

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ П.М. МАШЕРОВА»

Факультет химико-биологических и географических наук

Кафедра химии и естественнонаучного образования

СОГЛАСОВАНО

Заведующий кафедрой

 О.М. Балаева-Тихомирова

10.12.2020

СОГЛАСОВАНО

Декан факультета

 Т.А. Толкачёва

10.12.2020

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
ПО УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

для специальности второй ступени высшего образования

1-31 80 01 Биология. Функциональная биология

Составители: А.А. Чиркин, Е.И. Кацнельсон

Рассмотрено и утверждено

на заседании научно-методического совета 18.02.2021, протокол № 4

УДК 576(075.8)
ББК 28.050я73
К48

Печатается по решению научно-методического совета учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова». Протокол № 7 от 29.06.2021.

Составители: профессор кафедры химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П.М. Машерова, доктор биологических наук, профессор **А.А. Чиркин**; преподаватель кафедры химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П.М. Машерова **Е.И. Кацнельсон**

Рецензенты:
заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии УО «ВГМУ»,
доктор медицинских наук, профессор *О.Д. Мяделец*;
доцент кафедры экологии и географии ВГУ имени П.М. Машерова,
кандидат биологических наук, доцент *В.Я. Кузьменко*

К48 Клеточная биология для специальности второй ступени высшего образования 1-31 80 01 Биология. Функциональная биология : учебно-методический комплекс по учебной дисциплине / сост.: А.А. Чиркин, Е.И. Кацнельсон. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2021. – 140 с.
ISBN 978-985-517-823-2.

Учебно-методический комплекс разработан на факультете химико-биологических и географических наук для студентов специальности второй ступени высшего образования 1-31 80 01 Биология. Функциональная биология в соответствии с учебной программой «Клеточная биология» (рег. № УД-23-043/уч. от 26.06.2019 г.), на основе государственного Образовательного стандарта высшего образования второй ступени по специальности 1-31 80 01 Биология. Функциональная биология ОСВО 1-31 80 01-2019, учебной программы БГУ рег. № УД-4224/уч. от 30.06.2017 г. и учебного плана ВГУ имени П.М. Машерова.

В издании представлены пояснительная записка (предисловие), лекционный материал, практический блок, рекомендуемая литература и информация о материально-технической обеспеченности по дисциплине «Клеточная биология».

УДК 576(075.8)
ББК 28.050я73

ISBN 978-985-517-823-2

© ВГУ имени П.М. Машерова, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА	4
ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ	5
<i>Тема 1</i> Введение в клеточную биологию	5
<i>Тема 2</i> Биоэнергетика и метаболизм	9
<i>Тема 3</i> Структура и функции мембран	15
<i>Тема 4</i> Взаимодействие между клетками и их окружением	22
<i>Тема 5</i> Система цитоплазматических мембран. Везикулярный транспорт	27
<i>Тема 6</i> Цитоскелет и молекулярные основы клеточной подвижности	30
<i>Тема 7</i> Природа гена и генома	35
<i>Тема 8</i> Ядро клетки и контроль экспрессии генов	39
<i>Тема 9</i> Репликация и репарация ДНК	43
<i>Тема 10</i> Молекулярные основы деления клеток	47
<i>Тема 11</i> Коммуникации между клетками: клеточный сигналинг и трансдукция (передача) сигнала	50
<i>Тема 12</i> Принципы культивирования клеток	54
<i>Тема 13</i> Стволовые клетки	59
<i>Тема 14</i> Банки клеточных культур	65
<i>Тема 15</i> Рекомбинантные белки: получение и использование	70
<i>Тема 16</i> Антитела и клеточная биология	73
<i>Тема 17</i> Биотехнологии на основе культур клеток	79
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	83
РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ	92
Примеры тестовых заданий	92
Программные вопросы для контроля	95
ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ ЗНАНИЙ ...	98
Наименование тем дисциплины и их содержание	98
Практические занятия	101
Управляемая самостоятельная работа и темы рефератов	102
Список литературы	105
Глоссарий	106
ПРИЛОЖЕНИЕ	109

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Учебная программа по дисциплине «Клеточная биология» для студентов второй ступени высшего образования составлена в соответствии с требованиями Образовательного стандарта высшего образования ОСВО 1-31 80 01-2019 и учебного плана ВГУ имени П.М. Машерова с учетом действующей учебной программы ВГУ № УД-4224/уч. от 20.06.2017 года. Клеточная биология является одной из важнейших фундаментальных дисциплин в системе биологического образования. Современная клеточная биология тесно связана с биохимией, генетикой, цитологией, микробиологией, другими биологическими дисциплинами и является методической основой для изучения на клеточно-молекулярном уровне жизнедеятельности клеток и многоклеточных организмов. Изучение дисциплины позволит расширить научный кругозор студентов-биологов, способствовать их развитию как самостоятельных специалистов и получить знания, необходимые для проведения исследований на современном научно методическом уровне.

Цель учебной дисциплины – сформировать у студентов целостную систему знаний о природе процессов в клетке и понимание молекулярных основ физиологических реакций, координации работы клеток и их взаимосвязи с окружением.

В задачи дисциплины входит изучение общей структурной и функциональной организации клетки, молекулярных основ важнейших физиолого-биохимических процессов клетки; изучение работы и регуляции генетического аппарата, системы биосинтеза, посттрансляционной модификации и транспорта белков; исследование молекулярных механизмов регуляции клеточного цикла; изучение механизмов клеточной сигнализации, программируемой клеточной смерти, дифференциации и координации функций клеток. Подготовка специалиста-биолога подразумевает получение им информации не только о структурных и функциональных свойствах основных классов природных веществ, но и механизмах регуляции и взаимосвязи биохимических процессов, протекающих в клетках.

Дисциплина «Клеточная биология» рассчитана на студентов второй ступени высшего образования, прослушавших курсы «Цитология», «Биохимия», «Генетика» и «Микробиология» и уже имеющих определенные знания по предмету клеточной биологии. В настоящем курсе основные разделы клеточной биологии освещены более подробно с использованием наиболее современной доступной информации.

Программа для очной формы обучения рассчитана максимально на 112 часов, в том числе 50 часов аудиторных занятий: 34 – лекционных и 16 – лабораторных занятий; самостоятельная работа – 62 часа. Итоговый контроль – экзамен. При заочной форме обучения предусмотрено 6 лекционных часов, 2 – практические занятия и 8 – УСР. Итоговый контроль – экзамен. Дисциплина относится к компоненту учреждения высшего образования.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

Тема 1

ВВЕДЕНИЕ В КЛЕТОЧНУЮ БИОЛОГИЮ

Историческая справка

В 1838 г. М. Шлейден – описал различия клеток растительных тканей.

В 1839 г. Т. Шванн сформулировал основные постулаты клеточной теории

1. Все организмы состоят из одного или многих видов клеток.

2. Клетки являются структурной единицей жизни.

В 1855 г. Р. Вирхов сформулировал закон:

3. Клетки могут возникать только при делении предсуществующих клеток.

Основные свойства клеток

1. Жизнь – основное свойство клеток, клетки – наименьшая единица жизни.

Смерть клетки – прекращение жизни.

2. Клетки изучают морфологическими и биохимическими методами.

3. Поверхность клетки изучают с помощью сканирующего электронного микроскопа. Внутреннее содержимое клеток изучают на срезах клеток с помощью светового микроскопа или с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

Отрасли молекулярной биологии, связанные с клеточной биологией (рисунок 1 см. Приложение).

В 2016 году стартовал проект «Атлас клеток человека». Инициаторы американский Институт Брода (Broad Institute), английский Институт Сенджера и Фонд Wellcome Trust. «Мы считаем, что наличие подробного описания всех типов клеток в здоровом организме человека окажет воздействие практически на все аспекты биологии и медицины в последующие десятилетия», – рассказал один из инициаторов проекта доктор Авив Регев (Aviv Regev) в официальном представлении проекта. «Сейчас у нас есть инструменты, чтобы понять, из чего мы состоим, как работают наши тела, и раскрыть, как меняются все эти клетки, когда мы заболеваем. Создавая этот атлас, мы разрабатываем новый исследовательский инструмент для всего сообщества», – добавляет доктор Авив Регев (рисунок 2 см. Приложение).

В основу нового атласа клеток человека легли успехи одноклеточной геномики. Международное научное сообщество выступило с инициативой создания атласа клеток человека, основанного на транскриптоме, то есть на индивидуальном для каждого типа клеток, наборе молекул РНК. Именно транскриптом наилучшим образом характеризует функциональную активность одной клетки, группы клеток или определённой ткани.

Молекулярное сходство живых организмов

Для практически всех живых организмов одинаковыми являются базовые процессы:

1. Матричный синтез белков (ДНК→РНК→белок).

2. Запасание химической энергии.

3. Построение мембранных структур.

Самовоспроизведение клеток

1. Организм строится в соответствии с информацией, закодированной и хранящейся в генах.
2. Большая часть генетической информации упакована в виде нуклеиновых кислот хромосом (часть в составе митохондриальной ДНК).
3. Молекулярная структура генов является местом мутационных процессов, лежащих в основе развития и эволюции живых организмов.
4. Расшифровка механизмов использования генетической информации клетками является важнейшей задачей науки последних десятилетий.
5. Деление клеток происходит путем получения из материнской клетки двух дочерних.
6. Перед делением клеток генетический материал удваивается, и каждая дочерняя клетка получает одинаковое количество генетического материала.
7. В результате деления получают дочерние клетки одинакового объема. Однако, это правило нарушается при образовании ооцитов млекопитающих.

Основные характеристики клеток

1. Жизнедеятельность клетки определяется тысячами химических реакций ферментативной природы (энергетические и пластические процессы).
2. Клетки способны к различным типам движения и переноса веществ (биохимические белковые моторы, трансмембранные транспортные системы и др.).
3. Клетки способны отвечать на стимулы физической, химической и биологической природы (основную роль играют рецепторы и чувствительные к воздействию фактору молекулы и процессы).
4. Клетки способны к регуляции нервными (электрическими сигналами) и химическими сигнальными молекулами (аутокринная, паракринная и эндокринная системы).
5. Клетки способны к развитию (стволовые клетки, трансформация, дифференцировка и др.).

Существуют два основных класса клеток – прокариотические и эукариотические (рисунок 3 см. Приложение).

Происхождение прокариот и эукариот (биологические часы) (рисунок 4 см. Приложение). После формирования планеты Земля примерно 4,6 миллиардов лет тому назад в течение 1 миллиарда лет создавались условия для возникновения органических молекул на основе углерода, возникли молекулы РНК («мир РНК»), затем появились рибозимы, т.е. РНК, обладающие свойствами модификации молекул. Возникновение дезоксирибозы и азотистых оснований привело к формированию ДНК (молекулы способной нести генетический код и быть намного более устойчивой, чем РНК). В этот период важную роль сыграли принципы хиральности, которые привели к введению в полимеры белков L-аминокислот, а в полимеры углеводов – D-сахаров. Возникновение амфифильных молекул постепенно обеспечило образование мембран, которые могли создавать изолированные компартменты (пузырьки), причем различия в концентрациях натрия, кальция снаружи и калия внутри пузырька, а также изменяемые концентрации протонов снаружи и внутри пузырьков привели к созданию разности потенциалов на мембране, а если происходило их выравнивание высвобождалась энергия. Для запасаения энергии сформировались фосфоангидридные связи, достигшие совершенства в

составе АТФ. Все это привело к образованию прокариотических клеток. Почти 1,5 миллиарда лет прокариоты (фотосинтетические бактерии, цианобактерии и др.) использовали химическую энергию растворенных веществ и энергию солнца. В результате их деятельности 2 миллиарда лет тому назад в атмосфере накопился кислород (точка Пастера, 1%) и возникли эукариотические организмы. Далее развитие форм жизни происходило намного быстрее, поскольку аэробные процессы существенно эффективнее анаэробных: 1 миллиард лет тому назад сформировалось царство водорослей, развивались беспозвоночные, затем сформировались наземные формы жизни – растения, животные и человек.

В процессе эволюции прокариоты совершенствовались. Например, многие из этих клеток способны через конъюгацию осуществлять горизонтальный перенос информации. Известно, что в большинстве случаев прокариоты являются не-сексуальными организмами. Они содержат только одну копию простой хромосомы и не способны к мейозу, образованию гамет или истинной фертилизации. Но некоторые прокариоты способны к конъюгации, в процессе которой осуществляется контакт и передача друг другу фрагментов ДНК в виде плазмид. Это свойство прокариот лежит в основе их изменчивости, в частности, появлении внутрибольничных инфекций за счет возникновения устойчивых к антибиотикам штаммов микроорганизмов.

Не менее интересны и механизмы подвижности прокариот. Известно, что эукариотические клетки обладают набором различных механизмов для локомоции. Механизмы подвижности прокариот проще: локомоция зависит от белковых филаментов, называемых флагеллами. Ротация флагелл создает эффект пропеллера в среде. Некоторые эукариотические клетки (протисты, сперматозоиды) также обладают флагеллами, которые устроены намного сложнее.

Особый интерес представляет механизм формирования эукариотических клеток из прокариотических симбионтов (рисунок 5 см. Приложение).

На рисунке 6 (см. Приложение) показаны принципиальные различия в биосинтезе белка у прокариот и эукариот.

Из анализа рисунка следует, что последовательность реакций ДНК → РНК → белок у прокариот происходит в одном компартменте, поскольку у этих простейших клеток нет внутриклеточных мембран. Симбиоз нескольких прокариотических клеток привел к разделению реакций ДНК → РНК и РНК → белок мембраной ядра. Таким образом, процессы репликации и транскрипции оказались в ядре. Здесь же происходит созревание информационной РНК (процессинг, включая сплайсинг). После выхода мРНК в цитозоль на ней осуществляются процессы сборки рибосом и трансляция.

Относительные размеры клеток и клеточных компонентов

Ангстрем (Å) – внесистемная единица длины, равная 10^{-10} м ($1 \text{ Å} = 0,1 \text{ нм} = 100 \text{ пм}$; $10\,000 \text{ Å} = 1 \text{ мкм}$). 10^{-10} м – это приблизительный диаметр орбиты электрона в невозбужденном атоме водорода. Тот же порядок имеет шаг атомной решетки в большинстве кристаллов.

В клеточной биологии удобно пользоваться следующим рядом единиц:

- 1 Ангстрем = 0,1 нм, устарел, диаметр атома водорода;
- 1 нм = 10 ангстрем, цепочка из 10 атомов водорода;

- 1 нм = 10^{-9} (устаревшее миллимикрон, ммк), длины волн света (красный – 750 нм);
- 1 мкм = 10^{-6} м, диаметр бактерии 1 мкм, эритроцита 7 мкм, эпителиальной клетки или волоса 100 мкм;
- 1 мм = 10^{-3} м, размер парамеции 1,5 мм, икринка лягушки 2,5 мм.

Выделяют следующие наиболее используемые типы филогенетического дерева:

Дендрограмма – общий термин, обозначающий схематическое представление филогенетического дерева.

Кладограмма – филогенетическое дерево, не содержащее информации о длинах ветвей.

Филограмма (или *фенограмма*) – филогенетическое дерево, содержащее информацию о длинах ветвей; эти длины представляют изменение некой характеристики, например, число мутаций в каком-либо гене.

Хронограмма – филограмма, длины ветвей в которой представляют эволюционное время.

Филогенетическое дерево, построенное на секвенировании рРНК представлено на рисунке 7 см. Приложение.

В настоящее время для изучения проблем клеточной биологии используют модельные организмы, в том числе вирусы, археи, бактерии, протисты, грибы, растения, животные (беспозвоночные и позвоночные); модельные органы и ткани; модельные клетки и клеточные линии; модельные популяции. По последним данным около 90 различных живых объектов нашли применение в качестве моделей множества состояний нормы и патологии. Модельные организмы интенсивно изучаются, поскольку открытые при их изучении закономерности зачастую свойственны другим организмам, в том числе и человеку. Модельные организмы используются в тех случаях, когда проведение соответствующих исследований на человеке невозможно по техническим или этическим причинам. Использование модельных организмов основано на том, что все живые организмы имеют общее происхождение и сохраняют много общего в механизмах хранения и реализации наследственной информации, метаболизме и др. Одним из первых основные виды модельных организмов популяризировал автор известного многократно переиздаваемого труда «Cell and molecular biology. Concepts and experiments» G. Karp (2005-2017) (рисунок 8 см. Приложение).

Контрольные вопросы:

1. Назовите и охарактеризуйте основные свойства клеток.
2. Чем отличаются прокариотические клетки от эукариотических клеток.
3. Каков эволюционный механизм формирования эукариотических клеток из прокариотических симбионтов.
4. Приведите примеры модельных организмов для прокариот, эукариот, растений, генетических исследований, изучения судьбы клеток, человека.

Тема 2

БИОЭНЕРГЕТИКА И МЕТАБОЛИЗМ

Биоэнергетика – раздел биохимии, изучающий энергетические процессы в клетке. Биоэнергетика базируется на законах термодинамики. Первый закон термодинамики – это закон сохранения энергии: энергия не появляется и не исчезает. Всякий раз, когда энергия используется для выполнения работы или же переходит из одной формы в другую, общее количество энергии остается неизменным. Вторым закон термодинамики гласит, что все физические или химические процессы стремятся идти в направлении, соответствующем необратимому переходу полезной энергии в хаотическую, неупорядоченную форму. Мерой такого перехода служит величина – энтропия.

Для клеточной биологии важны разъяснения академика В.П. Скулачева.

Первый закон биоэнергетики: живая клетка избегает прямого использования энергии внешних ресурсов для совершения полезной работы; она сначала превращает их в одну из трех конвертируемых форм энергии («энергетических валют»), а именно в АТФ, $\Delta\mu H^+$ или $\Delta\mu Na^+$, которые затем расходуются для осуществления различных энергоемких процессов. $\Delta\mu H^+$ представляет собой потенциальную энергию ионов водорода, находящихся в некотором объеме, который отделен мембраной от другого объема, содержащего меньше ионов водорода или заряженного более отрицательно. Протоны не проходят через мембраны! Существует две формы протонного потенциала между двумя отсеками, разделенными мембраной: 1) градиент электрического поля $\Delta\psi$ и 2) градиент кислотности ΔpH .

Второй закон биоэнергетики: любая живая клетка всегда располагает как минимум двумя «энергетическими валютами»:

- водорастворимой (АТФ);
- связанной с функционированием мембран в виде $\Delta\mu H^+$, либо $\Delta\mu Na^+$.

Третий закон биоэнергетики: «энергетические валюты» клетки могут превращаться одна в другую. Поэтому получения хотя бы одной из них за счет внешних ресурсов достаточно для поддержания жизнедеятельности, т.е. обеспечение механической, осмотической, химической работы.

Энтропия. Процесс останавливается, когда наступает состояние равновесия, при котором энтропия имеет максимально возможное при данных условиях значение. Энтропия является количественной характеристикой или мерой неупорядоченной энергии в данной системе. Живые организмы сохраняют внутреннюю упорядоченность, получая свободную энергию в виде пищевых веществ (или солнечного света) из окружающей среды и возвращая в нее такое же количество энергии в менее полезной форме, главным образом в форме тепла, которое рассеивается в окружающей среде.

Метаболизм (metabole – греч. изменение, превращение) – это совокупность процессов превращения веществ и энергии в организме, происходящих с участием ферментов. В наиболее употребительном значении термин «метаболизм» равнозначен «обмену веществ». В точном смысле «метаболизм» означает промежуточный обмен, т.е. превращение веществ внутри клеток с момента их поступления до образования конечных продуктов. Вещества, участвующие в метаболизме, называются метаболитами.

Деление живых организмов по форме усвояемого углерода:

Автотрофы («сами себя питающие») усваивают CO_2 воздуха в процессе фотосинтеза и из него строят все свои органические вещества (фотосинтезирующие бактерии, зеленые растения).

Гетеротрофы («питающиеся за счет других») получают углерод из сложных органических соединений (высшие животные и большинство микроорганизмов), т.е. они питаются продуктами жизнедеятельности других клеток.

В биосфере автотрофы и гетеротрофы являются участниками кругооборота углерода и кислорода между животным и растительным мирами. Автотрофы используют атмосферный CO_2 для синтеза органических молекул и многие из них выделяют кислород из воды в результате этого процесса. Гетеротрофы используют органические продукты автотрофов как источник питания и выделяют CO_2 , а также воду и продукты распада азотсодержащих соединений: аммиак (рыбы), мочевую кислоту (рептилии, птицы) или мочевину (млекопитающие).

Метаболизм складывается из 2-х фаз – катаболизм и анаболизм:

Катаболизм – ферментативное расщепление крупных пищевых или депонированных молекул (углеводов, липидов, белков) до более простых (лактат, H_2O , CO_2 , NH_3) с выделением энергии и запасанием ее в виде АТФ или восстановительных эквивалентов (НАДН, НАДФН, ФАДН₂).

Анаболизм – ферментативный синтез крупных полимерных молекул из простых предшественников с затратой АТФ или НАДФН.

Анаболизм и катаболизм не являются простым обращением реакций. Катаболические и анаболические пути должны отличаться хотя бы одной из ферментативных реакций, чтобы регулироваться независимо. Например, специфический путь распада глюкозы до лактата (анаэробный гликолиз) включает 11 реакций; обратный процесс – синтез глюкозы из лактата (глюконеогенез) включает 8 обратимых реакций и 3 дополнительные реакции с новыми наборами ферментов. На этих стадиях регулируются суммарные скорости распада и синтеза глюкозы.

Реакции катаболизма и анаболизма часто разделены мембранами и протекают в разных компартментах клеток. Например, распад жирных кислот протекает в митохондриях, а синтез – в цитозоле.

Метаболический статус (status – состояние на какой-либо момент времени) – взаимоотношение анаболических и катаболических процессов в организме на определенный момент времени.

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы. Идея W.Jencks (1969) о способности белков-антител катализировать химические реакции была подтверждена в конце 80-х годов прошлого века. Были введены термины «каталитические антитела» или «абзимы» (от antibody enzyme). Каталитические РНК (рибозимы) были описаны в 80-х годах прошлого века (T.R.Chech et al., 1981; S.Guerrier-Takada et al., 1983). Рибозимы достаточно широко представлены в природе и играют важную роль в эволюции живых организмов, поскольку они могут обеспечивать репродукцию и процессинг РНК без участия белков-ферментов.

Ферменты ускоряют реакции в миллионы раз. Многие реакции не могут протекать в организме в отсутствие ферментов. Например, гидратация углекислоты, катализируемая карбоангидразой, является одной из наиболее быстрых реакций. Каждая молекула фермента гидрирует 10^6 молекул CO_2 за секунду! Эта катализируемая

реакция протекает в 10^7 раз быстрее, чем не катализируемая. Ферментативный гидролиз пептидной связи происходит за миллисекунды, а без фермента для разрыва пептидной связи при нейтральном значении pH потребуется от 10 до 1000 лет.

Сходства между ферментами и химическими катализаторами:

1. Не расходуются и не образуются в процессе реакции.
2. Катализируют только энергетически возможные реакции.
3. Не изменяют свободную энергию субстратов и продуктов реакции.
4. Не смещают равновесия реакции, а ускоряют его наступление.

Различия между ферментами и химическими катализаторами:

1. Ферменты являются белками и поэтому катализируют реакции в «мягких» условиях (давление 1 атм, $t=37^\circ\text{C}$ и нейтральное значение pH).

2. Ферменты обладают физико-химическими свойствами, характерными для белков: высокой молекулярной массой, амфотерностью, не способны к диализу, подвергаются высаливанию, денатурируют.

3. Для ферментов характерна более высокая эффективность. Например, энергия активации разложения перекиси водорода $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + 1/2\text{O}_2$ равна 75,2 кДж/моль. При добавлении неорганического катализатора платины энергия активации снижается до 50,2 кДж/моль. Фермент каталаза снижает энергию активации до 8,3 кДж/моль.

4. Активность фермента регулируется и контролируется на генетическом уровне и посредством низкомолекулярных соединений (субстратов и продуктов реакции).

5. Ферменты обладают специфичностью. Различают 4 вида специфичности ферментов.

1) *Абсолютная специфичность* – фермент катализирует превращение только одного субстрата. Например, аргиназа расщепляет аргинин, уреазы – мочевину.

2) *Относительная специфичность* – фермент расщепляет определенный тип связи. Например, липаза гидролизует жиры по месту сложноэфирной связи на глицерин и жирные кислоты.

3) *Относительная групповая специфичность* – фермент расщепляет определенный тип связи, но в ее образовании участвуют определенные функциональные группы. Такие ферменты обычно участвуют в процессе пищеварения. Например, пищеварительные ферменты, гидролизующие пептидную связь в белках, относятся к протеиназам (относительная специфичность), но среди них пепсин расщепляет пептидную связь, образованную аминогруппой ароматических аминокислот; трипсин – пептидную связь, образованную карбоксильной группой основных аминокислот, а химотрипсин – карбоксильной группой ароматических аминокислот (относительная групповая специфичность).

4) *Стереохимическая специфичность* – фермент катализирует превращение определенного стереоизомера. Например, оксидаза L-аминокислот превращает только L-аминокислоты.

6. В организме действуют, как правило, полиферментные системы, в результате чего происходит многоэтапное превращение вещества с допустимыми для организма перепадами энергии.

Полиферментные системы (комплексы) представляют собой несколько ферментов, катализирующих ряд согласованных реакций, причем конечные

продукты одной ферментативной реакции являются субстратами для следующей. Различают три типа мультиферментных комплексов:

- а) ферменты растворены в цитоплазме и контакт субстратов с ними осуществляется посредством диффузии;
- б) ферменты соединены друг с другом за счет белок-белковых взаимодействий;
- в) ферменты соединены друг с другом и иммобилизованы на внутриклеточных или цитоплазматических мембранах.

В трехмерной структуре фермента выделяют несколько участков, несущих определенную функцию. В молекуле фермента выделяют активный центр, т.е. участок с которым связывается субстрат и протекает каталитическая реакция.

Характеристика активного центра фермента:

1. Активный центр фермента формируется при образовании третичной структуры белка за счет пространственного сближения радикалов аминокислот.
2. Активный центр образуется боковыми радикалами аминокислот, которые могут располагаться на значительном расстоянии в первичной структуре.
3. Активный центр представляет собой полость, щель или карман; на область активного центра приходится всего лишь 25-100-часть от объема фермента.
4. Активный центр не является жесткой структурой. Его конформация изменяется при связывании субстрата.
5. У сложных ферментов в состав активного центра входят кофакторы.
6. В активном центре выделяют контактный (якорный) участок, связывающий субстрат и каталитический участок, где происходит превращение субстрата.
7. Субстрат связывается с активным центром фермента не ковалентными связями.

Кроме активного центра у ряда ферментов имеется регуляторный, или аллостерический (от греч. allos – иной, чужой), центр, который в молекуле фермента пространственно разделен с активным центром.

Характеристика аллостерического центра фермента:

1. Аллостерический центр, как правило, пространственно отделен от активного центра.
2. К аллостерическому центру присоединяются вещества – эффекторы, которые делятся на активаторы и ингибиторы.
3. Присоединение эффектора к аллостерическому центру приводит к изменению третичной и/или четвертичной структуры молекулы фермента и соответственно конфигурации активного центра, вызывая снижение или повышение ферментативной активности.

Ферменты, имеющие аллостерический центр, называются аллостерическими.

Классы ферментов:

1. Оксидоредуктазы. К классу оксидоредуктаз относятся ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции.
2. Трансферазы. К классу трансфераз относятся ферменты, катализирующие реакции межмолекулярного переноса групп.
3. Гидролазы катализируют гидролиз эфирных, сложноэфирных, пептидных и гликозидных связей, кислородных ангидридов, связей С-С, С-галоген и Р-N, т.е. расщепление внутримолекулярных связей с участием воды.

4. Лиазы (синтазы) – это ферменты, отщепляющие группы от субстратов по негидролитическому (без участия воды) механизму, с образованием двойных связей.

5. Изомеразы катализируют различные типы оптических, геометрических и позиционных изомеров.

6. Лигазы (синтетазы) катализируют соединения двух молекул, сопряженное с разрывом пирофосфатной связи АТФ или другого макроэргического соединения.

Номенклатура ферментов

Каждый фермент имеет специальный шифр, состоящий из 4-х кодовых чисел, разделенных точками; первая цифра характеризует класс реакции, вторая – подкласс, третья – подподкласс, четвертая указывает порядковый номер фермента в его подподклассе. Например, лактатдегидрогеназа имеет шифр 1.1.1.27, т.е. фермент относится к 1-му классу (оксидоредуктазы), к 1-му подклассу (оксидоредуктазы, действующие на СН-ОН-группировки в качестве доноров атомов водорода), к 1-му подподклассу (акцептором атомов водорода служит никотинамидадениндинуклеотид) и занимает 27 позицию в перечне ферментов упомянутого подкласса.

Активность ферментов зависит от 6 факторов:

1. От количества фермента при избытке субстрата.
2. От концентрации субстрата (уравнение Михаэлиса-Ментен).
3. От температуры реакции.
4. От величины рН.
5. От наличия активаторов.
6. От наличия ингибиторов.

Единицы измерения активности ферментов:

1. *Стандартная международная единица* (Е или U) – количество фермента, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в минуту (мкмоль/мин).

Катал – количество фермента, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 моль субстрата в секунду (моль/сек). 1 Е фермента соответствует 16,67 ккат; 1 кат = 6×10^7 Е

2. *Удельная активность* – число единиц ферментативной активности на 1 мг ферментативного белка.

3. *Молярная активность (число оборотов)* – число молекул субстрата, подвергающихся превращению одной молекулой фермента в секунду.

Единицы энергии: калория (кал) эквивалентна количеству тепла для подъема температуры 1 г воды от 14,5 до 15,5 °С. Килокалория (ккал) равна 1000 кал. Джоуль (Дж) равен работе, совершаемой силой 1 Н при перемещении точки ее приложения на 1 м в направлении действия силы. Килоджоуль (кДж) равен 1000 Дж. Соотношение единиц энергии: 1 ккал = 4,184 кДж.

Биоэнергетика, или биохимическая термодинамика, занимается изучением энергетических превращений, сопровождающих биохимические реакции. Изменение свободной энергии (ΔG) – это та часть изменения внутренней энергии системы, которая может превращаться в работу. Это полезная энергия и выражается уравнением $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, где ΔH – изменение энтальпии, T – абсолютная температура, ΔS – изменение энтропии.

Выделяют следующие типы реакций:

1. Если значение $\Delta G < 0$, то реакция протекает самопроизвольно и сопровождается уменьшением свободной энергии. Такие реакции называют экзергоническими.

2. Если значение $\Delta G > 0$, то реакция будет протекать только при поступлении свободной энергии извне; такая реакция называется эндергонической.

3. При $\Delta G = 0$ система находится в равновесии.

Величина ΔG при стандартных условиях протекания химической реакции (концентрация веществ-участников 1,0 М, температура 25 °С, рН 7,0) обозначается $\Delta G_0'$ и называется стандартной свободной энергией реакции.

Известны 3 типа аккумуляторов энергии в организме:

1. *Внутренняя мембрана митохондрий* – это промежуточный аккумулятор энергии при образовании АТФ. За счет энергии окисления веществ происходит «выталкивание» протонов из матрикса в межмембранное пространство митохондрий. В результате создается электрохимический потенциал (ЭХП) на внутренней мембране митохондрий. При разрядке мембраны энергия электрохимического потенциала трансформируется в энергию АТФ: $E_{\text{окисл.}} \rightarrow E_{\text{ЭХП}} \rightarrow E_{\text{АТФ}}$. Для реализации этого механизма внутренняя мембрана митохондрий содержит ферментативную цепь переноса электронов на кислород и АТФ-синтазу (протонзависимую синтазу АТФ).

2. *АТФ и другие макроэргические соединения.* Материальным носителем свободной энергии в органических веществах являются химические связи между атомами. Обычным энергетическим уровнем возникновения или распада химической связи является $\sim 12,5$ кДж/моль. Однако имеется ряд молекул, при гидролизе связей которых выделяется более 21 кДж/моль энергии. К ним относятся соединения с макроэргической фосфоангидридной связью (АТФ), а также ацилфосфаты (ацетил-фосфат, 1,3-бисфосфоглицерат), енол-фосфаты (фосфоенолпируват) и фосфогуанидины (фосфокреатин, фосфоаргинин). К макроэргическим соединениям относят также нуклеозидтрифосфаты, которые обеспечивают энергией ряд биосинтезов: УТФ – углеводов; ЦТФ – липидов; ГТФ – белков. В биоэнергетике мышц важное место занимает креатинфосфат.

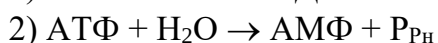
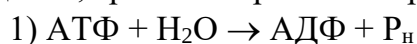
3. *НАДФН + H^+* – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный. Это специальный аккумулятор с высокой энергией, который используется в клетке (цитозоль) для биосинтезов. $R-CH_3 + НАДФН_2 + O_2 \rightarrow R-CH_2OH + H_2O + НАДФ^+$ (здесь показано создание ОН-группы в молекуле).

В клетках теплокровных АТФ как универсальный аккумулятор энергии возникает двумя путями:

1) аккумулирует энергию более энергоемких соединений, стоящих выше АТФ в термодинамической шкале без участия O_2 – субстратное фосфорилирование: $S \sim P + АДФ \rightarrow S + АТФ$;

2) аккумулирует энергию электрохимического потенциала при разрядке внутренней мембраны митохондрии – окислительное фосфорилирование.

АТФ является универсальным источником энергии для совершения основных видов работы клетки (передача наследственной информации, мышечное сокращение, трансмембранный перенос веществ, биосинтезы):



Сопряжение эндергонических и экзергонических реакций

Жизненно важные процессы в организме – реакции синтеза, мышечное сокращение, проведение нервного импульса, транспорт веществ через мембрану – получают энергию путем сопряжения с окислительными реакциями, в результате которых происходит высвобождение энергии. Т.е. эндергонические реакции в организме сопряжены с экзергоническими (рисунок 9 см. Приложение). Для химического сопряжения эндергонических реакций с экзергоническими реакциями необходимы аккумуляторы энергии в организме, в которых запасается примерно 50% энергии.

Энергетический заряд

Многие реакции метаболизма контролируются энергетическим обеспечением клеток, который контролируется энергетическим зарядом клетки. Энергетический заряд может колебаться от 0 (все АМФ) до 1 (все АТФ). Согласно Д. Аткинсону, образующие АТФ катаболические пути ингибируются высоким энергетическим зарядом клетки, а утилизирующие АТФ анаболические пути стимулируются высоким энергетическим зарядом клетки. Оба пути функционируют одинаково при энергетическом заряде, близком к 0,9. Следовательно, энергетический заряд, подобно рН, является буферным регулятором метаболизма (соотношения катаболизма и анаболизма). В большинстве клеток энергетический заряд колеблется в пределах 0,80-0,95.

Контрольные вопросы:

1. Перечислите и поясните суть трех законов биоэнергетики.
2. Приведите классификацию живых организмов по форме усвояемого углерода.
3. Опишите из каких фаз складывается метаболизм.
4. Назовите классы ферментов, принципы номенклатуры и способы выражения активности ферментов.
5. Как осуществляется регуляция ферментов?
6. Опишите виды аккумуляторов энергии в организме.

Тема 3

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ МЕМБРАН

Мембраны – это высокоорганизованные структуры, отграничивающие внутреннее пространство клетки или ее отсеков, построенные из белков и липидов. Углероды возможны на внешней поверхности плазматической мембраны (рецепторы).

Функции мембран

1. Отделяют клетки от окружающей среды.
2. Обладают избирательной проницаемостью, содержат специфические транспортные системы.
3. Внутренние мембраны клеток ограничивают органеллы и формируют обособленные внутриклеточные отсеки – компартменты.
4. Обеспечивают функциональную специализацию клетки.
5. Играют центральную роль в системе межклеточных взаимодействий.

6. В них располагаются рецепторы, воспринимающие химические, физические и другие внешние сигналы.

7. Некоторые мембраны сами способны генерировать сигнал (химический или электрический).

8. Участвуют в процессах превращения энергии (фотосинтез, окислительное фосфорилирование).

На электронных микрофотографиях при окраске осмием плазматическая и внутриклеточные мембраны имеют триламенарное строение, что доказывает их строение в виде фосфолипидных бислоев.

Основными липидами мембран являются фосфолипиды, гликолипиды и холестерол.

Глицерофосфоглицериды являются основным компонентом большинства мембран и состоят из спирта глицерола, 2-х остатков жирных кислот, остатка фосфорной кислоты (фосфатидил-) и спирта, по названию спирта формируется название фосфолипида:

- холина (фосфатидилхолин),
- этаноламина (фосфатидилэтаноламин),
- серина (фосфатидилсерин),
- глицерола (фосфатидилглицерол),
- глицеролфосфата, треонина или инозитола.

Сфингомиелины содержат спирт сфингозин. Жирная кислота присоединяется амидной связью к аминогруппе сфингозина. Первичная гидроксильная группа сфингозина эстерифицируется фосфорилхолином. Сфингомиелины находятся преимущественно в миелиновых оболочках.

Холестерол определяет прочность мембраны и располагается сочлененными кольцами в области гидрофобных цепей остатков жирных кислот фосфолипидов и гидроксильной группой в 3-м положении в области полярных головок фосфолипидов.

Липиды выполняют структурную роль в мембране. Основная масса липидов в клеточной мембране обеспечивает жидкую матрицу для вращения белков и их латеральной диффузии для физиологического функционирования. К ключевым макромолекулярным структурам, образуемым в водной среде фосфолипидами, относят: мицеллы (в них происходит всасывание продуктов переваривания в энтероциты кишечника); липосомы (структуры для транспорта гидрофильных лекарств через плазматические мембраны клеток) (рисунок 10 см. Приложение).

История представлений о строении плазматической мембраны: липидный бислой Davson-Danielli; жидкостно-мозаичная Singer-Nicolson (рисунок 11 см. Приложение); мозаично-рафтовая.

Липидный бислой состоит из двух слоев – внешнего и внутреннего. Компоненты бислоя неравномерно распределены между двумя поверхностями, чтобы создать асимметрию между внешней и внутренней поверхностями. Эта асимметричная организация важна для клеточных функций, таких как передача сигналов. Асимметрия биологической мембраны отражает различные функции каждого из слоев мембраны. Как видно на модели жидкостно-мозаичной структуры, внешний и внутренний слои мембраны неодинаковы по своему составу. Некоторые белки и липиды располагаются только на одной поверхности мембраны, а не на другой. Как плазматическая мембрана, так и внутриклеточные мембраны имеют

цитозольные и эктоплазматические поверхности. Такая ориентация сохраняется во время мембранного транспорта: белки, липиды, гликоконъюгаты, направляемые к просвету эндоплазматического ретикулума и аппарату Гольджи, экспрессируются на внешней стороне мембраны. В эукариотических клетках новые фосфолипиды синтезируются ферментами, связанными с той частью мембраны эндоплазматического ретикулума, которая обращена к цитозолу. Эти ферменты, использующие свободные жирные кислоты в качестве субстратов, откладывают все вновь образованные фосфолипиды в цитозольную половину бислоя.

Чтобы мембрана росла равномерно, половина новых молекул фосфолипидов должна быть перенесена на противоположный монослой. Этот перенос катализируется ферментами, называемыми флиппазами. В плазматической мембране флиппазы селективно переносят определенные фосфолипиды, так что разные типы концентрируются в каждом монослое (рисунок 12 см. Приложение). Такой перенос фосфолипида требует энергии и проходит с потреблением АТФ. Флиппазы относятся к АТФазам Р типа, у человека к флиппазам относится АТФаза II.

Липидные рафты возникают, когда липидные частицы и белки объединяются в домены мембраны. Они помогают организовать компоненты мембраны в локализованные области, которые участвуют в определенных процессах, таких как передача сигнала и межклеточные взаимодействия. Поэтому в настоящее время рассматривается динамическая твердо-каркасная жидкостно-мозаичная доменно-рафтовая модель строения биологической мембраны. Отметим, что мембрана эритроцитов имеет уникальный липидный состав, она состоит из холестерина и фосфолипидов в равных массовых пропорциях.

Характеристика мембран

1. Мембраны являются сложными структурами, построенными из липидов, белков и углеводов. Основу мембран составляет липидный бислой, имеющий толщину 6-10 нм.

2. Соотношение белков и липидов в мембранах варьирует от 1:4 до 4:1 и зависит от типа клеток и органелл.

3. Мембраны являются асимметричной структурой с отличающимися наружной и внутренней поверхностями.

4. Мембрана стабилизируется нековалентными связями и является термодинамически стабильной и метаболически активной.

5. Специфические белки встроены в мембраны и выполняют специфические функции рецепции управляющих сигналов, межклеточного взаимодействия, транспорта веществ и пр.

6. Мембраны – это жидкостные структуры.

Классификация белков мембран:

1) поверхностные (периферические) мембранные белки, связанные с гидрофильной поверхностью липидного бислоя;

2) интегральные мембранные белки, погруженные в гидрофобную область бислоя.

3) прошивающие мембрану белки. Имеют конформацию α -спирали во внутренней части мембраны. В этой части белка преобладают гидрофобные аминокислотные остатки.

Белки обеспечивают функции мембран.

Типы мембранных белков

Мембранные белки можно разделить на две группы:

1. структурные белки поддерживают структуру всей мембраны. Это, как правило, периферические белки, выступающие в роли «молекулярного бандажа»;
2. динамические белки непосредственно участвуют в процессах, происходящих на мембране. Выделяют три класса таких белков:
 - 1) транспортные участвуют в трансмембранном переносе веществ;
 - 2) каталитические – это ферменты, интегрированные в мембрану и катализирующие происходящие там реакции;
 - 3) рецепторные – это мембранные рецепторы, специфически связывающие биорегуляторы

Углеводы мембран

В составе мембран углеводы находятся только в соединении с белками (гликопротеины и протеоглики) и липидами (гликолипиды). В мембране гликозилировано около 10% всех белков и 5-25% липидов. Углеводные цепи белков колеблются по составу от 2-х членных структур до разветвленных 18-членных полисахаридов.

Функции углеводов:

- 1) определяют межклеточное взаимодействие;
- 2) участвуют в системе иммунитета (антигенные детерминанты групп крови) (рисунок 13 см. Приложение);
- 3) входят в состав рецепторов.

Мембраны в клетках обычно отделяют замкнутые пространства или отсеки (компарменты), в которых клетки могут поддерживать химическую или биохимическую среду, отличную от внешней. Например, мембрана вокруг пероксисом защищает остальную часть клетки от пероксидов, химических веществ, которые могут быть токсичными для клетки, а клеточная мембрана отделяет клетку от окружающей среды. Пероксисомы – это одна из форм вакуолей, обнаруженных в клетке, которые содержат побочные продукты химических реакций внутри клетки. Большинство органелл отделяются такими мембранами и называются «мембраносвязанными» органеллами.

Наиболее важной особенностью биомембраны является ее избирательная проницаемость. Это связано с размером, зарядом и химическими свойствами атомов и молекул, пытающихся пересечь ее. Избирательная проницаемость важна для эффективного отделения клетки или органеллы от окружающей среды. Биологические мембраны также обладают определенными механическими или эластичными свойствами, которые позволяют им изменять форму и способствовать перемещениям в пространстве. Небольшие гидрофобные молекулы могут легко пересекать фосфолипидные бислои путем простой диффузии. Частицы, которые необходимы для функционирования клетки, но не могут свободно диффундировать через мембрану, проникают через мембранный транспортный белок или захватываются посредством эндоцитоза, когда мембрана формирует везикулы, в составе которых перемещаются частицы или жидкость внутрь клетки. Многие типы специализированных плазматических мембран могут отделять клетку от внешней среды: апикальные, базолатеральные, пресинаптические и постсинаптические, мембраны жгутиков, ресничек, микроворсинок, филоподий и ламеллоподий,

сарколеммы мышечных клеток, а также специализированные миелиновые и дендритные мембраны нейронов. Плазматические мембраны могут также образовывать различные типы «супраембранных» структур, такие как кавеолы, постсинаптические плотности, подосомы, инвадоподии, десмосомы, гемидесмосомы, обеспечивать очаговую (фокальную) адгезию и контакты клеток. Эти типы мембран различаются по липидному и белковому составу. Разные типы мембран также создают внутриклеточные органеллы: эндосомы; гладкий и шероховатый эндоплазматический ретикулум; саркоплазматический ретикулум; аппарат Гольджи; лизосомы; митохондрии (внутренняя и внешняя мембраны); ядро (внутренняя и внешняя оболочки); пероксисомы; вакуоли; цитоплазматические гранулы; клеточные везикулы (фагосомы, аутофагосомы, везикулы, покрытые клатрином, везикулы, покрытые СОРІ и покрытые СОРІІ) и секреторные везикулы (включая синапсомы, акросомы, меланосомы и хромоаффинные гранулы). Различные типы биологических мембран имеют различный липидный и белковый состав. Состав мембран определяет их физические и биологические свойства. Некоторые компоненты мембран играют ключевую роль в медицине, например, оттокные насосы, которые выкачивают лекарства из клетки.

Методы исследования биологических мембран

Биохимические методы позволяют разделять, выделять и анализировать в чистом виде липидные, белковые и углеводные компоненты: методы выделения субклеточных фрагментов (хроматография, электрофорез, центрифугирование, иммуноаффинные методы) идентификации и оценки чистоты субклеточных фракций выделения органелл и мембранных систем экстракции липидов и разделения их по классам количественного определения фосфолипидов исследования трансмембранного распределения липидов солюбилизации мембранных белков, их реконструкции и определения функциональной активности реконструированных мембран, выделения и модификации мембранных белков. Эти методы позволяют получить информацию о механизме фотосинтеза, электронном транспорте, транспорте кислорода в тканях, транспорте ионов, взаимодействии веществ различной природы с мембранами, белок-липидных взаимодействиях и других процессах. Они основаны на присутствии в изучаемой системе эндогенных или экзогенных (вносимых в систему экспериментатором) хромофорных групп. К эндогенным хромофорам относятся порфирины, флавины, каротиноиды, пиридиннуклеотиды, цитохромы, гемоглобин, миоглобин, которые поглощают свет в видимой области спектра. Акридины, нафталин-сульфонаты, цианины являются экзогенными хромофорами. К оптическим методам относят абсорбционную спектрофотометрию, люминесценцию, метод флуоресцентных зондов, а также круговой дихроизм, дисперсию оптического вращения. Последние наряду с ИК-спектроскопией и спектроскопией комбинационного рассеяния используются для определения содержания различных элементов вторичной структуры молекулы белка, позволяют изучать ее конформационные переходы.

Физиологические методы используют для изучения функционирования естественных и искусственных мембран. Они позволяют исследовать проницаемость мембран, процессы возбуждения, торможения, проведения нервного импульса, распределения и выведения ионов и молекул из клеток и тканей, изменения физиологических функций клеток.

Генетические методы основаны на использовании мутантов, дефектных по синтезу определенных мембранных белков. Они позволяют исследовать функции мембранных белков, их роль в функционировании мембран, проблемы самоорганизации мембран.

Биофизические методы позволяют изучать динамическую организацию биомембран, получить представления об упаковке и движении липидных молекул в природных и модельных мембранах, их взаимодействии друг с другом и молекулами белков, исследовать фазовые переходы и другие процессы. К ним относятся дифракционные методы (рентгеновская дифракция, дифракция нейтронов), резонансные методы, метод электронной микроскопии, оптические методы (круговой дихроизм, дисперсия оптического вращения, абсорбционная спектроскопия, люминесценция, метод флуоресцентных зондов), метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии, метод моделирования и получения искусственных мембран и др. Дифракционные методы основаны на взаимодействии электромагнитного излучения или частиц с длиной волны, соизмеримой с межатомным расстоянием, и компонентов мембраны. В основе рентгеноструктурного анализа лежит взаимодействие рентгеновского излучения с электронами вещества, в результате которого возникает дифракция рентгеновских лучей с длиной волны $\sim 0,1$ нм. Последние рассеиваются на электронных оболочках атомов. Интерференция волн, рассеянных веществом, приводит к возникновению дифракционной картины, что позволяет зарегистрировать рентгенограмму. Резонансные методы анализа веществ подразделяют на метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Метод ЯМР основан на резонансном поглощении в сильном внешнем магнитном поле энергии электромагнитного радиочастотного поля системой атомных ядер, обладающих магнитным моментом. Он позволяет получать сведения о подвижности молекул липидов биомембран, об упаковке фосфолипидных молекул в бислое, используется для регистрации изменений значения pH в частицах малого размера (искусственные мембраны, митохондрии), изучать процессы латеральной диффузии липидов и трансбислойного движения (флип-флоп-переходы) молекул. К недостаткам метода ЯМР следует отнести низкую чувствительность (концентрация образца должна быть не менее 10 моль/л), а также малую эффективность в изучении крупных молекул, т.е. мембранных белков. Метод ЭПР применяют для изучения фазовых переходов в липидном бислое, микровязкости мембран, подвижности углеводородных цепей, латеральной диффузии и флип-флоп переходов. Недостаток этого метода заключается в том, что введение зонда изменяет структуру бислоя и свойства мембраны. Метод ЭПР более чувствителен по сравнению с методом ЯМР, так как магнитный момент электрона в 1000 раз выше, чем ядра.

