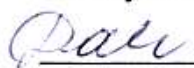


Учреждение образования «Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»

Биологический факультет
Кафедра ботаники и физиологии растений

СОГЛАСОВАНО

Заведующий кафедрой

 Н.М. Дайнеко

«24» декабря 2020 г.

СОГЛАСОВАНО

Декан факультета

 В.С. Аверин

«23» декабря 2020 г.



ЭЛЕКТРОННЫЙ УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
ПО УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

для специальности

1-31 80 01 Биология (профилизация Функциональная биология)

Составитель:

канд.биол.наук, доцент Храмченкова О.М.

Рассмотрено и утверждено на заседании
кафедры ботаники и физиологии растений
18.12.2020 г., протокол № 4.

Рассмотрено и утверждено на заседании
научно-методического совета

18.03.2021 протокол № 4

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

А.А. Дворник, заведующий лабораторией моделирования и минимизации антропогенных рисков ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси», кандидат биологических наук;

Кафедра биологии УО «Гомельский государственный медицинский университет».

**Содержание электронного учебно-методического комплекса
по дисциплине «Клеточная биология»
для специальности 1-31 80 01 Биология
(профилизация Функциональная биология)**

	Пояснительная записка.....	4
1	Теоретический раздел.....	8
1.1	Перечень теоретического материала.....	8
1.2	Материалы для обеспечения самостоятельной учебной работы магистрантов.....	10
2	Практический раздел.....	14
2.1	Перечень практических (семинарских) занятий и задания к ним.....	14
3	Контроль знаний.....	19
3.1	Перечень тем экзаменационных работ.....	19
4	Вспомогательный раздел.....	20
4.1	Учебная программа дисциплины.....	20
4.2	Перечень рекомендуемой литературы.....	20

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) по учебной дисциплине «Клеточная биология» компонента учреждения высшего образования, модуля «Клеточная биология и молекулярно-генетические механизмы биосигнализации», создан в соответствии с требованиями Положения об учебно-методическом комплексе на уровне высшего образования и предназначен для магистрантов специальности 1-31 80 01 Биология (профилизация Функциональная биология). Содержание разделов УМК соответствует Образовательному стандарту высшего образования второй ступени (магистратура) ОСВО 1-31 80 012012, учебным планам ГГУ имени Ф. Скорины специальности 1-31 80 01 Биология, регистрационные номера G 310117/2М от 08.06.2017 и G 310117/2МЗФ от 08.06.2017. Главная цель ЭУМК – оказание методической помощи магистрантам в систематизации учебного материала при изучении дисциплины и в процессе подготовки к итоговой аттестации по курсу «Трансдукция фитогормональных сигналов».

Биология клетки – фундаментальная научная дисциплина, представленная в учебных программах всех ведущих вузов мира. Значение достижений современной клеточной биологии неопределимо для развития практически всех разделов биологии, сельского хозяйства, медицины, экологии, генной инженерии, биотехнологии и нанобиологии. Реакции на уровне клетки определяют физиологические процессы в организме, контролируют здоровье человека и продуктивность растений. Понимание механизмов данных реакций имеет большое прикладное значение, так как лежит в основе создания новых лекарственных препаратов, биотехнологий и методов повышения урожайности растений. В этой связи, изучение клеточной биологии – важный компонент подготовки специалистов-биологов.

Цель дисциплины: ознакомление с фундаментальными основами и современными представлениями о структуре, молекулярной организации, исполнительных и регуляторных механизмах функций прокариотических и эукариотических клеток.

Основные задачи дисциплины – дать представление о фундаментальных основах строения, молекулярной организации и регуляторных механизмах живых клеток; ознакомить с научными достижениями в области клеточной эволюции, взаимодействия клеток со средой, энергетике, механизмах движения клеток, межклеточных коммуникациях, репродукции и цитодифференцировки.

В преподавании данной дисциплины, наряду с лекциями, учебным планом предусмотрены практические (семинарские) занятия, которые способствуют развитию у обучающихся таких необходимых навыков, как выбор и решение поставленной задачи, сбор и аналитический анализ опубликованных данных, умение выделять главное и делать обоснованное заключение. Они стимулируют регулярное изучение научной литературы,

закрепляют знания, полученные на первой ступени высшего образования, прививают навыки самостоятельной работы. На практических (семинарских) занятиях используются методы интерактивного обучения, основанных на психологии человеческих взаимоотношений и взаимодействий.

В результате изучения дисциплины магистрант должен:

знать:

- основы устройства, функционирования и интеграции в ткани клеток живых организмов;
- структуру клеточных компонентов, молекулярную природу происходящих в них процессов;
- механизмы регуляции физиологических процессов в клетках;
- методы исследования, культивирования и практического использования клеточных культур;

уметь:

- использовать знания о молекулярных основах функционирования клетки, координации физиологических функций клетки;
 - применять на практике знания об основных экспериментальных подходах клеточной биологии;
 - использовать знания клеточной биологии в целях развития новых подходов в биотехнологии, генной инженерии и сельском хозяйстве;
- владеть:
- навыками научного анализа и разработки проблем фундаментальной и прикладной клеточной биологии;
 - техникой планирования и проведения универсального клеточно-биологического исследования с использованием современных аналитических подходов.

Изучение учебной дисциплины «Клеточная биология» должно обеспечить формирование у магистранта следующих компетенций:

АК-2. Применять методологические знания и исследовательские умения, обеспечивающие решение задач производственной, научно-педагогической, управленческой и инновационной деятельности.

АК-3. Использовать междисциплинарный подход при решении проблем, совершенствовать навыки, связанные с использованием технических устройств, управлением информацией и работой с компьютером.

АК-4. Самостоятельно изучать новые методы исследований, приобретать новые знания и умения, в том числе в областях знаний, непосредственно не связанных со сферой деятельности, повышать свою квалификацию в течение всей жизни, обеспечивать личностное и профессиональное саморазвитие.

СК-2. Быть способным использовать знания о молекулярных основах функционирования клеточных систем и механизмах биосигнализации в разработке актуальных вопросов физиологии животных и растений, биотехнологии, экологии, фармации, сельском и лесном хозяйстве

ПК-1. Квалифицированно проводить научные исследования (осуществлять постановку научной проблемы, выбирать грамотные и экспериментально обоснованные методические подходы, проводить анализ результатов экспериментальных исследований, оценивать их достоверность и осуществлять статистическую обработку, формулировать из полученных результатов корректные выводы).

ПК-2. Осуществлять поиск и анализ данных по изучаемой проблеме в научных, научно-технических и других информационных источниках, составлять аналитические обзоры;

ПК-3. Организовывать работу по подготовке научных статей, сообщений, рефератов и заявок на изобретения и лично участвовать в ней.

ПК-5. Квалифицированно проводить научно-производственные исследования (осуществлять постановку научной проблемы, имеющей практическую значимость; выбирать грамотные и экспериментально обоснованные методические подходы; проводить анализ результатов экспериментальных исследований, оценивать их достоверность и осуществлять статистическую обработку, давать рекомендации по практическому применению полученных результатов).

ПК-11. Составлять отчеты по научным, научно-производственным проектам исследований.

Изучение учебной дисциплины «Клеточная биология» базируется на знаниях, полученных по учебным дисциплинам «Цитология и гистология», «Биохимия», «Физиология человека и животных», «Физиология растений», «Молекулярная биология» и др.

Изучение данной учебной дисциплины предусмотрено магистрантами 1 курса специальности 1-31 80 01 Биология (профилизация Функциональная биология). Общее количество часов для магистрантов **дневной** формы обучения – 112 (3 зачетных единицы); аудиторных – 50, из них: лекции – 34, в том числе – УСП – 12, практические (семинарские) занятия – 16. Форма отчетности – экзамен во 2 семестре. Общее количество часов для магистрантов **заочной** формы обучения – 112 (3 зачетных единицы); аудиторных – 16, из них: лекции – 10, практические (семинарские) занятия – 6. Форма отчетности – экзамен во 2 семестре.

Структура УМК включает:

Учебно-методическое обеспечение дисциплины

1. Теоретический раздел (перечень материала для теоретического изучения дисциплины в объеме, установленном учебным планом по специальности).

2. Практический раздел (материалы для проведения практических (семинарских) занятий по дисциплине в соответствии с учебным планом).

3. Контроль самостоятельной работы магистрантов (материалы текущей и итоговой аттестации, позволяющие определить соответствие учебной деятельности обучающихся требованиям образовательных стандартов высшего образования и учебно-программной документации, в

том числе задания управляемой самостоятельной работы магистрантов, темы экзаменационных работ).

4. Вспомогательный раздел.

4.1. Учебно-программные материалы (учебная программа (рабочий вариант) для магистрантов дневной и заочной форм получения образования).

4.2. Информационно-аналитические материалы (список рекомендуемой литературы, перечень электронных образовательных ресурсов и их адреса и др.).

Работа с УМК должна включать ознакомление с тематическим планом дисциплины, представленным в учебной программе. С помощью учебной программы по дисциплине можно получить информацию о тематике лекций и практических (семинарских) занятий, перечнях рассматриваемых вопросов и рекомендуемой для их изучения литературы. Для подготовки к практическим (семинарским) занятиям и промежуточным контрольным мероприятиям необходимо использовать материалы, представленные в разделе учебно-методическое обеспечение дисциплины, а также материалы для текущего контроля самостоятельной работы.

1 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

1.1 Перечень теоретического материала

Раздел 1 Структурная и функциональная организация ядерного аппарата клетки.

Тема 1 Строение и химия клеточного ядра.

- 1 Морфология ядерных структур.
- 2 Структура и химия хроматина.
- 3 Ядерный белковый матрикс.
- 4 Хромонемный уровень упаковки хроматина.

Тема 2 Ядерные транскрипты и их транспорт

- 1 Ядрышко – источник рибосом.
- 2 Нерибосомные продукты клеточного ядра.
- 3 Ядерная оболочка

Раздел 2 Клеточные мембраны

Тема 3 Состав и свойства биологических мембран.

- 1 Общие свойства биологических мембран.
- 2 Структура биомембран.
- 3 Барьерно-транспортная роль плазмалеммы.

Тема 4 Транспорт веществ через мембрану.

- 1 Характеристика транспортных процессов.
- 2 Везикулярный перенос: эндоцитоз и экзоцитоз.

Раздел 3 Цитозоль и эндомембранные структуры

Тема 5 Цитозоль.

- 1 Основные определения. Разграничение понятий.
- 2 Химический состав цитозоля.
- 3 Организация и функции цитозоля

Тема 6 Эндоплазматический ретикулум.

- 1 Вакуолярная система внутриклеточного транспорта.
- 2 Гранулярный эндоплазматический ретикулум.
- 3 Гладкий эндоплазматический ретикулум.
- 4 Эндоплазматический ретикулум растительных клеток.

Тема 7 Аппарат Гольджи.

- 1 Строение аппарата Гольджи.
- 2 Основные клеточные процессы, связанные с аппаратом Гольджи.
- 3 Растительный аппарат Гольджи.

Тема 8 Эндомембранные структуры вакуолярной природы.

- 1 Лизосомы.
- 2 Сферосомы, пероксисомы, глиоксисомы.
- 3 Растительные вакуоли.

Раздел 4 Системы энергообеспечения клетки

Тема 9 Митохондрии

- 1 Строение митохондрий.
- 2 Функции митохондрий и энергопреобразование.

3 Растительные митохондрии.

Тема 10 Пластиды

1 Общая характеристика пластид.

2 Хлоропласты высших растений.

3 Геном и белоксинтезирующая система хлоропластов.

Раздел 5 Цитоскелет и производные протопласта

Тема 11 Опорно-двигательная система цитоплазмы.

1 Промежуточные филаменты и микрофиламенты.

2 Микротрубочки.

3 Клеточный центр.

4 Кинетосома, реснички, жгутики.

Тема 12 Производные протопласта.

1 Клеточная оболочка.

2 Эргастические вещества или включения.

3 Клеточный сок.

Раздел 6 Клеточная жизнь, смерть и канцерогенез

Тема 13 Рост и деление клеток.

1 Рост и деление клеток.

2 Клеточный цикл и его регуляция.

3 Стволовые клетки.

Тема 14 Гибель клеток.

1 Биологические деструктивные процессы.

2 Апоптоз.

3 Онкоз.

4 Некроз.

Тема 15 Клеточная гибель у растений.

1 Апоптоз при индивидуальном развитии.

2 Реакции на патоген и стрессовые воздействия.

3 Механизмы апоптоза у растений.

Тема 16 Молекулярные механизмы канцерогенеза.

1 Общие сведения о канцерогенезе.

2 Канцерогены.

3 Молекулярно-генетические основы онкогенеза.

4 Общая схема онкогенеза.

Тема 17 Культуры клеток животных и человека

1 Получение и культивирование клеток человека и животных.

2 Создание коллекций культур клеток.

3 Создание банков культур клеток и современные требования к их контролю.

1.2 Материалы для обеспечения самостоятельной учебной работы магистрантов.

Для организации самостоятельной работы магистрантов по учебной дисциплине рекомендуется использовать современные информационные технологии: разместить в сетевом доступе комплекс учебных и учебно-методических материалов (программа учебной дисциплины, учебно-методический комплекс, методические указания к практическим занятиям, задания в тестовой форме, темы рефератов, список рекомендуемой литературы и информационных ресурсов и др.). Для общей оценки качества усвоения магистрантами учебного материала предлагается использование рейтинговой системы.

УСР № 1. Ядерные транскрипты и их транспорт

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

- 1 Ядрышко – источник рибосом.
- 2 Нерибосомные продукты клеточного ядра.
- 3 Ядерная оболочка

Форма работы – индивидуальная.

Форма контроля выполнения заданий: проверка конспектов.

Учебно-методическое обеспечение:

- 1 Албертс, Б. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Албертс, Д. Брей, К. Хопкин. – М.: Лаборатория знаний, 2018. – 768 с.
- 2 Фаллер, Д.М. Молекулярная биология клетки / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс. – М.: БИНOM, 2017. – 256 с.
- 3 Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов, Москва: МИА, 2007. – 536 с.
- 4 Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: Академкнига, 2004. – 495 с.
- 5 Эллиот, В. Биохимия и молекулярная биология / В. Эллиот, Д. Эллиот. – М.: Академкнига, 2003. – 446 с.
- 6 Негроров, В.В. Растительная клетка: учебное пособие / В.В. Негроров. – Воронеж: ВГУ, 2010. – 171 с.

УСР № 2. Состав и свойства биологических мембран

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

- 1 Общие свойства биологических мембран.
- 2 Структура биомембран.
- 3 Барьерно-транспортная роль плазмалеммы.

Учебно-методическое обеспечение:

- 1 Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов, Москва: МИА, 2007. – 536 с.
- 2 Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: Академкнига, 2004. – 495 с.

3 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 1: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 437 с.

4 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

5 Биохимия растений / Б. Хельд. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. - 471 с.

6 Болдырев, А.А. Биомембранология: учебное пособие / А.А. Болдырев, Е.И. Кяйвярйнен, В.А. Илюха. – Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН, 2006. – 226 с.

УСР № 3. Цитозоль

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

1 Основные определения. Разграничение понятий.

2 Химический состав цитозоля.

3 Организация и функции цитозоля.

Учебно-методическое обеспечение:

1 Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: Академкнига, 2004. – 495 с.

2 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 1: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 437 с.

3 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

4 Биохимия растений / Б. Хельд. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. - 471 с.

5 Негрбов, В.В. Растительная клетка: учебное пособие / В.В. Негрбов. – Воронеж: ВГУ, 2010. – 171 с.

6 База научных данных в области биомедицинских наук – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed>.

7 Энциклопедия: Фонд знаний – Ломоносов – lomonosov-fund.ru?enc/ru/encyclopedia:0132746.

УСР № 4. Митохондрии

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

1 Строение митохондрий.

2 Функции митохондрий и энергопреобразование.

3 Растительные митохондрии.

Учебно-методическое обеспечение:

1 Албертс, Б. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Албертс, Д. Брей, К. Хопкин. – М.: Лаборатория знаний, 2018. – 768 с.

2 Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: Академкнига, 2004. – 495 с.

3 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

4 Биохимия растений / Б. Хельд. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. - 471 с.

5 База научных данных в области биомедицинских наук – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed>.

6 Сайт лаборатории клеточной биотехнологии. – Режим доступа: <http://science.spb.ru/sci/item/cellbio-2>

7 Энциклопедия: Фонд знаний – Ломоносов – lomonosov-fund.ru?enc/ru/encyclopedia:0132746.

УСР № 5. Опорно-двигательная система цитоплазмы

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

1 Промежуточные филаменты и микрофиламенты.

2 Микротрубочки.

3 Клеточный центр.

4 Кинетосома, реснички, жгутики.

Учебно-методическое обеспечение:

1 Албертс, Б. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Албертс, Д. Брей, К. Хопкин. – М.: Лаборатория знаний, 2018. – 768 с.

2 Фаллер, Д.М. Молекулярная биология клетки / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс. – М: БИНОМ, 2017. – 256 с.

3 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 1: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 437 с.

4 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

5 Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: Академкнига, 2004. – 495 с.

6 Энциклопедия: Фонд знаний – Ломоносов – lomonosov-fund.ru?enc/ru/encyclopedia:0132746.

УСР № 6. Клеточная гибель у растений

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

- 1 Апоптоз при индивидуальном развитии.
- 2 Реакции на патоген и стрессовые воздействия.
- 3 Механизмы апоптоза у растений.

Учебно-методическое обеспечение:

- 1 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 1: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 437 с.
- 2 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 459 с.
- 3 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.
- 4 Биохимия растений / Б. Хельд. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. - 471 с.
- 5 Болдырев, А.А. Биомембранология: учебное пособие / А.А. Болдырев, Е.И. Кяйвярайнен, В.А. Илюха. – Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН, 2006. – 226 с.
- 6 Негроров, В.В. Растительная клетка: учебное пособие / В.В. Негроров. – Воронеж: ВГУ, 2010. – 171 с.

2 ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

2.1 Перечень практических (семинарских) занятий и задания к ним

По дисциплине «Клеточная биология» предусмотрены практические (семинарские) занятия, которые способствуют развитию у магистрантов таких необходимых навыков, как выбор и решение поставленной задачи, сбор и аналитический анализ опубликованных данных, умение выделять главное и делать обоснованное заключение. Они стимулируют регулярное изучение магистрантами актуальной научной литературы, закрепляют знания, полученные при прослушивании лекций, прививают навыки самостоятельной работы, способствуют выработке навыков научной полемики. Практические (семинарские) занятия нацелены на пробуждение научного интереса, стимуляцию накопления научных знаний, формулирование выводов. Проведение практических (семинарских) занятий способствуют более глубокому усвоению широкого круга специальных биологических понятий, повышают познавательные возможности обучающихся. Практические (семинарские) занятия проводятся согласно графика учебного процесса и самостоятельной работы. Темы практических (семинарских) занятий приведены в таблице.

	Раздел дисциплины	Тема занятия
1	Структурная и функциональная организация ядерного аппарата клетки	Организация ядерного генома
	Клеточные мембраны	Активные формы кислорода и состояние окислительного стресса в клетке
2	Цитозоль и эндомембранные структуры	Эволюция клетки
		Эндомембранные структуры
3	Системы энергообеспечения клетки	Биоэнергетика клетки
	Цитоскелет и производные протопласта	Цитоскелет эукариот и прокариот
	Клеточная жизнь, смерть и канцерогенез	Клеточная гибель. Некроз и апоптоз
		Молекулярно-генетические аспекты канцерогенеза

Практические (семинарские) занятия проводятся один раз в неделю, продолжительность занятий – два академических часа. Подготовка к семинару сводится к следующему плану:

1. Выбор темы, определение задач.
2. Подбор дополнительной литературы.
3. Подготовка вопросов для обсуждения.
4. Распределение заданий и тем для сообщений.

5. Организация предварительной работы, консультации.
6. Определение критериев оценки выступлений.
7. Выбор методов и приемов проведения.
8. Подбор средств наглядности.
9. Составление плана проведения практических занятий.

Практические занятия организуются с целью расширения и обобщения знаний магистрантов по теме или разделу и сводятся к следующей структуре:

1. Вводное слово преподавателя: формулировка задач, постановка проблемы, знакомство с планом проведения семинара.
2. Выступления магистрантов (сообщения по заданным вопросам).
3. Обсуждение вопросов семинара в процессе беседы.
4. Подведение итогов (анализ сообщений, оценка их выступлений).

Структура практического (семинарского) занятия может быть различной, она зависит от сложности обсуждаемых вопросов, дидактических задач и может проводиться в виде:

- развернутой беседы,
- докладов,
- обсуждение рефератов,
- семинаров-диспутов,
- мини-конференций.

На практических (семинарских) занятиях используются методы интерактивного обучения. Учебный процесс, опирающийся на использование интерактивных методов обучения, организуется с учетом включенности в процесс познания всех магистрантов группы без исключения. Совместная деятельность означает, что каждый вносит свой особый индивидуальный вклад, в ходе работы идет обмен знаниями, идеями, способами деятельности. Организуются индивидуальная, парная и групповая работа, используется проектная работа, осуществляется работа с различными источниками информации. Интерактивные методы основаны на принципах взаимодействия, активности обучаемых, обязательной обратной связи. Создается среда образовательного общения, которая характеризуется открытостью, взаимодействием участников, равенством их аргументов, накоплением совместного знания, возможностью взаимной оценки и контроля.

ЗАНЯТИЕ 1 ОРГАНИЗАЦИЯ ЯДЕРНОГО ГЕНОМА

Рассматриваемые вопросы:

1. Современные представления об организации клеточного ядра.
2. Строение ядерной оболочки и ядерных пор.
3. Структура и репликация хромосомы.
4. Синтез и процессинг РНК. Контроль генной экспрессии.
5. Дифференцировка клеток и ее связь с экспрессией генов.
6. Роль ядра и цитоплазмы в экспрессии и репрессировании генов.

ЗАНЯТИЕ 2 АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В КЛЕТКЕ

Рассматриваемые вопросы:

1. Активные формы кислорода и продукты первичного окисления липидов как сигнальные молекулы.
2. Нарушения мембранных структур, связанные с повышением концентрации АФК.
3. Окислительный стресс у растений. Повреждения биомолекул активными формами кислорода.
4. Окислительный стресс у животных и человека. Повреждения биомолекул активными формами кислорода.
5. Детоксикация продуктов окислительной модификации биомолекул.
6. Механизмы повреждения ДНК и ядерных мембран активными формами кислорода

ЗАНЯТИЕ 3 ЭВОЛЮЦИЯ КЛЕТКИ

Рассматриваемые вопросы:

1. Возникновение первой клетки. Формирование метаболизма.
2. Прокариоты и эукариоты: сходства и различия. Многоклеточность.
3. Химические компоненты клетки. Упорядоченность биологических систем и энергия.
4. Питательные вещества и источники энергии клетки. Биосинтез и создание упорядоченности.
5. Координация катаболизма и биосинтеза в клетке.
6. Эволюция макроэргических соединений и систем энергопреобразования в клетке.

ЗАНЯТИЕ 4 ЭНДОМЕМБРАННЫЕ СТРУКТУРЫ

Рассматриваемые вопросы:

1. Общая схема функционирования вакуолярной системы. Взаимодействие органоидов вакуолярной системы.
2. Современные представления о строении и функционировании гранулярного эндоплазматического ретикулума.
3. Котрансляционный транспорт растворимых белков. Синтез мембранных белков.
4. Транспорт между эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи. Особенности организации аппарата Гольджи в различных типах клеток.
5. Молекулярные маркеры лизосом. Классификация лизосом. Набор лизосомальных ферментов.
6. Функция лизосом. «Лизосомные» болезни (наследственные и приобретенные).

ЗАНЯТИЕ 5 БИОЭНЕРГЕТИКА КЛЕТКИ

Рассматриваемые вопросы:

1. Молекулярная и ультраструктурная организация митохондрий, пластид.
2. Первичные механизмы преобразования энергии, редокс циклы и синтез макроорганических соединений в цитозоле клеток.
3. Преобразование энергии в процессах фотосинтетического и окислительного фосфорилирования.
4. Хемиосмотическая теория синтеза АТФ.
5. Вторичные механизмы преобразования энергии.
6. Способы энергообеспечения механического движения, трансмембранного переноса веществ, биосинтезов, деления клеток.

ЗАНЯТИЕ 6 ЦИТОСКЕЛЕТ ЭУКАРИОТ И ПРОКАРИОТ

Рассматриваемые вопросы:

1. Основные типы, молекулярная организация и исполнительные механизмы систем, обеспечивающих движение.
2. Системы движения, основанные на полимеризации (деполимеризации) и взаимодействии микротрубочек и актиновых нитей.
3. Тубулины, G- и F-актин, миозин, MAP и БАМ и другие белки как элементы «конструктора» для построения цитоскелета.
4. Динеины и кинезины – моторные белки. Клеточный центр. Центросомы и центриоли. Центросомный цикл.
5. Базальные тельца, строение и движение ресничек и жгутиков.
6. Цитоскелет растительных клеток – особенности организации и функционирования.

ЗАНЯТИЕ 7 КЛЕТОЧНАЯ ГИБЕЛЬ. НЕКРОЗ И АПОПТОЗ

Рассматриваемые вопросы:

1. Классификации некрозов животных и человека: по этиологии; клинко-морфологическая; по механизму возникновения. Причины некрозов.
2. Изменения в клетках и тканях животных и человека, происходящие при некрозах.
3. Некрозы у растений – основные особенности, классификация, изменения в клетках и тканях, происходящие при некрозах.
4. Фазы апоптоза: сигнальная, эффекторная, деградиционная. Регуляция апоптоза.
5. Роль апоптоза в организме животных и человека. Патологии, обусловленные нарушениями апоптоза.
6. Апоптоз у прокариот. Апоптоз у одноклеточных эукариот. Апоптоз у многоклеточных эукариот. Апоптоз у растений.

ЗАНЯТИЕ 8 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Рассматриваемые вопросы:

1. Механизмы канцерогенеза: теория четырехстадийности. Стадии формирования опухоли.

2. Системная эволюция опухоли. Теория клональной экспансии. Теория раковых стволовых клеток. Современные представления о принципах развития опухоли. Циркулирующие опухолевые клетки.

3. Генетическая и фенотипическая гетерогенность опухолевой ткани. Особенности использования в клинической практике. Методы оценки. Современное состояние проблемы.

4. Понятие о микроокружении. Инвазия. Подготовка ниши. Регионарные и удаленные метастазы. Внутриопухолевые взаимодействия.

5. Устойчивость опухоли к терапии. Ключевые «точки» инициации устойчивости. Комплексное представление.

6. Системный подход к проблеме преодоления лекарственной устойчивости. Тактика сдерживающей терапии. Иммуноterapia опухолей. Противоопухолевые вакцины.

Для участия в занятии каждый магистрант готовит сообщение на одну из обозначенных тем. Сообщение состоит из текста и презентации. Оно должно быть рассчитано на 15 минут доклада (3-4 страницы текста) + 35-40 слайдов презентации. Выступление на каждом занятии оценивается. Остальные члены группы готовят проблемные вопросы для дискуссии.

3 КОНТРОЛЬ ЗНАНИЙ

3.1 Перечень тем экзаменационных работ

По дисциплине «Клеточная биология» предусмотрено написание экзаменационной работы. Экзаменационная работа выполняется в электронном виде, включает титульный лист, основное содержание и список использованных источников информации (книги, статьи, интернет-источники). Объем экзаменационной работы – не менее 20 страниц основного текста. Источников информации – не менее 15.

Оформление страницы: поля: верхнее и нижнее – 2 см; левое – 3 см; правое – 1 см. Шрифт Times New Roman, 14 pt. Абзацный отступ – 1,25 см; выравнивание по ширине, междустрочный интервал – одинарный.

Отдельные страницы: титульный лист и список использованных источников. Текст освещается по плану, снабжается цветными иллюстрациями с подписями.

Титульный лист и список использованных источников оформляется по СТП.

Примерная тематика экзаменационных работ:

- 1 Эволюция электрон-транспортных цепей.
- 2 Геномы митохондрий и хлоропластов.
- 3 Дифференцировка клеток и поддержание нормальной организации тканей.
- 4 Механизмы апоптоза.
- 5 Вирусная инфекция и геном.
- 6 Стволовые клетки и регуляция их популяции. Роль стволовых клеток в норме и патологии.
- 7 История возникновения и развития клеточных теорий.
- 8 Возникновение первой клетки. Формирование метаболизма.
- 9 Механизмы транспорта молекул внутри ядра.
- 10 Общая характеристика и классификация фотобиологических процессов и их стадий.

Экзаменационная работа выполняется в электронном виде, включает титульный лист, основное содержание и список использованных источников информации (книги, статьи, интернет-источники). Объем экзаменационной работы – не менее 20 страниц основного текста. Источников информации – не менее 15.

Оформление страницы: поля: верхнее и нижнее – 2 см; левое – 3 см; правое – 1 см. Шрифт Times New Roman, 14 pt. Абзацный отступ – 1,25 см; выравнивание по ширине, междустрочный интервал – одинарный, автоматический перенос слов.

Отдельными страницами являются титульный лист и список использованных источников.

Текст освещается по плану, снабжается цветными иллюстрациями с подписями.

4 ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

4.1 Учебная программа дисциплины

Файл прилагается.

4.2 Перечень рекомендуемой литературы

Основная

- 1 Албертс, Б. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Албертс, Д. Брей, К. Хопкин. – М.: Лаборатория знаний, 2018. – 768 с.
- 2 Фаллер, Д.М. Молекулярная биология клетки / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс. – М.: БИНОМ, 2017. – 256 с.
- 3 Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов, Москва: МИА, 2007. – 536 с.
- 4 Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: Академкнига, 2004. – 495 с.
- 5 Эллиот, В. Биохимия и молекулярная биология / В. Эллиот, Д. Эллиот. – М.: Академкнига, 2003. – 446 с.
- 6 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 1: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 437 с.
- 7 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 459 с.
- 8 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.
- 9 Биохимия растений / Б. Хельд. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. - 471 с.

Дополнительная

- 10 Болдырев, А.А. Биомембранология: учебное пособие / А.А. Болдырев, Е.И. Кяйвярйнен, В.А. Илюха. – Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН, 2006. – 226 с.
- 11 Негроров, В.В. Растительная клетка: учебное пособие / В.В. Негроров. – Воронеж: ВГУ, 2010. – 171 с.
- 12 Киселев, Ф.Л. Молекулярная онкология: от вирусной теории к лечению рака / Ф.Л. Киселев, Е.Н. Имянитов, Н.П. Киселева, Е.С. Левина. – М.: ГЕОС, 2013. – 152 с.

Интернет-ресурсы

- 13 База научных данных в области биомедицинских наук – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed>.
- 14 Сайт лаборатории клеточной биотехнологии. – Режим доступа: <http://science.spb.ru/sci/item/cellbio-2>
- 15 Сайт по биотехнологии. – Режим доступа: <http://jbio.ru/biotexnologiya-mikrobiologicheskij-sintez-kletochnaya-i-gennaya-inzheneriya>
- 16 Энциклопедия: Фонд знаний – Ломоносов – lomonosov-fund.ru?enc/ru/encyclopedia:0132746.

РАЗДЕЛ 1

СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЯДЕРНОГО АППАРАТА КЛЕТКИ

Тема 1 Строение и химия клеточного ядра

- 1 Морфология ядерных структур.
- 2 Структура и химия хроматина.
- 3 Ядерный белковый матрикс.
- 4 Хромонемный уровень упаковки хроматина.

1 Морфология ядерных структур.

Ядро осуществляет две группы общих функций: одна из них – хранение генетической информации, другая – ее реализация, обеспечение синтеза белка.

В первую группу входят процессы, обуславливающие поддержание наследственной информации в виде неизменной структуры ДНК. Эти процессы связаны с наличием так называемых репарационных ферментов, ликвидирующих спонтанные повреждения молекулы ДНК (разрыв одной из цепей ДНК, часть радиационных повреждений), что сохраняет строение молекул ДНК практически неизменным в ряду поколений клеток или организмов. Далее в ядре происходят воспроизведение, или редупликация, и разъединение (сегрегация) молекул ДНК, что дает возможность двум клеткам получить совершенно одинаковые и в качественном и количественном смысле объемы генетической информации. В ядре эукариот происходят процессы изменения и рекомбинации генетического материала, что наблюдается во время мейоза (кроссинговер). Наконец, ядра непосредственно участвуют в процессах распределения молекул ДНК при делении клеток.

Другой группой клеточных процессов, обеспечивающихся активностью ядра, является создание собственного аппарата белкового синтеза. Это не только синтез (транскрипция) на молекулах ДНК разных информационных РНК, но также транскрипция всех видов трансферных РНК и рибосомных РНК. В ядрах эукариотических клеток происходит «созревание» (процессинг, сплайсинг) первичных транскриптов.

В ядре эукариот образуются также субъединицы рибосом путем комплексования синтезированных в ядрышке рибосомных РНК с рибосомными белками, которые синтезируются в цитоплазме и переносятся в ядро. Таким образом, ядро представляет собой не только вместилище генетического материала, но и структуру, где этот материал воспроизводится и функционирует. Поэтому выпадение или нарушение любой из перечисленных выше функций губительно для клетки в целом.

Ядерный аппарат эукариотических клеток имеет ряд отличий от прокариотических. Во-первых, ДНК-содержащий компонент отделен от цитоплазмы специальной оболочкой (ядерная оболочка), во-вторых, количество ДНК в ядрах эукариот в тысячи раз больше, чем в составе нуклеоидов бактерий, в-

третьих, ДНК эукариот представляет собой сложный нуклеопротеидный комплекс, образующий специальную структуру – хроматин, из которого и состоят эукариотические хромосомы. Далее, в состав ядер эукариот входят несколько физически не связанных хромосом, каждая из которых содержит одну линейную гигантскую молекулу ДНК. Каждая хромосомная ДНК представляет собой полирепликонную структуру, т.е. содержит множеств автономно реплицирующихся участков. Синтез и образование транскриптов эукариотических клеток сопровождаются процессами вторичной их перестройки, «созревания», включающей в себя как фрагментацию (процессинг), так и сращивание отдельных фрагментов ДНК (сплайсинг). Наконец, в ядрах не происходит синтеза белков, т.е. в эукариотических клетках процессы синтеза ДНК и РНК разобщены от процесса синтеза белков.

Клеточное ядро, обычно одно на клетку (есть примеры многоядерных клеток), состоит из ядерной оболочки, отделяющей его от цитоплазмы, хроматина, ядрышка и других продуктов синтетической активности, ядерного белкового остова (матрикса) и кариоплазмы (или ядерного сока). Эти основные компоненты встречаются практически во всех неделящихся клетках эукариотических одно- или многоклеточных организмов.

Главный компонент ядер – хроматин, является структурой, выполняющей генетическую функцию клетки, в хроматиновой ДНК заложена практически вся генетическая информация. Ядерная оболочка выполняет сложную барьерно-рецепторную, а также транспортную и каркасную функции. Нехроматиновый ядерный белковый остов (матрикс) обеспечивает не только пространственное расположение хромосом в ядре, но и участвует в их функциональной активности. Одним из хромосомных участков, определяющих синтез рРНК и образование клеточных рибосом, является ядрышко. Кроме того, в ядре наряду с хроматином и матриксом обнаруживаются различные рибонуклеопротеидные структуры, содержащие разные типы РНК. Между всеми этими компонентами заключена жидкая фаза клеточного ядра – кариоплазма, в которой протекают многие процессы, связанные как с ядерным метаболизмом, так и с внутриядерным транспортом белков и РНК.

В отличие от прокариотических клеток ДНК-содержащий материал хроматина эукариот может пребывать в двух альтернативных состояниях: деконденсированном в интерфазе и в максимально уплотненном во время митоза, в составе митотических хромосом.

В неделящихся (интерфазных) клетках хроматин, выявляемый с помощью светового микроскопа, может равномерно заполнять объем ядра или же располагаться отдельными сгустками (хромоцентры). Нередко он особенно четко обнаруживается на периферии ядра (пристеночный, маргинальный, примембранный хроматин) или образует внутри ядра переплетения довольно толстых (около 0,3 мкм) и длинных тяжей в виде внутриядерной сети. Такие ядра часто встречаются в клетках растений.

Хроматин интерфазных ядер представляет собой несущие ДНК тельца (хромосомы), которые теряют в это время свою компактную форму, разрыхляются, деконденсируются. Степень такой деконденсации хромосом может

быть различной в ядрах разных клеток. Когда хромосома или ее участок полностью деконденсированы, эти зоны называют диффузным хроматином. При неполном разрыхлении хромосом в интерфазном ядре видны участки конденсированного хроматина (иногда называемого гетерохроматином).

Максимально конденсирован хроматин во время митотического деления клеток, когда он обнаруживается в виде телец – хромосом. В этот период хромосомы не несут никаких синтетических нагрузок, в них не происходит включения предшественников ДНК и РНК. Исходя из этого, можно считать, что хромосомы клеток могут находиться в двух структурно-функциональных состояниях: в рабочем, частично или полностью деконденсированном, когда с их участием в интерфазном ядре происходят процессы транскрипции и репликации, и в неактивном – в состоянии метаболического покоя при максимальной их конденсации, когда они выполняют функцию распределения и переноса генетического материала в дочерние клетки.

В дифференцированных клетках всего лишь около 10% генов находится в активном состоянии, остальные гены инактивированы и входят в состав конденсированного хроматина (факультативный гетерохроматин). Это обстоятельство объясняет, почему большая часть хроматина ядра структурирована.

Хромосомы всех эукариотических клеток построены по одному плану. Они включают в себя три основных компонента: собственно тело хромосомы (плечо), теломерный, конечный участок и центромеру. Наиболее просто устроены хромосомы дрожжевых клеток: палочковидное тело хромосомы на одном конце имеет теломеру, а на другом – центромеру. Хромосомы животных и растений также представляют собой палочковидные структуры разной длины с довольно постоянной толщиной, но обычно имеют два хромосомных плеча, соединенных в зоне центромеры. Эта зона называется первичной перетяжкой. Соответственно оба плеча хромосомы оканчиваются теломерами. Хромосомы с равными или почти равными плечами называют метацентрическими, с плечами неодинаковой длины – субметацентрическими, палочковидные хромосомы с очень коротким, почти незаметным вторым плечом – акроцентрическими.

В области первичной перетяжки (центромеры) расположен кинетохор – пластинчатая структура, имеющая форму диска. К нему подходят пучки микротрубочек митотического веретена, идущие в направлении к центриолям. Эти пучки микротрубочек принимают участие в движении хромосом к полюсам клетки при митозе.

Обычно каждая хромосома имеет только одну центромеру (моноцентрические хромосомы), но могут встречаться хромосомы дицентрические и полицентрические, т.е. обладающие множественными кинетохорами.

В зоне первичной перетяжки присутствует особая, центромерная, сателлитная ДНК, отличающаяся высоким уровнем повторности нуклеотидных последовательностей.

Некоторые хромосомы имеют вторичную перетяжку. Последняя обычно расположена вблизи дистального конца хромосомы и отделяет маленький

участок – спутник. Вторичные перетяжки называют еще и ядрышковыми организаторами, так как именно на этих участках хромосом в интерфазе происходит образование ядрышка. Здесь же локализована ДНК, ответственная за синтез рРНК. В хромосомах человека ядрышковые организаторы расположены в коротких плечах вблизи центромер.

Плечи хромосом оканчиваются конечными участками – теломерами. Теломерные концы хромосом не способны соединяться с другими хромосомами или их фрагментами, в отличие от концов хромосом, лишенных теломерных участков (в результате разрывов), которые могут присоединяться к таким же разорванным концам других хромосом. В теломерах локализована особая теломерная ДНК, защищающая хромосому от укорачивания в процессе синтеза ДНК.

Размеры хромосом у разных организмов варьируют в широких пределах. Так, длина хромосом может колебаться от 0,2 до 50 мкм. Самые мелкие хромосомы отмечены у некоторых простейших, грибов, водорослей; очень мелкие хромосомы – у льна и морского камыша; они настолько малы, что с трудом видны в световом микроскопе. Наиболее длинные хромосомы обнаружены у некоторых прямокрылых насекомых, у амфибий и у лилейных. Длина хромосом человека находится в пределах 1,5-10 мкм.

Число хромосом у различных объектов также значительно колеблется, но характерно для каждого вида животных и растений. У некоторых радиоларий число хромосом достигает 1000-1600. Рекордсменом среди растений по числу хромосом (около 500) является папоротник уховник, 308 хромосом у тутового дерева, у речного рака 196 хромосом. Наименьшее количество хромосом (2 хромосомы на гаплоидный набор) наблюдается у одной из рас аскариды, у сложноцветного *Haplopappus gracilis* всего 4 хромосомы (2 пары).

Совокупность числа, величины и морфологии хромосом называется кариотипом данного вида. Кариотип – это как бы лицо вида. Даже у близких видов хромосомные наборы отличаются друг от друга или по числу хромосом, или по величине хотя бы одной или нескольких хромосом, или по форме хромосом и по их структуре. Структура кариотипа данного вида не зависит ни от типа клеток, ни от возраста животного или растения. Все клетки индивидуумов одного вида имеют идентичные наборы хромосом. Следовательно, структура кариотипа может быть таксономическим (систематическим) признаком, который все чаще используется в систематике животных и растений.

Если делящиеся клетки на некоторое время охладить или обработать каким-либо веществом, разрушающим микротрубочки веретена (например, колхицином), то деление клеток прекратится. При этом исчезнет веретено, а хромосомы без расхождения к полюсам будут продолжать цикл своих превращений: они начнут набухать, одеваться ядерной оболочкой. Так возникают за счет объединения всех нераззошедшихся наборов хромосом крупные новые ядра. Они, естественно, будут содержать вначале $4n$ число хроматид и соответственно $4c$ количество ДНК. По определению, это уже не диплоидная, а тетраплоидная клетка. Такие полиплоидные клетки могут из стадии G, пе-

переходить в S-период и, если убрать колхицин, снова делиться митотическим путем, давая уже потомков с 4л числом хромосом. В результате можно получить полиплоидные клеточные линии разной величины плоидности (4л, 8л, 16л и т.д.). Этот прием часто используется для получения полиплоидных растений.

Как оказалось, во многих органах и тканях нормальных диплоидных организмов животных и растений встречаются клетки с крупными ядрами, количество ДНК в которых кратно больше $2n$. При делении таких клеток видно, что количество хромосом у них также кратно увеличено по сравнению с обычными диплоидными клетками. Эти клетки являются результатом соматической полиплоидии. Подобные клетки появляются в результате отсутствия в целом или в результате незавершенности отдельных этапов митоза.

2 Структура и химия хроматина.

Хроматин – основной компонент клеточного ядра; его достаточно легко получить из выделенных интерфазных ядер и из выделенных митотических хромосом. Для этого используют его свойство переходить в растворенное состояние при экстракции водными растворами с низкой ионной силой или просто деионизованной водой. При этом участки хроматина набухают и переходят в гель. Чтобы такие препараты перевести в настоящие растворы, необходимы сильные механические воздействия: встряхивание, перемешивание, дополнительная гомогенизация. Это, конечно, приводит к частичному разрушению исходной структуры хроматина, дробит его на мелкие фрагменты, но практически не меняет его химического состава.

Главными компонентами хроматина являются ДНК и белки, среди которых основную массу составляют гистоны и негистоновые белки. В среднем в хроматине около 40% приходится на ДНК и около 60% – на белки, среди которых специфические ядерные белки-гистоны составляют от 40 до 80% от всех белков, входящих в состав выделенного хроматина.

В структурном отношении хроматин представляет собой нитчатые комплексные молекулы дезоксирибонуклеопотеида (ДНП), которые состоят из ДНК, ассоциированной с гистонами. Поэтому укоренилось другое название хроматина – нуклеогистон. Именно за счет ассоциации гистонов с ДНК образуются очень лабильные, изменчивые нуклеиново-гистоновые комплексы, где отношение ДНК : гистон равно примерно единице, т.е. они присутствуют в равных весовых количествах. Эти нитчатые фибриллы ДНП и есть элементарные хромосомные, или хроматиновые, нити, толщина которых в зависимости от степени упаковки ДНК может колебаться от 10 до 30 нм. Фибриллы ДНП могут в свою очередь дополнительно компактизоваться с образованием более высоких уровней структуризации ДНП, вплоть до митотической хромосомы. Роль некоторых негистоновых белков заключается именно в образовании высоких уровней компактизации хроматина.

В препарате хроматина на долю ДНК приходится обычно 30-40%. Эта ДНК представляет собой двухцепочечную спиральную молекулу, подобную чистой выделенной ДНК в водных растворах.

Было обнаружено, что в составе хромосом длина индивидуальных линейных (в отличие от прокариотических хромосом) молекул ДНК может достигать сотен микрометров и даже нескольких сантиметров.

Общее количество ДНК, входящее в ядерные структуры клеток, в геном организмов, колеблется от вида к виду, хотя у микроорганизмов количество ДНК на клетку значительно ниже, чем у беспозвоночных, высших растений и животных.

Сателлитная ДНК – характерный компонент эукариотического генома, состоящий из тандемно организованных повторов нуклеотидных последовательностей. Сателлитная ДНК не кодирует белки и локализована в конститутивном гетерохроматине хромосом. Сателлитная ДНК характерна для теломерных и центромерных областей хромосом.

Молекулы ДНК гетерогенны не только по участкам разной нуклеотидной последовательности, но и различны в отношении их синтетической активности.

Репликация ДНК. Бактериальная хромосома реплицируется как одна структурная единица, имеющая одну стартовую точку репликации и одну точку терминации. Таким образом, бактериальная циклическая ДНК является одним репликоном. От стартовой точки репликация идет в двух противоположных направлениях, так что по мере синтеза ДНК образуется так называемый глазок репликации, ограниченный с двух сторон репликационными вилками, что хорошо видно при электронно-микроскопическом изучении вирусных и бактериальных реплицирующихся хромосом.

У эукариотических клеток организация репликации иного характера – полирепликонная. Одновременно в интерфазной хромосоме существует множество мест репликации и множество автономных точек начала репликации. По расстоянию между средними точками смежных метящихся репликонов, т.е. по расстоянию между двумя соседними стартовыми точками репликации, можно узнать величину отдельных репликонов.

В среднем величина репликонов у высших животных составляет около 30 мкм, или 100 т.п.н. Следовательно, в гаплоидном наборе млекопитающих должно быть 20 000-30 000 репликонов. У низших эукариот величина репликонов меньше – около 40 т.п.н. Синтез ДНК в репликоне идет в двух противоположных направлениях. Реплицирующиеся концы, или вилки, в репликоне прекращают движение, когда встретятся с вилками соседних репликонов (в терминальной точке, общей для соседних репликонов). В этом месте реплицированные участки соседних репликонов объединяются в единые ковалентные цепи двух новосинтезированных молекул ДНК. Функциональное подразделение ДНК хромосом на репликоны совпадает со структурным подразделением ДНК на домены, или петли, основания которых скреплены белковыми связками.

Таким образом, весь синтез ДНК на отдельной хромосоме протекает за счет независимого синтеза на множестве отдельных репликонов с последующим соединением концов соседних отрезков ДНК.

В некоторых случаях наблюдается одновременное включение всех репликонов или же появление дополнительных точек начала репликации, что дает возможность закончить синтез всех хромосом за минимально короткое время. Это явление происходит на ранних этапах эмбриогенеза некоторых животных.

Синтез ДНК по длине отдельной хромосомы происходит неравномерно. Обнаружено, что в индивидуальной хромосоме активные репликоны собраны в группы – репликативные единицы, которые включают в себя 20-80 точек начала репликации.

Кластеры репликонов, объединенные в репликационные единицы, связаны с белками ядерного матрикса, которые вместе с ферментами репликации образуют так называемые кластеросомы – зоны в интерфазном ядре, в которых идет синтез ДНК. Порядок, в котором активируются репликационные единицы, может, вероятно, определяться структурой хроматина в этих участках.

Последовательность начала и окончания репликации отдельных хромосом в наборе не беспорядочная. Существует строгая последовательность репродукции хромосом относительно других хромосом в наборе. Длительность процесса репликации отдельных хромосом прямо не зависит от их размеров.

Таким образом, синтез ДНК в геноме эукариот начинается почти одновременно на всех хромосомах ядра в начале S-периода. Но при этом происходит последовательное и асинхронное включение разных репликонов как в разных участках хромосом, так и в разных хромосомах. Последовательность репликации того или иного участка генома строго детерминирована генетически.

Гистоны. Роль ДНК в составе как интерфазных хромосом (хроматин интерфазного ядра), так и митотических хромосом достаточно ясна: хранение и реализация генетической информации. Однако для выполнения этих функций в составе интерфазных ядер необходимо иметь четкую структурную основу, которая позволила бы расположить огромные по длине молекулы ДНК в строгом порядке, чтобы с определенной временной последовательностью протекали процессы как синтеза РНК, так и редупликации ДНК. В среднем на интерфазное ядро млекопитающих приходится около 2 м ДНК, которая локализуется в сферическом ядре со средним диаметром около 10 мкм. Это значит, что такая огромная масса ДНК должна быть уложена с коэффициентом упаковки 10^3 – 10^4 . При этом в ядре должен сохраниться определенный порядок в расположении частично или полностью деконденсированных хромосом. Кроме того, должны быть реализованы условия для упорядоченного функционирования хромосом.

В клеточном ядре ведущая роль в организации расположения ДНК, в ее компактизации и регулировании функциональных нагрузок принадлежит ядерным белкам. Белки в составе хроматина очень разнообразны, но их можно разделить на две группы: гистоны и негистоновые белки. На долю гистонов приходится до 80% всех белков хроматина. Их взаимодействие с ДНК происходит за счет солевых или ионных связей и неспецифично в отношении

состава или последовательностей нуклеотидов в молекуле ДНК. Несмотря на преобладание в общем количестве, гистоны представлены небольшим разнообразием белков: эукариотические клетки содержат всего 5-7 типов молекул гистонов. В отличие от гистонов так называемые негистоновые белки большей частью специфически взаимодействуют с определенными последовательностями молекул ДНК, очень велико разнообразие типов белков, входящих в эту группу (несколько сотен), велико разнообразие функций, которые они выполняют.

Гистоны – обширный класс ядерных белков, выполняющих две основные функции: они участвуют в упаковке нитей ДНК в ядре и в эпигенетической регуляции таких ядерных процессов, как транскрипция, репликация и репарация. Существует пять различных типов гистонов H1/H5, H2A, H2B, H3, H4. Гистоны H2A, H2B, H3, H4, называемые *кóровыми* гистонами (от англ. core – сердцевина), формируют нуклеосому, представляющую собой белковую глобулу, вокруг которой накручена нить ДНК. Гистон H1/H5, называемый линкерным гистоном (от англ. link – связь), связывается с внешней стороной нуклеосомы, фиксируя на ней нить ДНК. В хроматине гистоны составляют 25-40 % сухого веса. Благодаря высокому содержанию лизина и аргинина гистоны проявляют сильно основные свойства. Гистоны непосредственно контактируют с ДНК и способны нейтрализовать отрицательный заряд фосфатных групп ДНК за счёт положительных зарядов аминокислотных остатков. Последовательность аминокислот в этих белках является консервативной и практически не различается в организмах различных таксонов. Гистоны присутствуют в ядрах эукариотических клеток; у бактерий гистонов нет, но они выявлены у архей группы Euryarchaea.

В процессе жизнедеятельности клеток с гистонами происходят модификации. Главными из которых является ацетилирование и метилирование остатков лизина, что приводит к потере положительного заряда. Фосфолирование сериновых остатков, которое приводит к появлению отрицательного заряда. Эти модификации гистонов существенно сказываются на функциях белков и их способностью взаимодействовать с молекулой ДНК. Так, например, повышенное ацетилирование гистонов предшествует активации генов, а фосфолирование или, наоборот, дефосфолирование связано с конденсацией или деконденсацией хроматина.

Все типы гистонов синтезируются в цитоплазме на рибосомах, транспортируются в ядро через поровые комплексы и связываются с ДНК во время ее репликации в S-периоде клеточного цикла. Т.е. синтез гистонов и синтез ДНК синхронизированы.

Включившись в состав хроматина, гистоны становятся очень стабильными, имеют низкую скорость замены и примерно в течение 4 – 5 циклов клетки не выходят из состава.

Функции гистонов: упаковка ДНК; структурная роль в организации хроматина; регуляция уровня транскрипции; определяют степень компактности и активности хроматина.

Нуклеосома – это структурная часть хромосомы, образованная совместной упаковкой нити ДНК с гистоновыми белками H2A, H2B, H3 и H4. Последовательность нуклеосом, соединенная гистоновым белком H1, формирует нуклеофиламент, или иначе нуклеосомную нить.

Вокруг нуклеосомного ядра, представленного гистонным октамером, ДНК делает 1,67 оборота (147 п.н.). Суперспираль ДНК вокруг нуклеосомы левозакрученная, хотя сама спираль ДНК правозакрученная. Участок ДНК между нуклеосомами называется линкерной ДНК и составляет 10-100 п.н.

Сборка нуклеосомы происходит на ДНК. При репликации ДНК материнские гистоны распределяются случайным образом по дочерним цепям. Гистоновые шапероны временно экранируют заряд гистонов, обеспечивая правильную сборку нуклеосомы. Шаперон CAF1 связан с PCNA, сидит в репликационной вилке, связывая «старые» димеры H3H4, начинает пострепликационную сборку нуклеосом с посадки этого димера.

Несмотря на то, что нуклеосома связывает ДНК независимо от последовательности, различные последовательности ДНК могут в 1000 раз отличаться по потенциалу связывать нуклеосому. Если подряд следуют последовательности, изгибающие ДНК в одну сторону (например, ТАТА), связывание нуклеосомы будет неустойчиво.

В геноме присутствуют:

- участки, свободные от нуклеосом (открытый хроматин: сайты связывания транскрипционных факторов, регуляторных белков);
- участки, где положение нуклеосомы строго фиксировано (например, старт транскрипции многих генов);
- участки, в которых нуклеосомная укладка подвержена регуляции белками АТФ-зависимого ремоделинга хроматина.

Таким образом, первый, нуклеосомный, уровень компактизации хроматина играет как регуляторную, так и структурную роль, обеспечивая плотность упаковки ДНК приблизительно в 6-7 раз.

Второй уровень компактизации ДНК – фибрилла диаметром 30 нм. При участии гистона H1 организованная в нуклеосомы ДНК образует фибриллу диаметром 30-нм. Такие фибриллы образуются спонтанно из структур типа «бусинок на нити» при повышении ионной силы (до 60 мМ) либо при добавлении ионов Mg^{2+} до 0,3 мМ. Существуют две принципиально различающиеся модели 30-нм фибриллы. Согласно одной из этих моделей, нуклеосомная нить, содержащая гистон H1, сворачивается в соленоид диаметром 30-нм, в одном витке которого (с шагом в 11 нм) содержится 6 нуклеосом. Согласно данной модели, спейсерная ДНК продолжает суперспираль, возникающую при закручивании ДНК на нуклеосомной глобуле. Другая модель предполагает, что в составе 30-нм фибриллы нуклеосомы организованы в зигзагообразную структуру, параметры которой могут варьировать в известных пределах. Зигзагообразная модель предполагает, что спейсерная ДНК пересекает ось фибриллы. Результаты последних исследований подтверждают зигзагообразную модель организации 30-нм фибриллы. Зигзагообразная фибрилла является существенно более динамичной, чем соленоид. Толщина этой фиб-

риллы, отражающая плотность упаковки нуклеосом, может варьировать при сохранении основного принципа зигзагообразной организации.

Как нуклеосомный, так и нуклеомерный уровни компактизации ДНК хроматина осуществляются за счет гистоновых белков, которые участвуют не только в образовании нуклеосом, но и в их кооперативном объединении в виде фибрилл ДНП, где ДНК претерпевает дополнительную сверхспирализацию. Все остальные уровни компактизации связаны с дальнейшим характером укладки фибрилл диаметром 30 нм в новые компактизационные уровни, где ведущую роль играют негистоновые белки.

Негистоновые белки составляют около 20% всех белков хроматина. Это сборная группа белков, отличающихся друг от друга как по общим свойствам, так и по функциональной значимости. Кроме ферментов, непосредственно связанных с хроматином (ферменты, ответственные за репарацию, редубликацию, транскрипцию и модификации ДНК, ферменты модификации гистонов и других белков), в эту фракцию входит множество других белков. Весьма вероятно, что часть негистоновых белков представляет собой специфические белки - регуляторы, узнающие определенные нуклеотидные последовательности в ДНК.

Петлевые домены ДНК – третий уровень структурной организации хроматина – хромомерный. В высших уровнях организации хроматина специфические белки связываются с особыми участками ДНК, которая в местах связывания образует большие петли, или домены. В некоторых местах есть сгустки конденсированного хроматина, розетковидные образования, состоящие из многих петель 30 нм-фибрилл, соединяющихся в плотном центре. Средний размер розеток достигает 100-150 нм. Розетки фибрилл хроматина – хромомеры. Каждый хромомер состоит из нескольких содержащих нуклеосомы петель, которые связаны в одном центре. Хромомеры связаны друг с другом участками нуклеосомного хроматина. Такая петельно-доменная структура хроматина обеспечивает структурную компактизацию хроматина и организует функциональные единицы хромосом – репликоны и транскрибируемые гены.

3 Ядерный белковый матрикс.

В интерфазном ядре развернутые хромосомы располагаются не хаотично, а строго упорядоченно. Такая организация хромосомы в трехмерном пространстве ядра необходима не только для того, чтобы при митозе происходила сегрегация хромосом и их обособление от соседей, но и для упорядочения процессов репликации и транскрипции хроматина. Вероятно, для осуществления этих задач должна существовать какая-то каркасная внутриядерная система, которая может служить объединяющей основой для всех ядерных компонентов: хроматина, ядрышка, ядерной оболочки. Такой структурой является белковый ядерный остов, или матрикс. Необходимо сразу же оговориться, что ядерный матрикс не представляет собой четкой морфологической структуры; он выявляется как отдельный морфологический гетерогенный компонент при экстракции из ядер практически всех участков хроматина, ос-

новой массы РНК и липопротеидов ядерной оболочки. От ядра, которое не теряет при этом своей общей морфологии, являясь сферической структурой, остается как бы каркас, остов, который иногда называют еще «ядерным скелетом».

Ядерный матрикс состоит, по крайней мере, из трех компонентов: периферического белкового сетчатого (фиброзного) слоя – ламины (nuclear lamina, fibrous lamina), внутренней, или интерхроматиновой, сети (остов) и «остаточного» ядрышка.

Ламина представляет собой тонкий фиброзный слой, подстилающий внутреннюю мембрану ядерной оболочки. В ее состав входят также комплексы ядерных пор, которые как бы вмурованы в фиброзный слой. Часто эту часть ядерного матрикса называют фракцией «поровый комплекс–ламина» (PCL: pore complex–lamina). В интактных клетках и ядрах ламина большей частью морфологически не выявляется, так как к ней тесно прилегает слой периферического хроматина. Лишь иногда ее удается наблюдать в виде относительно тонкого (10-20 нм) фиброзного слоя, располагающегося между внутренней мембраной ядерной оболочки и периферическим слоем хроматина. Структурная роль ламины очень велика: она образует сплошной фиброзный белковый слой по периферии ядра, достаточный для того, чтобы поддерживать морфологическую целостность ядра.

Внутриядерный остов, или сеть, морфологически выявляется только после экстракции хроматина. Он представлен рыхлой фиброзной сетью, располагающейся между участками хроматина, часто в состав этой губчатой сети входят различные гранулы РНП-природы.

Наконец, третий компонент ядерного матрикса – «остаточное» ядрышко – плотная структура, повторяющая по своей форме ядрышко, также состоит из плотно уложенных фибрилл.

Морфологическая выраженность этих трех компонентов ядерного матрикса, так же как и количество во фракциях, зависит от целого ряда условий обработки ядер.

Компоненты ядерного матрикса представляют собой не застывшие жесткие структуры, а компоненты, обладающие динамической подвижностью, которые могут меняться не только в зависимости от условий их выделения, но и от функциональных особенностей нативных ядер.

Молекулярная характеристика белков внутриядерного остова детально еще не разработана. Показано, что в его состав входит ряд белков, принимающих участие в доменной организации ДНК в интерфазном ядре при создании розетковидной, хромомерной формы упаковки хроматина. Предположение относительно того, что элементы внутреннего матрикса представляют собой сердцевины розеточных структур хромомеров, находит подтверждение в том, что полипептидный состав матрикса интерфазных ядер (за исключением белков ламины) и остаточных структур метафазных хромосом (осевые структуры, или скэффолд) практически одинаковы. В обоих случаях эти белки отвечают за поддержание петлевой организации ДНК.

Петли ДНК, которые связаны с ядерным матриксом, являются обособленными топологическими доменами. Показано, что в ядрах имеется от 60 000 до 125 000 участков ДНК, защищённых от нуклеаз и расположенных на всех трёх компонентах ядерного матрикса. Для образования участков прикрепления петель ДНК к ядерному матриксу важны MAR-элементы (SAR, S/MAR) – элементы генома, которые специфически связываются с изолированным ядерным матриксом в условиях *in vitro*. В состав этих элементов входит ДНК длиной около 200 пар оснований, и они располагаются на расстоянии от 5 до 112 000 п. н. друг от друга.

Места расположения элементов MAR очень сходны с сайтами связывания ДНК с топоизомеразой II, задействованной в образовании петель хроматина. Показано, что ядерный матрикс связан с репликацией ДНК: более 70 % новосинтезированной ДНК локализуется в зоне внутреннего ядерного матрикса. Фракция ДНК, связанная с ядерным матриксом, обогащена репликативными вилками. Кроме того, в составе ядерного матрикса обнаружена ДНК-полимераза α и другие ферменты, участвующие в репликации ДНК.

В состав ядерного матрикса входит около 1% РНК, включающей в себя как гетерогенную высокомолекулярную РНК, так и рибосомную РНК и РНК ядерных малых РНП. На возможность связи элементов матрикса с процессами транскрипции указывали данные о том, что при коротком мечении матрикс обогащался быстро меченной гетерогенной РНК. Обнаружено, что в состав белков внутреннего ядерного матрикса входит РНК-полимераза II, ответственная за синтез информационных РНК. С ядерным матриксом клеток яйцеводов кур оказалась связанной большая часть (95%) новосинтезированных пре-мРНК овальбумина и пре-рРНК. Эти наблюдения привели к заключению, что ядерный матрикс может выполнять структурную роль в синтезе, процессинге и транспорте РНК в ядре.

С ядерным матриксом связаны собственно транскрибирующиеся гены. Транскрипционные комплексы закреплены на ядерном матриксе, а сама транскрипция осуществляется одновременно с перемещением матричной ДНК относительно закрепленных транскрипционных комплексов, содержащих РНК-полимеразу II. Кроме тРНК и ее предшественников в составе ядерного белкового матрикса обнаруживаются малые ядерные рибонуклеопротеиды (мяРНП), которые участвуют в созревании информационных РНК, в процессе сплайсинга. Эти РНК-содержащие частицы, иногда называемые сплайсосомами, собраны в группы, или кластеры, связанные с белками ядерного матрикса.

Элементы ядерного матрикса могут прямо участвовать в регуляции транскрипции. Так, участки MAR обычно связаны с такими регуляторными последовательностями на ДНК, как энхансеры и сайленсеры, определяющими интенсивность транскрипционных процессов. На ядерном матриксе локализованы белки-рецепторы для ряда стероидных гормонов.

Относительно связи ДНК с элементами ядерного матрикса на сегодня сложились представления о том, что эта связь может отражать различные функциональные особенности. Например, связь ДНК с ламиной может отра-

жать структурную, постоянную ассоциацию ДНК, а связь с внутренними элементами - функциональную, связанную как с синтезом ДНК, так и РНК.

Поведение белков ядерного матрикса во время митоза изучено еще недостаточно. При митозе компоненты ламины разбираются, частично переходя в цитоплазму, частично (ламин В) оставаясь в связи с мембранами. Относительно компонентов внутриядерного матрикса сведений меньше: известно, что часть этих белков входит в состав матрикса (скэффолда) митотических хромосом.

4 Хромонемный уровень упаковки хроматина.

Исследуя структурную организацию хроматина и хромосом, можно определенно говорить о нескольких уровнях компактизации ДНК. Первый – нуклеосомный, дающий семикратное уплотнение ДНК и составе фибрилл ДНП, второй – фибрилла диаметром 30 нм, или нуклеомерный уровень, с 40-70-кратной степенью упаковки, третий – доменно-петлевой, или хромомерный, приводящий к 600-700-кратному уплотнению ДНК в составе этих структур. Для поддержания первых двух уровней компактизации было достаточно участия только гистоновых белков, тогда как петлевые и розеткоподобные доменные структуры уже требовали участия негистоновых белков и перехода от спирального, или соленоидного, типа укладки ДНК к образованию компактных глобулярных структур, состоящих из петель хроматиновых фибрилл диаметром 30 нм, к структурам типа хромомеров, имеющих уже размеры 0,1-0,2 мкм.

Однако еще в классических работах цитологов начала XX века как в интерфазных ядрах, так и, особенно, в митотических хромосомах описывались нитчатые структуры – хромонемы, имеющие толщину 0,1-0,2 мкм. Их удавалось наблюдать как на фиксированных объектах, так и в живых клетках. Подробные исследования ультраструктуры митотических хромосом на разных этапах митоза с помощью электронной микроскопии полностью подтвердили наличие этого четвертого уровня компактизации хроматина.

При изучении ультраструктурных основ строения митотических хромосом необходимо учитывать хромонемный уровень компактизации хроматина. Хромонему – нитчатую хроматиновую структуру со средней толщиной 0,1-0,2 мкм удастся проследить в естественных условиях на разных стадиях начальной конденсации хромосом в профазе митоза и при деконденсации хромосом в телофазе. Причем такие хромонемы выявляются как в клетках растений, так и животных.

Согласно современным представлениям, хромонема является одним из высших уровней компактизации хроматина, представляя собой фибриллярное образование диаметром около 0,1-0,3 мкм. Эта структура содержит несколько более низких уровней компактизации дезоксинуклеопротеида, таких как нуклеосомный уровень, фибриллы толщиной 30 нм, петлевые домены и так далее. Хромонемный уровень конденсации дезоксинуклеопротеида встречается в хромосомах животных и растений. Хромонемный уровень компактизации в естественных условиях может быть обнаружен в профазе и

телофазе митоза. В настоящее время вопрос о способе укладки хромонемы в составе митотической хромосомы остаётся нерешённым.

Как интерфазные, так митотические хромосомы состоят из элементарных хромосомных фибрилл – молекул ДНП (дезоксирибонуклеопротеида). На каждую хромосому приходится одна гигантская фибрилла ДНП, сложно уложенная в относительно короткое тельце – собственно митотическую хромосому. В митотической хромосоме существуют боковые петли молекулы дезоксирибонуклеопротеида. Боковые петли хромосом в вытянутом состоянии могут достигать 30 мкм. При их компактизации (спирализации) образуются структуры промежуточного характера – так называемые хромонемные фибриллы. Взаимодействие этих компонентов хромосом друг с другом и их взаимная агрегация приводят к конечной компактизации хроматина в виде митотической хромосомы.

Тема 2 Ядерные транскрипты и их транспорт

- 1 Ядрышко – источник рибосом.
- 2 Нерибосомные продукты клеточного ядра.
- 3 Ядерная оболочка

1 Ядрышко – источник рибосом.

Ядрышко – немембранный внутриядерный субкомпартмент, присущий всем без исключения эукариотическим организмам. Представляет собой комплекс белков и рибонуклеопротеидов, формирующийся вокруг участков ДНК, которые содержат гены рРНК – ядрышковых организаторов. Основная функция ядрышка – образование рибосомных субъединиц.

Ядрышко – наиболее заметная видимая структура ядра, имеющаяся у всех эукариотических организмов. Ядрышко – наиболее плотная структура эукариотической клетки. Плотность ядрышка обусловлена высоким содержанием белка (до 70-80 % сухой массы). Кроме белка, ядрышко содержит 5-14 % РНК и 2-12 % ДНК.

В ядрышке выделяют три основных структурных компонента, соответствующих разным этапам биогенеза рибосом: фибриллярный центр (ФЦ), плотный фибриллярный компонент (ПФК) и гранулярный компонент (ГК). В начале митоза происходит разборка ядрышек, а по окончании митоза они собираются снова.

Фибриллярные центры сформированы фибриллами диаметром около 5 нм; они частично окружены плотно упакованными фибриллами, образующими плотный фибриллярный компонент. Гранулярный компонент состоит из гранул диаметром 15-20 нм. В ядрах фибробластов человека на долю плотного фибриллярного компонента приходится 15 % объёма ядрышка, а на долю гранулярного компонента – 75 %. В ядрышках высших растений доля ПФК значительно выше. В ядрышках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* обнаруживаются только ПФК и ГК. Было высказано предположение, что эволюция

ФЦ, ПФК и ГК начиналась с двухчастной системы, в которой компоненты ФЦ и ПФК были перемешаны.

У дрожжей *S. cerevisiae* ядрышко интенсивно контактирует с ядерной оболочкой. У высших эукариот ядрышки располагаются на ядерной оболочке или рядом с ней. В клетках HeLa впячивания ядерной оболочки образуют несколько ядрышковых каналов, которые непосредственно контактируют с ядрышком, расположенным в центре ядра. Функции этих каналов неизвестны. Ядрышки также взаимодействуют с ядерной ламиной, и ламины участвуют в организации хроматина. Было показано, что ламин B1 поддерживает функциональную пластичность ядрышек и участвует в структурной реорганизации ядра и ядрышек после митоза.

Хроматин обнаруживается в нескольких зонах ядрышка. Конденсированный хроматин находится на периферии ядрышка, а также в гранулярном компоненте, а неконденсированный хроматин — в плотном фибриллярном компоненте и фибриллярных центрах. Предполагается, что филаменты ДНК, обнаруживаемые в фибриллярных центрах, соответствуют рДНК (ядрышковым организаторам). Ядрышко вставляет специфические белки (такие, как антиген склеродермы Nor90 в области ядрышковых организаторов) в хроматин в области границы ядрышка, чтобы отделить себя от остального ядра, поэтому ядрышко нередко оказывается окружённым гетерохроматином. У растений обнаружены домены хроматина, ассоциированные с ядрышком.

На периферии ядрышка находится околядрышковый компартмент — динамичная структура, содержащая большое количество РНК-связывающих белков, а также РНК-полимеразу III.

Всякое ядрышко образуется вокруг специальных последовательностей ДНК — ядрышковых организаторов. Ядрышковые организаторы представляют собой гены рДНК, собранные в ряды из tandemных повторов и разделённые спейсерами. Ядрышковые организаторы и ФЦ состоят из плотно ассоциированных фибрилл толщиной от 6 до 10 нм, оба содержат РНК-полимеразу I и характеризуются уникальной чертой — способностью окрашиваться солями серебра (аргиофильностью). В электронный микроскоп гены рРНК видны как образующие структуры типа «ёлочек», в которых боковые изогнутые нити представляют собой транскрипты пре-рРНК, а сидящие в ответвлении гранулы являются молекулами РНК-полимеразы I.

Количество ядрышек в ядре клетки определяется её стадией развития или дифференцировки, а их размер зависит от уровня синтеза рибосом. При этом максимальное количество ядрышек в клетке определяется количеством ядрышковых организаторов, кроме того, ядрышек всегда больше в крупных полиплоидных ядрах. Так, у шпорцевой лягушки имеется две хромосомы, несущие ядрышковые организаторы, и, следовательно, обычно 1-2 ядрышка.

В делящихся клетках, активно синтезирующих рибосомы, размер ядрышек варьирует от 0,5 до 7 мкм в диаметре. У большинства раковых клеток ядрышко крупнее, чем у нормальных клеток той ткани и органа, откуда они произошли. В случае клеток агрессивной формы рака молочной железы наблюдается увеличение размеров ядрышка на 30 % по мере развития опухо-

ли. В дифференцировавшихся клетках образование рибосом снижается или прекращается вовсе (например, в эритроцитах и лимфоцитах), и размер их ядрышек уменьшается до 0,1-0,3 мкм.

Степень выраженности ГК и ПФК, а также прочие структурные особенности позволяют выделить несколько структурных типов ядрышек: ретикулярный (нуклеолонемный), компактный, кольцевидный, остаточный (покоющийся) и сегрегированный.

Ядрышки ретикулярного типа присущи большинству клеток, как животных, так и растительных. Такие ядрышки имеют нуклеолонемное строение, хорошо развиты ПФК и ГК, но часто ФЦ выражены плохо из-за активной транскрипции.

