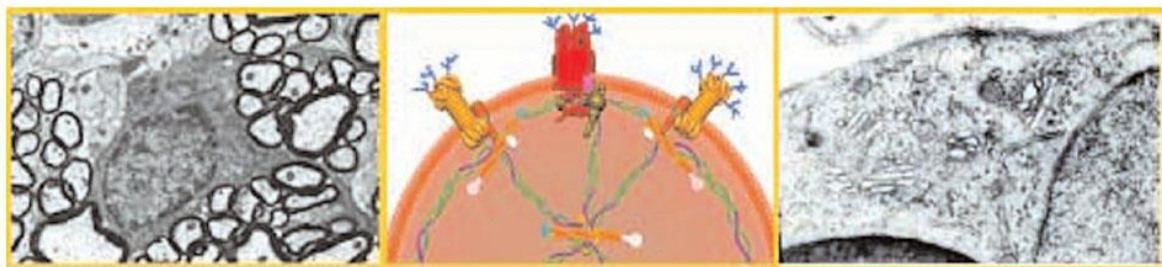


ЦИТОЛОГИЯ

Э.К.Гасымов

Доктор медицинских наук, профессор



Учебник утвержден на основе указа номер 732 Министерства
Образования Азербайджанской Республики от 25.10.2005 г.

Баку – «Time Print»- 2013

UDK:576.3

Одобрено Министерством Здравоохранения Азербайджанской Республики
(протокол № 97 Научно-медицинского Совета от 06.10.2005)

Перевод с азербайджанского:

Старший преподаватель А.И.Шахмамедова

Ассистент С.А.Исрафилова

Рецензенты:

Заведующий кафедрой Медицинской биологии и генетики АМУ, д.б.н.,
профессор А.А.Мехралиев

Профессор кафедры Гистологии, эмбриологии и цитологии
Азербайджанского Медицинского университета, д.м.н. Г.К. Мурадов.

Научные редакторы: доц. М.Р. Гулиев

доц.М.Т.Оруджев

Гасымов Э.К. Цитология. Учебник. Баку. «Time Print»- 2013

Издание третье, обработанное и дополненное

Учебник составлен на основании программы медицинского университета и с
учетом последней Гистологической Номенклатуры.

Третье издание отредактировано, даны новые материалы касательно
категорий клеток. Наряду со студентами медицинских ВУЗов учебник может
быть использован также студентами биологических факультетов,
аспирантами, цитологами и врачами.

ISBN 5-86874-214-1

Э.К. Гасымов, 2009

Данный учебник
посвящен моим
бывшим, настоящим и
будущим студентам

Автор

Предисловие

Вступление к данному учебнику хотелось бы начать с цитаты авторов учебного пособия «Общая гистология», изданного в 1975-м году на азербайджанском языке, проф.М.С. Абдуллаева и доц.Г.С. Абиева: *«В последние годы в результате стремительного развития гистологии, а в частности одного из ее разделов – цитологии, в этой области было выявлено много новшеств. Донести эти новшества до студентов без соответствующих учебников затруднительно. Цито- и гистологические открытия столь стремительны, что учебники изданные в последние десять лет можно считать устаревшими.....»*

Однако без преувеличения можно отметить, что в последние 30 лет совместное усердие физиков, математиков, биологов и ученых медицинской сферы позволило заново выстроить методические основы цитологии и повысить технические возможности в этой области. Имеющиеся новшества значительно расширили познания касательно структур, принимающих участие в организации клетки. Результатом этого являются изданные зарубежными изданиями многочисленные учебники ,посвященные клеточной биологии (цитологии). Гистологическая номенклатура раздела цитологии значительно расширилась в сравнении с предыдущей.

В представленном вам учебнике отображена самая последняя информация относительно химического состава и физических свойств клеточной мембраны, ее избирательной проницаемости, а также о взаимосвязи рецепторов клеточной мембраны с молекулами принимающими участие в эндо- и экзоцитозе и специализированных белков (каналы, переносчики, рецепторы) с элементами цитоскелета. В учебник включена информация о строении и механизмах деятельности как классических общепринятых органелл (ядро, центросома, рибосома, митохондрии, эндоплазматическая сеть, лизосомы, пероксисома, комплекс Гольджи), так и о не известных ранее органеллах (протеасома, эндосома).

Одним из наиболее важных открытий XX века является раскрытие генома человека. Принимая это во внимание, в данный учебник включена информация о деятельности международного комитета занимающегося проектом генома человека, а также его достижения.

Во время составления данного пособия наряду с монографиями и учебниками также использовались очерки и статьи, опубликованные в научной литературе данного периода. В конце каждого раздела указан весь использованный список литературы , а так же дополнительные материалы рекомендуемые для прочтения. В учебнике наряду со снимками трансмиссионного и сканирующего электронного микроскопа представлены пространственные схематические рисунки и таблицы, отображающие строение внутриклеточных структур и цитофизиологические процессы протекающие в клетке.

Принимая во внимание то, что предоставленная информация, а также термины используемые в последней номенклатуре являются сравнительно новыми, не исключается вероятность опечаток и погрешностей. В связи с этим все обоснованные замечания и предложения будут приняты и учтены в последующих изданиях.

Автор

Оглавление

Раздел 1. Общие понятия о клетке.....	4
Раздел 2. Клеточная мембрана – Плазмоллема.....	16
Общие сведения о строении клеточной мембраны.....	16
Химический состав клеточной мембраны.....	19
Липиды клеточной мембраны.....	19
Белки клеточной мембраны.....	24
Углеводы клеточной мембраны.....	27
Функции клеточной мембраны.....	28
Избирательная проницаемость.....	28
Насосы.....	30
АТФ-азы Р-типа.....	30
АТФ-азы F-типа.....	30
АТФ-азы V-типа.....	32
АТФ-азы ABC-типа.....	33
Каналы.....	34
Воротные ионные каналы.....	35
Открытые ионные каналы.....	40
Белки-переносчики.....	43
Одиночный транспорт (унипорт).....	44.
Сопряженный транспорт в одном (симпорт) и в противоположном (антипорт) направлениях.....	44
Эндоцитоз.....	46
Фагоцитоз.....	47
Макропиноцитоз.....	48
Микропиноцитоз.....	48
Обычный пиноцитоз (без покрытия).....	48
Кавеолы.....	50
Рецептор-опосредованный эндоцитоз – пиноцитоз с клатриновым покрытием.....	50
Экзоцитоз.....	53
Восприятие раздражений (рецепторная функция).....	56
Семиспиральные рецепторы.....	62
Фермент-опосредованные рецепторы.....	62
Рецепторы клеточной адгезии.....	63
Ядерные рецепторы.....	65
Вторичные посредники.....	65
G-белок.....	66
Циклические нуклеотиды.....	67
Производные фосфолипидов.....	69
Оксид азота.....	69
Раздел 3. Цитоплазма.....	73
Эктоплазма- кортикальная цитоплазма.....	73
Эндоплазма.....	80
Цитоскелет.....	80
Микрофиламенты.....	81
Промежуточные филаменты.....	86
Микротрубочки.....	91
Белки связанные с микротрубочками.....	95
Хемомеханические преобразователи.....	95
Жгутики и реснички.....	100
Движение клетки.....	104
Раздел 4. Органеллы и цитоплазматические включения.....	107
Клеточный центр – центросома.....	107
Митохондрии.....	113
Рибосомы.....	121
Эндоплазматическая сеть.....	126

.Гладкая эндоплазматическая сеть.....	127
Гранулярная эндоплазматическая сеть.....	129
Комплекс Гольджи.....	131
Эндосома.....	142
Циркуляция и переваривание клеточных биополимеров	145
Лизосомы.....	145
Протеасомы.....	151
Пероксисомы.....	154
Цитоплазматические включения.....	155
Раздел 5. Ядро.....	164
Ядерная оболочка.....	166
Наружная клеточная мембрана	168
Внутренняя клеточная мембрана.....	168
Ядерная пора.....	169
Нуклеоплазма.....	175
Хроматин.....	176
Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК).....	176
Гетерохроматин.....	182
Эухроматин.....	183
Ядрышко.....	183
Гены и их экспрессия.....	185
РНК.....	191
Геном.....	192
Митохондриальный геном.....	198
Строение метафазной хромосомы.....	198
Хромосомная сердцевина.....	201
Хромотиновое покрытие метафазной хромосомы.....	203
Раздел 6. Клеточный цикл.....	220
Интерфаза.....	221
G ₁ -фаза.....	225
S-фаза.....	225
G ₂ -фаза.....	228
Типы деления клеток.....	229
Амитоз.....	229
Митоз.....	229
Профаза.....	230
Метафаза.....	234
Анафаза.....	235
Телофаза.....	236
Мейоз.....	237
I мейоз (редукционное деление).....	238
I профаза.....	238
I метафаза.....	242
I анафаза.....	243
I телофаза.....	243
II мейоз (эквационное деление).....	243
Полиплоидия и хромосомные нарушения.....	244
Дифференцировка, старение и гибель клеток	245
Список использованной литературы	250

ОБЩИЕ ПОНЯТИЯ О КЛЕТКЕ

Одним из основных этапов развития *цитологии* (на греческом: *cytos*-клетка, *logos*-наука) стало создание клеточной теории.

Изобретение двухлинзовой цилиндрической трубки в начале XVII века итальянским ученым Г.Галлилеем позволило ему наряду с исследованием состояния небесных тел, изучать строение насекомых, а также, впоследствии, описать с удивительной точностью строение их зрительного аппарата. Однако его достижения в изучении живых организмов были не столь выдающимися в сравнении с открытиями, принесенными в науку астрономию.

Продолжительные дискуссии физиков касательно свойств, присущих свету (волновых или корпускулярных), ведущиеся во второй половине семнадцатого столетия, ознаменовались изобретением микроскопа. Таким образом появились обширные возможности для изучения тончайших структур живых организмов.

Первые источники информации о клетке принадлежат британскому физiku Роберту Гуку. При помощи собственноручно собранного микроскопа он выявил, что тонкие срезы коры дерева состоят из частиц, отделенных друг от друга перегородками (стенками). Он набросал рисунки этих частиц (рис. 1.1) и назвал их "*cellula*", что в переводе с латыни означает маленькая комната, камера. Так появился используемый в настоящее время термин "*клетка*".

Несмотря на то, что изобретение Р.Гука подтверждалось со стороны его многочисленных сторонников (М.Мальпиги, А.Левенгук, Н.Грю, Ф.Фонтана и др.), строение живых организмов, состоящих из клеток, все еще оставалось невыясненным.

Стремительное развитие технического оснащения микроскопов в начале девятнадцатого века привело к накоплению информации о структуре клеток. Я.Пуркин (1830) обнаружил, что элементы, необходимые для функционирования клетки, расположены не в стенке, а в протоплазме. Спустя всего год после этого, Роберт Браун обнаружил "сферическую структуру" в протоплазме клетки - ядро.

Суммируя информацию, полученную в результате изучения растительной и животной клеток, Теодор Шванн (1839) и Матиас Шлейден, выдвинули первые два постулата **клеточной теории**:

1. **Все организмы состоят из одной или более клеток.**
2. **Клетка является первичной единицей, участвующей в организации всех организмов.**

Несмотря на эти открытия, вопрос о том, как именно зарождается клетка оставался открытым.

М. Шлейден считал, что клетки воспроизводятся из собственного клеточного зернистого субстрата (*теория цитобластемы*).

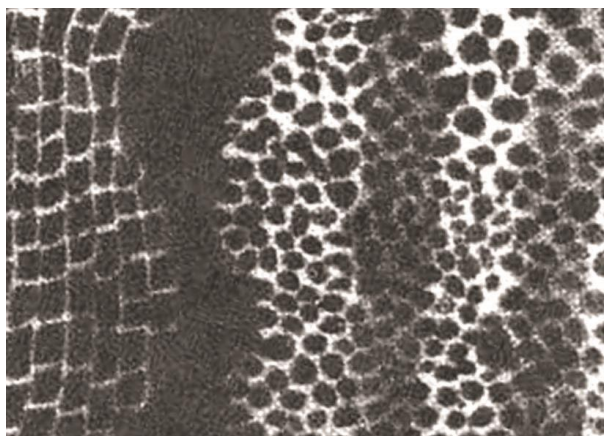


Рис. 1.1. Фрагмент микрофотографии, выполненной в 1662 году Робертом Гуком. (из Ж.К.Ролан и др. «Атлас по биологии клетки» М.: Мир, 1978)

Ярый противник теории самовоспроизведения, немецкий ученый Рудольф Вирхов, завершил в 1858 году свой труд «Клеточная патология», посвященный развитию и размножению клеток, и пришел к следующему выводу, выдвинутому в качестве третьего постулата клеточной теории:

3. Размножение клеток осуществляется только путём деления существующих.

Наконец, следует отметить, что клеточная теория дала начало развитию основополагающих принципов эмбриологии, гистологии и физиологии.

По современным воззрениям клетки делятся на два основных типа: прокариотические и эукариотические. Прокариотические (*на греческом: pro – до, karyon – ядро*) клетки обнаруживаются только у бактерий. Эти клетки имеют небольшие размеры (1 мкм) и упрощенную структуру. Главной отличительной особенностью прокариотической клетки является отсутствие ядерной оболочки, отделяющей дезоксирибонуклеиновую кислоту с генетическим материалом от цитоплазмы. Кроме того, в цитоплазме этих клеток встречаются не все элементы цитоскелета и не все органеллы.

В эукариотических (*на греческом: eu – настоящий, karyon – ядро*) клетках имеется ядерная оболочка, отделяющая генетический материал от цитоплазмы. Также они обладают большими размерами (5-50 мкм). В составе этих клеток имеются выполняющие различные функции органеллы, элементы цитоскелета и гистоны, связанные с генетическим материалом.

Несмотря на указанные выше различия, молекулярная основа признаков присущих живой материи (генетическая информация в ДНК, мембрана, окружающая клетку, энергетический обмен на основе соответствующих механизмов) в прокариотических и эукариотических клетках практически одинаковы. Эта особенность дает основания полагать, что оба типа клеток имеют общее происхождение, а также позволяет применить закономерности одного типа клеток к другому типу.

Информация, представленная в данном руководстве, относится большей частью к эукариотическим клеткам. В организме человека идентифицировано более 200 дифференцированных типов клеток. Каждая из них имеет соответствующую форму, размер, внутреннее строение и функцию, которые могут меняться в определенных рамках.

В формировании особенностей, характерных для каждого типа клеток, состав окружающей среды играет исключительную роль, наряду с диффузией газов и созданием

оптимальной среды для обмена питательных веществ.

Одним из наиболее важных принципов формирования клеток является зарождение небольшого объема структур с максимально возможной поверхностью для обмена веществ. Например, если мы протянем вдоль мембраны ворсинок эпителиального слоя, покрывающего стенку тонкого кишечника длиной, равной 5 метрам в кишечной полости, то в итоге получим трубку протяженностью в 1 км.

При даче названий клеткам строго определенного принципа не существует. В этом случае используются различные критерии. Клетки классифицируются:

- в зависимости от тканей и органов, которым они принадлежат (эпителиоциты, мезенхимоциты, лимфоциты, хондроциты, остеоциты, кардиомиоциты, нейроны, гепатоциты, альвеолоциты, энтероциты и т.д.);

- по схожести с геометрическими фигурами (цилиндрические, кубические, пирамидальные, многоугольные, дискоциты, сфероциты и т.д.), либо по схожести с предметами [палочковидные, колбовидные, столбчатые, веретенообразные, звездчатые, грушевидные, яйцевидные (овальные), древовидные (дендритные) и др.];

- в зависимости от размера (мелкие, средние, большие, огромные);

- в соответствии с формой (плоские, тучные, реснитчатые, шиповидные и т.д.);

- с учетом особенностей окраски (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы или ацидофилы, хромоффиноциты, аргирофильные и т.д.);

- в соответствии с функциями (макрофаги, фибробласты, остеобласты, остеокласты, эндокриноциты, гонадотропоциты и т.д.);

- в зависимости от локализации (интерстициальные, юкставаскулярные, мезангиальные, эндотелиальные, мезотелиальные, горизонтальные и т.д.);

- в честь ученых, которые обнаружили их (клетки Шванна, Купфера, Хофбауера, Лангерханса, Пуркинье, Бетс, Лейдига, Сертоли) и т.д.

Живая материя - протоплазма (*protoplasma*) состоит из двух частей:

цитоплазмы (на греческом: *plazma* - формировать плазму) и **ядра** (на греческом: *пих* - ядро ореха). Первая ограничена клеточной мембраной, а вторая - оболочкой ядра, то есть пространство между клеточной мембраной и ядерной оболочкой относится к цитоплазме (рис. 1.2).

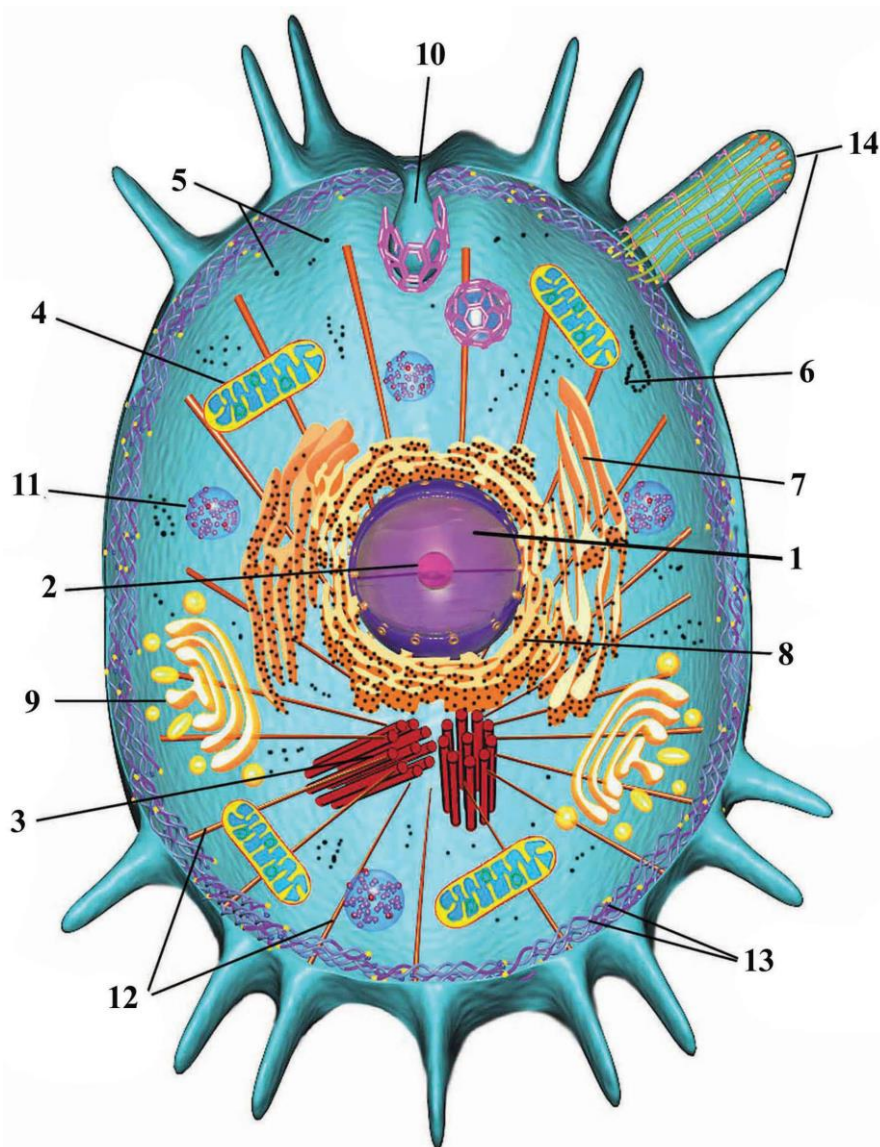


Рис. 1.2. Трехмерное изображение составных элементов соматической клетки.

Схема на основе электронограммы.

1. ядро; 2. ядрышко; 3. центриоли; 4. митохондрии; 5. свободные рибосомы; 6. полирибосомы; 7. гладкая эндоплазматическая сеть; 8. гранулярная эндоплазматическая сеть; 9. комплекс Гольджи; 10. рецептор–опосредственный эндоцитоз; 11. лизосомы; 12. микротрубочки; 13. кортикальная цитоплазма; 14. микроворсинки.

Частицы внутри цитоплазмы, окруженные биологической мембраной, называются **вакуолоплазмой**. К ним относятся лизосомы, митохондрии, пероксисомы, эндосомы, секреторные и транспортные пузырьки, эндоплазматическая сеть, комплекс Гольджи. Избирательная проницаемость биологической оболочки, окружающей эти частицы, создает необходимую среду для выполнения их функций.

Для описания оставшегося пространства между частицами вакуолоплазмы в цитоплазме используются термины "*цитозоль*" или "*гуалоплазма*". Следует отметить, что термин "*цитозоль*" впервые был использован как биохимический термин при описании гомогенной бесструктурной массы цитоплазмы находящейся над органеллами и частицами клетки при **центрифугировании**. Электронно-микроскопически термин "**цитозоль**" трактуется

как аморфное вещество клетки или матрикс. В его состав входят органические и неорганические вещества растворенные в воде или в виде суспензии, рибосомы, филаменты цитоскелета, органеллы филаментарного строения (центриоли) (рис. 1.2). Термины гиалоплазма и цитозоль не рассматриваются в качестве синонимов и используются только в исследованиях, проводимых под световым микроскопом. Цитоплазма, которая располагается между структурами внутри клетки (ядра и органелл), определяемых при помощи светового микроскопа, называется **гиалоплазмой**.

Самой крупной органеллой клетки является **ядро**, отделенное от цитоплазмы ядерной оболочкой (рис. 1.2). Оно состоит из содержащих генетический материал **хроматина**, **ядрышка**, являющегося центром синтеза рибосомальной РНК, ядерного матрикса и ядерных частиц образующих **нуклеоплазму**.

Большинство соматических клеток имеет **одно ядро**. Однако в некоторых случаях обнаруживается большее количество ядер. **Многоядерные** клетки образуются, в основном, двумя способами:

1)	в	результате
слияния большого числа одноядерных клеток	(sinsitium);	2) увеличение
количества ядер в процессе деления, не сопровождающиеся цитотомией	(plazmodium).	

Многоядерные клетки первого типа участвуют в развитии остеокластов, поперечно-полосатых мышечных волокон и цитотрофобластов плаценты. Многоядерные клетки второго типа обнаруживаются иногда в эпителиальных клетках, а также в особенности в клетках печени.

В противовес вышесказанному, некоторые клетки, достигнув терминальной стадии процесса дифференциации теряют свое ядро. В качестве примера **безъядерных клеток** можно привести красные тельца крови и кератиноциты рогового слоя эпидермиса.

Важнейшая роль в определении уровня дифференциации клеток и степени малигнизации опухолей принадлежит показателю **ядерно-цитоплазменного** соотношения. Для этого необходимо вычислить соотношение объема ядра к объему цитоплазмы.

Так же как и организм, состоящий из органов с разной уникальной формой, строением и функциями, клетка обладает метаболическими активными структурами - **органеллами** (на лат. *мелкие органы*), выполняющими специализированные функции. Они входят в состав как вакуолоплазмы (мембранных органелл), так и цитозоля (немембранных органелл). К мембранным органеллам относятся эндоплазматическая сеть, митохондрии, комплекс Гольджи, лизосомы, эндосомы, пероксисомы, а к немембранным - рибосомы, центросома и протеосомы. Несмотря на то, что большинство названных органелл можно увидеть при помощи светового микроскопа, собрать современные данные об их химическом составе, механизмах структурно-метаболических процессов в них стало возможным лишь при использовании электронно-микроскопических, биохимических, гистохимических, иммуноцитохимических и др. методов.

В состав цитозоля входят также микротрубочки и филаменты, формирующие **цитоскелет**, который играет немаловажную роль в придании клетке определенной формы, во внутриклеточном транспорте и в ее движении (рис. 1.2).

Кроме того, внутри клетки могут встречаться **включения** - временные элементы, не всегда участвующие в метаболизме. К ним относятся запасы питательных веществ, скопления пигментов и кристаллов.

Прежде чем приступить к обсуждению материала, представленного в книге,

хотелось бы прояснить один вопрос. Во многих учебниках клеточную оболочку (плазмолемму) описывают в составе группы мембранных органелл.

Однако, другие авторы описывают клетку, как состоящую из **трех основных компартментов**: клеточная оболочка, цитоплазма и ядро.

В 80-х годах прошлого столетия стали публиковаться материалы, в которых рибонуклеиновые кислоты (РНК) были представлены не только как переносчики генетической информации, но и как биокатализаторы. До того времени было принято считать, что роль биокатализаторов может выполнять только группа особых белков - ферменты. Несмотря на то, что эта информация была неожиданной и являлась полной противоположностью данным, представленным в учебниках того периода времени, более поздние исследования показали, что как прокариоты, так и эукариоты содержат специальные РНК молекулы, обладающие ферментативной активностью - *рибозимы*. Также было установлено, что первые организмы на планете Земля состояли из молекул РНК, окруженных двойным фосфолипидным слоем и способных к саморепликации (рис. 1.3). Тот период называли *эпохой РНК*. Исключительную роль в описании данной информации сыграли американские ученые Т.Р.Чех и С.Альтман, за что им была присуждена Нобелевская премия по химии в 1989 году.

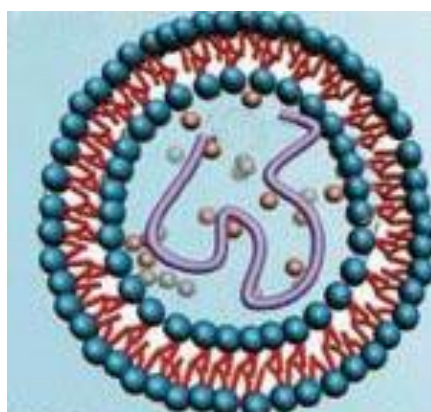


Рис. 1.3. Схема, иллюстрирующая бислоем фосфолипидов, окружающий самореплицирующуюся молекулу РНК в первичных живых организмах.

Таким образом, если мы примем во внимание, что в процессе филогенеза первичная клетка образовалась в результате процесса формирования двойного фосфолипидного слоя вокруг самореплицирующейся молекулы РНК, становится ясно, что плазмолемма играет важную роль в организации живых организмов (рис. 1.3).

Индивидуальное развитие любого человеческого организма начинается с периода формирования **зиготы**, образующейся в результате слияния одной мужской и одной женской половых клеток.

В последней версии «Гистологической Номенклатуры», предложенной на конференции Федерации Международных Сообществ по Анатомии в городе Киото в 2004-м году, была предложена новая классификация типов клеток, формирующихся на начальных этапах эмбрионального развития. Согласно этой номенклатуре, в указанном периоде пренатального развития формируются следующие типы клеток:

1. Первичные клетки (на лат: *cellulae primordialis*) - К ним относятся **зигота** и первые клетки, образующиеся в результате ее деления.

2. **Клетки основатели** (на лат: *cellulae fundatoria*) - эти клетки могут дать начало тканям любого типа, а также одному или нескольким типам клеток.

3. **Предстволовые клетки** (на лат: *cellulae proprecursoria*) - из этих клеток могут развиться одна или несколько стволовых клеток

4. **Стволовые клетки** (на лат: *cellulae precursoria*) – часть стволовых клеток, сохранившиеся в недифференцированном состоянии, воспроизводят себе подобные клетки. Другие стволовые клетки, вступившие на линию дифференцировки, образуют колониобразующие единицы. Последние способны поддерживать стабильно свое количество и производить различные специализированные типы клеток.

5. **Клетки-предшественники** (на лат: *cellulae progenetrix*) - являются производными стволовых клеток, но сохранять свое количество неизменным не могут. Эти клетки могут преобразовываться только в один вид специализированных клеток.

В зависимости от этапов развития онтогенеза стволовые клетки делятся на несколько типов:

1. стволовые клетки эмбриона (эмбриональные);
2. стволовые клетки плода (фетальные);
3. стволовые клетки новорожденного (неонатальные);
4. стволовые клетки взрослых (зрелые);

Прежде чем дать обширную информацию касательно стволовых клеток, хотелось бы отметить потенциальные возможности клеток, образующихся на начальных этапах онтогенеза. Этот процесс дает возможность оценить практическое применение и современные достижения науки, посвященной стволовым клеткам и развивающейся с космической скоростью. Информация касательно обсуждаемой темы нашла свое отражение в схеме (рис. 1.4), предложенной Д.Зипори (2005).

Как видно из их схемы, **тотипотентностью** обладают только зигота, сформированная в результате оплодотворения и клетки, образованные в результате ее первых делений (бластомеры) (рис. 1.4 С и D). Из этих клеток формируются как сам эмбрион и плод, так и окружающие их образования (амниотический мешок, пупочный канатик и пуповина). Таким образом, в случае необходимости каждая из тотипотентных клеток может развиваться в целый организм. Как пример раздельного развития тотипотентных клеток, образованных из одной зиготы на начальных этапах эмбрионального развития можно привести развитие однояйцевых близнецов.

По своим потенциальным возможностям к тотипотентным клеткам близки **плюрипотентные клетки**. Из этих клеток развиваются только те типы клеток, которые участвуют в образовании самого эмбриона и плода. Следует отметить, что отмечались случаи нахождения плюрипотентных клеток на таких стадиях развития эмбриона, как бластуляция и гастрюляция (рис. 1.4 С). Однако, результаты недавно проведенных исследований показали, что плюрипотентные клетки присутствуют также и в зрелом организме.

К плюрипотентным клеткам в период эмбрионального развития относятся скопившиеся в одном из полюсов бластоцисты **клетки внутренней клеточной массы** (показаны зеленым цветом в рис.1.4 А), клетки **эпибласта** (их также называют примитивной эктодермой), а также **тератомы** (эмбриональные опухоли) и **первичные половые клетки**. Вне зависимости от источников развития плюрипотентные клетки обладают общими морфо-функциональными особенностями.

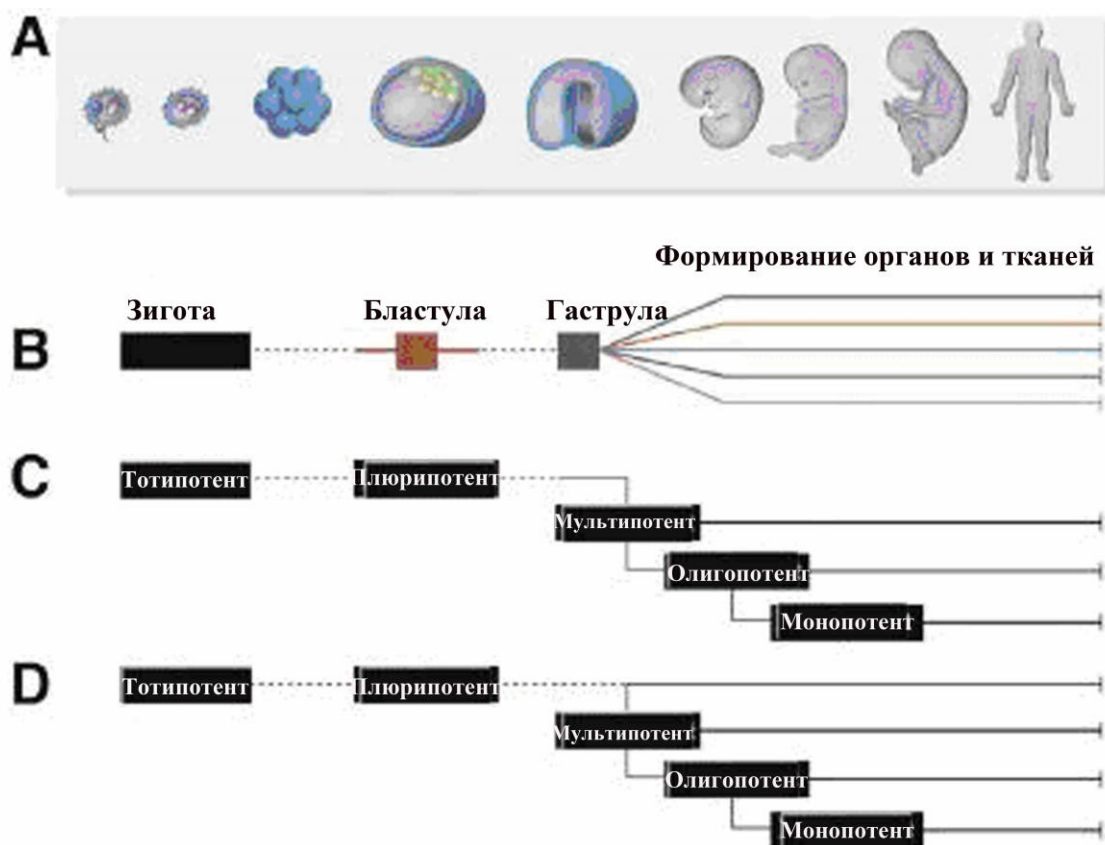


Рис. 1.4. Обобщенная на основе научных воззрений схема развития потенций клеток (С и D) в разных периодах онтогенеза (А и В)

Среди плюрипотентных клеток с медицинской точки зрения особую значимость имеют стволовые клетки человеческого эмбриона (на англ. *human Embryonal Stem cells - hESCs*). Впервые эти клетки были выделены в 1998-м году Д.А. Томсоном и сотрудниками. Как и у других млекопитающих, они были выделены из внутренней клеточной массы бластоцисты. Этими авторами была выдвинута теория возможности применения этих клеток при лечении ряда заболеваний (сахарный диабет, дегенирирующие заболевания нервной системы – болезни Паркинсона и Альцгеймера, повреждение спинного мозга и др.). Наряду с основополагающими нововведениями в указанных направлениях всё ещё остается ряд нерешенных проблем. Плюрипотентные клетки обладают нижеследующими особенностями:

- образуются из тотипотентных клеток;
- в них обнаружена высокая активность щелочной фосфатазы и теломеразы - ферментов, не обладающих тканевой специфичностью;
- в плазмолемме имеются гликолипидные антигены **SSEA-3, SSEA-4** и поверхностные маркеры кератан-сульфатных протеогликанов (англ.: *marker*) **Tra 1-60, Tra 1-8**;
- При помощи факторов транскрипции **Oct-4** и **NANOG** более 1000 генов, обеспечивающих высокую пролиферативную активность, подвергаются экспрессии, не дифференцируясь при этом. Начиная с периода дифференциации активность вышеупомянутых факторов транскрипции понижается с участием специальных репрессоров.
- являясь бессмертными клетками, обладают способностью к колонизации без "постоянной" спецификации (дифференциации), увеличивая свое количество (пролиферируют). В течение шести месяцев из 30 клеток, выделенных из внутренней клеточной массы, развивается

больше 1 миллиона плюрипотентных hESCs. Большинство авторов описывают эту особенность как способность к самовосстановлению или самообновлению (*на англ: self-renewal*).

- при проникновении в другой организм с иммунодефицитом (*in vivo*) они образуют опухоли, относящиеся к новообразованиям различных зародышевых листков - тератомы (см. выше);

- *in vitro* они образуют мультипотентные и олигопотентные стволовые клетки, развивающиеся из всех трех зародышевых листков (эктодерма, мезодерма и энтодерма) и дающие начало всем типам дифференцированных клеток, а также монопотентным предшественникам – унибластным клеткам (рис. 1.4 С и D).

Следует отметить, что большинство данных о стволовых клетках было получено, в основном, при исследовании гематopoэтических стволовых клеток (*на англ: hematopoietic stem cells HSCs*), обеспечивающих развитие форменных элементов крови. Большинство иностранных авторов сходятся во мнении, что HSCs были открыты в 60-х годах предыдущего столетия. Однако, ради справедливости следует отметить, что обширными сведениями по данному вопросу делился еще в конце XIX века профессор Петербургской Военно-Медицинской Академии А.А. Максимов и ряд немецких ученых (Weidenreich, Dominici, Ferrata). В книге А.А. Максимова "Основы гистологии" 1914-го года издания, отмечалось, что на начальном этапе эмбрионального развития формируются два типа кроветворных клеток. К первому типу клеток относятся **примитивные эритробласты**, которые в течение короткого промежутка времени отделяются от кровотока, не оставляя следов. В противовес первому типу, клетки второго типа **лимфоциты**, обладают безграничными возможностями для развития и прогрессивной дифференциации в различных направлениях. Размножаясь с высокой скоростью, они превращаются в *клетки-основатели*, способные к воспроизведению всех форменных элементов крови на всех этапах онтогенеза (унитарная теория). Если мы заменим слово *основатель* на *ствол*, то увидим, что упомянутые признаки относятся к HSCs. Согласно новой гистологической номенклатуре стволовые клетки, начиная с детского возраста вплоть до пожилых лет, обобщенно называются зрелыми стволовыми клетками. Некоторые авторы называют эти клетки соматическими стволовыми клетками.

Начиная с 1960-х годов, в результате обширных исследований стволовых клеток, проведенных при помощи современных на тот момент методов, было обнаружено, что в составе красного костного мозга помимо HSCs, который формирует все форменные элементы крови, также имеются **мезенхимальные стволовые клетки** (*на англ: mesenchymal stem cells MSCs*). Так как из последних образуется также соединительная ткань костей, хрящей, связок, сухожилий, жира и т.д., их также называют *стромальными клетками красного костного мозга*. В настоящее время подтверждено, что зрелые стволовые клетки содержатся в коже, нервной системе, сердце, эпителиальном слое кишечника, печени, роговице и сетчатке глазного яблока, простате и т.д.

Так как зрелые стволовые клетки обладают ограниченной способностью к делению их не относят к группе бессмертных клеток. Эти клетки могут пролиферировать (создавать колонии), не подвергаясь при этом дифференциации, а также могут превращаться в одну или несколько дифференцированных клеток.

Если зрелая стволовая клетка дает начало более чем двум дифференцированным клеткам, ее называют **мультипотентной**. До последнего времени отмечалось, что зрелая стволовая

стволовая	клетка	дает	начало
-----------	--------	------	--------

только тем типам клеток, которые находятся в составе определенного органа или ткани. Как примеры можно привести формирование форменных элементов крови из HSCs, клеток соединительной ткани (фибробластов, остеобластов, хондроцитов и др.) - из MSCs, двух типов глиальных клеток - астроцитов и олигодендроцитов, а также нейронов - из **невральных стволовых клеток**.

В дальнейшем экспериментально было доказано, что некоторые зрелые стволовые клетки обладают плюрипотентной способностью к воспроизведению клеток с различным строением и происхождением. Так, из HSCs могут развиваться глиальные и нервные клетки наряду с поперечно-полосатыми мышечными волокнами, кардиомиоцитами и гепатоцитами. Описанные свойства зрелой стволовой клетки называются *пластичностью* или *трансдифференциацией*.

Если из зрелой стволовой клетки образуется одна или максимум две дифференцированные клетки, их относят к **олигопотентным клеткам**. В качестве примера можно привести стволовые клетки, превращающиеся в волосных фолликулах только в пигментные клетки, а в печени - как в гепатоциты, так и в эндотелиоциты.

Монопотентные предшественники формируются как из мультипотентных, так и из олигопотентных стволовых клеток, которые под воздействием необходимых факторов превращаются в специализированные (дифференцированные) клетки.

Главным препятствием к использованию эмбриональных или зрелых стволовых клеток при лечении различных заболеваний является иммунологическая несовместимость донора и реципиента. В этом случае у реципиента происходит *реакция отторжения*. Для подавления активности иммунной системы организма, то есть для того, чтобы пересаженные стволовые клетки прижились у реципиента используют иммуносупрессоры. Различного рода осложнения, выявляемые во время использования указанной группы препаратов значительно осложняет их применение, а в некоторых случаях делает его абсолютно невозможным. Для решения вышеописанной проблемы в последние десять лет было проведено большое количество различных исследований с использованием современных методов молекулярной биологии. Среди этих методов способ ретровирусной трансдукции (перенос нужных генов при помощи ретровирусов) занимает особое место. Группа японских ученых (K.Takahashi, S.Yamanaka, 2006; K.Takahashi et al, 2007, 2007a) при помощи указанного метода получила плюрипотентные стволовые клетки, внедрив факторы транскрипции **Oct3/4, Sox2, Klf4** в ядро фибробластов кожи (дермы) людей и мышей среднего возраста. Говоря простым языком, этот метод позволил получить плюрипотентные стволовые клетки из фибробластов кожи самого пациента. Авторы предложили назвать последние **индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками** (на англ: *induced pluripotent stem – (iPS) cells*).

Получение iPS клеток имеет два важных научно-практических значения. *Первое* - выяснение факторов транскрипции, необходимых для превращения дифференцированных соматических клеток в недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки. А *второе* - отсутствие реакции отторжения при переносе iPS клеток реципиенту во время трансплантации. Результаты опросов, проведенных одним из известнейших информационных центров, показало, что открытие японских ученых было включено в список самых важных научных достижений 2007 года.

Литература:

Cech TR. A model for the RNA-catalyzed replication of RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986; 83(12):4360-3.

Cech TR. Nobel Lecture. Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from Tetrahymena. Biosci. Rep., 1990; 10(3):239-61.

Deolittle WF. Phylogenetic

Classification and the universal tree. *Science*, 1999; 284:2124-2128.

Gilbert W. The RNA world. *Nature*, 1986; 319: 618-627.

Lawrence NP, Richman A, Amini R, Altman S. Heterologous enzyme function in *Escherichia coli* and the selection of genes encoding the catalytic RNA subunit of Rnase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84(19):6825-9.

Orgel LE. The origin of life A review of facts and speculations. *Trends Biochem. Sci.*, 1998; 23:491-494.

Pace NR, March TL. RNA catalysis and origin of life. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 1985; 16(2):97-116.

Pfeffer FI et al. Lineage-negative side-population (SR) cells with restricted hematopoietic capacity circulate in normal human adult blood: immunophenotypic and functional characterization. *Stem Cells*, 2002; 20:417-427.

Reed RE, Altman S. Repeated sequences and open reading frames in the 3'flanking region of the gene for the RNA subunit of *Escherichia coli* ribonuclease P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983; 80(17):5359-63.

Sela M, White FH. Jr, Arfinsen CB. Reductive cleavage of disulfide bridges in ribonuclease. *Science*, 1957; 125:691692.

Steidl U et al. Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow-derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells. *Blood*, 2002; 99:2037-2044.

Steidl U, Kronenwett R, Martin S, Haas R. Molecular biology of hematopoietic stem cells. *Vitam. Horm.*, 2003; 66:1-28.

Hüceyrə kateqoriyaları

Aflatoonian B, Harry Moore H. Germ cells from mouse and human embryonic stem cells. *Reproduction*, 2006; 132:699-707.

Aflatoonian B, Moore H. Human primordial germ cells and embryonic germ cells, and their use in cell therapy. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005; 16:530-535.

Alberio R, Johnson AD, Stick R, Campbell KH. Differential nuclear remodeling of mammalian somatic cells by *Xenopus laevis* oocyte and egg cytoplasm. *Experimental Cell Research*, 2005; 307:131-141.

Alberio R, Keith H, Campbell KH and Johnson AD. Reprogramming somatic cells into stem cells. *Reproduction*, 2006; 132:709-720.

Armstrong L, Lako M, Dean W, Stojkovic M. Epigenetic modification is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer. *Stem Cells*, 2006; 24(4):805-814.

Blelloch R, Wang Z, Meissner A et al. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells*, 2006; 24:2007-2013.

Blelloch R, Wang Z, Meissner A et al. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells*, 2006; 24:2007-2013.

Boiani M, Eckardt S, Scholer HR et al. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes and Development*, 2002; 16:1209-1219.

Bruno L, Hoffmann R, McBlane F et al. Molecular signatures of self-renewal, differentiation, and lineage choice in multipotential hemopoietic progenitor cells in vitro. *Mol. Cell Biol.*, 2004; 24(2):741-756.

Campbell KHS, Alberio R. Reprogramming the genome: role of the cell cycle. *Reproduction Supplement*, 2003; 61:477-494.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 2007; 25(11):2739-2749.

Chambers I, Colby D, Robertson M et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 2003; 113:pp. 643-655.

Clark AT, Bodnar MS, Fox M, Rodriguez RT, Abeyta MJ, Firpo MT, Pera RA. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Human Molecular Genetics*, 2004; 13:727-739.

Clark AT, Reijo Pera RA. Modeling human germ cell development with embryonic stem cells.

Regenerative Medicine, 2006; 1:85-93.

Collas P, Taranger CK. Epigenetic reprogramming of nuclei using cell extracts. *Stem Cell Rev.*, 2006; 2(4):309317.

Collas P. Dedifferentiation of cells: new approaches. *Cytherapy*, 2007;9(3):236-44.

David PJ, Hunt DPJ, Morris PM, Sterling J et al. A highly enriched niche of precursor cells with neuronal and glial potential within the hair follicle dermal papilla of adult skin. *Stem Cells*, 2008; 1:163-172.

De Paiva CS, Pflugfelder SC, Li DQ. Cell size correlates with phenotype and proliferative capacity in human corneal epithelial cells. *Stem Cells*, 2006; 24(2):368-375.

Do JT, Scholer HR. Cell-cell fusion as a means to establish pluripotency. Ernst Schering Research Found Workshop, 2006; (60):35-45.

Draper JS, Moore HD, Ruban LN, Gokhale PJ, Andrews PW. Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*, 2004; 13:325-336.

Elwood NJ, Zogos H, Pereira DS et al. Enhanced megakaryocyte and erythroid development from normal human CD34+ cells: consequence of enforced expression of SCL. *Blood*, 1998; 91(10):3756-3765.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981; 292:154-156.

Guan K, Nayernia K, Maier MS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 2006; 440:1199-1203.

Ke Y, Chi L, Xu R, Luo C, Gozal D, Liu R. Early response of endogenous adult neural progenitor cells to acute spinal cord injury in mice. *Stem Cells*, 2006; 24(4):1011-1019.

Li WL, Su J, Yao YC, Tao XR, Yan YB, Yu HY, Wang XM, Li JX, Yang YJ, Lau JT, Hu YP. Isolation and characterization of bipotent liver progenitor cells from adult mouse. *Stem Cells*, 2006; 22:322-32.

Malaterre J, Mantamadiotis T, Dworkin S et al. c-Myb is required for neural progenitor cell proliferation and maintenance of the neural stem cell niche in adult brain. *Stem Cells*, 2008; 26(1):173-181.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *PNAS*, 1981; 78:7634-7638.

Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 1992; 70:841-847.

Metcalf D. Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions. *Stem Cells*, 2007; 25(10):23902395.

Nakamura Y, Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sakai D, Mochida J, Hotta T, Ando K. Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. *Br. J. Dermatol.*, 2006; 154(6):1062-70.

Owen M, Friedenstien AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp.*, 1988;136:42-60.

Renard JP, Maruotti J, Jouneau A, Vignon X. Nuclear reprogramming and pluripotency of embryonic cells: Application to the isolation of embryonic stem cells in farm animals. *Theriogenology*, 2007; 68(1) : 196-205.

Stem Cell Basics. <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics1.asp>

Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat. Protoc.*, 2007; 2(12):3081-3089.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K,

Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007; 131(5):861-872.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006; 126(4):663-676.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998; 282:1145-1147.

Wang F, Kou Z, Zhang Y, Gao S. Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos. *Biol. Reprod.*, 2007; 77(6):1007-16.

Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 2000; 100:157168.

Xin L, Lukacs RU, Lawson DA, Cheng D, Witte ON. Self-renewal and multilineage differentiation in

vitro from murine prostate stem cells. Stem Cells, 2007; 25(11):2760-2769.

Zipori D. The Stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. Stem Cells, 2005; 23(6):719-726.

Zwaka TP, Thomson JA. A germ cell origin of embryonic stem cells? Development, 2005; 132:227-233.

КЛЕТОЧНАЯ ОБОЛОЧКА (Плазмолемма)

Плазмолемма представлена двумя слоями фосфолипидов, белками, углеводами и служит барьером между цитоплазмой и межклеточной средой. В связи с тем, что большинство водорастворимых веществ неспособно преодолевать фосфолипидный слой, перемещение жизненно необходимых ионов и биологически активных веществ в цитоплазму и в обратном направлении осуществляется с помощью молекул специализированных белков. Наряду с этим, другая группа белков плазмолеммы (рецепторы), принимая сигналы из окружающей среды, направляет их в различных направлениях в саму клетку, либо в другие клетки многоклеточного организма. Таким образом, клеточная мембрана, обладающая избирательной проницаемостью, обеспечивает взаимосвязь клетки с окружающей средой и с другими клетками.

Общие сведения о строении клеточной оболочки

Современные сведения о клеточной оболочке были получены благодаря исследованиям, проведенным на эритроцитах млекопитающих. Отсутствие в этих клетках ядер и внутриклеточных мембран облегчило биохимическое исследование плазмолеммы.

В 1925г. Голландские ученые Э.Гортер и К.Грендель, поместив в воду экстрагированные **липидные** молекулы определенной части эритроцитов, наблюдали двукратное увеличение занимаемого ими пространства и в связи с этим высказали предположение о формировании плазмолеммы из **двух слоев липидов** (рис.2.1.А). Большая заслуга этих ученых состояла в том, что они показали направленность гидрофобных концов липидных молекул кнутри, а гидрофильных концов кнаружи плазмолеммы. Так же нужно отметить то, что лишь в данном случае молекулы липидов, охватывая со всех сторон находящиеся в цитоплазме образования, могут обеспечить соответствующий барьер (рис.1.2.). В дальнейших исследованиях было доказано, что плазмолемма, состоящая только из двух слоев липидов, не смогла бы обеспечить целостность клетки. После обнаружения в плазмолемме белков, Ф.Даниэлли и Г.Даусон (в 1935) предложили **теорию белково-липидного бутерброда**. Согласно этой теории молекулы липидов окружены с обеих сторон одним слоем молекул белка (рис.2.1).

Наличие, при рассмотрении в электронном микроскопе двух темных (наружный и внутренний) и одного светлого слоя в плазмолемме, было принято как морфологическое подтверждение теории белково-липидного бутерброда (рис.2.2). Но микроскопическое исследование сколов, сделанных с помощью техники заморозки и разлома (криофрактография) показало, что молекулы белков и липидов располагаются не в виде отдельных слоев, а в перемешанном состоянии (рис.2.1 С).

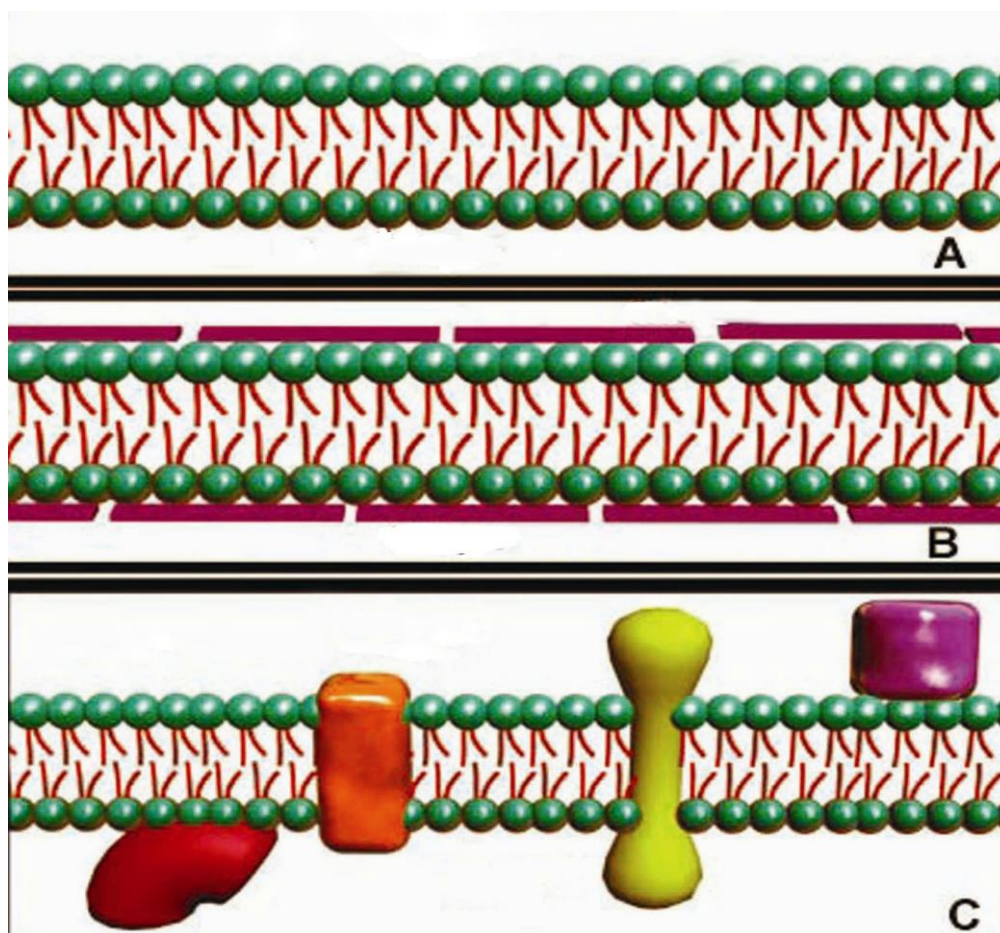


Рис.2.1. Схема существующих теорий о строении клеточной мембраны:

А - теория двуслойных липидов (Э.Гортер и К.Грендель, 1925);

В - теория белково-липидного бутерброда (Ф.Даниэлли и Г. Даусон, 1935);

С - жидкостно-мозаичная теория (Дж. Сингер и Г.Николсон, 1972).

Авторы этих исследований Дж. Сингер и Г. Николсон в 1972г. выдвинули *жидкостно-мозаичную теорию* клеточной мембраны. Согласно этой теории, молекулы белков, напоминая айсберги в липидном океане, взаимодействуют либо с обоими (**интегральные белки**), либо с одним (**периферические белки**) слоем фосфолипидов (рис.2.3.) В связи с тем, что большинство интегральных белков связаны с производными как вне, так и внутри самой клетки, их также называют трансмембранными белками. На криофрактограммах молекулы белка выглядят как **внутримембранные частички** на фоне гладкой поверхности фосфолипидов (рис.2.4.).

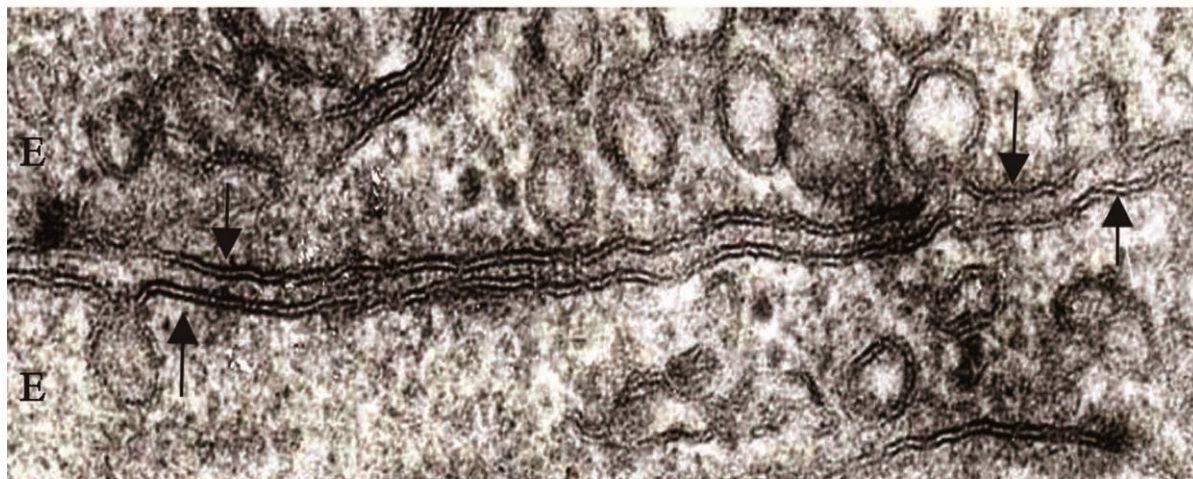


Рис. 2.2. Электронно-микроскопическое строение плазмолемм соседних эндотелиальных клеток. Е - эндотелиальные клетки; ↑ - клеточная мембрана.

Во время разлома замороженных объектов, в том случае если молекулы остаются на фосфолипидном слое, образуется **возвышенность (бугорок) внутримембранной частицы**, а в том случае если отсоединяются, то соответственно образуется **впадина внутримембранной частицы** (рис.2.5).

На Р-поверхности (обращенной к протоплазме) преобладают возвышенности, а на Е-поверхности (обращенной к эктоплазме) преобладают впадины (рис.2.4) Это говорит о том, что большинство трансмембранных белков имеют тесную связь с элементами цитоскелета.

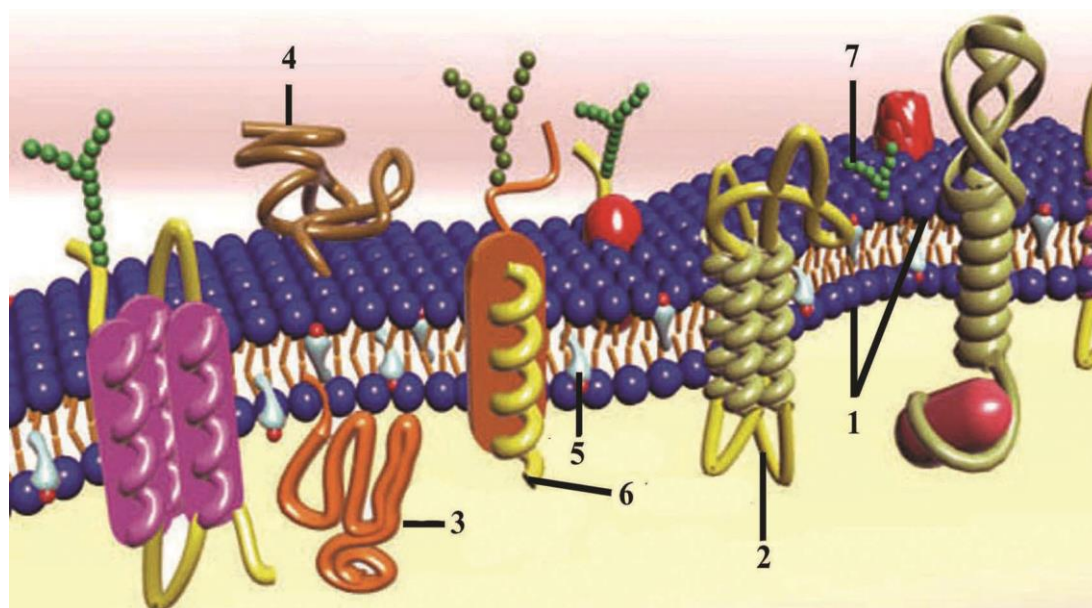


Рис. 2.3. Жидкостно-мозаичная модель клеточной мембраны. Схема.

1- фосфолипиды; 2- интегральные белки; 3- внутренний периферический белок; 4- наружный периферический белок; 5- холестерин; 6- гликопротеин; 7- гликолипид

Подводя итоги общих сведений, нужно отметить, что при рассмотрении ультратонких срезов полностью перпендикулярно пронизывающих клеточную мембрану и имеющих толщину 9-10нм, можно ясно рассмотреть **наружный темный, средний светлый и внутренний темные слои** (рис.2.2). Причиной того, что внутренний и наружный слои выглядят темными, является оседание во время фиксации редуцированных молекул металла осмия на гидрофильные части производных, принимающих участие в образовании плазмолеммы.



Рис.2.4. Криофрактограмма клеточной мембраны.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ

По химическому составу плазмолемма представлена липидами, периферическими и интегральными белками, а также углеводами.

Липиды клеточной мембраны

Липиды, участвующие в образовании мембраны, в основном представлены фосфолипидами (фосфатидилхолин, фосфатидилэтанохоллин, фосфатидилсерин, сфингомиелин и т.д.), холестерином и в малом количестве (2%) гликолипидами.

Важную роль в образовании клеточной мембраны играют 2 основных свойства липидных молекул. **Первое** - наличие у них притягивающихся к воде (гидрофильных головок) и отталкивающихся от воды (гидрофобных хвостиков) участков, **второе** свойство – то, что они являются не твердыми, а вязкими жидкостями с коэффициентом диффузии $10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}^{-1}$.

Благодаря первому свойству, липидные молекулы, становясь хвостом к хвосту, образуют двухслойный каркас клеточной мембраны (рис.1.3,2.1).

Второе же свойство обеспечивает не только, необходимую для многих функций плазмолеммы подвижность, но и подвижность входящих в ее состав белков (рис.2.5).

Полярная (гидрофильная) головка **фосфолипидов** состоит из различных спиртов, фосфатных кислот и остатков глицерина, а неполярный (гидрофобный) хвостик представлен цепями жирных кислот, связанными с глицерином посредством ковалентных связей (рис.2.6). В одной из двух цепей жирных кислот, в одном либо нескольких местах имеются двойные связи (ненасыщенные жирные кислоты).

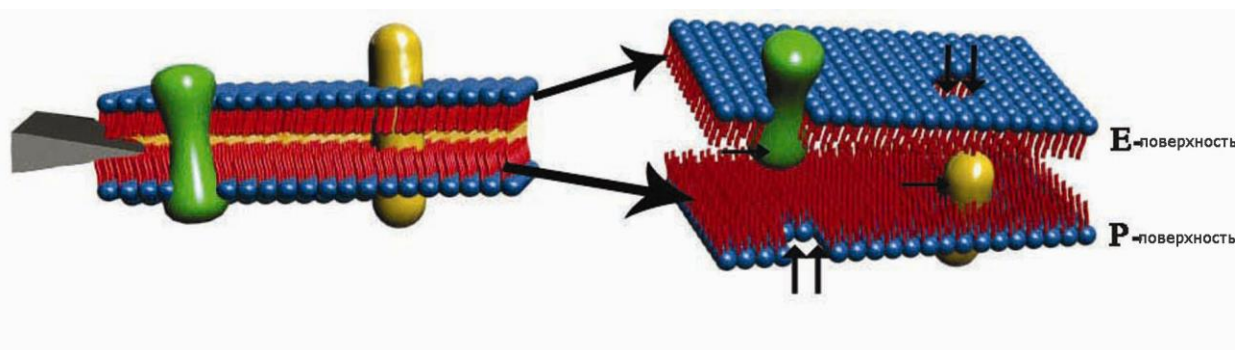


Рис.2.5. Вследствие замораживания биологических образцов раствором фреона низких температур (ниже -150°C) уменьшается притяжение между гидрофобными частями фосфолипидов в составе клеточной мембраны. Поэтому во время скола данных холодных объектов (не ниже -100°C), наружный и внутренний слои клеточной мембраны отделяются друг от друга. Дополнительная информация дана в тексте.

→

→ - возвышенность внутримембранной частицы; → - впадина внутримембранной частицы.

На месте этой связи образуется завиток и кривизна, которая с одной стороны препятствует тесному расположению соседних молекул фосфолипидов, а с другой стороны - укорачивает данную цепь жирной кислоты. В связи с укорачиванием цепей ненасыщенных жирных кислот, цепи образованные насыщенными жирными кислотами приобретают возможность свободно смещаться внутри плазмолеммы. Благодаря данным свойствам обеспечивается текучесть клеточной мембраны и наряду с этим ее пластичность.

Кроме заметной разницы в молекулярном строении липидов, как различных клеток, так и на различных поверхностях одной клетки, было определено также их асимметричное размещение в соседних слоях плазмолеммы. К примеру, если в наружном слое плазмолеммы преобладают сфингомиелин и гликолипид, то на внутреннем слое чаще встречаются фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол (рис.2.7).

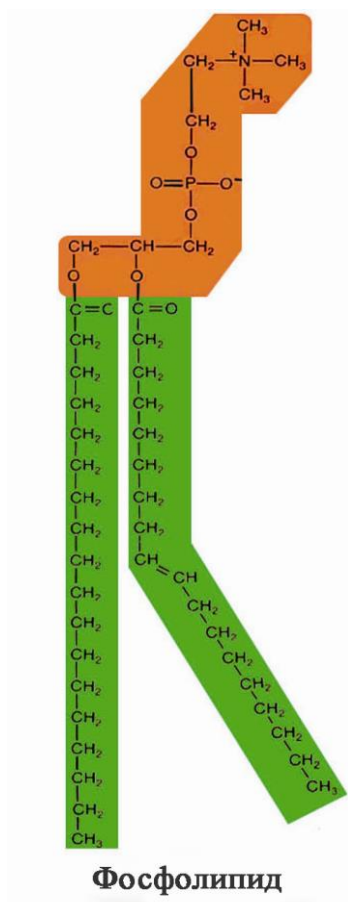


Рис.2.6. Схема строения наиболее часто встречающегося фосфолипида клеточной мембраны. Головка фосфолипида показана каштановым, а хвостик – зеленым цветом. На месте расположения двойной связи в цепи жирных кислот образуется искривление.

В связи с тем, что последние несут отрицательный заряд, образовавшаяся разность электрического потенциала препятствует перемещению молекул липидов с одного слоя плазмолеммы в другой.

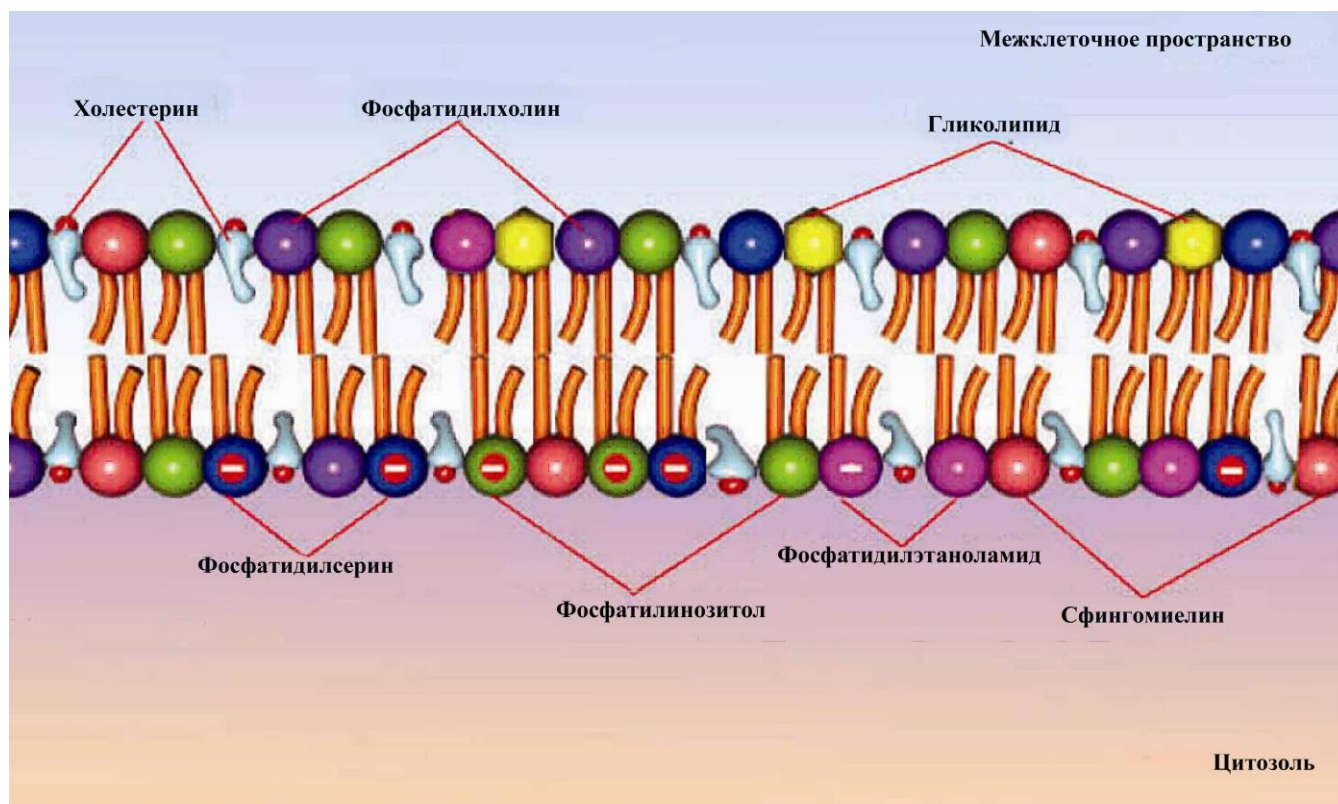


Рис.2.7. Особенности расположения липидов с различными зарядами, участвующих в образовании клеточной мембраны. Описание в тексте. Схема составлена на основании информации Дж. М. Купера (2000).

Наряду с этим, в наружном слое плазмолеммы образуется производное сфингомиелина, холестерина и связанного с ними трансмембранного белка, имеющее диаметр до 50нм и напоминающее плывущий по воде деревянный плот – «*рафт*». Характерной особенностью данного «рафта» является то, что входящие в его состав молекулы перемещаются не по отдельности, а вместе. Эти «рафты» принимают активное участие в передаче сигнала от одной клетки в другую, а так же в процессе эндоцитоза.

Молекулы фосфолипидов наряду с обеспечением избирательной проницаемости клеточной мембраны, так же играют важную роль в обеспечении реакции сигнала-ответа между клетками. Было определено, что часть веществ, играющих роль вторичных посредников [сфингозин, диглицерол, фосфатидная кислота (*fosfatidic acidi*), инозитол 1,4,5 – трифосфат, арахидоновая кислота, серамид (*ceramide*) и др.], при воздействии различных ферментов, отделяются от молекул фосфолипидов.

Биологически активные вещества, известные как медиаторы воспаления (простогландины, тромбоксаны, лейкотриены) и играющие важную роль в защите организма от чужеродных образований, так же синтезируются из арахидоновой кислоты входящей в состав фосфолипидов.

В последнее время **липосомы** широко используются как модель клеточной мембраны. Липосомы представляют собой пузырьки, диаметром от 25нм до 1мкм, созданные искусственным путем. Учитывая тот факт, что молекулы фосфолипидов во время контакта сливаются друг с другом, липосомы используют для проникновения лекарственных веществ, косметических средств, генов и т. д. в цитоплазму клетки.

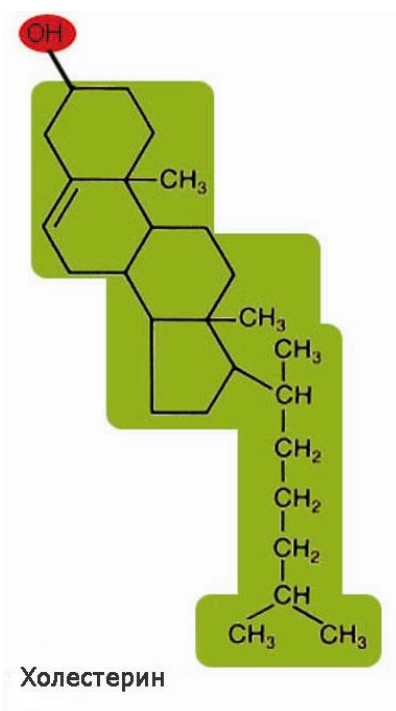


Рис.2.8. Схематический рисунок молекул холестерина, участвующих в образовании клеточной мембраны. Головка несущая OH- группу окрашена в красный цвет.

В составе плазмолеммы молярностью равной молекуле липида обладает **холестерин**. Конденсированное циклическое строение (рис.2.8) и клиновидная форма (рис.2.7) молекулы холестерина (холестерола) дает возможность ему выполнять различные по сравнению с фосфолипидами функции.

Молекулы холестерина, в основном не обладающие полярностью, не образуют отдельный слой в составе плазмолеммы. Та их часть, которая несет OH – группу (головка) образует связь с соответствующей частью фосфолипидов, а карбогидрогеновые цепи связываются с жирными кислотами. Молекулы холестерина, связываясь с углеводами в составе фосфолипидов, уменьшают тем самым текучесть и деформацию плазмолеммы. Вследствии этого, у животных клеток отпадает необходимость образования пленки (стенки) вокруг плазмолеммы. Следовательно, наличие ненасыщенных жирных кислот в составе фосфолипидов увеличивает текучесть и эластичность клеточной оболочки, а наличие молекулы холестерина - уменьшает.

Сохранение определенного соотношения между данными процессами, обеспечивает адаптацию клетки к внутренним и внешним воздействиям. Примером этому может служить тот факт, что при воздействии высокой температуры молекула холестерина ограничивает подвижность жирных кислот, уплотняя плазмолемму, тем самым уменьшая ее проницаемость. А при воздействии низких температур, холестерин, перекрещиваясь с цепями жирных кислот, поддерживает текучесть плазмолеммы, оберегая тем самым ее от замерзания.

Холестерин играет важную роль в метаболизме множества необходимых организму жизненно важных веществ. При синтезе стероидов (половые гормоны, кортикостероиды), желчных кислот, витамина Д, важным, можно сказать первым компонентом, является холестерин.

Белки клеточной мембраны

В выполнении множества функций клеточной мембраны роль белков является незаменимой. Более 50% объема клеточной мембраны составляют белки. Но в связи со значительной разницей между молекулярными массами липидов и белков на одну молекулу белка в составе плазмолеммы приходится от 50 до 100 молекул липидов.

Одной из важных характерных черт морфо-функциональной характеристики белков является последовательность аминокислот в их составе, а второй – изучение их трехмернопространственного строения.

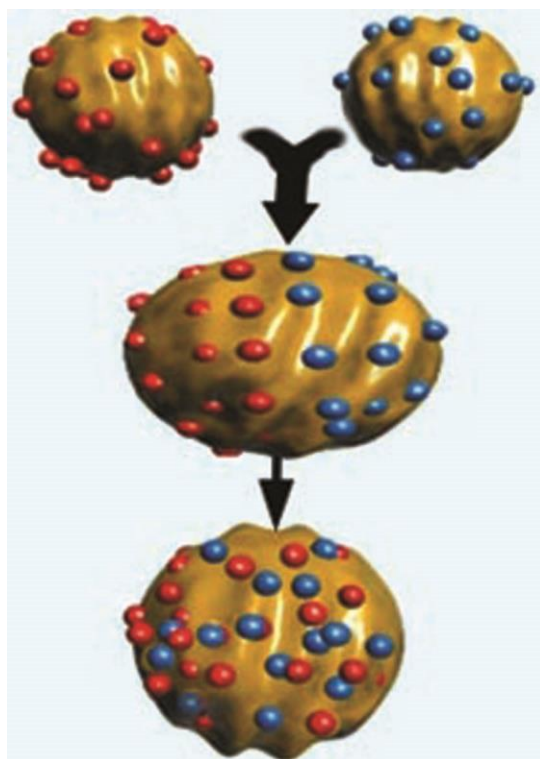


Рис.2.9. Слияние (внизу) белков плазмолеммы гибридной клетки (в центре), образовавшейся из клеток человека (слева) и мыши (справа), в результате их латерального перемещения.

В настоящее время из 200 тыс. белков с определенными последовательностями аминокислотных остатков лишь примерно у 4 тыс. было уточнено их трехмернопространственное строение. Если учесть тесную связь пространственной конфигурации белка с пребыванием его в активном либо пассивном состоянии, мы видим всю важность не только фундаментальных, но и практических значений данной информации.

После классической работы Д.Сингера и Г.Николсона, как было сказано выше, в плазматической мембране выделяют периферические и интегральные (большинство из них - трансмембранные) белки.

Периферические белки могут образовывать связи, как с молекулами липидов, так и с трансмембранными белками. Однако в связи с отсутствием среди них ковалентных связей, периферические белки могут с легкостью отделяться от плазматической мембраны под воздействием кислых и

концентрированных солевых растворов. Интегральные же белки, имеющие амфифильные свойства, напротив, образуют многочисленные ковалентные связи, как с гидрофильными, так и с гидрофобными образованиями плазматической мембраны. Как следствие этого, лишь нарушив целостность плазматической мембраны с помощью специальных детергентов (напр. октил гликозид), можно отделить интегральные белки от плазматической мембраны.

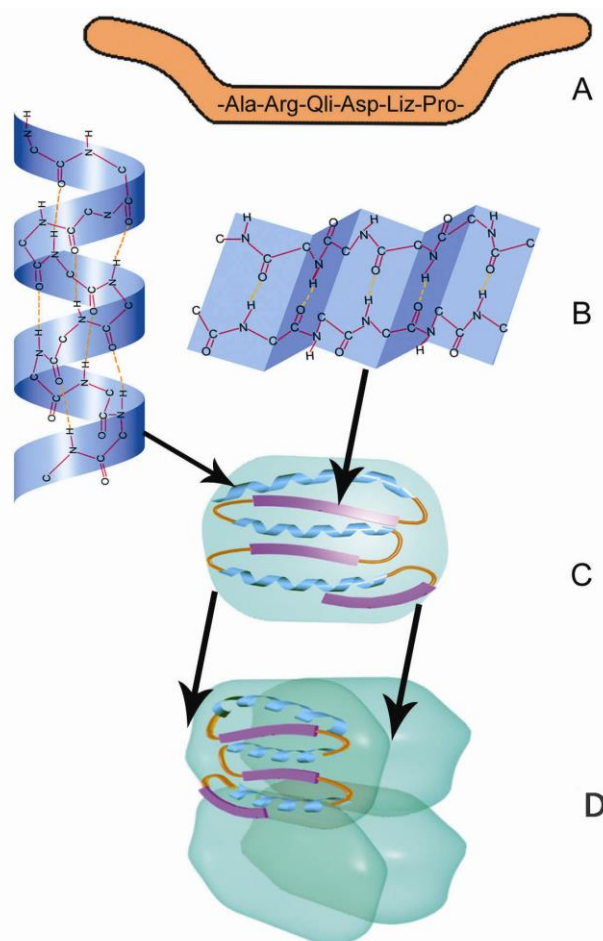


Рис. 2.10. Модели строения молекул белка. А – первичное строение; В – вторичное строение (α -спирали слева и β – складки справа); С – третичное строение; D – четвертичное строение. В третичном строении α -спирали показаны голубым, β -складки – фиолетовым, а соединяющие их друг с другом петли – оранжевым цветом.

Особо следует отметить исследования Л.Фрея и М.Эдидина (1970), которые послужили начальной точкой возникновения теории «жидкостно-мозаичного» строения плазматической мембраны. Данные авторы, пометив молекулы белков плазмолеммы методом флуоресценции (окрасив соответственно красным и зеленым красителем), обнаружили полное смешивание соответствующих белков друг с другом спустя лишь 40 минут после соединения клеток мыши и человека (гибридная клетка), тем самым морфологически продемонстрировав способность к латеральному перемещению белков в составе клеточной мембраны (рис 2.9). Дальнейшие исследования показали, что существующие белки имеют

различную способность к перемещению на поверхности клеточной мембраны. Одна группа белков свободно перемещается на поверхности клеточной мембраны. Другая группа может перемещаться лишь в определенном направлении. У третьей группы белков периоды свободного перемещения и резкого снижения способности к движению сменяют друг друга. Наряду с этим большая часть белков, по причине тесной связи с элементами цитоскелета, лишена способности к перемещению.

Подвижность белков в составе клеточной мембраны играет особую роль в проведении внешних воздействий внутрь клетки, в рецепторном эндоцитозе и в соединении клеток между собой, а также с межклеточным веществом.

Более подробная информация о трехмерном строении молекулы белка дана в учебниках биохимии и клеточной биологии. Однако, с целью облегчить материал, данный в этом учебнике, очень важно ознакомление с молекулярными основами возможных связей пространственного строения белков и их функций.

Большинство белков, в том числе и белки в составе клеточной мембраны, имеют глобулярное строение. Данная группа белков, в отличие от фибриллярных, имеет присущее им высокоупорядоченное пространственное строение. У глобулярных белков выделяют 4 уровня строения (рис.2.10):

- **Первичной структурой белка** является последовательное расположение генетически детерминированных аминокислотных остатков (стр.2.10 А).

- **Вторичной структурой** называют конфигурацию белка в виде α -спиралей (рис.2.10 В слева) и β -складок (рис.2.10 справа) Формирование α -спиралей осуществляется путем создания водородных связей каждой четвертой аминокислоты полипептидной цепи (соответственно составу аминокислот) с соседними аминокислотами, а формирование β -складок - путем создания водородных связей между аминокислотами располагающихся параллельно относительно друг друга цепей.

- Располагающиеся в какой-либо полипептидной цепи α -спирали и β -складки, загибаясь с помощью петли, образованной из нитеобразной части остатка аминокислоты (рис.2.10 С), принимают свойственную белкам пространственную конфигурацию. Это носит название **третичной структуры** белка.

- Некоторые белки состоят из нескольких полипептидных цепей. Каждая полипептидная цепь в их составе носит название *мономера* или *субъединицы*. Молекула белка, образованная путем соединения мономеров между собой различными способами, носит название **четвертичной структуры** белков.

Впервые информация о связи трехмерного строения белков и выполняемыми ими функциями была получена благодаря Кристиану Арфинсону и его сотрудникам (1957). Эти авторы определили, что фермент рибонуклеазы, раскрывая свои складки под воздействием теплоты, теряет свою активность (денатурация), а при переносе его в насыщенный кислородом физиологический раствор, сам по себе способен восстановить складчатое строение, вернув при этом свою активность. Эти исследования с одной стороны свидетельствуют о том, что основой трехмерного строения белка является последовательность генетически детерминированных аминокислот, с другой стороны показало наличие тесной связи между трехмернопространственной конфигурацией белков и их функциями. На основании проведенных экспериментов различного направления, К.Арфинсен пришел к такому выводу, что трехмернопространственная конфигурация белков в складчатом виде термодинамически соответствует их самому стабильному состоянию.

Наряду с подтверждением данного соответствия, также было определено, что трехмернопространственное строение белка, является крайне не постоянным образованием. Так, разница свободной энергии (энергия Гельмгольца) между складчатым и раскрытым состоянием одного и того же

белка практически в десять раз меньше, чем энергия в одной ковалентной связи (400 кДж/моль-1). Таким образом, расходуя очень мало энергии, можно изменить трехмернопространственное строение белка.

Эта особенность позволяет белкам, изменив свое трехмернопространственное строение, с легкостью выполнить присущие им биологические функции. Не случайно, что в настоящее время все процессы, начиная от открытия-закрытия ионных каналов и заканчивая делением клетки, связывают с изменением трехмерного строения белка. Наряду со сказанным, так же следует отметить то, что имеющееся небольшое изменение в строении молекулы белка, может полностью нарушить их стабильность. Поэтому даже малейшие мутационные изменения в любой части организма, случившиеся по различным причинам, резко нарушают строение белков и их функции, что может являться причиной возникновения различных заболеваний.

Углеводы клеточной мембраны

Углеводы, связанные с клеточной мембраной, в основном встречаются в виде гликолипидов и гликопротеинов, образованных путем создания ковалентных связей между олигосахаридами с фосфолипидами наружного слоя и трансмембранными белками (рис.2.2 и 2.7). Они составляют 2-10% общего объема клеточной оболочки. Тонкие фибриллярные части, образованные из олигосахаридов в составе гликолипидов и гликопротеинов, соединяясь с образованиями межклеточного вещества, ферментами и т. д. образуют покров, имеющий аморфное строение и окутывающий клеточную мембрану со всех сторон, именуемый **гликокаликсом** (рис.2.11). Молярный состав и толщина гликокаликса резко отличается на разных поверхностях клетки. Самый толстый гликокаликс наблюдается на апикальной поверхности энтероцитов в составе стенки тонкой кишки (50 нм), а самый тонкий – в миелиновом слое нервного волокна (1-20 нм).

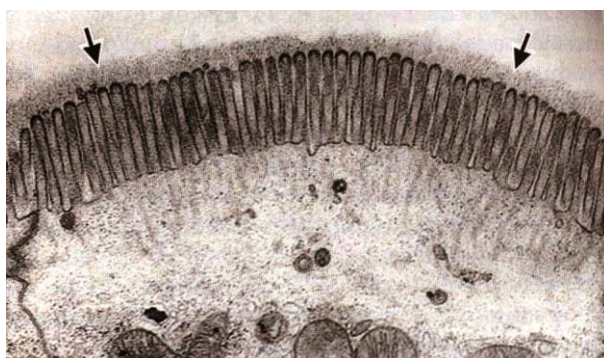


Рис.2.11. Элементы гликокаликса в микроворсинках энтероцитов. Электронограмма.

Гликокаликс играет важную роль в защите клетки от физических и механических воздействий, в образовании межклеточных связей, в регуляции избирательной проницаемости сосудов, в принятии клеткой разного рода сигналов, в пристеночном пищеварении, в иммунном ответе организма против чужеродных тел и т.д.

Некоторые олигосахариды, принимающие участие в образовании гликокаликса, служат меткой для определения типа клетки в многоклеточных организмах, а также для обнаружения клеток по различным причинам синтезирующих чужеродные для организма белки (напр. раковые клетки).

Для четкого обнаружения элементов гликокаликса не только на светоптическом, но даже и на электронномикроскопическом уровне, необходимо использование специальных лектинов, рутениума красного и альцианового синего.

Функции клеточной мембраны

Клеточная мембрана создает условия для образования барьера между цитоплазмой и окружающей средой, для способности различных поверхностей одной клетки иметь различные физические свойства и химический состав, для возможности выполнения разнообразных функций, различающихся своими механизмами действия. В обобщенном виде можно выделить пять основных функций клеточной мембраны:

1. Избирательная проницаемость;
2. Эндоцитоз;
3. Экзоцитоз;
4. Восприятие раздражений различного происхождения и инициация внутриклеточных процессов (рецепторная функция);
5. Обеспечение взаимосвязей между клеточными и неклеточными элементами (сведения об этом можно получить в учебнике общей гистологии).

Избирательная проницаемость

Большая часть молекул, необходимых для деятельности клетки, не способна свободно проходить сквозь плазмолемму. Причиной этого является биологический барьер, созданный гидрофобными частями цепей жирных кислот фосфолипидов в составе плазмолеммы. Поэтому, жирорастворимые газы (O_2 , N_2), гидрофобные молекулы (бензол, некоторые витамины и гормоны), а так же нейтральные гидрофильные молекулы маленьких размеров (вода, этиловый спирт, глицерин, мочевины) способны свободно проходить сквозь плазмолемму (рис.2.12).

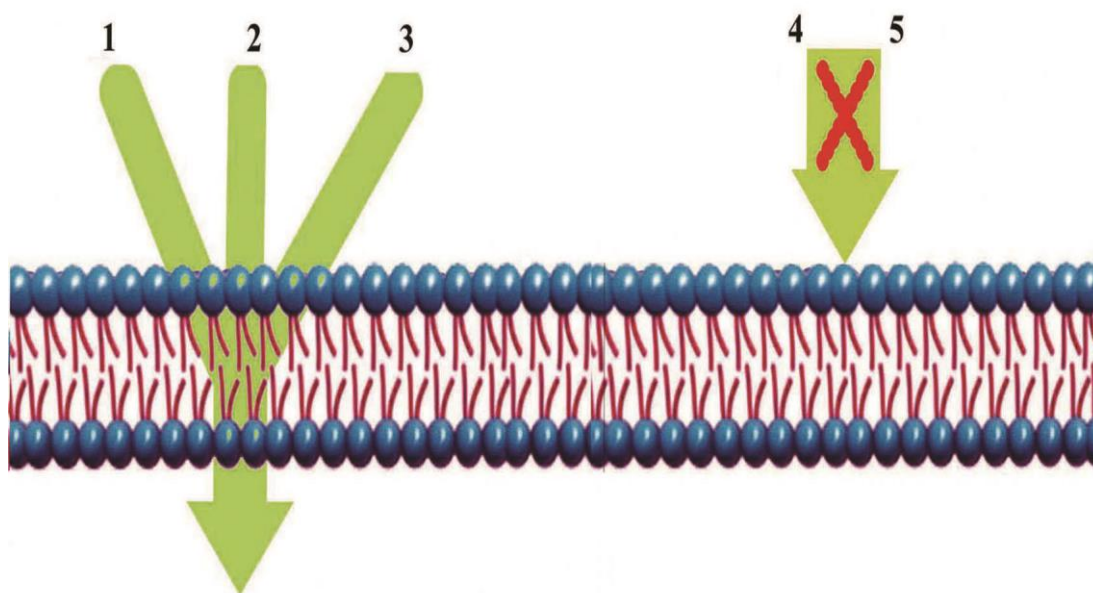


Рис. 2.12. Особенности проницаемости фосфолипидного слоя клеточной мембраны.

1- газы; 2- гидрофобные молекулы; 3- нейтральные гидрофильные молекулы; 4- молекулы больших размеров; 5- заряженные молекулы и ионы

Процесс, при котором вышеуказанные молекулы свободно проникают внутрь клетки или в обратном направлении, в зависимости от разницы концентрации с обеих сторон плазмолеммы (от места с большей концентрацией к месту с меньшей) называется **простой диффузией** (рис.2.13.-1).

Наряду с этим, нейтральные молекулы (не несущие заряд) и имеющие молекулярную массу выше, чем 150кД [1Д (дальтон) = $1,6605 \cdot 10^{-24}$ грамм], (напр. глюкоза, сахароза) и молекулы несущие заряд, независимо от их массы, в т.ч. ионы (H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^-) не могут преодолевать барьер плазмолеммы (рис.2.12).

Исследования, проведенные в 30х годах прошлого века, показали, что указанные молекулы и ионы все же могут проникать сквозь плазмолемму внутрь клетки и в обратном направлении в зависимости от разности концентрации и потенциала, причем с большей скоростью по сравнению с простой диффузией. Принимая во внимание эти фактические данные, стал использоваться термин - **облегченная диффузия**. Во время облегченной диффузии, в отличие от простой, молекулы и ионы, проникающие сквозь плазмолемму, не вступают в непосредственную связь с биологическим барьером, образованным фосфолипидными слоями, а проникают внутрь клетки и в обратном направлении с помощью специализированных интегральных белков (рис 2.13.-2,3).

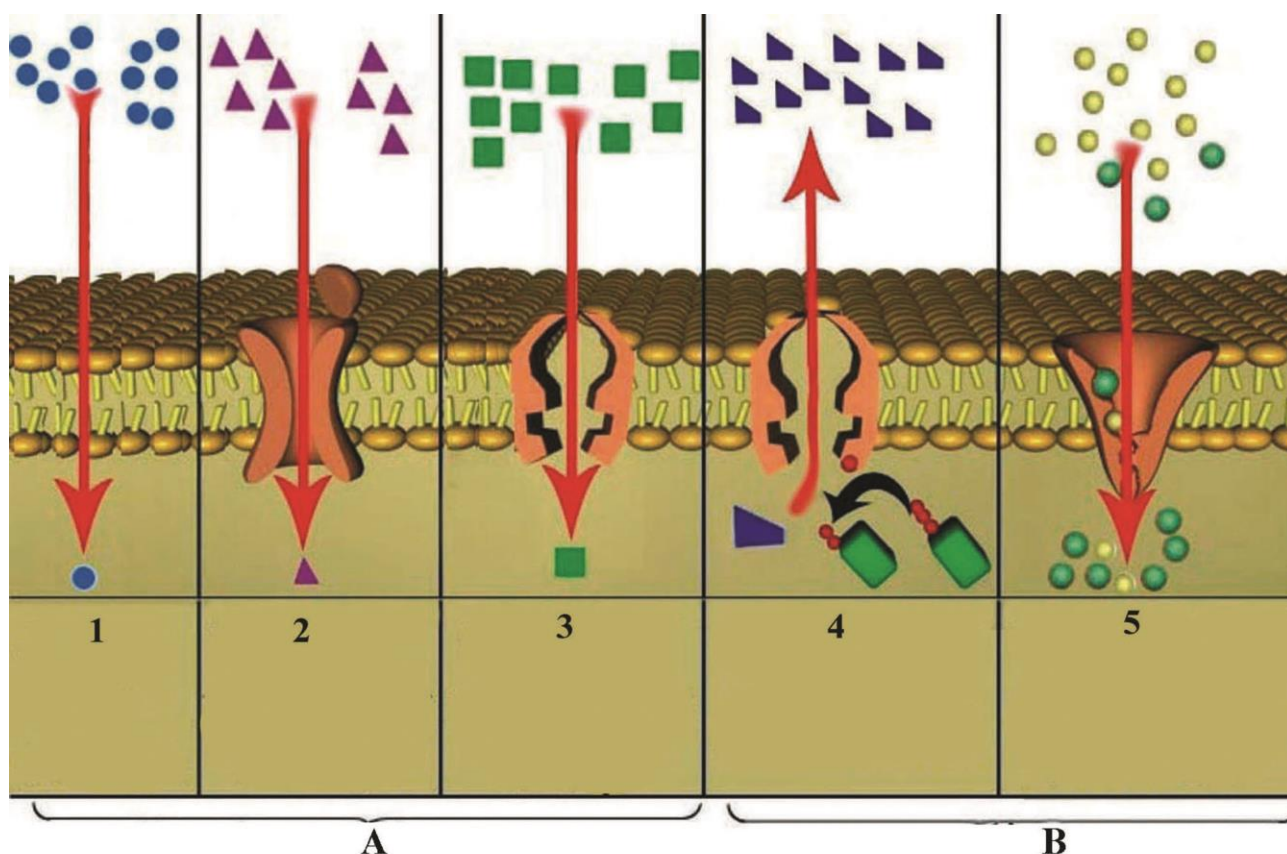


Рис. 2.13. Виды пассивного (А) и активного (В) транспорта.

1- Обычная диффузия; 2- канал-опосредованная диффузия; 3- диффузия при помощи транспортных белков; 4- активный транспорт при помощи насоса; 5- активный транспорт за счет градиента концентрации

Если в процессе простой и облегченной диффузии ионы и молекулы перемещаются сквозь плазмолемму со стороны большего электрического заряда (потенциала) или большей концентрации в сторону меньшего, то такое перемещение называется **пассивным транспортом** (рис.2.13 – 1,2,3).

Если ионы и молекулы проникают сквозь клеточную мембрану в обратном (от малого к большому) направлении разницы потенциала и концентрации, то такой процесс, не зависимо от его механизма, носит название **активного транспорта**. Данный процесс осуществляется непосредственно с помощью энергии, образованной во время гидролиза макроэргических молекул [аденозинтрифосфат (АТФ) или гуанозинтрифосфат (ГТФ)] и называется **первичным активным транспортом**, а белки участвующие в этом процессе называются **насосами** (рис.2.13 - 4).

Если активная проницаемость осуществляется посредством белков-переносчиков благодаря энергии, высвободившейся в результате образования электрохимического градиента (разницы) в процессе деятельности насосов, то такой процесс называется **вторичной активным транспортом** (рис.2.13 - 5).

Белки, которые обеспечивают облегченную диффузию, происходящую без затрат энергии (пассивно), а также участвующие во вторичном активном транспорте называются **белками-переносчиками** (рис.2.13 – 3,5).

В составе плазмолеммы, наряду с насосами и белками-переносчиками, была обнаружена третья группа белков, которая участвует в переносе ионов, молекул воды и глицерина. Называются они соответственно **ионными и водными каналами**.

Таким образом, белки плазмолеммы, обеспечивающие ее избирательную проницаемость и имеющие свойственные им особенности, можно разделить на три большие группы:

1. насосы;
2. каналы;
3. переносчики.

Насосы

Большинство насосов обеспечивающих перемещение ионов и молекул против разницы концентрации и потенциала (более чем в 100 раз) являются ферментами, с АТФ-азной активностью. В данный момент, в эукариотических клетках, различают следующие АТФ-азы:

АТФ-азы Р-типа

АТФ-азы F-типа

АТФ-азы V-типа

АТФ-азы ABC-типа (АТФ Соединяющие Кассеты)

АТФ-азы Р- типа

К АТФ-азам Р-типа относятся:

Na^+/K^+ - АТФ-азы, находящиеся на клеточной мембране всех живых существ

Ca^{2+} - АТФ-азы, находящиеся в составе биомембран плазмолеммы и эндоплазматической сети.

H^+/K^+ - АТФ-азы, находящиеся в составе плазматической мембраны клеток желудка и почек.

Na^+/K^+ насосы были обнаружены Скоу в 1957-ом году во время изучения влияния некоторых катионов на периферические нервные АТФ-азы. Несмотря на то, что данное открытие не было в свое

время достойно оценено (Скоу благодаря этому открытию стал лауреатом Нобелевской премии лишь спустя 40 лет), дальнейшие исследования показали, что большинство процессов, протекающих в клетке, происходят благодаря энергии трансмембранного потенциала (электрохимического), образующегося в результате деятельности Na^+/K^+ насосов (рис.2.13 - 5).

Na^+/K^+ -АТФ-азы будучи интегральными белками, состоят из каталитической α -субъединицы и β -гликопротеина. Необходимые для деятельности насоса АТФ, Na^+ и K^+ катионы, а так же подвергающиеся процессу фосфорилирования остатки аспарагиновой кислоты, располагаются на α -субъединице. Процесс присоединения 3Na^+ (рис.2.14 -1) к обращенной в сторону цитоплазмы поверхности Na^+/K^+ насоса является причиной гидролиза молекулы АТФ и фосфорилирования (рис.2.14 -2) α -субъединицы. В результате этого часть насоса, соединенная с Na^+ , подвергаясь конформационному изменению, переворачивается в сторону наружной поверхности клетки и таким образом обеспечивает выход Na^+ из клетки (рис.2.14 -3).