При исследовании мембран наиболее часто используют методы замораживания-скалывания, распределение меченых атомов фосфолипидов, извлечение белков из мембраны с помощью детергентов (рисунк 14 см. Приложение).

Большой интерес представляет изучение подвижности мембранных белков. Известно, что отдельные липидные молекулы подвергаются свободной латеральной диффузии внутри каждого из слоев липидной мембраны. Диффузия происходит с высокой скоростью, при этом в среднем молекула липида диффундирует на 2 мкм примерно за 1 секунду, что примерно соответствует длине крупной

бактериальной клетки. Также было замечено, что отдельные молекулы липидов быстро вращаются вокруг своей оси. Более того, молекулы фосфолипидов могут, хотя и редко, мигрировать с одной стороны липидного бислоя на другую (процесс, известный как flip-flop). Однако перемещение фосфолипидов может быть усилено ферментами флиппазами. Описанные выше процессы влияют на неупорядоченную природу липидных молекул и взаимодействующих белков в липидных мембранах, что сказывается на текучести мембран, передаче сигналов, перемещении и функции (рисунок 15 см. Приложение).

Существуют ограничения на латеральную подвижность липидных и белковых компонентов в жидкой мембране, обусловленные образованием субдоменов внутри липидного бислоя. Эти подобласти возникают в результате нескольких процессов, например, связывание компонентов мембраны с внеклеточным матриксом, нанометрическими участками мембраны с определенным биохимическим составом, которые способствуют образованию липидных рафтов и белковых комплексов, опосредованных межбелковыми взаимодействиями. Кроме того, ассоциации белок-цитоскелет опосредуют образование «цитоскелетных заборов», в которых липидные и мембранные белки могут свободно диффундировать, но редко уходят. Ограничение скорости латеральной диффузии компонентов мембраны очень важно, потому что оно определяет функциональную специализацию определенных областей внутри клеточных мембран. Многие клетки поддерживают асимметричное распределение фосфолипидов между слоями цитоплазматической и эктоплазматической мембран. Утрата асимметрии, в частности появление анионного фосфолипида фосфатидилсерина на эктоплазматической поверхности, может служить ранним индикатором апоптоза.

Принцип метода оценки скорости перемещения молекул фосфолипидов в мембране (рисунок 16 см. Приложение).

Механизмы мембранного транспорта

- простая диффузия небольших и незаряженных молекул без затраты энергии по градиенту концентрации;
- облегченная диффузия осуществляется специальными белковыми внутри-мембранными переносчиками без затраты энергии и по градиенту концентрации;
- активный транспорт (первичный, вторичный) осуществляется специальными ферментами против градиента переносимых ионов с затратой энергии;
- везикулярный транспорт (эндоцитоз – фагоцитоз и пиноцитоз; экзоцитоз).

Контрольные вопросы:

1. Назовите и опишите функции мембран.
2. Перечислите основные липиды мембран и назовите их функции.
3. Опишите роль белков и углеводов мембран.
4. Как развивались представления о строении плазматических мембран?
5. Укажите основные характеристики мембран.
6. Опишите основные методы исследования биологических мембран.
7. С какой скоростью перемещаются молекулы фосфолипидов в мембранах?

Тема 4

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ И ИХ ОКРУЖЕНИЕМ

Соединительная ткань – это ткань живого организма, не отвечающая непосредственно за работу какого-либо органа или системы органов, но играющая вспомогательную роль во всех органах, составляя 60–90% от их массы. Выполняет структурообразующую, защитную и трофическую функции. Соединительная ткань образует опорный каркас (строму) и наружные покровы (дерму) всех органов. Общими свойствами всех соединительных тканей является происхождение из мезенхимы, а также выполнение опорных функций и структурное сходство. Выделяют пять основных видов соединительной ткани (рисунок 17 см. Приложение).

Соединительную ткань отличает от других тканей преобладанием межклеточного вещества над клеточными элементами.

Межклеточное вещество включает три класса биомолекул:

- 1) структурные белки (коллаген и эластин);
- 2) специализированные белки (фибриллин, фибронектин и ламинин);
- 3) протеогликаны (включают гликозаминогликаны – ГАГ).

Клетки, относящиеся к соединительной ткани

- фиброциты – неактивные фибробласты;
- фибробласты – производят коллаген и эластин, а также другие вещества внеклеточного матрикса, способны делиться;
- фиброкласты – клетки, способные поглощать и переваривать межклеточный матрикс; являются зрелыми фибробластами, к делению не способны;
- меланоциты – сильно разветвлённые клетки, содержащие пигмент меланин, присутствуют в радужной оболочке глаз и коже (по происхождению – эктодермальные клетки, производные нервного гребня);
- макрофаги – клетки, поглощающие болезнетворные организмы и отмершие клетки ткани, чужеродные частицы (по происхождению моноциты крови);
- эндотелиоциты – окружают кровеносные сосуды, производят внеклеточный матрикс и продуцируют гепарин; эндотелий сосудов, также, как и синовиальная клетки суставов, относятся к соединительной ткани;
- тучные клетки (мастоциты), или тканевые базофилы – это клетки соединительной ткани, которые продуцируют метакроматические гранулы, выделяют при воспалении и поглощают при выздоровлении гепарин, гистамин и серотонин; концентрированы под кожей, вокруг лимфатических узлов и кровеносных сосудов, в селезёнке и красном костном мозге и участвуют в развитии воспаления и аллергии;
- мезенхимные клетки – клетки эмбриональной соединительной ткани.

Таким образом, клетки соединительной ткани синтезируют молекулы межклеточного вещества (рисунок 18 см. Приложение), выделяют сигнальные молекулы (гепарин, гистамин, серотонин и др.), участвуют в иммунном ответе и в неспецифической реактивности организма.

Межклеточное вещество соединительных тканей содержит множество разных органических и неорганических соединений, от количества и состава которых зависит консистенция ткани. Кровь и лимфа, относимые к жидким соединительным тканям, содержат жидкое межклеточное вещество – плазму. Матрикс

хрящевой ткани – гелеобразное межклеточное вещество, а матрикс кости, как и волокна сухожилий – нерастворимые твёрдые вещества.

Коллаген

В организме млекопитающих коллаген составляет 25% от всех белков. Вторичная структура коллагена – левозакрученная спираль с шагом 0,96 нм, более плотная по сравнению с α -спиралью. На 1 виток спирали приходится 3,3 аминокислотных остатка. В отличие от α -спирали образование водородных мостиков здесь невозможно. В отличие от вторичной структуры сама молекула коллагена является правозакрученной спиралью, образованной из трех левозакрученных спиралей.

Коллаген имеет необычный аминокислотный состав: 1/3 составляет глицин, примерно 10% пролин, а также гидроксипролин и гидроксизин. Последние две аминокислоты образуются после биосинтеза коллагена путем посттрансляционной модификации с участием витамина С. Поэтому при цинге нарушается прочность коллагена.

Образование коллагеновых волокон

Цепи коллагена после синтеза на полисомах переходят в эндоплазматическую сеть в виде предшественников, имеющих дополнительные пептиды на концах цепей (содержат много остатков цистеина). Эти телопептиды участвуют во внутриклеточном образовании тройных спиралей. Тройная спираль проколлагена фиксируется дисульфидными связями между тремя С-концевыми телопептидами. Молекула проколлагена транспортируется из цистерн эндоплазматического ретикулула в аппарат Гольджи для дополнительного гликозилирования. Затем молекула проколлагена методом экзоцитоза поступает во внеклеточное пространство.

Коллагеновые волокна образуются из отдельных молекул коллагена, которые формируют перекрывающуюся структуру (поперечная исчерченность с периодом 67 нм за счет смещения каждой соседней молекулы в фибрилле на $\frac{1}{4}$ своей длины относительно соседней). Схема синтеза коллагена представлена на рисунке 19 (см. Приложение).

Известны более 15 типов коллагеновых молекул (изоколлагены):

- Тип I $[\alpha(1)]_2\alpha_2(I)$ и тип II $[\alpha(II)]_3$ – кости, дентин, роговица, гиалиновый хрящ.
- Тип III $[\alpha(III)]_3$ – дерма, десна, клапаны сердца.
- Тип IV $[\alpha(IV)]_3$ – базальные мембраны.
- Тип V $[\alpha(V)]_2\alpha_2(V)$ и тип VI $\alpha_1(VI), \alpha_2(VI)$ – кости, роговица, клапаны сердца, артериальные сосуды.
- Тип VII $\alpha_1(VII)$ и тип VIII $\alpha_1(VIII)$ – эндотелий сосудов.
- Тип IX $\alpha_1(IX) \alpha_2(IX)$ и тип X $\alpha_1(X)$ – хрящевая ткань.

Изоколлагены типов I-III – образуют фибриллы; изоколлагены типов IV и VII являются сетью формирующими, например, в базальных мембранах, изоколлагены IX и XII участвуют в образовании фибрилл (рисунок 20 см. Приложение).

За эластические свойства соединительной ткани отвечают эластические волокна. Десмозин – основа эластических волокон (рисунок 21 см. Приложение).

Для обеспечения архитектуры волокнистых структур соединительной ткани используются белки ламинин и энтактин. Ламинин – это белок, состоящий из трех полипептидных цепей организованных в виде крестообразной структуры. Домены ламинина связывают коллаген типа IV, гепарансульфат и гликопротеины поверхности клеток. Энтактин служит для связывания между ламинином и коллагеном.

Компоненты базальной мембраны

Коллаген типа IV, гепаран сульфат, ламинин и энтактин могут образовывать базальные мембраны. Коллаген IV типа на $\frac{1}{4}$ длиннее молекул других типов коллагена (при биосинтезе не теряются концевые телопептиды), что позволяет ему создавать двумерную сеточку к которой прикрепляются эндотелиальные и эпителиальные клетки и которая образует ложа для мышечных и жировых клеток. При резком уменьшении содержания коллагена IV типа эпидермис легко отделяется от дермы (пузырчатка).

Протеогликаны

Протеогликаны – это сложные белки, в которых с молекулами белка ковалентно связаны гликозамингликаны. Схема строения протеогликанов представлена на рисунке 22 (см. Приложение).

1. Гиалуроновая кислота состоит из 250 тысяч несulfатированных дисахаридных единиц. Она образует свободные от клеток пространства для целлюлярной миграции в норме и при патологии.

2. Коровий белок присоединяется к гиалуроновой кислоте, образуя структуру типа ершика для мытья пробирок.

3. Гликозамингликаны (кератансульфат, хондроитинсульфат и др.) соединены через связывающий трисахарид (галактоза-галактоза-ксилоза) с серином корового белка.

Функции протеогликанов:

- 1) взаимодействие с коллагеном, эластином, фибронектином и др.;
- 2) являясь полианионами, они связывают катионы;
- 3) определяют форму и упруго-эластические характеристики органов;
- 4) участвуют в рецепции, эндо- и экзоцитозе, межклеточном взаимодействии;
- 5) регулируют процессы трансмембранного переноса (например, клубочковую фильтрацию);
- 6) гомеостатическое действие (антикоагулянтное действие, функционирование тучных клеток и др.);
- 7) образуя структуры типа молекулярных сит обеспечивают барьерную функцию, защищая организм от проникновения микробов, чужеродных молекул, токсинов.

Макромолекулы межклеточного вещества: протеогликаны формируют матрикс, в котором находятся белки фибронектин, коллаген и ламинин, имеющие места связывания друг с другом и с рецепторами – интегринами (рисунок 23 см. Приложение).

Фибронектин

Фибронектин – гликопротеин, состоящий из двух субъединиц, которые связаны на С-концах двумя дисульфидными связями. В каждой субъединице до 15 раз повторяется аналогичная последовательность из 90 аминокислотных остатков. Эти домены являются местами специфического связывания с гепарином, коллагеном, поверхностями клеток. Фибронектин ускоряет миграцию клеток в межклеточном веществе соединительной ткани.

Распад белков межклеточного матрикса

Для распада белковых молекул межклеточного вещества служат металлопротеиназы матрикса (МПМ) и их тканевые ингибиторы (ТИМПМ). Семейство МПМ включает примерно 20 ферментов, способных расщеплять практически все компоненты внеклеточного матрикса соединительных тканей. МПМ представляют собой семейство цинк- и кальций-зависимых эндопептидаз. Они играют важную роль во многих физиологических процессах (эмбриональное развитие, морфогенез, репродукция и ремоделирование ткани), а также в различных патологических процессах (артритах, злокачественном росте и сердечно-сосудистых заболеваниях). Количество вновь синтезируемых МПМ регулируется в основном на уровне экспрессии генов, а протеолитическая активность существующих МПМ контролируется как активацией проферментов, так и ингибированием активных ферментов эндогенными ингибиторами, $\alpha 2$ -макроглобулином и тканевыми ингибиторами металлопротеиназ.

По специфичности МПМ можно разделить на:

- коллагеназы (ММР-1, -8 и -13), расщепляют коллагены типов 1-3, 7 и 10;
- желатиназы (ММР-2 и -9), расщепляют коллаген 4 типа и денатурированные коллагены;
- стромелизины (ММР-3 и -10, расщепляют фибронектин, ламинин, коллаген 4, 5 и 7 типа, а также протеогликаны.

Помимо сходства на уровне аминокислотной последовательности, все МПМ образуются из неактивных предшественников, которые превращаются в активные протеиназы под воздействием внеклеточных факторов. Источниками МПМ являются многие клетки, включая фибробласты, макрофаги, гладкомышечные клетки сосудистой стенки, нейтрофилы; их продукция увеличивается под влиянием цитокинов.

Молекулы клеточной адгезии

Представляют собой мембранные белки, участвующие в связывании клетки с внеклеточным матриксом и другими клетками. Большинство молекул клеточной адгезии принадлежат к следующим семействам белков: интегрины; адгезивные рецепторы суперсемейства иммуноглобулинов; селектины; кадгерины.

Селектины

Селектины являются трансмембранными гликопротеинами и состоят из единственной полипептидной цепи. Существует 3 подгруппы селектинов:

- Е-селектин (в эндотелиальных клетках);
- L-селектин (в лейкоцитах);
- Р-селектин (в эндотелиальных клетках и тромбоцитах).

Кадгерины

Кадгерины – основной класс молекул клеточной адгезии, обеспечивающие кальций-зависимое соединение клеток в плотных тканях организма. Внеклеточная часть классических кадгеринов состоит из пяти повторяющихся доменов (ЕС-1-5). Их взаимодействие сближает мембраны клеток (рисунки 24 см. Приложение).

Селектины обеспечивают специфическое узнавание клеток, вступающих в контакт, а кадгерины участвуют в образовании клеточных контактов и адгезии (слипанию).

Контакты между клетками

Между мембранами контактирующих клеток формируются связи – межклеточные контакты. Каждый тип межклеточных контактов формируется за счет специфических белков, подавляющее большинство которых – трансмембранные белки.

Простое межклеточное соединение

При простом межклеточном соединении мембраны клеток сближены на расстояние 15–20 нм. Это соединение занимает наиболее обширные участки соприкасающихся клеток. Посредством простых соединений осуществляется слабая механическая связь, не препятствующая транспорту веществ в межклеточных пространствах.

Плотные контакты

Клеточные мембраны максимально сближены, фактически происходит их слияние. Роль плотного соединения заключается в механическом сцеплении клеток и препятствии транспорту веществ по межклеточным пространствам. Плотные соединения образуются между эпителиальными клетками в желудке, кишечнике для препятствия к распространению содержимого этих органов (желудочный сок, кишечный сок).

Плотные контакты реализуются через систему ветвящихся полосок. Каждая полоска состоит из белков, пронизывающих мембраны соседних клеток и непосредственно соединяющихся друг с другом во внеклеточном пространстве. Хотя в образовании плотных контактов участвуют многочисленные белки, главные из них – клаудины и окклюдины. Различные периферические белки, расположенные на цитоплазматической стороне мембран, соединяют плотные контакты с актиновым цитоскелетом.

Функции плотных контактов:

- механически соединяют клетки эпителия;
- обеспечивают барьер для латеральной диффузии белков, благодаря чему сохраняется полярность клеток эпителия;
- обеспечивают барьер на пути большинства веществ, из-за чего эти вещества транспортируются в организм через мембраны и через цитоплазму клеток.

Десмосомы и гемидесмосомы

Десмосома – тип межклеточных контактов, обеспечивающих прочное соединение клеток (как правило, эпителиальной или мышечной ткани) у животных. Функции десмосом заключается главным образом в обеспечении механической связи между клетками. Через десмосомы промежуточные филаменты соседних клеток объединяются в непрерывную сеть, охватывающую всю ткань. Десмосома состоит из белков клеточной адгезии из семейства кадгеринов и соединительных (адапторных) белков, которые соединяют их с промежуточными филаментами. Белки клеточной адгезии, формирующие десмосомы – десмоглеин и десмоколлин. Внутриклеточный белок десмоплакин (при участии еще двух белков, плакофиллина и плакоглобина) соединяет внутриклеточные домены десмоглеина с промежуточными филаментами (рисунок 25 см. Приложение).

Гемидесмосомы – тип межклеточных контактов, связывающих эпителиальные клетки с внеклеточным матриксом. Основные трансмембранные белки гемидесмосом – интегрины и коллаген XVII. С промежуточными филаментами они соединяются при участии дистонина и плектина. Основной белок межклеточного

матрикса, к которому клетки присоединяются с помощью гемидесмосом – ламинин (рисунок 26 см. Приложение).

Щелевое соединение, щелевой контакт

Это способ соединения клеток в организме с помощью белковых каналов (коннексонов). Через щелевые контакты могут непосредственно передаваться от клетки к клетке электрические сигналы (потенциалы действия), а также малые молекулы (с молекулярной массой примерно до 1000 Да). Этим щелевые контакты отличаются от плазмодесмы, через которые могут транспортироваться макромолекулы и даже органоиды.

Коннексоны

Структурную основу щелевого соединения составляют коннексоны – каналы, образуемые шестью белками-коннексинами. В нервной системе щелевое соединение между нейронами встречается в так называемых электрических синапсах.

Отдельные коннексоны обычно сосредоточены на ограниченных по площади участках мембран – нексусах, или бляшках диаметром 0,5-1 мкм. В области нексуса мембраны соседних клеток сближены, расстояние между ними составляет 2-4 нм.

Контрольные вопросы:

1. Опишите группы клеток, относящихся к соединительной ткани.
2. Перечислите три класса биомолекул, входящих в состав межклеточного вещества.
3. Опишите структурные элементы межклеточного пространства: коллагены.
4. Приведите классификацию и опишите типы межклеточных контактов.

Тема 5

СИСТЕМА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН. ВЕЗИКУЛЯРНЫЙ ТРАНСПОРТ

Томас Зюдхоф, Рэнди Шекман, Джеймс Ротман были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине в 2013 году за открытие механизмов везикулярного транспорта в клетке. Суть открытия заключается в том, что разнообразные молекулы, упакованные в пузырьки-везикулы, постоянно пересылаются из одного отдела клетки в другой, а также секретируются наружу. Точная доставка возможна благодаря комплексу белков, которые выступают как в качестве «адреса», так и в качестве «почтового отделения» в каждом клеточном отделе.

Введение в проблему

Чтобы груз был доставлен по нужному адресу в клетке, его нужно упаковать в пузырек везикулу и снабдить специальным сигнальным белком. В качестве грузов могут выступать самые разнообразные молекулы: гормоны, ферменты, строительные белки и др. Отдельным примером клеточного транспорта является передача сигнала между нейронами – она осуществляется посредством выброса в синаптическую щель нейромедиаторов, упакованных в такие же везикулы. Везикула представляет из себя пузырек, окруженный билипидным слоем – такой же

мембраной, как та, что ограничивает клетку. На рисунке 27 (см. Приложение) представлена электронная микрофотография синапса в месте контакта двух нейронов, где указаны синаптические пузырьки-везикулы.

SNARE-гипотеза Джеймса Ротмана

SNARE-гипотеза – ключевая гипотеза, объясняющую принцип внутри- и межклеточного транспорта. Согласно ей, в процессе формирования и доставки везикул участвуют белки, принадлежащие к двум группам: v-SNARE (v – от vesicle «везикула») и t-SNARE (t – от target «мишень»). Они специфически узнают друг друга. Схема SNARE-гипотезы представлена на рисунке 28 (см. Приложение).

Согласно SNARE-гипотезе: 1) пузырьки (везикулы) отпочковываются от мембраны одной из органелл (например, эндоплазматического ретикулума) и получают «ключ» – один из белков семейства v-SNARE; 2) точная доставка осуществляется благодаря тому, что на целевой органелле есть специфический белок семейства t-SNARE, выступающий в роли «замка» (мишень).

Примеры везикулярного транспорта по типу эндоцитоза

Фагоцитоз (от греч. фагос – есть, цитос – клетка) наблюдается в специальных клетках (макрофагах и гранулоцитах). При фагоцитозе происходит захват крупных молекул (вирусы, бактерии, клетки) (рисунок 29 см. Приложение).

Пиноцитоз (от греч. пинос – пить) захват жидкости или растворенных компонентов, характерен для всех клеток. Пиноцитоз бывает избирательный и селективный рецепторно-осредованный.

Фагоцитарный ответ клетки включает следующие этапы:

1. Рецепторы на поверхности мембраны фагоцита в углублениях, покрытых белком клатрином, взаимодействуют с молекулами частиц, которые необходимо поглотить и уничтожить, и включают фосфатидилинозитольный механизм фагоцитоза. Образуются выросты плазматической мембраны макрофага, окружающие поглощаемую частицу, и формируется фагосома.

2. В цитозоле макрофага фагосомы сливаются с первичными лизосомами. Благодаря низким значениям pH внутри фаголизосомы происходит гидролиз органических молекул поглощаемой частицы гидролазами лизосом.

3. Непереваренные молекулы в виде остаточных телец методом экзоцитоза возвращаются на поверхность клеток.

4. Продукты гидролиза поступают в цитозоль и утилизируются для нужд макрофага.

Основными путями везикулярного транспорта в клетке являются экзоцитоз и эндоцитоз. Схема везикулярного транспорта представлена на рисунке 30 (см. Приложение).

На рисунке 31 (см. Приложение) показана схема эндоцитоза. В участке плазматической мембраны имеются углубления, содержащие снаружи рецепторы, а изнутри покрытые белком клатрином. При захвате частицы этот участок мембраны углубляется и отшнуровывается в цитозоль в виде окаймленной клатрином везикулы. Навстречу ей от мембран транс-Гольджи отшнуровывается одномембранная органелла лизосома, содержащая набор ферментов, способных гидролизовать различные полимерные молекулы до мономеров в условиях слабокислой реакции среды лизосомы. Происходит слияние эндосомной везикулы и лизосомы, происходит переваривание захваченных полимерных молекул. Продукты

переваривания поступают в цитозоль и используются для биосинтетических и энергетических нужд клетки. Непереваренные остатки поглощенной частицы либо выбрасываются из клетки методом экзоцитоза, либо окисляются и превращаются в пигментированный белок старения липофусцин.

Рецептор липопroteинов низкой плотности (ЛПНП-рецептор, *low density lipoprotein receptor, LDL Receptor*) – белок, опосредующий эндоцитоз липопroteинов низкой плотности, обогащённых холестерином. ЛПНП-рецептор представляет собой мембранный белок, специфически распознающий аполипопротеин В-100 и аполипопротеин Е находится в углублении снаружи мембраны клетки. Изнутри участок углубления покрыт белком клатрином (рисунок 32 см. Приложение).

На рисунке 33 (см. Приложение) представлена структура клатрина и формирование окаймленной клатрином везикулы.

Различают два типа окаймленных везикул

COP (покрывающий белок) II перемещают материал из эндоплазматического ретикула к «вперед» к ERGIC и комплексу Гольджи.

COP I перемещают материал в обратном направлении из ERGIC и комплекса Гольджи в ЭПР, а также из транс-Гольджи в цис-Гольджи.

Покрытые клатрином везикулы перемещают материал от транс-Гольджи (TGN) к эндосомам, лизосомам, растительным вакуолям; транспортируют материал от плазматической мембраны в цитоплазматические компартменты в процессе эндоцитоза.

Экзоцитоз

Вещества, высвобождаемые путем экзоцитоза, делят на 3 группы:

1) вещества, связывающиеся с клеточной поверхностью как периферические белки – антигены;

2) вещества, включающиеся во внеклеточный матрикс – коллаген, гликозаминогликаны;

3) вещества, входящие во внеклеточную среду, как сигнальные молекулы (инсулин, катехоламины, паратгормон) или ферменты (экзокринные железы, эктоферменты).

Известно два типа экзоцитоза:

1. Конститутивный постоянно действующий секреторный путь с помощью везикул.

2. Регулируемый секреторный путь с накоплением экскретируемых веществ в гранулах.

Аутофагия – это естественный процесс замены состарившихся элементов клетки. В 2016 году японский ученый Йосинори Осуми был удостоен Нобелевской премии за открытие и исследование механизмов аутофагии. Аутофагия – процесс, при котором внутренние компоненты клетки доставляются внутрь её лизосом или вакуолей и подвергаются в них деградации. Является естественным, регулируемым механизмом клетки, который разрушает ненужные или дисфункциональные компоненты.

Различают три типа аутофагии – микроаутофагию, макроаутофагию и шапероновую аутофагию. При микроаутофагии макромолекулы и обломки клеточных мембран просто «захватываются» лизосомой при недостатке энергии или строительного материала (например, при голодании). Этот процесс имеет место и при

нормальных условиях. Например, в процессе аутофагии разрушенной митохондрии происходит выброс остаточных веществ методом экзоцитоза и накопление окисленных остаточных веществ в виде липофусцина. Схематично процесс аутофагии разрушенной митохондрии представлен на рисунке 34 (см. Приложение).

В предыдущих разделах пособия приводились сведения об образовании эукариотических клеток путем симбиоза ряда прокариотических клеток. Так, вероятно, возникли митохондрии из аэробных прокариот. Можно полагать, что режим деления эукариотической клетки может не совпадать с режимом обновления (деления) митохондрий. В этом случае «состарившуюся» митохондрию необходимо убрать методами аутофагии. При макроаутофагии участок цитоплазмы, часто содержащий какие-либо органоиды, окружается мембранным компартментом, похожим на цистерну эндоплазматической сети. В результате этот участок отделяется от остальной цитоплазмы двумя мембранами. Такие двухмембранные органеллы, окружающие удаляемые органеллы и цитоплазму, называются аутофагосомы. Аутофагосомы соединяются с лизосомами, образуя аутофаголизосомы, в которых органеллы и остальное содержимое аутофагосом перевариваются. Видимо, макроаутофагия неизбирательна, хотя часто подчеркивается, что с помощью неё клетка может избавляться от «отслуживших свой срок» органоидов (митохондрий, рибосом и др.). Третий тип аутофагии – шапероновая. При этом способе происходит направленный транспорт частично денатурировавших белков из цитоплазмы сквозь мембрану лизосомы в её полость, где они перевариваются. Этот тип аутофагии, описанный только для млекопитающих, индуцируется стрессом (например, при голодании или физических нагрузках). Она происходит при участии цитоплазматических белков-шаперонов семейства белков теплового шока hsp-70, вспомогательных белков и LAMP-2, который служит мембранным рецептором комплекса шаперона и белка, подлежащего транспорту в лизосому.

Контрольные вопросы:

1. Объясните принцип внутри- и межклеточного транспорта, согласно SNARE-гипотезы.
2. Приведите примеры и опишите везикулярный транспорт по типу эндоцитоза.
3. Как осуществляется экзоцитоз и какие типы молекул при этом выделяются?
4. Для чего необходим рецептор липопротеинов низкой плотности?
5. Какие выделяют типы окаймленных везикул?
6. Опишите процесс аутофагии.

Тема 6

ЦИТОСКЕЛЕТ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ПОДВИЖНОСТИ

Цитоскелет – это клеточный каркас или скелет, находящийся в цитоплазме живой клетки. Цитоскелет – динамичная, изменяющаяся структура, в функции которой входит:

- 1) поддержание и адаптация формы клетки ко внешним воздействиям;
- 2) экзо- и эндоцитоз;
- 3) обеспечение движения клетки как целого;

- 4) активный внутриклеточный транспорт;
- 5) клеточное деление.

Цитоскелет клетки состоит из трех типов фибрилл:

- 1) микротрубочки;
- 2) средние филаменты;
- 3) микрофиламенты (актиновые филаменты).

Белки цитоскелета

Цитоскелет образован белками, выделяют несколько основных систем, называемых: 1) по основным структурным элементам, заметным при электронно-микроскопических исследованиях (микрофиламенты, промежуточные филаменты, микротрубочки); 2) по основным белкам, входящим в их состав (актин-миозиновая система, кератины, тубулин-динеиновая система).

Различия между полимерами и филаментами

Клетки эукариот содержат три типа так называемых филаментов (рисунок 35 см. Приложение). Это супрамолекулярные, протяжённые структуры, состоящие из белков одного типа, сходные с полимерами. Разница заключается в том, что в полимерах связь между мономерами ковалентная, а в филаментах связь составных единиц обеспечивается за счёт слабых нековалентных взаимодействий.

Микротрубочки

Микротрубочки полые, диаметр 25 нм, состоят из белков α , β -тубулиновых гетеродимеров, которые собраны в протофиламенты. Особенности: подвижность, стабильность и способность к взаимодействию определяется ассоциированными с микротрубочками белками – MAPs.

Функции микротрубочек

1. Формируют часть митотического веретена, центриоли.
2. Образуют сердцевинную часть ресничек и флагелл.
3. Определяют расположение целлюлозы в стенках растительных клеток.
4. Поддерживают мембраны аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикула.
5. Обеспечивают подвижность везикул и других молекул между клеточным телом и окончаниями аксонов нервных клеток.

Структура микротрубочек: микротрубочки состоят из глобулярных субъединиц; в микротрубочке собрано 13 субъединиц; модель α , β -тубулиновых гетеродимеров (α -тубулин связан с ГТФ, которая не гидролизуется, β -тубулин связан с ГДФ, которая заменяется на ГТФ перед полимеризацией; плюс конец сверху) (рисунок 36 см. Приложение).

Локализация микротрубочек («путей» перемещения грузов) в клетке представлена на рисунке 37 (см. Приложение).

«Моторные» белки»

Известны три семейства моторных белков: кинезины и динеины, которые движутся вдоль микротрубочек, и миозины, которые движутся вдоль микрофиламентов. Эти белковые моторы способны конвертировать химическую энергию АТФ в механическую энергию, которая используется для перемещения структур, присоединенных к моторам. Энергия реализуется за счет конформационных изменений моторных белков, сопряженных с фосфорилированием-дефосфорилированием макроэргических нуклеотидов.

Кинезины и динеины

Кинезины и цитоплазматические динеины перемещают материалы вдоль микротрубочек в противоположных направлениях. Кинезины движут материалы в направлении плюс-конца микротрубочек, а цитоплазматические динеины – минус-конца микротрубочек. Кинезины обычно перемещая груз от центра клетки к периферии, а также вдоль аксона от клеточного тела к нервному окончанию.

Механизмы перемещения по микротрубочкам и использованием белка кинезина представлены на рисунке 38 (см. Приложение).

Кинезин перемещает вдоль микротрубочек мембранные пузырьки (везикулы) и другие органоиды (например, митохондрии). На каждый «шаг» головки при этом затрачивается энергия гидролиза одной молекулы АТФ. Ранее считалось, что энергия АТФ обеспечивает перемещение головки в нужном направлении. Теперь предполагается, что головка болтается случайным образом за счет диффузии, а энергия АТФ затрачивается на связывание с тубулином.

Цитоплазматический динеин и транспорт органелл по микротрубочкам представлены на рисунке 39 (см. Приложение).

Скорость движения и переноса грузов

Максимальная скорость переноса грузов по микротрубочкам, которую могут развивать биохимические моторы:

- динеины около 14 мкм/с;
- кинезины только около 2-3 мкм/с.

Динеины делятся на две группы: цитоплазматические – растворимые белки цитоплазмы; аксонемные входят в состав аксонемы эукариотических жгутиков и ресничек. Динеины задействованы в движении хромосом и влияют на месторасположение веретена деления при делении клетки.

В эукариотических клетках цитоплазматический динеин (1,5 Мда) активируется соединением с динактином, белком, необходимым для митоза.

Аксонемный динеин

Благодаря аксонемному динеину реснички и жгутики подвижны. Такой динеин находится только в клетках, имеющих эти структуры. Аксонемные динеины – гетеродимеры или гетеротримеры, имеющие две или три моторные головки. Предполагается, что группы молекул динеина, отвечающих за движение в противоположных направлениях, активируются и инактивируются согласованным образом, и поэтому реснички и жгутики могут двигаться как вперед, так и назад.

Центр организации микротрубочек

Центр организации микротрубочек (ЦОМТ, microtubule-organising centre, МТОС) – структура эукариотической клетки, на которой собираются микротрубочки.

ЦОМТ имеет две основные функции:

- 1) сборка жгутиков и ресничек;
- 2) образование нитей веретена деления в ходе митоза и мейоза.

Нуклеация микротрубочек

В животных клетках микротрубочки формируют с центросомами структуру, содержащую две бочонкообразных центриоли. Центриоли содержат 9 симметрично расположенных фибрилл, каждая из которых состоит из трех микротрубочек. Микротрубочки ориентированы в направлении от перичентриолярного материала.

Микротрубочки, которые формируют реснички или флагеллы, происходят от базальных тел, имеющих такую же структуру, как и центриоль.

Центросомы, базальные тела, другие МТОС (наружная поверхность ядерной мембраны растительных клеток) содержат γ -тубулин, необходимый для нуклеации микротрубочек.

Центриоль

В большинстве клеток животных в течение интерфазы присутствует одна центросома, обычно располагающаяся возле ядра. В ней до S-периода содержится одна центриоль.

В ходе S-периода достраивается вторая центриоль.

Микротрубочки заякорены своими (-) концами на центросоме, что предотвращает их полный распад. Отходящие от центросомы микротрубочки медленно растут, а затем быстро распадаются почти целиком начиная с (+) конца. Полярность микротрубочек важна для везикулярного транспорта.

Базальное тельце

В эпителиальных клетках животных, клетках сетчатки глаза и других нервных клетках – рецепторах, а также в клетках многих протистов ЦОМТы, содержащие центриоли, служат базальными тельцами ресничек и жгутиков. На базальных тельцах происходит нуклеация микротрубочек, а заякоривание (-) концов обеспечивает их стабилизацию. Базальные тельца обеспечивают рост ресничек и жгутиков.

Микротрубочки – динамические полимеры

Микротрубочки цитоскелета являются динамическими полимерами, которые могут укорачиваться, удлиняться, разъединяться и собираться. Разборка микротубулярного цитоскелета индуцируется колхицином, низкой температурой, повышенной концентрацией ионов кальция.

Микротрубочки цитоскелета разъединяются перед клеточным делением и субъединицы тубулина вновь собираются как часть митотического веретена. Этот процесс разборки-сборки повторяется при каждом делении.

Движение ресничек и флагелл

Реснички и флагеллы имеют осевую нить, построенную из микротрубочек, которая обеспечивает поддержание структуры и движение. Осевая нить состоит из 9 внешних сдвоенных микротрубочек (А – завершенная и В – незавершенная). Два ответвления тянутся от А-микротрубочки каждого дублета. Ответвления состоят из цилиарного динеина – моторного белка превращающего энергию гидролиза АТФ в движение ресничек и флагелл. Это происходит, когда динеин одного дублета контактирует с В-микротрубочкой соседнего дублета: происходит изменение конформации, и микротрубочка А перемещается. Смещение на одну сторону осевой нити чередуется со смещением на другую сторону, поэтому реснички и флагеллы наклоняются в одну и затем в другую стороны.

Компоненты аксонемы

Для нормально функционирующих жгутиков большинства эукариот характерна так называемая структура 9+2 (девять периферических дублетов микротрубочек, расположенных по кругу, и две микротрубочки в центре). Схема строения аксонемы жгутика представлена на рисунке 40 (см. Приложение).

Центральные микротрубочки

В центре аксонемы проходят две микротрубочки, заключенные в центральную капсулу. В ряде случаев, например, в неподвижных сенсорных ресничках центральные микротрубочки не развиты. Такой вариант строения аксонемы (с имеющимися периферийными дублетами, но без центральных микротрубочек) получил краткое обозначение «9+0».

Динеиновые ручки

Динеиновые ручки образованы двигательным белком динеином. Они крепятся к А-микротрубочкам периферических дублетов и направлены к В-микротрубочкам. Молекулы динеина способны к обратимому изменению конформации при гидролизе АТФ. За счет этих изменений обращенный к В-микротрубочке конец ручки может перемещаться, обеспечивая скользящее движение периферических дублетов аксонемы друг относительно друга.

Радиальные спицы и нексины

Радиальные спицы, отходящие от периферических микротрубочек к центральной паре, представляют собой Т-образные структуры, крепящиеся к А-микротрубочкам периферических дублетов и обращенные расширенным концом к центру аксонемы. Состав радиальных спиц высококонсервативен. Несократимые мостики, связывающие между собой периферические дублеты, и капсула вокруг центральной пары микротрубочек образованы белками, получившими название нексинов.

Базальное тельце (кинетосома)

Лежащее в цитоплазме клетки основание аксонемы – кинетосома, или базальное тельце, нередко связанное с клеточным центром, отличается от дистальной части аксонемы тем, что в ней отсутствуют центральные микротрубочки, а на периферии располагается девять триплетов, а не дублетов. Схема строения базального тела и реснички представлена на рисунке 41 (см. Приложение).

Средние филаменты

Средние филаменты – нитеобразные структуры диаметром 10 нм. Состоят из симметричных тетрамерных субъединиц, которые собираются в филаменты, лишенные полярности. Устойчивы к значительным усилиям, относительно не растворимы, но являются динамичными структурами. Сборка и разборка средних филаментов зависит от фосфорилирования-дефосфорилирования белков. Обеспечивают механическую стабильность клеток и необходимы для тканеспецифических функций.

Актиновые филаменты

Актиновые филаменты (микрофиламенты) диаметром 8 нм, состоят из дважды скрученного полимера белка актина и играют ключевую роль во всех видах сократимости и подвижности в пределах клетки. В разных клетках образуют высокоупорядоченные структуры, сети или пучки. Актиновые филаменты часто связываются с S1 головками миозина (имеют полярность). С плюс-конца присоединяют субъединицы, с минус-конца теряют. Присоединяющаяся субъединица должна быть связанной с АТФ, которая гидролизует в процессе присоединения новой субъединицы. В клетке поддерживается равновесие между мономерной и полимерной формами актина. Цитохалазин способствует деполимеризации филаментов, а фаллоидин препятствует деполимеризации.

Миозины

Микрофиламент-зависимые процессы реализуются при соединении актиновых филаментов или чаще при взаимодействии с моторным белком миозином.

Перемещение фагоцитированной бактерии через мембрану макрофага определяется полимеризацией актина. Миозины делятся на 2 класса: обычные II типа и необычные I, III-XIV типов. Миозин II типа в мышцах и может быть в неммышечных активностях (цитокинезы). Головка миозина связывает актиновый филамент и за счет гидролиза АТФ обеспечивают перемещение его. Необычные миозины могут иметь одну головку и обеспечивать перемещение органелл.

Примеры неммышечной подвижности

Перемещение клеток через среду и аксональный рост.

Переползание клеток сопровождается формированием уплощенной вуалеподобной формы на движущемся конце клетки. Выдающиеся вперед выросты за счет временной фиксации к поверхности обеспечивают переползание. Этот процесс связан с нуклеацией и полимеризацией актиновых филаментов и их ассоциацией с различными актин-связывающими белками. Энергия для этого исходит от процесса полимеризации актина.

Кончик растущего аксона представляет перемещающийся конус, имеет несколько типов подвижных выростов и определяет предпочтительный путь роста.

Контрольные вопросы:

1. Опишите строение и функции цитоскелета клетки.
2. Охарактеризуйте структурно-функциональную роль микротрубочек, средних филаментов и микрофиламентов.
3. Для чего необходимы семейства моторных белков?
4. Из каких компонентов состоит аксонема?
5. Приведите примеры неммышечной подвижности.

Тема 7

ПРИРОДА ГЕНА И ГЕНОМА

В организме человека функционирует около 400 различных типов клеток, которые обеспечивают формирование органов и тканей тела. Абсолютно все клетки нашего организма содержат одинаковые гены и при этом клетки разных тканей кардинально отличаются друг от друга: клетки печени не похожи на нервные или на клетки крови. Причины таких различий заключаются в том, какую именно часть генома они используют в процессе своего индивидуального развития и метаболизма. Очевидно, что работа генов неодинакова в разном месте и в разное время. Но как это регулируется – является самым главным секретом нашего генома.

ДНК выполняет три функции: 1) локализация генов; 2) механизмы репликации; 3) механизм синтеза полипептидных цепей. Когда говорят о размере генома, то подразумевают общее содержание ДНК в единичном наборе хромосом ядра. Такой набор хромосом называют гаплоидным. Измерения размера генома приводятся в дальтонах, парах нуклеотидов (п.н.) или пикограммах (пг). Соотношение между этими единицами измерения, следующие: $1 \text{ пг} = 10^{-9} \text{ мг} = 0,6 \times 10^{12} \text{ дальтон}$

$= 0,9 \times 10^9$ п.н. В гаплоидном геноме человека содержится около 3,2 млрд. п. н., что равно 3,5 пг ДНК. В ядре одной клетки человека содержится около 7 пг ДНК. Если учесть, что средний вес клетки человека равен примерно 1000 пг, то легко рассчитать, что ДНК составляет менее 1% от веса клетки.

Ген – единица наследственности, представляющая собой *часть молекулы ДНК*, кодирующей последовательность аминокислот одной полипептидной цепи. Экспрессией гена называют синтез 1) РНК и 2) белка по программе гена. Большинство генов относят к «стандартным» кодирующим белок генам.

Различают следующие основные виды ДНК: 1) ядерные (хромосомные) ДНК; 2) ДНК плазмид; 3) ДНК хлоропластов; 4) ДНК митохондрий; 5) ДНК вирусов.

Ядерная ДНК локализована в ядре эукариотической клетки. Аналогом ядерной ДНК у бактерий служит генофор, или нуклеоид, который представляет собой кольцевидно замкнутую ДНК, не отделенную от цитоплазмы мембраной. Нередко генофор называют бактериальной хромосомой. Ядерная ДНК содержит основной объем информации обо всех наследственных признаках организма.

ДНК плазмид – это обычно кольцевидно замкнутые молекулы ДНК небольшого размера, находящиеся в цитоплазме прокариот. Плазмидные ДНК – это относительно автономные структуры: они способны реплицироваться независимо от ядерной ДНК, переходить из одной клетки в другую в процессе их контактов. Эту способность используют инженеры-генетики для переноса наследственной информации из одних организмов в другие (технологии рекомбинантных ДНК). Горизонтальный обмен ДНК плазмид между бактериями лежит в основе большинства трудно излечимых заболеваний из-за развития устойчивости возбудителей заболеваний к антибиотикам, передаваемой плазмидами.

ДНК хлоропластов находятся в пластидах растений. Гены несут информацию о белках и РНК, необходимых для нормальной работы фотосинтетического аппарата растительной клетки (рисунок 42 см. Приложение).

ДНК митохондрий, подобно ДНК хлоропластов, обеспечивают автономный синтез белка, который протекает в митохондриях. Несмотря на известную автономность, функционирование ДНК хлоропластов и ДНК митохондрий четко координировано с деятельностью ядерной ДНК.

Митохондриальная ДНК человека представлена на рисунке 43 (см. Приложение).

Вирусные ДНК несут относительно небольшой объем наследственной информации (от 10 до 150 генов), обеспечивающей циркуляцию этих паразитов в природе, в частности инфицирование клетки-хозяина. Подобно плазмидным ДНК, вирусные ДНК обладают способностью «путешествовать» между клетками и встраиваться (интегрироваться) в их ДНК.

ДНК ядер, митохондрий (хлоропластов) в совокупности образуют единый наследственный аппарат эукариотической клетки.

Геном человека – повторяющиеся ДНК

В ходе проекта «Геном человека» выяснилось, что «смысловые» участки ДНК, содержащие гены, кодирующие информацию о белках, занимают лишь 1% генома. Около 99% последовательностей ДНК генома человека относят к некодирующей ДНК (называемой также «мусорной» (junk DNA), которая не

экспрессируется, то есть не имеет выражения в белке. В основном это многократно повторяющиеся некодирующие последовательности нуклеотидов.

Доля кодирующих участков в расчете на весь геном в ходе эволюции резко уменьшается – у дрожжей она очень высока, у человека – очень мала. Мы приходим к достаточно парадоксальному на первый взгляд выводу: эволюция эукариот от низших форм к высшим сопряжена с «разбавлением» генома – на единицу длины ДНК приходится все меньше информации о структуре белков и РНК, и все больше информации «ни о чем».

На рисунке 44 (см. Приложение) приведена доля некодирующих участков ДНК у различных организмов.

Уровни реализации генетической информации

1. Геном – совокупность наследственного материала (ДНК), заключенного в гаплоидном наборе хромосом клеток данного вида организмов.

2. Транскриптом – совокупность всех транскриптов (РНК), синтезируемых одной клеткой, группой клеток или организмом, включая мРНК и некодирующие РНК.

3. Протеом – термин для обозначения совокупности белков (протеинов) организма.

4. Метаболом – представляет собой полный набор низкомолекулярных метаболитов (таких как промежуточные продукты обмена веществ, гормоны и другие сигнальные молекулы, и вторичные метаболиты), которые могут быть найдены как в биологическом образце, так и в единичном организме.

Разнообразие геномов

1. Чёткая корреляция между размером генома и генетической сложностью отсутствует.

2. Минимальный размер генома возрастает пропорционально увеличению сложности организма.

3. Размеры геномов могут сильно варьировать даже в пределах одного таксона.

4. Общее количество ДНК в гаплоидном геноме является характерной чертой каждого вида и называется величиной *C*.

В среднем можно ориентироваться на количество генов у различных организмов: паразитирующие бактерии – 500, свободноживущие бактерии – 1500, многоклеточные эукариоты, содержащие около 1000 клеток – 13000, высшие растения 25000, млекопитающие 20000-30000 генов.

Заключение по классическим методам исследования генома

1. У эукариот только 1% генома человека состоит из кодирующих регионов.

2. Экзоны, кодирующие белки, составляют около 5% от общей длины гена.

3. Геном человека содержит от 20000 до 25000 генов.

4. Около 60% генов человека могут экспрессироваться по механизму альтернативного сплайсинга, когда по программе одного гена синтезируются до 10 белков.

5. Протеом человека представлен 50000-60000 различных полипептидных цепей.

Проект FANTOM

Проект был начат в 2000 году. Целью проекта являлось составление карты генов, работающих в различных тканях и клетках млекопитающих, в первую очередь человека.

В результате масштабных исследований была составлена карта, на которой можно увидеть не только где и какие гены работают и как они регулируются, но и понять, как те или иные клетки обретают свою индивидуальность. Составленный атлас имеет огромный потенциал для науки и медицины.

В основу проекта FANTOM положен Кэп-анализ.