Компактный тип ядрышка отличается от ретикулярного меньшей выраженностью нуклеолонемного строения и большей частотой встречаемости ФЦ. Компактные ядрышки встречаются в активно делящихся клетках, например, клетках растительных меристем и клетках культуры ткани. По-видимому, компактный и ретикулярный типы могут переходить друг в друга.

Кольцевидный тип встречается в животных клетках. Ядрышки этого типа в световой микроскоп выглядят как кольцо с оптически светлой центральной зоной, которая является фибриллярным центром, окружёнными фибриллами и гранулами. Типичные кольцевидные ядрышки имеются у клеток с низким уровнем транскрипции, таких как лимфоциты и эндотелиоциты.

Остаточные ядрышки присущи клеткам, полностью утратившим способность к синтезу рРНК: нормобластам, дифференцированным энтероцитам, клеткам шиповатого слоя кожного эпителия и другим. Часто они с трудом различимы в световой микроскоп из-за малых размеров и окружённости конденсированным хроматином. Иногда они могут активироваться и принимать активную ретикулярную или компактную форму.

Сегрегированный тип ядрышек встречается у клеток, у которых синтез рРНК прекращён под действием антибиотиков, например, актиномицина Д и амфотерицина, и других химических веществ, или же повреждён синтез ДНК и белков под действием митомицина, пуромицина и многих канцерогенов. Разные компоненты ядрышка обособляются друг от друга, но объём ядрышка прогрессивно уменьшается.

В ходе клеточного цикла разборка ядрышек происходит в профазе, а их сборка начинается в телофазе. Белковые комплексы и рибонуклеопротеиды, оставшиеся от ядрышек, разобранных в профазе, используются для сборки ядрышек в дочерних клетках.

Образование рибосом начинается с транскрипции генов рДНК РНК-полимеразой I. Именно синтез рРНК определяет способности клетки к росту и пролиферации, и почти все клеточные пути, влияющие на них, непосредственно регулируют синтез рРНК. По мере того, как первая молекула РНК-полимеразы проходит одну транскрипционную единицу генов рРНК, на освобождающийся участок садится следующая РНК-полимераза и синтезирует новую РНК. Конечным продуктом является пре-рРНК 45S. По мере синтеза пре-рРНК окутывается рибосомными белками, которые поступают в яд-

ро из цитоплазмы. Именно продуктами транскрипции рРНК образована зона ПФК вокруг ФЦ. После отделения 45S рРНК она расщепляется на более мелкие молекулы, которые дают начало рибосомным субъединицам 40S и 60S. Малые субъединицы синтезируются в ядрышке примерно за 30 минут, а синтез больших субъединиц занимает около часа. Незрелая субъединица 60S соединяется в ядрышке с третьей (помимо 28S и 5,8S) молекулой рРНК – 5S рРНК. Новообразованные субъединицы выходят из ядра в цитоплазму через ядерные поры. Полная рибосома 80S образуется после того, как малая субъединица свяжется с мРНК и потом с большой субъединицей.

Образование рибосом – один из наиболее энергозатратных процессов, протекающих в эукариотической клетке, и оно сильно связано с клеточным циклом и клеточной пролиферацией. Показано, что активация образования рибосом вызывает быстрый рост клетки и деление. Многие белковые факторы, регулирующие образование рибосом, также непосредственно участвуют в некоторых стадиях клеточного цикла и у дрожжей, и у млекопитающих. Механизмы, контролирующие биогенез рибосом, также работают в ходе фазы G1 клеточного цикла и сообщаются с белками, осуществляющими переход из фазы G1 в S-фазу, в результате клетка может вступить в деление или же не делиться в зависимости от интенсивности процесса образования рибосом.

2 Нерибосомные продукты клеточного ядра.

Информационные РНК образуются при участии РНК-полимеразы II, начинающей синтез со стартовой точки транскрипционной единицы и кончающей его в точке терминции. При этом образуется одна молекула РНК – транскрипт, предшественник информационной РНК. Размер транскрипционных единиц разных генов может значительно варьировать от 6 тыс. до 200 тыс. нуклеотидов. Поэтому суммарная фракция РНК, синтезированная на разных генах, содержит молекулы различной длины. Эта первично синтезированная РНК, или так называемая гетерогенная ядерная РНК (гяРНК), встречается только в ядре и не обнаруживается в цитоплазме. В цитоплазму попадает уже информационная РНК, образуемая в результате изменений в ядре первичных транскриптов РНК (гяРНК).

Величина гяРНК в несколько раз больше той, которая требуется для синтеза белков: для синтеза «среднего белка», состоящего из 400 аминокислот, необходима матричная РНК в 1200 нуклеотидов. На самом деле величины информационных РНК в составе синтезирующих белок полисом в несколько раз короче первичных транскриптов. Это укорочение является результатом «созревания» гяРНК-процессинга, но иного характера, чем процессинг рибосомных РНК. Структура гена эукариот оказалась состоящей из чередующихся последовательностей нуклеотидов – экзонов и интронов. **Экзоны** – участки ДНК, которые обладают кодирующей информацией и входят в состав информационных РНК, а **интроны** содержат последовательности, не входящие в информационную РНК. Первичный транскрипт РНК содержит полную копию гена, включает в себя все последовательности, как

экзоны, так и интроны. Интроны впоследствии вырезаются из первичного транскрипта, концы же фрагментов РНК сшиваются ковалентно, что приводит к общему укорачиванию образовавшейся молекулы информационной РНК. Этот процесс получил название сплайсинга. Так как большинство генов млекопитающих содержит большее число интронов, чем экзонов, процесс сплайсинга РНК приводит к тому, что очень длинные молекулы гяРНК (первичных транскриптов, содержащих более чем 50 000 нуклеотидов) укорачиваются до длины цитоплазматических иРНК (обычно от 500 до 3000 нуклеотидов длиной).

По мере синтеза и роста гяРНК она связывается с рядом ядерных белков, образуя гяРНК-частицы (гетерогенные ядерные рибонуклеопротеиновые частицы). При этом высокомолекулярная гяРНК в ядрах наматывается на глобулярные белковые частицы – информомеры. На каждый информомер приходится отрезок РНК длиной около 500—600 нуклеотидов. Такой комплекс информомера и РНК образует мономер или 30S частицу. В состав каждого информомера входит более 30 белковых молекул информатина. Таким образом, первичный транскрипт структурного гена, отвечающего за образование информационной РНК, представляет собой гигантскую молекулу гяРНК, связанную со множеством белковых частиц – информомеров. Считается, что участки гяРНК между информомерами могут быть использованы для сплайсинга с помощью специальных белковых комплексов – сплайсосом. В состав сплайсосом входят 5-7 малых ядерных рибонуклеопротеидов (мяРНК, или snRNP – small nuclear ribonucleoprotein). Эти особые малые ядерные РНК (мяРНК) представляют собой РНК-частицы (U1, U2, U5, U4, U6 snRNP) с константой седиментации около 10S. В каждой частице содержится одна малая молекула РНК (90-400 нуклеотидов) и около семи молекул белка. Так что сплайсосома представляет собой крупный рибонуклеопротеидный комплекс величиной, сравнимой с рибосомой (константа седиментации около 60S).

При синтезе гяРНК и после него сплайсосомы связываются с цепью РНК в местах на границе между экзонами и интронами, специфически узнавая эти места, производят разрыв в основании петли интрона и сшивают свободные концы. Таким способом участки интронных последовательностей вычлняются из состава первичного транскрипта, а затем быстро деградируют в ядре. В результате этого процесса длина результирующей молекулы РНК может укорачиваться в несколько раз.

Считается, что после созревания иРНК при переходе из ядра в цитоплазму теряет белки, входящие в состав информомера, «переодевается» в ядерной поре, а белки информомера остаются в ядре. В цитоплазме иРНК снова одеваются новыми белками, образуя «информосомы» – форму хранения иРНК в неактивном состоянии, или связываются с белками, необходимыми для трансляции.

Используя метод избирательного контрастирования солями урана структур, содержащих РНК, удастся выделить ряд компонентов, которые можно отнести к неядрышковым продуктам транскрипции. Это – перихрома-

тиновые фибриллы, перихроматиновые гранулы и интерхроматиновые гранулы.

Перихроматиновые фибриллы обнаруживаются по периферии участков конденсированного хроматина (около мембранного или любого другого). Они имеют толщину около 3-5 нм, часто образуют рыхлую неправильную сеть. Оказалось, что этот компонент ядра сильно изменяется при стимуляции синтеза РНК.

Другой тип РНК-содержащих структур интерфазного ядра – **перихроматиновые гранулы**. Они имеют диаметр около 45 нм и окружены светлым ореолом. Эти гранулы встречаются только на периферии конденсированного хроматина, в диффузном хроматине их нет. Считается, что между этими гранулами и перихроматинизированными фибриллами существует структурная связь.

Интерхроматиновые гранулы – третий тип РНК-содержащих структур. Они имеют размер 20-25 нм и группируются всегда в форме скоплений между участками хроматина. Эти гранулы не стандартны по величине и переплетены тонкими фибриллами.

В таком случае всю картину динамики синтеза гРНК можно представить следующим образом. Деконденсирующиеся участки хроматина (эухроматин) по периферии конденсированных зон хроматина, связываясь с РНК-полимеразой II, транскрибируют гРНК в виде начальных перихроматинизированных фибрилл, объединяющиеся с белками информофер, которые затем, подвергаясь созреванию с участием сплайсосом (интерхроматиновых гранул), дают начало зрелым формам иРНК – комплексам информофер, или перихроматиновым гранулам. Вероятно, не все зрелые иРНК могут переходить в крупные (45-60 нм) перихроматиновые гранулы, а последние, вероятно, характерны для РНК с высокой молекулярной массой.

3 Ядерная оболочка.

Ядерная оболочка состоит из двух мембран (наружной и внутренней), которые расположены параллельно на расстоянии от 10 до 50 нм. Ядерная оболочка полностью окружает ядро, отделяя генетический материал клетки от цитоплазмы и служа барьером, предотвращающим свободную диффузию макромолекул между нуклеоплазмой и цитоплазмой. Наружная ядерная мембрана продолжается в мембрану шероховатого эндоплазматического ретикула (ЭПР) и покрыта рибосомами. Промежуток между ядерными мембранами называется перинуклеарным пространством и продолжается в люмен ЭПР.

Ядерные поры, представляющие собой заполненные водой каналы в ядерной оболочке, состоят из множества белков, называемых нуклеопоринами. У человека масса пор составляет около 120 000 кДа, что в 40 раз больше массы рибосомы; при этом у дрожжей в состав ядерных пор входит около 50 белков, а у позвоночных – несколько сотен. Хотя диаметр пор составляет 100 нм, ширина щели, через которую могут проходить молекулы, из-за наличия внутри пор регуляторных систем составляет всего 9 нм. В такую щель могут

проходить водорастворимые малые молекулы, но не крупные молекулы – такие, как нуклеиновые кислоты и большие белки; для переноса этих молекул в ядро необходим активный (то есть энергозатратный) транспорт. На оболочке ядра типичной клетки млекопитающего располагается от 3000 до 4000 пор, и у каждой в месте слияния двух ядерных мембран находится кольцевая структура, имеющая 8 осей симметрии. К кольцу прикрепляется особая структура, известная как ядерная корзина, которая выдаётся в нуклеоплазму, а несколько её филаментов выдаются в цитоплазму. Обе структуры необходимы для опосредования связывания транспортных ядерных белков.

Большинство белков, субъединицы рибосом и некоторые ДНК переносятся через ядерные поры посредством семейства транспортных факторов, известных как кариоферины. Кариоферины, опосредующие транспорт в ядро, также называются импортинами, а опосредующие транспорт из ядра – экспортинами. Большинство кариоферинов непосредственно взаимодействуют со своим грузом, но некоторые используют для этого адаптерные белки. Стероидные гормоны (такие, как кортизол и альдостерон), а также другие жирорастворимые малые молекулы могут диффундировать в цитоплазму внутрь клетки через клеточную мембрану; в цитоплазме они связываются с белковыми ядерными рецепторами, которые доставляют их в ядро. Здесь ядерные рецепторы, связанные со своими лигандами, функционируют как транскрипционные факторы, а в отсутствие лиганда многие рецепторы функционируют как гистондеацетилазы, подавляющие экспрессию некоторых генов.

РАЗДЕЛ 2 КЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАНЫ

Тема 3 Состав и свойства биологических мембран

- 1 Структура биомембран.
- 2 Биологические функции мембран.
- 3 Барьерно-транспортная роль плазмалеммы.

1 Структура биомембран.

Как известно, в клетке много разных мембран – плазмалемма; внутренняя и наружная мембраны ядерной оболочки, внутренняя и наружная мембраны митохондрий; мембраны ЭПС (эндоплазматической сети), лизосом, пероксисом и прочих мембранных структур. Между этими мембранами существуют определенные различия, но имеется и немало общего. Самое главное – то, что все они построены по одному и тому же принципу.

В основе биомембраны находится двойной слой амфифильных липидов (или липидный бислой). Конкретно, практически каждая молекула мембранного липида имеет гидрофильную «головку» и два гидрофобных «хвоста». Каждый из последних представляет собой длинную углеводородную цепь, причем обычно одна из этих цепей предельная (т.е. не содержит двойных связей), а вторая непредельная (имеет одну или более двойных связей).

Липиды клеточных структур эукариотических клеток представлены 3 основными группами: фосфолипиды, гликолипиды и стероиды. Фосфолипиды подразделяются на 2 группы: глицерофосфолипиды (производные фосфатидной кислоты – фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит) и сфингофосфолипиды (производные церамида, сфингомиелины). Гликолипиды клеточных мембран – гликозильные производные церамида, представлены цереброзидами, сульфатидами и ганглиозидами. В них гидрофобная часть представлена церамидом. Гидрофильная группа – углеводный остаток, присоединенный гликозидной связью к гидроксильной группе у первого углеродного атома церамида. Стероиды – спирты со стерановым скелетом, к которым относятся как немембранные липиды (из них наиболее важны гормоны), так и компоненты мембран. В перечень мембранных компонентов стероидного ряда входят холестерин, ситостерин, тетрахименин. В тканях животных распространен холестерин. В растительных клетках холестерин не обнаружен, его заменяют фитостерины. У бактерий стероиды отсутствуют. Холестерин и его эфиры – неперенные составляющие плазматических мембран клеток животных. При этом холестерин легче встраивается в мембрану, чем его эфиры. Молекула холестерина не содержит длинных прямых цепочек, а состоит из четырех колец; крайнее шестичленное кольцо соединено с полярной гидроксильной группой (ОН), а наиболее отдаленное от него пятичленное кольцо – с разветвленной углеводородной цепочкой из восьми атомов углерода. В водной среде такие амфи-

фильные молекулы самопроизвольно образуют бислой, в котором гидрофобные части молекул ориентированы друг к другу, а гидрофильные – к воде.

Клеточные мембраны замкнуты, они имеют внутреннюю и внешнюю поверхности, различающиеся по липидному и белковому составу – эту особенность мембран называют трансмембранной асимметрией. Характерная особенность биологических мембран – различный состав липидов по обе стороны бислоя. Известно несколько механизмов, обеспечивающих асимметричное распределение фосфолипидов в мембране. Один из них связан с термодинамической вероятностью распределения липидов в соответствии со стереоконфигурацией их молекул. Асимметрия липидов возникает, прежде всего, потому, что в случае замкнутого мембранного бислоя липиды с более объемными полярными «головками» стремятся находиться в наружном монослое, так как там площадь поверхности, приходящаяся на полярную «головку», больше. По этой причине фосфатидилхолины и сфингомиелины локализованы преимущественно в наружном монослое, а фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин, в основном, во внутреннем. Это, соответственно, приводит к различиям в заряде фосфолипидов и различной гидратации их полярных «голов» по обе стороны бислоя.

Второй механизм реализуется за счет различий в составе среды по обе стороны бислоя в условиях нативной клетки. С внеклеточной стороны мембрану омывает среда с высоким содержанием натрия и кальция, а со стороны цитоплазмы мембрана контактирует с магнием и калием. Различия ионного состава вне- и внутриклеточной среды вносят вклад в создание и поддержание изгибов, то есть в асимметрию бислоя. Именно этот фактор обеспечивает создание градиента кривизны, складок, сморщиваний, отшнуровку частей биологической мембраны в виде везикул.

Молекулы фосфолипидов способны к нескольким видам подвижности в бислое: 1) изменение ориентации полярных голов, 2) латеральное движение, 3) колебания ацильных цепей, 4) образование кинков и их перемещение вдоль ацильных цепей (в поперечном направлении), 5) ротационная подвижность (вращение вокруг длинной оси), 6) переход с одной стороны бислоя на другую (по типу флип-флоп), 7) выход из бислоя.

Кроме того, в состав мембран входят белки. При этом т.н. интегральные белки глубоко встроены в мембрану, насквозь пронизывая липидный бислой. А периферические белки лишь связаны с одной из поверхностей мембраны. Контакт белков с липидами бислоя происходит по тому же принципу: с гидрофобными частями липидов взаимодействуют неполярные (гидрофобные) радикалы аминокислот, а с гидрофильными «головками» – полярные и заряженные радикалы.

В водной среде различные структуры, образуемые фосфолипидами ведут себя как жидкие кристаллы, то есть анизотропные жидкости, обладающие признаками упорядоченности. Таким структурам присущи лиотропный мезоморфизм (зависимость структуры от гидратации) и термотропный мезоморфизм (зависимость структуры от температуры). Представления о лиотропном и термотропном мезоморфизме как свойствах мембран связаны

между собой. Фазовые переходы липидов, осуществляющиеся по типу «гель – жидкий кристалл», происходят при температуре ($T_{кр}$), величина которой зависит от содержания воды в системе. $T_{кр}$ достигает минимума, как только общее содержание воды превышает то количество, которое могут связывать липидные структуры.

Микровязкость и фазовые переходы липидов определяют функциональную динамичность мембраны. Совершенно очевидно, что липидный состав различных мембран не является случайным, однако удовлетворительного объяснения этому феномену не найдено. Клеточная мембрана может содержать более 100 разных типов липидных молекул. Почему их так много и почему каждая мембрана имеет уникальный липидный состав, пока неясно. Но становится все более очевидным, что липиды активно участвуют в процессах, протекающих в мембранах. Рассмотрим некоторые факторы, возможно, предопределяющие липидный состав мембраны.

1. Смесь липидов обязательно должна быть способна образовать стабильный бислой, в котором могли бы функционировать белки.

2. Некоторые липиды способствуют стабилизации сильно искривленных участков мембраны, образованию контакта между мембранами или связыванию определенных белков, поскольку форма этих молекул благоприятствует нужной упаковке бислоя на соответствующих участках мембраны.

3. Некоторые липиды являются важными биорегуляторами. Наиболее изучена в этом отношении регуляторная роль производных фосфатидилинозитола в плазматических мембранах клеток эукариот. Некоторые мембранные липиды являются предшественниками вторичных посредников при передаче гормонального сигнала.

4. Некоторые липиды участвуют в реакциях биосинтеза.

5. Отдельные липиды необходимы для поддержания оптимальной активности ряда ферментов. Они формируют среду для функционирования мембранных белков, способных принимать нативную конформацию лишь в гидрофобном окружении.

6. Ганглиозиды (гликолипиды), как полагают, играют важную роль в регуляции роста клеток, являются специфическими рецепторами в плазматической мембране и ответственны за клеточную адгезию.

7. Некоторые липиды выполняют «якорную» функцию, например, к молекуле фосфатидилинозитола через олигосахарид могут присоединяться специфические белки наружной поверхности клетки – образуется фосфатидилинозитолгликан.

8. Липиды могут быть аллостерическими активаторами мембранных ферментов.

К мембранным белкам относятся белки, которые встроены в клеточную мембрану или мембрану клеточной органеллы или ассоциированы с таковой. Около 25 % всех белков являются мембранными.

Мембранные белки могут быть классифицированы по топологическому или биохимическому принципу. Топологическая классификация основана на том, сколько раз белок пересекает липидный бислой. В соответствии с этим

критерием белки подразделяются на монотопические, битопические и политопические:

- монотопические белки взаимодействуют с одной поверхностью мембраны и не пересекают ее;
- битопические пронизывают мембрану насквозь и взаимодействуют с обеими ее поверхностями;
- политопические пронизывают мембрану несколько раз (многократное взаимодействие с липидами).

Понятно, что первые относятся к периферическим белкам, а вторые и третьи к интегральным.

По биохимической классификации мембранные белки делятся на интегральные и периферические.

Интегральные мембранные белки прочно встроены в мембрану и могут быть извлечены из липидного окружения только с помощью детергентов или неполярных растворителей. По отношению к липидному бислою интегральные белки могут быть трансмембранными политопическими или интегральными монотопическими.

Периферические мембранные белки являются монотопическими белками. Они либо связаны слабыми связями с липидной мембраной, либо ассоциируют с интегральными белками за счет гидрофобных, электростатических или других нековалентных сил. Таким образом, в отличие от интегральных белков они диссоциируют от мембраны при обработке соответствующим водным раствором (например, с низким или высоким рН, с высокой концентрацией соли или под действием хаотропного агента). Эта диссоциация не требует разрушения мембраны.

Мембранные белки могут быть встроены в мембрану за счет жирнокислотных или пренильных остатков либо гликозилфосфатидилинозитола, присоединенных к белку в процессе их посттрансляционной модификации.

Белок-липидные взаимодействия. Анализ белок-липидных взаимодействий в мембране позволяет выделить контакты 4 основных типов.

1 тип: наиболее часто распространен случай, когда внедряющийся в бислой белок вызывает локальное возрастание упорядоченности части липидной массы (создание аннулярного слоя). Так действуют бактериородопсин, грамицидин (пептидный ионофор, увеличивающий проницаемость мембран для ионов) и многие другие интегральные мембранные белки.

2 тип: периферические белки, не проникающие на всю глубину бислоя, вызывают эластическую деформацию одной его стороны. Такое влияние на физико-химические параметры бислоя характеризуется определенным дальностью действия. Именно им определяется облегчение взаимодействия мембранных рецепторов с инсулином и другими гормонами.

3 тип: в результате ярко выраженной гидрофобности белка может происходить резкое изменение градиента кривизны и деформация бислоя, что имеет место в случае взаимодействия с мембраной цитохрома b5.

4 тип: сочетание гидрофильных и гидрофобных свойств белковой молекулы может обеспечить не только проникновение белка через бислой, но и

существенное давление на него, приводящее к изменению геометрии бислоя – сжиманию одних частей и уширению других (например, в случае белка эритроцитарных мембран гликофорина).

Как правило, именно белки ответственны за функциональную активность мембран. К таким белкам относятся разнообразные ферменты, транспортные белки, рецепторы, каналы, белки, образующие поры (аквапорины), то есть разнообразные белковые структуры, которые обеспечивают уникальность функций каждой мембраны.

Мембранные белки по биологической роли можно разделить на три группы:

I – белки-ферменты, обладающие каталитической активностью,

II – рецепторные белки, специфически связывающие те или иные вещества,

III – структурные белки.

Кроме липидов и белков, во многих (хотя не во всех) мембранах обнаруживаются углеводы. Но не в качестве самостоятельных компонентов, а как составные части соответствующих липидов (гликолипидов) и белков (гликопротеинов). Чаще всего углеводы представлены олигосахаридными цепями и в случае плазмалеммы расположены с наружной ее поверхности.

В мембранах гликозилировано около 10 % всех белков и от 5 до 26 % липидов (в зависимости от объекта). В числе углеводных компонентов – глюкоза, галактоза, нейраминная кислота, фукоза и манноза.

Углеводные части мембранных структур почти всегда направлены наружу и выступают над поверхностью клетки. Обширную группу углеводных соединений составляют протеоглики, состоящие из белка с отходящими от него боковыми углеводными цепями. Эти соединения обычно слабо связываются с мембраной и находятся на ее наружной поверхности. Таким образом, вся наружная поверхность клетки окружена углеводной оболочкой, которую называют гликокаликсом.

Гликокаликс выполняет рецепторную и маркерную функции, а также участвует в обеспечении избирательности транспорта веществ и пристеночном (примембранном) пищеварении. Наличие гликокаликса характерно для клеток животных, встречается также у бактерий.

Углеводная оболочка клетки выполняет ряд важных функций: большинство клеток способны отталкивать другие отрицательно заряженные частицы благодаря тому, что многие углеводные молекулы имеют отрицательный заряд; гликокаликс соседних клеток скрепляет их друг с другом; многие углеводные цепочки выполняют роль рецепторных молекул для связывания гормонов, включая инсулин.

Связывание таких рецепторов с гормонами приводит к активации определенных мембранных белков, которые, в свою очередь, запускают каскад ферментативных реакций внутри клетки; некоторые углеводные фрагменты вступают в иммунные реакции.

2 Биологические функции мембран.

Барьерная – обеспечивает регулируемый, избирательный, пассивный и активный обмен веществ с окружающей средой. Например, мембрана пероксисом защищает цитоплазму от опасных для клетки пероксидов. Избирательная проницаемость означает, что проницаемость мембраны для различных атомов или молекул зависит от их размеров, электрического заряда и химических свойств. Избирательная проницаемость обеспечивает отделение клетки и клеточных компартментов от окружающей среды и снабжение их необходимыми веществами.

Транспортная – через мембрану происходит транспорт веществ в клетку и из клетки. Транспорт через мембрану обеспечивает доставку питательных веществ, удаление конечных продуктов обмена, секрецию различных веществ, создание ионных градиентов, поддержание в клетке оптимального pH и концентрации ионов, которые нужны для работы клеточных ферментов.

Частицы, по какой-либо причине неспособные пересечь фосфолипидный бислой (например, из-за гидрофильных свойств, так как мембрана внутри гидрофобна и не пропускает гидрофильные вещества, или из-за крупных размеров), но необходимые для клетки, могут проникнуть сквозь мембрану через специальные белки-переносчики (транспортёры) и белки-каналы или путем эндоцитоза.

При пассивном транспорте вещества пересекают липидный бислой без затрат энергии так как происходит перенос веществ из области высокой концентрации в область низкой, то есть против градиента концентрации (градиент концентрации указывает направление увеличения концентрации) путем диффузии. Вариантом этого механизма является облегченная диффузия, при которой веществу помогает пройти через мембрану какая-либо специфическая молекула. У этой молекулы может быть канал, пропускающий вещества только одного типа.

Активный транспорт требует затрат энергии, так как происходит перенос веществ из области низкой концентрации в область высокой, то есть по градиенту концентрации. На мембране существуют специальные белки-насосы, в том числе АТФаза, которая активно вкачивает в клетку ионы калия (K^+) и выкачивает из нее ионы натрия (Na^+).

Матричная – обеспечивает определенное взаиморасположение и ориентацию мембранных белков, их оптимальное взаимодействие.

Механическая – обеспечивает автономность клетки, ее внутриклеточных структур, также соединение с другими клетками (в тканях). Большую роль в обеспечении механической функции имеют клеточные стенки, а у животных – межклеточное вещество.

Энергетическая – при фотосинтезе в хлоропластах и клеточном дыхании в митохондриях в их мембранах действуют системы переноса энергии, в которых также участвуют белки.

Рецепторная – некоторые белки, находящиеся в мембране, являются рецепторами (молекулами, при помощи которых клетка воспринимает те или иные сигналы).

Например, гормоны, циркулирующие в крови, действуют только на такие клетки-мишени, у которых есть соответствующие этим гормонам рецепторы. Нейромедиаторы (химические вещества, обеспечивающие проведение нервных импульсов) тоже связываются с особыми рецепторными белками клеток-мишеней.

Ферментативная – мембранные белки нередко являются ферментами. Например, плазматические мембраны эпителиальных клеток кишечника содержат пищеварительные ферменты.

Осуществление генерации и проведения биопотенциалов. С помощью мембраны в клетке поддерживается постоянная концентрация ионов: концентрация иона K^+ внутри клетки значительно выше, чем снаружи, а концентрация Na^+ значительно ниже, что очень важно, так как это обеспечивает поддержание разности потенциалов на мембране и генерацию нервного импульса.

Маркировка клетки – на мембране есть антигены, действующие как маркеры – «ярлыки», позволяющие опознать клетку. Это гликопротеины (то есть белки с присоединенными к ним разветвленными олигосахаридными боковыми цепями), играющие роль «антенн». Из-за бесчисленного множества конфигурации боковых цепей возможно сделать для каждого типа клеток свой особый маркер. С помощью маркеров клетки могут распознавать другие клетки и действовать согласованно с ними, например, при формировании органов и тканей. Это же позволяет иммунной системе распознавать чужеродные антигены.

3 Барьерно-транспортная роль плазмолеммы.

Плазмолемма (внешняя клеточная мембрана, цитолемма, плазматическая мембрана) занимает в клетке пограничное положение и играет роль полупроницаемого селективного барьера, который, с одной стороны, отделяет цитоплазму от окружающей клетку среды, а с другой – обеспечивает ее связь с этой средой.

Функции плазмолеммы определяются ее положением и включают:

- 1 Распознавание данной клеткой других клеток и прикрепление к ним;
- 2 Распознавание клеткой межклеточного вещества и прикрепление к его элементам (волокам, базальной мембране);
- 3 Транспорт веществ и частиц в цитоплазму и из нее (посредством ряда механизмов);
- 4 Взаимодействие с сигнальными молекулами (гормонами, медиаторами, цитокинами и др.) благодаря наличию на ее поверхности специфических рецепторов к ним;
- 5 Движение клетки (образование псевдо-, фило- и ламеллоподий) – благодаря связи плазмолеммы с сократимыми элементами цитоскелета.

Структура плазмолеммы. Плазмолемма – самая толстая из клеточных мембран (7,5-11 нм); под электронным микроскопом она, как и другие клеточные мембраны, имеет вид трехслойной структуры, представленной двумя электронно-плотными слоями, которые разделены светлым слоем. Ее моле-

кулярное строение описывается жидкостно-мозаичной моделью, согласно которой она состоит из липидного (фосфолипидного) бислоя, в который погружены и с которым связаны молекулы белков.

Липидный бислой представлен преимущественно молекулами фосфатидилхолина (лецитина) и фосфатидилэтаноламина (цефалина). В состав большинства мембран входит также холестерин (холестерол). В мембране гидрофобные цепи обращены внутрь бислоя, а гидрофильные головки – наружу. Состав липидов каждой из половин бислоя неидентичен. Липиды обеспечивают основные физико-химические свойства мембран, в частности, их текучесть при температуре тела. Некоторые липиды (гликолипиды) связаны с олигосахаридными цепями, которые выступают за пределы наружной поверхности плазмолеммы, придавая ей асимметричность. Электронно-плотные слои соответствуют расположению гидрофильных участков липидных молекул.

Липидные рафты – особые участки (микродомены) плазматической мембраны, обогащенные гликофинголипидами и холестерином. Эти участки координируют клеточные процессы, влияют на текучесть мембраны, служат организующими центрами для сборки сигнальных молекул, регулируют перемещение мембранных белков, рецепторов, а также регулируют нейротрансмиссию. Липидные рафты более структурированы и упакованы плотнее, чем окружающий их липидный бислой; при этом они способны свободно в нем перемещаться.

Одним из главных различий липидных рафтов и плазматической мембраны является их липидный состав. Исследования показали, что липидные рафты содержат в 3-5 раз больше холестерина, чем окружающий их липидный бислой. Кроме того, липидные рафты обогащены сфинголипидами – например, сфингомиелином, содержание которого в липидных рафтах обычно на 50 % превышает таковое в плазматической мембране. Глицерофосфолипидов в рафтах практически нет. Чтобы компенсировать повышенное содержание сфингомиелина, доля фосфатидилхолина в липидных рафтах снижена, в результате чего процент холин-содержащих липидов в них также почти на 50 % ниже по сравнению с окружающей мембраной. Холестерин предпочтительнее взаимодействует со сфинголипидами (хотя и не только с ними), что обусловлено их структурой и степенью насыщения их углеводородных цепочек. Хотя не все фосфолипиды в рафте полностью насыщены, их гидрофобные ацильные группировки более насыщены и упакованы плотнее, чем в липидах окружающего бислоя.

Холестерин служит динамическим «клеем», который скрепляет липиды рафта воедино и заполняет все пустоты между ними. Из-за жесткой природы стерольной группы холестерин предпочтительнее располагается в рафтах, где длинные насыщенные ацильные хвосты сфинголипидов могут образовывать более компактные и прочные связи с его кольцевой системой, чем более короткие и часто ненасыщенные хвосты фосфолипидов окружающего бислоя. По этой причине липидные рафты являются менее жидкими по сравнению с остальным бислоем.

Липидные рафты чрезвычайно обогащены интегральными мембранными белками двух классов: одни заякорены в мембране при помощи двух ковалентно связанных с этими белками длинноцепочечных насыщенных жирных кислот (две пальмитоильные или пальмитоильная и миристоильная группы), а другие – посредством гликозилфосфатидилинозитольного (GPI-) якоря. Между белками рафта и остального бислоя происходит постоянный обмен: мембранные белки могут заходить внутрь рафтов и выходить наружу за время порядка нескольких секунд. Для процесса, в котором взаимодействуют два мембранных белка, их одновременное присутствие в одном и том же рафте очень сильно увеличивает вероятность их столкновения.

Предполагают существование двух типов липидных рафтов: планарные (также известные как некавеолярные, или гликолипидные рафты) и кавеолярные липидные рафты. Планарные липидные рафты лежат в плоскости плазматической мембраны (не образуют впячиваний) и не имеют отличительных морфологических особенностей. Кавеолярные рафты, напротив, формируют в плазматической мембране колбообразные впячивания, содержащие белок кавеолин, который входит в состав особых углублений мембраны – кавеол; большинство наблюдаемых рафтов относятся к этому типу. Кавеолины интенсивно экспрессируются в мозге, микрососудах нервной системы, эндотелиальных клетках, астроцитах, олигодендроцитах, шванновских клетках, спинальных ганглиях и нейронах гиппокампа. Планарные рафты содержат белок флотиллин и встречаются в нейронах, лишенных кавеол. Оба типа рафтов имеют сходный липидный состав (обогащены холестерином и сфинголипидами). Флотиллин и кавеолин обладают способностью рекрутировать сигнальные молекулы к липидным рафтам, тем самым играя важную роль в передаче сигналов, опосредованной нейромедиаторами. Было высказано предположение, что эти микродомены отвечают за такую пространственную организацию сигнальных молекул, которая способствует кинетически выгодным взаимодействиям, необходимым для передачи сигнала. Впрочем, эти же микродомены и разделяют сигнальные молекулы, подавляя ненужные взаимодействия и приводя к затуханию сигнала.

Одним из важных доказательств в пользу существования липидных рафтов является их работа как платформ, на которых концентрируются отдельные рецепторы после активации при связывании с лигандом. Если же активация рецептора происходит в самом липидном рафте, то сигнальный комплекс оказывается защищенным рафтом от внешних ферментов, например, мембранных фосфатаз. В общем, липидные рафты привлекают белки в новую микросреду, так что их (де)фосфорилированное состояние может быть изменено локальными киназами и фосфатазами и дать начало последующим реакциям сигнального пути. Было установлено, что липидные рафты участвуют во многих сигнальных путях – например, сигнальном пути иммуноглобулина E, T- и B-клеточных антигеновых рецепторов, рецептора эпидермального фактора роста (EGF), инсулинового рецептора и др.

Липидные рафты как платформы для проникновения вирусов в клетку. Для проникновения в клетку вирусов, облигатных внутриклеточных парази-

тов, необходимо специфическое взаимодействие вируса и клеточных рецепторов на плазматической мембране. Накапливаются подтверждения того, что вирусы попадают в клетку через специфические мембранные микродомены, в том числе липидные рафты.

Плазмолеммные белки составляют более 50% массы мембраны и удерживаются в липидном бислое за счет гидрофобных взаимодействий с молекулами липидов. Они обеспечивают специфические свойства мембраны (типы белков и их содержание в мембране отражают ее функцию) и играют различную биологическую роль (переносчиков, ферментов, рецепторов и структурных молекул). По своему расположению относительно липидного бислоя мембранные белки разделяются на две основные группы — интегральные и периферические.

Периферические белки непрочно связаны с поверхностью мембраны и обычно находятся вне липидного бислоя.

Интегральные белки либо полностью (собственно интегральные белки), либо частично (полуинтегральные белки) погружены в липидный бислой; часть белков целиком пронизывает всю мембрану (трансмембранные белки). Интегральные белки плазмолеммы хорошо выявляются при использовании метода замораживания-скалывания. При этом плоскость скала обычно проходит через гидрофобную середину бислоя, разделяя его на два листка — наружный и внутренний. Интегральные белки имеют вид округлых внутримембранных частиц.

Часть белковых частиц связана с молекулами олигосахаридов (гликопротеины), которые выступают за пределы наружной поверхности плазмолеммы, другая имеет липидные боковые цепи (липопротеины). Молекулы олигосахаридов связаны также с липидами в составе гликолипидов. Углеводные участки гликолипидов и гликопротеинов придают поверхности клетки отрицательный заряд и образуют основу так называемого гликокаликса. Эти углеводные участки играют роль рецепторов, обеспечивающих распознавание клеткой соседних клеток и межклеточного вещества, а также адгезивные взаимодействия с ними. В состав гликокаликса некоторые авторы включают, помимо углеводных компонентов, периферические мембранные белки и полуинтегральные белки, функциональные участки которых находятся в надмембранной зоне (например, иммуноглобулины). В гликокаликсе находятся рецепторы гистосовместимости, некоторые ферменты (часть которых может производиться не самой клеткой, а адсорбироваться на ее поверхности), рецепторы гормонов.

Белковые молекулы мозаично распределены в липидном бислое, однако они не жестко фиксированы в нем, а напротив, могут перемещаться в его плоскости. В некоторых условиях определенные белки способны накапливаться в отдельных участках мембраны, образуя агрегаты. Перемещение белковых частиц, по-видимому, не является произвольным, а контролируется внутриклеточными механизмами, в которых участвуют микрофиламенты, прикрепленные к некоторым интегральным белкам.

Мембранные рецепторы являются преимущественно гликопротеинами, которые расположены на поверхности плазмолеммы клеток и обладают способностью высокоспецифически связываться со своими лигандами. Они выполняют ряд функций: регулируют проницаемость плазмолеммы, изменяя конформацию белков и ионных каналов; регулируют поступление некоторых молекул в клетку; действуют как датчики, превращая внеклеточные сигналы во внутриклеточные; связывают молекулы внеклеточного матрикса с цитоскелетом; эти рецепторы, называемые интегринами, играют важную роль в формировании контактов между клетками и клеткой и компонентами межклеточного вещества.

Рецепторы, связанные с каналами, взаимодействуют с сигнальной молекулой (нейромедиатора), которая временно открывает или закрывает воротный механизм, в результате чего инициируется или блокируется транспорт ионов через канал.

Каталитические рецепторы включают внеклеточную часть (собственно рецептор) и цитоплазматическую часть, которая функционирует как протеинкиназа (посредством таких рецепторов на клетки воздействуют инсулин и некоторые факторы роста).

Рецепторы, связанные с G-белками – трансмембранные белки, ассоциированные с ионным каналом или ферментом, – состоят из рецептора, взаимодействующего с сигнальной молекулой (первый посредник), и G-белка (гуанозин трифосфат-связывающего регуляторного белка), включающего несколько компонентов), который передает сигнал на связанный с мембраной фермент (аденилатциклазу) или ионный канал, вследствие чего активируется второй внутриклеточный посредник – чаще всего циклический АМФ (цАМФ) или Ca^{2+} . Около 80% всех гормонов и нейромедиаторов действуют через рецепторы, связанные с эффекторными механизмами посредством G-белков.

В составе плазмолеммы находятся интегрины, называемые клеточными адгезионными молекулами (КАМ) – трансмембранные белки, служащие рецепторами для внеклеточных фибриллярных макромолекул фибронектина и ламинина. Фибронектин связывается с клетками и молекулами внеклеточного матрикса (коллагеном, гепарином, фибрином). Таким образом, фибронектин играет роль адгезионного мостика между клеткой и компонентами межклеточного вещества. Между тем, внутриклеточная часть молекулы интегринна через ряд других белков связана с цитоскелетом.

Поверхностный аппарат клетки выделяется некоторыми авторами, которые рассматривают его как структурно и функционально единое образование, состоящее из трех компонентов: надмембранного комплекса (гликокаликса), плазмолеммы и подмембранного комплекса. Подмембранный комплекс образован специализированной периферической частью цитоплазмы, прилежащей к плазмолемме (кортикальный слой) и содержащей элементы цитоскелета, преимущественно актиновые микрофиламенты. Более глубоко располагаются промежуточные фмламенты и микротрубочки. Благодаря сокращению сети микрофиламентов, связанных с белками плазмолеммы, про-

исходят изменения формы клетки и ее отдельных участков, формирование псевдоподий, выростов, перемещение клетки в пространстве.

Особенности плазмалеммы растительных клеток.

Жирнокислотный состав: основными жирными кислотами плазмалеммы являются: пальмитиновая, олеиновая, линоленовая. Практически отсутствует стеариновая и полностью арахидоновая, характерные для мембран животных и грибов.

Набор стероидов: В плазмалемме как и во всех мембранах растительной клетки, почти нет холестерина. Его заменяют фитостерины.

Набор белков: Наличие специфических белков: прежде всего арабиногалактанов, обеспечивающих структурное и функциональное взаимодействие плазмалеммы с клеточной стенкой.

Функциональные особенности плазмалеммы растительной клетки.

1. Градиент электрохимического потенциала плазматической мембраны создается за счет активного переноса сопрягающего иона с одной стороны мембраны на другую. Для плазмалеммы растительной клетки сопрягающим ионом выступает H^+ , а у животных - Na^+ .

2. У растительной клетки электрическая разность потенциалов составляет $\Delta\psi$ от 100 до 250 мВ, что существенно выше, чем у животной клетки.

3. Плазмалемма растительной клетки вместе со специфическим участком ЭР образует плазмодесмы - специальные цитоплазматические каналы, пронизывающие клеточную стенку и соединяющие смежные клетки.

Существенно различаются условия функционирования плазмалеммы и мембраны животной клетки. Плазмалемма в норме испытывает давление цитоплазмы и клеточной стенки.

Тема 4 Транспорт веществ через мембрану

1 Характеристика транспортных процессов.

2 Везикулярный перенос: эндоцитоз и экзоцитоз.

1 Характеристика транспортных процессов.

Одна из наиболее существенных функций биологических мембран – обеспечение избирательной проницаемости для веществ, транспортируемых в процессе жизнедеятельности как из клетки в среду, так и из среды во внутреннее пространство клетки. Отдельные части живой системы, разделенные мембраной, будь то разные клетки или отдельные компартменты внутриклеточной среды, функционируют как открытые системы. С помощью транспортных систем осуществляется регуляция объема клеток, величины рН и ионного состава цитоплазмы.

Среди многообразных явлений, протекающих в клетке, важное место занимают активный и пассивный транспорт веществ, осмос, фильтрация и биоэлектrogenез. Благодаря транспортным системам клетки накапливают метаболиты, важные для обеспечения энергетического цикла и метаболических

процессов, выводят в окружающую среду токсические вещества, а также создают разность потенциалов на мембране. В настоящее время очевидно, что все эти явления, так или иначе, определяются барьерными свойствами клеточных мембран.

В зависимости от потребностей клетки транспорт веществ осуществляется или по или против концентрационного градиента. Способ проникновения через мембрану в значительной степени определяется свойствами вещества. Низкомолекулярные нейтральные вещества, такие, как газы, вода, аммиак, глицерин и мочевины, свободно диффундируют через биомембраны. Однако с увеличением размера молекулы теряют эту способность. К примеру, клеточные мембраны непроницаемы для глюкозы и других сахаров. Проницаемость биомембран зависит также от полярности веществ. Неполярные вещества, такие, как бензол, этанол, диэтиловый эфир и многие наркотики, способны проникать в клетку в результате диффузии.

Напротив, для гидрофильных, особенно заряженных веществ, мембрана непроницаема. Однако во многих случаях именно такие вещества необходимы для функционирования клетки, поэтому в живых системах эволюционно сформировались специализированные транспортные системы для переноса таких веществ через мембрану.

Выделяют 5 разновидностей мембранного транспорта: 1) пассивная диффузия; 2) облегченная диффузия; 3) первично-активный транспорт; 4) вторично-активный транспорт; 5) механизм, сопряженный с изменением структурной целостности мембран.

Перенос веществ через биологические мембраны осуществляется с помощью различных механизмов и протекает в основном без нарушения структурной целостности мембран.

Если транспорт сопровождается уменьшением свободной энергии, он протекает самопроизвольно и называется пассивным. Пассивный транспорт (пассивная или облегченная диффузия) происходит по направлению градиентов химического (электрохимического) потенциала, результатом чего является уменьшение градиентов концентраций, если нет других процессов, которые обеспечивают их поддержание на постоянном уровне. Активным транспортом называют процесс переноса веществ или ионов против их концентрационных градиентов, который, так или иначе, обеспечивается энергией метаболических процессов.

По пути **простой диффузии** частицы вещества перемещаются сквозь липидный бислой. Направление простой диффузии определяется только разностью концентраций вещества по обеим сторонам мембраны. Путём простой диффузии в клетку проникают гидрофобные вещества (O_2 , N_2 , бензол) и полярные маленькие молекулы (CO_2 , H_2O , мочевины). Не проникают полярные относительно крупные молекулы (аминокислоты, моносахариды), заряженные частицы (ионы) и макромолекулы (ДНК, белки).

Простая диффузия представляет собой процесс, при котором газ или растворенные вещества распространяются и заполняют весь объём вещества. Молекулы или ионы, растворённые в жидкости, находясь в хаотичном состо-

янии, сталкиваются со стенками клеточной мембраны, что может вызвать двоякий исход: молекула либо отскочит, либо пройдет через мембрану. Если вероятность последнего велика, то говорят, что мембрана проницаема для данного вещества.

Если концентрация данного вещества по обе стороны мембраны различна, то возникает процесс, который способствует выравниванию концентрации. Через клеточную мембрану проходят как хорошо растворимые (гидрофильные), так и нерастворимые (гидрофобные) вещества.

Диффузия через биологические мембраны является *неспецифической*, если осуществляется благодаря физико-химическим свойствам липидного бислоя, а не константным структурам мембраны. Механизм неспецифической диффузии малых молекул, таких как диметилформамид, вода или гидрофобные молекулы основан на динамических свойствах бислоя.

Полагают, что малые молекулы могут достаточно быстро проникать через бислой вместе с кинками, возникающими в области дефектных зон в структуре бислоя. Такие короткоживущие мигрирующие образования нельзя считать порами, поскольку они не требуют специальных белковых образований.

Вследствие теплового движения хвостов молекул фосфолипидов кинки, возникающие в области дефектных зон, могут перемещаться поперек мембраны и переносить попавшие в них мелкие молекулы, в первую очередь молекулы воды. Такие короткоживущие мигрирующие образования нельзя считать порами, поскольку они не требуют специальных белковых образований.

Осмоз – особый вид диффузии воды через полупроницаемую мембрану в область более высокой концентрации растворенного вещества. В результате такого движения внутри клетки создается значительное давление, которое называют осмотическим. Это давление может даже разрушить клетку.

Ионные каналы – порообразующие белки (одиночные либо целые комплексы), поддерживающие разность потенциалов, которая существует между внешней и внутренней сторонами клеточной мембраны всех живых клеток. Относятся к транспортным белкам. С их помощью ионы перемещаются согласно их электрохимическим градиентам сквозь мембрану. Такие комплексы представляют собой набор идентичных или гомологичных белков, плотно упакованных в липидном бислое мембраны вокруг водной поры. Каналы расположены в плазмалемме и некоторых внутренних мембранах клетки.

Через ионные каналы проходят ионы натрия, калия, хлора и кальция. Из-за открывания и закрывания ионных каналов меняется концентрация ионов по разные стороны мембраны и происходит сдвиг мембранного потенциала.

Канальные белки состоят из субъединиц, образующих структуру со сложной пространственной конфигурацией, в которой кроме поры обычно имеются молекулярные системы открытия, закрытия, избирательности, инак-

тивации, рецепции и регуляции. Ионные каналы могут иметь несколько участков (сайтов) для связывания с управляющими веществами.

Классификация ионных каналов проводится по различным параметрам и поэтому единой унифицированной классификации для них пока не существует.

Так, возможна классификация по структуре (строению) и происхождению от однотипных генов.

По этому принципу, например, выделяют три семейства лиганд-активируемых ионных каналов: с пуриновыми рецепторами (АТФ-активируемые); с никотиновыми АХ-рецепторами, ГАМК-, глицин- и серотонин-рецепторами; с глутаматными рецепторами.

При этом в одно и то же семейство попадают ионные каналы с разной ионной селективностью, а также с рецепторами к разным лигандам. Но зато образующие эти каналы белки имеют большое сходство в строении и происхождении.

Ионные каналы также можно классифицировать по селективности в зависимости от проходящих через них ионов: натриевые, калиевые, кальциевые, хлорные, протонные (водородные).

Согласно функциональной классификации, ионные каналы группируются по способам управления их состоянием на следующие виды: неуправляемые (независимые); потенциал-управляемые (потенциал-чувствительные, потенциал-зависимые, voltage-gated); лиганд-управляемые (хемоуправляемые, хемочувствительные, хемозависимые, лиганд-зависимые, рецептор-активируемые); Опосредованно-управляемые (вторично-управляемые, ион-активируемые, ион-зависимые, мессенджер-управляемые, управляемые метаботропными рецепторами); совместно-управляемые (NMDA-рецепторно-канальный комплекс); стимул-управляемые (механочувствительные, механосенситивные, активируемые растяжением (stretch) липидного бислоя, протон-активируемые, температурно-чувствительные).

Наиболее часто встречаются два типа каналов: ионные каналы с лиганд-зависимыми воротами (находятся, в частности, в постсинаптической мембране нервно-мышечных соединений) и ионные каналы с потенциал-зависимыми воротами. Лиганд-зависимые каналы превращают химические сигналы, приходящие к клетке, в электрические; они необходимы, в частности, для работы химических синапсов. Потенциал-зависимые каналы нужны для распространения потенциала действия.

Свойства ионных каналов. Для каналов характерна ионная специфичность. Каналы одного типа пропускают только ионы калия, другого – только ионы натрия и т.д. Селективность – это избирательно повышенная проницаемость ионного канала для определённых ионов и пониженная для других. Такая избирательность определяется селективным фильтром – самым узким местом канальной поры. Фильтр, кроме узких размеров, может иметь также локальный электрический заряд. Управляемая проницаемость – это способность открываться или закрываться при определённых управляющих воздействиях на канал. Инактивация – это способность ионного канала через

некоторое время после своего открытия автоматически понижать свою проницаемость даже в том случае, когда открывший их активирующий фактор продолжает действовать. Блокировка – это способность ионного канала под действием веществ-блокаторов фиксировать какое-то одно своё состояние и не реагировать на обычные управляющие воздействия. Блокировку вызывают вещества-блокаторы, которые могут называться антагонистами, блокаторами или литиками. Пластичность – это способность ионного канала изменять свои свойства, свои характеристики. Наиболее распространённый механизм, обеспечивающий пластичность – это фосфорилирование аминокислот канальных белков с цитоплазматической стороны мембраны ферментами-протеинкиназами.

Облегчённая диффузия. Большинство веществ переносится через мембрану с помощью погружённых в неё транспортных белков (белков-переносчиков). Все транспортные белки образуют непрерывный белковый проход через мембрану. С помощью белков-переносчиков осуществляется как пассивный, так и активный транспорт веществ. Полярные вещества (аминокислоты, моносахариды), заряженные частицы (ионы) проходят через мембраны с помощью облегчённой диффузии при участии белков-каналов или белков-переносчиков. Участие белков-переносчиков обеспечивает более высокую скорость облегчённой диффузии по сравнению с простой пассивной диффузией. Скорость облегчённой диффузии зависит от ряда причин: от трансмембранного концентрационного градиента переносимого вещества, от количества переносчика, который связывается с переносимым веществом, от скорости связывания вещества переносчиком на одной поверхности мембраны (например, на наружной), от скорости конформационных изменений в молекуле переносчика, в результате которых вещество переносится через мембрану и высвобождается на другой стороне мембраны. Облегчённая диффузия не требует специальных энергетических затрат за счёт гидролиза АТФ. Эта особенность отличает облегчённую диффузию от активного трансмембранного транспорта.

Характерными чертами этого вида транспорта являются: высокая скорость переноса веществ; зависимость от строения веществ; насыщаемость; конкуренция и чувствительность к ингибиторам.

Все перечисленные выше черты являются результатом действий специальных белков-переносчиков, а также их малого содержания в клетке. При достижении максимального числа переносимых веществ, когда все переносчики заняты, дальнейшее увеличение не приведёт к возрастанию количества переносимых веществ – явление насыщения. Вещества, которые постоянно переносятся одним и тем же переносчиком, будут конкурировать за него.

Белки-переносчики – это трансмембранные белки, которые специфически связывают молекулу транспортируемого вещества и, изменяя конформацию, осуществляют перенос молекулы через липидный слой мембраны. В белках-переносчиках всех типов имеются определённые участки связывания для транспортируемой молекулы. Они могут обеспечивать как пассивный, так и активный мембранный транспорт.

Аквапорины – интегральные мембранные протеины, формирующие поры в мембранах клеток. Они избирательно пропускают молекулы воды, позволяя ей поступать в клетку и покидать её, в то же время препятствуя потоку ионов и других растворимых веществ. Другие акваглицеропорины пропускают не только воду, но и глицерин, CO_2 , аммиак и мочевины, в зависимости от диаметра и формы образуемой поры, однако аквапорины совершенно непроницаемы для заряженных частиц, и это их свойство позволяет сохранять электрохимический мембранный потенциал.

Аквапорины содержатся в мембранах множества клеток человека, а также бактерий и других организмов. У млекопитающих описано 13 типов аквапоринов, из них 6 обнаруживаются в почках. У растений описано 5 групп аквапоринов. Транспорт воды от клетки к клетке связан с пересечением плазматических мембран при участии аквапоринов плазматической мембраны и тонопласта. Аквапорины играют важную роль в поддержании нормальной осмолярности цитоплазмы и принимают участие в росте клеток растяжением, участвуют в регидратации обезвоженных пыльцевых зёрен на рыльце пестика и регуляции трансмембранного потока воды в растущую пыльцевую трубку.

В противоположность вышеописанным процессам **активный транспорт** осуществляется против градиента концентрации или заряда, поэтому он требует притока дополнительной энергии, которая обычно обеспечивается за счет гидролиза АТФ (иногда – за счет мембранного потенциала).

Первичный активный транспорт, также называемый прямым активным транспортом, напрямую использует метаболическую энергию для транспортировки молекул через мембрану. Вещества, которые переносятся через клеточную мембрану посредством первичного активного транспорта, включают ионы металлов, такие как Na^+ , K^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+} . Эти заряженные частицы нуждаются в ионных насосах или ионных каналах, чтобы пересекать мембраны. Большинство ферментов, осуществляющих этот тип транспорта, являются трансмембранными АТФазами. Первичная АТФаза, универсальная для всего животного мира, – это **натриево-калиевый насос**, который помогает поддерживать клеточный потенциал. Другими источниками энергии для первичного активного транспорта являются окислительно-восстановительная энергия и энергия фотонов (свет). Примером первичного активного транспорта **с использованием окислительно-восстановительной энергии** является митохондриальная электронная транспортная цепь, которая использует восстановительную энергию НАДН для перемещения протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану против градиента их концентрации. Примером первичного активного транспорта **с использованием световой энергии** являются белки, участвующие в фотосинтезе, которые используют энергию фотонов для создания градиента протонов через тилакоидную мембрану, а также для создания восстанавливающей силы в форме НАДФН.

Существует классификация способов, которые обеспечивают транспорт веществ через клеточную мембрану.

Транспорт может идти по механизму унипорта (облегченной диффузии), согласно которому только одно вещество переносится через биомембрану в одном направлении с помощью канальных или транспортных белков (например, транспорт глюкозы в клетках печени). Примерами унипорта также являются транспорт ионов кальция через внутреннюю мембрану митохондрий.

Транспортный процесс, который требует сопряженного переноса двух или более ионов (веществ) в одном направлении, называют симпортом, как, например, активный транспорт аминокислот или глюкозы вместе с ионами натрия в эпителиальных клетках кишечника протекает по механизму симпорта.

Транспорт ионов (веществ), сопряженный с переносом других ионов (веществ) в противоположном направлении, называют антипортом, как, например, обмен ионов HCO_3^- на Cl^- в мембране эритроцитов. Примером такого транспорта может также служить Na^+/H^+ -антипорт во внутренней мембране митохондрий и K^+/H^+ -антипорт, катализируемый ионофором нигерицином в бислоях. Трансмембранный обмен (антипорт) или односторонний транспорт (симпорт) рассматриваемых ионов осуществляют специфические переносчики.

Таким образом, при симпорте и антипорте белки функционируют в режиме, при котором перенос одного растворенного вещества зависит от одновременного или последовательного переноса другого вещества. Указанные термины – антипорт и симпорт (котранспорт) – связывают не только с явлениями пассивного транспорта, осуществляющегося с помощью переносчика (например, симпорт анионов, осуществляющийся методом электрофореза), но и в случае, когда процесс сопряжен с энергозависимыми реакциями.

Энергия, запасаемая клеткой в виде ионных градиентов, созданных первично активным транспортом веществ через мембрану, может использоваться другими транспортными процессами, которые в таком случае (по отношению к энергетическому обеспечению процесса) называют вторично-активным транспортом. Так, к примеру, происходит при аккумуляции в клетке глюкозы или других метаболитов – они переносятся против концентрационного градиента за счет того, что одновременно с ними в клетку переносятся ионы Na^+ . В клетках низших эукариот градиент Na^+ может быть заменен градиентом протонов. Перенос осуществляется с помощью белков-переносчиков, имеющих молекулярную массу 25–40 кДа. Некоторые переносчики сахаров выделены из плазматических мембран слизистой кишечника, эритроцитов, бактерий. Они имеют широко варьирующее сродство (Ка для переносимых веществ варьирует от 10^{-7} до 10^{-4} М) и различную специфичность к переносимым соединениям. Обнаруживаются случаи переноса одной и той же аминокислоты 3–4 разными переносчиками или, наоборот, выявляется специфичность одного переносчика к 2–3 разным соединениям. Удобным объектом для изучения транспорта метаболитов являются микроорганизмы, дефицитные по конкретным переносчикам. Соответствующие субстраты не попадают внутрь клетки и поэтому не могут утилизироваться.

К вторично-активному транспорту относятся и процессы переноса, сопряженные с ферментативной модификацией переносимых соединений. Например, фосфотрансферазная система бактерий, отсутствующая у эукариот, фосфорилирует сахара в процессе их проникновения через мембрану, вовлекая их тем самым в клеточный метаболизм. У грам-отрицательных бактерий так переносятся D-глюкоза, D-фруктоза и D-глюкозамин. У грам-положительных бактерий набор переносимых веществ шире: сюда относятся также пентозы, сахароза, трегалоза, лактоза, глицерин. При этом лактоза и фруктоза фосфорилируются по C1, остальные вещества – по концевому углероду.

Митохондрии – это пример системы, осуществляющей вторично-активный транспорт Ca^{2+} . В этом случае перенос иона осуществляется по градиенту потенциала, образованного на мембране за счет метаболических процессов, например, дыхания или гидролиза АТФ. При этом на мембране генерируется потенциал, и транспорт Ca^{2+} осуществляется по принципу электрофореза.

2 Везикулярный перенос: эндоцитоз и экзоцитоз.

Все мембранные органоиды в клетке тесно связаны друг с другом и функционируют как единое целое. Клетка постоянно взаимодействует с внешней средой и должна координировать этот процесс с работой внутриклеточных органелл. Для этого в клетке сформировался сложный регулируемый механизм адресной доставки веществ к местам их предназначения. Такой системой является аппарат везикулярного транспорта макромолекул с помощью небольших транспортных пузырьков (везикул). В этой системе задействованы все мембранные структуры и органоиды клетки: плазматическая мембрана, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы, транспортные пузырьки.

Мембрана, которая образует транспортные пузырьки, называется донорной, а мембрана, к которой они направляются – акцепторной. В каждом конкретном случае донорные и акцепторные мембраны могут принадлежать к разным элементам мембранной системы клетки.

Основными путями везикулярного транспорта макромолекул являются anterograde (экзоцитозный) путь, осуществляющий доставку вновь синтезированных в клетке белков и липидов через ЭПР и АГ к плазматической мембране или другим внутриклеточным органеллам (эндосомам, лизосомам), и противоположный ему по направлению retrograde (эндоцитозный) путь. По эндоцитозному пути осуществляется транспорт макромолекул различной природы от плазматической мембраны к месту их деградации в лизосомах или вещества; они могут возвращаться обратно к плазматической мембране (путь рециклирования) или доставляться к плазматической мембране на противоположный конец клетки (транскитозный путь).

Антероградный (биосинтетический) путь проходят образующиеся после синтеза на рибосомах белки, попадающие в цистерны эндоплазматического ретикула, упаковывающиеся там в транспортные везикулы и

направляемые к цис-цистернам аппарата Гольджи. Проходя через АГ, белки модифицируются и сортируются и по достижении транс-цистерн аппарата Гольджи упаковываются в транспортные пузырьки (везикулы), судьба которых может быть различна. Так, если белки должны секретироваться во внешнюю среду путем экзоцитоза, они попадают в крупные (до 500 нм) секреторные гранулы, и тогда этот участок пути называется секреторным. Другие белки направляются к плазматической мембране, и в этом случае мелкие транспортные везикулы формируются из мембран последней транс-цистерны АГ. Другие везикулы, также образованные из транс-цистерн аппарата Гольджи, направляются в эндосомы и лизосомы. Таким образом, пункт конечного назначения антероградного пути может находиться как вне клетки, так и внутри нее, однако в любом случае он начинается в клетке. Основной сортирующей станцией антероградного пути являются мембраны транс-цистерн АГ.

Ретроградный (эндоцитозный) путь начинается с плазматической мембраны, обеспечивая связь клетки с внешней средой. Эндоцитоз традиционно разделяют на клатрин-зависимый, в ходе которого образование окаймленных пузырьков происходит с участием специального белка – клатрина, и клатрин-независимый. Клатрин-опушенные пузырьки могут образовываться в разных частях мембранной системы клетки: из плазматической мембраны, из транс-мембран АГ, из мембран эндосом. Частным случаем клатрин-зависимого эндоцитоза является фагоцитоз.

Клатрин-независимые транспортные пузырьки формируются в мембранах эндоплазматической сети или АГ с помощью специальных COP-1 и COP-II белков и переносятся антероградно в цис-цистерны АГ или ретроградно в цистерны эндоплазматической сети.

Рассмотрим основные стадии транспортных процессов в клетке.

1. Образование окаймленной ямки и отпочковывание пузырька. На этой стадии транспортируемые молекулы – «грузы» – через специфические рецепторы связываются с мембраной-донором. Регулируют этот процесс специальные ГТФ связывающие белки из семейства Rab и белки связывания SNARE (soluble Nethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor).

2. Перемещение пузырька к целевой акцепторной мембране (путем диффузии или при участии цитоскелета). На этой стадии происходит отделение от транспортной везикулы клатриновых белков опущения. Направление пузырька к определенной мембране органоида происходит с помощью специальных аминокислотных последовательностей на белках связывания. Белки, направляемые в один и тот же компартмент, несут на себе определенные сигналы локализации, узнаваемые специальными мембранными рецепторами. Эти рецепторы, взаимодействуя с компонентами формирующейся везикулы (как структурными, так и регуляторными), обеспечивают сортировку определенного класса белков в соответствующие транспортные пузырьки. Например, последовательность лизин-аспарагин-глутамин-лейцин на концевых участках пептида определяет слияние пузырька именно с мембраной эндоплазматического ретикулума. В 1999 г. Гюнтеру Блобелю за открытие этих

сигнальных последовательностей в белках была вручена Нобелевская премия.

3. Заякоривание (anchoring, tethering) или стыковка (docking) пузырька к акцепторной мембране с помощью Rab-белков и белков из группы SNARE.

4. Слияние (fusion) мембраны пузырька с акцепторной мембраной и переход его содержимого в просвет органоида или в случае плазматической мембраны выброс во внеклеточную среду (секреция).

5. Рециклинг регуляторных белков. После слияния с акцепторной мембраной регуляторные белки отсоединяются от мембраны транспортного пузырька и направляются в соседний участок акцепторной мембраны, где формируются пузырьки, направляемые в рециркуляцию.

В результате везикулярный транспорт происходит с очень высокой точностью, вероятность ошибочных слияний, так же как и неверной сортировки, очень низкая, а уровень координации всех протекающих в клетке транспортных процессов очень высок.

Наряду с клатрин-независимым эндоцитозом, существует процесс образования кавеол. Кавеолы – это стабильные впячивания мембраны клетки (в форме буквы Ω) диаметром от 50 до 100 нм (отсюда их название, в буквальном переводе означающее «маленькая пещерка»). Кавеолы имеют необычный липидный состав: наружный слой мембраны в области кавеол обогащён холестерином и сфинголипидами. В связи с этим кавеолы можно рассматривать как разновидность липидных рафтов – микродоменов клеточной мембраны, содержащих много сфинголипидов и холестерина. Однако кавеолы состоят отнюдь не только из липидов: в их состав входят также различные белки, в первую очередь – кавеолины и кавины. Процесс образования кавеол зависит от содержания холестерина в плазматической мембране и, как правило, наблюдается в районах формирования липидных рафтов.

Эндоцитоз – процесс захвата внешнего материала клеткой, осуществляемый путём образования мембранных везикул.

Типы эндоцитоза. Фагоцитоз (поедание клеткой) – процесс поглощения клеткой твёрдых объектов, таких как клетки эукариот, бактерии, вирусы, остатки мёртвых клеток и т. п. Вокруг поглощаемого объекта образуется большая внутриклеточная вакуоль (фагосома). Размер фагосомы – от 250 нм и больше. Путём слияния фагосомы с первичной лизосомой образуется вторичная лизосома. В кислой среде гидролитические ферменты расщепляют макромолекулы, оказавшиеся во вторичной лизосоме. Продукты расщепления (аминокислоты, моносахариды и прочие полезные вещества) транспортируются затем через лизосомную мембрану в цитоплазму клетки. Фагоцитоз распространен очень широко. У высокоорганизованных животных и человека процесс фагоцитоза играет защитную роль. Фагоцитарная деятельность лейкоцитов и макрофагов имеет огромное значение в защите организма от попадающих в него патогенных микробов и других нежелательных частиц. Фагоцитоз впервые описал русский ученый И.И. Мечников.

Пиноцитоз (питьё клеткой) – процесс поглощения клеткой жидкой фазы из окружающей среды, содержащей растворимые вещества, включая

крупные молекулы (белки, полисахариды и др.). При пиноцитозе от мембраны отшнуровываются внутрь клетки небольшие пузырьки – эндосомы. Они меньше фагосом (их размер до 150 нм) и обычно не содержат крупных частиц. После образования эндосомы к ней подходит первичная лизосома, и эти два мембранных пузырька сливаются. Образовавшаяся органелла носит название вторичной лизосомы. Процесс пиноцитоза постоянно осуществляют все эукариотические клетки.

Рецептор-опосредованный эндоцитоз – активный специфический процесс, при котором клеточная мембрана выпячивается внутрь клетки, формируя окаймлённые ямки. Внутриклеточная сторона окаймлённой ямки содержит набор адаптивных белков (адаптин, клатрин, обуславливающий необходимую кривизну выпячивания, и др. белки). Макромолекулы, связывающиеся со специфическими рецепторами на поверхности клетки, проходят внутрь со значительно большей скоростью, чем вещества, поступающие в клетки за счет пиноцитоза. Внешняя сторона мембраны при этом включает специфические рецепторы (например, ЛПНП-рецептор). При связывании лиганда из окружающей клетку среды окаймлённые ямки формируют внутриклеточные везикулы (окаймлённые пузырьки). Рецептор-опосредованный эндоцитоз включается для быстрого и контролируемого поглощения клеткой соответствующего лиганда (например, ЛПНП). Эти пузырьки быстро теряют свою кайму и сливаются между собой, образуя более крупные пузырьки – эндосомы. После чего эндосомы сливаются с первичными лизосомами, в результате чего формируются вторичные лизосомы. Например, когда животной клетке необходим холестерин для синтеза мембраны, она экспрессирует ЛПНП-рецепторы на плазматической мембране. Богатые холестерином и эфирами холестерина ЛПНП, связавшиеся с ЛПНП-рецепторами, быстро доставляют холестерин в клетку.

Экзоцитоз – механизм клеточных выделений: у эукариот клеточный процесс, при котором внутриклеточные везикулы (мембранные пузырьки) сливаются с внешней клеточной мембраной. При экзоцитозе содержимое секреторных везикул (экзоцитозных пузырьков) выделяется наружу, а их мембрана сливается с клеточной мембраной. Практически все макромолекулярные соединения (белки, пептидные гормоны и др.) выделяются из клетки этим способом; у прокариот везикулярный механизм экзоцитоза не встречается: у них экзоцитозом называют встраивание белков в клеточную мембрану (или в наружную мембрану у грамотрицательных бактерий), выделение белков из клетки во внешнюю среду или в периплазматическое пространство.

Экзоцитоз может выполнять три основные задачи: доставка на клеточную мембрану липидов, необходимых для роста клетки; высвобождение различных соединений из клетки, например, токсичных продуктов метаболизма или сигнальных молекул (гормонов или нейромедиаторов); доставка на клеточную мембрану функциональных мембранных белков, таких как рецепторы или белки-транспортёры. При этом часть белка, которая была направлена внутрь секреторной везикулы, оказывается выступающей на наружной поверхности клетки.

У эукариот различают два типа экзоцитоза:

Кальций-независимый конститутивный экзоцитоз встречается практически во всех эукариотических клетках. Это необходимый процесс для построения внеклеточного матрикса и доставки белков на внешнюю клеточную мембрану. При этом секреторные везикулы доставляются к поверхности клетки и сливаются с наружной мембраной по мере их образования.

Кальций-зависимый неконститутивный экзоцитоз встречается, например, в химических синапсах или клетках, вырабатывающих макромолекулярные гормоны. Этот экзоцитоз служит, например, для выделения нейромедиаторов. При этом типе экзоцитоза секреторные пузырьки накапливаются в клетке, а процесс их высвобождения запускается по определённому сигналу, опосредованному быстрым повышением концентрации ионов кальция в цитозоле клетки. В пресинаптических мембранах процесс осуществляется специальным кальций-зависимым белковым комплексом SNARE.

РАЗДЕЛ 3 ЦИТОЗОЛЬ И ЭНДОМЕМБРАННЫЕ СТРУКТУРЫ

Тема 5 Цитозоль

- 1 Основные определения. Разграничение понятий.
- 2 Химический состав цитозоля.
- 3 Организация и функции цитозоля

1 Основные определения. Разграничение понятий.

Цитоплазма – полужидкое содержимое клетки, её внутренняя среда, кроме ядра и вакуоли, ограниченная плазматической мембраной. Включает гиалоплазму – основное прозрачное вещество цитоплазмы, находящиеся в ней обязательные клеточные компоненты – органеллы, а также различные непостоянные структуры – включения. Иногда под цитоплазмой понимают только гиалоплазму. Термин «цитоплазма» был введен А. фон Келликером в 1863 г. как синоним термину «протоплазма». Впоследствии протоплазма стала подразумевать все содержимое клетки вне ядра, включая органеллы. Э. Страсбургер в 1882 г. предложил называть так протоплазму без органелл, вакуолей и пластид.

Цитозоль – жидкое содержимое клетки. Большую часть цитозоля занимает внутриклеточная жидкость. Цитозоль разбивается на компартменты при помощи разнообразных мембран. У эукариот цитозоль располагается под плазматической мембраной и является частью цитоплазмы, в которую, помимо цитозоля, входят митохондрии, пластиды и другие органеллы, но не содержащаяся в них жидкость и внутренние структуры. Таким образом, цитозоль представляет собой жидкий матрикс, окружающий органеллы. У прокариот большая часть химических реакций метаболизма происходит в цитозоле, и лишь небольшая их часть происходит в мембранах и периплазматическом пространстве. У эукариот, хотя многие реакции протекают в органеллах, некоторые реакции происходят в цитозоле.

Гиалоплазма – основное гомогенное или тонкозернистое вещество клетки, заполняющее внутриклеточное пространство между органеллами, значительно варьирует по биохимическому составу у разных организмов; основная роль гиалоплазмы – объединение всех клеточных структур в отношении их химического взаимодействия и обеспечения транспортных биохимических процессов.

Протоплазма – цитоплазма и ядро клетки. Термин «протоплазма» ввёл в 1839 г. Я. Пуркинье. В XIX – начале XX века понятие протоплазмы использовалось широко, в современной научной литературе почти не встречается.