В то же время, присоединение 2K^+ к части развернувшейся в сторону наружной поверхности клетки (рис.2.14 -4) является причиной отсоединения фосфатной группы от α -субъединицы (дефосфорилирование) (рис.2.14 -5). Тогда насос, вернувшись в свое первоначальное состояние, обеспечивает перемещение K^+ в клетку (рис.2.14 -6). Таким образом Na^+/K^+ насос при помощи энергии, высвободившейся в результате гидролиза одной молекулы АТФ, способен переместить 3Na^+ - из клетки и 2K^+ - в клетку против электрохимического градиента.

Для того чтобы отчетливо показать важность деятельности Na^+/K^+ насоса, следует отметить выраженную разницу распределения молекул, несущих положительный и отрицательный заряд в плазмолемме снаружи и внутри клетки (табл. 2.1). Как следует из таблицы, с внешней стороны клеточной мембраны преобладают ионы Na^+ , Cl^- и Ca^{2+} , а с внутренней – K^+ и органические вещества, несущие положительный заряд (аминокислоты, нуклеотиды, сахара, макромолекулы).

При отсутствии такого равновесия осмотическое давление, создаваемое органическими веществами, стало бы причиной притока жидкости в клетку и нарушения, тем самым ее целостности. Вместе с тем, следует учитывать частые изменения количества органических веществ в клетке в зависимости от протекающих в ней процессов. В таком случае ясно видна роль Na^+/K^+ насосов в поддержании стабильности объема клетки. Разница, образующаяся при распределении катионов во время работы Na^+/K^+ насосов, является источником энергии для протекания вторично активного транспорта. Результатом этого является то, что более 25% АТФ, синтезируемых в клетке, расходуется в процессе деятельности Na^+/K^+ насосов.

Na^+/K^+ насосы также имеют крайне важную роль при распространении электрических сигналов в нервных и мышечных клетках.

Участие ионов Ca^{2+} , как вторичных посредников, в различного рода процессах, идущих внутри клетки, требует поддержания их концентрации внутри цитозоля на очень низком уровне. Это требование осуществляется благодаря находящимся в составе клеточной мембраны **Ca^{2+} АТФ-азным ферментам (насосам)**. Данный насос, имеет схожую с Na^+/K^+ насосом α -субъединицу и подвергаясь конформационному изменению, происходящему благодаря энергии высвободившейся в результате гидролиза одной молекулы АТФ, выводит Ca^{2+} из клетки, а H^+ перемещает внутрь клетки.

Насосы Ca^{2+} аналогичного строения расположены также в стенке саркоплазматической сети мышечных волокон. В результате деятельности данных насосов Ca^{2+} , находящийся в цитозоле, перемещается в полость саркоплазматической сети, которая служит для них амбаром, а 2H^+ напротив, перемещается в цитозоль.

В результате деятельности данных насосов уровень Ca^{2+} в цитозоле поддерживается в нужном количестве, а H^+ , попавший в цитозоль, либо выводится из клетки с помощью белков-переносчиков клеточной мембраны, либо нейтрализуется с помощью систем, играющих буферную роль.

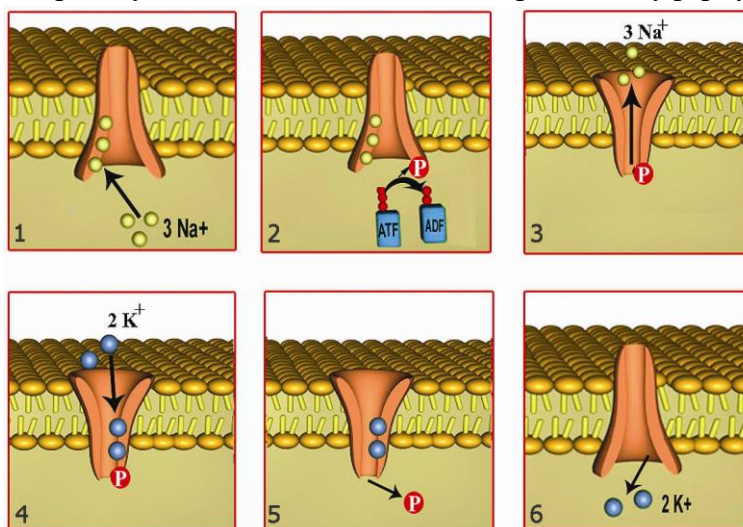


Рис. 2.14. Механизм работы Na^+/K^+ насоса. Описание в тексте.

Следует отметить, что в случае резкого изменения концентрации Ca^{2+} в цитозоле, насосы Ca^{2+} в противовес указанному выше механизму начинают активно синтезировать АТФ.

H^+/K^+ АТФ-азы играют важную роль в синтезе соляной кислоты в составе желудочного сока. В результате деятельности данных насосов, находящиеся в клетке ионы H^+ замещаются на располагающиеся вне клетки ионы K^+ . Это происходит на апикальной поверхности париетальных клеток, входящих в состав желез слизистого слоя желудка. Данный электронейтральный обмен является причиной поддержания постоянного уровня кислотности париетальных клеток и резкого увеличения уровня кислотности желудочного сока ($\text{pH}=2,0$). H^+/K^+ насосы по своему строению так же состоят из α - и β - субъединиц.

АТФ-азы F -типа

АТФ-азы F -типа встречаются во внутренней оболочке митохондрий эукариотической клетки и представлены в большинстве учебников как АТФ-синтетаза. АТФ-синтетазы F-типа состоят в основном из двух частей:

- 1.Обращенная в сторону матрикса митохондрий гидрофильная глобулярная часть, состоящая из α - и β -субъединиц.
- 2.Часть, находящаяся во внутренней оболочке, осуществляющая пассивное перемещение H^+ в матрикс.

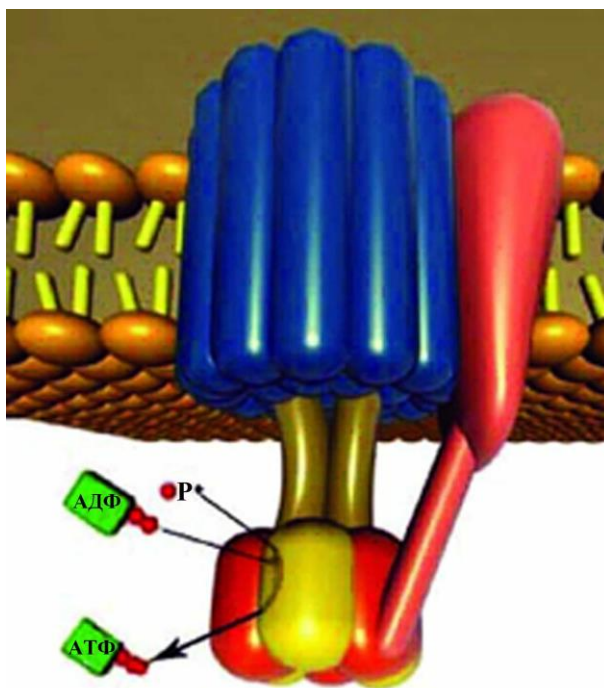


Рис.2.15. Схема строения фермента АТФ-синтетазы, располагающегося на внутренней мембране митохондрий [Составлено на основе информации Т.Элстона, Г.Ванга и Дж.Остера (Nature, 1998, 391 p.510-513)].

Эти части соединены друг с другом с помощью γ -субъединицы. Во время перемещения H^+ из межмембранного пространства в матрикс, γ -субъединица, вращаясь, подвергается конформационному изменению β -субъединицы, которая при этом синтезирует АТФ путем присоединения PO_4 к АДФ (рис 2.15). Если же АТФ, связанная с α -субъединицей, подвергается гидролизу, то H^+ , находящийся в матриксе, может активно перемещаться в межмембранное пространство. Таким образом, АТФ-азы F-типа осуществляют свою работу в качестве насоса.

АТФ-азы V-типа

АТФ-азы V-типа, как следует из их названия, находятся в составе оболочки окружающей вакуолоплазму в цитоплазме. Кроме того, АТФ-азы V-типа находятся в составе плазмолеммы клеток, создающих вокруг себя кислую среду (остеокласты, макрофаги и т.д.).

Основная функция данных АТФ-аз состоит в регулировании кислотности, необходимой для протекания ферментативных процессов в соответствующих органеллах и обеспечение сочтанного перемещения H^+ с помощью энергии, создаваемой градиентом концентрации (напр. проникновение некоторых нейромедиаторов в синаптические пузырьки).

Несмотря на схожесть строения АТФ-аз V-типа с АТФ-азами F-типа (рис.2.15), они не способны принимать участие в синтезе АТФ, а лишь являются протонными насосами (во время гидролиза 1 молекулы АТФ в вакуолоплазму поступает 1 или 2 H^+).

АТФ-азы ABC-типа

АТФ-азы ABC-типа (ATP Binding Cassette - АТФ соединяющие кассеты) - наиболее часто встречающиеся во всех живых организмах насосы. Они отличаются как по своим функциям, так и по

своему строению от АТФ-аз Р-, F- и V-типа. Основным отличием их строения является наличие не одного, а двух мест соединяющихся с АТФ (рис.2.16). Поэтому их называют АТФ соединяющие кассеты.

Основное функциональное отличие заключается в том, что в результате деятельности данных насосов обеспечивается перемещение из клетки, либо в некоторые органеллы не протонов, а ионов и молекул (сахара, аминокислоты, полисахариды, дипептиды, липиды, стероиды и даже некоторые белки).

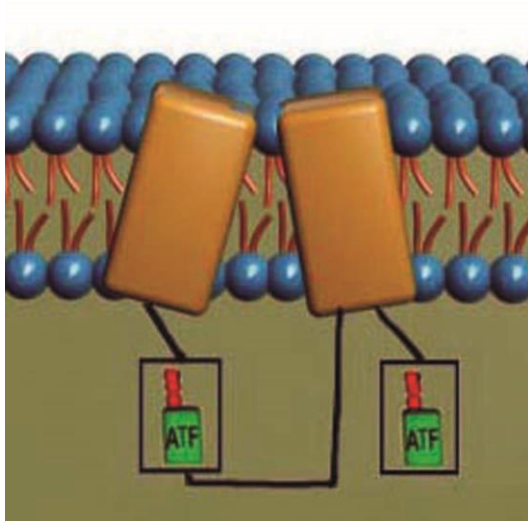


Рис.2.16. Схема строения АТФ-азы АВС-типа (АТФ соединяющей кассеты).

Впервые АТФ-азы АВС-типа были обнаружены во время исследований в клетках злокачественных опухолей. Было определено, что часть данных клеток погибает под воздействием токсического действия лекарственных препаратов, в то время как другая часть клеток в тех же условиях сохраняет свою целостность и продолжает свою деятельность. После подтверждения наличия в цитоплазме клеток второй группы специфического гена, участвующего в синтезе белков АВС-типа, его стали именовать геном устойчивости к различным лекарственным средствам (MDR – multidrug resistance gene).

В настоящее время насос, именуемый MDR-1 и синтезируемый в нормальном состоянии в малом количестве, участвует в выведении чужеродных и опасных образований из клетки. В связи с тем, что в некоторых злокачественных клетках данный насос синтезируется в больших количествах и немедленно выводит лекарственные средства, является причиной отсутствия терапевтического эффекта.

В результате проведенных исследований обнаружено, что белки, работающие в дыхательных путях, как каналы Cl^- , обеспечивающие перемещение поступивших в цитоплазму белков-антигенов в эндоплазматическую сеть, а также участвующие в синтезе желчи печени и участвующие в создании основы хромосомы, являются АТФ-азами АБК-типа.

КАНАЛЫ

Интегральные белки, принимающие участие в процессах избирательной проницаемости путем облегченной диффузии, делятся по своим морфо-функциональным особенностям на две группы:

1. белки, образующие канал или ионные каналы (рис.2.13 - 2)
2. белки-переносчики (рис.2.13 - 3).

Гидрофобные аминокислоты данных белков, вращаясь в ту или иную сторону, образуют связь с цепями жирных кислот молекул фосфолипидов, а гидрофильные аминокислоты, вращаясь к центру, формируют наружную часть гидрофильного отверстия (туннель) (рис.2.13 – 2,3).

Известно, что одна часть ионных каналов, кодируемая более чем 100 генами, способна перемещать в различных направлениях клеточной мембраны лишь один ион, другая часть – несколько ионов или растворенные в воде микромолекулы.

Характерной особенностью ионных каналов является их способность к избирательной проницаемости. Данную особенность можно ясно наблюдать на примере сравнения потенциал-зависимых Na^+ и K^+ каналов. Известно, что ионы K^+ значительно больше по своим размерам ($r=0,133$) в сравнении с ионами Na^+ ($r=0,095$). Несмотря на это, скорость проведения ионов K^+ через K^+ канал значительно выше (как минимум в 1000 раз), чем их пропускная способность для ионов Na^+ . В отличие от обычных гидрофильных отверстий, ионные каналы не всегда пребывают в открытом состоянии (см. далее). В пространственном строении белков, образующих эти каналы, имеется часть, напоминающая дверь, которая лишь при воздействии определенных внутри- или внеклеточных сигналов способна, изменив свою форму, привести каналы в открытое состояние и вновь вернуться в обратную форму. (см. далее).

Учитывая сказанное выше, можно разделить ионные каналы на две группы – открытые каналы и каналы с дверью (открывающиеся/закрывающиеся).

Воротные каналы (каналы «с дверью»)

Среди воротных каналов всесторонне изучены K^+ , Na^+ , Ca^{2+} и Cl^- -каналы.

K^+ каналы. Современные представления о строении и механизмах функционирования ионных каналов, обладающих избирательной проницаемостью, наиболее полно сформировались при изучении каналов K^+ . Не случайно то, что автор множества инноваций в этой области Р.МакКиннон, является одним из двух ученых, получивших в 2003 году Нобелевскую премию в области химии.

В результате исследований проведенных Р.МакКинноном и другими авторами было определено, что каналы K^+ имеют 4 субъединицы одинакового состава, которые охватывают со всех сторон путь прохождения ионов. На концах субъединиц, обращенных к поверхности клетки, имеется фильтр, обладающий избирательной проницаемостью, а на поверхности, обращенной в сторону цитоплазмы имеется участок, играющий роль двери. Роль фильтра играет гидрофильная полость, имеющая диаметр 0,2 нм и длину 1,2 нм, образованная промежутками между Р-петлями (оранж. цвета на рис.2.17), соединяющими α -субъединицы белка между собой. Данная полость всех видов K^+ каналов выстлана глицин-тирозин-глицин последовательностью остатков аминокислот и окружена со всех сторон атомами кислорода (на рис.2.17 указ. как черные точки), входящими в состав карбонильной группы ($\text{C}=\text{O}$).

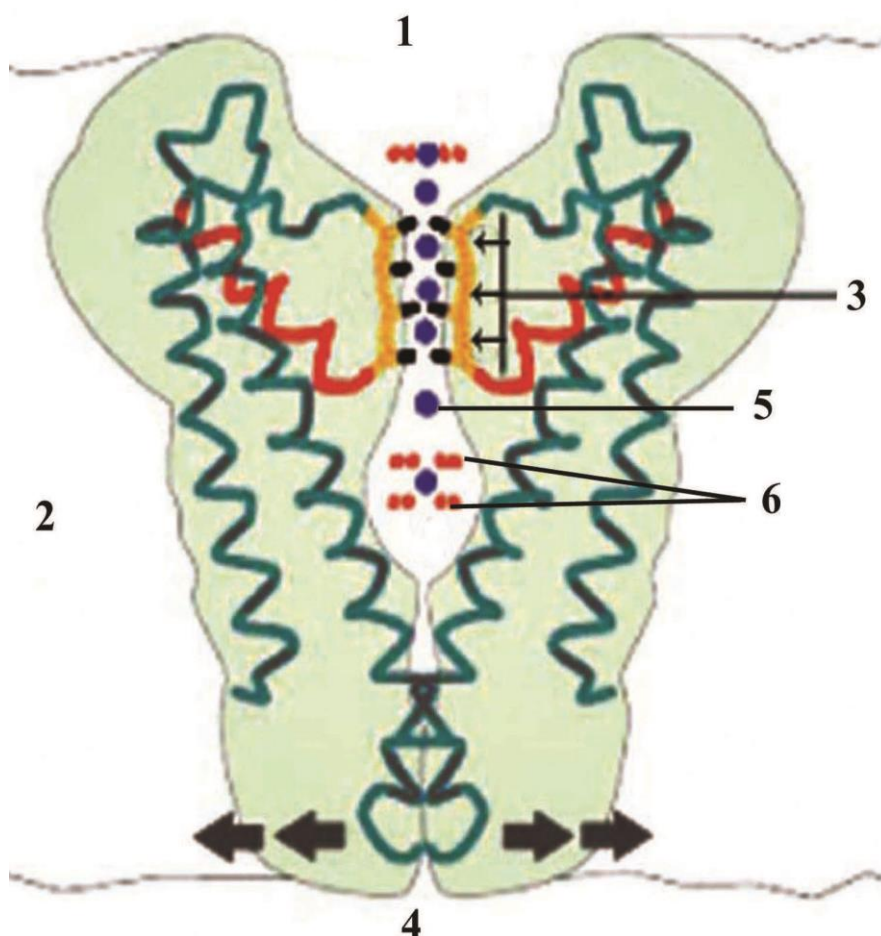


Рис. 2.17. Схема воротного K^+ канала.

1- Ионный канал; 2- клеточная мембрана; 3- фильтр для ионов; 4- воротный участок; 5- ионы K^+ ; 6- молекулы воды

Как видно из рисунка 2.17, ионы K^+ снаружи и внутри фильтра находятся лишь в соединенном с молекулой воды состоянии, а в области фильтра видны лишь дегидратированные K^+ . Таким образом, если в обычном состоянии K^+ образует связи с атомами кислорода в составе воды, то в области фильтра подобные связи он образует с атомами кислорода карбонильной группы аминокислот. Точнее K^+ , теряя свою водную оболочку (после дегидратации), перемещается внутрь фильтра, вступая в связь с карбонильными группами аминокислот.

Имеется две причины значительно низкой скорости прохождения ионов Na^+ по K^+ каналам: 1) в связи с маленькими размерами дегидратированных ионов Na^+ они не способны создавать необходимые связи с окружающими фильтр карбонильными группами; 2) по причине больших размеров ионов Na^+ , соединенных с молекулами воды, они не могут размещаться в полости фильтра.

У белков, образующих K^+ каналы во внутриклеточной части, имеется специфический сенсорный участок со стороны цитоплазмы, способный воспринимать деполяризацию, являющийся участком соединения с Ca^{2+} , а на части обращенной к наружной стороне клетки – участок соединения с различными лигандами. Сравнительный анализ белков во время открытого и закрытого положений канала показывает, что сенсорные участки, принимая соответствующие раздражения, оттягивают в

сторону α -спирали (рис.2.17 указ.стрелкой), расположенные возле цитоплазмы, тем самым приводя канал в открытое состояние.

Калиевые каналы встречаются во всех имеющихся клетках организма. Данные каналы участвуют в образовании мембранного потенциала (потенциал покоя), в регуляции осмотического давления и объема клетки, в модуляции электрических раздражений в нервных клетках и т.д.

При мутационных изменениях в синтезе белков, составляющих K^+ каналы, наблюдается существенное снижение уровня ионов K^+ в организме и как следствие, удлинение интервала QT на электрокардиограмме, отображающей деятельность сердца (ЭКГ). Причиной этого является запоздалое открытие калиевых каналов во время деполяризации в клетках сердечной мышцы. Тогда, в результате увеличения срока потенциала действия в сердце могут наблюдаться аномальные ритмы сердечного цикла, приводящие в итоге к внезапной смерти.

Na^+ каналы по своему строению схожи с K^+ каналами. Основное их отличие заключается в том, что они состоят не из отдельных субъединиц, а из одной белковой цепи с молекулярной массой 260 кД. Основной особенностью Na^+ каналов является то, что они, открывшись всего лишь на одну или две миллисекунды, вновь возвращаются в закрытое состояние. Между тем первичная деполяризация, необходимая для образования потенциала действия в некоторых видах клеток, в особенности способных принимать раздражение, таких как поперечнополосатая мышечная, нервная, сердечная, возможна лишь при переходе каналов в открытое состояние.

Следует отметить, что врожденная недостаточность синтеза белков натриевых каналов также может являться причиной удлинения интервала QT на ЭКГ. Однако в данном случае появление аномальных ритмов наблюдается в результате запоздалой реполяризации из-за удлинения периода возвращения Na^+ канала в неактивное состояние. Местные анестетики (лидокаин, прокаин), которые используются при обычных медицинских операциях, сохраняя каналы Na^+ в закрытом состоянии, препятствуют возникновению потенциала действия и тем самым нарушают транспорт болевого импульса в центральную нервную систему.

Ca^{2+} каналы в сравнении с другими катионовыми каналами представлены сложными белковыми комплексами, которые состоят из субъединиц (α , α_2 , β , γ) различного состава и количества. Данные каналы находятся как в клеточной оболочке, так и в оболочке окружающей эндоплазматическую сеть.

Ca^{2+} канал, активирующийся во время деполяризации клеточной мембраны и присоединения лиганда к определенной рецепторной части, обеспечивает перемещение ионов Ca^{2+} в цитоплазму по градиенту концентрации.

Ca^{2+} каналы играют важную роль в регулировании мембранного потенциала, в сокращении мышц, в процессе секреции, в образовании межклеточных связей, в осуществлении в качестве вторичного посредника, различных процессов, идущих в клетке.

СГ каналы. Это самые распространенные потенциал-зависимые каналы. До настоящего времени среди них обнаружено более 15-ти изомеров. Белки, участвующие в их образовании, состоят из двух субъединиц (димеры).

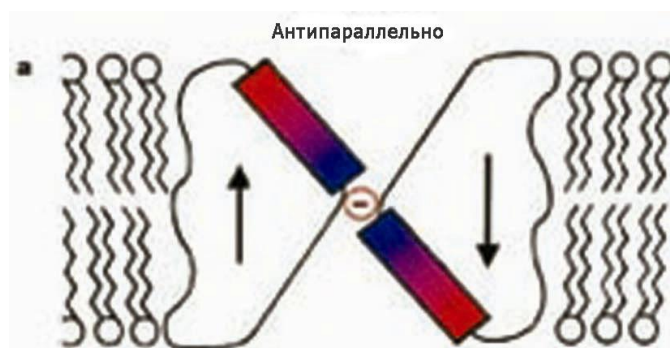


Рис.2.18. Образование ионного фильтра в центре Cl^- канала, путем охватывания его положительно заряженными аминокислотными остатками в антипараллельно расположенных α -спиралях субъединиц канала.

В отличие от K^+ каналов в Cl^- каналах путь для ионов находится не между субъединицами, а внутри каждой из них. В связи с этим их сравнивают с двуствольным ружьем. Это свойство делает Cl^- каналы схожими с поринами и аквапоринами.

Второй отличительной особенностью Cl^- каналов по сравнению с K^+ каналами, является то, что часть, играющая роль фильтра, находится не вблизи от поверхности клетки, а в центре канала.

Каждая субъединица Cl^- каналов состоит из 18 α -спиралей и имеет две схожие части. При этом аналогичные друг другу части, располагаются в противоположных направлениях (антипараллельно) (рис.2.18), охватывая ионный канал со всех сторон. Таким образом, части субъединиц, несущие положительный заряд (окрашены на рисунке 2.18 красным), располагаясь в центре клеточной мембраны, окружают отверстие, играющее роль фильтра, длина которого 1,5нм, а ширина 0,2нм. Выше и ниже данного отверстия расположены гидратированные ионы Cl^- (рис.2.19). Способность, описанного выше канала избирательно пропускать только ионы Cl^- объясняется наличием в области фильтра специальных участков, способных соединяться с ионами Cl^- . В обычном состоянии эти места заняты карбоксильными группами глутаминовой кислоты.



Рис.2.19. Ионы Cl^- соединяются с областью фильтра после отсоединения молекул воды. После перемещения они вновь соединяются с молекулами воды и переходят с одной стороны канала в другую (Farhlee C. Am. J. Physiol. Ren. at Physiol. 2001, v.280,F 748 – F 757).

Вследствие различных физических и химических воздействий (электрический потенциал, концентрация Cl^- и pH) указанные карбоксильные группы меняют свое положение и их места занимают ионы Cl^- . Наличие положительно заряженных частей в области фильтра притягивает ионы Cl^- , тем самым обеспечивается их прохождение с одной стороны клеточной мембраны в другую (рис.2.19).

Cl^- каналы участвуют в усилении чувствительности клеточной оболочки к раздражению (в частности в поперечнополосатых мышечных волокнах и нервных клетках), в регулировании внутриклеточного давления, в регулировании уровня pH в составе органелл, а также в прохождении солей содержащих молекул и воды сквозь эпителиальные выстилки.

В случае мутационных изменений Cl^- каналов наблюдается болезнь Томпсона (миотония) и мочекаменная болезнь.

В зависимости от того, какие физические и химические факторы, влияют на открытие ионных каналов, можно выделить механо-чувствительные, потенциал-зависимые, G-белок-зависимые, лиганд-зависимые (медиатор-зависимые, нуклеотид-зависимые, АТФ-зависимые, пептид-зависимые) каналы.

Механо-чувствительные каналы.

Открытое состояние данных каналов возможно только в результате физического воздействия на клетку. Примером могут послужить волосковые клетки в органе слуха и относящиеся к механорецепторам тельца Фатера-Пачини. Так было выявлено, что расположенные на фаланговых клетках базилярной пластинки сенсорные волосковые клетки перепончатой улитки на своей апикальной поверхности имеют особые микроворсинки - стереоцилии. Последние могут вступать в тесный контакт с белками покровной (текториальной) мембраны кортиева органа с помощью особых тонофибрилл. Поэтому в такт полученным акустическим сигналам происходит резонансные отклонения стереоцилий в определенном направлении, что вызывает натяжения вышеназванных тонофибрилл. Это приводит к открытию канала. При этом большое количество ионов (в основном катионов) проникают в цитоплазму, что вызывает деполяризацию волосковых сенсорных клеток, а это в свою очередь передается нервным клеткам. В итоге данные воздействия, обернувшись нервным импульсом, воспринимаются мозгом в виде звука (интерпретация).

Потенциал-зависимые каналы открываются и закрываются в результате изменения потенциала вокруг плазмолеммы клетки. К примеру, при проведении импульса нервным волокном деполяризация определенной части данного волокна не позволяет закрывшимся на небольшой период времени (несколько миллисекунд) Na^+ каналам аксолеммы открыться вновь. Это имеет особое значение для передачи каждого нервного импульса в отдельности и носит название *рефракторного периода*.

G-белок-зависимые каналы. Конформационные изменения белков, составляющих данный канал и приводящие к его открытию либо закрытию, возможны лишь при участии G-белка. Примером может служить открытие K^+ каналов, во время присоединения G-белка к рецептору ацетилхолинмускорина в сердечной мышце.

Лиганд-зависимые каналы. В белках, образующих данный канал, имеется рецепторная часть, соединяющаяся с сигнальными молекулами (лигандами). Поэтому, открытие их возможно лишь во время соединения лиганда с рецептором. Данные каналы в отличие от потенциал-зависимых каналов, снова закрываются лишь после отсоединения лиганда. Для активации данных каналов в роли лиганда выступают нейромедиаторы, некоторые нуклеотиды, АТФ, ГТФ и небольшие пептиды:

- **медиатор-зависимые каналы** расположены в основном в постсинаптической оболочке синаптической области и соединяясь с соответственным нейромедиатором изменяют свою конфигурацию, тем самым обеспечивая поступление определенных ионов в клетку. Если поступивший

в цитоплазму ион является положительным, то в результате деполяризации импульс передается от одной клетки в другую. Если поступит отрицательный ион, то вследствие гиперполяризации импульс от клетки к клетке не передаётся. Поэтому первая группа носит название *раздражающих*, а вторая группа - *тормозящих медиаторов*.

- **нуклеотид-зависимые каналы** изменяют свою конформацию во время соединения с циклическим аденозинмонофосфатом (цАМФ), либо с циклическим гуанозинмонофосфатом (цГМФ), пропуская при этом соответствующие ионы в клетку. Примером этому может служить открытие соответствующих ионных каналов во время присоединения цГМФ к палочковым клеткам сетчатой оболочки и цАМФ к обонятельным рецепторам.

- **АТФ-зависимые каналы** - участвуют в поступлении катионов в клетку во время присоединения АТФ, находящейся вне клетки. Молекулы АТФ в синаптическом пузырьке находятся в связанном с нейромедиатором состоянии и выводятся при помощи экзоцитоза. Примером могут служить симпатические нервы, иннервирующие сосуды, и нервы участвующие в восприятии боли. Следует отметить, что наряду с АТФ-зависимыми существуют также ГТФ-зависимые каналы. Вместе их называют «пуриnergическими» каналами и обозначают соответственно P2X и P2Y.

- **пептид-зависимые каналы.** Данные каналы, открывающиеся при воздействии мелких пептидов, впервые были обнаружены у беспозвоночных. Они избирательно участвуют в перемещении лишь ионов Na^+ .

Несмотря на установленные фактические данные, подтверждающие синтез определенных пептидов в человеческом мозге, информация об их функции все еще является поверхностной.

Открытые ионные каналы

Наряду с указанными выше воротными каналами существуют также и постоянно открытые каналы. Среди них наиболее часто встречающимися являются K^+ каналы, водные каналы – порины и аквапорины.

Следует отметить, что наряду с потенциал-зависимыми и лиганд-зависимыми K^+ каналами, во всех клетках человеческого организма существуют так же открытые каналы K^+ . Эти каналы также называют *выпрямляющими K^+ каналами*. Они регулируют потенциал покоя, способность нервных клеток и клеток сердечной мышцы к раздражению.



Рис.2.20. Схематический вид сагитального разреза субъединицы AQP1. Показано перемещение молекул воды из внеклеточного пространства в цитоплазму. Видны 4 молекулы воды, расположенные в ряд в центре канала. Дополнительная информация дана в тексте (P.Agre,D.Kozono. – FEBS Letters 27718,2003,p.1-7).

Водные каналы - аквапорины. Несмотря на то, что аквапорины относятся к семейству самых древних белков, определяющихся в живых организмах (от бактерий до человека) их роль в качестве канала для молекулы воды была выявлена сравнительно недавно.

В 1988-м году П.Агре с сотрудниками опубликовали информацию о выделенном ими из эритроцитов и эпителиоцитов почечных канальцев ранее неизвестного белка CHIP28. В ходе дальнейших углубленных исследований после выявления состава белка и гена, участвующего в его синтезе, авторы добиваются экспрессии данного белка на оболочке яйцеклетки шпорцевой лягушки (Xenopus). Яйцеклетка, слабо проводящая воду в обычном состоянии, после экспрессии данного белка в гипотонических (гипоосмотических) растворах набухает и лопается. С того момента было подтверждено, что обнаруженный белок CHIP28, является водным каналом и в данное время он именуется аквапорин-1 (AQP1).

Каждый из водных каналов состоит из четырех субъединиц, которые в свою очередь состоят из 6 внутримембранных α - субъединиц. В центре каждой субъединицы имеется похожий на песочные часы канал, в котором размещаются молекулы воды (рис.2.20). Со стороны обращенной к цитоплазме и к поверхности клетки диаметр данного канала составляет 2 нм, в направлении же к центру канал (коридор) сужается.

Выше от центра канала на расстоянии 0,8 нм, имеется узкое отверстие диаметром 0,28 нм (примерно равное диаметру молекулы воды). Вокруг отверстия и в области сужения канала расположены положительно заряженные аминокислоты (рис.2.20 R195, H180). Данные каналы проводят только молекулы воды и на это есть три причины:

1. Узкий диаметр канала
2. Электростатическое отталкивание катионов положительно-заряженными аминокислотами, расположенными вокруг отверстия канала

3. Расположение на противоположных полюсах канала только положительно-заряженных аминокислот (рис.2.20 N76).

Таким образом, обеспечивается прохождение молекул воды, сквозь канал не обычным током, а путем вращения. Это препятствует прохождению протонов в центре канала способом разбрызгивания (“proton hopping”).

В 2003 году П.Агре стал лауреатом Нобелевской премии благодаря своим заслугам по обнаружению участвующего в образовании водного канала AQP1, а также благодаря исследованиям по пространственному строению и механизму работы данного канала. В результате интенсивных работ последних лет, наряду со сбором информации о строении аквапоринов, была также выяснена их роль в образовании ряда заболеваний. Примечательным фактом является то, что в результате исследований, проведенных с аквапоринами, были подтверждены принципы возникновения дисфункций белка на молекулярном и атомарном уровнях.

AQP1 чаще всего встречаются в эритроцитах, в эндотелиальных клетках сосудов, в проксимальных извитых канальцах почек и в желудочках мозга (в местах образования спинномозговой жидкости). При врожденных нарушениях синтеза AQP1 на фоне отсутствия видимых изменений, у данных лиц уровень концентрации выделяемой ими мочи не превышает 450 мОсм (в норме 1000-12000 мОсм) и выявляется недостаточное количество воды в секрете потовых и других желез.

В случае недостаточности AQP2 происходит нарушение реабсорбции воды собирательными почечными канальцами, в результате чего выделяется до 20 литров мочи в день (в норме 1,5-2,0л), что приводит к возникновению нефрогенного несахарного диабета.

В настоящее время обнаружено 10 изомеров аквапорина у млекопитающих. 4 из них (AQP1, AQP2, AQP4, AQP5) обеспечивают прохождение сквозь клеточную мембрану в обоих направлениях только молекул воды, 4 других (AQP3, AQP7, AQP9, AQP10) - проводят кроме воды также и молекулы глицерина. Оставшиеся два аквапорина (AQP6, AQP8) участвуют соответственно в образовании межклеточных связей и регуляции pH в составе органелл. Следует отметить, что скорость проникновения молекул воды сквозь клеточную мембрану посредством простой диффузии очень мала. Благодаря присутствию аквапоринов, в результате изменений, происходящих по различным причинам вокруг клеточной мембраны, становится возможным проникновение 10⁶ молекул воды сквозь клеточную оболочку в обоих направлениях. Мгновенное набухание эритроцитов (в гипотоническом растворе) либо их сморщивание (в гипертоническом растворе), зависящее от осмотического давления окружающей среды связано с наличием молекулы аквапорина-1 в их стенке.

Порины - являются белками, образующими открытый, наполненный водой канал и более широкие по сравнению с другими каналами. Они обнаруживаются в наружной оболочке митохондрий, хлоропластов и грамотрицательных бактериях. Состоят они не из внутримембранных α -спиралей, а из β -складок.

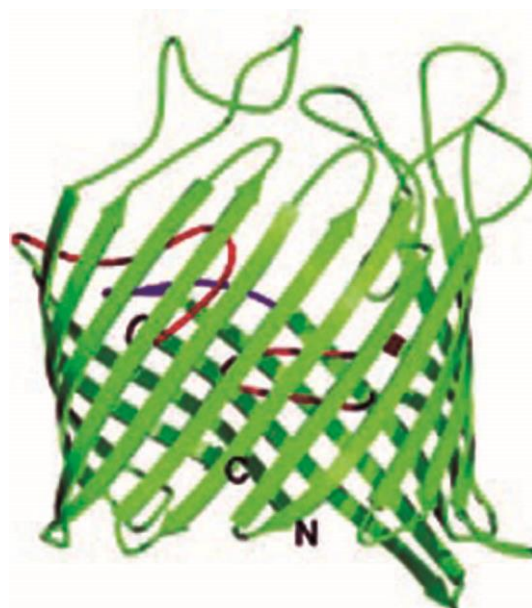


Рис. 2.21. Строение мономера порина. Имеется от 16 до 18 складок в составе каждого мономера.. (H.Nikaido. J.Microb, and Mol.Biol. Ref.,2003,v.67,4,p.593-656).

Порин - тример, состоящий из трех субъединиц. 16-18 β - складок каждой из трех субъединиц, напоминают форму бочки и располагаясь параллельно друг другу, но в противоположных направлениях, окружают канал со всех сторон (рис.2.21).

Наряду с ионами через пориновые каналы могут свободно проходить, также и низкомолекулярные гидрофильные молекулы.

Белки – переносчики

Данные белки так же называют *ионофорами* или *транспортёрами*. Молекулы белков-переносчиков неоднократно перекрещиваются с клеточной мембраной и с одной либо с обеих сторон имеют участки для соединения с определенными ионами и молекулами. Поэтому, по сравнению с белками, образующими ионные каналы белки-переносчики лишь после непосредственного соединения с ионами и молекулами обратимо изменяют свою конформацию, и обеспечивают перенос с одной стороны мембраны на другую (рис.2.14).

Перенос обеспечиваемый белками-переносчиками, может быть как одиночным, так и сочетанным, т.е. подразделяется на две группы (рис.2.22).

Во время одиночного переноса (унипорт) лишь одно вещество способно перемещаться в одном направлении (рис.2.22 -1). Во время сочетанного перемещения, белок-переносчик способен обеспечить перенос двух и более веществ (рис.2.22 -2) в одном (симпорт) и противоположных (антипорт) направлениях (рис.2.22-3).

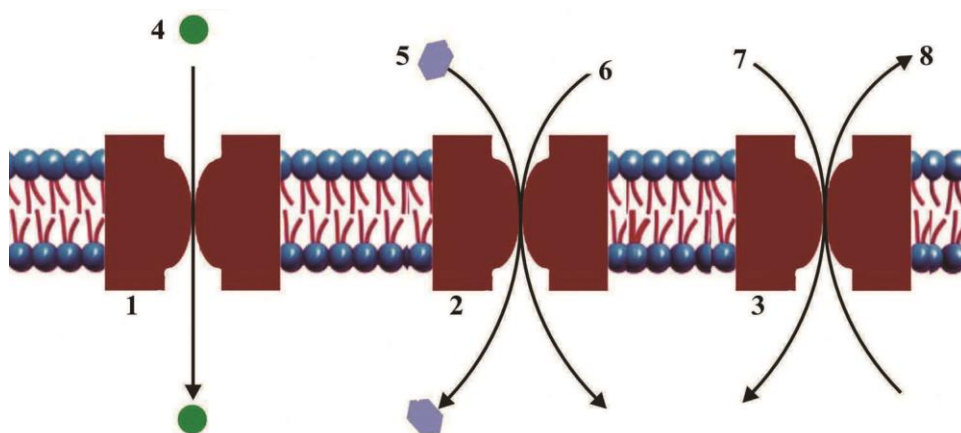


Рис.2.22. Виды одиночного и сочетанного перемещения.

1- унипортный транспорт; 2- симпортный совместный транспорт; 3- антипортный совместный транспорт; 4- аминокислота; 5- глюкоза; 6- Na^+ ; 7- АДФ; 8- АТФ.

Одиночное перемещение (унипорт)

Одиночное и сочетанное перемещение ионов и молекул показано в таблице 2.2

Как видно из таблицы белки, участвующие в одиночном перемещении (унипорт) глюкозы и аминокислот, осуществляют его при помощи облегченной диффузии (рис.2.22-1).

Вид перемещения	Унипорт	Симпорт	Антипорт
Перемещающиеся молекулы и ионы	Глюкоза Аминокислоты	Na^+ /Глюкоза Na^+ /Аминокислоты Na^+/Cl^- $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ $\text{Na}^+/\text{H}_2\text{PO}_4$	Na^+/H^+ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ АДФ/АТФ

У белков, обеспечивающих унипорт, либо на внутриклеточной их части, либо на поверхности, обращенной к цитоплазме, имеются участки для соединения с глюкозой (рис. 2.23) и аминокислотами. Как только происходит соответствующее соединение белки, подвергшись конформационному изменению, перемещают глюкозу и аминокислоты по градиенту концентрации (рис.2.23 В и С). Таким образом, глюкоза перемещается из плазмы крови в эритроциты, а в клетках печени, напротив (в участках синтеза глюкозы) из цитоплазмы в межклеточную жидкость.

Существует 6 видов интегральных гликопротеинов, кодируемых GLUT – генами, которые участвуют в переносе глюкозы. Они обозначаются соответственно GLUT 1-6. Было установлено, что GLUT - 1 в эритроцитах, GLUT – 3 в нервных клетках, GLUT – 4 в жировых и мышечных клетках, GLUT – 5 в сперматозоидах и клетках эпителия кишечника участвуют в переносе глюкозы и фруктозы из окружающей среды в клетку, а GLUT – 2 переносит глюкозу из эпителия кишечника в межклеточное пространство.

В случае мутации гена GLUT – 2 вместо аминокислоты валин на 197-й позиции располагается аминокислота изолейцин, что может являться причиной возникновения инсулин независимого сахарного диабета (второго типа).

Так же существует около 10-ти интегральных гликопротеинов, участвующих в переносе отдельных и определенных групп аминокислот через клеточную мембрану, кодируемых SLC- 1 и SLC – 3 генами. Они участвуют во всасывании аминокислот в кишечнике, реабсорбции их проксимальными канальцами почек, а также в поступлении в цитоплазму нейронов и глиальных клеток аминокислот выполняющих роль нейромедиатора.

Как видно из таблицы, сочетанное перемещение в одном (**симпорт**) направлении ионов и молекул осуществляется с помощью энергии, образованной вследствие разности концентрации ионов Na^+ (см.стр.28), т. е. с помощью вторичного активного транспорта. Еще одна особенность белков, осуществляющих импорт-перемещение, заключается в том, что на их поверхности, обращенной к цитоплазме или внутрь клеток, есть участки для соединения не только с молекулами Na^+ , но и с другими ионами и молекулами (рис.2.24). Сочетанное перемещение глюкозы и Na^+ в одном направлении, осуществляется с помощью гликопротеинов кодируемых SGLT генами. Они располагаются на апикальной поверхности эпителия проксимальных извитых канальцев почек и энтероцитов тонкой кишки и обеспечивают поступление глюкозы в цитоплазму соответствующих клеток.

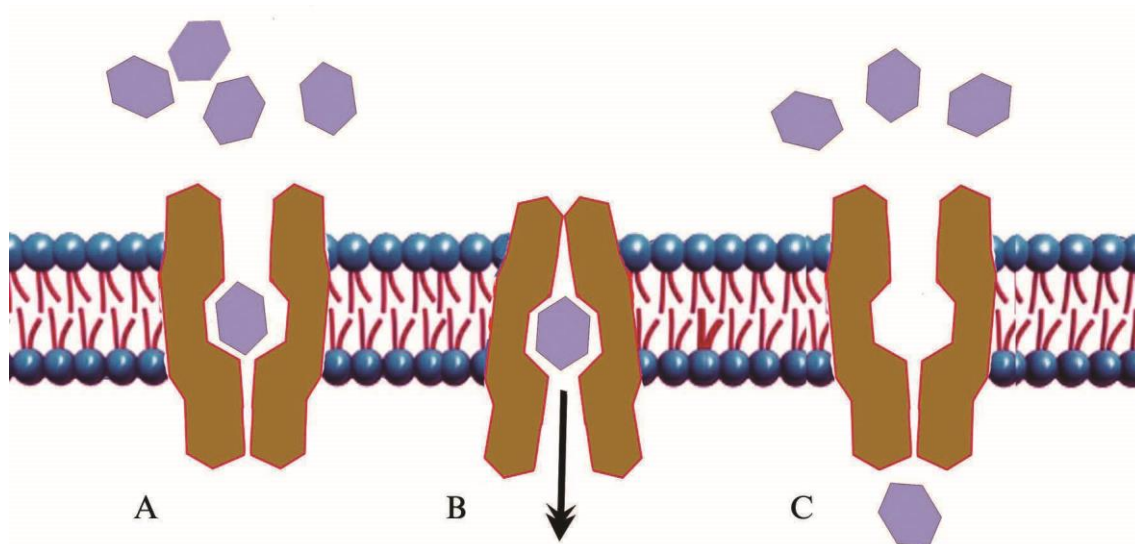


Рис.2.23. Облегченная диффузия при помощи переносчика.

С помощью переносчика Na^+/Cl^- , $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ обеспечивается проницаемость эпителиальных тканей и регуляция процессов секреции. В реабсорбции фосфатов проксимальными канальцами почек участвуют $\text{Na}^+/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ -переносчики, кодируемые NTP2 генами.

Белки, участвующие в противоположно направленном (**антипорт**) транспорте ионов, именуются также катионными (Na^+/H^+ , $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) и анионными ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) обменниками. С помощью деятельности Na^+/H^+ катионного обменника в почках, в пищеварительной трубке и во многих других органах, в результате поступления Na^+ в цитозоль и выведения оттуда H^+ , образовавшегося в процессе метаболизма, обеспечивается регуляция уровня pH.

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ катионные обменники встречаются во многих клетках, в частности в тех, которые способны раздражаться и сокращаться. В результате деятельности этого белка 3 Na^+ поступают в клетку, а один Ca^{2+} покидает ее против градиента концентрации. Благодаря работе $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ переносчика и Ca^{2+} насоса разность концентрации Ca^{2+} в клетке и вне ее достигает 10 тысяч.

К переносчикам, осуществляющим противоположное сочетанное перемещение (антипорт) относятся так же АДФ/АТФ-переносчики, расположенные во внутренней оболочке митохондрий.

Субъединицы (2 шт.), в составе данных переносчиков, состоящие из 6 α -спиралей, предположительно считаются предками остальных переносчиков.

В результате деятельности АДФ/АТФ-переносчиков, АДФ находящаяся в цитоплазме замещается на АТФ, синтезирующийся в матриксе митохондрий (рис.2.22).

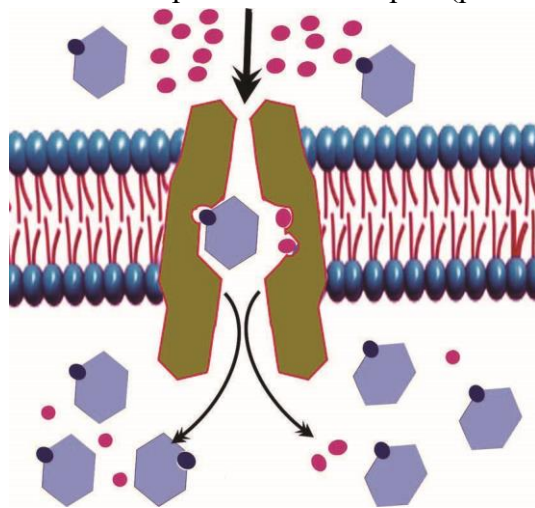


Рис.2.24. Вторичная активная проницаемость. Перенос глюкозы против градиента концентрации с помощью энергии, образованной разностью концентрации ионов (Na^+) благодаря работе Na^+/K^+ насосов.

Среди анионных обменников широко изученным является расположенный в плазмолемме эритроцитов белок-полоса 3. Углекислый газ (CO_2), образующийся в тканях при окислительных процессах, поступив в цитоплазму эритроцитов преобразуется в анион бикарбоната (HCO_3^-) под воздействием фермента карбоангидразы.

Следует отметить, что белки, составляющие данные структуры, функционируют не поодиночке, а все вместе, координируя свою деятельность, тем самым обеспечивая присущие каждой клетке функции, регулируя объем клетки, приспособлявая ее к окружающей среде и т.д.

Примером этому может служить перемещение ионов Na^+ и Cl^- из толстого отдела восходящей петли Генле входящего в состав морфо-функциональной единицы почки (нефрона), в пространство, окружающее каналец (рис.2.25). Что же касается почечных каналцев, то при помощи переносчика $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ локализованного на апикальной поверхности клеток эпителия, соединенных друг с другом плотными контактами, происходит замещение на определенные ионы соответственно градиенту Na^+ . На базолатеральной поверхности этих же клеток, при помощи Na^+/K^+ насоса, 3 Na^+ перемещаются в околоканальцевую жидкость, а 2 K^+ - в цитоплазму (рис.2.25).

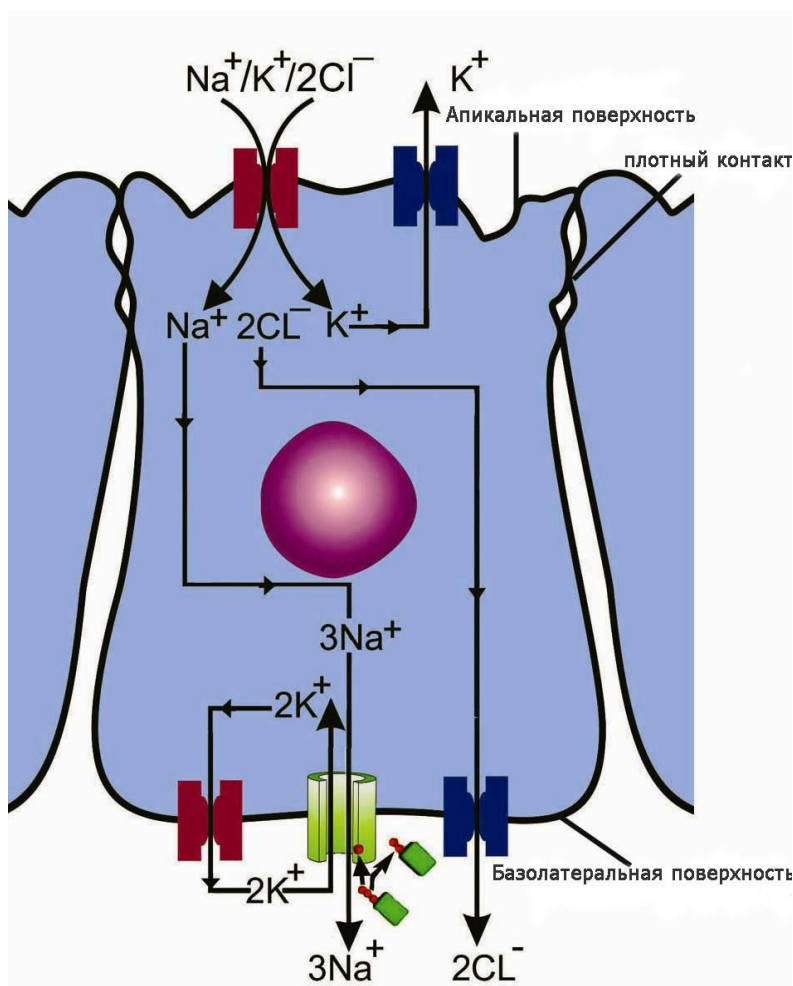


Рис.2.25. Механизм образования гипертонического раствора вокруг трубочек мозгового вещества почки, в результате работы переносчиков и насосов на апикальной и базальной частях эпителия покрывающего восходящее колено петли Генле.

Каналы Cl^- , на той же поверхности перемещают одноименные ионы в околоканальцевую жидкость. Наряду с этим, ионы K^+ , поступившие в цитоплазму и с апикальной и с базальной поверхности эпителиальных клеток, возвращаются обратно с помощью открытых каналов K^+ . Т.о. поступление молекулы NaCl в полость толстой части восходящей петли Генле из околоканальцевой жидкости, с одной стороны приводит к выведению Na^+ и Cl^- из организма, а с другой стороны является причиной увеличения осмолярности интерстициальной жидкости в мозговом веществе почки. Последнее является основным фактором образования вторичной (концентрированной) мочи.

Эндоцитоз

Не сумевшие поступить в клетку с помощью насосов, каналов и переносчиков макромолекулы, растворенные в воде вещества, микроорганизмы, различные частички (фрагменты погибших клеток) и др., поступают в нее при помощи эндоцитоза, имеющего различные формы и достаточно сложные механизмы. Термин «эндоцитоз» был впервые использован Кристианом де Дью (1963) для отображения процесса поглощения цитоплазмой производных, расположенных вне клетки.

Во всех клетках организма, за исключением эритроцитов, роль эндоцитоза в обеспечении клетки продуктами питания, в ее защите и в поддержании стабильности околоклеточной среды (гомеостаз) является незаменимой.

Процесс эндоцитоза имеет различные классификации. Общепринятым является то, что процесс поглощения крупных частиц и микроорганизмов называется **фагоцитозом** (рис.2.26-1), а макромолекул и растворенных в воде веществ – **пиноцитозом**. Если пузырек, образованный в процессе пиноцитоза, колеблется в размере 50-150 нм, то процесс называют **микропиноцитозом** (рис.2.26 – 5,6,7), а если он более больших размеров (150-200 нм) – то процесс именуется **макропиноцитозом** (рис.2.26-8).

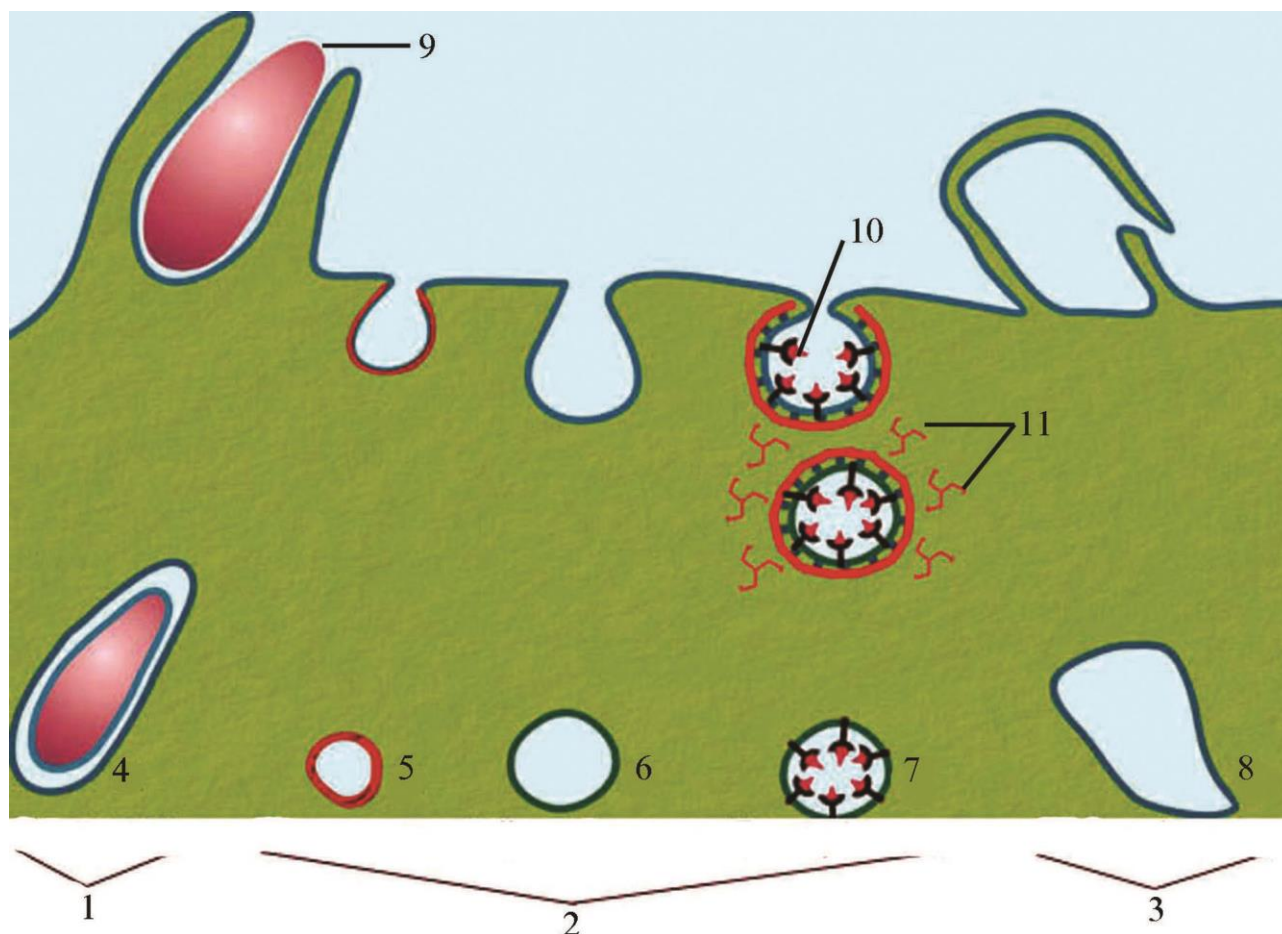


Рис.2.26. Виды эндоцитоза.

1- фагоцитоз; 2- микропиноцитоз; 3- макропиноцитоз; 4- фагосома; 5- кавеосома; 6- микропиносома; 7- рецептосома; 8- макропиносома; 9- поглощаемая частица; 10- комплекс лиганд-рецептор; 11- клатриновые белки.

Фагоцитоз

Фагоцитозом называют процесс поглощения специальными клетками (макрофаги, нейтрофилы) бактерий, одноклеточных, грибов, поврежденных клеток и не пригодных околоклеточных веществ (рис.2.27А). Процесс поглощения чужеродных организму частиц является рецептор-зависимым процессом и чаще всего обеспечивается при помощи специальных молекул (*опсонины*). В роли опсонинов выступают антитела и комплементарные белки крови. Антитела, соединяясь с антигенами на поверхности попавших в организм микроорганизмов, а комплементарные белки – с зараженными и

погибшими клетками. После этого и те и другие вступают в связь с опсонин-рецепторами на поверхности фагоцитов, запуская при этом процесс фагоцитоза. Формирование опсонин-рецепторных связей также называют *слипающейся стадией фагоцитоза*. После этого начинается процесс поглощения чужеродных частиц. Для этого, выросты на поверхности клетки (псевдоподии) соединяются между собой, охватывая частицу со всех сторон (рис.2.27 А). В итоге частица, окруженная клеточной оболочкой, поступает в клетку в качестве фагосомы. После соединения фагосомы с первичной лизосомой в цитоплазме начинается процесс уничтожения и переваривания чужеродных частиц.

Макропиноцитоз

Термин *макропиноцитоз* используется для обозначения процесса поступления пузырьков (макропиносомы) (2.26 - 8) с большим объемом жидкости в цитоплазму клетки (пузырьки достигают 1мкм), образованных в результате соединения ламеллоподий (рис.2.27 В), являющихся выростами клеточной оболочки. Примером макропиноцитоза может служить процесс поглощения тиреоглобулина Т-тироцитами щитовидной железы или процесс поглощения большого объема жидкости дендритическими клетками для обеспечения иммунного контроля. Следует отметить, что под воздействием факторов роста, процесс макропиноцитоза может временно протекать и в других клетках.

Микропиноцитоз

Микропиноцитоз в свою очередь имеет несколько форм:

1. Простой (без покрытия) пиноцитоз – поперечный размер пузырьков до 100 нм. (рис.2.26 - 6)
2. Пиноцитоз с клатриновым покрытием (рецептор-опосредованный) – поперечный размер пузырьков колеблется в пределах 100-150 нм (рис.2.26 -7).
3. Кавеолы – поперечный размер пузырьков 50-80 нм (рис.2.26 - 5)

Лишь в одном из вышеуказанных форм пиноцитоза – рецептор-опосредованном, пиноцитозные пузырьки окружены клатриновым покрытием, образованным несколькими белками. В связи с этим, фагоцитоз, простой пиноцитоз, кавеолы называют также эндоцитозом без клатринового покрытия.

Простой пиноцитоз (без покрытия)

Относительно механизма образования пузырьков в процессе простого пиноцитоза (рис.2.27 С), а также об их дальнейшей судьбе нет какого-либо общепринятого суждения. Наряду с этим, в виду отсутствия у них белка кавеолина и клатринового покрытия, имеется не малое количество информации о принятии их за самостоятельную производную и об их роли в обеспечении транспорта между клеточной мембраной и органеллами, в частности между лизосомами и комплексом Гольджи. Экспериментально было доказано, что перемещение некоторых молекул (IL-2, липиды, бактерии, токсины и т.д.) обеспечивается пузырьками, не имеющими покрытия.

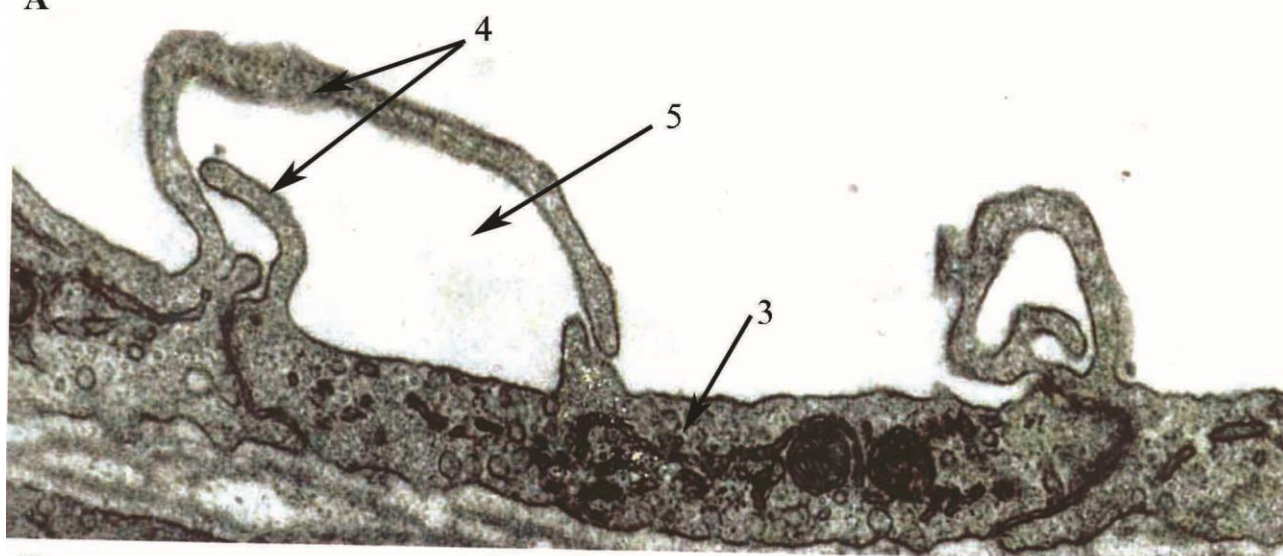
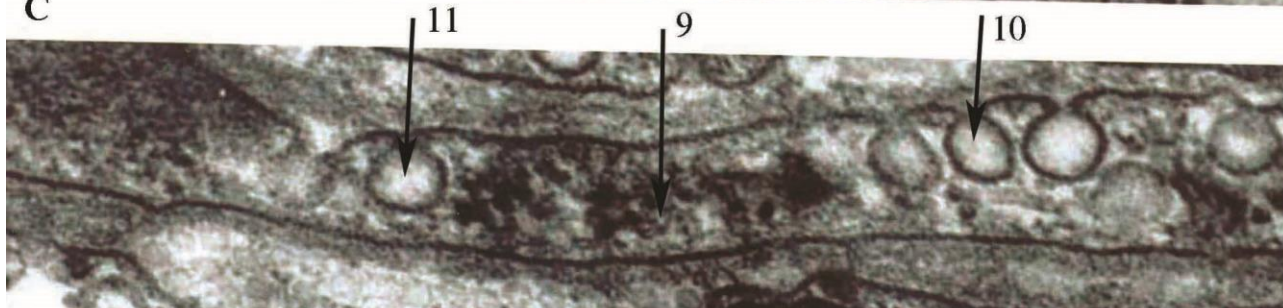
**A****B****C****D**

Рис. 2.27. Электронно-микроскопический снимок форм эндоцитоза.

А. Фагоцитоз – поглощение подвергнувшегося деструкции миелинового нервного волокна со стороны эндоневрального макрофага;

В. Макропиноцитоз – поглощение большого объема воды и растворенных в воде веществ из просвета сосуда в клетку при помощи отростков эндотелиальных клеток артериальных сосудов;

С. Рецептор-опосредованный эндоцитоз (показан одной стрелкой) и простой пиноцитоз (показан двумя стрелками);

Д. Видны кавеолы связанные и не связанные с клеточной мембраной периневральных клеток.

1. эндоневральный макрофаг; 1. деструктивное безмиелиновое нервное волокно; 3. эндотелиальная клетка; 4. отростки эндотелиальной клетки; 5. поглощаемая жидкость; 6. клеточная мембрана; 7. рецептосома; 8. пинососома; 9. периневральная клетка; 10. кавеола-связанная с клеточной мембраной; 11. кавеола-не связанная с клеточной мембраной.

Кавеолы

Кавеолы, будучи пузырьками (рис. 2.26-5, 2.27 Д), соединенными с клеточной мембраной посредством узкого перешейка, встречаются практически во всех формах клеток, в частности в клетках эндотелия. Обнаружение в стенках кавеол молекул, участвующих в образовании «рафта» (см. выше), указывает на тесную связь между этими двумя образованиями. Точнее предполагается, что кавеолы образуются именно в области данных рафтов. В образовании кавеол принимают участие элементы, составляющие «рафта», а так же белок *кавеолин*, имеющий связи с холестерином и жирными кислотами, который играет особо важную роль. В связи с наличием в области кавеол множества рецепторов, сигнальных молекул и переносчиков, они играют роль сигнального центра, дающего старт многим процессам, протекающих в клетке. Нахождение в области перешейка и вокруг него белка *динамина* (см. далее) имеющего ГТФ-азную активность, который участвует в отделении пузырька от цитоплазмы, свидетельствует о способности пузырька поступать в цитоплазму в качестве самостоятельного транспортного пузырька.

Кавеолы также способны перемещать в цитоплазму некоторые небольшие молекулы, не теряя при этом связь с клеточной оболочкой. Во время этого процесса, именуемого **патоцитозом**, некоторые небольшие молекулы (напр. холестерин), поступают в цитоплазму методом диффузии, вступая при этом в связь лишь со стенкой кавеолы.

Рецептор-опосредованный эндоцитоз – пиноцитоз с клатриновым покрытием

С помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза обеспечивается поступление в клетку различных веществ – лигандов (напр. трансферринов, липопротеинов, токсинов, иммуноглобулинов, факторов роста, некот. вирусов) (рис. 2.26 -7). Основной причиной того, что данный процесс носит избирательный характер является наличие в мембране клеток интегральных белков, играющих роль рецептора, способных соединяться лишь с определенными лигандами. После установления роли белка-клатрина в образовании пузырька, было выявлено участие в данном процессе, еще более чем 25-ти белков. Не останавливаясь на подробном описании каждого из них отметим, что в образовании пузырька с покрытием участвуют: интегральные белки, играющие роль рецептора; адапторные (арестин, AP-2) белки (сортировщики); клатрин; динамин и амфифизин. (рис. 2.28).

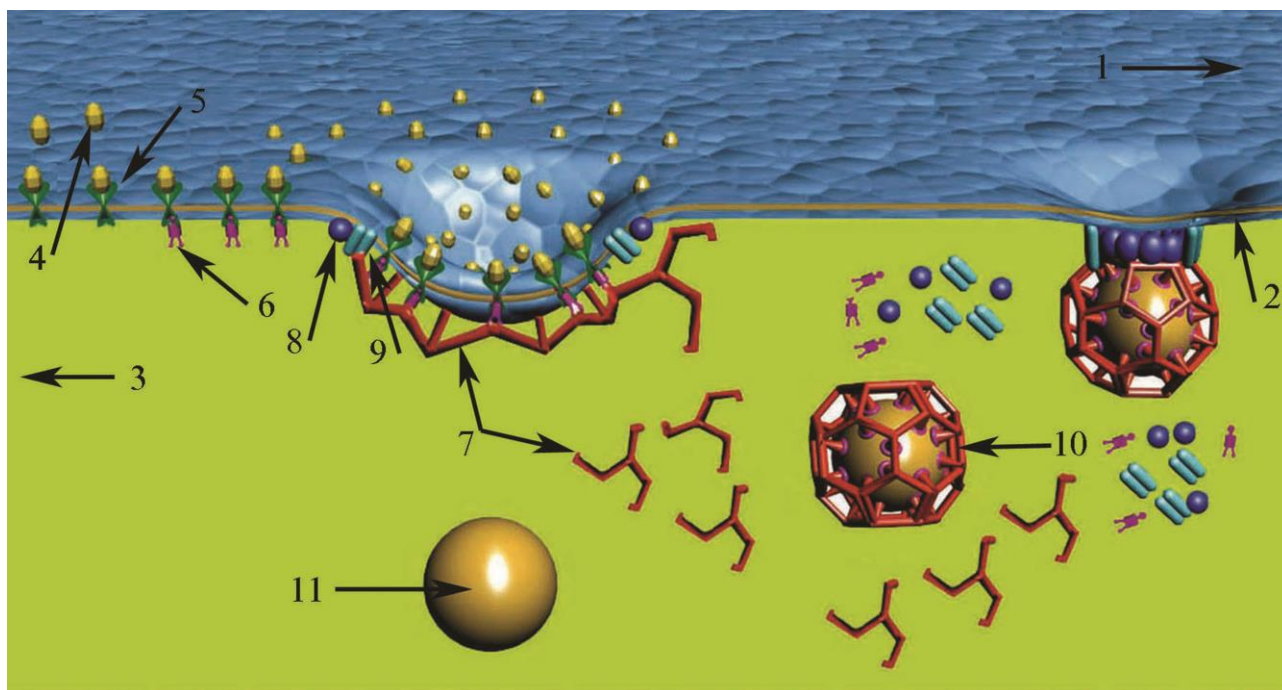


Рис.2.28. Схематический рисунок механизма образования пиноцитозного пузырька с клатриновым покрытием.

1- внеклеточная среда; 2- клеточная мембрана; 3- цитоплазма; 4- лиганд; 5- рецептор; 6- AP-2; 7- клатрин; 8- динамин; 9- амфифизин; 10- пузырек с клатриновым покрытием; 11- пузырек освобожденный от клатрина.

Было выявлено четыре вида белков, играющих роль адаптера (Adapter proteins AP1, AP2, AP3, AP4). Среди них в процессе эндоцитоза участвует лишь AP2. Адаптерные белки играют роль моста между клатрином и цитоплазматической поверхностью интегрального белка (рецептора). Процесс образования белком AP2 связи между цитоплазматической поверхностью интегрального белка и клатрином указывает на начало процесса рецептор-опосредованного эндоцитоза. (рис.2.28).

Белок клатрин состоит из трех тяжелых (190кД) и трех легких (30кД) цепей. Тяжелые и легкие цепи, соединяясь, отходят от центральной точки в виде трех лучей, образуя структуру именуемую *трискелионом* (рис.2.28).

Как только AP2 соединяется с комплексом лиганд-рецептор (рис.2.26-6, 2.28), они так же связываются и с молекулами клатрина и образуют окантованную ямку (рис.2.29) на поверхности клеточной мембраны. Молекула AP2 и клатрина соединяясь между собой вокруг ямки, образуют плетеную сеть, имеющую пять или шесть отверстий. Параллельно с образованием сети, трискелионовый комплекс меняет свое пространственное строение, углубляя ямку и превращая ее в пузырек (рис.2.29 -2,3).

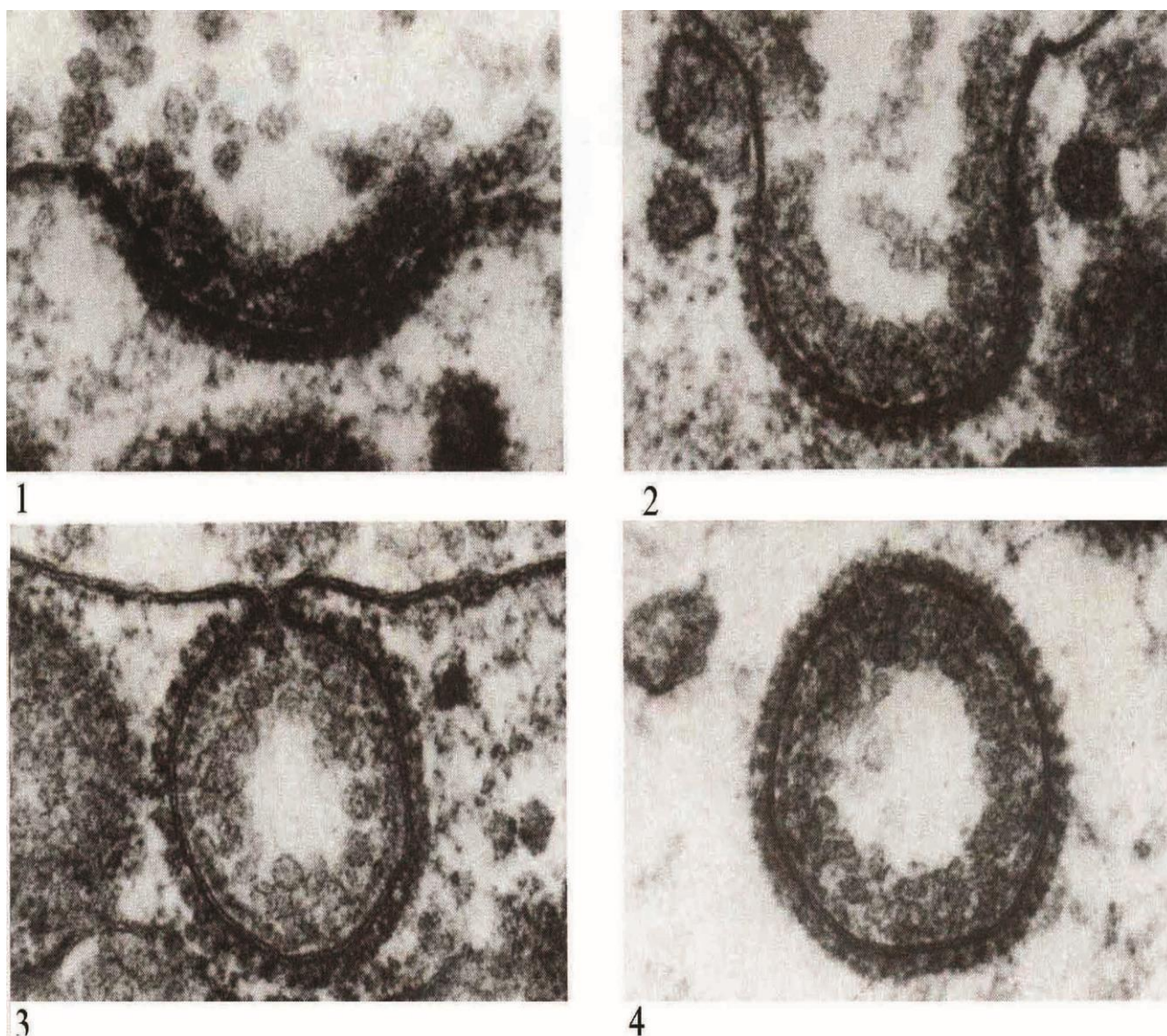


Рис.2.29. Этапы формирования пузырька с клатриновым покрытием.

- 1 - образование инвагинации с покрытием;
- 2 – углубление инвагинации с покрытием;
- 3 – отшнуровка пузырька с покрытием;
- 4 – погружение рецептосомы в цитоплазму (В.М.М. Perry. J.Ctl Sci, 19979, v.39, p.266)

По мере углубления пузырьков в цитоплазму амфифизин, располагающийся в области перешейка, образует связи, с одной стороны с клатрином и AP2, а с другой стороны с белком **динамин** (рис.2.28), имеющим ГТФ-азную активность. Белки динамина, соединяясь друг с другом, образуют кольцо в области перешейка пузырька (рис.2.28). Подвергшийся гидролизу белок динамина, изменив свою конформацию, способствует сужению области перешейка пузырька с последующим его отделением от клеточной мембраны. Т.о., окруженный со всех сторон клатрином и AP2 белком пузырек, имеющий в своей полости часть мембраны, поступает в цитоплазму (рис.2.28, 2.29 -4).

Как только данный пузырек поступает в цитоплазму, он теряет свой клатрин и AP2 покрытие под воздействием специфических факторов HSP70 (белки теплового шока), **шапероны** (рис.2.28) и соединяется с первичной эндосомой. (см.ниже).

Исследования последних лет показали, что в образовании и поступлении в цитоплазму клатринового пузырька участвуют элементы цитоскелета – актин и связанные с ним белки. (M.Sekiya-Kaïasaki et al, 2003, E.Smythe and K.R. Ayscohdh, 2003).

Подводя итоги изучения сведений, связанных с процессом эндоцитоза, следует отметить, что эндоцитоз с клатриновым покрытием происходит на тех участках плазмолеммы, где сосредоточены лиганд-рецепторные комплексы, а эндоцитоз без клатринового покрытия (простой эндоцитоз, кавеолы, макропиноцитоз, фагоцитоз) происходит с участием специализированных участков клеточной мембраны, называемой «рафтом». В образовании эндоцитоза без клатринового покрытия в определенной последовательности принимают участие белки - кавеолин, ARF (белок связанный с ГТФ, отделяющий пузырьки от транс-сети комплекса Гольджи), динамин, анкирин, спектрин, и актин.

Экзоцитоз

Дословно термин *экзоцитоз* обозначает процесс выведения из клетки, посредством клеточной мембраны веществ, синтезируемых в клетке, либо ненужных производных, образованных в результате процессов метаболизма и зачастую может заменяться термином секреция (выделение). Однако следует учесть, что во время секреции, наряду с выведением синтезируемых веществ, обеспечивается также обновление состава самой клеточной мембраны.

В процессе экзоцитоза существует два вида связей между клеточной оболочкой и мембраной пузырька с остаточными частицами,: 1) полное слияние и 2) механизм «kiss and run», без полного слияния, с частичным освобождением.

В процессе **полного слияния** клеточная оболочка, окружающая пузырек, целиком сливается с клеточной мембраной, при этом полностью высвобождает секрет, находящийся в ее полости в околоклеточное пространство и вновь возвращается в цитоплазму при помощи клатринового покрытия.

В процессе механизма «kiss and run» в месте соединения оболочки пузырька с клеточной мембраной посредством определенных молекул образуется небольшое отверстие (рис.2.30). Это отверстие, достигая определенных размеров, высвобождает секрет за 6 миллисекунд и тут же восстанавливает свою целостность (рис.2.30).

Если этого времени (6 миллисекунд) оказывается достаточным для высвобождения нейромедиатора из синаптического пузырька нервной системы, то эпителиальные клетки за данный промежуток времени могут высвободить лишь малую часть гранул секрета с плотным содержимым. Т.о., в процессе механизма «kiss and run», с одной стороны отпадает необходимость возврата оболочки пузырька обратно в цитоплазму, с другой стороны становится возможным регулировать количество (кванты) высвобождаемого секрета.

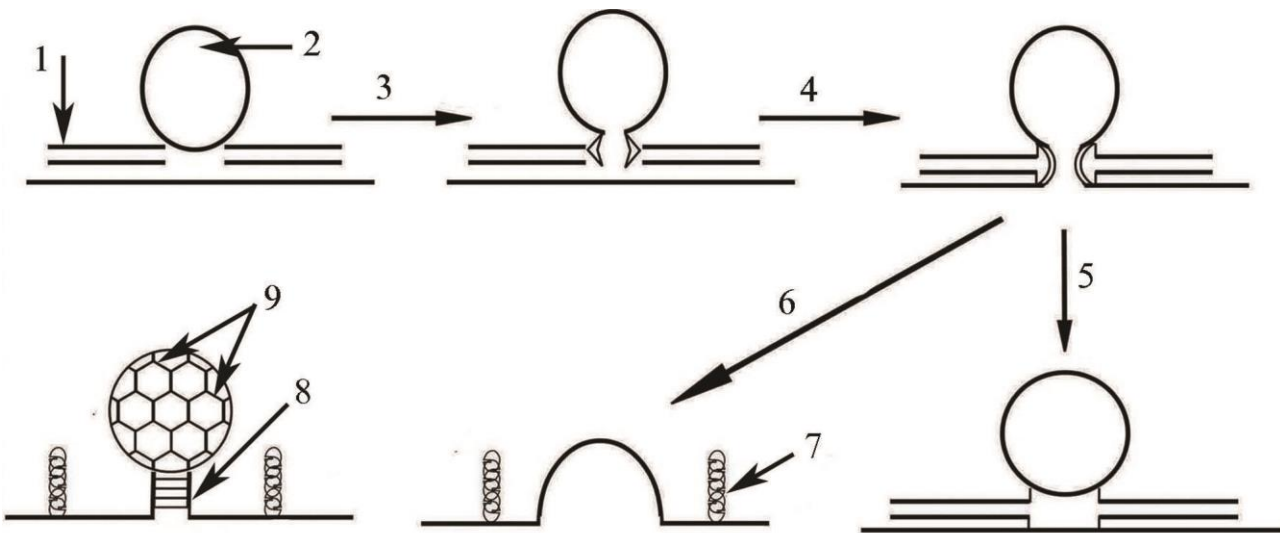


Рис.2.30. Виды экзоцитоза: "kiss and run" и абсолютное слияние. Схема.

1- Клеточная мембрана; 2- экзосома; 3- формирование поры слияния; 4- расширение поры слияния (высвобождение содержимого); 5- восстановление целостности мембран (kiss and run); 6- абсолютное слияние; 7- комплекс SNARE; 8- динамин; 9- клатрин.

Для объяснения связи оболочки секреторного пузырька с клеточной оболочкой в процессе экзоцитоза, со стороны Дж. Ротмана и его сотрудников, была выдвинута **гипотеза SNARE**.

Термин SNARE является аббревиатурой, которая в свою очередь состоит из трех терминов:

N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor (NSF) – чувствительный к N-этилмалеимиду фактор слияния. Это название было дано потому, что NSF, под воздействием N-этилмалеимида теряет свою активность и останавливает движение пузырьков в клетке.

Soluble NSF attachment proteins (SNAPs) – это белки соединяющиеся с жидким NSF. Жидкий NSF может поддерживать связь с оболочками лишь совместно с особой группой белков.

SNAP reseptors (SNARES) - рецепторы SNAP.

Как видно из термина SNARE в процессе экзоцитоза участвуют NSF, соединенные с ним белки (SNAPs) и их рецепторы.

В виду того, что один из рецепторов SNAP располагается в стенке пузырька, его называют также **v-SNARE** (рис.2.31-1) или VAMP (vesicle associated membrane protein) – мембранный белок связанный с пузырьком, либо **синаптобrevин**.

А рецептор SNAP, располагающийся в мембране в области прикрепления пузырька, называется **t-SNARE** (рис.2.31-1) или **синтаксин**. Буква t является начальной буквой английского слова target (мишень) и указывает на то, что в процессе экзоцитоза клеточная мембрана является мишенью.

У млекопитающих было выявлено более 35-ти видов белков SNAP и белков соответствующих им рецепторов. В процессе экзоцитоза участвуют лишь белок VAMP (v-SNARE)/ **SNAP-25** и синтаксин (t-SNARE) (рис.2.31).

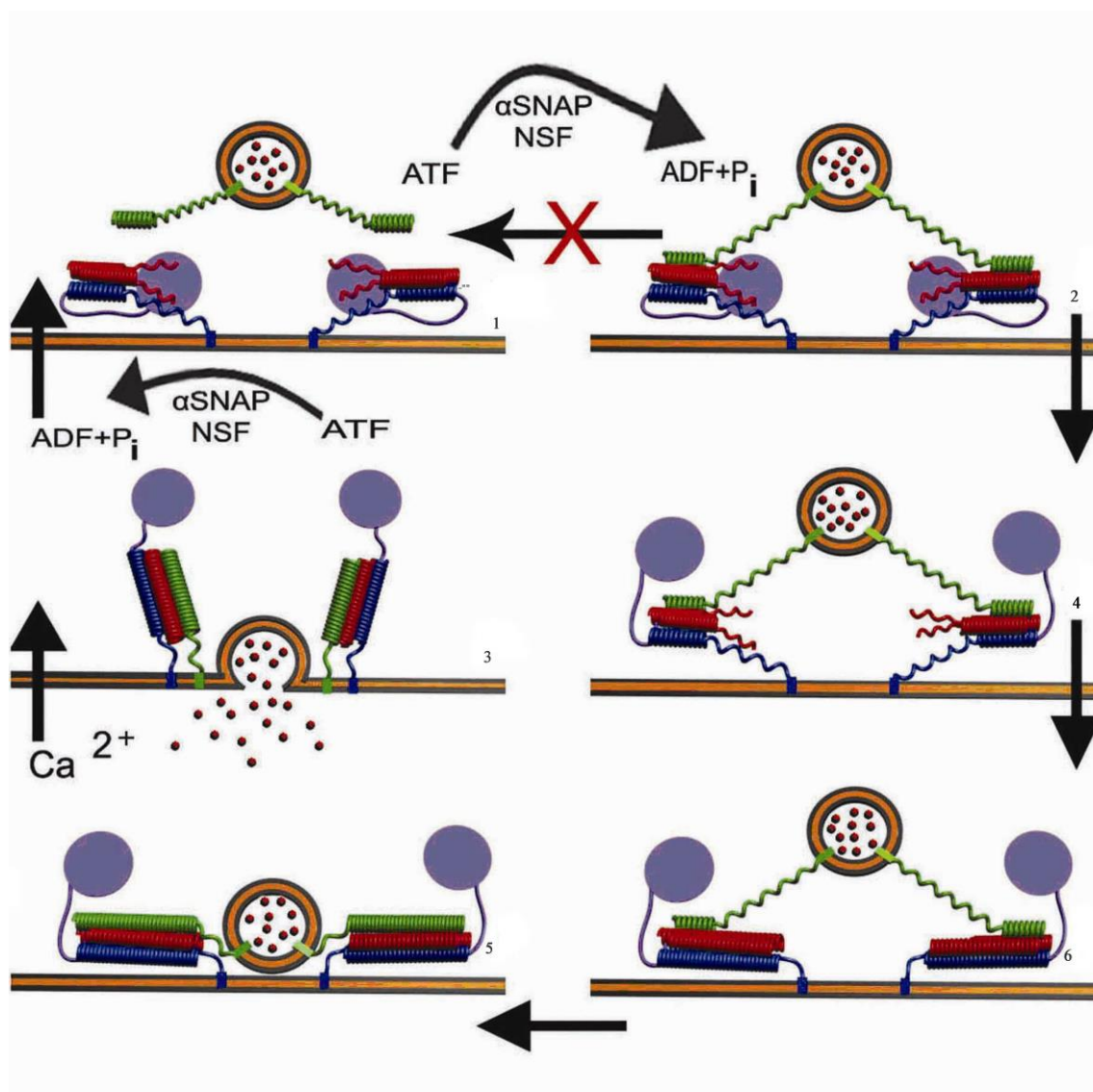


Рис.2.31. Последовательность образования комплексов транс- и цис- SNARE во время экзоцитоза. Описание в тексте. Схема составлена на основании информации J.B. Bock and R.H. Scheller, 1999; T. Weber et al, 2000; X.Hna and R.H. Scheller, 2001; J. Melia et al, 2002 (см.список литературы).

Как видно из рисунка 2.31 -1, с секреторным пузырьком соединяется лишь v-SNARE (зеленого цвета), а белки t-SNARE (синие) и SNAP-25 (красные) расположены на стороне клеточной мембраны. Отличие t-SNARE от SNAP-25 заключается в наличии регуляторного участка в его NH₂ конце (фиолетового цвета).

А белок SNAP-25 имеет участки для соединения как с t-SNARE так и с v-SNARE.

Первоначально по гипотезе SNARE процесса экзоцитоза предполагалось, что приближения синаптического пузырька к клеточной мембране и их слияние, осуществляется благодаря перекручиванию вышеуказанных белков друг с другом (рис.2.30). Но последующие исследования показали что, во время возникновения комплекса SNARE, завитки α -спиралей белков не только не перекручиваются друг с другом, а напротив, располагаются параллельно и сжимаются. Эти исследования, демонстрирующие очень тесное расположение полностью спирализированных частей белка, позволили Р.Линну и Р.Шеллеру (1997) выдвинуть теорию “zippering” (молния) для объяснения

процесса возникновения комплекса SNARE. В данный момент эта теория принята со стороны многих исследователей.

Возникновение комплекса SNARE во время экзоцитоза является энергозависимым процессом и происходит при помощи энергии образованной при распаде АТФ с участием NSF АТФ-азы и α -SNAP, который является его коферментом.

В это время, последовательно происходят следующие процессы:

- периферическая часть v-SNARE связывается с белком SNAP-25 (рис.2.31-2);
- регуляторная часть, расположенная на NH₂ конце t-SNARE, отделяется от места образования комплекса SNARE (рис.2.31-3);
- Белки t-SNARE и SNAP-25 вследствие уплотнения их спиралей приближаются к клеточной оболочке (рис.2.31-4);
- в результате сохранения плотного расположения спиралей v-SNARE из 4х присоединенных друг к другу α - спиралей образуется комплекс транс-SNARE (транс он именуется в виду того, что внутримембранная часть белка v-SNARE находится внутри пузырька, а соответствующая часть t-SNARE в составе клеточной мембраны). В этот момент оболочка, окружающая секреторный пузырек, приближается к оболочке клеточной мембраны до момента соприкосновения (рис.2.31-5). Следует отметить, что комплекс транс-SNARE устойчив, как к ферментам (напр. NSF АТФ-аза), так и к физическим факторам (напр. к температуре до +97⁰. За время существования этого комплекса, биологически активные вещества в составе синаптического пузырька могут частично высвободиться из цитоплазмы (рис. 2.30):
- завершающим итогом становится поступление ионов Ca²⁺ в цитозоль, что становится причиной полной спирализации комплекса SNARE и оболочка синаптического пузырька соединяется с оболочкой клеточной мембраны, в результате чего секрет полости пузырька полностью высвобождается из клетки (рис. 2.31-6).

Ввиду того, что белки в составе комплекса SNARE располагаются в этот момент с одной стороны мембраны (на поверхности обращенной к цитоплазме) их называют *комплекс цис-SNARE*. Вследствие того, что комплекс цис-SNARE расщепляется под воздействием NSF АТФ-азы, составляющие его части возвращаются в свое исходное положение для того, чтоб вновь принять участие в процессе экзоцитоза (рис.2.31-1).

Принятие раздражений (рецепторная функция)

Одним из важных свойств каждой клетки является ее способность выбирать из всевозможных воздействующих факторов (**сигналов**) окружающей среды (раздражители, **лиганды**) лишь те, которые являются необходимыми для ее жизнедеятельности и обеспечивать им соответствующий ответ.

К воздействующим факторам можно отнести химические вещества (газы, аминокислоты, белки, нуклеотиды, стероиды и липидные образования), физические факторы (различные облучения, механическое воздействие, осмотическое давление), другие клетки и межклеточные образования.

В основе ответа каждой клетки на определенные воздействия лежит наличие особых рецепторов на ее поверхности или в цитоплазме, связывающихся с соответствующими факторами и веществами (**лиганды**), несущими информацию. Связь лиганда с рецептором носит непременно избирательный характер и требует соответствия, подобно соответствию замка к ключу. Т.е., лишь в случае соединения

лиганда с соответствующим ему рецептором, возможен запуск определенных ответных реакций. Одним из свойств лиганда является его способность воздействовать и при низких концентрациях.

Можно сказать, что все процессы, протекающие в клетке (рост, секреция, движение, метаболизм, пролиферация, регенерация, дифференциация и т.д.), происходят благодаря многочисленному количеству сложных реакций, образующихся после соединения сигнальных молекул с соответствующими рецепторами.

В зависимости от физико-химических свойств лиганда, рецепторы могут располагаться, либо на мембране клетки, либо в ее цитоплазме. Если воздействующие факторы способны преодолеть фосфолипидный слой, то их рецепторы располагаются в цитоплазме и именуются **ядерными рецепторами**. К таким лигандам можно отнести различные излучения, стероидные гормоны (половые, минералокортикостероиды, глюкокортикостероиды), гормоны щитовидной железы, ретиноиды, витамин Д, азот-2-оксид (NO) и карбон-2-оксид (CO).

В связи с неспособностью большинства лигандов растворяться в липидах, их рецепторы расположены на клеточной мембране.

Все рецепторы являются белками, а точнее гликопротеинами, независимо от их расположения, механизма работы и формы.

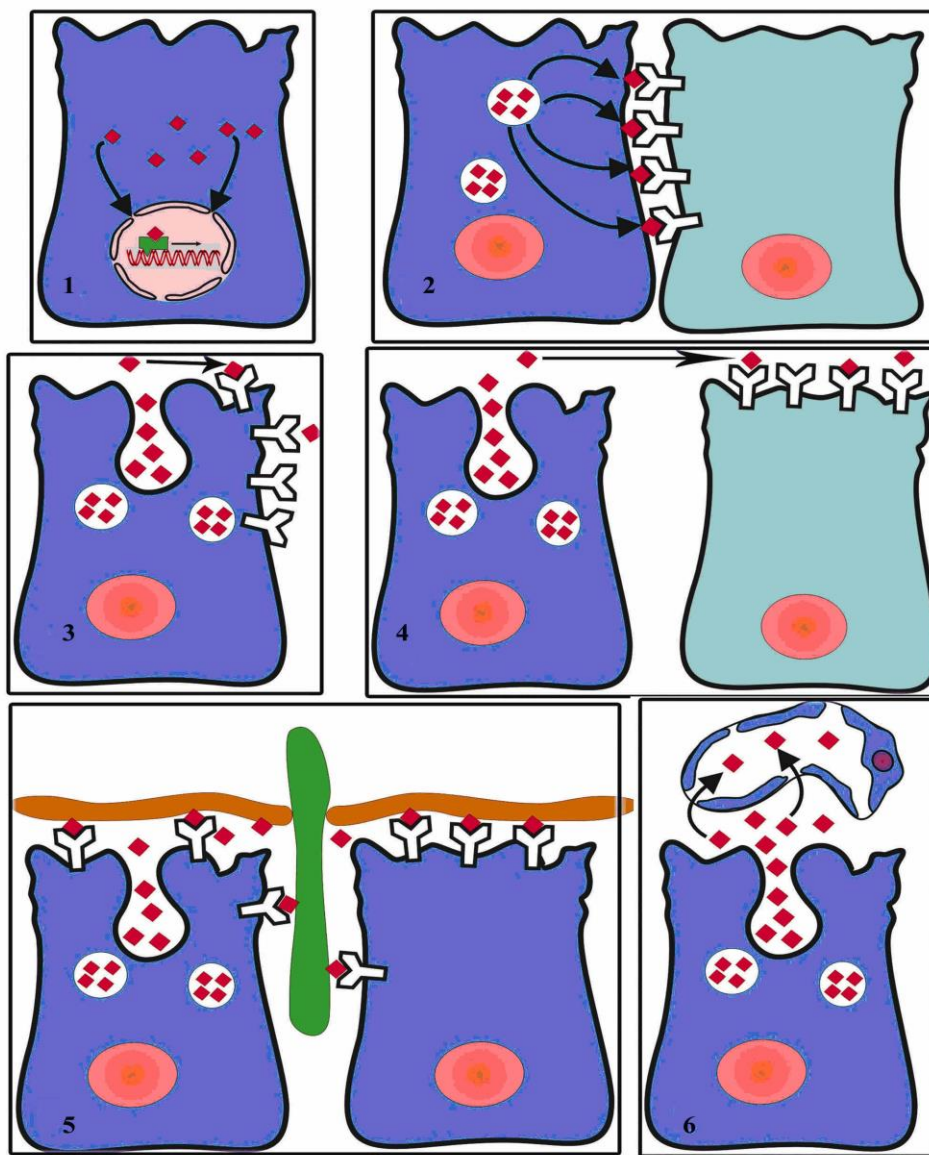


Рис.2.32. Формы регуляций между клетками многоклеточного организма. Описание в тексте.

В настоящее время в эукариотической клетке выявлено 20 поколений рецепторов, каждое из которых имеет сотни изомеров, которые избирательно связываются с лигандами. Следует отметить, что изучение связи лиганда с рецептором является одним из современных направлений молекулярной биохимии.

В зависимости от места рецептора, а так же от поля воздействия лиганда, в многоклеточном организме выделяют несколько форм регуляций:

- **Интракриновая регуляция** (рис.2.32-1). В данном случае активные вещества (лиганды), образующиеся в цитоплазме клетки, с помощью особых переносчиков поступают в ядро той же клетки, активируют транскрипционные факторы и тем самым воздействуют на синтез белков.
- **Юкстракриновая регуляция** (рис.2.32-2). В этом случае синтезированный лиганд поступает на клеточную мембрану и соединяясь с соответствующими ему рецепторами соседних клеток, воздействует на их деятельность.
- **Аутокриновая регуляция** (рис.2.32-3). Лиганд, выведенный из какой-либо клетки, вступает во взаимодействие с соответствующим рецептором этой же клетки.
- **Паракриновая регуляция** (рис.2.32-4). Синтезируемый в определенной клетке лиганд, выводится из клетки посредством экзоцитоза и распространяясь путем диффузии, вступает в связь с определенными рецепторами близлежащих клеток, воздействуя на их деятельность.
- **Матрикриновая регуляция** (рис. 2.32-5). Лиганд, покинув клетку, вступает в связь с элементами межклеточного вещества (матриксом), после чего воздействует либо на клетку, которая его воспроизвела, либо на другие клетки, имеющие соответствующий рецептор.
- **Эндокриновая в регуляция** (рис.2.32-6). Лиганды, синтезируемые в какой-либо эндокринной клетке (их так же называют гормонами), поступая в кровоток, разносятся по всему организму и вызывают изменения в клетках, расположенных на различных расстояниях от места его синтеза.
- **Нейротрансмиттерная регуляция** (рис.2.33 А) является одной из форм паракринового. В этом случае импульс из одной нервной клетки в другую происходит с помощью химических синапсов между нейронами, а роль лигандов здесь выполняют нейромедиаторы
- **Нейрогормональная регуляция** (рис.2.33 В) является формой эндокринного воздействия. В данном случае гормон, играющий роль лиганда, синтезируется специальными нейросекреторными клетками, затем поступает в кровь посредством нейровазальных синапсов и разносится по всему организму. Достигая клеток, имеющих соответствующие рецепторы, гормон вызывает в них различные ответные изменения.