Кэп-анализ экспрессии генов (Cap Analysis Gene Expression, CAGE) - технология исследования генной активности, которую используют в 114 лабораториях в 20 странах, разработана в 90-х годах XX века группой ученых Японского института физико-химических исследований под руководством Йошихиде Хайяшизаки.

Это методика, с помощью которой можно определять последовательности ДНК, с которых начинается считывание генов. Длина и состав этих начальных участков позволяет судить об активности того или иного гена, а также о том, какие элементы регулируют его экспрессию.

КЭП-технология включает следующие этапы

1. Сначала фиксируется экспрессия начальных сайтов каждого гена (промоторы). Затем регистрируется сколько раз происходило считывание каждого нуклеотида. Далее строится частотная диаграмма «активности» выбранного участка.

2. Эта диаграмма анализируется статистически: значимые пики отделяются от незначимых.

3. В результате получается ряд пиков, которые отражают активность участков промоторов и их регуляторных элементов.

4. Для каждого гена (то есть его промотора) в разных типах клеток и тканей такие диаграммы имеют свои индивидуальные черты.

Таким путем было выявлено около 3,49 млн пиков у человека и 2,088 млн – в тканях мыши.

Например, начальный участок считывания гена *B4GALT1*. Это участок из 266 нуклеотидов, который был поделен на 6 групп. Каждой группе соответствовал пик числа считанных нуклеотидов, проявляющийся устойчиво в разных условиях.

Картина проявления пиков специфическая по окраске для разных типов клеток: Т-клетки CD4⁺ (синие), моноциты (желтые), клетки гладкой мускулатуры аорты (зеленые), культура раковых клеток коры надпочечников (красные) и т.д.

Значение проекта

1. Специфическую активность в различных типах клеток и тканей определяют промоторы, которые запускают работу гена, а также энхансеры – усилители генной экспрессии.

2. В результате проекта FANTOM удалось идентифицировать более 180 000 промоторов и 44 000 энхансеров в 180 типах клеток человека. Выяснилось, что регуляция степени транскрипции специфична для определенных типов клеток и в каждой из них реально функционирует совсем немного генов.

3. Кроме того, был составлен атлас активности 1500 регуляторных белков в разных клетках. Это своего рода наглядная глобальная база данных в отношении регуляции. Теперь можно увидеть не только где и какие гены работают, но и как они регулируются – то есть понять, как те или иные клетки обретают свою индивидуальность.

Многие промоторы в клетках млекопитающих составлены из нескольких точек (сайтов) начала считывания. Определяющим для клетки оказывается, с какого из них начинается считывание. В каждой конкретной клетке реально работают

лишь некоторые гены. Важно, что эволюция тканеспецифичных участков промоторов шла быстрее и иными путями, чем неспецифичных участков. Неспецифические участки оказались относительно консервативными.

На эмблеме проекта FANTOM обозначены главные цели и главные достижения коллектива: атлас экспрессии промоторов, атлас энхансеров (регуляторных элементов), атлас коэкспрессии генов в клетках (рисунок 45 см. Приложение).

Контрольные вопросы:

1. Перечислите и охарактеризуйте основные виды ДНК.
2. Опишите геном митохондрий.
3. Назовите уровни реализации генетической информации.
4. В чем заключается методический подход оценки экспрессии генов в проекте FANTOM?
5. Каково значение проекта FANTOM?

Тема 8

ЯДРО КЛЕТКИ И КОНТРОЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Ядро клетки

Функции ядра:

1. хранение генетической информации;
2. размножение клеток и передача генетического материала поколениям;
3. участие в синтезе белков.

Ядро в интерфазе:

В интерфазе клеточного цикла ядро обеспечивает:

- 1) синтез рРНК, мРНК и рРНК;
- 2) формирование субъединиц рибосом.

В интерфазе в составе ядра обнаруживаются оболочка (нуклеолема), хроматин, нуклеоплазма, ядрышко. При подготовке клетки к делению (S-фаза) ядро удваивает содержание ДНК.

Нуклеолема

Нуклеолема (ядерная оболочка) – сложное образование, отделяющее содержимое ядра от цитоплазмы и других элементов живой клетки. Она состоит из внутреннего и наружного листков, между которыми находится перинуклеарное щелевидное пространство. Наружный листок нуклеолеммы со стороны гиалоплазмы окружен сетью виментиновых промежуточных филаментов и имеет на своей поверхности рибосомы, прикрепленные к ней большими субъединицами. Внутренний листок – гладкий и образует связи с пластинкой (ламиной) ядра и участвует в фиксации интерфазных хромосом. Нуклеолема выполняет следующие функции: формообразовательную и рецепторно-барьерно-транспортную.

Строение оболочки ядра представлено на рисунке 46 (см. Приложение).

В ядерной оболочке расположены ядерные поровые комплексы. Ядерная пора позвоночных включает: цитоплазматическое кольцо, ядерную корзину, 8 цитоплазматических филаментов и центральный транспортер. Размер ядерных пор и их структура стандартны для всех клеток эукариот. Число ядерных пор зависит

от метаболической активности клеток: чем выше уровень синтетических процессов в клетке, тем больше пор на единицу площади поверхности клеточного ядра.

Перинуклеарное пространство

Перинуклеарное пространство прерывается множеством пор. Они представляют собой сквозные туннели, сообщающие содержимое ядра и гиалоплазмы. Стенка пор образована слившимися листками нуклеолеммы. В области пор отсутствует гетерохроматин. Диаметр ядерных пор – около 90 нм. Поровые туннели заполнены поровыми комплексами, состоящими из трех компонентов: поровых колец, центральных спиц и центральной гранулы.

Ядерная пластинка (ламина)

Внутренняя ядерная мембрана связана с тонким волокнистым белковым слоем – ядерной ламиной, состоящей из белков ламинов, относящихся к полипептидам, образующим промежуточные 10 нм филаменты цитоплазмы. Густая сеть фибрилл ядерной ламины обеспечивает целостность ядра. С внутренней стороны к ламине крепятся петли хроматина, заполняющего ядро.

Ядерная пластинка: а) лежит на внутренней поверхности оболочки ядра и состоит из перпендикулярных друг другу волокон.

Транспорт цитоплазма↔ядро

Ядерная оболочка пропускает пассивно ионы и мелкие молекулы (сахара, нуклеотиды, АТФ и др.) по градиенту концентрации, осуществляет активный избирательный транспорт крупных молекул белков и рибонуклеопротеидов через ядерные поры. Клетка HeLa имеет 10 млн рибосом, для ее роста необходимо импортировать в ядро 560000 рибосомальных белков и экспортировать 14000 рибосомальных субъединиц за каждую минуту.

Импорт белков из цитоплазмы в ядро включает несколько стадий: переносимая молекула связывается с рецептором и комплекс (NLS+рецептор импортин α/β) связывается с цитоплазматическим филаментом ядерной поры; происходит перенос комплекса в ядро; при взаимодействии с Ran-ГТФ комплекс диссоциирует, переносимый белок остается в ядре, а Ran-ГДФ+импортин- β и импортин- α возвращаются в цитозоль.

Экспорт мРНК из ядра: пре-мРНК содержит экзоны и интроны; осуществляется вырезание интронов (сплайсинг с участием белков EJC и Aly); связь зрелой мРНК с белком TAP обеспечивает перенос через пору; в цитоплазме вспомогательные белки отщепляются и мРНК готова к трансляции.

Эухроматин и гетерохроматин

Хроматин интерфазных ядер представляет собой деконденсированные хромосомы. Зоны полной деконденсации их участков морфологи называют эухроматином.

При неполном разрыхлении хромосом в интерфазном ядре видны участки конденсированного хроматина, иногда называемого гетерохроматином.

Чем «диффузнее» распределен хроматин в интерфазном ядре (т.е. чем больше эухроматина), тем интенсивнее в нем протекают синтетические процессы.

Максимально конденсирован хроматин во время митотического деления клеток, когда он обнаруживается в виде плотных митотических хромосом. В этот период хромосомы не выполняют никаких синтетических функций.

При частичной или полной деконденсации хромосом в интерфазном ядре происходят процессы транскрипции и редупликации.

С помощью электронного микроскопа в хроматине видны элементарные хромосомные фибриллы толщиной 20-25 нм. Фибриллы хроматина представляют собой сложные комплексы дезоксирибонуклеопротеидов (ДНП), в состав которых входят ДНК и специальные хромосомные белки (гистоновые и негистоновые) и РНК в соотношении 1:1,3:0,2.

Среди хромосом человека самая большая первая хромосома содержит ДНК с общей длиной до 7 см. Суммарная длина молекул ДНК во всех хромосомах одной клетки человека составляет около 170 см.

Нуклеосомы

Белки хроматина составляют 60–70% от его сухой массы. К ним относятся гистоны и негистоновые белки. Негистоновые белки составляют 20% от количества гистонов. Гистоны – щелочные белки, обогащенные основными аминокислотами (главным образом лизином и аргинином, обеспечивающими общий положительный заряд). Гистоны расположены по длине молекулы ДНК не равномерно, а в виде блоков. В один такой блок (белковая основа нуклеосомы) входят 8 молекул гистонов (по две молекулы H2A, H2B, H3, H4). После обвивания этих белков отрицательно заряженной двухцепочечной ДНК (1,8 оборота, 146 п.н.) формируется нуклеосома. Размер нуклеосомы около 10 нм, между нуклеосомами линкерная ДНК диаметром 2 нм и связана она снаружи гистонового ядра гистоном H1. Межнуклеосомный разрыв ДНК – причина апоптоза. При образовании нуклеосом происходит компактизация ДНК примерно в 5 раз.

Второй уровень компактизации: образование 30 нм – фибриллы.

Высший уровень организации хроматина – хроматиновые петли. Они выявляются, если из митотической хромосомы удалить гистоны сульфатом декстрана.

На рисунке 47 (см. Приложение) показаны все уровни организации хромосомы: ДНК → нуклеосома → филамент-10 нм → фибрилла-30 нм → петлевые домены → метафазная хромосома.

Эпигенетический контроль экспрессии генов

В 1942 году Конрад Уоддингтон (Conrad Hal Waddington) ввел термин «эпигенетика», который означает «изменения фенотипа при отсутствии изменений генотипа». Спустя 75 лет стало известно, что эпигенетические механизмы преобразуют экспрессию генов не изменяя последовательность ДНК, а воздействуя на хроматин, представляющий собой адаптированную к физиологии организма форму хранения генетической информации. Эпигенетические механизмы дополняют генетический код ДНК и стабилизируют программы экспрессии генов, тем самым обеспечивая идентичность клеток одного типа.

Анализ эпигенома

Метод иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием нового поколения (ChIP-seq) обеспечил возможность анализа эпигенома с разрешением примерно в одну пару оснований и позволил проводить «эпигеномное профилирование» как нормальных, так и аномальных клеток, и тканей. Определены ферменты, участвующие в регуляции состояний хроматина, которые стимулируют (эухроматин) или подавляют (гетерохроматин) активность генов. Исследованы эпигенетические механизмы стабилизации хроматина, регуляции генов,

транскрипционном сайленсинге («выключении» гена) и обратимости как модификации гистонов, так и метилирования ДНК.

Гипотеза гистонового кода

Система эухроматин ↔ гетерохроматин контролирует экспрессию генов с помощью двух механизмов):

– цис-механизмы (ацетилирование) за счет отрицательного заряда ацетильной группы уменьшают положительный заряд гистонов и ослабляют прочность связей с ними отрицательно заряженных цепей ДНК;

– транс-механизмы связывания включают действие эффекторных белков.

N-концевые аминокислотные остатки гистонов могут ацетилироваться, метилироваться или фосфорилироваться, что влияет на функции хроматина. Например, метилирование лизина 9 в гистоне H3 ведет к конденсации хроматина и репрессии транскрипции, а ацетилирование – к деконденсации хроматина и экспрессии генов.

Эпигенетический барьер для репрограммирования

Эпигенетический контроль крайне важен для поддержания идентичности клеток одного типа и процесса клеточного репрограммирования. Прорывное исследование по репрограммированию показало, что одновременное воздействие нескольких определенных транскрипционных факторов (в настоящее время известных как «Yamanaka factors») («факторы Яманаки») при экспрессии в дифференцированных и зрелых соматических фибробластах индуцирует плюрипотентность и приводит к образованию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК).

Рак и эпигенетическая терапия

Хроматин раковых клеток более хрупок, чем хроматин нормальных, и обладает более высоким уровнем «эпигенетического шума», что объясняет, почему раковые клетки более восприимчивы к лечению эпигенетическими ингибиторами в сочетании с лучевой терапией. Записывающие, и стирающие гистон-модифицирующие ферменты оказались привлекательными лекарственными мишенями в онкологии. Выявляется все больше хроматин-ассоциированных РНК (например, энхансерные РНК, повторяющиеся РНК), которые инициируют переход хроматина в различные состояния и стабилизируют их, даже в случае аллелей с одинаковой последовательностью ДНК. Фактически, РНК можно рассматривать как одну из «главных молекул» эпигенетического контроля, что обосновывает новые пути терапии рака.

Контрольные вопросы:

1. Какое строение имеет оболочка ядра?
2. Опишите функционально-структурную роль эухроматина и гетерохроматина.
3. Что такое гипотеза гистонового кода?
4. Для чего необходим эпигенетический контроль экспрессии генов?
5. Как используется эпигенетическая терапия в лечении рака?

Тема 9

РЕПЛИКАЦИЯ И РЕПАРАЦИЯ ДНК

Репликация – процесс передачи генетической информации от ДНК к ДНК. Протекает в S-фазу клеточного цикла. Репликация происходит полуконсервативным способом. Полуконсервативный способ означает, что цепи материнской молекулы ДНК расходятся и каждая служит матрицей для синтеза новой комплементарной последовательности. Две образовавшиеся двуспиральные молекулы ДНК, каждая из которых состоит из одной родительской и одной вновь синтезированной комплементарной цепи, распределяются между двумя дочерними клетками (рисунок 48 см. Приложение).

Описание опыта Мезельсона и Сталя

E.coli выращивали в течение ряда поколений на среде, содержащей в качестве единственного источника азота хлористый аммоний (NH_4Cl) с «тяжелым» изотопом ^{15}N . Вследствие этого все азотсодержащие соединения, в том числе и основания ДНК, включали этот изотоп в свой состав. Затем *E.coli* переносили на среду, в которой находился NH_4Cl с изотопом ^{14}N . После первого деления обе молекулы ДНК содержали одну «легкую» и одну «тяжелую» цепи. После второго удвоения образовались две молекулы «легкой» ДНК и две гибридные (одна «легкая» и одна «тяжелая» цепи).

Условия необходимые для репликации

1. Матрица, которой является неспаренная цепь ДНК.
2. Субстраты синтеза, которыми являются дезоксинуклеозидтрифосфаты (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, ТТФ).

Синтез идет по схеме: $d(\text{НМФ})_n + d\text{НТФ} = d(\text{НМФ})_{n+1} + \text{PP}_n$, где $d(\text{НМФ})_n$ – ДНК до удлинения, $d(\text{НМФ})_{n+1}$ – ДНК после удлинения, $d\text{НТФ}$ – дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, PP_n – пирогосфат.

Нуклеозидтрифосфаты необходимы в качестве источника энергии, т.к. при расщеплении пирогосфата выделяется энергия для образования фосфодиэфирных связей.

3. Ферменты и белковые факторы, участвующие в синтезе ДНК:

3.1. ДНК-полимеразы I и III (у прокариот), которые участвуют в образовании 3',5'-фосфодиэфирных связей и обладают 3'→5' и 5'→3' экзонуклеазными активностями; ДНК-полимераза II, IV и V, участвуют в специфической репарации; у эукариот найдено пять типов ДНК-полимераз: α , ϵ , β , γ и δ .

3.2. DnaA-белок – узнает участок начала репликации.

3.3. DnaB-белок (хеликаза) – расплетает двойную спираль ДНК.

3.4. DnaC-белок – необходим для присоединения хеликазы к месту инициации синтеза.

3.5. ДНК-связывающий белок – стабилизирует расплетенные одноцепочечные участки ДНК и повышает активность хеликазы.

3.6. ДНК-гираза (топоизомераза II) вводит отрицательные супервитки в ДНК, выполняя функцию шарнира при продвижении репликационных вилок.

3.7. Праймаза (ДНК-зависимая РНК-полимераза, dnaG-белок) синтезирует РНК-затравку (праймер).

3.8. ДНК-лигаза - соединяет концы фрагментов ДНК.

Репликацию ДНК осуществляет сложный ферментный комплекс, состоящий из 15–20 различных белков, называемый реплисомой.

Репликон — это участок ДНК, который содержит сайт инициации репликации. Геномы бактерий, как правило, представляют собой один репликон, это значит, что репликация всего генома является следствием всего одного акта инициации репликации. Геномы эукариот (а также их отдельные хромосомы) состоят из большого числа самостоятельных репликонов, это значительно сокращает суммарное время репликации отдельной хромосомы.

Молекулярные механизмы, которые контролируют количество актов инициации репликации в каждом сайте за один цикл деления клетки, называются контролем копийности.

Стадия инициации

Репликация ДНК у *E.coli* начинается в области начала репликации, которая называется *oriC*. Два гексамера *dnaB*-белка присоединяются к каждой цепи ДНК и действуют как хеликазы (*helix* - спираль), расплетая в обоих направлениях ДНК. На разделение каждой пары оснований расходуется энергия гидролиза двух молекул АТФ. К каждой из разделившихся цепей прочно присоединяются несколько молекул ДНК-связывающего белка (SSB белок – *single strand binding*), которые препятствуют обратному восстановлению цепей.

Синтез праймера

В каждой репликативной вилке выделяют 3' и 5' концы. Синтез дочерних нитей ДНК происходит всегда в направлении 5'→3'. Стадия инициации завершается синтезом праймера – короткого фрагмента РНК, состоящего из 10-60 рибонуклеотидов, комплементарных одной из цепи матричной ДНК. Синтез праймера осуществляется ферментом ДНК-зависимой-РНК-полимеразой или праймазой. Синтез праймера необходим для фермента ДНК-полимеразы III, который не может начать синтез дочерней нити ДНК на "пустом" месте; 3'-ОН группа концевой рибонуклеотида праймера служит затравкой для синтеза ДНК под действием ДНК-полимеразы.

При расплетании ДНК возникает проблема ее суперскручивания выше места расплетения. Поэтому у прокариот хеликазе помогает фермент ДНК-гираза (семейство топоизомераз). Гираза выполняет функцию шарнира: он обеспечивает кратковременный разрыв одной из цепи ДНК, быстро восстанавливаемый с высокой точностью после одного или нескольких оборотов вокруг второй цепи. В результате расплетения молекулы ДНК образуется репликационный пузырь, который состоит из 2 репликативных вилок.

Процесс репликации происходит в обеих репликативных вилках, но имеет противоположное направление, что обусловлено антипараллельностью двух полинуклеотидных цепей ДНК.

Элонгация репликации

К 3'-ОН группе праймера присоединяется ДНК-полимераза III которая по принципу комплементарности синтезирует дочернюю цепь ДНК в направлении 5'→3'. Точность синтеза определяется тем, что фермент ДНК-полимераза III катализирует образование фосфодиэфирной связи только в том случае, если основание предыдущего нуклеотида комплементарно соответствующему основанию матрицы. Если не произошло образование водородных связей между присоединенным нуклеотидом и матрицей, фермент возвращается, вырезает неправильный нуклеотид с 3'-конца цепи

за счет экзонуклеазной активности, после чего ДНК-полимераза продолжает присоединять правильные нуклеотиды в направлении 5'→3'.

У *E.coli* частота ошибок составляет 1 на 10^9 - 10^{10} присоединенных нуклеотидов. Хромосомы *E.coli* содержат $4,6 \times 10^6$ пар нуклеотидов. Следовательно, частота ошибок составляет 1 на 1 000 – 10 000 репликаций. Фермент распознает неправильные пары по геометрии их взаимодействия (углы) (рисунок 49 см. Приложение).

Лидирующая и запаздывающие цепи

Если направление синтеза дочерней цепи ДНК и направление движения репликативной вилки совпадают, то цепь синтезируется непрерывно и называется лидирующей.

Если направление синтеза ДНК и движение репликативной вилки не совпадают – цепь синтезируется фрагментами и называется запаздывающей.

Фрагменты, синтезированные в запаздывающей цепи, называются фрагментами Рейджи Оказаки и состоят из 1000-2000 нуклеотидов у прокариот и 100-200 нуклеотидов у эукариот.

Координация синтеза лидирующей и запаздывающей цепей ДНК

Образование петли, запаздывающей цепью позволяет димерному холоферменту ДНК-полимеразы III одновременно и в одном направлении синтезировать обе дочерних цепи ДНК (на запаздывающей цепи после синтеза праймера) (по А. Корнбергу) (рисунок 50 см. Приложение).

Замена праймера на цепь ДНК и сшивание фрагментов Оказаки

После завершения синтеза фрагмента Оказаки РНК-затравка (праймер) удаляется нуклеотид за нуклеотидом с помощью 5'→3' экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы I. По мере отщепления рибонуклеотидных мономеров каждый из них замещается на соответствующий дезоксирибонуклеотид в ходе полимеразной реакции, осуществляемой ДНК-полимеразой I (при этом в качестве затравки используется 3'-конец предыдущего фрагмента Оказаки). Новый фрагмент Оказаки присоединяется к запаздывающей цепи ДНК с помощью фермента ДНК-лигазы.

Стадия терминации репликации

Терминация синтеза ДНК наступает вследствие исчерпания матрицы. У хромосомы *E.coli* две репликативные вилки содержат область терминации, состоящий из копий 20 пар нуклеотидов и называемый Ter (terminus).

Репликационные пузыри сливаются, молекулы дочерней цепи ДНК сшиваются ДНК-лигазой и на каждой матрице образуется дочерняя цепь ДНК.

Вновь синтезированная ДНК компактизуется в виде новых нуклеосом.

Репарация ДНК

Британец Томас Линдаль, американец Пол Модрич и американец Азиз Санджап были удостоены Нобелевской премии по химии в 2015 года за исследование механизмов репарации ДНК.

Известны четыре типа повреждений ДНК:

1. Затрагивающие единичные нуклеотиды: депуринизация; дезаминирование цитозина до урацила; дезаминирование аденина до гипоксантина; алкилирование оснований; вставка или делеция нуклеотида; включение основания-аналога.

2. Затрагивающие пару нуклеотидов: УФ-индуцируемое образование тимин-новых димеров; поперечные сшивки бифункциональным алкилирующим агентом.

3. Разрывы цепей: ионизирующая радиация; радиоактивная дезинтеграция каркаса ДНК.

4. Поперечные сшивки: между основаниями одной цепи или разных цепей; между ДНК и молекулами белка (например, гистонами).

Повреждение ДНК под воздействием факторов окружающей среды, а также нормальных метаболических процессов, происходящих в клетке, происходит с частотой от нескольких сотен до 1000 случаев в каждой клетке, каждый час. Поэтому имеются системы репарации (восстановления) ДНК.

Системы репарации

Каждая из систем репарации включает следующие ферменты:

ДНК-хеликаза – фермент, «узнающий» химически изменённые участки в цепи и осуществляющий разрыв цепи вблизи от повреждения;

экзонуклеаза – фермент, удаляющий повреждённый участок;

ДНК-полимераза – фермент, синтезирующий соответствующий участок цепи ДНК взамен удалённого;

ДНК-лигаза – фермент, замыкающий последнюю связь в полимерной цепи и тем самым восстанавливающий её непрерывность.

Прямая репарация

Прямая репарация – наиболее простой путь устранения повреждений в ДНК. Участвуют ферменты, способные быстро (как правило, в одну стадию) устранять соответствующее повреждение, восстанавливая исходную структуру нуклеотидов. Так действует Об-метилгуанин-ДНК-метил-трансфераза, которая снимает метильную группу с азотистого основания на один из собственных остатков цистеина.

Эксцизионная репарация

Эксцизионная репарация (*excision* – вырезание) включает удаление повреждённых азотистых оснований из ДНК и последующее восстановление нормальной структуры молекулы по комплементарной цепи. Ферментативная система удаляет короткую одноцепочечную последовательность двухцепочечной ДНК, содержащей ошибочно спаренные или поврежденные основания, и замещает их путём синтеза последовательности, комплементарной оставшейся нити. Эксцизионная репарация включает три этапа:

1. Измененный участок ДНК распознается и удаляется при помощи ферментов ДНК-репарирующих эндонуклеаз.

2. ДНК-полимераза I связывается с 3'-концом поврежденной цепи ДНК и заполняет брешь, присоединяя нуклеотиды друг за другом комплементарно неповрежденной цепи ДНК.

3. ДНК-лигаза сшивает фрагменты ДНК и, тем самым, завершает восстановление структуры ДНК.

Пострепликативная репарация

Тип репарации, имеющей место в тех случаях, когда процесс эксцизионной репарации недостаточен для полного исправления повреждения. После репликации с образованием ДНК, содержащей поврежденные участки, образуются одноцепочечные бреши, заполняемые в процессе гомологичной рекомбинации при помощи белка RecA. Восстановление разрыва двух цепей: белок Ku находит место разрыва и прикрепляется, затем присоединяется белок DNA-PKcs, который фосфорилирует белки и затем ДНК-лигаза IV сшивает две цепи.

SOS-репарация

Осуществляется индуцибельными ферментами. Этот механизм включается для спасения клетки в условиях, когда нарушения ДНК реально угрожают ее жизнеспособности: при этом снижается скорость репликации, что делает процесс репарации более эффективным; блокируется деление клеток; индуцируется синтез ряда белков, в частности, белков теплового шока.

Действие SOS-репарации носит кратковременный характер, и примерно через 40-60 мин она переключается на конститутивную репарацию. SOS-система – защитная система, включающаяся в клетке в ответ на повреждения ДНК, произошедшие в клеточном цикле и не устранённые при репарации ДНК, и начало мутагенеза. Система включает в себя белок RecA (Rad51 у эукариот). Белок RecA, стимулированный одноцепочечной ДНК, участвует в инактивации репрессора LexA и, таким образом, запускает SOS-систему. Эта система репарации нередко допускает ошибки.

Контрольные вопросы:

1. В чем заключался опыт Мезельсона и Сталя?
2. Перечислите условия необходимые для репликации.
3. Назовите и охарактеризуйте стадии репликации.
4. Какие типы повреждений ДНК существуют?
5. Назовите типы и основные механизмы репарации ДНК?

Тема 10

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК

Клеточный цикл у эукариот

У животных клеток интервал между митозами (клеточный цикл, точнее митотический цикл) составляет примерно 10-24 ч. За это время клетка проходит четыре фазы жизненного цикла: G₁-фазу начального роста, S-фазу удвоения молекул ДНК, G₂-фазу роста, M-фазу клеточного деления (рисунок 51 см. Приложение). В G₁-фазе, продолжительность которой может сильно варьировать, происходит синтез мРНК, белков и других компонентов клетки. Клетки, которые прошли дифференцировку и больше не делятся, постоянно находятся в фазе покоя G₀. При стимуляции митогенами (например, ростовыми факторами, онкогенными вирусами) покоящиеся клетки могут вернуться в состояние, свойственное фазе G₁. Если такие клетки пройдут критическую *точку*, они вступают в S-фазу. G₂-фаза является конечным этапом подготовки клетки к делению. Совокупности фазы G₁, G₀, S и G₂ носят название интерфазы. В клеточном цикле интерфаза сменяется существенно более короткой фазой митоза (M).

Регуляция клеточного цикла

Регуляция клеточного цикла осуществляется посредством обратимого фосфорилирования/дефосфорилирования регуляторных белков. Ключевым белком, регулирующим вступление клетки в митоз (G₂/M-переход), является специфическая серин/треонин-протеинкиназа, которая носит название фактор созревания [ФС (MPF, от англ. maturation promoting factor)]. В активной форме фермент (фактор созревания) катализирует фосфорилирование многих белков, принимающих участие в митозе (гистон H1, ламин – компонент цитоскелета, обнаруженный в ядерной мембране, факторы транскрипции, белки митотического веретена и ряд ферментов). Фосфорилирование этих белков запускает процесс митоза.

Колебания MPF-активности и циклина в процессе клеточного цикла представлены на рисунке 52 (см. Приложение).

Фактор созревания

Фактор созревания – гетеродимерный фермент, включающий:

- 1) регуляторную субъединицу, циклин;
- 2) каталитическую субъединицу, циклинзависимую киназу [ЦЗК (CDK от англ. cyclin dependent kinase) или p34^{cdc2}; 34 кДа].

Активной формой фермента является лишь димер ЦЗК+циклин.

Завершение митоза

После завершения митоза регуляторная субъединица ФС, циклин, метится убиквитином и подвергается протеолизу (расщеплению). Затем действуют протеинфосфатазы, которые дефосфорилируют белки, принимавшие участие в митозе, после чего клетка возвращается в состояние интерфазы.

Итак: **включение митоза – фосфорилирование, завершение митоза – дефосфорилирование белков.**

Регуляция фаз митоза

В клетках позвоночных присутствует ряд различных циклинов и циклинзависимых киназ. Разнообразные сочетания двух субъединиц фермента регулируют запуск митоза, начало процесса транскрипции в G1-фазе, переход критической точки после завершения транскрипции, начало процесса репликации ДНК в S-периоде интерфазы (стартовый переход) и другие ключевые переходы клеточного цикла.

Регуляция клеточного цикла у дрожжей представлена на рисунке 53 (см. Приложение).

Циклины и Cdk-киназы клеточного цикла

G₁ начало – активность Cdk низкая (образуются пререпликационные комплексы на ДНК (ori)).

G₂ середина – активность Cdk проявляется за счет ассоциации Cdk4 и Cdk6 с циклинами D1, D2 и D3 → фосфорилирование белка Rb, который вызывает экспрессию генов циклинов E и A, Cdk1 и белков репликации.

Переход G₁-S – необходимы комплексы циклин E-Cdk2 и циклин A-Cdk2, (для начала репликации).

Переход G₂-M требует комплексов циклин A-Cdk1 и циклин B1-Cdk1 (служат для фосфорилирования белков цитоскелета, гистонов и белков оболочки ядра).

Стадии митоза растительной клетки

1. *Профаза*: компактные митотические хромосомы, состоят из двух хроматид, связанных в центромере; митотическое веретено организовано; эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и оболочка ядра фрагментированы, цитоскелет не собран.

2. *Прометафаза*: кинетохоры хромосом связаны с микротрубочками и движутся к экватору веретена.

3. *Метафаза*: хромосомы располагаются в экваторе веретена.

4. *Анафаза*: центромеры расщепляются, хромосомы разделяются и движутся к полюсам веретена.

5. *Телофаза*: хромосомы собираются у полюсов веретена и диспергируются. Вокруг собирается оболочка ядра. Воссоздаются эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи. Дочерние клетки формируются путем цитокинеза.

Модель разрушения ядерной оболочки

Цитоплазматические моторы-динеины во время профазы и ранней метафазы перемещают ядерную оболочку по микротрубочкам в сторону centrosомы, что ведет к ее напряжению и фрагментации.

В процессе митоза формируются митотические хромосомы. В них цепи ДНК связываются специальными белками когезином и конденсином. Митотические хромосомы служат для переноса генетической информации и не функционируют для синтеза полипептидных цепей (экспрессия генов на этой стадии ДНК в виде гетерохроматина отсутствует). Каждая митотическая хромосома включает пару сестринских хроматид, связанных белковым комплексом кохезина.

Центросомный цикл животной клетки

В начале G_1 фазы centrosома содержит две центриоли под прямым углом; в S-фазе формируются пара дочерних центриолей; дочерние центриоли растут в G_2 -фазе; в начале митоза разделяются 2 centrosомы, содержащие по две центриоли. В прометафазе происходит выравнивание положения хромосом за счет полимеризации-деполимеризации микротрубочек. Образование митотического веретена происходит в профазе. Митотическое веретено образуется двумя centrosомами, между которыми располагаются микротрубочки, состоящие из белка тубулина. В опухолевой клетке может возникать более двух centrosом, формируется мультиполярное веретено, что обеспечивает перемещение аномального числа хромосом.

Митотическое веретено животной клетки

Каждый полюс веретена содержит пару центриолей, окруженных перичентриольным материалом, из которого формируются микротрубочки. Имеется три типа волокон веретена – астральные, хромосомальные и полярные. Все микротрубочки веретена (их может быть тысячи) имеют знак «минус» по направлению к centrosоме.

Протеинкиназы ATR (при действии УФО – образование тиминовых димеров) и ATM (при радиации – разрыв цепей ДНК) включают сигнальные пути остановки клеточного цикла.

Чек-поинты (the spindle checkpoint), т.е. отметка (контрольная точка), отменяют следующую стадию клеточного цикла: переход $G_1 \rightarrow S$, $G_2 \rightarrow M$, прометафаза митоза. Например, присутствие белка Mad2 на кинетохоре хромосомы не позволит хромосоме занять свое место в метафазной пластинке, что будет препятствовать началу анафазы митоза. Наиболее важным чек-поинтом является переход $G_1 \rightarrow S$. Если в стадии G_1 ДНК содержит превышающий определенный уровень повреждений, клетка не поступает в стадию S, возвращается в стадию G_1 для репарации ДНК и попытка повторяется. Если уровень мутаций не удалось снизить, клетка направляется для уничтожения по механизму апоптоза, поскольку недопустимо передавать дочерним клеткам измененную мутациями ДНК. При опухолевой трансформации клеток происходят два процесса: 1) клетка приобретает способность преодолевать контрольный пункт $G_1 \rightarrow S$ и 2) клетка делается способной ускользать от апоптоза.

Контрольные вопросы:

1. Опишите клеточный цикл у эукариот.
2. Какова роль циклинзависимых киназ и циклинов?
3. Назовите основные контрольные пункты (чек-поинты) митоза.
4. Охарактеризуйте centrosомный цикл эукариотической клетки.
5. Какие свойства отличают опухолевую клетку от нормальной при митотическом делении?

Тема 11

КОММУНИКАЦИИ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ: КЛЕТОЧНЫЙ СИГНАЛИНГ И ТРАНСДУКЦИЯ (ПЕРЕДАЧА) СИГНАЛА

Сигнальные молекулы

Для координации функций клеток многоклеточного организма служат две группы веществ: утилизируемые молекулы и сигнальные молекулы. Необходимым условием существования, роста, развития, адаптации и воспроизведения многоклеточного организма является информационный обмен между его клетками с помощью сигнальных веществ. Сейчас известно несколько сотен сигнальных молекул, включая гормоны. Граница между утилизируемыми и сигнальными молекулами часто условна. Например, в β -клетках островков Лангерганса поджелудочной железы, секретирующих инсулин, глюкоза является как источником энергии, так и сигналом для усиления биосинтеза инсулина.

Гормонпродуцирующие клетки регулируют другие клетки. Например, инсулин обеспечивает синтез гликогена, жира и белков (анаболический эффект); глюкагон обеспечивает распад гликогена, жира и белков (катаболический эффект).

Гормоны (сигнальные молекулы) – вещества органической природы, которые:

- 1) вырабатываются в специализированных клетках желез внутренней секреции;
- 2) поступают в кровь или лимфу;
- 3) взаимодействуют с клетками-мишенями, оказывая влияние на обмен веществ и физиологические функции.

Гормоны центральных и периферических желез человека представлены на рисунке 54 (см. Приложение).

Во внеклеточной жидкости гормоны присутствуют в очень низкой концентрации – в 10^6 - 10^9 раз ниже содержания других структурно сходных соединений (стеролов, аминокислот, пептидов, белков) и иных веществ, которые находятся в крови в концентрации 10^{-5} - 10^{-3} моль/л. Следовательно, клетки-мишени должны отличать данный гормон не только от других гормонов, присутствующих в малых количествах, но и от прочих соединений. Такую высокую избирательность обеспечивают рецепторы. Биологический эффект гормонов начинается с их связывания со специфическими рецепторами, а завершается, как правило, диссоциацией рецептора и гормона.

Свойства рецепторов

- 1) по строению являются гликопротеинами;
- 2) обладают высоким сродством (10^{-11} - 10^{-9} моль/л) к гормону;
- 3) характеризуются высокой специфичностью связывания гормона;
- 4) отличаются насыщенностью при физиологических концентрациях гормона (гиперболический закон связывания);
- 5) характеризуются обратимостью связывания (гормон и рецептор связываются за счет сил гидрофобного и электростатического взаимодействия);
- 6) обладают способностью к трансдукции сигнала.

Рецепторы первого типа

Рецепторы первого типа являются белками, имеющими одну трансмембранную полипептидную цепь. Это аллостерические ферменты (тирозинкиназа,

протеинфосфатаза, гуанилатциклаза), активный центр которых расположен на внутренней стороне мембраны. Внеклеточный домен этого рецептора связывается с гормоном. Ферментативной активностью обладает внутриклеточный домен, который активируется, когда гормон связывается с внеклеточным доменом. К такому типу рецепторов принадлежат рецепторы инсулина, ростовых факторов и цитокинов.

Рецепторы второго типа. Ионные каналы

Эти рецепторы являются олигомерными белками, образующими лиганд-активируемый ионный канал. Эти каналы чаще всего находятся в закрытом состоянии и открываются на короткое время. Связывание лиганда ведет к открытию канала для ионов Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Cl^{-} . По такому механизму осуществляется действие нейромедиаторов, таких как ацетилхолин и γ -аминомасляная кислота.

Рецепторы третьего типа

Рецепторы третьего типа, сопряженные с ГТФ-связывающими белками (7ТМ-рецепторы). Такие рецепторы передают сигнал с помощью G-белков на белки-эффекторы, которые являются ферментами или ионными каналами. В результате изменяется концентрация ионов или вторичных посредников. Различают Gs (стимулирующий), Gi (ингибирующий) и Gq-белки. Ферментами-эффекторами являются аденилатциклаза, гуанилатциклаза, фосфолипаза C, МФ-фосфодиэстераза.

Неэндокринные клетки способны продуцировать сигнальные молекулы (чаще для паракринной регуляции):

- эйкозаноиды (простагландины, тромбоксаны, лейкотриены, простаглицлины);
- разные семейства факторов роста (EGF – эпидермальный фактор роста, FGF – фактор роста фибробластов, PDGF – фактор роста из тромбоцитов, TGF β – трансформирующий фактор β , NGF – фактор роста нервов);
- цитокины – регуляторы воспаления и гемопоэза (интерлейкины, интерфероны, хемокины).

Гормоны насекомых (рисунок 55 см. Приложение)

- экдизоны, гормоны линьки, образующиеся в железах, расположенных в переднегруди насекомых;
- ювенильные гормоны – гормоны насекомых, регулирующие их постадийное развитие. Ювенильные гормоны, способствуя развитию и росту личиночных органов, тормозят метаморфоз, являются антагонистами гормонов экдизонов, стимулирующих линьку и метаморфоз.

Гормоны растений (рисунок 56 см. Приложение).

Ауксин (индол-уксусная кислота) – стимулятор роста плодов (побегов) – фототропизм, гравитропизм.

Цитокинин (зеатин) – стимуляция деления клеток (цитокинез), рост апикальной меристемы побега.

Гиббереллин (гибберелловая кислота) – контроль удлинения гипокотилия, прорастания семян и др.

Абсцизовая кислота – антагонист ауксина, цитокининов, гибберелина.

Этилен – контроль развития проростка, созревание плодов (в частности, фруктов); гормон стресса.

Олигосахарин (гептаглюкозид) – синтез стрессовых метаболитов, или фитоалексинов – защитных веществ, синтезируемых растениями в ответ на заражение их фитопатогенными грибами.

Гормоны могут быть классифицированы по месту синтеза и месту действия на 3 группы:

1) эндокринные гормоны синтезируются эндокринными железами и транспортируются кровью к клеткам-мишеням;

2) паракринные гормоны синтезируются вблизи места их действия;

3) аутокринные гормоны действуют на те же клетки, которые их синтезируют.

Классификация гормонов по химической структуре:

1) пептиды и белки, которые синтезируются в виде больших предшественников и затем подвергаются процессингу и секреции;

2) производные аминокислот (катехоламины и тиреоидные гормоны – производные тирозина, мелатонин – производное триптофана);

3) стероидные гормоны (кортикостероиды и половые гормоны, которые являются производными холестерина);

4) производные жирных кислот (эйкозаноиды);

5) газы (оксид азота).

Классификация гормонов по растворимости:

1) гидрофильные (пептиды, белки, катехоламины);

2) липофильные (стероиды и тиреоидные гормоны).

По механизму действия гормоны классифицируются на 3 группы

1. Гормоны, не проникающие в клетку и имеющие рецепторы на поверхности мембран. Действие этих гормонов на клетку осуществляется через вторичные посредники, образующиеся в клетке после связывания гормона с рецептором. К этим гормонам относятся гидрофильные гормоны – белково-пептидной природы и катехоламины.

2. Гормоны, проникающие в клетку (липофильные гормоны). Свободный гормон легко проходит сквозь плазматическую мембрану любой клетки и, попадая в клетку-мишень, связывается с рецепторами, локализованными в цитоплазме или ядре клетки. Комплекс лиганд-рецептор рассматривается как внутриклеточный посредник действия гормонов этой группы. К этой группе гормонов относят стероидные и тиреоидные гормоны.

3. Гормоны смешанного действия. Рецепторы расположены на поверхности клеток. После связывания гормона с рецептором, комплекс проникает внутрь клетки и оказывает эффект. К этой группе гормонов относится инсулин.

Механизм действия гормонов, проникающих в клетку

Липофильные гормоны (стероидные, ретиноевая кислота, тиреоидные гормоны) диффундируют через плазматическую мембрану и связываются со специфическими рецепторами, расположенными в цитозоле или ядре клеток. Гормон-рецепторный комплекс приобретает способность связываться с хроматином. Гормон-рецепторный комплекс связывается со специфической областью ДНК – гормон-чувствительным элементом (HRE, hormone response element) и активирует или инактивирует специфические гены. Гормон избирательно влияет на транскрипцию генов и продукцию соответствующих мРНК, изменяет через экспрессию генов количество специфических белков и, как следствие, скорость метаболических процессов (первичный ответ генов). В некоторых случаях продукты первичных генов могут активировать другие гены – вторичный ответ генов (рисунок 57 см. Приложение).

Механизм действия гормонов, не проникающих в клетку

Передача гормонального сигнала в клетку не проникающих гормонов осуществляется через мембранные рецепторы. Рецепторы для гормонов этой группы – интегральные мембранные белки, которые связывают сигнальные вещества на внешней стороне мембраны и за счет изменения пространственной структуры генерируют сигналы на внутренней стороне мембраны (рисунок 58 см. Приложение).

Выделяют 3 типа вторичных посредников

- 1) циклические нуклеотиды (цАМФ и цГМФ)
- 2) метаболиты фосфатидилинозитола
- 3) ионы Ca^{2+}

При действии гормона на клетку происходит активация фермента через аденилатциклазный механизм, который является так называемым каскадным регулированием (рисунок 59 см. Приложение). Последовательность событий в данном механизме включает:

- 1) молекула гормона (адреналин) взаимодействует со своим рецептором;
- 2) активный гормон-рецепторный комплекс воздействует на мембранный G-белок;
- 3) G-белок активирует фермент аденилатциклазу;
- 4) аденилатциклаза превращает АТФ в циклический АМФ (цАМФ) – вторичный посредник (мессенджер);
- 5) цАМФ аллостерически активирует фермент протеинкиназу А;
- 6) протеинкиназа А фосфорилирует внутриклеточные белки
- 7) киназа фосфорилазы фосфорилирует фосфорилазу "b" гликогена, последняя в результате превращается в активную фосфорилазу "a";
- 8) активная фосфорилаза "a" гликогена расщепляет α -1,4-гликозидные связи в гликогене с образованием глюкозо-1-фосфата.

Внутриклеточные посредники – продукты распада фосфатидилинозитола представлены на рисунке 60 (см. Приложение).

Фосфатидилинозитольный путь: связывание гормона с рецептором активирует G-белок и фосфолипазу C, которая расщепляет фосфатидилинозитолдифосфат мембраны на диацилглицерол (DG) и инозитолтрифосфат (IP_3). DG вместе с фосфатидилсерином активируют протеинкиназу C, которая фосфорилирует ферменты. IP_3 связывается с рецептором на ЭПР $\rightarrow \text{Ca}^{2+}$ в цитозоль, связывается с кальмодулином (CaM) и активируют Ca^{2+} /CaM-зависимые протеинкиназы.

Роль оксида азота (NO) как эндотелиального расслабляющего фактора (рисунок 61 см. Приложение)

1. Вазодилататоры (например, ацетилхолин, брадикинин) взаимодействуют с эндотелиальными клетками в малых кровеносных сосудах через рецепторы.

2. Посредством фосфатидилинозитольного механизма происходит поступление ионов кальция в цитозоль (действие инозитол-3-фосфата).

3. Ионы кальция активируют NO-синтазу, которая катализирует образование NO из аргинина.

4. NO диффундирует в мышечные клетки.

5. NO ведет к активации в цитозоле гуанилатциклазы, повышающей уровень цГМФ. Этот внутриклеточный посредник стимулирует активность ряда цГМФ-

зависимых протеинкиназ, которые фосфорилируют специфические мышечные белки, ответственные за релаксацию.

6. При введении глицеролтринитрата (нитроглицерина) NO образуется в цепи реакций: глицеролтринитрат → нитрат → нитрит → NO. NO является короткоживущим веществом, его период полужизни в тканях около 4 секунд (реагирует с кислородом и супероксидным радикалом).

Отмена гормонального сигнала реализуется по двум путями: 1) отделение гормона; 2) фосфорилирование цитоплазматической части рецептора и связывание с β -аррестином.

Контрольные вопросы:

1. Перечислите свойства гормонов.
2. По каким принципам классифицируют гормоны?
3. Какие существуют типы рецепторов?
4. Охарактеризуйте важнейшие гормоны растений и насекомых.
5. Опишите механизм действия гормонов, не проникающих в клетку.
6. Опишите механизм действия гормонов, проникающих в клетку.
7. Перечислите этапы активации фермента через аденилатциклазный механизм.
8. Какова роль оксида азота как эндотелиального расслабляющего фактора?

Тема 12

ПРИНЦИПЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

Методы культивирования клеток получили значительное развитие в 1940-х 1950-х годах в связи с исследованиями в области вирусологии. Выращивание вирусов в культурах клеток дало возможность получения чистого вирусного материала для производства вакцин.

Вакцина против полиомиелита стала одним из первых препаратов, массово произведённых с использованием технологии культивирования клеток. В 1954 г. Энлерс, Уэллер и Роббинс получили Нобелевскую премию «За открытие способности вируса полиомиелита расти в культурах различных тканей».

Одна из самых ранних культур клеток человека, полученная от Генриетты Лакс, которая умерла от рака шейки матки в 1951 г. Культура клеток HeLa является модельной (стандартной) и используется до настоящего времени во многих лабораториях мира.

Выделение клеток

Клетки могут быть выделены из крови, но к росту в культуре способны только лейкоциты. Моноядерные клетки могут быть выделены из мягких тканей с помощью ферментов коллагеназы, трипсина, проназы, разрушающих внеклеточный матрикс. Культуры клеток, взятых непосредственно от объекта (*ex vivo*), называются первичными. Большинство первичных клеток, за исключением опухолевых, имеют ограниченный срок использования. После определённого количества делений клетки прекращают делиться, хотя могут при этом сохранить жизнеспособность.

Существуют иммортализованные («бессмертные») линии клеток, способные размножаться бесконечно. У большинства опухолевых клеток эта способность является результатом случайной мутации, но у некоторых лабораторных клеточных линий она приобретена искусственно, путём активации гена теломеразы.

Культивирование клеток

Клетки выращивают в специальных питательных средах, при постоянной температуре. Для культур растительных клеток используется регулируемое освещение. Для клеток млекопитающих обычно необходима также специальная газовая среда, поддерживаемая в инкубаторе клеточных культур. Как правило, регулируется концентрация в воздухе углекислого газа и паров воды, но иногда также и кислорода.

Питательные среды для разных культур клеток различаются по составу, pH, концентрации глюкозы, составу факторов роста и др.

Факторы роста, используемые в питательных средах для клеток млекопитающих, чаще всего добавляют вместе с сывороткой крови. Одним из факторов риска при этом является возможность заражения культуры клеток прионами или вирусами. Наилучшим, но и наиболее дорогостоящим способом является добавление вместо сыворотки очищенных факторов роста.

