

**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: заочная

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Организация самостоятельной работы	3
2.	Методические рекомендации по самостоятельному изучению вопросов	7
3.	Методические рекомендации по подготовке к занятиям	51
3.1	Генетика и генетическая информация.....	51
3.2	Генно-модифицированные источники пищевой продукции. Концепция биобезопасности пищевой продукции и питания.....	52
3.3	Общая схема реализации генетической информации.....	53
3.4	Механизмы реализации генетической информации.....	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 курсового проекта (работы)	подготовка реферата/эссе	индивидуальные домашние задания (ИДЗ)	самостоятельное изучение вопросов (СИВ)	подготовка к занятиям (ПкЗ)
1	2	3	4	5	6	7
1.	Модифицированные организмы и биобезопасность. Состояние проблемы.	-	-	-	5	-
2.	Генетический риск и биобезопасность при получении ГМО.	-	-	-	5	-
3.	Биобезопасность в клеточных, тканевых и органо-ногенных технологиях получения ГМО.	-	-	-	5	-
4.	Методы оценки продуктов, содержащих ГМО на биобезопасность	-	-	-	5	-
5.	Контроль и регулирование деятельности при получении и использовании ГМО.	-	-	-	5	-
6.	Методы генной	-	-	-	5	-

	инженерии					
7.	Задачи молекулярной биологии в XXI веке	-	-	-	5	-
8.	Генетика и генетическая информация				5	1
9.	Генно-модифицированные источники пищевой продукции. Концепция биобезопасности пищевой продукции и питания	-	-	-	5	1
10.	Общая схема реализации генетической информации	-	-	-	5	1
11.	Механизмы реализации генетической информации	-	-	-	5	1
12.	Особенности механизмов трансляции у прокариот и эукариот	-	-	-	5	-
13.	Хромосомы: строение и функционирование	-	-	-	5	-
14.	Переработка, передача и изменение генетической	-	-	-	5	-

	информации в ряду поколений					
15.	Сохранение и защита генетической информации	-	-	-	5	-
16.	Развитие многоклеточного организма	-	-	-	5	-
17.	Иммунитет. Некоторые отклонения в работе иммунной системы	-	-	-	5	-
18.	Получение животных и растительных трансгенных организмов	-	-	-	5	-
19.	Геномика и генная терапия	-	-	-	5	-
20.	Молекулярная биология и возникновение жизни.	-	-	-	5	-
21.	Молекулярная биология и происхождение человека	-	-	-	5	-
22.	Методологически е основы разработки рецептур и технологий генетически модифицированн ых продуктов питания	-	-	-	5	-

23.	Степень безопасности трансгенных пищевых продуктов	-	-	-	8	-
-----	----------------------------------------------------	---	---	---	---	---

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО САМОСТОЯТЕЛЬНОМУ ИЗУЧЕНИЮ ВОПРОСОВ

2.1 Модифицированные организмы и биобезопасность. Состояние проблемы.

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

В живых клетках происходит синтез множества органических молекул, среди которых главную роль играют полимерные макромолекулы – белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды.

Особая роль в жизнедеятельности живых организмов принадлежит белкам. От родителей детям передаётся генетическая информация о специфической структуре и функциях всех белков данного организма. Синтезированные белки выполняют многообразные функции: ускоряют химические реакции, выполняют транспортную, структурную, защитную функции, участвуют в передаче сигналов от одних клеток другим и таким образом реализуют наследственную информацию. Поэтому белки называют также протеинами (от греч. *proteos* - первый).

На долю белков внутри клетки приходится более половины их сухого вещества. В организме человека насчитывают около 50 000 индивидуальных белков. Видовая и индивидуальная специфичность набора белков в данном организме определяет особенности его строения и функционирования. Набор белков в дифференцирующихся клетках одного организма определяет морфологические и функциональные особенности каждого типа клеток.

Как и любой полимер, белок состоит из мономерных единиц, или «строительных блоков». В белках организма человека такими мономерами служат 20 из нескольких сотен известных в природе аминокислот. Аминокислоты, находящиеся в белках, связаны друг с другом пептидными связями. Линейная последовательность аминокислот в белке уникальна для каждого индивидуального белка; информация о ней содержится в участке молекулы ДНК, называемой геном.

Полипептидные цепи за счёт внутримолекулярных взаимодействий образуют пространственные структуры - конформации белков. На определённом участке белковой молекулы из радикалов аминокислот формируется активный центр, который может специфично (комплементарно) связываться с молекулами-лигандами.

Так же как и другие биологические макромолекулы (полисахариды, липиды и нуклеиновые кислоты), белки являются необходимыми компонентами всех живых организмов и играют важную роль в жизнедеятельности клетки. Белки осуществляют процессы обмена веществ. Они входят в состав внутриклеточных структур — органелл и цитоскелета, секретируются во внеклеточное пространство, где могут выступать в качестве сигнала, передаваемого между клетками, участвовать в гидролизе пищи и образовании межклеточного вещества.

Классификация белков по их функциям является достаточно условной, так как один и тот же белок может выполнять несколько функций. Хорошо изученным примером такой многофункциональности служит лизил-тРНК-синтетаза — фермент из

класса аминоксил-тРНК-синтетаз, которая не только присоединяет остаток лизина к тРНК, но и регулирует транскрипцию нескольких генов. Многие функции белки выполняют благодаря своей ферментативной активности. Так, ферментами являются двигательный белок миозин, регуляторные белки протеинкиназы, транспортный белок натрий-калиевая аденозинтрифосфатаза и др.

Каталитическая функция

Наиболее хорошо известная функция белков в организме — катализ различных химических реакций. Ферменты — это белки, обладающие специфическими каталитическими свойствами, то есть каждый фермент катализирует одну или несколько сходных реакций. Ферменты катализируют реакции расщепления сложных молекул (катаболизм) и их синтеза (анаболизм), в том числе репликацию и репарацию ДНК и матричный синтез РНК. К 2013 году было описано более 5000 тысяч ферментов. Ускорение реакции в результате ферментативного катализа может быть огромным: например, реакция, катализируемая ферментом оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазой, протекает в 10¹⁷ раз быстрее некатализируемой (период полуреакции декарбоксилирования оротовой кислоты составляет 78 миллионов лет без фермента и 18 миллисекунд с участием фермента). Молекулы, которые присоединяются к ферменту и изменяются в результате реакции, называются субстратами.

Хотя ферменты обычно состоят из сотен аминокислотных остатков, только небольшая часть из них взаимодействует с субстратом, и ещё меньшее количество — в среднем 3—4 аминокислотных остатка, часто расположенные далеко друг от друга в первичной структуре — напрямую участвуют в катализе. Часть молекулы фермента, которая обеспечивает связывание субстрата и катализ, называется активным центром.