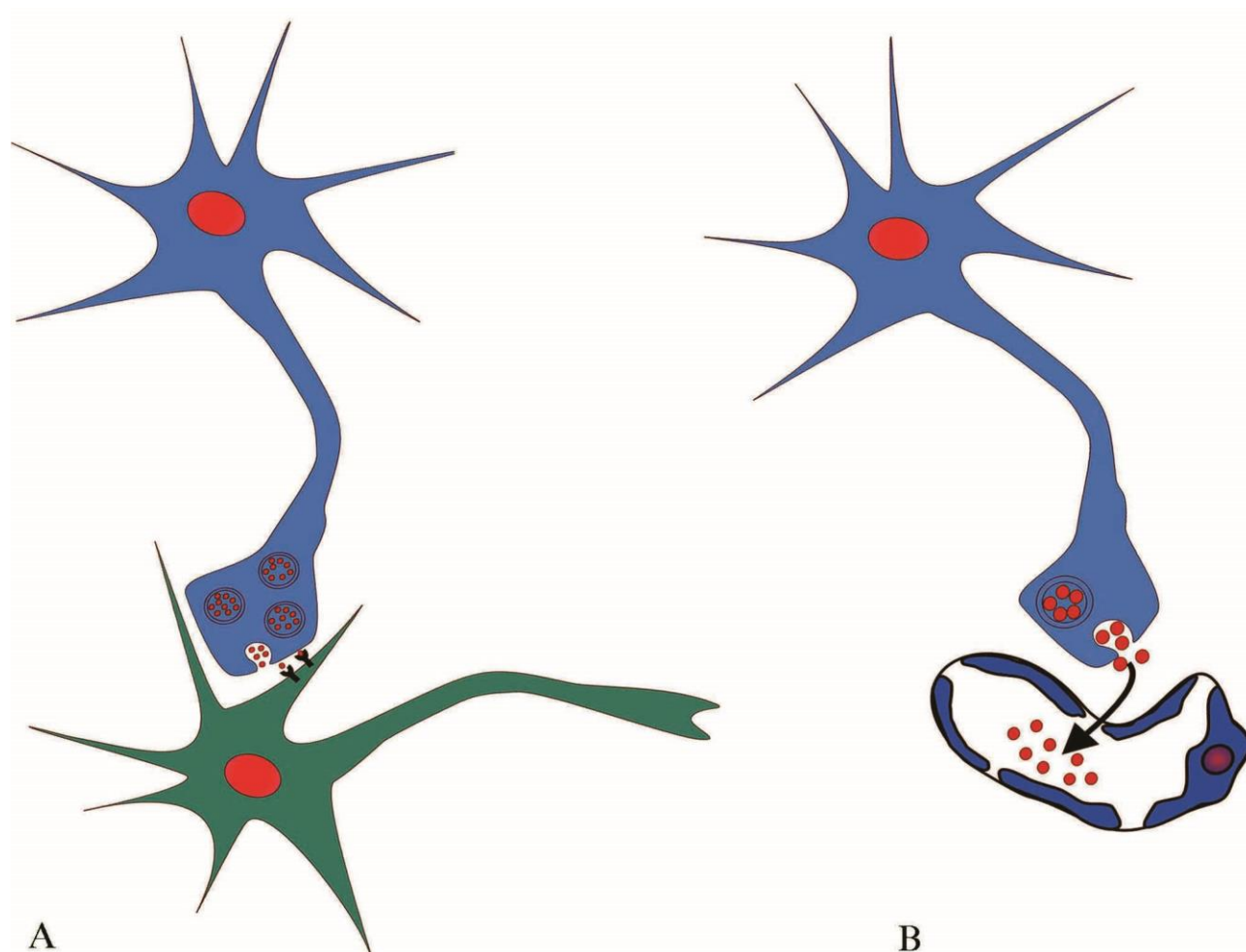


Рис.2.33. Формы осуществления регуляций с участием нервных клеток. А – нейротрансмиттерная регуляция; В – нейрогормональная регуляция.

Все указанные выше формы регуляций и все ответные процессы происходят внутри одного организма. Кроме того некоторые биологически активные вещества, синтезированные в одном организме, могут проявлять свое воздействие не только в организме своего, но и в организме другого вида, порой далеко отстоящего. Данные группы биологически активных веществ именуемые *аттрактантами* (*attract* – англ. *привлекать, манить*) воздействуют на рецепторы другого организма (в основном расположенные в обонятельной области носа) влияя на их развитие и характер происходящих изменений. Эту форму воздействия называют **эктокринией**.

Во время реакции сигнала и ответа клетки, сначала воздействующие факторы или вещества (**лиганды**) соединяются с рецептором, активируя его (рис.2.34 А). Сигнал, принятый активированным рецептором, преобразуется внутри клетки в химический сигнал. В это время изменяется количество небольших молекул, играющих роль посредника (трансдюсер), либо меняется активность белков-посредников(рис.2.34В).

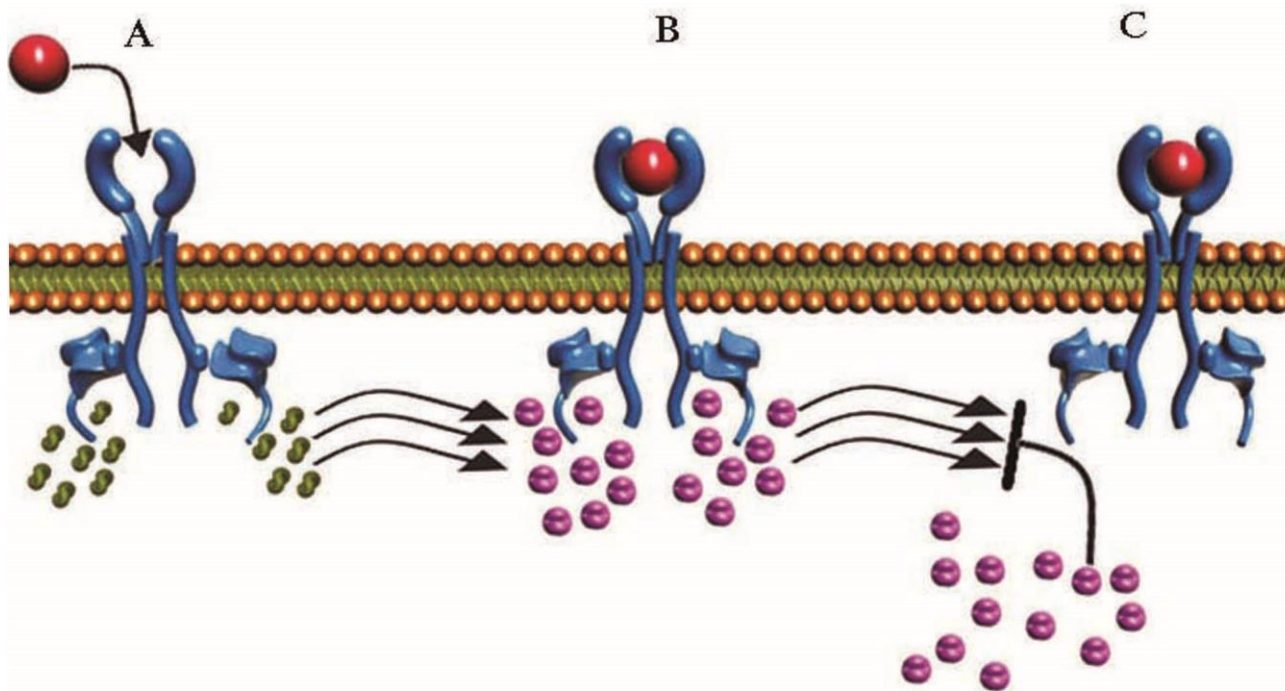


Рис.2.34. Схематический рисунок восприятия раздражений. Описание в тексте.

Последние, соединяясь с соответствующими эффекторами (рабочие белки), способствуют изменениям в деятельности клетки. Как только в лиганд-опосредованном ионном канале лиганд соединяется с соответствующим рецептором сигнал, принимаемый рецептором и необходимый для протекания различных процессов в клетке, передается эффекторам посредством посредников различного количества. Наряду со способностью одного сигнала распространяться в различных направлениях (дивергенция), имеет место и схождение (конвергенция) сигналов, распространяющихся параллельно, в одной точке (срединный эффектор), тем самым создаются условия для их интеграции. Поступление интегрированных сигналов к эффектору и наличие обратной связи, создают возможность упорядочить различные стадии реакций сигнала-ответа. В качестве примера можно показать деактивацию активированных рецепторов, под воздействием параллельно идущих сигналов или с помощью отрицательной обратной связи посредников (рис.2.34).

В случае когда активация рецептора заканчивается синтезом белков, посредники образуют связь непосредственно с факторами транскрипции (см.ниже). Учитывая, что факторы, являющиеся причиной активации рецепторов, именуются первичными посредниками, то небольшие молекулы и белки, участвующие в передаче сигнала в клетке от рецептора к эффектору, именуются вторичными посредниками (см.ниже).

В основном известно 5 групп рецепторов:

1. Рецепторы опосредованные с ионными каналами
2. Семиспиральные рецепторы
3. Фермент-опосредованные рецепторы
4. Рецепторы клеточной адгезии
5. Ядерные рецепторы.

Семиспиральные рецепторы

Эти рецепторы, называемые так же рецепторами, *сопряженными с G-белком* являются наиболее встречаемыми. В их строении имеется две основные черты: первая – белок, играющий роль рецептора состоит из 7 α -спиралей (рис.2.35-1); вторая – это существующая взаимосвязь со связанным с ГТФ G-белком, который состоит из 3-х субъединиц (α, β, γ). G-белок сопряженные рецепторы активируются под воздействием таких биологически активных веществ как ацетилхолин, ангиотензин-2, кальцитонин, эндотелин, гистамин, норадреналин, вазопрессин, окситоцин, серотонин, тромбин и т.д., которые обеспечивают соответствующие ответные реакции клеток.

Чтобы подчеркнуть наличие огромного количества семиспиральных рецепторов, можно отметить, что лишь в плазмолемме клеток обонятельной зоны слизистой оболочки носа, имеется от 500 до 1000 семиспиральных рецепторов, способных принимать факторы, образующие запах.

Каталитические (фермент – сопряженные) рецепторы

Фермент-сопряженные рецепторы, как и рецепторы, сопряженные с белком G являются трансмембранными гликопротеинами и делятся на две группы:

1. Фермент – рецепторы (рис.2.35-2)
2. Рецепторы, связанные с ферментами (рис.2.35-3)

Характерной особенностью первых является то, что они состоят из одной субъединицы и имеют на наружной поверхности клеточной мембраны рецепторный участок для соединения с лигандом, а на стороне, обращенной к цитоплазме – участок, имеющий ферментативную активность. К этой группе рецепторов относится рецептор тирозинкиназы, рецептор серин-тиреонин киназы, рецептор тирозинфосфатазы, рецептор гуанилатциклазы.

У второй группы рецепторов участки соединяющиеся с лигандом и ферментативно активные участки состоят из разных субъединиц (рис.2.35-4). К данной группе рецепторов относятся рецепторы, связанные с тирозинкиназой, рецепторы цитокинов, рецепторы связанные со сфингомиелиназой.

Следует отметить, что для процессов приема сигналов и их распространения с последующей активацией, либо дезактивацией внутриклеточных процессов, важную и преобладающую роль играет процесс присоединения неорганической фосфатной группы к молекуле белка-мишени (фосфорилирование), либо ее отсоединение. Присоединение неорганической фосфатной группы к молекуле белка-мишени осуществляется при помощи фермента **протеинкиназы**, а отсоединение – при помощи **протеинфосфатазы**.

Последовательность и обратимость данных процессов обеспечивает вовлечение в цикл, за очень небольшой срок (миллисекунды), особой группы белков и в связи с этим обеспечивается своевременная ответная реакция клетки. В этом случае изменяется активность либо белков, поступивших в клетку, либо факторов транскрипции, расположенных в ядре.

Не случайно, что все из упомянутых выше каталитических рецепторов, за исключением рецептора гуанилатциклазы и рецептора связанного со сфингомиелазой, имеют протеинкиназную (большинство) и протеинфосфатазную активность.

Воздействие на клетку различных факторов роста (эпидермальных, тромбоцитарных, фибробластов, гепатоцитов, нервных клеток (нейротрофинов), инсулиноподобных, эндотелиальных и т.д.), а также инсулина, колониестимулирующего фактора макрофагов, β -трансформирующего фактора роста происходит благодаря рецептору, связанному с тирозинкиназой.

Регуляция определенных направлений развития мезодермальных элементов происходит после того, как рецепторная часть **рецептора серин-тиреонин киназы** образует связь с активинном, ингибинами, морфогенетическим белком кости, β -трансформирующим фактором роста. При помощи рецептора **тирозинфосфатазы** происходит отсоединение фосфатных групп, присоединенных при воздействии тирозинкиназы, от остатка аминокислоты тирозина. Т.о. регулируется продолжительность деятельности белков, активированных воздействием тирозинкиназы. Следует отметить, что наряду с рецептором тирозинфосфатазы, в цитозоле имеется около 30 свободных белков, имеющих тирозинфосфатазную активность.

Когда **рецептор гуанилатциклазы** соединяется с соответствующим лигандом (натрийуретический фактор предсердия, эндотоксин, устойчивый к теплу и т.д.), на их цитоплазматическом конце, вследствие определенной ферментативной активности, происходит синтез циклической ГМФ.

Рецепторы сопряженные с тирозинкиназой в В-лимфоцитах соединяются с антигенами, а в Т-лимфоцитах – с главным комплексом гистосовместимости и тем самым регулируют рост и дифференциацию соответствующих клеток.

Рецепторный участок **рецептора цитокинов** соединяется в цитоплазме с белками, имеющими тирозинкиназную активность. Данные рецепторы, активируясь в результате воздействия различных интерлейкинов (IL-2-6), α , β и γ интерферонов, гормона роста, колониестимулирующего фактора (гранулоцитов, моноцитов), эритропоэтина, пролактина и т.д., участвуют в дифференциации и росте различных групп клеток.

Рецепторы сопряженные со сфингомиелиназой после соединения с интерлейкином-1 (IL-1) и с фактором некроза опухоли и принимают участие в гибели опухолевой клетки, а также в протекании воспалительного процесса и в заживлении ран.

Рецепторы клеточной адгезии

Одним из важных условий в формировании какой-либо ткани или органа, является возникновение молекулярных связей между самими клетками, а так же с макромолекулами межклеточного вещества. Это происходит посредством специальных белков. В этом случае тканеспецифичные типы клеток распознают друг друга и между ними образуются разного рода связи. Одной из первостепенных связей является слипание (адгезия) соседних клеток друг с другом и с элементами матрикса. К белкам, участвующим в образовании адгезии, относятся кагерины, интегрины и селектины.

Кадгерины (рис.2.35-5). Описанно свыше 80-ти видов кадгеринов. Они принимают участие в образовании Ca^{2+} - опосредованных связей между клетками, составляющими организм. В этом случае соседние клетки соединяются посредством расположенных на их мембранах идентичных молекул кадгерина (гомофилическая связь) при участии Ca^{2+} . Участки молекулы кадгерина обращенные к цитоплазме, образуют связи с элементами цитоскелета посредством белков α - и β - катенина. Сигналы необходимые для запуска процесса пролиферации, движения и дифференциации клетки, передаются в ядро клетки посредством кадгерина и катенинов. В клетках, связанный между собой посредством кадгеринов, процессы митоза не наблюдаются и данный процесс именуется *контактным тормозом*.

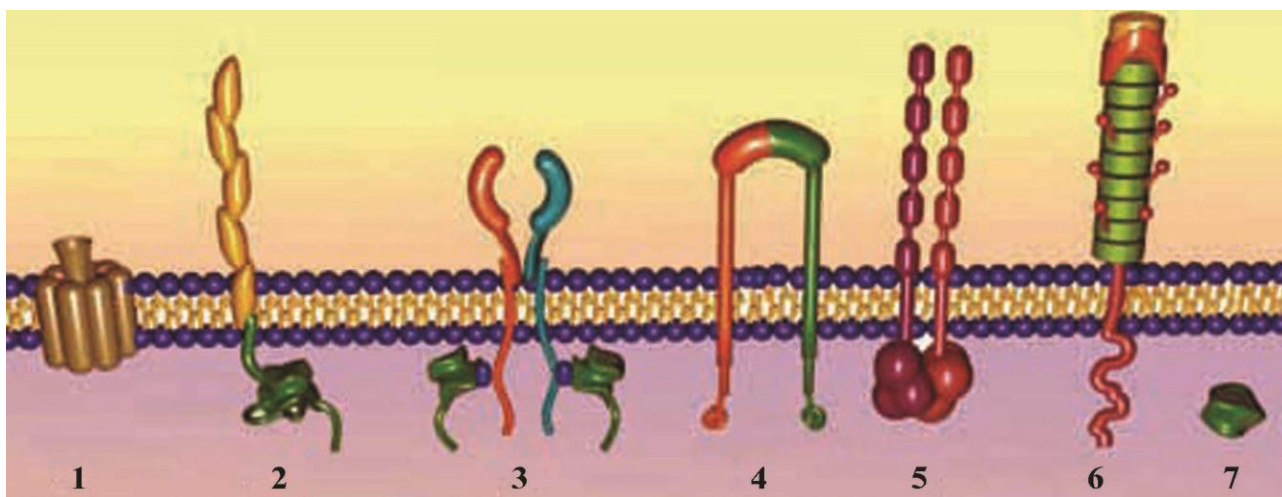


Рис.2.35. Особенности строения мембранных и ядерных рецепторов. Описание в тексте.

Интегрины (рис.2.35- 4) играют роль рецепторов для макромолекул межклеточного вещества (коллаген, фибронектин, ламинин, хондронектин, фибриноген и т.д.) Та часть α - и β -субъединиц интегрина, которая обращена к околоклеточной поверхности, соединяется с вышеуказанными макромолекулами, а концы обращенные к цитоплазме образуют фокальные (точечные) связи с помощью специальных белков. При помощи этих связей клетки, с одной стороны скрепляются с элементами межклеточного матрикса, с другой стороны благодаря им проводятся сигналы из околоклеточной среды в клетку. В последнем случае принимает участие особая группа нерецепторных белков тирозинкиназы, именуемая ФАК (focal adhesion kinase). В этот момент в результате действия факторов роста, в клетках происходят соответствующие изменения (рост, движение, изменение формы).

Селектины (рис.2.35- 6) в основном принимают участие в образовании адгезивной связей между лейкоцитами, тромбоцитами и эндотелиальными клетками, выстилающими со всех сторон просвет сосуда. Селектины имеют внутримембранный участок, состоящий из одной цепи, а также участок, обращенный к поверхности клетки и соединенный с углеводами (лектин). Роль естественного лиганда для селектинов играют гликопротеины, имеющие в своем составе большое количество олигосахаридов.

Благодаря селектинам лейкоциты имеют возможность покидать кровоток, поступать в околососудистое пространство и вновь возвращаться в кровоток. Этот процесс происходит благодаря временным адгезивным связям, образующимся с участием Ca^{2+} , возникающим между селектинами на мембране лейкоцитов, а также между молекулами муцина на поверхности клеток эндотелия. Таким же способом обеспечивается участие форменных элементов крови в воспалительных процессах.

Ядерные рецепторы

Как было сказано выше, стероидные гормоны, витамин Д₃, ретиноиды (производные витамина А) и гормоны щитовидной железы способны свободно преодолевать фосфолипидный барьер (рис.2.35-7). Поэтому в клетках, имеющих чувствительность к данным биологически активным веществам, имеется группа специальных рецепторных белков, именуемых ядерными рецепторами. Эти рецепторы расположены в цитозоле или в самом ядре. В связи с тем, что ядерные рецепторы принимают прямое или опосредованное

участие в экспрессии генов, их также называют *факторами транскрипции*. Следует отметить, что в последнее время обнаружена особая группа рецепторов, относящихся к ядерным рецепторам, но естественные лиганды которых, так и не выявлены. Ввиду отсутствия естественных лиганд их так же называют *рецепторами «сиротами»*.

Существует так же заметная разница в механизме действия ядерных рецепторов. Так, рецепторы стероидных гормонов в цитоплазме встречаются в связанном с белком теплового шока (Hsp70) виде. После того, как определенный гормон соединится с рецептором, он отделяясь от Hsp 70 сквозь ядерную пору поступает в нуклеоплазму и соединившись с фактором транскрипции соответствующего гена, меняет его активность.

Рецепторы гормонов щитовидной железы (тироксин), витамина Д и ретиноидов бывают соединены в ядре с промоторной частью соответствующего гена ДНК. Во время соединения данных биологически активных веществ с рецептором, активируются соответствующие факторы транскрипции и начинается синтез необходимого белка.

Имеющаяся в последнее время информация указывает на то, что в активации ядерных рецепторов «сирот» участвуют продукты первичного метаболизма холестерина.

Вторичные посредники

В принятии раздражений и переносе их к рабочим образованиям (эффекторам) принимает участие большое количество белков различного состава. Для приведения этих белков в активное состояние в цитоплазме имеется большое количество веществ, имеющих способность к диффузии. В виду того, что вещества, обладающие способностью к воздействию (лиганды), называются **первичными посредниками**, то вещества, активирующие белки, которые участвуют в передаче сигнала в клетке, именуются **вторичными посредниками**.

О существовании вторичных посредников стало известно во время изучения влияния гормонов (в особенности адреналина) на клетки. Исследуя механизмы расщепления гликогена до глюкозы в клетках печени, Э.Сутерланд (1958) определил, что в клетке под воздействием адреналина на короткий период времени увеличивается количество циклического аденозинмонофосфата (цАМФ).

Дальнейшие исследования показали, что влияние не только адреналина, но и многих других гормонов способно вызвать в клетках каскад изменений, в которых самое активное участие проявляет цАМФ. Последний образуется в результате активизации фермента аденилатциклазы.

Учитывая общебиологическое значение данного открытия, Сутерланд в 1971-ом году был удостоен Нобелевской премии в области физиологии и медицины. В формировании современных научных представлений о вторичных посредниках особую роль сыграло открытие G – белка. В 70-х годах прошлого века Мартин Родбелл с сотрудниками обнаружили, что одним из веществ, участвующих в активации фермента аденилатциклазы необходимого для образования цАМФ, является гуанозинтрифосфат (ГТФ). Впоследствии в данном процессе было обнаружено участие белка – *фермента гуанозинтрифосфатазы (ГТФ-аза)*, соединенного с гуанозин нуклеотидом (сейчас называется попросту **G- белок**).

Во всех клетках обнаружено два вида фермента ГТФ-азы, соответственно состоящего из одной (мономер) или трех (тример) субъединиц. Каждый из двух видов ГТФ-аз может соединяться с молекулами гуанозиндифосфата (ГДФ) или гуанозинтрифосфата (ГТФ). Причем, соединяясь с ГДФ, они принимают не активную, а с ГТФ – активную конформацию.

У млекопитающих в структурах G – белка было обнаружено около 20-ти изомеров, кодируемых специальными генами, в составе α -субъединицы, около 6-ти изомеров в составе β -субъединицы и около 12-ти изомеров в составе γ -субъединицы G-белка. Наличие изомеров у G-белка создает возможность образовывать связи с одной стороны с рецепторами различного строения расположенными в клеточной мембране, с другой стороны с расположенными в цитоплазме многочисленными белками-мишенями данных рецепторов. Кроме того, в случае, когда изомер G-белка активирует какой-либо белок, другой его изомер приводит этот же белок в неактивное состояние. Например, G_s -белок, активируя фермент аденилатциклазу, является причиной синтеза цАМФ из АТФ, тогда как G_i – белок напротив приводит фермент аденилатциклазу в неактивное состояние.

В настоящее время выявлены следующие вещества, играющие роль вторичных посредников:

- G – белок;
- циклические нуклеотиды (цАМФ);
- кальций;
- фосфолипидные образования – производные фосфолипидов;
- оксид азота (NO).

G – белок

В неактивном состоянии G – белок состоит из трех (α , β , γ) субъединиц, соединенных с ГДФ. (рис.2.36 А). В случае соединения лиганда с рецептором (рис.2.36 В), у последнего на конце, обращенном в цитоплазму, в результате конформационных изменений, происходит замещение ГДФ, входящего в состав G – белка, на ГТФ. Активированная α - субъединица в составе G – белка, вместе с ГТФ отсоединяется от других субъединиц. Каждая из образованных частей G – белка, обладает биологической активностью и способна, соединившись с соответствующим эффектором, повлиять на его деятельность. В нашем примере (рис.2.36 С) α - субъединица вместе с ГТФ, соединившись с тем концом фермента аденилатциклазы, который обращен в цитоплазму, активирует его. В это время протекает два параллельных процесса. С одной стороны под действием активированного фермента аденилатциклазы, происходит синтезирование из АТФ одного из вторичных посредников – цАМФ. С другой стороны в результате гидролиза ГТФ α -субъединица, соединяясь с ГДФ, переходит в неактивное состояние и объединяясь с β - и γ -субъединицами G – белка (рис. 2.36 D), восстанавливает его способность вновь участвовать в реакциях сигнала и ответа.

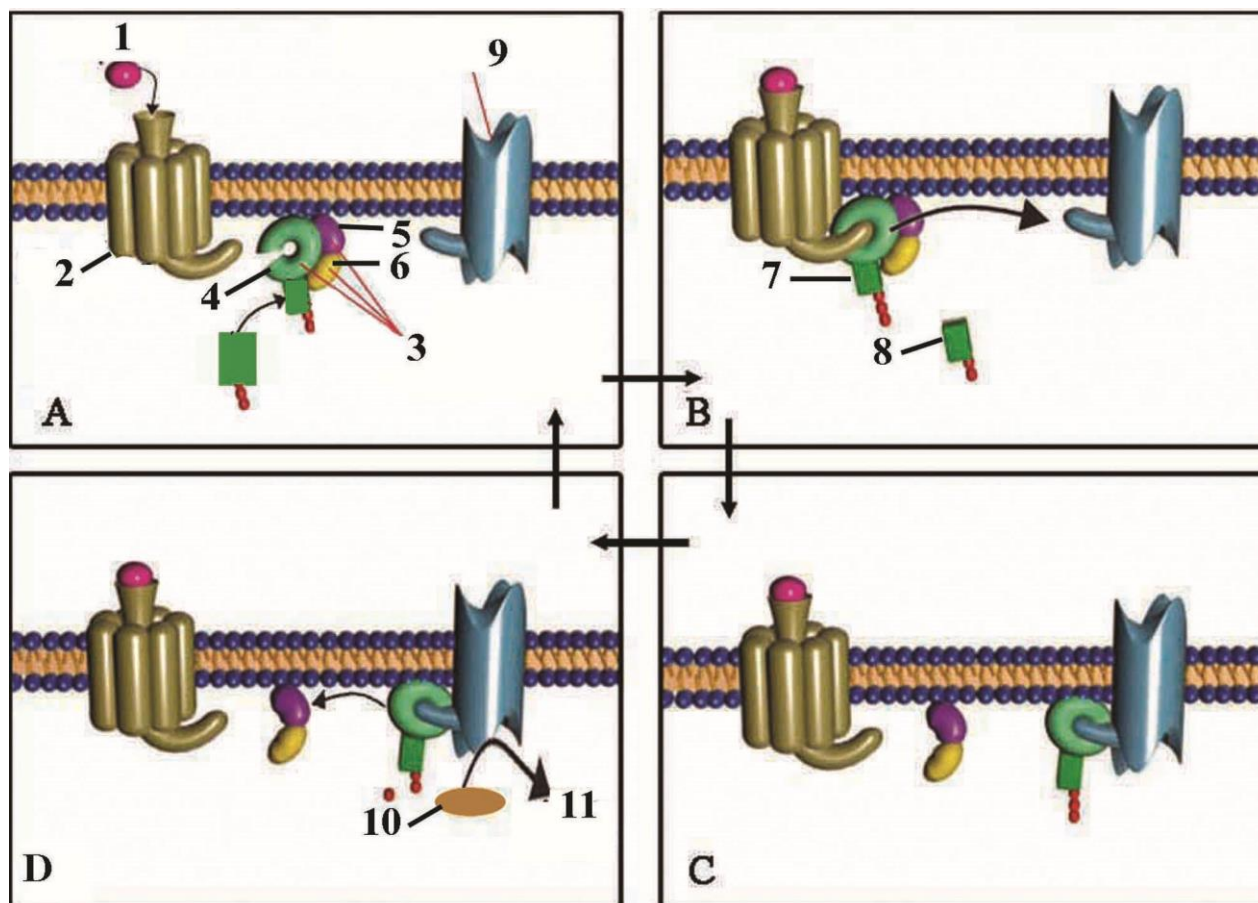


Рис.2.36. Схема последовательных процессов взаимодействия семиспирального рецептора с аденилатциклазой с участием G-белка. Подробное описание в тексте.

1.лиганд 2.рецептор 3.G-белок 4.α-субъединица 5.β-субъединица 6.γ-субъединица 7.ГТФ 8.ГДФ 9.аденилатциклаза 10.АТФ 11.цАМФ+пиррофосфат.

Циклические нуклеотиды

Один из циклических нуклеотидов – цАМФ, образуется (из АТФ) в результате активации фермента **аденилатциклазы**, расположенной на клеточной оболочке, а цГМФ образуется из ГТФ с участием фермента гуанозинциклазы. В отличие от аденилатциклазы, гуанозинциклаза встречается как в клеточной оболочке, так и в цитозоле. В связи этим второй отличительной особенностью является то, что фермент гуанозинциклаза может соединяться с лигандами как внутри клетки (напр. NO,CO), так и вне ее.

Так же как и в случае с другими вторичными посредниками, концентрация циклических нуклеотидов в клетке строго контролируется. Для этого, образованные в результате различных воздействий цАМФ и цГМФ, в течении всего лишь нескольких миллисекунд, расщепляются под воздействием фермента фосфодиэстеразы в АМФ и ГТФ, не имеющие никакой активности.

Коротко о механизме участия циклических нуклеотидов в проведении сигналов в клетку можно сказать, что цАМФ в цитозоле вначале соединяется со способной образовывать с ней связь **протеинкиназой А (ПКА)**. Активированная ПКА делится на две субъединицы, имеющие каталитическую активность и регулирующий компонент. Субъединицы, имеющие каталитическую активность, активируют посредством фосфорилирования другие ферменты цитозоля, что и является причиной запуска цепных ответных процессов.

Увеличение количества цАМФ в цитозоле является причиной транскрипции чувствительных к ней генов. Основным условием транскрипции данных генов-мишеней является наличие в их составе **элемента ответа цАМФ** (*cAMP response element* – CRE). При этом роль фактора транскрипции играет белок связанный с CRE (CREB). Каталитические субъединицы отделенные от активированной ПКА (см.выше), проникнув в ядро, активируют (фосфорилируют) белок CREB, и тем самым являются причиной транскрипции соответствующих генов.

Ионы кальция

Ионы Ca^{2+} , играющие роль вторичных посредников, являются важным фактором в течение таких, казалось бы, не связанных друг с другом процессов, как образование межклеточных связей, сокращение мышц, процессы секреции, передача нервного импульса, деление клетки и т.д.

В отличие от других вторичных посредников, Ca^{2+} не являются продуктом каких-либо ферментативных реакций, а находится в «готовом» виде либо в межклеточной жидкости, либо в цитоплазме, в полости эндоплазматической сети, являющейся для них амбаром. Поступление их в цитозоль, или выведение оттуда, осуществляется с помощью специальных насосов и каналов. Еще одной особенностью Ca^{2+} является то, что вследствие наличия в цитозоле белков связывающих Ca^{2+} , они не способны свободно диффундировать в цитоплазме. Было подсчитано, что из 100 Ca^{2+} , поступивших в цитоплазму, лишь один способен распространяться с помощью диффузии. Поэтому Ca^{2+} может оказывать свое воздействие лишь в определенной части цитоплазмы.

Поддержание очень низкого уровня Ca^{2+} (0,1мМ), с помощью деятельности каналов, расположенных в клеточной оболочке и в стенке эндоплазматической сети, резко повышает чувствительность клеток к поступлению этих ионов в цитозоль.

Небольшое увеличение концентрации Ca^{2+} является причиной активации белков, способных соединяться с ним, в том числе различных киназ и фосфатазных групп. Существуют так же отличия в механизме ответа клетки на сигналы Ca^{2+} .

Так, если произошло связывание ионов Ca^{2+} с белками, образующими Ca^{2+} -зависимые ионные каналы (K^+ и Cl^-), а также сформировалась связь ионов Ca^{2+} с тропонином в поперечнополосатом мышечном волокне, либо с синаптотаксинами в стенке синаптического пузырька, то в таком случае происходит ответная реакция клетки на сигнал. В дальнейшем с участием других клеточных белков обеспечивается функциональная ответная реакция.

Среди белков, связывающихся с Ca^{2+} , наиболее распространенным и имеющим сложный механизм воздействия является **кальмодулин**. Присоединение к каждой молекуле кальмодулина 4 Ca^{2+} является причиной образования комплекса Ca^{2+} /кальмодулин, который вызывает сокращение клеток гладкой мускулатуры, вернее переводит не активный миозин в активное состояние.

Группа ферментов, проявляющих киназную активность, активирующихся с помощью комплекса Ca^{2+} /кальмодулин, именуется *Ca^{2+} /кальмодулин-зависимыми киназами*. (CaM-киназы). CaM-киназы, в свою очередь принимают участие в гликогенолизе, синтезе катехоламинов и фосфорилировании факторов транскрипции и белков, которые участвуют в сокращении клеток гладкой мускулатуры. Для интереса можно отметить то, что переход фактора транскрипции CREB в активное состояние может быть как результатом действия цАМФ, так и за счет его фосфорилирования с помощью CaM-киназы. Т.о. наличие взаимных

связей между путями передачи сигналов различного происхождения в клетку, создает условия для регуляции ответных реакций клетки.

Производные фосфолипидов

Под воздействием ферментов фосфолипазы, липидкиназы и липидфосфотазы на молекулы фосфатидилинозитола, фосфатидилхолина и сфингомиелина локализованных в клеточной мембране, в клетке синтезируются инозитолтрифосфаты, серамиды, сфингозины, диацилглицеролы, арахидоновая кислота и т. д., которые являются вторичными посредниками.

Образование и механизм действия вторичных посредников, имеющих липидную природу, будет рассматриваться на примере **инозитолтрифосфата (IP₃)**, **диацилглицерола (DAG)** и **серамидина**.

Фермент С-фосфолипаза, активированный во время соединения рецепторов G-белка или рецепторов тирозинкиназы с различными гормонами и факторами роста, подвергает гидролизу фосфатидилинозитол, находящийся во внутреннем слое клеточной мембраны, образует вторичные посредники IP₃ и DAG, имеющие различный механизм воздействия.

IP₃, поступая в цитоплазму, соединяется с рецепторами на мембране гладкой эндоплазматической сети, открывает Ca²⁺ каналы и обеспечивает выход определенных ионов в цитозоль.

DAG, оставаясь в составе клеточной мембраны, является причиной активации серин-тиреонин киназ, относящихся к семейству **протеинкиназ С** (*protein kinase C* – PKC), и играющих важную роль в процессах роста и дифференциации клеток.

Вторичный посредник - *серамид*, имеющий липидную природу, синтезируется во время соединения рецептора, связанного со сфингомиелиназой, находящийся на клеточной мембране, с фактором некроза опухоли (*tumor necrosis factor* – TNF) и интерлейкином 2 (IL2). Во время образования указанной выше связи, фермент сфингомиелиназа отделяет холиновую группу от сфингомиелина, расположенного в наружной оболочке клеточной мембраны, синтезируя серамид. Молекулы серамида, поступая в цитоплазму, активируют различные группы фосфатаз и киназ, и тем самым принимают участие в различных процессах от пролиферации клеток до их апоптоза (запрограммированная смерть клетки).

Оксид азота

Оксид азота (NO) является вторичным посредником. Он синтезируется в результате воздействия фермента синтазы оксида азота (*nitric oxide syntase* – NOS) на аминокислоту аргинин и молекулярный кислород. В виду того, что он является газом, он может воздействовать как на синтезирующую его клетку, так и распространившись способом диффузии воздействовать на окружающие клетки. В 1980-ом году было обнаружено, что NO, синтезируемый в эндотелиальных клетках, может воздействовать методом диффузии на клетки гладкой мышцы стенок артерии, расслабляя их. В настоящее время выявлено участие NO в качестве нейромедиатора как в периферической, так и в центральной нервной системе.

Механизм действия NO связывают в основном с ферментом - гуанилатциклазой. NO, связываясь с железом в составе данного фермента, активирует его и является причиной образования цГМФ. Процессы, в которых принимает участие последний, до сих пор не выявлены.

Следует отметить что NO также играет роль в процессе уничтожения макрофагами микробов и злокачественных клеток. Т.о., пероксинитрит ($\text{OONO}^\cdot$), образованный в результате соединения NO и супероксида аниона ($\text{O}_2^\cdot$), расщепляясь образует $\text{OH}^\cdot$ и NO_2 , каждый из которых является причиной уничтожения микроорганизмов поглощенных макрофагами.

В данный момент было доказано участие NO в изменениях, происходящих в цитоскелете клетки, во время различных воздействий.

Литература

- Barenholz Y. Sphingomyelin and cholesterol: from membrane biophysics and rafts to potential medical applications. *Subcell. Biochem.*, 2004; 37:167-215.
- Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1998; 14:111-136.
- Danielli JF, Davson H. A contribution to the theory of the permeability of thin films. *J. Comp. Cell Physiol.*, 1935; 5:495-508.
- Deamer DW. The first living systems: a bioenergetic perspective. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1997; 61(2):23-61.
- Dowham W. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Ann. Rev. Cell Biochem.*, 1997; 62:121-138.
- Gahmberg GG, Tolvanen M. Why mammalian surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem Sci*, 1996; 21:308-311.
- Gorter E, Grendel FJ. On biomolecular layers of lipoids on the chromocytos of the blood. *J. Exp. Med.*, 1925; 41:439-443.
- Monnard PA, Deamer DW. Membrane self-assembly processes: steps toward the first cellular life. *Anat. Rec.*, 2002; 268(3):196-207.
- Ostermeyer AG, Ramcharan LT, Zeng Y, Lublin DM, Brown DA. Role of the hydrophobic domain in targeting caveolin1 to lipid droplets. *J. Cell Biol.*, 2004; 164(1):69-78.
- Pol A, Luetterforst R, Lindsay M, Heino S, Ikonen E, Parton RG. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Biol.*, 2001; 152(5):1057-70.
- Ronzon F, Morandat S, Roux B, Bortolato M. Insertion of a glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme into liposomes. *J. Membr. Biol.*, 2004; 197(3):169-77.
- Simons K and Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 1997; 6:247-296.
- Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 1972; 175:720.
- Smart EJ, Ying Y, Donzell WC, Anderson RG. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271(46):29427-35.
- Watanabe Y. Synthesis of inositol phosphates and phospholipids. *Anticancer Res.*, 1999; 19(5A):3727-32.

Насосы

- Carafoli E. Calcium-- a universal carrier of biological signals. Delivered on 3 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *FEBS J.* 2005 Mar; 272(5):1073-89.
- Cole SP, Deeley RG. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays*. 1998 Nov; 20(11):931-40.
- DeGorter MK, Conseil G, Deeley RG, Campbell RL, Cole SP. Molecular modeling of the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Jan 4; 365(1):29-34.
- Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Center M, Cole SP, Deeley RG, Keppler D. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene encoded conjugate export pump. *Biochem J.* 1996 Mar 1; 314 (Pt 2):433-7.
- Michael D. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI; 2002 Nov.
- Neault JF, Malonga H, Diamantoglou S, et al. Secondary structural analysis of the Na^+ , K^+ -ATPase and its Na^+ (E1) and K^+ (E2) complexes by FTIR spectroscopy. *J Biomol Struct Dyn.* 2002

Oct; 20(2):173-8

Post RL, Sen AK, Rosenthal AS. A phosphorylated intermediate in adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport across kidney membranes. *J Biol Chem.* 1965 Mar; 240:1437-45

Rosenberg MF, Mao Q, Holzenburg A, Ford RC, Deeley RG, Cole SP. The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). crystallization and single-particle analysis. *J Biol Chem.* 2001 May 11; 276(19):16076-82.

Rothnie A, Callaghan R, Deeley RG, Cole SP. Role of GSH in estrone sulfate binding and translocation by the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *J Biol Chem.* 2006 May 19; 281(20):13906-14.

Skou JC. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. 1957. *Biochim Biophys Acta.* 1989; 1000:439-46.

Skou JC. Nobel Lecture. The identification of the sodium pump. *Biosci Rep.* 1998 Aug; 18(4):155-69.

Skou JC. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Nov; 9(11):2170-7.

Slot AJ, Wise DD, Deeley RG, Monks TJ, Cole SP. Modulation of human MRP1 (ABCC1) and MRP2 (ABCC2) transport activities by endogenous and exogenous glutathione-conjugated catechol metabolites. *Drug Metab Dispos.* 2007 Dec 13;

Zhang DW, Cole SP, Deeley RG. Determinants of the substrate specificity of multidrug resistance protein 1: role of amino acid residues with hydrogen bonding potential in predicted transmembrane helix 17. *J Biol Chem.* 2002 Jun 7; 277(23):20934-41.

Каналы

Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry. The Royal Swedish Academy of Sciences. Stockholm, Sweden, 8 October 2003. Website: www.kva.se.

Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S. Aquaporin water channels from atomic structure to clinical medicine. *Journal of Physiology,* 2002; 542(1):3-16.

Agre P, Kozono D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Letters,* 2003; 555(1):72-8.

Armstrong CM, Hille B. Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron,* 1998; 20:371-380.

Bass RB, Strop P, Barclay M, Rees DC. Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science,* 2002; 298(5598):1582-7.

Biggin PC, Roosild T, Choe S. Potassium channel structure: domain by domain. *Curr. Opin. Struct. Biol.,* 2000; 10(4):456-61.

Bretweiser G. Mechanisms of K⁺ channel regulation. *Membrane Biol.,* 1996; 1521-11.

Brown DA, Bruce JI, Straub SV, Yule DI. cAMP potentiates ATP-evoked calcium signaling in human parotid acinar cells. *J. Biol. Chem.,* 2004; 279(38):39485-94.

Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, et al. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature,* 2002; 415:287-294.

Dutzler R, Campbell EB, MacKinnon R. Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science,* 2003; 300(5616):108-12.

King LS, Agre P. Man Is Not a Rodent. Aquaporins in the airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.,* 2001; 24:221-223.

MacKinnon R. Potassium channels. *FEBS Letters,* 2003; 555(1):62-5.

McManus ML, Chrchwell KB, Strange K. Regulation of cell volume in health and disease. *N. Engl. J. Med.,* 1995; 333:1260-1266.

Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature,* 2003; 424(6943):949-55.

Olkkonen VM, Ikonen E. Genetic defects of intracellular membrane transport. *N. Engl. J. Med.,* 2000; 343:1095-1104.

Peterson BZ, Johnson BD, Hockerman GH, Acheson M, Scheuer T, Catterall WA. Analysis of the dihydropyridine receptor site of L-type calcium channels by alanine-scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.,* 1997; 272(30):18752-8.

Rash JE, Yasumura Th, Hudson CS, Agre P, Nielsen S. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *PNAS,*

1998; 95(20):11981-11986.

Reuss L, Hirst BH. Water transport controversies - an overview. *Journal of Physiology*, 2002; 542(1):1-2.

Zagotta WN, Siegelbaum SA. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1996; 19:235-263.

Эндоцитоз и экзоцитоз

Banani E, Murray J W, Stockert RJ. et al. Regulation of early endocytic vesicle motility and fission in a reconstituted system. - *Journal of Cell Science* 2003, 116, 2749-2761

Bock JB, Scheller RH. SNARE proteins mediate lipid bilayer fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96(22):122279.

Brone B, Eggermont J. PDZ proteins retain and regulate membrane transporters in polarized epithelial cell membranes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2005; 288(1):C20-9.

Burgoyne RD, Fisher RJ, Graham ME. Regulation of kiss-and-ran exocytosis. *Trends in Cell Biology*, 2001; 11(10):404-405.

Chen YA, Scales SJ, Patel SM, Doung YC, Scheller RH. SNARE complex formation is triggered by Ca^{2+} and drives membrane fusion. *Cell*, 1999; 97(2):165-74.

Damm E, Pelkmans L, Kartenbeck J et al. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis : entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. - *JCB*, 2005, V. 168, N. 3, 477-488

Dietrich LE, Peplowska K, Lagrassa TJ, Hou H, Rohde J, Ungermann C. The SNARE Ykt6 is released from yeast vacuoles during an early stage of fusion. *Embo. Rep.*, 2005; 6(3):245-50.

Dulubova I, Sugita Sh, Hill S, Hosaka M et al. A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *The EMBO Journal*, 1999; 18:4372-4382.

Fasshauer D, Sutton R.B, Brunger AT, Jahn R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R- SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95(26):15781-6.

Han X, Wang Ch, Jihong Bai, Chapman ER, Jackson MB. Transmembrane segments of syntaxin line the fusion pore of Ca^{2+} -triggered exocytosis. *Science*, 2004; 304 (5668) :289-292.

Heinrich R, Rapoport TA. Generation of nonidentical compartments in vesicular transport systems. *J. Cell Biol.*, 2005; 168(2):271-80.

Hua Y, Scheller RH. Three SNARE complexes cooperate to mediate membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98(14):8065-70.

Kirchhausen T. Clatrin. *Annu. Rev. Biochem.*, 2000; 69:699-727.

Kirkham M, Fujita A, Chadda R et al. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles *JCB*, 2005, V.168, N.3, 465-476

Kjeken R, Egeberg M, Habermann A. et al. Fusion between Phagosomes, Early and Late Endosomes: A Role for Actin in Fusion between Late, but Not Early Endocytic Organelles. -*MBC*, 2004, Vol. 15, Issue 1, 345-358.

Kuliawat R, Kalinina E, Bock J,

Fricker L et al. Syntaxin-6 SNARE involvement in secretory and endocytic pathways of cultured pancreatic beta-cells. *Mol. Biol. Cell*, 2004; 15(4):1690-701.

Lin RC, Scheller RH. Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. *Neuron*, 1997; 19(5):1087-94.

Loranger SS, Linder ME. SNAP-25 traffics to the plasma membrane by a syntaxin-independent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277(37):34303-9.

May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.*, 2001; 114:1061-1077.

McNew JA, Weber Th, Engelman DM, Sollner ThH, Rothman JE. The length of the flexible SNAREpin juxtamembrane region is a critical determinant of SNARE-dependent fusion. *Biophysical Journal*, 2003; 84:1527-1547.

McNew JA, Weber Th, Parlati F, Johnston RJ et al. Close is not enough: SNARE-dependent membrane fusion requires an active mechanism that transduces force to membrane anchors. *Mol. Cell.*, 1999; 4(3):415-21.

McNew JA, Weber Th, Parlati F, Johnston RJ et al. Membrane fusion mediated by coiled coils: a hypothesis. *Biophys. J.*, 2000; 78(2):886-900.

Melia ThJ, Weber Th, McNew JA, Fisher LE et al. Regulation of membrane fusion by the membrane-proximal coil of the t-SNARE during zippering of SNAREpins. *The Journal of Cell Biology*, 2002; 158 (5):929-940.

Mukherjee S, Maxfield FR. Role of membrane organization and membrane domains in endocytic

lipid trafficking. *Review Traffic*, 2000; 1:203-211.

Nelson WJ, Yeaman C. Protein trafficking in the exocytic pathway of polarized epithelial cells. *Trends Cell Biol.*, 2001; 11(12):483-406.

Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J. Endocytosis without clathrin coats. *Trends in Cell Biology*, 2001; 11(10):406-410.

Nordeng TW, Gregers TF, Thomas, Kongsvik TL et al. The Cytoplasmic Tail of Invariant Chain Regulates Endosome Fusion and Morphology.- *MBC*, 2002, Vol. 13, Issue 6, 1846-1856.

Owen DJ, Luzio JP. Structural insights into clathrin-mediated endocytosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 2000; 12:467-474.

Peppelenbosch MP, DeSmedt M, ten Hove T, van Deventer SJ, Grooten J. Lipopolysaccharide regulates macrophage fluid phase pinocytosis via CD14-dependent and CD14-independent pathways. *Blood*, 1999; 93(11):4011-8.

Rossi V, Banfield DK, Vacca M, Dietrich LE et al. Longins and their longin domains: regulated SNAREs and multifunctional SNARE regulators. *Trends Biochem Sci.*, 2004; 29(12):682-8.

Scott BL, Van Komen JS, Irshad H, Liu S, Wilson KA, McNew JA. Sec1p directly stimulates SNARE-mediated membrane fusion in vitro. *J. Cell Biol.*, 2004; 167(1):75-85.

Sekiya-Kawasaki M, Groen AC, Cope MJ, Kaksonen M, Watson HA, Zhang C, Shokat KM, Wendland B, McDonald KL, McCaffery JM, Drubin DG. Dynamic phosphoregulation of the cortical actin cytoskeleton and endocytic machinery revealed by real-time chemical genetic analysis. *J. Cell Biol.*, 2003; 162(5):765-72.

Smythe E, Ayscough KR. The Ark1/Prk1 family of protein kinases. Regulators of endocytosis and the actin skeleton. *EMBO Rep.*, 2003; 4(3):246-51.

Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 1993; 362(6418):318-24.

Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 1998; 395(6700):347-53.

Tokumaru H, Umayahara K, Pellgrini

LL, Ishizuka T et al. SNARE complex oligomerization by synaphin/ complexin is essential for synaptic vesicle exocytosis. *Cell*, 2001; 104(3):421-32.

Tsuboi T, McMahon HT, Rutter GA. Mechanisms of dense core vesicle recapture following "kiss and run" ("cavcapture") exocytosis in insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279(45):47115-24.

Varlamov O, Volchuk A, Rahimian V, Doege CA et al. i-SNAREs : inhibitory SNAREs that fine-tune the specificity of membrane fusion. *The Journal of Cell Biology*, 2003; 164(1):79-88.

Volchuk A, Ravazzola M, Perrelet A, Eng WS, Di Liberto M, Varlamov O, Fukasawa M, Engel T, Sollner TH, Rothman JE, Orci L. Countercurrent distribution of two distinct SNARE complexes mediating transport within the Golgi stack. *Mol. Biol. Cell*, 2004; 15(4):1506-18.

Рецепторы, вторичные посредники

Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews*, 2001; 81(3): 1269-1304.

Barford D. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.*, 1996; 21:407-412.

Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update*, 2000; 6(3):225-236.

Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium - a life and death signal. *Nature*, 1998; 395:645-648.

Bettoun DJ, Burris ThP, Houck KA, Buck DW et al. Retinoid X receptor is a nonsilent major contributor to vitamin d receptor-mediated transcriptional activation., *Molecular Endocrinology*, 2003; 17(11):2320-2328.

Brown GC, Hoek JB, Kholodenko BN. Why do protein kinase cascades have more than one level? *Trends Biochem. Sci.*, 1997; 22:288.

Brown MS, Goldstein JL. Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 1974; 71:788-792.

ЦИТОПЛАЗМА

ЭКТОПЛАЗМА - КОРТИКАЛЬНАЯ ЦИТОПЛАЗМА

Цитоплазма, окруженная плазмолеммой, по различию состава структурных элементов, их взаимосвязи и функции, подразделяется на 2 части: эктоплазма и эндоплазма. *Эктоплазма* - это часть цитоплазмы, которая непосредственно прилегает к клеточной мембране, образуя молекулярные связи с её составными структурами, обеспечивает целостность клеточной мембраны, участвует в передаче сигналов к ядру и т.д. Эктоплазму также называют кортикальной цитоплазмой или кортикальным цитоскелетом. Участок со структурами цитоплазмы (элементы цитоскелета, органеллы, цитозоль, основные белки и т.д.), который располагается между эктоплазмой и ядерной оболочкой относится к *эндоплазме*.

Группа специальных белковых молекул, непосредственно или опосредованно соединяясь с белками и липидами клеточной мембраны, образует кортикальную цитоплазму. Так как эти связи не ковалентные, изменения, соответствующие функциональному состоянию клеток (восприятие раздражений, изменение формы, перемещение, деление и т.д.) происходят в очень короткое время.

В организации кортикальной цитоплазмы в основном участвуют следующие белки: спектрин, анкирин, белок 4.1, аддуксин, актин. Было выявлено, что изомеры этих белков (см. далее), впервые обнаруженные в эритроцитах млекопитающих, присутствуют во всех типах клеток человеческого организма. V. Benett и его сотрудники (1988-2004), имеющие особые заслуги в исследовании кортикальных белков, уверены что в первичных многоклеточных организмах (в метазоах) образование специализированных тканей из различных клеток было возможно только с участием белков кортикальной цитоплазмы. У первичных одноклеточных эукариотов (напр. у грибов) белки кортикальной цитоплазмы не синтезируются.

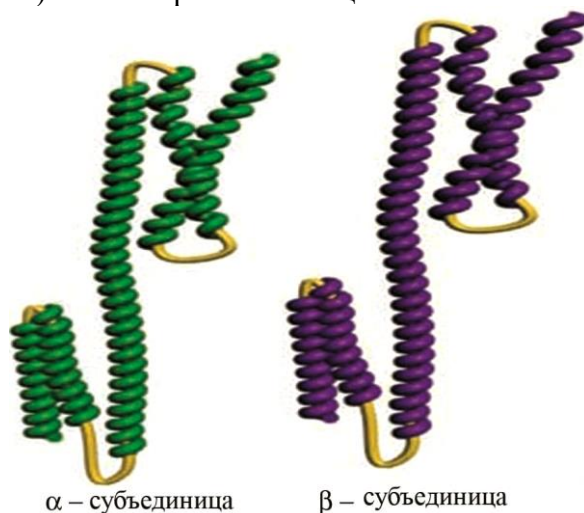


Рис. 3.1. Схематический рисунок трёхмерного пространственного строения белка спектрина. Каждая субъединица представляет повторяющиеся трёхслойные α спирали.

Большая часть белков кортикальной цитоплазмы приходится на **спектрин**. Спектрин образован из 2х субъединиц (α и β), каждая из которых состоит из трёхслойной α спирали (рис.3.1). α и β субъединицы в антипаралельном положении переплетаясь между собой, образуют гетеродимер спектрина. Гетеродимеры, соединяясь между собой по одной линии, образуют палочковидный белок спектрин длиной 200-260 нм, диаметром 3-6 нм, который имеет гетеротетрамерное строение (рис.3.2). Такое строение придаёт спектрину растяжимость, эластичность, создаёт условия для возвращения в исходное положение. У молекул белка спектрина есть ещё одна характерная особенность: они имеют определенные места (domains) для соединения не только с другими белками кортикальной цитоплазмы (см. далее), но и с молекулами белков и липидов клеточной мембраны, с катионами, а также с

ферментами, участвующими в передаче сигналов к ядру. Особенно нужно отметить места РН, СН и SH₃.

В белке спектрине домен, располагаясь вблизи COOH конца β-субъединицы, способен вступать в связь с **С киназа белком (C protein kinase – PKC)**. Последний, как известно, участвует в процессах роста и дифференциации клеток. Место рН впервые было обнаружено в молекуле белка плекстрина, и поэтому при обнаружении этого места в других белках их называли гомологами плекстрина (РН). Место РН в основном обеспечивает связи между рецепторами, G-белками и элементами клеточной мембраны.

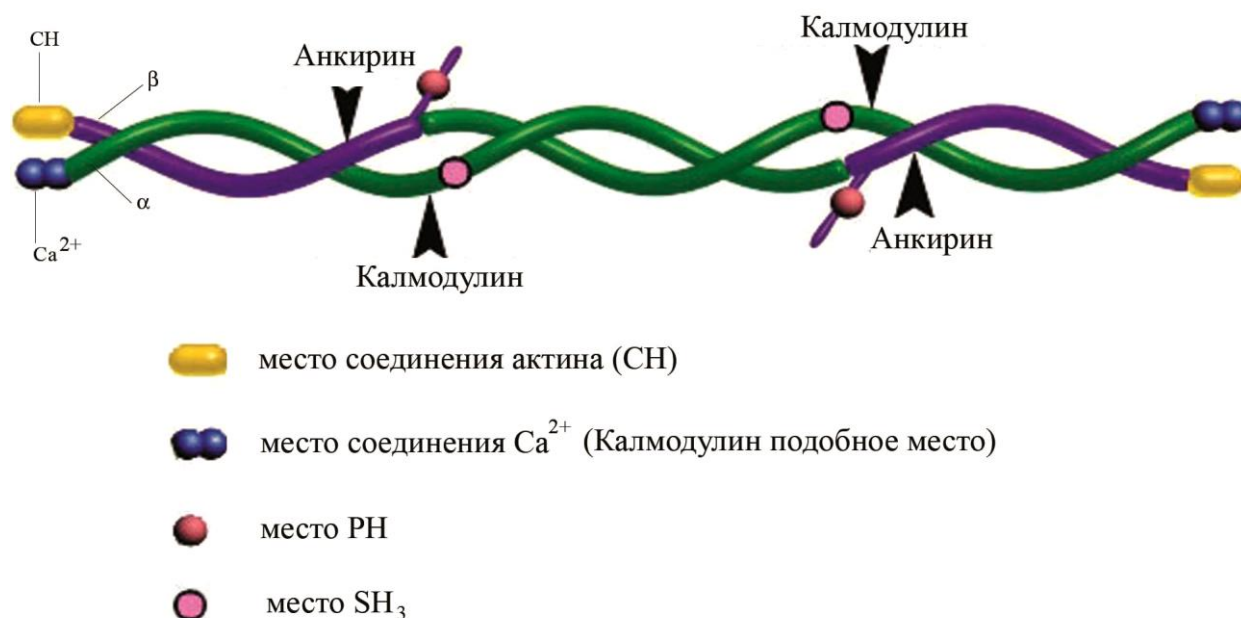


Рис.3. 2. Схематический рисунок гетеротетрамера спектрина.

Место СН соответствует месту соединения актина с белком калпонином в гладких миоцитах, поэтому называется гомологом калпонины (calponin homology-CH). Эти места встречаются во всех белках, которые могут связываться с белком актином. В белке спектрине домен СН располагается на NH₂-концах β-субъединицы.

Домен SH₃ встречается во всех белках и по способности взаимодействовать с Src тирозинкиназой именуется Src гомологом. Место SH₃ располагается в центральном участке α-субъединицы спектрина и обеспечивает связь с белками, которые участвуют в передаче сигналов от клеточной мембраны к ядру (рис.3.2). В α-субъединице спектрина (на COOH – конце) есть место для соединения с Ca²⁺. Это место по своему строению подобно белку калмодулину, соответственно называется *калмодулин подобное место*. Кроме этого, ближе к центральному участку α-субъединицы также имеется калмодулин подобное место. Спектрин, наряду с указанными выше белками, может также связываться с другими белками кортикальной цитоплазмы, о чём будет изложено при описании соответствующих белков.

Белок **анкирин** встречается в составе биологических мембран, окружающих органеллы, расположенных в области кортикальной цитоплазмы и в эндоплазме. Существуют 3 вида белка анкирина молекулярный вес которых колеблется от 26 кД до 480 кД. Они соответственно называются: AnkR или Ank-1, AnkB или Ank-2, AnkG или Ank-3. Анкирины также делятся ещё на 3 группы: 1-простые анкирины (canonical ankyrins), 2-гигантские анкирины (gigant ankyrins), 3-мелкие анкирины (small ankyrins).

Молекулярный вес простых анкиринов колеблется от 190 кД до 270 кД, они встречаются практически во всех клетках и тканях.

Простые анкирины в своём строении имеют места, соединяющиеся с клеточной мембраной (на NH₂ конце), со спектрином (в центре), а также «участок смерти» и регуляторный участок (COOH – конец) (рис.3.3). «Участок смерти» располагается между

местом соединения со спектрином и регуляторной частью. В этих местах имеются рецепторы Fas белков, участвующих в программированной гибели клеток (апоптозе), а также рецепторы фактора опухолевого некроза.

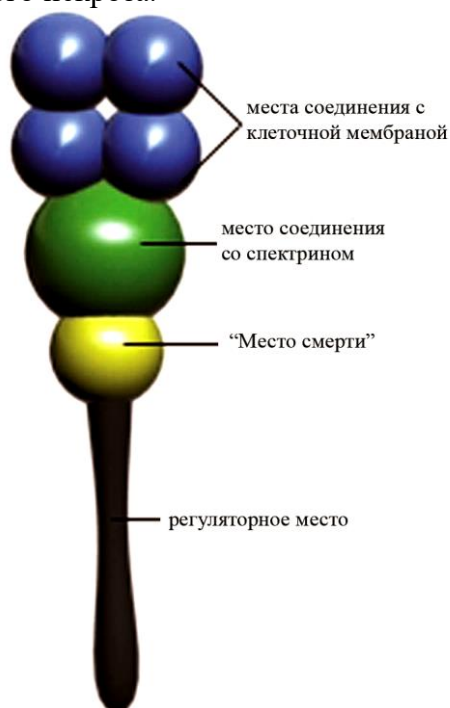


Рис. 3.3. Схематический рисунок белка анкирина.

На рисунке 3.4 дана информация о белках, с которыми связываются простые анкирины. По этой схеме видно, что молекулы анкирина имеют места соединения с расположенными в клеточной мембране разнообразными ионными каналами, в том числе и Ca^{2+} каналом, а также с адгезивными мембранными белками. Наряду с этим молекулы простых анкиринов имеют места соединения со спектрином кортикальной цитоплазмы, а также места для связывания с белками цитозоля - клатрином и тубулином.

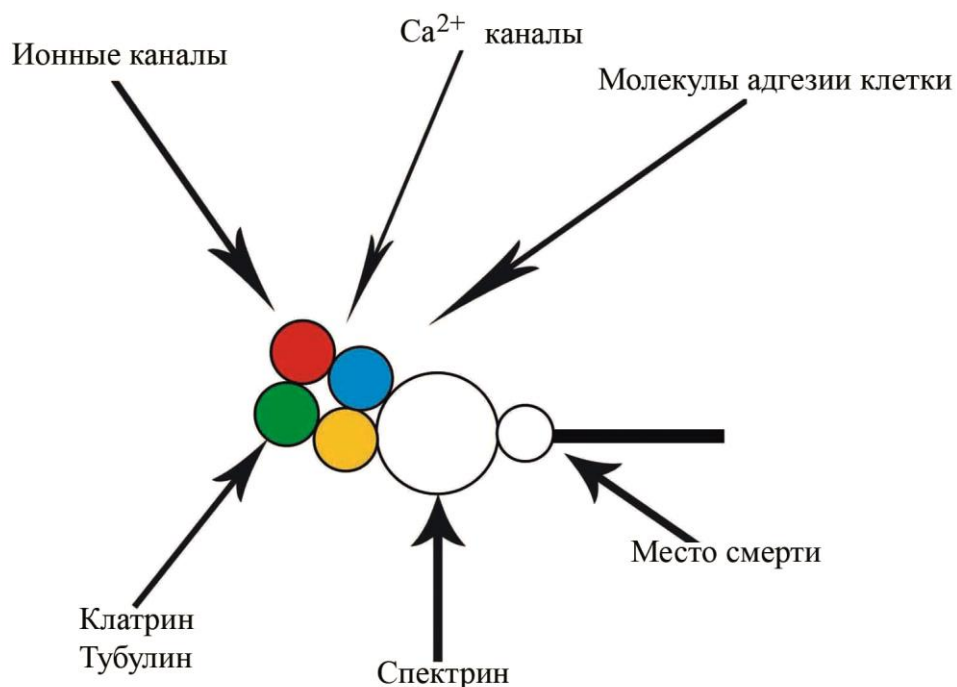


Рис. 3.4. Схематический рисунок отдельных частей белка анкирина и их связей.

Молекулярный вес гигантских анкиринов колеблется от 270 кД до 480 кД. В отличие от простых анкиринов в молекулах гигантских анкиринов между спектрином соединяющим

участком и «местом смерти» определенная последовательность аминокислот создает дополнительную хвостовую часть. Молекулы гигантских анкиринов встречаются в различных участках нервных волокон.

Молекулярный вес мелких анкиринов колеблется от 26 кД до 120 кД. В составе мелких молекул анкирина одна или несколько из вышеназванных частей отсутствует. Эти анкирины встречаются в составе мембран некоторых органелл - эндоплазматической сети, комплекса Гольджи, лизосом.

Белок В-анкирин участвует в регуляции связей между $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ обменниками, Na^+/K^+ АТФ - азами и рецепторами инозитолтрифосфата, расположен в комплексе «Т-трубочка/эндоплазматическая сеть» сердечных мышечных волокон. При мутации генов белка анкирина В у человека наблюдаются различные нарушения сердечной активности, брадикардия, синусовая аритмия, тахикардия и фибрилляция желудочков. Указанные явления в основном бывают наследственными и приводят к внезапной смерти в молодом возрасте (P.J.Mohler et al, 2004).

Белок 4.1 связывает спектрин и актин кортикальной цитоплазмы с производными липидов и белков клеточной мембраны. Белок 4.1 представляет собой единую группу трех белков – **erzin, radiksin и moezin (ERM)**, которые называются **FERM белками**.

Каждый из упомянутых белков имеет глобулярную головку на NH_2 конце, промежуточную часть, образованную α -спиралью и хвостовую часть - на COOH конце, несущим положительный заряд (рис.3.5).

Следует отметить относительность пограничной роли FERM – белков, локализованных между кортикальной цитоплазмой и цитозолем. В каждой клетке эти белки могут одновременно быть и в активной и в неактивной форме. Неактивная форма FERM белков формируется в том случае, когда их хвостовые части и глобулярные головки, связуясь между собой, приобретают свернутую форму.

При этом глобулярные головки вступают в соединение с фосфолипидами клеточной мембраны, а хвостовые части, имеющие фосфатные группировки, способны активизировать FERM-белки. В результате последние приобретают форму, которая показана на рис 3.5.

Активизированные FERM белки головками вступают в связь с фосфолипидами и адгезивными белками (CD-43, CD-44, ICAM 1,2,3) клеточной мембраны, хвостовая же часть - с актином и спектринном кортикальной цитоплазмы. Таким образом, возникают молекулярные связи между элементами клеточной мембраны и кортикальной цитоплазмы.

Огромная роль принадлежит FERM белкам для образования микроворсинок и выпячиваний различных размеров на поверхности клеток (см далее).



Рис. 3.5. Части белка 4.1 и связывающиеся с ними белки.

Одним из белков кортикальной цитоплазмы является белок **аддуксин** (adduction-сближение). Этот белок сближает белки кортикальной цитоплазмы (спектрин и актин) и обеспечивает молекулярную связь между ними. У человека известны 3 субъединицы аддуксина: α , β , γ . В каждой из этих субъединиц различают глобулярную головку, сформированную на NH_2 конце, шейку и хвостик, сформированный на COOH конце (рис. 3.6 А). Глобулярные участки субъединиц, соединяясь между собой, образуют димеры, соответственно димеры, соединяясь между собой, образуют тетрамеры аддуксина (рис.3.6 В). Участки, способные связываться со спектрином и актином, расположены в основном в шейке и хвостовой части аддуксина. Причем белок аддуксин способен образовывать связь с F актином как отдельно, так и совместно с β спектрином (см. рис 3.8). В последнем случае формируется комплекс F-актин-спектрин-аддуксин.

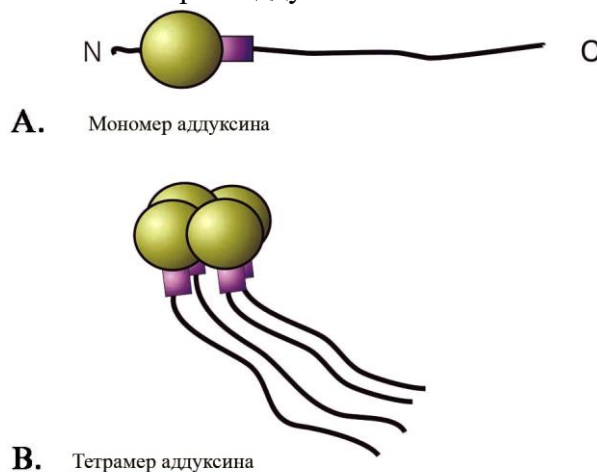


Рис. 3.6. Схематический рисунок мономера (А) и тетрамера (В) белка аддуксина.

Белок аддуксин соединяясь с (+) концом F актина предотвращает его (F актина) полимеризацию и сохраняет актин и спектрин в связанном друг с другом состоянии. Кроме этого комплекс F актин – спектрин – аддуксина белками анкирин и белком 4.1 связывается с клеточной мембраной и участвует в сохранении её целостности.

О формировании белка **актина** будет подробно изложено при описании элементов цитоскелета.

В организации кортикальной цитоплазмы также участвуют филаменты F актина, состоящие из 14-16 глобул актина. Их также называют мембрано-связанными короткими F актин филаментами. Филаменты F актина по всей длине связываются с белком **тропомиозином**, (+) концом, как было выше указано, связываются с белком аддуксином, а (-) концом с белком **тропомодулином**. Иногда под воздействием внешних факторов белок аддуксин фосфорилируется и разъединяется от белков спектрина и актина (рис.3.7). В таких случаях освобожденные от связи белки актин и спектрин участвуют при делении, перемещении, изменении формы клетки.

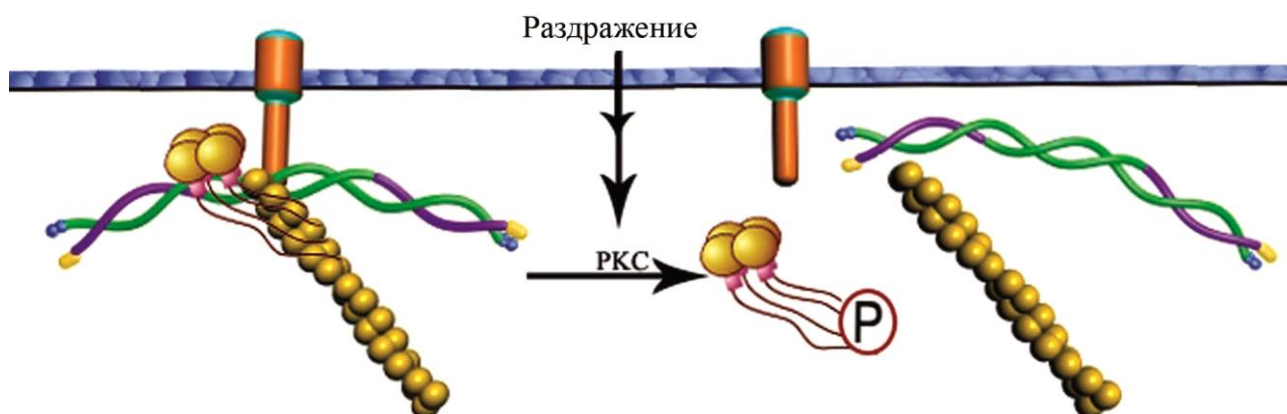


Рис.3.7. Схематический рисунок изменений происходящих в комплексе спектрин-актин-аддуксина при фосфорилировании белка аддуксина, опосредованный протеинкиназой C (PKC).

Взаимосвязи белковых молекул кортикальной цитоплазмы между собой и между молекулами белков клеточной мембраны подробно исследованы в микроворсинках энтероцитов эпителия тонкого кишечника и в эритроцитах человека.

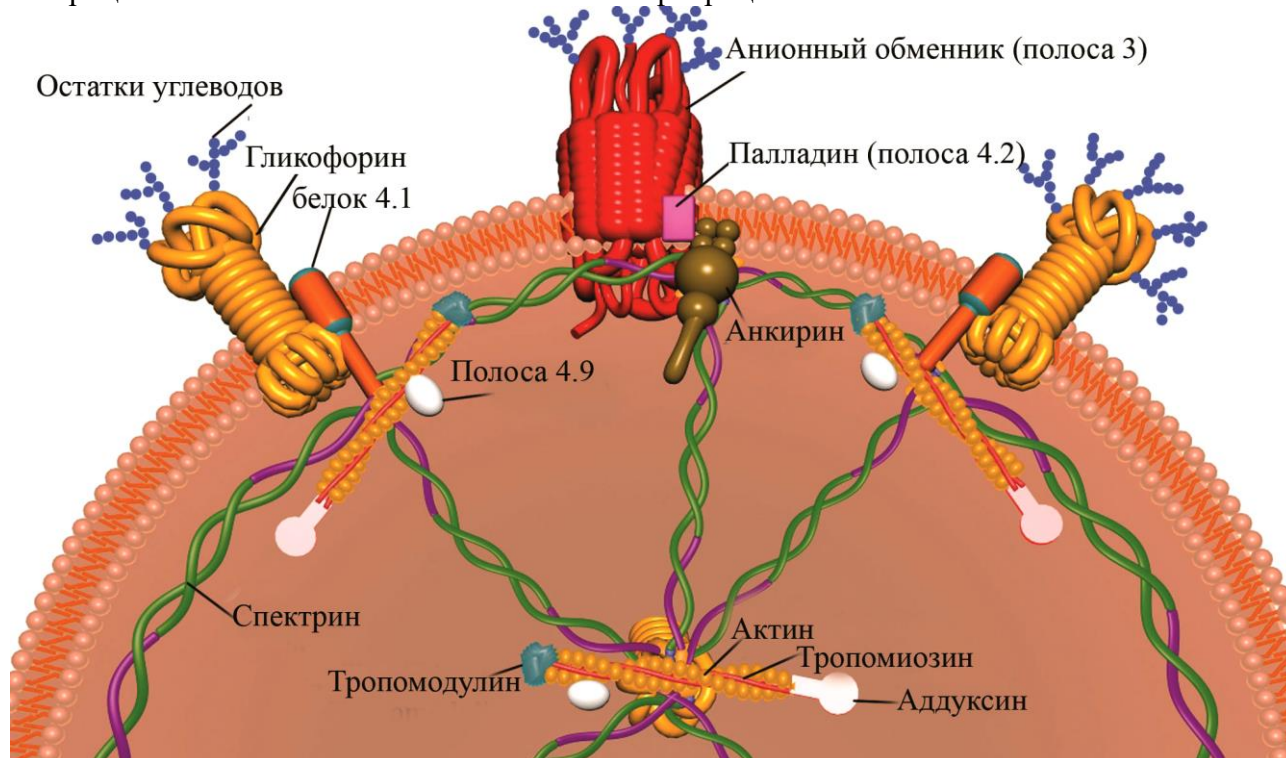


Рис 3.8.Схематический рисунок взаимосвязей элементов кортикальной цитоплазмы эритроцита между собой и элементами клеточной мембраны.

Спектрин, как известно, является основным белком кортикальной цитоплазмы. Большую роль в обеспечении связи спектрина с клеточной мембраной играет белок анкирин. Он связывает спектрин с анионообменником (белок полосы 3) в составе клеточной мембраны эритроцита человека (рис. 3.8). Белок полосы 3 - трансмембранный гликопротеид, который участвует в обмене O_2 и CO_2 . Указанная связь ещё более укрепляется белком палладином (белок 4.2). Кроме этого есть определенные точки соединения, где F актиновые филаменты, белки тропомиозин, тропомодулин и аддуксин образуя «узловые комплексы», одновременно связываются с белком спектрином в количестве от 5 до 7. Изложенная

совокупность белков с участием белка 4.1 связывается с белками гликофоринами в составе клеточной мембраны. Гликофорины относятся к классу мембранных гликопротеинов, которые выполняют рецепторную функцию. Нужно отметить, что филаменты с помощью белка 4.9 связываясь между собой, образуют актиновые пучки. Таким образом, формируется сеть, которая располагается под мембраной эритроцита. Эта сеть в основном состоит из белка спектрина, имеет эластическое свойство и образует молекулярную связь с мембраной. Благодаря такой структуре эритроциты сохраняют свойственную им двояковогнутую форму, а также выдерживают высокое гидростатическое давление в камерах сердца и в артериях, и при прохождении по мелким сосудам меняя форму, могут обратно возвращаться в исходное состояние.

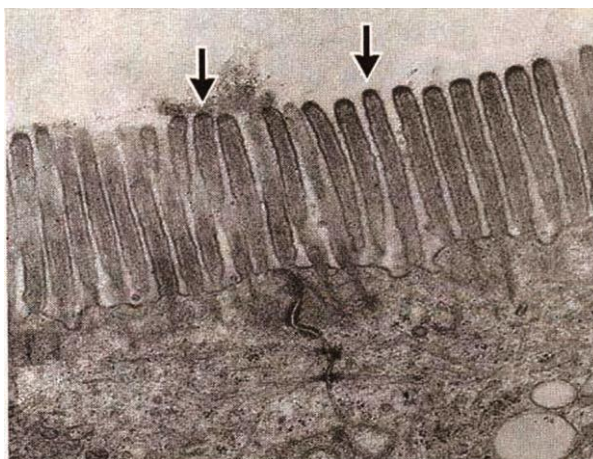


Рис. 3.9. Электронно-микроскопический рисунок микроворсинок на апикальной части энтероцитов.

Исследование микроворсинок на апикальной части энтероцитов показало, что их основная масса состоит из коротких актиновых филаментов (рис. 3.9, 3.10). Как видно на схеме, актиновые филаменты, которые соединены со спектрином, на верхушке микроворсинок с помощью белка 4.1 связываются с молекулами клеточной мембраны.

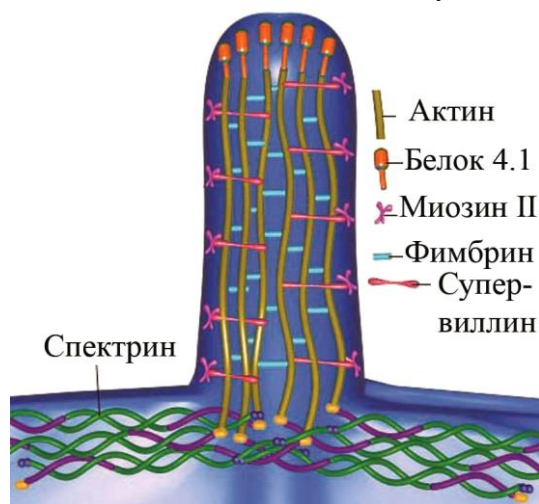


Рис. 3.10. Схематический рисунок элементов кортикальной цитоплазмы в составе микроворсинок на апикальной части энтероцита.

Эти актиновые филаменты между собой соединяются с участием белка фимбрина. Кроме этого, в соединении актиновых филаментов участвуют белки супервиллины. В молекуле супервиллина (рис. 3.10) в ее концевом участке, обращенном к клеточной мембране, имеется место для соединения с молекулой немышечного миозина II, а на участке, обращенном к кортикальной цитоплазме, расположено место для соединения с 3-м F

актиновыми филаментами. Такие пучки F актина в результате активности молекулы миозина II обеспечивают подвижность микроворсинок.

ЦИТОСКЕЛЕТ

Цитоскелет или опорно-двигательная система всех животных клеток, представляет собой динамическую внутриклеточную сетчатую структуру, состоящую из белковых нитей и трубчатых элементов локализованных в цитоплазме и некоторых участках ядра. Филаменты и трубчатые элементы цитоскелета образуют трехмерную сеть, взаимодействующих между собой структур. Функции цитоскелета сложны и многообразны. Цитоскелет выполняет роль структурного организатора цитоплазмы, обеспечивает поддержание и необходимые изменения формы клетки и все виды движений как клетки в целом, так и ее отдельных структур (органелл, транспортных пузырьков, хромосом и пр.). Цитоскелет обеспечивает транспорт веществ в клетку и из нее, а так же внутриклеточный транспорт веществ.

Элементы цитоскелета принимают участие в межклеточных взаимодействиях, формировании межклеточных контактов. Элементы цитоскелета активно участвуют при образовании выростов клетки (ламеллоподий, псевдоподий), при делении клетки, в процессах эндо- и экзоцитоза. Цитоскелет, обеспечивая целостность и эластичность клетки, как известно на 70-80% состоящей из воды, вместе с тем предотвращает ее деформацию.

Компоненты цитоскелета являются не мембранными органеллами цитоплазмы и имеют характерное распределение в клетке. В построении цитоскелета участвуют три главных типа белковых фибрилл разного калибра:

1. Микрофиламенты или тонкие филаменты, представляют собой нитчатые структуры, диаметр которых составляет 5-6 нм
2. Промежуточные филаменты, их диаметр примерно равен 10 нм
3. Микротрубочки, их диаметр – около 25 нм

МИКРОФИЛАМЕНТЫ

Микрофиламенты встречаются во всех эукариотических клетках. Они образуют как тонкую сеть, так и упорядоченные пучки в цитоплазме, входят в состав микроворсинок и межклеточных контактов. Наиболее выражена кортикальная сеть микрофиламентов расположенная под плазмолеммой, которая препятствует деформации клеток.

Основной белок тонких филаментов – **актин**. Глобулярные белковые молекулы **G-актина** имеют молекулярную массу 43 кД. Актин составляет 10-15 % всех клеточных белков в немышечных клетках. Содержание микрофиламентов в специализированных мышечных клетках очень высокое. Мономеры G-актина полимеризуются и образуют спиралевидный фибриллярный актин - **F-актин**. Два F-актина переплетаются и образуют тонкий филамент длиной 6-7 нм (рис.3.11).

Актиновые микрофиламенты полярны, имеют два функционально различных конца: (+) плюс конец, где больше положительных ионов и (-) минус конец, где больше отрицательных ионов.



Рис. 3.11. Схема строения тонких филаментов.

Положительный (+) конец актинового филамента из-за сходства с наконечником стрелы называется заостренным (*pointed*), а отрицательный (-) же конец - шиповатым (*barbed*).

Различного рода движения происходят, как правило, в результате скольжения (+) конца актинового филамента к центру миозинового филамента. Плюс конец является зоной полимеризации и роста фибриллы актина. Скорость полимеризации на (+) конце по сравнению с (-) концом в 5 раз больше. При формировании тонких филаментов параллельно с полимеризацией в плюс конце, так же происходит деполимеризация на минус конце, что дает возможность поддерживать длину филаментов. Экспериментально доказано, что токсин грибковой природы цитохалазин, связываясь с (+) концом актинового филамента, блокирует его полимеризацию, а токсин фаллоидин, связываясь с (-) концом - блокирует его деполимеризацию. Необходимо отметить, что процессы сборки и разборки актиновых филаментов зависят в основном от концентрации G-актина. Изменение полимеризации актина может привести к нарушениям движения клетки, цитокенеза, фагоцитоза и ряда других функций.

По своим изоэлектрическим параметрам белок актин подразделяется на α , β и γ – актины. Среди них α -актин определяется только в мышечных клетках, β и γ -актины встречаются и в других типах клеток.

Благодаря наличию в клетках специальных групп белков, которые способны связываться с актином, микрофиламенты участвуют в образовании различных специализированных структур в цитоплазме.

В цитоплазме клеток присутствуют около 50 различных белков, активность которых регулируется протеинокиназами и ионами Ca^{2+} . Эти белки принимают участие в различных внутриклеточных движениях (*миозин*), полимеризации (*profilin*) и деполимеризации (*kofilin*) Q-активных мономеров, в поддержании в свободном состоянии концов микрофиламентов (*fraqtin*), нарушении внутриспиральной структурированности микрофиламента (*helzolin*), нарушениях молекулярных взаимодействий микрофиламентов между собой и с другими структурами (*villin, filamin, α -aktinin, spektrin, ankirin, vinkulin, talin* и др).

Микрофиламенты и связывающиеся с ними белки для выполнения различных функций формируют пучки или трехмерную сеть. Иногда они так и именуются актиновые пучки или актиновая сеть.

Пучки актиновых филаментов в зависимости от упорядоченности их расположения и характера связанных с ними белков могут быть двух видов: **поддерживающие** (параллельные) и **сократительные** актиновые пучки.

Актиновые филаменты в поддерживающих (параллельных) пучках расположены полярно, то есть плюс концы всех филаментов расположены в одном конце и направлены к плазмолемме, минус концы направлены в цитоплазму, а связывающий белок фибрин обеспечивает очень тесное расположение мелких тончайших микрофиламентов в форме сети (рис 3.12).

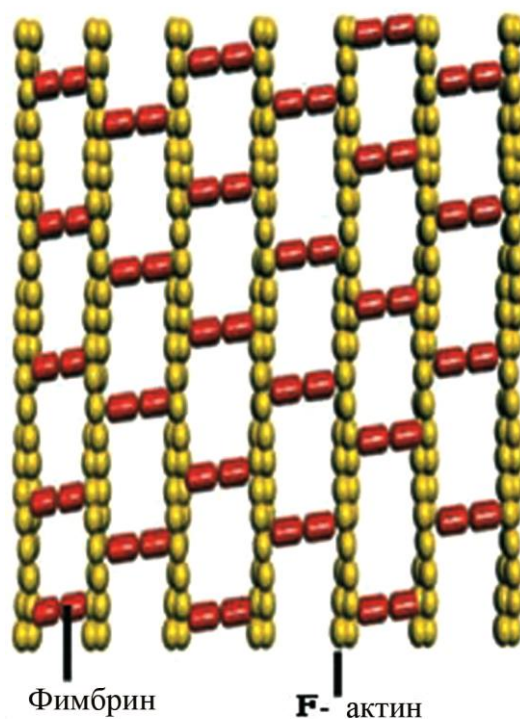


Рис. 3.12. Параллельные поддерживающие актиновые пучки.

В *сократительных* актиновых пучках плюс концы соседних микрофиламентов расположены противоположно и между ними связывающим белком является α -актинин, который имеет более крупные размеры, поэтому расстояние между микрофиламентами больше (рис 3.13).

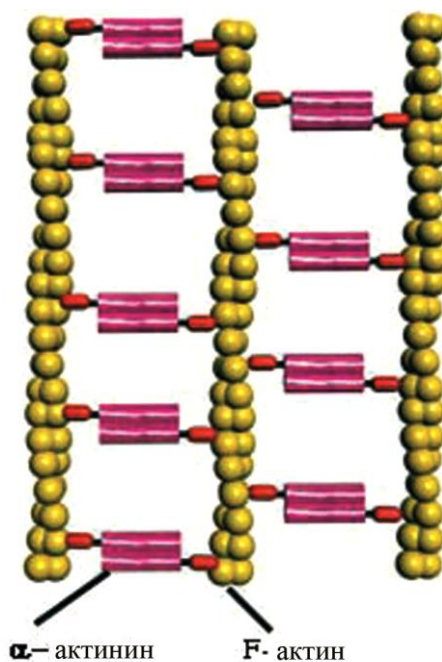


Рис. 3.13. Сократительные пучки актина.

Это дает возможность расположению между соседними микрофиламентами головок миозиновых молекул. Сократительные актиновые пучки встречаются больше в поперечнополосатых мышечных волокнах, в кардиомиоцитах, а также в гладкомышечных клетках. Надо отметить, что в гладкомышечных клетках сократительные пучки прикрепляются к плотным тельцам, в состав которых входит белок α -актинин (рис 3.14).

Микрофиламенты, входящие в состав актиновой сети, наряду с формированием трехмерной сети, могут также располагаться на некотором расстоянии друг от друга (рис 3.15).

Помимо пучков, микрофиламенты, располагающиеся на некотором расстоянии друг от друга формируют трехмерные сети (рис 3.15). В формировании таких сетей участвует связующий белок *филамин*. Белок филамин имеет форму «V» и состоит из двух субъединиц (рис 3.15). Одним концом субъединицы связываются между собой, а свободными концами - с местами пересечения актиновых микрофиламентов.



Рис. 3.14. Стрелкой указаны плотные тельца гладких миоцитов, которые являются местами прикрепления тонких филаментов.

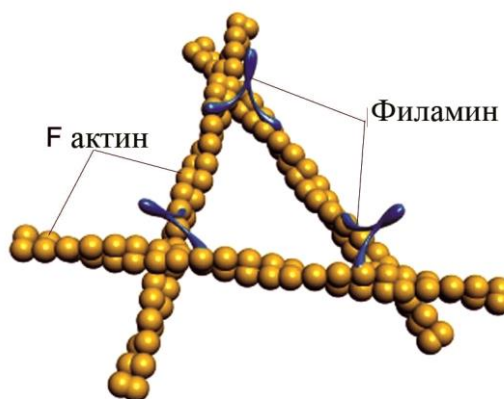


Рис 3.15. Сеть актиновых филаментов.

Следует отметить, что именно с участием актиновых сетей и пучков формируются структуры, связанные с плазмолеммой, такие как перетяжка деления, волокна натяжения, выросты клеточной поверхности и т.д.

Перетяжка деления формируется в анафазе митоза на экваторе делящейся клетки из актиновых филаментов и связанных с ними белков (рис 3.16).

Актиновые филаменты здесь формируют сократительные пучки. Плюс концы актиновых филаментов прикреплены при помощи специальных белков (белок 4.1.) к интегральным белкам плазмолеммы (CD 43). Между свободными концами расположены 15-20 молекул миозина, которые образуют толстый филамент. При увеличении концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме происходит скольжение филаментов, головки миозина связываются с актином и актиновые филаменты приближаются друг к другу. Так как один конец актиновых филаментов прикреплен к плазмолемме, на местах прикрепления

актиновых филаментов формируется борозда деления по всему экватору. Дальнейшее углубление борозды завершается разделением клетки на две дочерние.

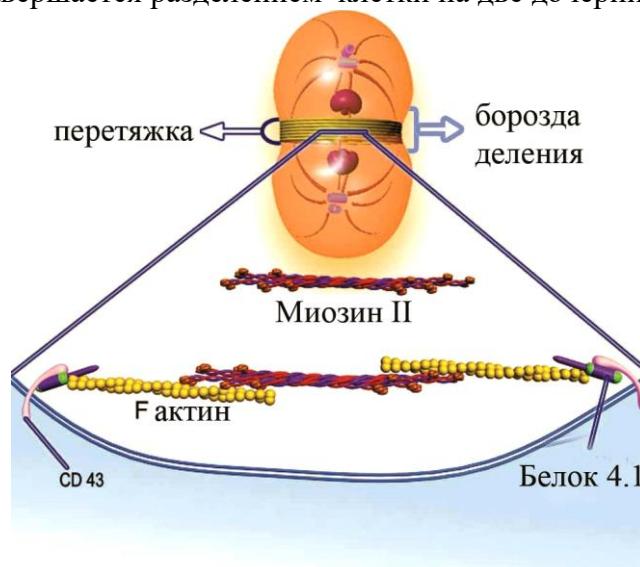


Рис. 3.16. Схематический рисунок перетяжки деления во время митоза, образованной с участием сократительных пучков актина и миозина II. (объяснение в тексте)

Волокна натяжения (stress fibers) располагаются в точках адгезии клетки с элементами межклеточного вещества. Волокна натяжения, располагаясь со стороны цитоплазмы, состоят из сократительных актиновых пучков (рис 3. 17). При адгезии клетки с элементами межклеточного вещества принимает участие также трансмембранный белок интегрин. Связь внутриклеточных и внеклеточных структур обеспечивается через белок интегрин. Такие связи встречаются в фокальных адгезивных контактах, когда клетка прикрепляется к макромолекулярным белкам окружающим клетку - таким как фибронектин, коллагеновые волокна и т д.

Концевые участки белка интегрин, обращенные к цитоплазме с помощью α -актинина образуют молекулярные связи с сократительными актиновыми пучками (рис 3.17). β -субъединица молекулы интегрин способна соединяться как с таллином, так и с α -актинином. Вместе с тем белок винкулин с одного конца вступает в связь с α -актинином, а с другой – таллином, последний при помощи винкулина может входить в непосредственную связь с актиновыми филаментами. Таким образом, при помощи интегринов обеспечивается молекулярная связь между элементами цитоскелета клетки и межклеточного вещества.

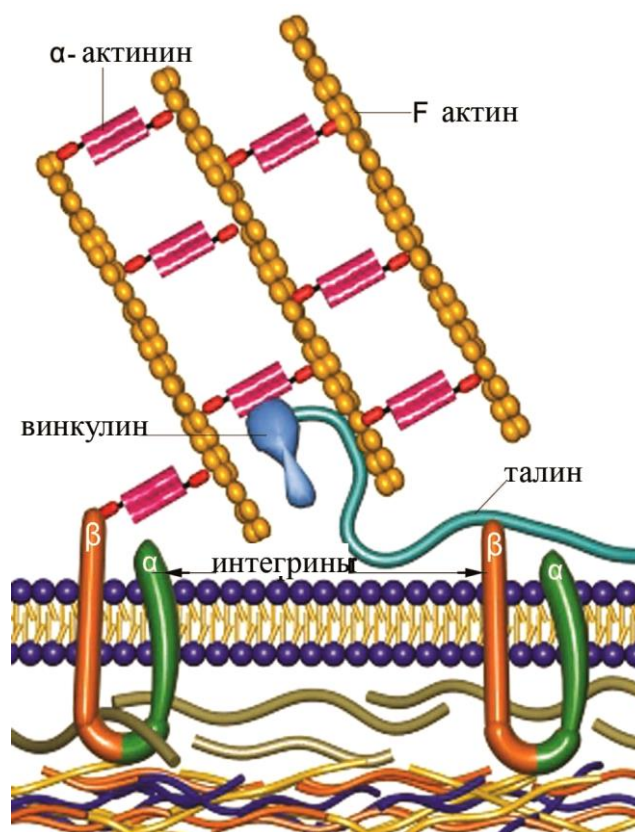


Рис. 3.17. Молекулярные связи волокон натяжения с элементами межклеточного вещества в точках адгезии (объяснение имеется в тексте).

Филоподии - шиповидные мелкие выросты цитоплазмы, состоящие из актиновых пучков, окруженных плазмолеммой (рис 3.18.А).

Ламеллоподии – это более широкие и уплощенные выросты клеток, которые содержат сеть актиновых филаментов (рис 3.18.В).

Псевдоподии - обеспечивают фагоцитоз и амeboидное движение клетки (рис 3,18.С). Амeboидное движение клеток осуществляется за счет образования локальных выступов цитоплазмы (псевдоподий), которые образуются в результате динамической перестройки кортикальной сети микрофиламентов. В живом организме таким образом перемещаются клетки во время эмбриональных миграций, а также подвижные клетки, как например, нейтрофилы или макрофаги.

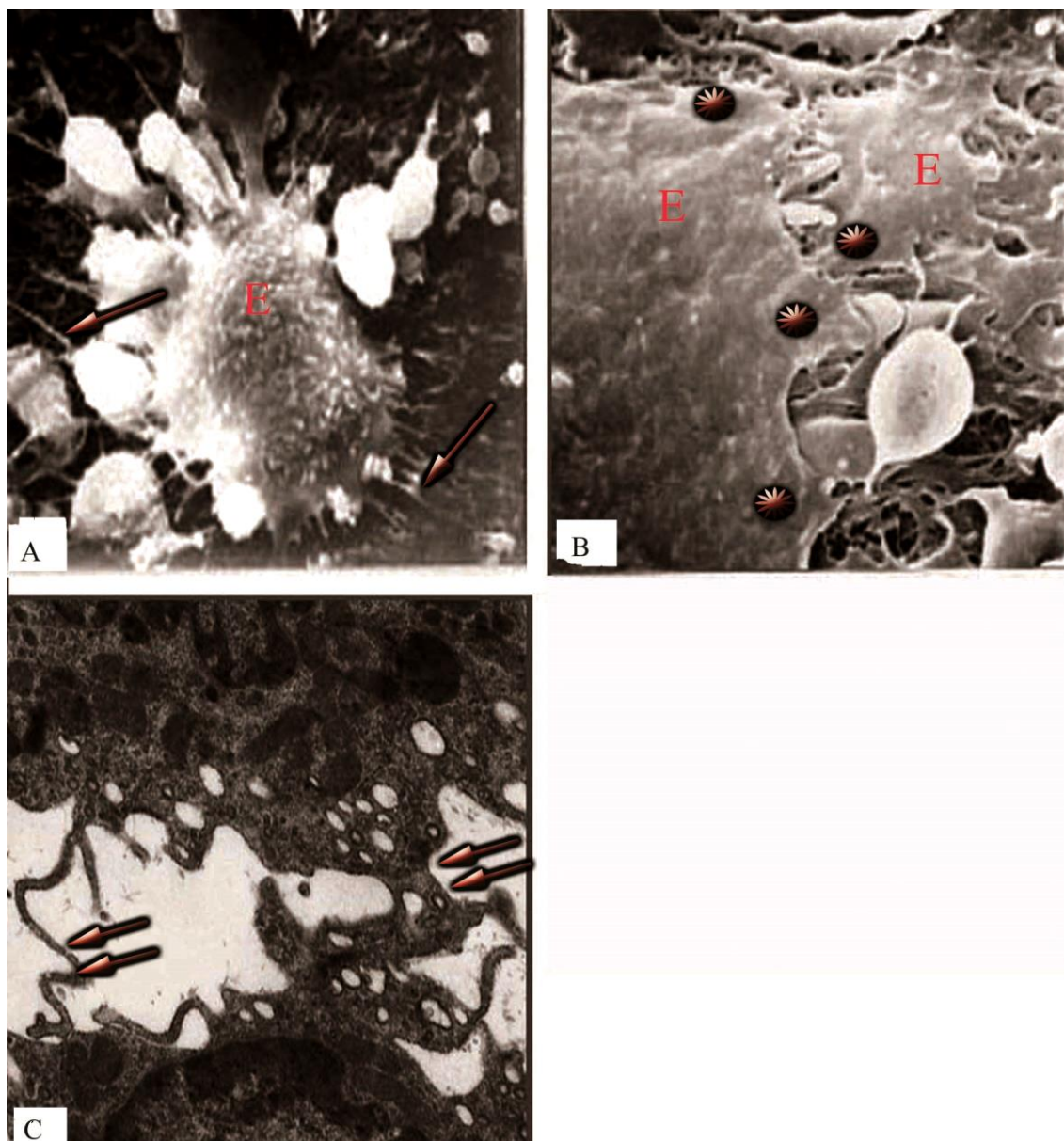


Рис. 3.18. Электронно-микроскопический рисунок периферических частей клеток. Стрелкой указаны филаподии (А), ламеллаподии (В) и псевдоподии (С)

А - филаподии эндотелиальных клеток, В - ламеллаподии регенерирующих эндотелиальных клеток, С - псевдоподии соседних макрофагов

Актиновые филаменты формируют поддерживающие пучки внутри микроворсинок. **Микроворсинки** представляют собой многочисленные локальные выступы плазматической мембраны, увеличивающие ее всасывательную поверхность, например, в эпителии тонкого кишечника или почечных канальцев

Изменение формы клеток, образование различных выростов клетки, происходит за счет изменения длины микрофиламентов в результате полимеризации или деполимеризации актина.