Выделяют следующие фазы культивирования клеток: лаг-фаза, экспоненциальная фаза, стационарная фаза и фаза отмирания (рисунок 62 см. Приложение).

Суспензионные и адгезивные культуры

Клетки можно выращивать в суспензии, либо в адгезивном состоянии. Некоторые клетки (такие, как клетки крови) в естественных условиях существуют во взвешенном состоянии. Существуют также линии клеток, искусственно изменённых таким образом, чтобы они не могли прикрепляться к поверхности; это сделано для того, чтобы увеличить плотность клеток в культуре.

Для выращивания адгезивных клеток требуется поверхность, например, культура ткани, или пластик, покрытый элементами внеклеточного матрикса для улучшения адгезивных свойств, а также для стимулирования роста и дифференцировки. Большинство клеток мягких и твердых тканей адгезивны.

Органотипические культуры клеток

Из адгезивного типа культуры выделяются органотипические культуры клеток, которые представляют собой трёхмерную среду. Эта система культивирования физически и биохимически наиболее сходна с живыми тканями, но имеет некоторые технические сложности. С целью обеспечения необходимых физических условий для культивирования адгезивных культур и заселения объёма внеклеточного матрикса тканеинженерных конструкций используются системы динамического культивирования. Используют биореакторы различных типов с выращиванием клеток в скаффолде: компрессионные, с механическим натяжением и гидростатическим давлением, с электростимуляцией клеток и тканей и комбинированных биореакторов. Особый интерес представляют рассасывающиеся скаффолды (например, из полилактидов).

Особенности выращивания клеток

При выращивании клеток, из-за постоянного деления может возникнуть их переизбыток в культуре, и, как следствие, возникают следующие проблемы:

1. Накопление в питательной среде продуктов выделения, в том числе токсичных.

2. Накопление в культуре омертвевших клеток, прекративших жизнедеятельность.

3. Скопление большого количества клеток оказывает негативное влияние на клеточный цикл, рост и деление замедляются, а клетки начинают стареть и отмирать (контактное ингибирование роста). По той же причине может начаться клеточное дифференцирование.

Для поддержания нормального функционирования культур клеток, а также для предотвращения негативных явлений периодически проводят замену питательной среды, пассирование и трансфекцию клеток. Во избежание загрязнения культур бактериями, дрожжами или другими линиями клеток, все манипуляции обычно проводят с соблюдением правил асептики в стерильном боксе. Для подавления микрофлоры в питательную среду могут быть добавлены антибиотики (пенициллин, стрептомицин) и противогрибковые препараты (амфотерицин В). Одним из продуктов метаболизма в клетках являются кислоты, вследствие чего рН среды постепенно снижается. Для контроля кислотности питательных сред, в них добавляют индикаторы рН. Если культура клеток адгезивная, питательную среду можно полностью заменять.

Пассирование клеток суспензионных культур

Пассирование (разделение) клеток – это отбор небольшого количества клеток для выращивания в другом лабораторном сосуде.

Если культура быстро растет, это необходимо делать регулярно, поскольку в среде истощаются питательные вещества и накапливаются продукты метаболизма.

Суспензивные культуры пассировать проще, так как для этого достаточно всего лишь отобрать необходимое количество клеток, поместить их в другие сосуды, и добавить свежей питательной среды.

Пассирование клеток адгезивных культур

Адгезивные же клетки следует отделить от субстрата и разделить их скопления. Чаще всего для этой цели используют смесь трипсина и ЭДТА или другие ферментные смеси, иногда достаточно только ЭДТА в физиологическом растворе (раствор Версена).

Если культура растет медленно, её обычно подкармливают без переноса в другой сосуд, периодически (обычно раз в 2-3 дня) отбирая часть использованной среды и добавляя свежую.

Трансфекция и трансдукция

В клетки при их выращивании можно внедрять чужеродную ДНК путём трансфекции (невирусный метод). Часто данную технологию применяют для управляемой экспрессии генов. Сравнительно недавно для этих целей была успешно реализована трансфекция мРНК.

ДНК также может быть внедрена в геном клетки с помощью вирусов или бактериофагов. Они, являясь внутриклеточными паразитами, как нельзя лучше подходят для этих целей, так как внедрение генетического материала в клетку-хозяина является обычной частью их жизненного цикла. Этот метод называется трансдукция.

Гибридома

Гибридома – это линия клеток, полученная в результате слияния нормальных лимфоцитов с «бессмертными» раковыми клетками. Используется для получения

моноклональных антител. Лейкоциты, выделенные из селезёнки или крови иммунизированных животных, производят антитела с необходимой специфичностью, но как у любой первичной культуры, их способность к пролиферации ограничена лимитом Хейфлика (до 50 делений в культуре клеток).

Для иммортализации их искусственно сливают с «бессмертной» линией клеток миеломы, в результате чего происходит рекомбинация признаков. После этого линию клонируют и отбирают клоны, способные одновременно к неограниченной пролиферации и производящие антитела против избранного антигена.

Гибридная технология:

- 1) иммунизация животных;
- 2) выделение В-лимфоцитов из селезёнки;
- 3) подготовка культуры клеток миеломы;
- 4) слияние В-лимфоцитов и клеток миеломы;
- 5) сегрегация клеточных линий;
- 6) скрининг и селекция линий, производящих антитела;
- 7) размножение гибридомы *in vitro* или *in vivo*;
- 8) получение антител.

Использование клеточных культур

Промышленным методом из культур клеток получают такие продукты, как ферменты, синтетические гормоны, моноклональные антитела, интерлейкины, лимфокины, противоопухолевые препараты. Многие простые белки относительно быстро могут быть получены с использованием рекомбинантных ДНК в бактериальных культурах. Сложные белки, такие как гликопротеины, в настоящее время могут быть получены только из животных клеток (эритропоэтин). Стоимость выращивания культур клеток млекопитающих является довольно высокой, поэтому в настоящее время проводятся исследования по возможности производства сложных белков в культурах клеток насекомых или высших растений.

Культура клеток человека

Рутинные этапы исследования:

1. Культивирование клеток человека (чаще лимфоцитов) на искусственных питательных средах.
2. Стимуляция митоза фитогемагглютинином (ФГА).
3. Добавление колхицина (разрушает тубулиновые волокна веретена деления) для остановки и накопления митозов в стадии метафазы.
4. Обработка клеток гипотоническим раствором, вследствие чего клетки разрушаются и появляются свободнолежащие хромосомы.
5. Простое, дифференцированное и специальное окрашивание хромосом.
6. Микроскопическое исследование хромосом и фотографирование.
7. Вырезание отдельных хромосом и построение кариогаммы (идиограммы).

Использование клеточных культур

Культивирование клеток является неотъемлемой частью технологии культивирования тканей и тканевой инженерии, поскольку именно оно определяет основы выращивания клеток и поддержания их в жизнеспособном состоянии *ex vivo*.

Вакцины

С применением методики культивирования клеток в настоящее время выпускаются против полиомиелита, кори, эпидемического паротита, краснухи, ветрянки. Вследствие угрозы пандемии гриппа, вызываемого штаммом вируса H5N1, созданы вакцины против птичьего гриппа с использованием клеточных культур. Аналогичные мероприятия осуществляются против возбудителей коронавирусных инфекций, носящих характер пандемии.

Культуры клеток не млекопитающих. Культуры клеток растений

Культуры клеток растений, как правило, выращиваются либо в виде суспензии в жидкой питательной среде, либо в виде каллусной культуры на твердой питательной основе. Культивирование недифференцированных клеток и каллуса требует соблюдения определённого баланса гормонов роста растений ауксинов и цитокининов.

Культивирование растений через каллусные культуры (рисунок 63 см. Приложение).

Продукты, представляющие интерес для биотехнологии растений, это вторичные метаболиты. Они используются для получения лекарственных препаратов, косметических средств, красителей, биологически активных добавок к пище (БАД), биологически активных веществ (БАВ), каучука и др. К вторичным метаболитам относят фенолы, терпеноиды, алкалоиды, гликозиды, стероиды. Содержание этих веществ в растениях низкое, поэтому широко используются методы селекции и генетической инженерии для повышения выхода вторичных метаболитов. Рынок для препаратов из вторичных метаболитов растений характеризуется тенденцией к увеличению спроса и предложений.

Бактериальные, дрожжевые культуры

Для культивирования небольшого количества клеток бактерий и дрожжей клетки высеивают на твердую питательную среду на основе желатина или агар-агара. Для массового производства применяют выращивание в жидких питательных средах (бульонах).

Вирусные культуры

Культуры вирусов выращивают на культурах клеток млекопитающих, растений, грибов или бактерий, в зависимости от природного хозяина конкретного типа вирусов. Но при некоторых условиях могут быть выращены и в клетках другого типа. В этом случае культура клеток сама служит средой для роста и репликации вируса.

Контрольные вопросы:

1. Какие выделяют фазы культивирования клеток?
2. Назовите правила и типы культивирования клеток?
3. Для чего используется гибридома?
4. Для каких целей используют клеточные культуры?
5. Что такое трансфекция и трансдукция?

Тема 13

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Стволовые клетки – недифференцированные (незрелые) клетки, имеющиеся у многих видов многоклеточных организмов. Стволовые клетки способны самообновляться, образуя новые стволовые клетки, делиться посредством митоза и дифференцироваться в специализированные клетки, то есть превращаться в клетки различных органов и тканей.

Развитие многоклеточных организмов начинается с одной стволовой клетки, называемой зиготой. Зигота – диплоидная (содержащая двойной набор хромосом) клетка, образующаяся в результате оплодотворения путем слияния яйцеклетки и сперматозоида. Зигота является тотипотентной клеткой, то есть способной породить любую другую клетку организма. Термин ввёл немецкий ботаник Э. Страсбургер. У человека первое митотическое деление зиготы происходит спустя приблизительно 30 часов после оплодотворения, что обусловлено сложными процессами подготовки к первому делению дробления. Клетки, образовавшиеся в результате дробления зиготы, называют бластомерами. Первые деления зиготы называют «делениями дробления» потому, что клетка именно дробится: дочерние клетки после каждого деления становятся всё мельче, а между делениями отсутствует стадия клеточного роста.

У наземных растений зигота образуется в клетке, называемой архегоний. У бессемянных растений архегонии, как правило, колбовидные, с длинной полостью трубкой, через которую клетка антеридия входит внутрь. Зигота растёт и делится внутри архегония. Зигота либо непосредственно после оплодотворения приступает к развитию, либо покрывается плотной оболочкой и на некоторое время превращается в покоящуюся спору – характерно для многих грибов и водорослей.

Стадии развития зародыша: гаметы → зигота → морула → бластула → гастрюла → нейрула → органогенез → организм.

В результате многочисленных циклов деления и процесса дифференцировки образуются все виды клеток, характерные для данного биологического вида. В человеческом организме таких видов клеток более 350.

Стволовые клетки сохраняются и функционируют и во взрослом организме, благодаря им может осуществляться обновление и восстановление тканей и органов. Тем не менее, в процессе старения организма их количество уменьшается.

В современной медицине стволовые клетки человека трансплантируют, то есть пересаживают в лечебных целях. Например, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток производится для восстановления процесса гемопоэза (кроветворения) при лечении лейкозов и лимфом.

Историческая справка

1 июня 1909 года термин «стволовая клетка» (*Stammzelle*) был предложен русским гистологом А. Максимовым (1874–1928). Он описал и привел доказательства их существования морфологическими методами

1981 год – эмбриональные клетки мышцы получены из эмбриобласта (внутренней клеточной массы бластоцисты).

1992 год – профессор Дэвид Харрис заморозил стволовые клетки пуповинной крови своего первенца.

1998 год – Джеймс Томсон и его сотрудники вывели первую линию человеческих ЭСК (эмбриональных стволовых клеток).

1999 год – признано открытие эмбриональных стволовых клеток третьим по значимости событием в биологии после расшифровки двойной спирали ДНК и проекта «Геном человека».

1999 год – создана система гемодиализа, в которой использовались размноженные в течение нескольких пассажей, клетки эпителия проксимальных почечных канальцев поросят.

2005 год – перечень заболеваний, при лечении которых была успешно применена трансплантация стволовых клеток, достигает нескольких десятков. Основное внимание уделяется лечению злокачественных новообразований, различных форм лейкозов и других болезней крови. Появляются сообщения об успешной трансплантации стволовых клеток при заболеваниях сердечно-сосудистой и нервной систем.

2006 год – создан метод возвращения дифференцированных клеток в плюрипотентное состояние.

2007 год – открытие нового вида стволовых клеток, обнаруженных в амниотической жидкости (околоплодных водах). Они могут стать потенциальной заменой ЭСК в исследованиях и терапии. 2. Три независимые исследовательские группы сообщили, что зрелые клетки кожи мышей могут быть перепрограммированы в состояние ЭСК. 3. Опубликованы материалы, которые доказывали возможность индуцирования практически любой зрелой клетки в состояние стволовой.

2008 год – выведены первые ЭСК человека без разрушения эмбриона; посредством терапевтического клонирования культивированы клонированные blastocysts человека; плюрипотентные стволовые клетки получены из печени и желудка мыши; эти индуцированные клетки оказались ближе к эмбриональным, чем индуцированные стволовые клетки; впервые достигнута успешная регенерация хряща в коленном суставе человека при использовании аутологичных зрелых МСК; выведены плюрипотентные стволовые клетки из сперматогонимальных клеток зрелого яичка человека путём культивирования *in vitro* с добавлением фактора ингибирования лейкемии; эмбрионоподобные стволовые клетки выведены из луковицы человеческого волоса.

2009 год – создан способ выведения эмбрионоподобных стволовых клеток из обычных зрелых клеток с использованием инновационной технологии «обёртывания» для доставки специфических генов в клетки с целью репрограммирования без рисков, которые возникают при использовании вирусов; создан способ манипулирования клетками кожи для выведения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с учётом индивидуальной специфики пациента.

2011 – выведены первые стволовые клетки вымирающих видов животных, что может спасти виды, которым грозит исчезновение.

2012 – выращены яйцеклетки из стволовых клеток, оплодотворены и получено здоровое потомство лабораторных мышей (вклад в решение проблемы бесплодия).

2013 – выращены из стволовых клеток ткани почек, надпочечников и половые клетки: были получены пять типов клеток почек, а также выращен фрагмент почечного канальца, участвующего в фильтрации крови; на пути решения проблемы дефицита продовольствия в мире, создано искусственное мясо. Оно «сплетено» из 20 тысяч белковых волокон, выращенных за три месяца из коровьих стволовых клеток.

Свойства стволовых клеток

Все стволовые клетки обладают двумя неотъемлемыми свойствами:

1. Самообновление, то есть способность сохранять неизменный фенотип после деления (без дифференцировки).
2. Потентность (дифференцирующий потенциал), или способность давать потомство в виде специализированных типов клеток.

Механизмы поддержки популяции

Существуют два механизма, поддерживающих популяции стволовых клеток в организме:

1. Асимметричное деление, при котором продуцируется одна и та же пара клеток (одна стволовая клетка и одна дифференцированная клетка).
2. Стохастическое деление: одна стволовая клетка делится на две более специализированных.

Классификация Вейгера и Вейсмана по способности продуцировать клеточные линии.

Дифференцирующий потенциал, или потентность, стволовых клеток год — это способность производить определенное количество разных типов клеток. В соответствии с потентностью стволовые клетки делятся на следующие группы:

— тотипотентные (омнипотентные) стволовые клетки могут дифференцироваться в клетки эмбриональных и экстраэмбриональных тканей. Такие клетки могут дать начало полноценному жизнеспособному организму. К ним относится оплодотворённая яйцеклетка, или зигота. Клетки, образованные при первых нескольких циклах деления зиготы, также являются тотипотентными у большинства биологических видов. К ним не относятся круглые черви, зигота которых утрачивает тотипотентность при первом делении. У некоторых организмов дифференцированные клетки также могут обретать тотипотентность. Так, срезанную часть растения можно использовать для выращивания нового организма именно благодаря этому свойству;

— плюрипотентные стволовые клетки являются потомками тотипотентных и могут давать начало практически всем тканям и органам, за исключением экстраэмбриональных тканей (например, плаценты). Из этих стволовых клеток развиваются три зародышевых листка: эктодерма, мезодерма и энтодерма. В 2015 году ученые обнаружили новый тип клеток — плюрипотентные стволовые клетки, специфичные к месту (region-selective pluripotent stem cells). Они самостоятельно колонизируют ту или иную область тела зародыша, после чего могут развиваться в клетки различных тканей.

— мультипотентные стволовые клетки способны дифференцироваться в целостный орган или несколько типов тканей. Мультипотентные стволовые клетки (МПСК) образуют многие, но не все линии клеток, обычно в пределах зародышевого листка.

Производные зародышевых листков

Эктодерма даёт начало нервной системе, органам чувств, переднему и заднему отделам кишечной трубки, кожному эпителию.

Из мезодермы формируются хрящевой и костный скелет, кровеносные сосуды, почки и мышцы.

Из энтодермы в зависимости от биологического вида образуются различные органы, ответственные за дыхание и пищеварение. У человека это – слизистая оболочка кишечника, а также печень, поджелудочная железа и легкие.

Олигопотентные клетки могут дифференцироваться лишь в некоторые, близкие по свойствам, типы клеток. К ним, например, относятся клетки лимфоидного и миелоидного рядов, участвующие в процессе кроветворения.

Унипотентные клетки (клетки-предшественницы, бластные клетки) – незрелые клетки, которые, строго говоря, уже не являются стволовыми, так как 1) могут производить лишь один тип клеток; 2) способны к многократному самовоспроизведению, что делает их долговременным источником клеток одного конкретного типа; 3) их способность к самовоспроизведению ограничена определённым количеством делений. К клеткам-предшественницам относятся, к примеру, некоторые из миосаттелитоцитов, участвующих в образовании скелетной и мышечной тканей.

Классификация по источнику получения

Стволовые клетки можно разделить на три основные группы в зависимости от источника их получения:

- эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) образуют внутреннюю клеточную массу (ВКМ), или эмбриобласт, на ранней стадии развития эмбриона. Они являются плюрипотентными. Важное преимущество ЭСК заключается в том, что они не экспрессируют HLA (human leucocyte antigens), то есть не вырабатывают антигены тканевой совместимости. Поэтому шанс того, что донорские эмбриональные клетки будут отторгнуты организмом реципиента очень невысок. Одним из главных недостатков ЭСК является невозможность использования аутогенного, то есть собственного материала, при трансплантации, поскольку выделение ЭСК из эмбриона несовместимо с его дальнейшим развитием;

- фетальные стволовые клетки получают из плодного материала после аборта (обычно срок гестации, то есть внутриутробного развития плода, составляет 9–12 недель). Изучение и использование такого биоматериала также порождает этические проблемы. Известно, что из клеток фетальной печени могут развиваться специализированные клетки печени и кроветворные клетки. Из фетальной нервной ткани, соответственно, развиваются более специализированные нервные клетки;

- постнатальные (стволовые клетки взрослого организма) обладают меньшей потентностью в сравнении с эмбриональными и фетальными стволовыми клетками, то есть могут порождать меньшее количество различных типов клеток. Возможность использования аутогенного материала обеспечивает эффективность и безопасность лечения. Стволовые клетки взрослого организма можно подразделить на три основных группы: гемопоэтические (кроветворные), мультипотентные мезенхимальные (стромальные) и тканеспецифичные прогениторные клетки. Клетки пуповинной крови являются наименее дифференцированными из всех клеток зрелого организма, то есть обладают наибольшей потентностью. Пуповинная кровь в основном содержит гемопоэтические стволовые клетки, а также мультипотентные мезенхимальные, но в ней присутствуют малые количества других разновидностей стволовых клеток, при определённых условиях способные дифференцироваться в клетки различных органов и тканей.

Гемопоэтические стволовые клетки

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – мультипотентные стволовые клетки, дающие начало всем клеткам крови миелоидного и лимфоидного рядов (рисунок 64 см. Приложение). Миелоидная ткань содержит одну ГСК на 10000 клеток. ГСК являются неоднородной популяцией. Различают три субпопуляции ГСК, в соответствии с пропорциональным отношением лимфоидного потомства к миелоидному (Л/М):

- у миелоидно ориентированных ГСК низкое Л/М соотношение (>0 , <3);
- у лимфоидно ориентированных – высокое (>10);
- у «сбалансированных» ГСК ($3 \leq \text{Л/М} \leq 10$).

Миелоидно ориентированные и «сбалансированные» ГСК способны к продолжительному самовоспроизведению.

Основным источником ГСК является костный мозг. Этот источник и сегодня наиболее широко используется в трансплантологии. ГСК располагаются в костном мозге у взрослых, включая тазовые кости, ребра, грудину и другие кости. Клетки могут быть получены непосредственно из тазовых костей при помощи иглы и шприца или из крови, после предварительной обработки цитокинами, включая G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), способствующий выходу стволовых клеток из костного мозга.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) – мультипотентные стволовые клетки, способные дифференцироваться в остеобласты (клетки костной ткани), хондроциты (хрящевые клетки) и адипоциты (жировые клетки). Предшественниками ММСК в эмбриональный период развития являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Они могут быть обнаружены в местах распространения мезенхимы, то есть зародышевой соединительной ткани. Основным источником ММСК является костный мозг. Кроме того, они обнаружены в жировой ткани и ряде других тканей с хорошим кровоснабжением (пульпе молочных зубов, амниотической (околоплодной) жидкости, пуповинной крови). Важнейшей и наиболее перспективной областью клинического применения ММСК является котрансплантация совместно с ГСК.

Тканеспецифичные прогениторные клетки

Тканеспецифичные прогениторные клетки (клетки-предшественницы) – малодифференцированные клетки, которые располагаются в различных тканях и органах и отвечают за обновление их клеточной популяции, то есть замещают погибшие клетки. К ним, например, относятся предшественники мышечных волокон, клетки-предшественницы лимфо- и миелопоэза. Отдельно исследуются нейральные стволовые клетки, которые также относятся к группе тканеспецифичных. Они дифференцируются в процессе развития эмбриона и в плодный период, в результате чего происходит формирование всех нервных структур будущего взрослого организма, включая центральную и периферическую нервную системы. Эти клетки были обнаружены и в ЦНС взрослого организма. Несмотря на то, что большая часть погибших нейронов не замещается, процесс нейрогенеза в ЦНС взрослого человека всё-таки возможен за счёт нейральных стволовых клеток, но в малом объеме.

Характеристики эмбриональных стволовых клеток

Плюрипотентность – способность образовывать любой из примерно 350 типов клеток взрослого организма (у млекопитающих).

Хоуминг – способность стволовых клеток, при введении их в организм, находить зону повреждения и фиксироваться там, исполняя утраченную функцию.

Тотипотентность – способность дифференцироваться в целостный организм (11 дней после оплодотворения).

Факторы, которые определяют уникальность стволовых клеток, находятся не в ядре, а в цитоплазме. Это избыток мРНК всех 3 тысяч генов, которые отвечают за раннее развитие зародыша;

Теломеразная активность. При каждой репликации часть теломер утрачивается (предел Хейфлика). В стволовых, половых и опухолевых клетках есть теломеразная активность, концы их хромосом надстраиваются, то есть эти клетки способны проходить потенциально бесконечное количество клеточных делений, т.е. они бессмертны.

Стволовые клетки и рак

В 2012 году для глиобластомы, папилломы и карциномы кожи и аденом кишечника было доказано существование ограниченного пула особых раковых стволовых клеток, которые являются предшественниками других клеток, и именно они отвечают за образование и рост опухоли.

Мнение Российской Православной Церкви РПЦ

Православная церковь выступает против использования стволовых клеток, материал для которых получают из эмбрионов, поскольку в христианстве эмбрион является человеком с душой, а уничтожение эмбриона – грехом убийства. Также православная церковь выступает против исследования стволовых клеток человеческих эмбрионов.

К 2014 году Европейский суд уточнил, что партеногенетически активированная яйцеклетка все же не составляет собой человеческий эмбрион, и, таким образом, разрешил патентовать стволовые клетки, полученные из неоплодотворенных яйцеклеток и связанные с ними технологии.

Использование СК в Российской Федерации и Республике Беларусь

3 февраля 2011 года Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и социального развития выдала разрешение на применение новой медицинской технологии ФС № 2011/002 (лечение донорскими стволовыми клетками следующих патологий: возрастные изменения кожи лица второй или третьей степени, наличие раневого дефекта кожи, трофической язвы, лечение аллопеции, атрофическое поражение кожи, в том числе атрофические полосы (striae), ожоги, диабетической стопы). В законе Республики Беларусь от 13 июля 2012 г. № 407-З «О трансплантации органов и тканей» предусмотрено использование гемопоэтических стволовых клеток – (комбинации клеток, полученных из костного мозга или периферической крови, в том числе пуповинной, и способных к восстановлению системы кроветворения при ее поражении вследствие заболевания).

Контрольные вопросы:

1. Охарактеризуйте существующие классификации стволовых клеток.
2. Что такое тканеспецифичные прогениторные клетки?
3. Назовите основные характеристики эмбриональных стволовых клеток.
4. Как регулируется применение стволовых клеток в медицине?

Тема 14

БАНКИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Число линий клеток животных постоянно растет, часто клетки внешне трудноразличимы. Наличие нескольких линий клеток в лаборатории, особенно, занимающейся получением собственных культур, создает предпосылки контаминации клеток не только посторонними микроорганизмами, но и клетками других линий. Использование клеток с отсутствием идентификационных характеристик ставит под сомнение адекватность получаемых результатов. Эти данные подчеркивают чрезвычайную важность и актуальность создания специализированных коллекций и аттестации поступающих и вновь получаемых культур клеток, используемых в научных или прикладных исследованиях.

Необходимость аттестации и стандартизации

Известно, что объективность результатов и качество биопрепаратов, получаемых с использованием культур клеток, в большей степени зависит от происхождения культуры клеток, ее соответствия паспортным характеристикам и безопасности. Основой стабильного производства безопасного препарата должна быть стандартизованная и аттестованная культура клеток. Система создания двухъярусного банка клеток, при котором создаются посевной и рабочий банки клеток, является необходимым условием для обеспечения продолжительного производства продукта.

Аттестация банков клеток в соответствии с современными требованиями ВОЗ, принимая во внимание контроль биологической безопасности клеток, и сохранение их функциональных свойств при длительном культивировании, обеспечивает стабильность и безопасность производства получаемого продукта.

Создание и развитие российской коллекции клеточных культур человека, животных и растений.

В институте цитологии РАН с 1978 года 35 лет создается Коллекция клеточных культур (РККК). Основная идея работы Коллекции состояла в создании и развитии Национальной коллекции клеточных культур человека, животных и растений. Задачей Коллекции было выведение, сбор, паспортизация и хранение эталонных клеточных линий согласно единым международным требованиям, а также обеспечение коллекционным клеточным материалом учреждений России и стран дальнего и ближнего зарубежья. Аналогичные работы ведутся сотрудниками Ботанического сада Республики Беларусь (Регистрационное свидетельство № 1341606174 от 05.01.2016 г. о включении в Государственный реестр информационного ресурса «Специализированный кадастр растений, животных, грибов Беларуси» (соавторы информационного ресурса Решетников В.Н., Ламан Н.А., Носиловский О.А. и др.).

Вопросы, решаемые с использованием банков культур клеток

Решение общебиологических проблем – дифференцировка, канцерогенез, клеточная подвижность, пролиферация, передача наследственной информации, регуляция экспрессии генов. Решения прикладных задач медицины, сельского хозяйства, биотехнологии и биологической промышленности.

Основные задачи: массовое промышленное производство вакцин и физиологически активных соединений, получение моноклональных антител методами гибридомной технологии, лечение тяжелых заболеваний методами генотерапии и клеточной заместительной тераии, повышение продуктивности сельскохозяйственных

животных и выведение новых сортов растений, сохранение биоразнообразия генофонда путем криоконсервации соматических и половых клеток животных и растений.

Сохранение характеристик культуры клеток

Клетки в культуре подвержены высокой наследственной изменчивости при длительном культивировании под действием меняющихся условий внешней среды. Успешное сохранение исходных или направленно измененных свойств клеточных линий достигается путем соблюдения строго выдерживаемых условий культивирования и криоконсервации клеточных культур. Поддержание исходных клеточных свойств и контроль за их состоянием осуществляют Национальные коллекции разных стран.

Разделы работы по созданию банков (коллекций) культур клеток

1. Создание, непрерывное поддержание и развитие фондов коллекции путем сбора, выведения, паспортизации и хранения клеточных линий человека, животных и растений.

2. Разработка единых требований к качеству коллекционного клеточного материала, единых паспортов, методов анализа, хранения и контроля клеточных линий.

3. Совершенствование методов ведения коллекции и работы с клеточными линиями на основе проведения многолетних научных исследований, посвященных: изучению влияния условий культивирования, криоконсервации и контаминации на генетическую изменчивость клеточных линий; получению новых клеточных линий и гибридом; разработке новых методов криоконсервации; селекции клеточных линий, имеющих промышленное значение; разработке бессывороточных сред.

4. Депонирование уникальных клеточных линий и гибридом, патентуемых в связи с их практической ценностью.

5. Создание информационных баз данных по клеточным культурам и постоянно действующей службы информации путем ежегодного издания информационного бюллетеня «Клеточные культуры».

6. Обеспечение образцами стандартного и полностью охарактеризованного клеточного материала фундаментальных и прикладных биологических, медицинских, сельскохозяйственных и биотехнологических исследований страны, а также биологической и медицинской промышленности стран.

7. Оказание научно-методической помощи сотрудникам научных учреждений стран по методам культивирования и анализа клеточных линий путем проведения кратковременных и длительных стажировок в базовых коллекциях, а также путем издания методических руководств, проведения конференций, совещаний и школ.

Коллекции в России

В настоящее время в фондах Российской коллекции клеточных культур содержится 2700 клеточных линий, из которых около 40% являются уникальными, полученными в Российской Коллекции клеточных культур. Около 700 референтных клеточных линий и гибридом депонировано в связи с их патентованием. Список клеточных линий представлен в Каталоге клеточных культур, изданном в 1999 году и переизданном в 2004 году в связи с большим спросом на информацию, представленную в каталоге.

Паспортизация Коллекции

В задачу Коллекции входит не только сбор и обеспечение сохранности клеточных линий, но и их подробная характеристика или паспортизация. Подробная

характеристика осуществляется на клетках ранних пассажей после размораживания криоконсервированного клеточного материала. Ввиду специфики работы с клеточными культурами в разных коллекциях, определяемой задачами исследований специализированных научных учреждений, а также наличием специалистов соответствующего профиля, характеристика свойств коллекционных линий значительно различается. Поэтому важна паспортизация банков клеточных культур.

Паспортизация культур клеток

Разработан единый паспорт, соответствующий международным требованиям, с некоторыми модификациями для соматических клеток человека, животных и растений. В число абсолютно необходимых характеристик паспортизуемых клеточных линий входят:

а) Жизнеспособность клеток после их размораживания, которая определяется числом клеток, выживших после криоконсервации. Жизнеспособность клеток устанавливают по эффективности клонирования, по окрашиванию витальными красителями и по скорости увеличения клеточной массы в процессе культивирования.

б) Морфология клеток в культуре и способ культивирования. В зависимости от тканевого происхождения морфология или тип роста клеток в культуры будет разный. Основными типами роста являются фибробластоподобный, эпителиоподобный, нейробластоподобный и лимфобластоподобный. Первые три типа культур относят к монослойному способу культивирования, т.е. клетки прикрепляются и распластываются на поверхности культуральной посуды, а последний тип относится к суспензионному или полусуспензионному способу культивирования, т.е. клетки растут в суспензии, иногда частично прикрепляясь, но, не распластываясь на субстрате. Морфология документируется микрофотографиями живых или фиксированных культур.

в) Видовая идентификация клеточных линий. В условиях культивирования клетки различных видов животных морфологически неразличимы. Кроме того, в результате технических ошибок персонала нередко происходит перекрестное заражение клетками разных линий. Так, при цитогенетическом обследовании фондов Американской коллекции клеточных культур было обнаружено, что некоторые постоянные клеточные линии являются дериватами одной из самых распространенных линий человека – HeLa (карцинома шейки матки). Первым методом определения видовой идентичности является подробный кариологический анализ, позволяющий с помощью разных дифференциальных окрасок хромосом определить видоспецифичность данной клеточной линии. Вторым методом является изоферментный анализ, основанный на разной электрофоретической подвижности определенных ферментов у разных таксономических групп животных и человека. Кроме того, для идентификации клеточных линий используют видоспецифические антисыворотки.

г) Кариологическая характеристика. Помимо необходимости использования кариологического анализа для определения видоспецифичности, каждая клеточная линия должна иметь полную кариологическую характеристику, которая строго специфична для каждой линии и включает: определенный спектр перестроенных (маркерных) хромосом или отсутствие таковых; модальное число хромосом, пределы изменчивости по числу хромосом, количество полиплоидов. Исходя из специфичности кариологической характеристики каждой клеточной

культуры, в ряде случаев кариологический анализ может помочь в идентификации конкретной линии.

д) Контаминация культур микроорганизмами. Эта характеристика является первой и решающей для дальнейшей судьбы клеточной линии. Проводится исследование культур на присутствие грибов, бактерий, микоплазм, вирусов. Определение наличия контаминаций представляет для коллекций особую важность, так как в них культивирование клеточных линий ведется в отсутствие антибиотиков. Присутствие грибов и бактерий определяется обычными и широко распространенными микробиологическими методами. Наибольшую опасность для клеточных культур представляют микоплазмы. Во многих случаях контаминация такого рода протекает бессимптомно. Тем не менее, латентное присутствие микоплазм существенно влияет на метаболизм клеток, вызывает хромосомные aberrации и изменения функций.

Дополнительные сведения к паспорту культуры клеток

Кроме перечисленных основных характеристик в паспорте приводятся данные, представляющие большую важность для исследователей, пользующихся коллекционными линиями. К ним относятся:

а) условия культивирования (тип питательной среды, сыворотки и другие компоненты, необходимые для конкретной линии клеток);

б) среда для замораживания, способ и режим криоконсервации, тип криопротектора;

в) чувствительность к вирусам;

г) специфические особенности линии, включающие эффективность клонирования, туморогенность, наличие биохимических и генетических маркеров.

Методические указания

Разработаны методические указания «Аттестация первичных или диплоидных культур клеток, пригодных для трансплантации» с учетом современных методов контроля безопасности клеток. Установлено, что для получения жизнеспособных стволовых и малодифференцированных клеток из разных тканей и органов, высокоперспективных для исследований или трансплантации, важным является время доставки органа, выбор методов выделения, условий культивирования и криоконсервации клеток.

Значение методических указаний

Создание банков, впервые полученных культур малодифференцированных клеток, криоконсервированных и аттестованных в соответствии с новыми Методическими указаниями, позволяет иметь достаточные запасы аттестованного клеточного материала для проведения фундаментальных исследований и заместительной терапии. Предлагаются способы выращивания фибробластов на специальных пленках, пористых подложках или микроносителях, что позволяет увеличивать количество клеток, транспортировать и поддерживать функционально-активные клетки на ранах различной этиологии. Способ транспортировки клеток в геле или на микроносителях позволяет сохранять жизнеспособность клеток в течение 5 и более дней.

Культуры клеток в медицине

Клетки из аттестованных посевных и рабочих банков используются в научных исследованиях и разработках новых вакцин против гриппа (клетки МДСК), против кори (клетки Л-68) и производстве коммерческой вакцины против

гепатита А (клетки 4647). Культура клеток 293 является субстратом для производства препарата «Канцеролизин», обладающего противоопухолевой активностью, прошедшего к настоящему моменту этап доклинических испытаний и рекомендованного для проведения ограниченных клинических испытаний. Культура клеток СНО-рЕ имеет практическое значение как стабильный продуцент рекомбинантного эритропоэтина человека и используется в исследованиях по разработке новых технологий получения таблетированной формы лекарственного препарата для регуляции эритропоэза. Произведены экспериментальные серии препарата и начаты доклинические исследования.

Заживление ран

Полученные и заложенные на хранение в виде аттестованных банков клеток культуры диплоидных клеток ФЭЧ 16-1 и ФЭЧ 16-2 показали хорошие заживляющие свойства при лечении ран. Основные результаты этих исследований легли в основу разработки новой технологии получения препарата «Культуры клеток диплоидные для заместительной терапии», производимого в виде суспензии клеток, в геле или в монослое на подложках. Разработаны Регламент производства, ФСП и Инструкция по применению.

Культуры клеток насекомых

Новые линии клеток насекомых, высокочувствительные к видоспецифичным вирусам ядерного полиэдроза, были использованы при разработке новых технологий получения энтомопатогенных бакуло вирусных препаратов, пригодных для борьбы с вредителями сельского и лесного хозяйства. Экспериментальные серии вирусов ядерного полиэдроза хлопковой совки *Heliothis armigera*, полученные на культуре клеток МБ-ХС-685, показали высокую эффективность при лабораторных испытаниях препарата на гусеницах.

Генный банк

Генный банк – тип биорепоzitория, в котором сохраняется генетический материал. Материал, возможно, сохранить во многих видах, однако самым частым методом консервации в современных генных банках является метод криоконсервации. Методом быстрой заморозки жидким азотом при -196°C возможно сохранять генетический материал клеток различного происхождения для дальнейших экспериментов. При размораживании материала могут возникать определенные механические повреждения клеточного материала, однако метод замораживания при низких температурах до сих пор применяется как основной в области консервации материала.

Также имеются другие, менее долгосрочные способы сохранения материала с подбором оптимальных условий и хранением без заморозки. Так у кораллов берут фрагменты, которые затем хранятся в емкостях для воды в контролируемых человеком условиях.

В генных банках растений хранятся замороженные образцы различных растительных тканей, заготовленные семена или собранная пыльца растений. Для животных возможно замораживание спермы и яйцеклеток в зоологических морозильниках. У растений возможно разморозить материал и распространить его из семян, пыльцы или отдельных клеток, однако, у животных необходима живая самка для осуществления искусственного оплодотворения и восстановления

живого организма из хранимого в банке материала. В целях сохранения биологического разнообразия сельского хозяйства, банки генов используются для сохранения генетических ресурсов растений основных сельскохозяйственных культур и их диких сородичей.

Контрольные вопросы:

1. Для чего необходима аттестация и стандартизация клеточных культур?
2. Какие вопросы решают банки культур клеток?
3. Назовите проекты по созданию банков культур клеток в Республике Беларусь?
4. Что входит в паспортизацию культуры клеток?
5. Что и как хранится в генных банках?

Тема 15

РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ: ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Чтобы клетка начала производить нужный белок в нее необходимо внедрить ген этого белка. Клетки программируются на генетическом уровне на выработку того или иного белка. В клетку-производитель предварительно вводят ДНК гена в трех вариантах:

- 1) трансфекция – введение молекулы ДНК (микроинъекция, электропорация, биолистика, липосомы и др.;
- 2) конъюгация – перенос ДНК с помощью плазмид;
- 3) трансдукция – перенос ДНК с помощью вирусов (для бактерий – бактериофагов).

Если ген (ДНК) в клетке экспрессируется – трансформация.

Белки, полученные при экспрессии перенесенных генов называют рекомбинантными.

Продуценты рекомбинантных белков

Сегодня наиболее распространенный тип клеток, используемый для производства простых рекомбинантных белков, – клетки бактерий, а именно кишечная палочка *Escherichia coli*. Преимуществами этих клеток являются: быстрая скорость размножения (около 30 мин), высокая плотность культуры, простой состав питательной среды и большое удельное количество производимого белка на клетку. Как следствие, бактерии обладают намного большей производительностью и меньшей конечной стоимостью продукта, по сравнению с остальными типами клеток. Для синтеза сложных рекомбинантных белков используют культуры эукариотических клеток (животные, растения, насекомые).

Синтез простых белков прокариотами

Бактерии, способны правильно производить только простые белки. Дело в том, что конвейер по производству белков в бактериях существенно проще, чем у более сложных эукариотических клетках. Вспомним некоторые причины этому:

во-первых, для фолдинга – сворачивания длинной полипептидной нити в правильную трехмерную форму – в клетке необходимы специальные белки – шапероны, а у бактерий этих шаперонов меньше, и они отличаются от эукариотических;

во-вторых, у бактерий отсутствует стадия посттрансляционная модификация белков, на которой удаляются вспомогательные последовательности, модифицируются аминокислотные остатки полипептидных цепей, происходит присоединение углеводов, липидов и других веществ;

в-третьих, многие белки (например, антитела) для правильного функционирования требуют объединения фактически нескольких белков (субъединиц) в один, а бактерии не могут этого сделать с чужеродными для них белками;

в-четвертых, высокая плотность нарабатываемого белка в бактериях является губительной для многих белков, и они выпадают в осадок.

Все это и ограничивает использование бактерий лишь производством относительно простых белков (чаще *E. coli*).

Для синтеза сложных рекомбинантных белков используют эукариотические клетки. В простейшем варианте используются клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. У этих клеток имеются мембранные структуры, в которых может происходить посттрансляционная модификация белков. Эти клетки используются в генетической инженерии для введения генов эукариот, в том числе человеческих клеток. Поэтому некоторым компромиссом между клетками млекопитающих и бактериями являются дрожжи, которые почти так же быстро делятся, как и бактерии (~2 ч) и тоже не очень требовательны к питательной среде. Дрожжи, как и человеческие клетки, имеют клеточное ядро и обладают аппаратом, необходимым для полного цикла производства человеческих белков. Однако многочисленные мелкие отличия этого аппарата у дрожжей и млекопитающих требуют оптимизации процесса для каждого отдельного белка. Это, наряду с невысоким выходом продукта, делает дрожжи не самой распространенной биотехнологической системой. Поэтому дрожжи не лучшая культура для образования рекомбинантных белков.

Синтез сложных белков

Для производства сложных белков предпочтительно использовать клетки, наиболее похожие на те, которые производят их в естественных условиях. Для производства антител используют гибриды В-клеток. Для производства человеческих рекомбинантных белков сейчас используют несколько клеточных линий, условия культивирования и питательные среды для которых подобраны так, чтобы обеспечить максимальный выход продукта. Наиболее распространена линия клеток яичника китайского хомячка СНО, которая может расти как прикрепившись к поверхности, так и в суспензии. Количество белка, получаемого из литра среды клеток млекопитающих, примерно в 10 раз ниже, чем из литра бактерий, а его производственная стоимость выше в десятки раз.

Использование рекомбинантных белков

Наибольшая часть разрабатываемых сегодня терапевтических препаратов – это рекомбинантные белки, и около 60% из них производится именно в клетках млекопитающих. В последние годы из 10 лидирующих по суммам продаж препаратов 7 являются рекомбинантными белками, а 5 из них произведены в клетках СНО. В этом списке преобладают рекомбинантные антитела, что обусловлено относительной предсказуемостью их активности. В отличие от большинства других биологически активных молекул, антитела взаимодействуют только с одной мишенью, которую они связывают с исключительной избирательностью и прочностью, в результате чего просто ее «выключают». Стоит отметить, что выключение

отдельной молекулы лишь инициирует биологический эффект, который развивается под влиянием множества факторов и остается во многом «черным ящиком». С этим связаны многочисленные противоречия в механизмах действия данных препаратов.

Поликлональные антитела

Антитела вырабатываются В-лимфоцитами в ответ на иммунизацию, то есть введение в организм антигена. Антитела можно выделить непосредственно из плазмы крови иммунизированного животного, которая содержит примерно 10 мг/мл антител. Антитела из плазмы крови называют поликлональными и широко применяют для научных исследований, однако для клинической диагностики они не годятся по двум причинам: 1) они не стандартизованы; 2) для клинической диагностики обычно нужна пара разных антител на один антиген.

Технология получения моноклональных антител

Схема процесса производства антител – гибридная технология. С целью получения таких стандартизованных антител необходимо выделить отдельные В-клетки, производящие антитела. Эти клетки выделяют из селезенки иммунизированных мышей. Далее для наработки антител эти В-клетки необходимо размножить, но поскольку они имеют ограниченную способность к делению, их иммортализуют путем слияния с линией раковых клеток (миеломой). Клетки гибридом рассаживают по лункам планшета с сильным разведением для обеспечения попадания не более одной клетки в лунку. Далее выращивают потомков одной клетки – клеточный клон. Антитела, производимые клоном клеток, идентичны и называются моноклональными.

Белки содержат сайты связывания металлов, которые могут быть использованы для очистки рекомбинантных или природных белков. Шесть или более идентичных гистидиновых остатков действуют как сайт связывания металлов для очистки и экспрессии белков. Последовательность hexa-His называют His-концом, который может быть помещен на N-конец белка-мишени. His-конец содержит сайт расщепления для специфических протеаз. Рекомбинантные белки с His-концом очищают методом металло-хелат аффинной хроматографии на никелевых ионных колонках, рекомбинантные белки после элюируются из метал-хелатной колонки с помощью гистидина или имидазола. Затем очищенный белок с His-концом обрабатывают с помощью специфической протеазы для отщепления His-конца, или не обрабатывают, если His-конец не влияет на активный сайт белка.

Рекомбинантные белки, созданные некоторыми генно-инженерными микроорганизмами

Вакцины:

Поверхностный антиген вируса гепатита В

Белок малярийного плазмодия

Белок оболочки HIV-1

Белок капсида HIV

Диагностика

Белок гепатита С

Антигены HIV-1

Антиген вируса сибирской язвы

Антиген вируса денге типа 1

Лекарственные вещества

Фактор роста эпидермиса

Инсулин

Инсулиноподобный фактор роста

Тромбоцитарный фактор роста

Фактор роста фибробластов

Фактор XIIIa системы свертывания крови

Интерфероны

Эритропоэтин

Соматотропин

Рекомбинантные альфа-интерфероны:

– Субстанция интерферона рекомбинантного (вирусные заболевания, иммуномодулятор, стрессовые состояния).

– Интерфероны+витамины (гиповитаминозы, вирусные заболевания, иммуномодулятор).

– Интерферон+антибиотики типа Гентаферон, Линкоферон и др. (смешанные инфекции, иммуномодулятор).

Современный биоинфармацевтический рынок

– Мировой рынок биофармацевтической продукции более 200 млрд долларов.

– 70% приходится на рекомбинантные белки.

Количество биотехнологических компаний выросло во Франции до 250, в Великобритании до 350, Германии до 450, в остальной Европе свыше 600 и в США – 1400.

Контрольные вопросы:

1. Кто является продуцентами рекомбинантных белков?
2. Почему прокариоты производят только простые белки?
3. Как происходит синтез сложных белков?
4. В чём заключается технология получения моноклональных антител?

Тема 16

АНТИТЕЛА И КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Иммуноглобулины (антитела) – большое семейство белков, которые синтезируются В-лимфоцитами и плазматическими клетками. Иммуноглобулины находятся в крови и при электрофорезе сыворотки крови образуют фракцию гамма-глобулинов. Часть особых иммуноглобулинов (секреторных) присутствует во всех секретах, продуцируемых слизистыми оболочками (слезная жидкость, слизь носа, бронхов, кишечника, половых органов).

Свободные иммуноглобулины-антитела могут связываться лейкоцитами и другими клетками специальными Fc-рецепторами.

Строение иммуноглобулинов

В структуре молекулы иммуноглобулина (рисунок 65 см. Приложение) различают 2 тяжелые (H - heavy) и 2 легкие (L - light) полипептидные цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Существуют 2 вида L-цепей (κ-каппа и λ-лямбда) и 5 видов H-цепей – гамма (γ), мю (μ), альфа (α), эпсилон (ε)

и дельта (δ). Тяжелые цепи определяют принадлежность иммуноглобулинов к соответствующему классу: IgG – тяжелая цепь γ , IgA – α , IgM – μ , IgD – δ , IgE – ϵ .

Константные и переменные участки

В цепях молекулы иммуноглобулинов различают константные (constant) и переменные (variable) фрагменты. Отдельные замкнутые в виде сфер участки цепей иммуноглобулина получили название доменов. Различают C_L , C_H^1 , C_H^2 и C_H^3 домены, а в IgM и IgE и C_H^4 домены, в V-фрагменте – V_H и V_L домены (в зависимости от цепи) (рисунок 66 см. Приложение).