Протопласт – содержимое растительной или бактериальной клетки, за исключением внешней клеточной оболочки (клеточной стенки), однако вместе с клеточной (плазматической) мембраной. Протопласт включает: цитоплазму, ядро, все органеллы клеточную мембрану. То есть протоплазму и мембрану.

Эктоплазма, также называемая плазматическая – наружный слой клеточной цитоплазмы, имеющий более высокую плотность по сравнению с её внутренним слоем (эндоплазмой, также называемой плазматическим). Разделение цитоплазмы на эктоплазму и эндоплазму условно и в большей степени выражено у простейших, где эктоплазма участвует в механизме движения клетки. В эктоплазме не содержатся гранулы и большинство органелл, но, например, у инфузории туфельки в эктоплазме находятся кинетосомы, от которых отходят реснички.

Эндоплазма – внутренняя часть цитоплазмы клетки, которая имеет меньшую плотность по сравнению с эктоплазмой и содержит большее количество клеточных органелл.

2 Химический состав цитозоля.

Термин «цитозоль» был предложен в 1965 г. Г. Ларди и первоначально использовался в отношении жидкости, которая выходит из повреждённых клеток и при ультрацентрифугировании которой оседают нерастворимые компоненты. Растворимые клеточные экстракты не идентичны растворимой части цитоплазмы и обычно называются цитоплазматической фракцией.

В настоящее время термин «цитозоль» используется для обозначения жидкой фракции цитоплазмы живой (интактной) клетки. В состав цитозоля не входят жидкости, находящиеся внутри органелл.

Доля объёма клетки, приходящаяся на цитозоль, варьируется: в то время как у бактерий цитозоль обеспечивает сохранение структуры клетки и занимает почти весь её объём, у растений большая часть объёма клетки приходится на крупную центральную вакуоль.

Большую часть объёма цитозоля составляет вода (около 70 % в типичной клетке), pH внутриклеточной жидкости составляет 7,4, при этом у человека pH цитозоля составляет от 7,0 до 7,4 и имеет большее значение в случае растущих клеток. Вязкость цитоплазмы примерно такая же, как у воды, хотя скорость диффузии малых молекул через эту жидкость примерно в 4 раза меньше, чем в чистой воде, из-за столкновений с многочисленными макромолекулами. Сокращение доли воды в клетке на 20 % останавливает метаболизм, причём при высыхании клетки скорость метаболизма прогрессирующе падает, и всякая метаболическая активность прекращается, когда уровень воды в клетке падает на 70 % ниже нормы.

Хотя вода необходима для жизни, структура этой воды в цитозоле изучена слабо, так как методы вроде ядерного магнитного резонанса и спектроскопии дают только лишь общую информацию о структуре воды, не учитывая микроскопические вариации. Даже структура чистой воды понятна плохо из-за склонности воды образовывать водяные кластеры посредством водородных связей.

Классическое представление о воде в клетке таково, что около 5 % воды находится в связанном с другими веществами состоянии (то есть обеспечивает сольватацию), а остальная вода имеет такую же структуру, как чистая вода. Сольватирующая вода неактивна при осмосе и может иметь другие

свойства как растворитель, концентрируя одни молекулы и выталкивая другие. Согласно другой точке зрения, на весь цитозоль огромное влияние оказывает большое количество растворённых макромолекул, и поведение цитозольной воды сильно отличается от поведения чистой воды. Есть предположение, что внутри клетки имеются участки большей или меньшей плотности воды, которые могут оказывать сильное влияние на структуру и функции других частей клетки. Однако результаты ядерного магнитного резонанса противоречат этому предположению, так как, согласно этим результатам, 85 % воды клетки ведёт себя как чистая вода, а остальная вода находится в связанном с макромолекулами состоянии и менее подвижна.

Концентрации ионов в цитозоле коренным образом отличаются от таковых во внеклеточной жидкости, кроме того, в цитозоле содержится больше заряженных молекул, таких как белки и нуклеиновые кислоты.

В отличие от внеклеточной жидкости, цитозоль имеет большую концентрацию ионов калия и меньшую концентрацию ионов натрия. Это различие в концентрации ионов необходимо для осморегуляции. Если бы концентрации ионов внутри клетки и вне её были одинаковы, по законам осмоса вода бы непрерывно поступала в клетку из-за того, что клетка содержит больше макромолекул, чем их имеется снаружи. Ионы натрия выкачиваются из клетки, а ионы калия, напротив, закачиваются ферментом Na^+/K^+ АТФ-азой. Далее ионы калия движутся по градиенту концентрации наружу через калиевые каналы, и выход катионов вызывает отрицательный мембранный потенциал. Чтобы сбалансировать разницу в потенциалах, из клетки также выходят отрицательно заряженные ионы хлора через специальные хлоридные каналы. Утрата ионов натрия и хлора компенсирует осмотический эффект высокой концентрации макромолекул внутри клетки.

Клетки могут выдерживать ещё большую разницу в потенциалах, накапливая в цитозоле осмопротекторы, такие как трегалоза и бетаины.

Трегалоза или микоза – углевод из группы невосстанавливающих дисахаридов. Трегалоза придаёт различным организмам свойство восстановления после длительного высушенного состояния.

Бетаин – триметилглицин – важный продукт в реакциях переметилирования, донор метильных групп. Является цвиттер-ионным соединением. Бетаин является активатором в синтезах фосфолипидов клеточных мембран, может функционировать как альтернативный донор метильных групп в превращении гомоцистеина в метионин. Считается, что через две эти реакции бетаин оказывает влияние на промежуточный метаболизм.

Некоторые из этих молекул помогают клетке выжить при полном высушивании и вхождении в криптобиоз. В этом состоянии цитозоль и осмопротекторы превращаются в стеклоподобное твёрдое вещество, которое предохраняет клеточные белки и мембраны от повреждений при высыхании.

Благодаря низкой концентрации кальция в цитоплазме он может работать как вторичный посредник в кальциевых путях передачи сигнала. В этом случае сигнал, такой как молекула гормона или потенциал действия, открывает кальциевые каналы, по которым кальций устремляется в цитозоль. Уве-

личение концентрации кальция в цитозоле активирует другие сигнальные молекулы, такие как кальмодулин и протеинкиназа С. Другие ионы, такие как ионы хлора и калия, тоже могут выполнять сигнальные роли в цитозоле, но эта роль в настоящее время плохо изучена.

Макромолекулы. Белковые молекулы, которые не прикреплены к мембранам или цитоскелету, растворены в цитозоле. Количество белков в клетках чрезвычайно велико и приближается к 200 мг/мл, белки занимают от 20 до 30 % всей клетки. Однако измерение точного количества белка в цитозоле интактной клетки очень сложно, поскольку некоторые белки слабо связаны с мембранами или органеллами и выходят в раствор при лизисе клеток. Действительно, эксперименты, в которых плазматическая мембрана клетки аккуратно разрушалась под действием сапона без повреждения других мембран, показали, что наружу выходит четверть белков. Такие полуразрушенные клетки были способны, тем не менее, синтезировать белки, если в доступе есть АТФ и аминокислоты, поэтому многие белки цитозоля в действительности связаны с цитоскелетом. Однако идея о том, что большинство белков прочно связаны с сетью, называемой микротрабекулярная решётка, в настоящее время представляется маловероятной.

У прокариот геном содержится в цитозоле в виде структуры, называемой нуклеоидом. Нуклеоид представляет собой неупорядоченную массу ДНК и ассоциированных белков, которые контролируют репликацию и транскрипцию бактериальной хромосомы и плазмид.

Высокая концентрация молекул в цитозоле порождает эффект, известный как макромолекулярное уплотнение, при котором эффективная концентрация молекул повышается, поскольку у них нет места для свободного движения. Этот эффект может вызывать существенные изменения в скорости химической реакции и положении равновесия. Его действие на изменение констант диссоциации особенно важно, поскольку благодаря этому благоприятной становится ассоциация макромолекул, например, сборка белков в мультибелковый комплекс и связывание ДНК-связывающих белков со своей мишенью на молекуле ДНК.

3 Организация и функции цитозоля.

Хотя компоненты цитозоля не отделены друг от друга мембранами, они не смешиваются друг с другом случайным образом, и внутри цитозоля имеется несколько уровней организации, локализирующих молекулы в специальных сайтах цитозоля.

Градиенты концентрации. Хотя мелкие молекулы быстро диффундируют в цитозоле, внутри цитозоля могут поддерживаться специальные градиенты концентрации. Хорошим примером могут служить «кальциевые вспышки» (calcium sparks), которые появляются на короткий период времени в участке рядом с открытым кальциевым каналом. «Вспышки» достигают около 2 мкм в диаметре и длятся всего несколько миллисекунд, хотя некоторые вспышки могут сливаться с образованием более крупных градиентов – «кальциевых волн» (calcium waves). Градиенты концентрации других малых

молекул, таких как кислород и АТФ, могут образовываться вблизи кластеров митохондрий, но механизм их образования менее понятен.

Белковые комплексы. Белки могут ассоциировать друг с другом с образованием белковых комплексов, которые часто содержат набор белков с похожими функциями, например, набор ферментов, катализирующих разные этапы одного и того же метаболического пути. Благодаря этому формируются субстратные каналы (substrate channeling), при которых продукты реакции одного фермента передаются непосредственно следующему ферменту пути без высвобождения в раствор. Субстратные каналы могут сделать метаболический путь более быстрым и эффективным, чем если бы ферменты располагались в цитозоле случайным образом, и предотвращают выход в раствор нестабильных промежуточных продуктов пути. Хотя в большом количестве метаболических путей ферменты плотно связаны друг с другом, существуют и более слабо связанные ферментные комплексы, которые очень трудно изучать вне клетки. Поэтому и значимость этих комплексов для метаболизма остаётся неясной.

Белковые компартменты. Некоторые белковые комплексы содержат внутри полость, изолированную от цитозоля. Примером такого комплекса может служить протеасома. Набор субъединиц протеасомы формирует полый «бочонок», содержащий протеазы, разрушающие цитоплазматические белки. Присутствие в цитоплазме неправильно уложенных белков небезопасно, поэтому «бочонок» покрыт регуляторными белками, которые распознают белки с меткой о деградации (убиквитиновой меткой) и направляют их в протеасому для разрушения.

Другой класс белковых компартментов – бактериальные микрокомпартменты, которые состоят из белковой оболочки, заключающей в себе разнообразные ферменты. Обычно такие компартменты имеют размер 100-200 нм и состоят из плотно подогнанных друг к другу белков. Хорошо изученным примером микрокомпартмента может служить карбоксисома, которая содержит ферменты фиксации CO_2 .

Карбоксисомы (полиэдральные тела) – микрокомпартменты в клетках бактерий, содержащие фиксирующие углерод ферменты. Они представляют собой многогранные однослойные белковые тела полиэдрической формы от 80 до 140 нанометров в диаметре. Они являются основной частью механизма концентрирования CO_2 , что помогает преодолеть неэффективность рибулозодифосфаткарбоксилазы (Рубиско) – главного фермента, лимитирующего скорость фиксации углерода в цикле Кальвина. Эти органеллы обнаружены во всех цианобактериях и многих хемотрофных бактериях, фиксирующих CO_2 .

Цитоскелетное сито. Хотя цитоскелет не является частью цитозоля, присутствие этой сети филаментов ограничивает диффузию крупных частиц внутри клетки. Например, в нескольких экспериментах контрольные частицы размером около 25 нм (почти как рибосома) удалялись из частей цитозоля, расположенных вблизи границы клетки и клеточного ядра. Такие компартменты могут содержать более густую сеть из актиновых филаментов, чем

остальной цитозоль. Эти микродомены могут влиять на расположение крупных частиц вроде рибосомы и других органелл, концентрируя их в одних местах клетки и вытесняя из других.

Функции. У цитозоля нет какой-то одной функции, потому что в нём протекает множество процессов. Среди этих процессов передача сигнала от клеточной мембраны к местам внутри клетки, таким как клеточное ядро и разные органеллы. В цитозоле также происходят многие реакции цитокинеза после распада ядерной оболочки в митозе. Другая значительная роль цитозоля – транспорт метаболитов от мест образования к местам использования. Среди метаболитов относительно простые водорастворимые молекулы, такие как аминокислоты, которые могут быстро диффундировать через цитозоль. Однако гидрофобные молекулы, такие как жирные кислоты или стеролы, могут переноситься в цитозоле с помощью специальных белков, которые транспортируют эти молекулы между мембранами. В составе везикул в цитозоле транспортируются молекулы, захваченные при эндоцитозе или предназначенные для секреции. Везикулы – это маленькие липидные мешочки,двигающиеся по цитоскелету при помощи моторных белков.

У прокариот в цитозоле протекает большинство метаболических процессов, как и у эукариот. Так, у млекопитающих около половины белков локализованы в цитозоле. Показано, что у дрожжей почти все метаболические пути и метаболиты локализованы в цитозоле. Среди метаболических процессов, которые у животных протекают в цитозоле, – синтез белка, пентозофосфатный путь, гликолиз и глюконеогенез. У других организмов эти метаболические пути могут быть локализованы иначе. Например, у растений синтез жирных кислот протекает в хлоропластах, а у апикомплексов – в апикопласте.

Многие белки претерпевают в цитозоле ковалентные модификации. Описано более 100 различных посттрансляционных модификаций белков. Роль большинства этих модификаций не выяснена: некоторые из них случайны и, по-видимому, не имеют функционального значения, но есть и такие, которые важны для жизни клетки, так как они тщательно контролируются специфическими ферментами.

Единственный известный случай гликозилирования в цитозоле клеток млекопитающих – это добавление к белкам N-ацетилглюкозамина.

Однако множество других ковалентных модификаций протекает в первую очередь именно в цитозоле. Некоторые из них стабильны, и необходимы для активности белка, например, ковалентное присоединение кофакторов (биотина, липоевой кислоты или пиридоксальфосфата). Определенные ковалентные модификации, происходящие в цитозоле, обратимы и служат для регуляции активности многих белков.

Некоторые белки цитозоля прикреплены к цитоплазматической стороне мембраны через цепь жирной кислоты. Клетки обладают специальным механизмом для транспорта растворимых белков из цитозоля к мембранам. Такие белки ковалентно связываются с цепью жирной кислоты, ко-

торая затем встраивается в липидный бислой с цитоплазматической стороны, закоривая в нем белок.

Связывание белка с мембраной через жирную кислоту может иметь важные функциональные последствия. Например, онкоген src вируса саркомы Рауса кодирует тирозин-специфическую протеникиназу, которая обычно связывается с мембраной при помощи ковалентно присоединенной цепи миристиновой кислоты (ненасыщенная жирная кислота с 14 углеродными атомами). В такой конфигурации эта протеникиназа превращает нормальную клетку в раковую. Если же присоединению жирной кислоты предшествует замена в молекуле белка N-концевого глицина на аланин, то src-белок сохраняет свою активность как протеникиназа, но остается в цитозоле и не трансформирует клетку.

Некоторые белки цитозоля являются короткоживущими. Кроме сигналов, определяющих место их локализации, клеточные белки имеют сигналы, определяющие время их жизни. Белки подвергаются непрерывному обмену: часть их молекул случайным образом деградирует и замещается новыми копиями. Большинство постоянных белков цитозоля существуют относительно долго – несколько дней. Другие, однако, деградируют гораздо быстрее – иногда через несколько минут после их синтеза. К таким белкам относятся ферменты, катализирующие «быстрые» (определяющие скорость) стадии метаболизма: скорости синтеза этих ферментов обычно регулируются в соответствии с внешними условиями, чтобы метаболизм был эффективен. Другие короткоживущие белки – это продукты таких клеточных онкогенов, как fos или myc, которые, как полагают, играют важную роль в регуляции роста и деления клетки. Поскольку белки указанных типов непрерывно и быстро разрушаются, их концентрации могут быстро меняться при изменении скорости их синтеза. В большинстве случаев для такой регуляции требуется еще и необычно быстрое обновление мРНК, кодирующих эти белки.

Большинство неправильно свернутых, денатурированных и других аномальных белков тоже быстро деградирует в цитозоле. Обычно они распадаются за несколько минут, тогда как нормальные копии этих же белков сохраняются. Аномальные белки возникают в результате ошибок при синтезе, когда в цепь встраивается неправильная аминокислота, или в результате химических повреждений, таких, как окисление боковых цепей некоторых аминокислот. Разнообразные мутантные формы обычных белков также распознаются в качестве аномальных. Сейчас становится все более очевидным, что и аномальные белки и белки, генетически запрограммированные на быструю замену, в конечном счете разрушаются в цитозоле при помощи одного и того же протеолитического механизма.

У эукариот избирательная замена белков происходит при помощи убиквитин-зависимого протеолиза.

Белки, которые необходимо разрушить с помощью протеасом, метятся ковалентным присоединением маленького белка убиквитина к остаткам лизина. Присоединение убиквитина осуществляется тремя ферментами. На первом этапе убиквитин-активирующий фермент, известный как E1, гидро-

лизует АТФ и аденилирует молекулу убиквитина. Далее аденилированный убиквитин переносится на остаток цистеина фермента E1 одновременно с аденилированием второго убиквитина[41]. Аденилированный убиквитин далее переносится на остаток цистеина второго фермента – убиквитин-конъюгирующего фермента (E2). На последнем этапе фермент из обширной группы убиквитинлигаз (E3) распознаёт белок, который нужно разрушить, и переносит на него убиквитин с E2. Таким образом, субстратную специфичность убиквитин-протеасомной системы обеспечивает именно E3. Для распознавания крышечкой протеасомы белок должен нести цепочку из как минимум четырёх мономеров убиквитина (то есть быть полиубиквитинированным).

Сам убиквитин состоит из 76 аминокислотных остатков и получил своё название за повсеместное распространение. Этот белок очень консервативен и выявляется у всех эукариот. Гены эукариот, кодирующие убиквитин, образуют тандемные повторы, вероятно, из-за того, что они очень активно транскрибируются, чтобы поддерживать необходимый уровень убиквитина в клетке. Высказываются предположения, что убиквитин – самый медленно эволюционирующий белок из известных. Убиквитин содержит семь остатков лизина, к которым могут присоединяться другие молекулы убиквитина, благодаря чему возможно образование полиубиквитиновых цепочек разного вида. Протеасома распознаёт полиубиквитиновые цепочки, в которых каждая следующая молекула убиквитина присоединяется к 48-му остатку предыдущего убиквитина, а все остальные участвуют в других клеточных процессах, то есть представляют собой посттрансляционные модификации.

Полиубиквитинированный белок распознаётся 19S-субъединицей, и для его денатурации (то есть разрушения пространственной структуры) необходима энергия АТФ. Далее белок должен попасть внутрь 20S-субъединицы, а именно в её активный центр. Поскольку полость 20S-субъединицы очень узкая и закрыта воротами из N-концов субъединиц α -кольца, субстрат должен быть хотя бы отчасти денатурирован. Кроме того, с него должна быть снята убиквитиновая метка. Переход денатурированного белка внутрь активного центра протеасомы называется транслокацией. Однако порядок, в котором происходит денатурация и деубиквитинирование белков-субстратов, неизвестен. То, какой из этих этапов является скоростью-лимитирующим, зависит от субстрата. Степень денатурации, которая позволяет субстрату попасть в активный центр, также неизвестна, однако третичная структура и некоторые связи внутри белковой молекулы, например, дисульфидные связи, препятствуют разрушению белка. Наличие неупорядоченных участков определённой длины внутри белка или на его конце облегчает эффективное разрушение.

Ворота, сформированные α -субъединицами, препятствуют попаданию внутрь 20S-частицы пептидов, состоящих из более чем четырёх остатков. Перед транслокацией пептида происходит его денатурация, для которой необходима энергия гидролиза АТФ, однако сам процесс транслокации не нуждается в дополнительном источнике энергии. Протеасома может разру-

шать денатурированные белки даже в присутствии негидролизуемого аналога АТФ, но не белки в нативной форме, что свидетельствует о необходимости энергии АТФ только для процесса денатурации. Проход денатурированного субстрата сквозь ворота идёт по типу облегчённой диффузии, если при этом АТФазные субъединицы 19S-частицы связаны с АТФ.

Денатурация глобулярных белков в целом протекает по одному и тому же механизму, хотя некоторые его реакции зависят от аминокислотного состава субстрата. Длинные участки, состоящие из повторяющихся остатков глицина и аланина, подавляют денатурацию, что снижает эффективность протеасомного разрушения, вероятно, из-за того, что гидролиз АТФ и денатурация оказываются разобщены.

Протеолиз субстрата β -субъединицами 20S-частицы происходит по типу треонинзависимой нуклеофильной атаки. Для депротонирования активной гидроксильной группы треонина может быть необходима вода. Дегградация происходит в центральной полости протеасомы, которая образуется при взаимодействии двух β -колец и в норме не выпускает наружу частично разрушенные белки, разрушая субстрат до пептидов из 7-9 остатков (хотя их длина может варьировать от 4 до 25 остатков в зависимости от организма и субстрата).

Хотя в норме протеасома высвобождает очень короткие пептиды, иногда продукты протеасомного разрушения сами по себе являются биологически активными функциональными молекулами. Некоторые транскрипционные факторы, в числе которых компонент комплекса NF- κ B млекопитающих, синтезируются в виде неактивных предшественников, которые становятся активными после убиквитинирования и протеасомной дегградации. Для подобной активации разрыв пептидных связей должен происходить не на концах молекулы, а в её средней части.

Тема 6 Эндоплазматический ретикулум.

- 1 Вакуолярная система внутриклеточного транспорта.
- 2 Гранулярный эндоплазматический ретикулум.
- 3 Гладкий эндоплазматический ретикулум.
- 4 Эндоплазматический ретикулум растительных клеток.

1 Вакуолярная система внутриклеточного транспорта.

Вакуолярная система, состоящая из одномембранных разнообразных по строению и функциям органелл (эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы, эндосомы, секреторные вакуоли), выполняет общую функцию синтеза, перестройки (модификации), сортировки и выведения (экспорта) из клетки биополимеров, главным образом белков-гликопротеидов, а также функцию синтеза мембран этой системы и плазматической мембраны.

Синтез основной массы клеточных белков протекает на полисомах в цитозоле. В зависимости от типа иРНК синтезируются различные белки, направляющиеся строго к своим внутриклеточным компонентам. Это связано с тем, что разные по назначению белки имеют определенные «сигнальные» последовательности аминокислот, как бы адреса, по которым разные белки распределяются в клетке. Так, ядерные белки имеют NLS-сигнальную последовательность, белки митохондрий, так же как белки цитозоля, цитоскелета, пластид и пероксисом, – свою сигнальную последовательность. Характерным является то, что все типы перечисленных белков начинают и заканчивают синтез в цитозоле и затем **посттрансляционно** с помощью внутриклеточных белковых комплексов переносятся «по адресам».

В отличие от этих типов белков, белки экспортного назначения и белки мембран синтезируются на рибосомах, расположенных на мембранах эндоплазматического ретикулума, и попадают внутрь вакуолей, по мере синтеза полипептидной цепи, **котрансляционно**. Затем эти белки уже внутри вакуолей или в составе мембран вакуолей транспортируются внутрь клетки.

Общая схема функционирования вакуолярной системы. Мембранные везикулярные компоненты объединены в единую функциональную систему. Все они имеют общее свойство: они представляют собой одномембранные компартменты, имеющие один общий источник образования (гранулярный эндоплазматический ретикулум). Для всей вакуолярной системы характерны кооперативность ее функционирования, взаимосвязь и последовательность этапов образования, перестройки, транспорта и экспорта синтезированных белков. Функции отдельных компонентов заключаются в следующем:

1. Гранулярный эндоплазматический ретикулум: котрансляционный синтез растворимых внутривакуолярных белков (секреторные белки, гидролазы лизосом и др.); котрансляционный синтез нерастворимых белков, входящих в состав всех мембран вакуолярной системы; первичная модификация растворимых и нерастворимых (мембранных) белков, их соединение с олигосахаридами – первичное гликозилирование синтезированных белков, образование гликопротеидов; синтез мембранных липидов и их встраивание в мембрану – «сборка мембран».

2. Отделение вакуолей, содержащих новообразованные продукты, и их переход в *цис*-зону аппарата Гольджи (ЭПР–АГ-комплекс).

3. *Цис*-зона аппарата Гольджи: вторичная модификация гликопротеидов; синтез полисахаридов (гемицеллюлоза растений) и гексозаминогликанов.

4. Промежуточная зона аппарата Гольджи: дополнительные модификации гликопротеидов, трансгликозилирование.

5. *Транс*-Гольджи сеть: сортировка секреторных и лизосомных белков; отделение вакуолей.

6. Экзоцитоз (секреция).

7. Экзоцитоз постоянный.

8. Отделение первичных лизосом с гидролазами.

9. Эндоцитоз.
10. Вторичная лизосома.
11. Рециклизация рецепторов гидролаз.
12. Рециклизация рецепторов плазматической мембраны.
13. Гладкий эндоплазматический ретикулум: синтез и конденсация липидов, депонирование ионов Ca^{2+} , синтез и ресорбция гликогена и др.
14. Транспорт в зону аппарата Гольджи.
15. Транспорт от аппарата Гольджи в эндоплазматический ретикулум.

2 Гранулярный эндоплазматический ретикулум

Отличительной чертой вакуолярной системы является то, что синтезированные полимеры и продукты их превращений отделены от собственно цитоплазмы, от цитозоля, и становятся изолированными от цитозольных ферментов. Такое разобщение очень важно для одновременного протекания в клетке многих синтетических процессов.

Открытие этой внутриклеточной мембранной структуры произошло на заре электронной микроскопии. В 1945 г. К.Р. Портер с сотрудниками изучал фибробласты цыплят с помощью электронного микроскопа. В это время еще не была разработана техника ультратонких срезов, поэтому авторы просматривали клетки на просвет, целиком. В световом микроскопе в фибробластах после фиксации и окраски видно, что периферия клеток (эктоплазма) окрашивается слабо, в то время как центральная часть клеток (эндоплазма) хорошо воспринимает красители. Портер увидел в электронном микроскопе, что зона эндоплазмы заполнена большим числом мелких вакуолей и каналов, соединяющихся друг с другом и образующих что-то наподобие рыхлой сети (ретикулум). Было видно, что стопки этих вакуолей и канальцев ограничены тонкими мембранами. Так был обнаружен **эндоплазматический ретикулум**, или **эндоплазматическая сеть**. Позднее, в 1950-е годы, при использовании метода ультратонких срезов удалось выяснить структуру этого образования и обнаружить его неоднородность. Самым же главным оказалось, что эндоплазматический ретикулум (ЭПР) встречается практически у всех эукариот.

Подобный электронно-микроскопический анализ позволил выделить два типа ЭПР: гранулярный (шероховатый) и гладкий.

На ультратонких срезах гранулярный ЭПР представлен замкнутыми мембранами, которые образуют на сечениях вытянутые мешки, цистерны или же имеют вид узких каналов. Ширина полостей цистерн может очень варьировать в зависимости от функциональной активности клетки. Наименьшая ширина их может составлять около 20 нм, в расширенном виде они достигают диаметра в несколько микрометров. Отличительной чертой этих мембран является то, что они со стороны гиалоплазмы покрыты мелкими (около 20 нм) темными, почти округлыми частицами – гранулами.

Впервые эти гранулы были описаны Дж. Паладе (гранулы Паладе), который доказал, что они представляют собой рибонуклеопротеиды. Теперь хорошо известно, что эти гранулы являются не чем иным, как рибосомами, связанными с мембранами ЭПР. На мембранах рибосомы расположены в ви-

де полисом (множество рибосом, объединенных одной информационной РНК), имеющих вид плоских спиралей, розеток или гроздей. Это работающие, синтезирующие белок рибосомы, которые прикрепляются к мембранам своей большой субъединицей.

Гранулярный (или шероховатый, в отличие от гладкого) ЭПР в клетках может быть представлен или в виде редких, разрозненных мембран, или же в виде локальных скоплений таких мембран (эргастоплазма). Первый тип гранулярного ЭПР характерен для недифференцированных клеток или клеток с низкой метаболической активностью. Эргастоплазма характерна для клеток, активно синтезирующих секреторные белки. Так, в клетках печени гранулярный ЭПР собран в отдельные зоны (тельца Берга), так же как в некоторых нервных клетках (тифоид). В клетках поджелудочной железы гранулярный ЭПР (эргастоплазма) в виде плотно упакованных друг около друга мембранных цистерн занимает базальную и околоядерную зоны клетки.

Наличие полисом на мембранах однозначно говорит о том, что гранулярный ЭПР является важным местом синтеза белков.

Количество рибосом на ЭПР четко связано с его синтетической активностью. Так, на мембранах ЭПР в клетке несекретирующей молочной железы связывается до 25% клеточных рибосом, после стимуляции лактации их количество там возрастает до 70%. Падение числа рибосом на мембранах ЭПР может происходить при дифференцировке клеток. Например, при частичном удалении печени у грызунов резко стимулируется деление клеток в оставшейся части. Это сопровождается редукцией гранулярного ЭПР и обеднением его рибосомами: число свободных рибосом, не связанных с мембранами, достигает 40%. Такое же уменьшение числа рибосом, связанных с ЭПР, наблюдается при различных патологических состояниях клеток (при алкогольном хроническом отравлении происходит уменьшение числа связанных рибосом на 25%).

Рибосомы, связанные с мембранами ЭПР, участвуют в синтезе белков, выводимых из данной клетки, – «экспортируемых» белков.

Действительно, большое число клеток многоклеточных организмов, богатых гранулярным ЭПР, синтезирует и выводит огромное количество белков. Например, клетки ацинусов поджелудочной железы синтезируют и выделяют массу белков-ферментов, участвующих в расщеплении пищи в кишечном тракте (протеиназы, липазы, нуклеазы и др.); клетки печени синтезируют альбумины крови; плазмациты – γ -глобулины; клетки молочной железы – казеин; слюнной железы – пищеварительные ферменты, амилазу и РНКазу и т. д. Такая же картина наблюдается у растений: железистые клетки, выделяющие белковые вещества, богаты гранулярным ЭПР. Другими словами, у многоклеточных организмов клетки, богатые эргастоплазмой, синтезируют выводимые из этих клеток белки, необходимые или для работы других клеток, или для выполнения общеорганизменных функций (пищеварительные ферменты, белки плазмы крови, гормоны и др.).

У одноклеточных также можно наблюдать гранулярный ЭПР, который, по-видимому, участвует в синтезе выводимых экспортируемых белков. Сре-

ди таких белков могут быть не только ферменты внеклеточного пищеварения.

Следовательно, роль гранулярного ЭПР заключается не просто в участии в синтезе белков на рибосомах его мембран, но и в процессе сегрегации, обособления этих синтезированных белков, в их изоляции от основных функционирующих белков клетки. Эта функциональная особенность гранулярного ЭПР очень важна, так как она связана с целым рядом процессов, приводящих к выделению таких белков с помощью вакуолей аппарата Гольджи.

Котрансляционный транспорт растворимых белков. Пути синтеза белков на рибосомах ЭПР можно представить в следующем виде. Еще в гиалоплазме происходит связывание иРНК, кодирующей секреторный белок, с рибосомой и начинается синтез белковой цепи. Важным является то, что сначала синтезируется «сигнальная последовательность», богатая гидрофобными аминокислотами. В нее входят 16-30 аминокислот. Эта «сигнальная последовательность» в цитозоле узнается и происходит ее связь с «узнающей сигнал частицей» (SRP-частица), состоящей из одной молекулы 7S РНК и шести различных полипептидных цепей. SRP-частица связывается после узнавания сигнального конца синтезирующейся молекулы белка с рибосомой, что приводит к полной остановке синтеза белка. На поверхности же мембраны ЭПР, обращенной к гиалоплазме, расположены интегральные рецепторные белки, соединяющиеся с SRP-частицами. В результате SRP-частица связывается со своим рецептором, одновременно она осуществляет связь данной рибосомы с мембраной ЭПР.

Такая «заякоренная» рибосома с SRP-частицей, блокирующей дальнейший рост полипептидной цепи, взаимодействует с большим белковым канальным комплексом – **транслоконом**. После связывания рибосомы с транслоконом происходит отделение SRP-частицы и синтезированный первичный пептид входит в канал диаметром около 2 нм, который образует транслокон. После этого возобновляется синтез полипептида, он удлиняется и его сигнальная последовательность вместе с растущей цепочкой оказываются внутри полости цистерны ЭПР. Таким образом, синтезируемый белок проходит сквозь мембрану ЭПР во время его синтеза, т.е. **котрансляционно**, одновременно с его трансляцией. Внутри полости ЭПР с помощью фермента (сигнальной пептидазы) сигнальная последовательность отщепляется. После окончания синтеза вся белковая молекула оказывается в полости ЭПР, и в это время рибосома отделяется от транслокона и диссоциирует. После этого в транслоконе канал закрывается. Во время трансмембранного переноса растущей белковой цепи происходит ее связь с олигосахаридами (гликозилирование). В полости цистерн ЭПР белки претерпевают ряд дополнительных изменений: образуются дисульфидные связи, происходит их правильное сворачивание, а также сборка четвертичной структуры белков. Только белки с правильной конформацией в дальнейшем будут переноситься в зону аппарата Гольджи.

Большинство белков, синтезированных в гранулярном ЭПР, относится к гликопротеидам. Связывание синтезирующейся белковой цепи с олигосахаридами происходит также котрансляционно. При этом на белковую молекулу переносится готовый блок олигосахаридов, который связывается с аспарагиновыми остатками белковой молекулы. Этот олигосахаридный комплекс содержит две молекулы N-ацетилглюкозамина, девять молекул маннозы и три молекулы глюкозы и связан со специальным липидом долихолом на внутренней поверхности мембраны ЭПР, смотрящей в просвет вакуоли ЭПР. По мере транслкации белковой цепи во время ее синтеза каждый аспарагиновый остаток связывается с олигосахаридным комплексом с помощью фермента, являющегося интегральным белком мембран ЭПР. Первичной модификации – гликозилированию, подвергаются как растворимые, так и мембранные белки, синтезирующиеся в ЭПР.

Синтез клеточных мембран. Итак, на рибосомах ЭПР происходит синтез основной части мембранных белков клетки. Синтез этих белков отличается от синтеза секреторных тем, что по мере синтеза мембранные белки не освобождаются от мембран, а остаются в их составе, становясь, таким образом, или трансмембранными интегральными белками, или полуинтегральными.

В ЭПР происходят синтез и сборка липидов самих мембран, включая фосфолипиды и холестерол. Ферменты, участвующие в синтезе липидов, встроены в мембрану ЭПР со стороны цитозоля, и синтез липидов происходит на мембране там же. Таким образом, синтезированные липиды встраиваются в мембрану ЭПР в липидный слой со стороны цитоплазмы, но переносятся на внутреннюю сторону с помощью переносчиков фосфолипидов. Билипидный слой мембраны растет, увеличивая поверхность вакуоли или цистерны ЭПР. Этот процесс идет одновременно с синтезом интегральных мембранных белков, так что липопротеидная мембрана, как таковая, строится и растет за счет двух процессов: синтеза и встраивания липидов, а также синтеза и интеграции мембранных белков. Необходимо подчеркнуть, что такое «зарождение» мембран вакуолярной системы происходит только в гранулярном ЭПР.

Сегодня можно сказать, что важнейшей функцией гранулярного ЭПР, вне зависимости от специализации или тканевой принадлежности клеток, является функция образования, построения клеточных мембран, которая заключается в том, что элементы гранулярного ЭПР синтезируют все мембранные белки, синтезируют липидный компонент мембран, но, кроме того, именно в гранулярном ЭПР происходит сборка липопротеидных мембран.

Интегральные белки мембран эндоплазматического ретикулума, мембран аппарата Гольджи, секреторных вакуолей и плазматической мембраны имеют одно происхождение: они синтезируются и встраиваются в мембрану в гранулярном ЭПР.

Следовательно, гранулярный эндоплазматический ретикулум представляет собой настоящую «фабрику» клеточных мембран. От того, какие интегральные и периферические белки будут синтезироваться на рибосомах

ЭПР и какие фосфолипиды будут здесь синтезироваться и включаться в мембрану, зависит тип образующегося нового участка мембраны: будет ли он компонентом гладкого ЭПР, мембран аппарата Гольджи, лизосомы или плазматической мембраны.

Транспорт между эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи. Дистальные участки гранулярного ЭПР, которые расположены в зоне, приближенной к аппарату Гольджи (АГ), теряют рибосомы и образуют мембранные выступы, от которых отпочковываются мелкие вакуоли, содержащие синтезированные в ЭПР белки. Эта зона называется ЭПР–АГ-промежуточный компартмент (ERGIC), или везикулярно-тубулярная группа (VTC). Вакуоли, отщепившиеся в этой зоне от ЭПР, – транзитные элементы, покрыты окаймляющим белковым слоем, аналогичным клатриновому слою эндоцитозных вакуолей.

Отделившиеся от ЭПР вакуоли становятся окаймленными пузырьками, затем они теряют белковую оболочку, сливаются друг с другом и транспортируются с помощью микротрубочек к *цис*-зоне аппарата Гольджи, где и сливаются с его мембранами. Адресность и точность слияния любых вакуолей с другими мембранами определяются специальными белками SNARE (рецептор белков, участвующих в прикреплении и слиянии мембран).

SNARE (soluble NSF attachment receptor) – большая группа белков, осуществляющих слияние внутриклеточных транспортных везикул с клеточной мембраной (экзоцитоз) или органеллой-мишенью, такой как лизосома. Насчитывается около 60 белков SNARE. Белки группы делятся на две функциональные категории: везикулярные белки (v-SNARE) и белки принимающей органеллы (t-SNARE). Новая структурная классификация подразделяет группу на R-SNARE и Q-SNARE.

После деполимеризации окаймляющего слоя COP II на поверхности вакуоли открываются интегральные мембранные белки – V-SNARE. Эти белки специфичны для каждого типа вакуолей, направляя их к тому участку, где они должны слиться с другими мембранами. Там они связываются с мембранными белками T-SNARE и SNAP25. В местах взаимодействия этих двух групп белков и происходит слияние мембран. Таким образом происходит транспорт синтезированных белков в зону аппарата Гольджи.

3 Гладкий (агранулярный) эндоплазматический ретикулум

Гладкий ЭПР представляет собой часть мембранной вакуолярной системы. В морфологическом отношении он также представлен мембранами, образующими мелкие вакуоли и трубки, каналцы, которые могут ветвиться, сливаться друг с другом. В отличие от гранулярного на мембранах гладкого ЭПР нет рибосом. Диаметр вакуолей и каналцев гладкого ЭПР обычно около 50-100 нм. Выраженность сети из этих мембранных элементов может быть неодинаковой как для различных клеток, так и внутри одной клетки. Большей частью такие гладкие каналцы образуют скопления, или зоны. Так, в клетках эпителия кишечника гладкий ЭПР локализуется главным образом в апикальной, верхней части клетки, вблизи всасывающей поверхности. В

клетках печени зоны гладкого ЭПР часто связаны с местами отложения гликогена. Встречаются клетки, где гладкий ЭПР занимает большую часть объема цитоплазмы (например, в интерстициальных клетках семенника, в растительных железистых терпеноидогенных клетках).

Неоднократно была установлена непрерывность перехода между гладкой формой ЭПР и гранулярной его формой. Часто можно наблюдать, как цистерна гранулярного ЭПР теряет на своей поверхности рибосомы и становится «гладкой» (рис. 191). При этом такой участок цистерны делается неровным, начинает как бы ветвиться, переходя в трубочки и каналцы гладкого ЭПР. Этот участок часто называют переходным из-за того, что именно здесь образуются и отделяются транспортные пузырьки, переносящие ново-синтезированные белки и липиды к зоне аппарата Гольджи.

Гладкий ЭПР является вторичным по отношению к гранулярному ЭПР, т.е. происходит из последнего. Так, у крысенка перед рождением в печеночных клетках образуется большое количество гранулярного ЭПР, но сразу после рождения появляется масса трубочек гладкого ЭПР. Ряд биохимических, морфологических и радиоавтографических данных приводит к заключению, что гранулярный ЭПР увеличивается в объеме, растет за счет синтезирующихся мембран, которые остаются в его составе, или, потеряв рибосомы, превращается в гладкий ЭПР. Например, при использовании радиоактивных предшественников мембранных компонентов и при получении отдельных фракций гладкого и гранулярного ЭПР было обнаружено, что при интенсивном разрастании гладкого ЭПР метка вначале появляется в гранулярном ЭПР и только спустя некоторое время – в гладком ЭПР.

Несмотря на топографическую связь и общность происхождения, эти два представителя ЭПР резко отличаются друг от друга в функциональном отношении. Как уже указывалось, отсутствие рибосом на гладком ЭПР прямо говорит о его непричастности к синтезу белков. Деятельность гладкого ЭПР скорее можно связать с метаболизмом липидов и некоторых внутриклеточных полисахаридов.

Участие гладкого ЭПР в синтезе триглицеридов и липидов было показано при изучении процессов всасывания жиров клетками кишечного эпителия. В просвете кишечника жиры распадаются до жирных кислот и моноглицеридов. В апикальных участках клеток кишечника видно при этом накопление осмиофильных гранул внутри просветов каналцев гладкого ЭПР. Это связано с ресинтезом новых триглицеридов из поступивших в клетку предшественников с образованием липидов и липопротеидов, которые с помощью вакуолей аппарата Гольджи выводятся из клеток и попадают в лимфатическое русло.

Мелкие капли липидов иногда в комплексе с белками можно наблюдать и в клетках печени, причем эти капли встречаются в полостях гладкого ЭПР около зоны аппарата Гольджи. Если крысам давать вещества, приводящие к образованию отложений больших капель жира (жировая дистрофия), то первые мелкие липидные капельки появляются в гладком ЭПР, но иногда и в полостях гранулярного ЭПР.

Гладкий ЭПР особенно в большом объеме встречается в клетках, секретирующих стероиды, в частности в клетках коркового вещества надпочечника. Основные ферменты синтеза стероидов были обнаружены во фракциях микросом, образовавшихся при разрушении гладкого ЭПР из этих клеток. Гладким ретикулумом богаты интерстициальные клетки семенников, участвующие в синтезе стероидных гормонов, а также клетки саленных желез в самом начале накопления жира.

Тесная топографическая связь гладкого ЭПР с отложениями гликогена (запасного внутриклеточного полисахарида животных и грибов) в гиалоплазме различных клеток говорит о его участии в метаболизме углеводов. В клетках печени, в мышечных волокнах гликоген откладывается в зонах, свободных от гранулярных цистерн ЭПР, но богатых пузырьками и канальцами гладкого ЭПР. Такие зоны гладкого ЭПР могут увеличиваться в размере как при исчезновении гликогена (например, при голодании), так и при увеличении его отложений.

В печени часто увеличение зон гладкого ЭПР связано с рядом патологических процессов в клетках. Так, при барбитуратных отравлениях, при действии различных канцерогенов или ядовитых веществ, при действии больших доз гормональных препаратов клетки печени теряют характерную для них базофилию цитоплазмы, в них падает содержание РНК и в цитоплазме появляются оксифильные зоны. В электронном микроскопе эти зоны представлены скоплениями гладкого ЭПР. Это явление связано с тем, что в этих местах происходят процессы деградации различных вредных веществ, процессы метаболической дезактивации, которые осуществляются целым рядом окислительных ферментов, из которых наиболее известен белок, называемый цитохром Р-450. Этот белок участвует в присоединении гидроксильной группы к различным, потенциально опасным водонерастворимым углеводородам или к липофильным ядовитым веществам (например, четыреххлористый углерод), попадающим в мембранный бислой. Здесь же другие ферменты добавляют к этим гидроксильным группам отрицательно заряженные молекулы (сульфат, глюкуроновая кислота), что делает метаболиты или вредные липофильные вещества растворимыми в воде, из-за чего они могут выводиться из организма вместе с мочой. Разросшийся гладкий ЭПР в клетках печени после удаления токсического вещества уничтожается, вероятно, с помощью лизосом – автофагосом.

В поперечно-полосатых мышцах вакуоли и каналы гладкого ЭПР (саркоплазматический ретикулум) окружают каждую миофибриллу. Здесь ЭПР выполняет специальную функцию депонирования ионов кальция. В присутствии АТФ он может активно поглощать и накапливать ионы кальция, что приводит к расслаблению мышечного волокна. Белки кальциевого насоса являются интегральными белками мембран саркоплазматического ретикула.

4 Эндоплазматический ретикулум растительных клеток.

Эндоплазматический ретикулум (ЭР) представляет собой непрерывную трехмерную сеть канальцев, составленную из пластинчатых и трубчатых ци-

стерн. Канальцы ЭР образованы одинарной мембраной (мембраной ЭР), на которую приходится более половины общего количества всех мембран клетки. Канальцы лежат под плазмалеммой, пронизывают всю цитоплазму и соединяются с ядерной оболочкой. Несмотря на многочисленные складки и изгибы, мембрана ЭР образует непрерывную поверхность, ограничивающую единое внутреннее пространство – называемое полостью, или люменом ЭР. Оно часто занимает более 10% общего объема клетки. Таким образом, полость ЭР отделена от цитозоля только одинарной мембраной. Обмен молекул между ЭР и цитозолем происходит через мембрану преимущественно по мономолекулярному механизму. Особенностью ЭР растительной клетки является то, что его полость простирается не только внутри отдельной клетки, но за счет плазмодесм – и вне ее границ.

Эндоплазматический ретикулум, расположенный под плазматической мембраной, носит название кортикального. Он характеризуется практически неподвижным фиксированным расположением спиралеобразных участков сети и канальцев со слепыми окончаниями. Кортикальный ЭР может выполнять функции неподвижного фиксатора для актиновых филаментов цитоскелета, которые осуществляют движение цитоплазмы. Трубочатые элементы ЭР, находящиеся во внутренних слоях клетки, характеризуются большей подвижностью. В отличие от животных клеток, где реорганизация ЭР цистерн и канальцев зависит от микротрубочек цитоскелета, движение ЭР в растительных клетках, по-видимому, зависит от актино-миозиновой системы.

Мембранная система ЭР – наиболее универсальная и адаптивная органелла эукариотических клеток. Эта гибкость обусловлена большой мембранной поверхностью, способной включать различные наборы интегральных и периферийных белков.

Основные функции ЭР – синтез, обработка и сортировка белков, гликопротеидов и липидов. На мембранах ЭР начинается синтез белков, предназначенных для транспорта по секреторному пути. Здесь же синтезируются большинство липидов для мембран митохондрий и пероксисом. ЭР является также важным участником сигнальных систем клетки, регулируя цитозольную концентрацию кальция.

Принято выделять две области ЭР – шероховатый и гладкий ЭР, однако в последнее время в ЭР было идентифицировано несколько специализированных областей, отличных «классических». В частности, в растительных клетках можно выделить зону «шлюза» между ЭР и оболочкой ядра, области фиксации актиновых филаментов, формирования белковых и масляных тел, образования вакуолей, контактов с плазмалеммой, вакуолью и с митохондриями; области плазмодесм и рециркуляции липидов.

Шероховатый и гладкий ЭР существуют в динамическом равновесии. Они различаются соответственно по присутствию или отсутствию рибосом на мембранной поверхности. Гладкий ЭР состоит из трубочатых канальцев, а шероховатый ЭР – из уплощенных цистерн.

Исходной структурой ЭР являются трубочатые канальцы, характерные для гладкого ЭР. При формировании шероховатого ЭР появляются чисто

пространственные ограничения, связанные с прикреплением на мембраны ЭР рибосом (полисом). Это приводит к уплощению трубчатых канальцев. Таким образом, различия между шероховатым и гладким ЭР обусловлены закреплением рибосом на мембранах ЭР. Закрепление первой рибосомы на ЭР способствует образованию рядом дополнительных рецепторов и каналов транслокации. Это приводит к закреплению новых рибосом и локальному расширению шероховатого ЭР возле данной области, т.е. фактически происходит самосборка шероховатого ЭР.

Шероховатый ЭР – место отправления белков по секреторному пути. Большинство растворимых белков, предназначенных для этого, синтезируются в виде предшественников с транзитным N-концевым сигнальным пептидом для мембраносвязанных полисом. Полипептиды котрансляционно транспортируются в полость ЭР, после чего сворачиваются и подвергаются определенным модификациям. Прежде всего соответствующая пептидаза отщепляет сигнальный пептид. Сворачивание белков в большой степени осуществляется за счет образования дисульфидных мостиков между остатками цистеинов. Правильность положения образования этих мостиков контролирует фермент протеин-дисульфидизомераза.

Наиболее важной модификацией белков, поступивших в ЭР, является их N-гликозилирование. Исходно в ЭР формируются 14-членные олигосахариды определенной структуры. Они присоединены к находящемуся в мембране ЭР долихолу – изопреноиду, состоящему из различного (от 14 до 24) числа изопреновых единиц. За счет долихола олигосахариды фиксируются на мембране и «ожидают» белки, поступающие в просвет ЭР. По мере поступления белка специфичные трансферазы переносят олигосахаридный фрагмент от долихола на определенный остаток аспарагина белка. Олигосахарид, используемый для N-гликозилирования белков ЭР, в растительной и животной клетке имеет различную структуру.

Правильное сворачивание растущей полипептидной цепи обеспечивают шапероны. Эти резидентные белки фиксируют растущий полипептид и направляют процесс сворачивания, ограничивая нежелательные взаимодействия. Наиболее важное значение имеют люмен-связанный шаперон Bip. Белки, которые не в состоянии сформировать правильную трехмерную структуру, в конечном счете подвергаются деградации. Некоторые белки, не свернутые должным образом в ЭР, возвращаются в цитозоль обратным переносом через мембрану ЭР.

Если белок, поступивший в ЭР, имеет C-концевой сигнальный тетрапептид KDEL, он остается в ЭР, а при отсутствии этой последовательности отправляется в аппарат Гольджи.

Функциональные свойства гладкого ЭР растительных клеток изучены недостаточно. По-видимому, одна из основных его функций – синтез липидных молекул. Мембраны гладкого ЭР обогащены ферментами биосинтеза глицеролипидов, изопреноидов, фенилиропаноидов, флавоноидов, восков. Косвенное свидетельство синтеза подобных соединений ферментами, расположенными в ЭР, получено при изучении ультраструктуры железистых кле-

ток, осуществляющих синтез и секрецию масел и флавоноидов. Эти клетки содержат обширные сети гладких ЭР мембран.

Участки формирования белковых тел. Запасные белки семян синтезируются в течение развития семени и служат основным источником аминокислот при прорастании и развитии проростка. Этот процесс различен у разных видов растений. Хлебные злаки синтезируют два класса запасных белков. Водорастворимые глобулины синтезируются рибосомами шероховатого ЭР и затем транспортируются через АГ к запасующим вакуолям. Более гидрофобные проламины кукурузы, сорго и пшеницы образуют белковые тела непосредственно в полости шероховатого ЭР. При этом синтезируемые молекулы белка остаются связанными с V_{ip} в течение длительного периода времени, а затем самоорганизуются в большие агрегаты. Эти агрегаты могут увеличиваться за счет «поимки» полисом, синтезирующих проламинов. Полисомы, образующие другие полипептиды, агрегатами не захватываются.

Участки формирования масляных тел. Триацилглицериды – запасющие масла семян, которые на ранних стадиях прорастания обеспечивают их энергией и липидами – строительными блоками образующихся мембран. Эти молекулы жиров синтезируются ЭР-связанными ферментами и запасаются в виде сферических масляных тел. Размер масляных тел зависит от вида растения и варьирует от 0,6 до 2,0 мкм.

Масляные тела возникают путем накопления молекул триацилглицеридов в специальных местах ЭР. Эти места определены присутствием олеозинов – интегральных белков мембран массой 16 – 25 кДа. Олеозины имеют «кнопкоподобную» структуру и подобно кнопкам вставлены в ЭР мембраны масляных тел. «Острие» кнопки состоит из 72 гидрофобных остатков аминокислот, организованных в форме антипараллельного β -скрученного домена, который присоединен своими обоими концами к «шляпке». Присутствие олеозинов, повидимому, заставляет вновь синтезируемые молекулы триацилглицеридов накапливаться между биослоями мембраны и образовывать сферические масляные тела, которые затем отпочковываются от ЭР. Каждое масляное тело окружено фосфолипидным монослоем, который содержит, помимо плотно упакованных олеозинов, и другие характерные белки. Размер масляных тел зависит от соотношения триацилглицеридов и олеозинов.

Область рециркуляции липидов. В плазмалемму постоянно встраиваются везикулы, отшнуровывающиеся от АГ, что приводит к увеличению ее поверхности. Обычно избыточный материал плазматических мембран возвращается внутрь клетки за счет эндоцитоза. Однако в растительных клетках эндоцитоз значительно осложнен, так как тургорное давление препятствует впячиванию плазмалеммы в цитозоль и формированию везикул. Оказалось, что возврат (рециркуляция) липидов в растительной клетке происходит путем их перемещения из плазмалеммы в ЭР. Этот процесс происходит в специальных областях, где плазматическая мембрана образует складку и пальцеподобный контакт с ЭР. Поскольку в этих местах не происходит слияния между ЭР и плазматической мембраной, предполагается, что рециркуляция липидов в зоне контакта происходит по мономолекулярному механизму.

Трубчатые участки ЭР являются структурной основой формирования плазмодесм. Плазмодесмы обеспечивают взаимосвязь между клетками растения. Первичные плазмодесмы образуются в течение цитокинеза, когда пакеты трубчатого ЭР «захватываются» строящейся срединной пластинкой, которая формирует новую клеточную стенку. Вторичные плазмодесмы образуются после формирования клеточных стенок. Механизм их образования включает ограниченное растворение клеточной стенки и формирование мостов между плазматической мембраной и ЭР смежных клеток.

Установлена физическая непрерывность как плазматических мембран двух смежных клеток, так и центрального цилиндра сжатой мембраны ЭР. При использовании флуоресцентных мембранных липидных зондов было показано, что от ЭР одной клетки к ЭР смежной клетки быстро диффундируют только те липиды, которые преобладают в мембранах ЭР. Липиды, характерные исключительно для наружного слоя плазматической мембраны, через плазмодесмы не передвигаются, несмотря на физическую непрерывность плазматической мембраны соседних клеток.

Пространство между плазматической мембраной и центральным ЭР цилиндром называется «эндоплазматическим кольцом». Оно содержит специобразные линкерные белки, ограничивающие размер молекул, которые могут проходить по плазмодесме между клетками.

До недавнего времени плазмодесмы в целом рассматривали как функциональные эквиваленты щелевых контактов животных клеток, так как эксперименты с мечеными молекулами показали, что эти два межклеточных перехода имеют сходные «пропускные» пределы для транспортируемых молекул – около 900 Да. Однако, по-видимому, правильнее сравнивать их с ядерными порами, прежде всего из-за способности достаточно быстро увеличивать степень открытия. При этом становится возможным проход через плазмодесмы больших молекул, в том числе белков, вирусных нуклеопротеидных комплексов и даже интактных вирионов. Транспорт вирусов через плазмодесмы – принципиальный момент в инфекционном процессе. Это свойство растительных вирусов позволило идентифицировать и охарактеризовать вирусные белки «движения», которые обладают способностью увеличивать «пропускной» предел плазмодесм, позволяя вирусу распространяться по всему растению.

Тема 7 Аппарат Гольджи

- 1 Строение аппарата Гольджи
- 2 Основные клеточные процессы, связанные с аппаратом Гольджи.
- 3 Растительный аппарат Гольджи.

1 Строение аппарата Гольджи

Аппарат (комплекс) Гольджи – мембранная структура эукариотической клетки, органелла, в основном предназначенная для выведения веществ, син-

тезированных в эндоплазматическом ретикулуме. Аппарат Гольджи назван в честь итальянского учёного Камилло Гольджи, впервые обнаружившего его в 1898 году.

Комплекс Гольджи представляет собой стопку дискообразных мембранных мешочков (цистерн), несколько расширенных ближе к краям, и связанную с ними систему пузырьков Гольджи. В растительных клетках обнаруживается ряд отдельных стопок (диктиосомы), в животных клетках часто содержится одна большая или несколько соединённых трубками стопок.

В комплексе Гольджи выделяют 3 отдела цистерн, окружённых мембранными пузырьками: цис-отдел (ближний к ядру); медиальный отдел; транс-отдел (самый отдалённый от ядра).

Эти отделы различаются между собой набором ферментов. В цис-отделе первую цистерну называют «цистерной спасения», так как с её помощью рецепторы, поступающие из промежуточной эндоплазматической сети, возвращаются обратно (это требует наличия сигнальной последовательности «лизин-аспарагин-глутамин-лейцин» и происходит благодаря связыванию этих белков с мембранными рецепторами в цис-Гольджи). Фермент цис-отдела: фосфогликозидаза (присоединяет фосфат к углеводу маннозе). В медиальном отделе находится 2 фермента: манназидаза (отщепляет маннозу) и N-ацетилглюкозаминтрансфераза (присоединяет определённые углеводы – гликозамины). В транс-отделе находятся ферменты пептидаза (осуществляет протеолиз) и трансфераза (осуществляет переброс химических групп).

Аппарат Гольджи обычно расположен около клеточного ядра, а в животных клетках он часто находится вблизи центросомы, или клеточного центра. Каждая стопка Гольджи (у растений называемая диктиосомой) обычно содержит от четырех до шести цистерн, имеющих, как правило, диаметр около 1 мкм. Число стопок Гольджи в клетке в значительной степени зависит от ее типа: некоторые клетки содержат одну большую стопку, тогда как в других имеются сотни очень маленьких стопок.

Со стопками Гольджи всегда ассоциирована масса мелких (диаметром ~ 60 нм) ограниченных мембраной пузырьков. Они группируются на стороне, примыкающей к ЭР, а также по периферии стопки вблизи расширенных краев каждой цистерны. Полагают, что эти пузырьки (пузырьки Гольджи) переносят белки и липиды в аппарат Гольджи, транспортируют их из него и между остальными цистернами. Многие пузырьки являются окаймленными и покрыты клатрином или другим специфическим белком. Часто можно видеть, как такие окаймленные пузырьки отшнуровываются от цистерн Гольджи.

В дистальном, или транс-участке диктиосом к последней мембранной плоской цистерне примыкает участок, состоящий из трубчатых элементов и массой мелких вакуолей, часто имеющих фибриллярную опушенность по поверхности со стороны цитоплазмы – это опушенные, или окаймленные, пузырьки такого же типа, как и окаймленные пузырьки при пиноцитозе. Это – так называемая транс-сеть аппарата Гольджи (TGN), где происходят разделение и сортировка секретируемых продуктов. Еще дистальнее располагается

группа более крупных вакуолей – это уже продукт слияния мелких вакуолей и образования секреторных вакуолей.

Аппарат Гольджи асимметричен – цистерны, располагающиеся ближе к ядру клетки (цис-Гольджи), содержат наименее зрелые белки. К этим цистернам непрерывно присоединяются мембранные пузырьки – везикулы, отпочковывающиеся от гранулярного эндоплазматического ретикулума (ЭПР), на мембранах которого и происходит синтез белков рибосомами. Перемещение белков из эндоплазматической сети (ЭПС) в аппарат Гольджи происходит неизбежно, однако не полностью или неправильно свернутые белки остаются при этом в эндоплазматической сети. Возвращение белков из аппарата Гольджи в ЭПС требует наличия специфической сигнальной последовательности (лизин-аспарагин-глутамин-лейцин) и происходит благодаря связыванию этих белков с мембранными рецепторами в цис-Гольджи.

Аппарат Гольджи развит в секреторных клетках, таких, например, как бокаловидные клетки эпителия кишечника, которые выделяют большое количество слизи. На транс-стороне аппарата Гольджи, обращенной к той части плазматической мембраны, где происходит секреция, образуются необычно большие пузырьки.

Функции аппарата Гольджи.

1. Разделение белков на 3 потока: 1) лизосомальный – гликозилированные белки (с маннозой) поступают в цис-отдел комплекса Гольджи, некоторые из них фосфорилируются, образуется маркер лизосомальных ферментов – манноза-6-фосфат. В дальнейшем эти фосфорилированные белки не будут подвергаться модификации, а попадут в лизосомы; 2) конститутивный экзоцитоз (конститутивная секреция). В этот поток включаются белки и липиды, которые становятся компонентами поверхностного аппарата клетки, в том числе гликокаликса, или же они могут входить в состав внеклеточного матрикса; 3) индуцируемая секреция – сюда попадают белки, которые функционируют за пределами клетки, поверхностного аппарата клетки, во внутренней среде организма. Характерен для секреторных клеток.

2. Формирование слизистых секретов – гликозамингликанов (мукополисахаридов)

3. Формирование углеводных компонентов гликокаликса – в основном гликолипидов.

4. Сульфатирование углеводных и белковых компонентов гликопротеидов и гликолипидов

5. Частичный протеолиз белков – иногда за счёт этого неактивный белок переходит в активный (проинсулин превращается в инсулин).

2 Основные клеточные процессы, связанные с аппаратом Гольджи.

Секреторная функция аппарата Гольджи. Мембранные элементы АГ участвуют в сегрегации и накоплении продуктов, синтезированных в ЭПР, участвуют в их химических перестройках, созревании: это главным образом перестройка олигосахаридных компонентов гликопротеинов в составе водорастворимых секретов или в составе мембран.

В цистернах АГ происходит синтез полисахаридов, их взаимосвязь с белками, приводящая к образованию мукопротеидов. Но главное, с помощью элементов аппарата Гольджи происходит процесс выведения готовых секретов за пределы клетки. Кроме того, АГ является источником клеточных лизосом.

Участие АГ в процессах выведения секреторных продуктов было хорошо изучено на примере экзокринных клеток поджелудочной железы. Для этих клеток характерно наличие большого числа секреторных гранул (зимогеновых гранул), которые представляют собой мембранные пузырьки, заполненные белковым содержимым. В состав белков зимогеновых гранул входят разнообразные ферменты: протеазы, липазы, карбогидразы, нуклеазы. При секреции содержимое этих зимогеновых гранул выбрасывается из клеток в просвет железы, а затем перетекает в полость кишечника. Так же подробно процессы синтеза и выведения белков были изучены на других клетках (молочная железа, бокаловидные клетки кишечника, щитовидная железа и др.). Синтезированный на рибосомах экспортируемый белок отделяется и накапливается внутри цистерн ЭПР, по которым он транспортируется к зоне мембран АГ. Здесь от гладких участков ЭПР отщепляются мелкие вакуоли, содержащие синтезированный белок, которые поступают в зону вакуолей в проксимальной части диктиосомы. В этом месте вакуоли могут сливаться друг с другом и с плоскими цис-цистернами диктиосомы. Таким способом белковый продукт переносится уже внутри полостей цистерн АГ.

По мере модификации белков в цистернах аппарата Гольджи, они с помощью мелких вакуолей переносятся от цистерн к цистерне в дистальную часть диктиосомы, пока не достигают трубчатой мембранной сети в *транс*-участке диктиосомы. В этом участке происходит отщепление мелких пузырьков, содержащих уже зрелый продукт. Цитоплазматическая поверхность таких пузырьков бывает сходна с поверхностью окаймленных пузырьков, которые наблюдаются при рецепторном пиноцитозе. Отделившиеся мелкие пузырьки сливаются друг с другом, образуя секреторные вакуоли. После этого секреторные вакуоли начинают двигаться к поверхности клетки, соприкасаются с плазматической мембраной, с которой сливаются их мембраны, и таким образом содержимое этих вакуолей оказывается за пределами клетки. Морфологически этот процесс экстррузии (выбрасывания) напоминает пиноцитоз, только с обратной последовательностью стадий. Он носит название **экзоцитоз**.

Такое описание событий является только общей схемой участия аппарата Гольджи в секреторных процессах. Дело усложняется тем, что одна и та же клетка может участвовать в синтезе многих выделяемых белков, может их друг от друга изолировать и направлять к клеточной поверхности или же в состав лизосом. В аппарате Гольджи происходит не просто «перекачка» продуктов из одной полости в другую, но и постепенно идет их «созревание», модификация белков, которая заканчивается «сортировкой» продуктов, направляющихся или к лизосомам, или к плазматической мембране, или к секреторным вакуолям.

Модификация белков в аппарате Гольджи. В цис-зону аппарата Гольджи синтезированные в ЭПР белки попадают после первичного гликозилирования и редукции там же нескольких сахаридных остатков. В конечном итоге все белки там имеют одинаковые олигосахаридные цепи, состоящие из двух молекул N-ацетилглюкозамина и шести молекул маннозы. В цис-цистернах начинается вторичная модификация олигосахаридных цепей и их сортировка на два класса. В результате олигосахариды на гидролитических ферментах, предназначенных для лизосом (богатые маннозой олигосахариды), фосфорилируются, а олигосахариды других белков, направляемых в секреторные гранулы или к плазматической мембране, подвергаются сложным превращениям, теряя ряд сахаров и присоединяя галактозу, N-ацетилглюкозамин и сиаловые кислоты.

При этом возникает специальный комплекс олигосахаридов. Такие превращения олигосахаридов осуществляются с помощью ферментов – гликозилтрансфераз, входящих в состав мембран цистерн аппарата Гольджи. Так как каждая зона в диктиосомах имеет свой набор ферментов гликозилирования, то гликопротеиды как бы по эстафете переносятся из одного мембранного отсека («этажа» в стопке цистерн диктиосомы) в другой и в каждом подвергаются специфическому воздействию ферментов. Так, в цис-участке происходит фосфорилирование манноз в лизосомных ферментах и образуется особая маннозо-6-фосфатная группировка, характерная для всех гидролитических ферментов, которые потом попадут в лизосомы.

В средней части диктиосом протекает вторичное гликозилирование секреторных белков: дополнительное удаление маннозы и присоединение N-ацетилглюкозамина. В транс-участке к олигосахаридной цепи присоединяются галактоза и сиаловые кислоты.

В ряде специализированных клеток в аппарате Гольджи осуществляется синтез собственно полисахаридов.

В аппарате Гольджи клеток животных осуществляется синтез длинных неразветвленных полисахаридных цепей глюкозаминогликанов. Один из них – гиалуроновая кислота, входящая в состав внеклеточного матрикса соединительной ткани, содержит несколько тысяч повторяющихся дисахаридных блоков. Многие глюкозаминогликаны ковалентно связаны с белками и образуют протеогликаны (мукопротеины). Такие полисахаридные цепи модифицируются в аппарате Гольджи и связываются с белками, которые в виде протеогликанов секретируются клетками. В аппарате Гольджи происходит также сульфатирование глюкозаминогликанов и некоторых белков.

Таким образом, разные цистерны аппарата Гольджи содержат разные резидентные каталитические ферменты и, следовательно, с созревающими белками в них последовательно происходят разные процессы. Понятно, что такой ступенчатый процесс должен как-то контролироваться. Действительно, созревающие белки «маркируются» специальными полисахаридными остатками (преимущественно маннозными), по-видимому, играющими роль своеобразного «знака качества».

Не до конца понятно, каким образом созревающие белки перемещаются по цистернам аппарата Гольджи, в то время как резидентные белки остаются в большей или меньшей степени ассоциированы с одной цистерной. Существуют две взаимноисключающие гипотезы, объясняющие этот механизм:

- согласно первой, транспорт белков осуществляется при помощи таких же механизмов везикулярного транспорта, как и путь транспорта из ЭПР, причём резидентные белки не включаются в отпочковывающуюся везикулу;
- согласно второй, происходит непрерывное передвижение (созревание) самих цистерн, их сборка из пузырьков с одного конца и разборка с другого конца органеллы, а резидентные белки перемещаются ретроградно (в обратном направлении) при помощи везикулярного транспорта.

Сортировка белков в аппарате Гольджи. Итак, через аппарат Гольджи проходят, по крайней мере, три потока синтезированных клеткой нецитозольных белков: поток гидролитических ферментов в компартмент лизосом; поток выделяемых белков, которые накапливаются в секреторных вакуолях и выделяются из клетки только по получении специальных сигналов; поток постоянно выделяемых секреторных белков. Следовательно, должен быть какой-то специальный механизм пространственного разделения этих разных белков и их путей следования.

В цис- и средних зонах диктиосом все эти белки идут вместе без разделения, они только раздельно модифицируются в зависимости от их олигосахаридных маркеров.

Собственно разделение белков, их сортировка, происходит в трансучастке аппарата Гольджи. Этот процесс не до конца расшифрован.

В АГ происходит не только транспорт везикул от ЭПР к плазматической мембране. Существует ретроградный перенос везикул. Так, от вторичных лизосом отщепляются вакуоли и возвращаются вместе с рецепторными белками в зону транс-АГ. Кроме того, существует поток вакуолей от транс-зоны к цис-зоне АГ, а также от цис-зоны к эндоплазматическому ретикулуму. В этих случаях вакуоли одеты белками СОР I-комплекса. Считается, что таким путем возвращаются различные ферменты вторичного гликозилирования и рецепторные белки в составе мембран.

Эти особенности поведения транспортных везикул дали основу гипотезе о существовании двух типов транспорта компонентов АГ.

По одному из них, наиболее старому, в АГ существуют стабильные мембранные компоненты, к которым от ЭПР эстафетно переносятся вещества с помощью транспортных вакуолей. По альтернативной модели, АГ является динамическим производным ЭПР: отщепившиеся от ЭПР мембранные вакуоли сливаются друг с другом в новую *цис*-цистерну, которая затем продвигается через всю зону АГ и в конце распадается на транспортные везикулы. По этой модели, ретроградные СОР I-везикулы возвращают постоянные белки АГ в более молодые цистерны. Таким образом, предполагается, что переходная зона ЭПР представляет собой «родильный дом» для аппарата Гольджи.

3 Растительный аппарат Гольджи.

Аппарат Гольджи занимает центральную позицию в секреторном пути транспорта макромолекул. Он получает вновь синтезируемые белки и липиды от ЭР и направляет их либо к поверхности клетки, либо к вакуолям. У растений в АГ происходит сборка сложных полисахаридов матрикса клеточной стенки, синтез и процессинг углеводных фрагментов О- и N-гликопротеинов. Гликозилтрансферазы и гликозидазы, которые осуществляют эти реакции, являются интегральными белками мембран АГ. Специфичные мембранные белки-переносчики поставляют нуклеотиды сахаров из цитозоля к гликозилтрансферазам, которые синтезируют различные углеводные продукты.

Принципиальное различие в функционировании аппарата Гольджи и системы ЭР связано с механизмом транспортировки синтезируемых и/или обрабатываемых продуктов внутри органеллы. Эндоплазматический ретикулум представляет собой единую полость, и молекулы имеют возможность распределяться по всей органелле. Аппарат Гольджи состоит из отдельных цистерн, и синтезируемые им продукты последовательно перемещаются между ними путем везикулярного транспорта.

Функциональная единица АГ растительной клетки представляет собой стопку цистерн, ассоциированную с ними транс-Гольджи-сеть и Гольджи-матрикс, который окружает обе структуры. Количество единиц АГ в клетке может варьировать в зависимости от ее вида, размера и стадии развития, а также от объема и типа секретируемых клеткой молекул. Например, маленькие клетки апикальной меристемы иван-чая (*Epilobium*) содержат приблизительно 20 единиц АГ, тогда как клетки хлопка (*Gossypium*), продуцирующие волокна, – более 10 000.

Стопки цистерн АГ носят название диктиосом, или стеков. Диктиосома включает 5 – 8 уплощенных цистерн. Цистерны морфологически полярны и имеют формирующуюся (цис-) и секреторную (транс-) сторону. Цис-сторона тесно связана с переходными элементами ЭР. Транс-сторона расширяется, образуя трубчатый ретикулум, называемый транс-Гольджи-сетью.

Транс-Гольджи-сеть (ТГС) – искривленная, полигональная сетчатая структура, построенная из канальцев с гладкой поверхностью. Она может иметь контакты с несколькими единицами АГ. От ТГС отделяется множество везикул, которые транспортируют различные молекулы к вакуолям или плазмалемме. ТГС представляет собой главный пункт разветвления секреторного пути: в частности, белки, предназначенные для экзоцитозного транспорта, отделяются от белков, направляемых в вакуоли. Размеры ТГС зависят от типа клетки.

Гольджи-матриksom называют тонкую нитевидную сетчатую структуру, которая окружает диктиосомы и ТГС. В Гольджи-матриксе нет рибосом и цитозольных белков. Предполагают, что в его функции входит защита диктиосом и предотвращение потерь транспортных везикул.

Со стопками Гольджи всегда ассоциировано множество мелких (диаметром около 60 нм), ограниченных мембраной пузырьков (везикул). Они

группируются на стороне, примыкающей к ЭР, а также по периферии стопки вблизи расширенных краев каждой цистерны. Полагают, что эти пузырьки (везикулы Гольджи) переносят белки и липиды в АГ и транспортируют их между цистернами.