Для осуществления любых видов движения в клетках актиновые микрофиламенты взаимодействуют с белками миозинами. В основе любого сокращения лежит скольжение актиновых и миозиновых нитей относительно друг друга.

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ФИЛАМЕНТЫ

Белковый состав промежуточных филаментов тканеспецифичен. Диаметр промежуточных филаментов составляет 10 нм. Название свое они получили, т.к. по

сравнению с микротрубочками (15-16 нм) и микрофиламентами (6-7 нм) по своему диаметру они занимают промежуточное положение (рис 3.19).

В отличие от других элементов цитоскелета промежуточные филаменты не участвуют в движениях клетки и в процессах внутриклеточного транспорта. Они играют важную роль: в поддержании внутреннего каркаса клетки; поддержании стабильного положения ядра; формируя трехмерную сеть в разных участках цитоплазмы, предотвращают деформацию клеток; играют существенную роль в происходящих во время митоза процессах и т.д. При мутациях генов, кодирующих промежуточные филаменты наблюдается нарушение цито- и гистоструктуры клеток и тканей организма.

Сведения о промежуточных филаментах стали накапливаться с 80-х годов прошлого столетия. В настоящее время изучены более 50 генов, кодирующих 6 белков, входящих в состав промежуточных филаментов (кератин, десмин, виментин, кислый фибриллярный белок глии, нейрофиламенты, белки ламины вокруг ядра).

Структурной единицей (мономером) промежуточного филамента является белковая полипептидная цепочка, которая имеет одинаковую для всех типов промежуточных филаментов центральную часть: это участок α -спирали, состоящий из 130 аминокислотных остатков. Начальная часть мономера (цепочки) представленная аминокислотной группой называется головкой, противоположный конец с карбоксильной группировкой - хвостик. Поскольку концевые участки полипептидной цепочки имеют разное строение и размер, это является причиной различия белкового состава различного типа промежуточных филаментов (схема 3.1). Этим они отличаются от других элементов цитоскелета.

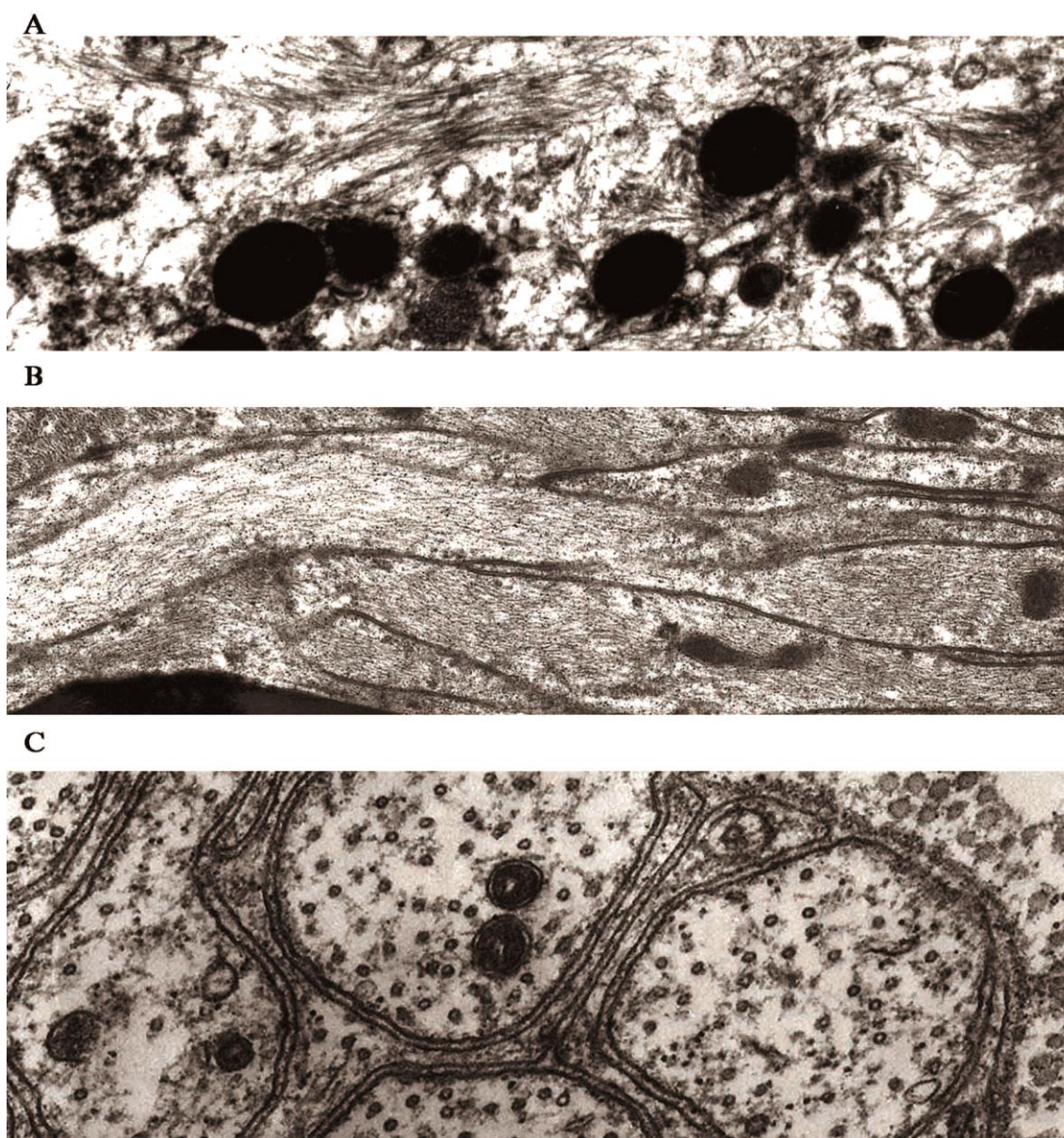


Рис. 3.19. Трансмиссионные электронно-микроскопические рисунки различных промежуточных филаментов.

А - пучки кератиновых промежуточных филаментов в эпителиоцитах потовых желез.

В - промежуточные филаменты в астрацитах зрительного нерва, состоящие из кислого фибриллярного белка глии.

С - промежуточные филаменты в аксонах безмиелиновых нервных волокон, состоящих из нейрофиламентов.

Общий принцип укладки мономеров можно привести на примере кератиновых белков. Вначале по две белковые молекулы мономеров образуют двойную спираль - вкрученный димер, затем каждые две такие спирали объединяются антипараллельно и образуют тетрамеры, и в дальнейшем тетрамеры формируют **протофиламент**, 2 протофиламента объединяются и образуют **протофибриллы** диаметром 4-5 нм, 4 протофибриллы формируют **филамент** диаметром 9-11 нм (рис 3.20).

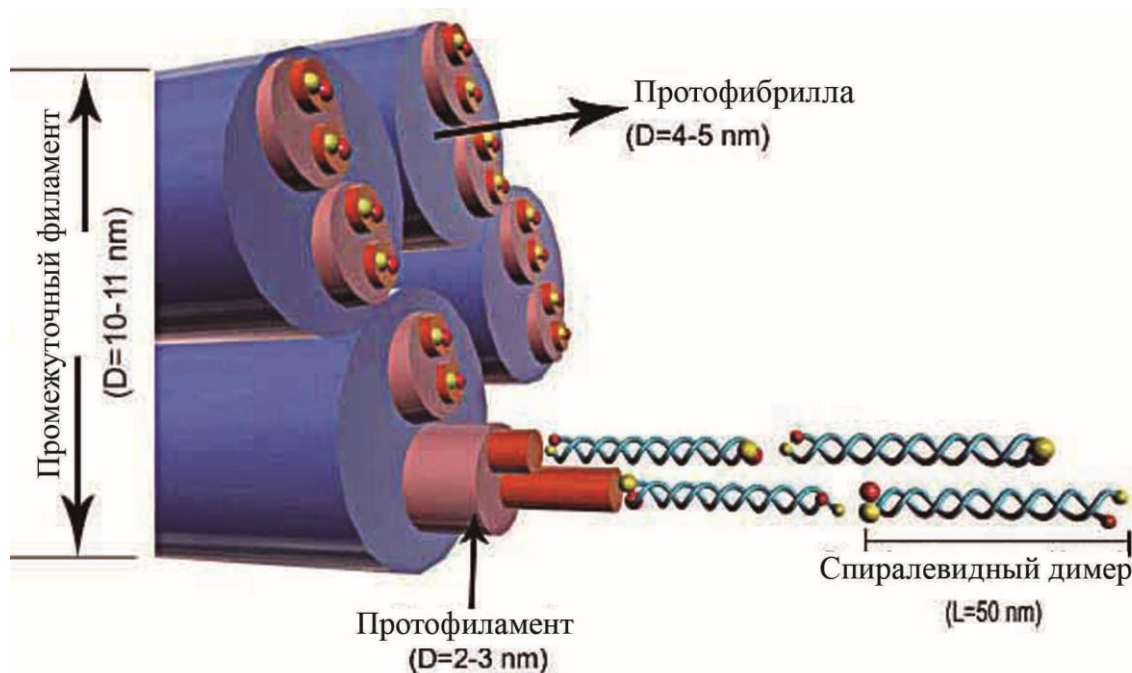


Рис.3. 20. Схематический рисунок формирования промежуточных филаментов. Объяснение имеется в тексте.

В отличие от микрофиламентов и микротрубочек, для формирования промежуточных филаментов не характерна постоянная сборка и разборка. Эти процессы могут происходить под действием специфических киназ, путем их фосфорилирования. Например, во время митоза в результате фосфорилирования ламина в промежуточных филаментах ядра нарушается целостность ядерной мембраны.

Белковый состав промежуточных филаментов тканеспецифичен. Как видно из таблицы 3.1 различают 6 основных типов белков промежуточных филаментов.

Цитокератины - характерный компонент цитоскелета эпителиальных клеток. Выделяют 2 вида кератина: кислые и щелочные цитокератины. Синтез обоих видов кератинового белка происходит в эпителиальных клетках любого типа. Затем они, объединяясь друг с другом, формируют промежуточные филаменты в составе как твердого (волосы, ногти), так и мягкого (в других органах) кератина.

Интерес представляет собой и тот факт, что эпителиоциты, имеющие различное происхождение, синтезируют исключительно себе подобный кератин. Так известно, что кератиноциты эпидермиса кожи располагаются в базальном слое и дифференцируются в единый тип клеток. Однако, несмотря на то, что базальные кератиноциты экспрессируют в V и XIV типы кератина, в корнеоцитах рогового слоя синтезируется кератин I и X типа. Следовательно, имеющие единое происхождение клетки эпидермиса при переходе из одного слоя в другой согласно изменяющимся условиям и микроокружению начинают синтезировать соответствующие этим условиям группы кератинового белка.

Объединяясь при помощи специальных групп белков с клеточной мембраной, а также с другими элементами цитоскелета, промежуточные филаменты формируют трехмерную сеть, т.е. создают внутриклеточный каркас, обеспечивают упругость клетки, поддерживают упорядоченность расположения компонентов цитоплазмы.

Белок		Колич. генов	Молекул. масса	Место экспрессии	Функции
Тип	Вид				
I.	Кислый кератин	>15	40-65	Эпителиальные	Обеспечивает организацию клеток
II.	Щелочной Кератин	>15	51-68	Эпителиальные клетки	общим слоем и устойчивость элементов цитоскелета к механ. воздействиям
III.	Виментин	1	54	Клетки мезенхимной природы (фибробласты, лейкоциты, эндот. клетки)	Окружает ядерн. мембрану и образ. связь с цитоплазматической частью ядерной поры
	Десмин	1	53	Мышечные клетки	Присоед. поперечно-полосатые микрофибриллы к Z-линии и прин. участие в образовании плотных телец гладких мышц
	Глиальн. кислый фибрил. белок	1	50	Глиальные клетки	Обеспечивает опору глиальных клеток
	Периферин	111	57	Периферическ. нейроны	
IV.	Нейрофиламенты:	1		Нейроны	Образ. цитоскелета аксонов
	NF-L (легкие)	1	67	эмбриональн.	дендритов, участ. в сохранении
	NF-M (средние)	1	150	нейроны	гелевого состояния цитоплазмы,
	NF-N (тяжелые)	1	200		образует перекрестные связи, обеспечивая устойчивость к мех. воздействиям
V.	α -интернексин	1	55		
	Ядерные ламины	4		Ядра	Организация ядерной мембраны и ее
	A		62	растительных и	контроль, принимает участие в
	B		69	животных	организации периф. хроматина
VI.	C		72	клеток	
	Нестин	1	230	Эмбриональн. е нервные, мышечные и др. клетки	Обеспечивает опору указанных клеток

Таблица 3.1. Белки промежуточных филаментов.

К белкам, связывающихся с промежуточными филаментами относятся филагрин, синемин, эмерин, плакины, ламиносвязывающие белки.

Филлагрин связывает кератиновые филаменты, формирует кератиновые пучки.

Синемин – белок, который участвует при формировании внутриклеточной сети промежуточных филаментов. Имеет молекулярную массу 190 кД.

Среди **плакинов** самыми распространенными являются десмоплакин и плектин. **Десмоплакины**, соединяясь с промежуточными филаментами, участвуют при образовании десмосом.

Плектин имеет самую большую молекулярную массу среди всех этих белков - примерно 500 кД, связывает промежуточные филаменты с актиновыми филаментами, микротрубочками, спектрином и полудесмосомами.

Ламин - соединяющие белки связывают ядерную мембрану с ламинами ядра.

Эмерин - белок локализованный на внутренней ядерной оболочке.

Следует отметить, что промежуточные филаменты принимают участие в образовании десмосомы. Следует отметить, что посредством промежуточных филаментов десмосомы принимают участие в образовании межклеточных контактов, а полудесмосомы - формируют связи с межклеточным веществом. В результате этих связей поддерживается механическая стабильность и упорядоченность расположения клеток и компонентов межклеточного вещества в различных частях организма.

Строгая тканеспецифичность промежуточных филаментов успешно используется в медицинской диагностике. Так, в ряде случаев одними только морфологическими критериями невозможно точно определить происхождение и тип опухоли. В таких случаях лишь иммуногистохимический анализ, выявляющий тип промежуточных филаментов в опухолевых клетках, позволяет точно установить их тканевую принадлежность. Это очень важно в диагностике злокачественных опухолей и в выборе правильной тактики лечения.

МИКРОТРУБОЧКИ

Микротрубочки — наиболее крупные компоненты цитоскелета. Микротрубочки выполняют опорную функцию, так же обеспечивают внутриклеточный транспорт органелл, мелких пузырьков; участвуют при формировании жгутиков, ресничек и при делении клеток (рис 3.19 С и 3.21).

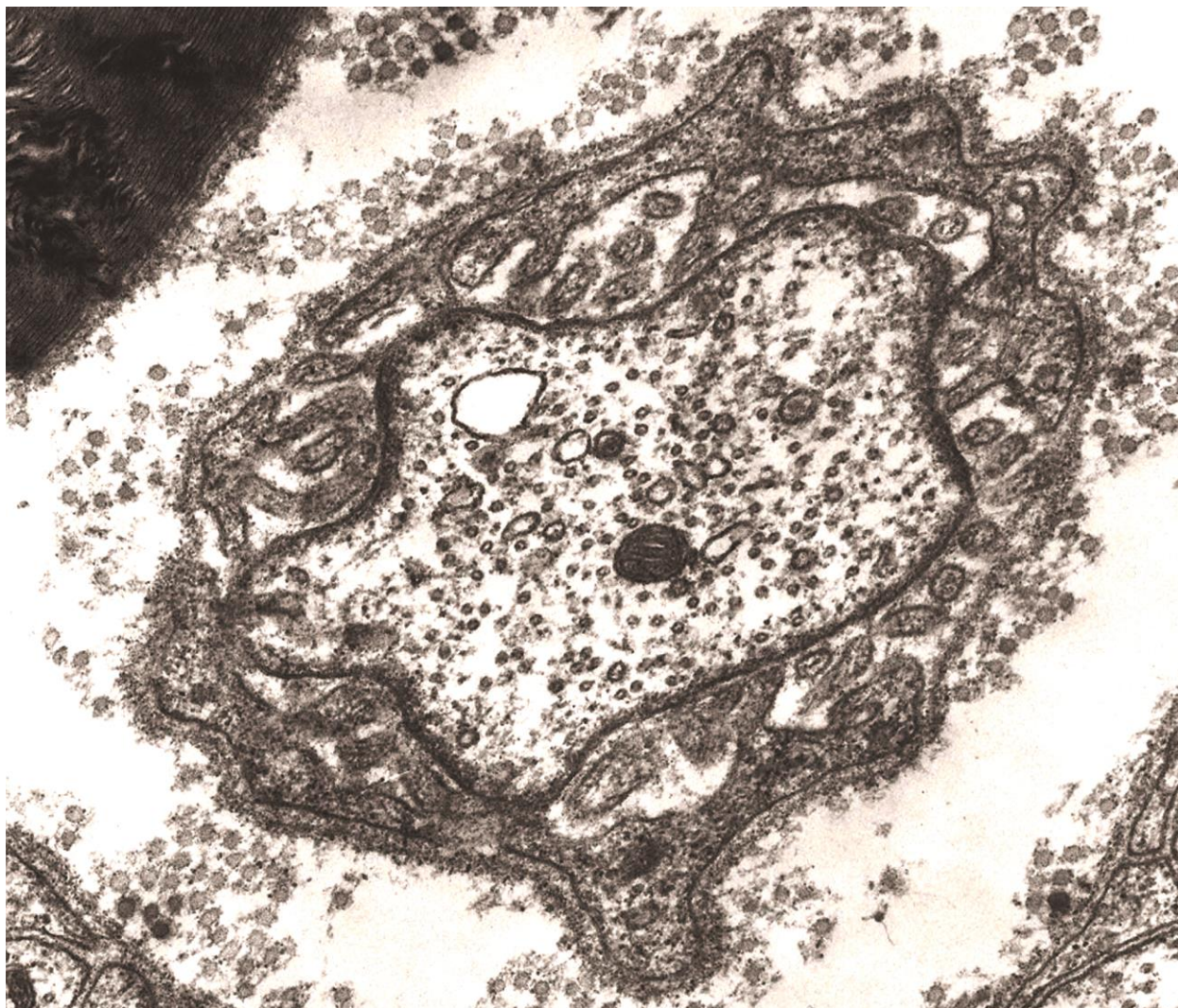


Рис.3.21. Электронно-микроскопический рисунок перехватов Ранвье миелиновых нервных волокон. Внутри аксона окруженного базальной мембраной и периферической частью леммоцитов видны срезы микротрубочек, нейрофиламентов, канальцев гладкой эндоплазматической сети и митохондрий.

Микротрубочки, состоящие из белка тубулина, при полимеризации последнего приобретают форму полого цилиндра. Их диаметр 24- 25 нм, длина достигает 25 мкм, толщина стенки цилиндра равна 5 нм, диаметр полости цилиндра 14-15 нм.

Белок тубулин имеет две глобулярные субъединицы: α и β тубулин, которые формируют димер, молекулярной массой 55кД (рис 3.22).

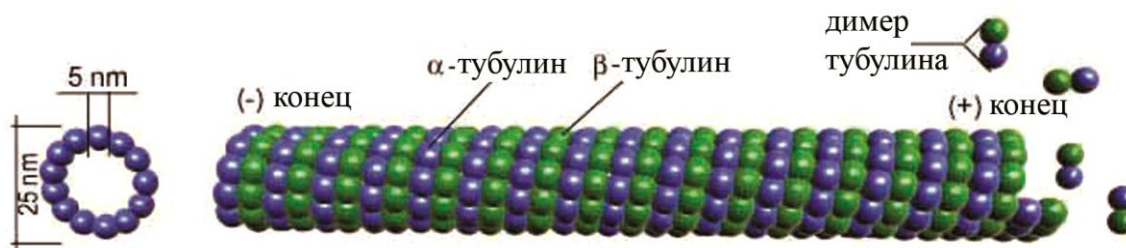


Рис. 3.22. Морфофункциональная характеристика и формирование микротрубочек. Объяснение имеется в тексте.

Длина тубулиновых димеров равна 7-8 нм, диаметр же каждого мономера 5 нм. Других белков кроме тубулина в составе микротрубочек не обнаружено.

С участием ионов Mg и ГТФ, димеры тубулина полимеризуются и формируют протофиламенты, которые располагаясь параллельно друг другу, укладываются в микротрубочку. Каждая микротрубочка состоит из 13-ти таких протофиламентов. Полярность протофиламентов определяет полярность микротрубочек: начало протофиламентов является (-) минус концом, где расположены мономеры α - тубулина; конечная часть (+) плюс концом, где расположены мономеры β -тубулина. Микротрубочки являются одним из самых нестабильных производных клетки. На их плюс-концах осуществляется быстрая спонтанная полимеризация - удлинение за счет присоединения димеров, а на минус- концах происходит медленная деполимеризация. При сниженной концентрации димеров тубулина преобладает разборка на минус конце. При оптимальной концентрации α и β тубулинов процессы сборки и разборки уравновешены. Микротрубочки растут достаточно быстро и достаточно быстро разбираются. Полимеризация микротрубочек - это энергозависимый процесс, где используется энергия гидролиза ГТФ. В живых клетках образование микротрубочек происходит постоянно. При формировании микротрубочек в интерфазных клетках важную роль играет перичентриольные структуры – сателлиты (рис 3.23).

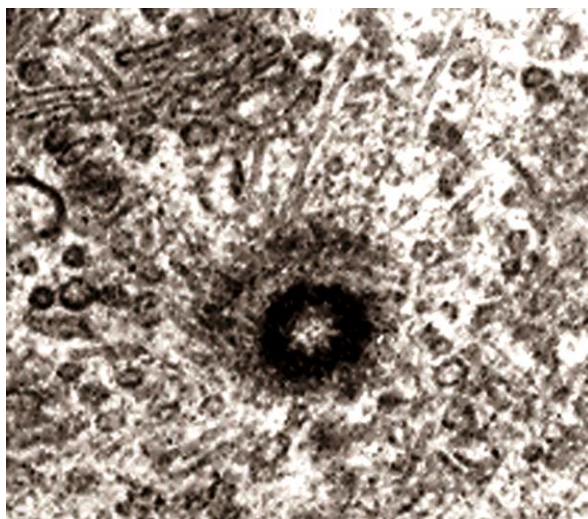


Рис. 3.23. Электронно-микроскопический рисунок поперечного среза centrosомы. Вокруг центриолей видны перичентриолярные структуры и начинающиеся из них микротрубочки.

Центриоли и окружающий их аморфный матрикс (центросфера) вместе называют клеточным центром или centrosомой. Доказано, что микротрубочки не образуют связи с центриолями, они связываются непосредственно с перичентриолярными структурами – с сателлитами. Именно в составе перичентриолярных структур выявлены молекулы третьего типа тубулина - γ (гамма) тубулин, который при помощи специальных белков формирует **комплекс - гамма тубулиновое кольцо**, состоящее из 10-13 γ тубулинов. Эти гамма тубулиновые комплексы иницируют полимеризацию тубулиновых димеров при формировании микротрубочек и остаются соединенными с минус концами микротрубочек.

Таким образом, centrosомы являются **центром организации** микротрубочек в цитоплазме и в базальном тельце аксономы ресничек. При этом формирование минус (-) конца микротрубочек начинается из centrosом, тогда как плюс (+) концы направляются радиально к плазмолемме (рис 3.24). Иммуногистохимическими методами доказано, что образование микротрубочек в интерфазной клетке всегда начинается с сателлита, а в процессе деления клетки - с центромеры хромосом.

Белки ассоциированные с микротрубочками делятся на две группы:

1. белки, поддерживающие стабильное состояние микротрубочек
2. белки, выполняющие функцию движения (моторная)

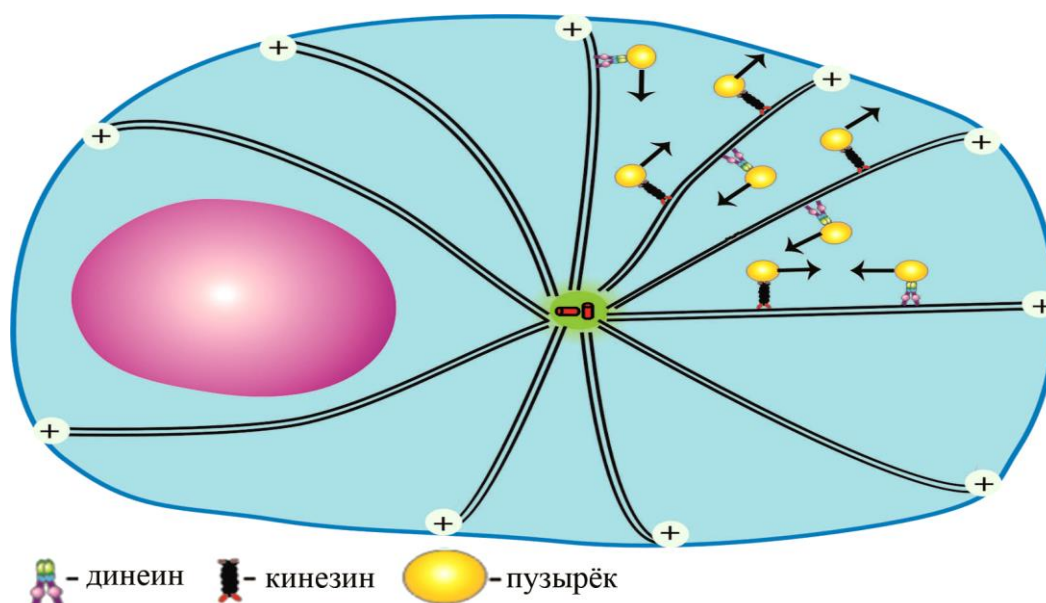


Рис.3. 24. Схема радиального расположения микротрубочек во время интерфазы.

Сборка и разборка микротрубочек в цитоплазме осуществляется чрезвычайно быстро. Среднее время пребывания микротрубочек в стабильном состоянии в интерфазе составляет в среднем около 10 мин. Для микротрубочек веретена деления это время измеряется секундами. Тем не менее, часть микротрубочек (10-20%) остаются относительно стабильными достаточно долго. Например, микротрубочки ресничек и жгутиков могут оставаться стабильными несколько дней, даже недель. Стабилизацию микротрубочек обеспечивают так называемые **МАР-белки** (Microtubule Accessory Proteins-белки ассоциированные с микротрубочками).

В настоящее время к MAP-белкам, стабилизирующим микротрубочки, относят свыше 100 разных белков в различных клетках. Из них наиболее изучены белки MAP-1, MAP-2, Тау и MAP-4. Среди названных белков MAP-4 выявлен во многих клеточных типах, а остальные три только в нервных клетках.

Как известно, в нервных клетках различают аксон, множество дендритов и тело клетки. Микротрубочки поддерживают форму клетки, обеспечивают внутриклеточный транспорт органелл, пузырьков в цитоплазме нервных клеток. В различных частях нервной клетки белки связанные с микротрубочками отличаются друг от друга, поэтому топографическое положение микротрубочек тоже отличаются. Так, минус концы микротрубочек в составе аксона обращены всегда к перикариону, плюс концы не направлены к периферии аксона. А в дендритах нервных клеток (+) и (-) концы микротрубочек по отношению к перикариону обращены в разные стороны, т.е. противоположно. Причиной вышеописанных различий в расположении микротрубочек в разных частях нервных клеток является характер ассоциированных с микротрубочками белков. Так в аксонах выявляются Тау-белки, отсутствуют MAP-2 белки; в дендритах, наоборот, присутствуют MAP-2, а Тау-белки отсутствуют.

В нервных клетках человека наиболее изученным является белок Тау-1. Этот белок состоит из 383 аминокислот, имеет молекулярную массу около 40 кД. В норме имеет линейную форму, располагаясь между протофиламентами микротрубочек, поперечно связывает тубулиновые молекулы соседних филаментов и обеспечивает их стабильность. Полагают, что одной из причин болезни Альцгеймера у пожилых является нарушение синтеза белка Тау-1 в нервных клетках. В результате этих нарушений образуются нейрофибриллярные клубочки, а увеличение их количества в нервных клетках заканчивается гибелью клеток.

Ко второй группе ассоциированных с микротрубочками белков относятся двигательные (моторные) белки - *динеин и кинезины*. О них информация дается в следующем разделе.

Каркасная роль микротрубочек заключается в поддержании формы и полярности клетки. При разборке микротрубочек клетка приобретает форму шара. В длинных аксонах нейронов, которые уходят от тела клетки на огромные расстояния (аксоны мотонейронов человека достигает около 1-метра в длину), микротрубочки одновременно выполняют и опорную, и транспортную функции. По ним к синаптическим окончаниям транспортируются пузырьки с нейромедиаторами.

Микротрубочки необходимы для ориентированного движения внутриклеточных мембранных органоидов (митохондрий, экзо- и эндоцитозных пузырьков, вакуолей, различного рода транспортных пузырьков). Сами по себе микротрубочки не способны к какому-либо виду движения. Они служат направляющими векторами, или образно говоря, рельсами, по которым перемещаются специальные двигательные (моторные) **белки-транслокаторы** (кинезины, динеины). Белки транслокаторы имеют сходную пространственную конструкцию, которая позволяет им закрепить груз (например мембранный пузырек) и доставить его в любую часть клетки.

В интерфазных клетках микротрубочки цитоплазмы, вместе с другими элементами цитоскелета, формируют внутриклеточную сеть, поддерживающую мембранные органеллы, например, цистерны эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи и т. д. В делящихся клетках микротрубочки формируют митотическое веретено и обеспечивают расхождение хромосом к полюсам.

Присутствие специальных веществ, относящихся к группе цитостатиков препятствует полимеризации микротрубочек. Цитостатики связываются с отдельными молекулами тубулинов, предотвращают их полимеризацию, ингибируют митоз. Это свойство цитостатиков используется в онкологической практике для прекращения пролиферации опухолевых клеток. К цитостатикам относятся алкалоид колхицин, винбластин и т. д.

ХЕМОМЕХАНИЧЕСКИЕ ПРЕОБРАЗОВАТЕЛИ

Одним из обязательных свойств всех клеток организма является способность преобразовывать химическую энергию в механическую энергию (в движение). Химическая энергия обычно в клетках аккумулирована в молекулах АТФ, при гидролизе которых и происходит высвобождение этой энергии с дальнейшим ее преобразованием в механическую.

Комплексы, образованные белками, участвующими в этом процессе, называются **хемомеханическими преобразователями**. В формировании этих комплексов участвуют не только элементы цитоскелета (актин и микротрубочки), но и необходимые белки – *транслокаторы*, имеющие АТФ - азную активность: динеин, кинезин, миозин.

Для создания определенного движения необходимо присутствие одного из комплексов тубулин-кинезина, тубулин-динеина и актин-миозина.

К хемомеханическим преобразователям, которые образуются при участии микротрубочек относятся комплексы динеин-тубулин, кинезин-тубулин. И динеин и кинезин имеют АТФ - азную активность. В 1965 году I.Gibbons получил в чистом виде белок динеин, а в 1985 году S.Brady, R.D. Vale и сотрудники получили в чистом виде белок кинезин.

С помощью видео-увеличительного микроскопа, который был изобретён в 1980 году, и в дальнейшем R.Allen-ом и S.Inoue, было доказано, что перемещение внутриклеточных структур живой неповрежденной клетки происходит с помощью именно вышеуказанных белков. Более того этими же методами обычно было выявлено, что даже в мазках, изготовленных из цитоплазматических элементов клеток, у которых удалена клеточная мембрана, органеллы и пузырьки сохраняют способность перемещаться в двух направлениях.

В середине 1980 годов участие динеина и кинезина во внутриклеточных перемещениях полностью было утверждено. В результате углубленного изучения белков динеина и кинезина стало очевидно, что общий план строения головки обоих белков и соответствующего участка белка миозина сходны. Отсюда вытекает, что есть белки - локомоторы (транслокаторы), имеющие АТФ-азную активность и общее происхождение.

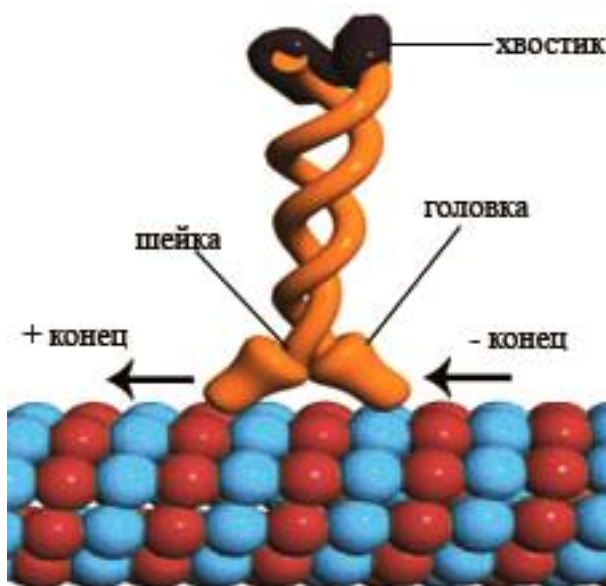


Рис. 3.25. Схематический рисунок отдельных частей кинезина и его взаимосвязь с тубулином.

Исследования, проведенные на аксонах нервных клеток показали, что перемещение пузырьков и органелл белками кинезином и динеином происходит с участием микротрубочек. С помощью кинезина пузырьки и органеллы перемещаются в (+) конец микротрубочки (рис.3.25), а с помощью динеина перемещаются в (-) конец микротрубочки (рис.3.26). Учитывая, что в аксонах (-) конец микротрубочек направлен к телу клетки, а (+) конец к концевым разветвлениям клетки, то становится ясным, что с помощью молекулы кинезина пузырьки и органеллы перемещаются от перикариона к периферии (антеградно), а с помощью молекулы динеина в противоположном направлении от периферии к перикариону (ретроградно).

В других клетках (-) конец микротрубочек располагается в области клеточного центра перинуклеарно, а (+) концы радиально расходящихся микротрубочек доходят до клеточной оболочки.

Вышеизложенное перемещение по микротрубочкам в двух направлениях демонстрирует наличие внутри клеток структур, подобных железнодорожным рельсам (рис.3.24).

Мономер белка **кинезина** состоит из тяжёлых и лёгких цепей (рис.3.25).

В тяжёлых цепях завершающихся аминокислотной группой различают глобулярную головку, шейку и хвостовую часть. Начальные и средние участки хвостов между собой переплетаются в виде спирали, а концевые участки остаются свободными и самостоятельно связываются с легкими цепями. Таким образом, формируется димер кинезина, который состоит из двух головок, спиралевидной части и свободного хвостового участка.

Механизм перемещения молекул кинезина по микротрубочкам происходит следующим образом:

1. одна молекула кинезина своим хвостом связывается с «грузом» (органеллы, пузырьки, хромосомы, и-РНК и др), а с другой стороны связывается только с одним протофиламентом в составе микротрубочки и самостоятельно перемещается со скоростью 0,5 мкм./сек. до конечного участка (+) конца микротрубочки.
2. молекулы кинезина перемещаются по микротрубочкам «шажками» длиной 8 нм -это общая длина α и β субъединиц одного белка тубулина.

У человека существуют 100 и более видов кинезина. Многие из них обеспечивают перемещение «груза» к (+) концу микротрубочки. Некоторые кинезины перемещают «груз» в противоположном направлении. Кроме того, известны специализированные кинезины, соответствующие различным видам «груза», что связано с различным строением их хвостовой части.

Среди белков транслокаторов самым крупным является белок **динеин** (2000 kD). В своем строении динеин имеет: 2 или 3 тяжёлые цепи и в разных количествах лёгкие и промежуточные цепи (рис.3.26).

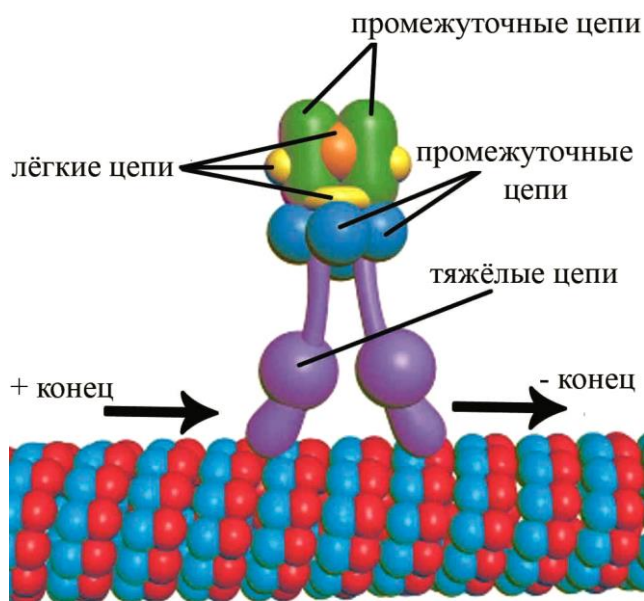


Рис 3.26. Схематический рисунок отдельных частей динеина и его взаимосвязь с тубулином

Молекулярный вес каждой тяжелой цепи 530 кД. Концевая «нитчатая» часть этой цепи соединяется с микротрубочкой, сферическая по форме часть – с АТФ. В проксимальной части динеин имеет соответствующие участки соединения с промежуточными и легкими цепями.

Молекулярный вес четырех легких цепей 53-59 кД, а двух промежуточных – 74кД.

Те участки промежуточных цепей, которые несут «груз» (органеллы, пузырьки и пр.), а также места соединения их с микротрубочками АТФ-азной активностью не обладают. Кроме того известно, что разные изомеры молекул динеина имеют определенные участки «мишени», по которым они отличаются. Уточнено, что в составе ресничек и жгутиков присутствует 7 видов аксонемального динеина, а в цитоплазме, органеллах, хромосомах и т.д. присутствуют специальные цитоплазматические динеины, перемещающие «груз». Причем в отличие от кинезинов, все формы динеинов перемещают «груз» по микротрубочкам в направлении к (-) концу.

Подробная информация о хемомеханических преобразователях **актин-миозиновых комплексов** дана в учебниках по общей гистологии. Следует отметить, что в настоящее время в составе различных комплексов актин-миозина изучены около 15 видов белка миозина, имеющих АТФ-азную активность, между тем белок актин бывает только одного вида. В зависимости от вида миозина направление и механизм внутриклеточных перемещений отличаются друг от друга.

Белок, участвующий в сокращении гладких миоцитов и поперечнополосатых мышечных волокон – это белок **миозин II**, имеющий АТФ-азную активность. Этот белок является димером больших размеров, весом 500 kD. Каждый его мономер организован из 1 тяжелой цепи и из 2 легких цепей. Тяжелая цепь имеет глобулярную головку и хвостовую часть, состоящую из α спирали, а 2 легкие цепи (легкая и регуляторная) объединяясь, располагаются вокруг головки мономера (рис. 3.27).

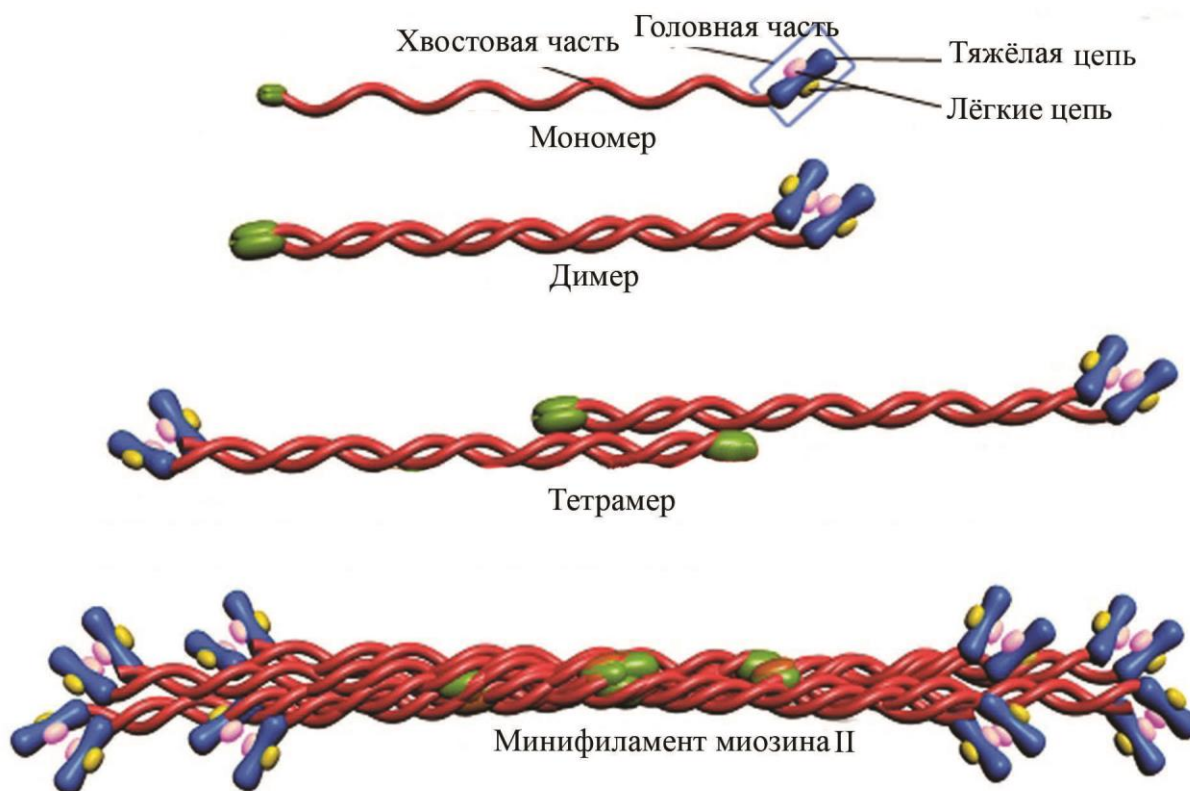


Рис. 3.27. Схематический рисунок молекулы немышечного миозина II в составе которого имеется мономер, димер, тетрамер и минифиламент миозина II.

Хвостовые части тяжёлых цепей, переплетаясь между собой в виде спирали, образуют димер миозина II. Таким образом, каждый димер миозина II имеет 2 тяжёлые и 4 лёгкие цепи.

Однако не все молекулы миозина имеют димерное строение. У некоторых миозинов (см. далее) хвостовые части тяжёлых цепей не переплетаются между собой и молекулы таких миозинов остаются в виде мономеров. Принимая во внимание вышесказанное, белок миозин димерного строения имеет две головки, а мономерного - одну.

Среди структур образованных из молекул миозина особое место занимают толстые филаменты, длина которых составляет 15-16 нм. В организации миозиновых филаментов в составе актин-миозинового комплекса участвуют только молекулы миозина димерного строения.

Следует отметить, что актин-миозиновые комплексы как в немышечных клетках, так и в гладкомышечных миоцитах и в поперечнополосатых мышечных волокнах имеют в целом общий принцип строения, однако есть и отличия. Поэтому, учитывая более сложные особенности строения толстых филаментов миозина II в поперечнополосатых мышечных волокнах, остановимся в качестве примера на актин-миозиновых связях, в составе немышечных клеток (немышечный миозин, минимиозин).

Минифиламент миозина II немышечных клеток состоит всего из 8 молекул миозина, имеющих две головки (димеры). В процессе организации минифиламентов концевые участки хвостовых частей двух молекул миозина II, располагаясь рядом на расстоянии 14 нм друг от друга, объединяясь, образуют тетрамеры.

Середина этого тетрамера состоит только из хвостов димеров, а на обоих концах располагаются головки миозиновых димеров. В последующих этапах образовавшиеся тетрамеры близко расположены (14-16 нм. в области головок) к первому тетрамеру, связываются и формируют минифиламент миозина II, у которого *центральная часть*

остаётся *гладкой* (за счёт хвостов), а на обоих концах располагаются головки молекул миозина. Образование толстых филаментов (мышечный миозин) происходит аналогично, но в отличие от вышеизложенного, количество тетрамеров, образующих центральный участок толстых филаментов, бывает больше. Во вторых, в результате соединений соответствующих белков в составе головок димеров миозина II длина толстых филаментов может увеличиваться.

Минифиламенты миозина II располагаются параллельно актиновым, положительный (+) и отрицательный (-) концы которых расположены противоположно друг к другу, т.е. антипараллельно. Так формируется **актин-миозиновый комплекс** (рис 3.28).

Положительный (+) конец актиновых нитей комплекса с помощью специальных белков поддерживает их в неподвижном (и без движения) состоянии. Активируясь в результате гидролиза АТФ, головки миозина II вступают в точечные связи со всеми окружающими их актиновыми филаментами и тянут их к центральному (оголенному) участку миозина II.

В результате положительные (+) концы противоположных актиновых нитей сближаются, создавая условие для сокращения.

Исследования Н.Е.Насли с сотрудниками (1957 г) методами электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа позволили им выдвинуть **теорию скольжения филаментов**, которая в настоящее время общепринята.

В формировании актин-миозиновых комплексов могут принимать участие как димеры миозина (с двумя головками), так и мономеры (с одной головкой). Первые из названных молекул миозина именуются *стандартными*, а вторые - *не стандартными*.

Нестандартной молекулой является **миозин I**.

Мономер молекулы миозина I состоит из головки и хвостовой части. Головка имеет АТФ-азную активность и по строению сходна с головкой миозина II. Однако хвостовая часть короткая и не образует димер (рис. 3.29).

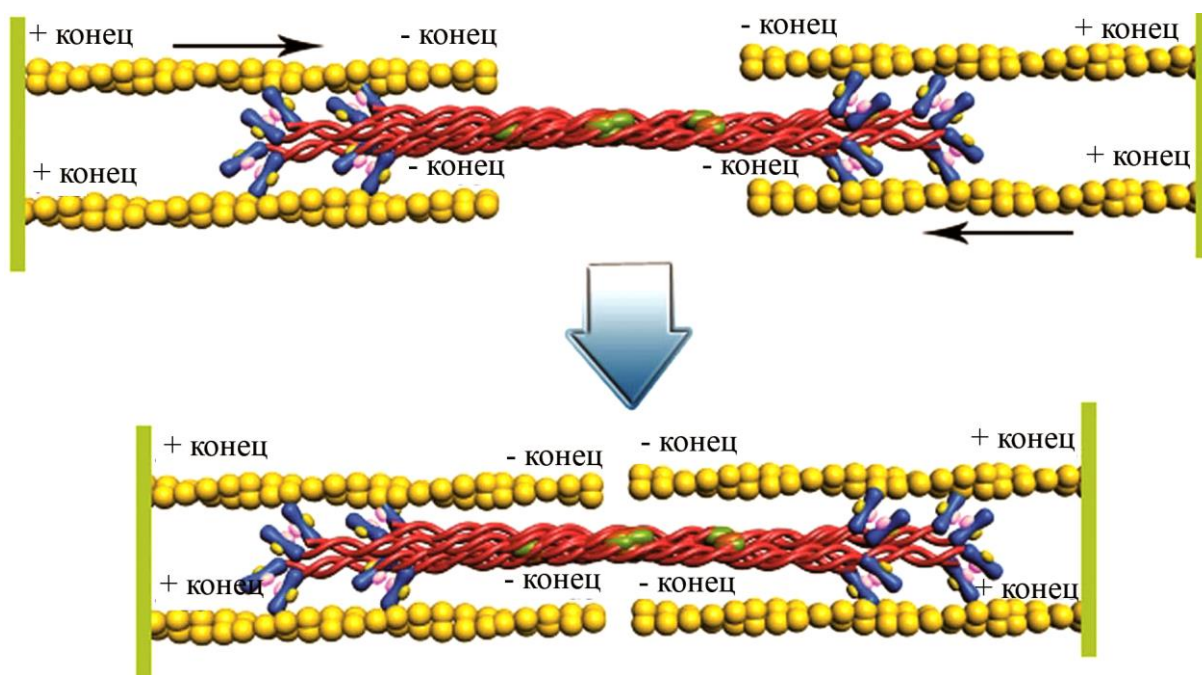


Рис.3.28. Схематический рисунок комплекса актин-миозина в расслабленном (сверху) и сокращенном (снизу) состояниях.

Молекулы миозина I участвуют в перемещении пузырьков и органелл в цитоплазме. Для этого их короткая хвостовая часть связывается с пузырьком или органеллой в составе цитоплазмы, а головка связывается только с одним актиновым филаментом (рис. 3.29).

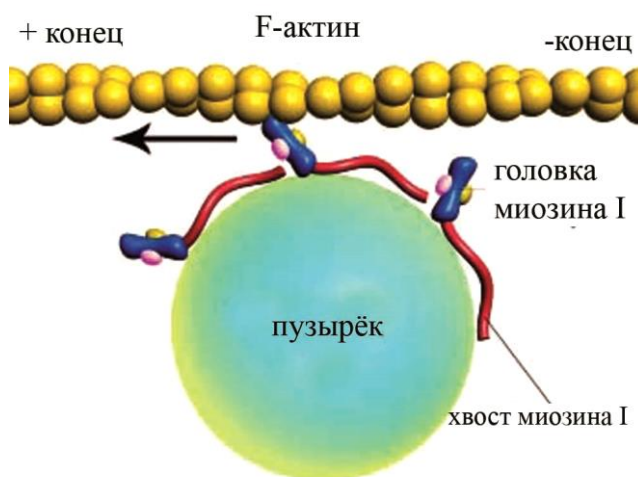


Рис.3.29. Схематический рисунок комплекса актин-миозина с участием молекулы миозин I. При гидролизе АТФ на головке, молекулы миозина I активизируясь, перемещаются к (+) концу актиновых филаментов и одновременно перемещают пузырьки и органеллы, связанные с их хвостом.

РЕСНИЧКИ И ЖГУТИКИ

Реснички и жгутики, как и микроворсинки, которые являются пальцевидными выростами плазмолеммы, обнаруживаются на свободных поверхностях клетки.

В отличие от микроворсинок основу ресничек и жгутиков образуют не актиновые филаменты, а аксонема, состоящая из микротрубочек и связанных с ними белков.

Хотя общий план строения ресничек и жгутиков почти одинаковый, имеются однако и следующие отличительные признаки:

-длина ресничек короче жгутиков, так, длина ресничек колеблется от 2- до 10 мкм, а длина жгутиков сперматозоида человека достигает примерно 50-70 мкм.

-количество ресничек одной клетки гораздо больше, чем количество жгутиков. Жгутиков может быть 1-2, а ресничек сотни.

-жгутики встречаются у человека только у сперматозоидов, а реснички во многих различных местах организма: в дыхательных путях, в некоторых отделах половых путей, в эпителиальных клетках выстилающих полости мозга, в органах слуха и равновесия.

При помощи ресничек обеспечивается продвижение слизи, жидкости вдоль поверхности этих клеток. Жгутики обеспечивают движение самой клетки в жидкой среде.

В организме человека многочисленные реснички содержат клетки реснитчатого эпителия дыхательных и половых путей (рис 3.30).

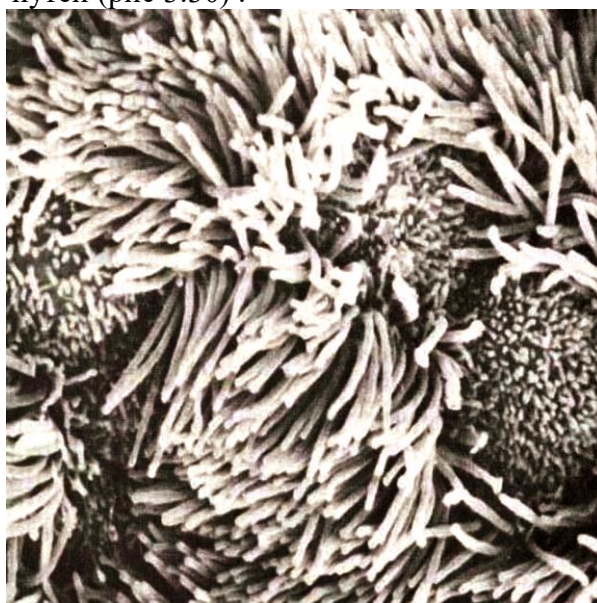


Рис.3.30. Сканирующий электронно-микроскопический рисунок реснитчатых клеток (маточные трубы мыши). Наряду с реснитчатыми клетками видны клетки с микроворсинками.

Координированные колебательные движения ресничек образуют на свободной поверхности однонаправленные волны, которые обеспечивают, например, продвижение яйцеклетки по яйцеводу или постоянное продвижение по дыхательным путям слизи с осевшими на ней частицами пыли и остатками слущивающихся эпителиальных клеток.

Общий принцип строения, функционирования и образования ресничек и жгутиков мы рассмотрим на примере реснички.

Реснички, выросты клетки покрытые плазматической мембраной длиной 5-10 мкм, шириной 0,2 мкм. У каждой реснички имеется основание, стержень и апикальная часть (рис. 3.31).

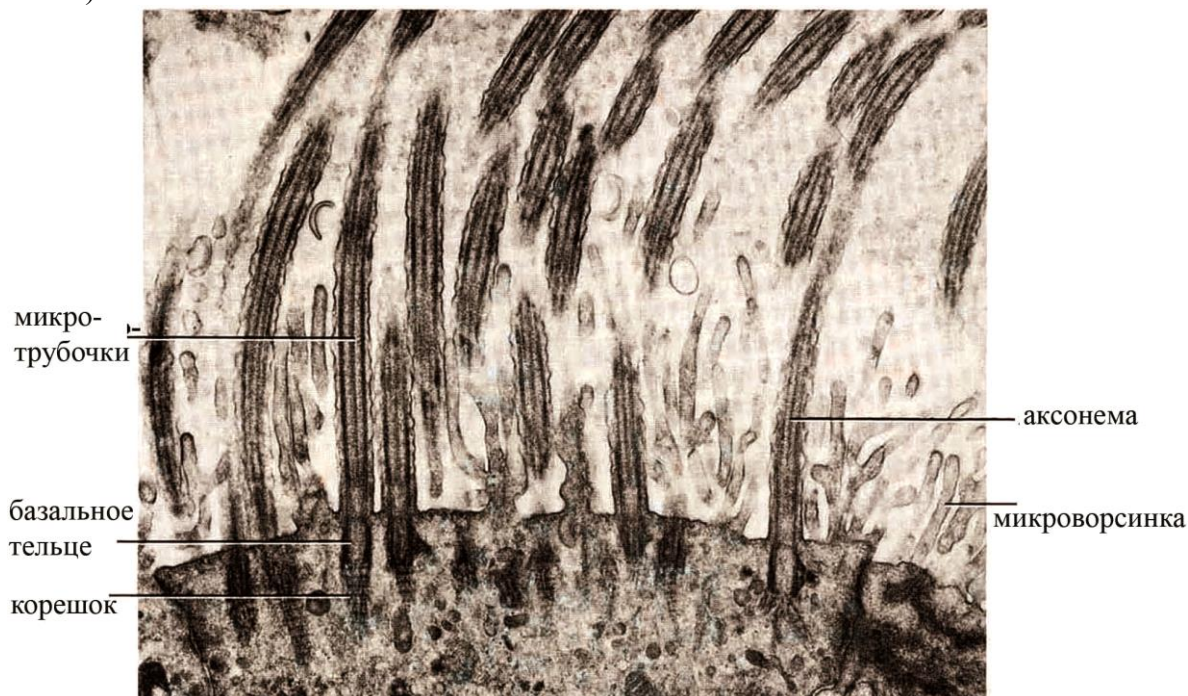


Рис.3.31. Электронно-микроскопический рисунок реснитчатых клеток стенки бронхов. Наряду с продольными и с косыми срезами ресничек видны также микроворсинки.

В основании каждой реснички расположено **базальное тельце** или **кинетосом**. Длина базального тельца 1 мкм, по строению подобно центриоли состоит из 9 триплетов микротрубочек (рис 3.32 В). Базальное тельце служит матрицей для формирования аксонемы - стержня реснички, и каждый из 9 триплетов формирует 9 дуплетов микротрубочек аксонемы (рис 3.32 А). Базальное тельце погружено в цитоплазму и ассоциировано с плазматической мембраной при помощи специальных белков. В местах расположения базальных телец имеется уплотнение элементов кортикальной цитоплазмы. У оснований базальных телец погруженных в цитоплазму имеется один или несколько корешков, состоящих из филаментов поперечнополосатой структуры. Соседние базальные тельца связываются друг с другом базальными ножками пластинчатой формы. Корешки и базальные ножки играют роль якоря для непосредственно связанных с ними ресничек, создавая для них опору необходимую при их движении. Базальные тельца соседних ресничек связываются друг с другом при помощи так называемых базальных ножек, которые состоят из специальных белков.

Стержень ресничек, покрытый клеточной оболочкой, состоит из аксонемы (ахон-ось, пета-нить). **Аксонема** - это система микротрубочек и связанных с ними белков. При этом 9 пар (дуплетов) микротрубочек расположены по периферии, а одна пара - центрально. Центральная пара микротрубочек, несмотря на свое свободное расположение, со всех сторон

окружена так называемой **центральной оболочкой** из тонких фибриллярных белков. Отходящие от этой оболочки белки в форме **радиальных стержней** связываются с периферическими дуплетами.

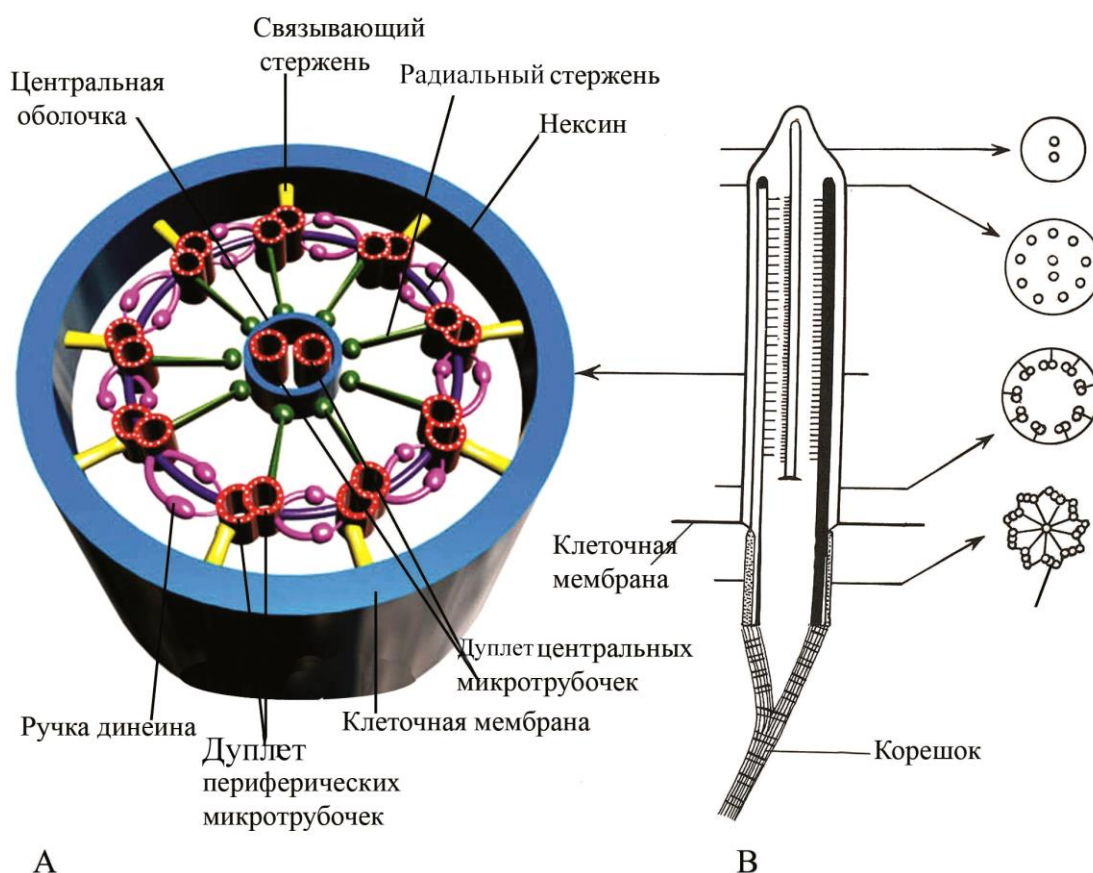


Рис. 3.32. Схематический рисунок структур участвующих в формировании ресничек.

А - строение аксонемы ресничек.

В - строение ресничек в продольном срезе и топографическое положение микротрубочек в поперечных срезах различных частей реснички.

Каждая центральная пара микротрубочек состоит из 13-ти протофиламентов.

В каждом периферическом дуплете различают 1 полную (А) микротрубочку, т.е. состоящую из 13 – ти протофиламентов и связанную с ней полную (В) микротрубочку, состоящую из 10-11-ти протофиламентов (рис. 3.32 А).

Белок **тектин** на стенке микротрубочки А обеспечивает ее соединение с микротрубочкой В.

Периферические дуплеты микротрубочек соединяются друг с другом при помощи белка **нексина**, а также при помощи белков, состав которых не уточнен, с плазматической мембраной.

Наряду с вышеуказанным к микротрубочке А со стороны обращенной к соседнему дуплету на расстоянии каждых 24 нм в определенном состоянии (наружном и внутреннем) присоединены 2 молекулы белка **динеина**. А точнее основание фибриллярной части динеина связаны с микротрубочками А, в то время как их головки обращены в сторону соседней микротрубочки В. Эти протянутые тяжи из белка динеина называются **динеиновыми ручками** (рис. 3.32 А).

Формулу аксонемы записывают следующим образом $(9 \times 2) + 2$. Плюс концы микротрубочек аксонемы расположены на вершине реснички, минус концы обращены к базальному тельцу. Ближе к апикальной части реснички заканчиваются сначала А, затем

В микротрубочки, поэтому в области верхушки реснички располагаются только 2 центральные микротрубочки.

Глобулярные головки динеина обладают АТФ-азной активностью. При гидролизе АТФ высвобождается энергия, благодаря которой происходит скольжение головок динеина по поверхности В микротрубочки соседней пары по направлению к ее (-) концу, т.е. в направлении базального тельца. При этом фибриллярная часть динеина на А микротрубочке сгибает ее в сторону соседнего дуплета, точнее происходит скольжение соседних дуплетов относительно друг к другу. А поскольку дуплеты соединены между собой белком нексином происходит сгибание реснички в целом.

Описанные волнообразные движения носят циклический характер и называются *биением реснички*. В этом цикле различают *рабочую фазу* - изгиб реснички вперед и *фазу возврата* - в исходное состояние (рис. 3.33).

Биение ресничек, присутствующих в эпителиальных клетках воздухоносных и половых путей, перемещает слизь с инородными частицами и остатками отмерших клеток и создает ток жидкости около клеточной поверхности. Так, к примеру, доказано, что в носовой полости циклическое волнообразное движение ресничек происходит со скоростью 6 и более мм в одну минуту, результатом чего и является очищение поступившего воздуха.

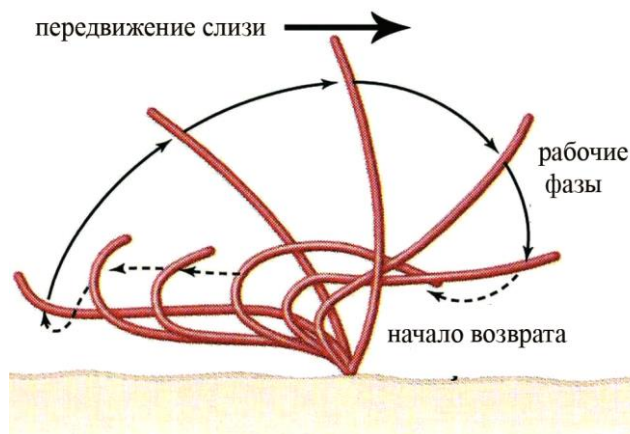


Рис.3.33. Движение реснички. На рисунке показано биение ресничек, которое имеет две фазы: рабочая фаза и фаза возврата. Благодаря такому движению обеспечивается продвижение слизи.

Известен ряд наследственных патологий, обусловленных неподвижностью ресничек и жгутиков, что связано с мутацией синтеза белков, обеспечивающих движение ресничек и жгутиков. Одна из таких форм мутаций, связанная с нарушением работы динеиновых ручек, приводит к синдрому **неподвижных ресничек**. Например, причина **синдрома Картагенера** (синдром неподвижных ресничек), который сопровождается хроническими заболеваниями дыхательной системы (хронический бронхит, ринит), является отсутствие динеиновых ручек в ресничках респираторного эпителия. Мужчины больные синдромом Картагенера страдают бесплодием, обусловленным неподвижностью сперматозоидов, что так же является следствием мутации динеиновых генов. Более половины больных с подобным синдромом имеют *sinus viscerum inversus* транспозицию внутренних органов (сердце справа, печень слева), что в совокупности описывает синдром Картагенера.

Также следует отметить, что несмотря на то, что жгутики и реснички имеют общий план строения, механизм движения жгутиков до настоящего времени окончательно не выяснен.

ДВИЖЕНИЕ КЛЕТКИ

Кортикальная цитоплазма и элементы цитоскелета участвуют не только в движении отдельных частей клеток, но также обеспечивают перемещение самой клетки. Процессы

происходящие при этом до конца не выяснены, но существуют сведения о механизмах движения фибробластов и подобных им клеток, нейтрофилов, лимфоцитов.

Для обеспечения движения этих клеток с участием цитоскелета происходят следующие последовательные процессы.

- во-первых, у таких клеток формируются передний конец по направлению движения и задний противоположный конец.
- клетки, способные к перемещению, образуют адгезивные контакты, выполняющие различные функции с окружающими элементами.
- на переднем полюсе клетки формируются выросты филоподии, ламеллоподии.

Скорость продвижения нейтрофилов и Т-лимфоцитов составляет 11 мкм/мин, а фибробласты и фибробластоподобные клетки перемещаются со скоростью 10 мкм/час. Поэтому, наверняка, существуют какие-то различия в механизмах их перемещения.

Фибробласты во время перемещения образуют адгезивные контакты с окружающими элементами межклеточного вещества, при этом множество точек адгезии формируются не только на передних полюсах, а также в области тела и заднего полюса клетки (рис 3.34). После того, как клетка обеспечивает стабильность своего положения, на передних концах в результате полимеризации актиновых филаментов и формирования параллельных поддерживающих актиновых пучков образуются филоподии. Образовавшиеся филоподии также восстанавливают адгезивные контакты с окружающими элементами. Далее, сократительные актиновые пучки, которые прикреплены к точкам адгезии со стороны цитоплазмы (волокна натяжения) с участием филаментов миозина II обеспечивают перемещение ядросодержащей части – тела клетки. Таким образом, клетка перемещается в размере длины филоподий.

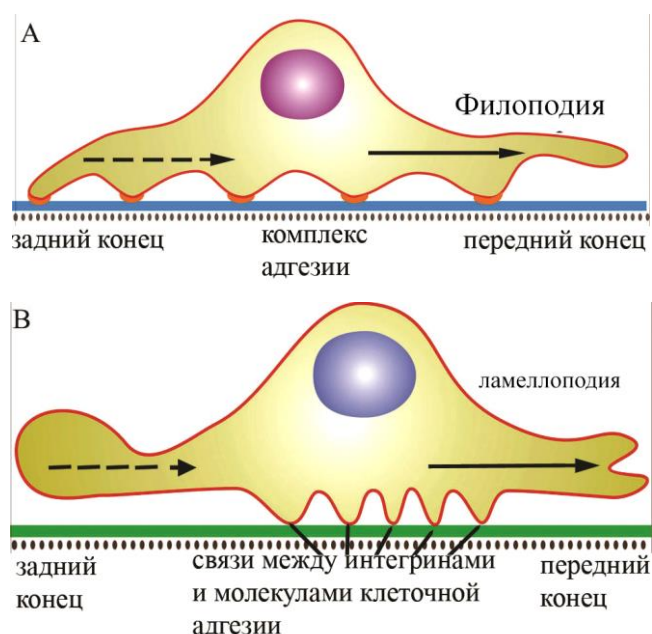


Рис. 3.34. А-перемещение фибробласта, В- перемещение Т-лимфоцитов. Схематический рисунок изменений формы клеток и их контактов во время их движения.

Более активное перемещение происходит у лимфоцитов, нейтрофилов. Существуют некоторые сведения о механизмах перемещения Т-лимфоцитов (рис 34). Как известно, эти клетки, покидая тимус, перемещаются в специфические зоны периферических органов иммунной системы или к очагам инфекции во время воспалительных реакций. Выяснилось, что для более ускоренного движения у этих клеток происходит перемещение белков плазмолеммы, которые выполняют различные функции. Так на переднем полюсе клетки в области ламеллоподий концентрируются рецепторные белки, воспринимающие химические сигналы и связанные с ними белки. В средней части клетки на плазмолемме располагаются

интегриновые молекулы – функциональный антиген лимфоцитов LFA-1, который взаимодействует с молекулами межклеточной адгезии мембраны эндотелиальных клеток сосудов. На задней части лимфоцитов в плазмолемме накапливаются множество различных белков, обеспечивающих межклеточные адгезивные контакты (CD-43, CD-44, β -1 интегрин и связанные с ними белки). Таким образом, активированные Т-лимфоциты образуют адгезию с эндотелиальными клетками лишь с центральной частью плазмолеммы тела клетки.

После воздействия хемоаттрактантов (химические сигналы) у Т –лимфоцитов, имеющих сферическую форму, в течении 60 сек с участием элементов кортикальной цитоплазмы вышеперечисленные белки цитоплазмы направленно перемещаются и в течении 60-160 сек полностью завершается формирование передних, задних полюсов и ламеллоподий. Ровно через 3 мин (160 сек) активированный Т-лимфоцит начинает движение. Перемещение Т-лимфоцитов начинается после взаимодействия LFA-1-интегрин лимфоцита с молекулами межклеточной адгезии эндотелиоцитов. Это взаимодействие служит не только для адгезии этих клеток, а в основном как сигнал для включения механизмов перемещения Т-лимфоцитов. После взаимодействия этих молекул, сигнал передается при помощи белка талина внутрь к сократительным актиновым филаментам и в результате взаимодействия их с миозином структуры, расположенные в центральной части клетки перемещаются в сторону ламеллоподий, то есть, к переднему полюсу. Далее задний конец клетки приближается к телу.

Надо отметить, что адгезивные контакты, образовавшиеся при перемещении лимфоцитов, очень слабые и элементы цитоскелета способны мгновенно перестраиваться. Полагают, что именно это обеспечивает их ускоренное движение.

Литература:

- Barkalow KL, Italiano JE, Chou DE et al. Alpha-adducin dissociates from F-actin and spectrin during platelet activation. *The Journal of Cell Biology*, 2003; 161(3):557-570.
- Bennett V, Baines AJ. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiological Reviews*, 2001; 81(3): 1353-1392.
- Li X, Bennett V. Identification of the spectrin subunit and domains required for formation of spectrin/adducin/actin complexes. *J. Biol. Chem.*, 1996;271(26):15695-702.
- Mohler PJ, Gramolini AO, Bennett V. Ankyrins. *Journal of Cell Science*, 2002; 115:1565-1566.
- Mohler PJ, Splawski I, Napolitano C et al. A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. *PNAS*, 2004; 101(24):9137-9142.
- Thorne RF, Legg JW, Isacke CM. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *Journal of Cell Science*, 2004; 117:373-380.
- Tsukita S, Yonemura S. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274(49):34507-34510.
- Sitoskelet
- Belmont LD, Mitchison TJ. Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell*, 1996;84:623-631.
- Desai A, Mitchison TJ. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1997; 13:83-117.
- Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science*, 1998; 279(5350):514-519.
- Harris ES, Li F, Higgs HN. The mouse formin, FRL, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279(19):20076-20087.
- Kinoshita K, Arnal I, Desai A, Drechsel, DN, Hyman AA. Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components. *Science*, 2001; 294:1340-1343.
- Kodama A, Lechler T, Fuchs E. Coordinating cytoskeletal tracks to polarize cellular movements. *J. Cell Biol.*, 2004; 167(2):203-207.
- Leung CL, Liem RKH, Parry DA, Green KJ. The plakin family. *Journal of Cell Science*, 2001; 114:3409-3410.
- Pope BJ, Zierler-Gould KM, Kuhne R, Weeds AG, Ball LJ. Solution structure of human cofilin. actin binding, pH sensitivity, and relationship to actin -depolymerizing factor. *J. Biol. Chem.*, 2004;

279(6):4840-4848.

Slep KC, Rogers SL, Elliott SL, et al. Structural determinants for EB1-mediated recruitment of APC and spectraplakins to the microtubule plus end. *J. Cell Biol.*, 2005; 168(4):587-598.

Steinert PM, Marekov LN et al. Keratin intermediate structure crosslinking studies yield quantitative information on molecular dimensions and mechanism of assembly. *JMB* 1993; 230(2):436-452.

Stuurman N, Heins S, Aebi U. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J. Struct. Biol.*, 1998; 122:42-66.

Kirpiklər, qamçılar, xemomexaniki çeviricilər və hüceyrənin hərəkəti

Benashski SE, King SM. Investigation of protein-protein interactions within flagellar dynein using homobifunctional and zero-length crosslinking reagents.

Methods, 2000; 22:365-371.

Driksen ER. In Hafes ESE, ed. *Scanning Electron Microscopic Atlas of Mammalian Reproduction*. Tokyo. Igaku Shoin, 1975.

Gibbons F, Chauwin JF, Desposito M, Jose JV. A dynamical model of kinesin-microtubule motility assays. *Biophys. J.*, 2001; 80(6):2515-26.

Goodenough UW, Heuser JE. Substructure of inner dynein arms, radial spokes, and the central pair/projection complex of cilia and flagella. *J. Cell Biol.*, 1985; 100:2008-2018.

Gomez-Mouton C, Abad JL, Mira et al. Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *PNAS*, 2001, vol. 98, no. 17, p. 9642-9647.

Hendrickson TW, Perrone CA, Griffin P et al. IC138 is a WD-repeat dynein intermediate chain required for light chain assembly and regulation of flagellar bending. *Mol. Biol. Cell*, 2004; 15(12):5431-42.

Hiratsuka Y, Tada T, Oiwa K, Kanayama T, Uyeda TQ. Controlling the direction of kinesin-driven microtubule movements along microlithographic tracks. *Biophys. J.*, 2001; 81(3):1555-61.

Hirokawa N, Noda Y, Okada Y. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998; 10(1):60-73.

Huxley HE. The double array of filaments in cross-striated muscle. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1957; 3:631-648.

Huxley HE. Fifty years of muscle and the sliding filament hypothesis. *Eur. J. Biochem.*, 2004; 271:1403-1415.

Kasprzak AA, Hajdo L. Directionality of kinesin motors. *Acta Biochim. Pol.*, 2002; 49(4):813-21.

King, S. AAA domains and organization of the dynein motor unit. *J. Cell Sci.*, 2000; 113:2521-2526.

Lee JH, Katakai T, Hara T. et al. Roles of p-ERM and Rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation. *JCB*, 2005, Volume 167, Number 2, 327-337.

Mandelkow E, Mandelkow EM. Kinesin motors and disease. *Trends Cell Biol*, 2002; 12(12):585-91.

Mizuno N, Toba S, Edamatsu M et al. Dynein and kinesin share an overlapping microtubule-binding site. *EMBO J.*, 2004; 23(13):2459-67.

Sakato M, King SM. Design and regulation of the AAA+ microtubule motor dynein. *J. Struct. Biol.*, 2004; 146:58-71.

Sturgess J. Morphological characteristics of the bronchial mucosa in cystic fibrosis. In: Quinton P., Martinez R, eds. *Fluid and electrolyte transport in exocrine glands in cystic fibrosis*. San Francisco, San Francisco Press, 1982.

Smith A., Carrasco YR., Stanley P. et al. A talin dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *JCB*, 2005, v.170, no.1, p.141-151

Vale RD. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, 2003; 112:467-480.

Yun M, Zhang X, Park CG, Park HW, Endow SA. A structural pathway for activation of the kinesin motor ATPase. *EMBO J.*, 2001; 20(11):2611-8.

Gibbons IR. Dynein family of motor proteins: present status and future questions. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1995; 32:136-144.

Sleigh M A. The nature and action of respiratory tract cilia. In: Brain J D, Proctor D F, Reid L M (eds) *Respiratory defense mechanisms. Part 1*. Dekker: New York: 1977, pp.247-288.

ОРГАНЕЛЛЫ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ ВКЛЮЧЕНИЯ

Общие сведения об органеллах и включениях входящих в состав цитоплазмы, были даны в начальных разделах учебника. В этот раздел включена информация об их взаимосвязях, особенностях строения и функциях каждой органеллы и включений в отдельности.

Клеточный центр – centrosома

Центросома или клеточный центр состоит из двух *центриолей*, расположенных под прямым углом относительно друг к другу и окружающего их со всех сторон *перичентриольного матрикса (центросферы)*.

Впервые о существовании centrosом заговорили В.Флемминг (1875) и Ван Бенеден (1876). Однако более углубленное светооптическое изучение их было проведено Теодором Бовери (1888г.), который и предложил термин «центриоли». Материалом его исследований были эмбрионы паразитических червей *Parascaris equorum*, относящиеся к типу круглых червей (Nematoda). В срезах, окрашенных железным гематоксилином по Гейденгайну, Т.Бовери обнаружил и сфотографировал центриоли. В делящихся клетках на стадии метафазы центриоли были описаны им как маленькие тельца, окрашивающиеся гематоксилином в темный цвет, от которых отходит цитоплазматическая радиальная лучистость (cytoplasmic radiating aster). Также он высказал мнение, что центриоли являются специализированными органеллами для процесса деления клетки. Среди данных приведенных Т.Бовери касательно centrosом, особого внимания заслуживает то, что он связал с centrosомами, а именно с поступлением лишних центриолей в зиготу, причину аномального деления зиготы (это случаи, когда образуются одно или многополюсные клетки) при диспермическом оплодотворении (в данном оплодотворении в яйцеклетку поступает не один, а два сперматозоида и вместе с ними лишние центриоли). Приведенные выше высказывания Т. Бовери касательно центриолей в настоящее время являются полностью принятыми.

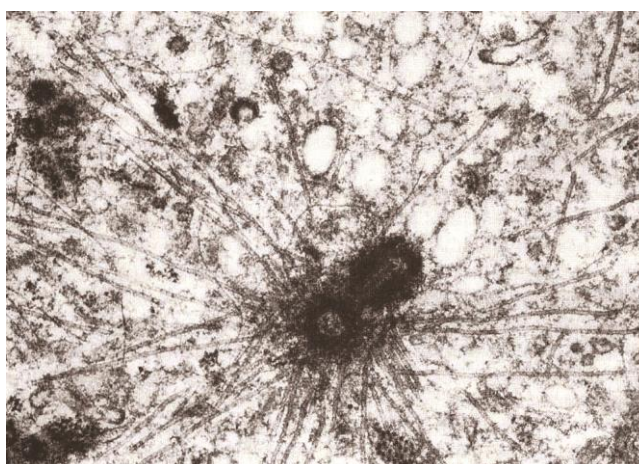


Рис. 4.1. Электронно-микроскопический снимок центриоли и окружающих ее образований. Видны квадратобразная (справа) и округлая (слева) центриоли возле темно окрашенного перичентриольного матрикса в центре электронограммы.

Современные сведения относительно строения centrosом были получены в результате электронно-микроскопических исследований. На ультратонком срезе, проходящем через центр centrosомы, на фоне темно окрашенного матрикса (рис.4.1) можно наблюдать две сравнительно светлые структуры, причем срез одной из них является продольным (справа), а второй – поперечным (слева). Это с одной стороны подтверждает наличие в составе centrosом не одной, а двух центриолей (поэтому их так же называют диплосомами), а с другой – то, что они располагаются перпендикулярно друг к другу.

Центриоли являются цилиндрическими образованиями диаметром 100-200 нм. и длиной примерно 400 нм. Центриоль, расположенную относительно близко к ядру называют *материнской*, а другую – *дочерней*. Еще одним отличием материнской центриоли является наличие на ее дистальном конце *субдистальных отростков* (рис. 4.4-1). Наличие в составе данных отростков специальных белков (сенексин, CEP-110, ϵ - тубулина и т.д.) значительно облегчает обнаружение материнской центриоли иммунофлюорисцентным методом. У большинства клеток при формировании ресничек центриоли играют роль базальных телец. В этом случае субдистальные отростки материнской центриоли обеспечивают более тесное объединение их с клеточной оболочкой. Дочерние же центриоли расположены перпендикулярно к проксимальному концу материнских.

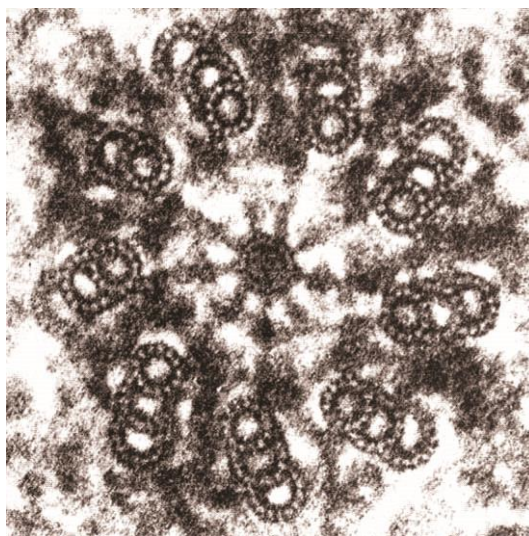


Рис. 4.2. Электронно-микроскопический снимок поперечного среза центриоли. Отчетливо видна взаимосвязь 9-ти триплетов микротрубочек друг с другом, а также количество и топографическое расположение протофиламентов тубулина, участвующего в образовании микротрубочек. Дополнительная информация в тексте (Perry M.M., Gilbert A.B. – J. Cell Sci.,1979, v.39, p.257).

Каждая из обеих центриолей в поперечном разрезе напоминает “зубчатое колесо” (рис. 4.2) и состоит из 9-ти тройных микротрубочек (триплетов), расположенных под углом 30° относительно друг к другу. Микротрубочки обозначают буквами А, В и С. Микротрубочки А расположены в центре цилиндрической centrosомы, а микротрубочки С – обращены в сторону матрикса. В то время как микротрубочки А состоят полностью из 13-ти протофиламентов тубулина, в микротрубочках В и С находится по 10-11 протофиламентов (рис. 4.2). Микротрубочки А и С соседних триплетов соединены друг с другом белками, состав которых точно не выяснен (рис. 4.3).

Микротрубочки центриолей так же, как и цитоплазматические микротрубочки, состоят в основном из гетеродимеров α - и β - тубулина. Однако в последнее время, в результате проведенных исследований, в составе центриолей обнаружено наличие γ , β , ϵ изомеров тубулина.

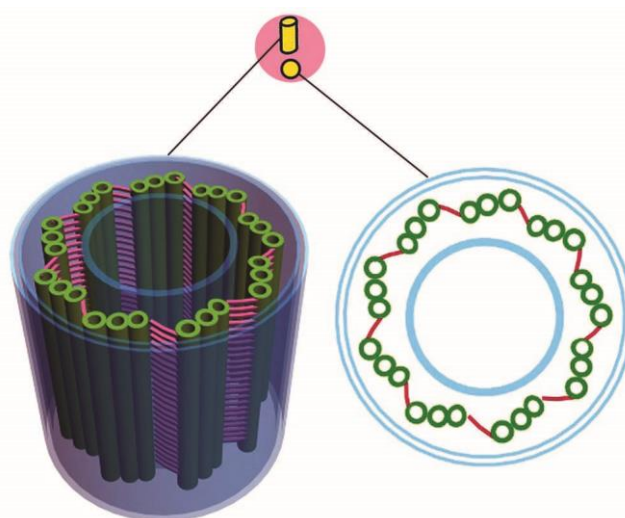


Рис. 4.3. Схема элементов, формирующих центриолы и матрикс вокруг центриолей.

γ - тубулин. Молекулы γ - тубулина входят в состав комплекса (γ -TuHC) γ -тубулинового кольца и, так же как и в случае базальных телец и веретена деления, обеспечивают сборку (nucleation) микротрубочек, составляющих центриолы.

β - тубулин находится в составе центриолей и базальных телец. Во время мутационных изменений данного белка, микротрубочки С не развиваются и триплеты микротрубочек в составе центриолей превращаются в дуплеты.

ϵ - тубулин является одним из белков, входящих в состав субдистальных отростков материнских центриолей. Во время дупликации центросом, данный белок поступает в состав новых центросом лишь после S фазы. Уменьшение количества белка ϵ - тубулина останавливает дупликацию центриолей в S фазе и формирует не зависящую от центриолей лучистость микротрубочек в стадии митоза. Т.о. ϵ - тубулин принимает участие в дупликации центриолей и организации перичентриолярного матрикса.

В состав центриолей, наряду с изомерами тубулина, входят и другие белки. Среди них всесторонне изученным является **центрин**. Это белок маленьких размеров (молек. масса 20 кД), имеющий кислые свойства и относящийся к Ca^{2+} зависимым белкам.

У человека выявлено 3 вида белков центрина. Белок центрин-1 синтезируется только в мужских половых клетках. Центрин-2 является специализированным белком центриолей и действует во всех фазах клеточного цикла. Белок центрин-3 встречается только в составе перичентриолярного матрикса.

После присоединения к центрину-2 зеленого флюорисцентного белка медузы (green fluorescent protein – GFP), при помощи флюоресцентного микроскопа было установлено, что он располагается в центральном канале центриолей. При остановке синтеза белка центрин-2, останавливается дупликация центриолей и на начальных стадиях митоза, в полях веретена

деления находится лишь одна центриоль. В результате последующих делений образуются клетки не имеющие центриоли, которые впоследствии погибают.

В составе субдистальных отростков материнской центриоли, наряду с указанными выше белками, обнаружен также белок **центриолин**. Подробная информация об этом будет дана в дальнейших разделах при описании участия центриолей в клеточном цикле.

Материнская и дочерняя центриоли могут называться также *зрелой* и *незрелой* соответственно. Зрелая центриоль формируется как минимум после двух последних делений клетки. Центриоль, формирующаяся лишь во время последнего деления называется не зрелой. Материнская (зрелая) и дочерняя (незрелая) центриоли отличаются друг от друга не только по строению, но и по химическому составу. Было выяснено, что лишь в составе зрелой центриоли имеется белок под названием **сенексин** (senex – старик) (молек. масса 96 кД). Данный белок поступает в состав незрелой центриоли в период перехода G₂ фазы митоза в профазу. Тем самым это говорит о том, что та центриоль, в составе которой имеется сенексин является зрелой, а это указывает на то, что она может играть роль базального тельца при формировании аксонемы и является местом скопления веществ, принимающих участие в образовании микротрубочек.

Перицентриолярный матрикс представлен тончайшими фибриллоподобными структурами, в результате плотного расположения которых он выглядит темноокрашенным (рис.4.1), имеет неопределенную форму с зубчатыми краями, отделяющими его от других структур цитоплазмы. Обычно, в области перицентриолярного матрикса не встречаются другие органеллы (напр. рибосомы) и оболочки. Однако здесь располагаются темно окрашенные тельца, размерами 70-100 нм – **спутники центриолей**. От матрикса во всех направлениях отходят микротрубочки (рис. 4.1), что указывает на то, что он играет роль организатора микротрубочек (см. ранее).

В составе перицентриолярного матрикса предполагается наличие около 100 белков. Среди них подробно изучены перичентрин, нинеин, γ – тубулиновый кольцевой комплекс.

Белок **перичентрин** имеет два изомера с молекулярной массой 220 и 350 кД. Этот белок представляет основную массу матрикса. На образованной ими решеткообразной сети, располагаются белки γ - тубулинового кольцевого комплекса, которые принимают участие в формировании микротрубочек. Белки перичентрина, играя роль основы, связываются и с другими белками, действующими в области центросом.

Белок **нинеин** соединяется своим S- концом с субдистальным отростком материнской центриоли, а N-концом - с белками кольцевого комплекса γ - тубулина.

Белок **Ser-135** обнаруживается по всей области центросомы, образуя связь с электронно-плотным веществом, окружающим центриоли. При увеличении количества данного белка, в области центросомы и в цитозоле образуются спиралевидные тельца, в виде темно окрашенных полосок, расположенных на расстоянии 6 нм друг от друга. Как увеличение, так и уменьшение количества данного белка приводит к нарушению образования веретена деления при митозе, а в интерфазе нарушается ход расположения микротрубочек.

Белок **PCM-1** (молек.масса 228 кД) был обнаружен в составе “центриолярных спутников”, расположенных в области матрикса. Белок PCM-1 играет роль “пристаней”, локализованной в области центросомы, куда собираются как центриоли, так и белки участвующие в образовании матрикса (за

исключением γ - тубулина). Так, вышеуказанные белки, соединяясь с белком PCM-1 , при помощи комплекса динеин-тубулина (см. ранее), перемещаются в область расположения centrosомы.

Если нарушается месторасположение белков, участвующих в образовании centrosом с помощью белка PCM-1, то клетки не могут вступить в фазу митоза. В итоге большинство типов клеток погибают с помощью апоптоза.

Клетки организма человека, достигшие терминальной дифференциации (мегакарициты, эритроциты, миобласты являющиеся предшественниками поперечно-полосатых мышечных волокон), на протяжении длительного времени утратившие способность к делению, не имеют в своем составе centrosом. Единственная клетка, являющаяся исключением из этого правила – это яйцеклетка готовая к оплодотворению. В процессе овогенеза перичентриольный матрикс в ней сохраняет свою форму, а обе центриоли разрушаются и исчезают. Механизм разрушения центриолей до сих пор не выяснен, но предполагается, что этот процесс носит активный характер и протекает с участием протеасом (см. далее).

Утратившая centrosому яйцеклетка человека, обретает способность к делению лишь после оплодотворения. В процессе сперматогенеза материнская центриоль в составе сперматозоида превращается в базальное тельце, участвующее в образовании его хвостовой части. Поэтому в процессе оплодотворения в зиготу поступает лишь дочерняя центриоль. Для деления зиготы дупликация дочерней центриоли происходит дважды. Таким образом, первое деление зиготы происходит лишь после образования двух пар центриолей.

Утрата центриолей в процессе овогенеза имеет важное биологическое значение для предупреждения партогенетического способа размножения (без участия сперматозоидов). Для интереса следует отметить, что у мышей и в процессе сперматогенеза и в процессе овогенеза утрачиваются обе центриоли. В яйцеклетке сохраняется лишь перичентриольный матрикс. Этот процесс (начало деления женской половой клетки без оплодотворения) очень схож с партеногенезом (parthenoz – девственница). Примечательно, что в эмбриональных клетках мыши в скором времени (незадолго до имплантации) центриоли появляются вновь. Таким образом, всплывает вопрос - как же образуются “новые центриоли”? С помощью современных методов было выяснено, что в составе зрелой яйцеклетки мыши имеются молекулы, играющие роль предшественников для формирования центриолей, представленные в виде скоплений мультивезикулярных телец.

Структуры, участвующие в образовании centrosом, подвергаются динамическим изменениям в процессе клеточного цикла. В центре этих изменений стоит дупликация centrosом, а началом является отсоединение centrosом друг от друга. В период интерфазы материнская и дочерняя centrosомы бывают связаны друг с другом при помощи эластического образования, состоящего из белков (рис.4.4-1). Во время перехода G_1 фазы в S фазу клеточного цикла E циклин соединяется с Cdk2 киназой (см.далее) и активирует ее. Активированный фермент Cdk2 вызывает фосфорилирование белка нуклеофосмина (nucleofosmin – NPM/B23), входящего в состав образований, соединяющих центриоли между собой. С того момента как фосфорилированный NPM/B23 покидает центриоль, начинается отделение центриолей друг от друга (рис.4.4-2). Наряду с белком NPM/B23 из состава centrosом отделяется также белок динамин-2. Все это указывает на участие данных белков в соединении центриолей.

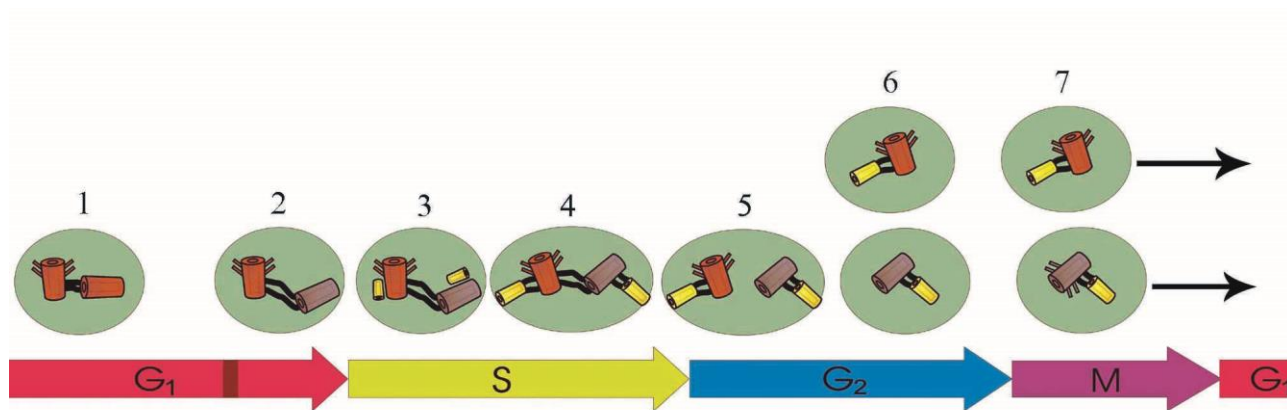


Рис. 4.4. Схема изменений, происходящих с центриолями на разных фазах клеточного цикла. Описание в тексте.

Отделение материнской центриоли от дочерней продолжается до конца S фазы. Лишь в данный момент начинается формирование **процентриолей**, располагающихся перпендикулярно на проксимальных концах центриолей (рис. 4.4-3 и -4). В начале процентриоли выявляются как скопления белка центрина. Вокруг данных скоплений формируются состоящие из димеров α - и β тубулинов девять микротрубочек, расположенных по окружности, затем они превращаются в дуплеты и наконец - в девять триплетов микротрубочек новой дочерней центриоли. Таким образом, в конце S фазы образуются две пары центриолей, все еще не утратившие между собой связь:

- изначальная материнская центриоль и располагающаяся перпендикулярно к ее проксимальному концу новая дочерняя центриоль;
- изначальная дочерняя центриоль и располагающаяся перпендикулярно к ее проксимальному концу новая дочерняя центриоль.

В период G_2 фазы вначале полностью теряется связь между двумя парами образованных центриолей (рис. 4.4-5). Далее отделившись, они окружаются перицентриональным матриксом (рис. 4.4-6). Нахождение ϵ -тубулина в окружающем центриоли матриксе, говорит о полном ее формировании.

Полное отделение двух пар центриолей друг от друга и разделение перицентрионального матрикса на две части происходит с помощью фермента Nek2 и белка C-Мар, являющегося объектом его воздействия.

Образование субдистальных отростков материнской центриоли происходит при переходе из G_2 фазы в S фазу. Таким образом, уже в период профазы митоза образуются две пары центриолей, имеющих в своем составе и материнскую и дочернюю центриоль, которые переходят в состав образовавшихся после телофазы дочерних клеток (рис. 4.4-7).