Гипервариабельные участки

Гипервариабельные участки (частые замены аминокислот) доменов тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей иммуноглобулинов (регионы, определяющие комплементарность – CDR) формируют активный центр молекулы иммуноглобулина (антитела). Это полость длиной 6 нм, шириной 1-1,7 нм, глубиной 0,6-0,7 нм, в которую вмещается детерминанта (эпитоп) антигена.

Структуры активного центра Ig, которые непосредственно соединяется с эпитопом антигена называют паратоп.

Шарнирный участок

Между C_H^1 и C_H^2 доменами тяжелой цепи локализуется подвижный – «шарнирный» участок молекулы иммуноглобулина, чувствительный к протеолитическим ферментам (папаину, пепсину, трипсину). Под действием папаина молекула иммуноглобулина расщепляется на 2 Fab-фрагмента (Fragment antigen binding – фрагмент, связывающий антиген) и Fc-фрагмент (Fragment crystallable – фрагмент кристаллизующийся).

Роль доменов

Когда молекула Ig связывает антиген, C_H^2 домен Fc-фрагмента иммуноглобулина активирует комплемент по классическому пути. C_H^3 домен может связываться с Fc-рецепторами, имеющимися на лейкоцитах и других клетках.

Тяжёлые и лёгкие цепи существуют в нескольких вариантах, отличающихся структурой и функциями, в связи с чем антитела делят на классы, или изотипы. Выделяют два типа L цепей (κ и λ) и пять изотипов H-цепей (μ , γ , α , δ и ϵ). В состав одной молекулы иммуноглобулина могут входить только H-цепи одного вида. У млекопитающих существует пять основных типов антител: IgM, IgG, IgA, IgD и IgE (латинские буквы в названиях классов антител соответствуют греческим в обозначении изотипов H-цепей). Иммуноглобулины классов IgG и IgA разделяют на подклассы (субтипы), также в зависимости от особенностей H-цепей. Иммуноглобулины всех классов могут принадлежать к K- и L-типам в зависимости от присутствия в их составе L-цепей κ - или λ -типов соответственно. Разные изотипы H-цепей имеют отличающееся количество C-доменов: γ -, α - и δ -цепи имеют по 3 C-домена, а в состав μ - и ϵ -цепей входит по 4 C-домена. Классы антител также различаются степенью гликозилирования, в частности, наименее гликозилированы антитела класса IgG.

По пространственному строению различают 4 типа иммуноглобулинов (рисунок 67 см. Приложение).

Краткая характеристика иммуноглобулинов представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристики основных классов иммуноглобулинов

Структура и свойства	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Содержание в сыворотке, г/л	8-12	1,5-3,0	0,8-1,5	0,03-0,2	0,00005-0,0002
Наличие в секретах	+	+++	+	?	+
Молекулярная масса, кДа	150	160-400	950	185	190
Н-цепь	γ	α	μ	δ	ϵ
Количество мономеров	1	1,2,3	5	1	1
Ј-цепь	-	+	+	-	-
Валентность	2	2-6	10	2	2
Период полураспада в сыворотке, сут	21	6	10	3	2
Функции					
Активация комплемента (классический путь)	++	+/-	+++	-	-
Опсонизация	+++	+	-	-	-
Агглютинация	+	-	+++	-	+
Преципитация	+	-	+	?	-
Противовирусная активность	++	+++	+	?	?
Сенсибилизация тучных клеток	-	-	-	-	+

Иммуноглобулины класса G (м.м. 150 кДа)

Составляют основную массу иммуноглобулинов сыворотки крови (75-85 %) – 10 г/л (8-12 г/л). Снижение концентрации IgG обозначается как гипогаммаглобулинемия IgG, увеличение – гипергаммаглобулинемия IgG. Антитела класса IgG появляются в большом количестве при вторичном иммунном ответе, поэтому основную массу антител против бактерий, их токсинов и вирусов составляют IgG.

При образовании комплекса с антигеном IgG активирует комплемент по классическому пути. IgG является единственным иммуноглобулином, проникающим через плаценту в организм плода. Будучи антителом, он защищает новорожденных и детей раннего возраста от инфекций и составляет основную массу иммуноглобулинов в крови. Препараты IgG (в чистом виде) применяются с заместительной целью при дефиците этих иммуноглобулинов и в случае тяжелых инфекций. IgG используются для лечения аллергических и аутоиммунных заболеваний, так как подавляют иммунный ответ. Следовательно, эти иммуноглобулины выполняют регуляторную роль.

Иммуноглобулины класса A (м.м. 160 кДа)

Имеются в крови и секретах слизистых оболочек. В сыворотке крови содержится 2 г/л (от 1,5 до 3 г/л) IgA (субклассы A₁ и A₂). В крови IgA присутствуют в виде мономеров, а в секретах в форме димеров и тримеров. Секреторные IgA (sIgA), будучи антителами, формируют местный иммунитет, препятствуют адгезии микроорганизмов к эпителию слизистых оболочек, усиливают фагоцитоз. Ежедневно в слизистой оболочке кишечника синтезируется до 3 г секреторного IgA. Большое количество его выделяется со слюной из носа. Новорожденные получают секреторный IgA с молоком матери.

Иммуноглобулины класса М (м.м. 950 кДа)

Содержатся в сыворотке крови в концентрации от 0,8 до 1,5 г/л, в среднем – 1 г/л. В крови они находятся в виде пентамеров, состоящих из 5-ти мономеров, соединенных J-цепью. Такие молекулы содержат 10 активных центров и могут связывать больше антигенных детерминант (от 5 до 10). Антитела IgM синтезируются в организме при первичном иммунном ответе, низкоаффинны, но высокоавидны из-за большого числа активных центров.

Иммуноглобулины класса D (м.м. 185 кДа)

Содержатся в сыворотке крови в концентрации 0,03-0,2 г/л. Они служат рецепторами созревающих В-лимфоцитов. Количество IgD увеличивается при некоторых вирусных инфекциях.

Иммуноглобулины класса E (м.м. 190 кДа)

Присутствуют в сыворотке крови в концентрации около 0,00005 г/л или от 0 до 100 МЕ/мл (одна международная единица равна 2,4 нг). При аллергии их содержание в крови увеличивается и многие из них специфичны к аллергену, т.е. являются антителами. IgE имеются в секрете слизистых оболочек носа, бронхов, кишечника, среди них много антител против аллергенов.

Возрастные особенности уровней иммуноглобулинов человека

У новорожденных в крови имеется только материнский IgG (8-10 г/л); уровень его снижается к 5-6 месяцам (до 5 г/л), а затем увеличивается за счет синтеза собственного IgG. Количество IgM очень небольшое (0,02-0,1 г/л), к году уровень их увеличивается, IgA и IgE – отсутствуют. В возрасте 2-х лет уровень всех иммуноглобулинов близок к нормам взрослых, а полностью соответствует им к 10 годам.

Аллотипы иммуноглобулинов

Это вариации в их строении у разных индивидуумов, обусловленные разными аллелями соответствующих генов, чаще постоянных доменов тяжелых и легких цепей. Тяжелые γ -цепи IgG могут отличаться по G-маркеру (вместо аспарагина и глутамина в участке их цепи имеются глутамин и метионин).

Изотипы и переключение изотипа

Изотипы – классы и субклассы иммуноглобулинов, отличающиеся константными доменами цепей: например, различия классов Ig по тяжелым цепям или изотипы κ и λ легких цепей. Переключение изотипа – изменение класса синтезируемого В-клетками иммуноглобулина в процессе иммунного ответа и созревания плазматической клетки (с IgM на IgA и IgG).

Fc-рецепторы для иммуноглобулинов-антител

Fc-рецепторы для иммуноглобулинов – важная группа молекул, находящихся на поверхности различных клеток, особенно лейкоцитов. Они связывают Fc-фрагменты иммуноглобулинов различных изотипов (классов). Их разнообразности обозначаются греческими буквами соответственно обозначениям тяжелых цепей иммуноглобулинов, которые они связывают: Fc γ R связывает IgG, Fc μ R связывает IgM, Fc α R – IgA, Fc δ R – IgD, Fc ϵ R – IgE.

Антитела

Иммуноглобулины любого из 5 классов, специфично взаимодействующие с определенным антигеном, называют антителами (АТ).

Идиотипы

Это варианты антител, отличающиеся по V-доменам и активным центрам, которые отражают их специфичность к антигену. Популяция В-лимфоцитов состоит из большого числа отличающихся клонов, каждый из которых синтезирует антитела определенной специфичности. Поэтому существует несколько миллиардов вариантов антител разной специфичности.

Образование легких цепей

При дифференцировке лимфоцитов наблюдается перенос генов (транспозиция) и их объединение. Три группы генов в хромосоме 2 образуют участок, ответственный за синтез легкой к-цепи Ig:

1) около 250 зародышевых V-генов, каждый из которых кодирует 94-95 аминокислотных остатков;

2) 5 J-(joint-соединение)-мини-генов, один из которых неактивный – псевдоген; остальные кодируют фрагменты из 12-14 остатков аминокислот;

3) C_κ-ген кодирует постоянный фрагмент каппа-цепи.

Рекомбинация начинается с объединения одного из V_κ-гена с одним J-мини-геном.

Образование тяжелых цепей

Структурная организация генов для тяжелых цепей иммуноглобулинов аналогична. Вариабельный участок тяжелой (H) цепи синтезируется под контролем трех случайно объединенных генов V, D и J, каждый из которых существует в виде многих аллелей (V - около 500, D до 20, J до 6). В результате может образоваться приблизительно – $500 \times 20 \times 6 = 60000$ вариантов тяжелых цепей иммуноглобулинов.

Соединение легких и тяжелых цепей

Разные тяжелые и легкие цепи тоже соединяются случайно, поэтому число вариантов иммуноглобулинов, связывающих разные антигены, т.е. антител увеличивается до 2×10^8 и более.

Виды антител

Различают естественные и иммунные антитела. Естественные АТ находятся в организме без предварительного введения антигена (иммунизации):

1) альфа- и бета-изогемагглютинины сыворотки крови человека I группы, направленные против А и В антигенов эритроцитов людей других групп крови (II-IV) - это чаще антитела класса IgM;

2) у человека есть IgM-антитела против эритроцитов животных;

3) естественные антитела против микробов, которые служат факторами естественного и видового иммунитета.

В небольшом количестве в крови имеются «нормальные АТ», способные взаимодействовать с собственными антигенами организма (аутологичные АТ), они стимулируют дифференцировку клеток.

Иммунные антитела

Иммунные АТ накапливаются и выявляются в сыворотке крови после предварительной иммунизации антигенами. Они связываются с нативными антигенами.

Различают несколько видов таких АТ:

Противоинфекционные АТ образуются после попадания в организм антигенов микробов, вирусов, простейших, грибов, токсинов. Соответственно различают антибактериальные, антитоксические, антивирусные и другие АТ.

Неинфекционные антитела

Неинфекционные антигены тоже вызывают появление в организме антител. Среди таких антител различают ксеногенные (антивидовые – против АГ другого вида), аллогенные (внутривидовые – против изоантигенов одного вида) и аутоантитела (к собственным антигенам организма).

В зависимости от оптимальной температуры взаимодействия с антигеном различают холодовые (реакция от 0 до 18 °С) и тепловые (37 °С) антитела.

Аффинность и авидность

Сила связывания (сродство) одного активного центра АТ с эпитопом антигена получила название аффинности (аффинитета).

Прочность связывания всей иммуноглобулиновой молекулы с антигеном называется авидностью (авидитетом). Обычно она прогрессивно увеличивается с увеличением количества активных центров в иммуноглобулиновой молекуле. Отсюда наибольшей авидностью обладают IgM.

Иммунные комплексы

Иммунные комплексы образуются при взаимодействии активных центров (паратопов) антител и детерминант (эпитопов) антигенов в нейтральной среде (рН 7,2-7,3) за счет слабых связей. Иммунные комплексы вызывают феномены агглютинации, преципитации и лизиса. Иммунные комплексы активируют комплемент по классическому пути.

При обычном иммунном ответе иммунные комплексы (ИК) связываются:

- 1) с CR-1-рецепторами эритроцитов и утилизируются в селезенке;
- 2) с Fc-рецепторами лейкоцитов (нейтрофилов, макрофагов), фагоцитируются и расщепляются.

Иммуногенность антигена

Каждое антитело специфично к одному эпитопу и может реагировать на близкие к нему по строению эпитопы. Чем больше эпитопов на молекуле и чем выше их разнообразие, тем сильнее иммунный ответ на антиген. Особенности иммунного ответа на антиген представлены на рисунке 68 (см. Приложение).

Контрольные вопросы:

1. Опишите строение иммуноглобулинов.
2. Перечислите возрастные особенности содержания иммуноглобулинов у человека.
3. Какие существуют виды антител?
4. Что такое иммунный комплекс?
5. Какие иммуноглобулины определяют при развитии и лечении коронавирусной инфекции?

Тема 17

БИОТЕХНОЛОГИИ НА ОСНОВЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК

Производство человеческих иммуноглобулинов

Методы получения антител подразделяются на гибридомные и дисплейные. Ранее указывалось, что синтез антител В-лимфоцитами *in vitro* возможен, если осуществить слияние этих клеток с миеломными (создание гибридом).

Получение антитела дисплейным методом *in vitro* схематически подражает эволюционному процессу формирования антител в организме:

- сначала необходимо породить разнообразие генов, кодирующих вариабельные фрагменты иммуноглобулинов – так получают библиотеки иммуноглобулинов.
- Затем нужно экспрессировать эти гены, то есть преобразовать генотип в фенотип (получить требуемые иммуноглобулины).
- Основным процессом является осуществление селективного давления, которое заставляет генотип направленно эволюционировать для получения нужного фенотипа, т.е. иммуноглобулинов.

Обычно клетки, производящие иммуноглобулины, культивируют в биореакторах-ферментёрах объемом от 100 до 25 000 л. Производство антител и других рекомбинантных белков делится на две большие стадии: *upstream process* (USP), включающий все стадии от размораживания пробирки с клоном-продуцентом до сбора среды культивирования, и *downstream process* (DSP) – процесс выделения и очистки продукта.

Производство моноклональных антител

Наиболее широко используются моноклональные антитела (МКА) в медицинской диагностике. Разработано множество тест-систем для постановки диагнозов. МКА используются и в процессах очистки веществ. Если получить антитела определенного типа и иммунизировать ими животное, то образуются абзимы (анти-антитела, или анти-идиотипные антитела). Они действуют на иммунную систему как псевдоантиген и поэтому могут быть использованы для ее стимуляции. На этом принципе основано получение вакцин нового типа. Наборы МКА могут быть также предназначены для борьбы с аллергенами. Благодаря высокой специфичности МКА широко используются в качестве зондов для точного определения природы молекул поверхности клеток и клеточных органелл.

Названия всех моноклональных антител (МКА) оканчиваются на «-mab» (от **m**onoclonal **a**ntibody). Если антитело получено от мыши, добавляется буква «o», и окончание у таких антител «-omab». Химерные антитела получили окончание «-ximab». Гуманизированные антитела имеют окончание «-zumab», полностью человеческие – «-umab». Например, **trastuzumab**, который применяется при раке молочной железы, – это гуманизированное МКА; **rituximab**, используемый для лечения В-клеточных лимфом, – химерное МКА.

Производство МКА является наиболее быстро развивающимся сегментом фармацевтической индустрии, составляющим третью часть всех биотехнологических продуктов. За последние 15 лет были утверждены более 40 терапевтических МКА. Большинство из них – молекулы IgG1. Некоторые причины успеха этого

класса иммуноглобулинов обусловлены тем, что они обладают долгим временем полужизни в сыворотке, а также эффекторными функциями их Fc-регионов.

Производство вакцин

Производство вакцин активизировало развитие клеточных технологий в 1950–1960-х годах. Первая вакцина, произведенная в линии клеток человека – против краснухи (1970 год). Для ее создания Стэнли Плоткин заражал клетки WI-38 вирусом и растил их при 30 °С. Это позволило отобрать штамм вируса, приспособленный именно к этой температуре, а не к 37°С, при которых вирус погибал. Сегодня крупномасштабное производство вирусных частиц в клеточных линиях осуществляется в биореакторах, которые еще называют ферментерами.

Схема технологического процесса производства вакцин

Для биореактора клетки из флакона сначала размножают, для чего обычно используют роллерные бутылки. С поверхности бутылей клетки в виде суспензии переносят в биореактор, где постоянно перемешивают, в результате чего они формируют клеточные сфероиды. Это позволяет более эффективно использовать объем и питательную среду и многократно увеличить концентрацию вируса на литр среды. При достижении максимальной плотности клетки заражают вирусом, после чего они начинают его производить в большом количестве. Вирус собирают из культуральной среды, инактивируют, очищают и в итоге получают готовую вакцину.

В 2019 г. новый коронавирус 2019-nCov вызвал пандемию COVID-19 (Corona Virus Disease). Возбудитель коронавируса с помощью S-белков фиксируется на поверхности клеток человека, используя в качестве рецептора мембранно-связанный ангиотензин-превращающий фермент 2 (АПФ-2). Попадая внутрь клетки, вирус заставляет ее начать трансляцию его РНК, чтобы продуцировать еще больше вирусных частиц. Иммунный ответ на это инфицирование включает следующие этапы: 1) специализированные «антигенпрезентирующие клетки» (АПК) фагоцитируют вирус и представляют его фрагменты на своей поверхности для последующей активации Т-хелперных клеток. 2) Т-хелперы обеспечивают другие стадии иммунного ответа: 3) В-лимфоциты вырабатывают антитела, которые блокируют вирус, не позволяя ему заражать клетки, а также маркируют его с целью последующего разрушения. 4) Т-киллеры идентифицируют и уничтожают инфицированные вирусом клетки.

В отношении **коронавируса испытывают как минимум восемь типов вакцин**, основанных на различных типах вирусов или вирусных компонентах. Вакцины на основе вируса – использование данного вируса в ослабленной или инактивированной форме. Атенуированные вакцины – вирус обычно ослабляется путем пассирования в клетках животных или человека, пока не проявятся мутации, которые делают его менее способным вызывать заболевание. Инактивированный вирус – вирус убивают с использованием химических веществ, таких как формальдегид, или физических факторов, например, тепла. Вакцины на основе нуклеиновых кислот – использование генетических конструкций на основе ДНК или РНК для синтеза белка коронавируса, который вызывает иммунный ответ. Нуклеиновая кислота встраивается в клетки человека, которые затем производят копии вирусного белка; большинство из этих вакцин кодируют S-белок вируса. Вирусный вектор – вирус (кори или аденовирус) генетически модифицируют таким

образом, что он получает способность продуцировать коронавирусные белки в организме, но такие вирусы ослаблены и поэтому они не вызывают заболевание. Вакцины на основе белков – используют фрагменты белков или белковые оболочки, имитирующие внешний слой коронавируса. Белковые субъединицы – субъединичные вакцины, основанные на S-белках вируса или ключевой его части, называемой участком связывания рецептора. Вирусоподобные частицы «пустые» вирусные оболочки имитируют структуру коронавируса, но не могут вызывать заболевание, поскольку они не содержат в своем составе генетический материал. По данным ВОЗ, в мире проводится более 110 исследований новых коронавирусных вакцин, причем некоторые из них в России, США, Китае и некоторых других странах прошли клинические испытания и массово используются для прививок населения, начиная с конца 2020 г. и начала 2021 г.

Клеточная терапия

Применение клеток в лечении – клеточная терапия – имеет долгую историю. На своей заре эти методы не имели почти никаких юридических ограничений, поскольку применялись крайне редко, а научный прогресс существенно опережал законодательство. Еще в XVII веке Жан-Батист Дени переливал кровь от овцы человеку. Гематология и по сегодняшний день является областью, где наиболее часто используют методы клеточной терапии. Точнее, преимущественно один метод – трансплантация кроветворных (гемопоэтических) СК после химиотерапии.

Трансплантация аутологичных кроветворных стволовых клеток (СК)

СК из периферической крови получают после предварительной стимуляции их выхода в кровоток из костного мозга, вводя препарат рекомбинантного белка (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор). СК костного мозга получают из тазобедренных костей, прокалывая их в нескольких местах с помощью специальной иглы. При этом получают в общей сложности около 1 л суспензии. После сепарации и культивирования стволовые клетки возвращают в организм.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК)

МСК открыты нашим соотечественником Александром Фриденштейном в 60-х годах прошлого столетия. МСК называют клетки соединительной ткани, способные дифференцироваться в клетки костной, хрящевой и жировой тканей (как обязательное условие, хотя и не только в них). МСК продемонстрировали высокую эффективность при регенерации их. Регенеративный эффект МСК обусловлен не столько приживлением самих трансплантируемых клеток, сколько выделяемыми ими веществами и микрочастицами, которые стимулируют регенеративную активность собственных стволовых клеток. Такая особенность открывает возможность создания аптечной формы «лекарства» для активации регенерации на основе выделяемых МСК факторов.

Лечение другими типами стволовых клеток

Другим распространенным клеточным продуктом являются клетки пуповинной крови, которые содержат большое количество клеток на ранних стадиях дифференцировки и не успели накопить генетических ошибок. Эти клетки можно использовать вместо костного мозга, не нанося травму при выделении. Однако в протоколах для костного мозга необходимо больше клеток, чем есть в крови одной пуповины, что требует разработки специальных протоколов для клеток пуповинной крови. Сегодня создается много протоколов клинических исследований

для лечения с помощью СК неврологических, аутоиммунных, сердечно-сосудистых и наследственных заболеваний.

Клеточная иммунотерапия опухолей

Одним из наиболее важных и продуктивных направлений клеточной терапии является адаптивная клеточная иммунотерапия, при которой иммунные клетки программируются на распознавание и уничтожение опухолей. При этом в собственные иммунные клетки пациента *in vitro* вводят ген, обеспечивающий распознавание «ракового антигена» (молекулы, которой много на раковых клетках, но почти нет на нормальных). После генетической модификации клетки вводят обратно пациенту.

1. При связывании антитела антигеном на поверхности опухолевой клетки высвобождаются цитотоксические гранулы, которые убивают раковую клетку (ADCC (antibody-dependent cytotoxicity – «антителозависимая цитотоксичность»). Наиболее активны в отношении ADCC клетки - *натуральные киллеры* (NK-клетки). 2. ADCP (antibody-dependent phagocytosis – антителозависимый фагоцитоз), при котором макрофаг после связывания антитела с рецептором поглощает целиком и раковую клетку, и связавшееся с ней антитело. 3. CDC (complement-dependent cytotoxicity – комплемент-зависимая цитотоксичность) - с Fc-фрагментом связывается белок C1q системы комплемента, и запускается каскад, приводящий к формированию в мембране раковой клетки канала и гибели клетки.

CAR-технологии

За распознавание «ракового антигена» отвечают химерные рецепторы антигенов (chimeric antigen receptor, CAR) из-за чего метод называют CAR-технологией. Антиген в теории возможно подбирать индивидуально для каждого пациента, но пока используют некоторые более-менее универсальные для определенных типов опухолей антигены, например CD19 для В-клеточных лимфом. В настоящий момент ведутся клинические испытания около сотни CAR-технологий, а в июле 2017 года одобрение FDA (надзорного органа США по контролю оборота лекарств и пищевых продуктов) получила первая такая технология – для лечения В-лимфом модифицированными Т-клетками, нацеленными против антигена CD19.

Клеточный компьютер Фуссенгера

Недавно был создан биологический двухъядерный процессор, похожий на электронный, интегрировав в клетку два ядра. Этот биологический компьютер крайне мал, но, теоретически, может быть масштабирован до любого мыслимого размера. Клеточный компьютер представляет собой микроткань с миллиардами клеток, каждая из которых оснащена двухъядерным процессором. Такой «вычислительный орган» может достичь вычислительной мощности, намного превышающей мощность цифрового суперкомпьютера, используя лишь немного энергии».

Контрольные вопросы:

1. Опишите процесс получения антител дисплейным методом.
2. Опишите схему технологического процесса производства вакцин.
3. Что такое клеточная иммунотерапия опухолей?
4. Что собой представляет клеточный компьютер Фуссенгера?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известный популяризатор медико-биологических знаний С.Ф. Багиров написал статью «CD-ландшафт клеток». Он дает описание кластерам дифференцировки (cluster of differentiation, cluster designation, CD) – это маркер, который идентифицирует конкретный паттерн (шаблон, регулярность) клеточной дифференцировки, выявляемый специфическим моноклональным антителом. Номенклатура CD завоевала официальный статус: она принята научным сообществом и одобрена Международным союзом иммунологических обществ и Всемирной организацией здравоохранения. Список CD-антигенов, внесённых в номенклатуру, постоянно пополняется и в настоящее время содержит 350 CD-антигенов и их подтипов. Два наиболее широко используемых CD-маркера – CD4 и CD8, которые соответственно являются характерными для Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов. Эти молекулы определяются в сочетании с CD3+, так и с другими маркерами для других популяций клеток (некоторые макрофаги экспрессируют низкие уровни CD4; дендритные клетки имеют высокие уровни CD8). Вирус иммунодефицита человека связывает CD4 и хемокиновый рецептор на поверхности Т-хелперов для проникновения в клетку. Таким образом, количество Т-лимфоцитов CD4 и CD8 в крови часто используется для мониторинга развития ВИЧ-инфекции.

В настоящее время инициирован проект CD Maps: многопрофильная исследовательская программа для создания карты клеточной поверхности иммунных клеток человека. Планируется проверить экспрессию уже известных CD маркеров на основных клеточных типах, используя современные возможности лабораторной диагностики. Точность данных обеспечивается использованием стандартизированных протоколов многоцветной проточной цитометрии. CD Maps должен создать огромную базу данных профилей экспрессии молекул, которая будет представлять собой уникальный ресурс с открытым доступом для фундаментальной, трансляционной и клинической иммунологии.

Современные методы исследования клеток

Проточная цитометрия – метод исследования дисперсных сред в режиме поштучного анализа элементов дисперсной фазы по сигналам светорассеивания (прямое светорассеивание – для определения относительного размера клеток или частиц; боковое светорассеивание – для оценки неоднородности внутриклеточного содержимого клетки, например, размеров ядра и гранулярности цитоплазмы) и флуоресценции (изучение клеточных маркеров с помощью меченных флюорохромными красителями антител к поверхностным и внутриклеточным компонентам клеток).

Иммунопреципитация – способ, с помощью которого можно выделить из смеси и осадить («precipitate») искомую молекулу за счет образования комплекса антиген-антитело.

Вестерн-блоттинг или ***иммуноблоттинг*** («blotting» – промокание) – аналитический метод, основанный на комбинации гель-электрофореза (проведение электрофоретического разделения белков) и иммунохимической реакции «антиген/антитело-исследуемый белок».

Иммуногистохимия – метод выявления специфических антигенов в тканях в результате распознавания соответствующим антителом с последующим анализом микропрепаратов на светооптическом уровне.

Трансфекция – метод генной инженерии, заключающийся в изменении фенотипа путем введения в эукариотическую клетку чужеродной нуклеиновой кислоты без использования вирусов. Вирусная «доставка» нуклеиновой кислоты называется трансдукцией.

CRISPR-технологии редактирования геномов. Система иммунитета присуща многоклеточным организмам, поскольку они обладают клеточными и гуморальными средствами неспецифической и специфической защиты от попадания во внутреннюю среду организма чужеродной генетической информации. Бактерии и археи не имеют такой системы защиты, как у животных, поскольку бактерии – существа одноклеточные. В 1987 году в геноме кишечной палочки *E. coli* был обнаружен загадочный участок, состоящий из многочисленных повторов. Функция этого участка, названного CRISPR-локусом, долгое время оставалась загадкой. Но в 2005 году сразу три группы ученых сообщили, что разделяющие эти повторы промежуточные последовательности зачастую бывают идентичны последовательностям, найденным в геномах бактериофагов и в плазмидах. Эта находка запустила целый каскад исследований, показавших, что бактерии не беззащитны против вирусов-бактериофагов и других патогенов. Система элементов геномной последовательности, названная CRISPR (произносится «КРИСПЕР»), и ассоциированные с ней белки Cas помогают им распознавать и уничтожать чужеродный генетический материал. Название локуса CRISPR «Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats» переводится как «скопление разделенных регулярными промежутками коротких симметричных повторов». В каждом конкретном локусе все повторы практически одинаковы и имеют длину от 24 до 48 пар нуклеотидов. Промежутки также примерно одинаковы по длине (21–72 п. н.), но весьма вариабельны по последовательностям ДНК. Промежуточные последовательности, или спейсеры, часто происходят из плазмид и фагов. Бактерии, выжившие после атаки фага, в результате так называемой адаптации пополняют свой CRISPR за счет спейсеров, идентичных небольшим «трофейным» участкам ДНК фага. Следовательно, спейсерные последовательности массива CRISPR – это память бактерии-хозяина о вирусных инфекциях и встречах с инородным генетическим материалом, напоминающая альбом сыщика, в котором на одинаковых листах прикреплены фотографии разных преступников.

Теперь рассмотрим исследования Д. Дудна и Э. Шарпентьер, которым была присуждена Нобелевская премия по химии в 2020 году. Длинная молекула РНК, которая образуется после транскрипции CRISPR, разрезается на фрагменты. Они называются CRISPR РНК (crРНК), причем каждый содержит спейсер и часть повтора. В этом процессе участвует небольшая РНК, комплементарная повторам, – tracrРНК: она необходима для точной работы белка Cas9 в комплексе с ферментом РНКазой III, катализирующим разрывы длинной молекулы РНК. Затем РНКазой III отделяется и организуется комплекс двух молекул crРНК и tracrРНК с белком Cas9. Белок Cas9 является дезоксирибонуклеазой. Белок Cas9 после связывания с tracrРНК за счет изменения третичной структуры приобретает способность осуществлять двухцепочечные разрывы в молекуле ДНК.

В описываемом процессе деградации чужеродной ДНК необходимо учесть возможность повреждения собственных генов бактерии. Для этого имеется механизм, согласно которому белки Cas узнают и затем деградируют опознанную РНК-гидом последовательность ДНК только при наличии после сайта-мишени короткой (от трех до девяти нуклеотидов) последовательности РАМ (protospacer adjacent motif). Cas9 распознает мишень с помощью crРНК, которая удерживается в молекуле Cas9 благодаря посредничеству tracrРНК. Фермент разрезает обе цепи ДНК.

Широкое применение предложенного метода точного разрезания двухцепочечной ДНК основано на объединении tracrРНК и crРНК в одну цельную молекулу РНК, названную РНК гидом, или sgРНК, от англ. single-guide RNA и изобретении вектора для клонирования этой РНК. Оказалось, что такая синтетическая sgРНК образует комплекс с белком Cas9 так же, как tracrРНК и crРНК по отдельности. Эта синтетическая молекула, находит комплементарные ДНК и правильно размещает Cas9 для их точного разрезания.

Создание различных sgРНК обеспечило развитие прорывных исследований в рамках проблемы редактирования геномов. Создаваемый фирмами-производителями фрагмент sgРНК, должен быть комплементарен участку ДНК-мишени для точного разрезания с последующей направленной модификацией генов. После того, как разрез в нужном месте сделан, клетка сама стремится его ликвидировать с помощью процесса, называемого репаративным синтезом ДНК.

В современной биотехнологии широко используется высокоточный генный скальпель, состоящий из sgРНК и Cas9. Для этого применяют CRISPR-Cas9 клонирующий вектор, т.е. кольцевую молекулу ДНК, которая кодирует sgРНК и матричную РНК белка Cas9. Такие векторы предлагаются биотехнологическими фирмами для точной вставки, с возможностью вставить в нужное место участок комплементарный ДНК-мишени. В таком векторе кроме кодирующих последовательностей, будут и управляющие, которые определяют начало транскрипции РНК. В коммерческий вектор вставляют изучаемую последовательность ДНК и ее вводят в клетки специального лабораторного штамма кишечной палочки. В результате культивирования делящиеся клетки многократно копируют вектор (процесс молекулярного клонирования). Копируют, но «не читают», так как sgРНК и Cas9 в бактериальных клетках не синтезируются. После этого вектор выделяют из бактерий и трансформируют им клетки, геном которых подлежит редактированию. В трансформированных клетках синтезируются РНК-гид и Cas9. Их комплекс переносится в ядро и находит полинуклеотидные цепи ДНК, подлежащие точному разрезанию. За короткие сроки синтезирована огромная библиотека РНК-гидов, включающая более 100 000 различных sgРНК. С ее помощью можно направлять Cas9 на 85–95% всех последовательностей генома человека.

Новейшие исследования в области клеточной биологии

1. У гигантских пандоравирусов выявлены некоторые реакции клеточного энергетического метаболизма. В частности, у них обнаружена способность создавать протонный градиент на мембране. *Pandoravirus salinus* был открыт в 2013 году и привлек внимание своим огромным геномом размером в два с половиной миллиона пар оснований, всего в два раза меньше, чем у кишечной палочки *E. coli*. Вместо капсида у зрелых частиц пандоравирусов есть аналог мембраны, под которой располагается многослойная оболочка. Мембраны играют ключевую

роль в энергетическом метаболизме живых клеток. У некоторых гигантских вирусов, возможно, есть частично автономный энергетический метаболизм, поскольку у них обнаружены аналоги ферментов цикла трикарбоновых кислот. С помощью биоинформатического анализа в геноме вируса выявлены восемь генов со слабым сходством с генами ферментов цикла трикарбоновых кислот. Такая последовательность реакций «прокручивает» молекулу ацетил-КоА с образованием восстановленных переносчиков протонов, которые затем передают их на мембрану. Оказалось, что шесть из этих восьми генов экспрессируются одновременно, в конце цикла развития вируса. Однако синтез рекомбинантных ферментов, соответствующих этим генам, в клетках кишечной палочки, показал, что только один из них обладает изоцитратдегидрогеназной активностью. Зачем пандоравирусам нужен энергетический метаболизм, не совсем понятно – следов синтеза АТФ в зрелых частицах не обнаружено. При дальнейшем развитии подобных исследований может быть построен эволюционный мост между классическими вирусами, способными размножаться только за счет паразитирования в клетках, и формированием клеток, обладающих геномом, обеспечивающим самостоятельную жизнедеятельность.

2. До 1960-х годов считалось, что у взрослых млекопитающих не появляются новые нейроны, а гибель нервных клеток компенсируется за счет перераспределения функций среди оставшихся. В 1962 году Жозеф Олтман из США в экспериментах на крысах впервые показал, что у взрослых грызунов идет процесс нейрогенеза, а через 30 лет, в 1998 году группа Петера Эрикссона обнаружила, что новые клетки образуются и в мозге взрослых людей. У большинства млекопитающих после рождения новые нейроны образуются в двух участках головного мозга: на стенках боковых желудочков мозга и в зубчатой извилине гиппокампа. В этих местах остаются нейральные стволовые клетки (которые очень похожи на эмбриональную радиальную глию), которые и дают новые нейроны и клетки глии. Последние наблюдения за работой мозга человека и других млекопитающих показывают, что некоторые клетки мозга, к примеру, центр обоняния, обновляются практически непрерывно, а в других его регионах, в том числе в гиппокампе, центре памяти, присутствуют достаточно большие колонии стволовых клеток, которые предположительно участвуют в нейрогенезе. Восстановление нейронных сетей мозга после различных повреждений остается актуальной интенсивно изучаемой проблемой. В ее решении следует учитывать виды подвижности, характерных для нервных стволов. Во-первых, это распространение электрических сигналов по перекресткам Ранвье, во-вторых, направленное перемещение везикул по тубулиновым филаментам аксонов с помощью биохимических моторов динеинов и кинезинов, в-третьих, трансмембранный перенос катионов и работа регулируемых каналов, в-четвертых, направленный рост конуса регенерирующего нерва и наконец – транспорт клеток по нервам. Последний тип перемещения клеток вдоль нерва является многообещающим путем переноса клеток через гемато-энцефалический барьер. В диссертации Ю.П. Токальчик «Эффективность репаративных процессов в поврежденных участках головного мозга в условиях периневральной имплантации стволовых клеток», выполненной под руководством академика НАНБ В.А. Кульчицкого в Институте физиологии НАНБ решалась задача доставки стволовых клеток по нейронам к поврежденным участкам мозга. В работе установлена

способность экзогенных мезенхимальных стволовых клеток периневрально перемещаться в поврежденный участок головного мозга крыс после введения в рецептивные окончания обонятельного и тройничного нервов, что обеспечивает увеличение числа стволовых клеток в области травмы и обеспечивает восстановление поврежденных нейронов.

3. Каким было начало эволюции эукариотической клетки? На этот вопрос ответить непросто, так как мы не знаем никаких промежуточных форм, существовавших на ранних этапах развития эукариот от прокариотического предка. Однако определенные сведения об этих древнейших этапах можно получить, анализируя и сравнивая геномы современных эукариот и прокариот. Международная группа генетиков решала эту задачу, выбрав для изучения только консервативные семейства белков и соответствующие им гены. Выделив процессы наследования, дупликации и новообразования, ученые обрисовали вероятный сценарий становления эукариот. Асгардархейный предок (особая группы архей, обитающих в настоящее время в районах глубоководных черных и белых курильщиков), гены которого чаще других дублировались и становились источником полезных инноваций, стал, по всей видимости, хозяином эндосимбионта (родственного альфа-протеобактериям), который со временем трансформировался в митохондрии. Гены бактерий различных линий внесли наибольший вклад в организацию метаболизма эукариот.

4. Уникальное происхождение митохондрий в ходе эволюции обуславливает их роль в вирус-опосредованных иммунных реакциях. Митохондрии являются потомками эндосимбиотических бактерий и сохраняют важные прокариотические свойства, такие как компактный кольцевой геном. Следовательно, у млекопитающих митохондриальная ДНК подвергается двунаправленной транскрипции, которая генерирует перекрывающиеся транскрипты, способные образовывать длинные двухцепочечные структуры РНК. Обнаружено, что наличие высоко нестабильных молекул нативных митохондриальных двухцепочечных РНК в цитоплазме регулирует активность сигнального пути MDA5 (melanoma-differentiation-associated gene 5, член семейства РНК-хеликазных рецепторов), который запускает реакцию на интерферон I типа. Митоптоз – это запрограммированная смерть митохондрий, включающая последовательность биохимических реакций, приводящих к удалению поврежденных митохондрий, или в случае более серьезных изменений – к интоксикации клетки и её последующему апоптозу (В.П. Скулачев). Последовательность событий «сигнал к самоликвидации митоптоз – апоптоз» отражает основные положения теории самоуничтожения клеток, которая подразумевает неспособность обеспечить скорость восстановления клеток, соразмерной их гибели. Митоптоз представляет собой механизм избавления клетки от «опасных» митохондрий, ставших таковыми в результате *увеличения концентрации свободных радикалов*, преимущественно, активных форм кислорода (АФК), или неспособности эти радикалы устранять. Этот механизм полезен, когда клетке необходимо избавиться от единичных поврежденных органелл. Остатки деградировавших митохондрий удаляются в процессе митофагии, ключевым агентом которого являются специальные органеллы – автофагосомы, или в составе митоптотических телец, которые экстрагируются во внеклеточное пространство. Внутри автофагосом митохондрии перевариваются после слияния с лизосомой. Если же

суперпродукция АФК охватила всю митохондриальную сеть, то наступают более трагические последствия для клетки - она вступает в апоптоз.

5. Некодирующие РНК. Некодирующие РНК (нкРНК, в англоязычной литературе – *non-coding RNA*, *ncRNA*) – это молекулы рибонуклеиновых кислот, которые не подвергаются трансляции, то есть по их последовательности не синтезируются белки. В геноме человека число генов некодирующих РНК превышает число белок-кодирующих генов (~23 000 и ~20 000, соответственно, согласно базе данных GENCODE). Если же учесть тот факт, что транскрипции подвергается не вся ДНК, а примерно 50–80% генома, то преобладание некодирующих последовательностей становится гораздо более впечатляющим: лишь 2% из образующихся РНК транслируется в белки, а оставшиеся 98% приходятся на нкРНК. Некодирующие РНК могут выполнять либо инфраструктурные, либо регуляторные функции. К инфраструктурным некодирующим РНК относят рРНК, тРНК и малые ядерные РНК. Для синтеза белков они необходимы не меньше, чем матричная РНК (мРНК), несущая информацию о необходимой последовательности аминокислот: рРНК являются компонентом рибосом, непосредственно синтезирующих белки, а тРНК «приносят» к рибосомам аминокислоты, из которых и синтезируется полипептидная цепь. Малые ядерные РНК участвуют в сплайсинге (процесс удаления интронов из незрелой мРНК) и регуляции РНК-полимеразы II – фермента, осуществляющего транскрипцию предшественников мРНК, микроРНК и самих мяРНК. Гены рРНК, тРНК и мяРНК относятся к генам «домашнего хозяйства» (*housekeeping genes*), и мутации в них несовместимы с жизнью. Регуляторные некодирующие РНК можно разделить на малые (20–400 нуклеотидов) и длинные (от 200–400 до десятков тысяч нуклеотидов). Все они участвуют в модификации других РНК и играют важную роль в регуляции экспрессии генов на разных уровнях. Хотя функциональная значимость установлена лишь для 1% всех длинных нкРНК человека, то есть примерно для полутора сотен видов молекул, показано, что они играют важную биологическую роль. Например, длинная регуляторная нкРНК под названием *Xist* участвует в процессе инактивации одной из двух X-хромосом у млекопитающих женского пола. *Xist* является самой длинной некодирующей РНК – её длина составляет 17 000 нуклеотидов! *Xist* функционирует на уровне организации хроматина, однако прочие длинные нкРНК способны регулировать экспрессию генов и на других уровнях: транскрипции, сплайсинга и посттранскрипционных процессов. Механизмы этой регуляции различны: одни нкРНК способствуют усилению взаимодействия нуклеиновых кислот с белками; другие функционируют как молекулярные «ловушки» или «губки» для белков и микроРНК, захватывающие молекулы и предотвращающие их взаимодействие с другими компонентами молекулярных путей.

Малые регуляторные нкРНК вовлечены во многие физиологические и патологические процессы: пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток, секрецию инсулина, биосинтез холестерина и др. Обнаружено, что все малые РНК функционируют на основе механизма РНК-интерференции. За открытие этого механизма американские исследователи Эндрю Файер (Andrew Fire) и Крейг Мелло (Craig Mello) в 2006 году получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине. Суть РНК-интерференции заключается в подавлении экспрессии гена на

посттранскрипционном уровне (после синтеза мРНК), при активном участии малых молекул РНК – кРНК или микроРНК. Считается, что микроРНК способны управлять экспрессией до 30% всех белок-кодирующих генов. Тем самым эти малые нкРНК регулируют многие процессы жизнедеятельности клеток: пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и др. И малым и длинным некодирующим РНК свойственна тканеспецифичная экспрессия, когда каждый отдельный тип нкРНК преобладает в какой-либо одной ткани организма. Так, miR-1 чаще других микроРНК встречается в мышечной ткани, в том числе и в сердце, а miR-122 с большей вероятностью обнаружится в гепатоцитах. Нарушения экспрессии нкРНК сопровождают многие заболевания, в том числе онкологические и наследственные, хотя в большинстве случаев неясно, является ли изменение экспрессии причиной или следствием болезни. К изменению уровня экспрессии – то есть снижению или усилению синтеза микроРНК могут приводить внешние факторы, например, ионизирующая радиация или воздействие перекиси водорода. Под их воздействием или спонтанно могут происходить мутации генов микроРНК, химические модификации ДНК и гистонов, активация генов транскрипционными факторами. Всё вышеперечисленное способно нарушать экспрессию микроРНК, вызвать увеличение или снижение количества молекул микроРНК в клетке, ослабление или усиление экспрессии мРНК-мишеней, а также может привести к появлению новых мишеней у микроРНК. Такие клеточные процессы могут отразиться и на здоровье человека – от появления незначительных особенностей фенотипа до развития тяжёлых болезней. Некоторые регуляторные нкРНК могут функционировать как онкогены – усиление их экспрессии ассоциировано со злокачественным перерождением, пролиферацией и миграцией опухолевых клеток. Как правило, в таком случае эти нкРНК подавляют экспрессию генов-супрессоров опухоли. Например, избыточный синтез miR-21, наиболее известной и изученной онкогенной микроРНК, ингибирует экспрессию PDCD4 – белка, стимулирующего апоптоз раковых клеток.

6. Некроптоз называют «запрограммированной формой некроза», так как он демонстрирует морфологические признаки, сходные с некрозом (набухание клеток с последующим разрывом плазматической мембраны), но при этом имеет четкую систему регуляции. Впервые был открыт в 1996 году в гепатоцитах свиньи, инфицированных вирусом коровьей оспы. Предполагается, что эволюционное значение этой формы клеточной смерти состоит в обеспечении резервного пути элиминации клеток в случаях ингибирования апоптотического пути. Некроптоз запускают различные стимулы, включая активацию рецепторов смерти (ключевую роль играет TNFRSF1A из надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, активирующий транскрипционный фактор «каппа-би» NF-κB; также возможна активация через FAS-рецептор), Toll-подобных рецепторов (TLR3 и TLR4), внутриклеточных сенсоров нуклеиновых кислот (например, Z-ДНК-связывающий белок 1 (ZBP1), также известный как DAI), рецепторов ретиноевой кислоты протеин 3 респондеров (RARRES3 или RIG1), белка эндоплазматического ретикулума, стимулятора генов интерферонов 173 (TMEM173 или STING) и рецепторов адгезии. Лиганды, активирующие внешний путь апоптоза (например, TNFSF10 или TRAIL, Fas-лиганд FASLG/FasL/CD95L), также могут

вызывать некроптоз при блокировке действия CASP8 и вызывающего смерть сигнального комплекса (DISC) ингибиторами каспаз (Z-VAD-FMK) или в случае истощения Fas-ассоциированных доменов смерти (FADD). Некроптоз не только опосредует адаптивный ответ при стресс-индуцированном нерепарируемом повреждении клеток, но также участвует в программах защиты эмбрионального развития (устранение потенциально дефектных организмов внутриутробно), а также в поддержании гомеостаза Т-клеток у взрослых. На молекулярном уровне некроптоз зависит от последовательной активации рецептора протеинкиназы-3 (RIPK3) и киназного домена смешанной линии, подобного псевдокиназе (MLKL). После инициации некроптоза RIPK3 активируется RIPK1 (при условии, что CASP8 неактивна - отличие от апоптоза) посредством взаимодействия между гомотипическими RHIM-доменами. Фосфорилирование этих белков в их киназном домене способствует RHIM-опосредованному взаимодействию, что приводит к образованию амилоидоподобного нитевидного сигнального комплекса, называемого некрсомой.

7. Пять экстремальных организмов, способных выжить на других планетах. Люди не могут находиться в суровых условиях космоса без специальной защиты, но прямо сейчас на Земле живут существа, которым не страшны кислотные дожди Венеры и солнечная радиация Марса.

Без кислорода. Бактерии – настоящие супергерои природы. Около 3,8 млрд лет назад первым живым организмам пришлось столкнуться с отсутствием кислорода, высокой радиацией и скачками температуры. Они смогли не только выжить, но и дали потомство, которое постепенно эволюционировало, пока не превратилось в предков людей. Древние микроорганизмы использовали серу, азот, железо, марганец и водород для дыхания и получения энергии. Некоторые бактерии делают так до сих пор. Например, самая обычная кишечная палочка (*Escherichia coli*) относится к так называемым анаэробам. Она прекрасно себя чувствует без кислорода – более того, его присутствие для нее ядовито. Бактерии обитают в кишечнике людей и помогают переваривать растительную пищу, но вполне могли бы выжить и на планетах, в атмосфере которых нет кислорода.

В кипящей воде. Для многощетинкового помпейского червя жизнь вблизи горячих гидротермальных источников – просто райское наслаждение. Исследователи долго не могли понять, как же он там не варится заживо. Когда этот организм только обнаружили, зоологи попытались поднять его на поверхность. Но без привычного экстрима червь скоропостижно скончался. Проведя молекулярно-генетические исследования, ученые еще больше запутались. У животного не было ни одного гена, отвечающего за защиту от высоких температур. Да и внешние покровы не отличались от обычного червя. Пришлось присмотреться повнимательнее. Оказалось, что на поверхности червя обитают симбиотические бактерии, которые защищают организм не только от высоких температур, но и от сероводорода. Такая прослойка поддерживает температуру внутри тела в районе +22°C. А выделения бактерий служат помпейскому червю пищей. Еще один кандидат для потенциальной колонизации других планет!