Международный союз биохимии и молекулярной биологии в 1992 году предложил окончательный вариант иерархической номенклатуры ферментов, основанной на типе катализируемых ими реакций. Согласно этой номенклатуре названия ферментов всегда должны иметь окончание -аза и образовываться от названий катализируемых реакций и их субстратов. Каждому ферменту приписывается индивидуальный код, по которому легко определить его положение в иерархии ферментов. По типу катализируемых реакций все ферменты делят на 6 классов:

КФ 1: Оксидоредуктазы, катализирующие окислительно-восстановительные реакции;

КФ 2: Трансферазы, катализирующие перенос химических групп с одной молекулы субстрата на другую;

КФ 3: Гидролазы, катализирующие гидролиз химических связей;

КФ 4: Лиазы, катализирующие разрыв химических связей без гидролиза с образованием двойной связи в одном из продуктов;

КФ 5: Изомеразы, катализирующие структурные или геометрические изменения в молекуле субстрата;

КФ 6: Лигазы, катализирующие образование химических связей между субстратами за счёт гидролиза дифосфатной связи АТФ или сходного трифосфата.

2.2 Генетический риск и биобезопасность при получении ГМО.

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.

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.

2.3 Биобезопасность в клеточных, тканевых и органогенных технологиях получения ГМО.

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

Биобезопасность в клеточных, тканевых и органных биотехнологиях. Манипуляции с растительными и животными клетками и их органеллами, а также с одноклеточными микроорганизмами осуществляют в научных лабораториях медицинской, пищевой и других видов промышленности, и они основаны на фундаментальных исследованиях биологии и цитологии клеток и тканей, открытии явления тотипотентности клеток (способность регенерировать взрослые организмы), а также на выявлении способности соматических клеток к слиянию (соматическая гибридизация), обмену органеллами, дифференциации и дедифференциации. В клеточных технологиях для получения клеток с измененной наследственностью используют спонтанный и направленный мутагенез. Это главная причина генетической гетерогенности клеток одного и того же генотипа. Поэтому в клеточных биотехнологиях необходим постоянный мониторинг за спектром соматической variability, появлением мутантов с положительными и отрицательными признаками. В большинстве случаев соматическая variability не выходит за рамки положительных или слабых отрицательных изменений и позволяет получать материал для селекции растений с улучшенными или исходными свойствами в границах обеспечения биобезопасности.

Главное, чего добиваются клеточные биотехнологи, — получение комплексно устойчивых генотипов сельскохозяйственных растений. Распространение в производстве неустойчивых к вредным организмам и абиотическим факторам среды сортов и гибридов сельскохозяйственных

растений может привести к большим потерям урожая. В этой связи лабораторный и полевой контроль за полученными клеточными регенерантами растений является крайне важным с точки зрения экологической безопасности при использовании в производстве. Система государственного испытания и регистрации сортов и гибридов при строгом соблюдении утвержденных методов и критериев оценки позволяет значительно ограничить подобную опасность.

Технология получения продуктов вторичного метаболизма в биореакторах на основе культуры клеток и суспензий дает возможность непрерывно автоматически контролировать и своевременно выявлять различные отклонения от нормы по основным параметрам и качеству получаемой продукции, не допускать возникновения опасных нарушений в любом звене технологического процесса. Биотехнологи, работающие с клетками (их суспензиями) и тканями животных, отмечают случаи накопления токсичных веществ в последних при нарушении техники и технологии их хранения и использования.

Таким образом, в растениеводстве в целом складывается безопасная ситуация при использовании клеточных биотехнологий в селекции, получении продуктов вторичного метаболизма для фармацевтической и пищевой промышленности. В то же время в животноводстве требуется проводить более жесткий контроль за производством и качеством продукции, получаемой на основе клеточных и тканевых технологий.

2.4 Методы оценки продуктов, содержащих ГМО на биобезопасность

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

Государственный контроль и регулирование генно-инженерной деятельности и использования генетически модифицированных организмов (ГМО) и полученных из них продуктов. Во всех государствах с развитой генно-инженерной инфраструктурой в науке и производстве в настоящее время приняты законы и другие государственные акты, создающие нормативно-правовую базу для современной биотехнологии и биоинженерии. В большинстве своем национальные законы различных государств адаптированы по главным принципиальным вопросам к международным требованиям и правилам в этой области науки и производства, что зафиксировано в документах ООН, ФАО, ЮНЕСКО и других международных организаций соответствующего профиля. В России Федеральный Закон «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» принят Государственной думой и подписан президентом РСФСР 5 июня 1996 года за № 86-ФЗ (16). Закон является рамочным, прямого и непрямого действия, и регулирует отношения в сфере природопользования, охраны окружающей среды и обеспечения экологической безопасности при генно-инженерной деятельности с биологическими объектами, за исключением человека, его клеток и тканей, которые регулируются специальным законодательством. В законе отражены задачи и основные направления государственного регулирования, а также системы безопасности в области генно-инженерной деятельности в России.

По этому закону государство обязано определять: основные направления деятельности федеральных органов государственной власти, органов государственной власти субъектов РФ, органов местного самоуправления, юридических лиц и граждан (физических лиц) в области генно-инженерной деятельности; основные положения правового регулирования отношений, возникающих в области генно-инженерной деятельности; механизмы, обеспечивающие безопасность граждан и окружающей среды в процессе осуществления генно-инженерной деятельности и использования ее результатов; правовые основы международного сотрудничества РФ в области генно-инженерной деятельности; а также создавать условия для развития приоритетных направлений в этой области исследований. Для реализации перечисленных задач закон предусматривает принятие федеральных и региональных программ в области развития генно-инженерной деятельности.

В законе четко сформулированы основные положения системы безопасности в области генно-инженерной деятельности и определены четыре уровня риска, соответствующие работам, которые представляют опасность для здоровья человека и сопоставимы с риском при следующих экспериментах: первый уровень риска — с непатогенными микроорганизмами; второй уровень риска — с микроорганизмами, потенциально способными к передаче инфекции; третий и четвертый уровни риска — с возбудителями особо опасных инфекций (в условиях открытых систем).

Закон содержит требования к лицам, осуществляющим генно-инженерную деятельность, главными из которых являются: обязательная профессиональная подготовка и состояние здоровья исследователей; правила безопасности; наличие соответствующих помещений, отвечающих тем же правилам; обязательное получение разрешения (лицензий) при работах, соответствующих третьему и четвертому уровням риска. В законе определены требования по стандартизации и сертификации генно-инженерной продукции, которая должна соответствовать требованиям экологической безопасности, санитарным нормам, фармакопейным статьям, обязательным требованиям государственных стандартов Российской Федерации. Продукция и услуги, соответственно полученные и предоставленные с применением ГМО, должны иметь сертификат качества и знак соответствия. Закон определяет ответственность юридических лиц и граждан (физических лиц), осуществляющих генно-инженерную деятельность, в соответствии с законодательством Российской Федерации.