В растительной клетке комплексы Гольджи (диктиосомы + ТГС) обычно рассеяны по всей цитоплазме – либо по одиночке, либо небольшими группами. Подобная локализация, а также актинзависимое передвижение диктиосом по цитоплазме гарантируют, что даже в большой вакуолизированной растительной клетке секретируемые вещества будут доставлены по назначению. Анализ характера движений диктиосом показал, что они движутся по типу «остановились-пошли» («stop-and-go»). Это послужило основанием для гипотезы, согласно которой диктиосомы могут делать паузу у экспортных участков ЭР, чтобы «принять груз», а также недалеко от формирующейся клеточной стенки, чтобы «разгрузиться».

В растительной клетке АГ остается структурно целостным и функционально активным в течение митоза, что необходимо для формирования мембран и макромолекул срединной пластинки. Новые диктиосомы образуются путем деления, которое может начинаться как с цис-, так и с транс-стороны. Это обычно происходит в течение фазы G2 клеточного цикла.

Транспорт продуктов в аппарате Гольджи. Стопки Гольджи состоят из морфологически неоднородных типов цистерн, содержащих различный набор ферментов и выполняющих разные функции.

Цис-цистерны являются «станциями приемки» продуктов, транспортируемых в везикулах от ЭР. После первого цикла обработки продукты транспортируются к промежуточным цистернам, затем – к транс-цистернам и, наконец, отправляются в ТГС. Транс-цистерны Гольджи и ТГС имеют наиболее кислый pH по сравнению с другими компартментами АГ. Это связано с активностью в их мембранах H⁺-АТФазы V-типа. Помимо регуляции ферментов, находящихся в этих компартментах, низкий pH, по-видимому, способствует формированию транспортных везикул.

Большинство везикул, отпочковывающихся от цистерн Гольджи и ТГС, имеют белковую оболочку. Она выполняет несколько функций: определяет типы молекул, помещаемые в данную везикулу, контролирует процесс формирования везикулы и, самое главное, определяет «место назначения» данной везикулы, так как ряд белков оболочки специфичны по отношению к мембране «назначения» везикулы.

Везикулы, участвующие в транспортных путях ЭР → Гольджи, Гольджи → Гольджи и Гольджи → ТГС, отпочковываются от мембран за счет механизма, использующего специальные белки оболочки – СОР (от англ. coat protein). После завершения формирования везикулы большинство белков отделяются от нее и могут участвовать в образовании другой везикулы.

У везикул, которые формируются в ТГС и предназначены для экспорта вакуолярных ферментов и запасных белков, оболочки содержат белок клатрин. Покрытые клатрином везикулы, называемые окаймленными пузырьками, транспортируют вещества исключительно в вакуоли. Молекулы, не по-

павшие в окаймленные пузырьки, впоследствии упаковываются в везикулы другого типа, которые отправляют их к клеточной поверхности. Этот вариант транспорта известен как «путь дефолта». Покрытые клатрином везикулы с различными «адаптерными» белками участвуют также в поглощении растворимых и мембранных белков в процессе энтоцитоза.

Функции аппарата Гольджи растительных клеток. Аппарат Гольджи участвует в сборке углеводных фрагментов N- и O-связанных гликопротеидов и протеогликанов, а также в синтезе сложных полисахаридов. Одна из основных функций гликозилирования – защита белков от протеолиза. В ряде случаев углеводные группы могут участвовать во взаимодействии клеточной стенки с плазмалеммой, определять правильное сворачивание белка или регулировать образование белковых ассоциаций. Большинство белков, имеющих N-гликозилирование, являются ферментами, тогда как O-гликозилированные белки часто выполняют структурные роли. Как N-, так и O-связанные гликаны представляют собой боковые цепи гликозилированных арабиногалактанов.

Синтез N-связанных гликопротеидов начинается в ЭР, где на поступающие в люмен ЭР белки переносятся от долинхола 14-членные олигосахариды. Последующая обработка олигосахарида, включающая систематическое удаление остатков маннозы и введение остатков других сахаров, происходит в АГ. Ферменты, вовлеченные в этот процесс, упорядоченно распределены по цис-, промежуточным и транс-цистернам в соответствии с последовательностью реакций формирования конкретного N-связываемого гликана.

Относительно образования O-гликозилированных белков в АГ известно меньше. Гликозилирование – важный момент образования многих структурных белков клеточной стенки. Сахара, главным образом арабиноза и галактоза, присоединяются к гидроксилсодержащим аминокислотам – гидроксипролину, серину и треонину. Посттранскрипционное образование гидроксипролина в белке происходит скорее всего в ЭР, тогда как O-гликозилирование белка – в цис-цистернах АГ.

Наиболее важной функцией растительного аппарата Гольджи следует считать синтез полисахаридов. В АГ синтезируются все полисахариды клеточной стенки, за исключением целлюлозы и каллозы. Полная картина синтеза этих соединений не ясна, однако известен ряд интересных деталей. Установлено, в частности, что в синтезе пектиновых соединений участвуют ферменты, расположенные во всех цистернах аппарата Гольджи, тогда как ферменты, ответственные за синтез ксилогликанов, расположены преимущественно в трансцистернах и ТГС.

Тема 8 Эндоплазматические структуры вакуолярной природы

- 1 Лизосомы.
- 2 Сферосомы, пероксисомы, глиоксисомы.
- 3 Растительные вакуоли.

1 Лизосомы.

Лизосома – окружённая мембраной клеточная органелла, в полости которой поддерживается кислая среда и находится множество растворимых гидролитических ферментов.

Лизосомы являются гетерогенными по форме, размеру, ультраструктурным и цитохимическим особенностям. В клетках животных размер лизосом составляет обычно менее 1 мкм, хотя в некоторых типах клеток, например, в макрофагах, размер лизосом может превышать несколько микрон. Лизосомы, как правило, имеют сферическую, овальную, иногда тубулярную форму. Число лизосом варьирует от одной (крупная вакуоль во многих клетках растений и грибов) до нескольких сотен или тысяч (в клетках животных). Лизосомы у животных обычно составляют не более 5 % внутриклеточного объёма.

Один из признаков лизосом – наличие в них ряда ферментов (кислых гидролаз), способных расщеплять белки, углеводы, липиды и нуклеиновые кислоты. К числу ферментов лизосом относятся катепсины (тканевые протеазы), кислая рибонуклеаза, фосфолипаза и др. Кроме того, в лизосомах присутствуют ферменты, которые способны отщеплять от органических молекул сульфатные (сульфатазы) или фосфатные (кислая фосфатаза) группы. Всего полость лизосомы содержит около 60 растворимых кислых гидролитических ферментов.

Для лизосом характерна кислая реакция внутренней среды, которая обеспечивает оптимум работы лизосомных гидролаз. Обычно pH в лизосомах составляет около 4,5-5,0 то есть концентрация протонов в них на два порядка выше, чем в цитоплазме. Это обеспечивается активным транспортом протонов, который осуществляет встроенный в мембраны лизосом белок-насос протонная АТФаза. Помимо протонного насоса в мембрану лизосом встроены белки-переносчики для транспорта в цитоплазму продуктов гидролиза макромолекул: аминокислот, сахаров, нуклеотидов, липидов.

Высокая активность кислой фосфатазы ранее использовалась как один из маркеров лизосом. В настоящее время более надёжным маркером считается присутствие специфических мембранных гликопротеидов – LAMP1 и LAMP2. Они присутствуют на мембране лизосом и поздних эндосом, но отсутствуют на мембранах других компартментов вакуоля.

LAMP1 (Lysosomal-associated membrane protein 1) – гликопротеин лизосомальной мембраны. Вместе с другим гомологичным белком LAMP2 составляет около 50 % от всех белков мембраны лизосом. Лизосомами считаются внутриклеточные органеллы, которые содержат эти белки.

Лизосомы формируются из пузырьков (везикул), отделяющихся от аппарата Гольджи, и пузырьков (эндосом), в которые попадают вещества при эндоцитозе. В образовании аутолизосом (аутофагосом) принимают участие мембраны эндоплазматического ретикулума. Все белки лизосом синтезируются на «сидячих» рибосомах на внешней стороне мембран эндоплазматиче-

ского ретикулума и затем проходят через его полость и через аппарат Гольджи.

Общепринятой классификации и номенклатуры для разных стадий созревания и типов лизосом нет. Различают первичные и вторичные лизосомы. Первые образуются в области аппарата Гольджи, в них находятся ферменты в неактивном состоянии, вторые же содержат активные ферменты. Обычно ферменты лизосом активируются при понижении pH. Среди лизосом можно также выделить гетеролизосомы (переваривающие материал, поступающий в клетку извне – путём фаго- или пиноцитоза) и аутолизосомы (разрушающие собственные белки или органоиды клетки). Наиболее широко используется следующая классификация лизосом и связанных с ними компартментов:

Ранняя эндосома – в неё поступают эндоцитозные (пиноцитозные) пузырьки. Из ранней эндосомы рецепторы, отдавшие (из-за пониженного pH) свой груз, возвращаются на наружную мембрану.

Поздняя эндосома – в неё из ранней эндосомы поступают пузырьки с материалом, поглощённом при пиноцитозе, и пузырьки из аппарата Гольджи с гидролазами. Рецепторы маннозо-6-фосфата возвращаются из поздней эндосомы в аппарат Гольджи.

Лизосома – в неё из поздней эндосомы поступают пузырьки со смесью гидролаз и перевариваемого материала.

Фагосома – в неё попадают более крупные частицы (бактерии и т.п.), поглощённые путём фагоцитоза. Фагосомы обычно сливаются с лизосомой.

Аутофагосома – окружённый двумя мембранами участок цитоплазмы, обычно включающий какие-либо органоиды и образующийся при макроаутофагии. Сливается с лизосомой.

Мультивезикулярные тельца – обычно окружены одинарной мембраной, содержат внутри более мелкие окружённые одинарной мембраной пузырьки. Образуются в результате процесса, напоминающего микроаутофагию, но содержат материал, полученный извне. В мелких пузырьках обычно остаются и затем подвергаются деградации рецепторы наружной мембраны (например, рецепторы эпидермального фактора роста). По стадии формирования соответствуют ранней эндосоме. Описано образование мультивезикулярных телец, окруженных двумя мембранами, путём отпочковывания от ядерной оболочки.

Остаточные тельца (телолизосомы) – пузырьки, содержащие неперева-ренный материал (в частности, липофусцин). В нормальных клетках сливаются с наружной мембраной и путём экзоцитоза покидают клетку. При старении или патологии накапливаются.

Функциями лизосом являются:

- переваривание захваченных клеткой при эндоцитозе веществ или частиц (бактерий, других клеток);
- аутофагия – уничтожение не нужных клетке структур, к примеру, во время замены старых органоидов новыми, или переваривание белков и других веществ, произведенных внутри самой клетки;

- автолиз – самопереваривание клетки, приводящее к её гибели (иногда этот процесс не является патологическим, а сопровождает развитие организма или дифференцировку некоторых специализированных клеток). Пример: При превращении головастика в лягушку, лизосомы, находящиеся в клетках хвоста, переваривают его: хвост исчезает, а образовавшиеся во время этого процесса вещества всасываются и используются другими клетками тела.

- растворение внешних структур (см, например, остеокласты).

Внутриклеточное пищеварение и участие в обмене веществ. У многих протистов и у животных, имеющих внутриклеточное пищеварение, лизосомы участвуют в переваривании пищи, захваченной путём эндоцитоза. При этом лизосомы сливаются с пищеварительными вакуолями. У протистов непереваренные остатки пищи обычно удаляются из клетки при слиянии пищеварительной вакуоли с наружной мембраной.

Многие клетки животных, у которых преобладает полостное пищеварение (например, хордовые) получают питательные вещества из межклеточной жидкости или плазмы крови с помощью пиноцитоза. Эти вещества также вовлекаются в обмен веществ клетки после их переваривания в лизосомах. Хорошо изученный пример такого участия лизосом в обмене веществ – получение клетками холестерина. Холестерин, приносимый кровью в виде ЛПНП, поступает внутрь пиноцитозных везикул после соединения ЛПНП с рецепторами ЛПНП на мембране. Рецепторы возвращаются к мембране из ранней эндосомы, а ЛПНП поступают в лизосомы. После этого ЛПНП перевариваются, а высвободившийся холестерин через мембрану лизосом поступает в цитоплазму.

Косвенно лизосомы участвуют в обмене, обеспечивая десенсибилизацию клеток к воздействию гормонов. При длительном действии гормона на клетку часть рецепторов, связавших гормон, поступают в эндосомы и затем деградируют внутри лизосом. Снижение числа рецепторов понижает чувствительность клетки к гормону.

Аутофагия. Обычно различают два типа аутофагии – микроаутофагия и макроаутофагия. При микроаутофагии, как при образовании мультивезикулярных телец, образуются впячивания мембраны эндосомы или лизосомы, которые затем отделяются в виде внутренних пузырьков, только в них попадают вещества, синтезированные в самой клетке. Таким путём клетка может переваривать белки при нехватке энергии или строительного материала (например, при голодании). Но процессы микроаутофагии происходят и при нормальных условиях и в целом неизбежны. Иногда в ходе микроаутофагии перевариваются и органоиды; так, у дрожжей описана микроаутофагия пероксисом и частичная микроаутофагия ядер, при которой клетка сохраняет жизнеспособность.

При макроаутофагии участок цитоплазмы (часто содержащий какие-либо органоиды) окружается мембранным компартментом, похожим на цистерну эндоплазматической сети. В результате этот участок оказывается отгорожен от остальной цитоплазмы двумя мембранами. Затем такая аутофаго-

сома сливается с лизосомой, и её содержимое переваривается. Видимо, макроаутофагия также неизбирательна, хотя часто подчеркивается, что с помощью неё клетка может избавляться от «отслуживших свой срок» органоидов (митохондрий, рибосом и др.).

Третий тип аутофагии – шаперон-зависимая. При этом способе происходит направленный транспорт частично денатурировавшихся белков из цитоплазмы сквозь мембрану лизосомы в её полость.

Автолиз. Ферменты лизосом нередко высвобождаются при разрушении мембраны лизосомы. Обычно при этом они инактивируются в нейтральной среде цитоплазмы. Однако при одновременном разрушении всех лизосом клетки может произойти её саморазрушение – автолиз. Различают патологический и обычный автолиз. Распространенный вариант патологического автолиза – посмертный автолиз тканей.

В норме процессы автолиза сопровождают многие явления, связанные с развитием организма и дифференцировкой клеток. Так, автолиз клеток описывается как механизм разрушения тканей у личинок насекомых при полном превращении, а также при рассасывании хвоста у головастика. Правда, эти описания относятся к периоду, когда различия между апоптозом и некрозом ещё не были установлены, и в каждом случае требуется выяснять, не лежит ли на самом деле в основе деградации органа или ткани апоптоз, не связанный с автолизом.

У растений автолизом сопровождается дифференциация клеток, которые функционируют после смерти (например, трахеид или члеников сосудов). Частичный автолиз происходит и при созревании клеток флоэмы – члеников ситовидных трубок.

2 Сферосомы, пероксисомы, глиоксисомы

Сферосомы –мембранные пузырьки, встречающиеся в клетках растений. Они окрашиваются липофильными красителями, имеют высокий коэффициент преломления и поэтому хорошо видны под световым микроскопом. Сферосомы образуются из элементов эндоплазматического ретикулума. На конце цистерны ЭПР начинает накапливаться осмиофильный материал, затем от этого участка отшнуровывается и начинает расти мелкий пузырек, достигающий диаметра 0,1-0,5 мкм. Это «просферосома», окруженная одинарной мембраной. Рост сферосом и перестройка их содержимого связаны с накоплением в них масла, так что сферосома постепенно превращается в масляную каплю. Отложение липидов начинается между осмиофильными слоями мембраны. Кроме жиров в составе сферосом обнаруживают белки и среди них фермент липазу, расщепляющую липиды.

Пероксисома – клеточная органелла, окружённая единственной мембраной и не содержащая ДНК и рибосом (в отличие от митохондрий и хлоропластов). Пероксисомы присутствуют во всех эукариотических клетках. Они содержат ферменты, которые при помощи молекулярного кислорода окисляют некоторые органические вещества. В пероксисомах также происходит β -окисление жирных кислот. В них также протекают первые этапы об-

разования плазмалогенов. У растений пероксисомы клеток листьев участвуют в процессе фотодыхания. Импорт белков в пероксисомы происходит при участии короткой сигнальной последовательности.

Пероксисомы представляют собой небольшие мембранные пузырьки размером 0,3-1,5 мкм, содержащие внутри гранулярный матрикс. В центре матрикса находится сердцевина, или нуклеоид. В этой зоне нередко (особенно в печёночных клетках) видны кристаллоподобные структуры, состоящие из регулярных фибрилл, или трубочек.

Пероксисомы присутствуют во всех эукариотических клетках. Размер, количество и белковый состав пероксисом различен в клетках различных тканей, а также может меняться под действием внешнего стимула. Например, у дрожжей, растущих на сахаре, пероксисомы маленькие. Однако у дрожжей, растущих на метаноле, имеются крупные пероксисомы, окисляющие метанол. Если дрожжи выращиваются на жирных кислотах, то они имеют большие пероксисомы, в которых интенсивно протекает β -окисление жирных кислот. У высших позвоночных животных особенно богаты пероксисомами клетки печени и почек. Так, каждый гепатоцит крысы содержит от 70 до 100 пероксисом.

Функции пероксисом чрезвычайно разнообразны в разных группах организмов. Однако практически у всех видов пероксисомы содержат фермент каталазу, а также ферменты β -окисления жирных кислот. Ниже рассмотрены известные функции пероксисом.

В пероксисоме обычно присутствуют ферменты, использующие молекулярный кислород для отщепления атомов водорода от некоторых органических субстратов с образованием пероксида водорода. К числу таких ферментов можно отнести различные оксидазы: уратоксидаза, оксидаза D-аминокислот.

Каталаза использует образующуюся H_2O_2 для окисления множества субстратов, например, фенолов, муравьиной кислоты, этанола и формальдегида. С помощью этой реакции в печени и почках происходит обезвреживание различных ядовитых веществ, находящихся в кровотоке. Около 25 % потребляемого этанола пероксисомы окисляют до ацетальдегида. Когда в клетке накапливается слишком много пероксида водорода, каталаза переводит его в воду.

В пероксисомах всех организмов протекает β -окисление жирных кислот. На каждом этапе этого процесса алкильная цепь жирной кислоты укорачивается на два атома углерода с высвобождением ацетил-КоА. Далее пероксисомы экспортируют его в цитозоль. У млекопитающих β -окисление протекает не только в пероксисомах, но и в митохондриях, однако у дрожжей и растений этот процесс проходит только в пероксисомах. В пероксисомах также протекает α -окисление жирных кислот, которые не могут подвергаться β -окислению из-за наличия метильной группы у β -атома углерода.

У животных в пероксисомах протекают первые реакции биосинтеза плазмалогенов – самых распространённых фосфолипидов миелина. Широко

обсуждается роль пероксисом в биосинтезе изопреноидов и холестерина у животных.

На пероксисомы приходится около 10 % активности двух ферментов пентозофосфатного пути: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, которые, как предполагается, по мере нужды пополняют пул NADPH вне пероксисомы.

В листьях растений пероксисомы участвуют в процессе фотодыхания. Этот процесс является следствием недостаточной специфичности главного фермента, фиксирующего углекислоту, – рубиско, который может связываться не только с углекислым газом, но и с кислородом. При взаимодействии кислорода с рибулозо-1,5-бисфосфатом под действием рубиско образуется 3-фосфоглицерат и 2-фосфогликолат. Фотодыхание убыточно для клетки, так как фиксации углекислого газа при этом не происходит, но образуется 2-фосфогликолат, усвоение которого для клетки энергетически невыгодно. Кроме того, в пероксисомах образуется ряд растительных гормонов.

У растений и некоторых других организмов в видоизменённых пероксисомах – **глиоксисомах** – заключены ферменты глиоксилатного пути. В ходе этого процесса ацетил-КоА, образующийся при окислении жиров (например, запасённых в семени) превращается в глиоксисоме в четырёхуглеродное промежуточное соединение цикла лимонной кислоты – сукцинат, которое выводится в цитозоль и далее используется для синтеза сахаров. Особенно много глиоксисом в тканях прорастающих семян, которые содержат много растительных жиров. Как и все пероксисомы, глиоксисомы содержат ферменты пути β -окисления, которые гидролизуют жирные кислоты до ацетил-КоА. Вдобавок к основным функциям пероксисом, глиоксисомы содержат ключевые ферменты глиоксилатного цикла (изоцитратлиазу и малатсинтазу), благодаря которым в них возможно протекание этого цикла. Таким образом, глиоксисомы (как и все пероксисомы) содержат ферменты для окисления жирных кислот, а также дополнительные энзимы для синтеза промежуточных продуктов, которые используются глюконеогенезом для синтеза сахаров. Молодые проростки используют эти органеллы для синтеза сахара из запасённых жирных кислот до тех пор, пока они не станут достаточно зрелыми, чтобы производить их самостоятельно путём фотосинтеза.

У некоторых простейших (например, трипаносом) имеется особая мембраносвязанная органелла, содержащая ферменты гликолиза – гликосома. Гликосомы – это наиболее специализированная органелла среди органелл, произошедших от пероксисомы. Пероксисомы высших эукариот очень похожи на гликосомы, а также глиоксисомы, имеющиеся у некоторых растений и грибов. Гликосома похожа на них основными чертами строения, такими как наличие одной мембраны и плотный белковый матрикс. Показано, что некоторые метаболические процессы, происходящие в пероксисомах, имеют место и в гликосомах трипаносом. Кроме того, сигнальная последовательность импорта белков в гликосомы очень похожа на аналогичную последовательность белков пероксисом. Кроме того, последовательности белков гликосом и пероксисом похожи не только в области сигнальных последовательностей.

В гликосомах были обнаружены белки, похожие на белки пластид, поэтому было высказано предположение, что когда-то произошёл горизонтальный перенос генов от фотосинтезирующего организма, и белки этих генов обнаруживаются в современных пероксисомах и гликосомах. Как и пероксисомы, собственного генома гликосомы не имеют.

Поскольку пероксисомы не содержат собственной ДНК и рибосом, все их белки должны импортироваться внутрь пероксисом из цитозоля. Процесс импорта белков в пероксисомы изучен недостаточно, но известно, что в нём задействованы растворимые рецепторы в цитозоле, которые узнают сигнальную последовательность, и белки докинга на обращённой к цитозолю стороне пероксисом. Процесс импорта сопровождается гидролизом АТФ, и в нём принимают участие около 23 различных белков, называемых пероксинами.

Процесс импорта белков пероксисом коренным образом отличается от транслокации белков в ЭПР, митохондрии и хлоропласты в том отношении, что белки пероксисом импортируются после того, как они приобрели в цитозоле нативную или даже олигомерную структуру. В этом отношении транспорт белков в пероксисомы напоминает перенос белков в ядро. При транспорте в ядро и в пероксисому рецептор, узнающий сигнальную последовательность, переносится с субстратом через мембрану, потом рецептор отделяется и экспортируется в цитозоль для дальнейшего использования.

Механизм образования новых пероксисом в клетке является предметом дискуссий. Доподлинно неизвестно, возникают ли пероксисомы из ранее существующих путём их роста и деления (подобно митохондриям и пластидам), или же они образуются путём отщепления от эндоплазматического ретикулума. Скорее всего, обе точки зрения могут соответствовать действительности, а механизм биогенеза пероксисом, вероятно, выглядит следующим образом. Среди белков пероксисом есть такие, которые сначала интегрируются в мембрану ЭПР, где они могут входить в состав особых везикул – предшественников пероксисом. Отщепление от ЭПР этих везикул и их дальнейшее слияние приводит к образованию пероксисомы, которая импортирует оставшиеся пероксисомальные белки при помощи собственного аппарата импорта. Далее пероксисома может расти и делиться с образованием дочерних пероксисом.

В 2017 году была предложена новая модель образования пероксисом *de novo*. Известно, что пероксисомы и митохондрии функционируют совместно во многих метаболических путях – таких, как β -окисление жирных кислот. Кроме того, в отсутствие пероксисом в клетках многие белки пероксины импортируются в митохондрии. В связи с этим предполагается, что пероксисомы представляют собой гибридный продукт слияния пре-пероксисомных везикул, отделившихся как от ЭПР, так и от митохондрий.

Насчёт происхождения пероксисом имеется ряд альтернативных гипотез. Поскольку пероксисомы разных организмов содержат ряд белков, одинаковых для всех, была предложена гипотеза эндосимбиотического происхождения пероксисом.

3 Растительные вакуоли

Вакуоли растительных клеток были обнаружены в ранних микроскопических исследованиях. Первоначально они были определены как «пустые», т.е. свободные от цитоплазмы части клетки. Вакуоли растительной клетки весьма разнообразны по форме, размеру, своему содержимому и функциональной роли. Отдельная клетка может содержать несколько видов вакуолей.

Вакуолями называют органеллы, заполненные жидкостью и окруженные одинарной мембраной – тонопластом. Вакуоли обычно занимают более 30 % объема клетки. Клетки апикальных меристем, как правило, содержат много маленьких вакуолей, которые сливаются в одну или несколько больших вакуолей по мере роста и развития клетки. В большой зрелой растительной клетке вакуоль может занимать до 90 % ее объема.

Вопрос, почему растительная клетка имеет столь значительную по размерам вакуоль, является одним из наиболее интересных в физиологии растений. Ответ на него можно искать исходя из способа существования растений – прежде всего фототрофности. Для эффективного фотосинтеза фиксированного в пространстве организма необходима большая площадь поглощающей свет поверхности. Именно поэтому большинство листьев имеет плоскую форму. На клеточном уровне также необходимо увеличение поверхности клетки. Возможно, в этом и состоит главная причина увеличения объема вакуолярного компартмента клетки. Такой способ увеличения размеров клеток, по-видимому, экономически наиболее выгодный («дешевый»), так как не требует увеличения объема цитозоля – метаболически «дорогого», обогащенного азотом компартмента клетки. Последнее особенно важно, так как растения «добывают» азот с большим трудом и со значительными энергетическими затратами. Формируя большой объем клетки за счет «недорогого» вакуолярного содержимого, главным образом воды и минеральных солей, растение способно кардинально снизить затраты на создание больших плоских структур – листьев, эффективных солнечных коллекторов.

Увеличение размеров (растяжение) растительной клетки происходит за счет осмотического поглощения воды вакуолью и изменения прочности клеточной стенки. Вода, поглощаемая вакуолью, создает тургорное давление, которое не только расширяет первичную клеточную стенку, но и обеспечивает тургор клетки. Для поддержания высокого осмотического потенциала вакуоли расширяющихся клеток в нее должны постоянно поступать соли и/или другие соединения. Транспорт этих соединений происходит активно, за счет электрохимического градиента протонов на тонопласте. Градиент ионов H^+ в свою очередь создается и поддерживается за счет работы двух электрогенных протонных насосов: H^+ -АТФазы V-типа (от англ. vacuolar) и вакуолярной H^+ -дифосфатазы (пирофосфатазы). Таким образом, тонопласт является энергизованной мембраной. Основные осмотические компоненты вакуолярного сока представлены ионами – K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NO_3^- и первичными метаболитами типа аминокислот, органических кислот и сахаров. Транспорт этих веществ осуществляется через тонопласт за счет работы спе-

цифичных транспортеров и каналов. Перемещение воды через тонопласт происходит также через специальные каналы – аквапорины, сформированные специфичными для тонопласта белками – TIPs (от англ. tonoplast intrinsic proteins).

В растительной клетке вакуоли представляют собой мультифункциональные органеллы, которые играют ключевую роль в клеточных стратегиях развития растения. Функционально вакуоли являются органеллами, которые находятся в конце секреторного пути растительных клеток. Экспериментальные данные свидетельствуют, что содержимое растительных вакуолей образуется как из внутриклеточного материала, так и за счет эндоцитоза.

Основные функции вакуолей. Хранение веществ. Кроме ионов, сахаров, полисахаридов, пигментов, аминокислот и органических кислот, в вакуолях растения хранится также большое количество белка. Особенно это характерно для вакуолей семян. Все перечисленные первичные метаболиты могут быть востребованы из вакуолей и использоваться в метаболизме клетки.

Лизис веществ. Вакуоли содержат те же типы кислых гидролаз, что и лизосомы животной клетки. Эти ферменты – протеазы, нуклеазы, гликозидазы и липазы – вместе способны обеспечить процесс разборки и рециклизации практически любых компонентов клетки. Подобная рециркуляция необходима не только для нормального метаболизма клеточных структур, но и для возврата ценных питательных веществ в течение запрограммированной смерти клетки, связанной с развитием и старением.

Регулирование pH и ионный гомеостаз. Большие вакуоли служат резервуарами для протонов и метаболически важных ионов, например, кальция. Как правило, вакуоли растения имеют pH между 5,0 и 5,5, однако диапазон изменения pH простирается от 2,5 (или ниже – вакуоли клеток плода лимона) до более чем 7,0 (вакуоли, запасующие белки). Контролируя поток протонов и других ионов из вакуолей в цитозоль, клетки могут регулировать не только pH цитозоля, но также и работу многих ферментов, сборку и разборку структур цитоскелета и процессы взаимодействия (слияния) мембранных структур.

Защита от патогенов и травоядных. В вакуолях растительных клеток накапливается удивительно разнообразное количество токсичных соединений. Особенно это характерно для специализированных клеток, расположенных в стратегически важных тканях (типа эпидермиса листа). Такая особенность позволяет растению эффективно бороться с патогенами и снижать риск быть съеденным насекомыми и животными. К токсичным соединениям относятся: фенольные соединения, алкалоиды, изопреноиды, цианогенные гликозиды и другие вторичные соединения; ферменты, разрушающие клеточные стенки, – хитиназы, глюканазы и др.; полимеры (латекс, каучук, гутта и др.).

Пигментация. Еще в XIX столетии было установлено, что многие пигменты находятся в вакуолях эпидермальных клеток цветков, листьев и стеблей. Недавние исследования показали, что мембраны таких специализированных вакуолей содержат специальные транспортные системы – ABC-переносчики (транспортеры) (от англ. ATP binding cassette transporters). Ва-

куоли, содержащие водорастворимые пигменты (антоцианы, беталаины), найдены во многих типах растительных клеток. Окраска лепестков цветка и плодов важна для привлечения опылителей или «распространителей» семян соответственно. Некоторые водорастворимые пигменты листа поглощают УФ-излучение и видимый свет, предотвращая тем самым фотодеструкцию фотосинтетического аппарата. Это свойство, по-видимому, наиболее существенно для листьев вечнозеленых растений в течение зимних месяцев.

Изолирование и обезвреживание токсичных веществ. Растения не имеют возможности избегать загрязненных ядовитыми и токсическими веществами мест обитания, но могут эффективно изолировать токсичные соединения (например, тяжелые металлы или ядовитые метаболиты типа оксалата) от метаболически активных компартментов клетки. Для этого они используют вакуоли. Например, для удаления оксалата специальные клетки формируют вакуоли, содержащие органический матрикс, внутри которого оксалат реагирует с кальцием с образованием щавелевокислого кальция. В других типах растительных клеток из цитозоля в вакуоли переносятся различные ксенобиотики. Для этого обычно используются белки-переносчики из семейства ABC-транспортеров. Накопление ядовитых веществ в вакуолях листа происходит достаточно часто. С листопадом токсичные соединения устраняются из растения полностью.

Формирование вакуолей. В отличие от других мембранных систем вакуоли — единственные органеллы, которые могут возникать путем дифференцирования из других мембранных систем, независимо от роста и деления клетки. Вопрос об их происхождении окончательно не решен. Были предложены две модели формирования вакуолей *de novo*. Одна модель постулирует, что вакуолярный компартмент исходно образуется из транс-Гольджи - сети. Согласно другой концепции, вакуоли формируются из расширения частей гладкого ЭР. К настоящему времени ряд экспериментальных фактов подтверждает реальность последней модели. Показано, что в дифференцирующихся клетках кончика корня, где первоначально большая центральная вакуоль отсутствует, моноклональные антитела к β -субъединице вакуолярной АТФазы овса были локализованы только в провакуолях и в гладком ЭР. Из ЭР образуются автофаговые вакуоли. Существуют данные, показывающие формирование вакуолей из транс- Гольджи - сети. Не исключено, что образование различных вакуолей в клетке происходит несколькими способами.

Автофагия – особый случай формирования вакуолей. В некоторых клетках (например, клетках семенной оболочки) вакуоли могут образоваться в результате автофагии. При формировании автофаговых вакуолей трубчатые участки гладкого ЭР формируют пальцеобразные выросты, которые подобно щупальцам захватывают часть цитоплазмы. Смежные «щупальца» смыкаются и образуется ранняя автофагосома – эндоплазматическая область, ограниченная двумя мембранами ЭР. После окончательного формирования автофагосомы, т.е. полного отделения от цитозоля, цитоплазма в ней деградирует, внутренняя мембрана разрушается, а наружная становится тонопластом. Автофагосомы имеют кислый pH и содержат много кислых гидролитических

ферментов. В конечном счете транспорт воды, облегченный γ -TIP-аквапорином, приводит к быстрому расширению вакуоли. Автофагия может повторно происходить в уже вакуолизированных клетках в ответ на голодание (например, в суспензионных культурах клеток, лишенных сахарозы).

Два типа вакуолей растительных клеток. До недавнего времени одной из нерешенных проблем физиологии растений был парадокс сосуществования в вакуолях запасных веществ и литических ферментов. Сейчас установлено, что растения имеют как минимум две различные вакуолярные системы: одну для хранения, а другую для выполнения литических функций. Эти два типа вакуолей различаются кислотностью вакуолярного сока: запасающие вакуоли имеют нейтральный pH, а литические – кислый, что оптимально для работы содержащихся в них протеаз и других гидролаз. Кроме того, вакуоли различаются составом интегральных белков, встроенных в тонопласт (TIPs). Для запасающих вакуолей характерны α -TIP, тогда как TIP-Ma27 (γ -TIP) являются маркерами литических вакуолей. Кроме того, в запасающих вакуолях находится аквапорин δ -TIP. Наличие в клетке двух типов вакуолярных систем также объясняет присутствие у транспортируемых в вакуоли белков нескольких типов сигналов на N- и C-концах. В частности, спорамины и алеураины содержат N-терминальный сигнал, фазеолин, лектин ячменя, хитиназа табака – C-терминальный. В некоторых вакуолярных белках (например, фитогемагглюнин и легумин) сигнал локализован во внутренней области зрелого белка. Белки, направляющиеся к запасающим вакуолям, обычно имеют лидерный участок на C-конце, тогда как гидролитические ферменты литических вакуолей – на N-конце. N-терминальный сигнал обычно содержит около 20 аминокислот с мотивом Asn-Pro-Ile-Arg. C-концевая сигнальная последовательность более вариабельна и содержит гидрофобные аминокислоты.

Когда в клетке образуются большие вакуоли, два типа вакуолей могут сливаться. В этом случае оба маркерных белка – α -TIP и γ -TIP – обнаруживаются в мембране некоторых областей вакуолярного компартмента одновременно.

Таким образом, для вакуолей растительной клетки характерно большое разнообразие форм и функций. По-видимому, цитологическое определение вакуолей охватывает несколько биохимически и физиологически разных структур. Более корректно вакуоли могут быть охарактеризованы только с учетом их функций в клетке и в связи с динамикой развития.

РАЗДЕЛ 4 СИСТЕМЫ ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ КЛЕТКИ

Тема 9 Митохондрии

- 1 Строение митохондрий.
- 2 Функции митохондрий и энергопреобразование.
- 3 Растительные митохондрии.

1 Строение митохондрий.

Митохондрия – двумембранная сферическая или эллипсоидная органелла диаметром обычно около 1 микрометра. Характерна для большинства эукариотических клеток, как автотрофов (фотосинтезирующие растения), так и гетеротрофов (грибы, животные).

Происхождение митохондрий. В соответствии с теорией симбиогенеза, митохондрии появились в результате захвата примитивными клетками (прокариотами) бактерий. Клетки, которые не могли сами использовать кислород для генерации энергии, имели серьёзные ограничения в возможностях развития; бактерии же (прогеноты) могли это делать. В процессе развития таких отношений прогеноты передали множество своих генов сформировавшемуся, благодаря повысившейся энергоэффективности, ядру теперь уже эукариот. Вот почему современные митохондрии больше не являются самостоятельными организмами. Хотя их геном кодирует компоненты собственной системы синтеза белка, многие ферменты и белки, необходимые для их функционирования, кодируются ядерными хромосомами, синтезируются в цитоплазме клетки и только потом транспортируются в органеллы.

Впервые митохондрии обнаружены в виде гранул в мышечных клетках в 1850 г. Число митохондрий в клетке непостоянно. Их особенно много в клетках, у которых велика потребность в энергии. По своему строению митохондрии представляют собой органеллы, обычно сферической формы, встречающиеся в эукариотической клетке в количестве от нескольких сотен до 1-2 тысяч и занимающие 10-20 % её внутреннего объёма. Сильно варьируются также размеры (от 1 до 70 мкм) и форма митохондрий. В зависимости от того, в каких участках клетки в каждый конкретный момент времени происходит повышенное потребление энергии, митохондрии способны перемещаться по цитоплазме в зоны наибольшего энергопотребления, используя для движения структуры цитоскелета эукариотической клетки. **В клетках растений и животных одновременно и примерно в равных количествах существуют три типа митохондриальных органелл: молодые протомитохондрии, зрелые митохондрии и старые постмитохондрии, деградирующие в липофусциновые гранулы.**

Наружная мембрана митохондрии имеет толщину около 7 нм, не образует впячиваний и складок и замкнута сама на себя. На наружную мембрану приходится около 7 % площади поверхности всех мембран клеточных органелл. Основная функция – отграничение митохондрии от цитоплазмы.

Наружная мембрана митохондрии состоит из липидов с вкраплениями белков (соотношение 2 : 1). Особую роль играет порин – каналообразующий белок. Он образует в наружной мембране отверстия диаметром 2-3 нм, через которые могут проникать небольшие молекулы и ионы весом до 5 кДа. Крупные молекулы могут проникать сквозь наружную мембрану только посредством активного транспорта с помощью транспортных белков митохондриальных мембран. Для наружной мембраны характерно присутствие ферментов: монооксигеназы, ацил-СоА-синтетазы и фосфолипазы А₂. Наружная мембрана митохондрии может взаимодействовать с мембраной эндоплазматического ретикулума; это играет важную роль в транспортировке липидов и ионов кальция.

Межмембранное пространство представляет собой пространство между наружной и внутренней мембранами митохондрии. Его размер – 10-20 нм. Так как наружная мембрана митохондрии проницаема для небольших молекул и ионов, их концентрация в периплазматическом пространстве мало отличается от таковой в цитоплазме. Крупным же белкам для транспорта из цитоплазмы в периплазматическое пространство необходимо иметь специфические сигнальные пептиды; поэтому белковые компоненты периплазматического пространства и цитоплазмы различны. Одним из белков, содержащихся не только во внутренней мембране, но и в периплазматическом пространстве, является цитохром с.

Внутренняя мембрана состоит в основном из белковых комплексов (соотношение белок/липид – 3:1) и образует многочисленные гребневидные складки – кристы, существенно увеличивающие площадь её поверхности и, например, в клетках печени составляет около трети всех клеточных мембран. Характерной чертой состава внутренней мембраны митохондрий является присутствие в ней кардиолипина – особого фосфолипида, содержащего сразу четыре жирные кислоты и делающего мембрану абсолютно непроницаемой для протонов.

Кардиолипин представляет собой дифосфатидилглицерол: два фосфатидилглицерола соединены с глицеролом, формируя димерную структуру. Таким образом, кардиолипин имеет четыре хвоста жирных кислот и два остатка ортофосфорной кислоты. Четыре алкильных группы кардиолипина открывают широкие возможности для разнообразия. Однако в большинстве животных тканей кардиолипин содержит С18-цепи с двумя ненасыщенными связями в каждой из них. Возможно, (18:2)-4 конфигурация радикальных групп является важным структурным требованием для высокой аффинности кардиолипина к белкам внутренней мембраны митохондрий млекопитающих, хотя, согласно некоторым исследованиям, важность этой конфигурации зависит от рассматриваемого белка. Каждый из фосфатов кардиолипина может связать один протон. При этом ионизация одного фосфата происходит при значении рН, сильно отличном от кислотности среды, при которой ионизируются обе фосфатные группы. Поэтому при нормальных физиологических условиях (значение рН примерно равно 7) кардиолипин несёт только один отрицательный элементарный заряд. Гидроксильные фосфаты образуют при

этом внутримолекулярные водородные связи с центральной гидроксильной группой глицерола, формируя бициклическую резонансную структуру. Эта структура связывает один протон, который затем используется при окислительном фосфорилировании. Такая бициклическая структура «головки» кардиолипина очень компактна, и «головка» этого фосфолипида мала относительно большого «хвоста», состоящего из четырёх длинных цепей.

Ещё одна особенность внутренней мембраны митохондрий – очень высокое содержание белков (до 70 % по весу), представленных транспортными белками, ферментами дыхательной цепи, а также крупными АТФ-синтетазными комплексами. Внутренняя мембрана митохондрии в отличие от внешней не имеет специальных отверстий для транспорта мелких молекул и ионов; на ней, на стороне, обращённой к матриксу, располагаются особые молекулы АТФ-синтазы, состоящие из головки, ножки и основания. При прохождении через них протонов происходит синтез АТФ. В основании частиц, заполняя собой всю толщу мембраны, располагаются компоненты дыхательной цепи. Наружная и внутренняя мембраны в некоторых местах соприкасаются, там находится специальный белок-рецептор, способствующий транспорту митохондриальных белков, закодированных в ядре, в матрикс митохондрии.

Матрикс – ограниченное внутренней мембраной пространство. В матриксе (розовом веществе) митохондрии находятся ферментные системы окисления пирувата, жирных кислот, а также ферменты цикла трикарбоновых кислот (цикла Кребса). Кроме того, здесь же находится митохондриальная ДНК, РНК и собственный белоксинтезирующий аппарат митохондрии.

Находящаяся в матриксе **митохондриальная ДНК** представляет собой замкнутую кольцевую двуспиральную молекулу, в клетках человека имеющую размер 16569 нуклеотидных пар, что приблизительно в 10^5 раз меньше ДНК, локализованной в ядре. В целом митохондриальная ДНК кодирует 2 рРНК, 22 тРНК и 13 субъединиц ферментов дыхательной цепи, что составляет не более половины обнаруживаемых в ней белков. В частности, под контролем митохондриального генома кодируются семь субъединиц АТФ-синтазы, три субъединицы цитохромоксидазы и одна субъединица убихинол-цитохром-с-редуктазы. При этом все белки, кроме одного, две рибосомные и шесть транспортных РНК транскрибируются с более тяжёлой (наружной) цепи ДНК, а 14 других тРНК и один белок транскрибируются с более лёгкой (внутренней) цепи.

На этом фоне геном митохондрий растений значительно больше и может достигать 370000 нуклеотидных пар, что примерно в 20 раз больше описанного выше генома митохондрий человека. Количество генов здесь также примерно в 7 раз больше, что сопровождается появлением в митохондриях растений дополнительных путей электронного транспорта, не сопряжённых с синтезом АТФ.

Митохондриальная ДНК реплицируется в интерфазе, что частично синхронизировано с репликацией ДНК в ядре. Во время же клеточного цикла митохондрии делятся надвое путём перетяжки, образование которой начина-

ется с кольцевой бороздки на внутренней митохондриальной мембране. Детальное изучение нуклеотидной последовательности митохондриального генома позволило установить то, что в митохондриях животных и грибов нередко отклонения от универсального генетического кода. Так, в митохондриях человека кодон АТА вместо изолейцина в стандартном коде кодирует аминокислоту метионин, кодоны АГА и АГГ, обычно кодирующие аргинин, являются стоп-кодонами, а кодон ТГА, в стандартном коде являющийся стоп-кодоном, кодирует аминокислоту метионин. Что касается митохондрий растений, то по-видимому, они используют универсальный генетический код. Другой чертой митохондрий является особенность узнавания кодонов тРНК, заключающаяся в том, что одна подобная молекула способна узнавать не один, но сразу три или четыре кодона. Указанная особенность снижает значимость третьего нуклеотида в кодоне и приводит к тому, что митохондриям требуется меньшее разнообразие типов тРНК. При этом достаточным количеством оказываются всего 22 различных тРНК.

Имея собственный генетический аппарат, митохондрия обладает и собственной белоксинтезирующей системой, особенностью которой в клетках животных и грибов являются очень маленькие рибосомы, характеризующиеся коэффициентом седиментации 55S, что даже ниже аналогичного показателя у 70S-рибосом прокариотического типа. При этом две большие рибосомные РНК также имеют меньшие размеры, чем у прокариот, а малая рРНК вообще отсутствует. В митохондриях растений, напротив, рибосомы более сходны с прокариотическими по размерам и строению.

В специализированных (не делящихся) клетках митохондрии обычно не делятся. Обновление пула митохондрий в этом случае происходит путём созревания митохондрий из протомитохондрий, имеющих исходно диаметр 0,1-0,2 микрона. Откуда берутся протомитохондрии неизвестно, но предполагается, что затравкой для них служит ДНК постмитохондрий, высвобождающаяся в цитоплазму. Протомитохондрии обладают высокой скоростью дыхания, но невысоким дыхательным контролем.

Митохондриальные белки. Количество транслируемых с митохондриальной мРНК белков, формирующих субъединицы крупных ферментных комплексов, ограничено. Значительная часть белков кодируется в ядре и синтезируется на цитоплазматических 80S-рибосомах. В частности, так образуются некоторые белки — переносчики электронов, митохондриальные транслоказы, компоненты транспорта белков в митохондрии, а также факторы, необходимые для транскрипции, трансляции и репликации митохондриальной ДНК. При этом подобные белки на своём N-конце имеют особые сигнальные пептиды, размер которых варьирует от 12 до 80 аминокислотных остатков. Данные участки формируют амфифильные завитки, обеспечивают специфический контакт белков со связывающими доменами митохондриальных распознающих рецепторов, локализованных на наружной мембране. До наружной мембраны митохондрии данные белки транспортируются в частично развёрнутом состоянии в ассоциации с белками-шаперонами. После переноса через наружную и внутреннюю мембраны в местах их контактов

поступающие в митохондрию белки вновь связываются с шаперонами, но уже собственного митохондриального происхождения, которые подхватывают пересекающий мембраны белок, способствуют его втягиванию в митохондрию, а также контролируют процесс правильного сворачивания полипептидной цепи. Большинство шаперонов обладает АТФазной активностью, в результате чего как транспорт белков в митохондрию, так и образование их функционально активных форм являются энергозависимыми процессами.

2 Функции митохондрий и энергопреобразование.

Одной из основных функций митохондрий является синтез АТФ – универсальной формы химической энергии в любой живой клетке. Как и у прокариот, данная молекула может образовываться двумя путями: в результате субстратного фосфорилирования в жидкой фазе (например, при гликолизе) или в процессе мембранного фосфорилирования, связанного с использованием энергии трансмембранного электрохимического градиента протонов (ионов водорода). Митохондрии реализуют оба эти пути, первый из которых характерен для начальных процессов окисления субстрата и происходит в матриксе, а второй завершает процессы энергообразования и связан с кристами митохондрий. При этом своеобразие митохондрий как энергообразующих органелл эукариотической клетки определяет именно второй путь генерации АТФ, получивший название «хемиосмотического сопряжения». По сути это последовательное превращение химической энергии восстанавливающих эквивалентов НАДН в электрохимический протонный градиент $\Delta\mu\text{H}^+$ по обе стороны внутренней мембраны митохондрии, что приводит в действие мембранно-связанную АТФ-синтетазу и завершается образованием макроэргической связи в молекуле АТФ.

В целом весь процесс энергообразования в митохондриях может быть разбит на четыре основные стадии, первые две из которых протекают в матриксе, а две последние – на кристах митохондрий:

- превращение поступивших из цитоплазмы в митохондрию пирувата и жирных кислот в ацетил-СоА;
- окисление ацетил-СоА в цикле Кребса, ведущее к образованию НАДН и двух молекул CO_2 ;
- перенос электронов с НАДН на кислород по дыхательной цепи с образованием H_2O ;
- образование АТФ в результате деятельности мембранного АТФ-синтетазного комплекса.

Ещё в цитоплазме в серии из 10 отдельных ферментативных реакций гликолиза шестиуглеродная молекула глюкозы частично окисляется до двух трёхуглеродных молекул пирувата с образованием двух молекул АТФ. Затем пируват переносится из цитозоля через наружную и внутреннюю мембраны в матрикс, где первоначально декарбоксилируется и превращается в ацетил-СоА. Этот процесс катализируется крупным пируватдегидрогеназным комплексом, имеющим размер, сопоставимый с размером рибосомы, и состоя-

щим из трёх ферментов, пяти коферментов и двух регуляторных белков. Точно так же жирные кислоты, полученные при расщеплении нерастворимых триглицеридов в цитоплазме, переносятся в митохондриальный матрикс в виде ацил-СоА-производных и подвергаются бета-окислению с образованием ацетил-СоА.

На следующем этапе, также протекающем в матриксе митохондрии, ацетил-СоА полностью окисляется в цикле Кребса. В его работе задействованы четыре отдельных фермента, за каждый цикл обеспечивающие распад ацетил-СоА на два атома углерода, в виде CO_2 . Этот процесс обеспечивает образование одной молекулы ГТФ, а также НАДН – высокоэнергетического промежуточного соединения, которое легко отдаёт электроны в цепь переноса электронов на кристах митохондрий.

Дальнейшие процессы энергообразования в митохондрии происходят на её кристах и связаны с переносом электронов от НАДН к кислороду. В соответствии с тем, что потребление кислорода в качестве окислителя обычно называют «внутриклеточным дыханием», электронно-транспортную цепь ферментов, осуществляющих последовательный перенос электронов от НАДН к кислороду, часто называют «дыхательной цепью». При этом трансформация энергии окисления осуществляется ферментами, расположенными на кристах митохондрий и осуществляющими векторный (направленный по отношению к сторонам мембраны) перенос протонов водорода из матрикса митохондрии в межмембранное пространство. В этом состоит принципиальное отличие работы оксидоредуктаз дыхательной цепи от функционирования ферментов, катализирующих реакции в гомогенном (изотропном) растворе, где вопрос о направлении реакции в пространстве не имеет смысла.

Весь процесс переноса электрона по дыхательной цепи может быть разбит на три стадии, каждая из которых катализируется отдельным трансмембранным липопроteidным комплексом (I, III и IV), встроенным в мембрану кристы митохондрии. В состав каждого из названных комплексов входят следующие компоненты:

- большой олигомерный фермент, катализирующий перенос электронов;
- небелковые органические (простетические) группы, принимающие и высвобождающие электроны;
- белки, обеспечивающие движение электронов.

Каждый из этих комплексов осуществляет перенос электронов от донора к акцептору по градиенту редокс-потенциала через ряд последовательно функционирующих переносчиков. В качестве последних в дыхательной цепи митохондрий функционируют мигрирующие в плоскости мембраны жирорастворимые молекулы убихинона, а также небольшие (молекулярная масса 13 кДа) водорастворимые белки, содержащие ковалентно связанный гем и называемые «цитохромами с». При этом три из пяти компонентов, составляющих дыхательную цепь, работают так, что перенос электронов сопровождается переносом протонов через мембрану крист митохондрий в направлении из матрикса в межмембранное пространство.

Дыхательная цепь начинается с комплекса I (НАДН-убихинон-оксидоредуктаза), состоящего как минимум из 26 полипептидных цепей и имеющего молекулярную массу около 850 кДа. Функциональная активность этого комплекса определяется тем, что он содержит в своём составе более 20 атомов железа, упакованных в ячейки из атомов серы, а также флаavin (фла-винмононуклеотид – производное витамина рибофлавина). Комплекс I ката-лизирует окисление НАДН, отщепляя от него два электрона, которые после «путешествия» по окислительно-восстановительным компонентам комплекса I попадают на молекулу-переносчик, в качестве которой выступает убихинон (Q). Последний способен ступенчато восстанавливаться, принимая на себя по два электрона и протона и, таким образом, превращаясь в восстановленную форму – убихинол (QH₂).

Энергетический потенциал (запас энергии) в молекуле убихинола су-щественно ниже, чем в молекуле НАДН, а разница в подобной энергии вре-менно запасается в виде электрохимического протонного градиента. Послед-ний возникает в результате того, что перенос электронов по простетическим группам комплекса I, ведущий к снижению энергетического потенциала электронов, сопровождается трансмембранным переносом двух протонов из матрикса в межмембранное пространство митохондрии.

Восстановленный убихинол мигрирует в плоскости мембраны, где до-стигает второго фермента дыхательной цепи – комплекса III (цитохром bc₁). Последний представляет собой димер с молекулярной массой более 300 кДа, сформированный из восьми полипептидных цепей и содержащий атомы же-леза как в виде железосерных центров, так и в виде комплексов с гемами b(I), b(II) и c₁ – сложными гетероциклическими молекулами с четырьмя атомами азота, расположенными по углам металлосвязывающего квадрата. Комплекс III катализирует реакцию окисления двух убихинолов до убихинонов, вос-станавливая две молекулы цитохрома c (гемсодержащий переносчик, нахо-дящегося в межмембранном пространстве). Отщепляющиеся при этом от убихинолов четыре протона освобождаются в межмембранное пространство, продолжая формирование электрохимического градиента.

Последняя стадия катализируется комплексом IV (цитохром с-оксидаза) с молекулярной массой около 200 кДа, состоящим из 10-13 поли-пептидных цепей и, помимо двух различных гемов, включающим также не-сколько атомов меди, прочно связанных с белками. При этом электроны, от-бираемые у восстановленного цитохрома c, пройдя по атомам железа и меди в составе комплекса IV, попадают на связанный в активном центре этого фермента кислород, что приводит к образованию воды.

Таким образом, суммарная реакция, катализируемая ферментами дыха-тельной цепи, состоит в окислении НАДН кислородом с образованием воды. По сути этот процесс заключается в ступенчатом переносе электронов между атомами металлов, присутствующих в простетических группах белковых комплексов дыхательной цепи, где каждый последующий комплекс обладает более высоким сродством к электрону, чем предыдущий. При этом сами электроны передаются по цепи до тех пор, пока не соединятся с молекуляр-

ным кислородом, обладающим наибольшим сродством к электронам. Освобождаемая же при этом энергия запасается в виде электрохимического (протонного) градиента по обе стороны внутренней мембраны митохондрий. При этом считается, что в процессе транспорта по дыхательной цепи пары электронов перекачивается от трёх до шести протонов.

Завершающим этапом функционирования митохондрии является генерация АТФ, осуществляемая встроенным во внутреннюю мембрану специальным макромолекулярным комплексом с молекулярной массой 500 кДа. Этот комплекс, называемый АТФ-синтазой, как раз и катализирует синтез АТФ путём конверсии энергии трансмембранного электрохимического градиента протонов водорода в энергию макроэргической связи молекулы АТФ.

АТФ-синтаза. В структурно-функциональном плане АТФ-синтаза состоит из двух крупных фрагментов, обозначаемых символами F1 и F0. Первый из них (фактор сопряжения F1) обращён в сторону матрикса митохондрии и заметно выступает из мембраны в виде сферического образования высотой 8 нм и шириной 10 нм. Он состоит из девяти субъединиц, представленных пятью типами белков. Полипептидные цепи трёх субъединиц α и стольких же субъединиц β уложены в похожие по строению белковые глобулы, которые вместе образуют гексамер $(\alpha\beta)_3$, имеющий вид слегка приплюснутого шара. Подобно плотно уложенным долькам апельсина, последовательно расположенные субъединицы α и β образуют структуру, характеризующуюся осью симметрии третьего порядка с углом поворота 120° . В центре этого гексамера находится субъединица γ , которая образована двумя протяжёнными полипептидными цепями и напоминает слегка деформированный изогнутый стержень длиной около 9 нм. При этом нижняя часть субъединицы γ выступает из шара на 3 нм в сторону мембранного комплекса F0. Также внутри гексамера находится минорная субъединица ϵ , связанная с γ . Последняя (девятая) субъединица обозначается символом δ и расположена на внешней стороне F1.

Мембранная часть АТФ-синтазы, называемая фактором сопряжения F0, представляет собой гидрофобный белковый комплекс, пронизывающий мембрану насквозь и имеющий внутри себя два полуканала для прохождения протонов водорода. Всего в состав комплекса F0 входит одна белковая субъединица типа a, две копии субъединицы b, а также от 9 до 12 копий мелкой субъединицы c. Субъединица a (молекулярная масса 20 кДа) полностью погружена в мембрану, где образует шесть пересекающих её α -спиральных участков. Субъединица b (молекулярная масса 30 кДа) содержит лишь один сравнительно короткий погружённый в мембрану α -спиральный участок, а остальная её часть заметно выступает из мембраны в сторону F1 и закрепляется за расположенную на её поверхности субъединицу δ . Каждая из 9-12 копий субъединицы c (молекулярная масса 6-11 кДа) представляет собой сравнительно небольшой белок из двух гидрофобных α -спиралей, соединённых друг с другом короткой гидрофильной петлёй, ориентированной в сторону F1, а все вместе образуют единый ансамбль, имеющий форму погружённого в мембрану цилиндра. Выступающая из комплекса F1 в сторону F0 субъеди-

ница γ как раз и погружена внутрь этого цилиндра и достаточно прочно зацеплена за него.

Таким образом, в молекуле АТФ-синтазы можно выделить две группы белковых субъединиц, которые могут быть уподоблены двум деталям мотора: ротору и статору. «Статор» неподвижен относительно мембраны и включает в себя шарообразный гексамер $(\alpha\beta)_3$, находящуюся на его поверхности и субъединицу δ , а также субъединицы a и b мембранного комплекса F_0 . Подвижный относительно этой конструкции «ротор» состоит из субъединиц γ и ϵ , которые, заметно выступая из комплекса $(\alpha\beta)_3$, соединяются с погружённым в мембрану кольцом из субъединиц c .

Способность синтезировать АТФ – свойство единого комплекса F_0F_1 , сопряжённого с переносом протонов водорода через F_0 к F_1 , в последнем из которых как раз и расположены каталитические центры, осуществляющие преобразование АДФ и фосфата в молекулу АТФ. Движущей же силой для работы АТФ-синтазы является протонный потенциал, создаваемый на внутренней мембране митохондрий в результате работы цепи электронного транспорта.

Сила, приводящая в движение «ротор» АТФ-синтазы, возникает при достижении разности потенциалов между наружной и внутренней сторонами мембраны > 220 мВ и обеспечивается потоком протонов, протекающих через специальный канал в F_0 , расположенный на границе между субъединицами a и c . При этом путь переноса протонов включает в себя следующие структурные элементы:

Два расположенных несоосно «полуканала», первый из которых обеспечивает поступление протонов из межмембранного пространства к существенно важным функциональным группам F_0 , а другой обеспечивает их выход в матрикс митохондрии;

Кольцо из субъединиц c , каждая из которых в своей центральной части содержит протонируемую карбоксильную группу, способную присоединять H^+ из межмембранного пространства и отдавать их через соответствующие протонные каналы. В результате периодических смещений субъединиц c , обусловленных потоком протонов через протонный канал происходит поворот субъединицы γ , погружённой в кольцо из субъединиц c .

Таким образом, каталитическая активность АТФ-синтазы непосредственно связана с вращением её «ротора», при котором поворот субъединицы γ вызывает одновременное изменение конформации всех трёх каталитических субъединиц β , что в конечном счёте и обеспечивает работу фермента. При этом в случае образования АТФ «ротор» крутится по часовой стрелке со скоростью четыре оборота в секунду, а само подобное вращение происходит дискретными скачками по 120° , каждый из которых сопровождается образованием одной молекулы АТФ.

Непосредственная функция синтеза АТФ локализована на β -субъединицах сопрягающего комплекса F_1 . При этом самым первым актом в цепи событий, приводящих к образованию АТФ, является связывание АДФ и фосфата с активным центром свободной β -субъединицы, находящейся в со-

стоянии 1. За счёт энергии внешнего источника (тока протонов) в комплексе F1 происходят конформационные изменения, в результате которых АДФ и фосфат становятся прочно связанными с каталитическим центром (состояние 2), где становится возможным образование ковалентной связи между ними, ведущей к образованию АТФ. На данной стадии АТФ-синтазы ферменту практически не требуется энергии, которая будет необходима на следующем этапе для освобождения прочно связанной молекулы АТФ из ферментативного центра. Поэтому следующий этап работы фермента заключается в том, чтобы в результате энергозависимого структурного изменения комплекса F1 каталитическая β -субъединица, содержащая прочно связанную молекулу АТФ, перешла в состояние 3, в котором связь АТФ с каталитическим центром ослаблена. В результате этого молекула АТФ покидает фермент, а β -субъединица возвращается в исходное состояние 1, благодаря чему обеспечивается цикличность работы фермента.

Работа АТФ-синтазы связана с механическими движениями её отдельных частей, что позволило отнести этот процесс к особому типу явлений, названных «вращательным катализом». Подобно тому, как электрический ток в обмотке электродвигателя приводит в движение ротор относительно статора, направленный перенос протонов через АТФ-синтазу вызывает вращение отдельных субъединиц фактора сопряжения F1 относительно других субъединиц ферментного комплекса, в результате чего это уникальное энергообразующее устройство совершает химическую работу – синтезирует молекулы АТФ.

В дальнейшем АТФ поступает в цитоплазму клетки, где расходуется на самые разнообразные энергозависимые процессы. Подобный перенос осуществляется специальным встроенным в мембрану митохондрий ферментом АТФ/АДФ-транслоказой, который обменивает вновь синтезированную АТФ на цитоплазматическую АДФ, что гарантирует сохранность фонда адениловых нуклеотидов внутри митохондрий.

3 Растительные митохондрии.

Растительные митохондрии представляют собой сферические или удлинённые органеллы диаметром от 0,5 до 1,0 мкм и длиной от 1 до 3 мкм. Число митохондрий в растительной клетке варьирует в зависимости от метаболической активности соответствующей ткани, однако для клеток одного типа (ткани) концентрация митохондрий в единице объема цитоплазмы обычно достаточно постоянна. Например, небольшие клетки кончика корня проростка кукурузы содержат приблизительно по 200 митохондрий, тогда как гораздо более крупные клетки зрелого корня могут иметь до 2000 митохондрий. В метаболически активных клетках, например, клетках спутниках ситовидных трубок или секреторных клетках, значительная часть (до 20 % от объема цитоплазмы) может быть занята митохондриями, сливающимися в единую «митохондриальную сеть» – хондриом.

Митохондрии, как и хлоропласты, имеют две мембраны – наружную и внутреннюю. Поверхность внутренней мембраны больше, чем внешней. На

ее долю приходится более 90 % всех митохондриальных липидов. Существенное увеличение поверхности внутренней мембраны митохондрий связано с наличием крист, которые достаточно глубоко внедряются в матрикс. На внутренней мембране расположены белковые комплексы дыхательной цепи. В матриксе находятся растворимые ферменты (в частности, цикла Кребса), митохондриальная ДНК (mtDNA), а также рибосомы. Наружная мембрана митохондрий содержит белки-порины, гомологичные бактериальным, и проницаема для небольших молекул. Внутренняя мембрана энергизованна и практически непроницаема для ионов и органических молекул. Транспорт через внутреннюю мембрану, как и у пластид, осуществляется белками-переносчиками (транспортерами) или через специальные каналы. Митохондрии размножаются делением. В отличие от пластид при их делении обычно не обнаруживается разделительного кольца.

Высшие растения, по-видимому, имеют наиболее крупный митохондриальный геном среди всех эукариотических организмов. Если у подавляющего большинства эукариот (в том числе и у водорослей), размер митохондриальной ДНК небольшой и составляет десятки тысяч пар оснований, то у высших растений – сотни тысяч.

Структура митохондриального генома растений также необычна. У большинства высших растений и водорослей ДНК митохондрий (мтДНК) представлена многочисленными кольцевыми молекулами размером не более 80 тыс. п. н., однако у целого ряда организмов, например, у хламидомонад, она имеет не кольцевую, а линейную структуру. Крупная митохондриальная ДНК высших растений часто содержит значительное количество протяженных повторов, а потому способна к внутри- и межмолекулярной рекомбинации с образованием большого числа кольцевых молекул различного размера. В митохондриальном геноме растений, помимо крупных кольцевых молекул ДНК, часто присутствуют кольцевые и линейные плазмиды.

К настоящему времени проведено полное секвенирование митохондриальной ДНК некоторых водорослей, а также высших растений (печеночника, арабидопсиса, риса). Показано, что у разных объектов в составе мтДНК содержится от 25 (у хламидомонады) до 104 (у печеночника) генов. У высших растений мтДНК содержит, как правило, чуть больше 50 генов.

Подавляющая часть генома митохондрий растений состоит из некодирующих последовательностей. Гены отделены друг от друга по меньшей мере несколькими тысячами нуклеотидных пар, поэтому каждый ген обычно считается автономно.

Белоксинтезирующий аппарат растительных митохондрий. Транскрипцию генов осуществляет мономерная РНК-полимераза фагового типа, кодируемая в ядре и способная эффективно мигрировать в митохондрии. Процесс созревания митохондриальных транскриптов в общих чертах сходен с таковым для пластид. Для ряда митохондриальных генов отмечен трансплайсинг. У высших растений практически все мРНК митохондрий подвержены интенсивному редактированию. Этот процесс включает не только ти-

пичное для пластид преобразование $C \rightarrow U$, но и обратную химическую модификацию $U \rightarrow C$.

Митохондриальные рибосомы растений заметно отличаются от цитозольных и пластидных рибосом. В частности, их малая субъединица содержит 18S рРНК, а в большой субъединице помимо 26S рРНК присутствует 5S-фрагмент рРНК. Все типы митохондриальных рРНК кодируются митохондриальным геномом. В отличие от многих эукариот, у которых белки митохондриальных рибосом кодируются исключительно ядерными генами, у высших растений, криптонад и золотистых водорослей более десятка рибосомальных белков кодируются собственным геномом. Особенность митохондриальной белоксинтезирующей системы растений состоит в том, что не все тРНК кодируются митохондриальным геномом. Недостающие варианты тРНК транспортируются в митохондрию из цитозоля.

Молекулярный аппарат аэробного дыхания у растений также находится под двойным генетическим контролем. У всех эукариот растворимые ферменты цикла Кребса находятся под ядерным контролем. Белки электрон-транспортной цепи митохондрий, напротив, обычно находятся под двойным контролем. В геноме митохондрий высших растений кодируются около 20 белков дыхательной цепи.

Транспорт цитозольных белков в митохондрии по механизму похож на транспорт в хлоропласты, но основан на других сигнальных последовательностях и других транспортных системах. Чаше всего кодируемые ядром митохондриальные белки синтезируются с N-терминальной лидерной областью, называемой пресиквенсом. Многие пресиквенсы формируют положительно заряженную амфипатическую α -петлю. Гидрофобные остатки аминокислот пресиквенса расположены на одной поверхности петли, а заряженные остатки – на другой.

Пресиквенс обеспечивает транспорт белка в матрикс митохондрий, после чего расщепляется эндопептидазой. Перенос белков происходит в специальных участках «слипания» внешней и внутренней мембраны митохондрий. В них мембраны не сливаются, но очень тесно контактируют в области площадью 4-6 нм.

Эти участки занимают приблизительно от 5 до 10% поверхности наружной мембраны. В переносе белков участвуют шапероны. Для переноса белков в митохондрию необходимы АТФ и градиент электрохимического потенциала на мембране.

Транспорт белков во внутреннюю мембрану и межмембранное пространство, как и у хлоропластов, требует двух сигналов. Такие белки обладают вторым пресиквенсом – гидрофобной последовательностью аминокислот, расположенной сразу после N-концевого пресиквенса.

Митохондрии растений, помимо своей основной задачи – окислительного фосфорилирования – имеют ряд дополнительных функций. Это прежде всего биосинтез некоторых соединений растительной клетки: ряда аминокислот, фолата, тимидилата. В митохондриях проходят важные метаболические

процессы, например, декарбоксилирование и дезаминирование аланина в системе фотодыхания.

Тема 10 Пластиды

- 1 Общая характеристика пластид.
2. Хлоропласты высших растений.
- 3 Геном и белоксинтезирующая система хлоропластов.

1 Общая характеристика пластид.

Пластиды – полуавтономные органеллы высших растений, водорослей и некоторых фотосинтезирующих простейших. Пластиды имеют от двух до четырёх мембран, собственный геном и белоксинтезирующий аппарат.

Согласно симбиогенетической теории пластиды, как и митохондрии, произошли в результате «захвата» древней цианобактерии предшественником эукариотической «хозяйской» клетки. При этом внешняя мембрана пластид соответствует плазматической мембране хозяйской клетки, межмембранное пространство – внешней среде, внутренняя мембрана пластид – мембране цианобактерии, а строма пластид – цитоплазме цианобактерии. Наличие трёх (эвгленовые и динофлагелляты) или четырёх (золотистые, бурые, жёлто-зелёные, диатомовые водоросли) мембран считается результатом двух- и трёхкратного эндосимбиоза соответственно.

Пластиды многих водорослей отличаются от пластид высших растений строением и составом пигментов.

В большинстве учебников ботаники и физиологии растений описаны пластиды (хлоропласты), характерные для цветковых растений. Они имеют две наружные мембраны, тилакоиды, собранные в стопки – граны, и два основных фотосинтетических пигмента – хлорофилл а и хлорофилл b. Но на самом деле пластиды гораздо разнообразнее и по строению, и по составу пигментов.

Первичные пластиды характерны, кроме высших растений, для зеленых и харовых водорослей, красных водорослей и глаукофитовых. Все эти пластиды окружены двумя мембранами. Считается, что они были приобретены в результате симбиоза гетеротрофных жгутиковых эукариот с предками хлоропластов – цианобактериями.

При этом и у этих групп водорослей пластиды заметно различаются. У зеленых и харовых водорослей пластиды по строению и составу пигментов такие же, как у высших растений. Считается, что высшие растения произошли от водорослей, сходных с харовыми. По строению их хлоропласты наиболее сходны с цианобактерией *Prochloron*. Эти пластиды содержат две формы хлорофилла – хлорофилл а и хлорофилл b. Те же формы хлорофилла имеет и *Prochloron*.

У красных и глаукофитовых водорослей тилакоиды не собраны в граны, а на их поверхности сидят особые тельца – фикобилисомы. Они состоят

из белков фикобилипротеинов. Окраску им придают входящие в их состав хромофоры фикобилины: фикоэритрин – красную, а фикоцианин – голубоватую. Они улавливают свет и передают его хлорофиллу а. У красных водорослей и некоторых цианобактерий есть также хлорофилл d.

По строению и составу пигментов эти хлоропласты наиболее сходны с большинством видов цианобактерий. При этом хлоропласты глаукофитовых водорослей имеют особенность: между двумя мембранами у них есть слой пептидогликана – вещества, образующего клеточные стенки бактерий. Эти хлоропласты, называемые часто цианеллы, рассматривают как «живые ископаемые» – эндосимбиотические органеллы, сохранившие примитивные предковые признаки.

Вторичные пластиды характерны для большинства групп водорослей. Они были приобретены в результате эндосимбиоза гетеротрофных протистов с автотрофными протистами, то есть в результате поглощения хищником-эукариотом другого эукариота – автотрофа, уже имевшего первичные пластиды. Исходно вторичные пластиды окружены четырьмя мембранами (снаружи внутрь – мембрана пищеварительной вакуоли, плазмалемма эукариотической клетки, две мембраны первичной пластиды). Впоследствии у многих групп водорослей одна или две из четырех мембран вторичных пластид редуцировались, а у некоторых все четыре мембраны сохранились.

Наиболее близки к исходному строению хлоропласты криптофитовых водорослей и хлорарахиевых водорослей. У этих небольших групп одноклеточных водорослей хлоропласты окружены четырьмя мембранами. У криптофитовых они содержат хлорофилл а, хлорофилл с и фикобилипротеины. У хлорарахиевых присутствуют хлорофилл а и хлорофилл b. Между второй и третьей мембраной находится нуклеоморф – рудиментарное ядро с сильно уменьшенным ядерным геномом.

Сейчас секвенированы полные геномы всех компартментов обеих групп водорослей. Оба исследованных нуклеоморфа содержат по три маленькие хромосомы (у изученной криптофитовой водоросли общий размер генома всего 550.000 п.н.). Из белковых генов нуклеоморфов всего примерно по 30 генов кодируют белки для первичной пластиды; остальные – это в основном «гены домашнего хозяйства» Их тоже не хватает: в перипластидное пространство (то есть в эукариота-симбионта) попадает из цитоплазмы хозяина более 2000 белков у криптофитовых и около 1000 у хлорарахиевых. В свою очередь, из нуклеоморфов в ядро переместились сотни генов. Геном нуклеоморфа у криптофитовых очень компактный: в нем короткие интроны, почти нет спейсеров, а 91 % последовательностей – кодирующие, как у прокариот!

