермой, а внутренние — со стенкой кишки. Когда перегородки между сомитами рассасываются, полости сомитов сливаются. Животные, имеющие целом, называются вторичнополостными (целомата). Остатки первичной полости сохраняются у целомата в виде каналов, щелей, лакун. Часть их становится полостью кровеносных сосудов, приобретающих у большинства собственные стенки. Первичнополостные лишены кровеносных сосудов, у них функцию крови выполняет полостная жидкость, омывающая внутренние органы. В развитии ряда целомата (например, моллюсков, членистоногих) происходит частичное слияние первичной полости с целомом. Такую полость называют смешанной, а кровеносную систему их — незамкнутой: кровь течет то в сосудах, то разливается по лакунам.

В процессе развития эмбриона зародышевые листки путем дифференцировки образуют ткани и органы. В формировании эпителиальной ткани участвуют все три зародышевых листка. Из эктодермы развиваются кожный эпителий и его железы, а у многих — передний и задний отделы кишечника, органы дыхания, мочевые протоки; из энтодермы — эпителий среднего (пищеварительного) отдела кишечника, нервная система; из мезодермы — скелет, мышцы, кровь.

3. 7 Иммуитет. Некоторые отклонения в работе иммунной системы

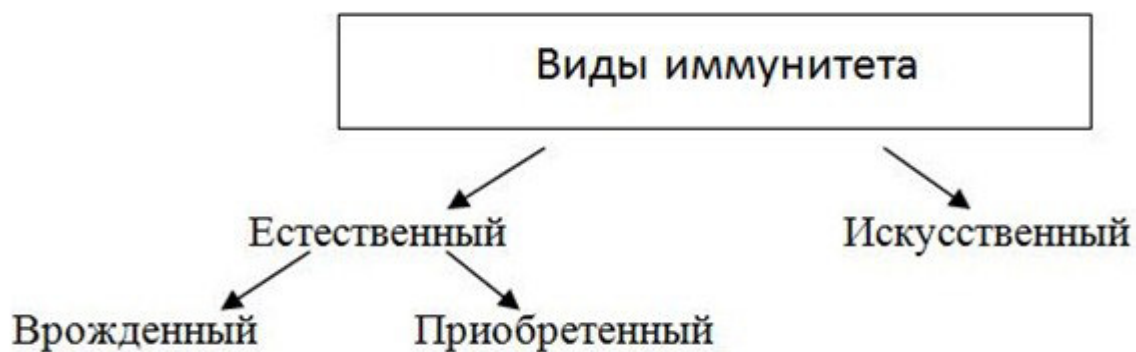
При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

Иммуитет — способность организма к невосприимчивости и сопротивлению чужеродным веществам различного происхождения. Эта сложная система защиты создавалась и менялась одновременно с развитием эволюции. Изменения эти продолжаются и сейчас, так как постоянно изменяются условия окружающей среды, а значит и условия проживания существующих организмов. Благодаря иммуитету, наш организм способен к распознаванию и уничтожению болезнетворных организмов, инородных тел, ядов и внутренних переродившихся клеток организма.

Понятие об иммуитете определяется общим состоянием организма, которое зависит от процесса обмена веществ, наследственности и изменений под действием внешней среды.

Естественно, организм будет отличаться крепким здоровьем, если сильным будет иммуитет. Виды иммуитета человека по своему происхождению делятся на врожденный и приобретенный, естественный и искусственный.

«Виды иммуитета» Схема



Врожденный иммунитет – это генотипический признак организма, передающийся по наследству. Работа этого вида иммунитета обеспечивается многими факторами на различных уровнях: клеточном и не клеточном (или гуморальном). В некоторых случаях естественная функция защиты организма может снижаться в результате совершенствования чужеродных микроорганизмов. При этом естественный иммунитет организма понижается. Это, как правило, происходит во время стрессовых ситуаций или при гиповитаминозе. Если чужеродный агент во время ослабленного состояния организма попадает в кровь, то в этом случае свою работу начинает приобретенный иммунитет. То есть разные виды иммунитета сменяют друг друга.

Приобретенный иммунитет – это фенотипический признак, сопротивляемость чужеродным агентам, которая формируется после вакцинирования или перенесенного организмом инфекционного заболевания. Поэтому стоит переболеть какой-либо болезнью, например, оспой, корью или ветрянкой, и тогда в организме формируются специальные средства защиты от этих болезней. Повторно уже человек ими заболеть не может.

Естественный иммунитет может быть, как врожденным, так и приобретенным после перенесенного инфекционного заболевания. Также этот иммунитет может создаваться с помощью антител матери, которые поступают к плоду во время беременности, а потом и при грудном вскармливании уже к ребенку. Искусственный иммунитет, в отличие от естественного обретается организмом после вакцинации или в результате введения особого вещества – лечебной сыворотки.

Если у организма наблюдается длительная устойчивость к повторному случаю инфекционного заболевания, то иммунитет можно назвать постоянным. При невосприимчивости организма к заболеваниям в течение некоторого времени, в результате введения сыворотки, иммунитет называют временным.

При условии выработки организмом антител самостоятельно – иммунитет активный. Если же антитела организм получает в готовом виде (через плаценту, из лечебной сыворотки или через грудное молоко), то говорят о пассивном иммунитете.

«Виды иммунитета» Таблица

Вид иммунитета	Способ проявления
----------------	-------------------

Врожденный (естественный)	Сопrotивляемость к заболеваниям с рождения
Приобретенный (естественный)	Формирование антител после инфекционной болезни
Активный (искусственный)	Возникает после прививки
Пассивный (искусственный)	Появляется в результате введения сыворотки

Иммунодефицитные заболевания. Причиной возникновения заболеваний иммунной системы является ее медленная неэффективная работа, когда иммунитет или его отдельные звенья полностью отсутствуют или нарушены вследствие дисфункции принципов функционирования системы. Заболевания данного типа бывают двух категорий: первичные (врожденные) и вторичные (приобретенные). Развитие врожденных заболеваний происходит в результате сбоя работы отдельных генов, дисфункция вызвана наследственными факторами. Врожденными заболеваниями считаются синдром Вискотта-Олдрича, хронический гранулематоз, у больных от рождения детей отсутствуют стволовые лимфоидные клетки Т-ряда и В-ряда, в костном мозге отсутствуют пре-В-лимфоциты. К приобретенным заболеваниям относятся СПИД, гепатит, цирроз, диабет, уремия и т.д. При поражении клеток иммунной системы вирусным агентом иммунодефицит рассматривается как отдельное заболевание. Аутоиммунные заболевания проявляются, когда механизм разрушения направлен на собственные здоровые клетки. В ходе болезни здоровые ткани и органы разрушаются собственной иммунной системой, поражаются целые системы, именно поэтому заболевание относится к категории системных. Самые известные аутоиммунные заболевания: красная системная волчанка, болезнь Грейвса, аутоиммунный тиреоидит, множественный склероз и так далее. Узнайте о лечебном эффекте криосауны: показания и противопоказания холодной процедуры. А также ознакомьтесь с процедурой «жемчужные ванны». Аллергические заболевания возникают вследствие гипериммунной реакции организма на воздействие факторов окружающей среды (продукты питания, химические вещества, растения, микроорганизмы и т.д.), они еще называются аллергенами. Причиной возникновения аллергических реакций могут быть самые разные факторы (загрязнение окружающей среды, изделия химической промышленности, прием антибиотиков и медицинских препаратов, физическая пассивность, стрессы, плохое питание, злоупотребление алкоголем и курением). Аллергены могут возникать также в результате самых разных соединений, попадают в организм из внешней среды и образуются внутри организма (аутоаллергены / эндогенные аллергены). Часто встречаются такие заболевания, как крапивница, поллинозы, бронхиальная астма, контактные дерматиты.

3. 8 Получение животных и растительных трансгенных организмов

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

Мы выяснили, что смысл генно-инженерных манипуляций состоит в переносе целевого гена в геном клетки-мишени и его экспрессии в новом генном окружении. Логика проведения такой манипуляции мало меняется в зависимости оттого, какой целевой ген будет использован и клетки какого организма подвергнутся изменению. Главное, что после получения трансформированной

изменённой клетки из неё можно получить полноценный организм. При этом подходы к формированию организма зависят от того, какая клетка — бактериальная, растительная или животная — служила мишенью для трансформации.

В случае бактериальной клетки либо клетки другого одноклеточного организма (например, дрожжей), получение трансгенного организма ограничивается непосредственным переносом гена в клетку-мишень. Клетка одноклеточных сама по себе — самостоятельный полноценный организм. Деление такой клетки приводит к появлению идентичных организмов с теми же свойствами, что были приобретены исходной трансгенной - материнской клеткой.

Для получения трансгенного животного в качестве клетки-мишени используют половую клетку — яйцеклетку. После трансформации в ходе естественных процессов развития яйцеклетка превращается в полноценный автономный организм. Передача новых признаков в поколениях невозможна, если процесс трансформации не затронул половые клетки.

Растения имеют важное преимущество перед животными, а именно — возможна их регенерация *in vitro* из недифференцированных соматических тканей с получением нормальных, фертильных растений. Это свойство (тотипотентность) дает возможность получать генетически модифицированные (трансгенные) растения и изучать функционирование введенных в растения генов.

Вводить в геном растительных клеток гены, кодирующие нужный белок, пробовали разными способами, однако они все были малоэффективны. Удобный способ доставки чужих генов был подсказан самой природой — трансформация растений с помощью почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes*. Как и у большинства других бактерий, I часть их генома находится не в основной хромосоме, а в плазмидах. Ti-плазмиды (tumor-inducing, опухолообразующие), найденные в *Agrobacterium tumefaciens* или Ri-плазмиды (root-inducing, корнеобразующие) в *Agrobacterium rhizogenes*, оказались лучшим инструментом для генной инженерии.

Агробактерии являются мезофильными обитателями почвы, среди них встречаются как сапрофитные (*A. radiobacter*), так и фитопатогенные (*A. tumefaciens*, *A. rubi*, *A. rhizogenes*, *A. vinis*) виды. Это короткие, подвижные грамотрицательные палочки с перитрихальными жгутиками.

Опухолевый рост у растений, индуцированный патогенными штаммами *Agrobacterium*, представляет собой особый случай паразитизма: паразит (агробактерия) изменяет обмен веществ в клетках хозяина, вводя свою генетическую информацию в его геном. Такое явление получило название «генетическая колонизация». Ферментативный механизм растения, отвечающий за транскрипцию собственной ДНК и синтез белка, распознает чужеродную ДНК из бактерии как свою собственную и транскрибирует ее вместе с обычными растительными генами. В природе образование опухоли начинается с повреждения стебля растения у самой земли. Агробактерии могут трансформировать растение только при наличии пораненной растительной ткани, которая теряет различные вещества, входящие в состав клеточных стенок (глюкозу, глюкуроновую кислоту, галактозу, галактуроно-вую кислоту, арабинозу, маннозу, фукозу, целлобиозу и ксилозу), а взамен в ней начинают синтезироваться специальные вещества — предшественники лигнина, являющиеся сигнальными молекулами для начала инфекции — ацетосирингон и гидро-ацетосирингон, способствующие заживлению раны.

Патогены чувствительны к ним и начинают двигаться к поврежденному участку ткани по градиенту концентрации этих веществ со скоростью 60 мкм/сек, а затем прикрепляются к клеткам растения в местах повреждений. После прикрепления бактерий к поверхности клеток растения они начинают образовывать целлюлозные фибриллы, которые видны при микроскопировании уже через 90 мин после добавления бактерий и к 10 часам инкубации формируют сеть, покрывающую поверхность растительных клеток. Фибриллы служат более прочному закреплению бактерий на поверхности хозяина. За целлюлозные фибриллы могут зацепиться свободно плавающие клетки бактерий, за счет чего увеличивается множественность заражения. В результате размножения образуются скопления бактерий на поверхности растения. Передача ДНК от бактерий в растительную клетку происходит при плотном контакте бактерий с плазмалеммой растительной клетки, который обеспечивается вследствие повреждения клеточных стенок ферментами, выделяемыми бактериями и растворяющими пектины клеточной стенки.

Для чего же нужно бактериям встраивать свои гены в клетки растения, изменяя их метаболизм? В растениях со встроенных бактериальных генов начинается синтез фитогормонов цитокининов и специфических, используемых только агробактериями, веществ — опинов. Синтез дополнительного количества гормонов в растительной клетке приводит к сдвигу баланса гормонов в клетке и, как следствие, к неуправляемому росту клеток, ведущему к образованию опухоли. Эти вещества — опины используются бактериями в качестве источника углерода и азота, что создаёт для них селективные преимущества, т.к. только агробактерии имеют гены, ответственные за деградацию этих соединений.

Геном *A. tumefaciens* состоит из 2-х частей — из большой линейной хромосомы (2 млн пар оснований) и значительно меньшей кольцевой хромосомы (206479 пар оснований). Именно эта кольцевая хромосома и носит название Ti-плазмиды (см. выше).

Гены, вызывающие формирование галлов на растениях, локализованы по большей части на Ti-плазмиде. *Agrobacterium tumefaciens* имеет очень широкий круг растений-хозяев и может инфицировать практически все двудольные растения. Долгое время считалось, что однодольные растения не чувствительны к агробактериальной инфекции. В настоящее время показано, что при соблюдении определенных условий агробактерии могут инфицировать и однодольные растения, в частности представителей таких семейств, как *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*, *Gramineae*, *Iridaceae* и некоторых других. Однако существуют определенные вариации круга хозяев для различных штаммов *Agrobacterium*: некоторые штаммы способны вызывать галлообразование на отдельных видах растений, но не инфицируют другие. Различные сорта одного и того же растения также могут иметь различную чувствительность к данному бактериальному штамму. В отличие от *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* фактически инфицируют все виды растений, как двудольные, так и однодольные.

Ti-плазида представляет собой кольцевую двунитевую ДНК, которая несет гены, участвующие в образовании опухоли. В растение переносится часть плазмиды, которая называется Т-ДНК (от англ. transferred DNA, т.е. «переносимая ДНК»), на которой локализованы гены синтеза ферментов, вызывающих формирование опухолей на растениях, а также гены синтеза опинов. Ti-плазида содержит также w^g-гены, которые экспрессируются под воздействием сигнальных молекул и являются ответственными за синтез, вырезание и перенос Т-ДНК, но сами в геном растения не переносятся.

Индукция *vir* генов обратима, и каскад реакций может быть прерван, что очень важно для патогена, поскольку в том случае, если инфицируется больной и/или нежизнеспособный организм, то перенос Т-ДНК в его клетки не осуществляется. После активации *w't*-генов в оболочке бактерии образуется разрыв, через который Т-ДНК переносится в растительную клетку. Похожим образом у бактерий происходит половой процесс, когда микробы просто обмениваются копиями плазмид.