Финансирование генно-инженерной деятельности и ее безопасности, согласно закону, осуществляется в установленном порядке за счет средств соответствующих бюджетов, целевых средств организаций и фондов, а также иных источников, не запрещенных законодательством Российской Федерации. «Российская Федерация, — указано в законе, — заключает международные договоры в целях дальнейшего развития и укрепления международного сотрудничества в области генно-инженерной деятельности.

На основании Федерального Закона «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» правительство Российской Федерации приняло ряд постановлений, обеспечивающих его реализацию (17, 18). При этом предусматривается создание Межведомственной комиссии по проблемам генно-инженерной деятельности для контроля за выполнением закона и постановлений правительства.

Правительство Российской Федерации постановлением № 120 от 16 февраля 2001 года утвердило положение «О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов», предназначенных для первого на территории Российской Федерации выпуска в окружающую среду, промышленного использования или импорта (17). Регистрацию ГМО и ведение сводного государственного реестра правительство возложило на Министерство промышленности, науки и технологий (Минпромнауки) РФ. Биобезопасность, применительно к указанному положению, означает отсутствие фактического или прогнозируемого нежелательного воздействия на окружающую среду модифицированных организмов по сравнению с исходными немодифицированными формами. Срок действия свидетельства (5 лет со дня даты включения ГМО в реестр) может быть продлен по заявлению его владельца на следующие 5 лет. При появлении в период срока действия свидетельства новых научно обоснованных данных о биобезопасности ГМО Минпромнауки РФ может по представлению экспертного совета принять решение о перерегистрации без проведения экспертизы; в случае выявления негативного воздействия ГМО на окружающую среду, подтвержденного экспертизой, регистрация может быть аннулирована.

В соответствии с этим постановлением Минпромнауки РФ приказом № 264 от 10 июля 2001 года был создан Экспертный совет по вопросам биобезопасности и утверждено положение, согласно которому этот совет является постоянно действующим органом, обеспечивающим объективность и надлежащее качество проверки представляемых заявителями сведений о биобезопасности генно-инженерно-модифицированных организмов. Экспертный совет организует и проводит экспертизу представленных заявителями в Минпромнауки РФ сведений, дает, по согласованию с Межведомственной комиссией по проблемам генно-инженерной деятельности, заключение о биобезопасности модифицированных организмов и возможности их государственной регистрации либо об отказе в такой регистрации или аннулировании государственной регистрации и представляет его в установленном порядке в Департамент науки о жизни и земле Минпромнауки РФ. Экспертный совет решает и другие важные вопросы, связанные с оценкой биобезопасности модифицированных организмов. Состав Экспертного совета формируется из числа ведущих ученых и высококвалифицированных специалистов в области генно-инженерной деятельности.

Стандартизация в биотехнологии и биоинженерии. Обязательным требованием для производства и реализации всех товаров в стране должна быть их стандартизация. Госстандарт России предложил создать федеральную программу «Проблемы производства и реализации продуктов питания, полученных из генно-модифицированных источников пищи», одной из главных задач которой будет нормативное и нормативно-методологическое обеспечение качества и генетической безопасности генно-модифицированных продуктов питания и продовольственного сырья. Для этого должны быть проведены соответствующие научные разработки и стандартизация документов, регламентирующих их производство, методы испытания, хранения и реализацию.

Основным приоритетным направлением научных исследований в области нормативного обеспечения Госстандарт России считает разработку «Концепции стандартизации генно-модифицированных продуктов». При этом необходимо внести изменения в действующие нормативные документы на пищевую продукцию, продовольственное сырье и

методы испытания в части включения дополнительных требований по генетической чистоте, нормам использования и методам испытания, идентификации и маркировке генно-модифицированных продуктов питания, а также на пороговые уровни потребления последних в качестве продуктов питания человека. Перед наукой ставятся также задачи по разработке и совершенствованию правил и порядка оценки соответствия генетически модифицированных продуктов питания требованиям генетической безопасности, а также нормативных документов по государственному контролю и надзору за производством, хранением, реализацией и обращением таких продуктов.

Россия, к сожалению, очень отстала в развитии биотехнологии и биоинженерии. В нашей стране до сих пор не зарегистрировано ни одного отечественного генно-модифицированного сорта или гибрида какой-либо сельскохозяйственной культуры. Создалась реальная опасность длительного отставания России в XXI веке в области биоинженерии от мирового уровня (4-7). По этому поводу нами направлено специальное письмо президенту страны (7). С целью быстрого преодоления этого отставания в этом письме предложено Минпромнауки РФ разработать «Концепцию развития биотехнологии в России», реализация которой должна быть направлена на быстрое преодоление отставания России в этой важной области науки. В концепции необходимо предусмотреть решение следующих важнейших задач:

- создание и реализация утвержденной федеральным законом научной программы по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности;
- признание важнейшим приоритетом XXI века ядерной биологии, стратегической части биотехнологии;
- приоритетное финансовое обеспечение развития биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности;
- восстановление деятельности ранее созданных в стране биотехнологических центров;
- оснащение биоинженерных научных учреждений и лабораторий современным научным оборудованием;
- привлечение для выполнения федеральной программы по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности молодых талантливых исследователей, создание им оптимальных производственных, жилищных и финансовых условий;
- обеспечение постоянного объективного информирования всего населения страны о содержании и результатах исследований по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности;
- совершенствование законодательной и другой нормативно-правовой базы по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности;
- создание в стране специального Федерального совета по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности.

Наиболее острой и экономически важной для России является проблема вывода из глубокого экономического кризиса продовольственного цеха страны — сельского хозяйства, без чего

практическое использование достижений биотехнологии невозможно. Вопросы биобезопасности могут и должны быть обеспечены на основе углубленных научных исследований и строжайшего выполнения законов, правительственных постановлений и высокой ответственности ученых и специалистов, а также практиков, работающих в области биотехнологии и биоинженерии. В решении этих задач очень важным является развитие международного сотрудничества на уровне государств, научных организаций и ученых. Выполнение совместных международных проектов позволит нашей стране преодолеть отставание и стать в этой области науки и производства в ряд с высокоразвитыми государствами мира.

2.5 Контроль и регулирование деятельности при получении и использовании ГМО.