У гаптофитовых и диатомовых водорослей, недавно открытого фототрофного протиста *Chromera velia* и у ее ближайших родственников споровиков (*Aureocymplexa*) есть четырехмембранные пластиды, утратившие нуклеоморф. У других водорослей (например, динофлагеллят и эвгленовых) встречаются трехмембранные хлоропласты со своеобразным набором хлоро-

филлов. Наличие трех мембран можно объяснить тем, что после двойного симбиоза (как у криптофитовых) одна из мембран редуцировалась.

По-видимому, в данном случае это была наружная мембрана клетки эукариотического симбионта; сохранились обе мембраны первичной пластиды и мембрана фагосомы.

Кем же были предки вторичных пластид? Сейчас считается, что хлоро-рахниевые и эвгленовые независимо друг от друга поработили зеленые водоросли. Все остальные группы, имеющие вторичные пластиды, приобрели в свое время в качестве симбионта красную водоросль.

Общие черты строения пластид высших растений. Типичные пластиды высших растений окружены оболочкой из двух мембран – внешней и внутренней. Внутренняя и внешняя мембраны пластид бедны фосфолипидами и обогащены галактолипидами. Внешняя мембрана не имеет складок, никогда не сливается с внутренней мембраной и содержит поровый белок, обеспечивающий свободный транспорт воды, ионов и метаболитов с массой до 10 кДа. Внешняя мембрана имеет зоны тесного контакта с внутренней мембраной; предполагается, что в этих участках осуществляется транспорт белков из цитоплазмы в начало пластид. Внутренняя мембрана проницаема для небольших незаряженных молекул и для недиссоциированных низкомолекулярных монокарбоновых кислот, для более крупных и заряженных метаболитов в мембране локализованы белковые переносчики. Строма – внутреннее содержимое пластид – представляет собой гидрофильный матрикс, содержащий неорганические ионы, водорастворимые органические метаболиты, геном пластид (несколько копий кольцевой ДНК), рибосомы прокариотического типа, ферменты матричного синтеза и другие ферментативные системы. Эндомембранная система пластид развивается в результате отщипывания везикул от внутренней мембраны и их упорядочивания. Степень развития эндомембранной системы зависит от типа пластид. Наибольшего развития эндомембранная система достигает в хлоропластах, где она является местом протекания световых реакций фотосинтеза и представлена свободными тилакоидами стромы и тилакоидами, собранными в стопки – граны. Внутреннее пространство эндомембран называется люмен. Люмен тилакоидов, так же, как и строма, содержит ряд водорастворимых белков.

Размножение и наследование пластид высших растений. Пластиды образуются путём деления уже существующих пластид. Наиболее часто делятся пропластиды, этиопласты и молодые хлоропласты. В меристематических тканях деление пластид коррелирует с делением клеток, поэтому в материнских и дочерних клетках число пластид примерно одинаковое. Механизм деления близок к делению прокариотических клеток. Деление пластид начинается с сжатия в центре, которое, углубляясь, образует перетяжку между двумя дочерними пластидами, после чего происходит полное разделение. На стадии перетяжки на внешней мембране образуется кольцо из белка, близкого по структуре к сократительному белку бактерий FtsZ.

У большей части цветковых растений наследование пластид происходит по материнской линии, поскольку в спермии пластиды либо не попадают,

либо деградируют в ходе развития мужского гаметофита или двойного оплодотворения. У некоторых растений (герань, свинчатка, ослинник) было обнаружено двуродительское наследование пластид. Для некоторых голосеменных растений (гинкго, саговники) характерно наследование пластид по отцовской линии.

Пластиды высших растений способны к дифференцировке, дедифференцировке и редифференцировке, набор пластид в клетке зависит от её типа. Пластиды высших растений разнообразны по строению и выполняют широкий спектр функций:

- фотосинтез;
- восстановление неорганических ионов (нитрита, сульфата);
- синтез многих ключевых метаболитов (порфирины, пурины, пиримидины, многие аминокислоты, жирные кислоты, изопреноиды, фенольные соединения и др.), при этом некоторые синтетические пути дублируют уже существующие пути цитозоля;
- синтез регуляторных молекул (гиббереллины, цитокинины, АБК и др.);
- запасание железа, липидов, крахмала.

По окраске и выполняемой функции выделяют следующие типы пластид:

Пропластиды – предшественники остальных типов пластид, присутствуют в меристематических клетках. Пропластиды имеют размеры от 0,2 до 1 мкм, что значительно меньше, чем размеры дифференцированных пластид. Внутренняя мембранная система развита слабо, содержат меньше рибосом чем дифференцированные пластиды, могут содержать отложения белка фитотерритина, основная функция которого хранение ионов железа.

Лейкопласты – неокрашенные пластиды, участвующие в синтезе изопреноидов эфирных масел (как правило моно- и сесквитерпенов). Характерной особенностью лейкопластов является наличие ретикулярного футляра – сети мембран гладкого эндоплазматического ретикулума, окружающей пластиду. Иногда под термином «лейкопласты» понимают любые неокрашенные пластиды, при этом выделяют следующие типы: амилопласты, элайопласты, протеинопласты.

Амилопласты – внешне похожи на пропластиды, но в строении содержатся гранулы крахмала. Амилопласты, как правило, присутствуют в запасющих органах растений, в частности в клубнях картофеля. В грависенсорных клетках корня амилопласты играют роль статолитов. Амилопласты высших растений могут превращаться в хлоропласты или хромопласты.

Статоциты – клетки растений, обеспечивающие гравитропизм. Внутри содержат статолиты – плотные органеллы, оседающие в нижней части клетки и за счёт этого регулирующие рост корня относительно вертикальной оси. У высших растений статолиты представлены преимущественно специализированными амилопластами, у харовых водорослей в ризоидах располагаются «блестящими телами», содержащие кристаллический сульфат бария. Ткань,

состоящая из статочитов, называется статенхимой. Наиболее изучены статочиты корневых чехликов и крахмалоносных влагалищ стебля.

Элайопласты – служат для запасаания жиров. Жиры в элайопластах запасаются в виде округлых пластоглобул, по существу, являющихся каплями жира. Как и все лейкопласты, элайопласты лишены пигмента, внутренняя мембранная система развита слабо.

Протеинопласты – служат для запасаания белков. Белки запасаются в них в виде кристаллов, кроме того, протеинопласты могут быть точками ферментативной активности, в которую вовлечены содержащиеся в них белки. Хотя все пластиды содержат белки в высоких концентрациях, только в протеинопластах, как было выяснено в 1960-х и 1970-х годах, содержатся крупные белковые включения, видимые как в световой, так и в электронный микроскоп. До сих пор неизвестно, специализируются ли они исключительно на запасаании белков, подобно тому как амилопласты запасают крахмал и элайопласты – жиры. Протеинопласты обнаружены во многих семенах, например, семенах бразильского ореха (*Bertholletia excelsa*) и арахиса культурного (*Arachis hypogaea*).

Этиопласты, или темновые пластиды, развиваются из пропластид в темноте, при освещении они превращаются в хлоропласты. В этиопластах отсутствует хлорофилл, но содержится большое количество протохлорофиллида. Липиды внутренних мембран стромы хранятся в форме рельефной мембранной структуры, называемой проламеллярным телом. Формирование квазикристаллической структуры проламеллярного тела происходит из-за отсутствия мембранных белков тилакоидов, необходимых для их формирования. Известно, что свет инициирует синтез белков тилакоидных мембран и хлорофилла из накопленного протохлорофиллида.

Хлоропласты – зелёные пластиды, основной функцией которых является фотосинтез. Хлоропласты как правило имеют эллипсоидную форму и длину от 5 до 8 мкм. Количество хлоропластов в клетке различно: в клетке хлоренхимы листа *Arabidopsis* содержится около 120 хлоропластов, в губчатой хлоренхиме листа клебевины их около 20, клетка нитчатой морской водоросли *Spirogyra* содержит единственный лентовидный хлоропласт. Хлоропласты имеют хорошо развитую эндомембранную систему, в которой выделяют тилакоиды стромы и стопки тилакоидов – граны. Зелёная окраска хлоропластов обусловлена высоким содержанием основного пигмента фотосинтеза – хлорофилла. Помимо хлорофилла хлоропласты содержат различные каротиноиды. Набор пигментов, участвующих в фотосинтезе (и, соответственно окраска) различен у представителей разных таксонов.

Хромопласты – пластиды, окрашенные в жёлтый, красный или оранжевый цвет. Хромопласты могут развиваться из пропластид или повторно дифференцироваться из хлоропластов; также хромопласты могут редиференцироваться в хлоропласты. Окраска хромопластов связана с накоплением в них каротиноидов. Развитие хромопластов связано с активацией ферментов биосинтеза каротиноидов. Неактивные формы этих ферментов как правило присутствуют в строме, а активные формы локализуются в мембранах пластид,

где также накапливаются липофильные предшественники каротиноидов. Хромопласты определяют окраску осенних листьев, лепестков некоторых цветов (лютики, бархатцы), корнеплодов (морковь), созревших плодов (томат). Пожелтение листьев перед листопадом связано с разрушением хлорофилла и демаскированием уже накопленных в хлоропластах каротиноидов. При этом синтез каротиноидов *de novo* незначителен. Таким образом, изменение пластид при старении листьев отличается от активного перехода хлоропластов в хромопласты при созревании плодов или формировании окрашенных лепестков. В связи с этим хромопласты, образующиеся при стрессе или старении листьев в результате разрушения хлорофилла, называют геронтопласты. Хромопласты могут дифференцироваться непосредственно из пропластид. Хромопласты могут редифференцироваться в хлоропласты, что часто наблюдается при освещении базальной части корнеплода моркови. Хромопласты придают яркий цвет созревшим цветкам и плодам, что необходимо для привлечения насекомых-опылителей и животных, которые разносят их семена.

Фотосинтезирующие структуры низших эукариотических и прокариотических клеток. Строение пластид у низших фотосинтезирующих растений (зеленые, бурые и красные водоросли) в общих чертах сходно с хлоропластами клеток высших растений. Их мембранные системы также содержат фоточувствительные пигменты. Хлоропласты зеленых и бурых водорослей (иногда их называют хроматофорами) имеют также внешнюю и внутреннюю мембраны; последняя образует плоские мешки, располагающиеся параллельными слоями, грани у этих форм не встречаются. У зеленых водорослей в состав хроматофора входят пиреноиды, представляющие собой окруженные мелкими вакуолями зону, вокруг которой происходит отложение крахмала.

Форма хлоропластов у зеленых водорослей очень разнообразна – это или длинные спиральные ленты (*Spirogira*), сети (*Oedogonium*), или мелкие округлые, похожие на хлоропласты высших растений

Среди прокариотических организмов многие группы обладают фотосинтетическими аппаратами и имеют в связи с этим особое строение. Для фотосинтезирующих микроорганизмов (синезеленые водоросли и многие бактерии) характерно, что их фоточувствительные пигменты локализируются в плазматической мембране или в её выростах, направленных вглубь клетки.

В мембранах синезеленых водорослей кроме хлорофилла находятся пигменты фикобилины. Фотосинтезирующие мембраны синезеленых водорослей образуют плоские мешки (ламеллы), которые располагаются параллельно друг над другом, иногда образуя стопки или спирали. Все эти мембранные структуры образуются за счет инвагинаций плазматической мембраны.

У фотосинтезирующих бактерий (*Chromatium*) мембраны образуют мелкие пузырьки, число которых так велико, что они заполняют практически большую часть цитоплазмы. Можно видеть, как эти пузырьки образуются за счет впячивания и последующего роста плазматической мембраны. Эти мембранные пузырьки (их также называют хроматофорами) содержат фоточув-

ствительный пигмент бактериохлорофилл, каратиноиды, компоненты фотосинтетической системы переноса электронов и фотофосфорилирования. Некоторые пурпурные бактерии содержат систему мембран, образующих правильные стопки, наподобие тилакоидов в гранах хлоропластов.

2. Хлоропласты высших растений.

От других типов пластид хлоропласты отличаются наличием зеленых пигментов хлорофиллов и сложно организованной системой внутренних мембран. Хлорофилл обеспечивает поглощение и первичное преобразование энергии света при фотосинтезе, а высокая степень организации внутренних мембранных структур хлоропластов составляет физическую основу для эффективного поглощения и преобразования энергии света в ходе фотосинтеза. Благодаря высокой степени организации внутренней мембранной структуры хлоропластов достигаются условия, необходимые для преобразования энергии:

- 1) определенная ориентация пигментов в мембране, обеспечивающая эффективное поглощение и преобразование энергии света;
- 2) пространственное разделение восстановленных и окисленных фотопродуктов, возникающих в результате первичных актов фотосинтеза, связанных с разделением зарядов в реакционном центре;
- 3) строгая упорядоченность компонентов реакционного центра, где сопряжены быстропротекающие фотофизические и более медленные ферментативные реакции; наличие определенных структур, где фотовозбужденный пигмент и химический акцептор жестко ориентированы относительно друг друга (необходимо для преобразования энергии в реакционных центрах);
- 4) пространственная организация электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) хлоропластов, основанная на определенной последовательности и строгой ориентации переносчиков в мембране (необходима для быстрого и регулируемого транспорта электронов и протонов);
- 5) определенным образом организованная система мембран в хлоропластах, обеспечивающая сопряжение транспорта электронов и синтеза АТФ.

Основные принципы структурной организации хлоропластов.

Внешняя оболочка хлоропластов ограничивает его внутреннее содержимое от цитоплазмы. Это барьер, осуществляющий контроль обмена веществ между хлоропластом и цитоплазмой. Оболочка состоит из двух мембран – наружной и внутренней. Наружная мембрана проницаема для большинства органических и неорганических молекул. Вместе с тем она содержит специальные транслокаторы белков, через которые поступают пептиды из цитоплазмы в хлоропласт.

Внутренняя мембрана оболочки хлоропластов обладает избирательной проницаемостью и осуществляет контроль над транспортом белков, липидов, органических кислот и углеводов между хлоропластом и цитоплазмой. Внутренняя мембрана оболочки участвует также в формировании внутренней мембранной системы хлоропластов.

Строма – гидрофильный, слабоструктурированный матрикс хлоропластов, содержащий водорастворимые органические соединения, а также неорганические ионы. В строме располагаются ферменты углеродного цикла фотосинтеза, здесь осуществляются реакции фотосинтетической ассимиляции углерода. Кроме того, строма содержит ферменты синтеза фотосинтетических пигментов, а также полярных липидов мембран хлоропластов. В строме находятся кольцевая ДНК (может быть несколько одинаковых копий), рибосомы, ферменты матричного синтеза, обеспечивающие синтез белков, входящих в состав мультипептидных комплексов мембран тилакоидов, а также водорастворимого белка – большой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы-оксигеназы – ключевого фермента углеродного цикла фотосинтеза.

Внутренняя мембранная система хлоропластов – здесь протекают световые реакции фотосинтеза. Она хорошо развита и неоднородна. Внутренние мембраны (ламеллы), занимают большую часть общего объема хлоропластов. Мембраны образуют тилакоиды, которые либо тесно соприкасаются друг с другом и уложены в стопки, или грани (тилакоиды гран), либо пронизывают строму, соединяя грани между собой (тилакоиды стромы). Соответственно образующие их мембраны называют мембранами (ламеллами) гран и мембранами (ламеллами) стромы.

Пространство внутри тилакоидов называется внутритилакоидным пространством, или люменом.

Согласно современным представлениям, при образовании гран внутренняя мембрана образует не замкнутые «мешочки», а, скорее, наслоения, складки. В результате внутри хлоропласта возникает единая внутренняя мембрана, которая разделяет внутреннее пространство хлоропластов на два отсека (компартамента) – строму и люмен. Интеграция внутреннего пространства тилакоидов гран и стромы достигается за счет того, что тилакоиды гран пронизаны одной или несколькими тилакоидами стромы. Тилакоиды стромы могут быть сильно перфорированы, в результате чего образуются узкие или широкие мембранные каналы, называемые фретами, которые связывают грани между собой.

Значение столь сложной организации внутренних мембран хлоропластов состоит в следующем.

- Внутренние мембраны хлоропластов включают мультипептидные комплексы, обеспечивающие поглощение и преобразование энергии света в ходе световых реакций фотосинтеза. Благодаря значительному мембранному пространству достигается увеличение числа функциональных единиц, способных осуществлять световые реакции фотосинтеза.

- Единство внутренней мембранной системы хлоропластов позволяет отдельным компонентам мембраны мигрировать латерально и вступать между собой в структурный и функциональный контакт. Это необходимо для переноса энергии квантов света в реакционные центры, а также для транспорта электронов по электрон-транспортной цепи в ходе световых реакций фотосинтеза.

- Разделение мембраной всего внутреннего пространства хлоропластов на два компартмента – стромальное и внутритилакоидное пространство (люмен) – позволяет создавать электрохимические градиенты ионов между ними.

Создание электрохимического градиента H^+ на внутренних мембранах хлоропластов – важный этап в трансформации энергии квантов света в энергию макроэргических связей АТФ.

Образование гранальной структуры внутри хлоропластов значительно повышает общую эффективность фотосинтеза и создает дополнительные возможности для регуляции световых реакций. Сегрегация (разделение) в отдельных отсеках мембраны (в стромальных или гранальных тилакоидах) компонентов мембран с различными функциями позволяет добиться определенной независимости их функционирования. Гранальная структура хлоропластов высших растений – итог длительного эволюционного процесса. Она впервые появилась у зеленых водорослей (эвгленовых), что было сопряжено с появлением у них хлорофилла b.

Химический состав и физические свойства тилакоидных мембран. Общий принцип организации тилакоидных мембран хлоропластов подобен структуре любой другой мембраны клетки: основу мембраны составляет билипидный слой, в который погружены в большей или меньшей степени отдельные белки и белковые комплексы. Вместе с тем существует определенная специфика липидного и белкового состава, а также особое распределение компонентов в мембранной системе хлоропластов. Это позволяет мембранам осуществлять уникальные энергопреобразующие реакции фотосинтеза и регулировать их в соответствии с меняющимися внешними условиями.

Химический анализ внутренних мембран хлоропластов показывает, что они включают липиды, белки и углеводы. Соотношение липидов и белков по весу близко к отношению 1:1. С учетом того, что молекулярная масса липидов меньше молекулярной массы белков, считают, что в среднем на 1 молекулу белка приходится около 500 молекул липидов. Углеводы главным образом входят в состав липидов (галактолипидов).

Липидный состав мембран тилакоидов. В мембранах хлоропластов найдены две группы липидов: циклические и нециклические.

Циклические липиды составляют около 65 % липидов мембран хлоропластов. К ним относятся хлорофиллы и каротиноиды – фотосинтетические пигменты хлоропластов, а также хиноны – пластохиноны и филлохиноны (витамин K_1). Эти соединения непосредственно участвуют в реакциях фотосинтеза. Кроме того, в мембранах хлоропластов в больших количествах присутствует α -токоферол, который повышает структурированность мембран и их устойчивость к свободнорадикальным процессам.

Нециклические липиды в мембранах хлоропластов представлены галактолипидами (нейтральными липидами), фосфолипидами и сульфолипидами. Они формируют липидный матрикс и участвуют в структурной организации мембран. Особенностью мембран хлоропластов является высокое содержание в них галактолинидов, в отличие от других мембран клетки, где

преобладают фосфолипиды. В мембранах тилакоидов хлоропластов галактолипиды составляют до 75 % всех липидов мембран. Галактолипиды содержат один или два остатка углевода, в соответствии с чем выделяют моногалактолипиды (моногалактозилдиацилглицеролы – МГДГ) и дигалактолипиды (дигалактозилдиацилглицеролы – ДГДГ). Галактолипиды не формируют истинный бислой, однако их присутствие важно для образования изгибов мембран и формирования тилакоидов. Кроме того, клиновидная форма молекул галактолипидов способствует встраиванию белков в липидный слой мембраны.

Фосфолипиды и сульфолипиды – анионные липиды, несущие отрицательный заряд при физиологических условиях pH. Основным представителем фосфолипидов в мембранах хлоропластов является фосфатидилглицерол (11 % от общего содержания в них липидов). В фосфатидилглицерол мембран хлоропластов входит специфичная для хлоропластов жирная кислота – трансгексадеценовая (транс- $C_{16:1}$). Ее присутствие необходимо для сборки светособирающих комплексов хлоропластов. Сульфолипиды (сульфохиновозилдиацилглицеролы), содержащие серу полярные липиды, найдены только у растений. Они составляют около 10 % от общего содержания липидов мембран. Липиды этой группы определяют поверхностный заряд мембран, а также влияют на функциональную активность белковых комплексов тилакоидных мембран.

Жирнокислотный состав липидов внутренних мембран хлоропластов также уникален. Он характеризуется высоким процентным содержанием ненасыщенных жирных кислот – линолевой ($C_{18:2}$) и линоленовой ($C_{18:3}$). Обогащенность липидов ненасыщенными жирными кислотами приводит к сдвигу температуры фазового перехода мембран тилакоидов в область более низких температур по сравнению с другими мембранами клетки. Кроме того, большое содержание ненасыщенных жирных кислот определяет высокую текучесть внутренних мембран тилакоидов и способствует латеральной, ротационной и трансмембранной диффузии компонентов мембран, наблюдаемой в ходе световых реакций фотосинтеза. Вместе с тем ненасыщенные жирные кислоты подвержены перекисному окислению, что в условиях образования активных форм кислорода в хлоропластах становится чрезвычайным фактором риска повреждения мембран.

Белковые компоненты тилакоидных мембран. В мембранах хлоропластов насчитывают более 60 различных белков. Большая их часть – интегральные белки мультипептидных комплексов, осуществляющие процессы поглощения и трансформации энергии при фотосинтезе. Другая часть белков располагается на поверхности тилакоидных мембран либо со стороны стромы, либо со стороны люмена. Поверхностные белки входят в периферические домены мультипептидных комплексов. Ряд поверхностных белков являются самостоятельными компонентами мембран.

Пять основных полипептидных комплексов встроены во внутренние мембраны хлоропластов: комплекс фотосистемы I (ФСI), комплекс фотосистемы II (ФСII), светособирающий комплекс II (ССКII), цитохромный b_6f -комплекс и АТФ-синтаза (CF_0 – CF_1 -комплекс). Комплексы ФСI, ФСII и

ССКП содержат пигменты (хлорофиллы, каротиноиды), большинство которых функционируют как пигменты-антенны, собирающие энергию для пигментов реакционных центров ФСІ и ФСІІ. Комплексы ФСІ и ФСІІ, а также цитохромный b_6f -комплекс имеют в своем составе редокс-кофакторы и участвуют в фотосинтетическом транспорте электронов. Белки этих комплексов отличаются высоким содержанием гидрофобных аминокислот, что обеспечивает их встраивание в мембрану. АТФ-синтаза ($CF_0 - CF_1$ -комплекс) осуществляет синтез АТФ.

Кроме крупных полипептидных комплексов в мембранах тилакоидов имеются небольшие белковые компоненты – пластоцианин, ферредоксин и ферредоксин-НАДФ-оксидоредуктаза, расположенные на поверхности мембран. Они входят в электрон-транспортную систему фотосинтеза.

Вода и неорганические ионы. Вода играет структурную роль, участвуя в формировании функционально активной конформации белковых компонентов мембран, стабилизирует мембраны, непосредственно участвует в процессах фотосинтеза. Неорганические ионы (в первую очередь одно- и двухвалентные катионы – K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) определяют общий поверхностный заряд мембран и возможность взаимодействия отдельных мембран друг с другом. Они контролируют образование фан в хлоропласте. Ионы важны также для сборки комплексов белков в мембране и создания определенной функционально активной конформации.

Ультраструктура внутренних мембран хлоропластов. Отдельные компоненты мембран занимают положение, строго детерминированное их физико-химическими свойствами. Гидрофобные аминокислоты в белках комплексов позволяют им встраиваться в билипидный слой мембран.

Гидрофильные участки этих белков, напротив, выталкиваются из гидрофобного слоя мембран и занимают поверхностное положение. В результате гидрофобных, гидрофильных, а также электростатических взаимодействий на поверхности мембран пептиды определенным образом ориентированы относительно друг друга в комплексах и относительно поверхности мембраны. Электростатические взаимодействия между отдельными пептидами направляют и регулируют сборку полипептидных комплексов мембран хлоропластов. С электростатическими и отчасти ковалентными взаимодействиями белков и кофакторов (пигментов, редокс-агентов) связано формирование активных функциональных центров в этих комплексах.

Асимметрия мембран. Различают трансмембранную и латеральную асимметрию (гетерогенность) внутренних мембран хлоропластов.

Трансмембранная асимметрия выражается в неоднородности химического состава и структуры внешнего и внутреннего слоя (лепестка) билипидной мембраны. Мультипептидные комплексы определенным образом ориентированы в мембране, причем существует достаточно высокая консервативность в расположении отдельных субъединиц и связанных с ними кофакторов относительно наружной и внутренней поверхностей мембраны. Первичные и вторичные доноры электронов в ФСІ и ФСІІ всегда расположены в доменах, приближенных к люменальной части комплексов, а акцепторы элект-

тронов – в доменах, обращенных к строме. Поверхностные белки мембран также всегда располагаются на определенной стороне мембраны (пластоцианин – со стороны люмена, ферредоксин и ферредоксин-НАДФ-оксидоредуктаза – с наружной, стромальной, стороны). Неравномерно также распределение липидных компонентов в мембране: с внешним липидным слоем (лепестком) ассоциированы около 60 % всех галактолипидов и около 70% фосфатидилглицерола, тогда как сульфохиновозилглицерол сосредоточен главным образом во внутреннем слое мембраны. Трансмембранная асимметрия внутренних мембран хлоропластов чрезвычайно важна для осуществления первичных реакций фотосинтеза, связанных с первичным разделением зарядов на мембране, а также для последующих процессов транспорта электронов и протонов, сопряженных с реакциями трансформации энергии при фотосинтезе.

Латеральная асимметрия (гетерогенность) состоит в том, что мембраны тилакоидов гран и стромы существенно различаются по химическому составу, структуре и функциям. Гранальные мембраны также различаются в зависимости от расположения в гране: мембраны торцевых (концевых) областей, боковых (маргинальных) областей и внутригранальные мембраны, тесно контактирующие друг с другом (спаренные).

Фотосистема I находится в стромальных тилакоидах (32 %), а также в маргинальных (36 %) и торцевых (32 %) областях гран. Фотосистема II в основном локализована в гранах, в области тесного контакта – «стэкинга» (85 %). Цитохромный комплекс распределен между стромальными и гранальными тилакоидами относительно равномерно. АТФ-синтазный комплекс располагается главным образом в мембранах стромальных тилакоидов, а также в маргинальных и торцевых мембранах гран. Такое неоднородное распределение комплексов во внутренней мембране создает структурную основу для функциональной гетерогенности разных областей внутренней мембранной структуры и обеспечивает возможность регуляции фотосинтетических процессов на уровне мембраны. В зависимости от условий освещения распределение компонентов мембран может меняться.

3 Геном и белоксинтезирующая система хлоропластов.

Все пластиды имеют собственный геном и белоксинтезирующую систему. У современных фотосинтезирующих эукариот пластидная ДНК (плДНК), как правило, представлена многокопийной кольцевой молекулой размером от 120 до 290 тыс. п. н. У большинства видов эта молекула содержит два инвертированных повтора (IRA и IRB – inverted repeats), разделяющих ее на две неравные области. У многих бобовых и большинства голосеменных растений ДНК пластид имеет всего лишь один IR-повтор и обладает измененным порядком генов.

Для некоторых видов высших растений проведено полное секвенирование плДНК. Установлено, что ДНК пластид содержит около 100 генов, причем их набор близок для разных видов. Все идентифицированные гены можно разделить на две группы:

- гены, обслуживающие процессы транскрипции и трансляции белков пластид (гены «домашнего хозяйства»);
- гены белков, обеспечивающих «полезную работу» пластид, прежде всего процесс фотосинтеза.

Многие пластидные гены организованы в виде оперонов – блоков генов, считывающихся с единого промотора. Ряд пластидных генов имеют мозаичную структуру, т.е. состоят из чередующихся экзонов и интронов.

Транскрипцию в пластидах обеспечивают РНК-полимеразы двух типов:

Мультисубъединичная пластидная РНК-полимераза бактериального типа состоит из двух α -субъединиц и по одной β , β' , β'' (все эти субъединицы кодируются в пластидном геноме). Однако для её активации необходимо присутствие σ -субъединицы, которая кодируется в ядре растительной клетки и импортируется в пластиды при освещении. Таким образом пластидная РНК-полимераза активна только на свету. Пластидная РНК-полимераза может обеспечивать транскрипцию с генов с эубактериальными промоторами (большинство генов фотосинтетических белков), а также с генов, имеющих универсальные промоторы.

Мономерная РНК-полимераза фагового типа кодируется в ядре и белок имеет специальную сигнальную последовательность, обеспечивающую импорт в пластиды. Обеспечивает транскрипцию генов «домашнего хозяйства» (в частности гены *g1f*-оперона, который содержит гены пластидной РНК-полимеразы).

Пластидный аппарат белкового синтеза находится под двойным генетическим контролем. Одни компоненты этого аппарата кодируются ядерными генами, другие (в том числе рибосомные и все транспортные РНК, а также приблизительно треть рибосомных белков) кодируются пластидной ДНК.

Рибосомы пластид существенно отличаются от цитозольных рибосом растительной клетки, но близки к рибосомам эубактерий. В пластидной рибосоме белков значительно меньше, чем в цитозольной. Это приводит к заметному снижению ее коэффициента седиментации (70S вместо 80S). Рибосомы пластид, как правило, содержат четыре типа рРНК, три из которых характерны для эубактерий. Четвертая рРНК не обнаруживается ни в одном другом типе рибосом. Пластидные рибосомы близки эубактериальным и по комплексу белков. Оба типа рибосом имеют практически одинаковое количество белков, обладают похожими иммунологическими характеристиками и чувствительны к одним и тем же антибиотикам (хлорамфеникол, стрептомицин). Для большинства белков пластидной рибосомы показана высокая степень гомологии с соответствующими полипептидами эубактерий.

Хлоропласты высших растений содержат около 40 генов, кодирующие «рабочие» белки пластид. У разных организмов набор генов хлоропластного генома может быть различным. В целом можно отметить следующую закономерность: функциональные белки фотосинтетического аппарата чаще кодируются в геноме хлоропластов, тогда как регуляторные или «дополнительные» – в ядерном геноме. Например, в хлоропластном геноме кодируются ос-

новные белки реакционных центров обеих фотосистем, апопротеины цитохромов b_6 и f , α - и β -субъединицы АТФ-синтазы, большая (каталитическая) субъединица рибулезобисфосфаткарбоксилазы (Рубиско). Под ядерным генетическим контролем находится весь спектр антенных хлорофиллсвязывающих белков, малая (регуляторная) субъединица Rubisco.

Транспорт цитозольных белков в пластиды. Если белок должен остаться в строме, то довольно сложный комплекс шаперонов, составленный из больших (Hsp60, мол. масса 60 кДа) и малых (10 кДа) субъединиц, обеспечивает его сворачивание в АТФ-зависимом процессе. Наоборот, белки, которые предназначены для люмена тилакоидов либо их мембран, поддерживаются шаперонами в развернутой форме, что необходимо для их дальнейшего транспорта. Белки, направляемые к внешней мембране, не транспортируются в строму, а попадают в мембрану непосредственно из цитозоля.

Белки, предназначенные для тилакоидов, содержат два сигнальных пептида («стромальный» и «люменальный»), расположенных последовательно один за другим. Первый пептид идентичен лидерному пептиду стромальных белков и направляет белок в строму хлоропласта. В строме протеаза удаляет «стромальный» пептид, что «открывает» второй лидерный пептид, который обеспечивает дальнейший транспорт белка через мембрану тилакоида. В люмене тилакоида второй сигнальный пептид отщепляется протеазой, и белок либо остается в люмене, либо встраивается в мембрану тилакоида.

Механизм встраивания интегральных белков в мембрану не совсем ясен. Скорее всего, белки встраиваются в мембрану за счет своих гидрофобных участков.

РАЗДЕЛ 5 ЦИТОСКЕЛЕТ И ПРОИЗВОДНЫЕ ПРОТОПЛАСТА

Тема 11 Опорно-двигательная система цитоплазмы

- 1 Промежуточные филаменты и микрофиламенты.
- 2 Микротрубочки.
- 3 Клеточный центр.
- 4 Кинетосома, реснички, жгутики.

Цитоскелет – это клеточный каркас или скелет, находящийся в цитоплазме живой клетки. Он присутствует во всех клетках эукариот, причём в клетках прокариот обнаружены гомологи всех белков цитоскелета эукариот. Цитоскелет – динамичная, изменяющаяся структура, в функции которой входит поддержание и адаптация формы клетки ко внешним воздействиям, экзо- и эндоцитоз, обеспечение движения клетки как целого, активный внутриклеточный транспорт и клеточное деление.

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

1. Промежуточные филаменты и микрофиламенты.

Промежуточные филаменты (ПФ) строятся из фибриллярных мономеров. Поэтому основная конструкция промежуточных филаментов напоминает канат, имеющий толщину около 8-10 нм. Они локализуются главным образом в околоядерной зоне и в пучках фибрилл, отходящих к периферии клеток и располагающихся под плазматической мембраной. Встречаются промежуточные филаменты во всех типах клеток животных, но особенно они обильны в тех клетках, которые подвержены механическим воздействиям: клетки эпидермиса, нервные отростки, гладкие и исчерченные мышечные клетки. В клетках растений ПФ не обнаружены.

В состав промежуточных филаментов входит большая группа изобелков (родственных белков), которую можно разделить на четыре типа. Первый тип составляют кератины, кислые и нейтральные, встречающиеся в эпителиальных клетках; они образуют гетерополимеры из этих двух подтипов. Кератины, кроме того, имеют, некоторую гетерогенность, зависящую от тканевого источника. Так, в эпителиях встречается до 20 форм кератинов, 10 форм других кератинов найдено в волосах и ногтях. Молекулярная масса кератинов колеблется от 40 до 70 тыс.

Второй тип белков ПФ включает в себя три вида белков, имеющих сходную молекулярную массу (45-53 тыс.). Виментин, характерный для клеток мезенхимного происхождения, входящий в состав цитоскелета клеток соединительной ткани, эндотелия, клеток крови. Десмин характерен для мы-

шечных клеток, как гладких, так и исчерченных. Глиальный фибриллярный белок входит в состав ПФ некоторых клеток нервной глии – астроциты и некоторые шванновские клетки. Периферин входит в состав периферических и центральных нейронов.

Третий тип – белки нейрофиламентов (молекулярная масса от 60 до 130 тыс.), встречается в аксонах нервных клеток.

Четвертый тип – белки ядерной ламины. Хотя эти последние имеют ядерную локализацию, они сходны по строению и свойствам со всеми белками промежуточных филаментов.

Все белки промежуточных филаментов обладают сходной аминокислотной последовательностью из 130 остатков в центральной части фибриллярной молекулы, которая обладает α -спиральным строением. Концевые же участки молекул имеют разные последовательности аминокислот, разную длину и не имеют α -спирального строения. Наличие протяженных α -спиральных участков позволяет двум молекулам образовывать двойную спираль, подобно тому как это происходит в молекуле миозина, что приводит к образованию палочковидного димера длиной около 48 нм. Два димера, объединяясь бок о бок, образуют короткий протофиламент – тетрамер, толщиной около 3 нм. Такие протофиламенты могут объединяться в более толстые и длинные фибриллы, и в конечном итоге образуется промежуточный полный филамент, состоящий из восьми продольных протофиламентов.

Иначе полимеризуются белки ядерной ламины: они образуют димеры с головками на одном конце и полимеризуются, создавая рыхлую прямоугольную решетку. Такие слои ламины быстро разрушаются во время митоза при фосфорилировании ламинов.

Цитоплазматические промежуточные филаменты относятся к самым стабильным и долгоживущим элементам цитоскелета. ПФ устойчивы к действию солей низкой и высокой концентрации, разрушаются только после воздействия денатурирующих растворов, таких как мочевины.

Топографически в клетке расположение промежуточных филаментов повторяет расположение микротрубочек, они как бы идут бок о бок. При разрушении микротрубочек колхицином происходит так называемый коллапс промежуточных филаментов: они собираются в плотные пучки или кольца вокруг ядра. Восстановление новой сети промежуточных филаментов начинается от зоны клеточного центра. Это наводит на мысль, что центром их полимеризации или нуклеации могут быть центры, общие с микротрубочками.

Микрофиламенты (актиновые микрофиламенты, МФ) – нити, состоящие из молекул глобулярного белка актина и присутствующие в цитоплазме всех эукариотических клеток. В мышечных клетках их также называют «тонкие филаменты» (толстые филаменты мышечных клеток состоят из белка миозина). Под плазматической мембраной микрофиламенты образуют трёхмерную сеть; в цитоплазме формируют пучки из параллельно ориентированных нитей или трёхмерную сеть. Имеют диаметр около 6-8 нм.

Микрофиламенты состоят из двух перекрученных цепочек из молекул глобулярного белка актина, имеют диаметр около 7-8 нм. Как и микротру-

бочки (и в отличие от промежуточных филаментов), микрофиламенты обладают полярностью. Это означает, что два их конца (обозначаемые как (+)-конец и (-)-конец) неравноценны по своему строению, способности присоединять новые молекулы актина и другим свойствам. В мышечных клетках (+)-концы МФ прикрепляются к Z-линиям саркомеров, а (-)-концы свободны.

Состав: актин; другие сократительные белки (в меньших, нежели актин, количествах): миозин, тропомиозин, актинин (несколько отличающиеся от соответствующих мышечных белков); различные специальные белки: винкулин, фрагмин, филамин, виллин и др.

Актин – глобулярный белок, из которого образованы микрофиламенты – один из основных компонентов цитоскелета эукариотических клеток. Актин имеет 2 формы: мономерную G-актин и полимеризованную форму (F-актин). Вместе с белком миозином образует основные сократительные элементы мышц – актомиозиновые комплексы саркомеров. Присутствует в основном в цитоплазме, но в небольшом количестве также найден в ядре клетки.

Функции микрофиламентов: формируют клеточный цитоскелет, создавая механическую поддержку; принимает участие в миозин-независимом изменении формы клетки и клеточное движение; в мышечных клетках актин вместе с миозином создает комплекс, участвующий в сокращении мышцы; в неммышечных клетках принимает участие в транспортировке миозином везикул и органелл; деление клеток и цитокинез.

2 Микротрубочки.

Микротрубочки представляют собой полые цилиндры диаметром 25 нм. Длина их может быть от нескольких микрометров до, вероятно, нескольких миллиметров в аксонах нервных клеток. Их стенка образована димерами тубулина. Микротрубочки, подобно актиновым микрофиламентам, полярны: на одном конце происходит самосборка микротрубочки, на другом – разборка. В клетках микротрубочки играют роль структурных во многих клеточных процессах.

Микротрубочки – это структуры, в которых 13 протофиламентов, состоящих из гетеродимеров α - и β -тубулина, уложены по окружности полого цилиндра. Внешний диаметр цилиндра около 25 нм, внутренний – около 15.

Один из концов микротрубочки, называемый плюс-концом, постоянно присоединяет к себе свободный тубулин. От противоположного конца – минус-конца – тубулиновые единицы отщепляются.

В образовании микротрубочки выделяют три фазы.

1 Замедленная фаза, или нуклеация. Это этап зарождения микротрубочки, когда молекулы тубулина начинают соединяться в более крупные образования. Такое соединение происходит медленнее, чем присоединение тубулина к уже собранной микротрубочке, поэтому фаза и называется замедленной.

2 Фаза полимеризации, или элонгация. Если концентрация свободного тубулина высока, его полимеризация происходит быстрее, чем деполимеризация на минус-конце, за счёт чего микротрубочка удлиняется. По мере её роста концентрация тубулина падает до критической, и скорость роста замедляется вплоть до вступления в следующую фазу.

3 Фаза стабильного состояния. Деполимеризация уравнивает полимеризацию, и рост микротрубочки останавливается.

Динамическая нестабильность. Микротрубочки являются динамическими структурами и в клетке постоянно полимеризуются и деполимеризуются. Центросома, локализованная вблизи ядра, выступает в клетках животных и многих протистов как центр организации микротрубочек (ЦОМТ): они растут от неё к периферии клетки. В то же время микротрубочки могут внезапно прекратить свой рост и укоротиться обратно по направлению к центросоме вплоть до полного разрушения, а затем вырасти снова. При присоединении к микротрубочке молекулы тубулина, несущие ГТФ, образуют «шапочку», которая обеспечивает рост микротрубочки. Если локальная концентрация тубулина падает, связанная с бета-тубулином ГТФ постепенно гидролизуются. Если полностью гидролизуются ГТФ «шапочки» на +-конце, это приводит к быстрому распаду микротрубочки. Таким образом, сборка и разборка микротрубочек связана с затратами энергии ГТФ. Динамическая нестабильность микротрубочек играет важную физиологическую роль. Например, при делении клетки микротрубочки растут очень быстро и способствуют правильной ориентации хромосом и образованию митотического веретена.

Функции. Микротрубочки в клетке используются в качестве «рельсов» для транспортировки частиц. По их поверхности могут перемещаться мембранные пузырьки и митохондрии. Транспортировку по микротрубочкам осуществляют белки, называемые моторными. Это высокомолекулярные соединения, состоящие из двух тяжёлых (массой около 300 кДа) и нескольких лёгких цепей. В тяжёлых цепях выделяют головной и хвостовой домены. Два головных домена связываются с микротрубочками и являются собственно двигателями, а хвостовые – связываются с органеллами и другими внутриклеточными образованиями, подлежащими транспортировке.

Выделяют два вида моторных белков: цитоплазматические динеины, кинезины.

Динеины перемещают груз только от плюс-конца к минус-концу микротрубочки, то есть из периферийных областей клетки к центросоме. Кинезины, напротив, перемещаются к плюс-концу, то есть к клеточной периферии.

Перемещение осуществляется за счёт энергии АТФ. Головные домены моторных белков для этого содержат АТФ-связывающие участки.

Помимо транспортной функции, микротрубочки формируют центральную структуру ресничек и жгутиков – аксонему. Типичная аксонема содержит 9 пар объединённых микротрубочек по периферии и две полных микротрубочки в центре. Из микротрубочек состоят также центриоли и веретено

деления, обеспечивающее расхождение хромосом к полюсам клетки при митозе и мейозе. Микротрубочки участвуют в поддержании формы клетки и расположения органоидов (в частности, аппарата Гольджи) в цитоплазме клеток.

Растительные микротрубочки. Микротрубочки растений являются высокодинамическими составляющими цитоскелета, которые вовлечены в важные клеточные процессы, в частности, сегрегацию хромосом, формирование фрагмопласта, микрокомпартиментализацию, внутриклеточный транспорт, а также в поддержание постоянной формы и полярности клетки. Мобильность микротрубочек обеспечивается динамической нестабильностью, передвижением полимеров моторными белками, тредмилингом и гибридным механизмом тредмилинга с динамической нестабильностью плюс-конца и медленной деполимеризацией минус-конца.

Микротрубочки чрезмерно чувствительны к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды (холоду, освещению, засухе, засолению, влиянию гербицидов и пестицидов, затоплению, сжатию, воздействию электрического поля, давлению и силе тяжести), а также к фитогормонам, антимитотическим препаратам и ряду других биологически активных соединений. Микротрубочки являются полыми полярными цилиндрическими филаментами диаметром свыше 24 нм, которые собираются из гетеродимеров α -и β -тубулина, которые в положении «голова-к-хвосту» формируют 13 протофиламентов.

В клетках высших растений присутствуют четыре типа построений микротрубочек: сетка кортикальных и эндоплазматических микротрубочек; препрофазная лента; митотическое веретено; фрагмопласт.

Белки, ассоциированные с микротрубочками. Все компоненты цитоскелета и другие органеллы связаны между собой рядом специфических белков, ассоциированных с микротрубочками (БАМ). В животных клетках наиболее исследованными БАМ является tau и БАМ2, которые стабилизируют микротрубочки и присоединяют их к другим клеточным структурам, а также транспортные белки динеин и кинезин. Функционирование различных групп растительных микротрубочек зависит от наличия изоформ БАМ из семьи БАМ65 и регуляторных киназ и фосфатаз. В частности, высококонсервативный животный гомолог семьи БАМ65 важен для получения микротрубочками определенных конфигураций на протяжении развития растения. Ориентация и организация различных популяций и типов построений микротрубочек является ткане- и органоспецифической.

Кортикальные микротрубочки. Ацентросомальные кортикальные микротрубочки (КМТ) важны для морфогенеза растений, регуляции клеточного деления и элонгации. Высокодинамическая популяция мембраносвязанных коротких КМТ быстро реориентируется из интерфазного поперечного положения в продольное при элонгации клетки. Ацентросомальные кортикальные микротрубочки имеют неупорядоченное размещение плюс-концов и обнаруживают динамическую нестабильность, а свободные минус-концы КМТ медленно деполимеризируются, то есть КМТ самоорганизуются гибридным

механизмом динамической нестабильности и тредмилинга. Энуклеация происходит по всей поверхности плазматической мембраны. Белок SPR1 регулирует динамику и организацию плюс-конца КМТ растений, что сказывается на анизотропном росте клетки. Ацентросомальные кортикальные микротрубочки располагаются параллельно целлюлозным микрофибриллам, правильная организация КМТ является существенной для нормального синтеза клеточной стенки. Установлено, что КМТ объединяются в узлы, которые часто пересекаются для стабилизации микротрубочек и удержания белков на их поверхности.

3 Клеточный центр.

Клеточный центр, или центросома – немембранная органелла в клетках эукариот, состоит из двух центриолей и перичентриольного материала. Является главным центром организации микротрубочек (ЦОМТ) эукариотической клетки, играет важнейшую роль в клеточном делении, участвуя в формировании веретена деления. Из центросомы образуются реснички и жгутики. Центросомы характерны для клеток животных, их нет у высших растений, у низших грибов и некоторых простейших. Ряд наследственных заболеваний человека вызван мутациями в генах, кодирующих центросомные белки.

У многих живых организмов (животных и ряда простейших) центросома содержит пару центриолей, цилиндрических структур, расположенных под прямым углом друг к другу. Каждая центриоль образована девятью триплетами микротрубочек, расположенными по кругу, а также ряда структур, образованных центрином, ценексином и тектином.

Обычно в течение клеточного цикла центриоль удваивается один раз. Рядом с каждой половинкой «материнской» центриоли достраивается «дочерний» цилиндр; происходит это, как правило, в течение G₂-периода интерфазы. В профазе митоза две центриоли расходятся к полюсам клетки и формируют две центросомы. Центросомы в свою очередь служат ЦОМТами (центрами организации микротрубочек) веретена деления. Однако от этой общей схемы существует масса отклонений. Во многих клетках центриоли многократно удваиваются за один клеточный цикл. При созревании яйцеклеток у подавляющего большинства животных центриоли разрушаются (при этом многие белки, входящие в состав центросом, по-прежнему присутствуют в клетке). При образовании сперматозоидов, напротив, деградирует центросома; одна из центриолей превращается в базальное тельце жгутика, а вторая сохраняется интактной. Однако у мыши и других грызунов (в отличие от остальных изученных млекопитающих), а также у улиток деградируют и обе центриоли сперматозоидов. После оплодотворения новые центриоли возникают в зиготе либо за счет удвоения центриоли, внесенной сперматозоидом, либо за счет образования заново.

В интерфазе клеточного цикла центросомы ассоциированы с ядерной мембраной. В профазе митоза ядерная мембрана разрушается, центросома делится, и продукты её деления (дочерние центросомы) мигрируют к полю-

сам делящегося ядра. Микротрубочки, растущие из дочерних centrosом, крепятся другим концом к так называемым кинетохорам на центромерах хромосом, формируя веретено деления. По завершении деления в каждой из дочерних клеток оказывается только по одной centrosоме.

Функции centrosомы. Centrosома играет важнейшую роль в клеточном делении, однако наличие клеточного центра в клетке не является необходимым для митоза. В клетке содержится одна или две centrosомы. Аномальное увеличение числа centrosом характерно для клеток злокачественных опухолей. Более двух centrosом в норме характерно для некоторых полиэнергидных простейших и для синцитиальных структур.

Кроме этого, в неделящихся клетках centrosомы могут определять полярность клеток. Centrosома в неделящихся клетках нередко ассоциирована с аппаратом Гольджи.

Помимо участия в делении ядра, centrosома играет важную роль в формировании жгутиков и ресничек. Центриоли, расположенные в ней, выполняют функцию центров организации для микротрубочек аксоном жгутиков. У организмов, лишенных центриолей (например, у сумчатых и базидиальных грибов, покрытосеменных растений), жгутики не развиваются.

У планарий и, возможно, некоторых других плоских червей нет centrosом (однако в клетках, несущих реснички, центриоли образуются).

4 Кинетосома, реснички, жгутики.

Кинетосома, или базальное тульце, или базальные гранулы, или блефаропласт – органелла эукариотической клетки, цилиндрическая структура из микротрубочек, располагающаяся в основании ундулиподий – жгутиков и ресничек. Будучи одним из видов центров организации микротрубочек (ЦОМТ), кинетосомы формируются из центриолей и служат основой для формирования аксономы жгутика.

Кинетосома состоит из девяти триплетов микротрубочек, состоящих из γ -тубулина и соединённых динеиновыми ручкам. Две микротрубочки каждого триплета непосредственно переходят в дублеты аксономы. В формировании и пространственной организации микротрубочек в кинетосоме ключевую роль играет нуклеотид-связывающий домен γ -тубулина. Зачастую кинетосомы закорены в цитоплазме с помощью корешкового аппарата, состоящего из микротрубочек или поперечно исчерченных фибриллярных корешков.

Реснички – органеллы, представляющие собой тонкие (диаметром 0,1-0,6 мкм) волосковидные структуры на поверхности эукариотических клеток. Длина их может составлять от 3-15 мкм до 2 мм (реснички гребных пластинок гребневиков). Могут быть подвижны или нет; неподвижные реснички играют роль рецепторов.

Строение и принцип работы у ресничек такие же, как у эукариотических жгутиков (различие в названиях сложилось исторически ещё до выяснения их структуры). Те и другие вместе называются ундулиподиями. Отличия ресничек от жгутиков – меньшая длина, присутствие на клетке в большом

количестве и координированное движение. Реснички более распространены и чаще выполняют функции, отличные от двигательной.

Реснички характерны для инфузорий. У многих беспозвоночных ими покрыта вся поверхность тела (ресничные черви, личинки кишечнорастных и губок) или отдельные его участки (например, жабры у полихет и двусторчатых моллюсков, подошва ноги у брюхоногих моллюсков). У коловраток из специализированных ресничек состоит коловращательный аппарат. У многих беспозвоночных (кишечнополостные, гребневики, турбеллярии и др.) реснички также имеются на клетках кишечного эпителия. У позвоночных (в том числе человека) клетки с подвижными ресничками также есть во многих органах. У человека ресничным эпителием выстланы дыхательные пути, евстахиевы трубы, семявыносящие каналы, желудочки мозга и спинномозговой (центральный) канал. Видоизмененные реснички служат световоспринимающим аппаратом фоторецепторов сетчатки глаза и воспринимающим запахи аппаратом хеморецепторов обонятельного эпителия. При нарушении работы ресничек возникают заболевания – цилиопатии.

Реснички покрыты мембраной, являющейся продолжением плазмалеммы – цитоплазматической мембраны. В центре проходит две полные (состоящие из 13 протофиламентов) микротрубочки, на периферии – девять пар микротрубочек, из которых в каждой паре одна полная, а вторая неполная (состоит из 11 протофиламентов). У основания находится базальное тело (кинетосома), имеющее в поперечном разрезе ту же структуру, что и половинка центриоли, то есть состоящее из девяти троек микротрубочек.

Механизм работы. К каждой полной микротрубочке периферических пар (дублетов) вдоль всей её длины присоединены «ручки» из двигательного белка динеина (см. статью «аксонема»). При гидролизе АТФ головки динеина «шагают» по микротрубочке соседнего дублета. Если бы микротрубочки не были закреплены на кинетосоме, это вызвало бы скольжение дублетов друг относительно друга. Такое скольжение наблюдается в эксперименте на ресничках, обработанных трипсином (длина аксонемы при добавлении АТФ увеличивается в результате в 9 раз). В интактной ресничке происходит изгибание дублетов и, в результате, всей реснички. Как правило, реснички совершают удары в одной плоскости. У инфузорий прямой удар (продвигающий клетку вперед) ресничка совершает в выпрямленном состоянии, а возвратный – в изогнутом. Как регулируется согласованное изгибание разных дублетов, видимо, неизвестно. При деполяризации мембраны и поступлении внутрь клетки ионов кальция у инфузорий направление прямого удара может меняться на противоположное.

Жгутик эукариот представляет собой тонкий вырост на поверхности клетки, покрытый клеточной мембраной и содержащий аксонему – сложный структурный элемент, представляющий собой систему микротрубочек. Жгутиками снабжены гаметы у многих организмов, зооспоры и клетки многих протистов. Жгутик осуществляет волнообразные или воронкообразные движения, совершая 10-40 оборотов в секунду. Энергия для движения эукарио-

тического жгутика добывается при гидролизе АТФ. Внешнюю, внеклеточную часть жгутика называют ундулиподией.

Ундулиподия обычно имеет одинаковую толщину по всей длине, которая составляет от 200 до 250 нм. Почти у всех свободноживущих протистов ундулиподии несут чешуйки или мастигонемы (нитевидные структуры, отходящие от поверхности жгутика). Структурная основа ундулиподии представлена аксонемой, которая состоит из 9 пар периферических микротрубочек (дублетов) и двух центральных микротрубочек. Эта формула ($9 \times 2 + 2$) характерна для всех эукариот, хотя известны и исключения (чаще всего редуцируется центральная пара микротрубочек, но иногда в аксонеме появляются дополнительные микротрубочки). Компоненты аксонемы имеют сложный состав и образованы более чем 250 белками. Две центральные микротрубочки имеют диаметр 25 нм и располагаются на расстоянии 30 нм друг от друга, они одеты общим чехлом из тонкого материала. При помощи радиальных спиц чехол соединяется с периферическими дублетами микротрубочек. Каждый дуплет образован микротрубочками А и В, причём радиальные спицы крепятся к А-микротрубочкам. От А-микротрубочек также отходят динеиновые ручки и нексиновые мостики. Динеиновые ручки направлены к соседнему дублету и обуславливают изгибание аксонемы, обеспечивая скольжение дублетов относительно друг друга. Нексиновые мостики нужны для прочной связки соседних дублетов в переходной зоне аксонемы, которая не подвергается изгибаниям. Иногда жгутики эукариот несут дополнительные структурные элементы, например, параксиальный тяж, имеющийся у некоторых протистов (динофлагеллят, эвгленовых и других). Параксиальный тяж состоит из микрофиламентов и идёт вдоль аксонемы.

На уровне выхода жгутика из клетки находится так называемая переходная зона аксонемы. Аксонема крепится к кинетосоме, или базальному телу, располагающемуся под клеточной мембраной. Кинетосома представляет собой полый цилиндр, стенка которого состоит из 9 триплетов микротрубочек, соединённых, как правило, фибриллярными мостиками. В состав триплета, помимо аксонемных А- и В-микротрубочек, входит дополнительная С-микротрубочка, прилегающая к В-микротрубочке. В центре проксимальной части кинетосомы находится ось со спицами, которая также имеется у центриолей.

От кинетосом непосредственно отходят так называемые корешки – фибриллярные или микротрубочковые структуры. Иногда они соединяются с кинетосомами короткими фибриллярными связками или начинаются в слое аморфного материала, окружающего кинетосому. Корешки обоих типов служат для закрепления жгутика в теле клетки.

Как правило, эукариотические клетки несут от 1 до 8 жгутиков, хотя среди протистов известно немало многожгутиковых форм. Жгутиконосных протистов подразделяют на четыре основные группы: изоконты несут одинаковые жгутики с одинаковым способом биения; анизоконты обладают жгутиками разной длины, но они также имеют одинаковый вид и способ биения; у гетероконтов имеется два разных по внешнему виду и расположению жгу-

тика с разными способами биения; наконец, стефаноконтные формы имеют венчик из 30-40 жгутиков на переднем конце клетки.

Тема 12 Производные протопласта

- 1 Клеточная оболочка.
- 2 Эргастические вещества или включения.
- 3 Клеточный сок.

1 Клеточная оболочка.

Клеточная оболочка – мертвый продукт жизнедеятельности протопласта, окружающий его снаружи. Клеточная стенка – совокупность клеточных оболочек двух смежных клеток и расположенного между ними межклеточного вещества.

Функции клеточной оболочки (стенки):

1. Структурная. Определение формы и размера клетки, ограничение растяжения протопласта.
2. Защитная. Защита от механических воздействий, высыхания, инфекций.
3. Механическая. Создание тургора.
4. Скелетная. Образование опорной системы наземных растений.
5. Транспортная. Обеспечение апопластного транспорта веществ.
6. Коммуникационная. Образование межклеточных связей.
7. Выделительная. Место для экскретов.
8. Запасаящая. Накопление запасных углеводов – гемицеллюлоз.
9. Регуляторная. Влияние на транспирацию, поглощение, транспорт, секрецию.

Состав и организация клеточной оболочки. Клеточная оболочка растительных клеток обладает сложным химическим составом веществ, которые можно разделить на две главные группы:

- вещества каркаса, создающие основу клеточной оболочки, её архитектуру;
- вещества матрикса, заполняющие пространство в каркасе клеточной оболочки и усиливающие её прочность.

Вещества каркаса. У водорослей, имеющих клеточные оболочки, веществами каркаса могут быть ксилан, маннан и целлюлоза. У высших растений каркас образован только целлюлозой (клетчаткой). В целлюлозе заключено 50 % углерода, находящегося в растениях, и по общей своей массе целлюлоза в биосфере занимает первое место среди всех органических соединений. В листьях растений содержится 15-30 % целлюлозы, в древесине – 50-70 %.

Целлюлоза (клетчатка) – полисахарид, включающий 1000-30 000 остатков β -D глюкозы, соединенных между собой гликозидными связями. Наличие гликозидных связей создаёт возможность образования поперечных

сшивок между молекулами. Благодаря этому, длинные и тонкие молекулы целлюлозы способны объединяться в пучки. Синтезируются молекулы целлюлозы специальными ферментами, встроенными в плазмалемму.

В химическом отношении целлюлоза является относительно инертным веществом. Она нерастворима в воде, спирте, эфире, слабых кислотах и щелочах, других растворителях. Молекула целлюлозы прочна и эластична, устойчива к температурным воздействиям (выдерживает температуру до 200 °C).

Формируя каркас, целлюлоза, в первую очередь, определяет архитектуру клеточной оболочки. Каркас представляет собой систему фибрилл различной сложности. Фибриллы – это пучки молекул целлюлозы, соединённых водородными связями.

В зависимости от размера различают три класса фибрилл:

1. Элементарные фибриллы или мицеллы. В состав такой фибриллы входит 60-100 параллельно расположенных молекул целлюлозы. Её поперечное сечение составляет 6-7 нм, длина – около 60 нм.

2. Микрофибриллы. Образуются в результате объединения между собой элементарных фибрилл и включают 2000 молекул целлюлозы. Поперечное сечение микрофибриллы составляет 10-35 нм (у водорослей в 10 раз больше), длина – несколько сот нанометров.

3. Макрофибриллы. Микрофибриллы (около 400). в свою очередь, переплетаются между собой как пряди в канате и объединяются в макрофибриллы, которые содержат 500000 молекул целлюлозы. Макрофибриллы имеют толщину около 0,5 мкм и могут достигать в длину 4 мкм. Они так же прочны, как равная им по толщине стальная проволока.

Вещества матрикса. Гемицеллюлозы, пектин и вода формируют основное вещество клеточной оболочки или матрикс. В состав матрикса клеточных оболочек помимо углеводных компонентов входит также структурный белок – экстенсин. Он является гликопротеином с высоким содержанием оксипролина и олигосахаридными боковыми цепями из арабинозы. Кроме того, в составе клеточных оболочек отмечаются ферменты, инкрустирующие и адкрустирующие вещества.

Гемицеллюлозы (полуклетчатки). По строению гемицеллюлозы напоминают целлюлозу и крахмал (это тоже полимеры). Их цепи состоят из остатков гексоз или пентоз, связанных кислородными мостиками. Но если молекулы целлюлозы насчитывают в своем составе от 1000 до 30000 мономеров, то цепочки гемицеллюлоз состоят из 150-300 молекул мономеров. Они значительно короче. Именно поэтому гемицеллюлозы нередко называют полуклетчатками. Основными гексозами гемицеллюлоз являются D-глюкоза и D-галактоза; пентозами – L-ксилоза и L-арабиноза.

По отношению к химическим агентам гемицеллюлозы гораздо менее стойки, чем целлюлоза: они растворяются в слабых щелочах без подогревания, а в глицерине – при температуре 300 °C; гидролизуются с образованием сахаров в слабых растворах кислот.

Гемицеллюлозы выполняют:

- механическую роль, участвуя наряду с целлюлозой и другими веществами в построении клетчатых стенок:

- роль запасных веществ, отлагающихся, а затем расходуемых. При этом функцию запасного материала несут преимущественно гексозы, а гемицеллюлозы с механической функцией обычно состоят из пентоз. В качестве запасных питательных веществ гемицеллюлозы отлагаются также в семенах многих растений, особенно у однодольных, например, в клеточных стенках эндосперма многих пальм (в частности, финиковой пальмы).

Пектиновые вещества имеют довольно сложный химический состав и строение. Химики определяют их как кальциевые-магниевые соли полимерной α -D галактуроновой кислоты, соединенные α -1,4-связями, т.е. мономером является галактуроновая кислота. Характерная особенность: пектиновые вещества сильно набухают в воде, а некоторые даже в ней растворяются. Легко они разрушаются и под действием щелочей и кислот.

Пектиновые вещества встречаются в трёх формах – протопектин, пектин и пектовая кислота. Это аморфные коллоидные соединения, пластичные и в высшей степени гидрофильные. Выполняют структурную (заполняют пространство между фибриллами) и транспортную функции.

Аморфные вещества матрикса, гемицеллюлозы и пектины синтезируются в вакуолях аппарата Гольджи и выделяются через плазмалемму наружу.

Химические видоизменения клеточной оболочки. Химические видоизменения клеточной оболочки могут происходить тремя путями – инкрустацией, адкрустацией и химическим перерождением её компонентов. Инкрустация – процесс отложения веществ внутри клеточной оболочки. Адкрустация – накопление веществ на наружной или внутренней поверхности клеточной оболочки. Химическое перерождение веществ включает метаморфоз ранее сформированных компонентов каркаса и матрикса клеточной оболочки в новые соединения.

1. Лигнификация – процесс инкрустации клеточной оболочки лигнином. Лигнин – ароматическое соединение, основным компонентом которого является оксигидроконифероловый спирт. Одревесневшие клеточные стенки приобретают жёсткость и прочность. Лигнифицированные клеточные стенки характерны для клеток проводящих и механических тканей. Древесина хвойных содержит 27-30 % лигнина (до 34 % у сосны), лиственных – 18-27 %.

2. Суберинизация – процесс инкрустации клеточной оболочки суберином. Суберин – сетевидный полимер, состоящий из ненасыщенных жирных кислот и жирных гидроксикислот. Пропитанные суберином клеточные стенки становятся полностью непроницаемыми для воды и воздуха. Суберинизация характерна для вторичных покровных тканей, тканей патологических образований.

3. Кутинизация – процесс адкрустации, реже инкрустации клеточной оболочки кутином, воском. Кутин – сетевидный полимер, состоящий из жирных гидроксикислот. Воск – смесь эфиров высокомолекулярных кислот и высокомолекулярных спиртов (преимущественно глицеридов жирных кислот, т.е. жиров). Слой кутина и восков защищает клетку от избыточного ис-

парения, инфекций и смачивания водой (например, листьев). Кутинизация характерна для эпидермы листьев, стеблей, плодов, а также мезофилла листа.

4. Минерализация – процесс инкрустации и адкрустации клеточной оболочки минеральными веществами. Эти включения могут составлять до 75 % массы клеточной оболочки. В качестве инкрустирующих веществ выступают кремнезём, соли карбоната и оксалата кальция и магния. Богаты кремнезёмом клетки кожицы стеблей и листьев хвощей, злаков, осок. Окремнение стенок свойственно и многим растениям из двудольных, особенно из семейства мареновых. Окремнению подвергаются жгучие волоски у крапивы двудомной. Кальций встречается в клеточных оболочках в виде углекислой, щавелевокислой и пектиновокислой соли.

5. Ослизнение – процесс образования в клеточных оболочках камедей и слизей – сложных углеводов пентозанов и гексозанов и их производных. Слизистые вещества могут накапливаться путём адкрустации или химического перерождения материала клеточной оболочки. Эти вещества близки к пектиновым соединениям и обладают высокой способностью к набуханию. Ослизнение бывает или нормальным явлением в жизни растения, или же происходит как патологический процесс. Путём ослизнения участков клеточной оболочки, с последующим удалением слизи происходит образование перфораций в члениках сосудов.

Камеди являются продуктами экссудативными, образуются в местах повреждений растения и в набухшем от воды состоянии обычно клейки и вытягиваются в нити. Камедь образуется в результате слизистого перерождения целлюлозных оболочек клеток паренхимной ткани сердцевины и сердцевинных лучей. Известны случаи слизистого перерождения и в области коровой паренхимы.

Образование камедей отмечено у представителей 40 семейств. Наиболее богаты камеденосами семейства бобовые, розанные, рутовые, мелиевые, анакардовые. Способность к образованию камедей свойственна, как правило, многолетним древесным формам. Камедь могут продуцировать различные части растения – корни, стебли, листья, плоды, семена. При травмировании органов растений камеди выполняют защитную функцию (например, камедетечение у вишен, слив, персиков).

Слизи сильно расплываются в воде и в нити не вытягиваются. Кроме того, в химическом отношении в слизях наблюдается преобладание пентозанов (их количество может достигать до 90 %) над гексозанами.

2 Эргастические вещества или включения.

Эргастические вещества или включения – необязательные компоненты клетки, пассивные производные протопласта, представляющие собой скопления веществ в твёрдой или жидкой форме, временно выведенные из обмена, или катаболиты. Главнейшими из этих веществ являются запасные вещества и продукты вторичного метаболизма. Часть этих веществ сосредотачивается внутри протопласта, другая – концентрируется снаружи протопласта, в клеточной оболочке.

Практически все эргастические вещества независимо от их природы могут вновь вовлекаться в процессы активного метаболизма клетки, поэтому их подразделение на ряд функциональных групп (структурные, защитные, запасные, катаболиты) достаточно условно.

Запасные питательные вещества – соединения, богатые энергией и находящиеся в клетке в пассивном состоянии. К ним относятся белки, липиды, углеводы.

Белковые включения. Белковые вещества в клетках растений накапливаются в твёрдом виде (кристаллическом) или в форме аморфных, мягких (пластичных или упругих) отложений.

Твёрдые отложения белка – кристаллиды – чаще наблюдаются в ядрах, реже – в гиалоплазме, стромах пластид (хлоро-, хромо-, лейкопластах), вакуолях, в расширениях цистерн ЭПР, матриксе пероксисом и митохондрий. Аморфные белковые включения наблюдаются в вакуолях.

В ядре число кристаллид может насчитывать десятки и сотни. Они очень мелкие (сравнимы с размерами ядрышек) и характеризуются призматической формой. В гиалоплазме форма кристаллид более разнообразна: кубическая, октаэдрическая, в виде гексагональных пирамид, сферическая, веретеновидная, кольцевая и др. В пластидах всех типов наблюдаются кристаллиды изодиаметрической формы: призмы, таблички, иглы.

Накопление белков в вакуолях может приводить к формированию особых структур, которые получили название белковых телец или алеироновых зёрен. Их размеры колеблются от 1 до 55 мкм. Алеироновое зерно состоит из оболочки (формируется из тонопласта) и расположенной под ней аморфной белковой массы, в которой могут быть включения трех типов – кристаллиты белка (один, реже 2-3), глобоиды, кристаллы оксалата кальция.

Кристаллиты имеют ромбоэдрическую форму. Глобоиды имеют сферическую форму и встречаются по несколько в одном зерне. Они состоят из фитина – калиево-магниево-кальциевой соли инозитгексафосфорной кислоты. Кристаллы оксалата кальция в составе алеироновых зерен представлены реже (семейство сельдерейные). Они имеют вид друз, игольчатых или таблитчатых включений.

Алеироновые зёрна, содержащие кристаллиты, называются сложными белковыми тельцами (семена льна, подсолнечника, тыквы, клещевины). Белковые тельца, состоящие только из аморфного белка, называются простыми (бобовые, рис, кукуруза).

Алеироновые зёрна формируются в клетках запасяющих тканей семян растений. Наиболее крупные они в семенах, богатых маслами (клещевина), сравнительно мелкие – в крахмалистых семенах (злаки, бобовые).

Липидные включения. Запасными формами липидов у растений выступают жиры и масла – глицериды глицерина и органических кислот (стеариновой, пальмитиновой, олеиновой, масляной, линолевой и др.). Жиры и масла чаще различают по физическим свойствам: жиры при обычной температуре твёрдые вещества, масла – жидкие.

Жиры и масла. Наиболее распространены у растений липидные включения в виде масел. Они образуют мелкие капли в строме пластид и гиалоплазме клеток. Жиры известны у ряда тропических растений (плоды кокосовой пальмы – *Cocos nucifera*, шоколадного дерева – *Theobroma cacao*, мускатника душистого – *Myristica fragrans*). Кристаллический жир встречается редко, например, игловидные кристаллы жира наблюдаются в клетках эндосперма семян масляной пальмы (*Elaeis sp.*).

Воски – жироподобные аморфные вещества, состоящие, главным образом, из сложных эфиров высших жирных кислот и одноатомных спиртов. Температура плавления восков 40-90 °С. Обычно воск выделяется на поверхности эпидермальных клеток, но может сосредотачиваться и внутри клеток. У представителей семейства бальнефоровых воск накапливается в стеблях и плодах. Жидкий воск встречается в клетках семядолей семян симмондсии китайской или хохобы (*Simmondsia chinensis*), по качеству он сходен с кашалотовым жиром (спермацетом).

Наибольшее количество липидов сосредотачивается в спорах и семенах растений. Среди цветковых 90 % видов имеют липиды в качестве запасных веществ в семенах. У некоторых растений запасные масла откладываются в клетках вегетативных органов – корневищ (черный папоротник, ирисы, купальницы), стеблевых клубней (цикламен, таро), корневых шишек (чуфа – *Cyperus esculentus*).

Включения углеводов. Запасные углеводы накапливаются в растительных клетках в растворимой и нерастворимой формах, что определяется особенностями образования и строения этих веществ. Растворимые запасные углеводы – сахара, инулин, сосредотачиваются преимущественно в клеточном соке вакуолей, нерастворимые – крахмал, гемицеллюлозы – в органоидах, гиалоплазме, клеточной оболочке.

Крахмал запасается в нерастворимом состоянии в виде крахмальных зёрен. Местами накопления крахмала в клетках растений служат пластиды, реже ядра, гиалоплазма. В хлоропластах образуются зёрна первичного крахмала (ассимиляционного), который со временем разрушается и синтезируется вновь в лейкопластах (амилопластах), образуя зёрна вторичного крахмала. Кроме этих двух физиологических форм у растений различают крахмал транзитный и оберегаемый.

По строению крахмальные зёрна очень разнообразны. При их микроморфологическом анализе учитывают ряд основных признаков: 1) величину, 2) форму, 3) число и положение образовательных центров, 4) слоистость, 5) наличие или отсутствие трещин. Наряду с этим, определяют тип крахмальных зерен (простое, полусложное, сложное) и способность к образованию агрегатов.

Крупные крахмальные зёрна образуются у картофеля (100-145 мкм), канны (180 мкм), петрова креста (275 мкм). Мелкие зёрна у какао (3-8 мкм), риса (2-8 мкм), гречихи (6-8 мкм). Молодые крахмальные зёрна имеют шаровидную или близкую к ней форму. У старых крахмальных зерен форма более разнообразна: яйцевидная (картофель), округлая (пшеница), угловатая (овес),

эллиптическая (горох). Форма крахмальных зерен является постоянным родовым признаком.