На высоте при низких температурах. Антарктический лишайник (*Pleopsidium chlorophanum*) способен обитать в самых негостеприимных местах

на Земле. Например, в Антарктиде на высоте до 2000 м. Он комфортно чувствует себя в холоде, сухости и условиях высокого ультрафиолетового излучения. Возможно, когда-нибудь это то ли растение, то ли гриб поможет заселить Марс. Однажды ученые поставили смелый эксперимент. Они смоделировали в лаборатории марсианские условия с радиацией, высокой температурой и составом атмосферы. Антарктический лишайник не просто выжил, но и фотосинтезировал, выделяя кислород. Настоящая находка для будущих колонизаторов Марса.

При радиации. Бракониды – семейство паразитических ос-наездников, которые откладывают яйца в еще живое насекомое. По мере взросления личинки питаются плотью несчастной жертвы. Когда-то бракониды вдохновили создателей фильмов про Чужих, но эти осы на самом деле космические. Например, они очень устойчивы к радиации: если максимум для таракана – 10 000 рад, то оса выживет при уровне радиации до 180 000 рад. Человеку же с его максимумом в 500 рад вообще лучше без специальной защиты в космос не выходить.

В космосе. Не каждая рыба способна стать космонавтом, но фундулюсу обыкновенному это удалось. Ихтиологи узнали о его необычайных способностях, когда обнаружили рыбку в загрязненных водоемах США. В течение 60 лет фундулюс не мог покинуть токсичные реки – пришлось приспособливаться. Повышенная соленость ему тоже нипочем, хотя многим животным такая вода разъедает кожные покровы. Кроме того, эти удивительные рыбы могут терпеть резкие скачки температуры и низкую концентрацию кислорода. В рамках эксперимента фундулюс отправился на два месяца в путешествие на орбитальную станцию «Скайлэб-3», став первой рыбой в космосе.

Мы не знаем, сможет ли когда-нибудь человек освоить другие планеты. Прежде чем строить колонии в Солнечной системе, ученым еще предстоит внимательно исследовать стойкие организмы, приспособившиеся к самым суровым условиям на Земле. Они могут подсказать возможные направления для развития человеческой цивилизации и научат ценить планету, которую мы все делим.

РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ

ПРИМЕРЫ ТЕСТОВЫХ ЗАДАНИЙ

1. Назовите межклеточные контакты запирающего типа:
 - а) межклеточные соединения, интердигитации;
 - б) десмосомы, адгезивный поясок;
 - в) плотное соединение;
 - г) щелевые соединения, синапсы;
 - д) все перечисленное верно.
2. Ген – это:
 - а) участок ДНК, состоящий из экзонов и интронов;
 - б) участок ДНК, где хранится информация о первичной структуре белка;
 - в) участок РНК, соответствующий информации об одном белке на ДНК;
 - г) участок ДНК, где хранится информация о первичной структуре полисахаридов.
3. Выберите верные утверждения:
 - а) ферменты специфичны, каждый фермент катализирует реакции одного типа;
 - б) ферменты универсальны и могут катализировать реакции разных типов;
 - в) каталитическая активность ферментов не зависит от рН и температуры;
 - г) каталитическая активность ферментов зависит от рН и температуры.
4. Универсальным источником энергии в клетке являются молекулы:
 - а) АТФ;
 - б) липидов;
 - в) ферментов;
 - г) углеводов.
5. Углеводы НЕ выполняют в клетке функцию:
 - а) структурную;
 - б) резервную;
 - в) энергетическую;
 - г) передачи информации.
6. Основные положения современной клеточной теории:
 - а) клетка – основная структурно-функциональная и генетическая единица живого;
 - б) клетки всех организмов сходны по строению, химическому составу и отличаются проявлениями процессов жизнедеятельности;
 - в) новые клетки образуются в результате деления исходной клетки;
 - г) новые клетки образуются из неклеточного вещества;
 - д) клетки многоклеточных организмов специализированы и образуют ткани.

7. Способы поступления веществ в клетку:

- а) диффузия и экзоцитоз;
- б) осмос и облегченная диффузия;
- в) диффузия и эндоцитоз;
- г) активный транспорт и экзоцитоз;
- д) гетерофагия и эндоцитоз.

8. Функции мембраны:

- а) структурная, каталитическая, участвует в преобразовании энергии;
- б) барьерная и сигнальная;
- в) энергетическая и структурная;
- г) двигательная и защитная;
- д) механическая, структурная и двигательная.

9. Особенности оболочки ядра:

- а) две элементарные мембраны без рибосом и поры;
- б) одна элементарная мембрана с рибосомами на внутренней поверхности, связанная с каналами ЭПС;
- в) две элементарные мембраны и перинуклеарное пространство;
- г) одна элементарная мембрана с рибосомами на наружной поверхности и поры;
- д) ядерная пластинка; состоящая из белков на внутренней поверхности карие-олеммы и поры.

10. Основу мембраны составляют:

- а) мономолекулярный слой липидов;
- б) бимолекулярный слой липидов, гидрофильные концы которых обращены друг к другу;
- в) сплошной слой белковых молекул;
- г) сплошной слой углеводов;
- д) бимолекулярный слой липидов, гидрофобные концы которых обращены друг к другу.

11. Основной белок микротрубочек:

- а) тубулин;
- б) актин;
- в) виментин;
- г) кератин;
- д) ламин.

12. Класс мембранных липидов составляют все, кроме:

- а) сфинголипиды;
- б) стероиды (холестерин);
- в) спектрины;
- г) гликолипиды;
- д) фосфолипиды.

13. Класс мембранных белков составляет все, кроме:

- а) структурные;
- б) транспортные;
- в) сигнальные;
- г) обеспечивающие межклеточное взаимодействие;
- д) стероиды.

14. Жизненный цикл митотически делящейся клетки подразделяется на следующие периоды, составляющие интерфазу:

- а) S – период, N – период;
- б) G₁ – период, S – период, G₂ – период;
- в) N – период, G₂ – период;
- г) G₂ – период, S – период.

15. Назовите межклеточные контакты простого типа:

- а) межклеточные соединения, интердигитации;
- б) десмосомы, адгезивный поясок;
- в) плотное соединение;
- г) щелевые соединения, синапсы;
- д) все перечисленное верно.

16. Автотрофные организмы ...

- а) образуют большое количество АТФ;
- б) синтезируют органические вещества из неорганических;
- в) синтезируют АТФ, расщепляя и преобразуя органические вещества;
- г) расщепляют органические вещества до неорганических.

17. В процессе биохимических реакций ферменты:

- а) ускоряют реакции, а сами при этом не изменяются;
- б) ускоряют реакции и изменяются в результате реакции;
- в) замедляют реакции, не изменяясь;
- г) замедляют реакции, изменяясь.

18. В процессе репликации ДНК участвуют следующие белки, кроме:

- а) узнающий белок;
- б) топоизомераза;
- в) пептидаза;
- г) геликаза;
- д) полимеразы.

19. Назовите межклеточные контакты коммуникационного типа:

- а) межклеточные соединения, интердигитации;
- б) десмосомы, адгезивный поясок;
- в) плотное соединение;
- г) щелевые соединения, синапсы;
- д) все перечисленное верно.

20. Класс мембранных белков составляет все, кроме:

- а) структурные;
- б) транспортные;
- в) сигнальные;
- г) обеспечивающие межклеточное взаимодействие;
- д) стероиды.

Примечание: каждый студент должен самостоятельно создать 20 тестов, из которых 5 имеют один правильный ответ, 5 – два правильных ответа, 5 – 3 правильных ответа, 5 – все ответы правильные.

ПРОГРАММНЫЕ ВОПРОСЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ

1. Химические основы жизни.

1.1 Признаки живой материи. Клеточный уровень организации живых систем. Биологические часы возникновения и развития жизни на Земле.

1.2 Относительные размеры клеток и их компонентов. Вирусы. Прокариоты. Формирование эукариот.

1.3 Молекулярная биология и филогенетическое дерево. Шесть типов модельных организмов.

1.4 Ковалентные связи. Нековалентные связи. Кислоты, щелочи и буферные растворы. Природа биологических молекул. Четыре типа биологических молекул: углеводы, липиды, белки и нуклеиновые кислоты. Формирование макромолекулярных и надмолекулярных структур.

1.5 Важные молекулярные процессы для человека: 1) свободные радикалы, старение и болезни; 2) нарушения фолдинга белков как причина заболеваний.

2. Биоэнергетика и метаболизм.

2.1. Законы термодинамики. Энергетика метаболических реакций.

2.2. Факторы, влияющие на активность ферментов (концентрация субстрата, фермента, pH, температура, активаторы, ингибиторы).

2.3. Ферментативные метаболические пути (катаболизм, анаболизм), регуляция. Понятие о карте метаболизма. Образование (окислительное фосфорилирование, субстратное фосфорилирование) и расходование (движение, трансмембранный перенос веществ, биосинтезы) энергии.

3. Структура и функция плазматических мембран.

3.1. Функции мембран. Химическое строение мембран. Структура и функции мембранных белков. Мембранные липиды и жидкость мембран.

3.2. Динамическая природа плазматических мембран. Модели мембран. Перенос веществ через мембраны. Мембранные потенциалы и нервные импульсы.

4. Аэробное дыхание и митохондрии.

4.1. Структура и функция митохондрий. Дыхательная цепь внутренней мембраны митохондрий.

4.2. Роль митохондрий в образовании АТФ, хемиосмотическая гипотеза образования электрохимического потенциала. «Молекулярная машина» для синтеза АТФ.

4.3. Образование активных метаболитов кислорода в митохондриях и их биологическая роль. Пероксисомы.

5. Взаимодействия между клетками и их окружением.

5.1. Молекулярная структура межклеточного пространства и его функции. Взаимодействие клеток с компонентами межклеточного пространства.

5.2 Молекулярные основы межклеточных взаимодействий.

5.3. Типы и молекулы прикрепления клеток к межклеточному матриксу. Десмосомы.

5.4. Понятие о трансмембранном сигналинге. Молекулы клеточных оболочек: гемицеллюлоза, пектины, белки.

6. Система цитоплазматических мембран: структура, функции, способы движения.

6.1. Понятие о системе внутриклеточных мембран. Методы исследования: радиоавтография, применение GFP (зеленый флуоресцирующий протеин), препаративное центрифугирование).

6.2. Молекулярное строение и функции эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи, лизосом.

6.3. Молекулярные основы, типы и функции везикулярного транспорта. Химия вакуолей растительных клеток. Эндоцитоз. Посттрансляционное перемещение белков в пероксисомы, митохондрии и хлоропласты.

7. Цитоскелет и молекулярные основы клеточной подвижности.

7.1. Молекулярное строение и функции цитоскелета: микротрубочки, филаменты и микрофиламенты.

7.2. Сокращение мышечных волокон, немышечная подвижность. Цилия и флагелла. Биохимические моторы. Энергетика движений клеточных элементов.

8. Природа гена и генома.

8.1. Концепция «ген как единица наследственности». Хромосомы – физические носители генов. Химическая природа генов.

8.2. Структура генома. Стабильность генома. Программа «Геном человека»: ожидания, реальность и перспективы.

9. Экспрессия генетического материала: от транскрипции до трансляции.

9.1. Основной постулат молекулярной биологии. Особенности транскрипции у прокариот и эукариот. Синтез и процессинг рРНК, тРНК и иРНК. Малые некодирующие РНК и интерферирующие РНК (siRNA).

9.2. Генетический код. Особенности митохондриального генетического кода. Адаптерная роль аминоксил-тРНК. Молекулярные основы трансляции.

10. Клеточное ядро и контроль экспрессии генов.

10.1. Молекулярное строение ядра эукариотической клетки.

10.2. Контроль экспрессии генов у прокариот. Контроль экспрессии генов у эукариот.

10.3. Уровни контроля экспрессии генов: транскрипционный, процессинга, трансляционный, посттрансляционный, эпигенетический.

11. Репликация ДНК и репаративный синтез ДНК.

11.1. Молекулярные основы репликации ДНК и ее биологическая роль. Молекулярные основы репаративного синтеза ДНК.

11.2. Ключевая роль матричных синтезов в происхождении жизни на Земле и эволюции живых организмов.

12. Молекулярные основы деления клеток.

12.1. Химия клеточного цикла. Циклины и циклин-зависимые киназы (Cdk). Cdk-ингибиторы (белки p21, p27).

12.2. Митоз. Мультипротеиновые комплексы - кохезин и конденсин. SCF и APC активности в процессе клеточного цикла. Цитокинез, тубулин и микротрубки.

13. Коммуникации между клетками: клеточный сигналинг и трансдукция (передача) сигнала.

13.1. Основные компоненты клеточной сигнальной системы. Внеклеточные сигнальные молекулы и их рецепторы.

13.2. G-белок ассоциированные рецепторы и их внутриклеточные рецепторы. Участие тирозинкиназы в передаче сигнала. Кальций как внутриклеточный посредник. Взаимодействия различных сигнальных путей. Роль NO как межклеточного посредника.

13.3. Апоптоз – запрограммированная гибель клеток.

14. Клеточные биотехнологии.

14.1. Принципы культивирования клеток. Питательные среды. Требования к физическим условиям культивирования. Типы клеточных культур в зависимости от источника получения.

14.2. Стволовые клетки, получение и использование.

14.3. Клеточные культуры как инструмент научных исследований.

14.4. Биотехнологическое производство рекомбинантных белков.

14.5. Гибридная технология в производстве моноклональных антител.

14.6. Клонирование животных путем переноса ядер соматических клеток.

14.7. Особенности культивирования растительных клеток.

14.8. Редактирование геномов с помощью CRISPR.

ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

Наименование тем дисциплины и их содержание

№ п/п	Наименование тем	Содержание
1	2	3
Модуль 1. Биохимические аспекты клеточной биологии		
1	Введение в клеточную биологию. Химические основы жизни.	Признаки живой материи. Клеточный уровень организации живых систем. Биологические часы возникновения и развития жизни на Земле. Размеры клеток и их химический состав. Вирусы. Прокариоты. Формирование эукариот. Клеточная биология и филогенетическое дерево. Шесть основных типов модельных организмов. Программа «Атлас клеток человека».
2	Биоэнергетика и метаболизм.	Законы термодинамики. Обеспечение поддержания структуры и функций клеток энергией. Образование (окислительное фосфорилирование, субстратное фосфорилирование) и расходование (движение, трансмембранный перенос веществ, биосинтезы) энергии. Сравнение структурно-функциональной организации электронтранспортных цепей митохондрий и хлоропластов. «Молекулярная машина» для синтеза АТФ. Образование активных метаболитов кислорода кислорода и их биологическая роль. Пероксисомы. Митоптоз как форма выживания клетки.
3	Структура и функция плазматических мембран.	Функции мембран. Химическое строение мембран. Структура и функции мембранных белков. Мембранные липиды и жидкостность мембран. Динамическая природа плазматических мембран. Модели мембран. Перенос веществ через мембраны. Мембранные потенциалы и нервные импульсы.
Модуль 2. Структурные и физиологические аспекты клеточной биологии		
4	Взаимодействия между клетками и их окружением.	Молекулярная структура межклеточного пространства и его функции. Взаимодействие клеток с компонентами межклеточного пространства. Молекулярные основы межклеточных взаимодействий. Типы и молекулы прикрепления клеток к межклеточному матриксу. Понятие о трансмембранном сигналинге.

5	Система цитоплазматических мембран: структура, функции, способы движения. Цитоскелет и молекулярные основы клеточной подвижности.	Понятие о системе внутриклеточных мембран. Методы исследования: радиоавтография, применение GFP (зеленый флуоресцирующий протеин), препаративное центрифугирование). Молекулярное строение и функции эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи, лизосом. Молекулярные основы, типы и функции везикулярного транспорта. Химия вакуолей растительных клеток. Эндоцитоз. Посттрансляционное перемещение белков в пероксисомы, митохондрии и хлоропласты. Молекулярное строение и функции цитоскелета: микротрубочки, филаменты и микрофиламенты, сокращение мышечных волокон, немышечная подвижность. Цилия и флагелла. Биохимические моторы. Энергетика движений клеточных элементов.
Модуль 3. Организация генома и передача генетической информации		
6	Природа гена и генома.	Концепция «ген как единица наследственности». Хромосомы – физические носители генов. Химическая природа генов. Структура генома. Стабильность генома. От программы «Геном человека» к программе «Миллион геномов».
7	Клеточное ядро и контроль экспрессии генов. Репликация ДНК и репаративный синтез ДНК.	Молекулярное строение ядра эукариотической клетки и регуляция транспорта через ядерные поры. Контроль экспрессии генов у прокариот. Контроль экспрессии генов у эукариот. Уровни контроля: транскрипционный, процессинг, трансляционный, посттрансляционный, эпигенетический.
8	Экспрессия генетического материала: от транскрипции до трансляции	Основной постулат молекулярной биологии. Особенности транскрипции у прокариот и эукариот. Синтез и процессинг рРНК, тРНК и иРНК. Роль альтернативного сплайсинга. Малые некодирующие РНК и интерферирующие РНК (siRNA). Генетический код. Особенности митохондриального генетического кода.
Модуль 4. Деление клеток и межклеточные взаимодействия		
9	Молекулярные основы деления клеток	Химия клеточного цикла. Циклины и циклин-зависимые киназы (Cdk). Cdk-ингибиторы (белки p21, p27). Роль белка p53. Митоз и мейоз. Мультипротеиновые комплексы – кохезин и конденсин. SCF и APC активности в процессе клеточного цикла. Контрольные точки клеточного цикла. Способность опухолевых клеток преодолевать контрольные точки и ускользать от апоптоза.

10	Коммуникации между клетками: клеточный сигналинг и трансдукция (передача) сигнала. Методы клеточной биологии.	Основные компоненты клеточной сигнальной системы. Внеклеточные сигнальные молекулы и их рецепторы. G-белок ассоциированные рецепторы и их внутриклеточные рецепторы. Участие тирозинкиназы в передаче сигнала. Кальций как внутриклеточный посредник. Взаимодействия различных сигнальных путей. Роль NO как межклеточного посредника. Апоптоз – запрограммированная гибель клеток.
11	Обзор методов клеточной биологии.	Световая микроскопия. Трансмиссионная электронная микроскопия. Сканирующая электронная микроскопия. Использование радиоизотопной техники. Клеточные культуры. Дифференциальное центрифугирование клеточных компонентов. Разделение и очистка макромолекул. Определение структуры белков. Определение количества белков и нуклеиновых кислот. Ультрацентрифугирование. Гибридизация нуклеиновых кислот. Технология рекомбинантных ДНК. Использование антител.
Модуль 5. Клеточные биотехнологии		
12	Принципы культивирования клеток	Принципы культивирования клеток. Получение культуры животных клеток. Питательные среды для культивирования животных клеток. Требования к физическим условиям культивирования. Типы клеточных культур в зависимости от источника получения. Ограниченные и постоянные клеточные линии. Трансформация диплоидных штаммов. Монослойные и суспензионные культуры.
13	Стволовые клетки	Стволовые клетки. Направления использования эмбриональных стволовых клеток, ограничения и проблемы клеточной терапии. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, их особенности и преимущества.
14	Банки клеточных культур	Клеточные культуры как инструмент научных исследований. Банки культур клеток животных и человека. Криосохранение. Получение противовирусных вакцин для животных и человека с помощью культур клеток.
15	Рекомбинантные белки: получение и использование	Биотехнологическое производство рекомбинантных белков с помощью культур животных клеток, их преимущества и недостатки по сравнению с бактериальными клетками. Терапевтические препараты, производимые с помощью культур животных клеток и трансгенных животных.

16	Антитела и клеточная биология	Гибридная технология в производстве моноклональных антител, направления их использования. Биспецифические антитела.
17	Биотехнологии на основе культур клеток	Клонирование животных. Технология переноса ядер соматических клеток. Особенности культивирования растительных клеток. Биотехнологии на основе культур клеток, тканей и органов растений (получение экономически важных вторичных метаболитов, микроклональное размножение и оздоровление растений, клеточные технологии в селекции растений, получение трансгенных растений, сохранение генофонда редких и исчезающих видов).
Модуль 6. Итоговый контроль – экзамен. Оценка практических навыков обучаемого по молекулярной биологии		

ИТОГО: Лекции 34 часа.

Для студентов заочной формы обучения читаются лекции № 12, 13, 14.

Практические занятия

№ п/п	Наименование	Содержание	Объем в часах
1	2	3	4
Модуль 1. Биохимические аспекты клеточной биологии			
1	Введение в клеточную биологию. Химические основы жизни.	Эволюция и гомология белков на примере белков системы протеолиза-антипротеолиза.	1
2	Структура и функция плазматических мембран.	Динамическая природа плазматических мембран. Модели мембран. Перенос веществ через мембраны.	1
Модуль 2. Структурные и физиологические аспекты клеточной биологии			
3	Взаимодействия между клетками и их окружением.	Молекулярная структура межклеточного пространства и его функции. Типы и молекулы прикрепления клеток к межклеточному матриксу.	1
4	Система цитоплазматических мембран: структура, функции, способы движения. Цитоскелет и молекулярные основы клеточной подвижности.	Методы исследования внутриклеточных мембран: радиоавтография, применение GFP (зеленый флуоресцирующий протеин), препаративное центрифугирование).	1

Модуль 3. Организация генома и передача генетической информации			
5	Природа гена и генома.	Программа «Геном человека»: практическое значение для биологии клетки.	1
6	Клеточное ядро и контроль экспрессии генов. Репликация ДНК и репаративный синтез ДНК.	Молекулярное строение ядра эукариотической клетки. Контроль экспрессии генов у прокариот и у эукариот.	1
7	Экспрессия генетического материала: от транскрипции до трансляции.	Исследование циркулирующих ДНК, микроРНК, протеасом.	2
Модуль 4. Деление клеток и межклеточные взаимодействия			
8	Молекулярные основы деления клеток.	Циклины и циклин-зависимые киназы (Cdk). Cdk-ингибиторы (белки p21, p27, p53).	2
9	Коммуникации между клетками: клеточный сигналинг и трансдукция (передача) сигнала. Методы клеточной биологии.	Световая микроскопия. Трансмиссионная электронная микроскопия. Сканирующая электронная микроскопия. Использование радиоизотопной техники. Клеточные культуры. Гибридизация нуклеиновых кислот. Технология рекомбинантных ДНК. Использование антител.	2
Модуль 5. Клеточные биотехнологии			
10	Стволовые клетки.	Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, их особенности и преимущества.	2
11	Клеточные биотехнологии.	CRISPR-технологии	2

Итого: 16 часов

Для заочного отделения проводится одно двухчасовое практическое занятие по теме «Биотехнология на основе культур клеток».

Управляемая самостоятельная работа и темы рефератов

№	Наименование тем	Содержание	К-во часов	Примечание
1	Химические основы жизни.	Молекулярная биология и филогенетическое дерево. Шесть основных типов модельных организмов.	6	Собеседование
2	Биоэнергетика и метаболизм. Аэробное дыхание и митохондрии.	Роль митохондрий в образовании АТФ, хемиосмотическая гипотеза образования электрохимического потенциала. «Молекулярная машина» для синтеза АТФ. Образование активных метаболитов кислорода в митохондриях и их биологическая роль. Пероксисомы.	6	Устный опрос

3	Структура и функция плазматических мембран.	Динамическая природа плазматических мембран. Модели мембран. Перенос веществ через мембраны. Мембранные потенциалы и нервные импульсы.	4	Собеседование Тестовый контроль
4	Взаимодействия между клетками и их окружением.	Понятие о трансмембранном сигналинге. Молекулы клеточных оболочек: гемицеллюлоза, пектины, белки.	6	Собеседование
5	Цитоскелет и молекулярные основы клеточной подвижности.	Молекулярное строение и функции цитоскелета: микротрубочки, филаменты и микрофиламенты, сокращение мышечных волокон, немышечная подвижность. Цилия и флагелла. Биохимические моторы. Энергетика движений клеточных элементов.	6	Собеседование Устный опрос
6	Природа гена и генома.	Концепция «ген как единица наследственности». Хромосомы – физические носители генов. Химическая природа генов. Структура генома. Стабильность генома. Программа «Геном человека»: ожидания, реальность и перспективы.	6	Собеседование Контрольная работа
7	Клеточное ядро и контроль экспрессии генов. Репликация ДНК и репаративный синтез ДНК.	Ключевая роль матричных синтезов в происхождении жизни на Земле и эволюции живых организмов.	6	Собеседование Тестовый контроль
8	Экспрессия генетического материала: от транскрипции до трансляции.	Генетический код. Особенности митохондриального генетического кода. Адаптерная роль аминокислот-тРНК. Молекулярные основы трансляции.	6	Собеседование
9	Молекулярные основы деления клеток.	Мультипротеиновые комплексы – кохезин и конденсин. SCF и APC активности в процессе клеточного цикла. Цитокинез, тубулин и микротрубки.	6	Устный опрос Тестовый контроль

10	Коммуникации между клетками: клеточный сигналинг и трансдукция (передача) сигнала. Методы клеточной и молекулярной биологии.	Взаимодействия различных сигнальных путей. Роль NO как межклеточного посредника. Апоптоз – запрограммированная гибель клеток.	4	Собеседование Тестовый контроль
11	Клеточные биотехнологии.	Получение моноклональных антител, клонирование животных, редактирование геномов.	6	Контрольная работа

Итого: 62 часа

1-й уровень заданий для УСР – темы 1, 2, 4, 8

2-й уровень заданий для УСР – темы 3, 5, 7, 10

3-й уровень заданий для УСР – темы 6, 9, 11

Требования к реферату

1. Формат А4, объем до 10 стр.
2. Состав: титульный лист с указанием темы, исполнителя и руководителя.
3. Реферат (до 200 слов)
4. Введение (цель и актуальность); Основная часть; Заключение; Список литературы.
5. Пройти проверку по программе «Антиплагиат».

Для заочного отделения: управляемая самостоятельная работа темы № 8, 9, 10 и 11 по 2 часа (всего 8 часов).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Бокуть, С.Б. Молекулярная биология: молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и реализации генетической информации: учеб. пособие / С.Б. Бокуть, Н.В. Герасимович, А.А. Милютин. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 463 с.
2. Коничев, А.С. Молекулярная биология: Учебник для студентов вузов, обуч. по спец. 032400 «Биология» / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2003. – 398 с.
3. Степанов, В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. Учебник для биологич. специальн. вузов / В.М. Степанов; ред. А.С. Спирин. – М.: Высшая школа, 1996. – 335 с.
4. Чиркин, А.А. Биохимия. Учебное руководство / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – М.: Медицинская литература, 2010. – 624 с.
5. Чиркин, А.А. Биологическая химия. Учебник. / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – Минск.: Вышэйшая школа, 2017. – 431 с.
6. Чиркин, А.А. Практикум по биохимии / А.А. Чиркин – Мн.: Новое знание, 2002. – 512 с.
7. Чиркин А.А. (ред.) Современные проблемы биохимии. Методы исследований. Минск: «Вышэйшая школа», 2013. – 491 с.

Дополнительная

8. Картель Н.А., Макеева Е.Н., Мезенко А.М. Генетика. Энциклопедический словарь. – Мн.: Тэхналогія, 2011. – 488 с.
9. Рыбчин, В.Н. Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин. – СПб: Издательство СПбГТУ, 2002. – 522 с.
10. Чиркин А.А., Данченко Е.О. Биохимия с основами молекулярной биологии. УМК. Витебск: ВГУ им. П.М. Машерова, 2006. – 295 с.
11. Чиркин, А.А. Основы генной инженерии: методы рекомбинантных ДНК / А.А. Чиркин – Витебск: УО «ВГУ им. П.М. Машерова, 2005. – 134 с.
12. Чиркин, А.А. Биохимия с основами генной инженерии / А.А. Чиркин – Витебск: УО «ВГУ им. П.М.Машерова, 2010. – 181 с.
13. Champe, P.C. Biochemistry / P.C. Champe, R.A. Harvey, D.R. Ferrier – Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005. – 534 p.
14. Karp G. Cell and molecular biology. Concepts and experiments. – John Wiley and Sons, 2005. – 780 p.
15. Ganten, D. Encyclopedic reference of genomics and proteomics in molecular medicine. Vol. 1-2 / D. Ganten, K. Ruckpaul – Berlin: Springer-Verlag, 2006. – 4180 p.
16. Weiss, K.M. Genetics and the Logic of Evolution / K.M. Weiss, A.V. Buchanan. – A John Wiley and Sons, Inc., Publication, 2004. – 541 p.

Перечень наглядных и других пособий, методических указаний по проведению конкретных видов учебных занятий, а также методических материалов к используемым в учебном процессе техническим средствам

1. Чиркин, А.А. Биохимия с основами генной инженерии / А.А. Чиркин – Витебск: УО «ВГУ им. П.М. Машерова, 2010. – 181 с.
2. Чиркин, А.А. Биохимия. Учебное руководство / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – М.: Медицинская литература, 2010. – 624 с.
3. Чиркин, А.А. Основы генной инженерии: методы рекомбинантных ДНК / А.А. Чиркин – Витебск: УО «ВГУ им. П.М. Машерова, 2005. – 134 с.
4. Лекционный курс.
5. Электронный учебно-методический комплекс (<http://sdo.vsu.by>).

Интернет-ресурсы

1. Энциклопедия генов и геномов университета Киото (Япония).
2. База данных по биохимическим и сигнальным путям живых клеток – <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
3. Курируемая база данных биохимических путей открытого доступа REACTOME - <https://reactome.org/>
4. Виртуальная библиотека ресурсов по биосигнализации клеток – <http://biochemweb.net/signaling.shtml>
5. Лекции известных исследователей по клеточной сигнализации и другим вопросам биологии - <https://www.ibiology.org/playlists/signaling/>
6. Сайт: medach (новости медико-биологических исследований).

ГЛОССАРИЙ

CDR (англ. complementarity-determining region) определяющий комплементарность сайт – те аминокислотные остатки антитела, которые взаимодействуют с антигеном.

Fab-фрагмент (англ. fragment antigen binding) фрагмент антитела, связывающий антиген. У антител IgG по два Fab-фрагмента.

Fc-фрагмент (англ. fragment crystallizable) фрагмент антитела, с которым связываются рецепторы на поверхности клеток иммунной системы и белки системы комплемента.

FR-регионы (англ. framework regions, каркасные регионы) участки Fab-фрагмента антитела, составляющие «каркас» для CDR.

In vivo (в пер. с лат. «в живом») эксперименты на животных.

In vitro (в пер. с лат. «в пробирке») эксперименты с отдельными молекулами и клетками, но не на животных.

In silico (в пер. с лат. «в кремнии») «сухие» эксперименты с применением компьютерных методов.

scFv-фрагмент (англ. single-chain fragment variable) синтетический белок, полученный слиянием вариабельных фрагментов тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей антитела с помощью соединяющего (линкерного) пептида длиной 10–25 аминокислот.

TNF (англ. tumor necrosis factor, фактор некроза опухолей) один из основных воспалительных цитокинов.

VH-домен – переменный домен тяжелой цепи антитела.

VL-домен – переменный домен легкой цепи антитела.

Агонист – антитело или другая молекула, увеличивающая активность мишени.

Амплификация – процесс увеличения количества копий, например, гена.

Антагонист – антитело или другая молекула, мешающая нормальному функционированию мишени. Например, антагонистическое антитело к рецептору снижает его активность.

Антиген – молекула, которая вызывает в организме иммунный ответ. Как правило, антиген – макромолекула белковой, полисахаридной или нуклеотидной природы, хотя иммунный ответ может возникнуть и на малую молекулу, если она присоединена к макромолекуле.

Антитело – молекула, обеспечивающая, с одной стороны, связывание антигена, а с другой – взаимодействие с клетками иммунной системы.

Апоптоз – запрограммированная и контролируемая гибель клетки.

Аффинность (сродство) характеристика силы связывания антитела с антигеном.

Бактериофаг – вирус, заражающий бактерии.

Переменные фрагменты антител – участки молекулы, которые отвечают за связывание антигенов, и поэтому сильно различаются даже у одного организма.

Вектор – средство доставки в клетку гена белка для экспрессии. Для продукции антител используются векторы на основе плазмид.

В-клетки (В-лимфоциты) – клетки иммунной системы, производящие антитела после встречи с антигеном.

Иммобилизация – закрепление молекул на поверхности, как правило, ковалентной пришивкой.

Иммуногенность – способность молекулы вызывать антительный иммунный ответ.

Имуноглобулин – белки, продуцируемые В-лимфоцитами и плазматическими клетками.

Клеточная линия – хорошо охарактеризованная генетически однородная популяция клеток, полученная от многоклеточного организма или из первичной культуры путем отбора и клонирования клеток, имеющих определенные свойства или маркеры, которые должны сохраняться в течение последующего культивирования.

Клон – генетически однородные копии одной родительской клетки.

Клонирование генов – выделение последовательности гена и получения многих его копий.

Конформация – (в случае белка) способ укладки полипептидной цепи в трехмерную структуру.

Культивирование – процесс выращивания клеток в контролируемых условиях.

Лизосома – внутриклеточный органелла, представляющий собой пузырек с кислой средой и гидролитическими ферментами. Предназначена для переваривания макромолекул.

Миелома – злокачественная опухоль, состоящая из плазматических клеток, то есть зрелых В-лимфоцитов, производящих антитела.

мРНК – матричная, или информационная, РНК, которая получается в ходе транскрипции ДНК и служит матрицей для синтеза белка рибосомами (трансляции).

Пептид – цепочка, состоящая из нескольких аминокислот.

Плаزمид – кольцевой фрагмент ДНК, способный к автономной репликации (воспроизведению) в клетке.

Промотор – последовательность ДНК, служащая сигналом начала транскрипции гена.

Рекомбинантный белок – белок, полученный в клетках другого вида методом клонирования гена.

Репликация – процесс синтеза дочерней молекулы на матрице родительской молекулы ДНК.

Рецептор – белковая молекула, которая после связывания сигнальной молекулы (лиганда) запускает каскад событий внутри клетки.

Секвенирование – определение последовательности ДНК.

Селективность антитела – способность связываться только с нужной мишенью. Достаточно селективное антитело связывается со своей мишенью на несколько порядков лучше, чем с остальными.

Система комплемента – система белков плазмы, которые обеспечивают защиту организма от чужеродных агентов. Является важным компонентом как врожденного, так и приобретенного иммунитета.

Скрининг – процесс выбора нужного варианта из множества, например, поиск клеточного клона, обладающего нужными свойствами среди множества похожих.

Специфичность антитела – способность связываться с нужной мишенью с достаточной силой (аффинностью).

Спленоцит – клетка селезенки.

Трансгенный организм – организм, у которого один или несколько генов заменены генами организма другого вида.

Фармакодинамика – влияние молекулы, введенной в организм, на его биохимические параметры.

Фармакокинетика – поведение молекулы в организме человека: всасывание, распределение в органах и тканях, метаболизм, выведение.

Экспрессия – процесс реализации генетической информации в клетке, то есть транскрипция гена, в результате которой образуется мРНК, и трансляция, в ходе которой рибосомы синтезируют белок в соответствии с информацией, записанной в последовательности мРНК.

Эндосома – внутриклеточная органелла, пузырек, образующийся в результате эндоцитоза – захвата внешнего материала клеткой путем впячивания мембраны.

Эпитоп – участок мишени, с которым связывается антитело. Может состоять как из последовательно расположенных аминокислот, так и из удаленных, сближенных в пространстве в результате трехмерной укладки белка (так называемый конформационный эпитоп).

Эукариоты – организмы, клетки которых содержат ядро. К эукариотам относятся, в частности, растения, животные и грибы, к прокариотам, не содержащим ядра – бактерии и археи.

Эфффекторы, клетки-эфффекторы – клетки иммунной системы, выполняющие функции уничтожения чужеродных агентов, например, макрофаги, нейтрофилы, цитотоксические Т-лимфоциты, натуральные киллеры (NK-клетки).

ПРИЛОЖЕНИЕ



Рисунок 1. – Геномика (генотип клетки), транскриптомика (РНК клетки), протеомика (белки клетки) и метаболомика (метаболиты клетки) в клеточной биологии

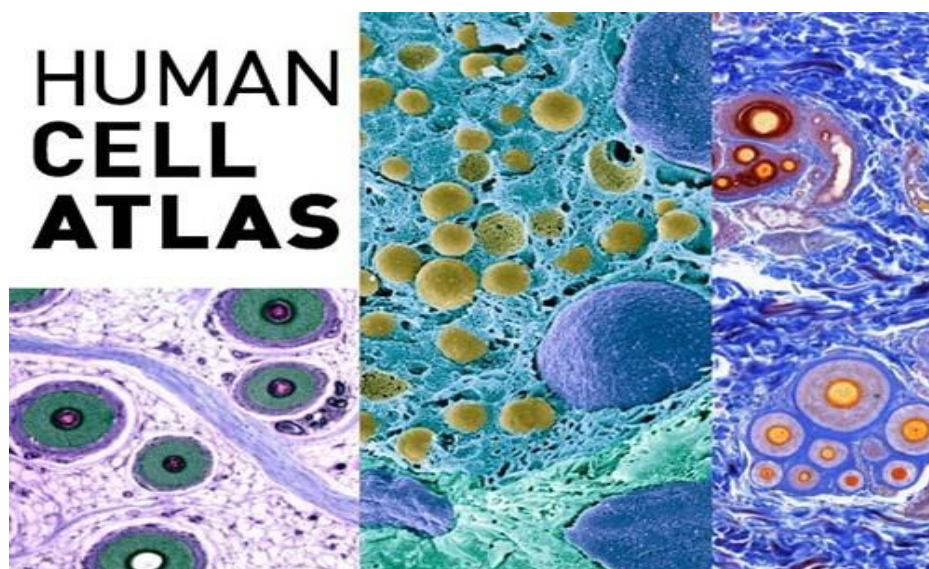
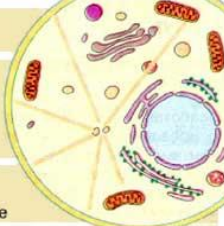
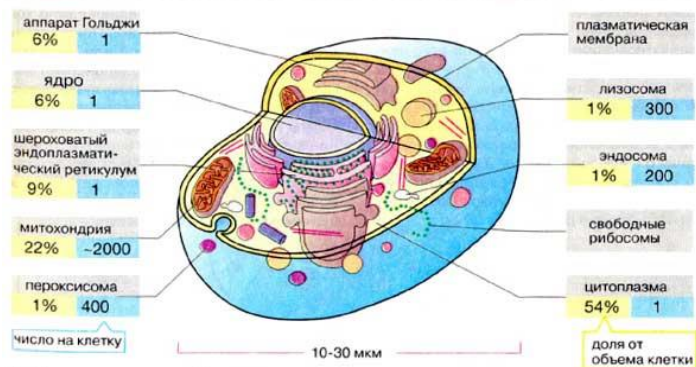


Рисунок 2. – Один из логотипов проекта «Атлас клеток человека»

Прокариоты	Эукариоты
 1-10 мкм Организмы эубактерии архебактерии	 грибы растения животные
Форма организма одноклеточные	одно- или многоклеточные
Органеллы, цитоскелет, аппарат клеточного деления отсутствует	присутствует, сложный, специализированный
DNA маленькая, кольцевая, нет интронов, плазмиды	большая, в клеточных ядрах, много интронов
RNA: синтез и созревание простой, в цитоплазме	сложный, в ядрах
Белки: синтез и процессинг простой, связанный с синтезом RNA	сложный, в цитоплазме и полости rER
Обмен веществ анаэробный или аэробный, легко перестраивающийся	преимущественно аэробный
Эндоцитоз и экзоцитоз нет	различные формы

А. Сравнение прокариот и эукариот



Б. Структура животной клетки

Рисунок 3. – Сравнительная характеристика прокариот и эукариот

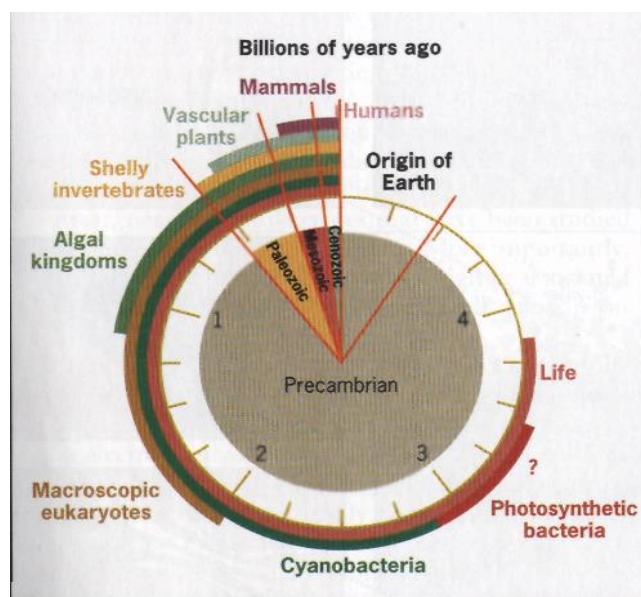


Рисунок 4. – Биологические часы (G. Karp, 2005)

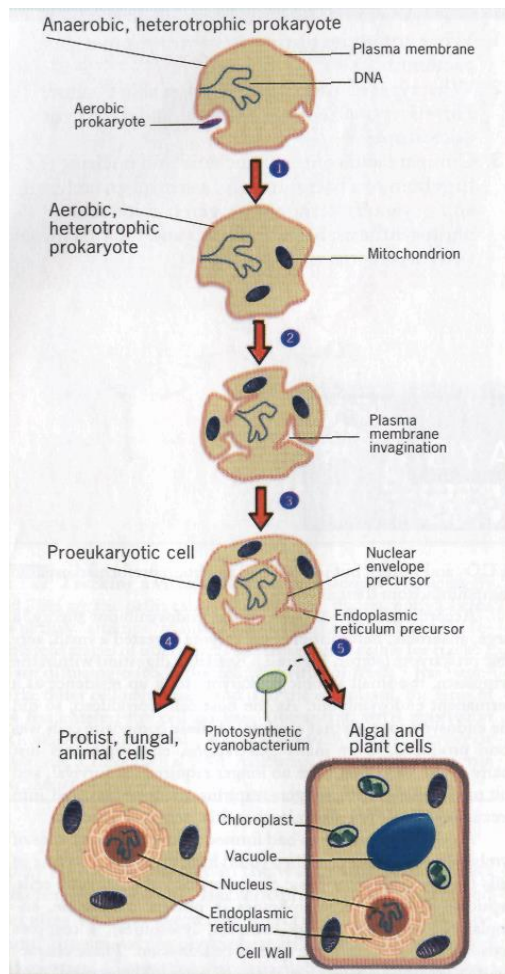


Рисунок 5. – Гипотетическая схема образования протистов, клеток грибов и животных, а также клеток водорослей и растений путем включения прокариотических клеток в последовательности анаэробный гетеротрофный прокариот → аэробный гетеротрофный прокариот → проэукариотическая клетка → клетки животных и клетки растений (G. Karp, 2005)

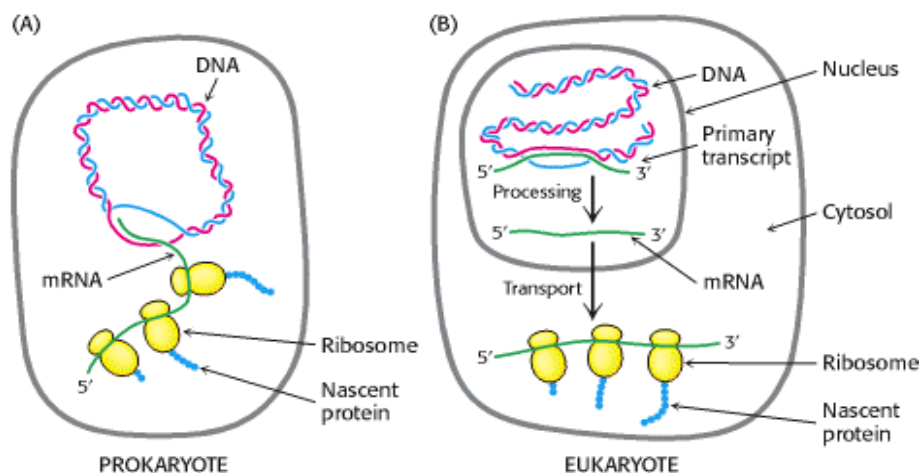


Рисунок 6. – Механизмы реализации основного постулата биологии ДНК → РНК → Белок у прокариот (А) и у эукариот (В) (G. Karp, 2005)

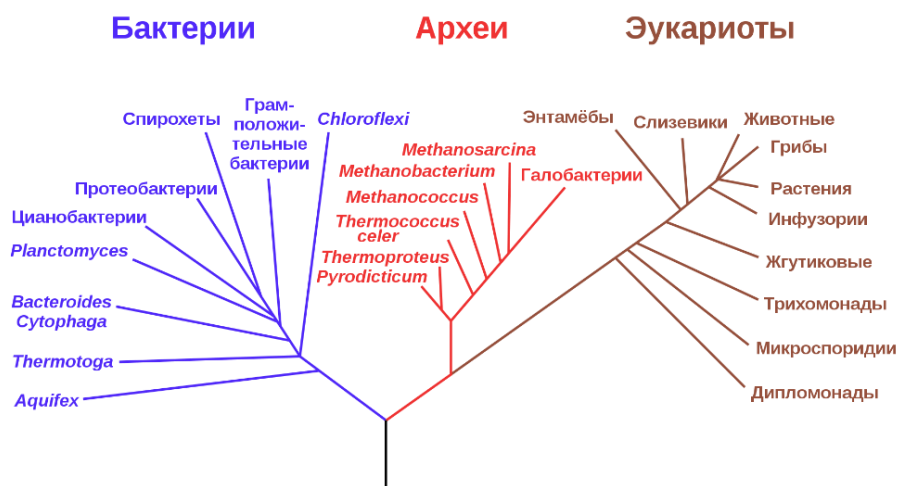


Рисунок 7. – Теоретически укоренённое дерево для генов рРНК, показывает общее происхождение бактерий, архей, эукариот (Wikipedia)



Рисунок 8. – Шесть основных модельных организмов: a) *Escherichia coli*, b) *Saccharomyces cerevisiae*, c) *Arabidopsis thaliana*, d) *Caenorhabditis elegans*, e) *Drosophila melanogaster*, f) *Mus musculus* (G. Karp, 2005)

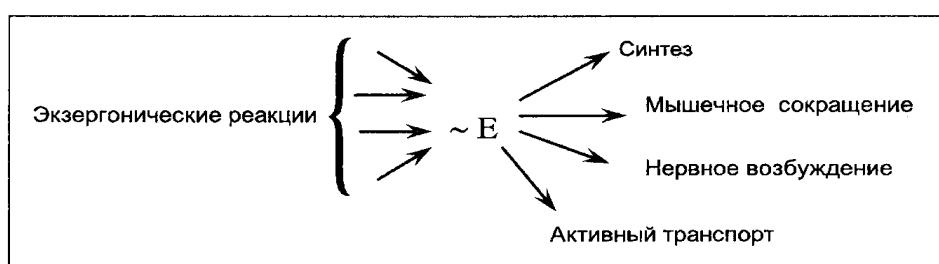


Рисунок 9. – Сопряжение экзергонических и эндергонических процессов

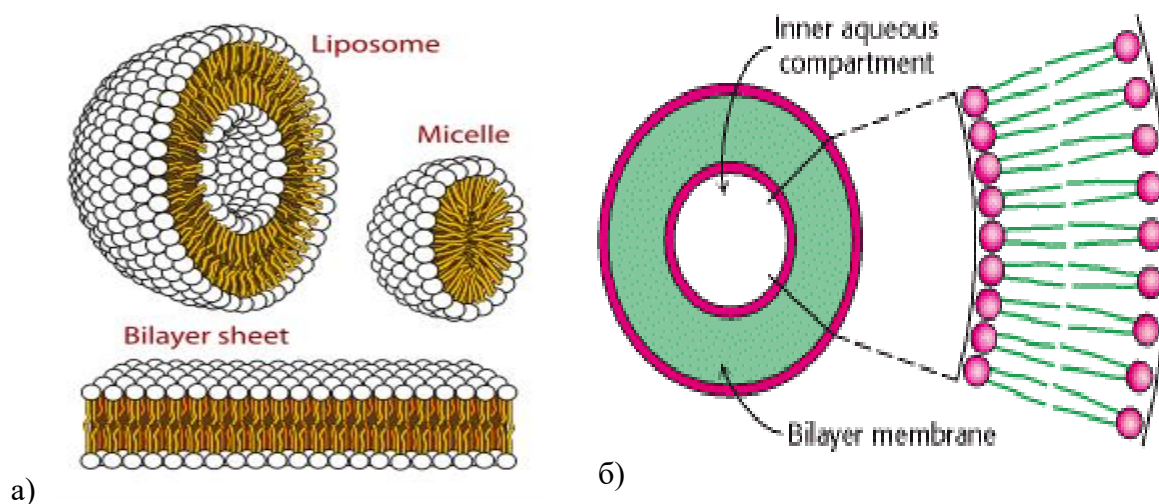


Рисунок 10. – Основные макромолекулярные структуры, образуемые в водной среде фосфолипидами: а) мицелла; б) липосома (Wikipedia)