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

При проведении Госсанэпиднадзора за пищевой продукцией, полученной из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего ГМ аналоги, при производстве, хранении, транспортировании и реализации пищевой продукции проверяется наличие санитарно-эпидемиологического заключения, оформленного в установленном порядке на конкретный вид продукции.

При проведении экспертизы пищевой продукции, полученной из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего ГМ аналоги, выборочно проводится отбор проб на лабораторные исследования с целью выявления наличия или отсутствия ГМИ пищи.

Лабораторный контроль проводится только в отношении пищевой продукции, содержащей белок или ДНК.

В случае, когда пищевая продукция не содержит белок или ДНК-экспертиза на наличие ГМИ пищи проводится на основе представленной документации.

В случае обнаружения в исследуемом образце пищевой продукции ГМИ пищи незарегистрированного в Федеральном Реестре Российской Федерации, а также нарушений правил маркировки пищевой продукции, полученной из/или с использованием ГМИ пищи - органы и учреждения Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека осуществляют внеплановые проверки по контролю данного вида пищевой продукции в соответствии с законодательством Российской Федерации (Федеральные законы: № 134-ФЗ от 08.08.01, № 52-ФЗ от 30.03.99, № 29-ФЗ от 02.01.00).

Применение биотехнологий в сфере производства пищи при условии контролировании генно-инженерной деятельности является исключительно перспективным направлением. Мировое производство генно-инженерно-модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения, начатое в 1996 г., выросло к 2013 г. в 100 раз, суммарная стоимость рынка семян ГМО с учетом стоимости конечных продуктов составила 160 млрд долларов США. С целью реализации прав потребителей на объективную информацию о производстве и ингредиентном составе продукта в большинстве стран мирового сообщества пищевые продукты из ГМО подлежат государственному контролю и обязательной маркировке. В связи с этим возникла необходимость разработки соответствующих методов контроля, которая началась одновременно с

выходом на мировой продовольственный рынок первого продукта, полученного с помощью методов генной инженерии.

В качестве мишени для выявления продукции, произведенной из ГМО, могут служить рекомбинантная ДНК, экспрессированный белок, определяющий заданный признак, и вещества, синтезированные в растении *de novo* или количество которых изменено в результате генетической трансформации. В последнем случае для выявления генетических модификаций могут применяться химические методы анализа: хроматография, спектрофотометрия, спектрофлуориметрия. В качестве примера можно привести генетически модифицированные линии сои G94-1, G94-19, G168, сравнительный анализ жирнокислотного состава которых показал увеличение содержания олеиновой кислоты до 83,8% по сравнению с традиционным аналогом, содержащим 23,1%. Применение в данном случае хроматографических методов позволяет выявить генетическую модификацию даже в таких продуктах, где ДНК и белок отсутствуют, например, в рафинированном соевом масле.

Методы определения экспрессированного белка (иммуноферментный анализ) имеют целый ряд преимуществ, которые связаны с достаточно простым форматом и относительно низкой стоимостью анализа по сравнению с другими методами. В то же время они имеют ограничения для широкого использования при проведении мониторинга за оборотом пищевой продукции, произведенной из ГМО. Так, в случае анализа пищевых продуктов, при производстве которых исходное сырье подвергается значительной технологической обработке (высокая температура, кислая среда, ферментативная обработка и др.), иммунологический анализ может давать нестабильные или плохо воспроизводимые результаты из-за денатурации белка. При исследовании колбасных и кондитерских изделий, продуктов детского питания, пищевых и биологически активных добавок к пище иммуноферментный анализ не приемлем. Следует также подчеркнуть, что возможность определения в продуктах модифицированного белка лимитируется уровнем его экспрессии в растении. В большинстве генетически модифицированных культур, представленных на мировом продовольственном рынке, в частях растений, употребляемых в пищу, уровень модифицированного белка ниже 0,06%. Кроме того, тесты, основанные на идентификации модифицированного белка, не являются специфичными для конкретных трансформационных событий.

В качестве наиболее предпочтительных для контроля оборота пищевой продукции из ГМО рассматриваются методы определения рекомбинантной ДНК. Первичная структура ДНК одинакова во всех клетках организма, поэтому любая часть растения может быть использована для идентификации ГМО. Методы, основанные на определении рекомбинантной ДНК, более чувствительны, чем методы, основанные на определении белка, они применимы как для скрининговых анализов, так и для определения конкретного трансформационного события, и легко переводятся в количественный формат.

Для идентификации и количественного определения рекомбинантной ДНК наиболее широко применяются методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Критическим и во многом определяющим исход анализа этапом ПЦР является выделение ДНК. При переходе от сырого необработанного сырья к пищевой продукции, подвергшейся технологической или кулинарной обработке возникает проблема выделения ДНК соответствующего качества в необходимом для проведения анализа количестве. Хотя ДНК более стабильна по сравнению с

белком, она также может разрушаться под действием высоких температур, облучения ультрафиолетовым светом, обработки кислотами и ферментами, специфично оказывающими воздействие на ДНК. Так, даже в случае выделения достаточно большого количества ДНК амплификация может не пройти из-за присутствия в продукте только очень коротких нитей ДНК. Критический размер ДНК-фрагментов для выявления методом ПЦР составляет 400 пар нуклеотидов. Установлено, что ДНК не определяется в пищевых продуктах, подвергшихся значительной технологической обработке: гидролизованные растительные белки, рафинированные масла, крахмалы высокой степени очистки, соусы, сахар и этиловый спирт, которые потенциально могут быть произведены из генно-инженерно-модифицированных растений. Кроме того, при выборе метода выделения ДНК следует учитывать, что вместе с ДНК из пищевых продуктов могут выделяться вещества (белок, жиры, полисахариды, полифенолы и др.), способные ингибировать ПЦР, что создает трудности для проведения анализа.

В настоящее время в исследованиях по определению рекомбинантной ДНК в пищевых продуктах и кормах наиболее широко используются два метода выделения ДНК: основанный на классическом протоколе для растительных тканей метод "СТАВ", и сорбционный метод, включающий стадию осаждения на сорбент, чаще всего диоксид кремния или магниты. Эти методы сопоставимы и стандартизованы (валидированы) для проведения исследований на наличие и количественное определение рекомбинантной ДНК.