В водном растворе крахмальные зёрна часто обнаруживают слоистое строение вокруг одной точки, называемой образовательным центром или ядром, который может находиться в центре или сбоку зерна. Расположение слоёв вокруг образовательного центра в крахмальном зерне может быть концентрическим (пшеница, горох, чечевица) или эксцентрическим (картофель, банан, батат). От образовательного центра зерна в радиальных направлениях могут расходиться трещины, возникающие в результате его обезвоживания (горох, фасоль, пшеница, рожь).

Слоистость крахмального зерна связана с наличием в нём двух различных полисахаридных комплексов, называемых амилоза и амилопектин. Амилоза лучше растворяется в воде, чем амилопектин, поэтому в воде различие в набухании этих веществ делают слоистость более выраженной. Соотношение амилозы и амилопектина зависит от вида растения, а их чередование обусловлено суточным ритмом и эндогенными факторами. Если в амилопласте возникает одно крахмальное зерно, оно называется простым (горох пшеница). При возникновении в пластиде нескольких крахмальных зёрен образуется сложное крахмальное зерно (картофель, канна, горох). Полусложное крахмальное зерно вначале возникает как сложное, а затем формирует общие крахмальные слои как в простом зерне (картофель, канна). У ряда растений образуются сложные крахмальные зёрна в виде агрегатов (овёс, гречиха, рис и др.).

Агрегаты – это скопления мелких простых крахмальных зёрен плотно прилегающих друг к другу, которые при слабом надавливании распадаются на составные части. Количество зёрнышек в агрегатах может быть очень большим: несколько десятков или сотен (у овса до трёхсот), несколько тысяч (у мыльнянок), несколько десятков тысяч (у щириц, шпината). Образование агрегатов объясняют групповым крахмалистым перерождением белковых вакуолей (алеироновых зерен).

Крахмал накапливается в семенах, в подземных побегах (клубнях, луковицах, корневищах), в корнях, в надземных двулетних и многолетних побегах. В семенах крахмал отмечается у сравнительно немногих семенных растений (около 10 %). Его количество в семенах может составлять $\frac{2}{3}$ (рожь, пшеница) и даже $\frac{3}{4}$. Из подземных органов богаты крахмалом клубни картофеля (18-20 %), луковицы гиацинта, корневище купены, корни батата, алтея аптечного. Содержание крахмала в паренхимных клетках саговой пальмы может составлять до $\frac{2}{3}$ от сухого веса ствола.

Гемицеллюлозы входят в состав клеточных оболочек. Содержание гемицеллюлоз в оболочках клеток древесины может быть от 17-47 %, в кожуре семян – 25 %. Кроме функции резервных питательных веществ гемицеллюлозы выполняют опорную функцию и способствуют защите клеток от инфекций.

Гемицеллюлозы откладываются в клетках семян финиковой пальмы, многих лилейных и ирисовых, бобовых. Кроме семян, отложения полуклет-

чатки наблюдаются и в других частях растений. Например, характерны отложения гемицеллюлоз в паренхимных клетках первичной коры и луба древесных растений (берёза, ольха, ива, белая акация, орешник и др.). Живые древесинные волокна часто содержат запасные гемицеллюлозы в качестве внутренних слоев клеточной оболочки, которые в весенний период растворяются.

Слизи – это смеси высокополимерных углеводов (пентозанов и гексозанов), при взаимодействии с водой образующих густые слизистые растворы. От крахмала они отличаются отсутствием характерных зёрен и реакции с раствором йода, от пектиновых веществ – отсутствием полигалактуроновых кислот и желирующей способности. Слизи могут возникать в растении путём перерождения: 1) клеток пограничных тканей (эпидерма, корневой чехлик). 2) отдельных клеток коровой и древесной паренхимы (слизистые идиобласты), 3) клеточных оболочек и межклеточного вещества.

Слизи для растения – это, прежде всего, резерв углеводов, воды и защитные биокolloиды. В вегетативных органах (клубни орхидных, корни окопника), семенной кожуре (семена царградских рожков - *Ceratonia siliqua*) слизь – запас питательных веществ. Слизь кожуры семян полифункциональна: защита от высыхания, удержание влаги, закрепление семени в почве, участие в распространении. У розы персидской мощный слой слизи покрывает листья. У насекомоядных растений (например, у росянок) слизь выполняет ловчую функцию.

Кристаллы – это твёрдые отложения солей или кремнезёма в клетках растений. Наиболее распространёнными включениями данной группы являются кристаллы солей щавелевоуксусной кислоты (оксалата кальция). Кристаллы оксалата кальция образуются в гиалоплазме, но при дальнейшем формировании они могут проникать в вакуоль. Известно образование кристаллов в результате перерождения ядер. Кристаллы оксалата кальция могут иметь разнообразную форму и располагаться в клетке по одиночке или группами.

Одиночные кристаллы встречаются в виде прямоугольных или пирамидальных призм (листья бегонии, белены, чины), стилоидов – сильно вытянутых призм, занимающих клетку целиком (листья агавы, ландыша, эйхорнии). сферитов – шаровидных тел с ярко выраженной слоистостью (стебель филлокактуса).

Часто кристаллы оксалата кальция образуют в клетках разнообразные скопления. К ним можно отнести друзы – шаровидные сростки призматических кристаллов (листья дурмана, черешок бегонии), рафиды – игольчатые, на обоих концах заострённые кристаллы, лежащие в клетке в виде стопки (листья винограда, стебель традесканции, корневище купены), двойниковые или тройниковые сростки призматических кристаллов (сухая чешуя лука), кристаллический песок – мелкие кристаллики неопределённой формы (стебель аукубы, бузины, листья красавки).

В одних случаях кристаллы оксалата кальция являются инкреторными веществами. в других – способны вновь включаться в обменные процессы.

Например, большое количество кристаллов может наблюдаться в незрелых плодах растений, а в процессе их созревания они исчезают.

Для друз и одиночных призматических кристаллов известны случаи, когда кристаллические отложения окружаются твёрдой капсулой (содержит целлюлозу), соединяющейся с клеточной оболочкой. Данное образование получило название розановских кристаллов (стебель конопли, липы, листья и черешки цитрусовых).

В особых клетках (литоцистах) немногих растений клеточная оболочка образует мешковидный вырост, обращенный в полость клетки, который содержит скопления минеральных веществ – карбонат кальция или кремнезём, либо оба этих вещества. Данное образование получило название цистолита. Цистолиты разнообразны по форме: гроздевидные (фикус), веретеновидные (крапива), шаровидные (конопля) и т.д.

Твёрдые отложения иных солей встречаются реже, но достаточно разнообразны. Кристаллы виннокислого кальция образуются в старых листьях виноградной лозы. Кристаллы гипса обнаруживаются в клетках тамарисковых и некоторых видов каперсов. Отложения фосфата кальция найдены в листьях сои и робинии. Углекислая известь (карбонат кальция) характерна для некоторых гераниевых, а также для древесины многих древесных пород (вязов, буков, груш и т.д.). Щавелевокислый магний (оксалат магния) отмечен в листьях злака щетинника (*Setaria* sp.), плодах чёрного перца. Твёрдые отложения кремнезёма могут формироваться снаружи клеток (эпидерма крапивы, хвощей, осок) или внутри клеток (пальмы, орхидные).

3 Клеточный сок.

Клеточный сок – концентрированный водный раствор различных веществ. Формируется клеточный сок благодаря деятельности цитоплазмы, но его состав и консистенция значительно отличается от её свойств. Значение рН клеточного сока у большинства растений колеблется в пределах от 3,5-5,5, а рН цитоплазмы приближается к 7,0.

Состав и концентрация клеточного сока зависят от многих факторов: возраста, типа, функции клетки, условий среды обитания растения и его видовых особенностей. Вода составляет в клеточном соке более 90 %. В ней растворены разнообразные минеральные и органические соединения. Вещества клеточного сока находятся в состоянии истинных или коллоидных растворов, реже принимают форму твёрдых включений (кристаллы, алейроновые зёрна) или капель (эфирные масла).

Соли органических кислот и минеральные ионы клеточного сока играют важную роль в осмотических процессах клетки. В клеточном соке накапливаются и хранятся ионы и различные соединения, которые могут нарушить метаболизм клетки. Примером таких веществ могут служить органические кислоты и их соли (оксалат кальция), пигменты (антоцианы), фенольные соединения (танины).

РАЗДЕЛ 6

КЛЕТОЧНАЯ ЖИЗНЬ, СМЕРТЬ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

Тема 13 Рост и деление клеток

- 1 Рост и деление клеток.
- 2 Клеточный цикл и его регуляция.
- 3 Стволовые клетки.

1 Рост и деление клеток.

Рост клеток – это увеличение их общей массы и объема, в том числе – цитоплазмы и органелл. Рост клеток происходит, когда общий уровень клеточного биосинтеза больше, чем общий показатель клеточной деструкции. Рост клеток не следует путать с клеточным делением или клеточным циклом. Рост и деление клеток могут происходить независимо друг от друга. Во время раннего эмбрионального развития деление клеток происходит многократно без их роста. И, наоборот, некоторые клетки могут расти без клеточного деления или без какого-либо развития клеточного цикла – рост нейронов во время поиска пути аксонов в развитии нервной системы.

У многоклеточных организмов рост ткани редко происходит исключительно за счет роста клеток без деления, чаще всего он происходит за счет пролиферации. Это связано с тем, что две клетки растут (накапливают массу) в два раза быстрее, чем одна клетка, а четыре клетки растут в 4 раза быстрее, чем одна клетка. Этот принцип приводит к экспоненциальному увеличению скорости роста ткани (накопления массы) во время пролиферации клеток из-за экспоненциального увеличения числа клеток. Размер клеток зависит как от роста, так и от деления. Непропорциональное увеличение скорости роста клеток приводит к образованию более крупных клеток, а непропорциональное увеличение скорости деления клеток приводит к образованию множества более мелких клеток.

Клеточная пролиферация обычно включает сбалансированные скорости роста и деления клеток, которые поддерживают примерно постоянный размер клетки в экспоненциально пролиферирующей популяции клеток. Некоторые особые клетки могут расти до очень больших размеров за счет необычного клеточного цикла «эндорепликации», в котором геном реплицируется во время S-фазы, но не происходит последующего митоза (M-фаза) или деления клеток (цитокинез). Эти большие эндореплицирующие клетки имеют множество копий генома, поэтому они очень полиплоидны. Ооциты могут быть необычно большими клетками у видов, у которых эмбриональное развитие происходит вдали от тела матери в яйцеклетке, откладываемой извне.

Механизмы контроля роста клеток. Клетки могут расти за счет увеличения общей скорости клеточного биосинтеза, так что производство биомолекул превышает общую скорость клеточной их деградации через протеасомы, лизосомы или аутофагию. Биосинтез биомолекул инициируется по-

средством экспрессии генов, которые кодируют РНК и/или белки, в том числе ферменты, катализирующие синтез липидов и углеводов. Отдельные гены обычно экспрессируются посредством транскрипции в информационную РНК (мРНК) и трансляции в белки, и экспрессия каждого гена происходит на различных уровнях специфическим для клеточного типа образом (в ответ на действие сети регуляции генов).

Для того, чтобы стимулировать рост клеток, глобальный уровень экспрессии гена может быть увеличен за счет повышения общей скорости транскрипции с помощью РНК-полимеразы II, (для активных генов) или общего уровня трансляции мРНК в белок путем увеличения числа рибосом и тРНК, чей биогенез зависит от РНК-полимеразы I и РНК-полимеразы III. Кроме того, может быть увеличена активность отдельных рибосом посредством регулирования активности факторов инициации трансляции, а также факторов активации биогенеза рибосом.

Чтобы подавить рост клеток, может быть уменьшена скорость экспрессии генов, или увеличена скорость биомолекулярной деградации, например, за счет увеличения скорости аутофагии.

Деление клетки – процесс образования из родительской клетки двух и более дочерних клеток.

Деление прокариотических клеток. Ключевыми событиями клеточного цикла как прокариот, так и эукариот являются репликация ДНК и деление клетки. Отличительной чертой деления прокариотических клеток является непосредственное участие реплицированной ДНК в процессе деления. В подавляющем большинстве случаев прокариотические клетки делятся с образованием двух одинаковых по размеру дочерних клеток, поэтому этот процесс ещё иногда называют бинарным делением. Так как чаще всего прокариотические клетки имеют клеточную стенку, бинарное деление сопровождается образованием септы – перегородки между дочерними клетками, которая затем расслаивается посередине. Процесс деления прокариотической клетки подробно изучен на примере *Escherichia coli*.

Центральную роль в делении клеток грамотрицательных бактерий играет септальное кольцо – кольцевая органелла, расположенная примерно посередине клетки и способная сокращаться, образуя перетяжку между двумя новыми дочерними клетками. Зрелое септальное кольцо представляет собой сложный белковый комплекс, состоящий более чем из дюжины разных белков.

Завершающим этапом деления прокариотической клетки является формирование перетяжки и конечное разделение двух новых клеток. Образование перетяжки затрагивает все компоненты клеточной оболочки (внутреннюю мембрану, слой пептидогликана и внешнюю мембрану). Параллельно с этим процессом ферменты септального кольца синтезируют (или модифицируют особым образом предсуществующий) пептидогликан септы. После формирования септы в работу вступают пептидогликангидролазы, которые отделяют будущие клетки друг от друга. Завершается процесс деления инвагинацией и обособлением внешних мембран клеток.

Амитоз, или прямое деление, – это деление интерфазного ядра путём перетяжки без образования веретена деления. В большинстве случаев амитоз наблюдается в клетках со сниженной митотической активностью: это стареющие или патологически измененные клетки, часто обреченные на гибель (клетки зародышевых оболочек млекопитающих, опухолевые клетки и др.).

При амитозе морфологически сохраняется интерфазное состояние ядра, хорошо видны ядрышко и ядерная оболочка. Репликация ДНК отсутствует. Спирализация хроматина не происходит, хромосомы не выявляются. Клетка сохраняет свойственную ей функциональную активность, которая при митозе почти полностью исчезает. При амитозе делится только ядро, причем без образования веретена деления, поэтому наследственный материал распределяется случайным образом. Отсутствие цитокинеза приводит к образованию двуйдерных клеток, которые в дальнейшем не способны вступать в нормальный митотический цикл. При повторных амитозах могут образовываться многоядерные клетки.

В настоящее время считается, что все явления, относимые к амитозу – результат неверной интерпретации недостаточно качественно приготовленных микроскопических препаратов, или интерпретации как деления клетки явлений, сопровождающих разрушение клеток или иные патологические процессы. В то же время некоторые варианты деления ядер эукариот нельзя назвать митозом или мейозом. Таково, например, деление макронуклеусов многих инфузорий, где без образования веретена происходит сегрегация коротких фрагментов хромосом.

Деление эукариотических клеток. Эукариотические организмы, состоящие из клеток, имеющих ядра, начинают подготовку к делению на определенном этапе клеточного цикла, в интерфазе. Именно в период интерфазы в клетке происходит процесс биосинтеза белка, удваиваются все важнейшие структуры клетки. Вдоль исходной хромосомы из имеющихся в клетке химических соединений синтезируется её точная копия, удваивается молекула ДНК. Удвоенная хромосома состоит из двух половинок-хроматид. Каждая из хроматид содержит одну молекулу ДНК. Интерфаза в клетках растений и животных в среднем продолжается 10-20 ч. Затем наступает процесс деления клетки – митоз.

Митоз – деление ядра эукариотической клетки с сохранением числа хромосом. В отличие от мейоза, митотическое деление протекает без осложнений в клетках любой пloidности, поскольку не включает как необходимый этап, конъюгацию, хромосом в профазе.

Мейоз – это особый способ деления клеток, в результате которого происходит уменьшение числа хромосом вдвое в каждой дочерней клетке. С помощью мейоза образуются гаметы. В результате редукции споры и половые клетки хромосомного набора получают в каждую гаплоидную спору и гамету по одной хромосоме из каждой пары хромосом, имеющихся в данной диплоидной клетке. В ходе дальнейшего процесса оплодотворения (слияния гамет) организм нового поколения получит опять диплоидный набор хромосом, то

есть кариотип организмов данного вида в ряду поколений остается постоянным.

2 Клеточный цикл и его регуляция.

Клеточный цикл – период существования клетки от момента её образования путём деления материнской клетки до собственного деления или гибели.

Длительность клеточного цикла у разных клеток разная. Быстро размножающиеся клетки взрослых организмов, такие как кроветворные или базальные клетки эпидермиса и тонкой кишки, могут входить в клеточный цикл каждые 12-36 ч. Короткие клеточные циклы (около 30 мин) наблюдаются при быстром дроблении яиц иглокожих, земноводных и других животных. В экспериментальных условиях короткий клеточный цикл (около 20 ч) имеют многие линии клеточных культур. У большинства активно делящихся клеток длительность периода между митозами составляет примерно 10-24 ч.

Фазы клеточного цикла эукариот. Клеточный цикл эукариот состоит из двух периодов:

1 период клеточного роста (интерфаза), во время которого идет синтез ДНК и белков и осуществляется подготовка к делению клетки. Состоит из нескольких стадий:

- G1-фазы (от англ. gap — промежуток), или фазы начального роста, во время которой идет синтез мРНК, белков, других клеточных компонентов;
- S-фазы (от англ. synthesis — синтез), во время которой идет репликация ДНК клеточного ядра, также происходит удвоение центриолей (если есть).
- G2-фазы, во время которой идет подготовка к митозу.

Клетки, которые более не делятся, находятся в фазе покоя G₀ (имея столько же ДНК, как в G₁);

2 период клеточного деления (фаза М, от слова mitosis — митоз). Включает две стадии:

- кариокинез (деление клеточного ядра). Митоз, в свою очередь, делится на пять стадий.
- цитокинез (деление цитоплазмы).

Регуляция клеточного цикла. Закономерная последовательность смены периодов клеточного цикла осуществляется при взаимодействии таких белков, как циклин-зависимые киназы и циклины. Клетки, находящиеся в фазе G₀, могут вступать в клеточный цикл при действии на них факторов роста. Разные факторы роста, такие как тромбоцитарный, эпидермальный, фактор роста нервов, связываясь со своими рецепторами, запускают внутриклеточный сигнальный каскад, приводящий в итоге к транскрипции генов циклинов и циклин-зависимых киназ. Циклин-зависимые киназы становятся активными лишь при взаимодействии с соответствующими циклинами. Содержание различных циклинов в клетке меняется на протяжении всего клеточного цикла. Циклин является регуляторной компонентой комплекса циклин-циклин-

зависимая киназа. Киназа же является каталитическим компонентом этого комплекса. Киназы не активны без циклинов. На разных стадиях клеточного цикла синтезируются разные циклины. Так, содержание циклина В в ооцитах лягушки достигает максимума к моменту митоза, когда запускается весь каскад реакций фосфорилирования, катализируемых комплексом циклин-В/циклин-зависимая киназа. К окончанию митоза циклин быстро разрушается протеиназами.

Контрольные точки клеточного цикла. Для определения завершения каждой фазы клеточного цикла необходимо наличие в нем контрольных точек. Если клетка «проходит» контрольную точку, то она продолжает «двигаться» по клеточному циклу. Если же какие-либо обстоятельства, например, повреждение ДНК, мешают клетке пройти через контрольную точку, которую можно сравнить со своего рода контрольным пунктом, то клетка останавливается и другой фазы клеточного цикла не наступает, по крайней мере, до тех пор, пока не будут устранены препятствия, не позволявшие клетке пройти через контрольный пункт. Существует как минимум четыре контрольных точки клеточного цикла: точка в G_1 , где проверяется интактность ДНК, перед вхождением в S-фазу, сверочная точка в S-фазе, в которой проверяется правильность репликации ДНК, сверочная точка в G_2 , в которой проверяются повреждения, пропущенные при прохождении предыдущих сверочных точек, либо полученные на последующих стадиях клеточного цикла. В G_2 -фазе детектируется полнота репликации ДНК, и клетки, в которых ДНК недореплицирована, не входят в митоз. В контрольной точке сборки веретена деления проверяется, все ли кинетохоры прикреплены к микротрубочкам.

Нарушения клеточного цикла и образование опухолей. Увеличение синтеза белка p53 ведет к индукции синтеза белка p21 – ингибитора клеточного цикла.

Нарушение нормальной регуляции клеточного цикла является причиной появления большинства твердых опухолей. В клеточном цикле, как уже говорилось, прохождение контрольных пунктов его возможно только в случае нормального завершения предыдущих этапов и отсутствия поломок. Для опухолевых клеток характерны изменения компонентов сверочных точек клеточного цикла. При инактивации сверочных точек клеточного цикла наблюдается дисфункция некоторых опухолевых супрессоров и протоонкогенов, в частности p53, pRb, Myc и Ras. Белок p53 является одним из факторов транскрипции, который инициирует синтез белка p21, являющегося ингибитором комплекса CDK-циклин, что приводит к остановке клеточного цикла в периоде G_1 и G_2 . Таким образом клетка, у которой повреждена ДНК, не вступает в S-фазу. При мутациях, приводящих к потере генов белка p53, или при их изменениях, блокады клеточного цикла не происходит, клетки вступают в митоз, что приводит к появлению мутантных клеток, большая часть из которых нежизнеспособна, другая – дает начало злокачественным клеткам.

3 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.

Свойства:

- самообновление, то есть способность сохранять неизменный фенотип после деления (без дифференцировки);
- потентность (дифференцирующий потенциал), или способность давать потомство в виде специализированных типов клеток.

Существуют два механизма, поддерживающих популяцию стволовых клеток в организме:

- асимметричное деление, при котором образуется две разных клетки (одна стволовая клетка и одна дифференцированная клетка);
- стохастическое деление: одни стволовые клетки делятся на две более специализированные, другие при делении дают две стволовых клетки.

Дифференцирующий потенциал, или потентность, стволовых клеток – это способность производить определённое 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, организованные в виде трёхмерных связанных структур (тканей, органов, систем органов, организма). 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. Однако к ним не относятся, например, 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 учёные 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 порождают клетки разных тканей, но многообразие их видов ограничено пределами одного зародышевого

листка. 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, уротелий мочевого пузыря, а также печень, поджелудочная железа и лёгкие.

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 могут производить лишь один тип клеток. Они способны к многократному самовоспроизведению, что делает их долговременным источником клеток одного конкретного типа и отличает от не стволовых. Однако их способность к самовоспроизведению ограничена определённым количеством делений, что также отличает их от истинно стволовых клеток. К клеткам-предшественницам относятся, к примеру, некоторые из миосателлитов, участвующих в образовании скелетной и мышечной тканей.

Стволовые клетки можно разделить на три основные группы в зависимости от источника их получения: эмбриональные, фетальные и постнатальные (стволовые клетки взрослого организма).

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) образуют внутреннюю клеточную массу (ВКМ), или эмбриобласт, на ранней стадии развития эмбриона. Они являются плюрипотентными. Важный плюс ЭСК состоит в том, что они не экспрессируют HLA (human leucocyte antigens), то есть не вырабатывают антигены тканевой совместимости. Каждый человек обладает уникальным набором этих антигенов, и их несовпадение у донора и реципиента является важнейшей причиной несовместимости при трансплантации. Соответственно, шанс того, что донорские эмбриональные клетки будут отторгнуты организмом реципиента очень невысок.

При пересадке иммунодефицитным животным эмбриональные стволовые клетки способны образовывать опухоли сложного (многоклеточного) строения – тератомы, некоторые из них могут стать злокачественными. Достоверных данных, о том, как ведут себя эти клетки в иммунокомпетентном организме, например, в организме человека, нет. Вместе с тем, следует отметить, что клинические испытания с применением дифференцированных дериватов (производных клеток) ЭСК уже начаты.

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). Фетальные стволовые клетки являются смесью мульт-

типотентных и унипотентных стволовых клеток. Естественно, изучение и использование такого биоматериала также порождает этические проблемы. Проблемой является и нелегальный рынок препаратов фетальных стволовых клеток в России. Британская компания ReNeuron исследует возможности использования фетальных стволовых клеток для терапии инсульта. Эти клетки уже начали дифференцировку, и, следовательно, каждая из них, во-первых, может пройти только ограниченное число делений, и, во-вторых, дать начало не любым, а достаточно определённым видам специализированных клеток. Так, 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. Несмотря на то, что стволовые клетки зрелого организма обладают меньшей потенциальностью в сравнении с эмбриональными и фетальными стволовыми клетками, то есть могут порождать меньшее количество различных типов клеток, этический аспект их исследования и применения не вызывает серьёзной полемики. Кроме того, 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.

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – мультипотентные стволовые клетки, дающие начало всем клеткам крови миелоидного (моноциты, макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, эритроциты, мегакариоциты и тромбоциты, дендритные клетки) и лимфоидного рядов (Т-лимфоциты, В-лимфоциты и естественные киллеры). Гемопоэтическая ткань содержит клетки с долгосрочными и краткосрочными возможностями к регенерации, включая мультипотентные, олигопотентные и клетки-предшественники. Миелоидная ткань содержит одну ГСК на 10 000 клеток. ГСК являются неоднородной популяцией. В настоящее время активно исследуются свойства различных групп ГСК, однако промежуточные результаты показывают, что только миелоидно ориентированные и «сбалансированные» ГСК способны к продолжительному самовоспроизведению. Кроме того, эксперименты по трансплантации показали, что каждая группа ГСК преимущественно воссоздаёт свой тип клеток крови, что позволяет предположить наличие наследуемой эпигенетической программы для каждой субпопуляции.

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, рёбра, 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 (ММСК) – мультипотентные стволовые клетки, способные дифференцироваться в

остеобласты (клетки костной ткани), хондроциты (хрящевые клетки) и адипоциты (жировые клетки).

Предшественниками ММСК в эмбриогенный 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. Существует ряд доказательств того, что естественная тканевая ниша ММСК расположена периваскулярно – вокруг кровеносных сосудов. Кроме того, ММСК были обнаружены в пульпе молочных зубов, амниотической (околоплодной) жидкости, пуповинной крови и вартоновом студне пупочного канатика. Эти источники исследуются, но редко применяются на практике. Например, выделение молодых ММСК из вартонова студня представляет собой крайне трудоёмкий процесс, поскольку клетки в нём также располагаются периваскулярно. В 2005-2006 годах специалисты по ММСК официально определили ряд параметров, которым должны соответствовать клетки, чтобы отнести их к популяции ММСК. Были опубликованы статьи, в которых представлен иммунофенотип ММСК и направления ортодоксальной дифференцировки. К ним относится дифференцировка в клетки костной, жировой и хрящевой тканей.

Многочисленные исследования показали, что ММСК человека могут избегать отторжения при трансплантации, вступать во взаимодействие с дендритными клетками и Т-лимфоцитами и создавать иммуносупрессивную микросреду посредством выработки цитокинов. Было доказано, что иммуномодулирующие функции ММСК человека повышаются, когда их пересаживают в воспалённую среду с повышенным уровнем гамма-интерферона. Другие исследования противоречат этим выводам, что обусловлено гетерогенной природой изолированных МСК и значительными различиями между ними, в зависимости от способа культивирования.

МСК могут быть активированы в случае необходимости. Однако эффективность их использования относительно низка. Так, к примеру, повреждение мышц даже при трансплантации МСК заживает очень медленно. В настоящее время проводятся исследования по активации МСК. Ранее проведённые исследования по внутривенной трансплантации МСК показали, что этот способ трансплантации часто приводит к кризу отторжения и сепсису. Сегодня признано, что заболевания периферических тканей, например, воспаление кишечника лучше лечить не трансплантацией, а методами, повышающими локальную концентрацию МСК.

Однако, исследования эффективности применения МСК для реэпителизации повреждённых кожных покровов, например, при синдроме диабетической стопы, показали свою результативность в клинических исследованиях.

Тканеспецифичные прогениторные клетки (клетки-предшественницы) – малодифференцированные клетки, которые располага-

ются в различных тканях и органах и отвечают за обновление их клеточной популяции, то есть замещают погибшие клетки. К ним, например, относятся миосателлитциты (предшественники мышечных волокон), клетки-предшественницы лимфо- и миелопоэза. Эти клетки являются олиго- и унипотентными и их главное отличие от других стволовых клеток в том, что клетки-предшественницы могут делиться лишь определенное количество раз, в то время как другие стволовые клетки способны к неограниченному самообновлению. Поэтому их принадлежность к истинно стволовым клеткам подвергается сомнению.

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, в частности, в субэпендимальной зоне, в гиппокампе, обонятельном мозге и т. д. Несмотря на то, что большая часть погибших нейронов не замещается, процесс нейрогенеза во взрослой ЦНС всё-таки возможен за счёт нейральных стволовых клеток, то есть популяция нейронов может «восстанавливаться», однако это происходит в таком объёме, что не сказывается существенно на исходах патологических процессов.

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

Использование стволовых клеток в медицине. Одной из первых областей применения стволовых клеток стала **онкология**. Их трансплантацию используют при онкогематологических заболеваниях. Эту процедуру также называют пересадкой костного мозга. Основными показаниями являются лейкоз, миеломная болезнь, лимфома Ходжкина и неходжкинские лимфомы. Трансплантация может быть аутологичной или аллогенной. В первом случае берут собственные стволовые клетки пациента. Их получают из периферической крови, а затем культивируют для увеличения количества. Аллогенная трансплантация предполагает забор клеток у гистологически совместимого донора. Аутологичная трансплантация менее эффективна. При злокачественных процессах она не излечивает болезнь полностью. Преимуществами являются быстрое восстановление иммунитета, отсутствие необходимости поиска донора. Не нужны препараты, подавляющие иммунитет, так как никогда не происходит реакция отторжения (трансплантат против хозяина). Аллогенная трансплантация стволовых клеток имеет более высокую эффективность. Донора берут из числа родственников или подбирают в банке доноров.

Офтальмология. Некоторые заболевания глаз не поддаются лечению. Это патологии нервной ткани. В случае поражения сетчатки или зрительного нерва острота зрения не восстанавливается. Возникающая в результате повреждения этих структур глаза слепота считается необратимой. Но недавно

дело сдвинулось с мертвой точки. Заболевания сетчатки и повреждения зрительного нерва еще нельзя полностью устранить, но уже достигаются неплохие результаты при использовании стволовых клеток. Из них можно вырастить сетчатку и пересадить человеку. Также стволовые клетки вводятся в организм человека для регенерации зрительного нерва. Первая пересадка сетчатки, выращенной из стволовых клеток, состоялась только в 2017 году. Но уже сегодня в развитых странах медицинские туристы могут воспользоваться последними разработками в области лечения стволовыми клетками, а также принять участие в клинических исследованиях.

Ортопедия. Собственные стволовые клетки человека используются для регенерации хряща. Наиболее исследована эта методика при лечении артроза коленного сустава. Сам по себе хрящ не восстанавливается, поскольку из-за отсутствия кровоснабжения метаболические процессы в нем протекают крайне медленно. В этом заключается главная проблема лечения артроза. Это заболевание не имеет обратного развития. Его исходом часто становится полное разрушение сустава с последующим эндопротезированием. Но в последние годы появляется все больше методик восстановления дефектов суставной поверхности. Одна из них предполагает использование стволовых клеток. Стволовые клетки вводят в коленный сустав и фиксируют коллагеновой матрицей. Там они превращаются в хондроциты – клетки хрящевой ткани – и закрывают дефект суставной поверхности. Данная процедура во многих случаях позволяет избавить пациента от необходимости имплантировать искусственный коленный сустав.

Неврология. Нервные клетки не восстанавливаются – избитая фраза, которую слышали все. Но стволовые клетки могут дифференцироваться в нейроны. Поэтому клеточная терапия применяется при многих заболеваниях центральной нервной системы: болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, инсульте, рассеянном склерозе и др., то есть, при тех заболеваниях, которые сопровождаются деградацией нервной ткани. Стволовые клетки помогают ее восстановить. Для этого требуется длительный курс клеточной терапии. Первые результаты отмечаются практически сразу после введения стволовых клеток. Но затем могут возникнуть побочные эффекты, которые проходят к концу второй недели лечения. Максимально видимый результат достигается через полгода.

Эндокринология. При сахарном диабете 1 типа происходит разрушение бета-клеток поджелудочной железы. Они отвечают за продукцию инсулина. В результате возникающего дефицита этого гормона нарушается транспорт глюкозы в ткани. Поэтому ее уровень в крови повышается, а человек вынужден постоянно делать себе инъекции инсулина, чтобы избежать гипергликемии. При помощи стволовых клеток врачам удалось частично решить эту проблему. Полипотентные стволовые клетки дифференцируются до бета-клеток, после чего начинают производить инсулин. Правда, одна проблема осталась нерешенной. Иммуитет, уничтоживший ранее клетки поджелудочной железы, после имплантации выращенных бета-клеток делает это снова. Поэтому эффект человек получает не пожизненный, а временный. Он

длится несколько лет, а затем постепенно снижается. Кроме того, с помощью стволовых клеток удастся лишь снизить риск осложнений и уменьшить дозы инсулина, но не вылечить болезнь полностью.

Другие направления Стволовые клетки с тем или иным успехом применяются и в других отраслях медицины. В пульмонологии их применяют для лечения бронхиальной астмы. При введении клеток через нос отмечается уменьшение выраженности воспалительных реакций в бронхах, нормализация реактивности, устранение признаков фиброза. Исследуется возможность выращивания и трансплантации структур бронхолегочной системы, что актуально при многих заболеваниях: муковисцидозе, раке легких, саркоидозе, легочном фиброзе. В нефрологии при помощи стволовых клеток уже пытаются лечить поликистоз почек. Предприняты первые успешные попытки выращивания целой почки. Предполагается, что в будущем этот метод заменит трансплантацию донорской почки. Пациенту будут выращивать его собственную почку из стволовых клеток, и пересаживать ее на место поврежденного органа. В кардиологии стволовые клетки начинают использовать для выращивания сосудистых протезов. Они будут обладать большей биологической совместимостью. Кроме того, в некоторых клиниках стволовыми клетками лечат кардиосклероз, возникающий в результате инфаркта миокарда. При гибели мышечной ткани происходит ее замещение рубцовой тканью, которая хоть и закрывает дефект, но не может сокращаться и расслабляться. В результате страдает функция миокарда. Введение стволовых клеток в организм позволяет нормализовать регенераторные процессы и восстановить утраченные мышечные волокна.

Использование стволовых клеток и онкологические заболевания. В СМИ активно идут дебаты, привели ли инъекции эмбриональных стволовых клеток к заболеванию раком и последующей преждевременной смерти многих известных людей, в основном артистов – Александра Абдулова, Веры Глаголевой, Ильи Олейникова, Любови Полищук, Жанны Фриске, Михаила Задорнова, Валентины Толкуновой, Клары Лучко, Анны Самохиной, Олега Янковского и других. Анализы знаменитых пациентов показывали, что в организме актёров происходит обновление, ускорение жизнедеятельности. Однако вскоре появилась страшная статистика: те, кто применял инъекции стволовых клеток, сначала реально молодели, а потом очень быстро «сгорали» от рака, в основном глиобластомы (рака мозга), заболевания во многом загадочного, которое характеризуется множественной генетической поломкой в клетках глии мозга, что приводит к быстрому экспансивному росту злокачественной опухоли.

После инъекций стволовых клеток начинается активное деление не только здоровых, но и патологических клеток организма, включая злокачественные, которых тем больше, чем старше организм. Временный импульс молодости проходит и возвращается упадок, а потом проявляются разные последствия. Так, если введенные клетки приживаются, то вследствие противоречия с клетками организма и иммунной системой они сами часто перерож-

даются в раковые. В любом случае это стрессовое воздействие на иммунитет, на фоне которого способна реализоваться патология.

Тема 14 Гибель клеток

- 1 Биологические деструктивные процессы.
- 2 Апоптоз.
- 3 Онкоз.
- 4 Некроз.

1 Биологические деструктивные процессы.

Биологические деструктивные процессы – разрушение клеток и тканей в ходе жизнедеятельности организма или после его смерти. Эти изменения широко распространены и встречается как в норме, так и в патологии.

Различают четыре формы биологической деструкции:

- клеточная гибель;
- изолированное разрушение межклеточного вещества (деградация, деполимеризация или лизис межклеточного вещества);
- некроз;
- разложение тканей мёртвого тела.

Клеточная гибель, деградация межклеточных структур и некроз развиваются не только при патологических процессах, но и в процессе жизнедеятельности, например, периодический некроз слизистой оболочки матки (эндометрия) у женщин репродуктивного возраста.

Клеточная гибель – разрушение как отдельных клеток, так и клеток в составе погибающей ткани. Различают физиологическую (естественную), насильственную и возрастную (старческую) формы клеточной гибели, которые по механизму реализации делятся на апоптоз и онкоз. Физиологическая и возрастная гибель клеток, как правило, происходит по механизму апоптоза. Насильственная клеточная гибель может реализоваться как путём апоптоза, так и онкоза.

Физиологическая (естественная) гибель клеток – разрушение клеток в ходе нормального онтогенеза. Благодаря естественной убыли клеток регулируется постоянство состава ткани (структурный, или тканевый, гомеостаз). Другим механизмом его регуляции является регенерация, обеспечивающая обновление и восстановление тканевых элементов.

Насильственная гибель клеток – явление патологическое, лежит в основе некроза. Насильственная гибель клеток возникает при воздействии чрезмерного по силе повреждающего фактора. Природа патогена при этом может быть физической, химической, или биологической.

Возрастная (старческая) гибель клеток наблюдается в стареющем организме. В основе старения лежит генетически детерминированная репрессия белкового синтеза. В стареющей клетке общее количество вновь синте-

зируемых белков, прежде всего ферментов, прогрессивно уменьшается, что вызывает нарушение клеточного метаболизма, а дегенеративные изменения приводят к гибели. Наряду с угнетением синтеза белков, участвующих в энергетическом и пластическом обмене, происходит торможение синтеза энзимов, контролирующих состояние клеточной ДНК (ферментов репарации ДНК), что способствует накоплению ошибок в структуре наследственного материала и синтезу на дефектной матрице функционально неполноценных белков. Атрофия органов в стареющем организме (возрастная атрофия) и снижение их функциональной активности (полиорганная недостаточность), характерные для старости, обусловлены именно возрастной гибелью клеток.

Выделяют два основных механизма клеточной гибели:

- активная форма (**апоптоз**) – форма клеточной гибели, реализующаяся при участии специального генетически детерминированного механизма саморазрушения, требующего затрат энергии АТФ;
- пассивная форма клеточной гибели (**онкоз**) – форма клеточной гибели, при которой не происходит активации энергозависимого генетически детерминированного механизма саморазрушения клетки.

При апоптозе в клетке происходит активация особых генов (летальные гены), на матрице которых синтезируются специальные белки, обеспечивающие разрушение клетки (летальные протеины). При этом клетка не должна испытывать дефицит энергии, т.к. процессы апоптоза требуют определённых энергозатрат, поэтому апоптоз иногда называют энергозависимой (АТФ-зависимой) формой гибели клеток. В условиях тяжёлой гипоксии и недостаточности макроэргических соединений в клетке апоптоз не развивается.

При пассивной гибели активации летальных генов и синтеза летальных протеинов не происходит; клетка погибает на фоне прогрессирующего энергодефицита, обусловленного влиянием внешнего патогена, или же моментально разрушается под воздействием сверхсильного ирританта, например, при действии открытого пламени или агрессивных химических веществ. Пассивную гибель клетки можно сравнить с убийством, а апоптоз – с самоубийством («клеточный суицид»).

2 Апоптоз.

Апоптоз – форма гибели клетки, проявляющаяся в уменьшении ее размера, конденсации и фрагментации хроматина, уплотнении цитоплазматической мембраны без выхода содержимого клетки в окружающую среду.

Процесс апоптоза можно условно разделить на три фазы: сигнальную (индукторную), эффекторную и деградиационную (фаза экзекуции или деструкции).

Сигнальная фаза. Инициация апоптоза может происходить посредством внешних (внеклеточных) или внутриклеточных факторов. Например, в результате гипоксии, гипероксии, субнекротического поражения химическими или физическими агентами, перекрёстного связывания соответствующих рецепторов, нарушения сигналов клеточного цикла, удаления факторов роста и метаболизма и т.д. Несмотря на разнообразие иницирующих факторов,

выделяются два основных пути передачи сигнала апоптоза: рецептор-зависимый (внешний) сигнальный путь с участием рецепторов гибели клетки и митохондриальный (собственный) путь.

Рецептор-зависимый сигнальный путь. Процесс апоптоза часто начинается с взаимодействия специфических внеклеточных лигандов с рецепторами клеточной гибели, экспрессированными на поверхности клеточной мембраны. Рецепторы, воспринимающие сигнал апоптоза, относятся к суперсемейству TNF-рецепторов (tumor necrosis factor receptor или кратко TNFR – «рецептор фактора некроза опухолей»). Наиболее изученными рецепторами смерти, для которых описана и определена роль в апоптозе, являются CD95 (также известный как Fas или APO-1) и TNFR1 (также называемый p55 или CD120a). К дополнительным относятся CAR1, DR3 (death receptor 3 – «рецептор смерти 3»), DR4 и DR5.

Все рецепторы смерти представляют собой трансмембранные белки, характеризующиеся наличием общей последовательности из 80 аминокислот в цитоплазматическом домене. Данная последовательность называется доменом смерти (death domain или кратко DD) и является необходимой для трансдукции сигнала апоптоза. Внеклеточные участки рецепторов смерти взаимодействуют с тримерами лигандов (CD95L, TNF, Apo3L, Apo2L и т. п.). Тримеры лигандов в результате взаимодействия тримеризуют рецепторы смерти (то есть «сшивают» 3 молекулы рецептора). Активированный таким образом рецептор взаимодействует с соответствующим внутриклеточным адаптером (или адаптерами). Для рецептора CD95(Fas/APO-1) адаптером является FADD (Fas-associated DD-protein – «белок, взаимодействующий с доменом смерти Fas-рецептора»). Для рецепторов TNFR1 и DR3 адаптером является TRADD (TNFR1-associated DD-protein – «белок, взаимодействующий с доменом смерти TNFR1-рецептора»).

Адаптер, ассоциированный с рецептором смерти, вступает во взаимодействие с эффекторами – пока ещё неактивными предшественниками протеаз из семейства иницирующих каспаз – с прокаспазами. В результате цепочки взаимодействия «лиганд-рецептор-адаптер-эффектор» формируются агрегаты, в которых происходит активация каспаз. Данные агрегаты именуются **апоптосомами**, апоптозными шаперонами или сигнальными комплексами, индуцирующими смерть (DISC – death-inducing signaling complex – «сигнальный комплекс, индуцирующий смерть»). Примером апоптосомы может служить комплекс FasL-Fas-FADD-прокаспаза-8, в котором активируется каспаза-8.

Рецепторы смерти, адаптеры и эффекторы взаимодействуют между собой сходными по структуре доменами: DD, DED, CARD. DD (death domain – «домен смерти») участвует во взаимодействии рецептора Fas с адаптером FADD и во взаимодействии рецепторов TNFR1 или DR3 с адаптером TRADD. Посредством домена DED (death-effector domain – «домен эффектора смерти») осуществляется взаимодействие адаптера FADD с прокаспазами -8 и -10. Домен CARD (caspase activation and recruitment domain – «домен активации и рекрутирования каспазы») участвует во взаимодействии адаптера

RAIDD с прокаспазой-2. Активированные иницирующие каспазы далее участвуют в активации **эффекторных каспаз**.

Митохондриальный сигнальный путь. Большинство форм апоптоза у позвоночных реализуется по митохондриальному пути, а не через рецепторы клеточной гибели. Митохондриальный сигнальный путь апоптоза реализуется в результате выхода апоптогенных белков из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму клетки. Высвобождение апоптогенных белков, предположительно, может осуществляться двумя путями: за счёт разрыва митохондриальной мембраны или же путём открытия высокопроницаемых каналов на внешней мембране митохондрий.

Ключевым событием митохондриального пути апоптоза является повышение проницаемости наружной мембраны митохондрий (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP). Существенную роль в повышении MOMP играют апоптотические Bcl-2-белки – Bax и Bak. Они встраиваются в наружную мембрану митохондрий и олигомеризуются. При этом, вероятно, нарушается целостность внешней мембраны митохондрий. При повышении MOMP из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль высвобождаются растворимые белки, участвующие в апоптозе: цитохром с; прокаспазы -2, -3 и -9; белок AIF (apoptosis inducing factor – «фактор, индуцирующий апоптоз»).

Разрыв внешней мембраны митохондрий объясняется увеличением объёма митохондриального матрикса. Данный процесс связывают с раскрытием пор митохондриальной мембраны, приводящим к снижению мембранного потенциала и высокоамплитудному набуханию митохондрий вследствие осмотического дисбаланса. Раскрытие пор стимулируют следующие факторы: неорганический фосфат; каспазы; SH-реагенты; истощение клеток восстановленным глутатионом; образование активных форм кислорода; разобщение окислительного фосфорилирования протонотическими соединениями; увеличение содержания Ca^{2+} в цитоплазме; воздействие церамида; истощение митохондриального пула АТФ и др.

Другие пути индукции апоптоза. Существует ряд менее распространённых механизмов инициации апоптоза. Например, за счёт активации прокаспазы-12, локализованной в эндоплазматическом ретикулуме. Высвобождение и активация прокаспазы-12 при этом обусловлены нарушениями внутриклеточного гомеостаза ионов кальция (Ca^{2+}). Активация апоптоза также может быть связана с нарушением адгезии клеток.

В качестве ещё одного фактора индукции апоптоза рассматривается атака инфицированных клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами, которые, помимо активации Fas-рецептора, способны секретировать перфорин вблизи мембраны заражённой клетки. Перфорин, полимеризуясь, образует трансмембранные каналы, через которые внутрь клетки поступают лимфотоксин-альфа и смесь сериновых протеаз (гранзимов). Далее гранзим В активирует каспазу-3 и запускается каспазный каскад.

Возможна инициация клеточной смерти при высвобождении лизосомальных протеаз – катепсинов. К примеру, каспаза-8 вызывает выход из лизосом активного катепсина В, который затем расщепляет регуляторный белок Bid. В результате образуется активный белок t-Bid, активирующий в свою очередь проапоптозный белок Bax.

Эффекторная фаза. В течение эффекторной фазы различные иницирующие пути конвертируются в один (или несколько) общий путь апоптоза. Как правило, происходит активация каскада белков-эффекторов и регулирующих их белков-модуляторов. Основными эффекторами апоптоза являются каспазы. В процессе активации они запускают каспазный каскад: сложно переплетённые цепочки взаимодействий иницирующих и эффекторных каспаз.

Каспазы представляют собой цистеиновые протеазы, которые расщепляют аминокислотные последовательности после остатка аспарагиновой кислоты. Каспазы образуются за счёт активации прокаспаз, в составе которых выделяют 3 домена: регуляторный N-концевой домен (продомен), большую и малую субъединицы. Активация происходит путём протеолитического процессинга: все три домена расщепляются, отделяется продомен, а оставшиеся большая и малая субъединицы ассоциируются, образуя гетеродимер. Два гетеродимера в дальнейшем формируют тетрамер – полноценную каспазу с двумя каталитическими участками.

Инициаторные каспазы активируют эффекторные каспазы, которые в свою очередь провоцируют и непосредственно участвуют в трансформации клетки. В итоге морфологические и биохимические изменения приводят к гибели клетки по типу апоптоза.

Одна из основных функций эффекторных каспаз заключается в прямом и опосредованном разрушении клеточных структур. Гидролизу подвергаются белки ядерной ламины, разрушается цитоскелет, расщепляются белки, регулирующие клеточную адгезию. Другой важной функцией эффекторных каспаз является инактивация белков, блокирующих апоптоз. В частности, расщепляется ингибитор DFF (DNA fragmentation factor – «фактор фрагментации ДНК»), препятствующий активации апоптозной ДНКазы CAD (caspase-activated DNase – «ДНКаза, активируемая каспазами»). Разрушению подвергаются и антиапоптозные белки семейства Bcl-2. Наконец, в результате действия эффекторных каспаз происходит диссоциация регуляторных и эффекторных доменов, участвующих в репарации ДНК, мРНК-сплайсинга и ДНК-репликации.

Помимо каспаз существуют и другие эффекторы апоптоза. Например, флавопротеин AIF, высвобождающийся из межмембранного пространства митохондрий, действует по независимому от каспаз пути. Попадая в клеточное ядро, AIF вызывает конденсацию хроматина и активирует эндонуклеазы, которые участвуют во фрагментации ДНК. На основании экспериментальных данных установлено, что апоптоз, протекающий в присутствии AIF, не предотвращается ингибитором каспаз (Z-VAD-fmk).

Деградационная фаза. Итогом программируемой клеточной гибели вне зависимости от изначального инициирующего воздействия является деградация клетки путём фрагментации на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной. Фрагменты погибшей клетки обычно очень быстро (в среднем за 90 минут фагоцитируются макрофагами либо соседними клетками, минуя развитие воспалительной реакции).

Морфология апоптоза. Условно деградацию погибающей клетки можно разделить на три последовательных фазы: высвобождения, блеббинга и конденсации. Деградация большинства клеток начинается с высвобождения прикреплений внеклеточного матрикса и реорганизации фокальной адгезии. Внутри погибающей клетки деполимеризуются микротрубочки цитоскелета. Внутриклеточные актиновые микрофиламенты реорганизуются в связанные с мембраной периферийные (кортикальные) кольцевые пучки. В итоге клетка приобретает округлую форму. Следующая за высвобождением стадия блеббинга характеризуется сокращением периферийных актиновых колец. В результате сокращений клеточная мембрана образует вздутия, клетка как бы «кипит». Процесс блеббинга энергозависим и требует большого количества АТФ. Фаза блеббинга в нормальных условиях завершается примерно через час. В итоге клетка фрагментируется на маленькие апоптотические тела, либо целиком конденсируется, округляясь и уменьшаясь в размерах.

Регуляция апоптоза. Белки семейства Bcl-2 являются основными регуляторами митохондриального пути апоптоза. Они оказывают решающее воздействие на изменение проницаемости наружной мембраны митохондрий (MOMP). В семействе Bcl-2 различают проапоптотические и антиапоптотические белки.

FLIP (FLICE-inhibitory protein – «белок, ингибирующий FLICE») – внутриклеточный ингибитор каспазы-8, блокирующий передачу сигнала апоптоза через рецепторы смерти. Роль FLIP является противоречивой, так как его сверхэкспрессия или ингибирует, или активирует апоптоз.

Белок p53. В нормальных клетках белок p53, как правило, находится в неактивной, латентной форме. Активация p53 происходит в ответ на повреждения ДНК, вызванные ультрафиолетовым или гамма-излучением, гиперэкспрессией онкогенов, вирусной инфекцией, оксидативным стрессом, гипогипертермией и др. Активированный p53 координирует процесс репарации ДНК, а также регулирует транскрипцию ряда генов-активаторов апоптоза в случае необратимых повреждений ДНК или нарушений регуляции клеточного цикла. К тому же имеются указания на то, что p53 принимает участие в запуске апоптоза путём стимуляции рецепторов смерти.

3 Онкоз.

Онкоз – форма клеточной гибели, при которой не происходит активации энергозависимого генетически детерминированного механизма саморазрушения клетки.

Механизм онкоза наиболее детально изучен на примере гипоксической гибели клеток. В патологии человека гипоксическая клеточная гибель явля-

ется весьма актуальной проблемой, поскольку данный тип гибели клеток определяет развитие инфаркта как широко распространённой формы некроза.

Фазы гипоксической гибели клетки.

1 фаза – компенсаторное накопление энергии и закисление внутриклеточной среды. Гипоксия, вызывая угнетение окислительного фосфорилирования, ведёт к дефициту макроэргических соединений в клетке. Гликолиз, несмотря на свою незначительную эффективность, на некоторое время компенсирует производство АТФ в клетке. Однако в ходе гликолиза в больших объёмах образуются органические кислоты, прежде всего лактат, что вызывает закисление внутриклеточной среды (интрацеллюлярный ацидоз).

Снижение внутриклеточного pH стабилизирует клеточные мембраны и способствует образованию гетерохроматина, вследствие чего ядро клетки уменьшается («сморщивается») и интенсивно воспринимает ядерные красители (гиперхромия, или гиперхроматоз). Стабилизация мембран и образование гетерохроматина являются компенсаторными процессами, т.к. ведут к снижению интенсивности обмена веществ в клетке вследствие инактивации мембранного транспорта и репрессии части генома. Это имеет важное значение для клетки в состоянии энергетического дефицита, поскольку, снижая интенсивность метаболизма, клетка сохраняет свои ресурсы и может более длительное время существовать в неблагоприятных условиях. Такой экономный режим даёт дополнительный шанс клетке для выживания.

2 фаза – декомпенсация энергопродукции и начало гидратации клетки. При прогрессировании гипоксии компенсаторный механизм синтеза макроэргов рано или поздно истощается. Прежде всего это обусловлено расходом запасённых ранее в клетке гликогена и липидов, а также прекращением поступления извне глюкозы и других энергетических субстратов. Восстановленная за счёт гликолиза концентрация АТФ вновь снижается.

Энергетический дефицит прежде всего сказывается на работе ионных каналов плазмалеммы, особенно Na-K-АТФазы. В результате недостаточной активности этих каналов клетка теряет калий и насыщается натрием, поступающим в протоплазму из интерстициального сектора по градиенту концентрации. Ионы натрия, в отличие от ионов калия, обладают значительно более высокой осмотической активностью (гидрофильностью). Вслед за натрием в клетку поступает вода, которая первоначально концентрируется в цистернах эндоплазматического ретикула.

Сморщенное в первой фазе онкоза ядро начинает расправляться и увеличиваться вследствие поступления в нуклеоплазму воды. Ядро становится более светлым, однако это происходит не за счёт эухроматинизации, а вследствие гидратации. Гетерохроматин распадается на мелкие глыбки и равномерно распределяется по территории ядра или концентрируется под кариолеммой (гиперхроматоз стенки ядра).

3 фаза – усиление гидратации клетки и появление видимых изменений в митохондриях. Если гипоксия не устранена, процессы повреждения в клетке переходят в качественно новую стадию, вовлекая митохондрии. Первым признаком гипоксического повреждения митохондрий является конденсация

(уплотнение) их матрикса. Межмембранное пространство расширяется, за счёт чего общий объём митохондрий остаётся прежним. Наиболее важная в функциональном отношении структура митохондрий – внутренняя мембрана – на этом этапе сохранна, поэтому при устранении гипоксии происходит полное восстановление жизнедеятельности клетки.

Помимо изменений в митохондриях, нарастает гидратация клетки, вакуоли продолжают увеличиваться. Клетка также увеличивается за счёт накопления в протоплазме воды. Прогрессирует дисфункциональное набухание ядра.

Первые три фазы гипоксической клеточной гибели являются обратимыми (паранекроз), несмотря на выраженные морфологические и функциональные отклонения. Это характеризует высокую степень прочности и надёжности конструкции биологических систем.

4 фаза – разрушение внутренней мембраны митохондрий. Данная фаза является стартом некробиоза – необратимого нарушения жизнедеятельности клетки. Ключевым событием становится деструкция митохондриальных эндомембран. Этому предшествует их набухание (гидратация) и образование в матриксе кристаллов кальция (кальциевые конкреции, микрокристаллические включения).

Прогрессирует гидропическая дистрофия и дисфункциональное набухание ядра. Крайняя степень выраженности гидропической дистрофии называется баллонной дистрофией. При этом вакуоли сливаются между собой. Увеличиваются также лизосомы, подвергающиеся интенсивной гидратации. Иногда цитоплазма приобретает «пенистый» вид из-за наличия множества тесно расположенных вакуолей.

5 фаза – массивное разрушение мембран и утрата наследственной информации. Клетка резко увеличена вследствие гидратации. Под влиянием гидростатического давления происходит разрыв мембран ядра и органелл. Высвобождающиеся при этом из лизосом гидролазы самоактивируются в кислой среде погибающей клетки и переваривают её содержимое, в том числе происходит ферментативное расщепление хроматина и уничтожение наследственной информации. Такое самопереваривание клетки под влиянием собственных лизосомальных гидролаз называется аутолизом.

Таким образом, основными изменениями ядра являются кариопикноз, гидратация (дисфункциональное набухание) и кариолиз; изменения митохондрий – конденсация матрикса, гидратация (набухание), образование кальциевых конкреций и деструкция мембран; изменения цистерн эндоплазматической сети и комплекса Гольджи – гидратация с формированием вакуолей, их слияние и разрушение; изменения лизосом – гидратация (набухание) и разрушение, сопровождающееся активацией кислых гидролаз и аутолизом клетки. Изменения цитоплазмы в целом характеризуются её базофилией, гидратацией и плазмолизом.

4 Некроз.

Некрозом как самостоятельной формой биологической деструкции называется разрушение ткани, т.е. комплекса клеток и межклеточного вещества (а не только клеток) в живом организме (*in vivo*). Так как при этом происходит гибель части многоклеточного организма, его иногда называют «местной смертью».

Нередко некроз ткани жизненно важного органа приводит к смерти организма. В других случаях смерть наступает на преднекротической стадии вследствие тяжёлых расстройств метаболизма повреждённой ткани.

Несмотря на то, что некроз развивается в ткани, образованной как клетками, так и межклеточным веществом, ключевым событием некроза является клеточная гибель (как в форме онкоза, так и апоптоза). Иногда в условиях патологии тканевая деструкция начинается с деградации межклеточного вещества, а позднее в процесс вовлекаются клетки.

Главными микроскопическими признаками некроза являются: потеря способности клеток и тканей избирательно окрашиваться; изменение ядер; изменение цитоплазмы; изменение межклеточного вещества.

Изменения ядер клеток. Ранние дегенеративные изменения сопровождаются уменьшением ядра и его гиперхромией (кариопикноз). Последующие изменения зависят от механизма клеточной гибели. Онкоз сопровождается гидратацией нуклеоплазмы и увеличением ядра, которое в тканевых срезах выглядит светлым за счёт отёка (набухание ядра). При апоптозе, напротив, происходит усиление кариопикноза. Изменения ядра клетки при некрозе завершаются его распадом, фрагментацией (кариорексис). Полное разрушение ядра обозначается термином «кариолизис» (кариолиз).

Изменения цитоплазмы. Изменения цитоплазмы зависят от формы гибели клеток. Апоптоз сопровождается уплотнением цитоплазмы вследствие дегидратации матрикса (коагуляция цитоплазмы), цитоплазма при этом окрашивается более интенсивно, объём её уменьшается. При пассивной гибели клетки, напротив, развивается прогрессирующий отёк (гидратация) гиалоплазмы и матрикса органелл. Гидратация цитоплазматических структур паренхиматозных клеток в патологии обозначается термином «гидропическая дистрофия», а резко выраженный отёк органелл (эндоплазматической сети, митохондрий, элементов комплекса Гольджи и т. п.) называется «баллонной дистрофией», или «фокальным колликационным некрозом клетки». Фрагментацию («глыбчатый распад») цитоплазмы принято обозначать термином «плазморексис», однако в полной мере плазморексис развивается только при апоптозе (фаза образования апоптозных телец). Разрушение цитоплазмы называется плазмолизисом.

Изменения межклеточных структур. При некрозе разрушаются также структуры экстрацеллюлярного матрикса (основное вещество и волокна). Наиболее быстро деполимеризуются протеогликаны (основное вещество волокнистой соединительной ткани), длительнее всего разрушаются ретикулярные (ретикулиновые) волокна. Коллагеновые волокна сначала увеличиваются за счёт отёка (набухают), затем разволокняются (разделяются на более тонкие нити) и разрушаются (коллагенолиз). Эластические волокна рас-

падают на отдельные фрагменты (эласторецис), после чего разрушаются (эластолиз).

Некроз не является только патологическим процессом, он происходит в ходе физиологической регенерации, например, в эпидермисе, слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта. Необратимые дистрофические изменения, предшествующие некрозу, называются некробиозом, а некробиоз, протекающий в течение длительного времени – патобиозом. Комплекс изменений ядра и цитоплазмы клетки, характеризующий состояние парабриоза, называется паранекрозом.

Причины, приводящие к некрозу, условно разделяются на экзогенные и эндогенные. Экзогенными причинами являются механическая травма, воздействие крайних температур, электрического тока, кислот, щелочей, ионизирующего излучения, солей тяжелых металлов, микроорганизмов и других повреждающих факторов. Из числа эндогенных причин некроза выделяют нарушение сосудистого, нейрогуморального, аллергического и метаболического характера.

Различают прямой некроз, обусловленный непосредственным действием повреждающего (производящего фактора), и непрямого, возникающего опосредованно через сосудистую, нервную и эндокринную системы.

В основе изменений, развивающихся в очаге некроза, лежит угасание анаболических и нарастание катаболических процессов. При этом наблюдается разобщение дыхания и фосфорилирования, перераспределение ионов, денатурация и коагулирование белка, исчезновение гликогена, инактивация ферментов, а в ряде случаев под влиянием ферментов микроорганизмов происходит разрушение клеточных структур и последующее удаление продуктов распада.

Некроз может возникать как клеточная патология и как тканевая реакция. В клетке этот процесс может быть связан с патологией митоза или наступает в период между делениями, как тканевая реакция, некроз включает в себя не только гибель клеток; он характеризуется также отграничением (демаркацией) и ликвидацией последствий омертвления.

Некротизированная ткань теряет характерную структуру, клетки ее распадаются, а их остатки подвергаются фагоцитозу; коллагеновые и эластические волокна набухают, гемолизуются, разрушаются. Участки некроза пропитываются кровью, происходит их инфильтрация лейкоцитами и макрофагами.

В процессе развития некроза различают **три стадии**:

1. Преднекроза – состояние органа, ткани. Клетки до появления необратимых изменений (некробиоз).
2. Гибели – необратимое прекращение жизнедеятельности тканей.
3. Деструктивные изменения – распад, удаление, отграничение остатков.

Классификация некроза построена с учетом стадии процесса, особенностей его возникновения (первичный, вторичный), распространенности (очаговый, тотальный), клинической картины и др. факторов.

Отличия апоптоза и некроза:

а) распространенность: некроз может захватывать территорию от части клетки до целого органа, апоптоз распространяется только на отдельные клетки или их группы;

б) апоптоз контролируется генетически (синтез антионкогена p53 приводит к активации апоптоза), некроз – нет;

в) биохимически: при апоптозе разрушение ядра происходит с участием специальных эндонуклеаз, расщепляющих ДНК с образованием однотипных по размерам фрагментов, а в цитоплазме никогда не активируются гидролитические ферменты;

г) морфологически: апоптоз – конденсация и маргинация хроматина, изрезанность контуров ядра, образование апоптозных телец, связанных цитоплазматическими отростками и их фагоцитоз; некроз – неупорядоченный распад хроматина, набухание органелл и фокусы разрушения мембран, аутолиз клетки под действием гидролитических ферментов;

д) на апоптоз реакция воспаления отсутствует, на некроз – присутствует.

Тема 15 Клеточная гибель у растений

1 Апоптоз при индивидуальном развитии.

2 Реакции на патоген и стрессовые воздействия.

3 Механизмы апоптоза у растений.

Смерть клетки – итог каскада метаболических событий, запускаемого сигналами. Идентифицированы два типа гибели клеток: некроз и программируемая клеточная смерть (ПКС). В отличие от некроза ПКС запрограммирована генетически, требует синтеза белков и энергообеспечения. Существуют три формы ПКС: апоптоз, маркерами которого являются образование апоптозных телец, активация каспаз и олигонуклеосомная фрагментация ДНК, аутофагия, характеризующаяся участием гидролитических ферментов лизосом и вакуолей, и автолиз, при котором происходит разрыв тонопласта вакуоли клетки растений и высвобождение ее содержимого в цитоплазму.

У растений ПКС наблюдается в онтогенезе и при защитной реакции растений, определяющей их устойчивость к патогену, – гиперчувствительном ответе (ГО). Клетки некоторых тканей и органов растений в определенный период развития погибают. В ряде случаев это способствует формированию специализированных тканей. ПКС в онтогенезе происходит при деградации алейронового слоя в семенах, образовании аэренхимы в корнях растений, формировании ксилемы и флоэмы, формировании листовых пластинок, опадании листьев и плодов. ПКС сопровождает репродукцию растений.

1 Апоптоз при индивидуальном развитии.

В ходе онтогенеза ПКС у растений наблюдается в различных тканях.

Прорастание пыльцевой трубки. Этот процесс осуществляется в результате гибели клеток на пути прорастающей пыльцевой трубки, зависит от видовой принадлежности пыльцы и не включается при действии чужеродной пыльцы.

Соматический эмбриогенез. В суспензионных культурах клеток некоторых видов растений индуцируется соматический эмбриогенез: из одиночных клеток можно вырастить взрослые растения – свойство тотипотентности растений. Тотипотентные клетки делятся асимметрично на две клетки, одна из которых останавливает синтез ДНК и погибает с признаками ПКС, тогда как другая, продолжая развиваться, формирует эмбрионид, выполняющий функцию зародыша.

Алейроновые клетки. В семенах однодольных растений имеется слой алейроновых клеток. При прорастании семян эти клетки секретируют ферменты, катализирующие гидролиз запасных полимеров эндосперма, и обеспечивают тем самым питание проростка. Будучи ненужными для последующего развития, алейроновые клетки погибают по завершении прорастания. По некоторым признакам их гибель имеет характер ПКС. Ядерная ДНК расщепляется на олигонуклеосомальные фрагменты, процесс стимулируется гибберелловой и блокируется абсцизовой кислотой.

Клетки корневого чехлика. Эти клетки защищают меристему корня при его росте. Программа гибели этих клеток включается даже при выращивании растений гидропонным способом.

Формообразование листьев. Очертания листьев у многих растений, по-видимому, формируются через механизм ПКС. Так, места перфораций, наличие лопастей у листьев растений из семейства Аронниковые определяются зонами гибели клеток на ранних стадиях развития.

Образование ксилемы и флоэмы. Элементы сосудов ксилемы – это останки специализированных клеток, дифференцировка которых может быть вызвана фитогормонами (комбинацией ауксина и цитокинина) или механическим травмированием растения. Дифференцировка состоит в удлинении клеток, значительном (вторичном) утолщении клеточных стенок и их лигнификации для придания прочности и жесткости. Конечный этап дифференцировки – клеточная смерть. Вначале разрывается тонопласт – мембрана вакуоли, содержащей гидролитические ферменты. Вслед за этим подвергаются автолизу ядро и клеточные органоиды. Ядро разрушается без предварительной конденсации хроматина и фрагментации на отдельные части. Исчезают также торцевые части клеточных стенок, и из отдельных оставшихся цилиндрических элементов клеточных стенок, расположенных последовательно, у интактных растений формируются длинные трубки проводящей системы. Главный компонент флоэмы – ситовидная трубка, представляющая собой колонку из живых цилиндрических клеток. Клеточные стенки на торцевых участках содержат отверстия, через эти отверстия клетки-цилиндры сообщаются друг с другом. Клетки, входящие в состав ситовидной трубки, утрачивают ядра, но сохраняют плазматическую мембрану, цитоплазму. Они метаболически активны. Эти клетки растений подобны безъядерным, метаболизирующим

клеткам животных – эритроцитам и эпителиальным клеткам глазного хрусталика.

Старение листьев. Лист – специализированный орган, осуществляющий фотосинтез, транспирацию и газообмен. Продолжительность жизни листа несколько месяцев, у вечнозеленых растений больше года. После этого фотосинтетически продуктивного периода наступает старение листа. Этот процесс включает гидролиз полимеров клеток и активный отток из листа мономеров и минеральных солей для использования в других органах. Старение листьев – генетически регулируемый процесс, зависимый от экспрессии *sag*-генов (*senescence-associated genes* – генов, связанных со старением). Конечная стадия процесса – апоптозное разрушение ДНК с образованием олигонуклеосомальных фрагментов. Этилен стимулирует экспрессию ряда *sag*-генов, некоторые из которых, судя по их нуклеотидной последовательности, кодируют цистеиновые протеазы. Старение листьев тормозится цитокининами. Какова роль ПКС в стареющем (отмирающем) листе? Она может быть связана с предотвращением заражения и последующего распространения патогена в функционально активные органы растения. Таким образом, роль ПКС сводится к установке барьера для инфекционного возбудителя, что не может быть реализовано при некротической гибели клетки.

Опадание листьев и созревших плодов. Эти процессы сопровождаются избирательной гибелью клеток отделительной зоны, расположенной между основанием черешка листа или плода и стеблем, которая активируется благодаря экспрессии *sag*-генов. Клетки в отделительном слое секретируют ферменты, разрушающие клеточные стенки (пектиназы и целлюлазы). Локально действуя на определенный участок, ферменты частично растворяют клеточные стенки в отделительном слое, а сами клетки отделительного слоя подвергаются автолизу, клеточные полимеры распадаются, и черешок отваливается от стебля.

2 Реакции на патоген и стрессовые воздействия.

Устойчивость растения к патогену определяется способностью распознать его и своевременно включить механизм защиты. Наряду с индукцией синтеза фитоалексинов (растительных антибиотиков) и гидролитических ферментов, растворяющих полимерные соединения патогена, в частности хитиназы, к таким механизмам относятся активация в инфицированных клетках и клетках, локализованных вблизи очага инфекции, программы собственной гибели – процесс, называемый гиперчувствительным ответом (ГО). Образуется зона мертвых обезвоженных клеток, которая служит барьером для дальнейшего распространения патогена. ГО – ответ растений на патогенные вирусы, бактерии, грибы и нематоды. При этом гибель клеток растений вызвана не прямым деструктивным действием патогена, а активацией патогеном генетической программы гибели растительной клетки.

Патоген, который вызывает ГО, называется авирулентным, а растение-мишень авирулентного патогена – резистентным (устойчивым) к патогену. Напротив, патоген, который, проникнув в клетки растения, размножается и

распространяется дальше, выходя за пределы начального участка инфекции, называется вирулентным, а растение-мишень – чувствительным к патогену.

Зачастую ГО ведет к системной приобретенной устойчивости (СПУ). СПУ – повышенная устойчивость растения к повторной атаке тем же самым или иным, даже неродственным патогеном. Такой иммунитет, обусловленный экспрессией антимикробных белков, обеспечивает долговременную (недели, месяцы) защиту всего организма (системную защиту) от широкого спектра патогенов, включая вирулентные формы. Развитие СПУ коррелирует с экспрессией ряда защитных генов, в том числе PR-генов (pathogenesis-related genes – генов, связанных с патогенезом). Салициловая кислота – природное соединение, участвующее в передаче сигнала для СПУ, индуктор экспрессии PR-генов.

Время, характерное для развития полной картины ГО, зависит от многих параметров и варьирует от десятков минут до нескольких суток. СПУ развивается за 1–2 недели. На попытку вторжения авирулентных патогенов, идентифицируемых с помощью рецепторов плазматической мембраны, клетки растений отвечают окислительным (дыхательным) взрывом – образованием активных форм кислорода (АФК).

Первичная форма АФК – супероксидный анион-радикал $O_2^{\cdot-}$, главным источником которого является NADPH-оксидаза плазматической мембраны, подобная таковой у макрофагов и нейтрофилов млекопитающих, которые с помощью АФК убивают вторгшиеся в организм микробные клетки, пожирают и переваривают их.

Из $O_2^{\cdot-}$ происходит образование H_2O_2 , катализируемое ферментом супероксиддисмутазой: $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O$. $O_2^{\cdot-}$ в клетках растений образуется также с участием пероксидаз клеточной стенки. Обычно пероксидазы катализируют разложение H_2O_2 : $H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2H_2O + A$, где AH_2 – донор электронов (NADH, NADPH, аскорбат, цистеин, глутатион).

В условиях защелачивания внеклеточной среды, которое происходит при узнавании патогена клеткой, одноэлектронное окисление NADH с участием пероксидаз ведет к образованию радикалов $NAD^{\cdot}$, самопроизвольно окисляющихся O_2 с образованием $O_2^{\cdot-}$: $NAD^{\cdot} + O_2 \rightarrow NAD + O_2^{\cdot-}$. H_2O_2 образуется с участием оксалаксоксидазы ($HOOC-COOH + O_2 \rightarrow 2CO_2 + H_2O_2$), аминок- и полиаминоксоксидазы, ксантин- и альдегидоксидазы. $O_2^{\cdot-}$ образуется при окислении NAD^+ -зависимых субстратов или сукцината в дыхательной цепи митохондрий. При дефиците $NADP^+$ значительное количество $O_2^{\cdot-}$ образуется фотосинтетической цепью переноса электронов в хлоропластах. Источником АФК являются также пероксисомы.