Т-ДНК, являясь фрагментом Ti -плазмиды, ограничена двумя прямыми повторами из 25 нуклеотидов, которые «обманывают» ферменты растительной клетки, заставляя их принять Т-ДНК за родную и встроить ее в собственный геном. Правый конец обозначается П (RB — right border), левый соответственно Л (LB — left border). Для нормального переноса в растительную клетку особенно важна ее правая граница, которая одна может определять встраивание Т-ДНК. Удаление правой границы из Ti -плазмид делает агробактерии полностью неинфекционными. В то же время замена правой границы как на искусственно синтезированную, так и на левую восстанавливает вирулентность бактерии. Любой фрагмент ДНК, помещенный между этими границами, может быть перенесен и встроен в ядро растительной клетки. Максимальный размер фрагмента ДНК, который может быть перенесен, пока не определен.

На рисунке приведена схема генетической трансформации клетки. Фенольные компоненты пораненной растительной клетки запускают экспрессию генов *vir*-области Ti -плазмиды. *vir*-белки вырезают Т-область из плазмиды, образуя Т-цепь. Затем Т-цепь и *vir*-белки нескольких типов переносятся в растительную клетку через транспортные каналы. Внутри клетки *vir*-белки взаимодействуют с Т-цепью, формируя Т-комплекс. Этот комплекс попадает в ядро, позволяя Т-ДНК интегрировать в геном растения и экспрессировать встроенные гены

После переноса в ядро растительной клетки Т-ДНК встраивается в геном в виде одной или нескольких копий. При этом одна из нитей плазмидной ДНК деградирует, а другая за счет рекомбинации с гомологичным участком ДНК клетки-хозяина может включиться в хромосому или внехромосомную единицу.

У Ri -плазмид имеются общие черты с Ti -плазмидой, в том числе гомологичная *vir*-область. Ее Т-ДНК также содержит гены, кодирующие опины и два гена синтеза ауксина и, кроме того, ещё в ней присутствуют специальные гены, называемые гогенами, которые и способствуют образованию опухоли в виде пучка корней.

Ti - и Ri -плазмиды оказались прекрасным инструментом для переноса генов в хромосомы растений. В начале 80-х гг. XX в. различными группами исследователей Ti -плазмиды были модифицированы путем удаления онкогенов (генов синтеза фито-гормонов и опинов) из области Т-ДНК; также из агробактерий была удалена вся лишняя ДНК, не нужная при клонировании ДНК. Клонирование в биологии — это получение точных копий организма или другого объекта, например, клетки или гена. Первоначально слово клон (от греч. ветка, побег) применялось для группы растений (например, фруктовых деревьев), полученных вегетативным способом от одного растения-производителя. Эти растения в точности повторяли качества своего прародителя и могли стать основателями нового сорта. Позже клоном стали называть не только всю такую группу, но и каждое отдельное растение в ней, а получение таких потомков — клонированием.

Со временем значение термина расширилось, и его стали применять в микробиологии, для методики выращивания культур бактерий — потомков одной клетки. Кроме того, в Ti -плазмиду

был также добавлен сайт инициации репликации, вырезанный из плазмиды кишечной палочки *E. coli*, чтобы можно было клонировать в ней плазмиды. После переноса с их помощью ДНК в ядро растительной клетки нормальный рост растения не нарушался. После этого оставалось вставить в Т-ДНК нужные гены: один или несколько целевых и не менее двух маркерных, которые позволяют отобрать сначала клетки кишечной палочки, а потом растительные, в которых перенос генов прошел удачно - ген устойчивости к определенному антибиотику или кодирующий светящийся белок, и т.п.

В растениях, трансформированных такими плазмидами, опухоли уже не образуются, и не происходит синтеза опинов. «Обманутая» человеком бактерия, внедряя свою ДНК в хромосому растения, в свою очередь «обманывает» геном растения, который после этого начинает синтезировать необходимые человеку продукты.

3. 9 Геномика и генная терапия

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

Лечение заболеваний с помощью генов получило название генотерапии. Сейчас в мире насчитывается порядка 400 проектов, посвященных лечению с помощью генотерапии.

Разработке программы генной терапии предшествуют тщательный анализ тканеспецифической экспрессии соответствующего гена, идентификация первичного биохимического дефекта, исследование структуры, функции и внутриклеточного распределения его белкового продукта, а также биохимический анализ патологического процесса. Все эти данные учитываются при составлении соответствующего медицинского протокола.

Апробацию процедуры генокоррекции наследственного заболевания проводят на первичных культурах клеток больного, в которых в норме функционально активен данный ген. На этих клеточных моделях оценивают эффективность выбранной системы переноса экзогенной ДНК, определяют экспрессию вводимой генетической конструкции, анализируют ее взаимодействие с геномом клетки, отрабатывают способы коррекции на биохимическом уровне. Используя культуры клеток, можно разработать систему адресной доставки рекомбинантных ДНК, однако проверка надежности работы этой системы может быть осуществлена только на уровне целого организма. Поэтому такое внимание в программах по генной терапии уделяется экспериментам *in vivo* на естественных или искусственно полученных моделях соответствующих наследственных болезней у животных.

Успешная коррекция генетических дефектов у таких животных и отсутствие нежелательных побочных эффектов генной терапии являются важнейшей предпосылкой для разрешения клинических испытаний. Таким образом, стандартная схема генокоррекции наследственного дефекта включает серию последовательных этапов. Она начинается созданием полноценно работающей (экспрессирующейся) генетической конструкции, содержащей смысловую (кодирующую белок) и регуляторную части гена. На следующем этапе решается проблема вектора, обеспечивающего эффективную, а по возможности и адресную доставку гена в клетки-мишени. Затем проводится трансфекция (перенос полученной конструкции) в клетки-мишени, оценивается эффективность трансфекции, степень коррегируемости первичного

биохимического дефекта в условиях клеточных культур (*in vitro*) и, что особенно важно, *in vivo* на животных - биологических моделях. Только после этого можно приступать к программе клинических испытаний.

Существует два типа генотерапии: заместительная и корректирующая.

Заместительная генотерапия заключается во вводе в клетку неповрежденного гена. Внесенная копия заменит по функциям сохранившийся в геноме больного дефектный ген. Все проводимые сегодня клинические испытания используют внесение в клетку дополнительных количеств ДНК.

При корректирующей терапии предполагается замена дефектного гена нормальным в результате рекомбинации. Пока этот метод на стадии лабораторных испытаний, так как эффективность его еще очень низка, но последние исследования показывают успехи в лечении некоторых заболеваний.

Амавроз Лебера - врожденная слепота, редкая форма наследственного заболевания, которое проявляется уже в младенчестве. Из-за дефектного гена (Retinal Pigment Epithelium, 65 kDa) в сетчатке умирают и не восстанавливаются светочувствительные клетки. По статистике, от амавроза Лебера страдает один человек на 81 тысячу. Болезнь сопровождается ослаблением или полной потерей зрения без анатомического нарушения структуры органов. Повреждение гена RPE65 приводит к прекращению синтеза определенных ферментов, участвующих в выработке светочувствительного пигмента, и дегенерации фоторецепторов. Врожденный амавроз Лебера впервые был описан в 1869 году немецким ученым-офтальмологом Теодором Лебером, однако этиология и патогенез этой группы болезней до настоящего времени остаются не до конца изученными.

Клиническими критериями диагностики ВАЛ являются: значительное снижение остроты зрения (от отсутствия реакции на свет и светоощущения до сотых долей), у большинства детей отмечаются плавающие движения глаз, нистагм, окуло-пальцевой симптом, косоглазие, могут встречаться деструкция стекловидного тела и частичное врожденное помутнение хрусталиков. Характерным является резкое снижение скотопических и фотопических показателей суммарного потенциала фоторецепторов сетчатки на электроретинографии (ЭРГ), вплоть до ее отсутствия, при нормальной офтальмоскопической картине глазного дна. Кроме того, отмечаются нарушения цветоощущения от красно-зеленой дисхроматопсии до ахроматопсии, сужение полей зрения до 30-10 градусов, значительное повышение порога электрической чувствительности.

Традиционная лекарственная терапия бессильна в борьбе с этим заболеванием. На помощь пришла генотерапия. Исследователи из США и Англии делали инъекцию вирусного вектора, содержащего исправленный ген в один глаз пациентов, страдающих амаврозом Лебера. Вектор содержал фермент, необходимый для продукции светочувствительного пигмента и вводился в эпителий пигментного слоя сетчатки. В первом исследовании у всех 12 пациентов светочувствительность в "пролеченном" глазу вернулась. У 4 детей зрение восстановилось до такой степени, что они могли заниматься спортом и нормально учиться в школе. Кроме того, были проведены исследования на саймири (белышья обезьянки), страдающих дальтонизмом. Инъекция "исправленных" генов вернула им полное цветовое зрение.

В зависимости от способа введения экзогенных ДНК в геном пациента генная терапия может проводиться либо в культуре клеток (*ex vivo*), либо непосредственно в организме (*in vivo*).

Клеточная генная терапия или терапия *ex vivo* предполагает выделение и культивирование специфических типов клеток пациента, введение в них чужеродных генов, отбор трансфицированных клеток и реинфузию их тому же пациенту.

Примером может служить лечение комбинированного иммунодефицита. Комбинированный иммунодефицит может быть результатом дефекта гена аденозиндезаминазы. Это заболевание клинически и иммунологически характеризуется дефектом как Т-, так и В-лимфоцитов. Диагностируется заболевание обычно в раннем возрасте, а признаками служат тяжелые, потенциально смертельные инфекции, глубокое нарушение клеточного иммунитета и дефицит антител, лимфопения, в основном за счет Т-лимфоцитов. Клинические проявления обычно включают задержку и отсутствие прогресса физического и моторного развития, персистирующие, вяло текущие и необычно упорные инфекции, вызванные низковирулентными оппортунистическими микроорганизмами (например, *Candida*, *Pneumocystis carinii*, *cytomegalovirus*). Тяжелые комбинированные первичные иммунодефициты классифицируются далее в зависимости от патогенеза, когда он известен (например, дефекта фермента), типа наследования и уровня нарушения дифференцировки.

Одной из форм комбинированного иммунодефицита является тяжелая комбинированная иммунная недостаточность ТКИН, или англоязычное (*severe combined immunodeficiency* - SCID или "bubble boy" disease). Обнаружены как Х-сцепленная, так и аутосомно-рецессивная формы SCID. В случаях SCID с нормальным количеством В-лимфоцитов обычно наблюдается Х-сцепленное наследование. Впервые попытка лечения такого больного методами генотерапии была предпринята в США в 1990 г. У больного ребенка извлекли Т-лимфоциты, трансформировали ретровирусным вектором, введя нормальный ген аденозиндезаминазы и вернули клетки в организм. Введение приходилось повторять. Более эффективна аналогичная трансформация стволовых клеток костного мозга.

В январе 2009 года итальянские ученые опубликовали данные о полном излечении 8-ми летнего мальчика, страдающего этим заболеванием. Кроме того, 8 из 10 участвовавших в клиническом испытании не нуждаются более в ферментозаместительной терапии и живут теперь нормальной жизнью. Никаких серьезных побочных эффектов от применения генотерапии обнаружено не было.

Х-сцепленная адренолейко дистрофия (АДЛ) - дегенеративное заболевание белого вещества головного мозга. Поражает мальчиков с частотой примерно 1/17 000. Оно убивает их еще до того, как наступит подростковый возраст. Заболевание обусловлено дефектом обмена жирных кислот. В результате нарушается миелинизация нервных клеток. Клиническая картина выражается в интеллектуальной, поведенческой недостаточности, расстройстве памяти, нарушении походки, расстройстве зрения вплоть до атрофии зрительных нервов.

В экспериментах французских исследователей скорректированный ген вставляли в клетки крови 7-летнего мальчика, страдающего АДЛ, некоторые клетки начинали продуцировать необходимый для обмена жирных кислот протеин, а также, по видимому, мигрировали в мозг. По крайней мере, спустя 2 года прогрессирующее повреждение мозга, характерное для этой болезни, прекратилось. В этих экспериментах гены доставлялись в клетки с помощью инактивированного вируса иммунодефицита человека (HIV).

Компания Genetix Pharmaceuticals, специализирующаяся на соматической генной терапии, также сообщила в ноябре 2009 года о создании препарата для лечения АДЛ на основе собственных гемопоэтических стволовых клеток костного мозга, «зараженных» модифицированным вирусом ВИЧ (лентивирусный вектор), несущим в себе ген, которого недостает в организме больного АДЛ. Такой препарат уже ввели двум юным пациентам (после миелоабляции), спустя 15 месяцев прогрессирование болезни прекратилось.

Генная терапия *in vivo* основана на прямом введении клонированных и определенным образом упакованных последовательностей ДНК в специфические ткани больного. В настоящее время не существует общедоступного метода культивирования клеток легких, поэтому при легочных заболеваниях единственный способ доставить чужеродный ген - это ввести его прямо в организм.

Муковисцидоз - весьма распространенное среди людей белой расы тяжелое наследственное заболевание легких, которое поражает, например, в семьях из Центральной Европы одного новорожденного из 2500 и для которого установлен дефектный ген, кодирующий белок-регулятор трансмембранной проводимости. Основное проявление дефектного гена – пневмония. Поражаются все эпителиальные клетки. Основная проблема – как доставить ген в клетки, покрытые слизью, которая препятствует трансформации. Неповрежденную копию "гена заболевания", включенную в аденовирусный вектор или липосому, вводят в форме аэрозоля в дыхательные пути больного.

Для коррекции нарушения при прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна (заболевании мальчиков, связанном с дефектами X-хромосомы) нормальный ген, кодирующий белок дистрофии, пытались прямо вкалывать в мышечные волокна, используя либо "голую" ДНК, либо аденовирусный вектор. Другие исследователи трансплантировали больному миобласты после генетической коррекции. Ранее неподвижный ребенок приобретал способность двигаться! К сожалению, во всех этих опытах удается получить только временный терапевтический эффект, и процедура введения гена должна неоднократно повторяться.

Список наследственных заболеваний, которые пытаются или планируют лечить генами, велик. Это и ревматоидный артрит, и фенилкетонурия, и заболевания, связанные с недостатком гормонов (инсулина, эритропоэтина, гормона роста). В случае хронической анемии, связанной с дефицитом эритропоэтина, на основании опытов на животных предлагается принципиально новый подход к лечению. Так как каждая из наших клеток содержит один и тот же геном, можно заставить фибробласты кожи, которые в норме не производят эритропоэтина, синтезировать этот гормон. Для этого нужно ввести в геном новую контролируемую область и тем самым снять запрет со считывания (экспрессии) гена эритропоэтина, присутствующего, но "молчащего" в фибробластах.

Практически в любой области медицины либо начаты клинические испытания лечения наследственных заболеваний с помощью генотерапии, либо в опытах на животных разрабатываются подходы к такому лечению. По мере усовершенствования методов доставки генов и контроля их экспрессии список заболеваний, к которым можно применять генотерапию, будет безусловно расширяться.