Типичная генетическая конструкция, используемая в биотехнологии растений, содержит смысловой, или целевой, ген, определяющий новый признак растения, а также регуляторные элементы функционирования этого гена, причем основными среди них являются промотор и терминатор. Часто используются маркерные гены, которые в большинстве случаев удаляются в ходе трансформации и отсутствуют в геноме генетически модифицированного растения. Применение при создании трансгенных растений одних и тех же регуляторных последовательностей и маркерных генов дает возможность проведения скрининговых анализов. Так, промотор 35S вируса мозаики цветной капусты и терминатор NOS из *Agrobacterium tumefaciens* использованы одновременно или по отдельности при создании всех трансгенных культур, присутствующих на мировом продовольственном рынке в настоящее время. Исключение составляют несколько линий ГМО с измененным жирнокислотным составом, которые идентифицируются при помощи химических и биохимических методов. Среди ГМО, композиционно эквивалентных традиционному аналогу, соя, устойчивая к глифосату, трансформационное событие MON 89788, впервые вышедшая на рынок в 2007 г. в США, также не содержит вышеупомянутых генетических регуляторных последовательностей [30]. Для определения этой линии сои разработаны методы, выявляющие промотор 35S вируса мозаики норичника, который был использован при данной трансформации растения. Возможность проведения скрининговых анализов является одним из наиболее убедительных преимуществ методов, основанных на определении рекомбинантной ДНК по сравнению с методами, основанными на определении экспрессированного белка. Методы, позволяющие идентифицировать промотор 35S и терминатор NOS, унифицированы и признаны в качестве стандартных в странах с обязательной маркировкой пищевой продукции из ГМО, в том числе в Российской Федерации [1-3, 5]. Для идентификации целевого гена в продукте используются праймеры, комплементарные участку этого гена. Данная категория методов более специфична, чем скрининговые. Один и тот же ген может применяться для создания целой серии ГМ культур,

например, ген *pat*, кодирующий синтез фермента фосфинотрицинацетилтрансферазы, который ацетирует свободную NH₂-группу глюфосината аммония и тем самым препятствует накоплению аммиака, присутствует в геноме всех ГМ растений, устойчивых к глюфосинату аммония [14]. Другой ген *Cry1A(b)* из *B. thuringiensis*, кодирующий синтез инсектицида, был применен при создании нескольких десятков видов генетически модифицированной кукурузы, в том числе линий MON 810 и Bt 11, устойчивых к стеблевому мотыльку и разрешенных для использования в пищевой промышленности и реализации населению в Российской Федерации .

Для идентификации встроенной в геном растения генетической конструкции используются праймеры, специфичные для этой конструкции. Выявление рекомбинантной ДНК этими методами однозначно говорит об использовании генно-инженерных технологий при производстве продукта. Однако следует учитывать, что одна и та же конструкция может быть использована для трансформации разных растений. Так, генетические конструкции pV-ZMBKO7 и pVZMGT 10 присутствуют в геноме кукурузы линии MON 809 (каждая по одной копии), MON 810 (1 копия первой конструкции), MON 832 (1 копия второй конструкции) .

Выявление конкретного трансформационного события предполагает амплификацию последовательности ДНК на пограничных участках генетической конструкции и генома растения, данный анализ наиболее специфичен, он однозначно определяет линию генетически модифицированного растения.

Визуализация результатов амплификации целевой ДНК при анализе пищевой продукции на наличие ГМО чаще всего осуществляется при помощи электрофоретического разделения ампликонов в агарозном геле .

Весьма перспективно использование ДНК-технологий с применением биологических микрочипов. Эти технологии обладают большим потенциалом для скрининга значительного количества ГМО растительного происхождения в одном анализе.

В основе методов лежит принцип комплементарности и специфичности между нитями ДНК. Короткие последовательности одиночной ДНК (зонды), комплементарные целевой ДНК, фиксируются на очень маленькой поверхности стекла. В случае присутствия в анализируемой пробе продукта целевой ДНК при нанесении на стекло ДНК из этой пробы идет связывание ее с фиксированными на стекле зондами. Этот процесс проходит на микроскопическом уровне с многими тысячами целевых ДНК на каждом стекле. Зондовые ДНК могут быть комплементарны участкам ДНК в области регуляторных последовательностей (промотор 35S или терминатор NOS), маркерных генов, целевых генов и пограничных участков между встроенной генетической конструкцией и геномом растения. Все это потенциально позволяет проводить как скрининговые анализы, так и идентификацию конкретных трансформационных событий .

Для увеличения чувствительности метода целевая ДНК может быть амплифицирована с применением мультиплексной ПЦР до связывания с зондом. Результаты считывали с помощью специальных устройств. К преимуществам этого метода следует отнести возможность качественного анализа большого числа ГМО одновременно, высокую чувствительность в случае предварительного проведения ПЦР, потенциальное снижение стоимости из-за мультиплексности одного анализа, потенциальной возможности автоматизации.

В настоящее время предложено несколько различных протоколов ген-чип-технологий для определения ГМО растительного происхождения .

В Российской Федерации разработан, доведен до уровня национального стандарта и применяется на практике метод идентификации ГМО растительного происхождения с применением ферментного анализа на биологическом микрочипе, включающий проведение асимметричной мультипраймерной ПЦР, гибридизацию и ферментный анализ продуктов амплификации на биологическом микрочипе с последующей детекцией на аппаратнопрограммном комплексе "Дегмиген-001". Высокая чувствительность метода позволяет улавливать содержание ГМО растительного происхождения в исследуемых пищевых продуктах от 0,1% .

Количественное определение ГМО растительного происхождения в пищевых продуктах в большинстве стран мира осуществляется с использованием ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени. Данный метод в настоящее время является признанным стандартом для проведения такого рода анализов. Для выявления продуктов амплификации применяют TagMan-зонды, в состав которых входит флуоресцентная метка и гаситель флуоресценции. В ходе ПЦР происходит разъединение флуоресцентной метки (красителя) и гасителя, что приводит к появлению свечения, интенсивность которого пропорциональна количеству рекомбинантной ДНК в продукте и измеряется в виде графика зависимости флуоресценции от количества циклов . В качестве красителей обычно используют карбоксифлуоресцеин (FAM), карбокси-X-родамин (ROX), а в качестве гасителя - тетраметилкарбоксиродамин (TAMRA), максимум поглощения для которых составляет соответственно 492, 580 и 545 нм, а максимум флуоресценции - 520, 605, 576 нм.

Количественный анализ ГМО предполагает проведение двух амплификаций одновременно: для рекомбинантной ДНК и ДНК, характерной для конкретного растения. Возможность проведения мультиплексной ПЦР с применением TagManзондов обусловлена различием длин волн максимума эмиссии красителей. Результат анализа выражается соотношением (в %) количества двух целевых последовательностей: рекомбинантной ДНК и эндогенной ДНК, присущей растению. Количество рекомбинантной ДНК рассчитывают с использованием калибровочной прямой, построенной в логарифмических координатах, при помощи сертифицированных стандартных образцов состава .

Особенностью этого метода является определение продуктов ПЦР непосредственно в ходе реакции. Метод отличается высокой чувствительностью и специфичностью, отсутствием контаминации продуктами ПЦР (анализ идет в закрытой пробирке, отсутствует стадия электрофореза), значительной экономией лабораторной площади и меньшей продолжительностью анализа.