На следующем этапе взаимодействия клетки с авирулентным патогеном в ход вступают АФК. АФК, генерируемые клеткой-мишенью, оказывают губительное действие на инфекционного возбудителя. Эффект оказывает не $O_2^{\cdot-}$ и даже не H_2O_2 . Очень опасным окислителем является продукт одноэлектронного восстановления H_2O_2 , гидроксильный радикал $OH^{\cdot}$. Высокая окислительная активность и радикальная природа позволяют $OH^{\cdot}$ без разбора окислять любые органические соединения, включая ДНК, белки и липиды.

Наиболее простой способ генерации $\text{OH}^\bullet$ – реакция Фентон: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^+) \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}(\text{Cu}^{2+})$; $\text{Fe}^{3+}(\text{Cu}^{2+}) + \text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^+) + \text{O}_2$. Однако концентрация $\text{OH}^\bullet$ невелика, да и время жизни $\text{OH}^\bullet$ слишком мало, около 10^{-9} с. Необходимо повысить надежность, чтобы обезопасить растение от вторжения патогена. Поэтому дальнейшие события разворачиваются на уровне клеточной стенки.

Клеточная стенка имеет сложное строение. Клеточная стенка растений состоит из полисахаридов (целлюлозы, гемицеллюлоз, пектинов), лигнина (главный структурный элемент этого полимера – производные фенилпропана) и структурных белков.

H_2O_2 , окисляя остатки тирозина (при этом образуются свободные радикалы остатков тирозина) в белках клеточной стенки, вызывает их сшивку с образованием дитирозиновых мостиков. АФК вызывают также перекрестную сшивку остатков фенольных соединений, входящих в состав лигнина, а также сшивку полисахаридов, этерифицированных производными фенола. Все это значительно увеличивает прочность клеточной стенки, создает физический барьер для патогена, пытающегося проникнуть в клетку.

Если принятые меры оказываются недостаточными, включается последний эшелон защиты организма от патогена – ГО. АФК играют важную роль в проявлении ГО: а) антиоксиданты подавляют его развитие, б) ГО усиливается у трансгенных растений, обладающих низкой активностью каталазы (катализирующей реакцию $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). В этой связи следует отметить значение салициловой кислоты, которая помимо функции сигнального соединения – индуктора СПУ выполняет и другую функцию – является ингибитором каталазы.

Эффективность АФК в качестве индукторов ГО значительно усиливается NO. У животных NO синтезируется с участием фермента NO-синтазы в реакции: аргинин + $\text{O}_2 \rightarrow$ цитруллин + NO. У растений ген, кодирующий NO-синтазу, не идентифицирован. Существуют альтернативные пути образования NO – через восстановление в фотосинтетической цепи переноса электронов в хлоропластах и дыхательной цепи митохондрий. Развитие ГО сопровождается зависимым от АФК увеличением содержания Ca^{2+} в клетках. Блокирование транспорта Ca^{2+} подавляет ГО.

В природных условиях на растения оказывают влияние разнообразные физико-химические факторы. Наиболее чувствительны к этим воздействиям белки, большинство из которых обладает каталитической функцией, то есть относится к ферментам. Слаженность в действии ферментов, наблюдаемая в нормальных условиях жизнеобеспечения клетки, нарушается при выключении отдельных реакций метаболизма в результате денатурации ферментов, катализирующих эти реакции.

Денатурация – это изменение пространственной укладки белковой молекулы, ее конформации, третичной и четвертичной структуры. Вот иллюстрация на примере дисульфидных связей. Предположим, что в нативной молекуле фермента имеются три дисульфидные связи: $-\text{S}_1-\text{S}_2-$, $-\text{S}_3-\text{S}_4-$ и $-\text{S}_5-\text{S}_6-$. Нагревание или другое воздействие приводит к разрыву этих связей. По-

сле прекращения воздействия связи могут быть восстановлены в прежнем порядке. Но порядок может быть нарушен, вместо прежних могут быть образованы иные дисульфидные мостики: –S1–S6–, –S2–S3– и –S4–S5–. Активность фермента при такой укладке молекулы может быть потеряна. Поэтому в клетке имеются специальные белки, называемые молекулярными шаперонами и шаперонинами, которые регулируют разворачивание и сворачивание белковых молекул, осуществляют ренатурацию белков. Их еще называют белками теплового шока, поскольку впервые они были обнаружены при действии повышенных температур.

Однако вернуться к прежней конформации удастся не всегда. Так бывает с высокомолекулярными белками куриного яйца, сваренного вкрутую. В живой клетке на белки, подвергшиеся необратимой денатурации, навешиваются метки из особого низкомолекулярного белка – убиквитина, тоже относящегося к белкам теплового шока. Убиквитинированные белки затем подвергаются АТФ-зависимому гидролизу до пептидов и отдельных аминокислот в специальных структурах клетки, называемых протеасомами. Если денатурированных белков в клетке образовалось много и жизнедеятельность клетки вследствие этого не может быть продолжена, включается механизм апоптоза со всеми признаками, характерными для этого процесса. Апоптоз продемонстрирован при различных воздействиях, включая засоление, УФ-облучение, отравление цианидом.

Особого рассмотрения заслуживает ПКС при затоплении растений, когда возникают трудности с доставкой кислорода. Образуется специальная ткань, называемая аэренхимой. Это адаптивная реакция растений на дефицит кислорода, заключающаяся в образовании полостей в корнях и у основания стебля, заполненных воздухом, за счет элиминации некоторых клеток с полным разрушением клеточных стенок с участием активирующихся гидролитических ферментов.

3 Механизмы апоптоза у растений.

Запуск программы клеточной гибели осуществляется в несколько этапов. На первом этапе клетка получает сигнал, инициирующий ПКС. Такие сигналы могут быть как внутриклеточные, так и внеклеточные (сигнализация на уровне организма). Сигнал передается в ядро при участии протеинкиназ, которые активируют транскрипционные факторы, вызывающие экспрессию генов и запуск механизмов, осуществляющих ПКС. Распад клетки – итог ПКС.

Внеклеточные сигналы представлены, прежде всего, фитогормонами. Фитогормон **этилен** участвует в опадании листьев, созревании и опадании плодов. Обработка этиленом вызывала гибель клеток эндосперма злаковых и формирование аэренхимы в корнях кукурузы. У мутантов *Arabidopsis thaliana* экзогенный этилен усиливал АФК- и токсининдуцированную ПКС. При этом наблюдалось усиление генерации АФК. По своим признакам этилениндуцированная смерть клеток (межнуклеосомная фрагментация ДНК, образование апоптозных телец) соответствует апоптозу. В клетках *A. thaliana* об-

наружено пять различных этиленовых рецепторов, расположенных транс-мембранно. Передача сигнала происходит, вероятно, с помощью МАР-киназного (mitogen-activated protein kinase) каскада.

Цитокинины подавляют пролиферацию клеток и индуцируют ПКС. Цитокинин N⁶-бензиламинопурин вызывал программируемую гибель клеток моркови и *A. thaliana*, детектируемую по конденсации хроматина, олигонуклеосомной деградации ДНК и выходу из митохондрий в цитоплазму цитохрома с. Действие цитокининов может быть связано с активацией ими синтазы 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты, являющейся предшественником этилена, хотя возможно наличие иных путей регуляции ПКС цитокининами.

Ауксин стимулировал ПКС в проростках табака. Ингибитор транспорта ауксина в клетки 2,3,5-трийодобензоат подавлял гибель клеток. Наблюдалась ауксинзависимая фрагментация ядерной ДНК. Предполагается, что действие ауксина связано с активацией синтеза этилена, поскольку ингибиторы синтеза этилена AgNO₃ и аминоксисацетат предотвращали ПКС в проростках. Однако ауксин подавлял олигонуклеосомную фрагментацию ДНК в клетках моркови, индуцированную цитокинином, а также предотвращал активацию индуцированного H₂O₂ МАР-киназного каскада в клетках листьев *A. thaliana*, способствующего запуску ПКС.

Абсцизовая кислота – регулятор развития эндосперма злаковых. Наблюдается стимуляция ПКС в эндосперме мутантов кукурузы, нечувствительных к абсцизовой кислоте или синтезирующих ее в низких концентрациях. Предполагается, что баланс между абсцизовой кислотой и этиленом регулирует инициацию ПКС в эндосперме. Абсцизовая кислота защищает клетки от ПКС при формировании пыльника у ячменя в андрогенезе, предотвращает гибель клеток и олигонуклеосомную фрагментацию ДНК, вызванную обработкой цитокинином.

При прорастании семян ПКС алеироновых клеток индуцируется **гиббереллином**, тогда как абсцизовая кислота подавляет клеточную гибель. Показано, что эта фитогормональная регуляция опосредована АФК. Вероятно, гиббереллин снижает антиоксидантную защиту клеток растений.

Жасмоновая кислота является сигнальным соединением, синтезирующимся при ГО. Жасмоновая кислота и метилжасмонат – конечные продукты липоксигеназного сигнального пути. Жасмоновая кислота стимулирует гибель протопластов *A. thaliana*, вызванную грибным токсином фумонизином В1. Однако метилжасмонат ингибирует озониндуцированную ПКС у мутантов *A. thaliana*. Предполагается, что жасмоновая кислота снижает продукцию АФК, индуцированную озоном. Таким образом, жасмонат в различных условиях может быть как позитивным, так и негативным регулятором программируемой гибели.

Салициловая кислота, как и индуцирующий ее образование H₂O₂, является одним из главных сигнальных соединений при ГО. Выявлено, что одна из двух МАР-киназ, вовлеченных в ГО клеток табака, индуцируется салициловой кислотой. Показана аккумуляция салициловой кислоты в клетках,

окружающих место заражения патогеном. У трансгенных растений, не синтезирующих салицилат, снижался уровень гибели клеток, индуцируемой O_3 или элиситорами патогенов. ПКС, индуцированная токсином гриба фумонизином В1, опосредована накоплением в клетках салициловой кислоты. Интересно, что салициловая кислота является ингибитором каталазы и пероксидаз, обеспечивающих защиту клетки от АФК.

Элиситоры – сигнальные молекулы различной природы, индуцирующие ПКС при ГО. В основном это вещества, входящие в состав клеточной стенки, мембран патогена или экскретируемые патогенными бактериями и грибами. Белки оболочки отдельных вирусов тоже обладают элиситорными свойствами. Элиситоры могут образовываться при ферментативном расщеплении кутикулы и полисахаридов клеточных стенок самих растений. К элиситорам относятся арахидоновая и эйкозапентаеновая кислоты, хитозаны, элиситины (небольшие пептиды, продуцируемые *Phytophthora* и *Pythium*, например, криптогеин), харпины (бактериальные белковые элиситоры), декстрины, называемые олигосахаридами (продукты гидролиза клеточных стенок растения, состоящие из нескольких остатков глюкозы).

CN^- не является чужеродным для растений. Многие растения (клевер, вишня, слива, маниок и др.) содержат цианогенные гликозиды, защищающие их от фитопатогенов.

У растений CN^- образуется:

- а) при деградации цианогенных гликозидов;
- б) при окислении 1-аминоциклолпропан-1-карбоновой кислоты на конечном этапе биосинтеза этилена, при этом образуются этилен, HCN и CO_2 .

В клетках растений CN^- подавляет фотосинтетический и дыхательный (с участием цитохромоксидазы) перенос электронов, снижает активность каталазы и пероксидаз – ферментов, осуществляющих деградацию H_2O_2 . CN^- вызывает ПКС у растений.

Внутриклеточные сигналы. Сигналы, запускающие ПКС, поступают не только извне. Так, необратимые нарушения вторичной структуры белков клетки инициируют программу гибели. Денатурация белков вызывается тепловым, окислительным и солевым воздействиями, тяжелыми металлами, мутациями и нарушениями в системе экспрессии генов.

Появление в клетке денатурированных белковых молекул активирует синтез особых белков – белков теплового шока (Hsp, heat shock proteins), к которым относят шапероны – семейство белков, восстанавливающих структуру денатурированных белков клетки. Показано, что Hsp 70, Hsp 90 и Hsp 27 являются ингибиторами апоптоза у животных. Нарушение вторичной структуры белков в клетке вызывает образование их комплексов с Hsp – шапероны восстанавливают правильную пространственную укладку белковых молекул. В связанном состоянии Hsp не могут подавлять апоптоз, и клетка погибает.

Тепловой шок у растений запускает ПКС. ПКС, вызванная тепловой обработкой клеток табака, сопровождается усилением генерации АФК. При этом в клетках уменьшается активность аскорбатпероксидазы и нарушается работа митохондриальной электрон-транспортной цепи (ЭТЦ). Белки тепло-

вого шока предотвращают деградацию клеток растений и их компонентов. Снижение экспрессии гена белка Hsp 70, локализованного в хлоропластах одноклеточной водоросли хламидомонады, повышало чувствительность фотосистемы (ФС) II к разрушительному действию интенсивного света, а сверхэкспрессия защищала ФС II от фотоингибирования. Мутация хлоропластного шаперонина 60β у *A. thaliana* вызывала ПКС.

Нарушения структуры ДНК, например, при УФ-облучении, вызывают ПКС у животных и растений. При повреждении ДНК в клетке животных активируется продукт гена p53. Хотя у растений не обнаружено гомолога p53, нельзя исключить наличие у них p53-подобного или альтернативных путей индукции ПКС. Стареющие семена прорастают медленнее молодых. Это обусловлено задержкой в фазе G1 клеточного цикла. В стареющих семенах уровень повреждений ДНК выше, поэтому задержка при их прорастании может быть вызвана активацией белка, подобного p53, приостанавливающего клеточный цикл и запускающего системы репарации. Пролиферация клеток в семемах запускается после починки поврежденной ДНК. Ультрафиолет (УФ), вызывающий повреждения ДНК, индуцирует ПКС у *A. thaliana*, при которой наблюдается олигонуклеосомная фрагментация ДНК и участие каспазоподобных протеаз.

Передача сигнала. Идентифицированы системы, передающие сигнал в ядро клетки, что вызывает активацию факторов транскрипции и экспрессию генов. Выявлено участие аденилатциклазной, MAP-киназной, фосфатидной, кальциевой, липоксигеназной, NADPH-оксидазной, NO-синтазной, зависящей от H⁺-помп сигнальных систем при ГО. Очевидно, в той или иной степени эти системы задействованы в ПКС. Считается, что наиболее важную роль в ПКС у растений играют кальциевая, липоксигеназная, NADPH-оксидазная, NO-синтазная и MAP-киназная системы.

Кальциевая сигнальная система активируется при повышении концентрации Ca²⁺ в цитоплазме. Поступающий в клетку сигнал воспринимается рецептором. Связанный с ним регуляторный G-белок активирует фосфолипазу C, которая катализирует гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата в плазматической мембране с образованием диацилглицерола и инозитол-1,4,5-трифосфата. Инозитолтрифосфат вызывает мобилизацию Ca²⁺ из внутриклеточных депо и из межклеточного пространства в цитоплазму. Накопление Ca²⁺ в цитоплазме может стимулироваться АФК. Ca²⁺ влияет на активность различных белков: у *A. thaliana* обнаружено около 250 белков, имеющих хотя бы одну Ca²⁺-связывающую аминокислотную последовательность. Диацилглицерол и повышение концентрации Ca²⁺ активирует протеинкиназу C, которая наряду с Ca²⁺-зависимыми протеинкиназами вызывает активацию факторов транскрипции и экспрессию генов, инициирующих ПКС.

Действие **липоксигеназной сигнальной системы** характеризуется окислением полиненасыщенных жирных кислот. Различные сигналы активируют фосфолипазу A₂, катализирующую высвобождение жирных кислот из мембранных фосфолипидов. Ненасыщенные жирные кислоты являются субстратами для α-диоксигеназы, пероксидаз и липоксигеназ, окисляющих их.

Окисление жирных кислот может осуществляться АФК. В результате окисления образуются гидроперекиси жирных кислот. Некоторые из них (оксипирины, например фитостерол, α -кетол, γ -кетол, травматиновая кислота, фитодиеновая кислота) играют роль клеточных метаболитов, регулирующих экспрессию генов. Из фитодиеновой кислоты могут синтезироваться жасмоновая кислота и метилжасмонат.

Основным метаболитом **NADPH-оксидазного сигнального** пути, включающегося, например, при ГО, является H_2O_2 . При ГО запускается каскад реакций, приводящий к гибели клетки, а также к образованию сигнальных соединений (H_2O_2 , салициловая кислота), активирующих различные защитные процессы в соседних клетках. Этот каскад включает вход в клетку Ca^{2+} и H^+ и выход K^+ и Cl^- . Увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клетки вызывает активацию NADPH-оксидазы плазматической мембраны. Большая субъединица NADPH-оксидазы имеет две регуляторные Ca^{2+} -связывающие аминокислотные последовательности. Кроме того, существует непрямая активация кальцием NADPH-оксидазы: Ca^{2+} активирует кальций-зависимую протеин-киназу (CDPK), индуцирующую NADPH-оксидазу; Ca^{2+} -связывающий белок кальмодулин активирует NAD-киназу, катализирующую превращение NADH в NADPH – субстрат NADPH-оксидазы. Важную роль в регуляции NADPH-оксидазы играет регуляторный GTP-связывающий G-белок Rac.

Активация NADPH-оксидазы вызывает образование АФК – супероксидного аниона-радикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$) и H_2O_2 . Образование H_2O_2 может идти и при участии пероксидазы клеточной стенки. При этом снижается экспрессия генов ферментов, утилизирующих H_2O_2 – аскорбатпероксидазы и каталазы.

H_2O_2 при ГО действует: а) как сигнальное соединение, вызывающее гибель клеток растений и экспрессию генов устойчивости к патогену; б) как антисептик по отношению к патогену; в) как соединение, вызывающее упрочнение клеточных стенок в месте заражения (механический барьер для патогена, препятствующий его проникновению). Увеличение прочности клеточных стенок происходит за счет окисления пероксидом остатков тирозина в белках клеточной стенки и остатков фенольных соединений, входящих в состав лигнина, что вызывает их перекрестную сшивку.

NADPH-оксидазная сигнальная система тесно связана с кальциевой и MAP-киназной системами передачи сигнала. Возможна непосредственная регуляция различных ферментов и факторов транскрипции пероксидом водорода. Окисление SH-группы остатка цистеина с помощью $\text{O}_2^{\cdot-}$ или H_2O_2 может приводить к изменению конформации, образованию дисульфидных мостиков и сшивке белков. Обычно такие изменения переводят ферменты в неактивное состояние, но есть белки, активность которых повышается при окислении. Важную роль в NADPH-оксидажном сигнальном пути играет салициловая кислота, ее концентрация в клетке при действии элиситоров или H_2O_2 возрастает в десятки раз.

NO, образующийся из аргинина при активации NO-синтазы элиситорами патогенов, может играть роль сигнальной молекулы, вызывая синтез фи-

тоалексинов и защитных белков. Предполагается, что передача сигнала в ядро происходит при активации оксидом азота гуанилатциклазы, которая катализирует образование cGMP из GTP. cGMP может активировать кальциевые каналы, повышая концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме, а также являться индуктором некоторых протеинкиназ, регулирующих экспрессию генов. NO способен нитрозировать глутатион, низкомолекулярный антиоксидант, и различные белки. S-нитрозирование глутатиона и белков может регулировать активность клеточных ферментов и транскрипцию генов. Оксид азота способен влиять на активность редокс-чувствительных факторов транскрипции и ряда ферментов.

Митохондрии играют важную роль в ПКС у растений. Несмотря на различия, в структуре, митохондрии растений, подобно митохондриям животных, способны генерировать АФК. Зарегистрировано усиление митохондриального транспорта электронов и генерации АФК при ПКС у *A. thaliana*, вызванной окислительным стрессом.

Альтернативная оксидаза (АО) является антиоксидантным ферментом – повышение уровня АФК в клетках растений стимулирует перенос электронов с участием АО. Пока не ясно, является ли высвобождение цитохрома c ключевым событием в ПКС у растений, запускающим гибель клеток, или же это – лишь результат деградации митохондрий в конечной стадии ПКС.

Хлоропласты также являются источниками активных форм кислорода, причем образование АФК в них значительно выше, чем в митохондриях. Синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) образуется в хлоропластах на свету – возбужденный хлорофилл, переходя в триплетное состояние, может взаимодействовать с кислородом, образуя $^1\text{O}_2$. Порфириновые интермедиаты, образующиеся при биосинтезе хлорофилла, и продукты распада хлорофилла обладают свойствами фотосенсибилизаторов, способных генерировать АФК в клетках. O_2^- образуется при одноэлектронном восстановлении кислорода компонентами ЭТЦ хлоропластов, преимущественно ФСII (Fe-S-центрами $\text{F}_{x,a,b}$). Кроме того, образование O_2^- может идти при участии ферредоксина и ферредоксин-NADP⁺-редуктазы. На восстановление O_2 до O_2^- может быть мобилизовано до 30 % электронного потока в ЭТЦ хлоропластов.

Когда пул ферредоксина перевосстановлен, становится возможной передача электронов от ФСII на кислород с образованием супероксидрадикала O_2^- . Этот процесс получил название реакции Мелера. Супероксидрадикал может восстанавливать ионы металлов, такие, как Fe^{3+} и Cu^{2+} (M^{n+}): $\text{O}_2^- + \text{M}^{n+} \rightarrow \text{O}_2 + \text{M}^{(n-1)+}$.

Супероксиддисмутаза катализирует дисмутацию O_2^- с использованием двух протонов, в результате чего образуются H_2O_2 и O_2 : $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$.

Ионы металлов, восстановленные супероксидом, реагируют с перекисью водорода с образованием гидроксил-радикала: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{M}^{(n-1)+} \rightarrow \bullet\text{OH} + \text{M}^{n+}$.

$\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 и $\bullet\text{OH}$ называют активными формами кислорода (АФК).

Гидроксил-радикал ($\bullet\text{OH}$) представляет из себя очень реакционноспособное соединение, повреждающее ферменты и липиды путем их окисления. Растительная клетка лишена каких бы то ни было защитных ферментов для ликвидации $\bullet\text{OH}$. Поэтому, чтобы не допустить восстановления ионов металлов, происходит быстрая элиминация $\bullet\text{O}_2^-$ при участии супероксиддисмутазы.

АФК, генерируемые в хлоропластах на свету, активируют экспрессию генов антиоксидантной защиты клеток. Также показано, что редокс-состояние пластохинона ЭТЦ хлоропластов регулирует экспрессию генов путем активации протеинкиназ. Структурное и функциональное сходство хлоропластов с митохондриями, высокая способность к образованию АФК и светозависимая регуляция экспрессии ядерных генов — предпосылки значимой роли хлоропластов в ПКС.

Тема 16 Молекулярные механизмы канцерогенеза

- 1 Общие сведения о канцерогенезе.
- 2 Канцерогены.
- 3 Молекулярно-генетические основы онкогенеза.
- 4 Общая схема онкогенеза.

1 Общие сведения о канцерогенезе.

Канцерогенез — сложный многоэтапный процесс, глубокая реорганизация нормальных клеток организма. Из всех предложенных к настоящему моменту теорий канцерогенеза, мутационная теория заслуживает наибольшего внимания. Согласно этой теории, опухоли являются генетическими заболеваниями, патогенетическим субстратом которых является повреждение генетического материала клетки (точечные мутации, хромосомные aberrации и т.п.). Повреждение специфических участков ДНК приводит к нарушению механизмов контроля за пролиферацией и дифференцировкой клеток и, в конце концов, к возникновению опухоли.

Генетический аппарат клеток обладает сложной системой контроля деления, роста и дифференцировки клеток. Изучены две регулирующие системы, оказывающие кардинальное влияние на процесс клеточной пролиферации.

Протоонкогены — это группа нормальных генов клетки, оказывающих стимулирующее влияние на процессы клеточного деления, посредством специфических продуктов их экспрессии. Превращение протоонкогена в онкоген (ген, определяющий опухолевые свойства клеток) является одним из механизмов возникновения опухолевых клеток. Это может произойти в результате мутации протоонкогена с изменением структуры специфического продукта экспрессии гена, либо же повышением уровня экспрессии протоонкогена при мутации его регулирующей последовательности (точечная мутация) или при переносе гена в активно транскрибируемую область хромосомы

(хромосомные aberrации). На данный момент наиболее изучена канцерогенная активность протоонкогенов группы *ras* (HRAS, KRAS2).

Ras – семейство генов, а также белки, которые они кодируют – так называемые малые G-белки (малые ГТФазы). Семейство генов RAS (Retrovirus Associated DNA Sequences) включает 3 гена: KRAS, HRAS, NRAS. Ras являются мембраносвязанными белками, участвующими в передаче сигнала. Они осуществляют один из первых этапов передачи сигнала извне клетки и, как правило, регулируют размножение клеток. Некоторые мутации могут приводить к постоянной активации Ras, что нарушает регуляцию деления клеток. Ошибки в регуляции Ras могут привести к росту опухоли и метастазированию. В 20-25 % опухолей человека обнаружены мутации в гене Ras, повышающие его активность, а в некоторых типах опухолей эта цифра доходит до 90%.

Ген-супрессор опухолей (антионкоген, опухолевый супрессор) – ген, продукт которого обеспечивает профилактику опухолевой трансформации клеток. Белковые продукты генов-супрессоров называют белками-супрессорами или антионкобелками. Кроме того, антионкогены могут кодировать и микроРНК.

МикроРНК – малые некодирующие молекулы РНК длиной 18—25 нуклеотидов (в среднем 22), обнаруженные у растений, животных и некоторых вирусов, принимающие участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов путём РНК-интерференции. Помимо внутриклеточной обнаружена внеклеточная (циркулирующая) микроРНК.

Гены-супрессоры обычно обнаруживаются при инактивирующих мутациях, которые фенотипически проявляются в формировании опухолей. Функционально гены-супрессоры противоположны онкогенам и часто негативно регулируют деление и рост клеток, а также уход от апоптоза. Наиболее известными белками-супрессорами являются p53, pRb и PTEN.

p53 (белок p53) – это транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл. p53 выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей, соответственно ген TP53 является антионкогеном. Мутации гена TP53 обнаруживаются в клетках около 50 % раковых опухолей. Зачастую его называют «стражем генома».

Белок ретинобластомы (белок pRb – retinoblastoma protein) – белок супрессора опухоли, дисфункционального при некоторых тяжелых формах рака. Одной из функций pRb является предотвращение прогрессии чрезмерного роста клеток путём ингибирования клеточного цикла, пока клетки не будут готовы к делению. Когда клетка готова к делению, pRb фосфорилируется, становится неактивным и позволяет прогрессировать клеточному циклу.

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) – фосфатаза с двойной субстратной специфичностью, продукт гена PTEN. Субстратами этой фосфатазы могут быть как белки, так и фосфатидилинозитол-3-фосфаты. PTEN катализирует отщепление фосфатной группы в положении 3D инозитольного кольца фосфатидилинозитол-3-фосфатов, лишая их таким образом функций вторичных посредников при передаче сигнала в клетке. Эта

фосфатаза является одним из немногих негативных регуляторов соответствующего сигнального пути, что делает её антионкобелком. Ген PTEN часто бывает мутирован при различных типах злокачественных опухолей.

Функции генов-супрессоров противоположны функциям протоонкогенов. Гены-супрессоры оказывают тормозящее влияние на процессы клеточного деления и выхода из дифференцировки. Доказано, что в ряде случаев инактивация генов-супрессоров с исчезновением их антагонистического влияния по отношению к протоонкогенам ведет к развитию некоторых онкологических заболеваний.

Таким образом, система протоонкогенов и генов-супрессоров формирует сложный механизм контроля темпов клеточного деления, роста и дифференцировки. Нарушения этого механизма возможны как под влиянием факторов внешней среды, так и в связи с геномной нестабильностью.

Некоторые ученые утверждают, что причиной опухолевой трансформации клетки может быть анеуплоидия (изменение числа хромосом или потеря их участков), являющаяся фактором повышенной нестабильности генома. Ещё одной причиной возникновения опухолей мог бы быть врождённый или приобретённый дефект систем репарации клеточной ДНК. В здоровых клетках процесс репликации ДНК протекает с большой точностью благодаря функционированию специальной системы исправления пострепликационных ошибок. Повреждение этих генов влечёт за собой нарушение функции всей системы репарации, и, следовательно, значительное увеличение уровня пострепликационных ошибок, то есть мутаций.

2 Канцерогены.

Канцерогены – факторы окружающей среды, воздействие которых на организм человека или животного повышает вероятность возникновения злокачественных опухолей. По оценкам онкологов, 80-90 % всех форм рака у человека представляет собой результат действия таких факторов. На данный момент известно большое количество факторов, способствующих развитию канцерогенеза.

Среди химических канцерогенов наиболее часто встречаемые следующие.

Нитраты и нитриты. Нитриты поступают в организм с пищей (в больших количествах они содержатся в злаках и корнеплодах, а также в мясопродуктах, куда их добавляют в качестве консервантов). Основным источником поступления в организм нитратов – овощи, выращенные в условиях чрезмерного применения азотных удобрений. Часть нитратов в процессе хранения пищевых продуктов или непосредственно в пищеварительном тракте может восстанавливаться до нитритов. Попадая в желудок, нитриты способны под действием желудочного сока превращаться в нитрозамины – вещества с широким спектром канцерогенного действия.

Пищевые добавки. Некоторые пищевые добавки являются доказанными канцерогенами и запрещены законодательством во многих странах.

Полициклические ароматические углеводороды и их производные – образуются при сгорании бытового мусора, неполном сгорании нефтепродуктов и присутствуют в выхлопных газах автомобилей. Среди них встречаются чрезвычайно канцерогенные вещества, в сотни раз более опасные, чем бензол. Некоторые могут образовываться при жарке пищи, перекаливании растительных масел.

Бензпирены – образуются при жарке и при приготовлении пищи на вертеле. Их много в табачном дыме. Продукты пиролиза белков образуются при длительном нагреве мяса в духовке.

Пероксиды – образуются в прогорклых жирах и при сильном нагреве растительных масел.

Афлатоксины – смертельно опасные микотоксины (подкласс поликетидов). Продуцируют эти токсины плесневые грибы – микромицеты нескольких видов рода Аспергилл (*Aspergillus*), в частности *Aspergillus flavus* (откуда и происходит название афлатоксинов) и *Aspergillus parasiticus*, которые произрастают и поражают зёрна, семена и плоды растений с высоким содержанием растительных масел и жирных кислот (например, на семенах арахиса, масличных культур) и других субстратах. Среди всех биологически производимых ядов афлатоксины являются самыми сильными гепатоканцерогенами из обнаруженных на сегодняшний день.

Диоксины – хлорорганические соединения, образующиеся при сжигании бытового мусора.

Винилхлорид – вещество является чрезвычайно огнеопасным и взрывоопасным. Продукты его горения токсичны. Оказывает на организм человека канцерогенное, мутагенное и тератогенное действие.

Бензол – токсичное и канцерогенное вещество. Пары бензола могут проникать через неповрежденную кожу. Если организм человека подвергается длительному воздействию бензола в малых концентрациях, последствия также могут быть очень серьёзными. В этом случае хроническое отравление бензолом может стать причиной лейкемии (рака крови) и анемии (недостатка гемоглобина в крови).

Формальдегид – токсичен и оказывает сильное отрицательное воздействие на центральную нервную систему. Формальдегид внесён в список канцерогенных веществ в разделе «вероятно канцерогенные для человека», при этом доказана его канцерогенность для животных.

Кадмий – кумулятивный яд (способен накапливаться в организме до опасных для здоровья количеств). Канцерогенен. Соединения кадмия ядовиты.

Мышьяк – ядовитое и канцерогенное вещество. Все соединения мышьяка также ядовиты.

Шестивалентный хром – является признанным канцерогеном при вдыхании.

Никель – соединения никеля токсичны, канцерогенны, аллергенны, мутагенны.

Асбест – среди канцерогенов стоит особняком. Его сложно отнести к химическим канцерогенам, которые, как правило, являются химически активными веществами. Канцерогенность асбеста, напротив, выражается в том, что живой организм не в состоянии избавиться от микроскопических, химически крайне инертных, частиц этого вещества.

Механизм действия химических канцерогенов. Все канцерогены в той или иной степени являются электрофилами, которые легко взаимодействуют с нуклеофильными группами азотистых оснований нуклеиновых кислот, в частности ДНК, образуя с ними прочные ковалентные связи. Негативные действия со стороны канцерогенов проявляются в химической модификации нуклеиновой кислоты. Последствия такой модификации проявляются в невозможности правильного протекания процессов транскрипции и репликации ДНК, вследствие чего возникают мутации. Накопление большого количества мутаций в геноме приводят к трансформации нормальной клетки в опухолевую, что является основой канцерогенеза.

Физические канцерогены. Наиболее известные физические канцерогены – это различные виды ионизирующего излучения (α , β , γ излучение, рентгеновское излучение, нейтронное излучение, протонное излучение, кластерная радиоактивность, потоки ионов, осколки деления), хотя они же применяются и для лечения онкологических заболеваний. Ультрафиолет полностью поглощается кожей, и потому может вызвать лишь меланому. Тогда как ионизирующее излучение, свободно проникающее внутрь организма, способны вызвать радиогенные опухоли любых тканей и органов организма (довольно часто кроветворных, вследствие высокой чувствительности).

Биологические канцерогены. Роль биологических факторов в канцерогенезе не столь велика, сколь у химических и физических факторов, но в этиологии некоторых злокачественных опухолей она весьма значительна. Так, до 25 % случаев возникновения первичного рака печени в странах Азии и Африки связывают с инфицированностью вирусом гепатита В. Около 300 000 случаев заболевания раком шейки матки в год и значительная доля случаев заболевания раком полового члена связывают с передаваемыми половым путём папилломавирусами. В 1990-е годы получены убедительные данные о зависимости большинства разновидностей рака желудка от инфицированности бактерией *Helicobacter pylori*.

3 Молекулярно-генетические основы онкогенеза.

В ходе онтогенеза клетки делятся (размножаются), приобретают новые функции (дифференцируются), перемещаются (мигрируют) и подвергаются программируемой гибели (апоптозу). Эти четыре основных клеточных процесса действуют в разных комбинациях и приводят к росту и морфогенезу, а на более поздних этапах онтогенеза обеспечивают состояние гомеостаза.

Все четыре клеточных процесса тщательно регулируются в ходе онтогенеза, а нерегулируемые состояния приводят к катастрофическим последствиям. Среди различных вариантов этих последствий особое место занимает опухолевый рост.

Опухолевый рост (новообразование) – аномальное скопление клеток, вызванное дисбалансом между ростом и гибелью клеток. Опухоли бывают доброкачественными и злокачественными. Злокачественные образования обозначают специальным термином – рак. Рак это не одно заболевание. Это сборный термин всех злокачественных образований. Злокачественность означает, что размножение клеток не контролируется, и опухоль способна прорасти смежные ткани и метастазировать в отдаленные участки, или то и другое одновременно. Опухоли, не способные к прорастанию и метастазированию, называются доброкачественными опухолями, хотя их размер и расположение могут вызывать дискомфорт, но в целом они благоприятны для пациента.

Всю патологию по типу мутаций и взаимоотношению со средой, принято делить на 5 групп:

I. Генные болезни.

II. Хромосомные болезни.

III. Болезни с наследственным предрасположением.

IV. Генетические болезни соматических клеток.

V. Болезни генетической несовместимости матери и плода.

Раковые заболевания относятся к IV группе классификации: генетические болезни соматических клеток. В каждой группе определяются дополнительные критерии классификации: тип наследования (аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный, сцепленный с полом); клинические проявления; прогноз; моногенные, полигенные болезни. Это общепринятая схема только частично пригодна для характеристики раковых заболеваний по причине особенностей их возникновения и течения.

Опухоли классифицируют в соответствии с тем типом клеток, из которых они происходят. Существует три основные формы злокачественных образований: саркомы, когда опухоль возникает в мезенхимальных тканях, например в костях, мышцах, соединительной ткани или в тканях нервной системы; карциномы, возникают в эпителиальной ткани, например в эпителии клеток кишечника, бронхов или протоках грудной железы; злокачественные неоплазии гемопоэтической и лимфоидной ткани, например лейкозы и лимфомы, захватывающие костный мозг, лимфатическую систему и периферическую кровь. В пределах каждой из этих трех групп опухоли классифицируются по их месторасположению, типу ткани, гистологическим особенностям и степени злокачественности.

Статистика показывает, что некоторые формы рака встречаются у более чем одной трети людей и вызывают более 20% всех смертей. Раковые опухоли, при отсутствии лечения, всегда приводят к летальному исходу.

Около 90% злокачественных опухолей у человека относятся к карциномам. Очевидно, что это связано с высокой пролиферативной активностью эпителиальных тканей, высокой их подверженностью вредным физическим и химическим факторам, а также большим удельным весом эпителиальных клеток в человеческом организме (более 60%).

В системе классификации раковых опухолей особое место занимает удивительный факт – только 7% приходится на долю врожденного (наследуемого) рака. В этой связи различают врожденный рак и приобретенный (спорадический), возникающий как следствие мутаций соматических клеток.

Для обозначения доброкачественных опухолей существуют специальные термины, например аденома – доброкачественная опухоль железистых органов и слизистых оболочек, выстланных кубическим или призматическим эпителием. Аденоме соответствует злокачественная опухоль – аденокарцинома. хондрома и хондросаркома – соответственно доброкачественная и злокачественная опухоли хрящевой ткани.

Раковые опухоли различного клеточного происхождения являются совершенно различными болезнями. В тоже время их объединяет два отличительных признака – способность к безудержной пролиферации и способность к метастазированию.

Сегодня достаточно хорошо изучена причина возникновения опухоли и результат ее развития.

Опухоли возникают как результат вирусных инфекций и как следствие мутаций, происходящих случайно или же под действием химических канцерогенов или облучения.

Для возникновения рака необходимо, чтобы в клетке сначала произошел ряд мутаций, освобождающих ее от воздействия различных регуляторов клеточного деления, а затем накопились дальнейшие изменения, делающие ее способной к инвазии и метастазированию.

В подавляющем числе случаев раковая опухоль развивается из отдельной аномальной клетки. Доказательством того, что раковые клетки данной опухоли являются клоном, берущим начало от единственной аномальной клетки (моноклональная природа рака), являются примеры моноклональных лейкоцитов у больных хроническим миелолейкозом, феномен инактивации X-хромосомы в женском организме и др.

У всех больных хроническим миелолейкозом лейкоциты отличаются специфическим хромосомным нарушением – так называемой филадельфийской хромосомой. Филадельфийская хромосома является результатом транслокации между плечами 22-й и 9-й хромосом.

Примечательно, что точка разрыва и восстановления транслоцированных фрагментов одна и та же у всех лейкозных клеток данного больного, но у разных больных точки разрыва различны за счет смещения на несколько сотен или тысяч пар азотистых оснований.

Опухоль растет медленно. Очевидно, что первичную раковую клетку обнаружить практически невозможно. К моменту обнаружения типичная раковая опухоль состоит не менее чем из миллиарда клеток.

Проращение в соседние ткани и метастазирование. Феноменология развития опухоли и проращение ее в соседние ткани хорошо иллюстрируется на примере карциномы шейки матки. Опухоли шейки матки происходят из многослойного плоского эпителия. В норме размножаются лишь клетки базального слоя эпителия, при этом новые клетки постоянно перемещаются к

поверхности эпителия, уплощаются, обогащаются кератином и достигнув поверхности эпителия слущиваются.

Однако у некоторых женщин обнаруживаются очаги дисплазии, в которых группы делящихся клеток наблюдаются за пределами базального слоя, что указывает на какие-то нарушения их дифференцировки. При этом клетки слущиваются с поверхности эпителия, находясь на аномально ранних стадиях дифференцировки. Такая дисплазия легко диагностируется путем микроскопии соскоба эпителия и не причиняет вреда хозяину.

Иногда эти клетки способны размножиться, давая, спустя несколько лет, очаги рака *in situ*. При этой ситуации уже все слои эпителия состоят из делящихся недифференцированных клеток, часто, весьма различных, по величине и кариотипу. Тем не менее, дефектные клетки находятся на одной стороне базальной мембраны – на стороне эпителия. На этой стадии заболевания можно достичь полного излечения – достаточно разрушить или удалить хирургически измененную ткань.

Без такого лечения в 20-30 % случаев происходит его дальнейшее развитие, приводящее к формированию злокачественной карциномы. Опухолевые клетки при этом нарушают целостность эпителия, проникают сквозь базальную мембрану и внедряются в подлежащую соединительную ткань. С этого момента эффективность хирургического лечения падает по мере распространения инвазивного роста.

Метастазирование. Способность раковых клеток давать метастазы – одно из главных свойств опухолей, затрудняющее их лечение. Чтобы распространиться по организму, опухолевые клетки должны освободиться от механического контакта с соседними клетками, пройти через ряд базальных мембран и слой эндотелиальных клеток, чтобы проникнуть в просвет сосуда; затем вновь «пройти» сквозь его стенку в другой части тела, и размножиться в ином окружении.

В сосудистое русло высвобождается значительно больше клеток, чем в дальнейшем образуется метастазов (1:1000). Специальными экспериментами показано, что клетки одной опухоли являются гетерогенными по своей способности к метастазированию.

Базальные мембраны несколько отличаются в разных тканях, но все базальные мембраны содержат коллаген IV типа вместе с протеогликанами и гликопротеинами, ламинином и энтактином.

Экспериментально продемонстрировано, что опухолевые клетки, чтобы проникнуть через базальную мембрану, должны, во-первых, к ней прикрепиться, а во-вторых, разрушить ее. Для прикрепления к базальной мембране опухолевые клетки несут на своей поверхности рецепторы ламинина, а для разрушения мембраны секретируют коллагеназу IV типа.

Было показано, что антитела или другие вещества, блокирующие прикрепление к ламинину или активность коллагеназы IV типа, могут подавлять метастазирование у экспериментальных животных.

Первичное проявление рака чаще всего связано с активацией онкогенов.

Протоонкогены регулируют клеточное деление, посредством выработки белков – факторов роста (стимулирующих клеточную пролиферацию), рецепторов, цитоплазматических сигнальных белков, факторов транскрипции, апоптоза.

Мутантный ген протоонкогена вызывает аномальную стимуляцию клеточного деления, образуется первичный клон опухолевых клеток.

Онкогены вызывают экспрессию в неправильное время (гетерохроническая экспрессия) и в неправильном месте (эктопическая экспрессия).

В многоклеточных организмах для поддержания гомеостаза по какому-либо свойству зачастую имеется прямая и противоположная функции. Такая закономерность обнаружена в клетках и в отношении онкогенности. Экспериментально была продемонстрирована супрессия (подавление) злокачественных свойств клетки нормальными клетками. Это открытие позволило сформулировать понятие о наличии в геноме особой группы генов, названных антионкогенами, или генами-супрессорами опухолевого роста. Функция генов-супрессоров – подавлять пролиферацию клеток, если она возникает в несоответствующем месте и в несоответствующее время.

Среди генов супрессоров выделяют две группы: 1 – гены хранители клеточного цикла (ХКЦ) и 2 – гены общего контроля (гены дворники).

Гены ХКЦ кодируют:

- регуляторы различных контрольных точек клеточного цикла;
- медиаторы программируемой гибели клеток (апоптоза).

Гены общего контроля (дворники) кодируют:

- белки, ответственные за обнаружение и исправление мутаций;
- белки, участвующие в расхождении хромосом в митозе;
- компоненты механизма апоптоза.

Протоонкогены, гены ХКЦ, гены общего контроля и гены апоптоза относятся к генам, мутации в которых вызывают рак. Это гены антионкогенного контроля.

Первичное проявление рака связано с активацией онкогена, стимулирующего неуправляемую клеточную пролиферацию и появление первичного клона опухолевых клеток.

Первичный клон опухолевых клеток служит резервуаром генетически нестабильных клеток, так называемых раковых стволовых клеток. Со временем эти клетки подвергаются новым мутациям, что приводит к появлению многочисленных линий клеток с различной степенью злокачественности.

Эпидемиологическая статистика позволила рассчитать, что в среднем для превращения нормальной клетки в опухолевую требуется от трех до семи случайных независимых событий. Число таких событий меньше при лейкозах и больше при солидных раковых опухолях.

4 Общая схема онкогенеза.

Патогенетическая схема онкогенеза предполагает следующие события: активация протоонкогенов, утрата экспрессии генов супрессоров опухолевого роста и потеря супрессии протоапоптозных генов. Сложность применения

этой схемы для унификации онкогенных состояний, определяется нестандартной последовательностью патогенетических событий, приводящих однако к конечной точке злокачественной опухоли. Тем не менее, по современным представлениям, стадии развития рака можно уложить, правда с некоторыми оговорками, в следующую последовательность событий.

Активация протоонкогенов и утрата генов-супрессоров опухолевого роста приводит к неуправляемой клеточной пролиферации. Рак развивается, накапливая дополнительные генетические повреждения, благодаря мутациям в генах «дворника», кодирующих клеточные механизмы репарации ДНК и поддерживающих цитогенетическую норму.

Повреждения в этих генах приводят к усиливающемуся каскаду мутаций в постоянно нарастающем количестве генов, управляющих пролиферацией клеток и репарацией ДНК. Дальнейшее развитие рака может идти как с сопутствующими дефектами репарации ДНК, так и без них.

К таковым относятся мутации генов супрессоров APC, приводящих к развитию доброкачественных аденом. Процесс образования аденом усиливается мутацией в гене RAS. Трансформация доброкачественных аденом в злокачественные происходит за счет накопления последующих мутаций и потери гетерозиготности. Последовательность генетических событий не имеет принципиального значения для конечного эффекта злокачественной опухоли. Важно, чтобы в клетке произошли все события. Например, при потере гетерозиготности 18g и 17g до того, как возникла мутация RAS, не может начаться рост ранней аденомы. Однако, как только произойдет мутация в гене RAS, гиперпролиферация быстро пройдет стадию промежуточной и поздней аденомы и трансформируется в карциному.

Схема хорошо иллюстрирует правило о том, что для возникновения рака единичной мутации недостаточно. В то же время единичная мутация, для возникновения рака необходима. Схема подтверждает вариант феномена опухолевой прогрессии – процесса, в ходе которого первоначальное малозаметное нарушение клеточного поведения постепенно перерастает в «полноценный» рак.

Тема 17 Культуры клеток животных и человека

1. Получение и культивирование клеток человека и животных.
2. Создание коллекций культур клеток.
3. Создание банков культур клеток и современные требования к их контролю.

1. Получение и культивирование клеток человека и животных.

Основание метода культуры клеток относят к началу XX века, когда была показана возможность выживания и деления клетки животного в системе *in vitro* (Jolly, 1903).

Реальное начало метода культивирования клеток и тканей животных связано с именем Ross Harrison (1907), который выделил и кратковременно культивировал ткани лягушки. Alexis Carrel (1912) использовал ткани и эмбриональный экстракт в качестве среды для поддержания органной культуры. Бурное развитие метода в 40-50-х годах связано с открытием ферментов и, в связи с этим, возможностью выделения суспензии отдельных клеток.

Первые попытки культивирования кусочков ткани в виде органных культур относятся к началу прошлого века, а культивирование отдельных клеток не удавалось. Основной причиной неудач было отсутствие адекватной питательной среды. Начало успешного развития метода культивирования отдельных клеток следует отнести к 1941 г., когда W.R. Earle вывел первую перевиваемую линию мышинных клеток L, широко распространенную и до настоящего времени в клональном варианте L929 (NCTC 929). Именно в это время были разработаны способы ферментативного диспергирования тканей и получения однослойных культур клеток, сконструированы первые адекватные и сравнительно доступные питательные среды.

Введение антибиотиков принципиально расширило возможность борьбы с бактериальной контаминацией. В результате исследователи смогли регулярно и с высокой эффективностью получать первичные, а затем перевиваемые клеточные культуры. Серьезным этапом развития метода стало получение из карциномы человека линии клеток HeLa, способных неопределенно долго расти *in vitro* и восприимчивых к большому числу различных вирусов человека.

Поворотным моментом, определившим бурное развитие и применение метода культур клеток, стало открытие J.F. Enders с сотрудниками, показавших способность вируса полиомиелита размножаться в культивируемых соматических клетках животного *in vitro*. Авторы обосновали возможность производства полиовакцины в первичных культурах клеток почек обезьян.

Теоретические изыскания в комплексе с практическими разработками привели к революционным изменениям в диагностике вирусных инфекций, выделении и идентификации вирусов, обусловили открытие новых таксономических групп вирусов, таких, как аденовирусы, риновирусы, и вызвали стремительное расширение состава известных групп. За полиовакциной последовала разработка других культуральных вакцин, в частности, против кори, краснухи, бешенства.

Усовершенствование методов и технологий получения и культивирования первичных и диплоидных культур привело к увеличению исследований с применением клеток. И практически все известные линии диплоидных и перевиваемых клеток были получены, в первую очередь, для исследования вирусов или наработки вакцинных препаратов. Позднее, с развитием методов генетической инженерии, культуры клеток стали использовать для получения высокопродуктивных штаммов-продуцентов биологически активных и лекарственных препаратов.

Выделение клеток из тканей и органов. В настоящее время культуру клеток, потенциально, можно получить практически из любого органа или

ткани человека или животного. Но чаще всего используют почки, легкие, кожу, тимус, тестикулы эмбрионов или молодых животных, эмбриональный или фетальный материал.

Выделение первичной суспензии клеток проводят в специальных ламинарных шкафах, обеспечивающих определенный уровень биобезопасности (BSL2) и соблюдение асептических условий работы. При этом важно исключить условия контаминации (загрязнения, инфицирования) как выделяемой культуры клеток, так и обеспечить условия безопасности для самого исследователя в случае, если ткани или клетки инфицированы посторонними микроорганизмами.

Ткань или орган забирают с соблюдением условий асептики, помещают в стерильный солевой раствор, это могут быть 0,9% раствор NaCl, раствор Хэнкса, Эрла и др., и транспортируют в специализированную лабораторию.

Скальпелем или ножницами измельчают ткань или орган до кусочков размерами не более 1-3 мм, тщательно отмывают от клеток крови в нескольких сменах стерильных растворов, а затем помещают в растворы ферментов, позволяющих изолировать отдельные клетки. Для этого чаще всего используют (0,25-0,5)% раствор трипсина. Могут также быть использованы коллагеназа, протеаза и т.д.

Часто при механическом измельчении ткани повреждаются ядра клеток и «выпавшая» ДНК под воздействием трипсина «распутывается» и увеличивает вязкость раствора с клетками, что не дает в последующем выделить отдельные клетки фильтрованием через специальное сито. Поэтому в ряде случаев в раствор добавляют ДНКазу, которая «режет» нити ДНК и, таким образом снижает вязкость раствора.

Для отделения, например, трофобластов от других типов клеток плаценты используют, кроме того, метод разделения клеток разных размеров в градиенте плотности Перколл (Percoll gradient). Клетки, выделенные с помощью ферментов, профильтрованные через сито с определенным размером, центрифугируют, осадок клеток ресуспензируют в питательной среде, разливают в культуральные флаконы и помещают в термостат или CO₂ инкубатор для дальнейшего культивирования.

Типы культур клеток. Культуры клеток могут быть первичными, диплоидными или перевиваемыми. Первичные культуры клеток получают путем диспергирования тканей разными методами: механически измельчая ткани с помощью ножниц, гомогенизатора и т.д.; выделяя клетки с помощью ферментов, главным образом, растворов трипсина, коллазы, протеазы и т.д.

Выделенные клетки выращивают в питательной среде *in vitro* в течение 1-3 пассажей и используют в производстве вакцин, для тестирования препаратов или типирования вирусов. Наиболее часто используют первичные фибробласты эмбрионов японских перепелов либо куриные эмбриональные фибробласты. В последние годы первичные культуры клеток рассматриваются как высокоперспективные для исследования дифференцировки клеток и регенеративной медицины.

При дальнейшем субкультивировании клетки могут формировать монослой, сохранять нормальный (диплоидный) набор хромосом и выдерживать пересевы до 50-60 пассажей. Такие культуры клеток считают диплоидными и их широко используют для производства вакцин, получения диагностических препаратов или заместительной терапии.

Некоторые культуры клеток при длительном культивировании приобретают способность к размножению вне организма неопределенно длительное время. Полагают, что механизм происхождения перевиваемых культур клеток – результат их генетической изменчивости. Клетки перевиваемых культур имеют одинаковую форму, сохраняют, как правило, гетероплоидный набор хромосом, стабильны в условиях роста *in vitro*, некоторые из них обладают онкогенной активностью. Последнее свойство ограничивает их использование при производстве вакцин.

Перевиваемые культуры клеток часто называют линиями клеток из-за стабильности их характеристик и неограниченности жизни *in vitro*. Перевиваемые линии клеток можно получить как из здоровых тканей животных, так и из опухолевых. Многие известные линии клеток человека или животных были получены из опухолевых тканей: Нер-2 (карцинома гортани человека); Нер-3 (лимфоидная карцинома человека), He-La (раковая опухоль шейки матки женщины Henrietta Lack); или нормальных тканей человека и животных: СНО (яичники китайского хомячка), Vero, CV, 4647 (почка зеленой мартышки), ВНК (почка новорожденного хомячка); L929 (фибробласты нормальной подкожной ткани мыши), MDCK (почка щенка собаки) и другие.

Ограничение сроков жизни диплоидных культур, пригодных для производства вакцинных, диагностических препаратов или препаратов для клеточной терапии, а также отсутствие отечественных линий клеток насекомых, перспективных для производства рекомбинантных или энтомопатогенных препаратов, подчеркивают целесообразность проведения исследований по получению новых культур клеток человека и животных. Успех в культивировании и поддержании клеток *in vitro* в большой степени зависит от индустрии производства питательных сред.

Питательные среды для выращивания клеток. Питательная среда является одним из важнейших компонентов выращивания клеток *in vitro*. Многие из удач, связанных с высокой скоростью роста и продуктивностью культур клеток, обязаны питательной среде, которая является источником питательных веществ, минералов, микроэлементов и ростовых факторов. Если первые попытки культивирования клеток были связаны с использованием только компонентов крови или лимфы, то в настоящее время разработан целый ряд уникальных составов сред, в том числе и бессывороточных или сред с определенным химическим составом.

В последние годы созданы специализированные среды для выращивания клеток из разных тканей и органов, учитывающие определенные особенности метаболизма клеток или уровень их дифференцировки. К наиболее распространенным и универсальным средам можно отнести: среда 199, Игла

MEM, Игла ДMEM, RPMI1640 и другие. Для культивирования малодифференцированных клеток часто используют среды F12 или DMEM/F12.

Набор выпускаемых в настоящее время сред позволяет выбирать среды для культивирования клеток разного тканевого и видового происхождения, определяемого особенностями биологии этих клеток в культуре. Понятие оптимизации среды впервые возникло с развитием масштабного культивирования клеток. В настоящее время разработана целая индустрия производства и совершенствования питательных сред для увеличения продуктивности культур клеток.

Сыворотка крови животных в большинстве случаев является одним из важнейших компонентов питательных сред. В ней содержатся пептидные ростовые факторы, стимулирующие клеточную пролиферацию, и другие важные для жизнедеятельности клетки *in vitro* компоненты.

Однако сыворотка, к сожалению, остается неопределенным по составу фактором при производстве вакцинных и лекарственных препаратов. Кроме того, по-прежнему, высока вероятность переноса инфекций. Поэтому в последние годы особенно активизировались исследования по созданию бессывороточных сред, пригодных для культивирования технологически перспективных линий клеток. Что касается качества современных бессывороточных сред, то они не универсальны и часто ограничивают качественные и ростовые свойства культивируемых клеток.

Таким образом, современные питательные среды позволяют не только культивировать многие уникальные типы клеток, но и производить достаточно большие количества продукта в клетках при масштабном их культивировании. Несмотря на множество исследований, бессывороточные среды не универсальны. Сыворотка крови животных, по-прежнему, остается одним из важнейших компонентов питательной среды. Поскольку сыворотка крови может нести потенциальную опасность из-за присутствия контаминантов, следует особенно внимательно относиться к вопросам контроля не только сыворотки, но и безопасности клеток и выращиваемого на них продукта.

Современные способы культивирования клеток. Культуры клеток в большей части субстратзависимы и растут в монослое на стекле или пластике. Некоторые типы клеток растут в суспензии в стационарных условиях либо при перемешивании. Для этого используют шейкерные установки либо биореакторы с внутренним перемешиванием питательной среды с клетками.

Основы промышленного культивирования клеток млекопитающих были заложены в начале 60 годов, а уже к концу 70-х различные компании и научно-исследовательские центры смогли наладить крупномасштабное получение одного из важнейших препаратов медицинского назначения – альфа интерферона. В настоящее время достаточно отработаны технологии производства моноклональных антител, генно-инженерных препаратов и вакцин.

Основной проблемой при выращивании клеток животных является повышение эффективности использования компонентов питательной среды и увеличение продуктивности клеток. Поскольку большая часть линий клеток животных субстрат зависима, то задача сводится к увеличению доступной

для роста клеток поверхности в расчете на единицу объема питательной среды.

Традиционно большинство типов клеток выращивают в монослое. Для решения проблем выращивания клеток в монослое разработаны многоуровневые культуральные флаконы – «фабрики клеток» (CellStack® Culture Chambers, Corning LifeSciences (Acton, MA, США), с площадью ростовой поверхности дна флакона 636 см² до более 40 отделений с общей площадью для выращивания клеток 25440 см². Такие флаконы могут использоваться для наработки большого числа первичных, диплоидных культур клеток, в том числе используемых для наработки генно-инженерных или вакцинных препаратов.

Субстратзависимые клетки можно также культивировать на стенках круглых флаконов (роллерных бутылях) в небольшом количестве питательной среды постоянно поворачивая флаконы. Выращивание клеток в роллерных бутылях позволяет в 8 - 10 раз увеличить поверхность по отношению к одинаковому со стационаром объему среды.

Роллерное культивирование привлекает простотой, надежностью, экономичностью и возможностью в короткое время развернуть промышленное производство. Постоянное чередование жидкой и воздушной фаз, омывающих монослой, создает благоприятные физиологические условия для роста клеток и способствует значительному повышению продукции препаратов или репродукции вирусов в таких условиях. Показано, что урожай вируса гриппа и парагриппа в роллерных системах культивирования повышается в 10-15 раз.

В Италии для наработки вакцин в заводских условиях используют 28 тыс. роллерных флаконов, контролируя при этом только температуру и скорость вращения. Замена стеклянных флаконов на «гофрированные» из пластика позволила получить 2 0 -кратный прирост клеток, а время удвоения клеточной популяции снизить до 8,35 часа. Кроме того, применение разовой пластиковой посуды позволяет значительно сократить ручной труд и таким образом снизить стоимость производства препарата.

Другим способом увеличения культуральной поверхности стало использование микроносителей. Такая система позволяет использовать все преимущества суспензионного культивирования клеток. Однако из-за высокой стоимости микроносителей система не столь популярна.

Принципиальный прогресс в развитии методов культивирования клеток и вирусов, означавший решительное изменение культуральной технологии, был связан с отказом от субстрата и переходом к суспензионному культивированию. В настоящее время для суспензионного выращивания клеток используют биореакторы объемом от 0,5 до 8 тыс. литров.

Английская фирма Celltech, производящая моноклональные антитела в эрлифтных ферментерах объемом 1000 литров, сконструировала реактор объемом до 10 тыс. литров. Американская компания Wyeth Biopharma, Andover (MA, USA) для производства моноклональных антител в культуре клеток запустила 150000 квадратных футов производственных площадей, организо-

ванных в соответствии с правилами Надлежащей практики производства (GMP) и включающих биореакторы объемом до нескольких тысяч литров.

Таким образом, бурное развитие технологий с применением клеток в производстве препаратов для лечения или иммунопрофилактики, требует не только получения новых высокочувствительных или продуктивных культур клеток животных, но стимулирует создание новых питательных сред, а также разработки новых условий культивирования и конструирования нового оборудования, пригодного для масштабной наработки клеток.

2. Создание коллекций культур клеток.

Методы контроля и паспортизации клеток. Исторически сложилось так, что после выделения первой перевиваемой линии клеток человека HeLa, полученной из карциномы шейки матки негритянки Henrietta Lack, значительно увеличилось число публикаций о получении новых линий клеток. Совершенствовались методы, число новых линий клеток росло. Следом были получены культуры клеток Hep-2, J-96, RH, KB, Fl и многие другие.

Исследователей удивляло, что линии, полученные из самых разных органов, имеют определенное сходство. Выдвигались теории, объясняющие это явление, появились термины «адаптация к условиям длительного культивирования», «спонтанная малигнизация клеток» и т.д.

И только в 1960-1963 гг. было показано, что большую часть так называемых «спонтанно» измененных перевиваемых линий различного видового происхождения по иммунологическим, кариологическим и биохимическим показателям можно отнести к двум видам – человеческие (HeLa) и мышинные (L).

Именно разработка методов анализа изоферментов и дифференциальной окраски хромосом позволила поставить вопрос о контаминации линий клеток клетками HeLa и L929. Это привело к принципиальному изменению подходов к получению и контролю перевиваемых линий клеток вообще. Стало ясно, что при проведении исследований с применением культур клеток особенно большое значение приобретает проблема стандартизации линий клеток, включая идентификацию клеток или подтверждение видового соответствия, а также контроль контаминации клеток как микроорганизмами, так и другими клетками.

В настоящее время в распоряжении исследователей имеются сотни линий клеток человека и животных, способных обеспечить все направления исследований. Многообразие линий клеток, высокая вероятность контаминации микроорганизмами и клетками других линий, наличие туморогенных и онкогенных свойств клеток делают культуры клеток небезопасными, что требует обязательного контроля клеток для получения адекватных результатов исследования или производства безопасного продукта.

Основой успешного развития вирусологических и биотехнологических работ с использованием культивируемых клеток является наличие коллекций культур клеток, охарактеризованных на современном методическом уровне в соответствии с общепринятыми требованиями (паспортом) и заложенных на

хранение в достаточном количестве, позволяющем длительное время обеспечивать стандартными отбивками клеток развивающиеся направления исследований.

Крупнейшие мировые и отечественные коллекции культур клеток человека и животных. Для обеспечения научных исследований или производств хорошо охарактеризованными культурами клеток в разных странах созданы специализированные коллекции культур клеток человека, сельскохозяйственных животных, насекомых и растений. Ниже представлен перечень наиболее крупных и известных коллекций культур клеток человека и животных.

- Американская коллекция типовых культур (ATCC, Вашингтон, США);
- Европейская коллекция культур клеток (ECACC, Великобритания);
- Институт вирусологии имени Д.И. Ивановского (Москва, РФ);
- НИИ Цитологии РАН (Санкт Петербург, РФ);
- Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирск, РФ);
- НИИ ветеринарии РАСХН (Москва, РФ).

Наиболее крупными и известными являются Европейская коллекция клеточных культур (ECACC) и Американская коллекция типовых культур клеток (ATCC), которые включают более 800 линий клеток или 450 линий и клонов клеток 43 видов животных, включая 200 штаммов фибробластов человека, и только 2 линии клеток комаров *Aedes aegypti* (ATCC-10) и *Aedes albopictus* (ATCC-15), соответственно. В Европе имеются и другие специализированные коллекции культур клеток человека и животных, как правило, это национальные коллекции клеток в разных странах.

Как уже отмечалось, успешное проведение исследований с применением культивируемых клеток и получение адекватных результатов возможно только при использовании паспортизованных в соответствии с современными требованиями культур клеток. Важными параметрами при паспортизации клеток являются: контроль видового соответствия клеток, отсутствие контаминации и культурально-морфологические характеристики.

Паспортизация культур клеток. Согласно современным требованиям, паспорт культуры клеток должен включать: полное наименование; тканевое и видовое происхождение клеток; описание культуральных и морфологических свойств культуры; описание кариотипа, особенностей криоконсервации; данные по контролю контаминации клеток посторонними микроорганизмами, в том числе грибами, бактериями, вирусами, микоплазмами; подтверждение видовой идентичности и данные по чувствительности клеток к вирусам или их продуктивности в случае использования культур клеток в качестве продуцентов рекомбинантных препаратов.

Число линий клеток постоянно растет, часто клетки внешне трудноотличимы. Они имеют сходную морфологию и ростовые свойства. Наличие нескольких линий клеток в лаборатории, особенно занимающихся получением собственных культур, создает предпосылки не только для загрязнения клеток

посторонними микроорганизмами, но и контаминации клеток клетками других линий. Более того, отсутствие данных кариологического и изоферментного анализа многих имеющихся и вновь получаемых культур клеток, ставит под сомнение их видовую принадлежность.

Если контаминация бактериями, грибами, микоплазмами и некоторыми вирусами может проявлять себя явно и постоянно находится под пристальным вниманием и контролем, то контаминация клеток клетками других линий часто выпадает из сферы тщательного контроля. Опыт работы крупных коллекций мира показывает, что уровень контаминации культур клеток млекопитающих колеблется от 20 до 30%.

В связи с этим при паспортизации линий клеток, особенно вновь поступающих в коллекцию или долго культивируемых в лаборатории вместе с другими культурами клеток, должны быть тесты, подтверждающие видоспецифичность клеток и позволяющие идентифицировать их.

Контроль клеток. Для идентификации линий клеток млекопитающих чаще всего используют анализ кариотипа и изоферментного состава исследуемых клеток. В ряде случаев для идентификации клеток применяют иммунологический контроль. По мнению Green A.C. с соавторами, для идентификации линий клеток насекомых необходимы, кроме того, знания культуральных и ростовых свойств клеток, их морфология и изоферментного состава. Рассмотрим эти методы отдельно.

Морфология клеток часто отражает специфику ткани или органа, из которого она получена. Так клетки, полученные из тканей почек, независимо от видового происхождения, как правило, представлены эпителиоподобными клетками: VERO, CHO, МДСК, Frhk-4, МДБК и другие, а клетки других тканей, например, легкого чаще всего фибробластоподобные (DBSFCL-1, Л-6 8, ФЭЧ 16-1 и др.). Линии лимфоидных культур клеток представлены, как правило, круглыми, свободноплавающими клетками (К-562, Namalva, Raji и др.). Однако это не всегда является закономерностью и клетки легкого эмбриона человека линии ЛЭЧ эпителиоподобные или полигональной формы, а клетки почки сирийского хомячка известной линии ВНК – фибробластоподобны.

В любом случае при характеристике культуры клеток, поступившей в коллекцию, в первую очередь проводят анализ морфологии нефиксированной культуры под инвертированным микроскопом или фиксированной и окрашенной гематоксилин-эозином после фиксации. Если фото живых клеток на стекле давало представление о характере роста культуры, то во втором случае позволяло наблюдать формы и размеры клеток и ядра. Количество ядрышек в ядре, а также соотношение размеров ядро/цитоплазма также являются характерными признаками линий клеток.

В некоторых случаях используют цветные красители, чаще флюорохромы, позволяющие демонстрировать некоторые особенности внутренней структуры клеток. Например, прижизненная окраска клеток акридиновым оранжевым позволяет показать активность лизосомального аппарата, определить размеры ядра, ядрышек, наличие или отсутствие других ДНК-овых образований или включений (ДНК микоплазм и т.п.).

Морфологические характеристики являются постоянным и потому отличительным признаком каждой линии клеток и вносятся в паспорт линии клеток вместе с их описанием. Электронно-микроскопическое обследование клеток и внутриклеточных структур позволяет выявить дополнительные особенности культур.

Таким образом, изучение морфологии клеток проводят с помощью световой, люминесцентной и электронной микроскопии. Морфология клеток, их размеры, а также тип их роста в монослое или в суспензии являются постоянными характеристиками каждой линии клеток, что позволяет в большей степени различать культуры клеток, являясь в числе других параметров контроля объективным доказательством принадлежности клеток к той или иной линии.

Кариологический анализ основывается не только на определении соответствия видовой принадлежности кариотипа клеток путем сравнения размеров, числа и соответствия пар хромосом, но и на детальном изучении хромосомного набора клеток каждой линии. Для идентификации отдельных хромосом клеток млекопитающих используют специальные дифференциальные С- и G-окраски хромосом.

Использование методов дифференциальной окраски хромосом дает возможность идентифицировать каждую хромосому набора, причем специфический рисунок каждой хромосомы не меняется, что позволяет определять участки или переносы части хромосом при различных хромосомных перестройках. Комплекс маркерных хромосом может служить для характеристики гетероплоидных линий клеток и помочь в решении проблемы идентификации перевиваемых культур клеток.

Именно при исследовании линий клеток человека были обнаружены уникальные маркерные хромосомы, свойственные клеткам HeLa, что позволило выделить целый ряд культур клеток человека в группу так называемых «дериватов HeLa». Позднее были описаны маркерные хромосомы для многих линий клеток других представителей млекопитающих.

Таким образом, анализ кариотипа культивируемых клеток, а, главное, наличие маркерных хромосом позволяет идентифицировать конкретные линии клеток и подтверждать их видовую принадлежность, стабильность или изменчивость кариотипа в процессе культивирования.

Анализ электрофоретической подвижности изоферментов представляет собой простой, практически доступный и надежный метод идентификации клеток на уровне рода и вида. Показано, что полиморфизм изоферментов, присущий данному виду, является генетическим автографом каждой линии клеток. Для контроля культур клеток млекопитающих наиболее часто используются два фермента – глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа (Г6ФДГ) и лактатдегидрогеназа (ЛДГ).

Контроль контаминации культур клеток микроорганизмами. Одним из факторов, нарушающих стабильность клеточных линий, влияющих на получаемые результаты и, таким образом, ограничивающих возможность их применения, является контаминация культур клеток различными микроорга-

низмами, в том числе бактериями, грибами, вирусами и микоплазмами. Контаминация бактериями или грибами происходит неизбежно с той или иной частотой в каждой лаборатории. Несмотря на то, что существуют схемы обработки клеточных культур с целью устранения такого рода контаминации, практически каждый случай означает потерю культуры.

Контаминация латентными и хронически инфицирующими вирусами выявляется наиболее трудно, и наличие ее может длительное время оставаться незамеченным. Для выявления вирусной контаминации используют реакцию гемадсорбции с эритроцитами 0 группы человека или морской свинки, пассирование на чувствительных клетках, прямую электронную микроскопию клеток и культуральной среды и многие другие методы.

Вирусная контаминация культур клеток животных – довольно частое явление. Некоторые линии клеток содержат эндогенные вирусы и секретируют вирусные частицы или экспрессируют вирусные антигены на своей поверхности (например, линии, трансформированные вирусом Эпштейна-Барра). Клетки, зараженные вирусом диареи коров через контаминированную сыворотку крови коров, внешне не изменяются. Показано, что инфицированная арбовирусами культура клеток комаров становится персистентно инфицированной. При этом клетки продолжают расти и продуцировать вирус без видимого цитопатического эффекта.

О высокой вероятности контаминации первичной или диплоидной культуры клеток свидетельствует статистика инфицированности донорского материала (органов и тканей для трансплантации), частота встречаемости вирусов СПИДа, гепатитов, ЦМВ и других вирусов человека.

Источником контаминантов может быть не стерильность рабочего помещения, первичный материал (ткань или орган), трипсин животного происхождения, а также инфицированная сыворотка крови животных, используемая для выращивания клеток человека или животных.

Применение таких клеток в исследованиях не только приводит к получению искаженных результатов, но, прежде всего, небезопасно как для получаемого продукта, так и для исследователей, работающих с ними. В культурах клеток, кроме того, могут присутствовать онкогенные вирусы.

Техника культивирования клеток и тканей постоянно меняется, и многие методические приемы систематически модернизируются, одновременно с этим совершенствуются методы контроля клеточных культур. К сожалению, в настоящее время нет единых методов контроля, позволяющих полностью исключить контаминацию вирусами, поэтому для контроля вирусной контаминации используют несколько методов: электронная микроскопия, методы иммунодиагностики, заражение иммуносупрессивных животных и т.п.

Контаминация культур клеток бактериями, грибами или вирусами хорошо известна вирусологам и исследователям, работающим с культурами клеток. Но более серьезной остается проблема микоплазменной контаминации, обусловленная, в первую очередь, широкой распространенностью этого микроорганизма. Как показывает мировой опыт, до от 10-15% до 45-90% случаев длительно культивируемых линий клеток были заражены микоплаз-

мами. Основным источником микоплазм являются первичный клеточный материал, питательные среды, сыворотки, трипсин, другие культуры клеток.

Микрокапли, возникающие при работе с культурами, могут содержать до $0,5 \times 10^6$ микоплазм. Такие микрокапли оседают из воздуха на посуду, рабочие поверхности и руки персонала в течение нескольких секунд и могут даже после работы с единичными инфицированными культурами вызывать тяжелое заражение рабочего пространства.

Серьезность проблемы заключается в том, что микоплазмы могут никак не проявлять себя, но вместе с тем вызывать серьезные изменения структуры и функции клеток, индуцировать хромосомные aberrации. Они влияют на синтез белков, нуклеиновых кислот, ангиогенез, клеточных мембран, индукцию туморогенных потенциалов, вызывают цитопатический эффект и гибель клеток. Наличие микоплазм в культурах может привести к значительным искажениям результатов биохимических и вирусологических исследований.