В составе субдистальных отростков материнской центриоли было обнаружено наличие нового белка, именуемого **центриолином** (A.Gromley et al, 2003). Отмечена важная роль этого белка в завершении процесса цитокенеза, являющегося конечным этапом клеточного цикла. При отсутствии воздействия белка центриолина, клетки остаются связанными друг с другом с помощью длинных мостикообразных цитоплазматических отростков. Несмотря на

это, не отделившиеся друг от друга клетки вновь вступают в клеточный цикл, и ввиду отсутствия цитокенеза, образуются многоядерные плазмодиумы (см. ранее). Такие клетки, постепенно утратив свою способность к делению, либо погибают методом апоптоза, либо вступают в G_0 фазу.

Как в интерфазе, так и в период клеточного цикла, centrosомы выполняют роль **центра организации микротрубочек**. Наряду с этим, в соответствии с имеющейся в течение последних десяти лет информацией, отмечается участие центриолей в начальных этапах репликации ДНК, в обеспечении перехода с G_1 в S фазу, в определении положения структур веретена деления в цитоплазме, в отделении хроматид друг от друга, в завершении цитокинеза и т.д. К тому же была подтверждена связь centrosом с биологически активными веществами, регулирующими важные направления деятельности клетки. В связи с последней информацией centrosомы рассматриваются как центр восприятия раздражения, интеграции и распространения регулирующих сигналов. Таким образом, centrosомы, полностью оправдывая свое название, играют роль клеточного центра.

Митохондрии

Энергия, необходимая для деятельности организмов, образуется в результате окисления продуктов питания. Этот процесс обеспечивается с помощью митохондрий – особых специализированных органелл эукариотических клеток. В результате процессов окисления и фосфорилирования, происходящих в митохондриях, энергия в составе продуктов питания преобразуется в химическую энергию, собранную в макроэргических связях молекулы аденозинтрифосфата (АТФ).

Термин *митохондрия* был взят из греческих слов “*mitos*” и “*chondros*” и дословно означает – нитеобразная структура.

В конце XX века Альтман применив реактив кислый фуксин, обнаружил в клетке нитеобразные перемещающиеся образования, и назвал их “*биобластами*”. По мнению Альтмана биобласты являются образованиями, которые встречаются во всех видах клеток организма, они схожи по строению с бактериями и способны к самостоятельному существованию. Несмотря на то, что данные высказывания Альтмана первоначально были встречены резкими возражениями, в дальнейшем информация, полученная современными методами, подтвердила правильность многих из них (см. далее).

Так, данные фазово-контрастной микроскопии обнаружили, что митохондрии являются подвижными, способны изменять форму (эластические) и увеличивать свое количество при помощи деления (как бактерии).

Светооптически митохондрии имеют палочковидное строение с диаметром 0,4-1 мкм и длиной 2-7 мкм, хотя иногда достигают 10 мкм. Количество митохондрий и их топографическое расположение в клетках значительно отличаются. Так, в клетках энергически малоактивных, например в неактивных лимфоцитах, их бывает всего несколько, тогда как в клетках печени они исчисляются тысячами. Митохондрии концентрируются в той части клетки, где имеется необходимость в АТФ. К примеру, в эпителии проксимальных

извитых канальцев почек, митохондрии скапливаясь в базальной части клеток, формируют базальную исчерченность.

В каждой митохондрии имеется **наружная мембрана митохондрии**, играющая роль покрова и **внутренняя мембрана митохондрии**, образующая складки различной формы и размера (рис. 4.5-1).

Между этими мембранами остается щелеобразное **межмембранное пространство**, размером 10-20 нм (рис.4.5-2). Внутри митохондрий расположен также **матрикс митохондрии**, окруженный внутренней мембраной и имеющий аморфное строение в виде отдельных гранул (рис. 4.5-3).

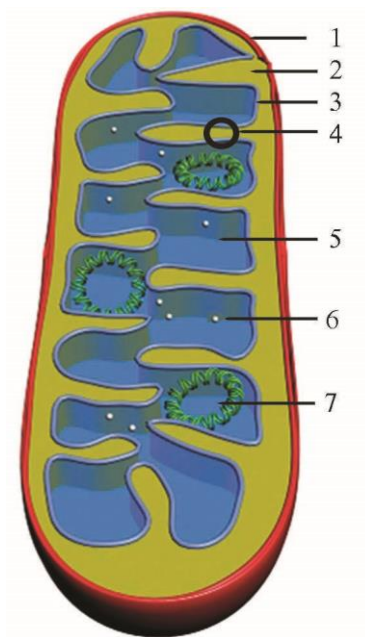


Рис. 4.5. Схема продольного среза митохондрий.

1. наружная митохондриальная мембрана; 2. межмембранное пространство;
3. внутренняя митохондриальная мембрана; 4. криста митохондрий; 5. матрикс митохондрий;
6. митохондриальные гранулы; 7. кольцевая ДНК

Внутренняя мембрана митохондрий увеличена благодаря складкам, увеличивающим тем самым обменную поверхность, обеспечивающую протекание важных процессов.

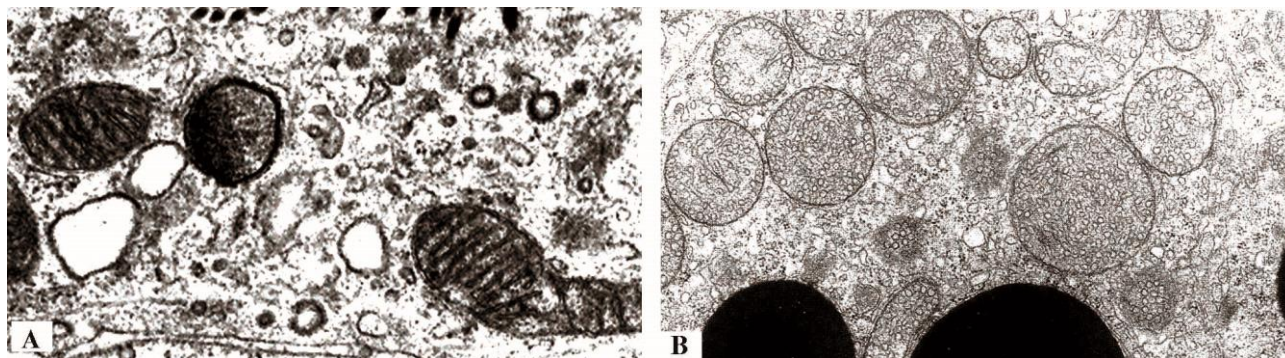


Рис. 4.6. Электронно-микроскопический снимок поперечного среза складок митохондрий, имеющих форму крист (А) и трубочек (В). А - гистотопографическое расположение образований матрикса, пузырьков с покрытием различного размера, цистерны гладкой эндоплазматической сети, вторичные лизосомы и две митохондрии в цитоплазме фибробласта. В – взаиморасположение митохондрий, липидных гранул, элементов гладкой эндоплазматической сети, цитоскелета, и структур матрикса в корковом веществе надпочечника (В – S.Morii et al. Acta Histocemica et Cytochemica, 1996, v.29, supplement, p.588).

Складки внутренней мембраны берут свое начало у края внутренней мембраны митохондрии, простираются в сторону центра матрикса и вновь возвращаются к месту начала, тем самым образуя палочкообразные выросты (рис. 4.5, 4.6 А). Из-за большого количества таких выростов, они напоминают зубцы гребня и называются **митохондриальными гребешками**. Существует прямая связь между активностью клетки и количеством и высотой митохондриальных гребней (крист). Самое большое количество и высота крист наблюдается в сердечной мышце, а противоположностью этого являются костные клетки (остеоциты). Следует отметить что, складки внутренней мембраны митохондрий некоторых клеток имеют не гребнеобразную, а трубчатую форму. Ультратонкие срезы таких митохондрий напоминают срезы микротрубочек (рис. 4.6 В). Такие митохондрии встречаются в основном в мозговом веществе надпочечников, синтезирующих стероидные гормоны и в половых железах.

Синтез АТФ в митохондриях становится возможным благодаря совместной деятельности различных насосов, переносчиков, белков переносящих электроны и ферментов. Последовательность и направленность протекающих процессов становится возможной благодаря различию в избирательной проницаемости белков, расположенных на наружной и внутренней мембранах митохондрий. В результате этого в области матрикса, а также на наружной и внутренней оболочках митохондрий происходят различные процессы.

В результате наличия в составе наружной мембраны митохондрий, как и у микробов, различных видов интегральных белков и поринов (см. ранее), вещества находящиеся в цитозоле и имеющие молекулярную массу до 10 кДж, а также вещества необходимые для синтеза АТФ, могут свободно проникать в межмембранное пространство. Кроме этого, в составе наружной мембраны имеются белки, участвующие в синтезе митохондриальных липидов.

Сквозь внутреннюю мембрану, на 75% состоящую из белков, в отличие от наружной, способны свободно проникать лишь O_2 , CO_2 и вода, а промежуточные продукты синтеза энергии (пируват, ацетил КоА) и даже ионы имеющие очень маленькие размеры (H^+ , Na^+) не могут проникать сквозь нее. В результате между матриксом и межмембранным пространством создаются условия для возникновения протонного градиента, необходимого для синтеза АТФ (см. далее).

Одной из основных причин этого, является наличие в составе внутренней мембраны большого количества молекул фосфолипида именуемого **кардиолипином**, имеющего не две, а четыре цепи жирных кислот. Наряду с этим, в результате наличия в составе внутренней

мембраны специальных переносчиков осуществляется транспорт (унипортно, симпортно и антипортно) необходимых веществ в матрикс и в обратном направлении.

К унипортным переносчикам относятся белки, переносящие ионы Ca^{2+} , а к белкам, осуществляющим симпортный транспорт относятся белки, переносящие H^+ с пируватом и H^+ с фосфатной группой (рис. 4.8).

К антипортным переносчикам относятся интегральные белки, обменивающие находящиеся в межмембранном пространстве молекулы H_2PO_4^- и пирувата на находящуюся в матриксе гидроксильную группу OH^- , а также АТФ, синтезируемый в матриксе, на АДФ, расположенный в межмембранном пространстве (рис.4.8). Перемещение фосфатной группы и пирувата в матрикс осуществляется с помощью энергии, образованной протонным градиентом, а выход Ca^{2+} из клетки и обмен АТФ на АДФ, осуществляется с помощью энергии, образованной разностью потенциала вокруг внутренних мембран митохондрий.

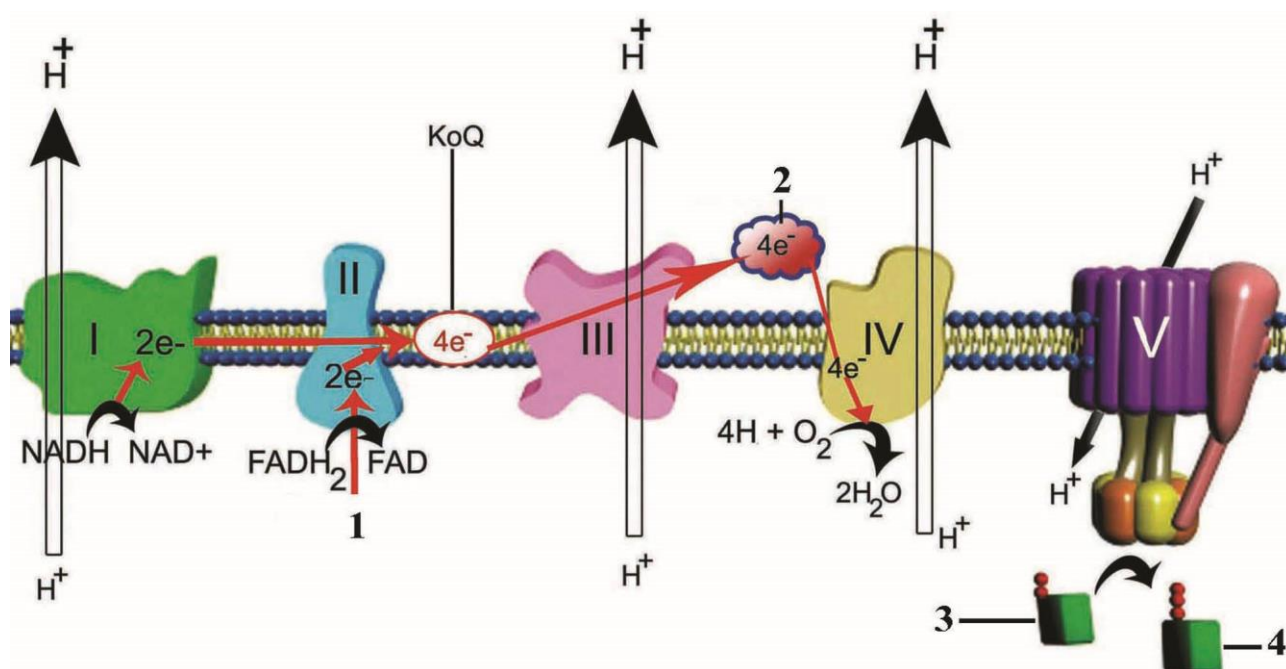


Рис. 4.7. Схематический рисунок комплексов белков внутренней митохондриальной мембраны. I-IV – белковые комплексы относящиеся к дыхательной цепи; V в составе V комплекса расположен фермент АТФ-синтетазы.

1- сукцинат; 2- цитохром; 3- АДФ; 4- АТФ.

Наряду с перечисленными выше переносчиками, на внутренней мембране митохондрий функционируют пять специальных комплексов белков (рис. 4.7).

Из этих комплексов I, II, III, IV относятся к дыхательной цепи. Они участвуют в переносе электрона высокой энергии с одного комплекса на другой, их также называют **цепью электронного транспорта**.

В основном в дыхательную цепь входят I, III, IV белковые комплексы и связанные с ними две подвижные молекулы переносчиков электрона – убихинон (кофермент Q) и цитохром “с”.

Ко второму комплексу относится фермент сукцинатдегидрогеназа, участвующая в основном в цикле Кребса и переносящая электроны с FADH_2 к убихинону. Но данный фермент не принимает участие в переносе протона H^+ в межмембранное пространство. А к V комплексу относится фермент АТФ-синтетаза, который переносит протоны только из межмембранного пространства в матрикс (см. далее).

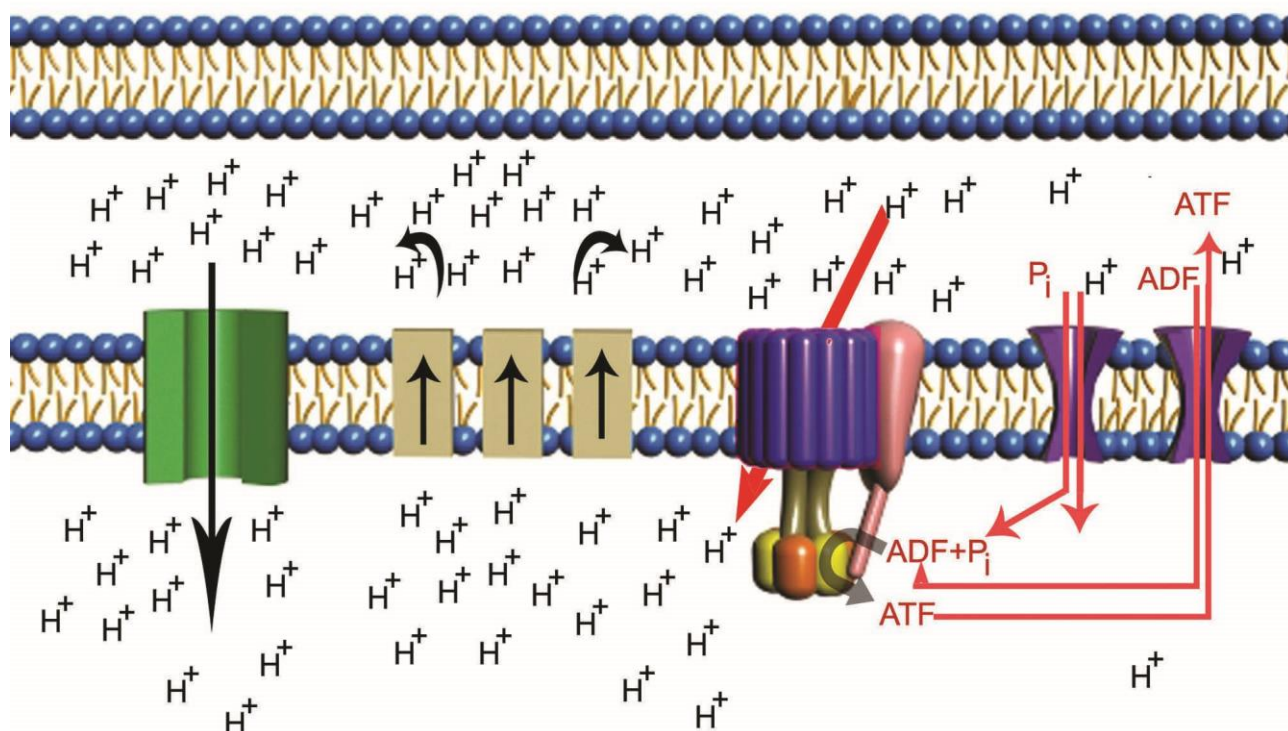


Рис. 4.8. Теория протонного градиента синтеза АТФ в митохондриях. Схема.

Слева показан транспорт H^+ с помощью белка термогенина (без синтеза АТФ); в центре – комплекс дыхательной цепи, образующий протонный градиент; справа от него – фермент АТФ – синтетаза; в самом конце слева – симпорт и антипорт переносчики. Как видно из схемы, лишь перенос H^+ из межмембранного пространства в матрикс с участием фермента АТФ-синтетазы (показано красной стрелкой), является причиной синтеза АТФ.

Окрасив митохондрии, утратившие в гипотоническом растворе свою целостность, при помощи негативного способа окраски, можно наблюдать небольшие (диаметр 9 нм) шарообразные выросты, расположенные на тонких нитях и направленные от внутренней митохондриальной мембраны в сторону матрикса. Указанные частицы соответствуют расположению АТФ – синтетазы и называются *митохондриальными (элементарными) частицами*.

Митохондриальный матрикс - является гелеобразной жидкостью, 50% которой составляют белки. Из-за большого количества белков электронно-микроскопически он выглядит как более плотная структура (рис.4.6 А). Большинство белков в составе матрикса

являются ферментами, участвующими в окислении главных источников энергии организма – глюкозы и жирных кислот (см. далее).

Наряду с ферментами в матриксе расположены также митохондриальная ДНК, митохондриальные рибосомы и митохондриальные гранулы (рис. 4.5).

Отличительной особенностью митохондрий от остальных органелл, расположенных в цитоплазме, является то, что они имеют собственную генетическую систему, не связанную с ядерным геномом. Митохондриальный геном, как и в случае бактерий, представлен несколькими копиями кольцевой молекулы ДНК, которая имеется в составе каждой митохондрии (рис 4.5).

В двуспиральной кольцевой молекуле ДНК имеются гены информационной РНК (константа седиментации 12S, 16S) и 22 транспортных РНК, необходимых для синтеза 13 митохондриальных белков. 12S иРНК и 16S иРНК, соединяясь с белками, образуют маленькую (35S) и большую (45S) субъединицы соответственно, а они формируют **митохондриальную рибосому** (60S). Несмотря на малые размеры, митохондриальные рибосомы по общему плану строения и функциям не отличаются от расположенных в цитозоле свободных рибосом (см. далее). Проведенные исследования показали, что большинство из 13 белков, синтезируемых в матриксе митохондрий, участвуют в организации белковых комплексов I, III, IV, V.

Между тем гены, координирующие большинство (95%) митохондриальных белков, расположены в ДНК ядер клеток. Эти белки, синтезируются на полирибосомах в цитозоле, а затем доставляются к нужным структурам митохондрий при помощи специальных групп белков (**шапероны и белки-транслокаторы**).

В матриксе митохондрий большинства клеток имеются митохондриальные гранулы, имеющие маленькие размеры (30 – 50нм). Несмотря на то, что функция данных гранул окончательно неизвестна, отмечается их тесная связь с катионами Ca^{2+} и Mg^{2+} . При нарушениях, вызванных увеличением концентрации Ca^{2+} в цитозоле, они переносятся в матрикс с помощью насосов Ca^{2+} . Таким образом, митохондрии, как и эндоплазматическая сеть, играют роль депо для Ca^{2+} .

Важной является информация о современных представлениях механизма образования энергии в форме макроэргических молекул АТФ, имеющих место при полном распаде глюкозы и жирных кислот в результате **окислительно-фосфорилирующих процессов** в митохондриях.

Процесс образования энергии при расщеплении глюкозы начинается в цитозоле, протекает в бескислородных условиях (анаэробных) и называется **гликолизом**. В процессе гликолиза образуются 2 молекулы АТФ, 2 молекулы пировиноградной кислоты (пирувата), а 2 молекулы никотинамидадениднуклеотида (NAD^+) редуцируются до NADH-а. Обе молекулы пировиноградной кислоты переносятся в матрикс митохондрий с помощью насосов (см. выше) и там каждая в отдельности подвергаясь окислительному декарбоксилированию, образует CO_2 , ацетил-КоА и одну молекулу NADH (I общий путь катаболизма).

Ацетил-КоА в матриксе вступив в цикл Кребса (цикл лимонной кислоты) (II общий путь катаболизма), преобразуется в оксалоацетат. В результате цикла Кребса, наряду с другими промежуточными продуктами, образуется 2 молекулы CO_2 , 1 молекула ГТФ, 3 молекулы NADH и 1 молекула флавинадениндинуклеотида (FAD^+) редуцирующегося до FADH_2 . Образующаяся ГТФ тут же преобразуется в АТФ.

Учитывая, что в цикл Кребса вступают 2 молекулы пировиноградной кислоты, следовательно, в результате окисления 1 молекулы глюкозы образуется 4 молекулы АТФ, 10 молекул NADH и 2 молекулы FADH_2 .

В отличие от глюкозы, процесс окисления жирных кислот начинается не в цитозоле, а непосредственно в матриксе митохондрий и называется **β - окислением**. На начальных этапах этого процесса жирные кислоты, используя энергию АТФ, соединяются с КоА и преобразуются в ацил – КоА (активированные жирные кислоты). В результате последующих процессов окисления, вследствие отделения от активированных жирных кислот двух атомов углерода, образуется ацетил-КоА, имеющий в своем составе на два углеродных атома меньше, чем ацил-КоА.

На каждом этапе отделения двух атомов углерода от жирных кислот, наряду с ацетил-КоА (активированной уксусной кислотой), образуется также 1 молекула NADH и 1 молекула FADH_2 . А образованные молекулы ацетил-КоА, как и в случае анаэробного гликолиза, вступают в цикл лимонной кислоты. Таким образом, в результате окисления каждой пальмитиновой кислоты, имеющей в своем составе 16 атомов углерода, образуется по 7 молекул NADH и FADH_2 и 8 молекул ацетил-КоА. Если учитывать количество производных, образованных из молекулы ацетил-КоА в процессе цикла Кребса, то очевидно, что при окислении одной молекулы жирной кислоты, имеющей в составе 16 атомов углерода, синтезируется 31 одна молекула NADH, 15 молекул FADH_2 и 8 молекул ГТФ (всего 131 молекула АТФ).

Протекание в митохондриях окислительно-фосфорилирующих реакций, необходимых для синтеза молекул АТФ, тесно связано с образованием NADH и FADH_2 , являющихся редуцированной формой NAD^+ и FAD^+ . Так, при повторном окислении последних, под действием ферментов дыхательной цепи, образуется *гидрид ион* (H^-), имеющий в своем составе электронную пару, обладающую большой энергией. Т.о. электронная пара, передвигаясь по дыхательной цепи, образует молекулу воды, редуцируя молекулу кислорода, тем самым H^- преобразуется в протон (H^+) (рис.4.7).

Ранее предполагалось, что в связи с тем, что передвижение электронной пары по дыхательной цепи является экзэргической реакцией, то высвобождающаяся энергия непосредственно расходуется на образование макроэргических связей в процессе образования молекул АТФ. Однако в 1961 году, Питер Митчел впервые выдвинул гипотезу о том что, молекулы АТФ синтезируются в результате создания образованного вокруг биологических мембран протонного (H^+) градиента (хемиоосмотическая теория). Несмотря на то, что изначально его предположение не было принято многими учеными, по истечению более чем 10 лет количество его сподвижников стало стремительно расти и в 1978-м году за гипотезу “Протонного градиента” он был удостоен Нобелевской премии.

В настоящее время полностью подтверждено, что синтез АТФ осуществляется благодаря протонному градиенту не только в митохондриях, но также и в бактериях и хлоропластах (в растениях).

Имеются две основные причины образования протонного градиента. Первая – это неспособность прохождения ионов и протонов сквозь внутреннюю мембрану митохондрий. Вторая причина заключается в том, что энергия высвобождающаяся при перемещении электронной пары по дыхательной цепи расходуется на образование из гидрид ионов (H^-) протонов H^+ , которые благодаря насосам в составе белковых комплексов I, II, IV, локализованных на внутренней мембране, выкачиваются из матрикса в межмембранное пространство. Это и создает протонный градиент по обе стороны внутренней мембраны (рис.4.7) Причем, в данном случае также как и в случае бактерий, вокруг биологических мембран (внутренняя мембрана митохондрий), образуется не Na^+ градиент (как в эукариотических клетках), а протонный градиент (рис.4.8). То есть концентрация последних в межмембранном пространстве выше, чем в матриксе. Большая часть протонов, сконцентрированных в межмембранном пространстве, способна возвращаться в матрикс при помощи **белков комплекса V (АТФ - синтетазы)**, локализованного на внутренней мембране (рис. 4.8).

Возвращающиеся в матрикс протоны становятся причиной активации АТФ-синтетазы (см. ранее) и АДФ расположенный в матриксе, соединяясь с фосфатной группой, образует АТФ (рис. 4.8).

Следует отметить, что комплексы дыхательных цепей, располагающиеся во внутренней мембране митохондрий, играют различные роли в процессе образования протонного градиента. Так, электронная пара, находящаяся в составе NADH, поступает в I комплекс цепи переноса электронов и захваченная **коэнзимом Q (убихинон)** переносится к цитохрому “b”, находящемуся в составе комплекса III. В комплексе III электронная пара переносится с цитохрома “b” в цитохром “с”. С помощью последнего переносчика электроны переносятся в IV комплекс (цитохромоксидаза). Белки IV комплекса, соединяя электроны с молекулами кислорода образуют воду (рис. 4.7). Ранее мы отмечали, что при переходе электронной пары с одного комплекса на другой высвобождается энергия. Благодаря этой энергии во время переноса $2e^-$ с каждого из I, II и III комплексов $3H^+$ переносятся из матрикса в межмембранное пространство.

Механизм переноса электронов при помощи FADH, отличается от описанного выше механизма. А именно, белки комплекса II (сукцинатдегидрогеназа) принимают электроны от сукцината, являющегося промежуточным продуктом цикла Кребса. В этом случае электроны связываются не с NADH, а с FADH₂ (рис.4.7). Электронная пара, находящаяся в составе FADH₂, захваченная коэнзимом Q в составе комплекса II, переносится к комплексу IV по описанной выше схеме и данный процесс завершается синтезом молекул воды. Вследствие того, что во время переноса электронов, отщепленных от FADH₂ свободная энергия не образуется, белки комплекса II не участвуют в образовании протонного градиента H^+ .

Во время перемещения по электронной цепи электронной пары, находящейся в составе одной молекулы NADH, синтезируется 3 молекулы АТФ. В аналогичном процессе с участием FADH₂ синтезируется 2 молекулы АТФ. Отсюда следует, что если при

расщеплении одной молекулы глюкозы образуется 38 молекул АТФ, то при расщеплении молекулы жирных кислот (содержащих в своем составе 16 атомов углерода) эта цифра достигает 131. Еще одной важной особенностью является то, что если при бескислородном гликолизе в цитоплазме образуется всего 2 молекулы АТФ, то в кислородной среде митохондрий, в процессе окислительного фосфорилирования, эта цифра увеличивается в 18 раз и достигает 36-ти.

Протонный градиент, образованный с помощью окислительно-фосфорилирующих процессов в бурой жировой ткани, является причиной образования тепла, а не АТФ. В составе внутренней мембраны митохондрий данных клеток имеется белок **термогенин**, схожий с АТФ-синтетазой. Во время возврата протонов в матрикс при помощи данных белков, вследствие отсутствия синтеза АТФ, энергия образованная протонным градиентом расходуется на образование тепла. Бурые жировые клетки имеются у детей и у животных, находящихся в зимней спячке. У первых тепло образованное бурыми жировыми клетками, повышая температуру тела, расходуется на уничтожение ряда бактерий, у вторых – становится причиной нормализации температуры тела в период пробуждения от зимней спячки, пониженной на 4-5 градусов.

В клетках местом наибольшего расхода кислорода являются митохондрии. Поэтому если в межклеточной среде по различным причинам наблюдается нехватка кислорода (гипоксия), то деструктивные изменения, происходящие в митохондриях, становятся причиной гибели клетки. К числу первых признаков гипоксии можно отнести набухание митохондрий и разжижение их матрикса.

Вследствие того, что митохондрии имеют свой геном, то в результате происходящих в них мутаций, возникают различные наследственные заболевания. Примером этого является наследственная оптическая нейропатия Лебера. Данное заболевание, встречающееся у 15-35 летних лиц, сопровождается атрофией зрительного нерва и как следствие – полной потерей зрения.

Одной из причин возникновения различных болезней (инсульт, атрофия зрительного нерва, невропатии, миопатии, болезни Паркинсона и Альцгеймера и т.д.), являются возрастные изменения генома и внутренних структур митохондрий.

Средняя продолжительность жизни митохондрий всего 10 дней. Они, так же как и бактерии, размножаются путем деления. В этом случае перегородка, образованная в центральной части, делит материнскую митохондрию на две части. Т.к. в составе митохондрий имеется несколько копий ДНК, то новообразованные митохондрии имеют специфические им ДНК (рис 4.5).

Рибосомы

Рибосомы относятся к гигантским макромолекулам. Они являются рибонуклеопротеинами, состоящими из четырех типов РНК (5 S, 5.8 S, 18 S и 28 S) и более чем 80-ти соединенных с ними белков. Рибосомы вместе с **информационной РНК (иРНК)** и **аминоацил-транспортной РНК (аа-тРНК)** обеспечивают синтез белков и

встречаются во всех типах клеток кроме эритроцитов. Однако существуют значительные отличия в их количестве и в характере связи с другими структурами цитозоля. Было выяснено, что в быстрорастущих клетках млекопитающих имеется около 10 миллионов рибосом.

В эукариотической клетке различают два вида рибосом: митохондриальные и цитоплазматические. Общий план строения этих рибосом является одинаковым, основное отличие заключается в большем размере вторых по сравнению с первыми (см. ранее).

Численные показатели рибосом и их составных частей, определяются при помощи *коэффициента седиментации Сведберга* ($1\text{ S} = 10^{-13}\text{ сек}$), который указывает на скорость оседания их в растворе.

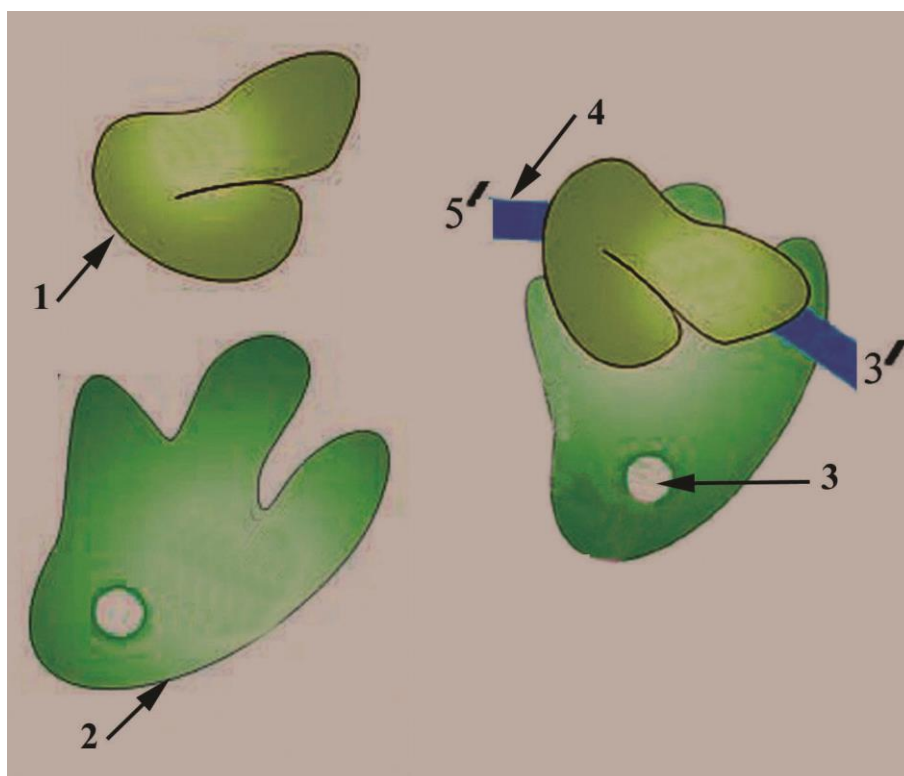


Рис. 4.9. Схематический рисунок малой и большой субъединиц рибосом.

1- малая субъединица; 2- большая субъединица; 3- пора выхода; 4- и-РНК.

Цитоплазматические рибосомы (80 S) являются плотными частицами с размерами 30х25х20 и состоят из большой и малой субъединиц (рис. 4.9). Каждая субъединица, состоящая из рРНК и белков, синтезируется в ядрышке. После синтеза рибосомальные белки, проникая сквозь ядерную пору, поступают в ядрышко. *Большая субъединица* (60 S) состоит из 5 S, 5.8 S и 28 S рРНК и 49-ти белков, а *малая субъединица* (40 S) состоит из 18 S рРНК и 33-х белков. В рибосомальных субъединицах белки (лишь по одному от каждого) располагаются вокруг **сердцевины**, образованной из комплементарно связанных друг с другом молекул рРНК.

В течение последних 10-ти лет было принято мнение, что белки в составе рибосом играют и структурную и функциональную (ферментативную) роль. Но в 1992-ом году Г. Ноллер

сотрудниками выяснили, что при экстракции белков из большой субъединицы она сохраняет ферментативную активность и участвует в образовании пептидных связей между аминокислотами. Белки, входящие в состав рибосом, формируют пространственное строение молекулы рРНК и удерживают тРНК в необходимом положении, тем самым усиливая функциональную активность рибосом.

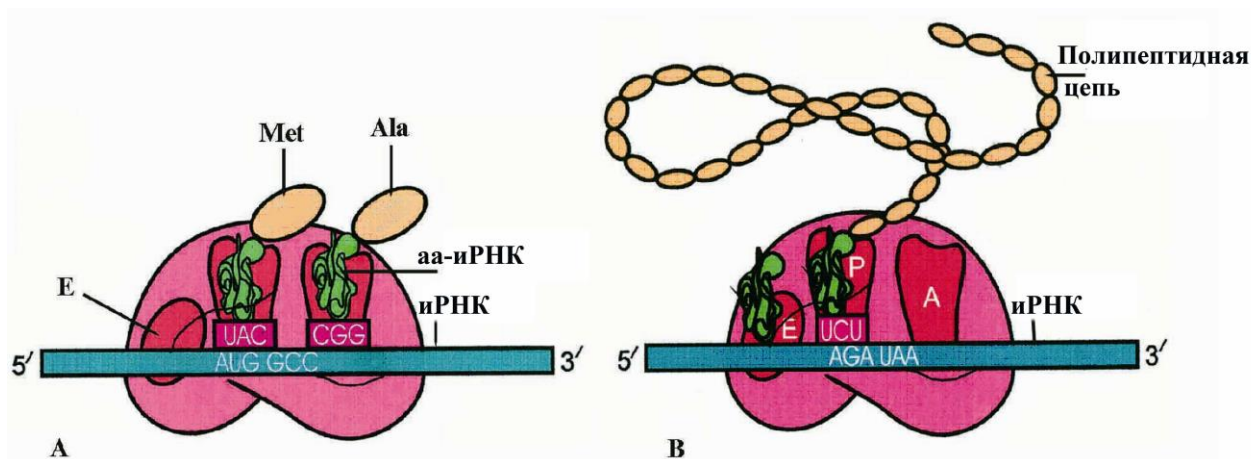


Рис. 4.10. Схематический рисунок взаимосвязей между белок-синтезирующими структурами рибосом и иРНК. А – начальный этап (инициации) синтеза белка, В – этап удлинения (элонгации). Подробная информация в тексте. Схемы, с небольшими поправками, были взяты из учебника G.M. Cooper – The cell: a molecular approach (2000, ASM Press).

На малой субъединице имеется участок связывающийся с информационной РНК (иРНК), А-участок для соединения с аа-тРНК, Р-участок для соединения пептидил-тРНК (Р-тРНК) и Е-участок для выхода (exit) тРНК (рис. 4.10 В).

А на большой субъединице находятся участок имеющий пептидилтрансферазную активность, тунелеобразная полость для размещения участка синтезируемого белка, выводное отверстие туннеля (рис. 4.9,4.14) и участок связывающийся с мембраной гранулярной эндоплазматической сети.

Во время синтеза белка, большая и малая субъединицы соединяются друг с другом, а между ними сохраняется щелеобразное пространство. Т.к. это пространство переходит в тунелеобразную полость большой субъединицы, то образованная полость целиком напоминает воронку. На поверхности малой субъединицы, все участки, соединяющиеся с различными образованиями (см.далее) располагаются в полости между субъединицами. В области полости не встречается ни один из белков принимающих участие в образовании рибосом и находящихся в окружающем цитозоле. Значит, соединения иРНК с рРНК и соединения аминокислот друг с другом пептидными связями происходит в полости рибосомы, которая окружена только молекулами РНК. Т.о. образования, участвующие в начальных этапах синтеза белка, оберегаются от воздействия находящихся в цитозоле белков (РНК-азы, протеазы), имеющих ферментативную активность.

Для того чтобы понять роль рибосом в синтезе белка, нужно прояснить ряд моментов. Первое – к Р-участку малой субъединицы вначале присоединяется участок антикодона тРНК, переносающий аминокислоту метионин к кодону AUG в составе иРНК – являющийся начальным показателем синтеза белка (рис.4.10 А).

Второе – к А-участку малой субъединицы присоединяется aa-тРНК, переносящая аминокислоту соответственно гену каждого белка (аминокислота аланин на рис. 4.10 А). Последняя, синтезируется с участием фермента тРНК-синтетазы, находящегося в цитозоле. Данный процесс состоит из двух фаз. Первая фаза называется фазой активации аминокислоты. В данном случае с участием фермента тРНК-синтетазы карбоксильная группа аминокислоты, соединяясь с α -фосфатной группой в составе АТФ, образует аминоацил АМФ. В последней фазе аминоацил АМФ вновь под воздействием фермента тРНК-синтетазы, соединяя аминоацильную группу с соответствующей тРНК, образует aa-тРНК. Таким образом, с одной стороны образуется антикодон, создающий комплементарные связи с кодоном иРНК, а с другой стороны – имеющая соответствующие аминокислоты aa – тРНК (рис. 4.10 А).

Третье - обязательно следует учитывать то, что рибосомы относятся к такой группе моторных белков как миозин, динеин и т.д. и обладают способностью свободно передвигаться по иРНК.

Белки синтезируются соответственно последовательности кодонов иРНК, синтезируемой на молекуле ДНК под воздействием фермента РНК-полимераза II и различных факторов транскрипции. Данный процесс называется **трансляцией**. Процесс трансляции состоит из трех последовательных этапов: начальный (initiation), удлинения (elongation) и терминальный (termination).

Начальный этап происходит с участием около 10-ти специальных белков. Эти белки называют eIFS (*eukaryotic initiation factors*), т.е. “эукариотические факторы инициации”. Один из данных факторов (eIF-2) вместе с ГТФ соединяется с тРНК, несущей аминокислоту метионин (met-тРНК), а три фактора (eIF-1, eIF-1A и eIF-3) соединяются с малой субъединицей рибосомы, тем самым активируя их. Активированная met-тРНК соединяется с Р-участком малой субъединицы (рис. 4.10 А). Это единственная РНК несущая аминокислоту, непосредственно соединяющаяся с Р-участком малой субъединицы. Параллельно с этим eIFS факторы, от 4-х до 6-ти, вместе с АТФ-азой соединяются с иРНК около “шапки” на 5’ конце. Это указывает на то, что данные комплексы имеют хеликазную (англ. helix – завиток) активность и участвуют в раскрытии спиралей иРНК. Как только раскрываются спирали иРНК (благодаря энергии образованной с помощью фермента АТФ-азы), малая субъединица, перемещаясь вместе с факторами соединенными с ней и с концом 5’, достигают кодона AUG (рис.4.10 А). В это время ГТФ, связанная с eIF-2, подвергаясь гидролизу, отделяется от met-тРНК. В результате, комплекс met-тРНК, который соединен с кодоном и антикодоном AUG иРНК связанной с малой субъединицей, оставшись свободным (рис.4.11-1), соединяется с большой субъединицей рибосомы (рис.4.11-2). На этом начальный этап заканчивается.

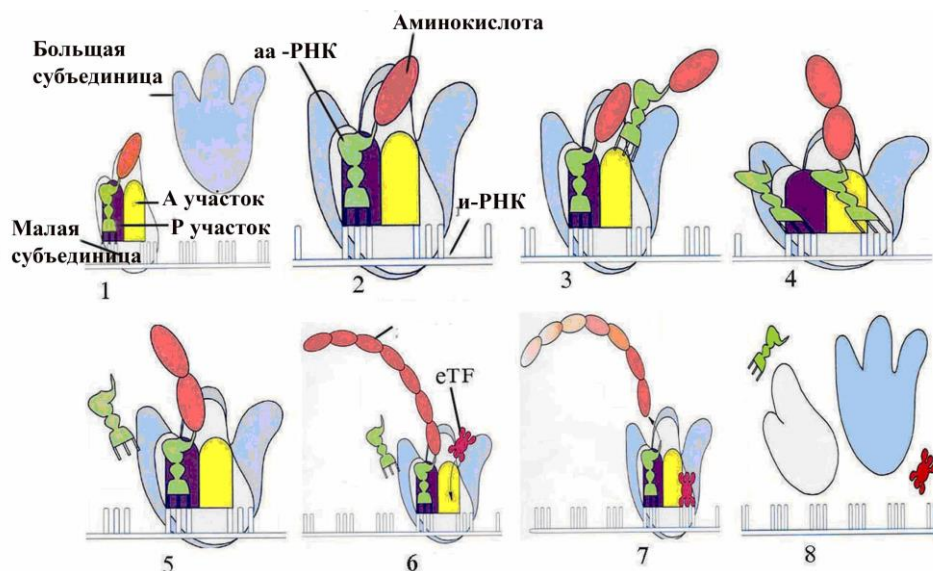


Рис.4.11. Схематический рисунок этапов синтеза белка в цитозоле. Описание в тексте. Схема, с небольшими поправками, была взята из учебника L.P. Gartner and J.L. Hiatt – Cjlrj Textbook of Histology (2nd ed., 2001, Ü.B. Saunders Company, p.26, fig 2 – 15).

Этап удлинения. На данном этапе в полости между двумя субъединицами происходит синтез полипептидной цепи. В начале процесса удлинения eEF-1 (*eukaryotic elongation factor*), т.е. “эукариотический фактор элонгации”, вместе с ГТФ соединяется с aa-тРНК, находящейся в цитозоле и приносит ее к А-участку малой субъединицы (рис.4.11-3). Если антикодон доставленной aa-тРНК совпадает с кодоном, следующим за AUG кодоном иРНК, то он с помощью энергии образованной гидролизом ГТФ, соединяется с А-участком. В случае если не совпадает, то при помощи специального механизма aa-тРНК замещается на новые, вплоть до соответствия доставленной аминокислоты. Как только соответствующая aa-тРНК доставляется и соединяется с А-участком, под воздействием имеющего пептидилтрансферазную активность участка большой субъединицы, карбоксильная группа метиониновой аминокислоты, расположенной на Р-участке образует карбоксильные связи с аминокислотой aa-тРНК, расположенной на А-участке (рис. 4.11-4). В это время аминокислота Р-участка соединяется с концом аминокислоты А-участка, т.е. тРНК расположенная на Р-участке остается без “груза”. После этого eEF-2 вместе с ГТФ обеспечивает перемещение рибосомы к концу тРНК вдоль одного кодона. Тогда оставшаяся без “груза” тРНК переходит к Е-участку – выходу, а имеющая белковые цепи пептидил РНК, занимает Р-участок (рис. 4.11-5). Т.о. освобождается А-участок, который принимает новую аминокислоту доставленную aa-тРНК. На следующем этапе находящаяся на Е-участке тРНК, лишенная “груза”, возвращается в цитозоль. Описанные процессы повторяются до места расположения кодона “стоп” на иРНК. Образованная белковая цепь, пройдя в туннель большой субъединицы, попадает в цитозоль через его выводное отверстие (рис. 4.11).

Терминальный этап. В терминальном этапе eTF (*eukaryotic termination factor*), т.е. “эукариотический фактор терминации” соединяется со “стоп” кодоном на А-участке малой субъединицы (рис. 4.11-6). Данный фактор с одной стороны препятствует соединению aa-тРНК к А-участку, с другой стороны подвергая гидролизу эфир пептидил-транспортной РНК располагающейся на Р-участке, отделяет белковую цепь от транспортной РНК (рис.4.11-7). С этого момента происходит отделение тРНК от Р-участка, eTF от А-участка, а тРНК от

большой и малой субъединицы (рис. 4.11-8). Субъединицы рибосом могут вновь принимать участие в трансляции иРНК. Осуществление синтеза белка при помощи ГТФ-связывающих белков с одной стороны являются причиной значительного увеличения его скорости, а с другой - значительного уменьшения случаев отклонения от установленной программы (месторасположение лишь одной аминокислоты из 10 тыс. может быть неверным). Было установлено, что для полного синтеза белка актина, состоящего из 375 последовательных аминокислот, требуется всего лишь 20 секунд. Возможность расположения около 15-ти рибосом на одном филаменте иРНК создает условия для синтеза большого количества белков за малый промежуток времени.

Рибосомы, будучи свободными или связанными с гранулярной эндоплазматической сетью, разделяются на две группы. Свободные рибосомы, в отдельности либо группируясь, участвуют в синтезе белков. В последнем случае, в виду того что на филаменте одной иРНК собирается большое количество рибосом, напоминая собранные на нить бусины. Их называют **полирибосомами** или **полисомами**. Следует отметить, что количество рибосом расположенных на иРНК указывает также на количество синтезируемых там молекул белка. Т.к. белки синтезируемые рибосомами или полирибосомами связанными с иРНК расположенной в цитозоле, расходуются на собственные нужды клетки, этот процесс именуется также **конститутивным синтезом белка**. Таким образом синтезируются белки, входящие в состав самого цитозоля, ядра, митохондрий, пероксисом и т.д. Рибосомы, связанные с гранулярной эндоплазматической сетью, в основном синтезируют белки используемые на стороне (экспорт).

Вследствие того, что в составе рибосом имеется много фосфатных групп, они имеют базофильные свойства и окрашивается кислотными красителями (гематоксилин, толионидин, и метиленовый синий) в темный цвет. Поэтому существует прямая связь между степенью базофилии клетки и интенсивностью синтеза белка.

Эндоплазматическая сеть

Эндоплазматической сетью называют структуру, образованную связанными друг с другом полостями различной формы, которые окружены мембраной и располагаются начиная от перинуклеарной области на всей протяженности цитоплазмы. Данные полости по форме бывают каналобразные, в виде трубочек, пузырьков и цистерн (уплощенных мешочков). Примерно 50% мембран, встречающихся в клетке, принимают участие в образовании эндоплазматической сети. Эти мембраны, непрерывно переходят от одного образования к другому и соединяют в себе вакуолоплазму, составляющую 10% от общего объема цитоплазмы.

Таким образом, в мембране эндоплазматической сети выделяют две поверхности: наружную – обращенную к цитозолю и внутреннюю (люминальную) – обращенную к вакуолоплазме. Расположенные на этих поверхностях белки, различного состава и активности, создают условия для выполнения свойственных им функций. Наряду с тем, что синтезируемые вещества накапливаются в оставшихся между мембранами пустотах, они так же подвергаются ферментативной модификации (в процессе созревания).

В эндоплазматической сети различают две части, которые отличаются друг от друга по функции и строению: гладкую и гранулярную эндоплазматическую сети. При электронной

микроскопии основной особенностью гранулярной является наличие на ней рибосом, соединенных с наружной мембраной.

Гладкая эндоплазматическая сеть

Ввиду того, что мембрана окружающая каналы, трубочки и пузырьки эндоплазматической сети на обращенной к цитозолю поверхности, а именно в ее сигнал распознающих участках, не имеет соответствующих рецепторов, то она не способна связываться с рибосомами и называется **гладкой эндоплазматической сетью**. Точнее, она воспринимается как гладкая часть эндоплазматической сети, поскольку границы между полостями гладкой и гранулярной эндоплазматическими сетями нет. Так как на ее поверхности нет рибосом, при электронной микроскопии она выглядит гладко (рис.4.6, 4.12). Вместе с тем, выявляющиеся на ультратонких срезах участки в большинстве своем имеют трубчатую форму: т.е. в составе гладкой эндоплазматической сети преобладают не пузырьки и цистерны, а трубчатые каналы (рис. 4.12).

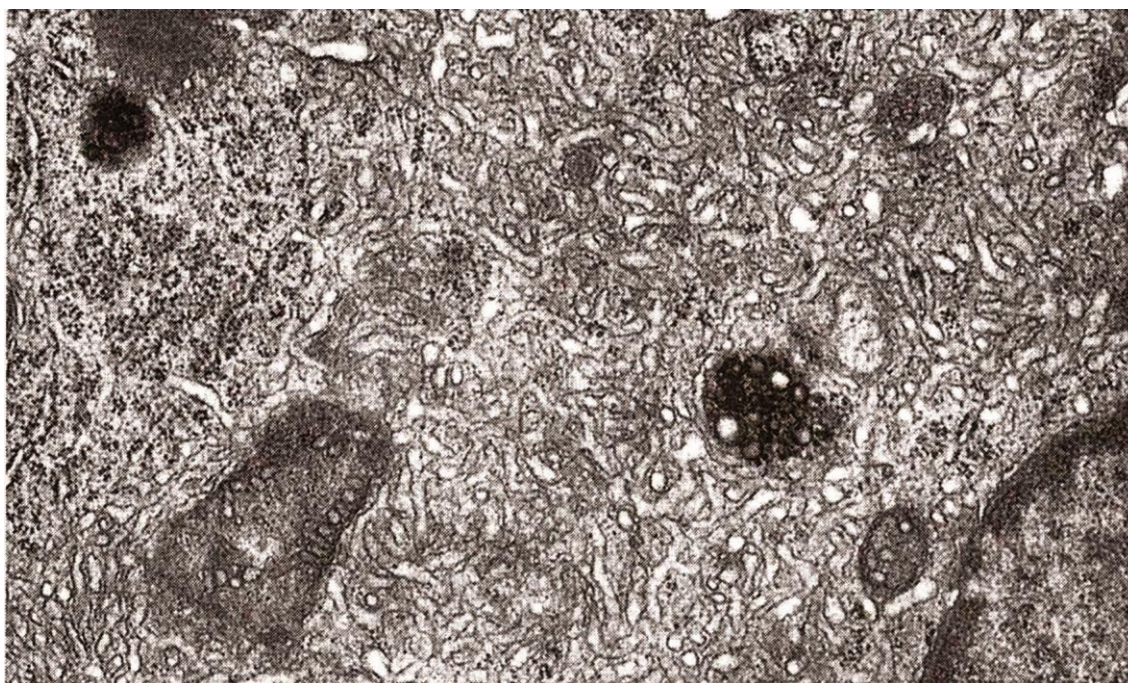


Рис.4.12. Электронно-микроскопический снимок гладкой эндоплазматической сети в синтезирующей стероидный гормон клетке коркового вещества надпочечника (T.S. Lesson, C.R. Lesson, A.A. Papparo: Text/Atlas of Histology, Philadelphia, WB. Saunders? 1988).

В большинстве типов клеток, встречающихся в организме, гладкая эндоплазматическая сеть занимает очень малое по объему пространство. В то же время в клетках, синтезирующих стероидные гормоны (в семенниках, яичниках, корковом веществе надпочечников), а также в тех клетках, в которых идет липидный обмен и детоксикация (в печени) токсических веществ (алкоголь, барбитураты и т.д.), гладкая эндоплазматическая сеть занимает большую часть цитоплазмы.

Среди разнонаправленных функций гладкой эндоплазматической сети важное место занимает то, что она является амбаром (депо) для ионов Ca^{2+} . Информация об участии ионов Ca^{2+} в различных процессах была приведена ранее в теме о “вторичных посредниках.” При этом следует отметить, что ионы Ca^{2+} , в отличие от других вторичных посредников, не

синтезируются. Ввиду этого нет никакого механизма, регулирующего их концентрацию при помощи метаболических процессов. Поэтому концентрация ионов Ca^{2+} регулируется путем поступления и выведения их из цитозоля.

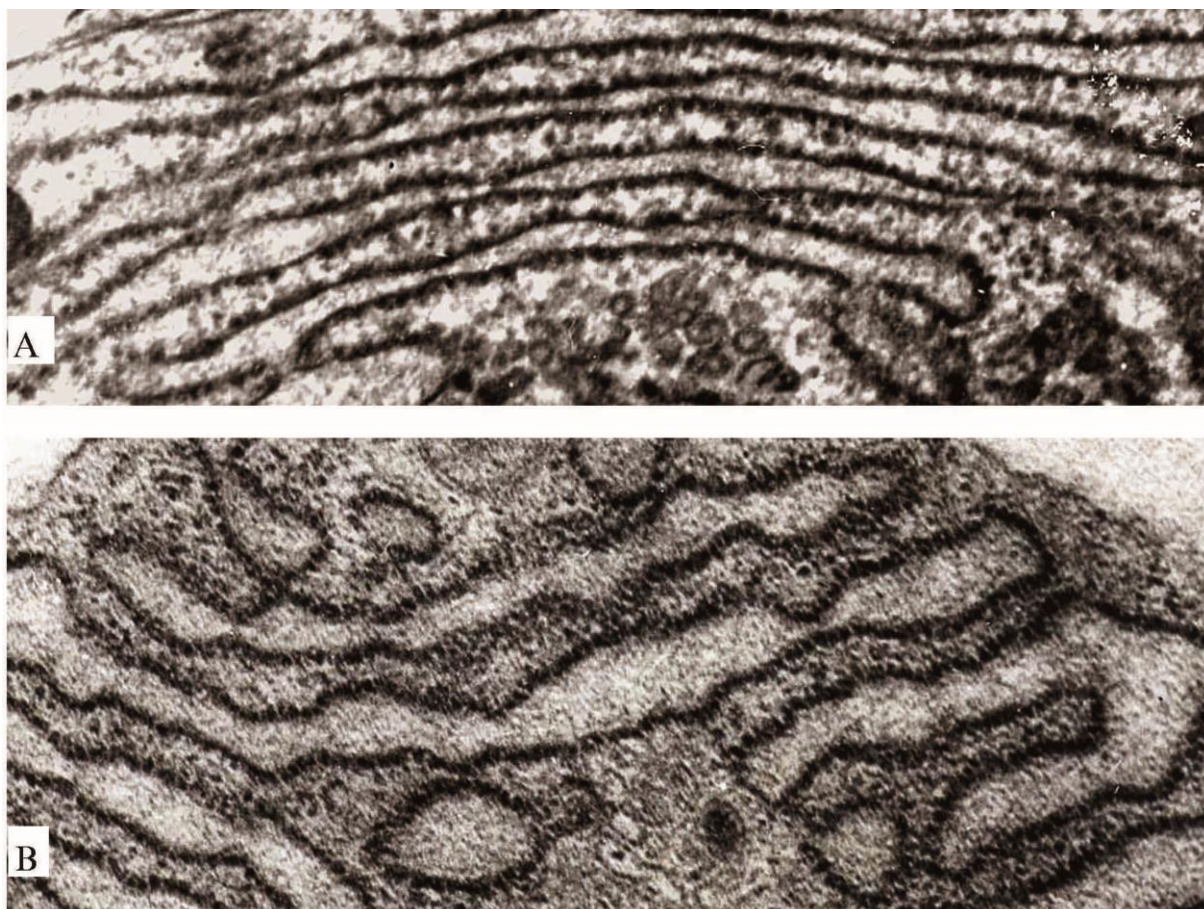


Рис.4.13. Электронно-микроскопический снимок гранулярной эндоплазматической сети эндоневрального фибробласта в периоды относительного покоя (А) и ускоряющегося синтеза белка (В). В случае В видно расширение цистерн и продукты синтеза аморфного строения в полости. На обоих снимках на мембранах цистерн расположены рибосомы.

Как только концентрация ионов Ca^{2+} в цитозоле превышает $0,1\text{мМ}$, **Ca^{2+} насосы**, располагающиеся на клеточной мембране и мембране окружающей гладкую эндоплазматическую сеть, переносят ионы Ca^{2+} в межклеточное пространство и в полость эндоплазматической сети. Вследствие наличия в полости последних белков **кальсеквестрина** (в поперечнополосатых мышечных волокнах) и **кальретикулина** (в гладкой мышце и неммышечных клетках), связывающих Ca^{2+} , эти ионы могут накапливаться здесь в 10 тысяч раз больших количествах, нежели в цитозоле. Но т.к. связь, создаваемая кальсеквестрином и кальретикулином с ионами Ca^{2+} , является слабой, то как только открываются каналы Ca^{2+} , располагающиеся в мембране окружающей гладкую эндоплазматическую сеть, 10^6 молекул Ca^{2+} в секунду, вновь поступают в цитозоль по градиенту концентрации. Кальсеквестрин является самым распространенным белком, связывающим Ca^{2+} и встречается также и в других типах клеток.

В мембране эндоплазматической сети имеется два типа агонист-зависимых Ca^{2+} каналов. Т.к. этими агонистами являются рианодин и инозитол 1, 4, 5- трифосфат, их соответственно называют Ca^{2+} каналы с рианодин и IP3 рецепторами.

Ca^{2+} каналы с рианодиновым рецептором открываются от воздействия дегидропиридоновых (DHP) рецепторов и ионов Ca^{2+} . В первом случае DHP рецепторы, входящие в состав плазмолеммы, в ответ на изменения мембранного потенциала меняют свое пространственное строение и активируют рианодиновые рецепторы, располагающиеся в стенке гладкой эндоплазматической сети. В результате депонированные в ЭПС ионы Ca^{2+} поступают в цитозоль. Каналы данного типа встречаются в саркоплазматической сети поперечнополосатых мышечных волокон. А во втором случае – во время открытия расположенных в плазмолемме потенциалзависимых Ca^{2+} каналов происходит увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле, что активирует рианодиновые рецепторы и тем самым ионы Ca^{2+} выводятся из депо. Ca^{2+} каналы данного типа встречаются в нейронах и кардиомиоцитах.

Ca^{2+} каналы с IP3 рецепторами. Во время воздействия агонистов (фактор роста пептидной природы, гормоны, медиаторы, световое излучение и пр.) на рецепторы тирозинкиназы и семиспиральные рецепторы, происходит активация фермента фосфолипаза-А, что и является причиной синтеза IP3 из входящих в состав клеточной мембраны фосфолипидов. Под воздействием же последних открываются Ca^{2+} каналы с IP3 рецепторами, обеспечивая поступление соответствующих ионов в цитозоль. Данные типы каналов встречаются в лимфоцитах, овоцитах, клетках гладкой мускулатуры и т.д.

Гранулярная эндоплазматическая сеть

Данная сеть в клетке является местом синтеза белков для экспорта (рис. 4.13). Синтезированные белки, отделяясь от цитозоля, либо выводятся из клетки путем экстррузии, либо входят в состав клеточной мембраны или мембран специальных органелл (напр. лизосом) находящихся в цитозоле. Характерной особенностью синтеза белка в гранулярной эндоплазматической сети является то, что синтезируемый белок поступает не в цитозоль, а в ее полость (рис. 4.14). Процесс поступления синтезируемых белков в полость гранулярной эндоплазматической сети, объясняется **сигнальной теорией**, выдвинутой Г.Биобелем и Б. Доббештейном (1971). Согласно данной теории иРНК для экспортных белков в своем составе содержит стартовый кодон (AUG), благодаря которому первым происходит синтез не самого белка, а его **сигнального участка**, который включает в себя последовательность около 20 аминокислот – сигнальный пептид (рис.4.14-1). Сигнальный участок соединяется с расположенным в цитозоле **сигнал распознающим участком** (рис. 4.14-2). Т.к. сигнал распознающий участок связывается с Р-участком рибосомы, синтез белка временно останавливается. Далее рибосома иРНК, сигнальный участок и сигнал распознающий участок связываются на наружной поверхности гранулярной эндоплазматической сети с рецептором сигнал распознающего участка (рис. 4.14-3).

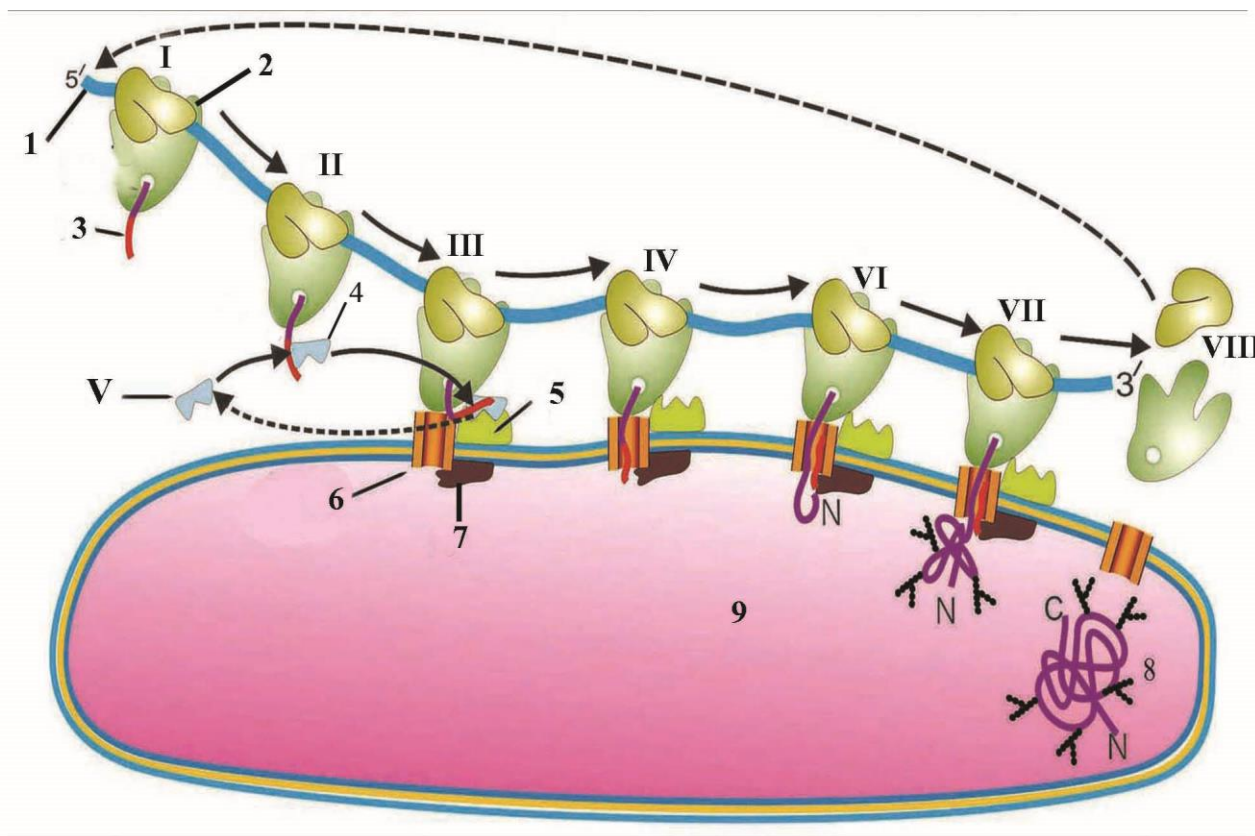


Рис.4.14. Схематический рисунок структур, участвующих в синтезе белка. Сигнальная теория. Подробное описание в тексте.

I. Синтез сигнального пептида; II. Связывание сигнального пептида с частицей распознающей сигнал, III. Связывание сигнал-распознающей частицы со своим рецептором; IV. Вхождение синтезированного белка в полость цистерны ЭПС; V. Отделение сигнального пептида от цепи основного белка; VI. Удлиняющийся полипептид; VII. Терминальный период синтеза белка; VIII. Разъединение субъединиц рибосом.

1. иРНК; 2. Рибосома; 3. Сигнальный пептид; 4. Частица распознающая сигнальный пептид; 5. Рецептор частицы, распознающей сигнал; 6. Белок Sec61; 7. Сигнальная пептидаза; 8. Синтезированный белок; 9. Цистерна ЭПС.

В составе мембраны гранулярной эндоплазматической сети наряду с рецептором сигнал распознающего участка, имеется трансмембранный белковый комплекс **Sec61**, центр которого представлен каналом, позволяющим синтезированному полипептиду войти в полость ЭПС. Как только рибосомы перемещаются от рецептора сигнал распознающего участка на белковый комплекс Sec61, сигнальный участок вместе с синтезируемым белком при помощи описанных выше каналов перемещается в центр гранулярной эндоплазматической сети (рис.4.14-4). Сигнальный участок отделяется от синтезируемого белка с помощью фермента *сигнальной пептидазы* (рис. 4.14-5) и расщепляется до аминокислот.

Субъединицы рибосом, дойдя до “стоп” кодона иРНК (рис.4.14-6), отделяются от мембраны гранулярной эндоплазматической сети и поступают в цитозоль (ис.4.14-7). Сам белок, благодаря ферментам находящимся как в полости, так и мембране гранулярной

эндоплазматической сети, подвергается следующим изменениям: формируется третичная организация, затем соединяясь с другими белками, образует белок, состоящий из нескольких субъединиц, между ними образуются дисульфидные связи, идет начало процессов их гликолизации и т.д.

Цистерны гранулярной эндоплазматической сети могут менять свои размеры в зависимости от количества синтезируемого в них белка (рис.4.13). Подвергшиеся изменению (модифицированные) белки в виде транспортных пузырьков отделяются от эндоплазматической сети в тех ее участках где нет рибосом и поступают в комплекс Гольджи. После того как рибосомы, прикрепленные своим сигнальным распознающим участком к гранулярной эндоплазматической сети, заканчивают синтез белка, они вновь возвращаются в исходное состояние для дальнейшего участия в синтезе белка (пунктирная линия на рис. 4.14).

Комплекс Гольджи

В 1898 году известный итальянский гистолог Камилло Гольджи (Camillo Golgi), используя предложенный им метод окраски нервной ткани раствором нитрата серебра, обнаружил в грушевидных клетках мозжечка (клетки Пуркинье) локализованную вокруг их ядер ранее не описанную структуру, состоящую из филаментов и гранул, которую он и представил как «внутренний сетчатый аппарат» (рис.4.15).

Т.к. окраска методом серебрения не всегда давала стабильные результаты, это стало причиной того, что открытие К.Гольджи на тот момент не было достойно оценено. Некоторые известные гистологи того времени, оседание солей серебра и осмия в околоядерной зоне воспринимали как артефакт. Но после использования в гистологии электронного микроскопа (А.Дальтон и М.Д. Феликс, 1954), было полностью подтверждено наличие комплекса Гольджи, как самостоятельной органеллы в составе всех типов клеток, за исключением эритроцитов и клеток ороговевающего эпителия.



Рис.4.15. Первый снимок, отображающий внутренний сетевой аппарат комплекса Гольджи в клетках Пуркинье мозжечка, окрашенных методом импрегнации металлами. G. Goldgi. Arch. Ital. Biol., 1898, v.30, p. 60-71.

Вместе с тем, проведенные наблюдения показали, что при окраске гистологических препаратов гематоксилином и эозином ядра окрашиваются в темный цвет, а между темно окрашенными цитоплазматическими элементами (в том числе и вокруг ядра) определяются слабо окрашенные или вовсе неокрашенные участки, которые полностью соответствуют месту расположения комплекса Гольджи. Это иногда носит название негативного окрашивания комплекса Гольджи. Следует отметить, что пластинчатый комплекс является единственной органеллой, названной в честь своего открывателя, и иногда именуется просто комплексом Гольджи. Во многих типах клеток производные комплекса Гольджи, связываясь друг с другом при помощи трубчатых структур, образуют единую структуру, окружающую ядро со всех сторон. А в поляризованных клетках эпителия, напротив, комплекс Гольджи, располагается в виде плотной стопки с одной стороны ядра. Пространство, занимаемое производными комплекса Гольджи в целом, называется **диктиосомой**.

При электронной микроскопии комплекс Гольджи выявляется 3-10-ю уплощенными мешочками (цистернами), которые располагаются вокруг ядра, вблизи центриолей, причем стенка их со всех сторон представлена непрерывающейся гладкой мембраной (рис.4.16). Срединная часть мешочков имеет сжатую форму, полость в центральной части щелевидна (до 25-ти нм), а оба конца имеют ампулярные расширения (рис. 4.16 и 4.17).

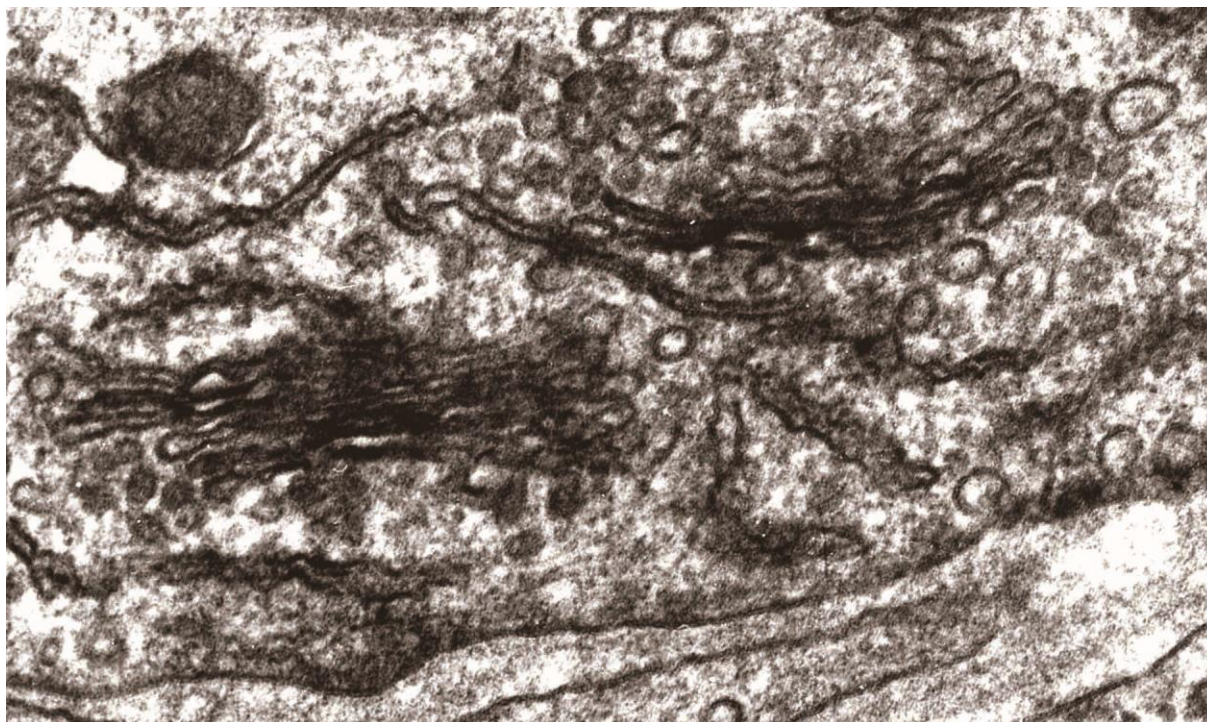


Рис.4.16. Электронно-микроскопический снимок двух комплексов Гольджи в эндотелиальной клетке. Наряду с цистернами комплекса Гольджи, видны фрагменты эндоплазматической сети и пузырьки различной формы и размера.

Так как центральные части мешочков плоские, а концы расширены, они напоминают неглубокие тарелочки. Мешочки располагаются друг над другом, а расстояние между ними

равно 30нм. Выпуклые части цистерн обращены в сторону ядра и напоминают стопку «лепешек».

В каждой стопке выделяют **цис-сторону** (цис-отдел, проксимальная сторона) – выпуклость, обращенная к ядру, **транс-сторону** (транс-отдел, дистальная сторона) – вогнутость, обращенная к клеточной мембране и **промежуточный отдел** располагающийся между ними. Указанные участки иногда соответственно называют цис-компармент, промежуточный компармент и транс-компармент (рис.4.17).

Цис-мешочки, располагающиеся на цис-стороне, отличаются сравнительно небольшими размерами и большей осмофильностью. Т.к. транспортные пузырьки, идущие со стороны эндоплазматической сети, вначале соединяются с этими мешочками, их иногда называют входом комплекса Гольджи или формирующей поверхностью.

Наибольшее количество мешочков расположено в промежуточном и транс компарментах. Разносторонняя модификация белков, липидов и полисахаридов происходит непосредственно в этой части.

Участок гранулярной эндоплазматической сети, имеющий непосредственную связь с комплексом Гольджи, а точнее отдел, в котором образуются транспортные пузырьки, по своему строению и из-за отсутствия в нем рибосом, отличается от других участков ЭПС. Учитывая это, конечную цистерну гранулярной эндоплазматической сети называют **переходной эндоплазматической сетью (ПЭС)**. Между данной структурой и цис мешочком комплекса Гольджи располагается **проксимальная трубчато-мешочковая сеть** (ближе к ядру), часто изменяющая свое строение и состав. Этот участок называют также *компарментом между комплексом Гольджи и эндоплазматической сетью, либо цис-сетью Гольджи* (рис. 4.17).

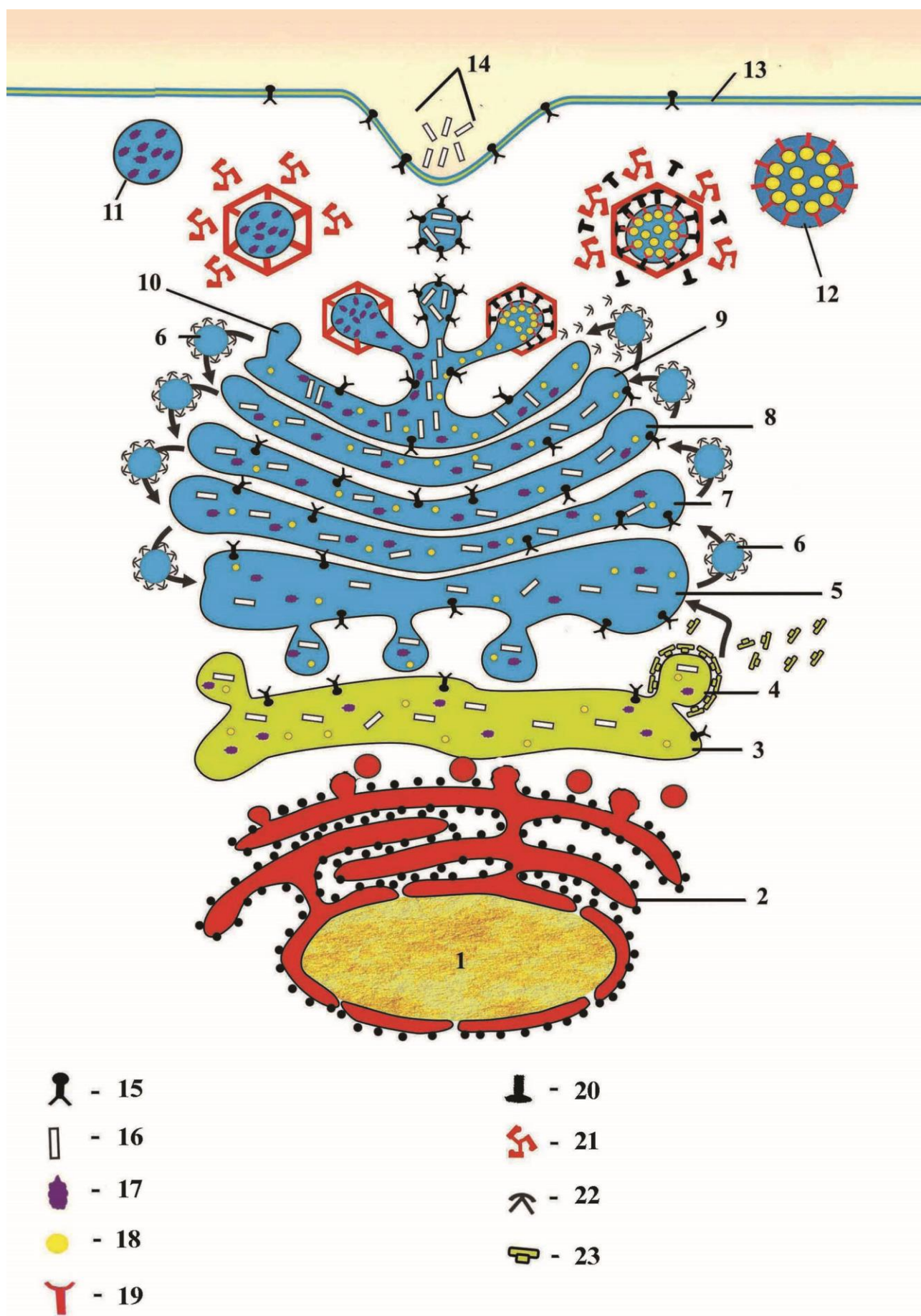


Рис.4.17. Структуры секреторного компартмента клетки. Схема.

1- ядро; 2- гранулярная ЭПС; 3- переходная ЭПС; 4- пузырек покрытый СОРІІ (coat protein); 5- проксимальная канальцевая- мешочковая сеть; 6- пузырьки покрытые СОРІ; 7- цис-сторона; 8- промежуточная часть; 9- транс-сторона; 10- дистальная канальцевая-мешочковая сеть; 11- секреторный пузырек; 12- первичная лизосома; 13- плазмолемма; 14- конститутивная секреция; 15- белок плазмолеммы; 16- белок конститутивной секреции; 17- белок регулируемой секреции; 18- лизосомальный фермент; 19- манноза-6-фосфат; 20- рецептор манноза-6-фосфата; 21-клатрин; 22- белок СОРІ; 23- белок СОРІІ.

Учитывая что участок именуемый транс-сетью Гольджи состоит из трубочек и пузырьков, то структуры, расположенные после транс мешочков комплекса Гольджи в совокупности называются **дистальной трубчато-мешочковой сетью** (отдалена от ядра). Т.о. в области диктиосомы, начиная от периферии переходной эндоплазматической сети и до наружной поверхности клетки, выделяют 5 участков, различающихся по строению и расположению:

- проксимальная трубчато-мешочковая сеть (ПТМС) или цис-сеть комплекса Гольджи;
- цис-сторона, проксимальная сторона или поверхность входа;
- промежуточный отдел, состоящий из нескольких промежуточных мешочков;
- транс-сторона, дистальная сторона или поверхность выхода;
- дистальная трубчато-мешочковая сеть (ДТМС) или транс-сеть комплекса Гольджи.

Проксимальные и дистальные трубчато-мешочковые сети являются самыми нестабильными образованиями области диктиосом (поэтому их называют также *пузырьково-трубчатыми кластерами*). Они расположены соответственно вблизи поверхности входа и выхода комплекса Гольджи, и обладают важной стратегической функцией в плане сортировки синтезируемых продуктов.

Формирующиеся на ПЭС участке гранулярной эндоплазматической сети пузырьки с СОР-ІІ покрытием (см. далее), доставляют новосинтезируемые белки к проксимальному трубчато-пузырьковому комплексу (рис.4.17). Формирующиеся в этой области пузырьки с СОР-І покрытием соединяются с цис-мешочками комплекса Гольджи и перемещают доставленные белки в их полости для дальнейшей модификации. Отсюда модифицированные белки с помощью пузырьков, образовавшихся на периферическом участке цис-мешочков, переходят в промежуточные мешочки, далее по такому же механизму в транс-мешочки и в итоге в конечный участок комплекса Гольджи – ПТМС (рис.4.17). Модификация белков происходит в основном в цис-, промежуточном и транс- мешочках (рис.4.17).

Основным направлением посттрансляционной модификации белков в комплексе Гольджи является модификация углеводной части в составе гликопротеинов синтезируемых в гранулярной эндоплазматической сети. Данный процесс происходит под воздействием ферментов с гликозидазной и гликозилтрансферазной активностью, расположенных в соответствующих цистернах или компартментах комплекса Гольджи, и завершается либо отделением, либо присоединением новых олигосахаридов к молекуле гликопротеина. Примером этого может служить отделение большей части молекул маннозы от

гликопротеинов, происходящее в цис- и промежуточных цистернах комплекса Гольджи. Некоторые авторы называют данный процесс очищением белка от “мусора”. Таким образом, именно в комплексе Гольджи формируются гликопротеины характерные для каждого типа клеток, имеющие в своем составе различные олигосахариды и в результате этого способные выполнять различные функции.

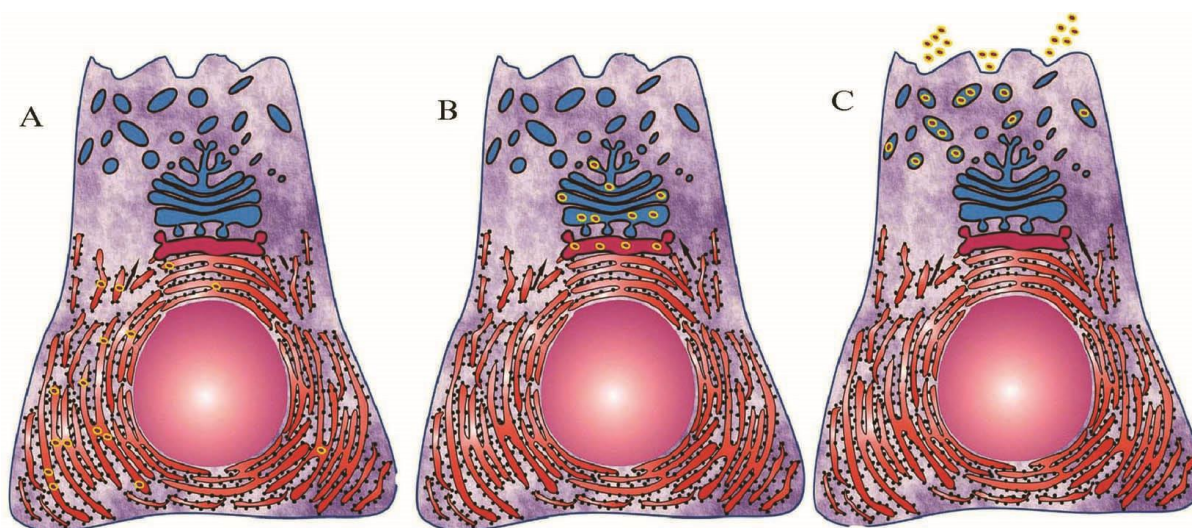


Рис.4.18. Схематический рисунок расположения в секреторной клетке поджелудочной железы молекулы белка, меченого радиоактивной аминокислотой. А – спустя 3 минуты после переноса секреторной клетки из среды с меченой аминокислотой, В – спустя 7 минут, С – спустя 2 часа. Схема составлена на основании материала полученного Дж. Паладе и сотрудниками.

Важные процессы необходимые для сортировки лизосомальных белков, также связаны с модификацией олигосахаридов в составе белков. Так, молекулы маннозы, которые должны будут поступить в состав лизосом, не только не отделяются от молекулы гликопротеина, а напротив, фосфорилируясь, превращаются в манноза-6-фосфат. Последние при помощи рецепторов манноза-6-фосфата, находящихся в ДТМС, поступают в пузырьки которые и будут участвовать в образовании лизосом (см.далее).

В результате присоединения к гликопротеинам сиаловой кислоты и галактозы, а также присоединения фосфатной и сульфатной групп к аминокислотам, в транс-цистернах комплекса Гольджи происходит синтез протеогликанов. Данные процессы также обеспечивают формирование пространственного строения белков.

Комплекс Гольджи наряду с формированием и сортировкой гликопротеинов, также принимает участие в синтезе липидов и в процессах присоединения к ним олигосахаридных групп. Следует отметить, что молекулы липидов, входящие в состав клеточной мембраны, гликолипиды и сфингомиелин синтезируется лишь в комплексе Гольджи.

Имеется два основных направления перемещения в клетке пузырьков, белков, органелл и т.д. Первое – это перемещение их от перинуклеарной части к периферии клетки. Это именуется *экзоцитозным маршрутом* или *антеградным перемещением* (движением). Второе – противоположность этого, т.е. перемещение от периферической части в сторону ядра. Последнее называется *эндоцитозным маршрутом* или *ретроградным перемещением*.

Информация об экзоцитозном перемещении белков синтезированных в гранулярной эндоплазматической сети, была впервые дана Дж.Палладе и его сотрудниками в 60-х годах. Для этого авторы на непродолжительное время поместили секреторные клетки (поджелудочной железы) в питательную среду с меченой аминокислотой, затем переместили их в обычную питательную среду и исследовали автордиографическим методом в различные периоды времени. В итоге было выявлено, что молекула белка с меченой аминокислотой располагается вначале в полости гранулярной эндоплазматической сети (спустя всего 3 минуты), затем в составе комплекса Гольджи (через 7 минут), далее в секреторных пузырьках и наконец вне клетки (через 120 минут) (рис.4.18). В результате определилось направление перемещения синтезируемых белков, но общее мнение относительно механизма этого процесса так и не сформировалось.

Перемещение синтезируемых белков и липидов в направлении комплекса Гольджи происходит путем **избирательного транспорта** (selected transport). Этот процесс был всесторонне изучен Дж.Полладе (1975). Избирательный транспорт является энергозависимым процессом и происходит при помощи специальных свободных (дискретных) структур – пузырьков (везикул).

Для обеспечения переноса груза посредством пузырьков, необходимо образование зачатка в донорском компартменте (напр. ПЭС) с последующим его полным отделением и достижением компартмента-мишени (реципиента) (напр. ПТМС), а также дальнейшим его соединением с реципиентом и высвобождением груза в его полость. Т.к. белки, участвующие в образовании стенок пузырьков донорского компартмента, являются местными (резидентными), они должны возвратиться на свои места. Т.е., должно обеспечиваться перемещение пузырьков в обоих направлениях между различными компартментами. Было выявлено соответствие между образованием описанных выше пузырьков, а также соединением их с компартментом - мишенью и процессами образования клатриновых пузырьков во время эндоцитоза, а также соединением клатриновых пузырьков с клеточной мембраной во время экзоцитоза.

Как и в случае рецептор-опосредованного эндоцитоза, в структурных производных, связанных с диктиосомой, переносимый груз после соединения со свойственным ему рецептором (поэтому данный процесс называется “избирательный транспорт”) окутывается покрытием из специализированных белков. Если во время рецептор-опосредованного эндоцитоза покрытием является клатрин и связанные с ним белковые комплексы, то в рассматриваемых нами производных - это белковые комплексы **СОР-I** и **СОР-II**. Термин СОР происходит из заглавных букв английских слов coat protein (белок покрытия). Комплексы белков СОР-I и СОР-II называют коатомер I и коатомер II соответственно (рис. 4.17).

В образовании пузырьков с СОР покрытием наряду с коатомерами, также принимают участие белки Arf1 и Sar1, имеющие ГТФ-азную активность. В обычном состоянии белки Arf1 и Sar1 находятся в соединенном с ГДФ состоянии.

Как только ГДФ под воздействием фактора изменяющего гуаниннуклеотид, замещается на ГТФ, комплексы белков коатомеров соединяясь друг с другом и с синтезируемыми веществами (грузом), присоединяются на обращенную к цитозолу поверхность

трансмембранного белка (рецептора), образуя при этом почкообразную возвышенность на донорском компартменте. Указанная возвышенность окружается со всех сторон COP-I, COP-II и связанными с ними белками и в свободном состоянии поступает в цитозоль (рис. 4.17). Когда пузырьки с COP покрытием передвигаясь с помощью микротрубочек, достигают компартмента-мишени, ГТФ находящаяся в составе белков Arf1 и Sar1, под воздействием белка активирующего ГТФ-азу превращается в ГДФ. В результате пузырьки до соединения с компартментом-мишенью, утрачивают связь с COP покрытием и превращаются в обычные пузырьки без покрытия.

Транспортные пузырьки соединяются с компартментом-мишенью при помощи белков **комплекса соединения с мишенью** (V-SNARE, t-SNARE т.д.) и высвобождают свой груз в его полость.

Пузырьки с COP-II покрытием участвуют лишь в перемещении синтезированных белков и липидов из ПЭС в ПТМС (рис. 4.17 справа). А перемещение данного груза в цис-компартмент и далее в ДТМС обеспечивают пузырьки с COP-I покрытием (рис. 4.17 слева).

Интересным является и тот факт, что белки пузырьков, перемещающихся по описанному выше маршруту, возвращаются на свои места также при помощи пузырьков с COP-I покрытием. Примером этого может служить то, что резидентные белки, перемещаясь в антеградном направлении из ПТМС, доставляются в гранулярную эндоплазматическую сеть. Избирательный характер в процессе возвращения резидентных белков связан с последовательностью аминокислот на обращенной к цитозолю поверхностью этих белков. Поэтому лишь белки, имеющие определенные аминокислотные остатки (которые являются местными для донорского компартмента), соединяясь с белковым комплексом COP-I возвращаются на свои первоначальные места. Подробную информацию об этом можно получить в современных очерках (L.Orcietol, 2003; D.Xu, J.C.Nay, 2004).

Таким образом, избирательный транспорт в цитозоле происходит при помощи COP-I, COP-II и клатринового покрытия транспортных пузырьков, которые вступая в связь с элементами цитоскелета, обеспечивают перемещение пузырьков с донорского компартмента к компартменту-мишени (реципиент). Движение пузырьков, связанных с диктиосомой, обеспечивается в основном с помощью микротрубочек и связанных с ними двигательных белков. Для подтверждения данного суждения следует отметить тот факт, что деполимеризация микротрубочек вследствие воздействия яда никодозола, является причиной мгновенного нарушения целостности всех производных входящих в комплекс Гольджи на всей протяженности цитоплазмы. Т.о., ясно видна роль микротрубочек не только в перемещении пузырьков с грузом, но и в формировании комплекса Гольджи как органеллы.

Еще одним показателем того, что данные связи являются тесными служит тот факт что вход в комплекс Гольджи – цис-сторона, располагается около ядра, вблизи от центра организации микротрубочек. По этой причине пузырьки, связанные с комплексом Гольджи перемещаются вдоль микротрубочек, располагающихся в радиальном направлении (напоминающем рельсы) между центром организации микротрубочек и клеточной мембраной до необходимой структуры. Как было сказано ранее, перемещение в сторону отрицательного конца (конец соединяющийся с центром организации микротрубочек) обеспечивается при помощи двигательного (моторного) белка динеина, а в сторону положительного конца – с помощью кинезина. Поэтому сформированные в ПЭС пузырьки с COP-II покрытием перемещаются в ПТМС при помощи динеин-тубулиновых механопреобразователей. Отсюда при помощи пузырьков с COP-I покрытием перемещаются в ретроградном направлении до цис цистерн комплекса Гольджи. Далее с помощью тех же пузырьков (с COP-I покрытием) посредством кинезин-тубулиновых механопреобразователей в антеградном направлении перемещаются к ДТМС.

В общих чертах следует отметить, что ретроградное перемещение в сторону цис-стороны комплекса Гольджи обеспечивается с помощью динеина, а обратное – anterograde перемещение в сторону плазмолеммы обеспечивается кинезином и связанными с ним белками. Благодаря описанным выше механизмам, пузырьки с СОР покрытием перемещаются между компартментами с большой скоростью (1 мкм/сек).

Последней из производных, входящих в состав диктиосомы является ДТМС. Эта сеть формируется в основном из соединенных друг с другом связанных с пузырьками трубочек. Наличие в ее составе местных (резидентных) белков указывает на то, что она является свободной структурой в области диктиосомы.

Белки, полисахариды, липиды перемещаются из комплекса Гольджи по пути экзоцитоза в ДТМС для сортировки, упаковки и доставки к месту предназначения.

Участие ДТМС в сортировке продуктов биосинтеза стало очевидно после высказывания Г. Мура и Р. Келли(1985) о существовании двух путей секреции: **регулируемого** и **не регулируемого** (конститутивного, спонтанного, самостоятельного). Секреторные белки, после упаковки их в плотные гелеобразные пузырьки (рис. 4.17, сверху слева) отделяясь избирательным путем от ДТМС, при необходимости выделяются из клетки с помощью экзоцитоза (поэтому секреция регулируемая). А синтезируемые белки клеточной мембраны упаковываются в транспортные пузырьки без покрытия (рис. 4.17 сверху в середине) и беспрерывно отделяются из цитоплазмы (поэтому секреция не регулируемая). Т.о. синтезируемые продукты после сортировки в ДТМС, упаковываясь в контейнеры различного строения, могут перемещаться в различных направлениях.

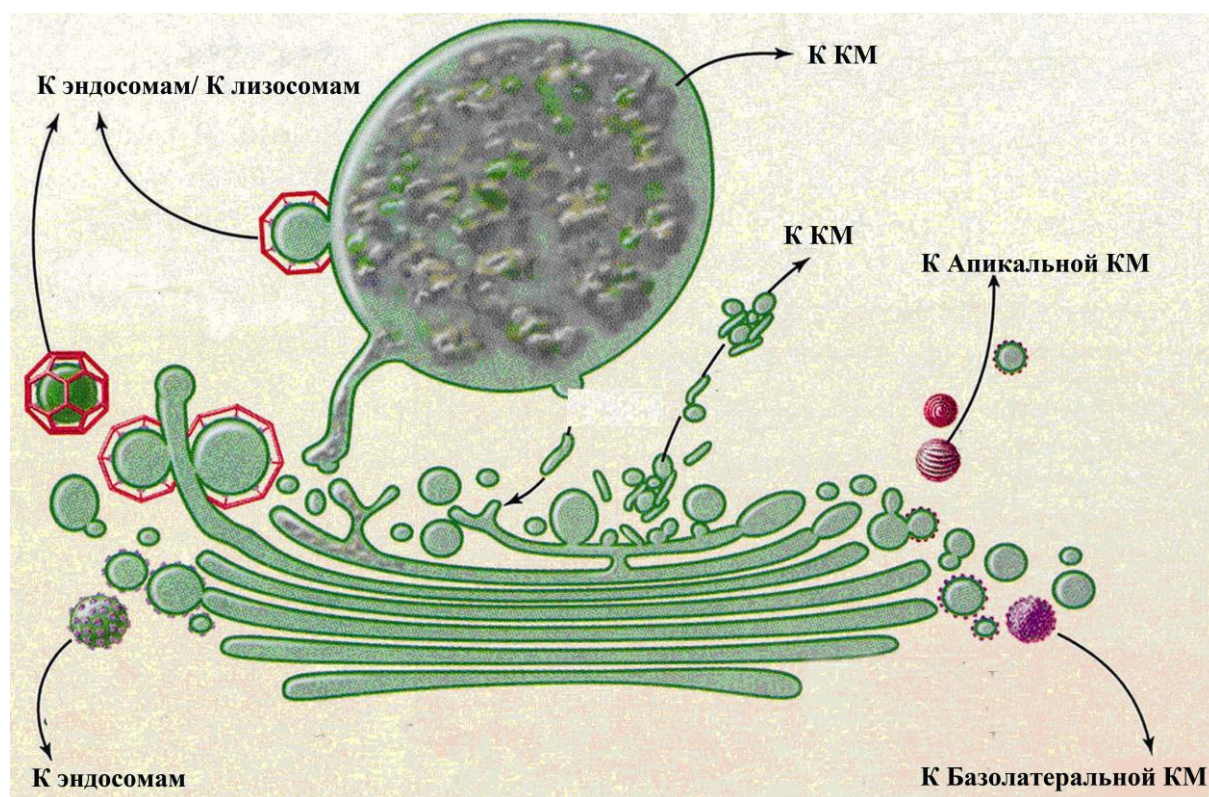


Рис.4.19. Схематический рисунок пузырьков (с покрытием и без), формирующихся в дистальной трубчато-мешочковой сети комплекса Гольджи и направление их движения. HZ

– клеточная мембрана. Схема, с небольшими поправками, взята из fig. 22-3, T.D.Pollard, W.C.Earnshaw. Ctl Biology, Philadelphia, WB. Sanders, 2002. КМ- клеточная мембрана.

Известно о формировании в ДТМС секреторных вакуолей, пузырьков с AP-1/клатриновым покрытием, липидный ”рафт” с кавеолиновым покрытием, с AP-3, AP-4 покрытиями, а также пузырьков без покрытия, участвующих в конститутивной секреции (рис. 4.19). Первые два типа участвуют в регулируемой, а остальные - в нерегулируемой (конститутивной) секреции.