3. 10 Молекулярная биология и возникновение жизни.

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

Гипотезы возникновения жизни

Панспермия - жизнь витает в космосе и разносится по планетам.

Жизнь зародилась абиогенно или нет?

Биогенез - живое только от живого.

Абиогенез - живое от неживого.

Луи Пастеру принадлежит первое прямое доказательство происхождения живого только от живого. В 1862 году он получил премию Французской академии наук за эту работу.

Суть опыта: в колбе с изогнутой трубкой находился прокипяченный сenny настой. В течение нескольких недель он стоял совершенно прозрачный. Как только колбу наклонили (сквозь трубку в колбу попали микроорганизмы) - настой забродил.

Эксперимент правильный. Вывод - живое только от живого.

Авторитет Пастера был столь велик, что к теории абиогенеза пришли лишь через 60 лет.

В 1924 году Александр Опарин высказал предположение, что ~4 млрд. лет назад жизнь могла возникнуть абиогенно, в силу тех условий, которые существовали тогда на Земле.

Джон Холдейн рассчитал, какие условия и как долго должны были существовать, чтобы зародилась жизнь, каковы необходимые источники энергии для зарождения жизни.

Теория биопозза

Джон Бернал создал теорию биопозза, включающую три стадии.

1. Образование биомономеров.
2. Образование биополимеров и их эволюция. Образование систем с обратной связью.
3. Образование мембранных структур и пробионтов (первых клеток).

Экспериментальное доказательство первой стадии - опыты Стенли Миллера.

Суть опыта: в колбе находилась смесь газов (H_2 , N_2 , NH_3 , CH_4 , CO , CO_2) при температуре ~ 100 °C. Кипящая вода служила источником водяного пара, а с помощью обратного холодильника поддерживалась циркуляция газовой смеси через сосуд. Давали искровой разряд в 60 тыс. вольт, что энергетически эквивалентно 50-и млн. лет на примитивной Земле. Результат был ошеломляющий: в колбе появились HCN , $HCHO$, $HCOOH$, несколько аминокислот, несколько азотистых оснований жирные кислоты, пириты, моносахара. Эксперимент повторяли много раз. Непременное условие успеха - отсутствие в колбе свободного кислорода. В зависимости от pH раствора и соотношения газов были получены разные наборы соединений. Если была H_3PO_4 , то образовывались даже нуклеотиды, а это уже гетерополимеры.

Таким образом была доказана первая стадия возникновения жизни. 4 млрд. лет тому назад с неизбежностью должны были возникнуть биомономеры.

Первичная атмосфера образующейся Земли кислород содержала, но он весь пошел на окисление. Свободного кислорода не было. Таким образом, возникновение биомономеров и биополимеров происходило во вторичной бескислородной среде.

У стадии 3 в принципе есть доказательства. Самая сложная и неочевидная - стадия 2.

2 стадия биопоэза.

Помимо 4-х основных классов биополимеров, могли образовываться и не дошедшие до нас гетерополимеры. Видимо, эволюция химических соединений шла по принципу минимума свободной энергии.

Остановимся пока на белках и нуклеиновых кислотах.

Из разных комплексов белок-нуклеиновая кислота рассмотрим только те, в которых нуклеиновая кислота сохраняется благодаря защите белком от ультрафиолетового излучения.

Накопим такие комплексы. Из их множества рассмотрим те, в которых белки способствуют увеличению количества защищенной нуклеиновой кислоты. То есть эти белки - ферменты. Из этих комплексов рассмотрим те, где нуклеиновые кислоты, количество которых возрастает под действием белков, способствуют увеличению количества белков благодаря, например, прямому кодированию. Возникают системы с обратной связью. Такие системы обладают некоторыми признаками живого.

Другой вариант.

Первыми молекулами были РНК.

Они имеют третичную структуру и обладают каталитической активностью. Позже появились белки, поддерживающие "выгодные" конформации РНК и защищающие их от расщепления. Уже потом возникает ДНК, как более надежный хранитель генетической информации. Она имеет две цепи, что обеспечивает репарацию, репликация осуществляется за один шаг. Отсутствие ОН-группы в 2'-положении пентозы делает ДНК устойчивой в слабощелочных условиях, губительных для РНК.

Стадия 3.

Представим, что лужа покрыта жирной пленкой, а под ней - белки. Если оторвать каплю, то могут получиться пузырьки, содержащие нуклеопротеидные системы с обратной связью. Когда они падают на поверхность водоема, то покрываются вторым липидно-белковым слоем - и образуется современная биологическая мембрана. В мембранной капле диффузия уже не очень существенна.

Далее образуются пробионты - первые организмы, имеющие мембрану.

Пробионты были первичными гетеротрофами. Они получали энергию при расщеплении органических веществ абиогенного происхождения, в изобилии имевшихся в окружающей среде. Примером древнего способа обмена веществ, дошедшего до наших дней, является гликолиз - ферментативное бескислородное расщепление глюкозы.

По мере истощения запаса органического материала (а новый не образовывался из-за изменения условий на Земле) возникала жесткая конкурентная борьба за него, что ускорило процесс эволюции первичных гетеротрофов.

Исключительным событием стало возникновение бактериального фотосинтеза, освободившего клетки от зависимости от доступности органики абиогенного происхождения. Скорее всего, фотосинтез возник у анаэробных бактерий, способных к азотофиксации. Побочным продуктом фотосинтеза является кислород. Его накопление в атмосфере привело к коренному изменению хода эволюции. Появление озонового экрана защитило первичные организмы от смертельного УФ-облучения и положило конец абиогенному синтезу органики.

Первые аэробные бактерии появились благодаря приобретению аппарата окислительного фосфорилирования. Продукты брожения подвергались дальнейшему окислению до CO_2 и H_2O . Аэробные (вторичные) гетеротрофы могли более эффективно, чем анаэробные (первичные) гетеротрофы, расщеплять органические вещества, образующиеся в результате фотосинтеза.

По-видимому, с ростом концентрации кислорода в атмосфере усложнялась жизнь первичных анаэробных гетеротрофов. Некоторые из них вымерли, другие нашли бескислородную среду. Примером могут служить дошедшие до наших дней метанобразующие бактерии или серные бактерии, живущие в горячих подземных источниках.

Некоторые первичные гетеротрофы пошли по пути, приведшему к образованию эукариотических клеток. Часть из них вступила в симбиоз с аэробными бактериями, способными к окислительному фосфорилированию. Поглотив вторичных гетеротрофов, первичные не расщепили их на молекулы, а сохранили в качестве энергетических станций, называемых сегодня митохондриями.

Такие симбионты дали начало царствам животных и грибов.

Другая часть первичных гетеротрофов "заключила союз" не только с аэробными гетеротрофами, но и с первичными фотосинтетиками, сохранив последних в качестве хлоропластов. Такие симбионты дали начало царству растений.

В пользу симбиотической теории образования эукариот говорят следующие факты:

- У митохондрий и хлоропластов две мембраны. Внутренняя - своя, наружная образована клеткой-захватчиком.
- Генетический код митохондрий идеален. Универсальный генетический код имеет два существенных отличия, касающихся инициации и терминации синтеза белка.

Таким образом эукариоты отстранились от чужой генетической информации.

Кроме того, они линеаризовали свою ДНК. Митохондрии и хлоропласты имеют кольцевую ДНК, хотя не очень понятно, для чего им нужна кольцевая ДНК, и бактериальные рибосомы. Однако понятно, почему у них такая ДНК и такие рибосомы. Потому, что их предки были бактериями. Сегодня часть генов митохондриальных белков и белков хлоропластов, в том числе их РНК- и ДНК-полимераз, находятся в ядре. Вероятно, попали они туда с помощью мобильных элементов.

Все бактерии делятся на эубактерии (в том числе *E.coli*) и археобактерии. Принципиальное отличие между ними в том, что гены археобактерий имеют экзон - интронное строение и сплайсинг. Эубактерии - результат эволюции ана- и аэробных гетеротрофов. Их эволюция шла в благоприятных условиях и они сменили больше поколений, избавившись от интронов. Археобактерии живут в экстремальных условиях: горячие, кислые, высокосолевые подземные воды. Эукариоты и археобактерии сохранили экзон-интронную структуру, что говорит о древнем происхождении экзонов и интронов.

4. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОДГОТОВКЕ К ЗАНЯТИЯМ

4.1 Генетика и генетическая информация

При подготовке к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

В хранении, передаче и преобразовании генетической информации центральное место занимают нуклеиновые кислоты. Решающим фактором при этом является способность нуклеиновых, оснований к специфическому (комплементарному) спариванию

А. Реализация и передача генетической информации

Хранение информации. Генетическая информация закодирована в последовательности нуклеотидов ДНК (DNA), организованных в функциональные участки, называемые генами. [РНК (RNA) как носитель генетической информации используется только некоторыми вирусами.] Участки ДНК кодируют белки, т. е. они содержат информацию об аминокислотной последовательности белков. Каждый остаток представлен в ДНК своим кодовым словом (кодоном), состоящим из трех следующих друг за другом оснований. Так, ДНК-кодон для фенилаланина представлен тринуклеотидом ТТС (2) На уровне ДНК кодоны образуют ее некодирующую цепь[последовательность нуклеотидов которой соответствует последовательности мРНК (mRNA)]

Репликация. Во время деления клеток генетическая информация должна перейти в дочерние клетки. Для достижения этого вся ДНК клетки копируется в процессе репликации во время S-фазы клеточного цикла, при этом каждая ее цепь служит матрицей для синтеза комплементарной последовательности.

Транскрипция. Для экспрессии гена, т.е. синтеза закодированных в нем белков, последовательность нуклеотидов кодирующей цепи ДНК должна быть трансформирована в аминокислотную последовательность. Поскольку ДНК не принимает непосредственного участия в синтезе белка, информация, хранящаяся в ядре, должна быть перенесена на рибосомы, где собственно и осуществляется биосинтез белков. Для этого соответствующий участок

кодирующей цепи ДНК считывается (транскрибируется) с образованием гетерогенной ядерной РНК [гяРНК (hnRNA)], т. е. последовательность этой РНК комплементарна кодирующей цепи ДНК. Поскольку в РНК вместо тимина содержится урацил ААГ триплет ДНК трансформируется в UUC-кодон гяРНК.

Созревание РНК. У эукариот гяРНК, прежде, чем покинуть ядро в виде матричной РНК (мРНК, 4), претерпевает существенные изменения: из молекулы вырезаются избыточные (некодирующие) участки (интроны), а оба конца транскриптов модифицируются путем присоединения дополнительных нуклеотидов.

Трансляция. Зрелая мРНК попадает в цитоплазму и связывается с рибосомами, преобразующими полученную информацию в аминокислотную последовательность. Рибосомы — это рибонуклеопротеидные комплексы, включающие несколько десятков белков и несколько молекул рибосомной РНК (рРНК (rRNA)). Рибосомные РНК выполняют функцию структурного элемента рибосом, а также принимают участие в связывании мРНК и образовании пептидных связей.

Механизм преобразования генетической информации основан на взаимодействии кодонов мРНК транспортной РНК [тРНК (tRNA)], которая переносит на рибосому аминокислоты, связанные с 3'-концом тРНК, в соответствии с информацией, закодированной в мРНК. Примерно в середине цепи тРНК расположен триплет (например, GAA), называемый антикодоном и комплементарный соответствующему кодону а мРНК. Если транслируется кодон UUC, то с ним взаимодействует антикодон в составе Phe-тРНК (5), несущей на 3'-конце остаток фенилаланина. Таким образом, остаток аминокислоты занимает положение, в котором на него может быть перенесена растущая полипептидная цепь, связанная с соседней тРНК (6).

Активация аминокислот. Прежде чем связаться с рибосомой, транспортные РНК присоединяют соответствующую аминокислоту с помощью специфического «узнающего» фермента обеспечивающего точный перенос (трансляцию) генетической информации с уровня нуклеиновых кислот на уровень белка.

4.2 Генно-модифицированные источники пищевой продукции. Концепция биобезопасности пищевой продукции и питания

При подготовки к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

Обсуждаются проблемы биобезопасности в биотехнологии и биоинженерии при создании генетически модифицированных организмов (ГМО). Рассматриваются различные аспекты биобезопасности при работе на генетическом, клеточном, тканевом и организменном уровнях. Описаны возможные отрицательные последствия встраивания в ДНК реципиентной клетки донорского чужеродного гена. Большое внимание уделено критериям, показателям и методам оценки биобезопасности ГМО и качества получаемых из них продуктов. Освещены особенности государственного правового регулирования в России и США генно-инженерной деятельности при создании и использовании ГМО. Предложены способы преодоления отставания по биотехнологии, биоинженерии биобезопасности в России.

Начало дискуссии по проблеме биобезопасности в науке и обществе положили основатели нового направления — биоинженерии. В 1974 году 11 ведущих молекулярных биологов мира во

главе с отцом генной инженерии американцем П. Бергом, создавшим первую рекомбинантную молекулу ДНК, обратились к мировому сообществу с письмом через журнал «Science», в котором предложили отказаться от экспериментов с рекомбинантными ДНК до проведения международной конференции по этой проблеме. Однако уже в 1975 году на конференции в Асиломаре (США) ученые пришли к выводу о том, что эксперименты в области генной инженерии — новейшей биотехнологии — не более опасны, чем аналогичные работы в других отраслях, но при этом, как и везде, необходим строгий контроль за соблюдением мер безопасности (1). В 1976 году в США были приняты первые правила, регламентирующие работу с рекомбинантными микроорганизмами, которые запрещалось выпускать за стены лабораторий. В конце 70-х годов в большинстве стран мира было разработано соответствующее законодательство.

О понятии безопасности. Природные, техногенные и другие факторы оказывают постоянное и значительное воздействие на человека и окружающую его среду обитания. Эти воздействия могут быть положительными и отрицательными. Наука, общество, государство должны разрабатывать и эффективно использовать системы мер по защите человека и окружающей среды от вредных воздействий любых опасных факторов. Из этого важнейшего положения вытекает общее понятие о безопасности человека, общества, государства, цивилизации, под которым понимается устойчивое состояние защищенности жизненно важных интересов личности и самой жизни человека, общества и государства от внешних и внутренних угроз (1-3).

Главнейшим объектом безопасности является человек с его потребностями, правами и здоровьем. Безопасность человека не может быть обеспечена без защиты безопасности среды его обитания и жизнедеятельности, а также общества, в котором он живет. Одним из основных принципов безопасности является взаимная ответственность человека, общества и государства. Достижение безопасности — это результат действия системы, предполагающей приведение в действие мер, адекватных угрозам жизненно важных интересов.