В настоящее время в литературе описано множество методов контроля микоплазменной контаминации. Одним из наиболее удобных и простых в исполнении представляется метод окрашивания флюорохромами Hoechst-33258, DAPI, оливомицином. Данные красители окрашивают двуцепочечные ДНК клеток и микоплазм, которые и выявляются в виде окрашенного ядра клеток и светящихся точек, выявляющихся в межклеточном пространстве или на цитоплазме клеток.

В настоящее время появились достаточно точные методы контроля микоплазм – методы ПЦР-анализа ДНК или РНК микоплазм, позволяющие исключить многие виды микоплазм даже в единичных количествах. Однако применение данного метода не позволяет исключить все виды микоплазм, потенциально контаминирующих клеточные культуры. Оригинальным, быстрым и достаточно точным представляется метод контроля по определению потребления аденина или окраски флюорохромами.

Простым, высокочувствительным и выполнимым в любой лаборатории остается микробиологический метод высева кондиционной питательной среды после выращивания клеток на селективную микробиологическую среду для микоплазм (PPLO). Метод позволяет выявить даже единичные микоплазмы, но не выявляет виды, которые не растут на питательной среде.

Таким образом, для контроля контаминации микоплазмами необходимо использовать несколько методов, среди которых метод ПЦР-анализа, микробиологический и гистохимический методы.

Что касается деконтаминации или освобождения клеток от микоплазм, то это достаточно серьезная проблема. Для этого используют антибиотики, химические реагенты, либо физические методы. К последним можно отнести воздействие повышенной до 41°C температуры или частотно-резонансный метод. Согласно мнению немецких исследователей, удаление микоплазм фактически равносильно нарушению свойств клеток, либо созданию новой линии клеток. Поэтому важно понимать эффективность методов деконтаминации, но и учитывать возможное изменение свойств клеток после обработки препаратами.

Поскольку микоплазмы достаточно долго сохраняются в помещении после работы с контаминированной культурой клеток, то, несомненно, важным условием работы с культурами клеток должно быть разделение работ по разным помещениям, либо по времени. Кроме того, в связи с высокой вероятностью передачи контаминирующих агентов необходим регулярный контроль не только культивируемых клеток, но и реагентов животного происхождения, используемых для их культивирования. Это, прежде всего трипсин, сыворотка крови животных, факторы роста и т.п. Контроль культур клеток, сывороток и, в конечном счете, вакцин чрезвычайно необходим, чтобы исключить серьезные последствия, как это было в случае с полиомиелитной вакциной, контаминированной вирусом SV-40 через сыворотку животных.

Таким образом, анализ литературы показал чрезвычайную важность проблемы контроля и паспортизации поступающих и вновь получаемых культур клеток, используемых в научных или прикладных исследованиях. Использование неидентифицированных или контаминированных клеток в научных исследованиях приводит к получению ложных результатов.

В связи с этим особое значение приобретает не только вопрос получения клеточных культур для обеспечения тех или иных экспериментальных исследований, но и задача сохранения таких культур с неизменными биологическими характеристиками в течение длительного времени. Поэтому вполне закономерной является постановка вопроса о создании отраслевых стандартов на клеточные культуры с регламентированными биологическими характеристиками, определяющими качественный уровень проводимых исследований и безопасность производимой продукции. Стандарты призваны отразить главные требования к клеточному субстрату и выделить основные критерии для паспортизации перевиваемых клеточных линий и клонов. Эти проблемы особенно касаются культур клеток, используемых для регенеративной медицины терапии или проведения научных исследований в этом направлении.

3. Создание банков культур клеток и современные требования к их контролю.

Основой успешного производства стандартных препаратов является стабильность и безопасность используемой культуры клеток. При постоянном культивировании клеток увеличивается вероятность микробной контаминации; существует риск потери интересующих нас характеристик клеток (например, снижение экспрессия поверхностного антигена или моноклональных антител); возможна генетическая изменчивость свойств, особенно в культурах с нестабильным кариотипом; потеря самой линии клеток из-за ограниченности их по числу пассажей (например, практически потеряна диплоидная линия клеток MRC-5); повышается риск контаминации клеток клетками другой линии и, кроме того, увеличивается стоимость из-за повышения затрат на поддержание клеток.

Важнейшим преимуществом использования серийно субкультивируемых клеток для производства продуктов биотехнологии является возмож-

ность иметь охарактеризованный общий источник для каждой производственной серии, т.е. сохраняемый запас клеток или банк клеток.

Использование клеток из аттестованного банка клеток позволяет: иметь клеточный материал постоянного или стабильного качества; использовать клетки одного пассажного уровня или в установленных пределах пассажей; культивировать клетки только, когда они нужны; сохранять характеристики исходной линии клеток.

Концепция создания двухъярусного банка клеток, при котором посевной банк клеток (Master Cell Bank) используется для генерации рабочего банка клеток (Working Cell Bank) является наиболее практичным подходом для обеспечения достаточного запаса клеточного субстрата для продолжительного производства продукта. Производители могут приготовить свои собственные банки клеток или получить из стороннего источника. В любом случае такие банки должны быть аттестованы.

В настоящее время определены требования к культурам клеток, используемым в качестве субстрата для производства медицинских и диагностических препаратов, включая производство вакцин, рекомбинантных препаратов.

Эти требования были разработаны в 1987-1989 гг. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ); американским органом контроля продуктов питания и лекарств (FDA) и национальным органом контроля (ГИСК им. Л.А. Тарасевича).

Согласно указанным документам, ВОЗ и национальный контрольный орган настаивают на необходимости создания системы посевных серий и рабочих или посевных банков клеток (РБК, ПБК). Клетки, используемые для производства биологических препаратов, должны быть одобрены и зарегистрированы национальным контрольным органом.

В требованиях ВОЗ и требованиях национального контрольного органа подробно описаны методы, используемые для аттестации клеток, включая описание единых характеристик. Помимо проведения морфологических тестов, изучения культуральных характеристик клеток, подчёркивается необходимость изучения безопасности клеток, что включает ряд методов выявления посторонних агентов на животных, куриных эмбрионах, или культурах клеток, контроль присутствия ретровирусов по активности обратной транскриптазы и испытание на онкогенность в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Для контроля видовой принадлежности или их идентификации, согласно национальным требованиям, используется биохимический метод изоферментного анализа состава клеток и анализ кариотипа (в том числе – цитогенетические маркеры).

Банки клеток, планируемых для использования в производстве биологических препаратов, должны быть одобрены и зарегистрированы национальным контрольным органом. Производство МИБП на перевиваемых линиях клеток должно быть основано на современной технологии, обеспечивающей высокую степень очистки готового продукта от клеточных компонен-

тов и эндогенных вирусов. Содержание клеточной ДНК в готовом препарате должно быть не выше 100 пг на дозу.

Национальные требования, кроме того, устанавливают порядок аттестации линий диплоидных клеток, получаемых из тканей и органов эмбрионов человека и животных, оформленных в самостоятельный раздел «Получение, аттестация и контроль линий диплоидных клеток, используемых в качестве субстрата для производства медицинских препаратов».

Поскольку культура клеток используется при производстве препаратов в течение длительного пассирования, то, кроме изучения паспортных характеристик, обязательным является подтверждение стабильности свойств клеток и в большей степени их безопасность в течение срока (количество пассажей), рекомендуемого для изготовления МИБП.

Важными параметрами контроля стабильности биологических свойств клеток являются неизменность культуральных, морфологических и продуктивных свойств, а также стабильность кариотипа клеток из посевного и рабочего банков при определенном количестве пассажей.

Безопасность клеток подтверждается отсутствием контаминантов, онкогенных и туморогенных характеристик. Изменение состава маркерных хромосом может свидетельствовать о небезопасности использования таких культур клеток, быть косвенным доказательством наличия вирусной или микоплазменной контаминации, а также появления туморогенных свойств. В связи с этим, Комитетом по биологическим стандартам ВОЗ было настоятельно рекомендовано проводить тщательный контроль стабильности именно этих характеристик клеток.

При увеличении числа пассажей или использовании клеток при более низких концентрациях, приводящих к увеличению числа удвоений популяции клеток, высока вероятность не только изменения кариотипа, но и, независимо от этого, появления онкогенных свойств клеток.

Установление числа пассажей, при которых можно использовать клетки в производстве, может иметь меньшее значение, чем тщательное исследование клеток при культивировании их после установленного уровня пассажей. Последнее особенно важно учитывать при использовании в производстве перевиваемых культур клеток, имеющих неограниченный срок жизни.

ВОЗ обобщила материалы по потенциальному риску для людей продуктов биотехнологического производства, приготовленных в клеточных культурах, инфицированных вирусными агентами. Оказалось, что в культурах клеток могут быть вирусы с известными моделями репликации, такие, как вирус обезьян SV-40, вирусные частицы ретровирусов типа А, которые можно обнаружить методом электронной микроскопии, а также вирусные геномы или части геномов, например, вирусов гепатита В, Эпштейн-Барра и герпеса. Латентные вирусы типа герпеса и ретровирусов могут встречаться в лимфоцитах и макрофагах людей и обезьян.

Перевиваемые клеточные линии обезьян могут содержать вирусы или вирусные гены, интегрированные в ДНК. Ткани и клетки птиц могут быть контаминированы экзогенными и эндогенными вирусами. И хотя нет доказа-

тельств возможности передачи болезни людям через препараты, изготовленные в таких культурах, современная ситуация с вирусом гриппа настораживает. В настоящее время многие вакцины, например, против жёлтой лихорадки, кори и живая против гриппа производятся на куриных эмбрионах, которые могут содержать птичьи вирусы лейкозов.

Перечисленные факты еще раз подчеркивают значимость контроля контаминации клеток для подтверждения безопасности культур клеток и получаемого препарата, согласно известным требованиям. Методические приемы постоянно совершенствуются и вводятся новые методы контроля клеток. Поэтому для контроля банков клеток в настоящее время дополнительно используют методы ПЦР и ИФА-анализа.

В последние годы возникло совершенно новое направление по применению клеток человека или животных для регенеративной медицины. Это, как правило, первичные или малокультивированные клетки. Несмотря на серьезные успехи регенеративной медицины до сих пор чрезвычайно серьезными и в большей степени нерешенными остаются проблемы нормативно-правовой базы данных исследований, этики и религии, и безопасности используемого материала.

СТРУКТУРА И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ПРАКТИЧЕСКИХ (СЕМИНАРСКИХ) ЗАНЯТИЙ

По дисциплине «Клеточная биология» предусмотрены практические (семинарские) занятия, которые способствуют развитию у магистрантов таких необходимых навыков, как выбор и решение поставленной задачи, сбор и аналитический анализ опубликованных данных, умение выделять главное и делать обоснованное заключение. Они стимулируют регулярное изучение магистрантами актуальной научной литературы, закрепляют знания, полученные при прослушивании лекций, прививают навыки самостоятельной работы, способствуют выработке навыков научной полемики. Практические (семинарские) занятия нацелены на пробуждение научного интереса, стимуляцию накопления научных знаний, формулирование выводов. Проведение практических (семинарских) занятий способствуют более глубокому усвоению широкого круга специальных биологических понятий, повышают познавательные возможности обучающихся. Практические (семинарские) занятия проводятся согласно графика учебного процесса и самостоятельной работы. Темы практических (семинарских) занятий приведены в таблице.

	Раздел дисциплины	Тема занятия
1	Структурная и функциональная организация ядерного аппарата клетки	Организация ядерного генома
2	Клеточные мембраны	Активные формы кислорода и состояние окислительного стресса в клетке
3	Цитозоль и эндомембранные структуры	Эволюция клетки
		Эндомембранные структуры
4	Системы энергообеспечения клетки	Биоэнергетика клетки
5	Цитоскелет и производные протопласта	Цитоскелет эукариот и прокариот
6	Клеточная жизнь, смерть и канцерогенез	Клеточная гибель. Некроз и апоптоз
		Молекулярно-генетические аспекты канцерогенеза

Практические (семинарские) занятия проводятся один раз в неделю, продолжительность занятий – два академических часа. Подготовка к семинару сводится к следующему плану:

1. Выбор темы, определение задач.
2. Подбор дополнительной литературы.
3. Подготовка вопросов для обсуждения.
4. Распределение заданий и тем для сообщений.
5. Организация предварительной работы, консультации.

6. Определение критериев оценки выступлений.
7. Выбор методов и приемов проведения.
8. Подбор средств наглядности.
9. Составление плана проведения практических занятий.

Практические занятия организуются с целью расширения и обобщения знаний магистрантов по теме или разделу и сводятся к следующей структуре:

1. Вводное слово преподавателя: формулировка задач, постановка проблемы, знакомство с планом проведения семинара.
2. Выступления магистрантов (сообщения по заданным вопросам).
3. Обсуждение вопросов семинара в процессе беседы.
4. Подведение итогов (анализ сообщений, оценка их выступлений).

Структура практического (семинарского) занятия может быть различной, она зависит от сложности обсуждаемых вопросов, дидактических задач и может проводиться в виде:

- развернутой беседы,
- докладов,
- обсуждение рефератов,
- семинаров-диспутов,
- мини-конференций.

На практических (семинарских) занятиях используются методы интерактивного обучения. Учебный процесс, опирающийся на использование интерактивных методов обучения, организуется с учетом включенности в процесс познания всех магистрантов группы без исключения. Совместная деятельность означает, что каждый вносит свой особый индивидуальный вклад, в ходе работы идет обмен знаниями, идеями, способами деятельности. Организуются индивидуальная, парная и групповая работа, используется проектная работа, осуществляется работа с различными источниками информации. Интерактивные методы основаны на принципах взаимодействия, активности обучаемых, обязательной обратной связи. Создается среда образовательного общения, которая характеризуется открытостью, взаимодействием участников, равенством их аргументов, накоплением совместного знания, возможность взаимной оценки и контроля.

ЗАНЯТИЕ 1 ОРГАНИЗАЦИЯ ЯДЕРНОГО ГЕНОМА

Рассматриваемые вопросы:

1. Современные представления об организации клеточного ядра.
2. Строение ядерной оболочки и ядерных пор.
3. Структура и репликация хромосомы.
4. Синтез и процессинг РНК. Контроль генной экспрессии.
5. Дифференцировка клеток и ее связь с экспрессией генов.
6. Роль ядра и цитоплазмы в экспрессии и репрессировании генов.

ЗАНЯТИЕ 2 АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В КЛЕТКЕ

Рассматриваемые вопросы:

1. Активные формы кислорода и продукты первичного окисления липидов как сигнальные молекулы.
2. Нарушения мембранных структур, связанные с повышением концентрации АФК.
3. Окислительный стресс у растений. Повреждения биомолекул активными формами кислорода.
4. Окислительный стресс у животных и человека. Повреждения биомолекул активными формами кислорода.
5. Детоксикация продуктов окислительной модификации биомолекул.
6. Механизмы повреждения ДНК и ядерных мембран активными формами кислорода

ЗАНЯТИЕ 3 ЭВОЛЮЦИЯ КЛЕТКИ

Рассматриваемые вопросы:

1. Возникновение первой клетки. Формирование метаболизма.
2. Прокариоты и эукариоты: сходства и различия. Многоклеточность.
3. Химические компоненты клетки. Упорядоченность биологических систем и энергия.
4. Питательные вещества и источники энергии клетки. Биосинтез и создание упорядоченности.
5. Координация катаболизма и биосинтеза в клетке.
6. Эволюция макроэргических соединений и систем энергопреобразования в клетке.

ЗАНЯТИЕ 4 ЭНДОМЕМБРАННЫЕ СТРУКТУРЫ

Рассматриваемые вопросы:

1. Общая схема функционирования вакуолярной системы. Взаимодействие органелл вакуолярной системы.
2. Современные представления о строении и функционировании гранулярного эндоплазматического ретикула.
3. Котрансляционный транспорт растворимых белков. Синтез мембранных белков.
4. Транспорт между эндоплазматическим ретикулом и аппаратом Гольджи. Особенности организации аппарата Гольджи в различных типах клеток.
5. Молекулярные маркеры лизосом. Классификация лизосом. Набор лизосомальных ферментов.
6. Функция лизосом. «Лизосомные» болезни (наследственные и приобретенные).

ЗАНЯТИЕ 5 БИОЭНЕРГЕТИКА КЛЕТКИ

Рассматриваемые вопросы:

1. Молекулярная и ультраструктурная организация митохондрий, пла-
- стид.

2. Первичные механизмы преобразования энергии, редокс циклы и синтез макроорганических соединений в цитозоле клеток.
3. Преобразование энергии в процессах фотосинтетического и окислительного фосфорилирования.
4. Хемиосмотическая теория синтеза АТФ.
5. Вторичные механизмы преобразования энергии.
6. Способы энергообеспечения механического движения, трансмембранного переноса веществ, биосинтезов, деления клеток.

ЗАНЯТИЕ 6 ЦИТОСКЕЛЕТ ЭУКАРИОТ И ПРОКАРИОТ

Рассматриваемые вопросы:

1. Основные типы, молекулярная организация и исполнительные механизмы систем, обеспечивающих движение.
2. Системы движения, основанные на полимеризации (деполимеризации) и взаимодействии микротрубочек и актиновых нитей.
3. Тубулины, G- и F-актин, миозин, MAP и БАМ и другие белки как элементы «конструктора» для построения цитоскелета.
4. Динеины и кинезины – моторные белки. Клеточный центр. Центросомы и центриоли. Центросомный цикл.
5. Базальные тельца, строение и движение ресничек и жгутиков.
6. Цитоскелет растительных клеток – особенности организации и функционирования.

ЗАНЯТИЕ 7 КЛЕТОЧНАЯ ГИБЕЛЬ. НЕКРОЗ И АПОПТОЗ

Рассматриваемые вопросы:

1. Классификации некрозов животных и человека: по этиологии; клинико-морфологическая; по механизму возникновения. Причины некрозов.
2. Изменения в клетках и тканях животных и человека, происходящие при некрозах.
3. Некрозы у растений – основные особенности, классификация, изменения в клетках и тканях, происходящие при некрозах.
4. Фазы апоптоза: сигнальная, эффекторная, деградационная. Регуляция апоптоза.
5. Роль апоптоза в организме животных и человека. Патологии, обусловленные нарушениями апоптоза.
6. Апоптоз у прокариот. Апоптоз у одноклеточных эукариот. Апоптоз у многоклеточных эукариот. Апоптоз у растений.

ЗАНЯТИЕ 8 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Рассматриваемые вопросы:

1. Механизмы канцерогенеза: теория четырехстадийности. Стадии формирования опухоли.

2. Системная эволюция опухоли. Теория клональной экспансии. Теория раковых стволовых клеток. Современные представления о принципах развития опухоли. Циркулирующие опухолевые клетки.

3. Генетическая и фенотипическая гетерогенность опухолевой ткани. Особенности использования в клинической практике. Методы оценки. Современное состояние проблемы.

4. Понятие о микроокружении. Инвазия. Подготовка ниши. Регионарные и удаленные метастазы. Внутриопухолевые взаимодействия.

5. Устойчивость опухоли к терапии. Ключевые «точки» инициации устойчивости. Комплексное представление.

6. Системный подход к проблеме преодоления лекарственной устойчивости. Тактика сдерживающей терапии. Иммунотерапия опухолей. Противоопухолевые вакцины.

Для участия в занятии каждый магистрант готовит сообщение на одну из обозначенных тем. Сообщение состоит из текста и презентации. Оно должно быть рассчитано на 15 минут доклада (3-4 страницы текста) + 35-40 слайдов презентации. Выступление на каждом занятии оценивается. Остальные члены группы готовят проблемные вопросы для дискуссии.

Учреждение образования
«Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе
ГГУ имени Ф.Скорины
И.В.Семченко
(подпись)
17.10.2019
(дата утверждения)
Регистрационный № УД-17-2019-65 /уч

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Учебная программа учреждения высшего образования
по учебной дисциплине для специальности 1-31 80 01 Биология
(профилизация Функциональная биология)

Учебная программа составлена на основе Образовательного стандарта высшего образования второй ступени (магистратура) ОСВО 1-31 80 012012, учебных планов ГГУ имени Ф. Скорины специальности 131 80 01 Биология, регистрационные номера G 31-2-01/д-19, G 31-2-01/з-19 от 09.04.2019.

Составитель:

О.М. Храмченкова, доцент кафедры ботаники и физиологии растений учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины», кандидат биологических наук, доцент

Рецензенты:

В.В. Потенко, заведующий кафедрой биологии с курсами нормальной и патологической физиологии учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет», доктор биологических наук, доцент

Д.Н. Дроздов, доцент кафедры зоологии, физиологии и генетики учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины», кандидат биологических наук, доцент

Рекомендована к утверждению:

Кафедрой ботаники и физиологии
растений
протокол № 10 от 18.04. 2019

Научно-методическим советом УО «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»
протокол № 8 от 17.05.2019

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Учебная дисциплина «Клеточная биология» относится к компоненту учреждения высшего образования, модулю «Клеточная биология и молекулярно-генетические механизмы биосигнализации» учебного плана специальности 1-31 80 01 Биология (профилизация Функциональная биология).

Биология клетки – фундаментальная научная дисциплина, представленная в учебных программах всех ведущих вузов мира. Значение достижений современной клеточной биологии неопределимо для развития практически всех разделов биологии, сельского хозяйства, медицины, экологии, генной инженерии, биотехнологии и нанобиологии. Реакции на уровне клетки определяют физиологические процессы в организме, контролируют здоровье человека и продуктивность растений. Понимание механизмов данных реакций имеет большое прикладное значение, так как лежит в основе создания новых лекарственных препаратов, биотехнологий и методов повышения урожайности растений. В этой связи, изучение клеточной биологии – важный компонент подготовки специалистов-биологов.

Цель дисциплины: ознакомление с фундаментальными основами и современными представлениями о структуре, молекулярной организации, исполнительных и регуляторных механизмах функций прокариотических и эукариотических клеток.

Основные задачи дисциплины – дать представление о фундаментальных основах строения, молекулярной организации и регуляторных механизмах живых клеток; ознакомить с научными достижениями в области клеточной эволюции, взаимодействия клеток со средой, энергетике, механизмах движения клеток, межклеточных коммуникациях, репродукции и цитодифференцировки.

В преподавании данной дисциплины, наряду с лекциями, учебным планом предусмотрены практические (семинарские) занятия, которые способствуют развитию у обучающихся таких необходимых навыков, как выбор и решение поставленной задачи, сбор и аналитический анализ опубликованных данных, умение выделять главное и делать обоснованное заключение. Они стимулируют регулярное изучение научной литературы, закрепляют знания, полученные на первой ступени высшего образования, прививают навыки самостоятельной работы. На практических (семинарских) занятиях используются методы интерактивного обучения, основанных на психологии человеческих взаимоотношений и взаимодействий.

В результате изучения дисциплины магистрант должен:
знать:

– основы устройства, функционирования и интеграции в ткани клеток живых организмов;

– структуру клеточных компонентов, молекулярную природу происходящих в них процессов:

– механизмы регуляции физиологических процессов в клетках;
– методы исследования, культивирования и практического использования клеточных культуры;

уметь:

– использовать знания о молекулярных основах функционирования клетки, координации физиологических функций клетки;

– применять на практике знания об основных экспериментальных подходах клеточной биологии;

– использовать знания клеточной биологии в целях развития новых подходов в биотехнологии, генной инженерии и сельском хозяйстве;

владеть:

– навыками научного анализа и разработки проблем фундаментальной и прикладной клеточной биологии;

– техникой планирования и проведения универсального клеточно-биологического исследования с использованием современных аналитических подходов.

Изучение учебной дисциплины «Клеточная биология» должно обеспечить формирование у магистранта следующих компетенций:

АК-2. Применять методологические знания и исследовательские умения, обеспечивающие решение задач производственной, научно-педагогической, управленческой и инновационной деятельности.

АК-3. Использовать междисциплинарный подход при решении проблем, совершенствовать навыки, связанные с использованием технических устройств, управлением информацией и работой с компьютером.

АК-4. Самостоятельно изучать новые методы исследований, приобретать новые знания и умения, в том числе в областях знаний, непосредственно не связанных со сферой деятельности, повышать свою квалификацию в течение всей жизни, обеспечивать личностное и профессиональное саморазвитие.

СК-2. Быть способным использовать знания о молекулярных основах функционирования клеточных систем и механизмах биосигнализации в разработке актуальных вопросов физиологии животных и растений, биотехнологии, экологии, фармации, сельском и лесном хозяйстве

ПК-1. Квалифицированно проводить научные исследования (осуществлять постановку научной проблемы, выбирать грамотные и экспериментально обоснованные методические подходы, проводить анализ результатов экспериментальных исследований, оценивать их достоверность и осуществлять статистическую обработку, формулировать из полученных результатов корректные выводы).

ПК-2. Осуществлять поиск и анализ данных по изучаемой проблеме в научных, научно-технических и других информационных источниках, составлять аналитические обзоры;

ПК-3. Организовывать работу по подготовке научных статей, сообщений, рефератов и заявок на изобретения и лично участвовать в ней.

ПК-5. Квалифицированно проводить научно-производственные исследования (осуществлять постановку научной проблемы, имеющей практическую значимость; выбирать грамотные и экспериментально обоснованные методические подходы; проводить анализ результатов экспериментальных исследований, оценивать их достоверность и осуществлять статистическую обработку, давать рекомендации по практическому применению полученных результатов).

ПК-11. Составлять отчеты по научным, научно-производственным проектам исследований.

Изучение учебной дисциплины «Клеточная биология» базируется на знаниях, полученных по учебным дисциплинам «Цитология и гистология», «Биохимия», «Физиология человека и животных», «Физиология растений», «Молекулярная биология» и др.

Изучение данной учебной дисциплины предусмотрено магистрантами 1 курса специальности 1-31 80 01 Биология (профилизация Функциональная биология). Общее количество часов для магистрантов **дневной** формы обучения – 112 (3 зачетных единицы); аудиторных – 50, из них: лекции – 34, в том числе – УСП – 12, практические (семинарские) занятия – 16. Форма отчетности – экзамен во 2 семестре. Общее количество часов для магистрантов **заочной** формы обучения – 112 (3 зачетных единицы); аудиторных – 16, из них: лекции – 10, практические (семинарские) занятия – 6. Форма отчетности – экзамен во 2 семестре.

СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО МАТЕРИАЛА

РАЗДЕЛ 1 СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЯДЕРНОГО АППАРАТА КЛЕТКИ

Модуль 1 (М1). Структурная и функциональная организация ядерного аппарата клетки

Тема 1. Строение и химия клеточного ядра.

Роль ядерных структур в жизнедеятельности клетки. Ядерные компоненты прокариот. Ядро эукариотических клеток. Эухроматин и гетерохроматин. Хромосомный цикл. Общая морфология митотических хромосом. Клеточный цикл эукариот. Эндорепродукция и полиплоидия. Пространственное расположение хромосом в интерфазном ядре. Структура и химия хроматина. ДНК хроматина. Репликация эукариотических ДНК. Основные белки хроматина – гистоны. Функциональные свойства гистонов. Первый уровень компактизации ДНК: структурная роль нуклеосом. Нуклеосомы при репликации и транскрипции. Второй уровень компактизации ДНК – фибрилла диаметром 30 нм. Негистоновые белки. Петлевые домены ДНК – третий уровень структурной организации хроматина. Ядерный белковый матрикс. Общий состав ядерного матрикса. ДНК ядерного белкового матрикса. Хромонемный (четвертый) уровень упаковки хроматина. Общая организация митотических хромосом.

Тема 2 Ядерные транскрипты и их транспорт.

Ядрышко – источник рибосом. Строение рибосом. Чем определяется число ядрышек в клетке. Множественность рибосомных генов. Амплифицированные ядрышки. Строение и функционирование генов рРНК. Структура ядрышка. Фибриллярный центр и ядрышковый организатор. Структурные типы ядрышек. Белки ядрышек. Общая схема работы ядрышка как специального локуса синтеза рибосом. Нерибосомные продукты клеточного ядра. Транскрипция нерибосомных генов. Морфология РНП-компонентов ядра. Синтез РНК в пуфах политенных хромосом. Транскрипция на мейотических хромосомах. Морфология транскрипции индивидуальных генов. Синтез транспортных РНК. Компоненты ядерной оболочки. Роль ядерной оболочки в ядерно-цитоплазматическом обмене. Импорт кариофильных белков. Экспорт из ядра в цитоплазму. Динамика ядерной оболочки в митозе.

Модуль контроля 2 (МК₂). Контроль усвоения раздела «Структурная и функциональная организация ядерного аппарата клетки»

Модуль обеспечивает контроль основных понятий, знаний и умений, освоенных магистрантами в результате изучения раздела «Структурная и функциональная организация ядерного аппарата клетки». Контроль

осуществляется в форме контрольной работы или тестирования с разноуровневыми заданиями (уровень узнавания; воспроизведение по памяти; воспроизведение на уровне понимания и применения знаний в знакомой ситуации; применение знаний в незнакомой ситуации; творческая деятельность). Также магистранты выполняют задания УСР № 1 по теме «Ядерные транскрипты и их транспорт».

РАЗДЕЛ 2 КЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАНЫ

Модуль 2 (М2). Клеточные мембраны

Тема 3. Состав и свойства биологических мембран.

Общие свойства биологических мембран – липопротеидных комплексов. Двойной слой липидов – структурная основа мембран. Мембранные белки – обязательные компоненты биологических мембран. Латеральная подвижность липидов и белков мембран. Асимметричность клеточных мембран. Различные свойства разных мембран. Связь мембран с цитоплазматическими белками. Рост многих мембран за счет встраивания вакуолей. Барьерно-транспортная роль плазмалеммы. Рецепторная роль плазмалеммы.

Тема 4. Транспорт веществ через мембрану.

Характеристика транспортных процессов. Низкомолекулярные соединения: три способа переноса. Простая диффузия. Облегченная диффузия. Активный транспорт. Перенос через мембраны частиц и высокомолекулярных соединений. Везикулярный перенос: эндоцитоз и экзоцитоз. Ионный гомеостаз клетки. Молекулярные основы первично-активного транспорта ионов. Na^+/K^+ -АТФаза. H^+ -АТФаза. Ca^{2+} -АТФазы.

Модуль контроля 2 (МК₂). Контроль усвоения раздела «Клеточные мембраны»

Модуль обеспечивает контроль основных понятий, знаний и умений, освоенных магистрантами в результате изучения раздела «Клеточные мембраны». Контроль осуществляется в форме контрольной работы или тестирования с разноуровневыми заданиями (уровень узнавания; воспроизведение по памяти; воспроизведение на уровне понимания и применения знаний в знакомой ситуации; применение знаний в незнакомой ситуации; творческая деятельность). Также магистранты выполняют задания УСР № 2 по теме «Состав и свойства биологических мембран».

РАЗДЕЛ 3 ЦИТОЗОЛЬ И ЭНДОМЕМБРАННЫЕ СТРУКТУРЫ

Модуль 3 (М4). Цитозоль и эндомембранные структуры

Тема 5. Цитозоль.

Основные определения. Разграничение понятий. Цитоплазма, протоплазма, цитозоль, гиалоплазма, протоплазма, протопласт, эктоплазма, эндоплазма. Химический состав цитозоля. Вода, неорганические вещества, макромолекулы. Осмопротекторы: трегалоза и бетаин. Организация и функции цитозоля. Градиенты концентрации. Кальциевые волны. Белковые комплексы. Субстратные каналы. Белковые компартменты. Протеасомы. Карбоксисомы. Цитосклетное сито. Ковалентные модификации белков в цитозоле. Связывание белков с мембраной. Деграция белков. Убиквитин-зависимый протеолиз.

Тема 6 Эндоплазматический ретикулум.

Вакуолярная система внутриклеточного транспорта. Функции отдельных компонентов. Гранулярный эндоплазматический ретикулум, основные типы. Котрансляционный транспорт растворимых белков. Строение и функции транслкона. Синтез клеточных мембран. Транспорт между эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи. Гладкий эндоплазматический ретикулум, топография и основные функции. Эндоплазматический ретикулум растительных клеток. Участки формирования белковых тел. Участки формирования масляных тел. Область рециркуляции липидов. Формирование плазмодесм.

Тема 7. Аппарат Гольджи.

Тонкое строение аппарата Гольджи. Основные клеточные процессы, связанные с аппаратом Гольджи. Секреторная функция аппарата Гольджи. Модификации белков в аппарате Гольджи. Сортировка белков в аппарате Гольджи. Растительный аппарат Гольджи.

Тема 8. Эндомембранные структуры вакуолярной природы.

Лизосомы. Строение и функции. Наборы ферментов. Мембранные гликопротеиды LAMP1 и LAMP2 как маркеры лизосом. Классификация лизосом, происхождение. Внутриклеточное пищеварение и участие в обмене веществ. Аутофагия. Три типа аутофагии. Автолиз. Сферосомы, пероксисомы, глиоксисомы. Строение и функции сферосом. Строение и функции пероксисом. Роль ферментов в клеточном метаболизме. Глиоксисомы – разновидность пероксисом. Глиоксисомы – особые пероксисомы простейших. Транспорт белков в пероксисомы. Образование пероксисом. Растительные вакуоли. Строение и основные функции. Формирование вакуолей. Аутофагия – особый случай формирования вакуолей. Два типа вакуолей растительных клеток.

Модуль контроля 3 (МК₃). Контроль усвоения раздела «Цитозоль и эндомембранные структуры»

Модуль обеспечивает контроль основных понятий, знаний и умений, освоенных магистрантами в результате изучения раздела «Цитозоль и эндомембранные структуры». Контроль осуществляется в форме

контрольной работы или тестирования с разноуровневыми заданиями (уровень узнавания; воспроизведение по памяти; воспроизведение на уровне понимания и применения знаний в знакомой ситуации; применение знаний в незнакомой ситуации; творческая деятельность). Также магистранты выполняют задания УСР № 3 теме «Цитозоль».

РАЗДЕЛ 4 СИСТЕМЫ ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ КЛЕТКИ

Модуль 4 (М4). Системы энергообеспечения клетки

Тема 9. Митохондрии.

Строение митохондрий, их происхождение. Наружная мембрана, межмембранное пространство, внутренняя мембрана, матрикс митохондрий. Кардиолипид. Митохондриальная ДНК, строение, репликация. Митохондриальные белки. Функции митохондрий и энергопреобразование. Липопротеидные комплексы митохондрий. Дыхательная цепь. Убихинон. АТФ-синтаза, строение, механизм синтеза АТФ. Растительные митохондрии. Особенности строения. Белоксинтезирующий аппарат растительных митохондрий. Митохондриальные рибосомы. Транспорт цитозольных белков в митохондрии.

Тема 10. Пластиды.

Общая характеристика пластид. Происхождение пластид. Первичные и вторичные пластиды. Общие черты строения пластид высших растений. Размножение и наследование пластид высших растений. Функции пластид. Пропластиды, лейкопласты: амилопласты, элайопласты и протеинопласты, этиопласты, хромопласты, хлоропласты, хромофоры водорослей. Фотосинтезирующие структуры низших эукариотических и прокариотических клеток. Хлоропласты высших растений. Условия, необходимые для преобразования энергии. Основные принципы структурной организации хлоропластов. Химический состав и физические свойства тилакоидных мембран. Липидный состав мембран тилакоидов. Белковые компоненты тилакоидных мембран. Вода и неорганические ионы. Ультраструктура внутренних мембран хлоропластов. Асимметрия мембран. Геном и белоксинтезирующая система хлоропластов. Основные группы генов. Типы РНК-полимераз. Рибосомы пластид. Транспорт цитозольных белков в пластиды.

Модуль контроля 4 (МК₄). Контроль усвоения раздела «Системы энергообеспечения клетки»

Модуль обеспечивает контроль основных понятий, знаний и умений, освоенных магистрантами в результате изучения раздела «Системы энергообеспечения клетки». Контроль осуществляется в форме контрольной работы или тестирования с разноуровневыми заданиями (уровень узнавания;

воспроизведение по памяти; воспроизведение на уровне понимания и применения знаний в знакомой ситуации; применение знаний в незнакомой ситуации; творческая деятельность). Также магистранты выполняют задания УСР № 4 теме «Митохондрии».

РАЗДЕЛ 5 ЦИТОСКЕЛЕТ И ПРОИЗВОДНЫЕ ПРОТОПЛАСТА

Модуль 5 (М5). Цитоскелет и производные протопласта

Тема 11. Опорно-двигательная система цитоплазмы.

Промежуточные филаменты. Микрофиламенты. Общие свойства. Актиниозомы. Комплексы немиелиновых клеток. Мышечные клетки. Микротрубочки. Общая характеристика. Центры организации микротрубочек. Динеины и кинезины – моторные белки. Клеточный центр. Центросомы и центриоли. Центросомный цикл. Базальные тельца, строение и движение ресничек и жгутиков.

Тема 12. Производные протопласта.

Клеточная оболочка. Состав и организация клеточной оболочки. Целлюлозный каркас, матрикс: гемицеллюлозы, пектины, вода. Химические видоизменения клеточной оболочки. Лигнификация, суберинизация, кутинализация, минерализация, ослизнение, камедетечение. Эргастические вещества или включения. Запасные питательные вещества. Кристаллы. Вещества вторичного синтеза. Клеточный сок. Состав клеточного сока.

Модуль контроля 5 (МК5). Контроль усвоения раздела «Цитоскелет и производные протопласта»

Модуль обеспечивает контроль основных понятий, знаний и умений, освоенных магистрантами в результате изучения раздела «Цитоскелет и производные протопласта». Контроль осуществляется в форме контрольной работы или тестирования с разноуровневыми заданиями (уровень узнавания; воспроизведение по памяти; воспроизведение на уровне понимания и применения знаний в знакомой ситуации; применение знаний в незнакомой ситуации; творческая деятельность). Также магистранты выполняют задания УСР № 5 теме «Опорно-двигательная система цитоплазмы».

РАЗДЕЛ 6 КЛЕТОЧНАЯ ЖИЗНЬ, СМЕРТЬ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

Модуль 6 (М6). Клеточная жизнь, смерть и канцерогенез

Тема 13. Рост и деление клеток.

Рост и деление клеток. Механизмы контроля роста клеток. Деление прокариотических клеток. Деление эукариотических клеток. Амитоз, митоз, мейоз. Клеточный цикл и его регуляция. Фазы клеточного цикла эукариот.

Регуляция клеточного цикла. Контрольные точки клеточного цикла. Нарушения клеточного цикла и образование опухолей. Стволовые клетки. Свойства. Тотипотентные, плюрипотентные, мультипотентные, олигопотентные и унипотентные стволовые клетки. Эмбриональные, фетальные и постнатальные стволовые клетки. Гемопоетические стволовые клетки. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки. Тканеспецифичные прогениторные клетки. Стволовые клетки раковых опухолей. Использование стволовых клеток в медицине и косметологии.

Тема 14. Гибель клеток.

Биологические деструктивные процессы. Клеточная гибель. Физиологическая (естественная), насильственная, возрастная (старческая) гибель клеток. Апоптоз. Сигнальная фаза. Рецептор-зависимый и митохондриальный сигнальный путь. Эффекторная фаза. Деградиционная фаза. Морфология апоптоза. Регуляция апоптоза. Белок p53. Онкоз. Схема онкоза на примере гипоксической гибели клетки. Некроз. Изменения ядер, цитоплазмы и межклеточных структур. Стадии некроза. Отличия некроза и апоптоза.

Тема 15. Молекулярные механизмы канцерогенеза.

Механизмы канцерогенеза. Рак как микроэволюционный процесс. Молекулярные основы поведения раковых клеток. Обнаружение генов, критичных для развития рака. Факторы, вызывающие мутации. Наиболее распространенные типы рака. Основные молекулярно-физиологические изменения в клетке, приводящие к возникновению опухолей. Клеточные культуры и их роль в раскрытии механизмов канцерогенеза.

Тема 15 Клеточная гибель у растений.

Апоптоз при индивидуальном развитии. Прорастание пыльцевой трубки. Соматический эмбриогенез. Алейроновые клетки. Клетки корневого чехлика. Формообразование листьев. Образование ксилемы и флоэмы. Старение листьев. Опадание листьев и созревших плодов. Реакции на патоген и стрессовые воздействия. Образованием активных форм кислорода. Денатурация белков. Шапероны и шаперонины. Механизмы апоптоза у растений. Внеклеточные сигналы. Этилен, АБК и другие фитогормоны. Элиситоры. Цинид-анион. Внутриклеточные сигналы. Кальциевая, липоксигеназная, NADPH-оксидазная, NO-синтазная и MAP-киназная системы. Участие митохондрий и хлоропластов в развитии ПКС. Реакция Мелера.

Тема 16 Молекулярные механизмы канцерогенеза.

Общие сведения о канцерогенезе. Протоонкогены. Семейство генов и белки Ras. Антиионкогены, опухолевые супрессоры. Белки p53, pRb и PTEN. Канцерогены. Классификация. Частота встречаемости. Механизм действия химических канцерогенов. Физические канцерогены, ультрафиолет и ионизирующие излучения. Биологические канцерогены. Онковирусы. Молекулярно-генетические основы онкогенеза. Опухолевый рост. Классификации опухолей. Доброкачественные и злокачественные опухоли.

Филадельфийская хромосома. Прорастание в соседние ткани и метастазирование. Первичное проявление рака. Общая схема онкогенеза. Профилактика злокачественных опухолей. Химиотерапия.

Тема 17 Культуры клеток животных и человека.

Получение и культивирование клеток человека и животных. Выделение клеток из тканей и органов. Типы культур клеток. Питательные среды для выращивания клеток. Современные способы культивирования клеток. Создание коллекций культур клеток. Методы контроля и паспортизации клеток. Крупнейшие мировые и отечественные коллекции культур клеток человека и животных. Паспортизация культур клеток. Контроль клеток. Контроль контаминации культур клеток микроорганизмами. Создание банков культур клеток и современные требования к их контролю.

Модуль контроля 6 (МК6). Контроль усвоения раздела «Клеточная жизнь, смерть и канцерогенез»

Модуль обеспечивает контроль основных понятий, знаний и умений, освоенных магистрантами в результате изучения раздела «Клеточная жизнь, смерть и канцерогенез». Контроль осуществляется в форме контрольной работы или тестирования с разноуровневыми заданиями (уровень узнавания; воспроизведение по памяти; воспроизведение на уровне понимания и применения знаний в знакомой ситуации; применение знаний в незнакомой ситуации; творческая деятельность). Также магистранты выполняют задания УСР № 6 теме «Клеточная гибель у растений».

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ КАРТА ДЛЯ ОЧНОЙ ФОРМЫ ОБУЧЕНИЯ

Номер раздела, модуля, темы	Название раздела, модуля, темы; перечень изучаемых вопросов	Количество часов				Материальное обеспечение занятия (наглядные, методические пособия и др.)	Литература	Формы контроля знаний
		лекции	практические (семинарские) занятия	лабораторные занятия	управляемая самостоятельная работа			
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Раздел 1	Структурная и функциональная организация ядерного аппарата клетки.	2	2		2			
М1	<i>Структурная и функциональная организация ядерного аппарата клетки.</i>	2	2		2			
Тема 1	Строение и химия клеточного ядра. 1 Морфология ядерных структур. 2 Структура и химия хроматина. 3 Ядерный белковый матрикс. 4 Хромонемный уровень упаковки хроматина.	2	2			Курс лекций, презентация	[1-5, 13-16]	Творческие задания для малых групп
Тема 2	Ядерные транскрипты и их транспорт 1 Ядрышко – источник рибосом. 2 Нерибосомные продукты клеточного ядра. 3 Ядерная оболочка				2	Курс лекций, презентация	[1-5, 13-16]	Текст УСР и презентация.
Раздел 2	Клеточные мембраны.	2	2		2			
М2	<i>Клеточные мембраны.</i>	2	2		2			
Тема 3	Состав и свойства биологических мембран. 1 Общие свойства биологических мембран. 2 Структура биомембран. 3 Барьерно-транспортная роль плазмалеммы.				2	Курс лекций, презентация	[3- 6, 10, 11, 13-16]	Текст УСР и презентация.
Тема 4	Транспорт веществ через мембрану. 1 Характеристика транспортных процессов. 2 Везикулярный перенос: эндоцитоз и экзоцитоз.	2	2			Курс лекций, презентация	[3- 6, 8 - 11, 13-16]	Творческие задания для малых групп
Раздел 3	Цитозоль и эндомембранные структуры.	6	4		2			
М3	<i>Цитозоль и эндомембранные структуры.</i>	6	4		2			
Тема 5	Цитозоль. 1 Основные определения. Разграничение понятий. 2 Химический состав цитозоля. 3 Организация и функции цитозоля				2	Курс лекций, презентация	[1-6, 11, 13-16]	Текст УСР и презентация.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Тема 6	Эндоплазматический ретикулум. 1 Вакуолярная система внутриклеточного транспорта. 2 Гранулярный эндоплазматический ретикулум. 3 Гладкий эндоплазматический ретикулум. 4 Эндоплазматический ретикулум растительных клеток.	2	2			Курс лекций, презентация	[1-6, 11, 13-16]	Творческие задания для малых групп
Тема 7	Аппарат Гольджи. 1 Строение аппарата Гольджи. 2 Основные клеточные процессы, связанные с аппаратом Гольджи. 3 Растительный аппарат Гольджи.	2				Курс лекций, презентация	[1-6, 11, 13-16]	
Тема 8	Эндоплазматические структуры вакуолярной природы. 1 Лизосомы. 2 Сферосомы, пероксисомы, глиоксисомы. 3 Растительные вакуоли.	2	2				[1-6, 11, 13-16]	Творческие задания для малых групп
Раздел 4	Системы энергообеспечения клетки	2	2		2			
М4	<i>Системы энергообеспечения клетки</i>	2	2		2			
Тема 9	Митохондрии 1 Строение митохондрий. 2 Функции митохондрий и энергопреобразование. 3 Растительные митохондрии.				2	Курс лекций, презентация	[3-7, 11, 13-16]	Текст УСР и презентация.
Тема 10	Пластиды 1 Общая характеристика пластид. 2 Хлоропласты высших растений. 3 Геном и белоксинтезирующая система хлоропластов.	2	2			Курс лекций, презентация	[6-9, 11, 13-16]	Творческие задания для малых групп
Раздел 5	Цитоскелет и производные протопласта	2	2		2			
М5	<i>Цитоскелет и производные протопласта</i>	2	2		2			
Тема 11	Опорно-двигательная система цитоплазмы. 1 Промежуточные филаменты и микрофиламенты. 2 Микротрубочки. 3 Клеточный центр. 4 Кинетосома, реснички, жгутики.				2	Курс лекций, презентация	[1-6, 11, 13-16]	Текст УСР и презентация.
Тема 12	Производные протопласта. 1 Клеточная оболочка. 2 Эргастические вещества или включения. 3 Клеточный сок.	2	2			Курс лекций, презентация	[1-6, 11, 13-16]	Творческие задания для малых групп

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Раздел 6	Клеточная жизнь, смерть и канцерогенез	8	4		2			
М6	Клеточная жизнь, смерть и канцерогенез	8	4		2			
Тема 13	Рост и деление клеток. 1 Рост и деление клеток. 2 Клеточный цикл и его регуляция. 3 Стволовые клетки.	2				Курс лекций, презентация	[2-5, 12-16]	
Тема 14	Гибель клеток. 1 Биологические деструктивные процессы. 2 Апоптоз. 3 Онкоз. 4 Некроз.	2	2			Курс лекций, презентация	[2-5, 12-16]	Творческие задания для малых групп
Тема 15	Клеточная гибель у растений. 1 Апоптоз при индивидуальном развитии. 2 Реакции на патоген и стрессовые воздействия. 3 Механизмы апоптоза у растений.				2	Курс лекций, презентация	[2-5, 12-16]	Текст УСР и презентация.
Тема 16	Молекулярные механизмы канцерогенеза. 1 Общие сведения о канцерогенезе. 2 Канцерогены. 3 Молекулярно-генетические основы онкогенеза. 4 Общая схема онкогенеза.	2	2			Курс лекций, презентация	[2-5, 12-16]	Творческие задания для малых групп
Тема 17	Культуры клеток животных и человека 1 Получение и культивирование клеток человека и животных. 2 Создание коллекций культур клеток. 3 Создание банков культур клеток и современные требования к их контролю.	2				Курс лекций, презентация	[2-5, 12-16]	
	Всего часов	22	16		12			Экзамен во 2 семестре

Доцент кафедры ботаники и физиологии растений, к.б.н.

О. М. Храмченкова

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ КАРТА ДЛЯ ЗАОЧНОЙ ФОРМЫ ОБУЧЕНИЯ

Номер раздела, модуля, темы	Название раздела, модуля, темы; перечень изучаемых вопросов	Количество часов				Материальное обеспечение занятия (наглядные, методические пособия и др.)	Литература	Формы контроля знаний
		лекции	практические (семинарские) занятия	лабораторные занятия	управляемая самостоятельная работа			
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Раздел 1	Структурная и функциональная организация ядерного аппарата клетки.							
М1	<i>Структурная и функциональная организация ядерного аппарата клетки.</i>							
Тема 1	Строение и химия клеточного ядра. 1 Морфология ядерных структур. 2 Структура и химия хроматина. 3 Ядерный белковый матрикс. 4 Хромонемный уровень упаковки хроматина.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[1-5, 13-16]	
Тема 2	Ядерные транскрипты и их транспорт 1 Ядрышко – источник рибосом. 2 Нерибосомные продукты клеточного ядра. 3 Ядерная оболочка	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[1-5, 13-16]	
Раздел 2	Клеточные мембраны.	2	2					
М2	<i>Клеточные мембраны.</i>	2	2					
Тема 3	Состав и свойства биологических мембран. 1 Общие свойства биологических мембран. 2 Структура биомембран. 3 Барьерно-транспортная роль плазмалеммы.	2	2	[3- 6, 10, 11, 13-16]		Курс лекций, презентация	[1-3, 6-10, 13-17]	Творческие задания для малых групп
Тема 4	Транспорт веществ через мембрану. 1 Характеристика транспортных процессов. 2 Везикулярный перенос: эндоцитоз и экзоцитоз.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[3- 6, 8 - 11, 13-16]	
Раздел 3	Цитозоль и эндомембранные структуры.	2	2					
М3	<i>Цитозоль и эндомембранные структуры.</i>	2	2					
Тема 5	Цитозоль. 1 Основные определения. Разграничение понятий. 2 Химический состав цитозоля. 3 Организация и функции цитозоля	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[1-6, 11, 13-16]	

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Тема 6	Эндоплазматический ретикулум. 1 Вакуолярная система внутриклеточного транспорта. 2 Гранулярный эндоплазматический ретикулум. 3 Гладкий эндоплазматический ретикулум. 4 Эндоплазматический ретикулум растительных клеток.	2				Курс лекций, презентация	[1-6, 11, 13-16]	
Тема 7	Аппарат Гольджи. 1 Строение аппарата Гольджи. 2 Основные клеточные процессы, связанные с аппаратом Гольджи. 3 Растительный аппарат Гольджи.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[1-3, 6-10, 13-17]	
Тема 8	Эндоплазматический ретикулум. 1 Лизосомы. 2 Сферосомы, пероксисомы, глиоксисомы. 3 Растительные вакуоли.		2				[1-6, 11, 13-16]	Творческие задания для малых групп
Раздел 4	Системы энергообеспечения клетки	2						
М4	Системы энергообеспечения клетки	2						
Тема 9	Митохондрии 1 Строение митохондрий. 2 Функции митохондрий и энергопреобразование. 3 Растительные митохондрии.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[1-3, 6-10, 13-17]	
Тема 10	Пластиды 1 Общая характеристика пластид. 2 Хлоропласты высших растений. 3 Геном и белоксинтезирующая система хлоропластов.	2				Курс лекций, презентация	[6-9, 11, 13-16]	
Раздел 5	Цитоскелет и производные протопласта	2						
М5	Цитоскелет и производные протопласта	2						
Тема 11	Опорно-двигательная система цитоплазмы. 1 Промежуточные филаменты и микрофиламенты. 2 Микротрубочки. 3 Клеточный центр. 4 Кинетосома, реснички, жгутики.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[1-3, 6-10, 13-17]	
Тема 12	Производные протопласта. 1 Клеточная оболочка. 2 Эргастические вещества или включения. 3 Клеточный сок.	2	2			Курс лекций, презентация	[1-6, 11, 13-16]	

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Раздел 6	Клеточная жизнь, смерть и канцерогенез	2	2					
М6	Клеточная жизнь, смерть и канцерогенез	2	2					
Тема 13	Рост и деление клеток. 1 Рост и деление клеток. 2 Клеточный цикл и его регуляция. 3 Стволовые клетки.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[2-5, 12-16]	
Тема 14	Гибель клеток. 1 Биологические деструктивные процессы. 2 Апоптоз. 3 Онкоз. 4 Некроз.		2	[2-5, 12-16]		Курс лекций, презентация	[1-3, 6-10, 13-17]	Творческие задания для малых групп
Тема 15	Клеточная гибель у растений. 1 Апоптоз при индивидуальном развитии. 2 Реакции на патоген и стрессовые воздействия. 3 Механизмы апоптоза у растений.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[2-5, 12-16]	
Тема 16	Молекулярные механизмы канцерогенеза. 1 Общие сведения о канцерогенезе. 2 Канцерогены. 3 Молекулярно-генетические основы онкогенеза. 4 Общая схема онкогенеза.	2		[2-5, 12-16]		Курс лекций, презентация	[1-3, 6-10, 13-17]	
Тема 17	Культуры клеток животных и человека 1 Получение и культивирование клеток человека и животных. 2 Создание коллекций культур клеток. 3 Создание банков культур клеток и современные требования к их контролю.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[2-5, 12-16]	
	Всего часов	10	6					Экзамен во 2 семестре

Доцент кафедры ботаники и физиологии растений, к.б.н.

О. М. Храмченкова

ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

I ЛИТЕРАТУРА

Основная

- 1 Албертс, Б. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Албертс, Д. Брей, К. Хопкин. – М.: Лаборатория знаний, 2018. – 768 с.
- 2 Фаллер, Д.М. Молекулярная биология клетки / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс. – М.: БИНОМ, 2017. – 256 с.
- 3 Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов, Москва: МИА, 2007. – 536 с.
- 4 Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: Академкнига, 2004. – 495 с.
- 5 Эллиот, В. Биохимия и молекулярная биология / В. Эллиот, Д. Эллиот. – М.: Академкнига, 2003. – 446 с.
- 6 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 1: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 437 с.
- 7 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 459 с.
- 8 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.
- 9 Биохимия растений / Б. Хельд. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. - 471 с.

Дополнительная

- 10 Болдырев, А.А. Биомембранология: учебное пособие / А.А. Болдырев, Е.И. Кяйвярайнен, В.А. Илюха. – Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН, 2006. – 226 с.
- 11 Негроров, В.В. Растительная клетка: учебное пособие / В.В. Негроров. – Воронеж: ВГУ, 2010. – 171 с.
- 12 Киселев, Ф.Л. Молекулярная онкология: от вирусной теории к лечению рака / Ф.Л. Киселев, Е.Н. Имянитов, Н.П. Киселева, Е.С. Левина. – М.: ГЕОС, 2013. – 152 с.

Интернет-ресурсы

- 13 База научных данных в области биомедицинских наук – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed>.
- 14 Сайт лаборатории клеточной биотехнологии. – Режим доступа: <http://science.spb.ru/sci/item/cellbio-2>
- 15 Сайт по биотехнологии. – Режим доступа: <http://jbio.ru/biotexnologiya-mikrobiologicheskij-sintez-kletochnaya-i-gennaya-inzheneriya>
- 16 Энциклопедия: Фонд знаний – Ломоносов – lomonosov-fund.ru?enc/ru/encyclopedia:0132746.

II ПЕРЕЧЕНЬ КОНТРОЛЬНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ УПРАВЛЯЕМОЙ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ И МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОРГАНИЗАЦИИ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ МАГИСТРАНТОВ

Для организации самостоятельной работы магистрантов по учебной дисциплине рекомендуется использовать современные информационные технологии: разместить в сетевом доступе комплекс учебных и учебно-методических материалов (программа учебной дисциплины, учебно-методический комплекс, методические указания к практическим занятиям, задания в тестовой форме, темы рефератов, список рекомендуемой литературы и информационных ресурсов и др.). Для общей оценки качества усвоения магистрантами учебного материала предлагается использование рейтинговой системы.

УСР № 1. Ядерные транскрипты и их транспорт

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

- 1 Ядрышко – источник рибосом.
- 2 Нерибосомные продукты клеточного ядра.
- 3 Ядерная оболочка

Форма работы – индивидуальная.

Форма контроля выполнения заданий: проверка конспектов.

Учебно-методическое обеспечение:

- 1 Албертс, Б. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Албертс, Д. Брей, К. Хопкин. – М.: Лаборатория знаний, 2018. – 768 с.
- 2 Фаллер, Д.М. Молекулярная биология клетки / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс. – М: БИНОМ, 2017. – 256 с.
- 3 Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов, Москва: МИА, 2007. – 536 с.
- 4 Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: Академкнига, 2004. – 495 с.
- 5 Эллиот, В. Биохимия и молекулярная биология / В. Эллиот, Д. Эллиот. – М.: Академкнига, 2003. – 446 с
- 6 Негроров, В.В. Растительная клетка: учебное пособие / В.В. Негроров. – Воронеж: ВГУ, 2010. – 171 с.

УСР № 2. Состав и свойства биологических мембран

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

- 1 Общие свойства биологических мембран.
- 2 Структура биомембран.
- 3 Барьерно-транспортная роль плазмалеммы.

Учебно-методическое обеспечение:

- 1 Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов, Москва: МИА, 2007. – 536 с.
- 2 Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: Академкнига, 2004. – 495 с.
- 3 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 1: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 437 с.
- 4 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.
- 5 Биохимия растений / Б. Хельд. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. - 471 с.
- 6 Болдырев, А.А. Биомембранология: учебное пособие / А.А. Болдырев, Е.И. Кяйвярайнен, В.А. Илюха. – Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН, 2006. – 226 с.

УСР № 3. Цитозоль

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

- 1 Основные определения. Разграничение понятий.
- 2 Химический состав цитозоля.
- 3 Организация и функции цитозоля

Учебно-методическое обеспечение:

- 1 Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: Академкнига, 2004. – 495 с.
- 2 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 1: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 437 с.
- 3 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.
- 4 Биохимия растений / Б. Хельд. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. - 471 с.
- 5 Негроров, В.В. Растительная клетка: учебное пособие / В.В. Негроров. – Воронеж: ВГУ, 2010. – 171 с.
- 6 База научных данных в области биомедицинских наук – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed>.
- 7 Энциклопедия: Фонд знаний – Ломоносов – lomonosov-fund.ru?enc/ru/encyclopedia:0132746.

УСР № 4. Митохондрии

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

1 Строение митохондрий.

2 Функции митохондрий и энергопреобразование.

3 Растительные митохондрии.

Учебно-методическое обеспечение:

1 Албертс, Б. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Албертс, Д. Брей, К. Хопкин. – М.: Лаборатория знаний, 2018. – 768 с.

2 Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: Академкнига, 2004. – 495 с.

3 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

4 Биохимия растений / Б. Хельд. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. - 471 с.

5 База научных данных в области биомедицинских наук – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed>.

6 Сайт лаборатории клеточной биотехнологии. – Режим доступа: <http://science.spb.ru/sci/item/cellbio-2>

7 Энциклопедия: Фонд знаний – Ломоносов – lomonosov-fund.ru?enc/ru/encyclopedia:0132746.

УСР № 5. Опорно-двигательная система цитоплазмы

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

1 Промежуточные филаменты и микрофиламенты.

2 Микротрубочки.

3 Клеточный центр.

4 Кинетосома, реснички, жгутики.

Учебно-методическое обеспечение:

1 Албертс, Б. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Албертс, Д. Брей, К. Хопкин. – М.: Лаборатория знаний, 2018. – 768 с.

2 Фаллер, Д.М. Молекулярная биология клетки / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс. – М.: БИНОМ, 2017. – 256 с.

3 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 1: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 437 с.

4 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

5 Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: Академкнига, 2004. – 495 с.

6 Энциклопедия: Фонд знаний – Ломоносов – lomonosov-fund.ru?enc/ru/encyclopedia:0132746.

УСР № 6. Клеточная гибель у растений

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

- 1 Апоптоз при индивидуальном развитии.
- 2 Реакции на патоген и стрессовые воздействия.
- 3 Механизмы апоптоза у растений.

Учебно-методическое обеспечение:

- 1 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 1: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 437 с.
- 2 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 459 с.
- 3 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.
- 4 Биохимия растений / Б. Хельд. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. - 471 с.
- 5 Болдырев, А.А. Биомембранология: учебное пособие / А.А. Болдырев, Е.И. Кяйвярйнен, В.А. Илюха. – Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН, 2006. – 226 с.
- 6 Негроров, В.В. Растительная клетка: учебное пособие / В.В. Негроров. – Воронеж: ВГУ, 2010. – 171 с.

III ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ РЕЗУЛЬТАТОВ УЧЕБНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ МАГИСТРАНТОВ

В качестве формы итогового контроля по дисциплине рекомендован экзамен. Оценка учебных достижений магистранта осуществляется на экзамене и производится по десятибалльной шкале. Для текущего контроля и самоконтроля знаний и умений магистрантов по данной дисциплине можно использовать следующий диагностический инструментарий:

- оценка участие в интерактивных лекциях;
- подготовка презентаций на заданную тему;
- устные опросы;
- письменные контрольные работы по отдельным темам курса.

IV ПЕРЕЧЕНЬ ПРАКТИЧЕСКИХ (СЕМИНАРСКИХ) ЗАНЯТИЙ

Очная форма получения образования, 2 часа каждое

Занятие 1. Организация ядерного генома.

Творческие задания для малых групп. Коучинг.

Рассматриваемые вопросы: Современные представления об организации клеточного ядра. Строение ядерной оболочки и ядерных пор.

Структура и репликация хромосомы. Синтез и процессинг РНК. Контроль генной экспрессии. Дифференцировка клеток и ее связь с экспрессией генов. Роль ядра и цитоплазмы в экспрессии и репрессировании генов.

Занятие 2. Активные формы кислорода и состояние окислительного стресса в клетке.

Интерактивная лекция.

Рассматриваемые вопросы: Активные формы кислорода и продукты первичного окисления липидов как сигнальные молекулы. Нарушения мембранных структур, связанные с повышением концентрации АФК. Окислительный стресс у растений. Повреждения биомолекул активными формами кислорода. Окислительный стресс у животных и человека. Повреждения биомолекул активными формами кислорода. Детоксикация продуктов окислительной модификации биомолекул. Механизмы повреждения ДНК и ядерных мембран активными формами кислорода

Занятие 3. Эволюция клетки.

Интерактивная лекция. Коучинг.

Рассматриваемые вопросы: Возникновение первой клетки. Формирование метаболизма. Прокариоты и эукариоты: сходства и различия. Многоклеточность. Химические компоненты клетки. Упорядоченность биологических систем и энергия. Питательные вещества и источники энергии клетки. Биосинтез и создание упорядоченности. Координация катаболизма и биосинтеза в клетке.

Занятие 4. Эндоплазматические структуры.

Интерактивная лекция. Коучинг.

Рассматриваемые вопросы: Общая схема функционирования вакуолярной системы. Взаимодействие органоидов вакуолярной системы. Современные представления о строении и функционировании гранулярного эндоплазматического ретикулума. Котрансляционный транспорт растворимых белков. Синтез мембранных белков. Транспорт между эндоплазматическим ретикуломом и аппаратом Гольджи. Особенности организации аппарата Гольджи в различных типах клеток. Молекулярные маркеры лизосом. Классификация лизосом. Набор лизосомальных ферментов. Функция лизосом. «Лизосомные» болезни (наследственные и приобретенные).

Занятие 5. Биоэнергетика клетки.

Интерактивная лекция. Коучинг.

Рассматриваемые вопросы: Молекулярная и ультраструктурная организация митохондрий, пластид. Первичные механизмы преобразования энергии, редокс циклы и синтез макроорганических соединений в цитозоле

клеток. Преобразование энергии в процессах фотосинтетического и окислительного фосфорилирования. Хемиосмотическая теория синтеза АТФ. Вторичные механизмы преобразования энергии. Способы энергообеспечения механического движения, трансмембранного переноса веществ, биосинтезов, деления клеток.

Занятие 6. Цитоскелет эукариот и прокариот.

Творческие задания для малых групп. Коучинг.

Рассматриваемые вопросы: Основные типы, молекулярная организация и исполнительные механизмы систем, обеспечивающих движение. Системы движения, основанные на полимеризации (деполимеризации) и взаимодействии микротрубочек и актиновых нитей. Тубулины, G- и F-актин, миозин, MAP и BAM и другие белки как элементы «конструктора» для построения цитоскелета. Динеины и кинезины – моторные белки. Клеточный центр. Центросомы и центриоли. Центросомный цикл. Базальные тельца, строение и движение ресничек и жгутиков. Цитоскелет растительных клеток – особенности организации и функционирования.

Занятие 7. Клеточная гибель. Некроз и апоптоз.

Интерактивная лекция.

Рассматриваемые вопросы: Классификации некрозов животных и человека: по этиологии, клинико-морфологическая; по механизму возникновения. Причины некрозов. Изменения в клетках и тканях животных и человека, происходящие при некрозах. Некрозы у растений – основные особенности, классификация, изменения в клетках и тканях, происходящие при некрозах. Фазы апоптоза: сигнальная, эффекторная, деградационная. Регуляция апоптоза. Роль апоптоза в организме животных и человека. Патологии, обусловленные нарушениями апоптоза. Апоптоз у прокариот. Апоптоз у одноклеточных эукариот. Апоптоз у многоклеточных эукариот. Апоптоз у растений.

Занятие 8. Молекулярно-генетические аспекты канцерогенеза.

Интерактивная лекция. Коучинг.

Рассматриваемые вопросы: Возникновение первой клетки. Формирование метаболизма. Механизмы канцерогенеза: теория четырехстадийности. Стадии формирования опухоли. Системная эволюция опухоли. Теория клональной экспансии. Теория раковых стволовых клеток. Современные представления о принципах развития опухоли. Циркулирующие опухолевые клетки. Генетическая и фенотипическая гетерогенность опухолевой ткани. Особенности использования в клинической практике. Методы оценки. Современное состояние проблемы. Понятие о микроокружении. Инвазия. Подготовка ниши. Регионарные и удаленные метастазы. Внутриопухолевые взаимодействия. Устойчивость опухоли к терапии. Ключевые «точки» инициации устойчивости. Комплексное представление. Системный подход к проблеме преодоления

лекарственной устойчивости. Тактика сдерживающей терапии. Иммуноterapia опухолей. Противоопухолевые вакцины.

Заочная форма получения образования, 2 часа каждое

Занятие 1. Активные формы кислорода и состояние окислительного стресса в клетке.

Интерактивная лекция.

Рассматриваемые вопросы: Активные формы кислорода и продукты первичного окисления липидов как сигнальные молекулы. Нарушения мембранных структур, связанные с повышением концентрации АФК. Окислительный стресс у растений. Повреждения биомолекул активными формами кислорода. Окислительный стресс у животных и человека. Повреждения биомолекул активными формами кислорода. Детоксикация продуктов окислительной модификации биомолекул. Механизмы повреждения ДНК и ядерных мембран активными формами кислорода

Занятие 2. Эндоплазматические структуры.

Интерактивная лекция. Коучинг.

Рассматриваемые вопросы: Общая схема функционирования вакуолярной системы. Взаимодействие органоидов вакуолярной системы. Современные представления о строении и функционировании гранулярного эндоплазматического ретикулума. Котрансляционный транспорт растворимых белков. Синтез мембранных белков. Транспорт между эндоплазматическим ретикулом и аппаратом Гольджи. Особенности организации аппарата Гольджи в различных типах клеток. Молекулярные маркеры лизосом. Классификация лизосом. Набор лизосомальных ферментов. Функция лизосом. «Лизосомные» болезни (наследственные и приобретенные).

Занятие 3. Клеточная гибель. Некроз и апоптоз.

Интерактивная лекция.

Рассматриваемые вопросы: Классификации некрозов животных и человека: по этиологии; клинко-морфологическая; по механизму возникновения. Причины некрозов. Изменения в клетках и тканях животных и человека, происходящие при некрозах. Некрозы у растений – основные особенности, классификация, изменения в клетках и тканях, происходящие при некрозах. Фазы апоптоза: сигнальная, эффекторная, деградационная. Регуляция апоптоза. Роль апоптоза в организме животных и человека. Патологии, обусловленные нарушениями апоптоза. Апоптоз у прокариот. Апоптоз у одноклеточных эукариот. Апоптоз у многоклеточных эукариот. Апоптоз у растений.

V ИТОГОВАЯ АТТЕСТАЦИЯ ПО ДИСЦИПЛИНЕ

По дисциплине «Клеточная биология» предусмотрено написание экзаменационной работы. Экзаменационная работа выполняется в электронном виде, включает титульный лист, основное содержание и список использованных источников информации (книги, статьи, интернет-источники). Объем экзаменационной работы – не менее 20 страниц основного текста. Источников информации – не менее 15.

Оформление страницы: поля: верхнее и нижнее – 2 см; левое – 3 см; правое – 1 см. Шрифт Times New Roman, 14 pt. Абзацный отступ – 1,25 см; выравнивание по ширине, междустрочный интервал – одинарный.

Отдельные страницы: титульный лист и список использованных источников.

Текст освещается по плану, снабжается цветными иллюстрациями с подписями.

Титульный лист и список использованных источников оформляется по СТП.

Примерная тематика экзаменационных работ:

- 1 Эволюция электрон-транспортных цепей.
- 2 Геномы митохондрий и хлоропластов.
- 3 Дифференцировка клеток и поддержание нормальной организации тканей.
- 4 Механизмы апоптоза.
- 5 Вирусная инфекция и геном.
- 6 Стволовые клетки и регуляция их популяции. Роль стволовых клеток в норме и патологии.
- 7 История возникновения и развития клеточных теорий.
- 8 Возникновение первой клетки. Формирование метаболизма.
- 9 Механизмы транспорта молекул внутри ядра.
- 10 Общая характеристика и классификация фотобиологических процессов и их стадий.

VI СТРУКТУРА РЕЙТИНГОВОЙ ОЦЕНКИ ЗНАНИЙ

Итоговая оценка по дисциплине (минимум 4, максимум 10 баллов) на основании данных ведомостей модульно-рейтинговой системы оценки знаний определяется по формуле:

$$\text{Итоговая оценка} = A \times 0,4 + B \times 0,6,$$

где A – средний балл текущей успеваемости, B – экзаменационный балл.

Итоговая оценка выставляется только в случае успешной сдачи экзамена (4 балла и выше).

Балл текущей успеваемости определяется по формуле:

$$A = (C + D) / 2,$$

где C – средний балл за 4 интерактивных практических (семинарских) занятия; D – среднее арифметическое оценок по 6 контрольным работам УСР.

**11 ПРОТОКОЛ СОГЛАСОВАНИЯ УЧЕБНОЙ ПРОГРАММЫ
ДИСЦИПЛИНЫ «ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ РАСТЕНИЙ С
ДРУГИМИ ДИСЦИПЛИНАМИ СПЕЦИАЛЬНОСТИ**

1 31 80 01 Биология (профилизация Функциональная биология)

Название дисциплины, с которой требуется согласование	Название кафедры	Предложения об изменениях в содержании учебной программы по изучаемой учебной дисциплине	Решение, принятое кафедрой, разработавшей учебную программу (с указанием даты и номера протокола)
Мембраны и межклеточные коммуникации	Зоологии, физиологии и генетики	Содержание учебной программы одобрить	Рекомендовать к утверждению учебную программу в представленном варианте протокол № 10 от <u>18.04.</u> 2019 г.
Эпигенетика	Зоологии, физиологии и генетики	Содержание учебной программы одобрить	Рекомендовать к утверждению учебную программу в представленном варианте протокол № 10 от <u>18.04.</u> 2019 г.

**ДОПОЛНЕНИЯ И ИЗМЕНЕНИЯ К УЧЕБНОЙ ПРОГРАММЕ
ПО ИЗУЧАЕМОЙ УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ**

на ____/____ учебный год

№ п/п	Дополнения и изменения	Основание

Учебная программа пересмотрена и одобрена на заседании кафедры
ботаники и физиологии растений
(протокол № ____ от _____ 20__ г.)

Заведующий кафедрой химии _____ Н.М. Дайнеко

УТВЕРЖДАЮ

Декан биологического факультета

УО «ГГУ им. Ф. Скорины», д.б.н. _____ В.С. Аверин