Предел количественного определения, относительное стандартное отклонение и погрешность метода определяются в межлабораторных испытаниях для каждого трансформационного события при выходе ГМО на продовольственный рынок .

В Российской Федерации в соответствии с Федеральным законом от 25.10.2007 г. № 234-ФЗ пищевая продукция, содержащая более 0,9% ГМО, подлежит обязательному этикетированию. Это послужило основанием для внедрения в практику государственного надзора и производственного контроля методов количественного определения рекомбинантной ДНК для

всех разрешенных в Российской Федерации линий ГМО. Результаты межлабораторных испытаний, проведенных в аккредитованных в установленном порядке лабораториях Европейского союза и Роспотребнадзора, показали, что предел количественного определения этих методов равен 0,1%, а погрешность и относительное стандартное отклонение не превышают 25% для каждого разрешенного для применения в пищевой промышленности и реализации населению в Российской Федерации ГМО растительного происхождения. Эти результаты свидетельствуют о соответствии требованиям, предъявляемым к методам количественного определения рекомбинантной ДНК в пищевых продуктах. В качестве примера представлены результаты испытаний 4 линий генетически модифицированной кукурузы, проведенные в условиях повторяемости (см. таблицу). Значение систематической погрешности, относительного стандартного отклонения и стандартного отклонения повторяемости соответствует требованиям ГОСТ Р ИСО 5725-4-2002.

2.6 Методы генной инженерии

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

В конце 70-х годов в биохимии был разработан ряд новых методологических подходов, ознаменовавших начало эры генетической инженерии. Методы рекомбинантных ДНК, перевернувшие наши представления о возможностях биотехнологии в сфере удовлетворения потребностей человека, позволяют направленно конструировать генетический материал, вводить его в живые клетки и с помощью последних реализовать эту генетическую информацию. Кроме того, благодаря технологии рекомбинантных ДНК значительно ускорились темпы расширения и развития наших знаний о функциях ДНК, организации генов, регуляции их экспрессии, первичной структуре белков, что в свою очередь создает основу для понимания природы различных заболеваний и борьбы с ними. Возможность введения любых сегментов ДНК в клетки позволяет создавать промышленные микроорганизмы, способные синтезировать ценнейшие белки. В этом разделе мы уделим основное внимание применению генетической инженерии в промышленности и использованию в

Выделение нового рекомбинантного гена заканчивается попытками получения его полноценной экспрессии в искусственных генетических системах. Экспрессия эукариотических генов в бактериях происходит неэффективно из-за образования телец включения и отсутствия необходимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных полипептидных цепей. Поэтому используются культивируемые клетки животных и растений, в геном которых рекомбинантные гены вводятся с помощью трансфекции.

Эффективный синтез рекомбинантных белков зависит не только от используемых клеточных линий, но и от конструкции экспрессирующего вектора, и от метода введения рекомбинантных ДНК в эукариотические клетки. Для повышения уровня экспрессии рекомбинантных генов, стабильно интегрированных в геном культивируемых клеток, разработаны методы их селективной амплификации. С использованием одного из таких методов получены мутантные сублинии клеток яичников китайских хомячков СНО, в которых амплификация происходит в присутствии селектирующего агента, например, метотрексата. Другие системы амплификации основаны на подавлении экспрессии жизненно важных ферментов, например, глутаминсинтетазы

или аденозиндезаминазы, под действием специфических ингибиторов: метионинсульфоксимины или 2'- дезоксигоформина соответственно.

Для получения рекомбинантных белков, кроме метода стабильно трансфицированных линий клеток, используют еще два подхода. С целью наработки небольшого количества рекомбинантных белков и контроля функциональной целостности генно-инженерных конструкций применяют временно экспрессирующиеся векторы, которые обладают способностью к репликации в культивируемых клетках COS во внехромосомном состоянии. В этом случае источником рекомбинантных белков являются супернатанты клеток. При другом подходе рекомбинантные белки синтезируют в культивируемых клетках насекомых после их заражения векторами на основе генома бакуловирусов. Последний подход допускает стабильную экспрессию многих рекомбинантных генов, продукты которых могут находиться как внутри клеток, так и в ассоциированном с поверхностью клеток состоянии, или они могут секретироваться в культуральную жидкость.

Швейцарскими исследователями (С. Гайссе с соавт., 1996 г.) было проведено сравнительное изучение эффективности экспрессии гена цитокина человека - фактора, ингибирующего лейкозы (huLIF - leukemia inhibitory factor) в разных эукариотических системах. Фактор huLIF представляет собой белок среднего размера, полипептидная цепь которого содержит несколько потенциальных сайтов N-гликозилирования и в процессе фолдинга образует три дисульфидные связи.

Если вводить ДНК в клетки многоклеточного организма, то результатом трансформации будет изменение свойств лишь небольшого числа клеток, которые приобрели новый ген или гены. Следовательно, для изменения свойств всего организма следует изменять геном половых клеток, которые перенесут новые свойства потомкам. У растений и животных целесообразно изменять такие свойства, как скорость роста, устойчивость к заболеваниям, способность адаптироваться к новым внешним условиям. В качестве маркеров в этом случае можно использовать полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (AFLP), анализ мини-сателлитов, анализ микросателлитной ДНК (SSR), гибридизацию и т.д.

Разработаны способы введения генов в эмбриональные клетки млекопитающих, мух и некоторых растений. От работы с довольно крупными яйцами амфибий перешли к изучению яйцеклеток и эмбрионов мыши, которая представляет наиболее изученное в генетическом отношении млекопитающее.

Микроинъекцию клонированных генов производят в один или оба пронуклеуса только что оплодотворенной яйцеклетки мыши. Чаще выбирают мужской пронуклеус, привнесенный сперматозоидом, так как его размеры больше. После инъекции яйцеклетку немедленно имплантируют в яйцевод приемной матери, или дают возможность развиваться в культуре до стадии бластоцисты, после чего имплантируют в матку.

Можно вводить ген в сперматозоиды и затем проводить ими оплодотворение. Таким образом были инъецированы гены интерферона и инсулина человека, ген β -глобина кролика, ген тимидинкиназы вируса простого герпеса и кДНК вируса лейкемии мышей. Число молекул, вводимое за одну инъекцию, колеблется от 100 до 300 000, а их размер - от 5 до 50 кб. Выживает

обычно 10 - 30% яйцеклеток, а доля мышей, родившихся из трансформированных яйцеклеток варьирует от нескольких до 40%. Таким образом, реальная эффективность составляет около 10%.