Секреторные гранулы и пузырьки отделяются от ДТМС в виде больших по сравнению с другими контейнерами секреторных вакуолей. В результате деятельности находящейся в их стенке вакуолярной АТФ-азы, происходит повышение кислотности и поступление ионов Zn^{2+} , вследствие чего в полости вакуоли происходит уплотнение и загустение секрета. Наряду с этим белки, случайно попавшие в состав секреторных вакуолей посредством пузырьков с клатриновым покрытием, переносятся к сортировочным (первичным) эндосомам (рис. 4.19). В результате данных процессов происходит формирование секреторных гранул и пузырьков, имеющих плотный гелеобразный секрет. Они накапливаются в цитоплазме и высвобождаются методом экстррузии в межклеточное пространство лишь во время воздействия на клетку факторов, приводящих к повышению концентрации ионов Ca^{2+} (рис. 2.31-6).

Пузырьки с AP-1/клатриновым покрытием участвуют в сортировке ферментов (гидролаз), находящихся в полости лизосом, а так же обеспечивают процесс их перемещения к первичным (периферическим) и конечным (перинуклеарным) эндосомам (рис. 4.19).

Процесс восстановления клеточной мембраны и тесно связанных с ней образований (гликокаликс, межклеточное вещество, базальная мембрана), т.е. возврат на исходные места ресинтезированных местных белков, липидов, так же, как и доставка мембранных фрагментов (к примеру, доставка «рафтов») к соответствующим участкам осуществляется путем **непрерывного экзоцитоза (конститутивная секреция)** (рис. 4.19). Именно поэтому важную часть жизнедеятельности каждой живой клетки составляет конститутивная (не регулируемая) секреция.

Было подсчитано, что в течение часа в фибробластах с помощью эндоцитоза в цитоплазму переносится площадь плазмолеммы практически равная площади всей поверхности клеточной мембраны. Это говорит о том, что для поддержания целостности клетки, мембранные производные соответствующие идентичной площади поверхности клеточной мембраны должны быть возвращены в нее в течение часа. Если добавить к этому обмен макромолекул между отдельными органеллами, можно приблизительно представить степень интенсивности всех процессов протекающих на клеточном уровне с участием пузырьков.

Конститутивные секреторные пузырьки имеют различную форму, зависящую от размера переносимых ими белков. Белки малых размеров переносятся к клеточной мембране в форме шарообразных пузырьков, а белковые комплексы (напр. протеогликианы) – в форме палочкообразных. Исследования, проведенные в последнее время с применением меченных

зеленых флюоресцентных белков, показало, что груз с вновь синтезированными белками от ДТМС к мембране переносится как с помощью маленьких пузырьков, так и с помощью пузырьков сравнительно большего размера.

В *полярных и не полярных клетках* (напр. в эпителии) процессы переноса груза от ДТМС к клеточной мембране имеют значительные отличия. Так, плотные контактные связи, расположенные на обращенных друг к другу поверхностях клеток эпителия (рис.2.25), не позволяют белкам, входящим в состав клеточной мембраны перемещаться с апикальной поверхности в базолатеральную и наоборот. Поэтому белки и липиды свойственные данным участкам доставляются к месту назначения другими механизмами. Было выявлено, что «рафты» (см. ранее) и фрагменты клеточной мембраны, имеющие в своем составе белок кавеолин, после синтеза в комплексе Гольджи с помощью соответствующих пузырьков (рис.4.19) поступают в состав клеточной мембраны лишь апикальной поверхности эпителиальных клеток. Наряду с этим местные (резидентные) белки и липиды базолатеральной мембраны доставляются из ДТМС к месту назначения при помощи пузырьков с AP-4 покрытием (рис. 4.19).

В то же время белки, отделившиеся с помощью специальных пузырьков от одной части (напр. базолатеральной) мембраны полярных клеток, могут перемещаться к ее другой поверхности (напр. апикальной). Это процесс называется **транцитозом**. К примеру в гепатоцитах все вновь синтезированные белки поступают в состав базолатеральной мембраны, после чего они сначала переносятся с помощью специальных пузырьков к ранним эндосомам (см.далее), а далее в состав апикальной мембраны.

Продукты биосинтеза переносятся из ДТМС к эндосомам с помощью избирательного белка AP-3 (рис. 4.19). Пузырьки, образующиеся с участием белков AP-3 и AP-4, в отличие от белков AP-1 и AP-2 не имеют клатринового покрытия.

Эндосома

Сортировка груза, поступившего в результате простого и рецептор-опосредованного эндоцитоза, расщепление его до конечных продуктов, а также доставка его к лизосомам, осуществляется при помощи структур именуемых **эндосомальным компартментом**. Этот компартмент состоит из трубчатообразных, пузыреобразных и вакуолеобразных структур.

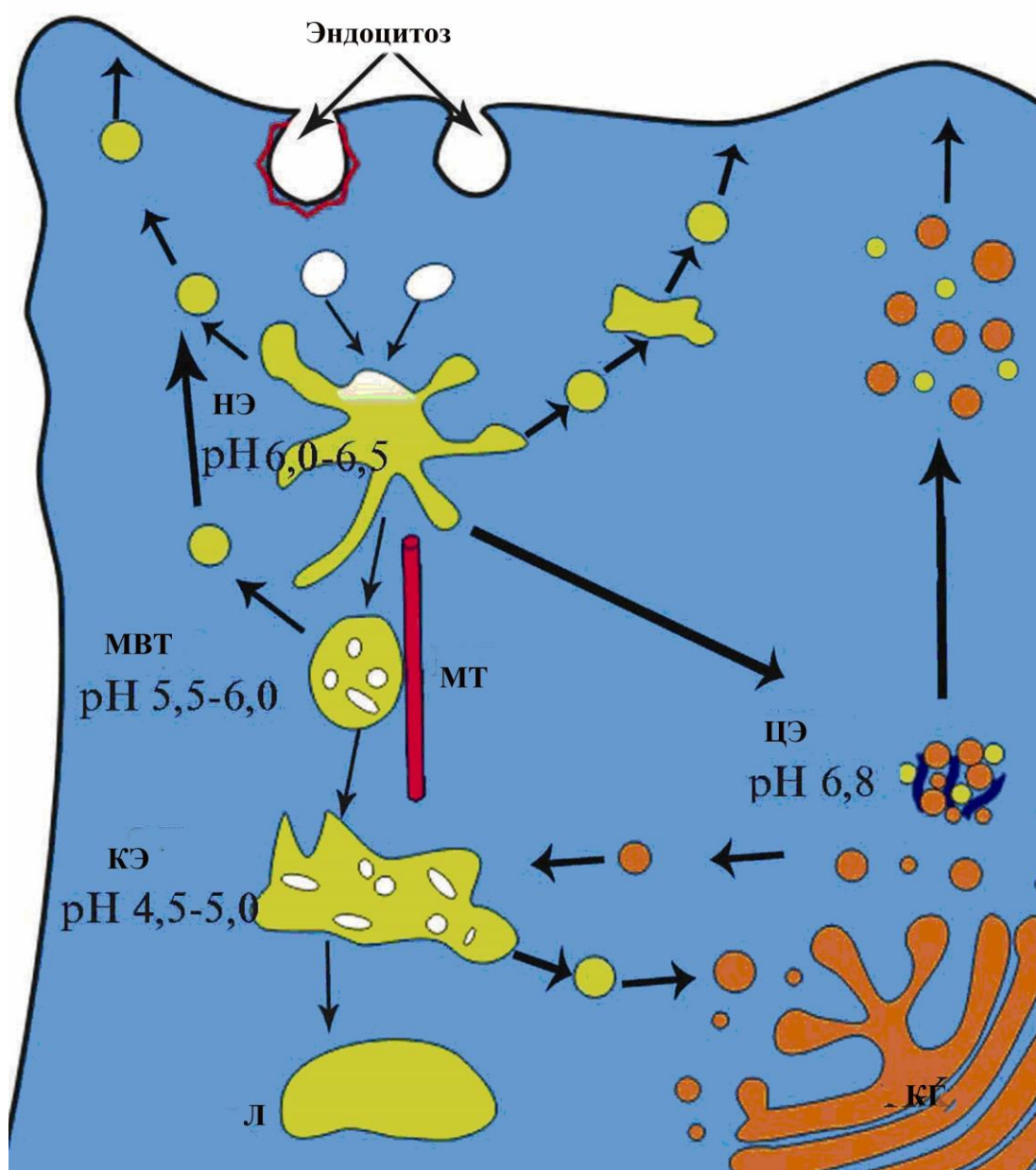


Рис.4.20. Схема процессов, происходящих во время перемещения в сторону лизосом образований, поступивших в цитозоль посредством эндоцитоза и направление возврата элементов клеточной мембраны (фосфолипидов, белков, особых рецепторов, «рафтов» и т.д.). НЭ – начальная эндосома; МВТ – мультивезикулярное тельце; МТ – микротрубочка; ЦЭ – циркулирующая эндосома; КЭ – конечная эндосома; Л – лизосома; КГ – комплекс Гольджи.

При помощи электронно-микроскопического и иммуногистохимического методов было выявлено 4 вида эндосом: ранняя или сортировочная, циркулирующая, мультивезикулярное тельце и поздняя эндосома (рис. 4.20). Единого мнения о взаимосвязи данных эндосом нет. Одни авторы считают, что каждая из указанных эндосом является самостоятельной органеллой и связаны они друг с другом только с помощью специальных эндосомальных пузырьков. Другие авторы рассматривают их как промежуточный продукт процесса созревания эндосом. По мнению же некоторых авторов, данные эндосомы являются

специализированными частями единого эндосомального компартмента, каждые из которых выполняют определенные функции.

В результате деятельности протонных насосов (вакуолярная H^+ /АТФ-аза), находящихся в составе мембран, окружающих эндосомы, в их полости образуется кислая среда. Причем кислотность постепенно нарастает от ранней эндосомы и до поздней. Так, рН в ранней эндосоме составляет 6.0-6.5, в мультивезикулярной – 5.5-6.0, а в поздней равна 4.5-5.0. Сортировка липидов и белков в основном связана с формой структур, участвующих в образовании эндосомального компартмента и от степени кислотности в их полости.

Пузырьки с клатриновым покрытием, образовавшиеся во время рецептор-опосредованного эндоцитоза, теряют свое покрытие и соединяются с ранней эндосомой. **Ранняя эндосома** состоит из трубчатообразных, пузыреобразных, вакуолеобразных структур и располагается вблизи ядра (рис. 4.20 и 4.21).

Как только пузырьки, образовавшиеся в результате рецептор-опосредованного эндоцитоза, соединяются с ранней эндосомой, вследствие воздействия кислой среды лиганд отделяется от рецептора (напр. рецепторы липопротеинов с низкой плотностью) и поступает в полость эндосомы, а рецепторы остаются на ее оболочке. Впоследствии рецепторы скапливаются в трубчатообразных, а растворенные лиганды в вакуолеобразных участках ранней лизосомы.

Рецепторы, скопившие в трубчатообразных частях ранней эндосомы, напрямую, либо посредством **циркулирующих эндосом**, возвращаются в состав клеточной мембраны (рис. 4.20). Циркулирующие эндосомы имеют трубчатообразную структуру и располагаются вокруг ядра, вблизи комплекса Гольджи. Они, наряду с ранними эндосомами, участвуют в возврате в состав клеточной мембраны липидов и белков, поступивших и из других источников.

Вакуолеобразные участки ранних эндосом с находящимися в их полости лигандами, перемещаются вдоль микротрубочек в сторону перинуклеарной области. Тогда в результате инвагинации окружающей их мембраны образуется **мультивезикулярные тельца**, состоящие из множества канальцев и пузырьков (рис. 4.20 и 4.21). Параллельно с этим возрастает степень кислотности их полости, продолжается циркуляция рецепторов в направлении ДТМС и клеточной мембраны, а в полость мультивезикулярных телец из ДТМС с помощью специальных пузырьков доставляются лизосомальные гидролазы. В итоге формируются **поздние эндосомы**, полностью готовые к соединению с лизосомами (рис. 4.20 и 4.21). Описанные процессы в целом также называют *созреванием эндосом*. Лиганды (напр. липопротеины с маленькой плотностью), вошедшие в полость ранней эндосомы, в течение нескольких минут доставляются в полость поздней эндосомы. В противовес этому белок трансферрин, участвующий в переносе ионов Fe^{3+} , в составе специальных пузырьков, при помощи экзоцитоза покидает клетку.

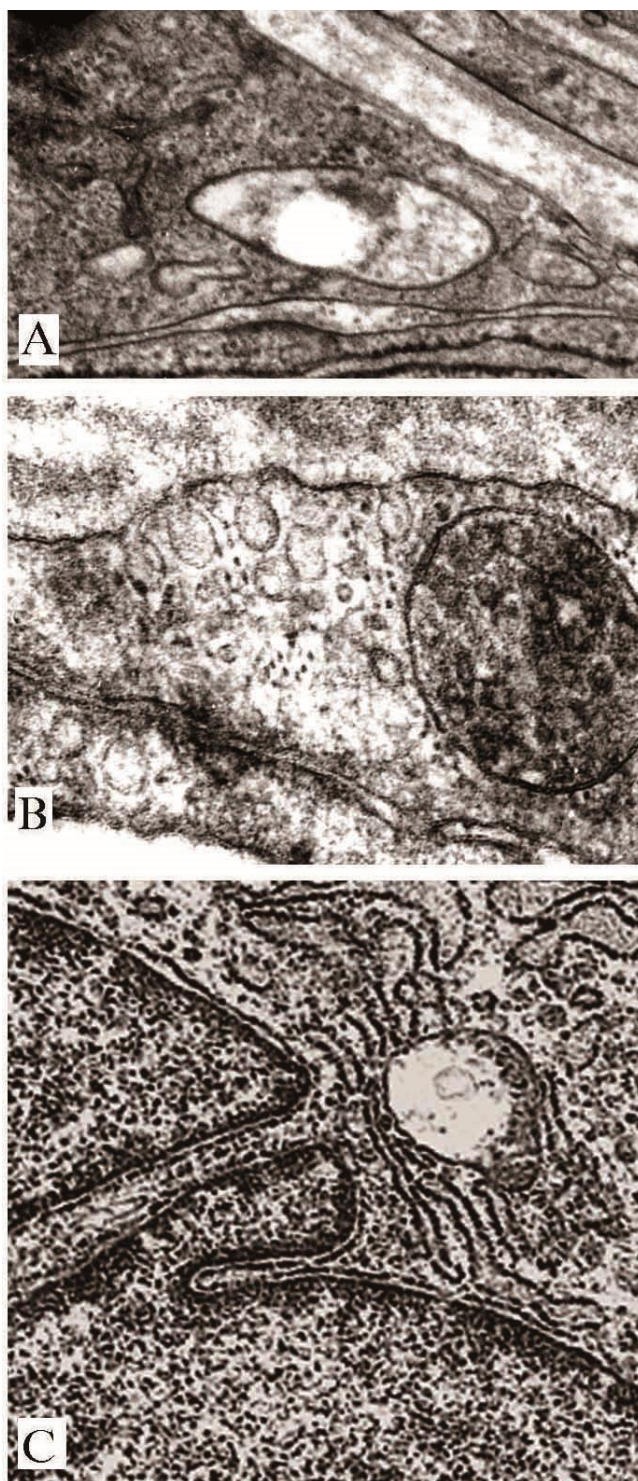


Рис.4.21. Электронно-микроскопический снимок начальной эндосомы (А), мультивезикулярного тельца (В) и конечной эндосомы (С), относящихся к эндосомальному компартменту.

Кроме того, множество факторов роста (напр. эпидермальный фактор роста) вместе с соединенными с ними рецепторами, доставляются в эндосому для расщепления. Т.о., при помощи отсоединения комплекса лиганд-рецептор от клеточной мембраны, создается еще одна возможность для регулирования ответных реакций на определенные группы факторов.

Циркуляция и переваривание клеточных биополимеров

В то время как продолжительность жизни большинства клеток организма исчисляется неделями, месяцами и годами, период полураспада (half-lives) составляющих их биополимеров исчисляется часами и днями. К примеру, период полураспада иРНК у млекопитающих составляет от 30-ти минут до 20-ти часов. Поэтому для жизнедеятельности каждой клетки необходима непрерывная циркуляция составляющих ее частиц.

Во время этого оборота с одной стороны расщепляются отработавшие и вышедшие из строя молекулы, с другой – молекулы, изменившие свою структуру, форму, топографическое положение и т.д. в результате нарушений процесса синтеза и прочих воздействий. Важным условием для осуществления данных процессов является сохранение определенного равновесия между процессами синтеза и расщепления биополимеров. Было подсчитано, что 40% от общего количества белков в составе печени крысы полностью заменяются новыми в течение лишь одного дня.

Производные, поступившие в клетку при помощи эндоцитоза, также подвергаются расщеплению. Во время этих процессов, также как и в пищеварительном канале, происходит расщепление биополимеров до конечных продуктов (напр., до аминокислот в случае белков). Это именуется **внутриклеточным пищеварением**.

Внутриклеточное пищеварение осуществляется при помощи специализированных органелл расположенных в цитоплазме – *лизосом* и *протеасом*. Если в случае протеасом осуществляется расщепление белка до пептидов, состоящих из 7-9 аминокислот, то под воздействием лизосомальных ферментов происходит расщепление всех биологических макромолекул до конечных продуктов. По этой причине лизосомы считаются центром внутриклеточного пищеварения.

Лизосомы

Лизосомы относятся к мембранным органеллам (к вакуолоплазме) и встречаются во всех типах клеток кроме эритроцитов. Первая информация о существовании лизосом была дана Кристианом де Дювом (Christian de Duve) и его сотрудниками во время дифференциального центрифугирования элементов клеток печени крысы. Авторы обнаружили мелкие частицы по способности осаждаться схожие с митохондриями, содержащие ферменты гидролазы (в т.ч. фермент-кислую фосфатазу), расщепляющие биологические макромолекулы исключительно с участием воды и назвали их лизосомами (lisis-растворение; soma-тело). В настоящее время при исследованиях, как на светооптическом, так и электронно-микроскопическом уровне, маркерной меткой для лизосом является определение в них активности фермента кислой фосфатазы (β -глицерилфосфатаза).

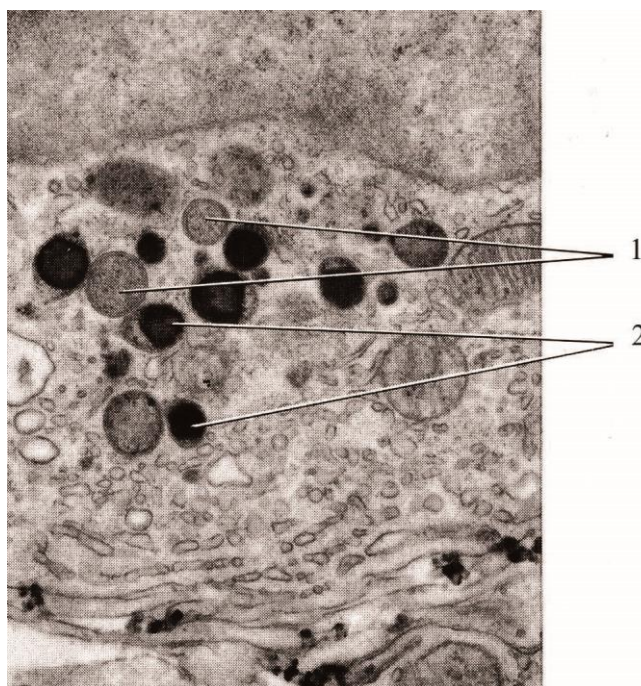


Рис.4.22. Электронно-микроскопический снимок первичных (1) и вторичных (2) лизосом в макрофаге крысы (А.W. Ham, D.H.Cormak. Histology. 8th ed. (переведенная на русский язык) 1982, v. 1, p.204, fig.5-36).

Лизосомы имеют шаровидную или эллипсоидную форму (рис.4.22) и содержат в своем составе более 60-ти ферментов кислых гидролаз, имеющих протеазную, рибонуклеазную, дезоксирибонуклеазную, липазную, сульфатазную, гликозидазную и пр. активность.

По морфометрическим и электронно-микроскопическим параметрам, а также по функциональной активности лизосомы делятся на два вида: первичные и вторичные лизосомы.

Первичные лизосомы – это пузырьки, имеющие в составе особые специализированные белки и утратившие клатриновое покрытие после отсоединения от дистальной трубчатомешочковой сети. Расположенная в их полости гомогенная зернистая структура состоит из неактивных ферментов (прогидролаз). Диаметр большинства первичных лизосом колеблется от 0,025 до 0,5 мкм. Лизосомы размером 0,5 мкм и поэтому хорошо различимые в световом микроскопе встречаются лишь в составе макрофагов и нейтрофилов. Наличие в составе первичных лизосом ферментов в неактивной форме свидетельствует об их участии во внутриклеточном пищеварении.

После активации ферментов входящих в состав первичных лизосом, они соединяются с окружающими их поздними эндосомами или фагосомами (см.далее) и образуют **вторичные лизосомы**. Они более крупных размеров и при электронной микроскопии в их составе обнаруживаются активированные гидролазы и соответствующие различным этапам продукты расщепления, имеющие гетерогенную структуру.

Формирование лизосом. Некоторая информация о синтезе, гликозилировании и фосфорилировании гидролаз, входящих в состав лизосом, была дана при описании гранулярной эндоплазматической сети и аппарата Гольджи (см. ранее). В дополнение следует указать, что лизосомальные гидролазы синтезируются в виде не активных

прогидролаз (рис. 4.17 в форме красных шариков). Как и в случае прочих синтезируемых белков (секреторные белки, белки клеточной мембраны), в белковую цепь прогидролаз олигосахариды присоединяются в гранулярной эндоплазматической цепи. Однако, еще в полости эндоплазматической сети в посттрансляционной модификации прогидролаз наблюдаются значительные отличия, по сравнению с прочими белками. В основе этого отличия лежит формирование **лиганда манноза-6-фосфат**, необходимого для сортировки лизосомальных белков в ДТМС диктиосомы. Для этого при участии фермента **фосфотрансферазы** в гранулярной эндоплазматической цепи происходит присоединение группы N-ацетилглюкозамина фосфата к молекуле маннозы, находящейся в 6-м положении. В дальнейшем это соединение, перемещается от цис-компартамента комплекса Гольджи к транс-компарменту. Здесь с участием фермента **фосфоглюкозидазы** происходит отсоединение N-ацетилглюкозы, в результате чего в углеводной цепи прогидролаз формируется остаток манноза-6-фосфат.

В ДТМС лишь прогидролазы, имеющие данный остаток, образуют связь с **рецептором манноза-6-фосфат (М6ФР) интегральных белков**. Данные белки располагаются в составе мембраны, окружающей ДТМС. После того как их участок, обращенный в полость сети, образует с прогидролазами лиганд-рецепторную связь, они меняют свое месторасположение и размещаются на определенном участке вакуолоподобной части (рис. 4.17, в ДТМС справа вверху). М6ФР интегрального белка концом, обращенным к цитозолю образует связь с белком AP-1, который в свою очередь образует связь с клатрином, после чего пузырьки с клатриновым покрытием, имеющие в своей полости прогидролазы поступают из ДТМС в цитозоль. После того, как данные пузырьки теряют в цитозоле свое клатриновое покрытие они, как сказано выше, называются первичными лизосомами (рис. 4.17, вверху справа).

Основным условием для отделения прогидролаз от М6ФР интегрального белка, а также для перехода их из пассивного состояния в активное, является образование кислой среды в полости лизосом. Для этого в мембране, окружающей лизосомы, располагаются специальные насосы (вакуолярная H^+ -АТФ-аза). В результате деятельности данных насосов кислотность в полости лизосом постепенно возрастает. Как только она достигает pH 5.5-6.0, М6ФР интегральный белок отделяется от прогидролаз, и с помощью специальных пузырьков возвращается в ДТМС. А когда кислотность в полости первичных лизосом достигает pH 4.5-5.0, от остатка манноза-6-фосфат, находящегося в составе прогидролаз, отделяется фосфатная группа. После этого лизосомальные ферменты готовы к расщеплению необходимых веществ.

Пузырьки с AP-3 покрытием (без участия клатрина) также участвуют в переносе лизосомальных проферментов. Данные пузырьки формируются благодаря образованию специальных связей между комплексом белка AP-3 и обращенным к цитозолю концом белка М6ФР, расположенного в вакуолярном участке ДТМС. При помощи пузырьков с AP-3 покрытием прогидролазы переносятся в полость поздних эндосом (рис. 4.19, внизу слева).

Следует отметить, что комплексы белков AP-1 и AP-3 играют важную роль не только в сортировке белков М6ФР, соединенных с прогидролазами, но и в сортировке белков, входящих в состав мембран, окружающих лизосомы и поздние эндосомы. В результате этого обеспечивается включение в мембрану лизосом и поздних эндосом специальных

белков, имеющих кислые свойства и богатых олигосахаридами, благодаря чему они оказываются устойчивыми к воздействию протеаз. Еще одной особенностью мембран, окружающих лизосомы и поздние эндосомы, является наличие в них, наряду с холестерином, большого количества редко встречающегося фосфолипида – *лизобифосфатидной кислоты*.

Тот факт, что лизобифосфатидная кислота располагается в основном на внутренней поверхности мембраны, свидетельствует о том, что она является устойчивой к гидролитическому воздействию ферментов, расположенных в стенках лизосом и поздних эндосом.

В норме оболочка, окружающая лизосомы и поздние эндосомы препятствует поступлению в цитозоль гидролаз, находящихся в их полости. Важную роль в защите цитоплазматических структур от воздействия лизосомальных ферментов играет также нейтральная среда (pH 7.0-7.3) цитозоля, которая резко снижает активность гидролаз.

Однако при воздействии на организм определенных факторов (высокая температура, ионизированное облучение, гипоксия, частицы пыли, некоторые канцерогены, некоторые лекарственные средства и т.д.), нарушается проницаемость мембраны лизосом, в результате чего активные гидролазы поступают в цитозоль и являются причиной как функциональных изменений в клетке, так и ее смерти. Также предполагается, что дегенеративные изменения, именуемые **аутолизом**, протекающие в клетке после биологической смерти, образуются в результате воздействия лизосомальных ферментов. Не случайно, что некоторые авторы называют лизосомы “бочкой-самоубийцей”.

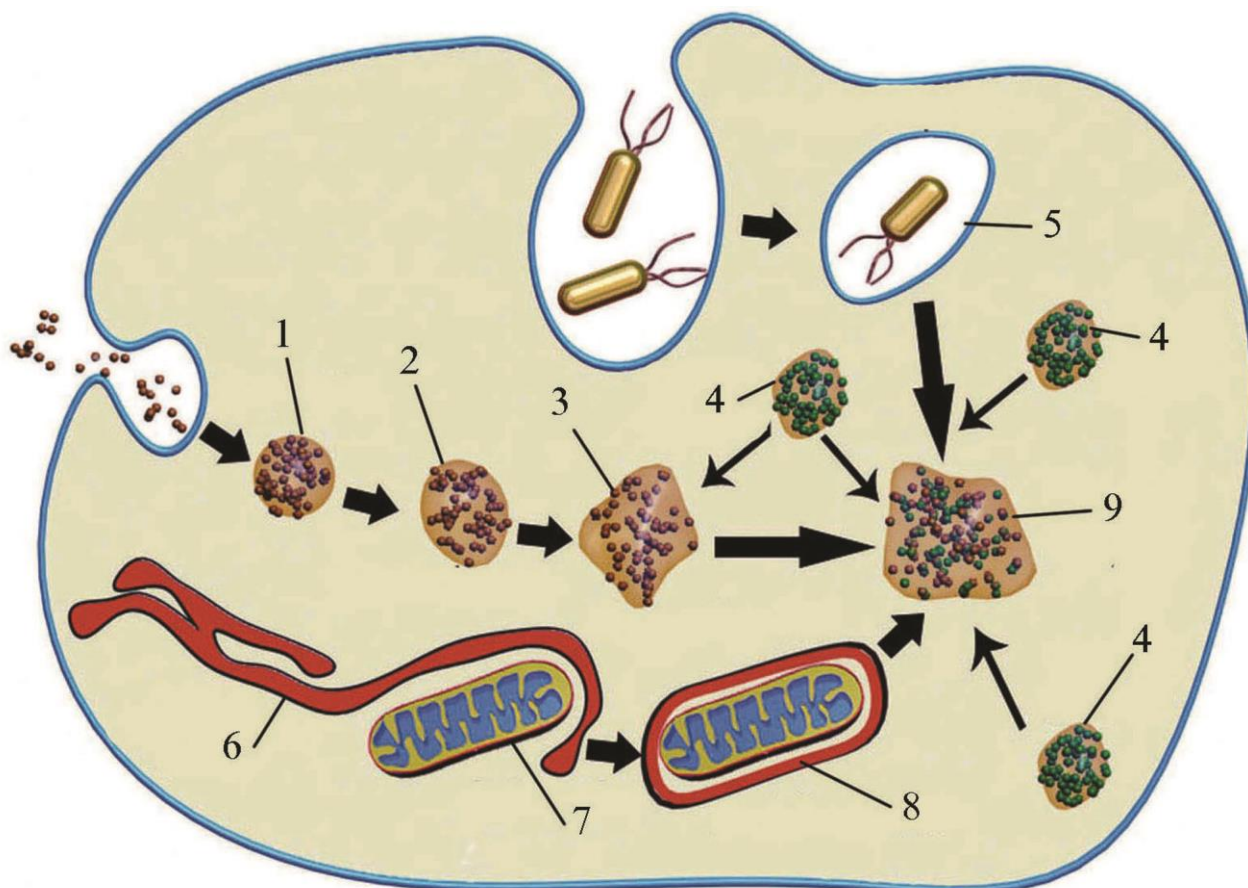


Рис.4.23. Взаимоотношение первичных и вторичных лизосом со структурами, сформировавшихся при эндоцитозе, фагоцитозе и аутофагии. Схема.

1- эндоцитоз; 2- первичная эндосома; 3- зрелая эндосома; 4- первичная лизосома; 5- гетерофагосома; 6- гладкая ЭПС; 7- митохондрия; 8- аутофагосома; 9- вторичная лизосома.

Лизосомы участвуют в клеточном переваривании производных как экзогенной (поступившие в цитоплазму извне) так и эндогенной (составляющие части цитоплазмы) природы (рис.4.23). Первый процесс именуется – **гетерофагией**, а второй – **аутофагией**. В обоих процессах материал, подвергаемый расщеплению находится в цитоплазме в виде структур окруженных оболочкой – **фагосом**, соответственно **гетерофагосом** и **аутофагосом**. С момента когда одна или несколько первичных лизосом соединяются с гетеро- или аутофагосомами и высвобождают активированные ферменты гидролаз в их полость, начинается процесс внутриклеточного пищеварения. В это время при электронной микроскопии в цитозоле обнаруживаются имеющие гетерогенную структуру **фаголизосомы** (различной формы и плотности) – вторичные лизосомы (рис. 4.23).

Конечные продукты расщепления биополимеров, образовавшиеся под воздействием гидролаз, поступают в цитозоль при помощи белков-переносчиков, расположенных в мембране фаголизосом и используются в синтезе новых биологических макромолекул. После завершения процесса переваривания в составе лизосом остаются не подвергшиеся перевариванию остатки: липидные пигменты, миелоноподобные тельца, асбест, частицы силиката, обломки клетки и т.д., которые называются **остаточные тельца**. Т.к. остаточные материалы в них постепенно уплотняются, остаточные тельца имеют более маленькие по сравнению с фаголизосомами размеры. Материал, находящийся в полости остаточных телец либо выводятся из клетки при помощи экзоцитоза, либо, соединяясь друг с другом, скапливаются в виде агрегатов различных в световой микроскоп. Примером могут служить богатые липидами и имеющие желтовато-золотистый оттенок **гранулы липофусцина** (пигмент старения), обнаруживающиеся в клетках с продолжительным сроком жизни (нервные клетки, клетки печени и сердечной мышцы).

В составе гетерофагосом, образовавшихся при помощи эндоцитоза, обнаруживаются бактерии, грибки, клетки окончившие жизнедеятельность, частицы клеток, утративших свою целостность, межклеточные структуры, частицы пыли и т.д. А в составе аутофагосом наряду с веществами растворенными в цитозоле, обнаруживаются также гранулы гликогена, рибосомы, части гранулярной эндоплазматической сети и т.д. Аутофагосомы в цитозоле образуются при помощи двух способов: микроаутофагии и макроаутофагии.

Во время **микроаутофагии** в отдельных местах мембраны эндосом или лизосом образуются пузырьки или впячивания с веществами растворенными в окружающем цитозоле.

А во время **макроаутофагии** относительно крупные образования расположенные в цитозоле (см.выше), окутываясь при помощи выростов периферических участков гладкой эндоплазматической сети, образуют аутофагосому, окруженную со всех сторон двухслойной мембраной.

Имеется еще один вид доставки к лизосомам производных, расположенных в цитозоле – **криниофагия**. В этом случае первичные лизосомы соединяются непосредственно с секреторными гранулами, расположенными в клетке, и расщепляют биологически активные вещества до конечных продуктов. Во время криниофагии расщеплению подвергаются с одной стороны не использованные секреторные гранулы, а с другой стороны – секреторные, по каким либо причинам изменившие свой состав. Примером может служить расщепление лизосомами гранул гормона пролактина в маммотропных клетках передней доли гипофиза матери, после прекращения грудного вскармливания ребенка.

Лизосомы некоторых клеток с помощью экзоцитоза доставляют ферменты, находящиеся в их составе в межклеточное пространство. Примером может служить поступление в межклеточную среду фермента коллагеназы, синтезируемого костеразрушающими клетками (остеокластами), которые участвуют в расщеплении коллагеновых волокон в межклеточной среде в процессе формирования костей. В то же время чрезмерное поступление лизосомальных ферментов в межклеточную среду является причиной начала воспалительного процесса в суставах (артритов).

Роль лизосомальных ферментов в клеточном метаболизме отчетливо видна во время патологических процессов, возникших в результате нарушения их синтеза. В настоящее время известно две группы болезней, связанных с лизосомами. Одна из них – **болезнь клеточных включений** (*inclusion cell disease*), вторая – **лизосомные болезни накопления** (*lysosomal storage disorders*).

В случае болезни клеточных включений (ее также называют *I-клеточная болезнь*), из-за отсутствия в комплексе Гольджи фермента трансферазы в составе прогидролаз отсутствует группа манноза-6-фосфат (см. ранее). Поэтому несмотря на то, что ферменты гидролаз при помощи экзоцитоза покидают клетку, они не могут поступать в состав лизосом. У таких больных в клетках начинают скапливаться зернистые включения, которые приводят к их функциональным нарушениям. Клинически у таких больных наблюдается физическое недоразвитие и отставание интеллекта.

В случае лизосомных болезней накопления, в результате мутации генов не синтезируется один или несколько лизосомных ферментов. Поэтому макромолекулы, которые должны были расщепляться данными ферментами, накапливаются в клетке. Количество лизосом с нерасщепленными макромолекулами постепенно возрастает, что приводит вначале к функциональным нарушениям, а в итоге и к деструктивным изменениям в клетке. В настоящее время известно около 30-ти лизосомных болезней накопления, передающихся по наследству. Среди них всесторонне изученными являются – болезнь Тей-Сакса и болезнь Помпе.

Во время **болезни Тей-Сакса** в лизосомах наблюдается нехватка фермента гексоаминидазы А, вследствие чего в нервных клетках накапливаются лизосомы, имеющие в своем составе много нерасщепленных GM2-ганглиозидов. У детей, страдающих данной болезнью наблюдается недоразвитие нервной системы и продолжительность их жизни составляет не более 3х лет.

Во время **болезни Помпе** в составе лизосом не обнаруживается фермент α -глюкозидаза, участвующий в расщеплении молекул гликогена до глюкозы. В результате этого в

поперечнополосатых мышцах, сердце и мозге обнаруживается большое количество скопившегося гликогена. Данная болезнь обнаруживается в раннем возрасте и проявляется увеличением печени (гепатомегалия).

Протеасомы

Если лизосомы участвуют в переваривании различных биополимеров, то протеасомы расщепляют лишь отдельные молекулы белков. К последним относятся – нормальные белки, завершившие свою функцию (обладающие непродолжительным сроком жизни), либо белки, подвергшиеся денатурации, принявшие неверную конфигурацию, не свойственные клетке (антигены) и т.д. В отличие от лизосом протеасомы располагаются как в цитоплазме, так и в нуклеоплазме. В одной клетке насчитывается около 30 тыс. протеасом.

Протеасомы состоят из больших белковых комплексов (26S), имеют в центре цилиндрическую **сердцевину** (20S), а на концах с одной или с обеих сторон, располагаются **верхушки** неопределенной формы (рис. 4.24). У млекопитающих длина сердцевин составляет 15 нм, диаметр – 11 нм, в центре находится полость размером 5 нм, имеющая 4 сужающиеся части. При помощи данных сужений полость разделяется на три части. Ферменты, имеющие протеолитическую активность и расщепляющие белки до пептидов располагаются в β -субъединицах, окружающих центральную камеру (см.ниже).

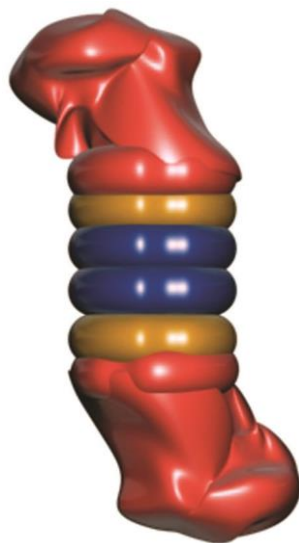


Рис.4.24. Модель пространственного строения протеасомы (26S). Сверху и снизу располагаются верхушки (красного цвета). В центре находится сердцевина (20S), состоящая из α – субъединиц (желтого цвета) и β – субъединиц (синего цвета).

Стенку сердцевин составляют 4 белковых кольца, каждый из которых состоит из 7 субъединиц. В двух центральных кольцах расположены β -субъединицы (рис.4.24, синего цвета), а в крайних – α -субъединицы (рис. 4.24,желтого цвета).

Верхушечная часть протеасом состоит из регулирующих белковых комплексов. Она участвует в доставке белков, предназначенных для расщепления, к каналу внутри сердцевин, а также в выводе пептидов, являющихся продуктами расщепления.

Следует отметить что белки, предназначенные для расщепления (белки-мишени), могут образовывать связи с протеасомами лишь после соединения (мечения) их с белком **убиквинтином**. Он был выявлен многими авторами и описывался под различными названиями. Однако в 1980-ом году К.Д. Вилкинсон с сотрудниками предложили назвать его убиквинтин (Ubique – везде, повсюду).

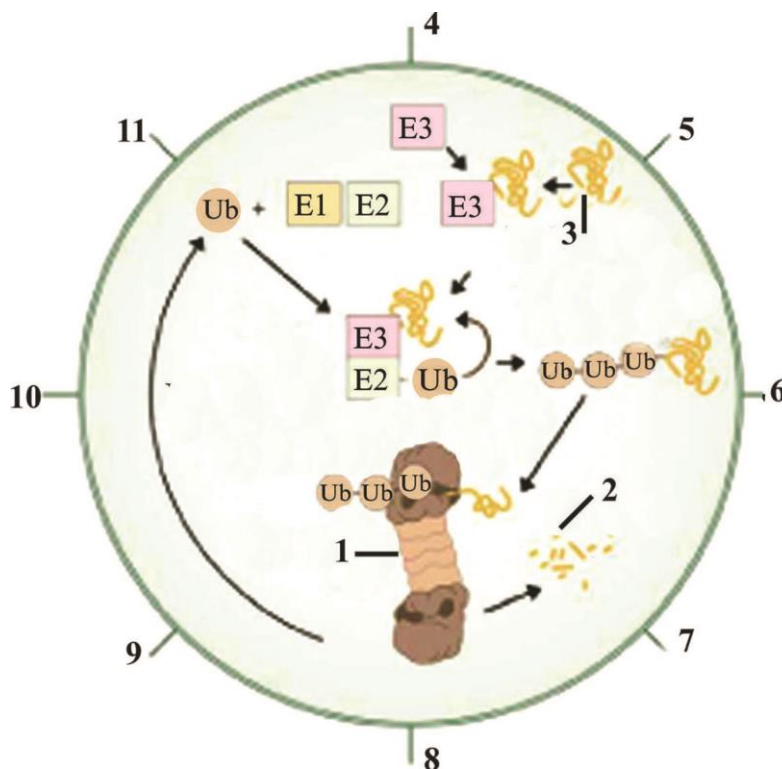


Рис.4.25. Схематический рисунок механизма убиквитин-опосредованного расщепления белка и участия данного процесса в жизнедеятельности клетки. The Nobel Prize in Chemistry 2004 Advanced information <http://nobelprize.org/chemistry/laureates/2004/chemadv04.pdf>

1- протеасома; 2- пептиды; 3- белок-мишень; 4- определение транскрипции; 5- репарация ДНК; 6- модуляция рецепторов; 7- метаболизм; 8- контроль за качеством; 9- передача сигнала; 10- иммунный ответ; 11- клеточный цикл.

Убиквинтин является небольшим белком, состоит из 76 аминокислот и имеет неизменную структуру. Мечение белков-мишеней убиквинтином называется процессом **убиквинации** и протекает этот процесс в три этапа (рис.4.25).

На *первом этапе* фермент E1 (E – взято от начальной буквы английского слова *enzym*, обозначающего фермент) с помощью энергии АТФ присоединяет убиквинтин (Ub) к своей сульфгидрильной группе (SH), тем самым активировав его (E1- S- Ub). Поэтому фермент E1 называют - **убиквинтин связывающий фермент**. Далее, без участия АТФ, фермент E1 замещается E2- **убиквинтин переносящим ферментом** (E2- S- Ub).

На *втором этапе* фермент E3 соединяется сначала с белком-мишенью, а после с E2- S- Ub. Фермент E3, имеющий убиквитин-лигазную активность, соединяет находящийся в составе данного комплекса убиквинтин с белком-мишенью. Т.к. данный процесс повторяется, фермент E3, играющий роль катализатора, обеспечивает присоединение нескольких молекул убиквтина к белку-мишени. (рис 4.24). Следует отметить, что белки-

мишени, соединившиеся лишь с одной молекулой убиквентина, не образуют связь с протеасомами.

Во время третьего этапа подвергшиеся убиквинации белки-мишени теряют связь с ферментом E3 и с этого момента они называются “мечеными” белками. Метки (полиубиквентиновая цепь) носят различные названия (“поцелуй смерти”, “метка смерти”, “черная метка”), но основной смысл заключается в том, что белки меченные подобным образом связываются с протеасомами и расщепляются до коротких пептидов.

Из представленного материала следует, что в мечении белков принимают участие три вида ферментов (E1, E2, E3). В клетках млекопитающих функционируют один или несколько E1 ферментов, несколько различных E2 фермента, и несколько сотен различных E3 фермента. Также была разработана технология возможности протекания данных процессов вне клетки.

После того как белки подвергшиеся полиубиквинации опознаются регулирующей частью вершины протеасомы, фермент, имеющий изопептидазную активность отделяет убиквентиновую цепь от белка-мишени и помогает ему переместиться в канал, расположенный в сердцевине протеасомы. Как было сказано выше белки-мишени, расщепляясь в канале сердцевины до пептидов, состоящих из 7-9 аминокислот, поступают в цитозоль.

Убиквентин-опосредованное расщепление белков принимает активное участие (рис.4.24) практически во всех процессах, обеспечивающих жизнедеятельность клетки (проведение сигналов, иммунные ответные реакции, клеточный цикл, регуляция процесса транскрипции, восстановление ДНК, модуляция рецепторов, процессы метаболизма и т.д.) Также было установлено, что 30% вновь синтезированных белков избирательно расщепляются протеасомами до пептидов. Это указывает на то, что последние являются *системой юконтроля качества*.

Учитывая особые заслуги в изучении механизма убиквентин-опосредованного расщепления белков, все три автора - А.Чехановер, А.Гершко и И.Роуз, были в 2004-м году удостоены Нобелевской премии. Подробно с данной информацией можно ознакомиться в статье комитета Нобелевской премии в области химии Шведской Королевской Академии Наук (см. список литературы).

Пероксисома

Пероксисомы окружены одним слоем мембраны, их матрикс представлен гомогенными зернистыми структурами, имеющих различную плотность (рис. 4.26). Они имеют шарообразную или овальную форму с диаметром от 0.2 до 1.5мкм. Самое большое количество пероксисом, имеющих диаметр 0.5 мкм и выше, встречается в основном в клетках печени и почек.

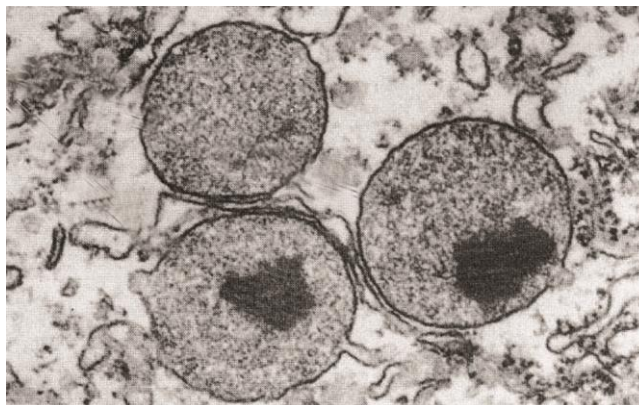


Рис.4.26. Электронно-микроскопическое строение пероксисом в клетках печени крысы. В составе двух из трех пероксисом имеется фермент урат оксидаза, обладающий плотной кристаллоидной консистенцией.

В мембране и матриксе пероксисом встречаются белки, свойственные лишь данным органеллам. Большинство этих белков синтезируются в полирибосомах цитозоля, имеют особые сигнальные участки, которые способны связываться с рецепторными белками стенки пероксисом, результатом чего становится поступление их в состав мембраны, либо в матрикс. Малая часть белков, входящих в состав мембраны пероксисом, синтезируется в гранулярной эндоплазматической сети.

В матриксе пероксисом имеется более 50-ти ферментов участвующих в процессах окисления. Во время протекающих здесь окислительных процессов происходит не синтез АТФ, как в митохондриях, а процессы внутриклеточного синтеза (анаболического) и расщепления (катаболического). К анаболическим процессам относится синтез в пероксисомах желчных кислот и холестерина, а к катаболическим – β -окисление цепи жирных кислот.

Окислительные ферменты, расположенные в матриксе пероксисомы (гидроксид оксидаза, D- и L-оксидаза, каталаза, урат оксидаза и т.д.), отделяют протон водорода из состава различных биополимеров и соединяют его с молекулярным кислородом (O_2). В результате этого образуется пероксид водорода (H_2O_2), представляющий опасность и для самой клетки. Однако присутствующий в матриксе пероксисом фермент каталаза поддерживает концентрацию пероксида водорода в пределах нормы. Т.о. при помощи фермента каталазы из 2 молекул пероксида водорода образуется либо вода и молекулы кислорода ($2 H_2O_2 \xrightarrow{\text{каталаза}} 2 H_2O + O_2$), либо происходит окисление другого органического вещества ($H_2O_2 + XH_2 \xrightarrow{\text{каталаза}} 2 H_2O + X$; X- какое – либо органическое вещество). Пероксид водорода играет важную роль в детоксикации многих веществ, представляющих организму угрозу, а также в уничтожении микроорганизмов.

В пероксисомах присутствуют ферменты принимающие участие в β -окислении длинных цепей жирных кислот. Под действием данных ферментов происходит расщепление жирных кислот с образованием описанного выше пероксида водорода и ацетил-коэнзима А (CoA). Молекулы ацетил – CoA в клетке используются для разных целей, в том числе при синтезе АТФ. Определенная часть ацетил – CoA покидает клетку и может использоваться соседними клетками.

Средняя продолжительность жизни пероксисом составляет 5-6 дней. Несмотря на то, что пероксисомы не имеют собственного генома, они, как и митохондрии увеличивают свое количество путем деления. Т.о. пероксисомы, увеличиваясь из-за поступления в них синтезированных в цитозоле белков, делятся на две части.

Цитоплазматические включения

В цитоплазме наряду с органеллами обнаруживаются структуры, встречающиеся не во всех типах клеток и характеризующиеся своей нестабильностью (то появляются, то пропадают). Их называют **включениями**. Раньше включения рассматривались как скопления производных синтезированных в клетке, либо поступивших в нее другими способами и не имеющих значения для ее жизнедеятельности. В данное время нет никаких сомнений, что включения являются важными структурами, обеспечивающими нормальную деятельность определенных групп клеток. Большинство из них имеют эндогенную природу и синтезируются самими клетками. В качестве примера можно указать гликоген, жировые капли, проферменты, некоторые пигменты и кристаллы. Наряду с ними существует также экзогенная (поступившие в клетку извне) группа включений. Среди них относящийся к липохромным включениям каротин (окрашивающий липиды), тяжелые металлы (напр. серебро и свинец), частички пыли асбеста, силиката, углерода и т.д.

Многие авторы относят к включениям скопления питательных веществ, некоторых пигментов и кристаллов, не зависимо от метода их поступления в клетку.

К включениям, имеющим в своем составе белки, относятся секреторные пузырьки. Подробная информация о них была дана при описании комплекса Гольджи.

Являющиеся продуктами питания углеводы накапливаются в клетках в виде гликогена, а липиды – в виде жировых капель. **Гликоген** образуется в результате полимеризации всосавшейся в кишечнике глюкозы и скапливается в основном в клетках печени, в волокнах поперечнополосатых мышц и в корковом веществе надпочечников. В результате того, что гликоген легко растворяется в воде, его невозможно обнаружить при помощи обычных гистологических методов, а лишь с помощью особых методов окраски. К ним относится окрашивание кармином по Бесту и методом Шиффа – йодной кислотой. Кармин Беста окрашивает гранулы гликогена в красный, а реактивы йодной кислоты Шиффа – в ярко красный или малиновый цвет.

При электронной микроскопии гранулы гликогена, по своим размерам и топографическому положению, делятся на два вида: α -гранулы и β -гранулы (рис. 4.27).

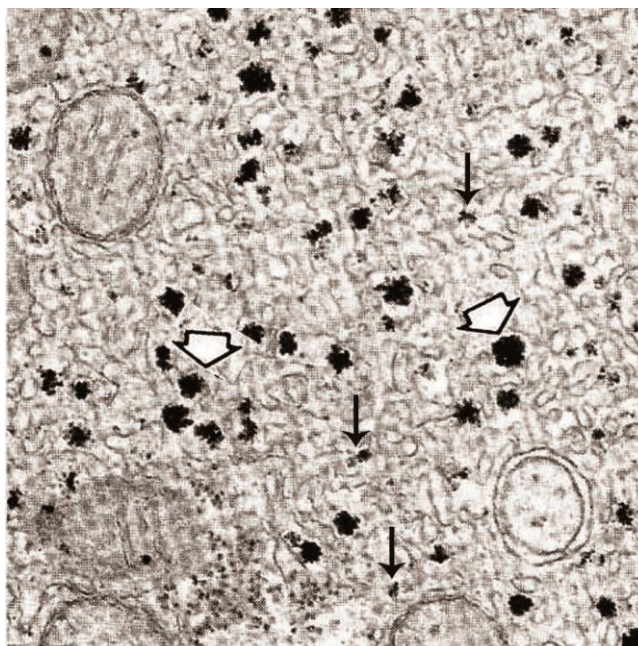


Рис.4.27. Электронно-микроскопический снимок гранул гликогена, расположенных возле трубочек гладкой эндоплазматической сети клеток печени. Белой стрелкой показаны α -гранулы, а черной стрелкой – β -гранулы (Cardell RR Jr. Smooth endoplasmic reticulum in rat hepatocytes during glycogen deposition and depletion. *Int Rev Cytol.* 1977, 48, p.221-79).

α - гранулы имеют большие размеры (80-90 нм) и плотно прилегают друг к другу образуя структуру, напоминающую гроздь или розетку (рис. 4.27, указаны белой стрелкой).

β - гранулы отличаются от α - гранул меньшими размерами (около 30 нм) и тем, что располагаются они не в виде скоплений, а по отдельности (рис. 4.27, указаны черной стрелкой).

α - гранулы встречаются в печени, а β - гранулы – в клетках мышц. Гранулы гликогена часто располагаются возле трубчатых цистерн гладкой эндоплазматической сети.

Капли жира – являются производными, имеющими в своем составе скопления триглицеридов, жирных кислот, холестерина и эфиров холестерина. Кроме жировых клеток (адипоцитов) они встречаются также в клетках печени и в органах синтезирующих стероидные гормоны (в корковом веществе надпочечников и половых железах). Если в случае жировых клеток вся цитоплазма представлена одной крупной жировой каплей, то в других группах клеток встречаются жировые капли различных размеров и количества.

Жировые капли не имеют мембрану, но наличие элементов цитоскелета по всему периметру капли, препятствует их соединению друг с другом (рис. 4.28).

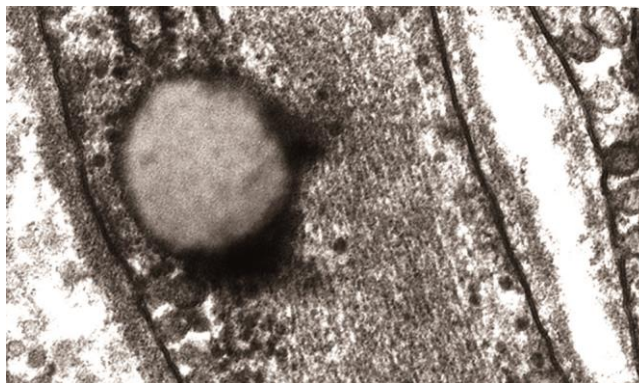


Рис.4.28. Электронно-микроскопический снимок капли жира в клетке гладкой мышцы.

Т.к. липиды растворяются в органических растворителях, используемых во время приготовления гистологических препаратов, видны бывают не сами жировые капли, а пустые вакуолеподобные структуры на месте занимаемого ими пространства. Чтобы предотвратить экстракцию липидов, необходимо произвести фиксацию исследуемых структур в осмиевой кислоте (OsO_4). В этом случае липидные капли окрашиваются в черный или темно каштановый цвет. Жировые капли также обнаруживаются при окрашивании замороженных и фиксированных в формалине срезов с помощью Судана черного, Судана III-IV, Шарлаха красного.

Основной запас энергии организма представляют липиды. Количество молекул АТФ, образованных при использовании 1 грамма жира, значительно больше, чем при использовании равного количества гликогена.

Внутриклеточные компоненты, обнаруживаемые благодаря своему природному цвету, без помощи какого-либо способа окраски, называются **пигментными включениями**. К ним относятся все экзогенные (см.выше) и некоторые эндогенные (гемоглобин и продукты его распада, меланин, липофусцин) включения.

Т.к. экзогенные включения растворяются в липидах (липохромы), они окрашивают компоненты находящиеся с ними в контакте в свойственный им цвет. Примером экзогенных включений растительного происхождения может служить каротин. Окрашивание жира человека и желтка яиц в желтый цвет, связано с присутствием в них каротина. Некоторые формы каротина участвуют в синтезе витамина А в организме.

Широко распространенными среди экзогенных пигментных включений являются частички пыли (уголь, асбест, силикат и т.д.) Они поступают в организм в основном с воздухом и окрашивают воздухоносные пути в свойственный им цвет, а также являются причиной развития различных патологических процессов в органах.

Среди неорганических веществ, скопления серебра и свинца могут являться причиной изменения цвета органов. Скопление солей серебра в коже, является причиной окрашивания ее в сероватый цвет. При увеличении количества свинца в организме, на деснах образуется каемка синего цвета.

Самыми широко распространенными среди эндогенных пигментных включений являются находящиеся в составе эритроцитов пигменты **гемоглобина** и продукты его

распада. Гемоглобин содержит в своем составе железо, имеет ярко-красный цвет и участвует в переносе кислорода. Окончившие свой жизненный цикл (примерно 120 дней) эритроциты, поглощаются и перевариваются макрофагами. В это время из молекул гемоглобина образуются содержащий железо пигмент **гемосидерин** и не содержащий железо – **билирубин**.

Гемосидерин состоит в основном из белка **ферритина** и имеет желто-каштановый цвет. При электронной микроскопии гемосидерин состоит из электронно-плотных гранул размером 8-9 нм. Данные гранулы расположены по отдельности или в виде скоплений неопределенной формы. Наиболее часто сидерин встречается в цитоплазме макрофагов, локализованных в селезенке, печени, легких, красном костном мозгу, в местах кровотечений и кровяных сгустков.

Впервые кристаллы пигмента желтого цвета на месте давнего кровотечения, обнаружил известный немецкий патолог Р.Вирхов (1848). Он также указал, что они образуются в результате расщепления гемоглобина. Автор произвел химический анализ данных кристаллов именуемых **гематоидином** и обнаружил, что они имеют идентичный состав с пигментом билирубина, окрашивающим желчь в желтовато-каштановый цвет. Пигмент билирубина, не имеющий в своем составе железо, легко растворяется в биологических жидкостях в сравнении с гемосидерином. Поэтому билирубин не скапливается в цитоплазме поглотивших эритроциты макрофагов в виде гранул (как гемосидерин), а поступает в кровь при помощи диффузии. Далее, из крови он захватывается клетками печени и включается в состав желчи.

Наряду с гемоглобином, широко распространенным эндогенным пигментом является **меланин**. Меланин, имеющий темно каштановый или черный цвет, синтезируется в цитоплазме меланоцитов из аминокислоты тирозина при участии фермента тирозиназы. Меланоциты встречаются в эпидермисе кожи, в сетчатой и радужной оболочках глаза, в черном веществе среднего мозга. Меланин играет важную роль в защите организма от ультрафиолетового излучения и в восприятии лучей света.

В определенных группах клеток встречаются скопления белков кристаллической формы. По своему строению они встречаются либо в виде отдельных кристаллов неопределенной формы и размеров, либо в виде кристаллиновой (кристалоподобной) сердцевин.

У человека **кристалоподобные включения** встречаются в основном в составе половых желез (семенник и яичники). Примером могут служить кристаллы Рейнке (Reinke) в клетках Лейдига, Чаркот-Ботчера (Charkot-Bottcher) в клетках Сертоли и Любарша (Lubarsh) в сперматогониях. Следует отметить, что кристаллы Рейнке встречаются также в клетках, расположенных во входной части яичников. Данные кристаллы окружены мембраной и располагаются в цитоплазме соответствующих клеток в свободном виде (рис. 4.29). Хотя и отмечено, что по составу они представлены белками, их функция еще не выяснена.

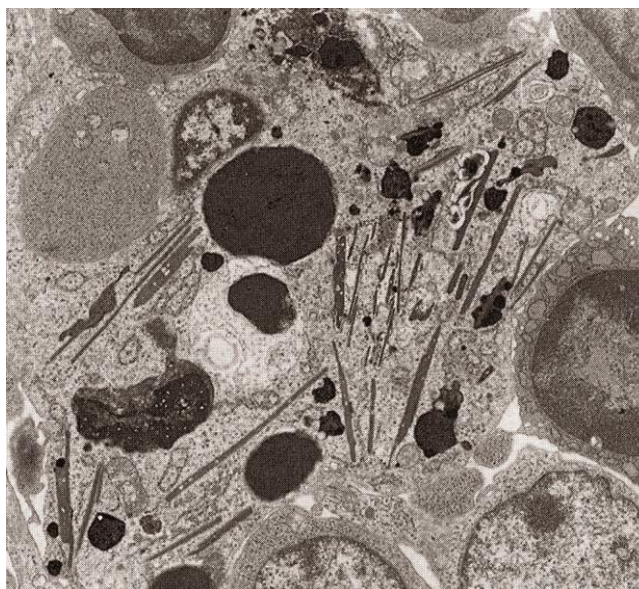


Рис.4.29. Электронно-микроскопическое строение кристаллообразных включений в макрофаге.

Включения с кристаллиновой сердцевинкой, в отличие от кристаллов, расположены в мембране не свободно, а в виде окруженных мембраной гранул. Примером являются кристаллиновая сердцевина в составе специфических гранул эозинофилов.

Кристаллиновая сердцевина имеет структуру кубовидной сети, повторяющейся через каждые 4 нм, и состоит из основных щелочных белков (major basic protein), имеющих молекулярную массу 9,2кД. Данный белок участвует в уничтожении гельминтов шистосомы, паразитирующих в организме человека.

Литература:

- Bornens M, Paintrand M, Berges J, Marty MC, Karsenti E. Structural and chemical characterization of isolated centrosomes. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 1987; 8(3):238-49.
- Chang P, Gidding ThH, Mark W, Srearns T. Tubulin is required for centriole duplication and microtubule organization. *Nature Cell Biology*, 2002;5:71-76.
- Chen D, Purohit A, Halilovic E, Doxsey SJ, Newton AC. Centrosomal anchoring of protein kinase C betaII by pericentrin controls microtubule organization, spindle function, and cytokinesis. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279(6):4829-4839.
- Dammermann A, Merdes A. Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *The Journal of Cell Biology*, 2002; 159(2):255-266.
- Dammermann A, Muller-Reichert T, Pelletier L, Habermann B et al. Centriole assembly requires both centriolar and pericentriolar material proteins. *Dev. Cell*, 2004; 7(6):815-29.
- Delattre M, Gonczy P. The arithmetic of centrosome biogenesis. *Journal of Cell Science*, 2004; 117:1619-1630.
- Delgehyr N, Sillibourne J, Bornens M. Microtubule nucleation and anchoring at the centrosome are independent processes linked by ninein function. *Journal of Cell Science*, 2005; 118:1565-1575.
- Dicthenberg JB, Wendy Z, Sparks CA, Young A et al. Pericentrin and tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J. Cell Biol.*, 1998; 141(1):163-174.
- Faragher AJ, Fry A.M. Nek2A kinase stimulates centrosome disjunction and is required for formation of bipolar mitotic spindles. *MBC Online*, 2003; 14(7):2876-2889.
- Fry AM. The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure.

Oncogene, 2002; 21(40):6184-6194.

Manandhar G, Schatten H, Sutovsky P. Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biology of Reproduction*, 2005; 72:2-13.

Meraldi P, Nigg EA. Centrosome cohesion is regulated by a balance of kinase and phosphatase activities. *Journal of Cell Science*, 2001; 114:3749-3757.

Ou YY, Mack GJ, Zhang M, Rattner J.B. CEP110 and ninein are located in a specific domain of the centrosome associated with centrosome maturation. *Journal of Cell Science*, 2002; 115:1825-1835.

Ou YY, Zhang M, Chi S, Matyas JR, Rattner JB. Higher order structure of the PCM adjacent to the centriole. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 2003; 55(2):125-33.

Piehl M, Tulu US, Wadsworth P, Cassimeris L. Centrosome maturation: measurement of microtubule nucleation throughout the cell cycle by using GFPtagged EB1. *PNAS*, 2004; 101(6):1584-1588.

Pihan GA, Wallace J, Zhou Y, Doxsey SJ. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Research*, 2003; 63:1398-1404.

Selvapandiyan A, Debrabant A, Duncan R, Muller J et al. centrin gene disruption impairs stage-specific basal body duplication and cell cycle progression in leishmania. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279(24):25703-25710.

Sonn S, Khang I, Kim K, Rhee K. Suppression of Nek2A in mouse early embryos confirms its requirement for chromosome segregation. *Journal of Cell Science*, 2004; 117:5557-5566.

Stearns T. Centrosome duplication. a centriolar pas de deux. *Cell*, 2001; 105(4):417-420.

Terra SL, English ChN, Hergert P, McEwen BF et al. The de novo centriole assembly pathway in HeLa cells : cell cycle progression and centriole assembly/maturation. *J. Cell Biol.*, 2005; 168(5):713-22.

Mitochondri

Andersson SG, Karlberg O, Canback B,

Kurland CG. On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2003; 358(1429):165-77.

Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.*, 2000; 25:319-324.

Frey TG, Renken CW, Perkins GA. Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1555:196-203.

Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science*, 1999; 283: 1476-1481.

Griparic L, van der Bliek AM. The many shapes of mitochondrial membranes. *Traffic*, 2001; 2:235-44.

Ko CH, Shen SC, Hsu CS, Chen YC. Mitochondrial-dependent, reactive oxygen species-independent apoptosis by myricetin: roles of protein kinase C, cytochrome c, and caspase cascade. *Biochem. Pharmacol.*, 2005; 69(6):913-27.

Lea PJ, Hollenberg MJ. Mitochondrial structure revealed by high-resolution scanning electron microscopy. *Am. J. Anat.*, 1989; 184:245-57.

Mannella CA, Marko M, Buttle K. Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. *Trends Biochem. Sci.*, 1997; 22:37-8.

Perkins G, Ellisman MH, Fox DA. Three-dimensional analysis of mouse rod and cone mitochondrial cristae architecture: Bioenergetic and functional implications. *Molecular Vision*, 2003; 9:60-73.

Perkins GA, Song JY, Tarsa L, Deerinck TJ, Ellisman MH, Frey TG. Electron tomography of mitochondria from brown adipocytes reveals crista junctions. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1998; 30:431-42.

Prince FP. Lamellar and tubular associations of the mitochondrial cristae: unique forms of the cristae present in steroid-producing cells. *Mitochondrion*, 2002; 1:381-9.

Reichert AS, Neupert W. Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1592:41-9. Renken C, Siragusa G, Perkins G, Washington L, Nulton J, Salamon P, Frey TG. A thermodynamic model describing the nature of the crista junction: a structural motif in the mitochondrion. *J. Struct. Biol.*, 2002; 138:137-44.

Semak I, Naumova M, Korik E, Terekhov V, Wortsman J, Slominski A. A novel metabolic pathway of melatonin: oxidation by cytochrome c. *Biochemistry*, 2005; 44(26):9300-9307.

Theissen U, Hoffmeister M, Grieshaber M, Martin W. Single eubacterial origin of eukaryotic sulfide: quinone oxidoreductase, a mitochondrial enzyme conserved from the early evolution of eukaryotes during anoxic and sulfidic times. *Mol. Biol. Evol.*, 2003; 20(9):1564-74.

Vijayasarathy C, Damle S, Lenka N, Avadhani NG. Tissue variant effects of heme inhibitors on the mouse cytochrome c oxidase gene expression and catalytic activity of the enzyme complex. *Eur. J. Biochem.*, 1999; 266(1):191-200.

Ribosom

Blobel G, Dobberstein B. Transfer of proteins across membranes. I. presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *Journal of Cell Biology*, 1975; 67:835-851.

Dong G, Nowakowski J, Hoffman DW. Structure of small protein B: the protein component of the tmRNA-SmpB system for ribosome rescue. *EMBO J.*, 2002; 21:1845-1854.

Gutmann S, Haebel PW, Metzinger L, Sutter M, Felden B, Ban N. Crystal structure of the transfer-RNA domain of transfer-messenger RNA in complex with SmpB. *Nature*, 2003; 424:699-703.

Ivanova N, Pavlov MY, Bouakaz E, Ehrenberg M, Schiavone LH Mapping the interaction of SmpB with ribosomes by footprinting of ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.*, 2005; 33(11):3529-39.

Lafontaine DL, Tollervey D. The function and synthesis of ribosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001; 2:514-520.

Larsson SL, Nygard O. Proposed secondary structure of eukaryote specific expansion segment 15 in 28S rRNA from mice, rats, and rabbits *Biochemistry*, 2001; 40:3222-3231.

Martoglio B, Dobberstein B. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol.*, 1998; 8:410-415.

Moazed D, Noller HF. Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome *Nature*, 1989; 342:142-148.

Noller HF, Hoffarth V, Zimmak L. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science*, 1992; 256:1416-1419.

Pavlov MY, Freistroffer DV, MacDougall J, Buckingham RH, Ehrenberg M. Fast recycling of *Escherichia coli* ribosomes requires both ribosome recycling factor (RRF) and release factor RF3. *EMBO J.*, 1997; 16:4134-4141.

Phelps SS, Jerinic O, Joseph S. Universally conserved interactions between the ribosome and the anticodon stem-loop of A site tRNA important for translocation. *Mol. Cell.*, 2002; 10:799-807.

Ramakrishnan V. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, 2002; 108, 557-572.

Ramakrishnan V, White SW. Ribosomal structures: Insights into the architecture, machinery and evolution of the ribosome. *Trends Biochem. Sci.*, 1998; 23:208-212.

Stroud RM, Walter P. Signal sequence recognition and protein targeting. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1999; 9:754-749.

Valle M, Gillet R, Kaur S, Henne A, Ramakrishnan V, Frank J. Visualizing tmRNA entry into a stalled ribosome. *Science*, 2003; 300:127-130.

Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom

Lieberman K et al. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*, 2001; 292:883-896.

Endoplazmatik şəbəkə

Ahearn GA, Mandal PK, Mandal A.

Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *J. Comp. Physiol.*, 2004; 174(6):439-52.

Alder NN, Shen Y, Brodsky JL, Hendershot LM, Johnson AE. The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, 2005; 31; 168(3):389-99.

Domenech RJ, Sanchez G, Donoso P, Parra V, Macho P. Effect of tachycardia on myocardial sarcoplasmic reticulum and Ca²⁺ dynamics: a mechanism for preconditioning? *J. Mol. Cell Cardiol.*, 2003; 35(12):1429-37.

Johnson AE, van Waes MA. The translocon: A dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1999; 15:799-842.

Llach A, Huang J, Sederat F, Tort L, Tibbits G, Hove-Madsen L. Effect of betaadrenergic stimulation on the relationship between membrane potential, intracellular [Ca²⁺] and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake in rainbow trout atrial myocytes. *J. Exp. Biol.*, 2004; 207(Pt 8):1369-77.

Schafer A, Wolf DH. Endoplasmic reticulum-associated protein quality control and degradation: genome-wide screen for ERAD components. *Methods Mol. Biol.*, 2005; 301:289-92.

Waters MG, Pfeffer SR. Membrane tethering in intracellular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1999; 11:453-459.

Holci kompleksi və sitoplazmada qovucuların nəqli - COP

BaHHH B.B. Kyma BefleT "üyTB ronBHXH"? (K 10 0-neTHro OTKPHTHH KOMnneKca ronbflXH). OTjqen Mop^onorHH (3aB. - npo^). B.B. BaHHH) PoccHäcKoro rocyäapCTBeHHoro MeflHöHHCKoro yHHBepcHTeTa, 1999, MockBa, YflK

576.31(091), CTp. 90-97.

Allan BB, Balch WE. Protein sorting by directed maturation of Golgi compartments. *Science*, 1999; 285:63-66.

- Farquhar MG, Palade GE. The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends in Cell Biology*, 1998; 8:2-10.
- Joglekar AP, Xu D, Rigotti D, Fairman R, Hay JC. The SNARE motif contributes to rbt1 intracellular targeting and dynamics independently of SNARE interactions. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278(16):14121-14133.
- Kamena F, Spang A. Tip20p prohibits back-fusion of COPII vesicles with the endoplasmic reticulum. *Science*, 2004; 304(5668):286-289.
- Kunau WH, Agne B, Girzalsky W. The diversity of organelle protein transport mechanisms. *Trends in Cell Biology*, 2001; 11(9):358-361.
- Lederkremer GZ, Cheng Y, Petre BM, Vogan E et al. Structure of the Sec23p/24p and Sec13p/31p complexes of COPII. *PNAS*, 2001; 98(19):10704-10709.
- Love HD, Lin Ch-Ch, Short CS, Ostermann J. isolation of functional Golgiderived vesicles with a possible role in retrograde transport. *J. Cell Biol.*, 1998; 140(3):541-551.
- Matsuoka K, Schekman R, Orci L, Heuser JE. Surface structure of the COPIIcoated vesicle. *PNAS*, 2001; 98(24):13705-13709.
- Mironov AA, Polishchuk RS, Luini A. Visualizing membrane traffic in vivo by combined video fluorescence and 3D electron microscopy. *Trends in Cell Biology*, 2000; 10:349-351.
- Orci L, Ravazzola M, Mack GJ, Barlowe Ch, Otte S. Mammalian Erv46 localizes to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment and to cis-Golgi cisternae. *PNAS*, 2003; 100(8):586-4591.
- Orci L, Ravazzola M, Volchuk A, Engel Th et al. Anterograde flow of cargo across the Golgi stack potentially mediated via bidirectional "percolating" COPI vesicles. *PNAS*, 2000; 97(19):10400-10405.
- Parlati F, Varlamov O, Paz K, McNew JA et al. Distinct SNARE complexes mediating membrane fusion in Golgi transport based on combinatorial specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2002; 99(8):5424-9.
- Peppelenbosch MP, DeSmedt M, ten Hove T, van Deventer SJH, Grooten J. Lipopolysaccharide regulates macrophage fluid phase pinocytosis via CD14-dependent and CD14-independent pathways. *Blood*, 1999; 93(11):4011-4018.
- Rohn WM, Rouille Y, Waguri S, Hoflack B. Bi-directional trafficking between the trans-Golgi network and the endosomal/lysosomal system. *Journal of Cell Science*, 2000; 113:2093-2101.
- Xu D, Hay JC. Reconstitution of COPII vesicle fusion to generate a pre-Golgi intermediate compartment. *JCB*, 2004; 167(6):997-1003.
- Endosom, lizosom və peroksisomlar
- Bucci C, Thomson P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B. Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 2000; 11:467-480.
- Edinger AL, Thompson CB. Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell*, 2003; 4(6):422-4.
- Fineschi B, Miller J. Endosomal proteases and antigen processing. *Trends Biochem. Sci.*, 1997; 22:377-382.
- Fouraux MA, Deneka M, Ivan V, van der Heijden A et al. Rabip4' is an effector of rab5 and rab4 and regulates transport through early endosomes. *Mol. Biol. Cell.*, 2004; 15(2):611-24.
- Haraguchi CM, Mabuchi T, Yokota S. Localization of a mitochondrial type of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in kidney and heart of rat: an immunocytochemical and biochemical study. *J. Histochem. Cytochem.*, 2003; 51(2):215-26.
- Heiland I, Erdmann R. Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J.*, 2005; 272(10):2362-72.
- Hislop JN, Marley A, Zastrow M. Role of mammalian vacuolar protein-sorting proteins in endocytic trafficking of a non-ubiquitinated G protein-coupled receptor to lysosomes. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279(21):22522-22531.
- Kjeken R, Egeberg M, Habermann A, Kuehnelt M et al. Fusion between phagosomes, early and late endosomes: a role for actin in fusion between late, but not early endocytic organelles. *Mol. Biol. Cell.*, 2004; 15(1):345-58.
- Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.*, 2005; 118(1):7-18.
- Lefkir Y, Malbouyres M, Gotthardt D, Ozinsky A et al. Involvement of the AP-1 adaptor complex in early steps of phagocytosis and macropinocytosis. *Mol. Biol. Cell.*, 2004; 15(2):861-9.
- Mayran N, Parton RG, Gruenberg J. Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *The EMBO Journal*, 2003; 22(13):3242-3253.
- Mullins C, Bonifacino JS. The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays*, 2001; 23:333-343.
- Nardacci R, Sartori C, Stefanini S. Selective autophagy of clofibrate-induced rat liver peroxisomes. Cytochemistry and immunocytochemistry on tissue specimens and on fractions obtained by Nycodenz density gradient centrifugation. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, 2000; 46(7):1277-90.

- Petiot A, Faure J, Stenmark H, Gruenberg J. PI3P signaling regulates receptor sorting but not transport in the endosomal pathway. *The Journal of Cell Biology*, 2003; 162(6):971-979.
- Raiborg C, Bache KG, Mehlum A, Stang E, Stenmark H. Hrs recruits clathrin to early endosomes. *The EMBO Journal*, 2001; 20(17):5008-5021.
- Rohn WM, Rouille Y, Waguri S, Hoflack
Bi-directional trafficking between the trans-Golgi network and the endosomal/lysosomal system. *Journal of Cell Science*, 2000; 113:2093-2101.
- Sachse M, Ramm G, Strous G, Klumperman J. Endosomes: multipurpose designs for integrating housekeeping and specialized tasks. *Histochem. Cell Biol.*, 2002; 117:91-104.
- Sachse M, Urbe S, Oorschot V, Strous GJ, Klumperman J. Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol. Biol. Cell*, 2002; 13(4):1313-28.
- Slagsvold T, Stenmark H. The structure of an endosomal protein sorter. *Dev. Cell*, 2004; 7(4):457-8.
- Tschantz WR, Digits JA, Pyun HJ, Coates RM, Casey PJ. Lysosomal prenylcysteine lyase is a FAD-dependent thioether oxidase. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276(4):2321-4.
- Ungewickell A, Ward ME, Ungewickell E, Majerus PW. The inositol polyphosphate 5-phosphatase Ocr1 associates with endosomes that are partially coated with clathrin. *Cell Biology*, 2004; 101(37):13501-13506.
- Van Diggelen OP, Schindler D, Willemsen R, Boer M et al. alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency, a new lysosomal storage disorder. *J. Inher. Metab. Dis.*, 1988; 11(4):349-57.
- Vonderheit A, Helenius A. Rab7 Associates with Early Endosomes to Mediate Sorting and Transport of Semliki Forest Virus to Late Endosomes. *PLoS Biol.*, 2005; 37:e233.
- Wilcke M, Alexson SE. Differential induction of peroxisomal populations in subcellular fractions of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001; 1544(1-2):358-69.
- Yamamoto K, Volkl A, Hashimoto T, Fahimi HD. Catalase in guinea pig hepatocytes is localized in cytoplasm, nuclear matrix and peroxisomes. *Eur. J. Cell Biol.*, 1988; 46(1):129-35.
- Yokota S, Oda T, Fahimi HD. The role of 15-lipoxygenase in disruption of the peroxisomal membrane and in programmed degradation of peroxisomes in normal rat liver. *J. Histochem. Cytochem.*, 2001; 49(5):613-22.
- Yoshihara T, Hamamoto T, Munakata R, Tajiri R, Ohsumi M, Yokota S. Localization of cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in the peroxisomes of rat liver cells: biochemical and immunocytochemical studies. *J. Histochem. Cytochem.*, 2001; 49(9):1123-31.
- Proteasom və ubiquinasiya
Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005; 6(1):79-87.
- Hershko A, Ciechanover A, Rose IA. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: A component that interacts with ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979; 76:3107-3110.
- Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. Components of ubiquitin-protein ligase system. *J. Biol. Chem.*, 1983; 258:8206-8214.
- Hoang T, Fenne IS, Cook C, Borud B et al. cAMP-dependent protein kinase regulates ubiquitin-proteasome-mediated degradation and subcellular localization of the nuclear receptor coactivator GRIP1. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279(47):49120-30.
- Maki CG, Huibregtse JM, Howley PM. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res.*, 1996; 56:2649-2654.
- Nohl H, Staniek K, Kozlov AV, Gille L. The biomolecule ubiquinone exerts a variety of biological functions. *Biofactors*, 2003; 18(1-4):23-31.
- Pickart CM. Mechanisms underlying Ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.*, 2001; 70:503-534.
- Sasajima H, Nakagawa K, Yokosawa H. Antiproliferative proteins of the BTG/Tob family are degraded by the ubiquitin-proteasome system. *Eur. J. Biochem.*, 2002; 269(14):3596-604.
- Ubiquitin-mediated proteolysis.
Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry, 6 October 2004. www.kva.se.
- Varshavsky A. The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.*, 1997; 22:383-387.
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.*, 1999; 68:1015-1068.
- Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.*, 1980; 255:7529-7532

ЯДРО

Ядро является одним из важнейших компонентов всех клеток человеческого организма (за исключением эритроцитов, некоторых стареющих и закончивших свою жизнедеятельность клеток). Удаление ядра из цитоплазмы становится причиной полной остановки синтеза белка и гибели клетки.

Являясь самой большой органеллой клетки, ядро содержит в себе компактно упакованные структуры с кислыми (ДНК и РНК) и щелочными (гистоны) свойствами, что дает возможность легко различать его под световым микроскопом. Не случайно, что наличие ядра внутри разного рода клеток было обнаружено еще Я.Пуркинье в 1825-1827 годах. В 1831 году Р.Броун отметил ядро, как одну из обязательных частей растительной клетки. Несмотря на то, что ядро обнаружено более чем 170 лет назад, гистотопография его структурных элементов, характер их строения, а также молекулярные основы процессов происходящих между цитоплазмой и нуклеоплазмой при синтезе белков детально были изучены только за последние годы.

Особенности избирательной проницаемости ядерной оболочки, отделяющей нуклеоплазму от цитоплазмы, делает ядро не только хранилищем генетической информации, но также и участником таких важных процессов, как репликация молекул ДНК, транскрипция и формирование иРНК (processing). Так, при помощи комплекса ядерной поры ядро контролирует поступление в нуклеоплазму из цитоплазмы факторов транскрипции, а также участвует в синтезе иРНК из первичных транскриптов с помощью специальных сплайсосом, находящихся в ядре и пр. Все это свидетельствует о том, что ядро играет роль интегративного центра управления синтезом белков и тем самым деятельностью клетки в целом.

Ядро, поперечный срез которого составляет 5-10 мкм, находится в основном в центре клетки и может иметь разную (круглую, овальную, грушевидную, бобовидную, многодольчатую, палочковидную, полиморфную с неровными краями и т.д.) форму (рис. 5.1 и 5.2). У млекопитающих большинство клеток являются одноядерными, реже встречаются двух- или многоядерные к примеру соответственно - гепатоциты и костеразрушающие клетки (остеокласты).

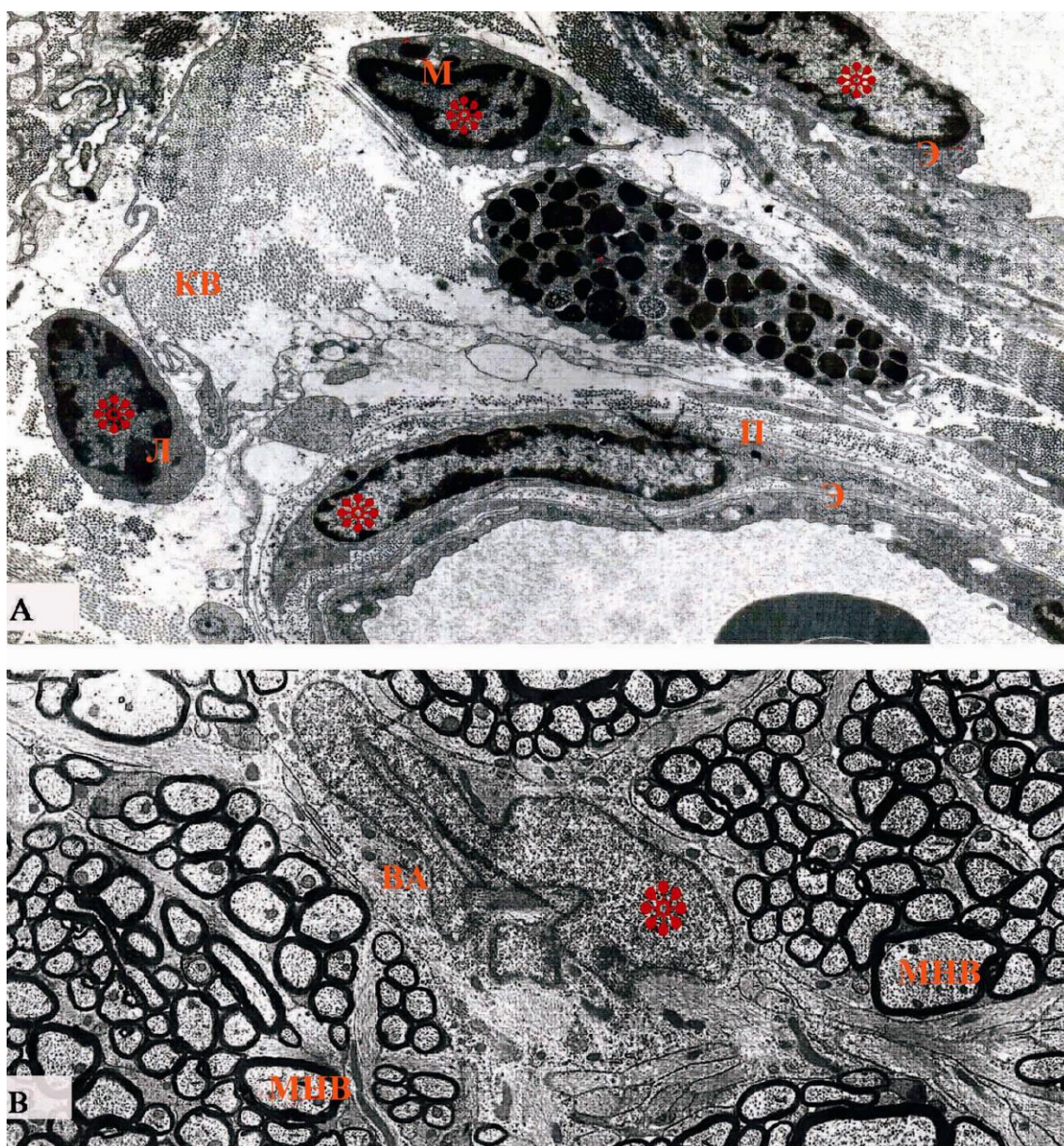


Рисунок 5.1. Электронно-микроскопический рисунок клеток с различными формами ядер.

А - Взаимная гистотопография клеток и неклеточных структур, располагающихся в стенке кровеносных сосудов и вокругсосудистых областях. Ультратонкий срез проходит через перицит (П), лимфоцит (Л), макрофаг (М) центральную (ядросодержащую) часть эндотелиальных клеток (Э) и периферическую часть тучных клеток (Т).

В - в центре поперечного среза зрительного нерва видно ядро неопределенной формы волокнистого астроцита (электронограмма к.м.н. Оруджева М.Т. и проф. Гасимова Э.К.)

МНВ - миелиновое нервное волокно; ВА - волокнистый астроцит; КВ - коллагеновые волокна; ядра отмечены звездочками.

Структурными компонентами ядра являются ядерная оболочка, нуклеоплазма, хроматин и ядрышко.

ЯДЕРНАЯ ОБОЛОЧКА

Ядерная оболочка, располагаясь между нуклеоплазмой и цитоплазмой, обладает избирательной проницаемостью (в основном для макромолекул), тем самым принимает участие в процессе синтеза белков и в формировании хроматина.

Светооптически на окрашенных гематоксилин-эозином гистологических препаратах, за ядерную оболочку принимается плотная полоса, обращенная к цитоплазме и окрашенная в синий цвет. Однако, при окрашивании ядерной оболочки после обработки гистологических срезов ферментом нуклеазой, было выявлено, что она имеет тонкую структуру. Электронно-микроскопические исследования показали, что в действительности толщина оболочки, разделяющая цитоплазму и нуклеоплазму, составляет всего лишь 40-60 нм и поэтому светооптически увидеть ее как отдельную структуру технически просто невозможно.

Ультраструктурно ядерная оболочка состоит из наружной и внутренней ядерных мембран, перинуклеарного пространства и комплексов ядерных пор (рис.5.2).

На большом протяжении ядерной оболочки между наружной и внутренней ядерными мембранами располагается щелевидное **перинуклеарное пространство** шириной в 25-30 нм (рис.5.2.В). В области ядерных пор данные мембраны непрерывно переходят друг в друга. По своему строению ядерные мембраны (состоящие из двухслойного фосфолипидного слоя толщиной 6-7 нм), напоминают другие внутриклеточные мембраны. Но существуют и отличия, так, в составе внутренней ядерной мембраны были обнаружены белки, характерные только для ядра.

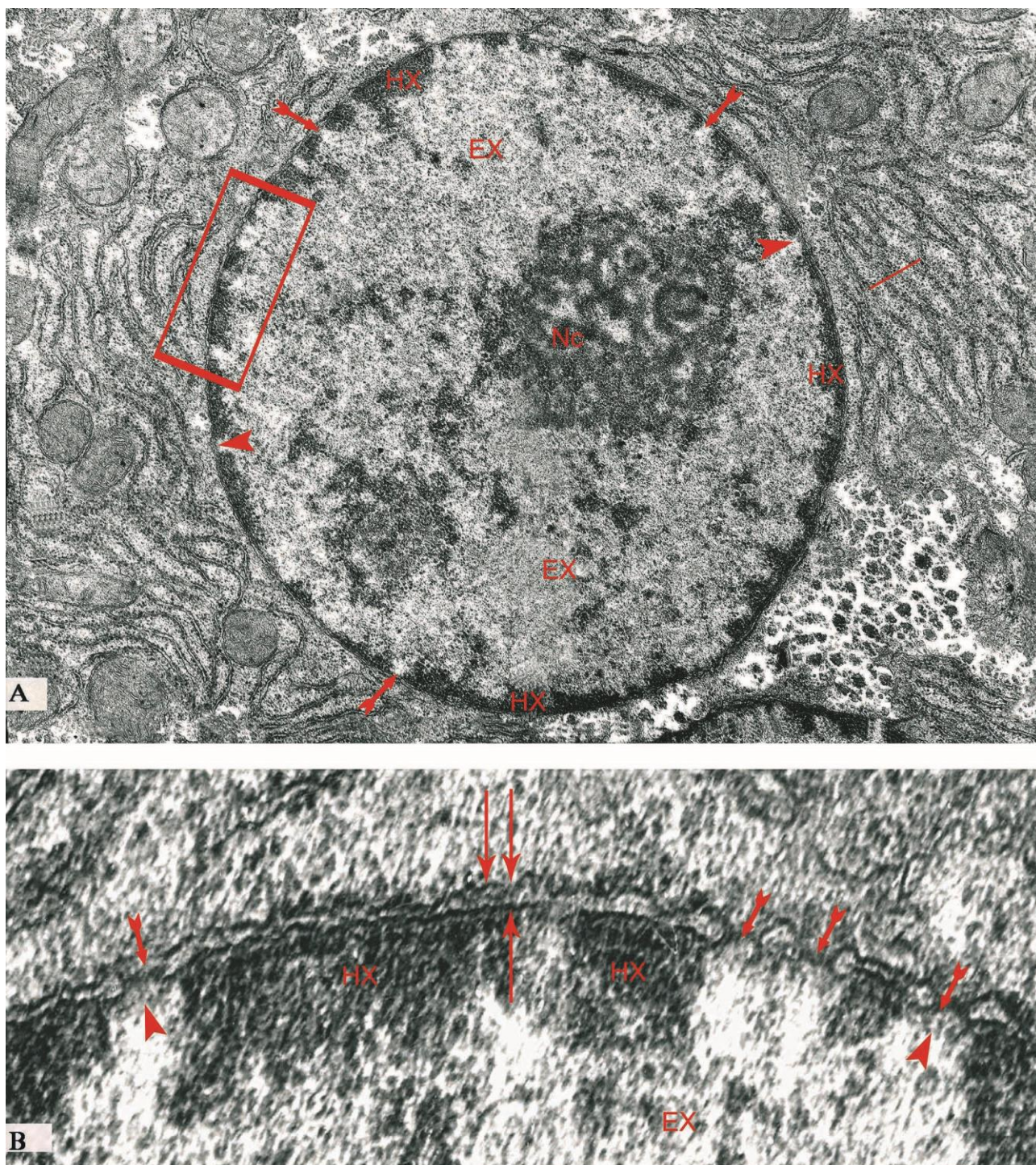


Рисунок 5.2. Электронно-микроскопический рисунок ядра и его составных элементов.

А – выявляется гетерохроматин (НХ), находящийся в области ядерной оболочки и в нуклеоплазме; эухроматин (ЕХ); ядерные поры (↓); каналы ядерных пор (▲) и топографическое положения ядрышка (Nc).

В - увеличенный фрагмент А ; видны наружная и внутренняя оболочки ядра (↑↑), перинуклеарное пространство (↑) и ядерная пора

НАРУЖНАЯ ЯДЕРНАЯ МЕМБРАНА

Наружная ядерная мембрана вместе с окружающим ее перинуклеарным пространством по строению очень сходна с гранулярной эндоплазматической сетью, а наличие на ее поверхности рибосом указывает на ее участие в синтезе белка (рис.5.4). Непрерывная связь перинуклеарного пространства с гранулярной и агранулярной эндоплазматической сетями, является еще одним доказательством вышесказанного.

Наружная ядерная мембрана, обращенная к цитоплазме, окружена тончайшей фибриллярной сетью, состоящей из виментиновых промежуточных филаментов. Взаимосвязи этой сети с элементами цитоскелета обеспечивают стабильность положения ядра внутри клетки при различных воздействиях.

ВНУТРЕННЯЯ ЯДЕРНАЯ МЕМБРАНА

Самой важной характерной особенностью **внутренней ядерной мембраны** является ее способность вступать в прочные молекулярные связи со специфической группой промежуточных филаментов – *ламинами*. О ламинах (А, В, С) кратко было изложено при описании промежуточных филаментов (см. стр.92.). К сказанному можно добавить то, что в результате соединения центральных частей мономеров ламинов (60-80кД) образуются димеры, которые соединяясь по принципу голова-хвостик формируют полимерную цепочку. Последние, располагаясь параллельно друг к другу образуют **ламинные филаменты** диаметром 10 нм. Ламинные филаменты скрещиваясь друг с другом под прямым углом и соединяясь с внутренней ядерной мембраной, создают трехмерную **ядерную пластинку** толщиной 80-100 нм. Во время интерфазы эта сеть играет роль структурной опоры для компонентов, входящих в состав ядра.

Молекулярные связи между внутренней ядерной мембраной и ламинными филаментами создаются с помощью ламин-В-рецептора (*lamin B reseptor – LBR*) и ламинсоединяющих (*lamin-associated proteins – LAPs*) интегральных белков, которые локализованы в составе внутренней ядерной мембраны.

Концевые отделы LBR и LAPs, входящие в состав ядерной пластинки содержат специфические участки для соединения как с ламинными филаментами, так и с хроматином.

В-лаminy наряду с LBR, соединяются также с интегральными белками, тогда как А и С лаminy - соединяются только с LBR-1 белком. Наличие таких избирательных соединений проявляет себя в изменениях ядерной оболочки, происходящих во время митоза. Известно, что в профазе митотического деления, ядерная оболочка, расщепляясь на отдельные пузырьки, теряет свою целостность. Во время митоза А и С лаminy фосфорилируясь, расщепляются до димеров. В-лаminy - наоборот, вступая в связи с липидами внутренней ядерной мембраны, становятся причиной образования пузырьков, содержимое которых в телофазе используется для восстановления ядерной оболочки.

ЯДЕРНАЯ ПОРА

Одним из характерных особенностей ядерной оболочки является наличие в ней от 3 до 5 тысяч ядерных пор, количество которых зависит от степени функциональной активности клеток. Наружная и внутренняя ядерные мембраны, сливаясь друг с другом (рис.5.4), образуют на поверхности ядерной оболочки отверстия, напоминающие туннель, которые и называются **ядерные поры** (рис.5.3). В местах образования ядерных пор, целостность наружной и внутренней ядерных мембран не нарушается. Таким образом, в местах образования ядерной поры происходит замыкание перинуклеарного пространства (рис.5.4).

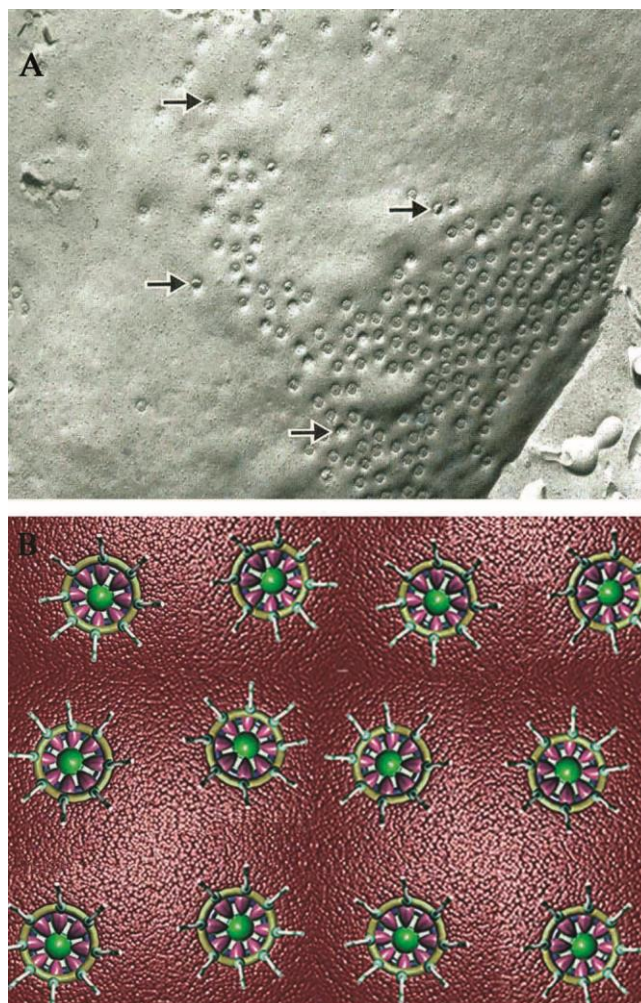


Рисунок 5.3 Электронно-микроскопический рисунок (А) и схематическое строение (В) ядерных пор, полученных методом криофрактографии. Фото Resarchers Ink.