Безопасность может быть биологической, экологической, экономической, продовольственной, военной и другой в зависимости от внутренних и внешних факторов, масштабы, направленность и степень воздействия которых угрожают деятельности, существованию и самой жизни объектов (человека, общества, государства, цивилизации в целом). Общее представление о взаимосвязи между видами безопасности и влиянием на них биотехнологии отражено в схеме Поповой (рис., цит. по 1).

Биологически опасные" организмы и их продукты представляют собой угрозу для существования не только человека, но и растений, животных и полезных микроорганизмов, вызывая различную степень их поражения или полную гибель, лишая человека продовольственных и других источников и возможностей существования (1,2, 4-7)

Проблемы биобезопасности существуют в мире давно, так как и в природе, и в производстве в различных необходимых человеку и обществу веществах (продуктах питания, лечения, гигиены и др.) нередко встречаются опасные для здоровья и жизни соединения.

Во всех государствах мира разработаны и применяются различные методы контроля за технологическими процессами и качеством вновь вовлеченных в сферу использования человеком новых биологических объектов и веществ, их токсичностью, аллергенностью и общей безопасностью для здоровья людей и состояния окружающей среды. Большую опасность для здоровья и жизни людей до сих пор представляет употребление в пищу ядовитых грибов как

следствие безграмотности и беспечности граждан. Наиболее опасными и часто трагичными являются проблемы алкогольной и наркотической токсикации людей.

4.3 Общая схема реализации генетической информации

При подготовке к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

Синтез белка - сложный многоступенчатый процесс, в котором участвуют ДНК, иРНК, тРНК, рибосомы, АТФ и разнообразные ферменты. Вначале аминокислоты в цитоплазме активируются с помощью ферментов и присоединяются к тРНК (к участку, где расположен нуклеотид ЦЦА). На следующем этапе идет соединение аминокислот в таком порядке, в каком чередование нуклеотидов с ДНК передано на иРНК. Этот этап называется трансляцией. На нити иРНК размещается не одна рибосома, а группа их - такой комплекс называется полисома.

Синтез белка состоит из двух этапов - транскрипции и трансляции.

I. Транскрипция (переписывание) - биосинтез молекул РНК, осуществляется в хромосомах на молекулах ДНК по принципу матричного синтеза. При помощи ферментов на соответствующих участках молекулы ДНК (генах) синтезируются все виды РНК (иРНК, рРНК, тРНК). Синтезируется 20 разновидностей тРНК, так как в биосинтезе белка принимают участие 20 аминокислот. Затем иРНК и тРНК выходят в цитоплазму, рРНК встраивается в субъединицы рибосом, которые также выходят в цитоплазму.

II. Трансляция (передача) - синтез полипептидных цепей белков, осуществляется в рибосомах. Она сопровождается следующими событиями:

1. Образование функционального центра рибосомы - ФЦР, состоящего из иРНК и двух субъединиц рибосом. В ФЦР всегда находятся два триплета (шесть нуклеотидов) иРНК, образующих два активных центра: А (аминокислотный) - центр узнавания аминокислоты и П (пептидный) - центр присоединения аминокислоты к пептидной цепочке.

2. Транспортировка аминокислот, присоединенных к тРНК, из цитоплазмы в ФЦР. В активном центре А осуществляется считывание антикодона тРНК с кодоном иРНК, в случае комплементарности возникает связь, которая служит сигналом для продвижения (скачок) вдоль иРНК рибосомы на один триплет. В результате этого комплекс "кодон рРНК и тРНК с аминокислотой" перемещается в активный центр П, где и происходит присоединение аминокислоты к пептидной цепочке (белковой молекуле). После чего тРНК покидает рибосому.

3. Пептидная цепочка удлиняется до тех пор, пока не закончится трансляция и рибосома не соскочит с иРНК. На одной иРНК может уместиться одновременно несколько рибосом (полисома). Полипептидная цепочка погружается в канал эндоплазматической сети и там приобретает вторичную, третичную или четвертичную структуру. Скорость сборки одной молекулы белка, состоящего из 200-300 аминокислот, составляет 1-2 мин. Формула биосинтеза белка: ДНК (транскрипция) --> РНК (трансляция) --> белок.

Завершив один цикл, полисомы могут принять участие в синтезе новых молекул белка.

Отделившаяся от рибосомы молекула белка имеет вид нити, которая биологически неактивна. Биологически функциональной она становится после того, как молекула приобретает вторичную, третичную и четвертичную структуру, т. е. определенную пространственно специфическую конфигурацию. Вторичная и последующие структуры белковой молекулы предопределены в информации, заложенной в чередовании аминокислот, т. е. в первичной структуре белка. Иначе говоря, программа образования глобулы, ее уникальная конфигурация определяются первичной структурой молекулы, которая в свою очередь строится под контролем соответствующего гена.

4.4 Механизмы реализации генетической информации

При подготовке к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

Результатом экспрессии генов, кодирующих белки или нуклеиновые кислоты, должно быть образование полноценных в функциональном отношении макромолекул, сопровождаемое формированием определенного фенотипа организма. В соответствии с основным постулатом молекулярной биологии генетическая информация передается односторонне от нуклеиновых кислот к белкам по схеме: ДНК \leftrightarrow РНК \rightarrow белок, т.е. в ряде случаев возможна передача генетической информации от РНК к ДНК с использованием механизма обратной транскрипции. Не обнаружена передача генетической информации от белков к нуклеиновым кислотам.

На первом этапе экспрессии генов происходит переписывание генетической информации на матричные (информационные) РНК (мРНК - messenger RNA, mRNA), которые являются местом промежуточного хранения информации. В некоторых случаях сами РНК являются конечным результатом экспрессии генов, и после ряда ферментативных модификаций они непосредственно используются в клеточных процессах. Это относится, прежде всего, к рибосомным и транспортным РНК (рРНК и тРНК). К таким РНК принадлежат и малые ядерные РНК (мяРНК), участвующие в процессинге предшественников мРНК эукариот, РНК, входящие в состав ферментов, и природные антисмысловые РНК.

Синтез РНК происходит в результате сложной последовательности биохимических реакций, называемой транскрипцией. На втором этапе реализации генетической информации, называемой трансляцией, последовательность нуклеотидов мРНК определяет последовательность аминокислотных остатков синтезируемых белков.

Таким образом, экспрессию генов определяют два глобальных молекулярно-генетических механизма: транскрипция генов и трансляция синтезированных мРНК рибосомами, которая завершается образованием полипептидных цепей, кодируемых генами. Однако процесс экспрессии генов не ограничивается их транскрипцией и трансляцией.

Существенными моментами экспрессии генов являются посттранскрипционные и посттрансляционные модификации мРНК и белков, которые включают процессинг их предшественников (удаление избыточных последовательностей и другие ковалентные модификации последовательностей РНК и белков). Посттранскрипционные модификации предшественников мРНК обеспечивают подготовку мРНК к трансляции рибосомами и определяют продолжительность ее существования в цитоплазме. Посттрансляционные модификации белков необходимы для их полноценного функционирования.

4.5 Особенности механизмов трансляции у прокариот и эукариот

При подготовке к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

Одной из особенностей трансляции у прокариот является включение в пептидную цепь в качестве первой аминокислоты модифицированного метионина - формилметионина, с которого начинаются все вновь синтезированные пептиды. Даже в том случае, когда роль стартового кодона выполняет кодон ГУГ, в обычных условиях шифрующий валин, в первом положении пептида оказывается формилметионин. Стартовый кодон АУГ или ГУГ следует за лидерным участком, который экранируется рибосомой в момент инициации трансляции.

Соединение рибосомы с мРНК обусловлено комплементарным взаимодействием нуклеотидов одной из рРНК с нуклеотидной последовательностью лидера мРНК.

Эта последовательность (Шайна-Дальгарно) располагается на расстоянии 4-7 оснований перед кодоном АУГ и обнаруживается повсеместно в лидерных участках у прокариот.

При соединении 5'-конца мРНК с малой субчастицей рибосомы стартовый кодон обычно оказывается почти в середине экранированного рибосомой фрагмента мРНК, в области, соответствующей ее П-участку.

У эукариот трансляция осуществляется в цитоплазме, куда попадает из ядра зрелая мРНК. Копированный конец мРНК распознается малой субчастицей рибосомы, затем лидирующая последовательность, содержащая до 100 нуклеотидов, взаимодействует с рРНК. При этом стартовый кодон АУГ оказывается в недостроенном П-участке рибосомы. После присоединения к стартовому кодону аминоацил-тРНК, несущей метионин, происходит воссоединение двух субчастиц рибосомы и формируются ее А - и П-участки. Синтез белка в эукариотической клетке, осуществляемый на моноцистронной мРНК, завершается после прохождения рибосомой по всей мРНК, вплоть до узнавания ею кодона-терминатора, прекращающего образование пептидных связей.

4.6 Хромосомы: строение и функционирование

При подготовке к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

Морфология хромосом лучше всего видна в клетке на стадии метафазы. Хромосома состоит из двух палочкообразных телец - хроматид. Обе хроматиды каждой хромосомы идентичны друг другу по генному составу.

Хромосомы дифференцированы по длине. Хромосомы имеют центромеру или первичную перетяжку, две теломеры и два плеча. На некоторых хромосомах выделяют вторичные перетяжки и спутники. Движение хромосомы определяет Центромера, которая имеет сложное строение.

ДНК центромеры отличается характерной последовательностью нуклеотидов и специфическими белками. В зависимости от расположения центромеры различают акроцентрические, субметацентрические и метацентрические хромосомы.

Как говорилось выше, некоторые хромосомы имеют вторичные перетяжки. Они, в отличие от первичной перетяжки (центромеры), не служат местом прикрепления нитей веретена и не играют никакой роли в движении хромосом. Некоторые вторичные перетяжки связаны с образованием ядрышек, в этом случае их называют ядрышковыми организаторами. В ядрышковых организаторах расположены гены, ответственные за синтез РНК. Функция других вторичных перетяжек еще не ясна.

У некоторых акроцентрических хромосом есть спутники — участки, соединенные с остальной частью хромосомы тонкой нитью хроматина. Форма и размеры спутника постоянны для данной хромосомы. У человека спутники имеются у пяти пар хромосом.

Концевые участки хромосом, богатые структурным гетерохроматином, называются теломерами. Теломеры препятствуют слипанию концов хромосом после редупликации и тем самым способствуют сохранению их целостности. Следовательно, теломеры ответственны за существование хромосом как индивидуальных образований.

Хромосомы, имеющие одинаковый порядок генов, называют гомологичными. Они имеют одинаковое строение (длина, расположение центромеры и т. д.). Негомологичные хромосомы имеют разный генный набор и разное строение.

Исследование тонкой структуры хромосом показало, что они состоят из ДНК, белка и небольшого количества РНК. Молекула ДНК несет отрицательные заряды, распределенные по всей длине, а присоединенные к ней белки — гистоны заряжены положительно. Этот комплекс ДНК с белком называют хроматином. Хроматин может иметь разную степень конденсации. Конденсированный хроматин называют гетерохроматином, деконденсированный хроматин — эухроматином. Степень деконденсации хроматина отражает его функциональное состояние. Гетерохроматиновые участки функционально менее активны, чем эухроматиновые, в которых локализована большая часть генов. Различают структурный гетерохроматин, количество, которого различается в разных хромосомах, но располагается он постоянно в околоцентромерных районах. Кроме структурного гетерохроматина существует факультативный гетерохроматин, который появляется в хромосоме при сверхспирализации эухроматических районов. Подтверждением существования этого явления в хромосомах человека служит факт генетической инактивации одной X-хромосомы в соматических клетках женщины. Его суть заключается в том, что существует эволюционно сформировавшийся механизм инактивации второй дозы генов, локализованных в X-хромосоме, вследствие чего, несмотря на разное число X-хромосом в мужском и женском организмах, число функционирующих в них генов уравнено. Максимально конденсирован хроматин во время митотического деления клеток, тогда его можно обнаружить в виде плотных хромосом

Размеры молекул ДНК хромосом огромны. Каждая хромосома представлена одной молекулой ДНК. Они могут достигать сотен микрометров и даже сантиметров. Из хромосом человека самая большая — первая; ее ДНК имеет общую длину до 7 см. Суммарная длина молекул ДНК всех хромосом одной клетки человека составляет 170 см.

Несмотря на гигантские размеры молекул ДНК, она достаточно плотно упакована в хромосомах. Такую специфическую укладку хромосомной ДНК обеспечивают белки гистоны. Гистоны располагаются по длине молекулы ДНК в виде блоков. В один блок входит 8 молекул гистонов, образуя нуклеосому (образование, состоящее из нити ДНК, намотанной вокруг октамера гистонов). Размер нуклеосомы около 10 нм. Нуклеосомы имеют вид нанизанных на нитку бусинок. Нуклеосомы и соединяющие их участки ДНК плотно упакованы в виде спирали, на каждый виток такой спирали приходится шесть нуклеосом. Так формируется структура хромосомы.

Наследственная информация организма строго упорядочена по отдельным хромосомам. Каждый организм характеризуется определенным набором хромосом (число, размеры и структура), который называется кариотипом. Кариотип человека представлен двадцатью четырьмя разными хромосомами (22 пары аутосом, X- и Y-хромосомы). Кариотип — это паспорт вида. Анализ кариотипа позволяет выявлять нарушения, которые могут приводить к аномалиям развития, наследственным болезням или гибели плодов и эмбрионов на ранних стадиях развития.

Длительное время полагали, что кариотип человека состоит из 48 хромосом. Однако в начале 1956 г. было опубликовано сообщение, согласно которому число хромосом в кариотипе человека равно 46.

Хромосомы человека различаются по размеру, расположению центромеры и вторичных

перетяжек. Впервые подразделение кариотипа на группы было проведено в 1960 г. на конференции в г. Денвере (США). В описание кариотипа человека первоначально были заложены два следующих принципа: расположение хромосом по их длине; группировка хромосом по расположению центромеры (метацентрические, субметацентрические, аacroцентрические). Точное постоянство числа хромосом, их индивидуальность и сложность строения свидетельствуют о важности выполняемой ими функции. Хромосомы выполняют функцию основного генетического аппарата клетки. В них в линейном порядке расположены гены, каждый из которых занимает строго определенное место (локус) в хромосоме. В каждой хромосоме много генов, но для нормального развития организма необходим набор генов полного хромосомного набора.

4.7 Переработка, передача и изменение генетической информации в ряду поколений

При подготовке к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

Молекулярно-генетический уровень является тем уровнем организации живой материи, на котором совершался переход от атомно-молекулярного уровня неживой материи к макромолекулам живой. Знание этого уровня организации живого необходимо для понимания жизненных явлений, происходящих на всех других уровнях организации жизни. Это уровень функционирования биополимеров, таких как белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и другие важнейшие органические соединения, положившие начало основным процессам жизнедеятельности. На этом уровне организации живой материи элементарными структурными единицами являются гены. Вся наследственная информация у живых организмов заложена в молекулах ДНК (дезоксирибонуклеиновые кислоты). Реализация этой информации связана с участием молекул РНК (рибонуклеиновые кислоты). С молекулярными структурами связаны хранение, изменение и реализация наследственной информации, то есть передача ее из поколения в поколение. Поэтому этот уровень и называют молекулярно-генетическим. РНК и ДНК были выделены из ядер клеток и поэтому получили название нуклеиновых, то есть ядерных, кислот.