Интеграция чужеродных генов неспецифична по отношению к хромосомам, а число копий чужеродного гена может различаться от нескольких штук до 100 и более. Эти гены образуют группу тандемных повторов, объединенных по типу "голова к хвосту". Чужеродная ДНК после инъекции была обнаружена как в соматических, так и в половых клетках. Это означает, что интеграция проходит на самых ранних стадиях развития зиготы.

В нескольких случаях гетерологичная ДНК наследовалась в трех поколениях мышей, что свидетельствует о стабильной интеграции. Интегрировавшая в половые клетки ДНК передается как менделевский ген. Установлено, что уровень экспрессии чужеродного гена зависит от места интеграции ДНК с хромосомами и от степени ее метилирования, а также от дифференцировки тканей. В некоторых случаях удалось получить тканеспецифическую экспрессию. Важно отметить что специфические чужеродные гены можно встраивать в геном клетки таким образом, что они подчиняются нормальным регуляторным сигналам.

В 1981 году Константины и Лэси (Оксфорд) провели инъекцию в яйцеклетки мыши фрагменты хромосомной ДНК кролика длиной 19 килобаз. Эти фрагменты содержали ген β -глобина кролика. Яйцеклетки культивировали до стадии бластоцисты и имплантировали в матку. У 24 мышей, родившихся в результате развития имплантированных яйцеклеток, проведены частичная гепатэктомия. Анализ ДНК из клеток печени показал, что у 9 мышей встречается от 1 до 20 копий на клетку гена β -глобина. После спаривания 4 трансформированных самцов с нормальными самками получили потомство из 18 животных. 6 из них также имели ген β -глобина. Установлено, что интеграция гена в клетки млекопитающих происходит случайным образом и не связана с конкретными областями хромосомы. Ген нестабилен, может быть утрачен или стать неактивным. Вместе с геном необходимо вводить регуляторные последовательности.

2.7 Задачи молекулярной биологии в XXI веке

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 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 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, псирты, моносахара. Эксперимент повторяли много раз. Неперменное 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 биопозза.

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.

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 родственных 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.

В настоящее время идет этап молекулярно-биотехнологической революции. Формально началом можно считать 15 октября 1980 г.

15 октября 1980 г. на Нью-Йорской фондовой бирже произошло знаменательное событие: уже через 20 минут после начала торгов стоимость 1 акции биотехнологической компании Genentech поднялась с 35 до 89 \$. Это был рекордный для того времени скачек цен на акции коммерческого предприятия. К моменту закрытия торгов в этот день, цена одной акции Genentech составляла 71,25 \$, а стоимость всех 528 000 акций была столь баснословно высока, что мелкие инвесторы, собиравшиеся приобрести небольшой пакет акций, не имели никаких шансов.

По-видимому, это был 1-й случай в истории, когда о начале революции возвестил биржевой колокол. В 1980 г., когда фирма Genentech впервые предложила обществу свои акции, это была не большая компания в Калифорнии, в течение 4 лет успешно работавшая над проблемой получения рекомбинантных ДНК. Ученым компании удалось выделить фрагменты гена (последовательности ДНК), кодирующие человеческий инсулин, и перенести их в генетические элементы (клонированные векторы), способные реплицироваться в клетках обычной кишечной палочки (*E. coli*). Эти бактериальные клетки работали как биологические фабрики по производству человеческого инсулина, который после соответствующей очистки мог использоваться как лекарственный препарат для больных диабетом, дающих аллергическую реакцию на свиной инсулин. Еще 10 лет назад такое развитие событий представлялось нереальным, но сегодня это стало вполне привычным.

2.8 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 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, 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 с 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 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.

2.9 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 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 и 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.

2.10 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.

2.11 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.

2.12 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 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.

2.13 Хромосомы: строение и функционирование

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

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, акроцентрические).

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.

2.14 Переработка, передача и изменение генетической информации в ряду поколений

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

Жизнь на Земле чрезвычайно разнообразна. С начала появления жизни на Земле, то есть с течением биологического времени (3,5–3,7 млрд лет) эволюция живых организмов насчитывает огромное количество видов. В настоящее время, по разным оценкам, на Земле существует около 500 тыс. видов растений, из которых 300 тыс. высших. Царство животного мира более разнообразно, чем царство растений. На сегодняшний день описано около 1,5 млн видов представителей животного мира, но очевидно, что это далеко не исчерпывающие сведения.

Все разнообразие видов на Земле классифицируют согласно категориям систематики: царство-тип-подтип-класс-отряд-семейство-род-вид-подвид-разновидность. Наиболее широкая и общая таксономическая единица – это царство. Современная биология выделяет пять царств. Это прокариоты, простейшие, грибы, растения, животные. Все эти таксономические единицы являются результатом исторического процесса в мире живой материи, его эволюции

Жизнь есть качественно новая форма организации материи, основное свойство которой состоит в способности усваивать энергию Солнца за счет процесса фотосинтеза и воспроизводить из неживого живое. Современная биологическая картина мира основывается на том, что мир живого – это колоссальная система высокоорганизованных систем.

Специфика жизненных процессов тесно связана с особым типом их субстрата – чрезвычайно сложными органическими соединениями: белками и нуклеиновыми кислотами. Любой живой организм представляет собой открытую органически целостную систему, в которой происходят сложные взаимодействия и имеют место взаимозависимости отдельных структурных и функциональных компонентов. Последние определяют автономный и самопроизводный характер морфогенетических процессов живых систем и их способность к самоорганизации. Это обеспечивает самосохранение живых систем, их адаптацию к внешней среде. Взаимодействие с внешней средой осуществляется через обменные процессы, в ходе которых происходит сложный синтез и деструкция поступающих в организм веществ. Молекулярная биология нашего времени выявила поразительное единство живой материи на всех уровнях ее развития – от простейших микроорганизмов до человека. Это единство представлено двумя основными классами молекул – нуклеиновыми кислотами и белками. Именно их взаимодействие и составляет основу жизни.

Почти все живые организмы состоят из клеток (кроме вирусов и фагов). По этому признаку организмы делятся на доклеточные и клеточные.

Доклеточные формы жизни – вирусы – занимают промежуточное положение между живым и неживым. Они сочетают в себе свойства и живого, и неживого. Вирусы существуют в двух формах – в форме вириона (покоящийся, внеклеточный вирус, который в «спячке» ведет себя как неживое вещество) и в форме репродуцирующегося внутриклеточного вируса, который ведет себя как живое вещество. Вирусы были открыты в 1982 г. русским микробиологом Д. И. Ивановским. Вирусы состоят из белковых молекул и нуклеиновых кислот и не имеют собственного обмена веществ. Они существенно отличаются от остальных форм жизни. Иногда их даже выделяют в отдельное царство живых организмов – *Vira*.