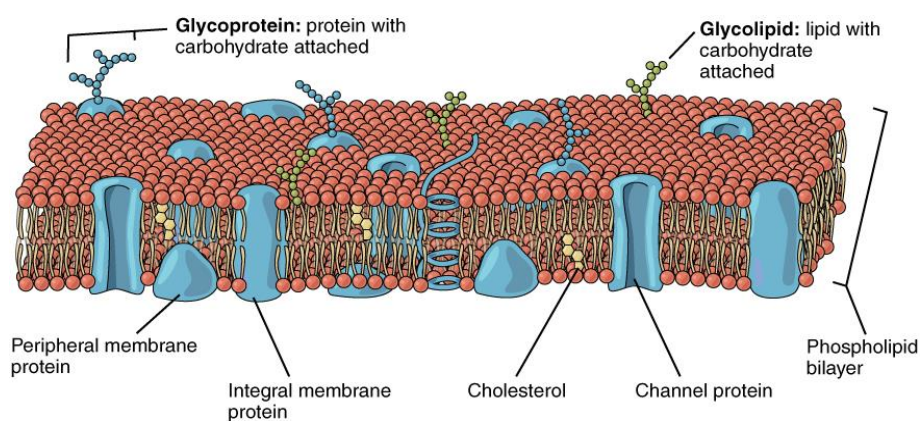


Рисунок 11. – Жидкостно-мозаичная модель строения плазматической мембраны (Wikipedia)

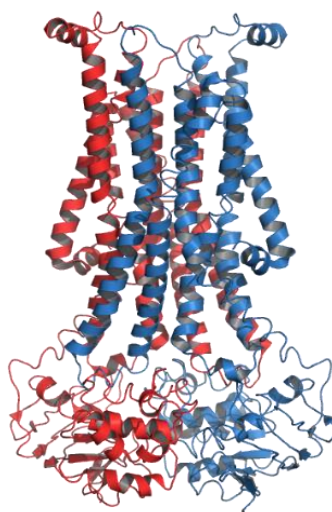


Рисунок 12. – Флиппазы – мембранные ферменты, переносящие молекулы фосфолипидов между двумя сторонами липидного бислоя клеточных мембран (Wikipedia)

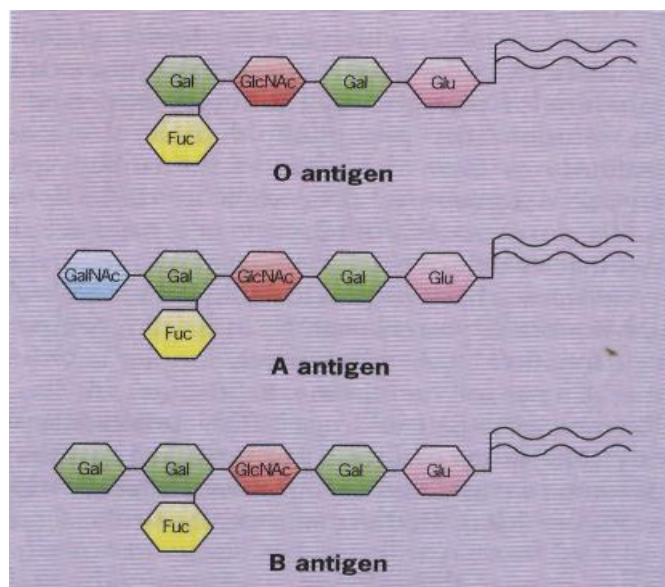


Рисунок 13. – Углеводные компоненты гликопротеинов мембраны эритроцитов, определяющие группы крови (Glu-глюкоза, Gal-галактоза, GlcNAc-N-ацетилглюкозамин, GalNAc- N-ацетилгалактозамин, Fuc-фукоза (G. Karp, 2005)

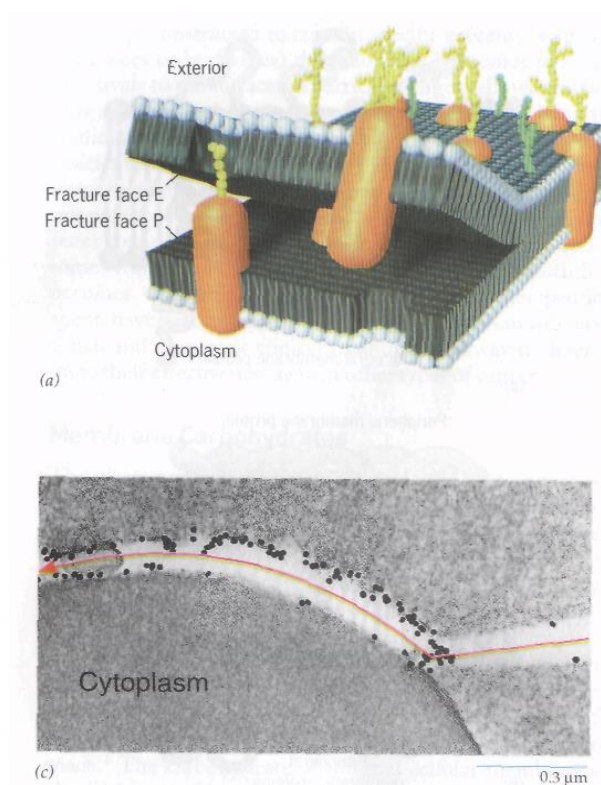


Рисунок 14. – После замораживания и скалывания белки выпадают из фосфолипидного бислоя, а оставшиеся полости позволяют судить об объемной структуре мембранных белков (а); распределение радиоактивных пятен позволяет в мембране определить положение головок фосфолипидов в бислое (с) (G. Karp, 2005)

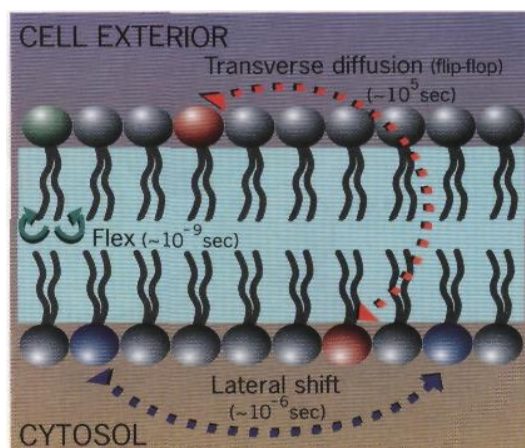


Рисунок 15. – Типы движения фосфолипидов мембраны: вращение на месте 10^{-9} с, латеральная диффузия 10^{-6} с, переход из монослоя в монослой затруднен 10^{-5} с (G. Karp, 2005)

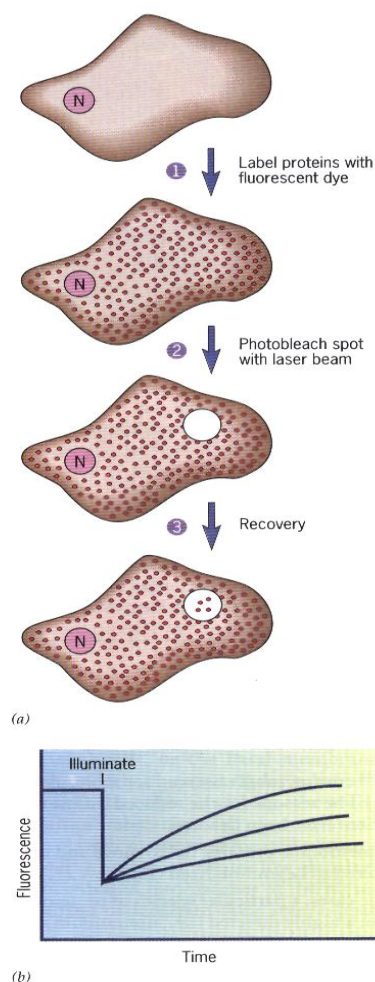


Рисунок 16. – Оценка скорости перемещения фосфолипидов в мембране: 1) клетка до исследования (N – ядро); 2) окраска фосфолипидов мембраны; 3) выжигание фосфолипидов в мембране лучом лазера; а) оценка флюоресценции переместившихся в поврежденную зону фосфолипидов; б) построение кривых восстановления флюоресценции фосфолипидов и расчет скорости перемещения фосфолипидов в мембране (G. Karp, 2005)

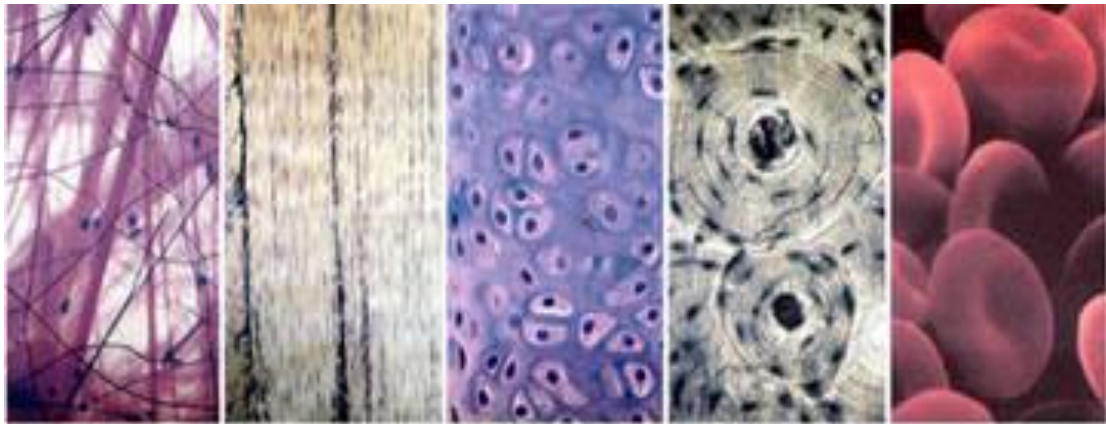


Рисунок 17. – Виды соединительной ткани: рыхлая соединительная ткань, плотная соединительная ткань, хрящ, кость, кровь

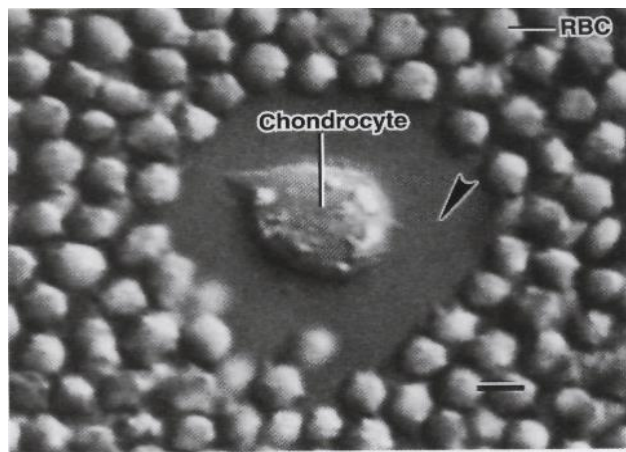


Рисунок 18. – Хондроцит синтезирует межклеточное вещество, отодвигая эритроциты (G. Karp, 2005)

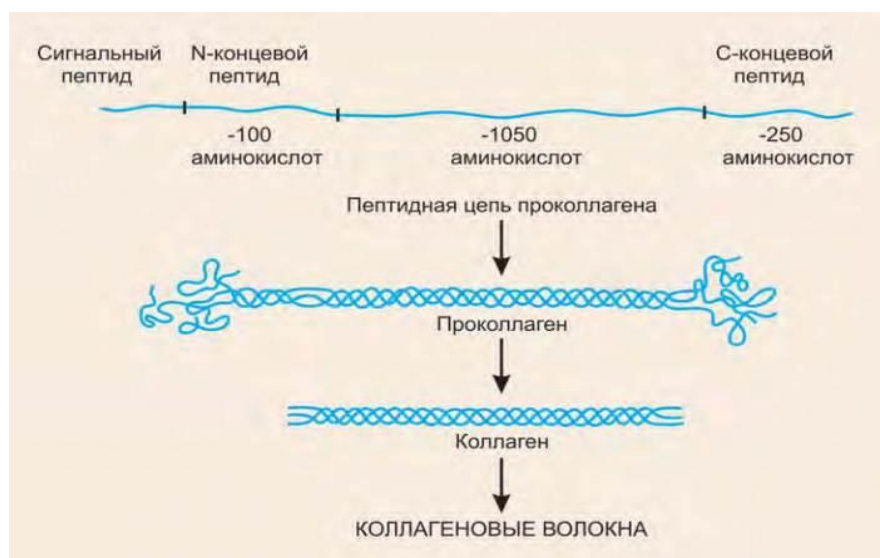
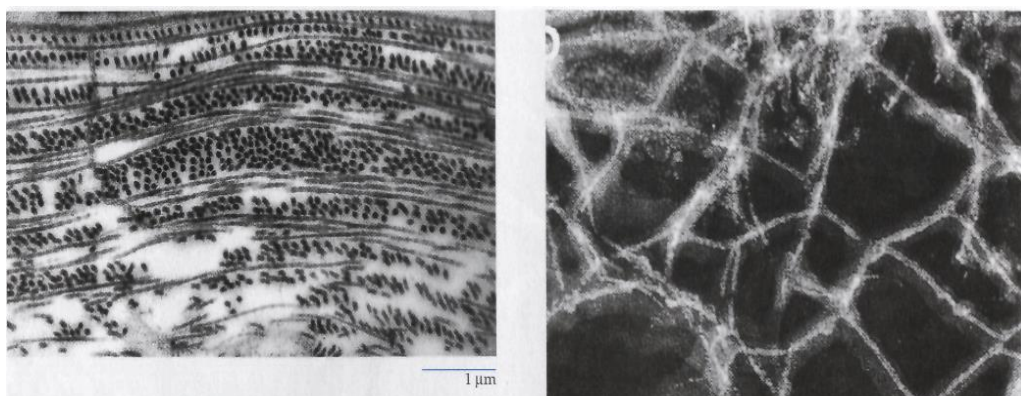


Рисунок 19. – Этапы синтеза молекулы коллагена



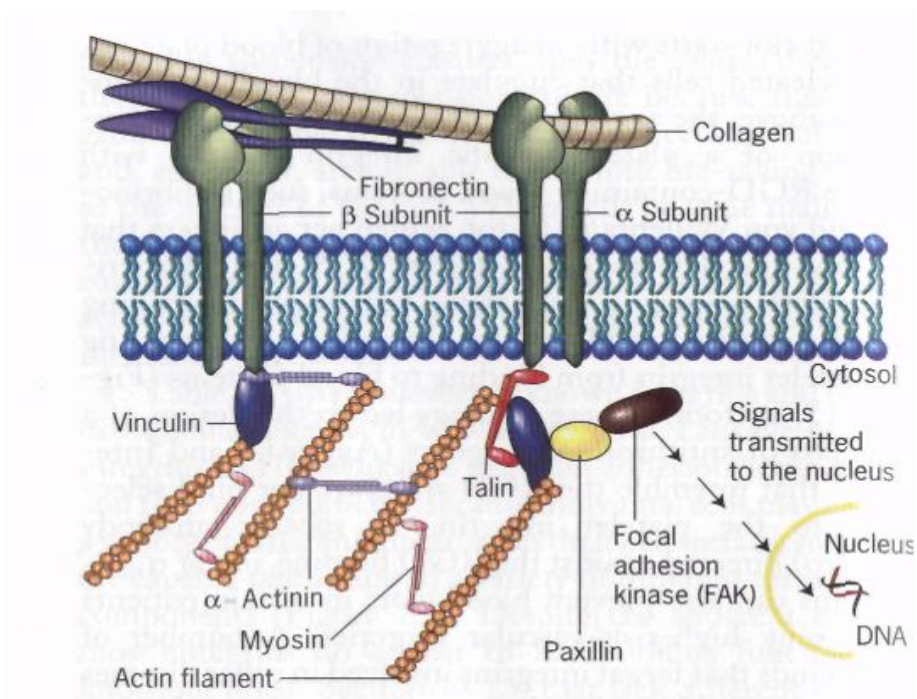


Рисунок 23. – Схема взаимодействия молекул интегринов с белками снаружи и внутри клетки, т.е. клетка фиксирована в межклеточном веществе (G. Karp, 2005)

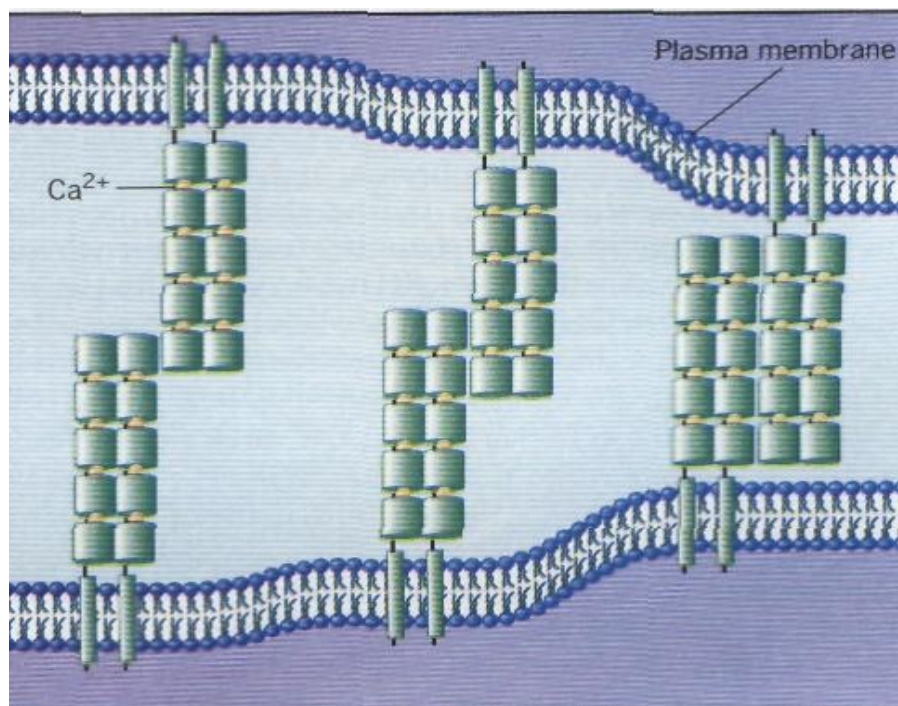


Рисунок 24. – Механизм сближения клеток и клеточная адгезия с участием кадгеринов (G. Karp, 2005)

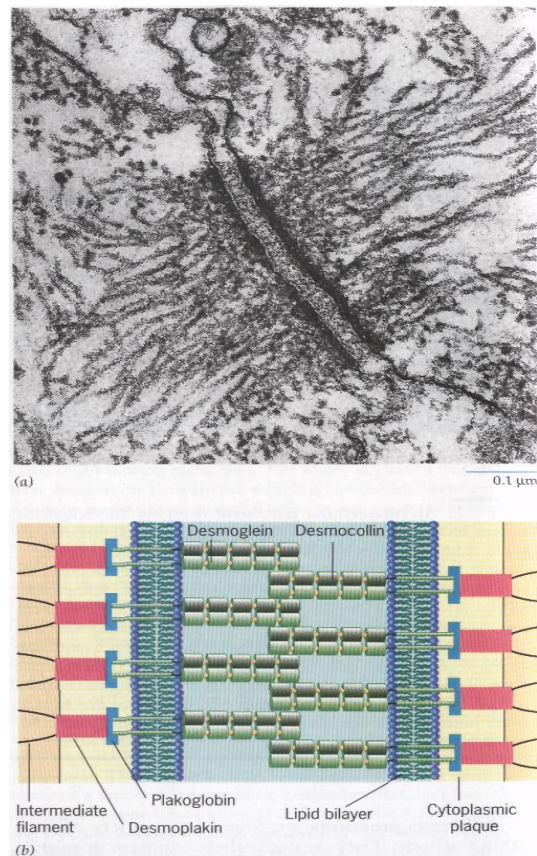


Рисунок 25. – Десмосома. а) Вид при морфологическом исследовании;
 б) схема устройства десмосомы (G. Karp, 2005)

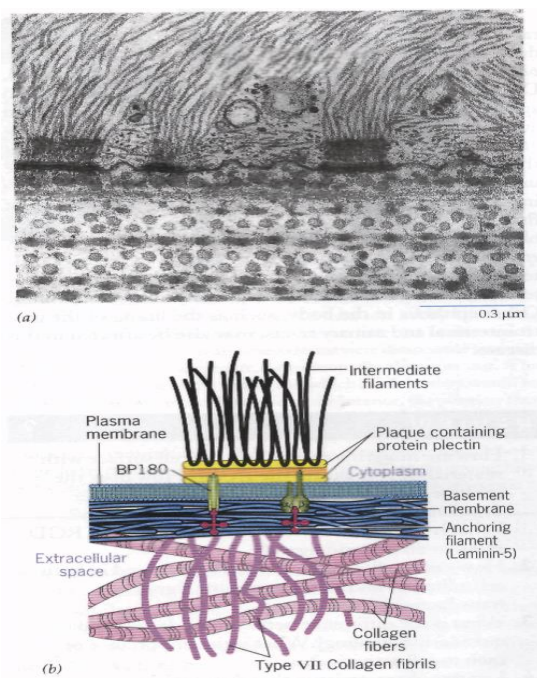


Рисунок 26. – Гемидесмосома. а) Вид при морфологическом исследовании;
 б) схема устройства гемидесмосомы (G. Karp, 2005)

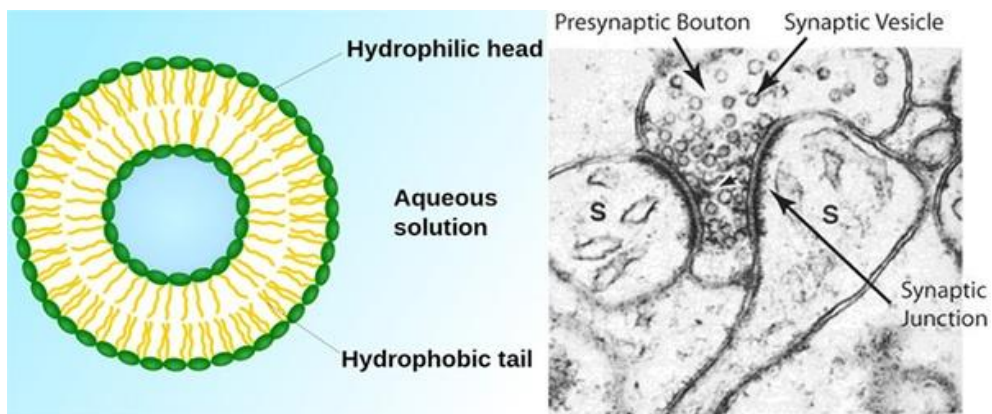


Рисунок 27. – Везикула: слева схема; справа везикулы в синаптической щели (Wikipedia)

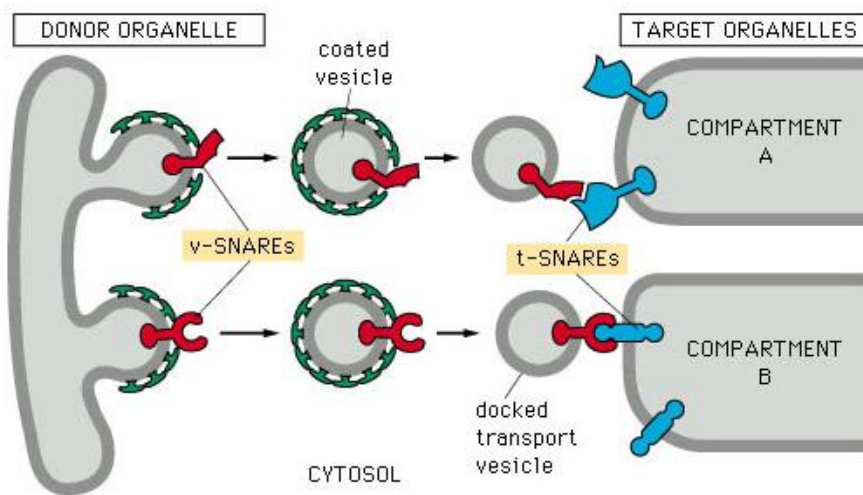


Рисунок 28. – SNARE-гипотеза (Wikipedia)

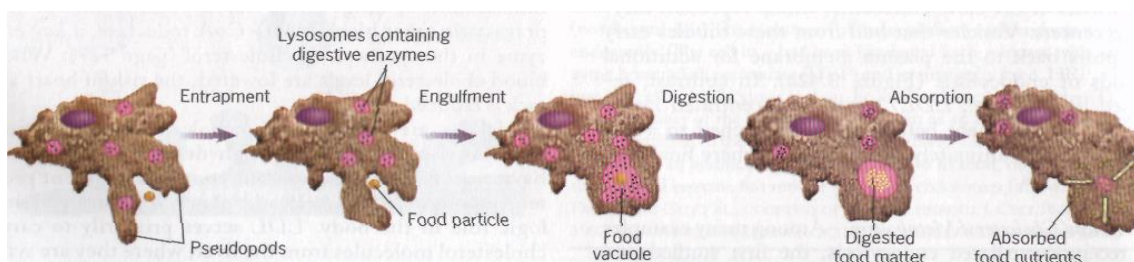


Рисунок 29. – Фагоцитоз твердой пищевой частицы амёбой

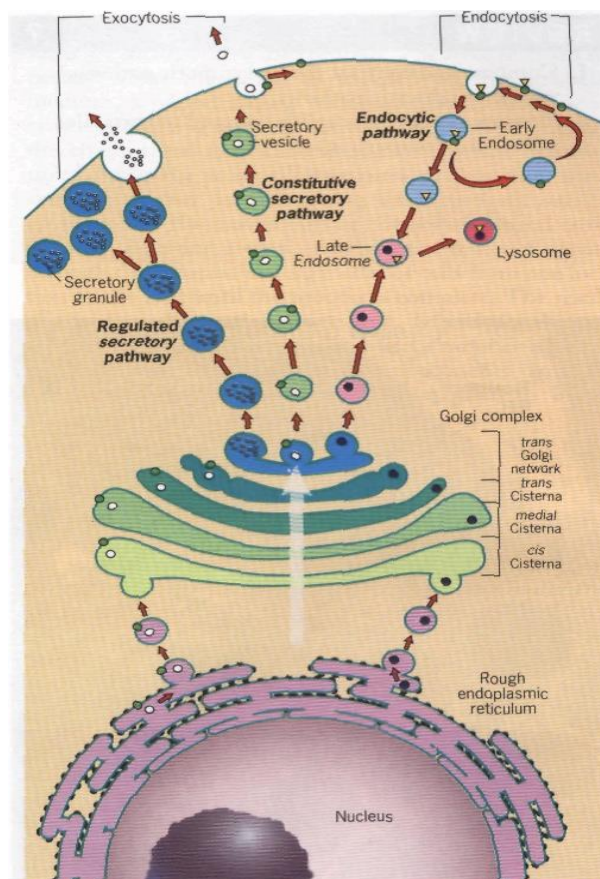


Рисунок 30. – Общая схема везикулярного транспорта в клетке. Стрелкой показан путь синтезированных в шероховатом эндоплазматическом пути белков к аппарату Гольджи, где происходит модификация белков и их дальнейшая запрограммированная судьба

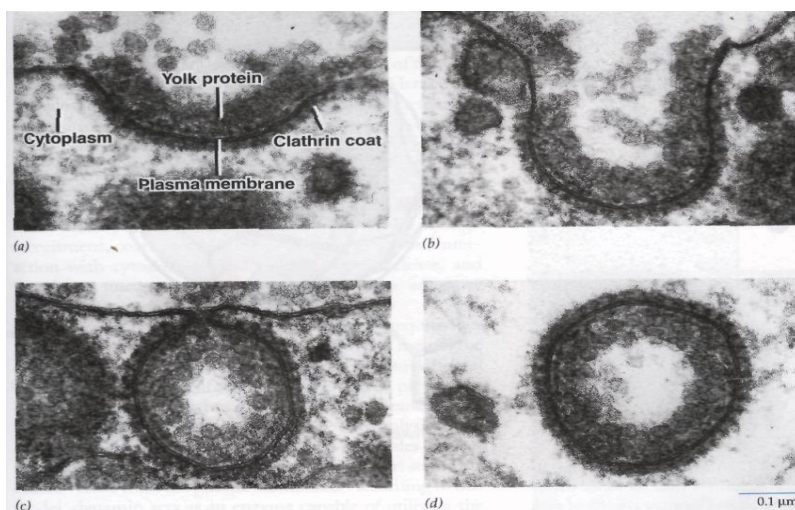


Рис. 31. – Рецепторно-опосредованный эндоцитоз липопротеинов. Рисунок из материалов Нобелевской премии М. Брауна и Д. Голдштейна 1985 г. а) Углубление плазматической мембраны, снаружи рецептор и захватываемые молекулы, изнутри окаймление клатрином; б) впячивание участка плазматической мембраны; с) отшнуровывание везикулы от плазматической мембраны; d) окаймленная везикула в цитозоле (G. Карп, 2005).

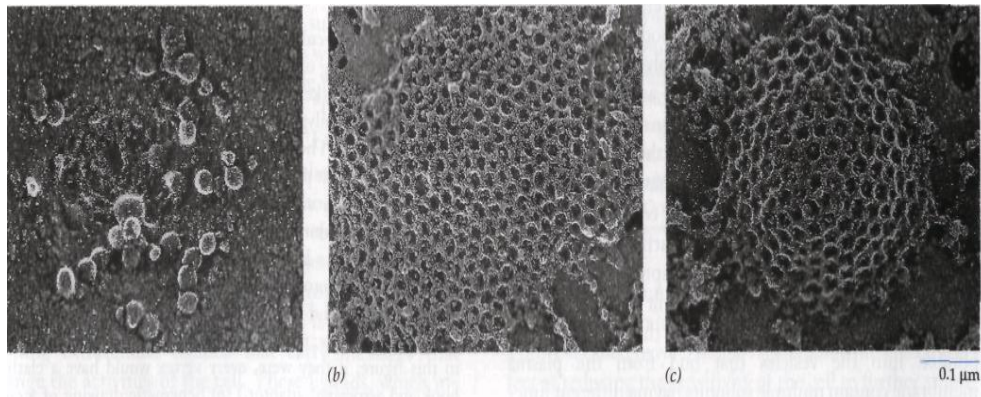


Рисунок 32. – Окаймленная ямка плазматической мембраны: ЛПНП снаружи (фото слева); b) вид с цитозольной стороны; ямка, c) покрытая клатрином с цитозольной стороны (G. Karp, 2005)

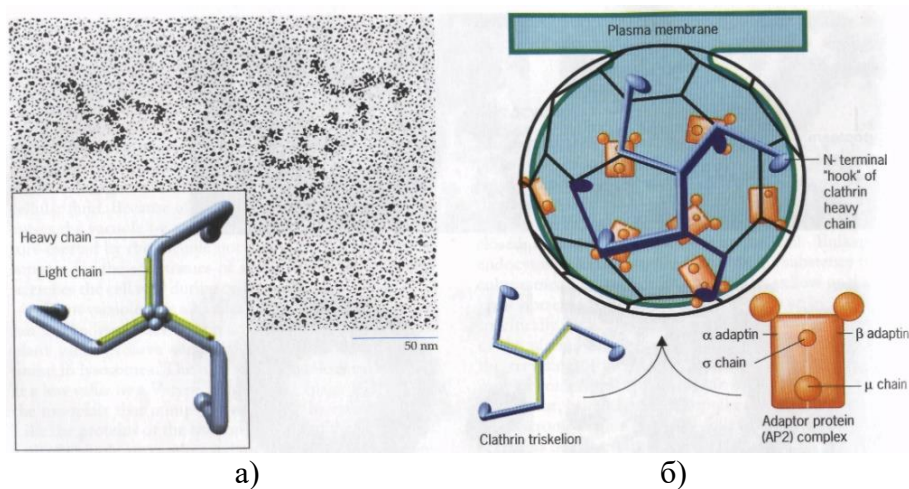


Рисунок 33. – Слева модель клатрина, вверху электронная фотографии клатрина. Справа формирование окаймления везикулы методом сборки из мономеров клатрина (G. Karp, 2005)

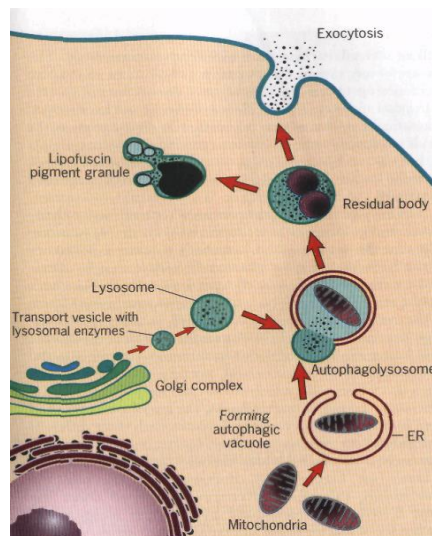


Рисунок 34. – Схема процесса аутофагии (G. Karp, 2005)

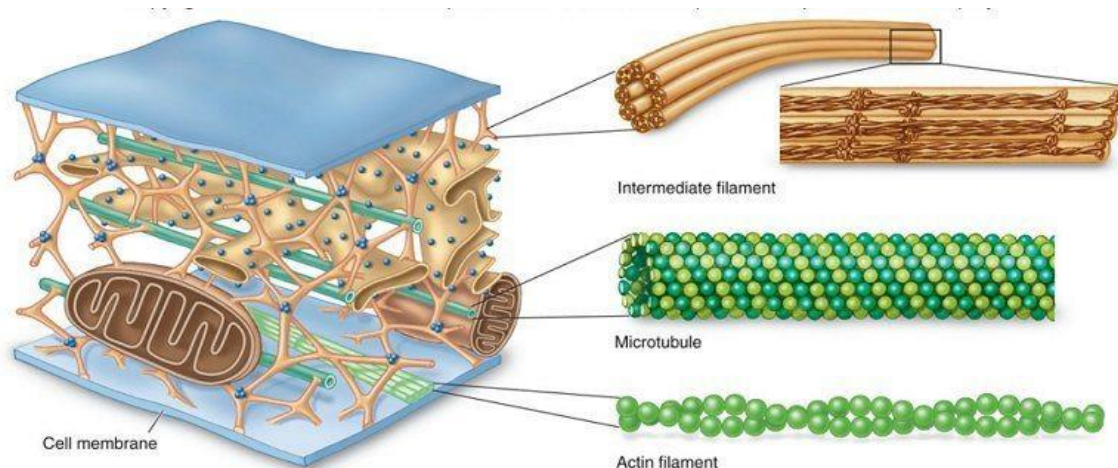


Рисунок 35. – Три типа филаментов в клетке: сверху вниз промежуточные филаменты (прочность ткани), микротрубочки (пути перемещения), актиновые микрофиламенты (сокращение, движение) (Wikipedia)

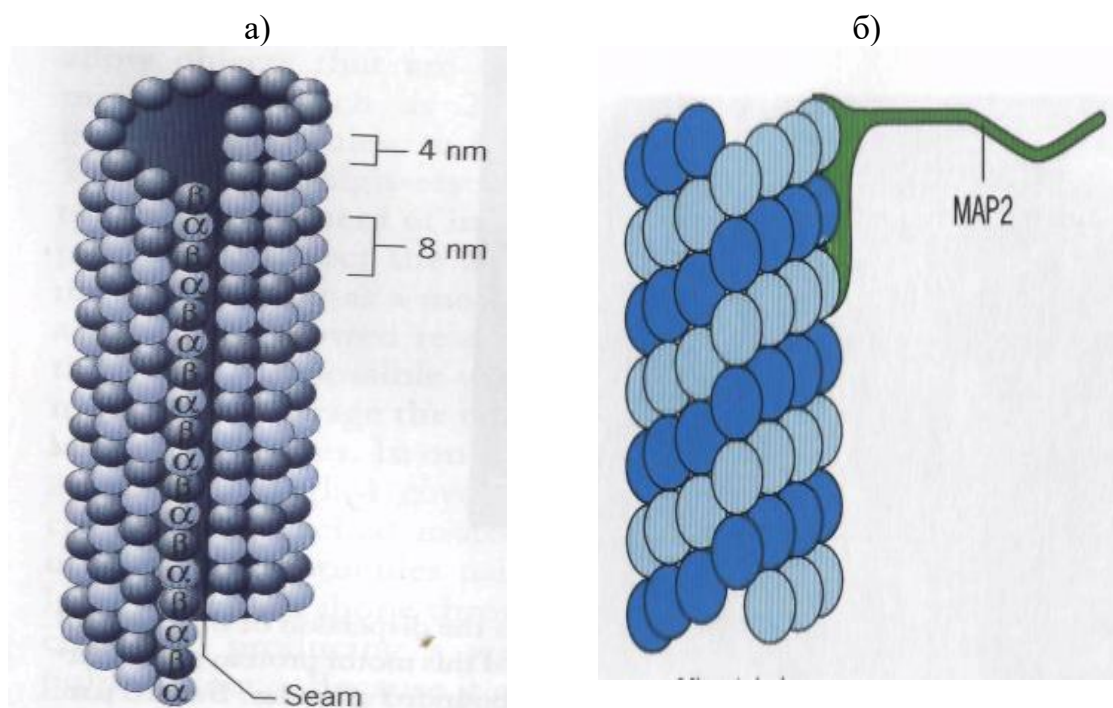


Рисунок 36. – Структура микротрубочек: а) образование микротрубочки из глобул тубулина; сверху 13 глобул β -субъединиц, сшиваются α и β , образуя шов; полярность – *плюс* конец где β -субъединицы, *минус* конец где α -субъединицы (полярность важна для роста и взаимодействий); б) ассоциированный с микротрубочкой белок (G. Karp, 2005)

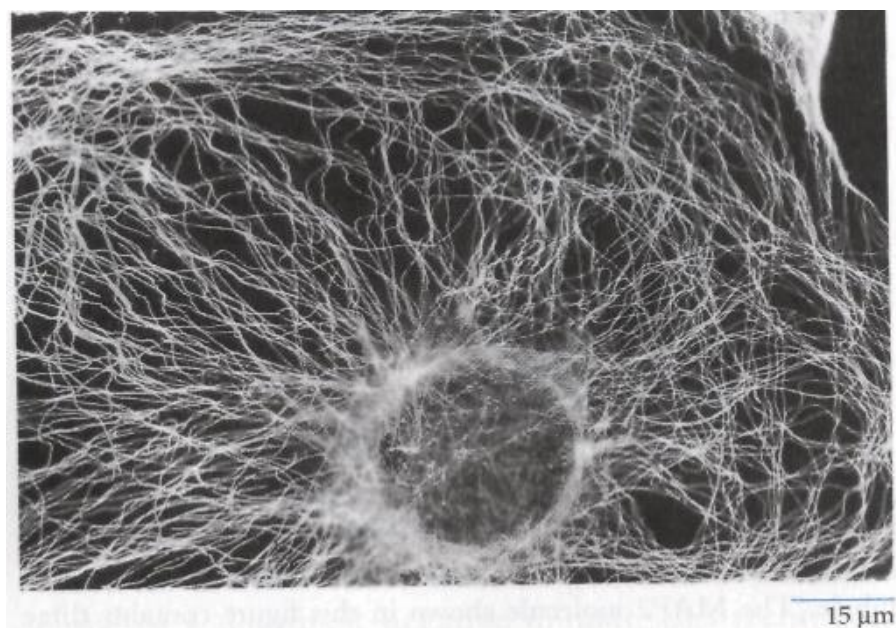


Рисунок 37. – Локализация микротрубочек в клетке (G. Карп, 2005)

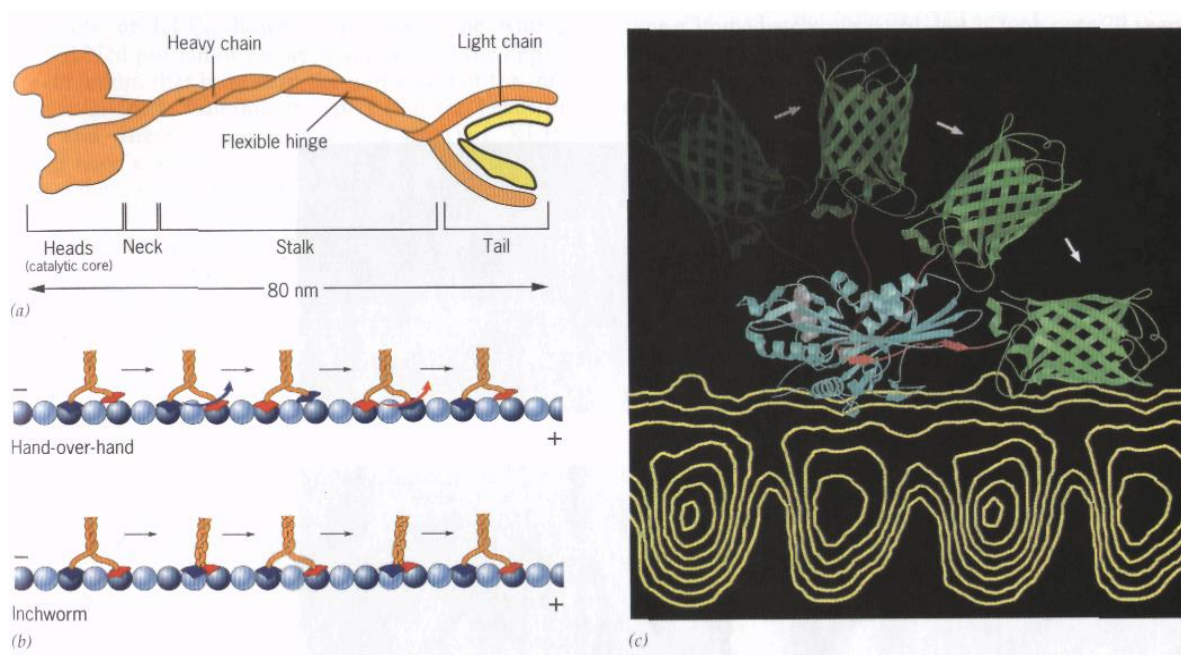


Рисунок 38. – Биохимический мотор кинезин: а) строение белка-мотора;
 б) перемещение и перенос груза к +-концу микротрубочки;
 с) третичная структура действия мотора (G. Карп, 2005)

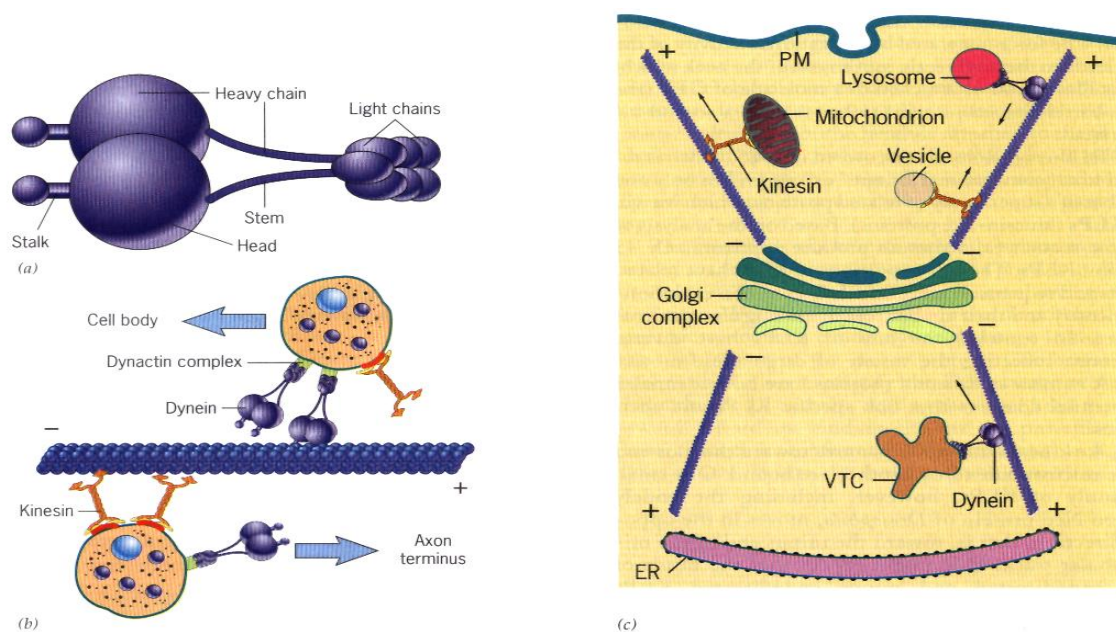


Рисунок 39. – а) Строение динеина; б) динеин (сверху) перемещает груз к минус-концу микротрубочки; кинезин (внизу) перемещает груз к плюс-концу микротрубочки; в) работа биохимических моторов по транспорту везикул (грузов) в системе шероховатый эндоплазматический ретикулум – аппарат Гольджи – плазматическая мембрана клетки (G. Karp, 2005)

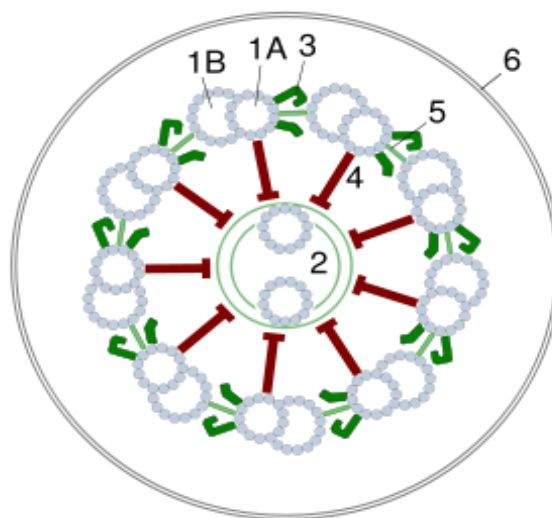


Рисунок 40. – 1А и 1В – А и В микротрубочки периферического дублета; 2 – центральная пара микротрубочек и центральная капсула; 3 – динеиновые ручки; 4 – радиальная спица; 5 – нексиновый мостик; 6 – клеточная мембрана

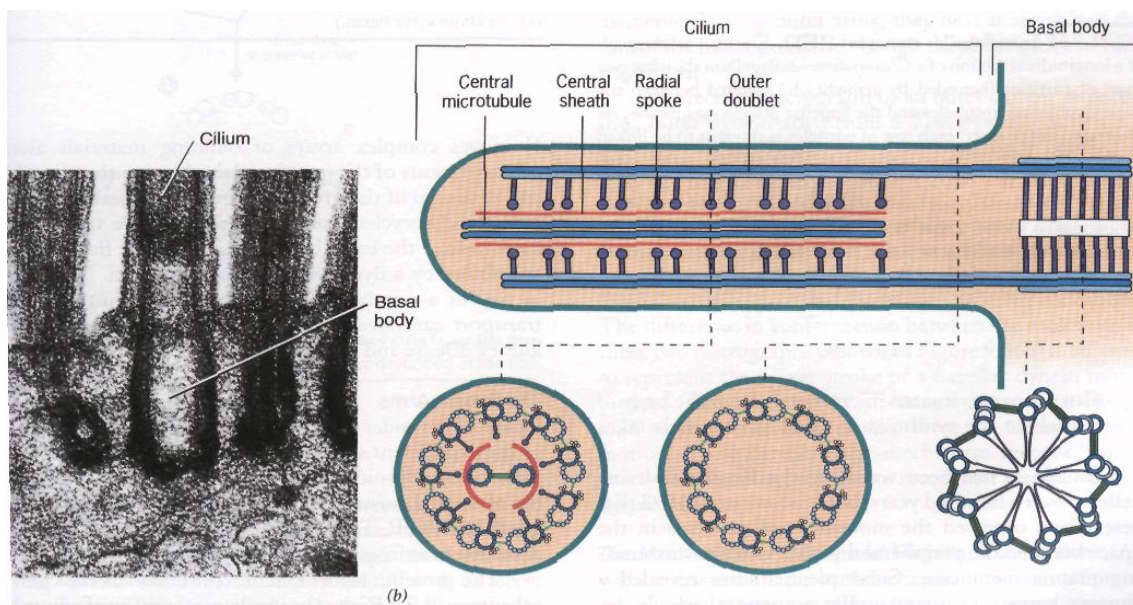


Рисунок 41. – Три формулы базальное тело (9×3), основание ворсинки (9+0) и ворсинка (9+2)