В этих кислотах имеются углеводные компоненты: Д-дезоксирибоза в ДНК и Д-рибоза в РНК, отсюда и название этих нуклеиновых кислот.

Роль нуклеиновых кислот в хранении и передаче наследственности, а также участие их в синтезе белка и обмене веществ были окончательно выяснены лишь в середине XX столетия. В 1953 г. американскими учеными Д. Уотсоном и Ф. Криком была предложена и экспериментально подтверждена гипотеза о структуре молекулы ДНК как материального носителя генетической информации. В 1960-е гг. французскими учеными Ж. Моно и Ф. Жакобом была решена одна из главных проблем генной активности, которая объясняла фундаментальную особенность функционирования живой природы на молекулярном уровне.

На молекулярно-генетическом уровне важнейшей задачей современной биологии является исследование механизмов передачи генной информации, наследственности, а также изменчивости.

Одним из важнейших механизмов изменчивости на молекулярном уровне является механизм мутации генов, то есть их непосредственное преобразование под воздействием внешних

факторов, вызывающих мутации (появление мутагенов), это – вирусы, радиация, токсические химические соединения.

Механизмом изменчивости может быть и рекомбинация генов, то есть создание новых их комбинаций. Этот процесс свойствен половому размножению у высших организмов. При нем не происходит изменения общего объема генетической информации. Этот механизм называется классическим.

В других так называемых неклассических случаях рекомбинация может сопровождаться увеличением информации генома клетки. В этом случае фрагменты хромосомы клетки-донора включаются в хромосому принимающей клетки. Они могут оставаться в скрытом, латентном, состоянии некоторое время, а также соединяться с принимающей клеткой (клеткой-реципиентом), когда под действием внешних факторов они становятся активными.

4.8 Сохранение и защита генетической информации

При подготовки к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

Существование биологических видов зависит от точности передачи генетической информации от организмов-родителей потомкам и от одной соматической клетки к другой. Точность передачи потомкам генетической информации должна быть, с одной стороны, достаточно высокой для сохранения данного вида в ряду поколений, с другой стороны, достаточно низкой, чтобы обеспечить возможность эволюции вида и приспособления его к изменяющимся условиям внешней среды. Важную роль в обеспечении точности передачи потомкам генетической информации играет механизм системы репликации ДНК и система репарации (исправления) ошибок, случайно возникающих при репликации ДНК и после ее завершения.

Консервация генетической информации, заключенной в отдельных генетических локусах, может быть вредной для организма и вида. В частности, одним из механизмов, лежащих в основе возникновения разнообразия антител, являются запрограммированные изменения генов иммуноглобулинов, которые закрепляются в геноме лимфоцитов в результате их отбора в онтогенезе. Высокий темп изменений некоторых генетических локусов у паразитических организмов, например, трипаносом, в результате которых меняется структура антигенных детерминант на поверхности их клеток, необходим для их выживания, так как помогает этим организмам избежать нейтрализующего действия иммунной системы организма-хозяина. Другим примером является генетическая изменчивость вируса гриппа.

Абсолютный консерватизм в передаче генетической информации сделал бы невозможным филогенетическое развитие организмов. Эволюционно сложившиеся отношения между точностью функционирования генетических систем и частотой ошибок, возникающих при воспроизведении генетической информации отдельных генетических локусов, сбалансированы между собой, и в ряде случаев являются регулируемыми. Запрограммированные и случайные наследуемые изменения генома, называемые мутациями, могут сопровождаться колоссальными количественными и качественными изменениями в экспрессии генов.

4.9 Развитие многоклеточного организма

При подготовке к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

Развитие оплодотворенного яйца начинается с его дробления на ряд клеток — бластомеров. В зависимости от количества желтка в яйце этот процесс протекает у разных животных различно. Дробление яйца бывает полным и неполным. Полное дробление яйца происходит в тех случаях, когда в нем мало желтка и он распределен в цитоплазме яйца более или менее равномерно; такие яйца именуются гомолецитальными.

При полном дроблении все яйцо делится на 2 части, затем на 4, 8, 16 и т. д. В результате такого дробления яйца образуется комочек клеток — морула. Позднее в центре зародыша возникает полость и морула превращается в бластулу. Неполное дробление наблюдается в яйцах с большим содержанием желтка. При этом типе дробления на бластомеры распадается не все яйцо, а только часть его, в которой содержится ядро, окруженное цитоплазмой (так называемая образовательная плазма).

В яйцах птиц, рыб и некоторых других животных образовательная плазма расположена на одном из их полюсов в виде небольшого диска (такие яйца называются телолецитальными). При развитии зародыша этот диск дробится на ряд бластомеров, расположенных в один слой, лежащий на массе желтка. В яйцах других животных (например, насекомых) желток обычно занимает среднюю часть (так называемые центролецитальные яйца). Дробление окружающей желток образовательной плазмы приводит к возникновению периферического слоя бластомеров, к образованию однослойного зародыша — бластулы, внутри которого имеется первичная полость — бластоцель (иногда заполненная желтком).

Следующий этап развития многоклеточного животного — гастрюляция — заключается в превращении однослойной бластулы в двухслойную гастролу. Гастрюляция у разных животных протекает неодинаково (рис. 26). У форм, яйца которых проходят полное и равномерное дробление, бластула имеет вид пузырька с клеточной стенкой примерно одинаковой толщины. В этом случае гастрюляция идет путем впячивания нижней части бластулы. В результате образуется зародыш с двумя зародышевыми листками: наружными — эктодермой и внутренним — энтодермой.

У животных, яйца которых проходят полное, но неравномерное дробление, верхняя часть бластулы сложена мелкими, а нижняя — более крупными бластомерами. В этом случае образование двухслойного зародыша (гастролы) происходит путем обрастания нижних крупных бластомеров более быстро делящимися верхними мелкими. Внутренний слой гастролы у некоторых животных образуется вселением (иммиграцией) отдельных клеток нижней части бластулы в ее полость (бластоцель).

Как бы ни шел процесс гастрюляции, он приводит к образованию зародыша, состоящего из двух слоев клеток: эктодермы и энтодермы. Пространство между ними остается первичной полостью тела, а гастроль (кишечная полость гастролы) в дальнейшем становится полостью кишечника взрослого животного. Отверстие гастролы — бластоиор (первичный рот) у большинства беспозвоночных животных сохраняется и становится ртом взрослых особей. Такие животные называются первичоротыми. У другой группы животных (иглокожих, хордовых) бластоиор зарастает или становится заднепроходным отверстием, рот же впоследствии образуется вновь (вторичпоротые).

Для низших многоклеточных животных — губок и кишечнополостных — характерно двухслойное строение тела. Но у более высокоорганизованных животных между эктодермой и энтодермой образуется средний зародышевый листок — мезодерма. Ее образование происходит различно. Низшие трехслойные животные в течение всей жизни сохраняют первичную полость тела, и их именуют первичнополостными. В развитии ряда хордовых мезодерма закладывается в виде парных карманообразных выпячиваний стенки кишечника зародыша. Они отшнуровываются от кишки, располагаясь по бокам от нее. Внутри каждого мезодермального мешочка — сомита имеется полость, называемая вторичной полостью тела — целомом. Сомиты располагаются между экто- и энтодермой в первичной полости тела и, разрастаясь, вытесняют ее.

Наружные стенки сомитов соприкасаются с эктодермой, а внутренние — со стенкой кишки. Когда перегородки между сомитами рассасываются, полости сомитов сливаются. Животные, имеющие целом, называются вторичнополостными (целомата). Остатки первичной полости сохраняются у целомата в виде каналов, щелей, лакун. Часть их становится полостью кровеносных сосудов, приобретающих у большинства собственные стенки. Первичнополостные лишены кровеносных сосудов, у них функцию крови выполняет полостная жидкость, омывающая внутренние органы. В развитии ряда целомата (например, моллюсков, членистоногих) происходит частичное слияние первичной полости с целомом. Такую полость называют смешанной, а кровеносную систему их — незамкнутой: кровь течет то в сосудах, то разливается по лакунам.

В процессе развития эмбриона зародышевые листки путем дифференцировки образуют ткани и органы. В формировании эпителиальной ткани участвуют все три зародышевых листка. Из эктодермы развиваются кожный эпителий и его железы, а у многих — передний и задний отделы кишечника, органы дыхания, мочевые протоки; из энтодермы — эпителий среднего (пищеварительного) отдела кишечника, нервная система; из мезодермы — скелет, мышцы, кровь.

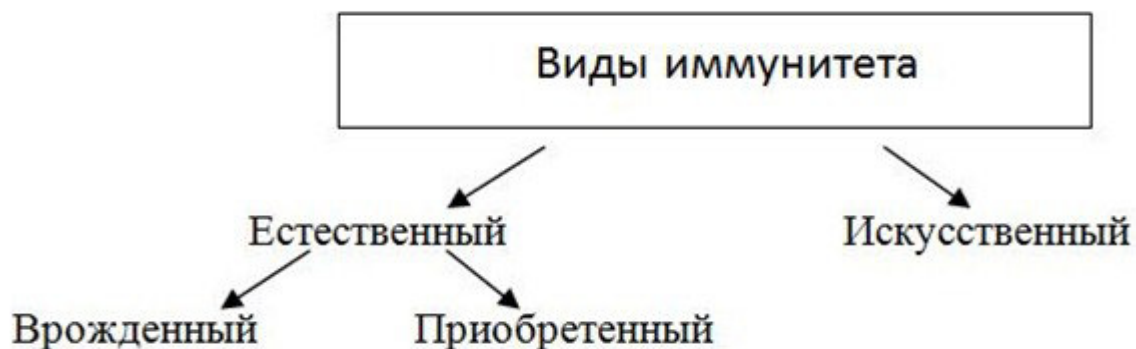
4.10 Иммуитет. Некоторые отклонения в работе иммунной системы

При подготовке к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

Иммуитет — способность организма к невосприимчивости и сопротивлению чужеродным веществам различного происхождения. Эта сложная система защиты создавалась и менялась одновременно с развитием эволюции. Изменения эти продолжаются и сейчас, так как постоянно изменяются условия окружающей среды, а значит и условия проживания существующих организмов. Благодаря иммуитету, наш организм способен к распознаванию и уничтожению болезнетворных организмов, инородных тел, ядов и внутренних переродившихся клеток организма.

Понятие об иммуитете определяется общим состоянием организма, которое зависит от процесса обмена веществ, наследственности и изменений под действием внешней среды.

Естественно, организм будет отличаться крепким здоровьем, если сильным будет иммуитет. Виды иммуитета человека по своему происхождению делятся на врожденный и приобретенный, естественный и искусственный.



Врожденный иммунитет – это генотипический признак организма, передающийся по наследству. Работа этого вида иммунитета обеспечивается многими факторами на различных уровнях: клеточном и не клеточном (или гуморальном). В некоторых случаях естественная функция защиты организма может снижаться в результате совершенствования чужеродных микроорганизмов. При этом естественный иммунитет организма понижается. Это, как правило, происходит во время стрессовых ситуаций или при гиповитаминозе. Если чужеродный агент во время ослабленного состояния организма попадает в кровь, то в этом случае свою работу начинает приобретенный иммунитет. То есть разные виды иммунитета сменяют друг друга.

Приобретенный иммунитет – это фенотипический признак, сопротивляемость чужеродным агентам, которая формируется после вакцинирования или перенесенного организмом инфекционного заболевания. Поэтому стоит переболеть какой-либо болезнью, например, оспой, корью или ветрянкой, и тогда в организме формируются специальные средства защиты от этих болезней. Повторно уже человек ими заболеть не может.

Естественный иммунитет может быть, как врожденным, так и приобретенным после перенесенного инфекционного заболевания. Также этот иммунитет может создаваться с помощью антител матери, которые поступают к плоду во время беременности, а потом и при грудном вскармливании уже к ребенку. Искусственный иммунитет, в отличие от естественного обретается организмом после вакцинации или в результате введения особого вещества – лечебной сыворотки.

Если у организма наблюдается длительная устойчивость к повторному случаю инфекционного заболевания, то иммунитет можно назвать постоянным. При невосприимчивости организма к заболеваниям в течение некоторого времени, в результате введения сыворотки, иммунитет называют временным.

При условии выработки организмом антител самостоятельно – иммунитет активный. Если же антитела организм получает в готовом виде (через плаценту, из лечебной сыворотки или через грудное молоко), то говорят о пассивном иммунитете.

Вид иммунитета	Способ проявления
Врожденный (естественный)	Сопrotивляемость к заболеваниям с рождения
Приобретенный (естественный)	Формирование антител после инфекционной болезни
Активный (искусственный)	Возникает после прививки
Пассивный (искусственный)	Появляется в результате введения сыворотки

Иммунодефицитные заболевания. Причиной возникновения заболеваний иммунной системы является ее медленная неэффективная работа, когда иммунитет или его отдельные звенья полностью отсутствуют или нарушены вследствие дисфункции принципов функционирования системы. Заболевания данного типа бывают двух категорий: первичные (врожденные) и вторичные (приобретенные). Развитие врожденных заболеваний происходит в результате сбоя работы отдельных генов, дисфункция вызвана наследственными факторами. Врожденными заболеваниями считаются синдром Вискотта-Олдрича, хронический гранулематоз, у больных от рождения детей отсутствуют стволовые лимфоидные клетки Т-ряда и В-ряда, в костном мозге отсутствуют пре-В-лимфоциты. К приобретенным заболеваниям относятся СПИД, гепатит, цирроз, диабет, уремия и т.д. При поражении клеток иммунной системы вирусным агентом иммунодефицит рассматривается как отдельное заболевание. Аутоиммунные заболевания проявляются, когда механизм разрушения направлен на собственные здоровые клетки. В ходе болезни здоровые ткани и органы разрушаются собственной иммунной системой, поражаются целые системы, именно поэтому заболевание относится к категории системных. Самые известные аутоиммунные заболевания: красная системная волчанка, болезнь Грейвса, аутоиммунный тиреоидит, множественный склероз и так далее. Узнайте о лечебном эффекте криосауны: показания и противопоказания холодной процедуры. А также ознакомьтесь с процедурой «жемчужные ванны». Аллергические заболевания возникают вследствие гипериммунной реакции организма на воздействие факторов окружающей среды (продукты питания, химические вещества, растения, микроорганизмы и т.д.), они еще называются аллергенами. Причиной возникновения аллергических реакций могут быть самые разные факторы (загрязнение окружающей среды, изделия химической промышленности, прием антибиотиков и медицинских препаратов, физическая пассивность, стрессы, плохое питание, злоупотребление алкоголем и курением). Аллергены могут возникать также в результате самых разных соединений, попадают в организм из внешней среды и образуются внутри организма (аутоаллергены / эндогенные аллергены). Часто встречаются такие заболевания, как крапивница, поллинозы, бронхиальная астма, контактные дерматиты.