Все клеточные живые организмы делятся на одноклеточные и многоклеточные. Одноклеточные организмы (бактерии, простейшие, некоторые водоросли и грибы) состоят лишь из одной клетки. Одноклеточные в свою очередь делятся на прокариотов (клетка которых лишена ядра) и эукариотов (клетка которых имеет ядро). Многоклеточные организмы состоят из множества клеток. Так, например, организм человека состоит из 10¹⁴ клеток. Клетки многоклеточного организма выполняют различные функции – как специализированные, так и обще клеточные. Многоклеточный живой организм обладает функциями и свойствами, которые не сводятся к функциям отдельных клеток и даже их суммы.

Современная наука о клетке – цитология – представляет клетку как чрезвычайно сложноорганизованную биологическую систему. Клетка состоит из оболочки (мембраны),

наполненной протоплазмой. В протоплазме находятся органоиды, выполняющие определенные специализированные функции (обмен веществ, дыхание, синтез белка и т. д.), и ядро (или нуклеотид) с генетическим аппаратом.

Элементы и компоненты биологических систем выражают дискретную составляющую живого. Живые объекты в общей системе живых организмов в природе относительно обособлены один от другого (особи, популяции, виды). Каждая особь одноклеточного или многоклеточного организма состоит из клеток. Клетка состоит из органелл. Органеллы в свою очередь представлены отдельными высокомолекулярными органическими веществами. Вследствие такой чрезвычайной сложности живых систем в природе не может быть двух одинаковых особей, популяций или видов, хотя в целом они могут быть очень близкими.

Биологические системы отличаются высоким уровнем целостности, основанной на структурах и типах связей между ее элементами. Это открытые системы, которым свойствен обмен веществом и энергией с окружающей средой. В процессе органической эволюции биологическим системам свойственны усложнение, снижение энтропии и рост самоорганизации.

2.15 Сохранение и защита генетической информации

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

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.

2.16 Развитие многоклеточного организма

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

Онтогенез, или процесс индивидуального развития особи, характерен для всех живых существ. Он означает закономерную и последовательную смену событий, определяющую развитие и существование организма от зарождения до конца жизни.

Обычно под онтогенезом понимают процесс развития многоклеточного организма (образующегося в результате полового размножения) от момента формирования зиготы до естественной смерти особи.

Понятие «онтогенез», безусловно, применимо и к одноклеточным организмам. Действительно, при делении, например, инфузории образуются дочерние клетки-особи, которые сначала существенно отличаются от материнского организма. Они мельче, лишены ряда органелл, формирующихся лишь течением времени, в процессе их индивидуального существования. Достигнув зрелого состояния, дочерние организмы дадут (претерпев деление) начало новому поколению.

При такой смене поколений не происходит естественной смерти особей, однако можно говорить об их онтогенезе — от деления до деления этих одноклеточных организмов.

Применимо данное понятие и к организмам, размножающимся бесполом путем. Например, при почковании у гидры процесс индивидуального развития особи начинается с момента возникновения почки на материнском организме до естественной смерти дочерней особи.

Наиболее подробно изучен онтогенез у многоклеточных животных, на примере которых мы и рассмотрим основные этапы и закономерности индивидуального развития.

При половом размножении у животных онтогенез начинается с момента формирования зиготы - клетки, образующейся в результате слияния яйцеклетки и сперматозоида. За счет митотического деления зиготы и последующих поколений клеток образуется многоклеточный организм, состоящий из большого числа клеток разных типов, различных тканей и органов. На ранних этапах онтогенеза происходит интенсивный рост (увеличение размеров и массы) развивающейся особи, дифференцировка и морфогенез. Дифференцировка, (возникновение различий между однородными клетками и тканями) лежит в основе морфогенеза, т. е. процесса формирования различных структур в развивающемся организме.

2.17 Иммуитет. Некоторые отклонения в работе иммунной системы

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

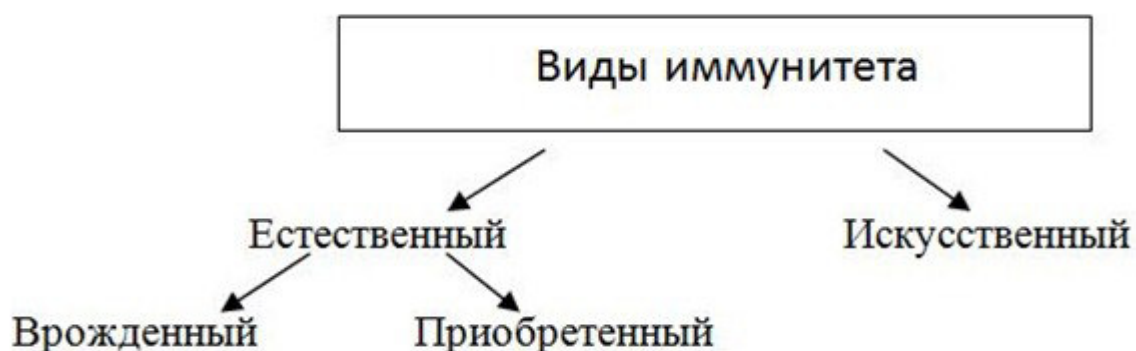
Иммуитет — способность организма к невосприимчивости и сопротивлению чужеродным веществам различного происхождения. Эта сложная система защиты создавалась и менялась одновременно с развитием эволюции. Изменения эти продолжаются и сейчас, так как постоянно

изменяются условия окружающей среды, а значит и условия проживания существующих организмов. Благодаря иммунитету, наш организм способен к распознаванию и уничтожению болезнетворных организмов, инородных тел, ядов и внутренних переродившихся клеток организма.

Понятие об иммунитете 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 иммунитет. Виды иммунитета человека по своему происхождению делятся на врожденный и приобретенный, естественный и искусственный.

«Виды иммунитета» 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.

2.18 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, целлюбиозу 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.

2.19 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 (экспрессирующей) 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.

2.20 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 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 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 $\sim 100^\circ C$. 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. Неперменное 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 биомомеры.

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 линейаризовали 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.

2.21 Молекулярная биология и происхождение человека

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

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.

2.22 Методологические основы разработки рецептур и технологий генетически модифицированных продуктов питания

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

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 дигидропикколилат 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).

2.23 Степень безопасности трансгенных пищевых продуктов

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

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-bred 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 размножить

ся 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.

3. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОДГОТОВКЕ К ЗАНЯТИЯМ

3.1 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 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-кодонгяРНК.

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 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.

3.3 Общая схема реализации генетической информации

При подготовки 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, полисома может 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 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 <-> РНК -> 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.