Диаметр ядерных пор колеблется от 70 до 100 нм. Указанные каналы, суживаясь посредством **комплексов ядерных пор** (рис. 5.3), способствуют простой диффузии мелких и крупных молекул между цитозолем и нуклеоплазмой.

Комплекс ядерной поры (КЯП) – это сложный белковый комплекс, диаметром 120-130 нм, высотой 70 нм, общим молекулярным весом приблизительно в 60 кД, состоящий приблизительно из 47 гликопротеинов (29 из них нуклеопорины, 18 - соединяющиеся с ними белки). Белки, участвующие в образовании этого комплекса, располагаясь вертикально рядом друг с другом и соединяясь между собой образуют цилиндрическую структуру,

состоящую из 8 спиц, обращенных к центральному каналу и перинуклеарному пространству. В центре этого цилиндра (рис. 5.4, белого цвета) и на поверхности, обращенной к цитоплазме, перинуклеарному пространству и нуклеоплазме (рис. 5.4. зеленого цвета) имеются 4 кольца.

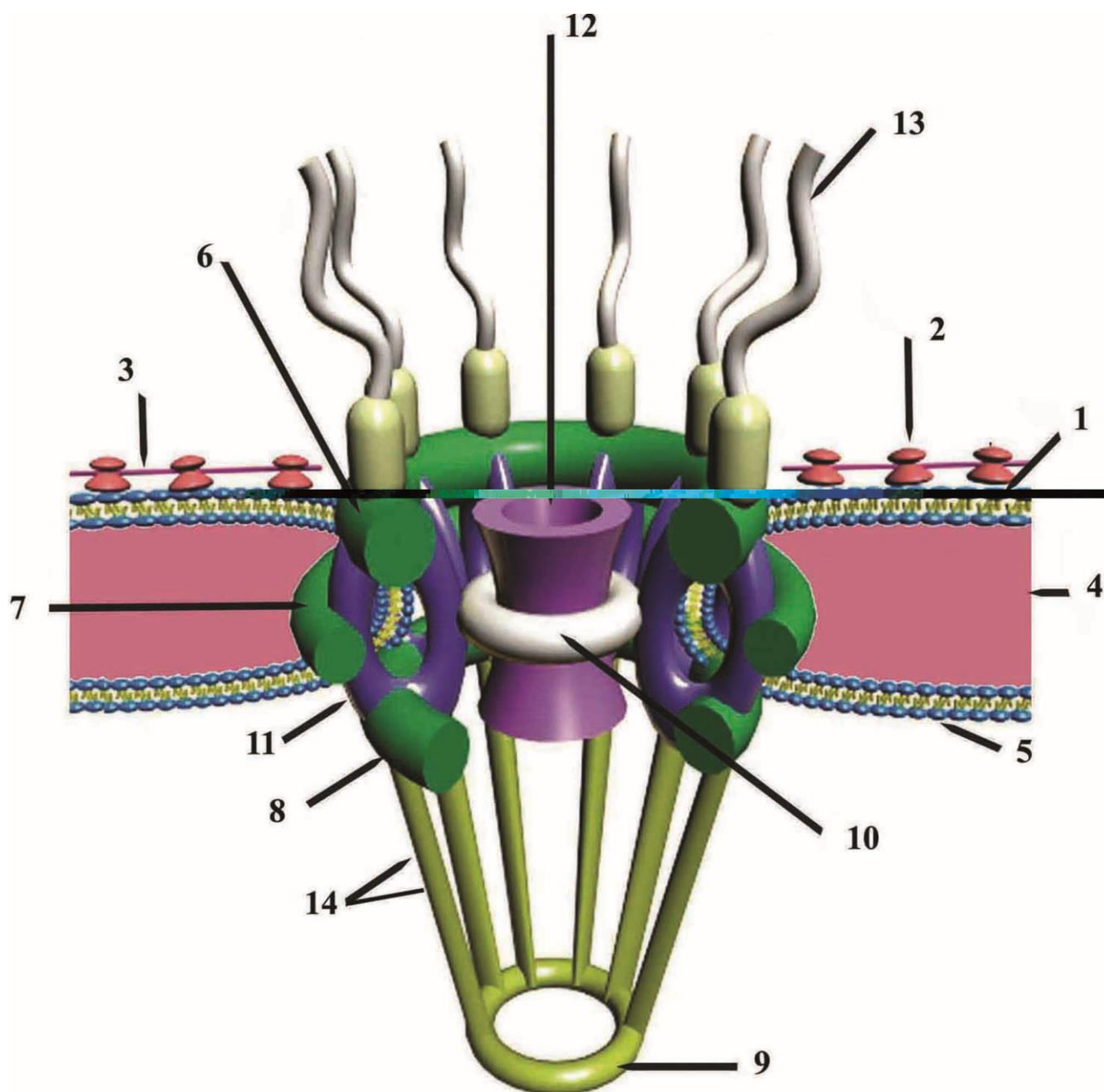


Рис. 5.4. Схематический рисунок пространственного строения комплекса ядерной поры (КЯП) (передняя часть частично обрезана). Схема была составлена по данным М. Suntharalingam, S. Wente (2003)

1. Наружная ядерная мембрана; 2. Рибосома; 3. иРНК; 4. Перинуклеарное пространство; 5. Внутренняя ядерная мембрана; 6. Цитоплазматическое пространство; 7. Люминальное пространство; 8. Ядерное кольцо; 9. Терминальное кольцо; 10. Внутреннее кольцо стержня; 11. Стержень; 12. Центральная часть; 13. Цитоплазматический филамент; 14. Ядерные филаменты.

Восемь белковых субъединиц соединяясь друг с другом на поверхности КЯП, обращенной к цитоплазме, образуют **цитоплазматическое кольцо**. От этого кольца в сторону цитоплазмы берут начало **цитоплазматические филаменты**, длиною в 30-50 нм. Благодаря участию этих филаментов вещества, которые должны поступить в ядро (import), направляются в сторону центрального канала КЯП.

Части «спиц», находящиеся в перинуклеарных пространствах, соединяясь также при помощи восьми белковых субъединиц, образуют **люминальное кольцо**.

На поверхности КЯП, обращенной к нуклеоплазме, соответственно формируется **внутреннее кольцо поры** (иногда его называют **ядерным кольцом**).

Указанные кольца в вертикальном направлении соединяются между собой (рис.5.4) восьмью спицами (spoke). Выросты спиц, обращенные в сторону центрального канала, соединяются друг с другом в области самой узкой части (40-55 нм) центрального канала при помощи **внутреннего кольца (центрального кольца)**. Вокруг последнего между соседними спицами находятся 8 **периферических каналов**, поперечный размер которых составляет 9-10 нм.

Берущие начало от внутреннего кольца ядерные филаменты, длиною 100 нм, направляясь в косом и радиальном направлении в сторону нуклеоплазмы, заканчиваются в самом мелком по размеру **терминальном (самом внутреннем) кольце**.

Указанные структуры, напоминающие корзину, называют *корзиной ядерной поры*, а филаменты, соединяющие кольца – *корзиночными филаментами*. Последние, обеспечивают выведение веществ из ядра (экспорт) направляя их в сторону центрального канала.

Из краткого описания КЯП следует, что связь между цитоплазмой и нуклеоплазмой осуществляется в основном с помощью его центральной части, размером 30-40 нм. Некоторые авторы (рис.5.4) указывают на наличие в центральном участке *туннеля (экспортеры)*, другие отмечают наличие *центральной пробки* в канале. Несмотря на несоответствие терминов, у всех авторов мнение однозначно: между ядром и цитоплазмой транспортные процессы осуществляются главным образом через центральный канал.

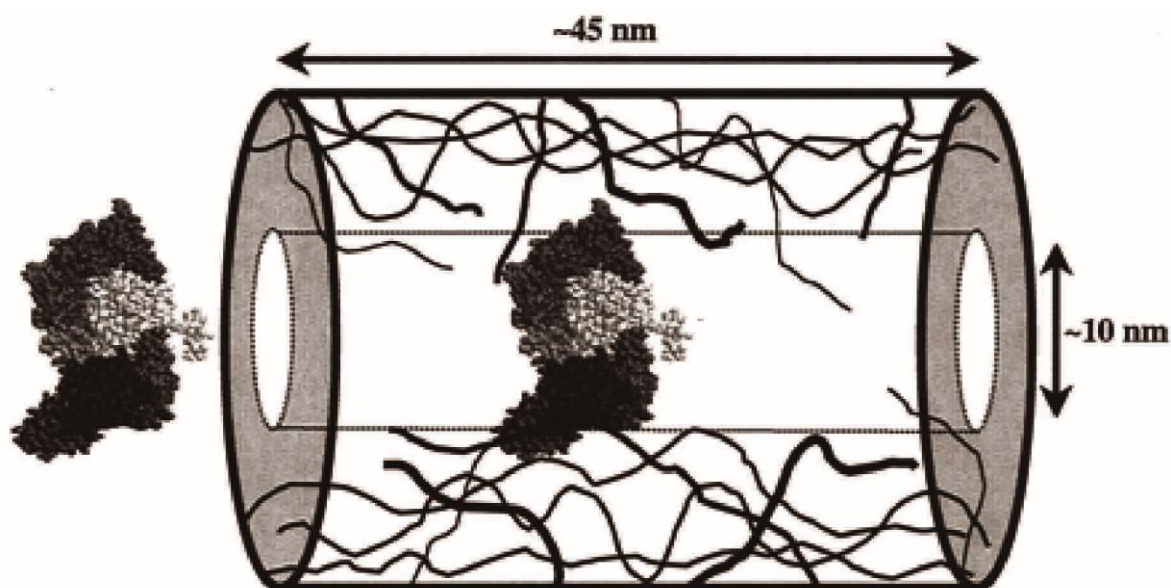


Рис.5.5. Схематический рисунок проницаемости ядерной поры в виде модели «жирного макарона» (obly spaghetti). Схема предложена I.G. Macara (2001).

Взаимоотношения структур, находящихся в центральном канале указаны на рис.5.5. Как видно из схем, в центральном канале длиной 45 нм имеется полость диаметром всего 10 нм. Вокруг этого канала располагаются повторяющиеся последовательности аминокислот (FG) – фенилаланина (F) и глицина (G) входящих в состав нуклеопоринов (на рис.5.5. данные участки указаны линиями различного диаметра и формы). Надо отметить, что между частями спиц направленных к ядерной поре, также остаются промежутки в 9-10 нм (рис 5.6).

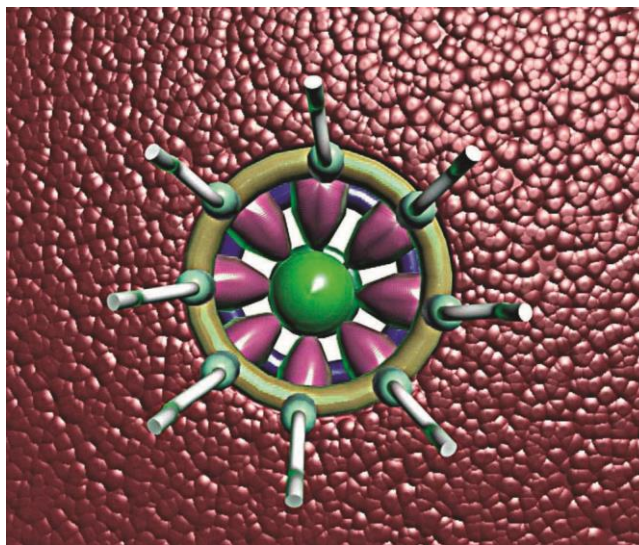


Рис. 5.6. Схема цитоплазматической поверхности комплекса ядерной поры. Видно пространство между центральной частью (зеленого цвета) и спицами (красного цвета).

Существуют три типа проводимости, осуществляемых ядерной порой.

- ограниченная диффузия
- облегченная диффузия
- односторонний Rap – зависимый транспорт

В термине *ограниченная диффузия* слово «ограниченная» подразумевает, что при этом способе через ядерную пору пассивно (путем простой диффузии) способны проходить молекулы с диаметром не более 10 нм и с молекулярным весом не выше 60 кД. То есть, ионы и молекулы диаметром до 10 нм и весом до 60 кД без всякой помехи могут проходить в обоих направлениях.

С помощью *облегченной диффузии* могут проходить молекулы, вступающие в специфическую связь с FG частями нуклеопоринов. Было установлено (Pollard V. Wet, 1996), что белок транспортин с молекулярным весом 90 кД, после соединения со специальным участком белка М9, связанным с иРНК, может транспортироваться через ядерную пору в обоих направлениях без затрат энергии. Пройти нуклеопоротеинового комплекса такого большого размера через ядерную пору становится возможным в результате взаимосвязи повторяющихся фрагментов FG нуклеопоринов с белком транспортин.

Наряду с транспортном, в облегченной диффузии также участвуют *фактор ядерного транспорта* - 2 (ФЯТ-2) и др. Об этом более подробную информацию можно получить в публикациях M.Suntharalingam и S.R. Wentenin (2003). Так как процессы, происходящие как при ограниченной, так и при облегченной диффузии протекают без затраты энергии, их относят к пассивному транспорту.

Несмотря на возможность облегченной диффузии, свободный транспорт локализованных в ядре гистонов и других мелких белки (ДНК и РНК полимеразы, факторы транскрипции и др.) из цитоплазмы в ядро, а иРНК, тРНК, частицы рибонуклеопротеинов и т.д. из ядра в цитоплазму практически невозможен.

Для транспорта указанных молекул в нужных направлениях, необходимо как минимум два условия.

Первое условие - у всех белков входящих в состав ядра, должны быть участки сигнала нахождения их в ядре (СЯН), а у белков, выходящих из ядра, должны быть соответственно участки сигнала ядерного экспорта (СЯЭ).

Второе условие - высокая концентрация Ran ГТФ - внутри ядра, а Ran-ГДФ - в цитоплазме. Второе условие связано с локализацией нуклеотида гуанина изменяющего фактора (Ran GEF) только лишь в ядре, а Ran-ГТФ-аза активирующего белка (Ran GAP) - только в цитоплазме. Разницы концентрации между Ran ГТФ и Ran ГДФ создается следующим образом: Ran ГДФ, входящий в ядро с помощью Ran GEF превращается в Ran ГТФ, а Ran ГТФ, входящий в состав цитоплазмы, под влиянием Ran GAP, подвергаясь гидролизу, превращается в Ran ГДФ. Указанная разница в концентрации создает условие для однонаправленного Ran-зависимого транспорта между цитоплазмой и ядром.

Переносчики Ran - зависимых импортинов и экспортинов, соответственно, схематично указаны на рис.5.7 и 5.8. Как видно из рисунка 5.7, транспортный белок, имеющий СЯН, после соединения с рецептором (В- импортином) входит через ядерную пору в нуклеоплазму. Этот процесс происходит в результате связи повторяющихся FG частей (см.выше) нуклеопорина и В импортина.

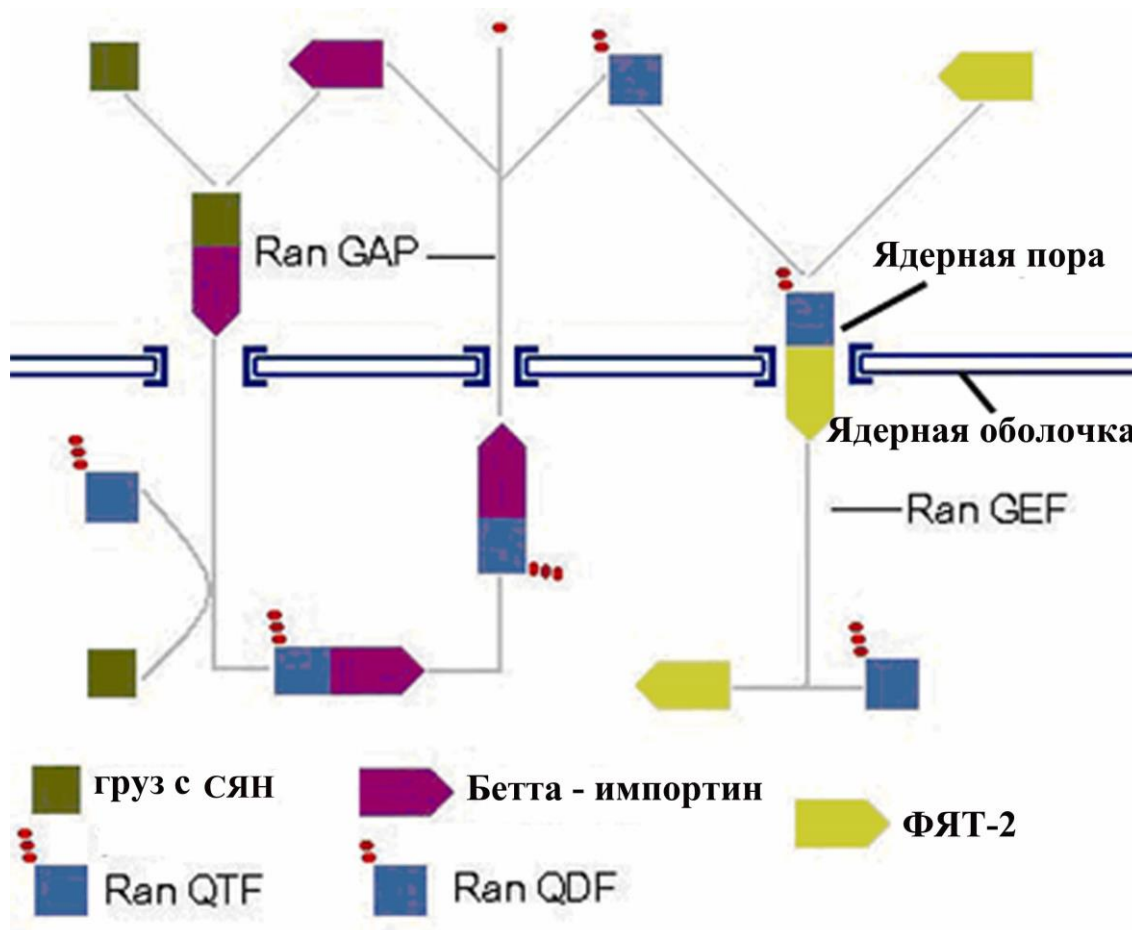


Рис. 5.7 (СЯН). Схематический рисунок, демонстрирующий роль Ran белка в ядерном импорте.

При вхождении комплекса В-импортин + груз в нуклеоплазму под влиянием Ran ГТФ, переносимый груз, отделяясь, остается в нуклеоплазме. А комплекс В-импортин вместе с Ran ГТФ переходит через ядерную пору в цитозоль. От воздействия Ran GAP, находящегося в цитозоле, создается комплекс, включающий в себя В-импортин, Ran- ГДФ и фосфатную группу. Освободившийся Ran ГДФ, соединяясь с находящимся в цитоплазме НТФ-2, вновь возвращается в нуклеоплазму. Здесь от воздействия Ran GEF, Ran ГДФ, отделяясь от НТФ-2, превращается в Ran ГТФ. Таким образом, количество Ran ГТФ в нуклеоплазме возвращается в свое прежнее состояние.

При ядерном экспорте (рис. 5.8) транспортный рецептор, несущий СЯН, соединяясь с белком (экспортином) и Ran ГТФ, переходит из нуклеоплазмы в цитозоль. В цитозоле от воздействия Ran GAP, в результате гидролиза Ran ГТФ, входящего в состав вышеуказанного комплекса, Ran ГДФ, фосфатная группа, груз с СЯН и эспортин, отделяются друг от друга. Экспортин так же как и импортин (см.выше), с помощью НТФ-2 возвращается в первоначальное место, т.е. в нуклеоплазму.

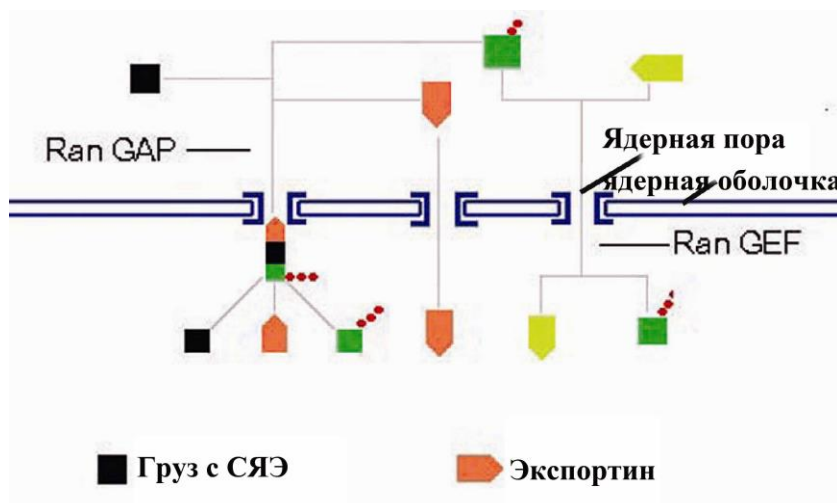


Рис. 5.8. Схематический рисунок, демонстрирующий роль Ran белка в ядерном экспорте

Поэтому, молекулы, подлежащие вхождению в ядро (гистоны, ДНК полимеразы, РНК полимеразы, факторы транскрипции, факторы скольжения и др.) и выходу из ядра (иРНК, тРНК, рибонуклеопротеины и др.), могут переноситься только избирательным путем, т.е. с помощью других транспортных белков, в одном направлении через расширенные ядерные поры.

Как при облегченной диффузии, так и однонаправленном Ran-зависимом переносе, ядерные каналы диаметром 10 нм, могут расширяться максимум до 25 нм. Только внутри ядра молекулы РНК, соединяясь с большим количеством (около 500) белков, образуют рибонуклеопротеиновые частицы диаметром до 50 нм. Такие частицы могут переноситься через ядерные поры только после их деформации. Например, молекула, имеющая диаметр 50 нм, может покинуть ядро только после деформации, преобразуясь в палочкообразную структуру диаметром 25 нм. Твердые частички размером больше 25 нм, неспособные к деформации, не могут проходить через ядерную пору.

НУКЛЕОПЛАЗМА

Пространства между хроматином и ядрышками внутри ядра называются **нуклеоплазмой**. В состав нуклеоплазмы входят ядерные частицы и ядерный матрикс.

К **ядерным частицам** относятся межхроматиновые и околохроматиновые гранулы и рибонуклеопротеиновые частицы различных размеров.

Межхроматиновые гранулы располагаются в ядре между хромосомами. Эти гранулы диаметром 20-25 нм соединяются с близлежащим хроматином с помощью тонких фибрилл. Межхроматиновые гранулы состоят из белковых факторов, участвующих в процессинге РНК и из мелкозернистых рибонуклеиновых скоплений.

Околохроматиновые гранулы диаметром от 30 до 50 нм, располагаются вокруг гетерохроматина. В свою очередь вокруг этих гранул выявляются, относительно светлоокрашенные кольцеобразные образования шириной 25 нм. В их составе выявляются РНК 4.7S и белки. При злокачественных опухолях или при высокой температуре (гипертермии), количество этих гранул увеличивается.

Гетерогенные и мелкозернистые рибонуклеопротеиновые частицы, образуются в ходе процессинга иРНК из молекул-предшественников, различных белков и мелких молекул РНК.

Структурно **ядерный матрикс**, состоит из комплекса ядерной поры, ядерной пластинки, остатков ядрышек, остатков рибонуклеиновых сетей и фибриллярных элементов. Указанные производные иногда объединяют под общим термином – *ядерный скелет (кариоскелет)*. Белки, входящие в состав ядерного скелета, представлены негистоновыми белками и играют в основном осевую роль для соединения петель ДНК.

Сравнительные расчеты показывают, что из общего содержания всех биохимических компонентов ядра в состав ядерного матрикса входят приблизительно белков – 10%, РНК – 30%, ДНК – 1-3% и фосфатов – 2.5%.

ХРОМАТИН

Главным структурным компонентом ядра является хроматин. Хроматин представлен молекулами ДНК, объединяющими в себе геном, а так же связанных с ними белков.

ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА (ДНК)

Молекулы **дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК)** объединяют в себе геном человека, в котором закодирована вся биологическая информация, обеспечивающая функционирование человека как живого организма: это процессы эмбриогенеза, роста, развития, метаболизма, особенности индивидуального развития.

Среди научных достижений прошлого века особое место занимает открытие модели строения молекулы ДНК лауреатами Нобелевской премии J.D. Watson и F.H.C. Krik (1953). На основе полученных этими авторами данных молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных антипараллельных цепей связанных между собой через комплиментарные связи между нуклеотидами и закрученных в спираль, в совокупности напоминая нитевидную лестницу (рис.5.9А). Нуклеозиды в каждой из полинуклеотидных цепей, имея в своем составе *пуриновые* (аденин, гуанин) и *пиримидиновые* (цитозин, тимин) азотистые основания, моносахарид *дезоксирибозу* и остаток *фосфорной кислоты*, соединяются друг с другом в результате образования фосфодиэфирных связей.

Связи же между двумя соседними цепями создаются по принципу комплементарности азотистых оснований: аденин (А) – тимин (Т) и гуанин (Г) – цитозин (Ц). Между аденином и тиминном образуются две, а между гуанином и цитозином – три водородные связи (рис. 5.9В). Указанные комплементарно связанные азотистые основания называются *основными парами* или же *нуклеотидными парами*.

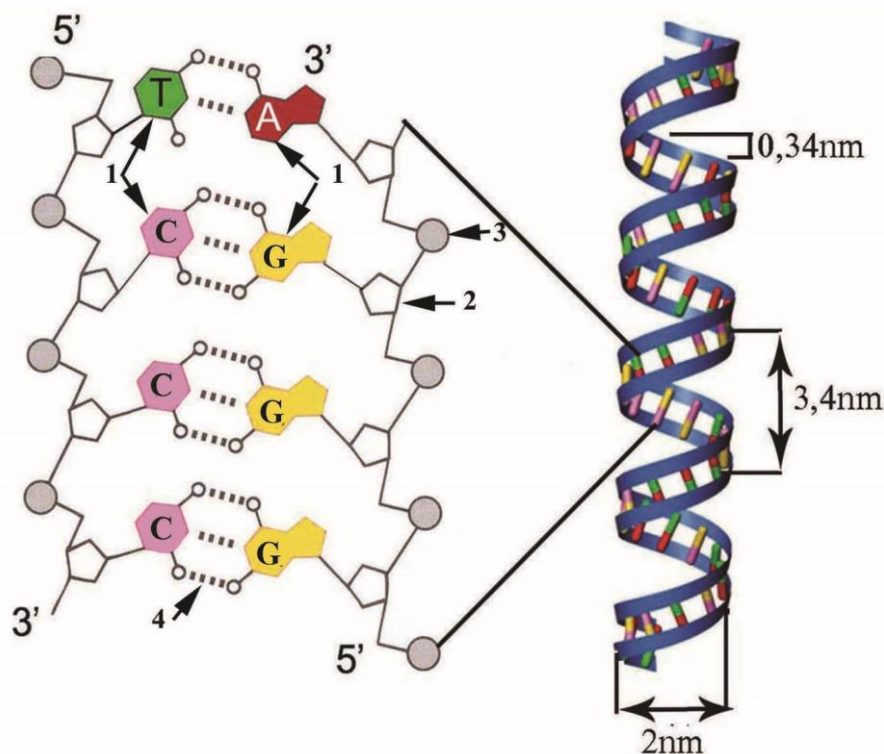


Рис. 5.9. Схематический рисунок связи между трехмерным строением молекулы ДНК (А) и гликозидами полипептидных цепей (В). Схема была составлена по данным J.D. Watson и F.H.C. Krika (1953).

1. азотистые основания; 2. дезоксирибоза; 3. фосфатная кислота ; 4. водородные связи

В одном обороте спирали цепи ДНК, в среднем, располагаются 10, 2 основных пар. Расстояние между соседними основными парами – 0,34 нм, длина одного оборота составляет 3,4 нм. Диаметр молекулы ДНК составляет 2 нм (рис. 5.9 В).

В неделящихся клетках количество молекул ДНК соответствует количеству хромосом, находящихся в ядре, т.е. 46. Если соединить молекулы ДНК одной клетки конец в конец по прямой линии, то общая длина будет составлять 1.7-2 метра.

Чтобы молекула ДНК такой длины, расположилась внутри ядра, диаметр которого в среднем не превышает 6 мкм, длина ее должна быть сильно укорочена. Это можно сравнить с нитью длиной в 40 км, собранной в теннисном мячике. Расположение молекулы ДНК в ядре происходит с участием специальных упаковочных белков. Упаковочные белки в основном делятся на две большие группы: гистоновые и негистоновые хромосомные белки. Находящийся внутри ядра нуклеопротеиновый комплекс, имеющий фибриллярное строение, образован в результате соединения молекул ДНК с вышеперечисленными белками и называется **хроматином**. Современные представления о строении структур, принимающих участие в процессах укорочения и плотного расположения молекул ДНК ядра, окончательно сложились после того, как с помощью электронно-микроскопического, рентгеноструктурного исследования и другими методами были изучены структуры, выявляющиеся при воздействии **фермента нуклеазы** (разрушающей ДНК) на хроматин внутри ядра. Было уточнено, что во время разрушения ДНК хроматин, в конечном счете, расщепляется на фрагменты приблизительно из 200 нуклеотидных пар. Сравнительное

изучение электронограмм этих фрагментов и тонких хроматиновых нитей (рис.5.10) показало, что вторые образуются в результате соединения первых друг с другом. Опираясь на эти сведения, R.D. Kornberg (1974), предложил назвать фрагменты содержащие в своем составе 200 нуклеотидных пар, структурной единицей хроматина - **нуклеосомой** (рис.5.11А).

Перед тем как приступить к характеристике нуклеосом и хроматосом, будет уместно остановиться на электронномикроскопическом строении тонких хроматиновых нитей. Как видно из рис 5.10 А – **тонкие хроматиновые нити** состоят из сферических частиц и объединяющих их тонких филаментарных структур. Многие авторы сравнивают это «с *нанизанными на нить бусинами*» (рис 5.10В). В результате проведенных исследований было определено, что «нить» диаметром 2 нм- сама молекула ДНК, а «бусины» диаметром 10 нм - молекулы ДНК, объединенные с гистоновыми белками, которые называются хроматосомами. Надо отметить, что химический состав и строение трехмерной пространственной структуры нуклеосомы было уточнено только в 1997 году.

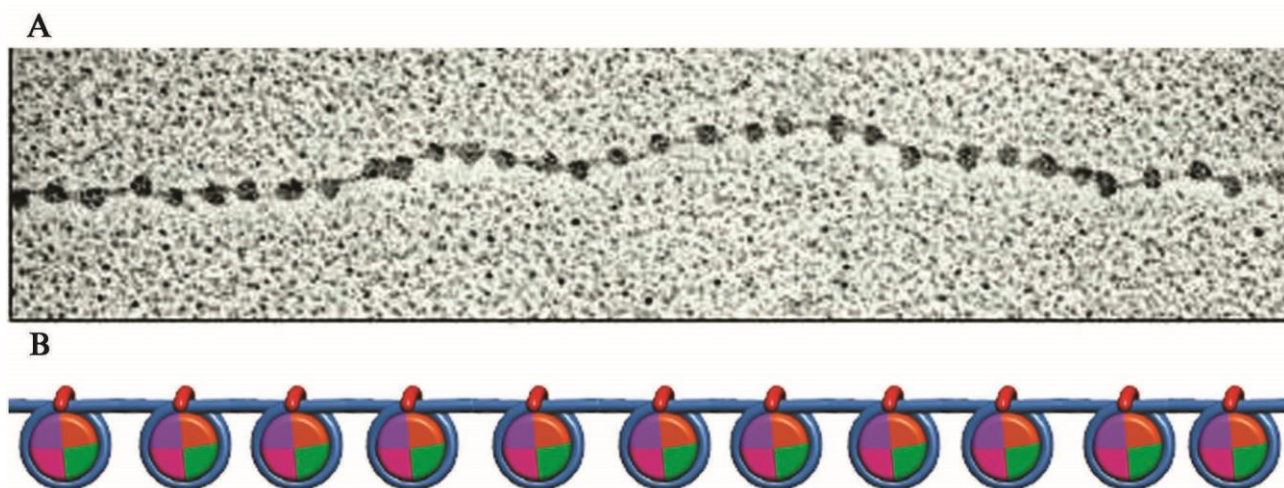


Рис. 5.10. Электронно-микроскопический (А) и схематический (В) рисунки тонких хроматиновых нитей. Электронограмма была взята из учебника В. Alberts et al Molekular Biology of the Cell,2002.

В составе хроматина было найдено 5 видов гистоновых молекул (Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4). В каждой клетке человека их общее число составляет 60 миллионов, а вес равен весу молекулы ДНК. Гистоновые белки состоят из коротких полипептидных цепей, в составе которых имеются 102-135 аминокислот. Так как в гистонах преобладают аминокислоты с щелочными свойствами (аргинин и лизин), они с легкостью могут вступать в связь с отрицательно заряженными фосфатными группами молекул ДНК. В образовании нуклеосом участвуют 4 типа гистоновых белка (Н2А, Н2В, Н3 и Н4), по 2 молекулы от каждого (рис.5.11 А). Таким образом, 8 гистоновых молекул (октамер) образуют ось, вокруг которой происходит обматывание 1,65 раз двухцепочной молекулы ДНК, содержащей в своем составе 146 пар нуклеотидов. Результатом описанного и является формирование нуклеосомы (рис.5.11А).

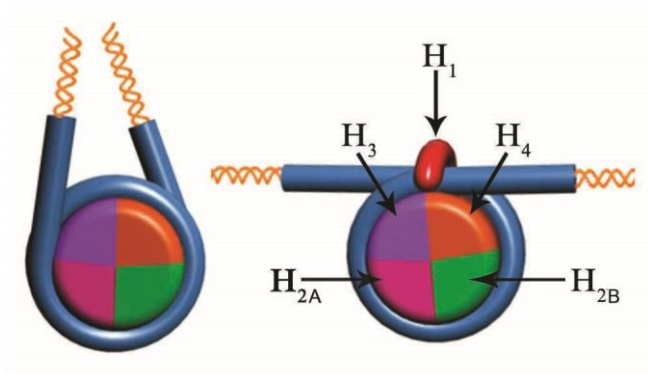


Рис. 5.11. Схематическое строение нуклеосомы и хроматосомы.

Так как длина молекулы ДНК, обмотанной вокруг гистоновых осей составляет 68 нм, а диаметр образовавшейся из нее нуклеосомы - 10 нм, то длина молекулы ДНК на уровне тонких хроматиновых нитей укорачивается всего в 6-7 раз.

Последующее укорачивание молекул ДНК происходит с участием хроматосом. **Хроматосомы** формируются следующим образом: молекула ДНК, включающая в себя 116 нуклеотидных пар дважды огибается вокруг гистоновой оси и соединяется при помощи белка H1 (рис.5.11В).

Хроматосомы в составе тонких хроматиновых нитей соединяются друг с другом посредством «линкерных» участков ДНК (linkers DNA) содержащих до 60 нуклеотидных пар. Хроматосомы в количестве от 6 до 8, связываясь друг с другом с помощью белка H1, образуют структуру диаметром 30 нм (рис. 5.12А и В). Ее называют **солиноидом** (греч.:*солиноид-труба*) или же **хроматиновыми волокнами**.

А



В

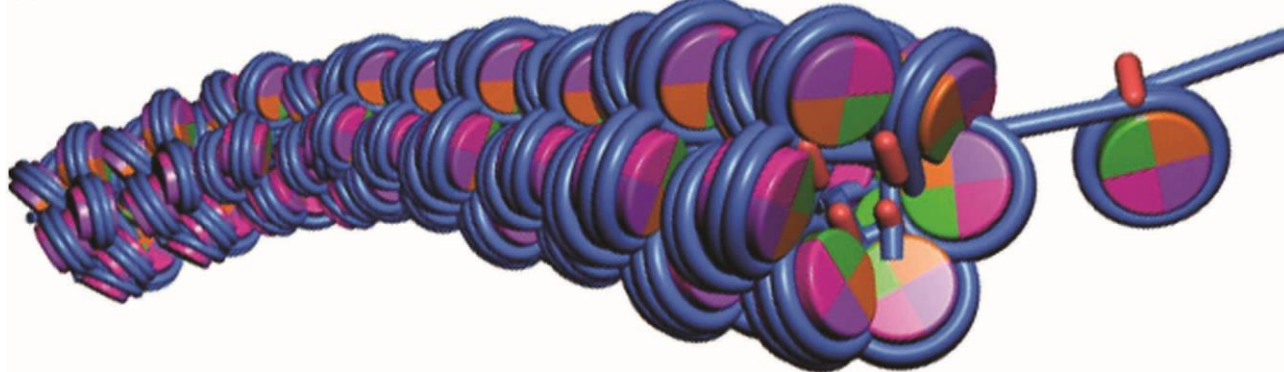


Рис. 5.12. Электронно-микроскопический (А) и схематический (В) рисунки солиноида. Электронограмма взята из учебника В. Alberts et al. Molecular Biology of the Cell., 2002, 4 ed

При вторичном уплотнении хроматина на уровне солиноида длина молекулы ДНК в среднем укорачивается в 40 раз.

В результате скручивания и сворачивания солиноида, и тем самым очередного этапа укорачивания молекул ДНК образуются **хроматиновые волокна диаметром 100-130 нм**. Молекулы ДНК в составе хромосомных волокон диаметром как 30 нм, так и 100-130 нм частями, богатыми (более 65%) аденином-тимином (АТ), вступая в соединение со стержневой частью хромосом, образуют **петли** (рис.5.13).

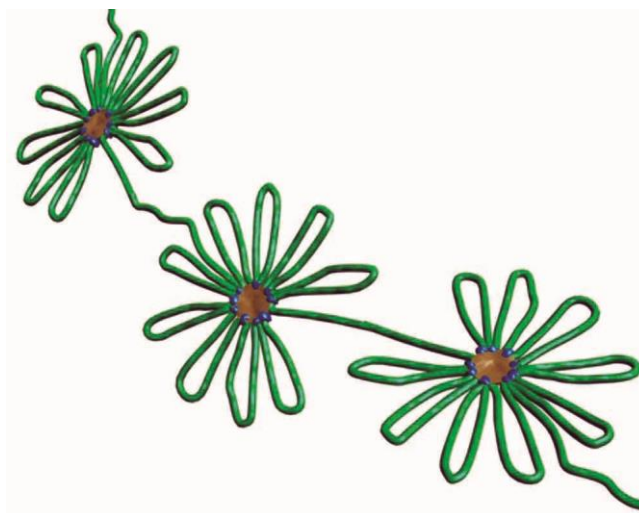


Рис. 5.13. Схематический рисунок хромосомных петель.

Как в интерфазных так и метафазных хромосомах, также обнаружены хроматиновые волокна диаметром 130-300 нм. О характере образования волокон таких размеров точных сведений нет, однако предполагается, что подобно тому, как из нуклеосом образуются солиноиды, так и из солиноидов, в результате различного рода их сворачиваний, образуются указанные хроматиновые волокна. Некоторые авторы, хроматиновые волокна, имеющие диаметр 100-130, называют также хромонемой. Надо отметить, что термины «хромонема» и «хромомер» использовались несколько лет назад, первый использовали как обозначение волокон внутри хромосом, а второй – как частицы встречающиеся на протяжении этих нитей. В настоящее время эти термины считаются устаревшими. Только лишь термин «хромомер» используется сейчас, для обозначения темных зон на огромных хромосомах.

Всего через три года после того, как были получены сведения о делении клеток путем митоза, С. Rabl (1885) выдвинул идею о том, что даже в период интерфазы хромосомы в ядре располагаются в строго определенных участках. В дальнейшем мысль касательно трехмерного пространственного строения хромосом полностью подтвердилась при использовании метода флюоресцентной гибридизации *in situ* (в культуре).

Хромосомы образуются связи с ядерной оболочкой, при этом их центромерные и теломерные участки, располагаясь противоположно друг к другу, формируют располагающийся здесь (под ядерной оболочкой) гетерохроматин.

Топографическое положение хромосом внутри ядра у птиц и млекопитающих, можно сказать, что остается неизменным на протяжении 33-х миллионов лет. Были так же

выявлены закономерности последовательного расположения генов, входящих в состав хромосом. Было определено, что в периоде индивидуального развития, первоначально экспрессируются гены хромосом расположенных в центре ядра, а далее – находящихся на периферии. В интерфазном ядре центромерные и теломерные участки хромосом в виде гетерохроматина находятся всегда вблизи ядерной оболочки.

В интерфазном ядре, а также между соседними хромосомами, остаются **межхромосомные области**. Во внутрихромосомных и межхромосомных областях происходит синтез первичных транскриптов по коду соответствующих генов, процессы сплайсинга и процессинга, формирование малых и больших частиц нуклеопротеинов и т.д.

Результатом электронномикроскопических исследований хромосом, меченых бромдиоксиуридином (BrdU) – аналогом тимина, представленных в форме схемы (рис.5.13.1), ясно демонстрируют участие и конкретное месторасположение каждой хромосомы в составе сформированного хроматина (центрально расположенные хромосомы указаны желтым цветом). Наряду с наличием взаимных связей между соседними хромосомами (указано большой стрелкой), во многих участках, как между соседними хромосомами, так и внутри отдельных хромосом ясно видны непрерывно переходящие друг в друга межхроматиновые области. В этих участках находятся также мелких размеров части соседних хромосом (указаны маленькой стрелкой). Межхроматиновые области в периферических частях ядра соединяются с каналом ядерной поры.

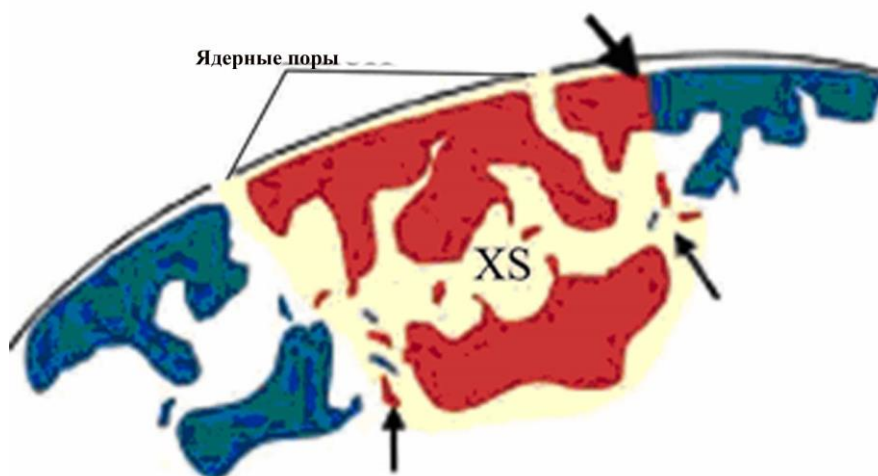


Рис. 5.13.1 Основанная на результатах электронномикроскопических исследований схема топографии межхроматиновых областей (XS). Объяснение дается в тексте. Схема была взята из статьи, опубликованной А.Е. Visser et al. J. Cell Sci., 2000, № 113, h.258-93

Надо отметить, что за счет хроматиновых нитей различного диаметра, петель, а также ряда неизвестных причин, длина молекул ДНК в составе интерфазных хромосом в среднем укорачивается в 1000 раз.

В метафазной хромосоме эта цифра минимально достигает 10 тыс. Поэтому хроматин в интерфазном ядре называется **рыхлым**, а находящийся в метафазной хромосоме – **компактным хроматином**.

Рыхлый хроматин определяется в виде гетерохроматина и эухроматина.

ГЕТЕРОХРОМАТИН

Гетерохроматин является транскрипционно неактивной конденсированной формой хроматина. При наблюдениях в световой микроскоп на препаратах, окрашенных основными красителями, он выявляется в основном в периферической зоне ядра, в виде темнотазофильных глыбок, имеющих разнообразную форму.

Под электронным микроскопом гетерохроматин выявляется в виде плотных скоплений состоящих из непокрытых оболочкой гранул и спиральнозакрученных тонких фибрилл. Несмотря на то, что большая часть гетерохроматина находится по периферии ядра и связана с ядерной оболочкой, он встречается также и в нуклеоплазме в виде отдельных скоплений. Гетерохроматин, связанный с ядерной оболочкой, отсутствует на уровне «канала» ядерной поры (рис.5.2 А,В).

В составе интерфазного ядра встречается два вида гетерохроматина. Один из них – конститутивный, второй – это факультативный гетерохроматин. Молекулы ДНК в составе **конститутивного (постоянного) гетерохроматина** никогда и ни в каких клеточных формах не транскрибируются. Примером этому может служить гетерохроматин, образованный при участии центромер и теломер хромосом. Особенность строения конститутивного гетерохроматина заключается в том, что молекула ДНК, участвующая в его организации, формируется за счет повторяющихся 100-1000 раз определенной последовательности азотистых оснований. Например, в теломерах хромосом человека одна из цепей ДНК содержит повторяющиеся TTAGGG азотистые основания.

В отличие от конститутивного, молекулы ДНК участвующие в организации **факультативного гетерохроматина** в одной группе клеточных типов проявляют способность к транскрипции (т.е. к переходу в состояние эухроматина), тогда как в другой группе клеток способность к транскрипции отсутствует и в них сохраняется состояние гетерохроматина.

В качестве примера факультативного гетерохроматина можно привести тельце *Барра* или же половой хроматин (*гоносом*), встречающийся у млекопитающих. Известно, что в соматической клетке женского пола имеются две X-половых хромосом. Несмотря на то, что у мужского пола имеется только одна X-хромосома, у обоих полов количество синтезируемых белков кодированных X-хромосомой одинаково. Это происходит в результате того, что у женщин одна из X-половых хромосом (выбор носит характер случайности) еще до периода имплантации эмбриона в стенку матки, конденсируется и превращается в факультативный. Переход одной из X-хромосом в неактивную форму называли **лайонизацией** в честь Мэри Лайон, автора всесторонне изучившей этот процесс.

ЭУХРОМАТИН

Эухроматин, будучи активной частью хроматина, является местом синтеза различных молекул РНК путем транскрипции молекул ДНК, являющихся носителями генетической информации. Эухроматин в отличие от гетерохроматина светооптически

проявляется как светло окрашенная гомогенная структура. При при электронной микроскопии он включает в себя неконденсированные нитеобразные фибриллярные петли, а также электронно светлые поля, непрерывно переходящие друг в друга (рис.5.2.А,В).

По последним данным основная масса эухроматина (приблизительно 90%) состоит из солиноидов диаметром в 30 мкм. Указанные участки эухроматина транскрипционно не активны. Остальная часть эухроматина (10%), состоящая из нуклеосом (диаметр 10 мкм), соединенных друг с другом с помощью молекул ДНК, бывает в состоянии готовности к участию в процессах транскрипции.

ЯДРЫШКО

Ядрышки являются немембранными, компактно расположенными структурами, выявляющимися только лишь в интерфазе. При митозе вследствие конденсации хроматина они как отдельные структуры не выявляются. В результате того, что в составе ядрышек содержится большое количество рибосомальных РНК (рРНК) при окраске гематоксилин-эозином данные структуры выявляются как темно окрашенные, базофильные сферической формы скопления. Обычно в каждом ядре встречается по два или три ядрышка.

Между степенью активности клетки и размерами ядрышка, а также интенсивностью их окрашивания существует сильная взаимосвязь. Так, например, в клетках, в которых синтезируется большое количество белка (эмбриональных, злокачественных, железистом эпителии и т. д.) наряду с темным окрашиванием ядрышки достигают размеров более 1 мкм, а в клетках со слабым синтезом белка (гладкомышечных, мужской половой клетке) их размер не превышает 1 мкм. Иногда в клетках, где синтез белка очень высок, 25 % объема ядра приходится на ядрышко.

При исследовании под световым микроскопом, структуры ядрышка, напоминающие плотное сплетение из нитей, называются также *нуклеомой (ядрышковыми нитями)*.

Под электронным микроскопом в ядрышке выявляются *фибрилярный центр, плотно-фибрилярный и гранулярный участки* (рис. 5.2 А и 5.14).

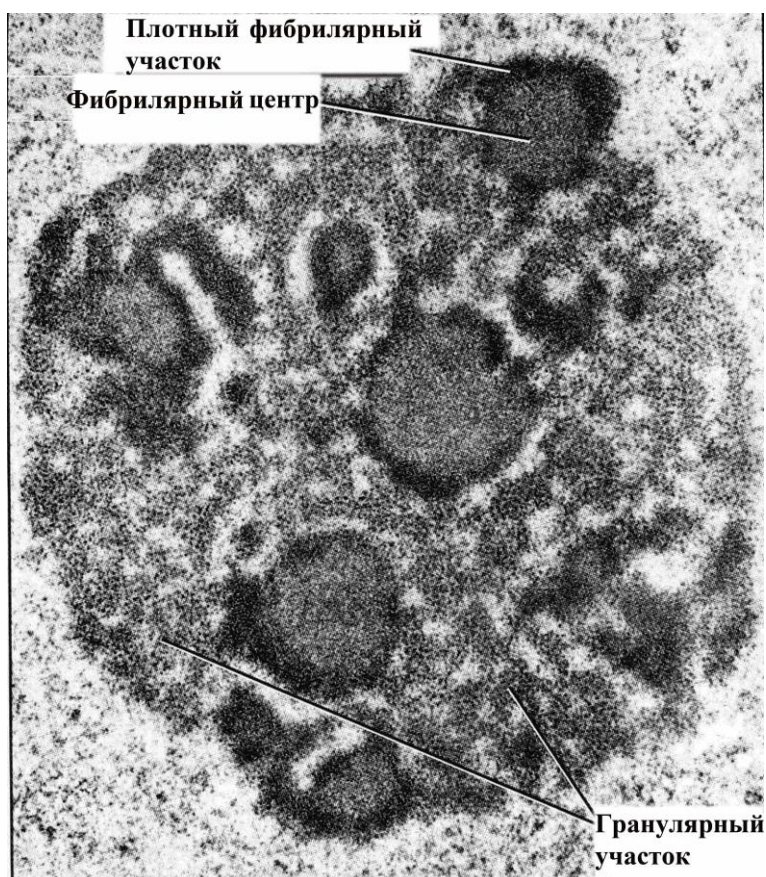


Рис. 5.14. Электронно-микроскопический рисунок ядрышка. Хорошо видны фибриллярный центр, плотно-фибрилярный и гранулярный участки ядрышка. Рисунок предложен D.W. Fawcett (The Cell Philadelphia; WB. Saunders, 1981, Fig. 134)

Фибриллярный центр — является светло окрашенной (как и ядерный эухроматин) частью ядрышка округлой формы, в составе которого находятся необходимые участки ДНК для транскрипции рРНК.

В составе рибосом эукариотических клеток, встречаются рРНК 5S, 5,8S, 18S, 28S.

Из них гены 5,8S, 18S, 28S рРНК находятся в фибриллярном центре ядрышка, а гены рРНК 5S - вне ядрышка. Таким образом, участки генов рРНК 5,8S, 18S, 28S в составе пяти хромосом человека (13, 14, 15, 21, 22) соединяясь, образуют фибриллярный центр ядрышка. Эту часть ядрышка также называют **организатором ядрышка**, так как она первая формируется при образовании дочерних клеток в результате деления. А ген 5S рРНК находится в составе первой хромосомы (рис.5.14).

Плотно-фибрилярный участок ядрышка располагается вокруг фибриллярного центра, образуется он в результате плотного скопления первичных генных транскриптов рРНК. Первоначально молекулы ДНК, расположенные по периферии фибриллярного центра, с помощью полимеразы I образуют транскрипт пре-рРНК 45S.

Из последних же, в результате нескольких делений, образуются свободные 5,8S, 18S, 28S рРНК. Следует помнить, что 5S рРНК транскрибируется с помощью полимеразы III из молекулы ДНК I-ой хромосомы.

Гранулярный участок ядрышка диаметром 15-20 нм, состоит из прорибосомальных субъединиц, образовавшихся в результате соединения рРНК с рибосомными белками, (рис.5.14). Указанные субъединицы, в свою очередь, пройдя через ядерные поры, входят в цитозоль, где принимают участие в формировании рибосом.

ГЕНЫ И ИХ ЭКСПРЕССИЯ

Гены - наследственные единицы, находящиеся в молекулах ДНК, которые несут всю полноту биологической информации, передаваемую из поколения в поколение. Каждый ген в составе различных хромосом, либо в митохондриальной молекуле ДНК имеет свое определенное место. Известно, что реализация генетической информации происходит после переписывания ее с молекулы ДНК на цепь рибонуклеиновой кислоты с помощью комплиментарных связей (см. далее). Иногда роль генов связывают с синтезом специализированных белков, выполняющих определенные функции. При этом нельзя забывать, что информационная РНК (иРНК), несущая в себе коды (кодируемая РНК), в плане последовательности аминокислот (см. ниже), для синтеза белка, составляет всего 4-5% всех РНК синтезируемых в ядре. Остальная же часть приходится на некодируемые РНК (см. ниже): рибосомальная (рРНК), транспортная РНК (тРНК), малая ядрышковая РНК (мяРНК), малое цитоплазматическое (мцРНК), самое малое микро (микРНК) и т.д. Таким образом, с молекулярной точки зрения термин ген означает месторасположение в составе молекулы ДНК нуклеотидных последовательностей для синтеза одной из вышеуказанных молекул РНК.

Необходимые для синтеза молекул РНК нуклеотидные последовательности в составе молекул ДНК, находятся не в собранном, а в разбросанном виде. То есть, части молекул ДНК определяющие последовательность нуклеотид какого-либо РНК (**экзоны**) сочетаются с нуклеотидными последовательностями (**интроны**), не участвующих в синтезе этой же РНК. Наряду с интронами (внутри генов) в составе молекул ДНК имеются также межгенные нуклеотидные последовательности (рис.5.15.).

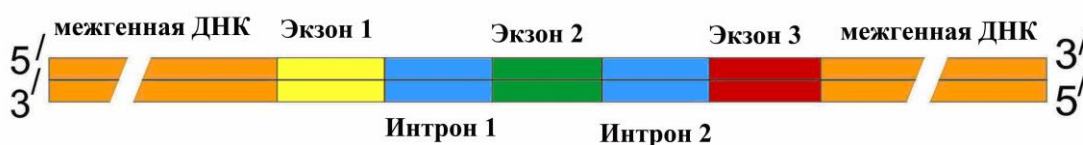


Рис. 5.15. Схематический рисунок топографического положения кодируемых (экзоны) и некодируемых (межгенные нуклеотидные последовательности и интроны) частей в составе молекул ДНК.

Начало и конец синтеза белка с определенной последовательностью аминокислот в их составе, кодируются тремя соседними нуклеотидами – триплетами молекулы ДНК. Каждый из этих триплетов называется **кодон**.

Из четырех разновидностей нуклеотидов могут формироваться 64 триплетов - кодонов. Так как сумма аминокислот, участвующих в синтезе белков – 20, месторасположение в полипептидных цепях большинства из них кодируется несколькими кодонами. Так, только две аминокислоты из 20 – метионин (АУГ) и триптофан (УГГ),

кодируются одним кодоном, тогда как у остальных эта цифра варьирует от 2 до 6. Фенотипическое проявление генов или генетической информации, наследственно закодированной в молекулах ДНК, называется **экспрессией генов**. В виду сложности протекания этот процесс проходит в несколько этапов. Сначала происходит **транскрипция** (копирование) молекул ДНК в тех местах, где необходима экспрессия важных генов. Учитывая существенную разницу в механизмах транскрипции различных групп генов, остановимся только на механизме транскрипции генов, участвующих в синтезе белка.

Одним из важнейших условий для нормальной деятельности клеток, является точное регулирование транскрипции тысяч генов, находящихся в составе их генома. Учитывая, что каждый ген имеет собственную программу транскрипции, для того чтоб контролировать эти процессы, с одной стороны необходимы соответствующие инструкции по регулированию активности генов, а с другой стороны, наличие факторов, приводящих в действие эти программирующие инструкции. С этой точки зрения интересно то, что как и сами гены, так и информация о программах возможной транскрипции кодированы в молекуле ДНК в виде нуклеотидных последовательностей. К таким нуклеотидным последовательностям, называемых **цис-влияющими элементами**, относятся основные (базальные) промоторы, проксимальные промоторные усилители (enhancers), глушители (silencers) и ограничивающе-изоляторные элементы (insulators) (рис 5.16).



Рис. 5.16. Схематический рисунок расположения нуклеотидных последовательностей взаимосвязанных с факторами, участвующими в процессе начала и конца транскрипции во время экспрессии генов.

Элементы, относящиеся к **основным (базальным) промоторам**, участвующие в запуске процесса транскрипции генов от начальной точки транскрипции (обычно отмечается как +1), располагаются в нуклеотидной последовательности от -40 до +40. Элементы, относящиеся к основным промоторам приведены на рис 5.17. Как видно из рисунка, в области точки старта транскрипции располагается – инициатор, проксимально от него - TATA boks и TFIIB (см. ниже), узнающий элемент (BTE), а в дистальной стороне располагается нижний промоторный элемент (APE). По самым последним данным (C.V.Lim и др, 2004) в составе осевого промотора были найдены новые промоторы, от +18-ти до +27-и, объединившие в себе 10 последовательных нуклеотидов и назвали его участком десяти элементов (УДЭ - MTE-motit ten element).

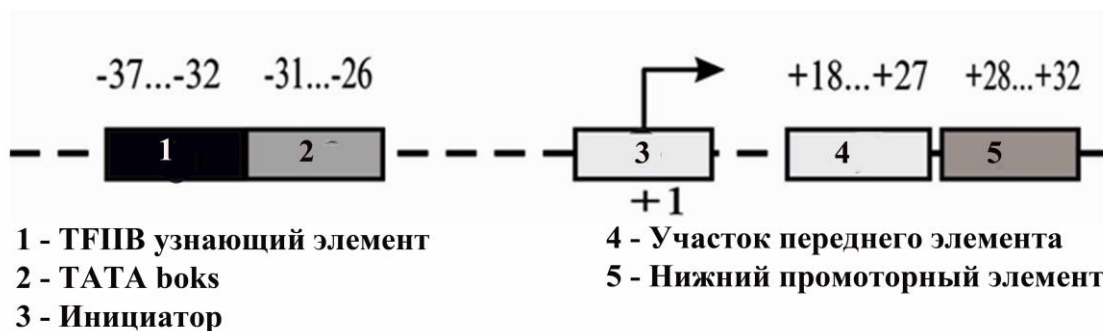


Рис. 5.17. Схематический рисунок элементов, относящихся к основным (базальным) промоторам. Объяснение дается в тексте.

Не все элементы, входящие в состав промоторов, встречаются во всех генах. Так, первоначальные предположения о наличии ТАТА boks во всех генах, в последующем были уточнены: оказалось, что из имеющихся у человека 1031 основных промоторов, он обнаруживается только в 32% (Suzuki и др.). Одним из интересных фактов является то, что в результате мутации потерявшие активность ТАТА boks и АРЕ нуклеотидные последовательности, могут компенсироваться элементами УДЕ. Выявлены также специальные факторы активаторов и репрессоров, взаимосвязанных с ТАТА boks и АРЕ. Элементы основных (базальных) промоторов принимают активное участие не только в запуске экспрессии генов, но и в их регуляции.

Проксимальные промоторные участки, находятся обычно от +1 стартовой точки в промежутках между -40 и -250 нуклеотидами (рис.5.16-5). В этих участках могут располагаться многочисленные последовательности нуклеотидов, взаимодействующих с фактором, соединяющимся с ДНК. Эти участки наряду со способностью соединяться с факторами, влияющими на активность репрессоров и активаторов, могут также играть роль посредника для образования взаимосвязи между отдаленно расположенными от точки – старт усилителями и элементами основных промоторов.

Усилители (ингансеры) и глушители (сайлансеры) могут находиться на расстоянии десятков тысяч нуклеотидных пар от точки старта, в местах регуляторных нуклеотидных последовательностей на конце 5' и 3' сторонах или же в интронах (рис. 5.16 2,3,4,5). Создавая связи со специальными факторами транскрипции, усилители и глушители способны соответственно останавливать и активировать (увеличение числа синтезируемых иРНК) экспрессию генов. Обычно некоторые усилители участвуют в экспрессии генов только отдельных тканей и групп клеток.

Пограничники-изоляторы (инсуляторы) не дают возможность воздействия одного усилителя, связанного с одним геном, на соседние гены (рис 5.16 -1).'

Белки, участвующие в экспрессии генов в составе эухроматина, делятся на 3 группы

1. Белки, создающие условия для движения транскрипционного аппарата на протяжении молекулы ДНК, т.е. белки, участвующие в модификации и реконструкции (ремодуляции) хроматина.

2. Белки, способные связываться с определенными нуклеотидными последовательностями в составе молекулы ДНК и избирательно усиливающие (активаторы) или останавливающие (репрессоры) транскрипцию соответствующих генов.

3. Белки, создающие связь с промоторными элементами молекулы ДНК, обеспечивающих синтез молекул РНК, и тем самым участвующих в организации начала комплекс процесса транскрипции.

В хромосомах же входящих в состав эухроматина (см. выше) очень тесная взаимосвязь между молекулами ДНК и гистонами, не дает возможность для транскрипции генов. Для того, чтобы стало возможным протекание транскрипции, в основном, происходят следующие изменения в составе хроматина:

- для начала процесса транскрипции, играет важную роль АТФ-зависимой фактор ремодуляции. Энергия, выделяющаяся при расщеплении АТФ, обеспечивает скольжение на протяжении молекул ДНК гистоновых осей хроматосом, в результате чего расстояние между соседними хроматосомами увеличивается. А это создает условия для присоединения факторов транскрипции к экспрессируемым участкам.

- результатом **ацетилизации гистонов** (с помощью фермента ацетилтрансферазы), составляющих основу хроматосомных осей, происходит уменьшение положительного груза в результате их взаимосвязь с молекулами ДНК слабеет. А от воздействия фермента гистон-деацетилазы происходит обратное. После соединения активаторов транскрипции с гистон-ацетилтрансферазой, а рецепторов транскрипции с гистон-деацетилазой, проявляют соответствующие воздействия.

- в местах расположения генов, участвующих в синтезе белка, встречаются в большом количестве ЦфГ динуклеотиды, расположенные вблизи промоторных частей генов (см. далее). Было определено, что присоединение к цитозину метиловой группы (**метиленизация**) предотвращает транскрипцию. Причина этому, присоединение специального белка (MeCP2) к метилизированной молекуле ДНК. Интересно то, что белок MeCP2 действует совместно с ферментом гистон деацетилазы.

В последнюю третью группу входят относящиеся к составу комплекса начинающей транскрипцию фермент РНК полимеразы II, и белковые комплексы состоящие от 60-ти до 70-ти полипептидов и по своим размерам напоминающие рибосомы. Так как большинство генов в составе генома у указанных белков принимают участие в экспрессии, их называют **общими факторами транскрипции**.

К общим факторам транскрипции (TF- translation factor), участвующих в синтезе иРНК относятся: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIF, TFIIIE, TFIIN. Среди указанных факторов самым большим по размеру является **фактор TFIID**. Этот фактор имеет на промоторной части, *TATA – связывающий белок или TBP (TATA – building protein)* и *узнающие TBP* части.

Как активаторы, так и репрессоры регулирующих белков второй группы, играющие в необходимых моментах развития различных типов клеток или тканей важную роль в экспрессии определенных генов, называют **специальными факторами транскрипции** (рис.5.18).

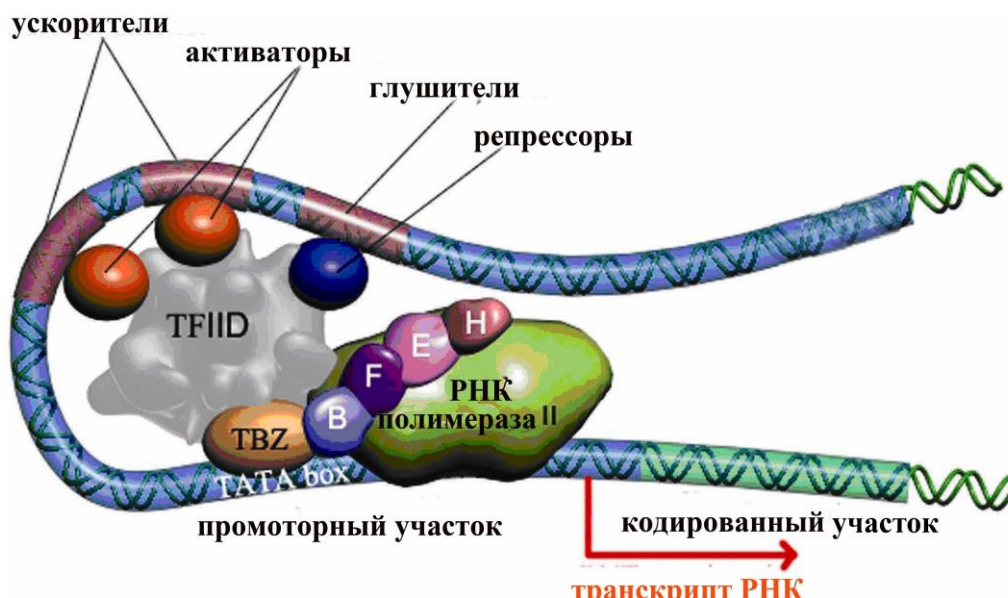


Рис. 5.18. Схематический рисунок взаимосвязи с молекулами ДНК и друг с другом фактора общей транскрипции, фермента РНК полимеразы II, белков активаторов и репрессоров.

Факторы транскрипции (TF) в зависимости от вида совместно действующих с ними ферментов полимеразы (I, II, III), отмечаются как TFI, TFII, TFIII).

В составе хроматина, после происходящих изменений, описанных выше, комплекс, начинающий транскрипцию, вступает в связь с соответствующими частями промоторов молекул ДНК (рис. 5.18). После этого, при участии фактора TFIID, обладающего геликазной активностью, за счет энергии, выделенной в результате расщепления АТФ, спираль молекулы ДНК начинает раскручиваться. На протяжении транскрибирующейся цепи молекулы ДНК, играющей роль матрицы (рис. 5.19), в направлении 3' - 5', на основе комплементарности с участием фермента полимеразы происходит синтез молекул РНК.

Синтезированные молекулы РНК, еще не готовые для синтеза белка, называются *первичным транскриптом* или же *пре-иРНК*. Параллельно с синтезом пре-иРНК в ядре начинается ее химическое производство (**процессинг**). Так, начиная с момента формирования в своем составе всего 20-25 нуклеотид и после присоединения ГТФ на начальный (5') конец иРНК, к гуанозину в 7-ом положении и к первым двум рибозам добавляются метиловые группы. Таким образом, на 5'-конце пре-иРНК формируется 7 метил-гуазиновая «головка» (от англ. capping). Эта головка увеличивает стабильность иРНК и создает условия для тесного соединения с рибосомами в процессе синтеза белка.

После окончания синтеза пре-иРНК на его 3'-конце до нуклеотидных последовательностей ААУААА под влиянием фермента эндонуклеазы пре-иРНК отделяется от цепи. Затем на его 3'-конце с участием фермента Poli-A полимеразы формируется хвостовая часть иРНК со включением до 200 адениновых нуклеотидов. Этот процесс называется **полиадениляцией** (рис. 5.19).

Формирующиеся таким образом хвостовые участки сохраняют стабильность иРНК, участвуют в процессах их вхождения в цитоплазму, в запуске начала трансляции (синтеза белка) и т.д. Интересно отметить, что в хвостовых частях большинства иРНК неоплодотворенной яйцеклетки всего 30-40 адениновых нуклеотидов, поэтому они не могут

принимать участие в синтезе белка. Однако сразу после оплодотворения в результате включения в хвостовые части этих иРНК адениновых нуклеотидов они активируются и начинается синтез белков, необходимых на начальных этапах оплодотворения.

Как видно из рис.5.19, в составе пре-иРНК с уже сформированными 5' головкой и 3'-концом, продолжают оставаться части (интроны), не участвующие в процессе синтеза белка (указ. синим цветом). Указанные интроны удаляются из состава иРНК с помощью процесса **сплайсинга**. Этот процесс протекает с помощью специальных сплайсеосом в локализованных внутри хромосом и межхромосомных участках интерфазного ядра. **Сплайсеосомы**, состоят из мелкоядерных нуклеопротеинов размерами с рибосому (мяНПУ). В их составе имеются мяРНК (U1,U2,U4, U5 и U6) и от 10 до 20 белков. Независимо от месторасположения, в начальных участках интронов (5' конец) ГУ, находятся ближе к концу - А, а в конце - АГ нуклеотиды.

С участием сплайсеосом сначала срезаются 5' конец интронов и ГУ из их состава, соединяются А нуклеотидами, находящимися ближе к концу интронов, затем срезаются 3' концы интронов и они отделяются от следующего экзона. Итак, после того, как интроны, схожие с поводками для лошадей (англ. lariat), отделяются (рис.5.19) от цепи пре-иРНК, концы экзонов соединяются друг с другом и формируются готовые для участия в синтезе белка иРНК.

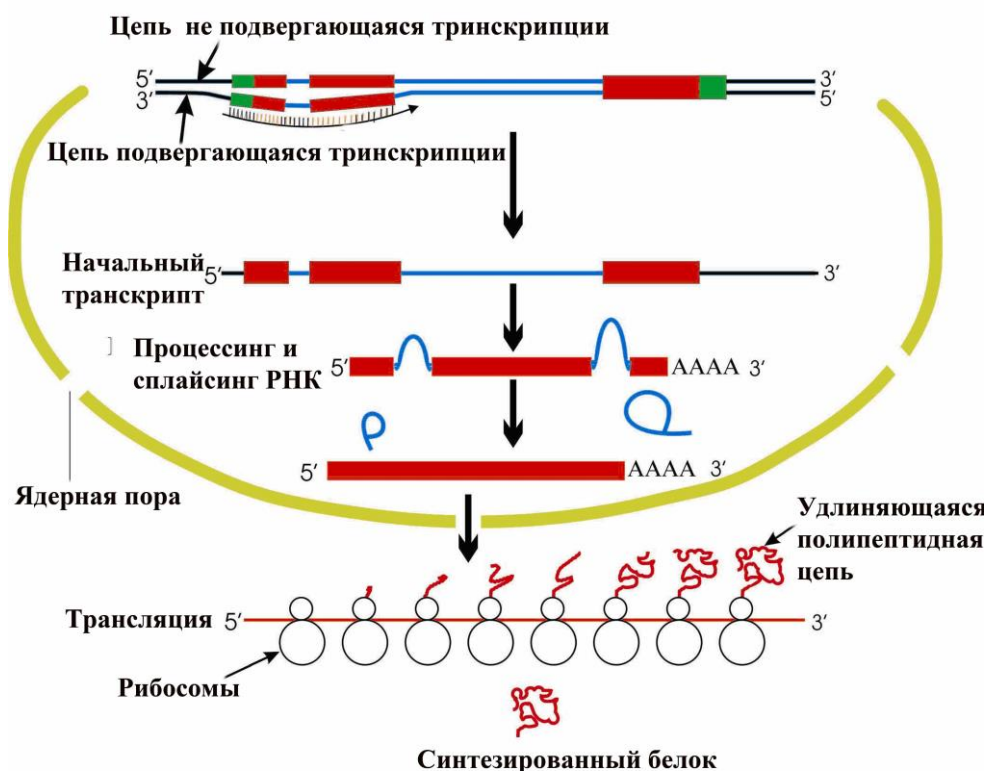


Рис. 5.19. Схематический рисунок стадий формирования иРНК и синтеза белка.

От транскрибирующей цепи, на комплементарных основах, после формирования «головки» и «хвоста» синтезированных пре-иРНК (начальный транскрипт), с участием сплайсеосом, интроны превращаясь в петли (синего цвета), отделяются от экзонов.

Так как экзоны, отделившиеся от пре-иРНК с помощью сплайсеосом, могут соединяться друг с другом в разных последовательностях (рис.5.20), из экзонов, входящих в состав одного гена могут синтезироваться несколько иРНК (в том числе несколько молекул белка). Этот процесс называется **альтернативным сплайсингом** и играет важную роль в формировании РНК, принимающих участие в синтезе тканеспецифичных белков (тропонин Т, тропомиозин, кальцитонин, большинство нейропептидов) и белков, входящих в состав факторов транскрипции.

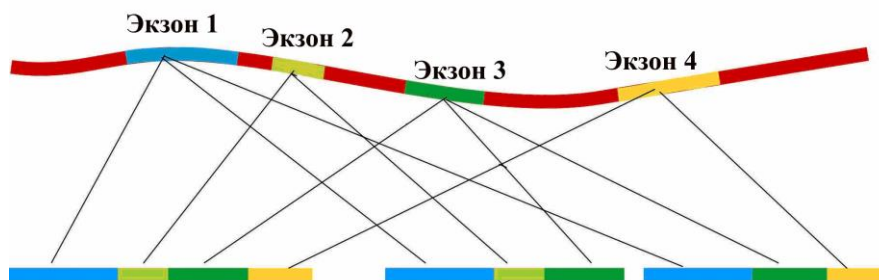


Рис. 5.20. Схематический рисунок формирования различных экзонных групп во время альтернативного сплайсинга. Так как элементы цис-действующих промоторов для синтеза белка находится в составе экзон-1 (см. стр. 189), он входит в состав всех групп формирующихся экзонов.

РНК

Среди биополимеров, синтезируемых в организме, рибонуклеиновые кислоты (РНК) занимают важное место. Общее количество молекул РНК, синтезируемых в каждой клетке, как минимум, в два раза больше молекул ДНК. Хотя молекулы РНК по химическому составу похожи на молекулы ДНК, однако у них в составе вместо моносахарида азотистого основания дезоксирибозы содержится моносахарид рибоза, а вместо тимина (Т) - урацил (У). Главное отличие РНК от ДНК в том, что она состоит не из двух, а из одной полинуклеотидной цепи. Эта особенность создает условие для копирования (в виде молекул РНК) на основе комплементарности, генетической информации записанной на молекулах ДНК.

Этот процесс, считающийся началом экспрессии генов, как отмечалось выше, называется транскрипцией (копированием), а общая сумма полученных копий РНК – **транскриптом**.

Обычно к транскриптам относят только иРНК, тРНК и рРНК (28S, 18S, 5,8S, 5S). Однако в последние годы в результате углубленных исследований были обнаружены малые ядрышковые РНК (м.ядр.РНК), малые ядерные РНК (м.яРНК), малые цитоплазматические РНК (м.ц.РНК), микроРНК (мик.РНК), малые тормозные РНК (м.тор.РНК) и иРНК-подобные (иРНК-под.) и др. Следует отметить, что открытие вышеназванных групп РНК, а также рибонуклеопротеидных частичек в их составе и соединенных с ними белков, способствовало пересмотру ранее принятых взглядов на механизмы сохранения генетической информации и экспрессии (реализации) генов. Итак, по

принятой схеме (**ДНК – иРНК - белок**), в результате транскрипции ДНК, образование иРНК должно завершиться синтезом белка. Однако последние исследования показывают, что иРНК соединяясь на основе комплементарности с м.ц.РНК, мик.РНК, м.тор.РНК, и др. теряет возможность синтеза белка. Тем самым указанные РНК в процессе синтеза белка играют роль регуляторов. Обширную информацию об этом можно получить в литературе (I. Bantounas et al, 2004; DP. Bartel, 2004; K.Numata et al, 2003; M.Szymanski, J.Barciszewski, 2003). В табл.5.1 приведен перечень ферментов РНК-полимераз, принимающих участие в транскрипции генов, кодирующих различные РНК из генома эукариотических клеток.

Надо отметить, что фермент полимеразы III (Pol-III), участвует в синтезе 5S рРНК и других мелких РНК, причем в отличие от Pol-I и Pol-II (рис.5.18) факторы транскрипции участков соединения с молекулами ДНК располагаются не впереди, а в конце последних.

Таблица 5.1. Типы РНК и РНК полимераз

Синтезируемые РНК	Виды РНК полимераз
иРНК	II
тРНК	III
рРНК: 5.8S, 18S, 28S	I
рРНК: 5S	III
м.я.РНК, м.ядр.РНК м.ц.РНК, мик.РНК м.тор.РНК, иРНК-под.	II и III

В механизмах транскрипции ядерных и митохондриальных ДНК имеются различия. Так, транскрипция митохондриальных молекул ДНК происходит, также как у бактерий, с участием только ферментов полимеразы, тогда как в транскрипции ядерных молекул ДНК наряду с РНК-полимеразами принимают участие также факторы транскрипции (см.далее).

ГЕНОМ

Геномом любой половой клетки (гаметы), особи, популяции или же вида, называется сумма нуклеотидных последовательностей в молекулах ДНК, несущих в себе всю генетическую информацию. Как и во всех многоклеточных организмах, геном человека в соответствии с местом расположения молекул ДНК, состоит из двух частей: ядерный геном и митохондриальный геном. Имея в виду, что количество генов и нуклеотидов в митохондриальных ДНК небольшое (см. далее) термины «*ядерный геном*» и «*геном*

человека» используются как синонимы. Геном человека включает в себя общее количество последовательностей нуклеотидов молекул ДНК 24-х хромосом: точнее в гаплоидном наборе хромосом имеет 22 соматические хромосомы (аутосом) и одна из 2-х половых хромосом (всего в геноме 24 хромосомы).

Среди научных достижений конца XX - начала XXI века первое место занимает завершение программы «Человеческий геном». Эта программа по своему мировому значению приравнивается к программе «Полет человека на луну».

Программа «Геном человека» была создана при Институте Национального Здоровья США и начала действовать с 1990 года. Основной целью программы было определение месторасположения последовательностей нуклеотидов и генов в составе 24 молекул ДНК. В претворении в жизнь программы «Геном человека» основополагающую роль сыграли созданный на общественных началах консорциум «Международный проект изучения генома человека», объединивший в себе 20 научно-исследовательских групп из 6 стран мира (США, Англия, Япония, Германия, Франция, Китай) и частная корпорация «Селера» в штате Мэрилэнд США. Первые данные о геноме человека, полученные этими научными объединениями были опубликованы в феврале 2001 года в таких известных мировых научных журналах как «Nature», «Science» и др. Благодаря этим исследованиям стали известны места расположения 90% нуклеотидных последовательностей в геноме человека. Впоследствии эти исследования были продолжены, а в апреле 2003 года были завершены. По последним данным, опубликованным в 2004 году консорциумом «Проект изучения генома человека», в геноме человека имеются 3,08 миллиардов **нуклеотидных пар**. Их них 2,88 миллиардов (93,5%) находятся в эухроматине, 0,2 миллиарда (6,5%) в гетерохроматине. Последовательность соединений нуклеотидов в составе молекулы ДНК обозначается начальными буквами их названий – «генетическими буквами» (А,Т,Ц,Г). Для того, чтобы иметь представление о геноме человека в полном объеме разместим 60 таких букв на строке длиной 10 см, в таком случае общая длина нуклеотидной последовательности будет превышать 5 тыс. км. Приняв во внимание то, что в организме у человека имеется 10^{13} - 10^{14} клеток, следовательно, если выстроить молекулы ДНК всех этих клеток конец в конец в один ряд, их общая длина в тысячи раз превысит расстояние между Землей и Солнцем.

Одним из важнейших значений проекта «Геном человека» является также и то, что наряду с геномом человека был изучен геном многих микробов и вирусов, плоских червей, мух дрозофил и млекопитающих – лабораторных мышей и крыс, причем эти исследования широко продолжают и в настоящее время.

Если обобщить современные данные последних лет, полученные в области изучения генома можно сделать следующие выводы:

- в составе эухроматина в ядрах клеток человека имеется 2,88 миллиардов нуклеотидных пар и это выше чем у мышей на 13,2% и на 4,5% выше, чем у крыс;
- ранее предполагаемая (от 50 тыс. до 140 тыс.) численность генов человека, участвующих в синтезе белка, оказались намного ниже и варьирует в пределах 20-25 тысяч;
- сравнительный анализ генома (у различных бактерий и многоклеточных организмов, в том числе у позвоночных) показывает, что в составе генома человека имеются

гомологичные гены структурно и функционально сходные с таковыми, присущими другим живым организмам. Так из 18055 групп генов 16782 относятся к группам гомологичных генов. В геноме человека, при сравнении с геномом мышей (или же наоборот) количество генов негомологичного строения не превышает 1 % от общего числа генов.

- всего 4-5 % генома человека (см. выше и рис.5.15) приходится на долю нуклеотидных последовательностей (промоторных участков и экзонов), непосредственно участвующих в синтезе различных групп РНК и белков. Функции остальных 95% до конца не выяснены: это или межгенные или же внутригенные (интроны) последовательности.

- в составе генома человека найдено около 20 тыс. **ложных генов**. Эти гены формируются или в результате мутации или же при повторном вхождении иРНК в состав ДНК (ретротранспозиция). Такие гены теряют способность к экспрессии, так как не имеют промоторных частей или же видоизменены.

Результатом дупликации и дивергенции существующих генов в течение 60-100 миллионов лет стало образование («рождение») 1183 новых генов. Вместе с тем продолжающиеся мутационные изменения ложных генов заканчиваются их деградацией, в результате чего в течение указанного периода времени некоторые гены (37) были устранены (т.е. наступила их «смерть»).

Среди повторяющихся в цепи ДНК динуклеотидов привлекает внимание особая роль последовательности ЦГ. Она называется ЦфГ островком: буква «ф» означает, что «Ц» и «Г» соединяются друг с другом при помощи фосфодиэфирной связи. В составе спирали ДНК островки ЦфГ находятся или вблизи промоторных частей или же внутри нее. Отсоединение метиловой группировки от ЦфГ островка ведет к экспрессии генов, а присоединение метиленовой группы (метилинизация) процесс экспрессии генов тормозит (см. выше). К сказанному следует добавить, что имеющиеся в составе генома человека новые гены из числа так называемых подвижных («прыгающих») как правило, начинают формироваться вблизи ЦфГ-островков.

Сравнительный анализ генома любых двух людей показывает, что нуклеотидные последовательности в геноме в 99,9% подобны друг другу. Что же касается 0,1% несхожести, это случаи замены одного из нуклеотидов в цепи ДНК (напр. А) одним из остальных трех нуклеотидов (Т, Ц, Г). Этот феномен называется **единым нуклеотидным полиморфизмом** (single nucleotide polymorphisms) и обозначается как SNPs. Исследования нуклеотидных последовательностей в молекулах ДНК, взятых у различных организмов показывают, что на каждые 100-300 нуклеотидных последовательностей приходится по одному SNPs. Итак, в геноме каждого человека может иметься до 10 миллионов нуклеотидных последовательностей в форме SNPs. Надо иметь в виду, что т.к. большая SNPs находится в не кодируемых частях молекул ДНК, не принимающих участие в синтезе белка, то это не приводит к значительным изменениям на организменном уровне. Однако, определенная часть из них (по последним данным около 500 тыс.), располагаясь на кодированных участках ДНК, становится причиной проявления индивидуальных особенностей у людей. Надо отметить, что исследования SNPs расширили возможности изучения их роли не только для проявления индивидуальных особенностей у человека, но также и в плане

особенностей проявления родственных связей, проявления генома в этнических группах и для выявления наследственных болезней. Результатом этих исследований стало то, что если к началу проекта «Геном человека» число известных наследственных болезней было около 200, в настоящее время эта цифра превышает 1600.

Одним из характерных особенностей генома человека и млекопитающих является положение сегментарной дупликации в составе молекулы ДНК. **Сегментарная дупликация** – процесс, происходящий за последние 40 миллионов лет, не относится к подвижным элементам генома и проявляется в результате удвоения (дупликации) сегмента ДНК на длину не менее 1000 нуклеотидных последовательностей (>1 kb). Сегментарная дупликация в геноме человека, приходится на 5,3% эухроматина. Эта цифра у мышей составляет 3%, а у крыс от 1 до 2%. Примечательно, что Y хромосома человека формируется из повторяющихся частей 25% ДНК, имеющих в своем составе 99,97% одинаковых нуклеотидных последовательностей.

Одиночный нуклеотидный полиморфизм (SNP) встречающийся менее, чем у 1% определенной человеческой популяции расценивается как мутация. В геноме у крыс имеются практически все гены, подобные (ортологически) тем генам в геноме у человека, которые связаны с определенными болезнями, однако степень замены их другими аналогичными генами имеет существенные различия.

Нуклеотидные последовательности генов в молекулах ДНК, участвующие в синтезе белка, были определены и уточняются при компьютерном анализе «открытыми рамками чтения» (*open-reading frames – ORFs*). Говоря о ORF, имеются в виду участки цепи нуклеотидных последовательностей молекулы ДНК, не имеющие стоп-кодонов (УАА, УАГ, УГА), указывающих на завершение синтеза белка, полипептидная цепь которой состоит, как минимум, из 100 аминокислот.

Все гены, находящиеся в геноме прокариотических клеток, можно сказать, что встречаются только один раз. А в составе генома эукариотических клеток могут встречаться несколько копий определенных генов, их называют *генными семьями*. Существование нескольких копий одного и того же гена обеспечивает синтез важнейших РНК и белков в большом количестве. В качестве примера можно указать на большое количество копий генов рРНК и гистоновых белков.

Было также установлено, что структурно молекула ДНК имеет еще более сложное строение, чем ранее предполагалось. Например, одна часть нуклеотидных последовательностей (40-41%) в гаплоидном наборе молекул ДНК встречается в основном один раз (в редких случаях несколько раз), в то время как количество встречаемости других нуклеотидных последовательностей измеряется тысячами (табл.5.2). Первая группа называется **однокопированными (single-copy) последовательностями ДНК**, а вторая группа – **повторяющимися последовательностями ДНК**.

Однокопированные последовательности ДНК находятся в основном в участках генома с большим количеством генов.

Повторяющиеся последовательности ДНК по принципу расположения в них нуклеотидных последовательностей, делятся на две большие группы:

1. Собранные в вереницу последовательности ДНК;
2. Разбросанные ДНК последовательности.

В собранных последовательностях ДНК разнообразное количество нуклеотидов повторяясь тысячи раз, выстраиваются непрерывной вереницей друг за другом, принимая участие в формировании из некодированных частей ДНК центромер (см.далее) и теломер (см.далее). Легкое отделение собранных последовательностей ДНК в процессе плотного градиентного центрифугирования от других частей молекул ДНК дало повод называть их ДНК- сателитами (спутниками). В гаплоидном наборе генома приблизительно 10% общего количества ДНК приходится на ДНК-сателиты.

Разбросанные ДНК последовательности встречаются на протяжении всего генома и делятся они на 4 подгруппы.

1. коротко разбросанные элементы (short interspersed elements - SINEs)
2. длинно разбросанные элементы (long interspersed elements – LINEs)
3. ретровирусоподобные элементы (retrovirus-like elemets)
4. подвижные ДНК элементы (DNA transposons).

В табл.5.2 приводятся данные о составе разбросанных ДНК последовательностей касательно количества нуклеотидных пар (динуклеотидов), числа встречаемости их в гаплоидном наборе генома и проценты.

Как видно из таблицы в гаплоидном наборе генома до 45% приходится на долю разбросанных нуклеотидных последовательностей. Из-за способности указанных групп ДНК перемещаться из одной части генома в другую их раньше называли «подвижные» или же «прыгающие» гены.

Указанные в таблице разбросанные ДНК последовательности отличаются друг от друга и по механизму формирования своих новых копий. Сформированные путем репликации отдельные или многочисленные копии подвижных ДНК – элементов встраиваются в места отсечения молекулы ДНК на протяжении всего генома.

Таблица 5.2. Характеристика разбросанных ДНК последовательностей
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РАЗБРОСАННЫХ ДНК

Тип	количество нуклеотидных пар	Число встречаемости	Процент (%)
Короткие разбросанные элементы (SINES)	до 300	$1,6 \times 10^6$	13
Длинные разбросанные элементы (LINES)	6000-8000	$0,9 \times 10^6$	21
Ретровирусоподобные элементы	1000-10000	$0,5 \times 10^6$	8
Подвижные ДНК-элементы	100-3000	$0,3 \times 10^6$	3

Формирование новых копий остальных трех видов разбросанных ДНК последовательностей происходит следующим образом:

- в начале с помощью фермента полимеразы III происходит транскрипция SINES, LINES и ретровирусоподобных элементов, затем формируются цепи соответствующих иРНК
- на цепях иРНК, играющих роль матрицы, под влиянием фермента анти-транскриптазы вновь синтезируются двухцепочные молекулы ДНК.
- копии вновь синтезированной ДНК, подобно подвижным ДНК-элементам интегрируются в другие части генома.

Следует отметить, что на начальных этапах изучения нуклеотидных последовательностей в составе генома полностью отсутствовали сведения о функциональной роли всех форм повторяющихся ДНК-последовательностей, поэтому их стали называть «эгоист», «ненужные», «мусор» ДНК. Однако полученные в последнее время данные, свидетельствуют об участии различного рода разбросанных ДНК-последовательностей в процессах эволюции, в экспрессии генов, в развитии различных генных заболеваний и т.д. С этой точки зрения, вызывают интерес «**Alu**» элементы, входящие в группу коротких разбросанных элементов.

Словом «**Alu**» был назван специальный участок в составе молекул ДНК, где при воздействии фермента Alu-1 (эндонуклеазы) происходит расщепление молекулы ДНК. Это место находится вблизи центра Alu элементов, а в хромосомах человека имеется около миллиона их копий. Поэтому из 13% коротко разбросанных элементов генома человека - 10% относят к Alu элементам.

В животном мире *Alu* элементы встречаются только в отряде приматов. Это свидетельствует о том, что сотни и миллионы копий Alu-элементов в геноме у приматов

формировались в ходе эволюции позвоночных в течение 65 миллионов лет. В процессе эволюции во время создания новых копий Alu-элементов предыдущие, оставаясь на своих местах, с каждым добавляющимся элементом Alu, сохраняют свою целостность и по законам Менделя передаются от родителей детям.

В то время как длинноразбросанные элементы (LINEs) находятся в хромосомах с рыхлым расположением генов, Alu элементы скапливаются в местах плотного расположения генов. Во время процесса сплайсинга часть Alu-элементов входит в состав иРНК. Подсчитано, что во время альтернативного сплайсинга (см.выше), свыше 5% использованных экзонов образуются из Alu-элементов.

Этот процесс, завершающийся с одной стороны синтезом белка, с другой стороны может стать причиной развития многих генетических заболеваний. В качестве примера можно привести следующее: вхождение в состав 18-го интрона VIII генного фактора Alu - элементов завершается перемещением в сторону 19-го экзона, а это становится причиной развития острой формы болезни гемофилии А.

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМ

Нуклеотидная последовательность митохондриального генома была определена в 1981 году Андерсоном и его сотрудниками. Исследования, ведущиеся в этой области, сыграли важную роль в возникновении идеи проекта «Геном человека». Митохондриальный геном имеет кольцевое строение, в составе которого имеется 16569 нуклеотидных пар. Не смотря на то, что митохондриальные гены плотно прилегают друг к другу, в их составе интроны не встречаются. В каждой клетке позвоночных, в среднем, имеется около тысячи копий митохондриальных ДНК.

В составе митохондриального генома обнаружено 37 генов. Лишь 13 из них обеспечивают синтез белков, принимающих участие в процессах транспорта протонов, окисления и фосфорирования, происходящих в митохондриях. Другие же (24), играют роль в формировании некодированных РНК цепей (рРНК, тРНК), обеспечивающих экспрессию генов, участвующих в последнем процессе. Так как в составе каждой митохондрии имеется в среднем 10 кольцевых молекул ДНК, то как в каждой из соматических так и в половой клетках в среднем насчитывается около 8 тыс. копий митохондриального генома.

СТРОЕНИЕ МЕТАФАЗНОЙ ХРОМОСОМЫ.

В основе большинства процессов клеточного цикла лежит формирование метафазных хромосом, выстраивание их в экваториальной плоскости при участии структурных элементов веретена деления и перемещение сестринских хроматид к полюсам клетки, равномерное распределение их между вновь образующимися клетками. Все это давало повод некоторым авторам расценивать метафазную хромосому как свободную органеллу. Хотя хромосомы микроскопически были исследованы более 100 лет назад, их составляющие элементы, структурные особенности и механизмы конденсации изучены не до конца. Несмотря на то, что конденсация хроматиновых нитей, дает возможность наблюдения хромосом в световой микроскоп, степень конденсации их настолько высока, что уточнить происходящие изменения под электронным микроскопом невозможно.

Первые сведения о морфологическом строении хромосом были получены при исследованиях в электронный микроскоп, где в эксперименте метафазные хромосомы были предварительно помещены в гипотонический раствор и удалены гистоны. Как видно из рисунка 5.21, в центре хромосом находится относительно конденсированная гомогенная часть, а вокруг нее располагаются петли, состоящие из хроматиновых нитей различного диаметра.

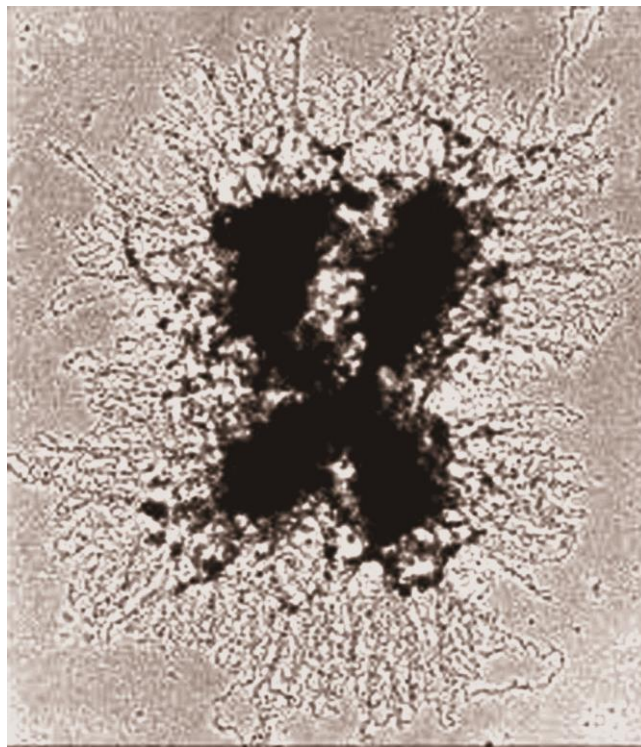


Рис. 5.21. Электронно-микроскопический рисунок продольного среза метафазной хромосомы, помещенной в гипотонический раствор. В центре рисунка видна осмифильная сердцевина с гомогенным строением, а вокруг нее хроматиновые нити разных размеров (W.C. Eargliaw and N.K. Laemmi. *J. Cell Biol.*, 1983, v. 96, p. 83-94, fig.2a)

На электронограмме (рис.5.22) хромосомы, отделенные от гистонов выглядят, на первый взгляд, как тонкие перепутанные нити ДНК. Один из авторов сравнил это с деформированной фибриллой «макарона». Несмотря на всю эту спутанность ясно видны образующиеся петли в цепях ДНК и их соединения с центрально расположенной гомогенной частью хромосомы. Общая картина гомогенного осмифильного центра (сердцевина) имеет сходство с формой метафазной хромосомы.

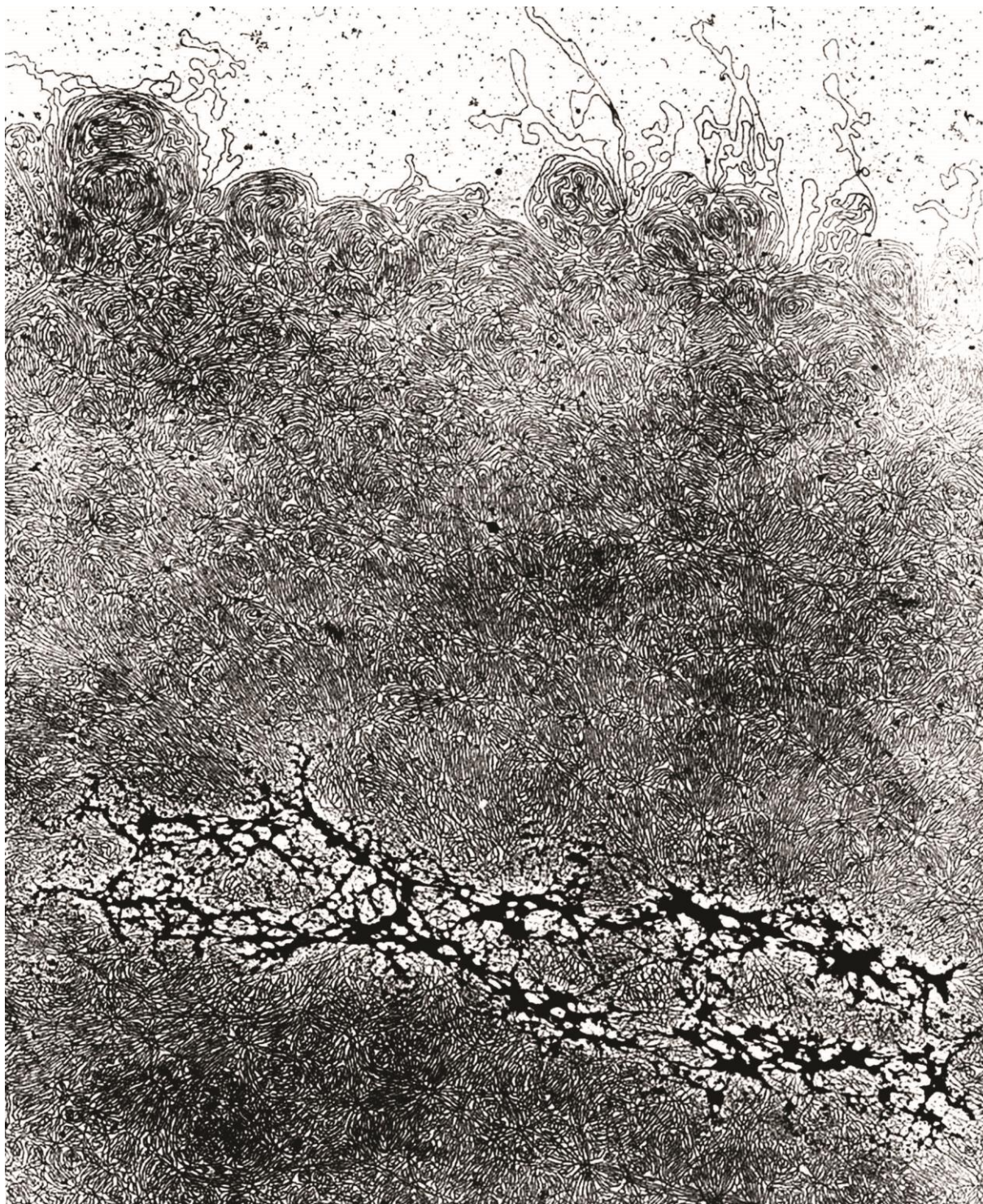


Рис. 5.22. Электронно-микроскопический рисунок метафазной хромосомы с экстракцией гистоновых белков. Видны фибриллы ДНК, не различимые на всем протяжении клубочка вокруг хромосомной сердцевины. На периферической части среза располагаются ДНК фибриллы петлеобразного строения (J.R. Paulson and N.K. Laemmi. J.Cell, 1977, №12, p.817. Copyright 1977 MIT)

Принимая во внимания все сказанное, в настоящее время в современной литературе и в большинстве научно-исследовательских работ, метафазная хромосома по своему химическому составу и физическим свойствам состоит из двух отличающихся частей: *хромосомной сердцевины и хроматинового покрытия*, окружающего ее со всех сторон.