В ДНК хлоропластов более 100 генов	
Гены	Варианты
Кодирующие РНК	
16S рРНК	1
23S рРНК	1
4,5S рРНК	1
5S рРНК	1
тРНК	30–32
Кодирующие гены	
Белки рибосом	20–21
РНК-полимераза	3
Другие	2
Функции, свойственные хлоропластам	
Рубиско (рибулозобисфосфат-карбоксилаза-оксигеназа) и тилакоиды	31–32
NADH-дегидрогеназа	11
Всего	105–113

Рисунок 42. – Информационная система хлоропластов растений (Wikipedia)

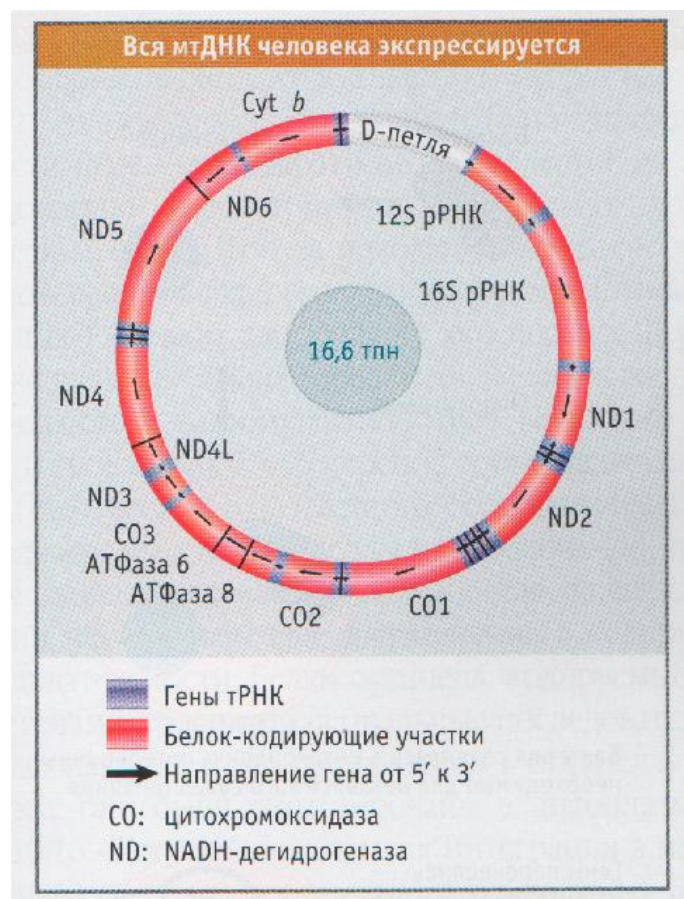


Рисунок 43. – Информационная система митохондрий человека (Wikipedia)

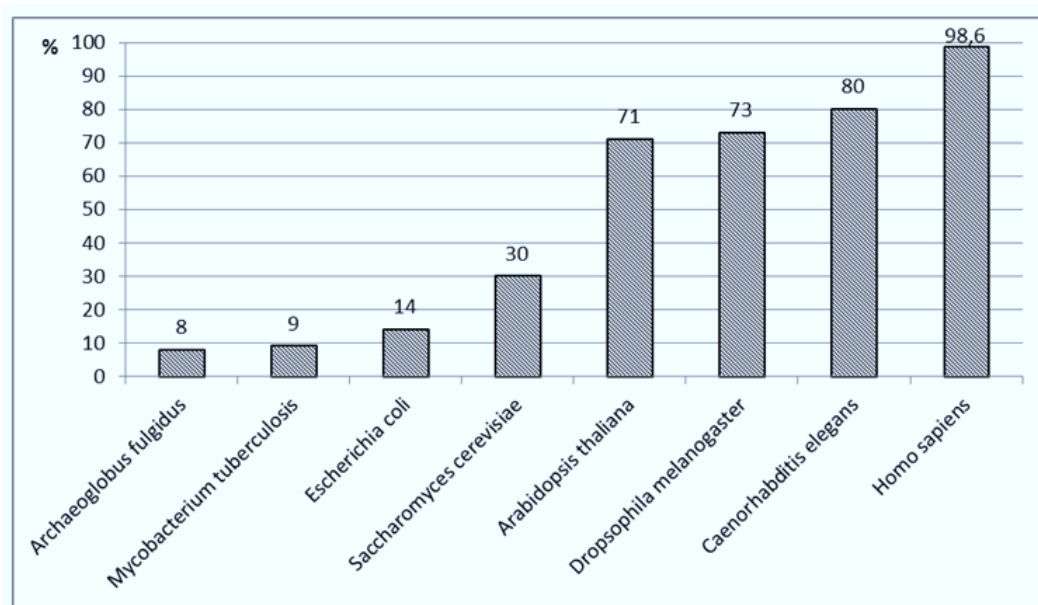


Рисунок 44. – Доля некодирующей ДНК у разных организмов (Wikipedia)

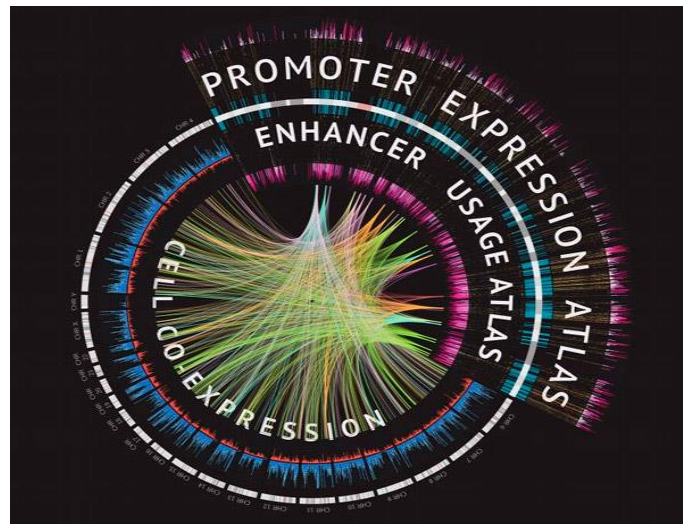


Рисунок 45. – Логотип проекта FANTOM

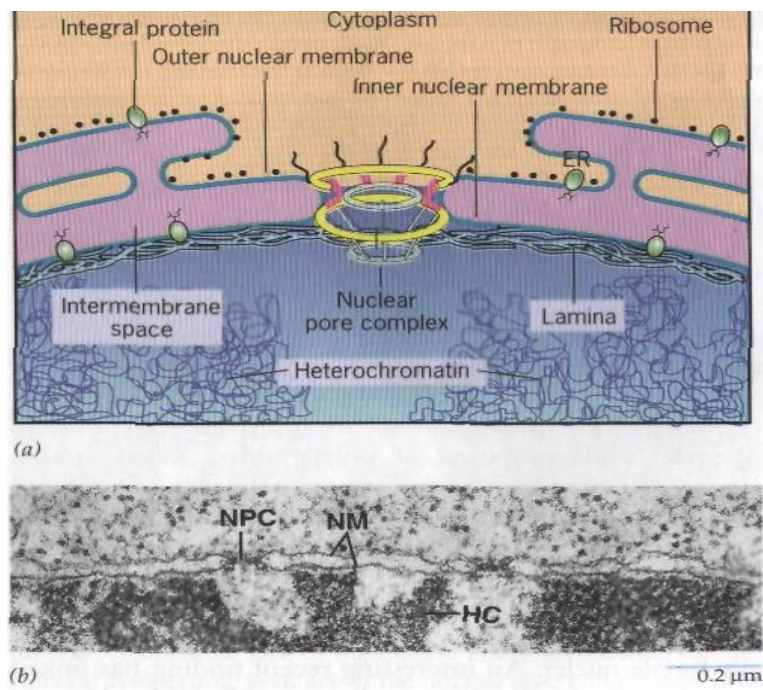


Рисунок 46. – а) Схема оболочки ядра, б) электронная фотография оболочки ядра (G. Karp, 2005)

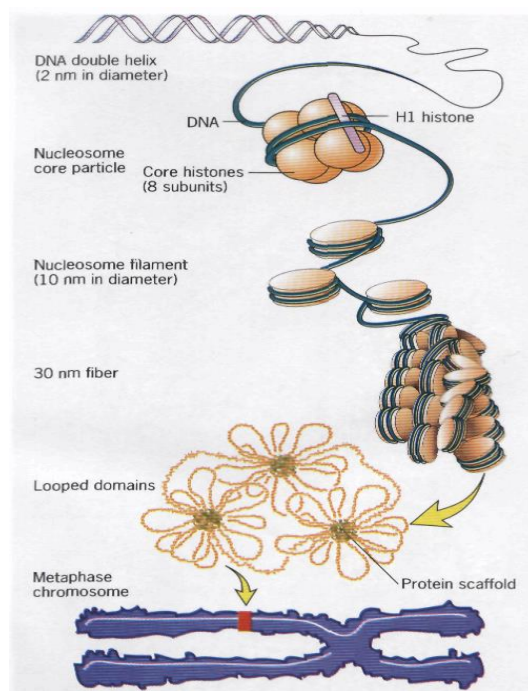


Рисунок 47. – Уровни компактизации (укладки) ДНК: ДНК, нуклеосомы, филамент нуклеосом, фибрилла, петлевые домены, метафазная хромосома (G. Karp, 2005)

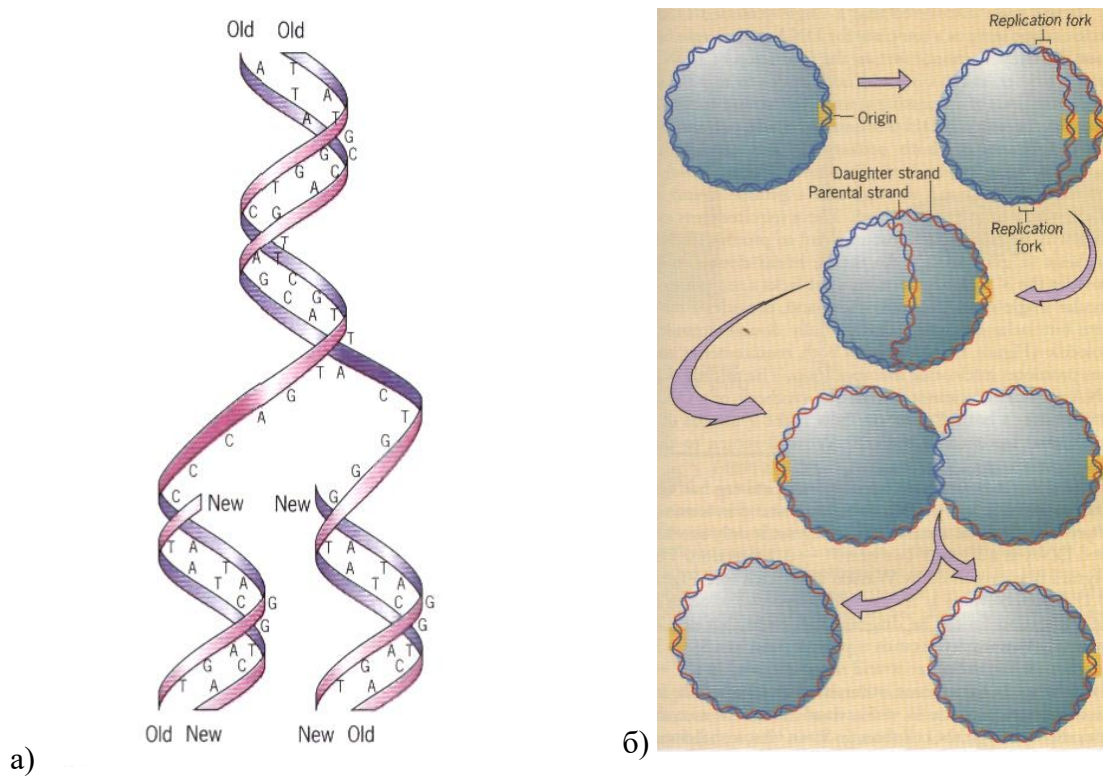


Рисунок 48. – а) репликация двухцепочечной ДНК; б) кольцевой ДНК

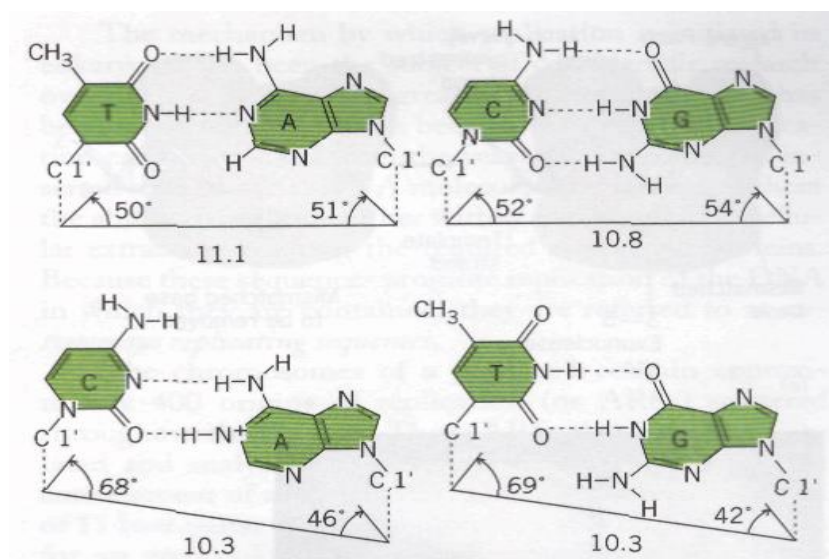


Рисунок 49. – Распознавание «неправильного» нуклеотида при вставке в растущую цепь ДНК

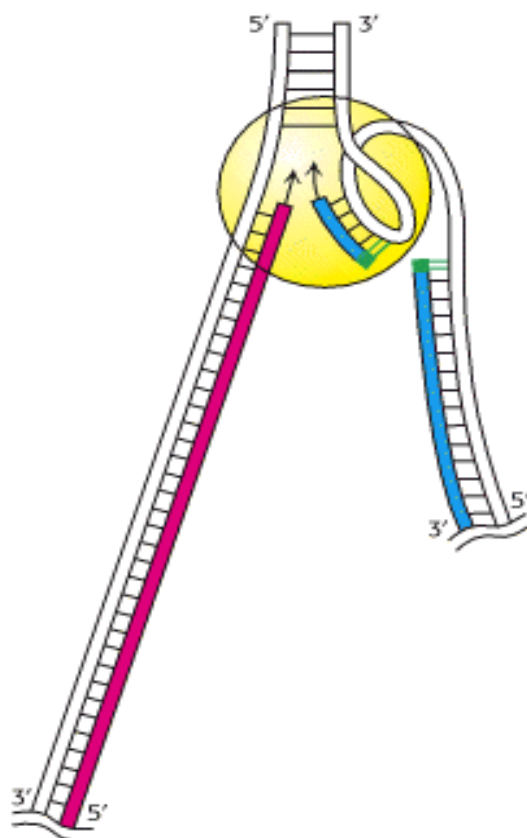


Рисунок 50. – Петля запаздывающей цепи позволяет ДНК полимеразе III синтезировать обе цепи в одном направлении

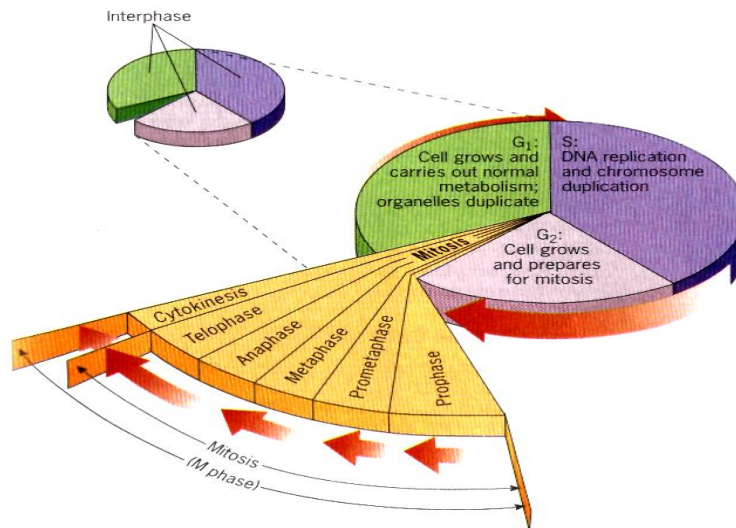


Рисунок 51. – Клеточный цикл эукариотических клеток (Wikipedia)

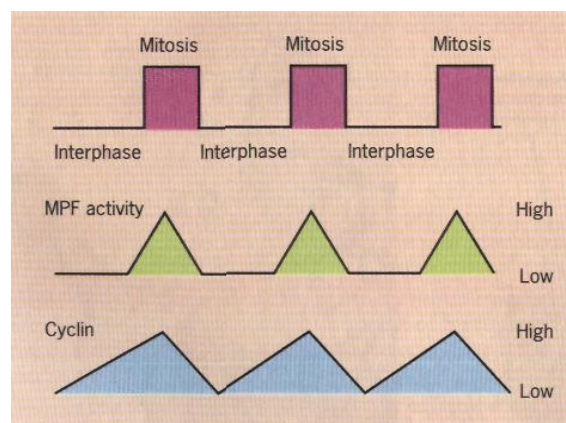


Рисунок 52. – Колебания MPF-активности и циклина в процессе клеточного цикла (G. Karp, 2005)

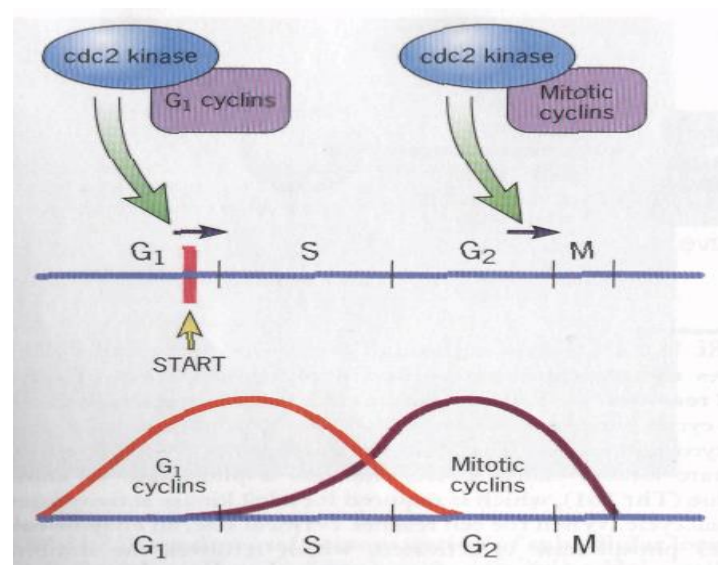
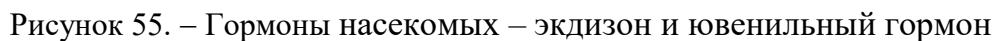
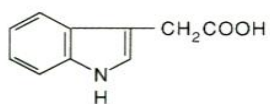
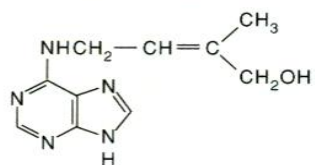


Рисунок 53. – Регуляторы клеточного цикла (G. Karp, 2005)

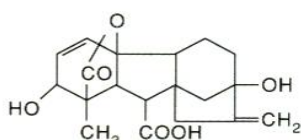




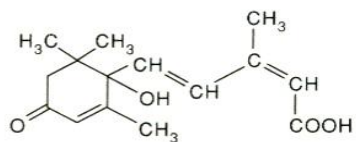
Auxin
(indole acetic acid)



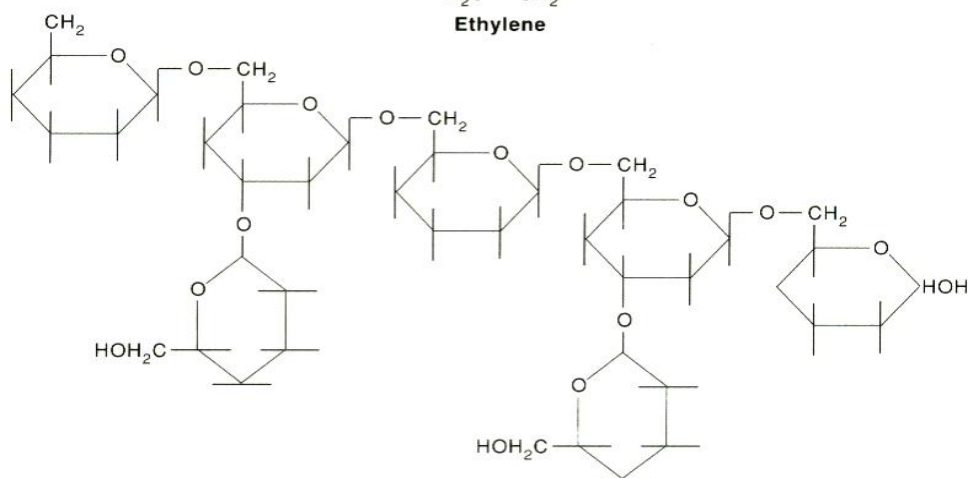
Cytokinin
(zeatin)



Gibberellin
(gibberellic acid)



Absciscic acid
 $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$
Ethylene



Oligosaccharin
(a heptagluconide)

Рисунок 56. – Гормоны растений

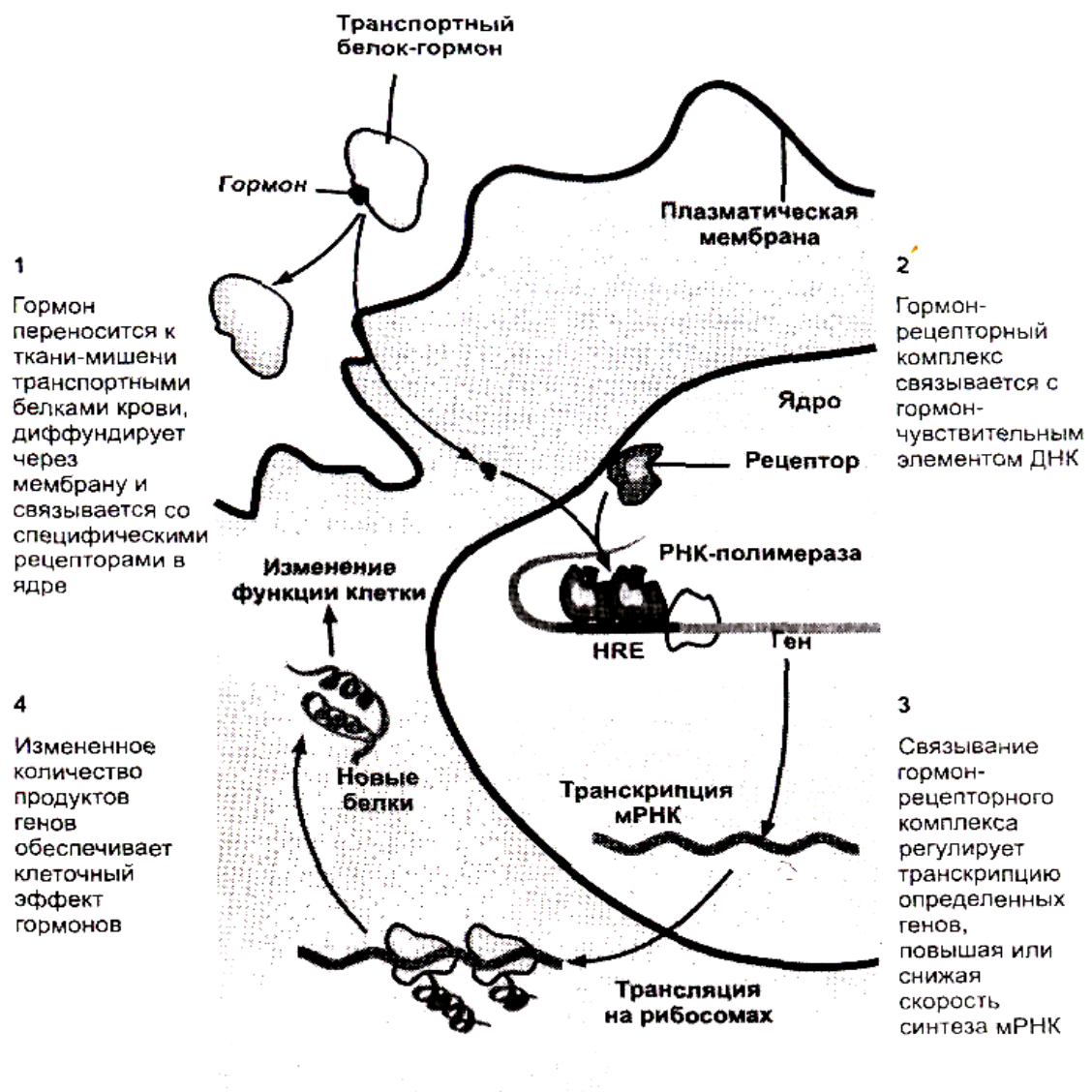


Рисунок 57. – Действие липофильных гормонов, проникающих через плазматическую мембрану

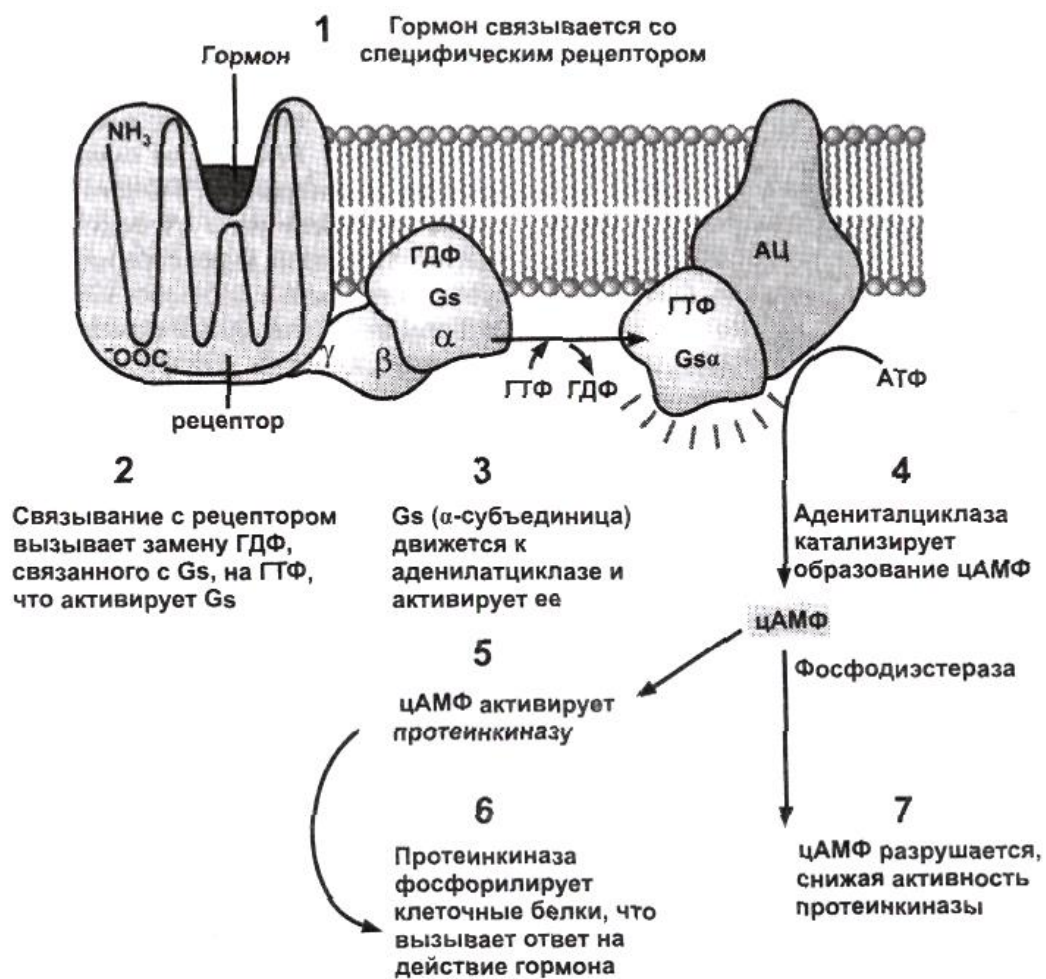


Рисунок 58. – Механизм действия гидрофильных гормонов, не проникающих в клетку

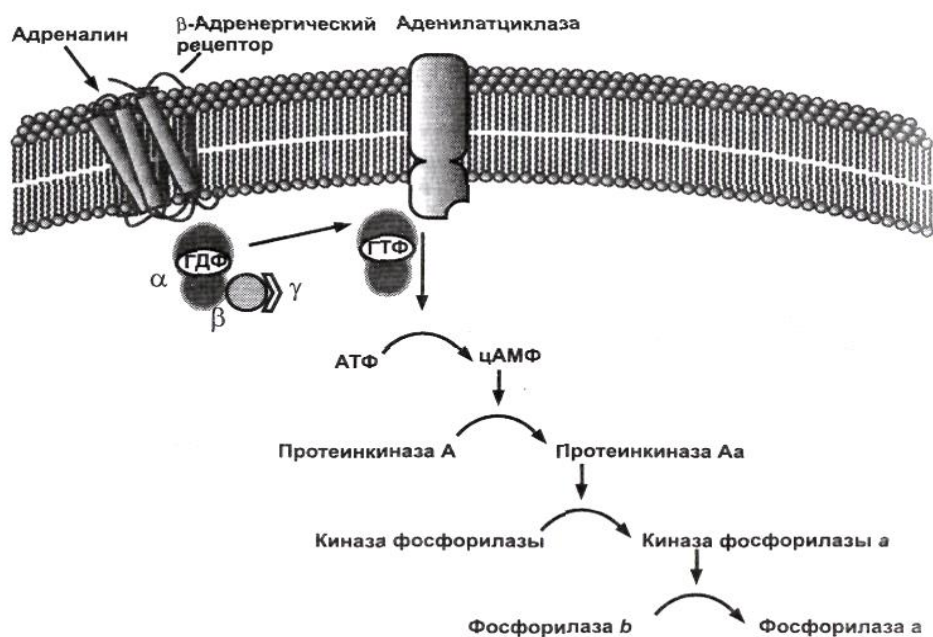


Рисунок 59. – Регуляция распада гликогена через аденилатциклазный механизм

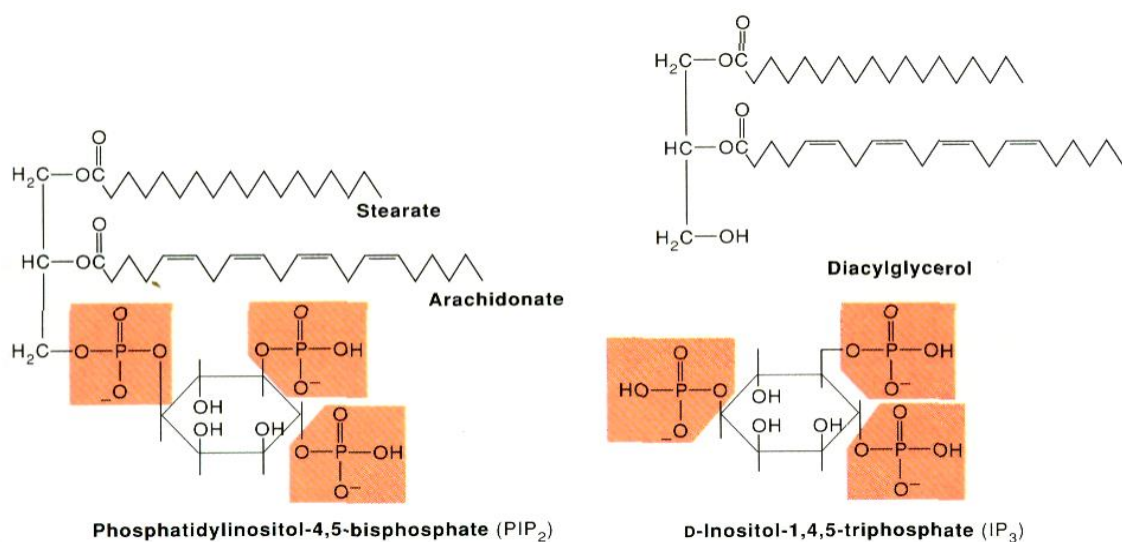


Рисунок 60. – Регуляторные молекулы – продукты распада фосфатидилинозитола

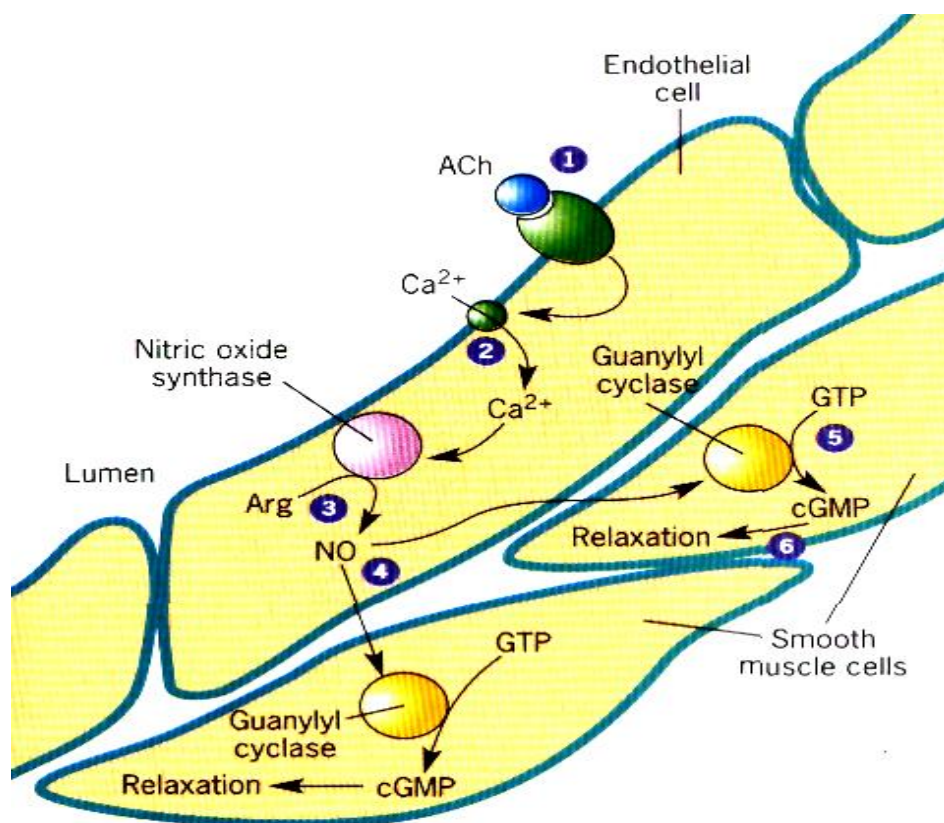


Рисунок 61. – Роль нитрата азота в расслаблении гладкой мускулатуры сосудов

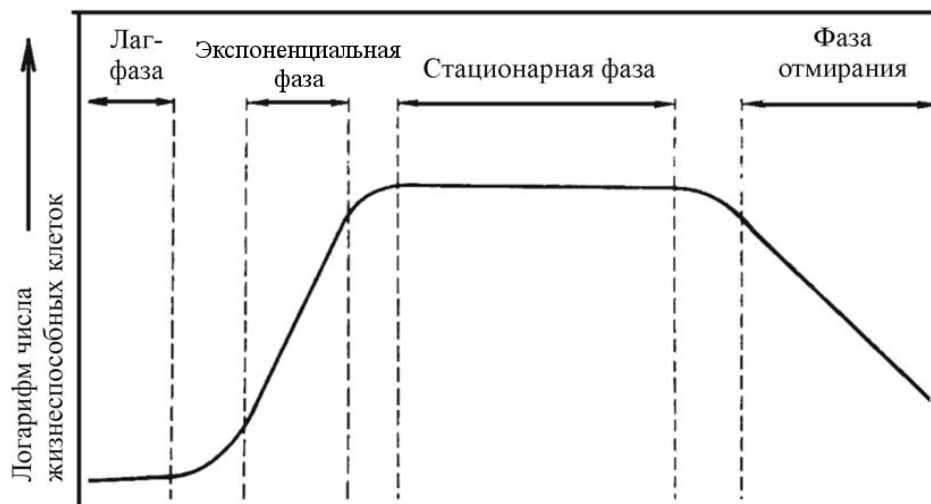


Рисунок 62. – Фазы роста культивируемых клеток

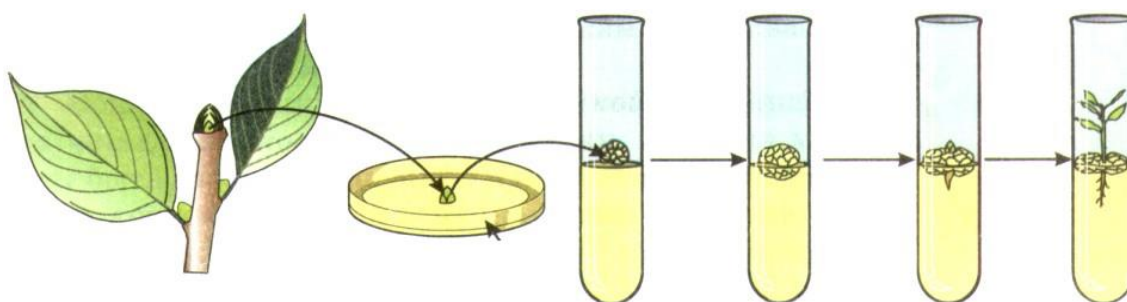


Рисунок 63. – Каллусные культуры в культивировании растений

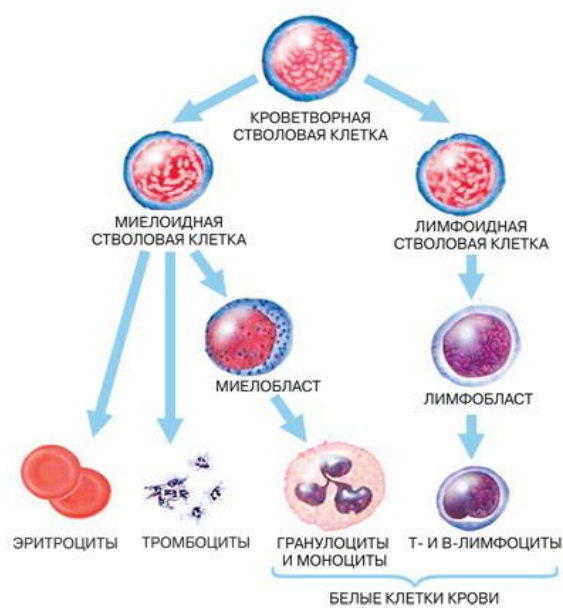


Рисунок 64. – Гемопоэтические стволовые клетки

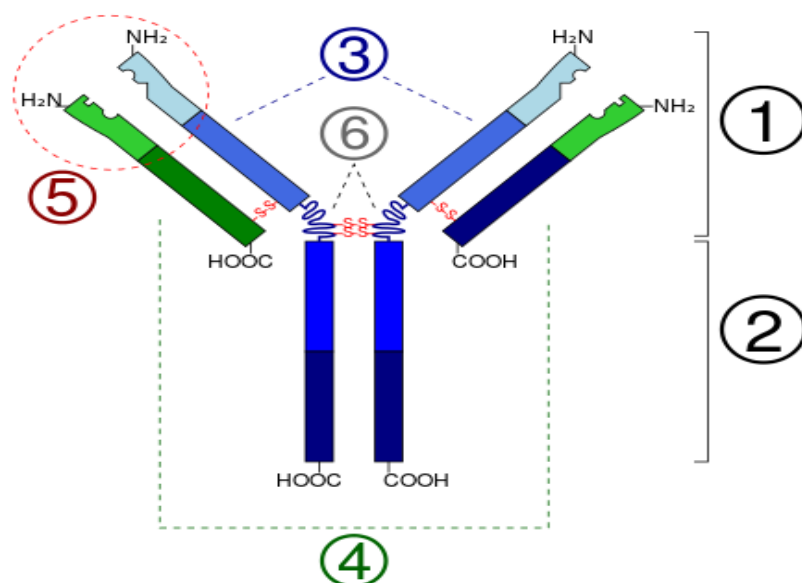


Рисунок 65. – Строение мономерного антитела. 1 – фрагмент Fab, 2 – фрагмент Fc, 3 – тяжёлые цепи, 4 – лёгкие цепи, 5 – антигенсвязывающие участки, 6 – шарнирные участки (Wikipedia)

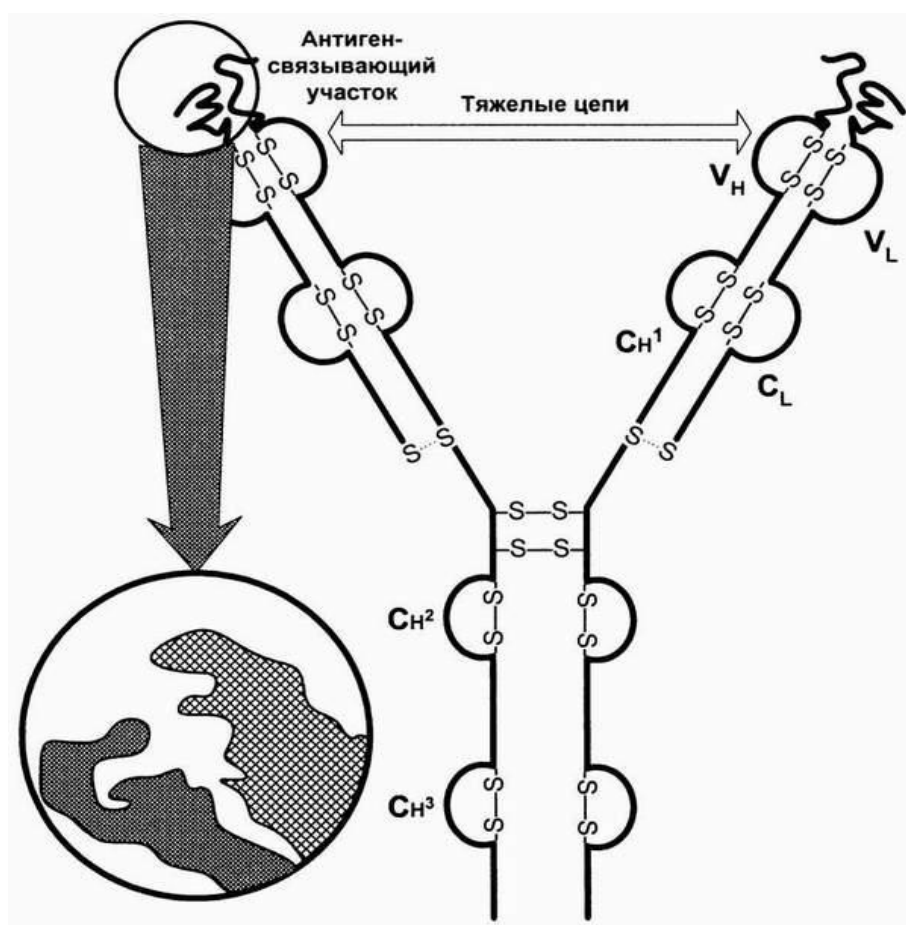


Рисунок 66. – Доменное строение иммуноглобулинов

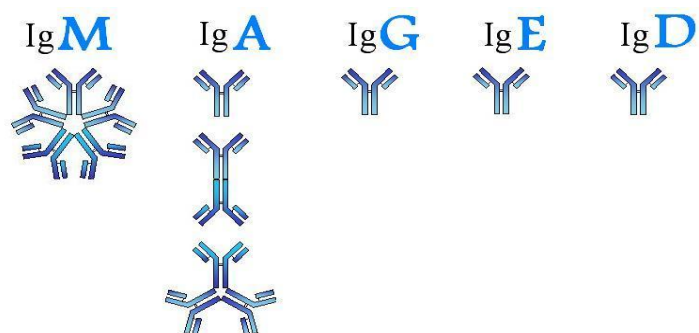


Рисунок 67. – Типы пространственных структур иммуноглобулинов

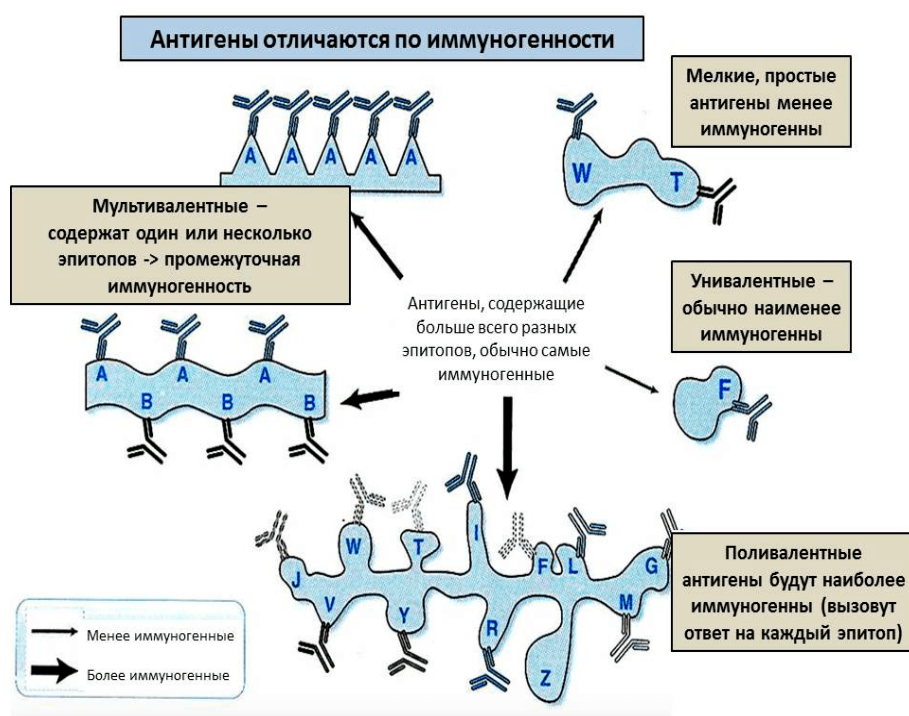


Рисунок 68. – Особенности иммунного ответа на антиген

Учебное издание

**КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ
ДЛЯ СПЕЦИАЛЬНОСТИ ВТОРОЙ СТУПЕНИ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ 1-31 80 01 БИОЛОГИЯ.
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ**

Учебно-методический комплекс по учебной дисциплине

Составители:

ЧИРКИН Александр Александрович
КАЦНЕЛЬСОН Екатерина Иосифовна

Технический редактор

Г.В. Разбоева

Компьютерный дизайн

В.Л. Пугач

Подписано в печать 28.10.2021. Формат 60х84 ¹/₁₆. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 8,13. Уч.-изд. л. 9,18. Тираж 30 экз. Заказ 164.

Издатель и полиграфическое исполнение – учреждение образования
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

Свидетельство о государственной регистрации в качестве издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/255 от 31.03.2014.

Отпечатано на ризографе учреждения образования
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».
210038, г. Витебск, Московский проспект, 33.