4.11 Получение животных и растительных трансгенных организмов

При подготовке к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

Мы выяснили, что смысл генно-инженерных манипуляций состоит в переносе целевого гена в геном клетки-мишени и его экспрессии в новом генном окружении. Логика проведения такой

манипуляции мало меняется в зависимости оттого, какой целевой ген будет использован и клетки какого организма подвергнутся изменению. Главное, что после получения трансформированной изменённой клетки из неё можно получить полноценный организм. При этом подходы к формированию организма зависят от того, какая клетка — бактериальная, растительная или животная — служила мишенью для трансформации.

В случае бактериальной клетки либо клетки другого одноклеточного организма (например, дрожжей), получение трансгенного организма ограничивается непосредственным переносом гена в клетку-мишень. Клетка одноклеточных сама по себе — самостоятельный полноценный организм. Деление такой клетки приводит к появлению идентичных организмов с теми же свойствами, что были приобретены исходной трансгенной - материнской клеткой.

Для получения трансгенного животного в качестве клетки-мишени используют половую клетку — яйцеклетку. После трансформации в ходе естественных процессов развития яйцеклетка превращается в полноценный автономный организм. Передача новых признаков в поколениях невозможна, если процесс трансформации не затронул половые клетки.

Растения имеют важное преимущество перед животными, а именно — возможна их регенерация *in vitro* из недифференцированных соматических тканей с получением нормальных, фертильных растений. Это свойство (тотипотентность) дает возможность получать генетически модифицированные (трансгенные) растения и изучать функционирование введенных в растения генов.

Вводить в геном растительных клеток гены, кодирующие нужный белок, пробовали разными способами, однако они все были малоэффективны. Удобный способ доставки чужих генов был подсказан самой природой — трансформация растений с помощью почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes*. Как и у большинства других бактерий, I часть их генома находится не в основной хромосоме, а в плазмидах. Ti-плазмиды (tumor-inducing, опухолеобразующие), найденные в *Agrobacterium tumefaciens* или Ri-плазмиды (root-inducing, корнеобразующие) в *Agrobacterium rhizogenes*, оказались лучшим инструментом для генной инженерии.

Агробактерии являются мезофильными обитателями почвы, среди них встречаются как сапрофитные (*A. radiobacter*), так и фитопатогенные (*A. tumefaciens*, *A. rubi*, *A. rhizogenes*, *A. vinis*) виды. Это короткие, подвижные грамотрицательные палочки с перитрихальными жгутиками.

Опухолевый рост у растений, индуцированный патогенными штаммами *Agrobacterium*, представляет собой особый случай паразитизма: паразит (агробактерия) изменяет обмен веществ в клетках хозяина, вводя свою генетическую информацию в его геном. Такое явление получило название «генетическая колонизация». Ферментативный механизм растения, отвечающий за транскрипцию собственной ДНК и синтез белка, распознает чужеродную ДНК из бактерии как свою собственную и транскрибирует ее вместе с обычными растительными генами. В природе образование опухоли начинается с повреждения стебля растения у самой земли. Агробактерии могут трансформировать растение только при наличии пораненной растительной ткани, которая теряет различные вещества, входящие в состав клеточных стенок (глюкозу, глюкуроновую кислоту, галактозу, галактуроно-вую кислоту, арабинозу, маннозу, фукозу, целлобиозу и ксилозу), а взамен в ней начинают синтезироваться специальные вещества — предшественники лигнина, являющиеся сигнальными молекулами для начала инфекции — ацетосирингон и гидро-ацетосирингон, способствующие заживлению раны.

Патогены чувствительны к ним и начинают двигаться к поврежденному участку ткани по градиенту концентрации этих веществ со скоростью 60 мкм/сек, а затем прикрепляются к клеткам растения в местах повреждений. После прикрепления бактерий к поверхности клеток растения они начинают образовывать целлюлозные фибриллы, которые видны при микроскопировании уже через 90 мин после добавления бактерий и к 10 часам инкубации формируют сеть, покрывающую поверхность растительных клеток. Фибриллы служат более прочному закреплению бактерий на поверхности хозяина. За целлюлозные фибриллы могут зацепиться свободно плавающие клетки бактерий, за счет чего увеличивается множественность заражения. В результате размножения образуются скопления бактерий на поверхности растения. Передача ДНК от бактерий в растительную клетку происходит при плотном контакте бактерий с плазмалеммой растительной клетки, который обеспечивается вследствие повреждения клеточных стенок ферментами, выделяемыми бактериями и растворяющими пектины клеточной стенки.

Для чего же нужно бактериям встраивать свои гены в клетки растения, изменяя их метаболизм? В растениях со встроенных бактериальных генов начинается синтез фитогормонов цитокининов и специфических, используемых только агробактериями, веществ — опинов. Синтез дополнительного количества гормонов в растительной клетке приводит к сдвигу баланса гормонов в клетке и, как следствие, к неуправляемому росту клеток, ведущему к образованию опухоли. Эти вещества — опины используются бактериями в качестве источника углерода и азота, что создаёт для них селективные преимущества, т.к. только агробактерии имеют гены, ответственные за деградацию этих соединений.

Геном *A. tumefaciens* состоит из 2-х частей — из большой линейной хромосомы (2 млн пар оснований) и значительно меньшей кольцевой хромосомы (206479 пар оснований). Именно эта кольцевая хромосома и носит название Ti-плазмиды (см. выше).

Гены, вызывающие формирование галлов на растениях, локализованы по большей части на Ti-плазмиде. *Agrobacterium tumefaciens* имеет очень широкий круг растений-хозяев и может инфицировать практически все двудольные растения. Долгое время считалось, что однодольные растения не чувствительны к агробактериальной инфекции. В настоящее время показано, что при соблюдении определенных условий агробактерии могут инфицировать и однодольные растения, в частности представителей таких семейств, как *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*, *Gramineae*, *Iridaceae* и некоторых других. Однако существуют определенные вариации круга хозяев для различных штаммов *Agrobacterium*: некоторые штаммы способны вызывать галлообразование на отдельных видах растений, но не инфицируют другие. Различные сорта одного и того же растения также могут иметь различную чувствительность к данному бактериальному штамму. В отличие от *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* фактически инфицируют все виды растений, как двудольные, так и однодольные.

Ti-плазида представляет собой кольцевую двунитевую ДНК, которая несет гены, участвующие в образовании опухоли. В растение переносится часть плазмиды, которая называется Т-ДНК (от англ. transferred DNA, т.е. «переносимая ДНК»), на которой локализованы гены синтеза ферментов, вызывающих формирование опухолей на растениях, а также гены синтеза опинов. Ti-плазида содержит также w^g-гены, которые экспрессируются под воздействием сигнальных молекул и являются ответственными за синтез, вырезание и перенос Т-ДНК, но сами в геном растения не переносятся.

Индукция *vir* генов обратима, и каскад реакций может быть прерван, что очень важно для патогена, поскольку в том случае, если инфицируется больной и/или нежизнеспособный организм, то перенос Т-ДНК в его клетки не осуществляется. После активации *w't*-генов в оболочке бактерии образуется разрыв, через который Т-ДНК переносится в растительную клетку. Похожим образом у бактерий происходит половой процесс, когда микробы просто обмениваются копиями плазмид.

Т-ДНК, являясь фрагментом Т1-плазмиды, ограничена двумя прямыми повторами из 25 нуклеотидов, которые «обманывают» ферменты растительной клетки, заставляя их принять Т-ДНК за родную и встроить ее в собственный геном. Правый конец обозначается П (RB — right border), левый соответственно Л (LB — left border). Для нормального переноса в растительную клетку особенно важна ее правая граница, которая одна может определять встраивание Т-ДНК. Удаление правой границы из Т1-плазмид делает агробактерии полностью неинфекционными. В то же время замена правой границы как на искусственно синтезированную, так и на левую восстанавливает вирулентность бактерии. Любой фрагмент ДНК, помещенный между этими границами, может быть перенесен и встроен в ядро растительной клетки. Максимальный размер фрагмента ДНК, который может быть перенесен, пока не определен.

На рисунке приведена схема генетической трансформации клетки. Фенольные компоненты пораненной растительной клетки запускают экспрессию генов *vir*-области Т1-плазмиды. *vir*-белки вырезают Т-область из плазмиды, образуя Т-цепь. Затем Т-цепь и *vir*-белки нескольких типов переносятся в растительную клетку через транспортные каналы. Внутри клетки *vir*-белки взаимодействуют с Т-цепью, формируя Т-комплекс. Этот комплекс попадает в ядро, позволяя Т-ДНК интегрировать в геном растения и экспрессировать встроенные гены

После переноса в ядро растительной клетки Т-ДНК встраивается в геном в виде одной или нескольких копий. При этом одна из нитей плазмидной ДНК деградирует, а другая за счет рекомбинации с гомологичным участком ДНК клетки-хозяина может включиться в хромосому или внехромосомную единицу.

У Ri-плазмид имеются общие черты с Т1-плазмидой, в том числе гомологичная *vir*-область. Ее Т-ДНК также содержит гены, кодирующие опины и два гена синтеза ауксина и, кроме того, ещё в ней присутствуют специальные гены, называемые гогенами, которые и способствуют образованию опухоли в виде пучка корней.

Т1- и Ri-плазмиды оказались прекрасным инструментом для переноса генов в хромосомы растений. В начале 80-х гг. XX в. различными группами исследователей Т1-плазмиды были модифицированы путем удаления онкогенов (генов синтеза фито-гормонов и опинов) из области Т-ДНК; также из агробактерий была удалена вся лишняя ДНК, не нужная при клонировании ДНК. Клонирование в биологии — это получение точных копий организма или другого объекта, например, клетки или гена. Первоначально слово клон (от греч. ветка, побег) применялось для группы растений (например, фруктовых деревьев), полученных вегетативным способом от одного растения-производителя. Эти растения в точности повторяли качества своего прародителя и могли стать основателями нового сорта. Позже клоном стали называть не только всю такую группу, но и каждое отдельное растение в ней, а получение таких потомков — клонированием.

Со временем значение термина расширилось, и его стали применять в микробиологии, для методики выращивания культур бактерий — потомков одной клетки. Кроме того, в Т1-плазмиду

был также добавлен сайт инициации репликации, вырезанный из плазмиды кишечной палочки *E. coli*, чтобы можно было клонировать в ней плазмиды. После переноса с их помощью ДНК в ядро растительной клетки нормальный рост растения не нарушался. После этого оставалось вставить в Т-ДНК нужные гены: один или несколько целевых и не менее двух маркерных, которые позволяют отобрать сначала клетки кишечной палочки, а потом растительные, в которых перенос генов прошел удачно - ген устойчивости к определенному антибиотику или кодирующий светящийся белок, и т.п.

В растениях, трансформированных такими плазмидами, опухоли уже не образуются, и не происходит синтеза опинов. «Обманутая» человеком бактерия, внедряя свою ДНК в хромосому растения, в свою очередь «обманывает» геном растения, который после этого начинает синтезировать необходимые человеку продукты.

4.12 Геномика и генная терапия

При подготовке к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

Лечение заболеваний с помощью генов получило название генотерапии. Сейчас в мире насчитывается порядка 400 проектов, посвященных лечению с помощью генотерапии.

Разработке программы генной терапии предшествуют тщательный анализ тканеспецифической экспрессии соответствующего гена, идентификация первичного биохимического дефекта, исследование структуры, функции и внутриклеточного распределения его белкового продукта, а также биохимический анализ патологического процесса. Все эти данные учитываются при составлении соответствующего медицинского протокола.

Апробацию процедуры генокоррекции наследственного заболевания проводят на первичных культурах клеток больного, в которых в норме функционально активен данный ген. На этих клеточных моделях оценивают эффективность выбранной системы переноса экзогенной ДНК, определяют экспрессию вводимой генетической конструкции, анализируют ее взаимодействие с геномом клетки, отрабатывают способы коррекции на биохимическом уровне. Используя культуры клеток, можно разработать систему адресной доставки рекомбинантных ДНК, однако проверка надежности работы этой системы может быть осуществлена только на уровне целого организма. Поэтому такое внимание в программах по генной терапии уделяется экспериментам *in vivo* на естественных или искусственно полученных моделях соответствующих наследственных болезней у животных.

Успешная коррекция генетических дефектов у таких животных и отсутствие нежелательных побочных эффектов генной терапии являются важнейшей предпосылкой для разрешения клинических испытаний. Таким образом, стандартная схема генокоррекции наследственного дефекта включает серию последовательных этапов. Она начинается созданием полноценно работающей (экспрессирующейся) генетической конструкции, содержащей смысловую (кодирующую белок) и регуляторную части гена. На следующем этапе решается проблема вектора, обеспечивающего эффективную, а по возможности и адресную доставку гена в клетки-мишени. Затем проводится трансфекция (перенос полученной конструкции) в клетки-мишени, оценивается эффективность трансфекции, степень регулируемости первичного биохимического дефекта в условиях клеточных культур (*in vitro*) и, что особенно важно, *in vivo*

на животных - биологических моделях. Только после этого можно приступать к программе клинических испытаний.

Существует два типа генотерапии: заместительная и корректирующая.

Заместительная генотерапия заключается во вводе в клетку неповрежденного гена. Внесенная копия заменит по функциям сохранившийся в геноме больного дефектный ген. Все проводимые сегодня клинические испытания используют внесение в клетку дополнительных количеств ДНК.

При корректирующей терапии предполагается замена дефектного гена нормальным в результате рекомбинации. Пока этот метод на стадии лабораторных испытаний, так как эффективность его еще очень низка, но последние исследования показывают успехи в лечении некоторых заболеваний.

Амавроз Лебера - врожденная слепота, редкая форма наследственного заболевания, которое проявляется уже в младенчестве. Из-за дефектного гена (Retinal Pigment Epithelium, 65 kDa) в сетчатке умирают и не восстанавливаются светочувствительные клетки. По статистике, от амавроза Лебера страдает один человек на 81 тысячу. Болезнь сопровождается ослаблением или полной потерей зрения без анатомического нарушения структуры органов. Повреждение гена RPE65 приводит к прекращению синтеза определенных ферментов, участвующих в выработке светочувствительного пигмента, и дегенерации фоторецепторов. Врожденный амавроз Лебера впервые был описан в 1869 году немецким ученым-офтальмологом Теодором Лебером, однако этиология и патогенез этой группы болезней до настоящего времени остаются не до конца изученными.

Клиническими критериями диагностики ВАЛ являются: значительное снижение остроты зрения (от отсутствия реакции на свет и светоощущения до сотых долей), у большинства детей отмечаются плавающие движения глаз, нистагм, окуло-пальцевой симптом, косоглазие, могут встречаться деструкция стекловидного тела и частичное врожденное помутнение хрусталиков. Характерным является резкое снижение скотопических и фотопических показателей суммарного потенциала фоторецепторов сетчатки на электроретинографии (ЭРГ), вплоть до ее отсутствия, при нормальной офтальмоскопической картине глазного дна. Кроме того, отмечаются нарушения цветоощущения от красно-зеленой дисхроматопсии до ахроматопсии, сужение полей зрения до 30-10 градусов, значительное повышение порога электрической чувствительности.

Традиционная лекарственная терапия бессильна в борьбе с этим заболеванием. На помощь пришла генотерапия. Исследователи из США и Англии делали инъекцию вирусного вектора, содержащего исправленный ген в один глаз пациентов, страдающих амаврозом Лебера. Вектор содержал фермент, необходимый для продукции светочувствительного пигмента и вводился в эпителий пигментного слоя сетчатки. В первом исследовании у всех 12 пациентов светочувствительность в "пролеченном" глазу вернулась. У 4 детей зрение восстановилось до такой степени, что они могли заниматься спортом и нормально учиться в школе. Кроме того, были проведены исследования на саймири (белышья обезьянки), страдающих дальтонизмом. Инъекция "исправленных" генов вернула им полное цветовое зрение.

В зависимости от способа введения экзогенных ДНК в геном пациента генная терапия может проводиться либо в культуре клеток (*ex vivo*), либо непосредственно в организме (*in vivo*). Клеточная генная терапия или терапия *ex vivo* предполагает выделение и культивирование

специфических типов клеток пациента, введение в них чужеродных генов, отбор трансфицированных клеток и реинфузию их тому же пациенту.

Примером может служить лечение комбинированного иммунодефицита. Комбинированный иммунодефицит может быть результатом дефекта гена аденозиндезаминазы. Это заболевание клинически и иммунологически характеризуется дефектом как Т-, так и В-лимфоцитов. Диагностируется заболевание обычно в раннем возрасте, а признаками служат тяжелые, потенциально смертельные инфекции, глубокое нарушение клеточного иммунитета и дефицит антител, лимфопения, в основном за счет Т-лимфоцитов. Клинические проявления обычно включают задержку и отсутствие прогресса физического и моторного развития, персистирующие, вяло текущие и необычно упорные инфекции, вызванные низковирулентными оппортунистическими микроорганизмами (например, *Candida*, *Pneumocystis carinii*, *cytomegalovirus*). Тяжелые комбинированные первичные иммунодефициты классифицируются далее в зависимости от патогенеза, когда он известен (например, дефекта фермента), типа наследования и уровня нарушения дифференцировки.

Одной из форм комбинированного иммунодефицита является тяжелая комбинированная иммунная недостаточность ТКИН, или англоязычное (*severe combined immunodeficiency - SCID* или "bubble boy" disease). Обнаружены как Х-сцепленная, так и аутосомно-рецессивная формы SCID. В случаях SCID с нормальным количеством В-лимфоцитов обычно наблюдается Х-сцепленное наследование. Впервые попытка лечения такого больного методами генотерапии была предпринята в США в 1990 г. У больного ребенка извлекли Т-лимфоциты, трансформировали ретровирусным вектором, введя нормальный ген аденозиндезаминазы и вернули клетки в организм. Введение приходилось повторять. Более эффективна аналогичная трансформация стволовых клеток костного мозга.

В январе 2009 года итальянские ученые опубликовали данные о полном излечении 8-ми летнего мальчика, страдающего этим заболеванием. Кроме того, 8 из 10 участвовавших в клиническом испытании не нуждаются более в ферментозаместительной терапии и живут теперь нормальной жизнью. Никаких серьезных побочных эффектов от применения генотерапии обнаружено не было.

Х-сцепленная адренолейко дистрофия (АДЛ) - дегенеративное заболевание белого вещества головного мозга. Поражает мальчиков с частотой примерно 1/17 000. Оно убивает их еще до того, как наступит подростковый возраст. Заболевание обусловлено дефектом обмена жирных кислот. В результате нарушается миелинизация нервных клеток. Клиническая картина выражается в интеллектуальной, поведенческой недостаточности, расстройстве памяти, нарушении походки, расстройстве зрения вплоть до атрофии зрительных нервов.

В экспериментах французских исследователей скорректированный ген вставляли в клетки крови 7-летнего мальчика, страдающего АДЛ, некоторые клетки начинали продуцировать необходимый для обмена жирных кислот протеин, а также, по видимому, мигрировали в мозг. По крайней мере, спустя 2 года прогрессирующее повреждение мозга, характерное для этой болезни, прекратилось. В этих экспериментах гены доставлялись в клетки с помощью инактивированного вируса иммунодефицита человека (HIV).

Компания Genetix Pharmaceuticals, специализирующаяся на соматической генной терапии, также

сообщила в ноябре 2009 года о создании препарата для лечения АДЛ на основе собственных гемопоэтических стволовых клеток костного мозга, «зараженных» модифицированным вирусом ВИЧ (лентивирусный вектор), несущим в себе ген, которого недостает в организме больного АДЛ. Такой препарат уже ввели двум юным пациентам (после миелоабляции), спустя 15 месяцев прогрессирование болезни прекратилось.

Генная терапия *in vivo* основана на прямом введении клонированных и определенным образом упакованных последовательностей ДНК в специфические ткани больного. В настоящее время не существует общедоступного метода культивирования клеток легких, поэтому при легочных заболеваниях единственный способ доставить чужеродный ген - это ввести его прямо в организм.

Муковисцидоз - весьма распространенное среди людей белой расы тяжелое наследственное заболевание легких, которое поражает, например, в семьях из Центральной Европы одного новорожденного из 2500 и для которого установлен дефектный ген, кодирующий белок-регулятор трансмембранной проводимости. Основное проявление дефектного гена — пневмония. Поражаются все эпителиальные клетки. Основная проблема — как доставить ген в клетки, покрытые слизью, которая препятствует трансформации. Неповрежденную копию "гена заболевания", включенную в аденовирусный вектор или липосому, вводят в форме аэрозоля в дыхательные пути больного.

Для коррекции нарушения при прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна (заболевании мальчиков, связанном с дефектами X-хромосомы) нормальный ген, кодирующий белок дистрофии, пытались прямо вкалывать в мышечные волокна, используя либо "голую" ДНК, либо аденовирусный вектор. Другие исследователи трансплантировали больному миобласты после генетической коррекции. Ранее неподвижный ребенок приобретал способность двигаться! К сожалению, во всех этих опытах удастся получить только временный терапевтический эффект, и процедура введения гена должна неоднократно повторяться.

Список наследственных заболеваний, которые пытаются или планируют лечить генами, велик. Это и ревматоидный артрит, и фенилкетонурия, и заболевания, связанные с недостатком гормонов (инсулина, эритропоэтина, гормона роста). В случае хронической анемии, связанной с дефицитом эритропоэтина, на основании опытов на животных предлагается принципиально новый подход к лечению. Так как каждая из наших клеток содержит один и тот же геном, можно заставить фибробласты кожи, которые в норме не производят эритропоэтина, синтезировать этот гормон. Для этого нужно ввести в геном новую контролируемую область и тем самым снять запрет со считывания (экспрессии) гена эритропоэтина, присутствующего, но "молчащего" в фибробластах.

Практически в любой области медицины либо начаты клинические испытания лечения наследственных заболеваний с помощью генотерапии, либо в опытах на животных разрабатываются подходы к такому лечению. По мере усовершенствования методов доставки генов и контроля их экспрессии список заболеваний, к которым можно применять генотерапию, будет безусловно расширяться.

Генотерапия применима не только к наследственным заболеваниям. Предстоит решить проблему лечения генами "чумы XX века" — синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД), возникающего при заражении вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). ВИЧ представляет

собой ретровирус, поражающий Т-лимфоциты и макрофаги. Болезнь удалось бы победить, если бы были найдены новые гены, введение которых в зараженные ВИЧ лимфоциты останавливало бы дальнейшее размножение вируса. Предложено множество хитроумных способов борьбы со СПИДом с помощью привнесенных генов. Все они основаны на новейших данных о строении и функционировании генома ретровируса. Например, вводя прямо в мышцы больного ретровирусные векторы, несущие отдельные гены ВИЧ, ученые рассчитывали на то, что гены ВИЧ после внедрения в ДНК хромосом хозяина смогут дать информацию для синтеза вирусных белков и произойдет "противоСПИДная" иммунизация больного этими белками. Однако еще не получено ощутимых результатов, которые сулили бы успех в борьбе с вирусом дикого типа, коварство которого заключается в его изменчивости.

Огромные перспективы открывает использование генотерапии для лечения онкологических заболеваний. Многолетние усилия ученых привели к пониманию того, что рак — это генетическое заболевание и его развитие происходит многостадийно, в результате серии генетических нарушений, накапливающихся в клетке. Следовательно, каждый из таких отдельных генетических эффектов может стать точкой приложения генотерапевтического подхода.

В настоящее время в мире около 400 проектов по генной терапии находятся на различных стадиях клинических испытаний: 261 из них проходит первую стадию (оценка токсичности), 133 - вторую (испытание на небольшой группе тяжелобольных пациентов) и только 3 проекта (два по лечению рака мозга и один по гемофилии) - на заключительной третьей стадии (масштабные клинические испытания). Пока генная терапия применяется в основном в онкологии (более 60% проектов). Примерно по 15% приходится на генную терапию инфекционных (СПИД, гепатит В, туберкулез) и моно генных заболеваний (муковисцидоз, семейная гиперхолестеринемия, мукополисахаридозы, гемофилия А и др.).

Методы генной терапии позволяют лечить различные генетические патологии в период внутриутробного развития.

Генная терапия успешно применяется для лечения не только наследственных, но и значительно более распространенных мультифакториальных болезней (диабет, остеопороз, ревматоидный артрит, различные опухоли). Для лечения таких заболеваний применяется не одна, а сразу много генетических конструкций, исправляющих дефекты различных стадий течения патологического процесса.

4.13 Молекулярная биология и возникновение жизни.

При подготовке к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

Гипотезы возникновения жизни

Панспермия - жизнь витает в космосе и разносится по планетам.

Жизнь зародилась абиогенно или нет?

Биогенез - живое только от живого.

Абиогенез - живое от неживого.

Луи Пастеру принадлежит первое прямое доказательство происхождения живого только от живого. В 1862 году он получил премию Французской академии наук за эту работу.

Суть опыта: в колбе с изогнутой трубкой находился прокипяченный сennyй настой. В течение нескольких недель он стоял совершенно прозрачный. Как только колбу наклонили (сквозь трубку в колбу попали микроорганизмы) - настой забродил.

Эксперимент правильный. Вывод - живое только от живого.

Авторитет Пастера был столь велик, что к теории абиогенеза пришли лишь через 60 лет.

В 1924 году Александр Опарин высказал предположение, что ~4 млрд. лет назад жизнь могла возникнуть абиогенно, в силу тех условий, которые существовали тогда на Земле.

Джон Холдейн рассчитал, какие условия и как долго должны были существовать, чтобы зародилась жизнь, каковы необходимые источники энергии для зарождения жизни.

Теория биопоза

Джон Бернал создал теорию биопоза, включающую три стадии.

1. Образование биомономеров.
2. Образование биополимеров и их эволюция. Образование систем с обратной связью.
3. Образование мембранных структур и пробионтов (первых клеток).

Экспериментальное доказательство первой стадии - опыты Стенли Миллера.

Суть опыта: в колбе находилась смесь газов (H_2 , N_2 , NH_3 , CH_4 , CO , CO_2) при температуре ~ 100 °C. Кипящая вода служила источником водяного пара, а с помощью обратного холодильника поддерживалась циркуляция газовой смеси через сосуд. Давали искровой разряд в 60 тыс. вольт, что энергетически эквивалентно 50-и млн. лет на примитивной Земле. Результат был ошеломляющий: в колбе появились HCN , $HCHO$, $HCOOH$, несколько аминокислот, несколько азотистых оснований жирные кислоты, псирты, моносахара. Эксперимент повторяли много раз. Непременное условие успеха - отсутствие в колбе свободного кислорода. В зависимости от pH раствора и соотношения газов были получены разные наборы соединений. Если была H_3PO_4 , то образовывались даже нуклеотиды, а это уже гетерополимеры.

Таким образом была доказана первая стадия возникновения жизни. 4 млрд. лет тому назад с неизбежностью должны были возникнуть биомомомеры.

Первичная атмосфера образующейся Земли кислород содержала, но он весь пошел на окисление. Свободного кислорода не было. Таким образом, возникновение биомономеров и биополимеров происходило во вторичной бескислородной среде.

У стадии 3 в принципе есть доказательства. Самая сложная и неочевидная - стадия 2.

2 стадия биопоза.

Помимо 4-х основных классов биополимеров, могли образовываться и не дошедшие до нас гетерополимеры. Видимо, эволюция химических соединений шла по принципу минимума свободной энергии.

Остановимся пока на белках и нуклеиновых кислотах.

Из разных комплексов белок-нуклеиновая кислота рассмотрим только те, в которых нуклеиновая кислота сохраняется благодаря защите белком от ультрафиолетового излучения.

Накопим такие комплексы. Из их множества рассмотрим те, в которых белки способствуют увеличению количества защищенной нуклеиновой кислоты. То есть эти белки - ферменты. Из этих комплексов рассмотрим те, где нуклеиновые кислоты, количество которых возрастает под действием белков, способствуют увеличению количества белков благодаря, например, прямому кодированию. Возникают системы с обратной связью. Такие системы обладают некоторыми признаками живого.

Другой вариант.

Первыми молекулами были РНК.

Они имеют третичную структуру и обладают каталитической активностью. Позже появились белки, поддерживающие "выгодные" конформации РНК и защищающие их от расщепления. Уже потом возникает ДНК, как более надежный хранитель генетической информации. Она имеет две цепи, что обеспечивает репарацию, репликация осуществляется за один шаг. Отсутствие ОН-группы в 2'-положении пентозы делает ДНК устойчивой в слабощелочных условиях, губительных для РНК.

Стадия 3.

Представим, что лужа покрыта жирной пленкой, а под ней - белки. Если оторвать каплю, то могут получиться пузырьки, содержащие нуклеопротеидные системы с обратной связью. Когда они падают на поверхность водоема, то покрываются вторым липидно-белковым слоем - и образуется современная биологическая мембрана. В мембранной капле диффузия уже не очень существенна.

Далее образуются пробионты - первые организмы, имеющие мембрану.

Пробионты были первичными гетеротрофами. Они получали энергию при расщеплении органических веществ абиогенного происхождения, в изобилии имевшихся в окружающей среде. Примером древнего способа обмена веществ, дошедшего до наших дней, является гликолиз - ферментативное бескислородное расщепление глюкозы.

По мере истощения запаса органического материала (а новый не образовывался из-за изменения условий на Земле) возникала жесткая конкурентная борьба за него, что ускорило процесс эволюции первичных гетеротрофов.

Исключительным событием стало возникновение бактериального фотосинтеза, освободившего клетки от зависимости от доступности органики абиогенного происхождения. Скорее всего,

фотосинтез возник у анаэробных бактерий, способных к азотификации. Побочным продуктом фотосинтеза является кислород. Его накопление в атмосфере привело к коренному изменению хода эволюции. Появление озонового экрана защитило первичные организмы от смертельного УФ-облучения и положило конец абиогенному синтезу органики.

Первые аэробные бактерии появились благодаря приобретению аппарата окислительного фосфорилирования. Продукты брожения подвергались дальнейшему окислению до CO_2 и H_2O . Аэробные (вторичные) гетеротрофы могли более эффективно, чем анаэробные (первичные) гетеротрофы, расщеплять органические вещества, образующиеся в результате фотосинтеза.

По-видимому, с ростом концентрации кислорода в атмосфере усложнялась жизнь первичных анаэробных гетеротрофов. Некоторые из них вымерли, другие нашли бескислородную среду. Примером могут служить дошедшие до наших дней метанобразующие бактерии или серные бактерии, живущие в горячих подземных источниках.

Некоторые первичные гетеротрофы пошли по пути, приведшему к образованию эукариотических клеток. Часть из них вступила в симбиоз с аэробными бактериями, способными к окислительному фосфорилированию. Поглотив вторичных гетеротрофов, первичные не расщепили их на молекулы, а сохранили в качестве энергетических станций, называемых сегодня митохондриями.

Такие симбионты дали начало царствам животных и грибов.

Другая часть первичных гетеротрофов "заключила союз" не только с аэробными гетеротрофами, но и с первичными фотосинтетиками, сохранив последних в качестве хлоропластов. Такие симбионты дали начало царству растений.

В пользу симбиотической теории образования эукариот говорят следующие факты:

- У митохондрий и хлоропластов две мембраны. Внутренняя - своя, наружная образована клеткой-захватчиком.
- Генетический код митохондрий идеален. Универсальный генетический код имеет два существенных отличия, касающихся инициации и терминации синтеза белка.

Таким образом эукариоты отстранились от чужой генетической информации.

Кроме того, они линеаризовали свою ДНК. Митохондрии и хлоропласты имеют кольцевую ДНК, хотя не очень понятно, для чего им нужна кольцевая ДНК, и бактериальные рибосомы. Однако понятно, почему у них такая ДНК и такие рибосомы. Потому, что их предки были бактериями. Сегодня часть генов митохондриальных белков и белков хлоропластов, в том числе их РНК- и ДНК-полимераз, находятся в ядре. Вероятно, попали они туда с помощью мобильных элементов.

Все бактерии делятся на эубактерии (в том числе *E.coli*) и археобактерии. Принципиальное отличие между ними в том, что гены археобактерий имеют экзон - интронное строение и сплайсинг. Эубактерии - результат эволюции ана- и аэробных гетеротрофов. Их эволюция шла в благоприятных условиях и они сменили больше поколений, избавившись от интронов.

Археобактерии живут в экстремальных условиях: горячие, кислые, высокосолесные подземные воды. Эукариоты и археобактерии сохранили экзон-интронную структуру, что говорит о древнем происхождении экзонов и интронов.

4.14 Молекулярная биология и происхождение человека

При подготовке к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

Антропогенез — процесс историко-эволюционного формирования человека, становление его как биологического вида в процессе формирования общества, т.е. социогенеза. Теория происхождения человека базируется на данных ряда биологических и гуманитарных наук. Палеоантропология, палеодемография, палеонтология и сравнительная биология позволяют выявить направление изменчивости морфологических особенностей у представителей эволюционирующего вида в условиях меняющейся среды, установить их численность и возрастную структуру. Эволюционная генетика накопила прямые доказательства существования естественного отбора в природе и разработала методы его математического моделирования. Психология, эволюционная морфология мозга прослеживают возникновение мышления и речи в процессе антропогенеза. Этнография позволяет проанализировать общественные отношения древнейших людей. Данные многих наук, особенно молекулярной биологии, уточняя отдельные моменты эволюции и формируя ее теоретическую основу, составляют понятие «синтетическая теория эволюции» (СТЭ), или современный синтез. Согласно эволюционному учению, проблема антропогенеза рассматривается как частный филогенетический вопрос в общей картине биологической эволюции — направленного исторического развития живой природы, включающего изменения генетического состава популяций, формирование адаптаций, образование и вымирание видов, преобразование биогеоценозов и биосферы в целом. Эти изменения происходят сотни миллионов лет, с момента возникновения жизни. Их результат — разнообразие форм жизни, которые являются продуктом и объектом эволюции, представляющим собой основу изучения эволюции любого масштаба.[^]

Движущей силой биологической эволюции является достижение соответствия развивающейся живой системы условиям ее существования, что сопряжено с преимущественным распространением одних и гибелью других дискретных биологических систем.

Подтвердить родственные связи человека и животных и в первую очередь высокую степень родства человека с человекообразными обезьянами можно с помощью прямых и косвенных доказательств.

Прямые доказательства — это костные останки ископаемого человека, ближайших его предков и родственников им форм. Научная интерпретация ископаемых материалов основана на сравнении их анатомических особенностей с существующими формами с учетом экологических влияний.

Косвенные доказательства наиболее многочисленные. К ним относятся сравнительно-анатомические, физиологические, биохимические, генетические и другие группы факторов, а также данные сравнительной эмбриологии, учение о рудиментарных органах и атавизмах.

Сравнительно-анатомические данные свидетельствуют о родстве живых организмов и человека по общему плану строения и аналогии органов и тканей. Все живые организмы, за исключением вирусов, имеют клеточное строение. В основе жизнедеятельности всех живых существ лежит непрерывный обмен веществ между ними и окружающей средой. Процессы обмена, распад и

синтез различных органических соединений в организмах управляются ферментными системами. Организмы синтезируют свои видоспецифические белки, отличающиеся от белков других видов характером чередования аминокислот. Можно проследить общие черты и в зародышевом развитии всех организмов. Еще в XIX в. К.М. Бэр сформулировал закон «зародышевого сходства», который гласит: чем более ранние стадии эмбриогенеза исследуются, тем более сходства обнаруживается между организмами — представителями различных видов позвоночных. Э. Геккель (1863, 1868), А.О. Ковалевский, А.Н. Северцев (1939) обратили внимание, что изучение развития эмбрионов дает возможность понять преобразование организмов и отдельных органов в процессе филогенеза — их исторического развития.

4.15 Методологические основы разработки рецептур и технологий генетически модифицированных продуктов питания

При подготовке к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

Генетически модифицированная пища — это продукты питания, полученные из генетически модифицированных организмов (ГМО) — растений, животных или микроорганизмов. Продукты, которые получены при помощи генетически модифицированных организмов или в состав которых входит хоть один компонент, полученный из продуктов, содержащих ГМО, также могут считаться генетически модифицированными, в зависимости от законодательства страны. Генетически модифицированные организмы получают некоторые новые свойства благодаря переносу в геном отдельных генов теоретически из любого организма (в случае трансгенеза) или из генома родственных видов (цисгенез).

На 2013 год, генно-модифицированные растения выращивались в 27 странах, на рынок было допущено 27 генно-модифицированных сельскохозяйственных культур (включая как пищевые, так и кормовые и технические).

В растительной клетчатке синтез определенных аминокислот прекращается, если их концентрация достигла определенного уровня. Генно-инженерными методами в растение кукурузы перенесли бактериальный ген *cordaA* из *Corynebacterium glutamicum* под контролем семенного промотора *Glb1*. Этот ген кодирует фермент лизин-нечувствительную дигидропиколинат синтазу, которая не распознается растительными системами обратного ингибирования. Кукурузы линии LY038, разработанная компанией Монсанто, содержит увеличенное количество аминокислоты лизина, и поэтому более питательная в качестве корма для животных. Линия кукурузы LY038 коммерческая и допущена к культивированию в Австралии, Канаде, Японии, Мексике, Филиппинах и США. В Европе запрос на культивирование был подан в Нидерландах, разрешение получено в 2007 году, но в 2009 году разрешение было отозвано.

Впервые генномодифицированные продукты появились на рынке в начале 1990-х годов. В 1994 коммерциализирован генетически модифицированный томат (FlavrSavr), продукции компании Calgene с повышенной лёжкостью. Генетическая трансформация в этом случае не приводила к встраиванию какого-либо гена, а касалась исключительно удаления гена полигалактуроназы при помощи антисенс-технологии. В норме продукт этого гена способствует разрушению клеточных стенок плода в процессе хранения. FlavrSavr недолго просуществовал на

рынке, поскольку существуют более дешевые конвенционные сорта с такими же свойствами. Большая часть современных генномодифицированных продуктов растительного происхождения.

По состоянию на 2009 год, было коммерциализировано и допущено к выращиванию как минимум в одной стране 33 вида трансгенных растений: соя — 1, кукуруза — 9, рапс — 4, хлопчатник — 12, сахарная свекла — 1, папайя — 2, тыква — 1, паприка — 1, томат — 1, рис — 1. На разных стадиях рассмотрения запросов на допуск находились ещё примерно 90 разных видов трансгенных растений в том числе картофель, слива, люцерна, фасоль, пшеница, земляной орех, горчица, цветная капуста, перец чили и другие.

В 2015 году генетически модифицированный атлантический лосось (AquAdvantage) был одобрен FDA для продажи в США..

К генетически модифицированной пище могут быть также отнесены сыры, производимые с использованием сычужного фермента от генномодифицированных бактерий (более 50% твердых сыров).

4.16 Степень безопасности трансгенных пищевых продуктов

При подготовке к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

Безопасность продуктов, полученных с помощью генетической инженерии — весьма важная проблема, которая возникла перед обществом в связи с широким внедрением в сельскохозяйственное производство ГМ-культур растений, являющихся сырьем для получения пищевых продуктов.

Еще в 1973 г., когда объектом генно-инженерных исследований являлись преимущественно микроорганизмы, были высказаны серьезные сомнения по поводу безопасности технологий рекомбинантных ДНК. Первые директивы, регламентирующие проведение всех экспериментов с рекомбинантными ДНК, были чрезвычайно строгими. Например, в Директиве Национального института здравоохранения США 1976 г. жестко оговаривались условия работы с рекомбинантными ДНК и выдвигались требования, чтобы в качестве хозяев для чужеродных ДНК использовались микроорганизмы, неспособные размножаться вне стен лаборатории и передавать свою ДНК другим микроорганизмам. Со временем требования к мерам безопасности для большинства экспериментов были существенно смягчены, и технология рекомбинантных ДНК стала быстро развиваться.

В настоящее время существуют две важные проблемы:

1. Контроль за производством и потреблением пищевых продуктов, содержащих генетически измененные организмы, или полученных с их использованием.
2. Контроль за преднамеренным высвобождением ГМО в окружающую среду.

Несмотря на то что большинство созданных трансгенных растений отличаются от исходного родительского сорта наличием только модифицированной ДНК и экспрессированного белка, определяющего новый признак, пищевая продукция из ГМИ относится к категории «новой».

Присутствие в пищевых продуктах трансгенной ДНК само по себе не представляет опасности для здоровья человека. Однако функциональные способности трансгенной ДНК связаны с возможным проникновением участка ДНК в клетки микрофлоры кишечника, в частности перенос генов устойчивости к антибиотикам, которые, как указывалось выше, широко используются в качестве селективных маркерных генов при создании ГМ-растений. Можно предположить, что естественная микрофлора кишечника в этом случае будет либо подавляться, либо, наоборот, расти. Однако вряд ли это опасение следует рассматривать как серьезную проблему, поскольку поступающая с пищей ДНК подвергается разрушению в пищеварительном тракте, и маловероятно сохранение целостной генетической конструкции (включающей и целевой ген, и регуляторные компоненты), способной к самостоятельному функционированию в кишечнике.

Гораздо большие опасения связаны с возможным изменением экспрессии генов модифицированной ДНК и соответственно новыми белками, которые могут оказать влияние на качество и безопасность пищевых продуктов. Не исключено, что введенные в ДНК растений гены могут вызвать неожиданные побочные эффекты:

- ♦ изменение потребительских свойств продукта (снижение пищевой ценности, изменение химического состава и т.п.);

- ♦ синтез компонентов, вызывающих аллергические реакции или обладающих токсическими, мутаген

ными, канцерогенными эффектами, оказывающих воздействие на человека, непосредственно употребляющего трансгенную пищу, а также на его последующие поколения.

Так, сообщалось о появлении аллергических реакций у людей, употреблявших трансгенную пищу. Широко обсуждался случай с трансгенной соей — продукцией биотехнологической компании «Pioneer Hi-breed International». Продукты переработки этих бобов вызывали аллергические реакции. Использование этих бобов было прекращено.

Сообщалось также о трансгенном картофеле, содержащем ген лектина, взятый от другого растения. В экспериментах на крысах было показано, что такой картофель вызывал токсический эффект, что приводило к ослаблению иммунной системы и уменьшению массы внутренних органов (мозга, легких, печени) у подопытных животных .

Что касается проблем, связанных с воздействием ГМО на окружающую среду, то здесь также имеются негативные примеры. Исследователями предполагалось, что пыльца с ГМ-растений, устойчивых к гербицидам, может попасть на другие растения, и это вызовет появление «суперсорняков». В настоящее время установлено, что ген устойчивости к гербициду ГМ-горчицы действительно передается дикой горчице и сорнякам. Не исключена также возможность попадания гена стерильности ГМ-культур в растения дикой флоры. Уже выведены сорта стерильных томатов, кукурузы, хлопка и других растений. Экспрессия гена стерильности вызывает синтез веществ, подавляющих развитие зародыша во втором поколении. Возможные последствия утечки таких генов в природную среду катастрофичны.

Особо следует сказать о проблеме безопасности применения генетически модифицированных микроорганизмов.

Существуют серьезные опасения, что ГММ, созданные без учета их вероятного воздействия на природные экосистемы, смогут бесконтрольно и неограниченно размножиться

в окружающей среде, что приведет к самым нежелательным последствиям:

- ♦ вытеснению аборигенных природных организмов из их экологических ниш и последующей цепной реакции нарушений экологического равновесия;
- ♦ уменьшению биоразнообразия;
- ♦ бесконтрольному переносу чужеродных генов из ГММ в природные, что сможет привести к активации как ранее известных, так и активации и/или образованию ранее неизвестных патогенов животных и растений.

Именно поэтому необходимы разработки подходов и методов оценки риска потенциальных опасностей, которые могут возникнуть после внедрения (интродукции) ГММ.