ХРОМОСОМНАЯ СЕРДЦЕВИНА

Первые сведения о белках, участвующих в образовании хромосомной сердцевины (иногда ее называют хромосомным стержнем, хромосомной осью, ядерным матриксом или кариоскелетом) были получены Струнниковым и его сотрудниками (1993). Поскольку эти белки у грибов обеспечивают стабильность малых хромосом, их предложили называть **SMC-белками** (*stability minichromosomes*). Однако, приняв во внимание результаты дальнейших исследований, демонстрирующих участие данных белков в динамических изменениях, происходящих в хромосомах, их стали называться **опорными структурами белками хромосом** (*structural maintenance of chromosomes- SMC*).

Было выявлено 6 видов белков SMC. Они соответственно называются SMC - 1-6. В имеющейся литературе некоторые из белков SMC называют также белки соединенные с хроматином (chromatin associated protein – CAP). Например, белок SMC2 - CAP-E, а белок SMC4 указывается как CAP-C. Эти белки также отмечаются как SMC2/CAP-E. Кроме вышеуказанного, в зависимости от объекта исследования к аббревиатуре прибавляются заглавные буквы, отражающие объект на латинском языке. Так, у человека (*human*) белки SMC указываются следующим образом:

SMC1/h SMC1

SMC2/h CAP-E

SMC3/h SMC-3

SMC4/h CAP-C

SMC5/h SMC-5

SMC6/h SMC-6

Все мономеры указанных белков имеют общий план строения (рис.5.23 А). Как видно из рисунка, белки SMC состоят из двух концов соответственно (NH₂) аминных и карбоксильных (COOH) групп. Связанные с этими концами α-спирали скручиваются, формируя спиралевидные части (coiled-coil), которые в местах перехода друг в друга имеют неспирализованную часть в форме эластической петли (hinge).

Присутствие на обоих концах SMC белков специальных участков для присоединения АТФ, указывает на их АТФ-азную активность. Наличие в составе одного мономера двух участков связывания с АТФ дает основание отнести SMC белки к ABC-АТФ-азам (ATP Building cassette, см.выше) (более подробные сведения об этом можно найти в трудах Т. Hirano (2002)).

Белки SMC, имеющиеся начиная от бактерий вплоть до человеческой клетки, встречаются в виде не мономеров, а димеров. Если в прокариотических клетках SMC-белки представлены гомодимерами, то в эукариотических клетках эти белки соединяются друг с другом в виде гетеродимеров. Гетеродимеры, соединяясь с другими (не SMC) белками создают специальные белковые комплексы.

Среди белковых комплексов, созданных с участием SMC белков, подробно изучены **сжимающий (конденсин)** и **соединяющий (когезин)** белковые комплексы. SMC-5 и SMC-6 белки также способны создавать комплексы, однако строение входящих в этот комплекс других (не являющихся SMC) белков до конца не изучено.

В организации белкового комплекса конденсина из SMC белков принимают участие SMC-2 и SMC-4, а из не-SMC белков – CAP-D2, CAP-G и CAP -H белки (рис. 5.23 В-в).

В составе когезинового белкового комплекса из SMC белков имеются - SMC-1 и SMC-3, а из не-SMC белков – соединяющие сестринские хроматиды (рис.5.23 В-в) Scc1 и Scc3 белки (sister chromatid cohesin - Scc).

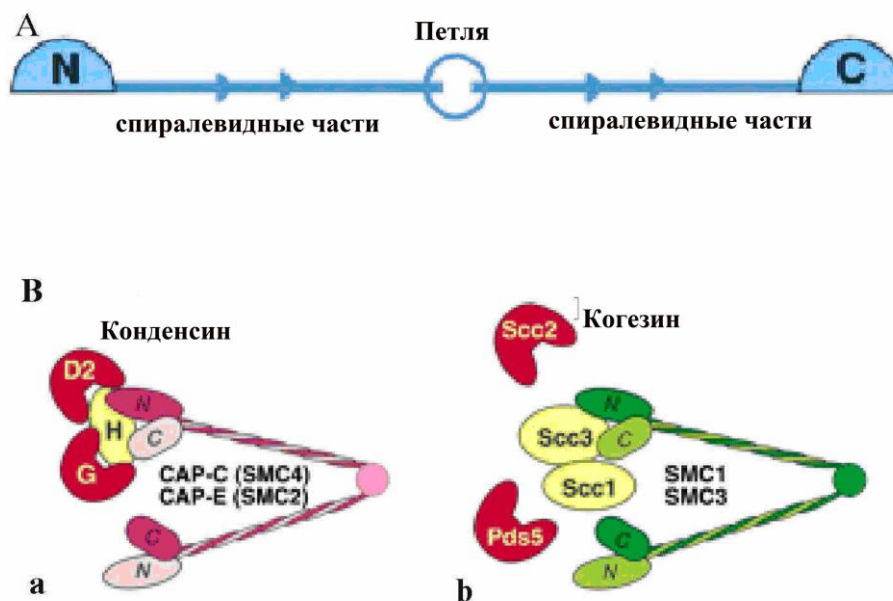


Рис. 5.23. Схематический рисунок мономеров (А) структурно опорных белков (SMC) хромосом, составных частей белковых комплексов конденсина (В-а) и когезина (В-в). Объяснение дано в тексте (Т. Hirano. The ABC of SMC proteins: two-armed ATFases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes and Development*, 2002, v.16, №4, p.399-414, fig.1 and fig.2)

Другая особенность когезиновых и конденсиновых белковых комплексов – это образование сетевых структур в результате объединения различных белков. Участие лишь одного комплекса когезина способствует образованию сети, в формировании которой участвуют свыше 17 белков. Последние исследования показывают, что из таких сетей формируются модули, а из последних – в целом хромосомная сердцевина.

В клетках позвоночных имеются 2 типа конденсинового комплекса. В интерфазе белок конденсин II, в основном, находится в ядре и во время профазы участвует в формировании хромосом. А белок конденсин I, как в интерфазе так и профазе, находится в составе цитоплазмы и только после того как ядерная оболочка исчезает (прометафаза) соединяется с хроматином. Конденсиновые белки соединяются с хроматином только в процессе митоза. Это соединение начинается после процесса фосфорилирования белка конденсина при участии Cdk1/tsiklin B. Соединенные с хроматином конденсиновые белки, за счет энергии, полученной в процессе распада АТФ, соединяясь с нитями хроматина, участвуют в их суперконденсации.

Еще одним из важнейших функций белка когезина является создание связей (мостиков) между молекулами ДНК сестринских хроматид. Эти взаимосвязи во время профазы и метафазы соединяют сестринские хроматиды, тогда как в анафазе способствуют их расхождению.

Среди исследований, проведенных за последние годы по изучению морфо-функциональной характеристики хромосомной сердцевинки особое место занимают вызывающие интерес исследования В. Houchmanzadeh и S. Dmitrov (1999). Авторы, изучая эластичность метафазных хромосом определили, что степень растяжимости их в длину, в 2 тыс. раз больше ожидаемого. Это свидетельствует о наличии в центре хромосом в составе их сердцевинной части прочных и одновременно высоко эластичных молекул. Сначала авторы выдвинули идею о том, что эти молекулы относятся к группе титинообразных белков. Однако в дальнейшем результаты совместных работ этих же авторов с другими (S. Almergo, D. Rivelino, T. Tirano, В. Houch-mandzadeh, S. Dmitrov, 2004) выявили, что эластические свойства хромосомных сердцевин во время митоза проявляются благодаря группе SMC - белков в составе последних.

ХРОМАТИНОВОЕ ПОКРЫТИЕ МЕТАФАЗНОЙ ХРОМОСОМЫ

Нуклеопротеиновый комплекс, сформированный в результате суперконденсации (до 10000-20000 раз) во время метафазы, называется **компактным хроматином**. Информация о структурах, формирующихся с участием нуклеопротеинов – нуклеосом, хроматосом, солиноидов и хроматиновых петель, приводилась при описании рыхлого хроматина в составе интерфазного ядра (см. выше).

Наличие всех вышеперечисленных структур в составе компактного хроматина также было подтверждено со стороны почти всех исследователей. Однако единого мнения о структурах, возникающих в результате конденсации хроматина после солиноида нет.

В частности были предложены несколько моделей строения метафазных хромосом:

- 1) модель радиальной петли
- 2) модель хроматин – белковой сети
- 3) модель иерархической (ступенчатой) спирали

Модель радиальной петли в настоящее время можно считать наиболее признанной. Согласно этой модели солиноиды диаметром 30 нм и хроматиновые нити диаметром 100-130 нм образуют петли в радиальном направлении вокруг сердцевинной части хромосомы (рис. 5.24). Начальные и концевые части этих петель при помощи специальных белков соединяются с хромосомной осью. Во время метафазы (рис. 5.24-в центре) указанные петли и соединяющие их хроматиновые нити, конденсируясь, образуют вокруг сердцевинки хромосомы компактный хроматин.

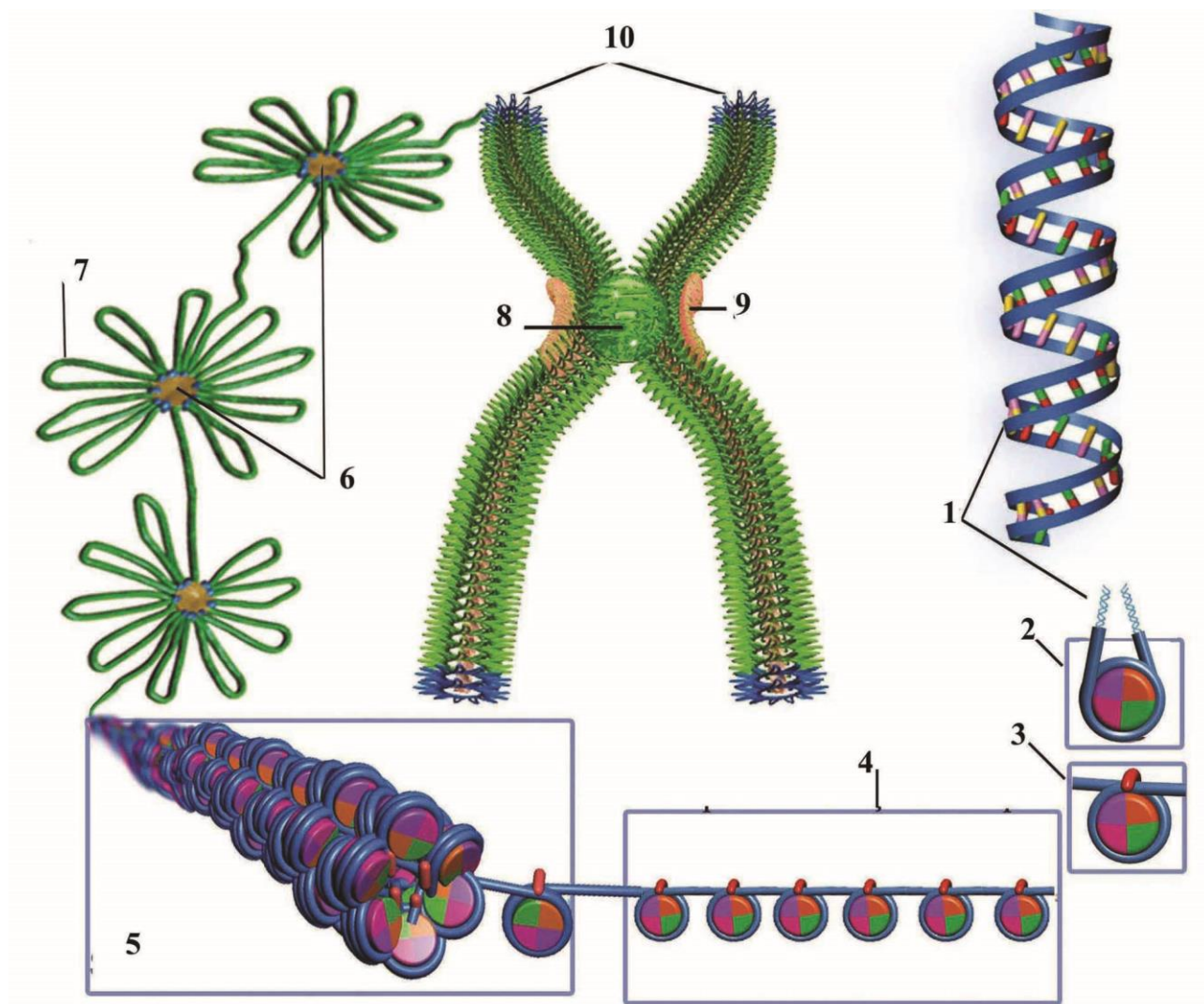


Рис. 5.24. «Модель радиальной петли» строения метафазной хромосомы. Схематический рисунок структур, участвующих в процессе формирования компактного хроматина: нуклеосом, хроматосом, образованных из последних «нанизанных на нить бус», солиноидов, радиальных хроматиновых петель и метафазных хромосом.

1. ДНК; 2. Нуклеосома; 3. Хроматосома; 4. Нитка бус; 5. Солиноид; 6. Матрикс хомосомы; 7. Петля хромосомы; 8. Центромера; 9. Кинетохор; 10. Теломер.

В модели хроматиновой белковой сети сердцевинная часть хромосомы не расценивается как самостоятельная структура метафазной хромосомы. Согласно данной модели хроматиновые нити различного диаметра, соединяясь друг с другом с помощью специальных белков, формируют компактный хроматин.

В модели иерархической (ступенчатой) спирали, в результате последовательного суммирования солиноидов хроматиновые нити постепенно увеличиваются в диаметре, затем скручиваясь, образуют хроматиды. В данной модели также отмечается отсутствие хромосомной сердцевинки в центральной части метафазных хромосом.

В последних новейших исследованиях (N.Kireeva и др. 2004), совместив данные сторонников модели радиальной петли (T.Nirano с соавт.) с данными, полученными сторонниками модели хроматин-белковой сети (A.B.Beltont с соавт.), предложен

компромисный вариант строения метафазной хромосомы, «иерархическое сворачивание, осевое склеивание». Эта модель была описана главным образом на основе иммунофлюоресцентных и электронномикроскопических исследований последовательных серийных срезов хромосомных сердцевинных белков SMC 2, тропоизомеразы II и хроматиновых нитей (рис.5.25).

Как видно из рисунка 5.25А, белок SMC 2 (1 и 2), свободно располагающийся вокруг хроматиновых нитей в начале профазы, только в конце профазы приближается к хроматиновым нитям (3 и 4), и входя между хроматиновыми нитями (5), образует сердцевинную часть метафазной хромосомы (6).

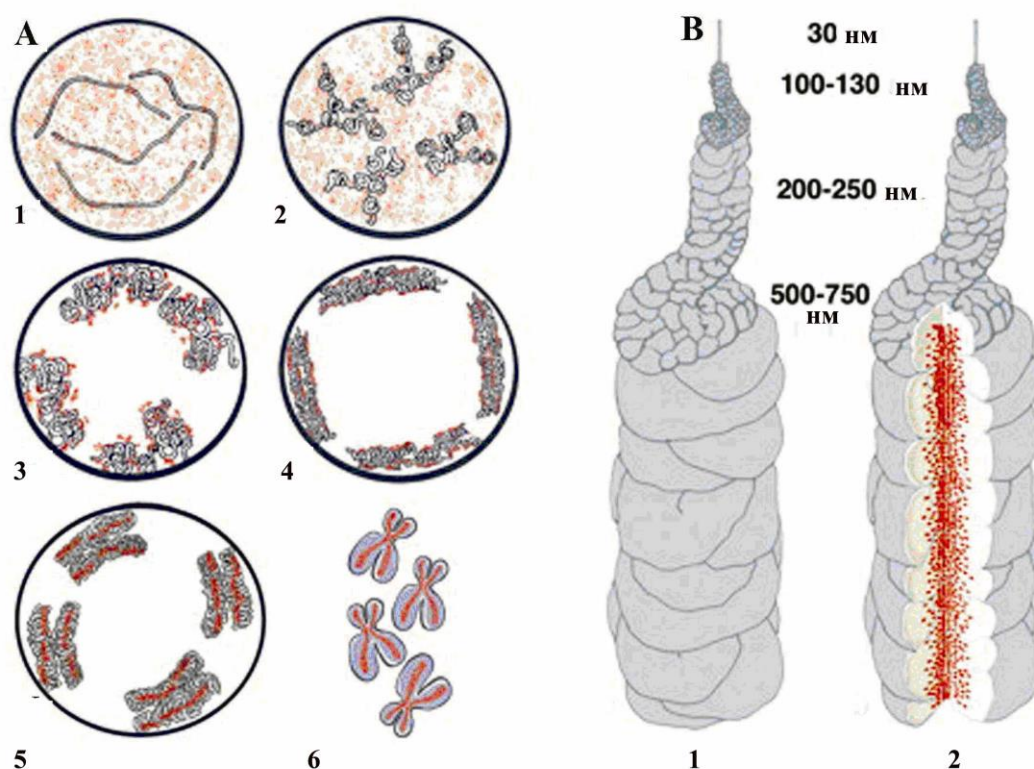


Рис. 5.25. Модель конденсации хромосомы.

А - стадии конденсации. Схематический рисунок для сравнения утолщения хроматиновых волокон при участии SMC2 белков (красного цвета) в начале S фазы (1), в G_2 фазе (2), в начале профазы (3), в середине профазы нб (4), в конце профазы (5) и во время метафазы (6).

В – модель «иерархического сворачивания, осевого слипания липучки» метафазной хромосомы. 1) путем сгибания хроматиновых нитей диаметром 30 нм- формируется хромонемные нити диаметром 100-130 нм, путем их сгибания - средний метафазный хроматин диаметром 200-250 нм, а из последних – метафазная хроматида диаметром 500-750 нм. 2) осевой конденсин, составляющий приблизительно одну третью часть метафазного хроматида, играя роль «липучки», обеспечивает стабильность метафазной хромосомы.

Согласно предлагаемой компромиссной модели, участвующие в организации хроматина хроматиновые нити диаметром 30 нм (рис. 5.25 В-1) наряду со складыванием, сворачиваясь, образуют хроматиновые нити диаметром 100-130 нм. В результате складывания последних, в середине профазы, образуются хроматиды диаметром 200-250 нм. Указанные хроматиды, сворачиваясь вокруг белков, образующих хромосомные сердцевинки, образуют метафазные хроматиды диаметром 500-750 нм. На белки, входящие в состав сердцевинной части хромосом приходится 1/3 часть размера хроматид (рис. 5.25 В-2). Здесь белки, играя роль «склеивающего материала», соединяют элементы компактного хроматина между собой, и обеспечивают формирование метафазной хромосомы в виде стабильно палочковидной структуры.

Надо отметить, что в суперконденсации метафазной хромосомы также участвуют Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} катионы. Еще в 1923 году Е. Hammersteyn отметил участие моно- и дивалентных катионов в конденсации хромосом. Последующие работы, проведенные в этом направлении показали, что в условиях с низкой концентрацией ионов и при отсутствии двухвалентных катионов, плотность хроматина резко уменьшается и в результате образуются спирали.

Результаты последних исследований (R. Strick et al., 2001; S. Almegro и др. 2004) показали, что важную роль в конденсации хроматина играет соединение катионов с отрицательными фосфатными остатками ДНК. В составе молекулы ДНК метафазной хромосомы на каждые 12,5-20 нуклеотидов приходится один катион Ca^{2+} , а на каждые 20-30 нуклеотидов – по одному Mg^{2+} . Части молекул ДНК, соединяющиеся с другими катионами, соединяются с Na^+ , K^+ и хроматиновыми белками. В результате, за счет подсоединенного груза формируются нейтральные метафазные хромосомы, а это с одной стороны создает возможность для их свободного передвижения в цитоплазме, а с другой стороны, нейтрализация катиона вызывает местные изменения в структуре ДНК. Таким образом, при сворачивании нейтральной части ДНК в сторону нейтральной, нуклеосом внутри солиноидов, а солиноидов внутри хроматиновых нитей, а также и в результате приближения последних друг к другу, происходит неограниченная (в 10-20 тыс. раз) конденсация структурных элементов в составе хроматина.

В заключении надо отметить, что составные элементы хроматина (нуклеосомы, хроматосомы, солиноиды и хроматиновые филаменты крупных размеров), окружающие хромосомную сердцевину и преобразовавшиеся с участием SMC белков в палочковидную форму, суперконденсируясь при помощи катионов, особенно при участии Mg^{2+} и Ca^{2+} , образуют нейтральную метафазную хромосому.

К участкам хромосом, отличающимся по своему нуклеотидному составу, топографическому положению и функциям относятся центромеры, кинетохоры и теломеры.

Сестринские хроматиды в составе большинства метафазных хромосом соединяются друг с другом с помощью первичных перетяжек **центромер** (рис. 5.24). Центромеры при митозе имеют особое значение для расположения сестринских хроматид в метафазной пластинке и для их равномерного распределения между двумя дочерними клетками. В боковых участках центромер метафазных хромосом располагаются **кинетохоры**, формирующиеся только в период митоза клеточного цикла и соединяющиеся с 30-40

микротрубочками (рис.5.24 и 5.26). При импрегнации солями серебра центромеры выявляются в форме темноокрашенных С-полос. В Y-хромосоме, в отличие от других хромосом, С полоса находится на одном конце ее длинных плеч. Поэтому их относят к телоцентрическим хромосомам.

Молекулы ДНК в составе центромер, совместно со связанными с ними белками образуют конститутивный хроматин, который не подвержен экспрессии ни в одном из клеточных типов. Центромеры представляют собой сочетание фракций ДНК, состоящих из повторяющихся нуклеотидных последовательностей. Каждая часть молекул ДНК, состоящая из повторяющихся нуклеотидных последовательностей, называется **мономером**. Мономеры, соединяясь по принципу головка-хвост образуют гетерохроматин с высокой степенью уплотнения. В составе некоторых мономеров имеются участки, состоящие из 17 нуклеотидных последовательностей (ЦТТЦГТТГГААРu – ЦГГГА), которые соединяются с В-центромерными белками (centromer protein-B, CENP-B).

Общее число нуклеотидных последовательностей, входящих в состав центромер значительно варьирует. В качестве примера можно привести следующее: если в составе центромеры Y хромосомы имеется 300 тыс. нуклеотидных последовательностей, то в 7-й хромосоме эта цифра достигает 5 миллионов.

В составе центромер наряду с CENP-B имеются также белки CENP-A и CENP-C. Однако надо отметить, что белок CENP-B во всех фазах клеточного цикла находится в связи с центромерами, тогда как CENP-A и CENP-C находятся во внутренних оболочках кинетохоров только лишь активных хромосом.

В профазе кинетохорные белки, входящие в состав ядра образуют вокруг центромер **кинетохоры** в форме «пуговицы» (рис. 5.26), которые способны соединяться с микротрубочками.

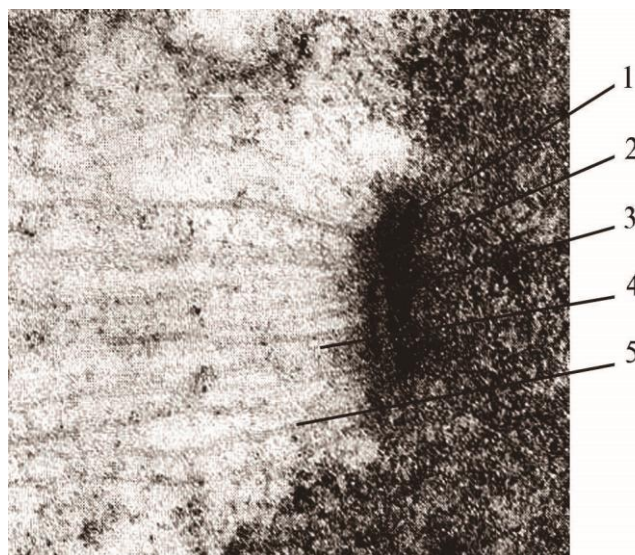


Рис. 5.26 .Электронно-микроскопический рисунок кинетохора метафазных хроматид, сформированного на поверхности, обращенной к полюсу клетки. 1.грубо-зернистый слой 2.волокистый слой 3.плотный слой 4.волокистый венец 5.микротрубочки кинетохор (Conly L.Rieder. Biological photo Service).

Кинетохоры, относящиеся к сестринским хроматидам, называются *сестринскими кинетохорами*. Только кинетохоры, формирующиеся во время митоза и сохраняющие связь с гетерохроматином через свой самый внутренний **грубогранулярный слой** (молекулы ДНК принимают участие и в создании этого слоя), имеют также по сравнению с внутренним слоем электронномикроскопически более светлый средний **волокнистый слой** и наружный **плотный слой**, богатый белками. Указанные слои кинетохора, выявляются электронномикроскопически только после присоединения к ним микротрубочек. Наряду с вышеперечисленным в кинетохорах имеется также связанная с наружным слоем **волокнисто-венечная часть** (рис.5.26). Находящиеся в этой части белки, обладающие АТФ-азной активностью и играют важную роль в растаскивании хромосом к полюсам.

При удалении белка конденсина из состава хромосом, в результате того, что строение кинетохоров подвергается изменениям, нарушается процесс построения хромосом в области экваториальной пластинки и процесс расхождения хроматид друг от друга.

Нуклеотидные последовательности начальной и конечной частей молекул ДНК вместе со связанными с ними белками, сформированные при организации любой хромосомы, образуют структуры, называемые **теломерами** (рис.5.24). Теломеры играют важную роль в целостности хромосом и в их репликации. Теломеры в интерфазе, связываясь с ядерной оболочкой, участвуют в формировании трехмерного пространственного строения хромосом и т.д. Хромосомы, в которых нарушена целостность теломерных частей, соединяясь друг с другом, создают хромосомные комплексы. Такие клетки утрачивают жизнеспособность.

Теломер структурно состоит из двух участков. Первый участок, являясь продолжением вновь реплицированной двухцепочной ДНК (дцДНК), у человека представлен идущими в направлении 5' и 3' повторяющимися нуклеотидными последовательностями АГГГТТ и комплементарно связанными с ними нуклеотидными последовательностями. Число этих повторений в различных хромосомах у человека претерпевает колебание в течение от 650 - 25000 лет. Второй участок, также состоящий из ТТАГГГ последовательностей, в своем составе насчитывает около 200 нуклеотидных последовательностей и является одноцепочным участком ДНК (рис.5.27-2).

В концевой части теломера его одноцепочный участок, создавая комплементарные связи с одной из разошедшихся цепей двуцепочного участка образует петлеобразную структуру (рис.5.27). В это время указанные участки, соединяясь с помощью специального белка, предотвращают его раскручивание. И таким образом участвуют в защите концевых частей ДНК от внешних воздействий.

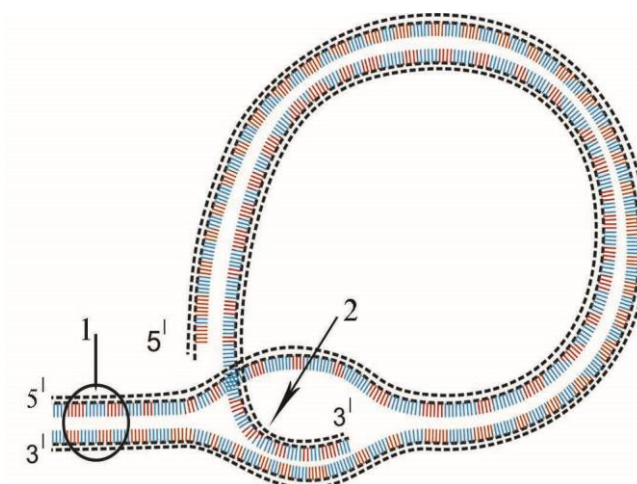


Рис. 5.27. Схематический рисунок формирующейся теломерной петли, образованной с участием участков двух- и одноцепочных участков теломера. 1- двухцепочный участок теломера, 2- одноцепочный участок теломера.

Синтез как двухцепочного, так и одноцепочного участков теломер, происходит с участием специального фермента **теломеразы**. Характерной особенностью фермента теломеразы является наличие в его составе РНК, которая играет роль матрицы и ферментативной части, обладающей **противо-транскрипционной** активностью (на основе матричной РНК, принимает участие в синтезе ДНК). Нуклеотидные последовательности, образованные на основе РНК матрицы, создают как двух- так и одноцепочные участки теломера.

Высокая степень активности фермента теломеразы у человека обнаруживается только в гаметах и эпителиальных клетках, выстилающих стенку кишечника. У остальных типов клеток активность теломеразы бывает низкой для того, чтобы сохранить высокую способность к пролиферации. Наряду с этим теломераза бывает наиболее активной в злокачественных клетках. Исходя из этого, в настоящее время одно из направлений в исследованиях по воздействию на развитие и течение злокачественных опухолей является разработка лекарственных средств, уменьшающих активность фермента теломеразы.

В последнее время было установлено участие теломеразы в регулировании клеточного цикла, особенно в старении клеток. Обширная информация об этом дана в разделе, посвященном старению клетки.

В составе хромосом различают первичные и вторичные перетяжки, *длинные (Q) и короткие (P) плечи, центромеры, кинетохоры и спутники* (рис.5.28). По топографическому положению первичных перетяжек различают следующие формы хромосом:

- *метацентрические хромосомы* – т.к. первичные перетяжки находятся в средней части хромосомы, их плечи бывают одинаковой длины.
- *субметацентрические хромосомы* – первичная перетяжка находится ближе к одному концу.
- *acroцентрические хромосомы* – из-за очень близкого расположения центромеры к одному из концов, плечо P оказывается очень коротким.

- *телоцентрические хромосомы* – т.к. центромеры соединяют концы хромосом друг с другом, у них отсутствуют короткие плечи.

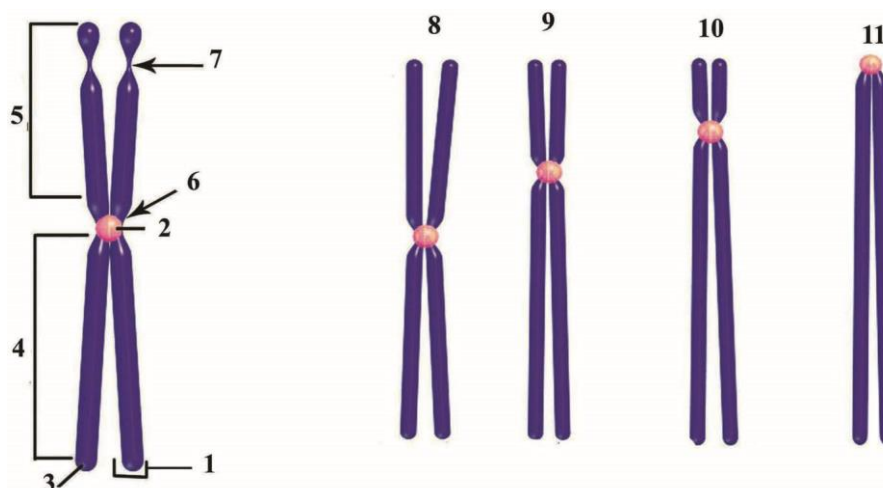


Рис.5.28. Схематический рисунок составных частей (справа) и видов (слева) хромосом.

1. Сестринские хроматиды; 2. Центромера; 3. Теломер; 4. Плечо-G; 5. Плечо-P; 6. I-ая перетяжка; 7. II-ая перетяжка; 8. Метацентрическая хромосома; 9. Субметацентрическая хромосома; 10. Акроцентрическая хромосома; 11. Телоцентрическая хромосома.

В области первичных перетяжек хромосом их объединяют друг с другом центромеры. На боковых частях центромер, находятся кинетохоры, состоящие из специальных белков, соединяющихся с микротрубочками веретена деления (рис. 5.24.).

Вторичные перетяжки отделяют участки, называемые **хромосомными спутниками (сателлитами)** от основной массы малых плеч. А *спутниковые или сателлитовые нити*, находящиеся в области вторичных перетяжек объединяют вышеуказанные структуры друг с другом. Структурно они формируются из хромосомной сердцевины и окружающей ее тонкой хроматиновой оболочки.

При цитогенетических исследованиях сборка хромосом изучена на лейкоцитах (в частности на лимфоцитах). Если лейкоциты *in vitro* поместить в специальную питательную среду и добавить фитогеоагглютинин, то они начинают делиться. Через 2-3 дня добавка *колхицина* в питательную среду приостанавливает деление клеток в прометафазе и метафазе. После того, как их на короткий срок помещают в гипотонический раствор, из распухших и лопнувших клеток изготавливаются **мазки** на предметных стеклах, которые затем окрашиваются различными методами.

Чтобы отличить хромосомы друг от друга, используются обычные и дифференциальные методы окрашивания. При обычных методах окраски (гематоксилином, сафранином, орсеином) хромосомы окрашиваются одинаково по всей длине, что позволяет судить об их размерах, топографическом положении первичных и вторичных перетяжек, но получить данные о других структурах невозможно. Этот пробел был решен со стороны Т. Kaspersson с соавт. (1968), предложившими метод *дифференциального окрашивания* (этот метод еще называют методом окрашивания полос). Исследование вышеуказанных авторов показали, что отдельные части фиксированных хромосом после обработки акрихин–

ипритином, под действием этого красителя видны в виде полосок, что в флюоресцентном микроскопе определяется ясноразличимыми желто-зелеными лучами. Учитывая, что по-английски акрихин-ипритин называется *quinacrine mustard*, найденные полосы называли *Q-полосы*.

В результате дальнейших исследований были предложены различные методы, окрашивающие хромосомы в форме полос не только методом флюоресценции, но и под обычным световым микроскопом. Среди них важное значение имеет окраска мазков крови смесью по методу Гимзы (*Giemsa*). При окрашивании денатурированных хромосом этим методом их окрашивающиеся и неокрашивающиеся части видны как темные и светлые полосы. Эти чередующиеся по окраске полосы называют в честь автора *G - полосы* (рис.5.29). Примечательно то, что топографическое положение и размеры Q и G -полос полностью соответствуют друг другу.

В дальнейшем была предложена новая модификация метода и т.к. при этом модифицированном методе темноокрашенные полосы стали выглядеть светлыми, а светлые напротив, темными, то этот метод окраски стали называть *противогимзовским (reverse-Giemsa) методом*, а полосы - *R-полосы*. При описанных методах окрашивания, такие полосы наблюдаются по всей длине хромосом. Аналогичные методы окрашивания были предложены также и для специфических участков хромосом. Среди этих методов можно указать на окрашивание методом импрегнации серебром конститутивного гетерохроматина (в центромерах) и теломеров. При этом соответственно проявляются – *C и T- полосы*.

Так как по местонахождению, размерам и количеству полос хромосомы резко отличаются друг от друга, цитогенетические исследования дают полную возможность определения **кариотипа** – совокупности числа, размеров и особенностей строения хромосом человека. Прежде, чем начать описание кариотипа, надо отметить, что ядрах **соматических клеток** в G_1 или же G_0 периодах интерфазы, содержат 46 хромосом, в каждой из которых имеется одна молекула ДНК. Так как 23 из них – материнские, 23—отцовские, то от каждой хромосомы бывает по две. Поэтому в интерфазном ядре отмечают наличие 23 пар хромосом. Из них 22 пары определяются как в мужских, так и в женских соматических клетках и называются **аутосомными хромосомами**. Оставшуюся одну пару хромосом называют **половыми хромосомами (гоносомами)**. У женщин обе половые хромосомы - это X, а у мужчин - одна X, а другая - Y хромосома. Это указывает на гомогаметность женского пола и гетерогаметность мужского.

В S периоде интерфазы, в результате репликации молекул ДНК, образуется точная копия каждой из вышеуказанных 46 хромосом. Предыдущие и новосинтезированные молекулы ДНК, при участии гистоновых и негистоновых белков, конденсируясь (см.далее), образуют сестринские хроматиды, а те в свою очередь, соединяясь друг с другом, образуют метафазные хромосомы. Итак, в отличие от интерфазного ядра (в их составе бывает только одна молекула ДНК) во время метафазы, хромосомы, располагающиеся в экваториальной области, состоят из двух хроматид, в составе каждой из которых имеются самостоятельные ДНК молекулы. То есть в составе метафазной хромосомы имеется не 46, а 92 молекулы ДНК. Это и лежит в основе того, что на стадии анафазы хроматиды расходятся уже как интерфазные хромосомы и участвуют в формировании ядер, образовавшихся дочерних клеток.

Как и в интерфазных хромосомах, в метафазной хромосоме у каждой материнской хромосомы имеется схожая по природе отцовская. Они называются **гомологичные хромосомы** (греч.:homologous-подобный). Несмотря на наличие в составе гомологичных хромосом различных вариантов генов (см.мейотическое деление) при обычном и дифференциальном окрашивании, никаких различий между ними не наблюдается. Поэтому в составе кариотипа у женщин имеется 22 пары аутосом и одна пара X хромосом, а у мужчин наряду с 22 парами аутосом последнюю пару формируют отличающиеся друг от друга X и Y хромосома (рис.5.29).

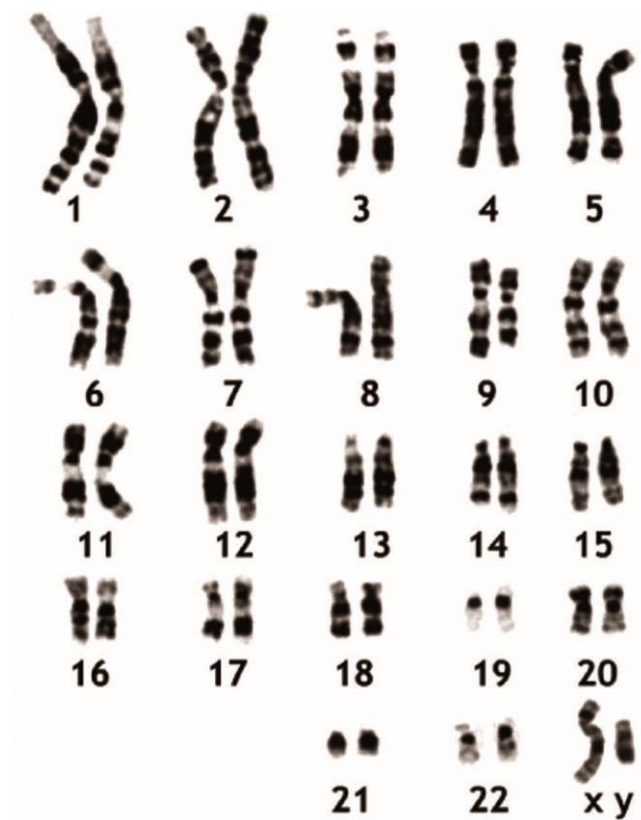


Рис.5.29. Мужской кариотип. Темные полосы, являются полосами G окрашенные методом Гимзы (Genetic Science Learning Center at the University of Utah).

Во всех клетках организма человека, общий план строения гомологичных хромосом одинаковый. Что же касается различных хромосом, то они отличаются друг от друга своей длиной, топографическому месторасположению первичных перетяжек, наличием или отсутствием вторичных перетяжек и хромосомных спутников, что выявляется по характеру и виду белков при использовании различных методов окрашивания. Несмотря на то, что по хромосомам имеется несколько классификаций, общепризнанной из них является предложенная в Париже в 1972 году. По этой классификации хромосомы делятся на семь групп (табл. 5.3) и в соответствии с английским алфавитом отмечаются буквами А-Г.

Таблица 5.3 Классификация хромосом

Группа	Хромосомы относящиеся к группе	Особенности
A	1-3	Крупные метацентрические
B	4,5	Крупные субметацентрические
C	6-12 и X	Метацентрические средних размеров
D	13-15	Акроцентрические средних размеров со спутниками
E	16-18	Короткая метацентрическая (16-я) и субметацентрическая (17 и 18-я)
F	19,20	Самая короткая метацентрическая
G	21,22	Короткие acrocentric, у 21 и 22- ой хромосомы имеются спутники

За последние годы в цитогенетических исследованиях были разработаны и подготовлены методы, создавшие революционные обновления. Основой большинства этих методов является **гибридизация in situ** нуклеиновых кислот.

Для этого изготавливаются мазки хромосом (см. выше) на предметном стекле (поэтому и называется *in situ*), производится фиксация, из состава хромосом при помощи протеаз удаляются белки, а затем проводится нагревание до 90°-100° по Цельсию. Под воздействием температуры в составе молекул ДНК происходит нарушение комплементарных связей (денатурация) и цепи ДНК отделяются друг от друга. После того, как к последним добавляются метки (радиоактивные атомы, пероксидаза хрена, флюорофоры, биотин-авидин и др.) и тем самым создаются меченые образцы одноцепочных ДНК, температура снижается до 65°. При этом меченые образцы молекулы ДНК создают комплементарные связи на соответствующих участках отделенных цепей ДНК (это и называется *гибридизация*). Так формируются меченые двухцепочные молекулы ДНК (натурализация), которые выявляются соответствующими методами.

Среди разработанных методов широкое применение получил метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization - FISH).

На основе этого метода хромосомы изучаются с помощью образцов одноцепочных ДНК, меченой флюорохромами (веществами, излучающими лучи разного цвета при люминисцентном микрокопировании).

Наиболее распространенными методами FISH являются М- FISH и Rx FISH методы.

Применение *М- FISH метода* позволяет с высокой точностью выявить и изучить весь хромосомный набор одновременно, т.к. при этом методе использованные меченые флюорохромами образцы ДНК устанавливают комплементарные связи с каждой из 24-х хромосом человека. В результате того, что при данном методе каждая из хромосом окрашивается в индивидуально своеобразный цвет, значительно облегчается их изучение с использованием компьютерной техники. Недостатком М- FISH метода является окрашивание хромосом на всем их протяжении в единый цвет, что делает невозможным судить о происходящих изменениях внутри хромосом.

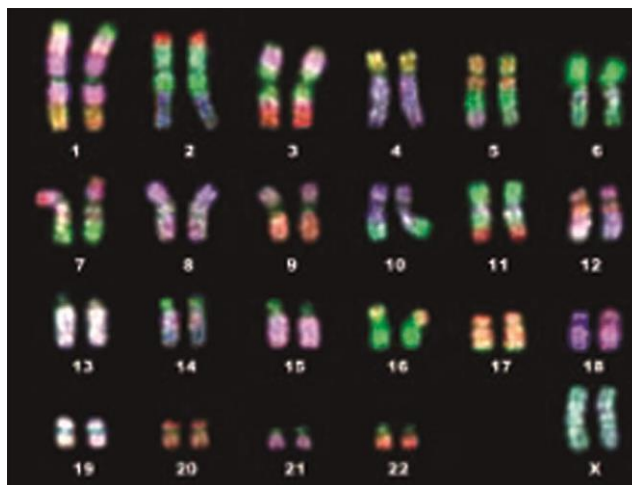


Рис. 5.30. Выявление хромосом относящихся к женскому кариотипу методом RxFISH. Ясно видны цветные полосы свойственные каждой хромосоме (Department of Clinical Cytogenetics, Addenbrookes Hospital / photo researchers, Inc)

Эти недостатки практически были устранены при применении *Rx FISH метода*. В этом методе в качестве «образцов ДНК» используются фрагменты молекул ДНК двух видов человекообразных обезьян – гиббонов (*Hylobates concolor* и *Hylobates syndactylus*). В составе этих фрагментов имеются места, гомологичные соответствующим участкам в каждой из хромосом человека, где и могут устанавливаться комплементарные связи. Следует отметить, что меченые флюорохромами фрагменты ДНК гиббонов окрашиваются в 7 различных цветов. Поэтому в результате возникших комплементарных связей между цепями ДНК и вышеназванными фрагментами при люминисцентном микрокопировании выявляется свойственная для каждой из хромосом человека характерная картина окрашенных цветных полос (рис.5.30). Окрашенные цветные полосы позволяют различать хромосомы (в составе кариотипа) друг от друга, выявлять внутривхромосомные и межхромосомные перемещения и одновременно значительно облегчают изучение генома человека в норме и при различных патологических процессах.

Литература:

- Adam SA, Marr RS, Gerace L. Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J. Cell Biol.*, 1990; 111:807-816.
- Babcock HP, Chen C, Zhuang X. Using single-particle tracking to study nuclear trafficking of viral genes. *Biophys. J.*, 2004; 87:2749-2758.
- Bayliss R, Ribbeck RK, Akin D, Kent HM, Feldherr CM, Gorlich D, Stewart M. Interaction between NTF2 and xFG-containing nucleoporins is required to mediate nuclear import of RanGDP. *J. Mol. Biol.*, 1999; 293:579-593.
- Bonifaci N, Moroianu J, Radu A, Blobel G. Karyopherin beta2 mediates nuclear import of a mRNA binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94(10):5055-60.
- Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, Chait BT, Matunis MJ. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.*, 2002; 158:915-927.
- Fahrenkrog, B, Aebi U. The vertebrate nuclear pore complex: from structure to function. *Results Probl. Cell Differ.*, 2002; 35:25-48.
- Feldherr CM, Akin D. The location of the transport gate in the nuclear pore complex. *J. Cell Sci.*, 1997; 110:3065-3070.
- Macara IG. Transport into and out of the nucleus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2001; 65:570-594.
- Peters R. Fluorescence microphotolysis to measure nucleocytoplasmic transport and intracellular mobility. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986; 864:305-359.
- Suntharalingam M, Wentz S. Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev Cell.*, 2003; 4(6):775-89.
- Schutz GJ, Sonnleitner M, Hinterdorfer P, Schindler H. Single molecule microscopy of biomembranes. *Mol. Membr. Biol.*, 2000; 17:17-29.
- DNT vs RNT
- Azuma J, Dasso M. The role of Ran in nuclear function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2000; 12:302-307.
- Gilbert DM. Making sense of Eukaryotic DNA replication origins. *Science*, 2001; 294:96-100.
- Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, Tainer JA. Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell*, 2000; 101(7):789-800.
- Ibba M, Curnow AW, Soll D. Aminoacyl-tRNA synthesis: divergent routes to a common goal. *Trends Biochem. Sci.*, 1997; 22:39-42.
- Junop MS, Obmolova G, Rausch K, Hsieh P, Yang W. Composite active site of an ABC ATPase: MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair. *Mol. Cell*, 2001; 7(1):1-12.
- Lamond AL, Earnshaw WC. Structure and function in the nucleus. *Science*, 1998; 280:547-553.
- Leatherwood J. Emerging mechanisms of eukaryotic DNA replication initiation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998; 10:742-748.
- Ogawa T, Okazaki T. Discontinuous DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.*, 1980; 49:421-457.
- Shatkin AJ, Manley JL. The ends of the affair: Capping and polyadenylation. *Nat. Struct. Biol.*, 2000; 7:838-842.
- Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 1953; 177:737-738.
- Will CL, Luhrmann R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2001; 13:290-301.

- Bantounas I., Phylactou L.A. and Uney J.B. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2004, 33:545-557.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanisms and function. *Cell*. 2004, 116(2):281-97.
- Szymanski M, Erdmann VA, Barciszewski J. Noncoding regulatory RNAs database. *Nucleic Acids Res.* 2003, 31(1):429-31.
- Szymanski M, Barciszewski J. Regulation by RNA. *Int Rev Cytol.* 2003; 231:197-258.
- Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet.* 2002 30(4):363-4.
- Numata K, Kanai A, Saito R, et al. Identification of Putative Noncoding RNAs Among the RIKEN Mouse FullLength cDNA Collection. *Genome Research.* 2003, 13:1301-1306.
- Transkripsiya
- Herbert A. The four Rs of RNA-directed evolution. *Nature Genetics*, 2004; 36:19-25.
- Levin M, Tjian R. Transcription regulation and animal diversity. *Nature*, 2003; 424:147-151.
- Lim CY, Santoso B, Boulay T, Dong E, Ohler U, Kadonaga JT. The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Genes Dev.*, 2004; 18(13):1606-17.
- Parsons XH, Garcia SN, Pillus L, Kadonaga JT. Histone deacetylation by Sir2 generates a transcriptionally repressed nucleoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100(4):1609-14.
- Schmutz J, Wheeler J, Grimwood J, Dickson M. Quality assessment of the human genome sequence. *Nature*, 2004; 429(6990):365-8.
- Torrents D, Suyama M, Zdobnov E,
- Bork P. A genome-wide survey of human pseudogenes. *Genome Res.*, 2003 Dec; 13(12):2559-67.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW et al. The sequence of the human genome. *Science*, 2001; 291(5507):1304-51.
- Genom
- TapaHTyn B. TeHOM nenoBeKa:ΘHqHKnoneflHH, HanncaH-Haa HeTHptMH 6yKBaMH. M.: H3HKH cnaBHCKOH KynBTыpH, c.392.
- Bailey JA, Liu G, Eichler EE. An Alu transposition model for the origin and expansion of human sental duplications. *Am. J. Hum. Genet.*, 2003; 73:823-834.
- Bantounas I, Phylactou LA, Uney JB. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *J. Mol. Endocrinol.*, 2004; 33(3):545-57.
- Brudno M, Poliakov A, Salamov A, Cooper GM et al. Automated wholegenome multiple alignment of rat, mouse, and human. *Genome Res.*, 2004; 14(4):685-92.
- Dagan T, Sorek R, Sharon E, Ast G, Graur D. AluGene: a database of Alu elements incorporated within protein-coding genes. *Nucleic Acids Res.*, 2004;32(Database issue): D489-92.
- Gonzalez P, Diez-Juan A, Coto E, Alvarez V et al. A single-nucleotide polymorphism in the human p27kip1 gene (838C>A) affects basal promoter activity and the risk of myocardial infarction. *BMC Biol.*, 2004; 2(1):5.
- Havlak P, Chen R, Durbin KJ, Egan A et al. The Atlas genome assembly system. *Genome Res.*, 2004; 14(4):721-32.
- Iborra FJ, Kimura H, Cook PR. The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biol.*, 2004; 2(1):9.
- International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the

euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 2004; 431:931-945.

International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001; 409(6822):860-921.

International Human Genome Sequencing Consortium. The sequence of the human genome. *Science*, 2001; 291(5507):1304-51.

Istrail S, Sutton GG, Florea L, Halpern AL et al. Whole-genome shotgun assembly and comparison of human genome assemblies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101(7):1916-21.

Kadonaga JT. The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp. Mol. Med.*, 2002; 34(4):259-64.

Li S, Cutler G, Liu JJ, Hoey T et al. A comparative analysis of HGSC and Celera human genome assemblies and gene sets. *Bioinformatics*, 2003; 19(13):1597-605.

Liu G, Zhao S, Bailey JA, Sahinalp SC et al. Analysis of primate genomic variation reveals a repeat-driven expansion of the human genome. *Genome Res.*, 2003; 13(3):358-68.

Numata K, Kanai A, Saito R, Kondo S et al. Identification of putative noncoding RNAs among the RIKEN mouse fulllength cDNA collection. *Genome Res.*, 2003; 13(6B):1301-6.

Rat Genome Sequencing Consortium. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, 2004; 428(6982):493-521.

Sanvicens N, Gomez-Vicente V, Masip I, Messeguer A, Cotter TG. Oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells is mediated by calpains and caspases and blocked by the oxygen radical scavenger CR-6. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279(38):39268-39278.

Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG et al. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101(7):1892-7.

She X, Jiang Z, Clark RA, Liu G et al. Shotgun sequence assembly and recent segmental duplications within the human genome. *Nature*, 2004; 431(7011):927-30.

Smale ST. Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev.*, 2001; 15(19):2515-9.

Stein LD. Human genome: end of the beginning. *Nature*, 2004; 431(7011):915-6.

Xromatin və xromosomların quruluşu

Akhmedov AT, Frei Ch, TsaiPflugfelder M, Kemper B, Gasser SM, Jessberger R. Structural maintenance of chromosomes protein C-terminal domains bind preferentially to DNA with secondary structure. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273(37):24088-24094.

Almagro S, Riveline D, Hirano T, Houchmandzadeh B, Dimitrov S. The mitotic chromosome is an assembly of rigid elastic axes organized by structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins and surrounded by a soft chromatin envelope. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279(7):5118-26.

Anderson DE, Losada A, Erickson HP, Hirano T. Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *The Journal of Cell Biology*, 2002; 156(3):419-424.

Bak P, Bak AL, Zeuthen J.

Characterization of human chromosomal unit fibers. *Chromosoma*, 1979; 73(3):30115.

Ball Jr AR, Yokomori K. The structural maintenance of chromosomes (SMC) family of proteins in mammals.

Chromosome Res., 2001; 9(2):85-96.

Bednar J, Horowitz RA, Grigoryev SA, Carruthers LM, Hansen JC, Koster AJ, Woodcock CL. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique

structural motif that directs the higherorder folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95(24):14173-8.

Belmont AS. Mitotic chromosome scaffold structure: new approaches to an old controversy. *PNAS*, 2002; 99(25):15855-15857.

Borland L, Harauz G, Bahr G, Heel M. Packing of the 30 nm chromatin fiber in the human metaphase chromosome. *Chromosoma*, 1988; 97(2):159-63.

Chen ES, Sutani T, Yanagida M. Cti1/C1D interacts with condensin SMC hinge and supports the DNA repair function of condensin. *PNAS*, 2004; 101(21):8078-8083.

Chiu A, Revenkova E, Jessberger R. DNA interaction and dimerization of eukaryotic SMC hinge domains. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279(25):26233-42.

Cobbe N, Heck MM. The evolution of SMC proteins: phylogenetic analysis and structural implications. *Mol. Biol. Evol.*, 2004; 21(2):332-47.

Coelho PA, Queiroz-Machado J, Sunkel CE. Condensin-dependent localisation of topoisomerase II to an axial chromosomal structure is required for sister chromatid resolution during mitosis. *Journal of Cell Science*, 2003; 116:4763-4776.

Cuvier O, Hirano T. A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation. *The Journal of Cell Biology*, 2003; 160(5):645-655.

Dou Y, Bowen J, Liu Y, Gorovsky MA. Phosphorylation and an ATPdependent process increase the dynamic exchange of H1 in chromatin. *The Journal of Cell Biology*, 2002; 158(7):1161-1170.

Earnshaw WC, Laemmli UK. Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. *The Journal of Cell Biology*, 1983; 96:84-93.

Fujioka Y, Kimata Y, Nomaguchi K, Watanabe K, Kohno K. Identification of a novel non-structural maintenance of chromosomes (SMC) component of the SMC5SMC6 complex involved in DNA repair. *Biol. Chem.*, 2002; 277(24):21585-21591.

Gassmann R., Vagnarelli P., Hudson D., Earnshaw WC. Mitotic chromosome formation and the condensin paradox. *Exp. Cell Res.*, 2004; 296(1):35-42.

Hagstrom KA, Meyer BJ. Condensin and cohesin: more than chromosome compactor and glue. *Nat. Rev. Genet.*, 2003; 4(7):520-34.

Hirano M, Hirano T. Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA. *EMBO J.*, 2002; 21(21):5733-44.

Hirano M, Hirano T. Positive and negative regulation of SMC-DNA interactions by ATP and accessory proteins. *EMBO J.*, 2004; 23(13):2664-73.

Hirano T. Chromosome shaping by two condensins. *Cell Cycle*, 2004; 3(1):268.

Hirano T. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev.*, 2002; 16(4):399-414.

Houchmandzadeh B, Dimitrov S. Elasticity measurements show the existence of thin rigid cores inside mitotic chromosomes. *J. Cell Biol.*, 1999;145(2):215-223.

Hudson DF, Vagnarelli P, Gassmann R, Earnshaw WC. Condensin is required for nonhistone protein assembly and structural integrity of vertebrate mitotic chromosomes. *Dev. Cell.*, 2003; 5(2):323-36.

Iwabuchi Sh, Muramatsu H, Chiba N, Kinjo Y, Murakami Y, Sakaguchi T, Yokoyama K, Tamiya E. Simultaneous detection of near-field topographic and fluorescence images of human chromosomes via scanning near-field

- optical/atomic-force microscopy (SNOAM). *Nucleic Acids Res.*, 1997; 25(8):1662-3.
- Kagansky A, Freeman L, Lukyanov D, Strunnikov A. Histone tail-independent chromatin binding activity of recombinant cohesin holocomplex. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279(5):3382-8.
- Kitajima TS, Yokobayashi S, Yamamoto M, Watanabe Y. Distinct cohesin complexes organize meiotic chromosome domains. *Science*, 2003; 300(5622):1152-5.
- Kornberg RD. Chromatin structure. A repeating unit of histones and DNA. *Science*, 1974; 184:868-871.
- Labhart P, Koller T, Wunderli H. Involvement of higher order chromatin structures in metaphase chromosome organization. *Cell*, 1982; 30(1):115-21.
- Laird CD, Wilkinson LE, Foe VE, Chooi WY. Analysis of chromatin-associated fiber arrays. *Chromosoma*, 1976; 58(2):169-90.
- Lavoie BD, Hogan E, Koshland D. In vivo dissection of the chromosome condensation machinery : reversibility of condensation distinguishes contributions of condensin and cohesin. *The Journal of Cell Biology*, 2002; 156(5):805-815.
- Lee YM, Lee S, Lee E, Shin H, Hahn Choi W, Kim W. Human kinesin superfamily member 4 is dominantly localized in the nuclear matrix and is associated with chromosomes during mitosis. *Biochem. J.*, 2001; 360(Pt 3):549-56.
- Lowe J, Cordell SC, Ent F. Crystal structure of the SMC head domain: an ABC ATPase with 900 residues antiparallel coiled-coil inserted. *Mol. Biol.*, 2001; 306(1):25-35.
- Meyer BJ. Sex in the worm counting and compensating X-chromosome dose. *Trends Genet.*, 2000; 16(6):247-53.
- Ono T, Fang Y, Spector DL, Hirano T. Spatial and temporal regulation of condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. *Mol. Biol. Cell*, 2004; 15(7):3296-308.
- Palter KB, Foe VE, Alberts BM. Evidence for the formation of nucleosome-like histone complexes on single-stranded DNA. *Cell*, 1979; 18(2):451-67.
- Poirier MG, Marko JF. Mitotic chromosomes are chromatin networks without a mechanically contiguous protein scaffold. *PNAS*, 2002; 99(24):15393-15397.
- Przewloka MR, Pardington PE, Yannone SM, Chen DJ, Cary RB. In vitro and in vivo interactions of DNA ligase IV with a subunit of the condensin complex. *Mol. Biol. Cell*, 2003; 14(2):685-97.
- Rasch P, Wiedemann U, Wienberg J, Heckl WM. Analysis of banded human chromosomes and in situ hybridization patterns by scanning force microscopy. *Cell Biology*, 1993; 90:2509-2511.
- Rattner JB, Hamkalo BA. Higher order structure in metaphase chromosomes. II. The relationship between the 250 A fiber, superbeads-on-a-string. *Chromosoma*, 1978; 69(3):373-9.
- Rattner JB, Hamkalo BA. Nucleosome packing in interphase chromatin. *J. Cell Biol.*, 1979; 81(2):453-7.
- Rattner JB, Lin CC. Radial loops and helical coils coexist in metaphase chromosomes. *Cell*, 1985; 42(1):291-6.
- Rattner JB, Rees J, Arnett FC, Reveille JD, Goldstein R, Fritzler MJ. The centromere kinesin-like protein, CENP-E. An autoantigen in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.*, 1996; 39(8):1355-61.
- Rattner JB. Integrating chromosome structure with function. *Chromosoma*, 1992; 101(5-6):259-64.
- Saitoh N, Goldberg IG, Wood ER, Earnshaw WC. ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. *J. Cell Biol.*, 1994; 127(2):303-18.
- Saitoh Y, Laemmli UK. Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly ATrich scaffold. *Cell*, 1994; 76(4):609-22.
- Sakai A, Hizume K, Sutani T, Takeyasu K, Yanagida M. Condensin but not cohesin SMC heterodimer induces DNA reannealing through protein-protein assembly. *The EMBO Journal*, 2003; 22(11):2764-2775.
- Schar P, Fasi M, Jessberger R. SMC1 coordinates DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res.*, 2004; 32(13):3921-9.
- Stray JE, Lindsley JE. Biochemical Analysis of the Yeast Condensin Smc2/4 Complex. AN ATPase that promotes knotting of circular DNA *J. Biol. Chem.*, 2003; 278(28):26238-26248.
- Strick R, Strissel PL, Gavrilov K, LeviSetti R. Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. *The Journal of Cell Biology*, 2001;

155(6):10, 899-910.

Strick TR, Kawaguchi T, Hirano T. Real-time detection of single-molecule DNA compaction by condensin I. *Curr. Biol.*, 2004; 14(10):874-80.

Strunnikov AV. Condensin and biological role of chromosome condensation. *Prog. Cell Cycle Res.*, 2003; 5:361-7.

Strunnikov, A.V., Larionov, V.L., and Koshland, D. SMC1: An essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous family. *J. Cell Biol.* 1993. 123: 1635-1648

Strunnikov AV. SMC proteins and chromosome structure. *Trends Cell Biol.*, 1998; 8(11):454-9.

Takemoto A, Kimura K, Yokoyama S, Hanaoka F. Cell cycle-dependent phosphorylation, nuclear localization, and activation of human condensin. *Biol. Chem.*, 2004; 279(6):4551-9.

Tamayo J. Structure of human chromosomes studied by atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.*, 2003; 141(3):198-207.

Tyler JK. Chromatin assembly. Cooperation between histone chaperones and ATP-dependent nucleosome remodeling machines. *Eur. J. Biochem.*, 2002; 269:2268-2274.

Volkov A, Mascarenhas J, AndreiSelmer C, Ulrich HD, Graumann PL. A prokaryotic condensin/cohesin-like complex can actively compact chromosomes from a single position on the nucleoid and binds to DNA as a ring-like structure. *Mol. Cell Biol.*, 2003; 23(16):5638-50.

Wen GY, Fisher MB, Genovese M, Goldberg EM, Jenkins EC. Brush-like fibers on the human chromosome periphery. *Scanning*, 2003; 25(6):316-20.

Wignall SM, Deehan R, Maresca ThJ, Heald R. The condensin complex is required for proper spindle assembly and chromosome segregation in *Xenopus* egg extracts. *The Journal of Cell Biology*, 2003; 161(6):1041-1051.

Xu YC, Bremer H. Winding of the DNA helix by divalent metal ions. *Nucleic Acids Res.*, 1997; 25(20):4067-71.

Yu HG, Koshland DE. Meiotic condensin is required for proper chromosome compaction, SC assembly, and resolution of recombination-dependent chromosome linkages. *The Journal of Cell Biology*, 2003; 163(5):937-947.

Zelenin MG, Zakharov AF, Zatsepina OV, Polijakov VYu., Chentsov YuS. Reversible differential decondensation of unfixed Chinese hamster chromosomes induced by change in calcium ion concentration of the medium. *Chromosoma*, 1982; 84(5):729-36.

КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ

Одной из фундаментальных особенностей клетки, равно как и целого организма, является способность к самовоспроизведению. Неслучайно, что выдвинутый Р. Вирховым постулат "*каждая клетка от клетки*" был принят в качестве важного положения клеточной теории.

Главным условием для собственной репродукции клетки является деление "материнской" клетки на две части с передачей полного комплекса генетического материала и органелл, в результате чего образуются две "дочерние" клетки. В связи с тем, что новообразованные клетки сохраняют способность к делению, от первичных родителей может образовываться огромное количество клеток. Примером может служить то, что общее количество клеток организма человека составляет 10^{13} – 10^{14} (100 триллионов) и все они возникли в процессе развития из одной оплодотворенной яйцеклетки (зиготы).

Наряду с размножением путем деления (*пролиферации*), в клетке происходят также процессы специализации (*дифференциации*) и запрограммированная смерть клеток, завершивших свою деятельность (*апоптоз*).

В широком смысле, последовательные процессы, происходящие в каждой клетке в период времени от одного деления до другого или же от последнего деления до гибели клетки называются **клеточным циклом**. Но, так как термин *цикл* в биологии используется

для иллюстрации повторяющихся процессов, клеточным циклом, как правило, называют период между двумя митотическими делениями.

Гистологически в клеточном цикле различают два периода:

1. деление клетки, происходящее за короткий промежуток времени и которое можно проследить при помощи светового микроскопа - стадия **митоза**;
2. стадия, включающая в себя основной период жизнедеятельности клетки, начиная от конца первого деления до начала второго деления – **интерфаза**.

Процессы, происходящие в клетке во время указанных периодов ее жизнедеятельности, можно увидеть при помощи светового микроскопа, применив обычное окрашивание. Однако, в последние годы эти процессы были изучены более детально на молекулярном уровне, с использованием современных биохимических, радио-автографических, иммуно-гистохимических и др. методов.

ИНТЕРФАЗА

Интерфаза, являющаяся начальной стадией жизнедеятельности любой клетки, делится на три фазы:

- постмитотическая или пресинтетическая фаза;
- синтетическая фаза или дупликация;
- постсинтетическая или премитотическая фаза;

Данные фазы обозначаются буквами **G₁**, **S** и **G₂** соответственно. Буква S является заглавной в английском слове "*synthesis*" и используется для описания периода синтеза полинуклеотидных цепей ДНК. Буква G является заглавной буквой английского слова "*gap*" - перерыв (интервал). Поэтому G₁ используется для описания "перерыва" между митотическим и синтетическим периодами, а G₂ - между синтетическим периодом и митозом. Также G₁ называют первым, а G₂ вторым перерывом (интервалом) (рис.6.1).

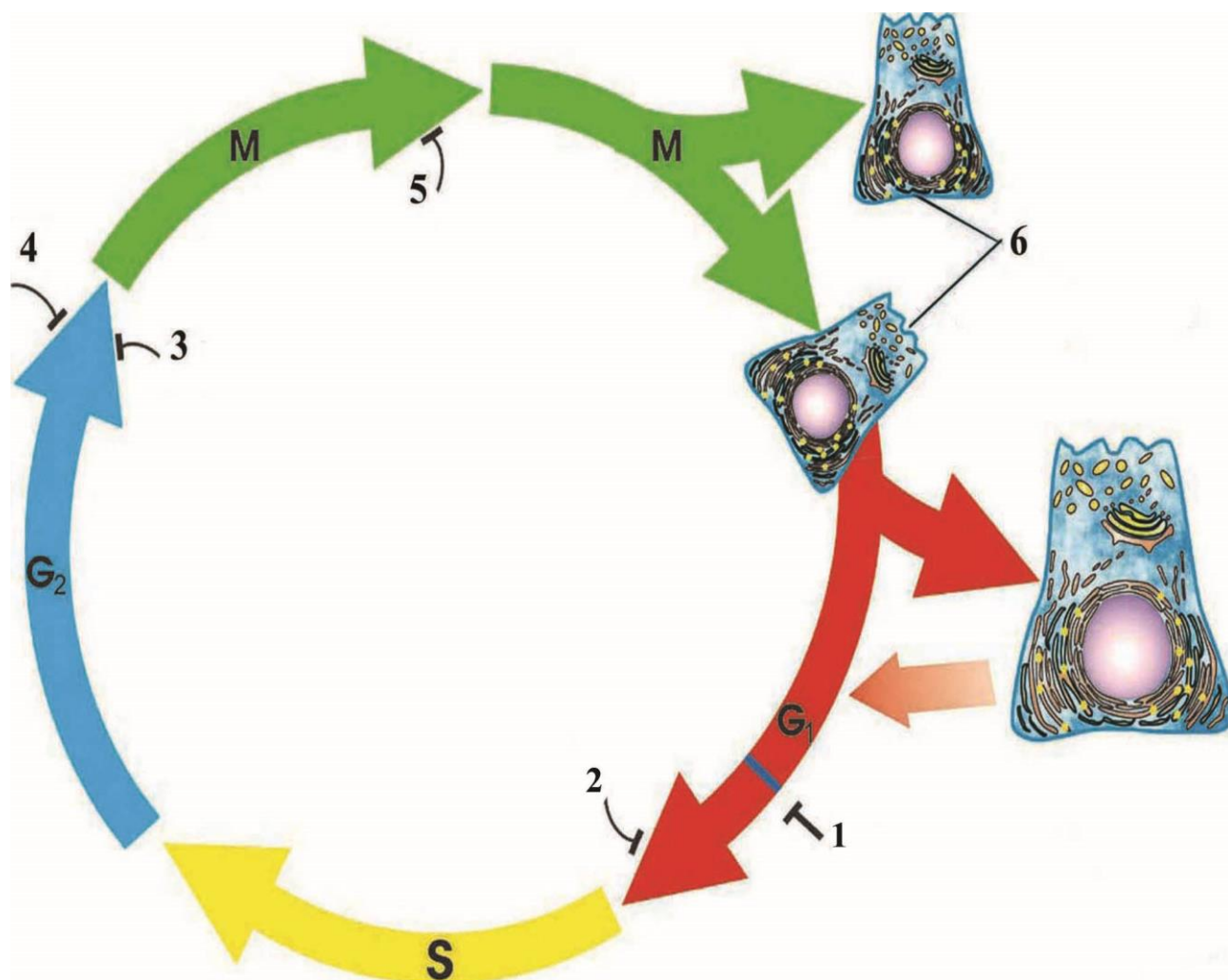


рис.6.1. Фазы клеточного цикла. Схема контрольно-переходных пунктов.

1- точка рестрикции (ограничения); 2- контрольно-переходный пункт (КПП) проверки целостности ДНК; 3- КПП проверки полной репликации ДНК; 4- КПП проверки полной дупликации и повреждения ДНК, а также определения дупликации centrosom; 5- КПП проверки становления метафазных хромосом; 6- дочерние клетки

В накопление и в научное обоснование современных данных касательно молекулярных основ процессов, протекающих во время клеточного цикла, важную лепту внесли результаты исследований злокачественных опухолей. Среди этих исследований особое внимание привлекает работа П.Рауса, в которой автор приходит к выводу о возникновении саркомы у куриц (злокачественной опухоли соединительной ткани) в результате деятельности специфических ретровирусов. Эти вирусы сейчас называются *вирусами саркомы Рауса* (RSV). Спустя 50 лет после этого открытия было доказано, что саркома птиц вызывается не целиком RSV, а Srs-геном в составе генома этого вируса. Г.Вармус и Дж.М.Бишоп с сотрудниками в 1976-м году выявили, что ген Srs является частью не только RSV, но и нормального генома курицы. Поздние исследования показали, что в геномах нормальных клеток присутствует большое количество генов, участвующих (при определенных условиях) в их преобразовании в клетки злокачественной опухоли.

Гены, способствующие трансформации клеток называются **онкогенами**, а те же гены, входящие в состав нормального генома - **протоонкогенами**.

Дальнейшие исследования полностью доказали участие большинства генов, входящих в эту группу (srs, gas, raf и др.) в синтезе факторов, регулирующих клеточный цикл. Следовательно, экспрессия протоонкогенов в норме регулирует клеточный цикл. Между тем мутации приводят к ненормальной экспрессии названных генов, результатом чего является

бесконтрольное (бесперывное) деление клеток, ведущее к развитию злокачественных опухолей.

В составе генома клеток человеческого организма имеется более 100 протоонкогенов. С протоонкогенами связан синтез многих соединений, принимающих участие в клеточном цикле: факторы роста, их рецепторы, факторы транскрипции, цитоплазматические протеинкиназы, ГТФ-зависимые белки и пр. Упомянутые соединения, являясь первопричиной деления клеток, участвуют в принятии **митогенных сигналов**, их передаче с поверхности клетки в ядро и тем самым обеспечивающих экспрессию определенной группы генов, ответственных за деление клетки.

Среди соединений, обладающих митогенной деятельностью, широко распространены:

- факторы роста - фактор роста нерва, фактор роста фибробластов, эпидермальный фактор роста, тромбоцитарный фактор роста;
- гормоны - инсулин, фолликулостимулирующий гормон, эстрогены, гормон роста и т.д.;
- цитокины - интерлейкины, эритропоэтины, интерфероны;
- нейромедиаторы - ацетилхолин, норадреналин, глицин;
- белки адгезивных контактов - интегрины, кадгерины, селектины и т.д.;
- макромолекулы, располагающиеся в межклеточном пространстве - фибронектин, ламинин;
- физические факторы - ультрафиолетовый свет, напряжение перемещения (shear stress), осмотическое давление и т.д.;

В результате воздействия митогенов наряду с самими циклинами и циклин-зависимыми киназами, непосредственно регулирующими клеточный цикл, происходит также экспрессия генов, участвующих в синтезе их активаторов и ингибиторов. Центральное место в экспрессии упомянутых генов занимают факторы транскрипции поколения E2F и белка (pRB) ретинобластомы (злокачественная опухоль сетчатки глаза). Факторы транскрипции E2F бывают постоянно связаны с соответствующими генами в составе ДНК.

Как только белок ретинобластомы pRB связывается с E2F, образуется комплекс pRB/E2F, и поскольку E2F переходит в неактивную форму процесс транскрипции приостанавливается. Напротив, в случае фосфорилирования белка pRB происходит его отделение из комплекса pRB/E2F. Отделившись от комплекса, E2F активизирует факторы транскрипции, что является причиной экспрессии генов, участвующих в регуляции клеточного цикла.

Основным фактором, который участвует в регуляции клеточного цикла является протеинкиназа, кодируемая геном Cdc2 (cell division cycle). Характерной особенностью этих ферментов является их способность к активации не по отдельности, а лишь в случае слияния их с так называемой **регуляторной субъединицей цикла**. Принимая это во внимание, указанные киназы называют **циклин-зависимыми киназами** (cyclin dependent kinase). Обнаружено 10 видов Cdk у эукариотов, называемых Cdk1, Cdk2, ... Cdk10 соответственно. На сегодняшний день известно 16 видов циклинов, молекулярная масса которых варьирует в пределах 35-90 kD и обозначаются они соответственно циклин А, В, С, D и т.д.

Регулирование клеточного цикла происходит в двух основных направлениях. В первом случае под контролем держится ход и завершение процессов, важных для перехода одной фазы цикла в другую, тогда как во втором - сам вышеупомянутый переходный процесс.

Регулирование первого типа происходит при помощи **контрольно-пропускных пунктов** (check point). Было установлено, что в каждой из G₁ и G₂ фаз имеется 2, а в метафазе 1 контрольно-пропускной пункт (КПП).

Первый КПП, функционирующий ближе к концу фазы G₁, называется **точкой ограничения** (restriction point). Продолжение цикла на уровне этой точки требует следующих условий:

1. объем и масса клетки должны достигать того уровня, который был до митоза;

2. питательные вещества (аминокислоты, фосфатная группа и др.), необходимые для синтеза ДНК и важных белков должны присутствовать в достаточном количестве;
3. сигнал, обладающий митогенным действием и необходимый для наступления пролиферации должен быть принят клеткой;

В случае выполнения указанных условий фаза G_1 продолжается, в противном же случае - клетка переходит в фазу G_0 или же погибает путем апоптоза.

Второй КПП функционирует в конце фазы G_1 и следит за повреждениями молекулы ДНК. В случае повреждения молекулы ДНК по разным причинам (ионизирующее излучение, химические мутагены, свободные радикалы и т.д.) клеточный цикл в фазе G_1 приостанавливается. Это происходит вследствие действия белков (p53, pRB, p27, PTEN), которые при означенных условиях синтезируются в результате экспрессии специфических генов – онкосупрессоров. Интересно отметить, что развитие злокачественных опухолей у человека часто происходит вследствие мутации гена **белка p53**. Указанное выше еще раз показывает, что клеточный цикл играет важную роль в жизни многоклеточного организма.

Третий КПП, находящийся в фазе G_2 проверяет целостность репликации молекул ДНК.

Важным условием для совершения митоза является полная дупликация ДНК. Контроль за этим процессом происходит **четвертым КПП** в фазе G_2 . Этот пункт наряду с дупликацией контролирует целостность молекулы ДНК (изменений), а также контролирует удвоение centrosom. Отклонения в указанных процессах передаются при помощи сенсорных белков эффекторным белкам. При помощи последних, завершается дубликация ДНК, а изменения молекулы ДНК устраняются (ремонтируются). В течение этого времени переход от фазы G_2 к фазе М приостанавливается. В случае невозможности устранения вышеупомянутых изменений, клетки погибают путем апоптоза.

В результате деятельности **пятого КПП** хромосомы, подвергшиеся дупликации, связываются с веретеном деления и выстраиваются в ряд у экваториальной границы. До этого момента отделение хроматид друг от друга откладывается. Это создает условия для равного разделения генома между дочерними клетками.

Второе направление регулирования клеточного цикла происходит во время перехода фаз. Так, под воздействием митогенных факторов циклин D Cdk4 объединяется с Cdk6, формируя **Cdk4/6 циклин D**, который и обеспечивает прохождение клетки через точку рестрикции (ограничения). В случае, если действие митогенного фактора прекратится раньше положенного, то клетка не сможет пройти через точку ограничения и вернется в фазу G_0 .

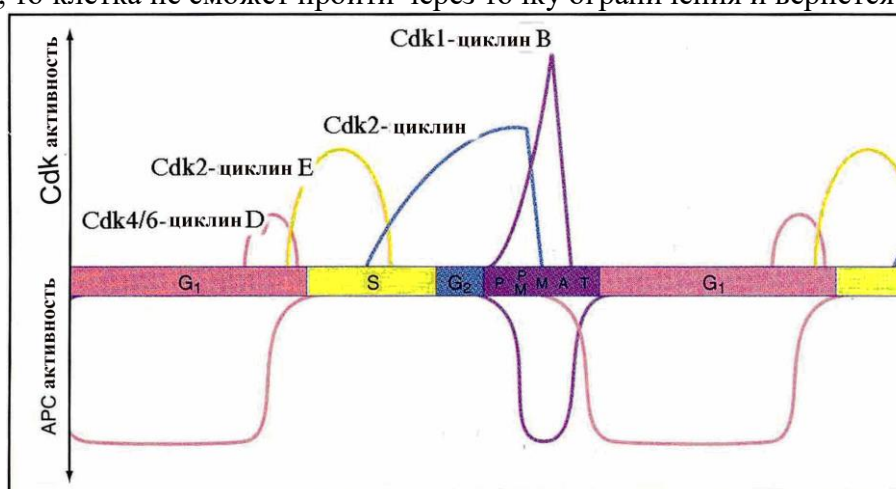


Рис.6.2. Схематический рисунок степени активности Cdk и APC на разных этапах клеточного цикла.

В фазах клеточного цикла участвуют следующие циклины и КПП: (рис.6.2)

- **циклин Cdk2 E** обеспечивает переход клетки из стадии G_1 в фазу S;
- переход клетки из фазы S в фазу G_2 и далее в стадию митоза осуществляется при помощи

комплекса **циклина Cdk2 A**;

- комплекс **циклин Cdk1 B**, весьма активный в начале митоза расщепляется во время анафазы и теряет свою активность. Это является причиной того, что новообразованные дочерние клетки переходят в интерфазу;

Данные, иллюстрирующие регулирование клеточного цикла, еще раз доказывают, что контроль и решения касательно последующих стадий жизнедеятельности клетки принимаются в начальной фазе интерфазы - G_1 фазе.

Фаза G_1

В этой фазе в первую очередь восстанавливаются исходные (до деления) показатели клетки: объем, ядрышки, внутриклеточный транспорт, в результате синтеза элементов цитоскелета. Для упомянутых процессов происходит синтез соответствующих РНК и белков. Затем начинается синтез необходимых белков, обеспечивающих процесс репликации ДНК и последовательное протекание клеточного цикла и наконец, ближе к концу фазы G_1 материнская и дочерняя центриоли начинают расходиться.

В фазе G_1 , наряду с упомянутыми процессами, дается старт очередному клеточному циклу, при условии, если были выполнены требования относительно прохождения точки рестрикции. В случае отсутствия соответствующего фактора роста клетки переходят из фазы G_1 в фазу G_0 . Причем переход может быть временным или постоянным. Поэтому фазу G_0 также называют двойственной.

В первом случае клетки, находящиеся в фазе G_0 , под воздействием соответствующего фактора, могут возвращаться в фазу G_1 и продолжить клеточный цикл. В качестве примера можно привести клетки фиброциты дермы кожи. В норме эти клетки, несмотря свою метаболическую активность, временно прекращают деления.. Если на коже, в силу различных причин, образуются раны, из поврежденных сосудов в область раны поступает тромбоцитарный фактор роста (**platelet derived growth factor – PDGF**), под действием которого фиброциты переходят из фазы G_0 в фазу G_1 и, пролифелируя, увеличивают свое количество. Этот процесс продолжается только до периода полного заживления раны, затем фиброциты вновь возвращаются в фазу G_0 .

Жизнедеятельность клеток, окончательно вышедших из фазы G_1 , протекает в трех основных направлениях:

- 1) клетки, перешедшие в G_0 фазу под воздействием специальных факторов роста, подвергаются процессу терминальной дифференцировки и утрачивают способность к делению. Как пример можно указать эритроциты и клетки рогового слоя эпидермиса.
- 2) клетки, находящиеся в фазе G_0 , под воздействием неадекватного фактора роста приобретают способность к пролиферации. Однако, впоследствии эти клетки либо самоустраниются посредством апоптоза, либо теряют способность к делению.
- 3) эти клетки формируют специальную группу **стареющих клеток (senescence)**. Период, длящийся от периода полной зрелости клетки вплоть до ее смерти, называется **периодом старения**. Так как старение является терминальной стадией G_0 фазы, эти клетки не могут выйти из этого состояния.

S фаза

В этой фазе продолжается синтез РНК и белков, начинается удвоение центросомы вместе с центриолями. Большинство синтезирующихся белков, это белки, входящие в состав хроматина – нуклеопротейны, в особенности гистоны. Наряду с названными процессами важным моментом синтетической фазы является **удвоение молекул ДНК – репликация**.

Репликация является сложным процессом, протекающим при участии различных специальных белков (в основном ферментов).

Так под воздействием особых ферментов в двухцепочной молекуле ДНК разрываются водородные связи между азотистыми основаниями (аденин-тимин, гуанин-цитозин) и цепи

ДНК расходятся. Каждая одиночная нить служит матрицей для создания новой.

По принципу комплиментарности на основе существующей собирается новая нить из свободных нуклеотидов, находящихся в клетке: напротив аденилового нуклеотида исходной цепи становится тимин новой нити, а напротив гуанина – комплиментарный ему цитозин. В результате вместо одной молекулы ДНК возникают две молекулы, в каждой из которых одна нить от старой молекулы, а другая заново синтезированная. Этот процесс называется редупликацией, т.е. удвоением.

В состав генома млекопитающих в среднем входит около 3×10^9 основных нуклеотидных пар. Было вычислено, что если молекула ДНК млекопитающих начинала свою репликацию с одной точки, то для завершения всего процесса репликации ей бы понадобилось как минимум 3 недели. Только известно, что S фаза у человека длится не более 8 часов. Это показывает, что процессы репликации ДНК должны начаться одновременно в нескольких местах молекулы. Каждое место, где начинается репликация хромосомальной ДНК называется **началом репликации**. Их количество в человеческом геноме достигает 60. Часть ДНК молекулы, подвергшаяся репликации, называется **репликоном**. Точка начала репликации находится примерно в центре репликона. Начиная от этой точки, спирали, образующие полинуклеотидные цепочки в составе молекулы ДНК разворачиваются в обоих направлениях. Так как места разъединения полинуклеотидных цепей ДНК молекулы похожи по форме на вилку, их называют **репликационной вилкой** и снабжены они репликационным аппаратом.

В состав репликационного аппарата входят, в основном, ДНК ферменты: геликаза, праймаза, различного рода полимеразы, а также белки, соединенные с одиночными цепочками ДНК.

Ферменты **ДНК геликазы** находятся в начале (рис.6.4) обеих репликационных вилок и обеспечивают раскрытие спиралей цепочек за счет энергии, высвобожденной в результате гидролиза АТФ (рис.6.4).

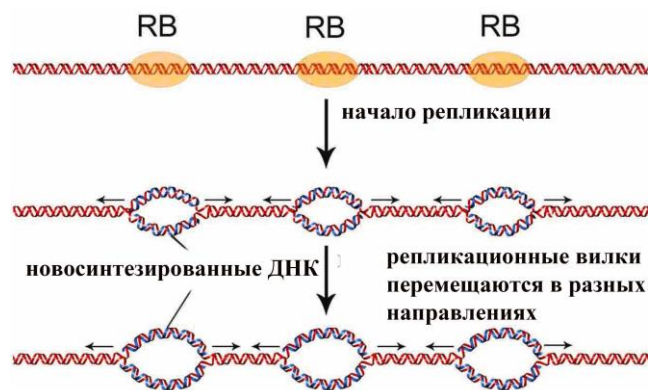


Рис.6.3. Схематический рисунок направления движения начала репликации (RB) и репликационной вилки.

Фермент **праймаза** совместно с ферментом α -полимеразой участвует в синтезе как РНК так и ДНК.

В клетках человека существует 5 видов (α , β , γ , δ , ϵ) **ДНК полимераз**. α -, δ -, ϵ -полимеразы участвуют в репликации ДНК ядра, а γ -полимераза входит в состав митохондрий. Активность β -полимеразы как в делящихся, так и в неделящихся клетках иллюстрирует ее роль в устранении изменений молекулы ДНК, появившихся в силу тех или иных причин (восстановление структуры ДНК).

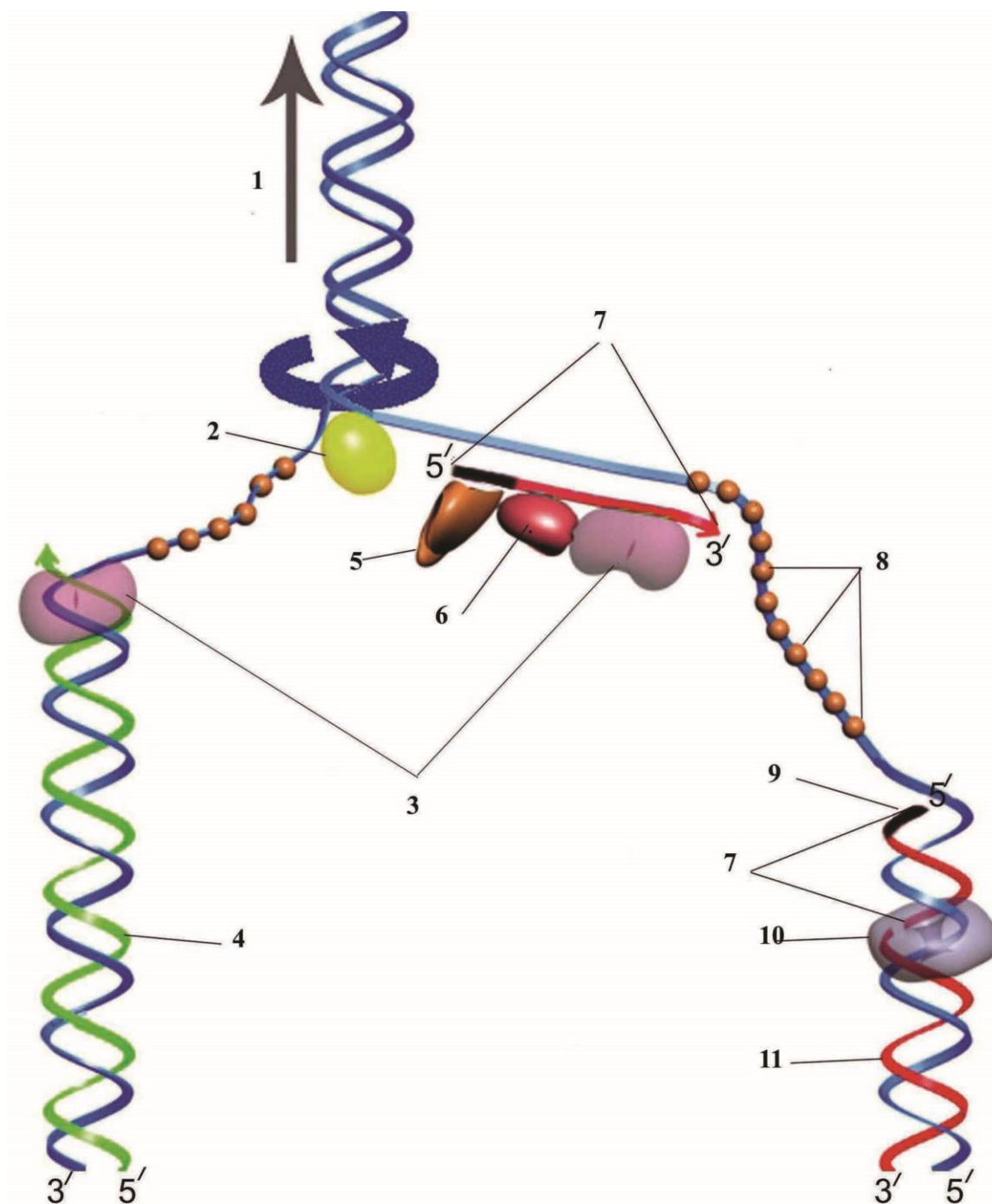


Рис.6.4. Схема репликации молекулы ДНК.

1- движение репликационной вилки; 2- геликаза; 3- полимеразы; 4- передовая цепь; 5- праймаза; 6- α-полимераза; 7- фрагмент-Оказаки; 8- белки, соединяющиеся с ДНК; 9- праймер; 10- ДНК-лигаза; 11- отстающая цепь.

Для того, чтобы ясно представить механизм репликации необходимо учитывать некоторые морфофункциональные особенности элементов участвующих в этом процессе:

- составные элементы полинуклеотидной цепи, входящие в состав молекулы ДНК, находятся в антипараллельном положении относительно друг друга. В итоге, в начале одной из цепей находится свободная ОН-группа в 3-м положении дезоксирибозы, тогда как у другой - в 5-м положении свободная PO_4 группа.
- ДНК-полимераза может синтезировать ДНК, используя короткую цепочку ДНК (матрицу) ферменты ДНК-полимеразы могут образовывать фосфодиэфирные связи только между теми нуклеозидами, которые посредством комплементарных оснований (аденин, гуанин, тимин,

цитозин) уже соединились с матрицей. То есть, в отличие от РНК полимераз, ДНК полимеразы не обладают способностью воспроизводить новую полинуклеотидную цепочку из свободных нуклеозидов;

- в удлиняющейся полинуклеотидной цепи ДНК-полимеразы могут создавать фосфодиэфирные связи между 5' фосфатными группировками вновь добавленного нуклеотида и 3' гидроксильной группой предыдущего нуклеотида.

Вышеупомянутые факты дают основание полагать, что одна из цепей, играющая роль матрицы молекулы ДНК, должна быть транслирована (прочитана) в направлении от 3' к 5', а другая - от 5' к 3'. Другими словами, одна формирующаяся цепь ДНК должна синтезироваться в направлении от 5' к 3', а другая - в противоположном.

Во время синтеза цепи ДНК в первом направлении роль образца (праймера), соединяющегося с матрицей при помощи основной комплиментарной пары, играет нуклеотид со свободной 5' трифосфат группой. Остальные нуклеотиды, образуя с матрицей комплиментарные связи, под воздействием фермента полимеразы формируют полинуклеотидную цепочку.

Удлинение этой цепи идет в направлении движения репликационной вилки без перерыва. Поэтому ее называют **передовой (leading) цепью**.

Однако поскольку все полинуклеотиды молекулы ДНК синтезируются только в направлении 5' - 3', то неизбежно встает вопрос о процессе создания второй новой полинуклеотидной цепи противоположного направления.

Внести ясность в эту задачу смогли японский ученый Т.Оказаки и его сотрудники в 80-х годах прошлого века, в результате проведенных ими исследований. Было обнаружено, что в направленности 3' - 5' новая полинуклеотидная цепь ДНК синтезируется в направлении противоположном движению репликационной вилки, причем не непрерывно, а по частям. Каждая такая часть названа **фрагментом Оказаки** и делится на начальную, промежуточную и конечную части (рис.6.4.).

Вследствие того, что ДНК полимеразы не обладают способностью полимеризации свободных нуклеозидов, то для синтеза каждого фрагмента Оказаки синтезируется **начальная часть** (праймер) в виде РНК цепочки, которая включает от 3-х до 10-и нуклеотидов и играет стартовую роль (затравка). Фермент РНК полимеразы, участвующая в синтезе этой цепи также называется **праймазой**. **Промежуточная часть** - это цепь ДНК, состоящая из 20-30 нуклеотидов, синтезированная при участии α -полимеразы. **Конечная часть** - цепь ДНК из 220-250 нуклеотидов, синтезированная при участии δ -полимеразы (рис.6.4).

Фермент δ -полимеразы, участвующая в синтезе конечной части фрагмента Оказаки, наряду с процессом полимеризации, принимает также участие в гидролизе цепи РНК, синтезированной в начальной части фрагмента Оказаки. Процесс гидролиза дойдя до группы 5' PO₄ в цепочке ДНК останавливается и 3' OH группа вновь синтезированного фрагмента становится напротив 5' PO₄ группы предыдущего матричного фрагмента. Фосфодиэфирная связь между указанными группами устанавливается при участии фермента **ДНК лигазы** (рис.6.4). Таким образом, из отдельных фрагментов Оказаки в направлениях 3' - 5' формируется новая цепь ДНК. В связи с тем, что синтез цепи ДНК в направлении 3' - 5' требует больших временных затрат по сравнению с синтезом цепи ДНК передовой цепи, ее часто называют **отстающей цепью** (рис.6.4).

Фаза G₂

Непосредственно в фазе G₂ имеется контрольно-переходный пункт, деятельность которого регулирует переход клетки в стадию митоза.

Действующий в G₂ фазе регулятор клеточного деления комплекс ACdk-2-циклин не только регулирует переход клетки из фазы G₂ в стадию митоза, но одновременно продолжает принимать участие в происходящих процессах клеточного цикла вплоть до середины профазы (рис. 6.2).

В фазе G₂ синтезируются важнейшие белки и РНК, необходимые для деления клетки, накапливается энергия для завершения митоза, проверяются процессы синтеза ДНК, а обнаруженные ошибки устраняются.

Среди процессов, происходящих в G₂ фазе, особого внимания заслуживают изменения микротрубочек. Так, сокращение продолжительности существования микротрубочек от 10 минут до 30 секунд к концу G₂ фазы приводит к выведению из строя микротрубочек цитоскелета в течении очень короткого промежутка времени. Вместе с тем, в связи с быстрым образованием микротрубочек вокруг centrosом, начинается процесс формирования веретена деления.

В G₂ фазе синтезируются негистоновые белки (напр. конденсин), участвующие в построении хромосом. Белок конденсин инициирует конденсацию хромосом, а как только начинается конденсация хромосом, происходит активация кинетохорных белков цитоплазмы. Последние, проникая в ядро, соединяются с центромерами.

ТИПЫ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК

В процессе деления клеток различают две протекающие одновременно стадии:

- деление ядра (кариокинез),
- деление цитоплазмы (цитокинез).

Деление ядра может быть прямым (амитоз) и непрямым. Существуют два вида непрямого деления: митоз и мейоз. Митоз присущ соматическим клеткам, а мейоз - половым.

АМИТОЗ

В процессе прямого деления клеток - при амитозе, ядерное вещество распределяется между "дочерними" ядрами неравномерно, случайным образом. Ядро и цитоплазма материнской клетки делятся надвое. В случае, если деление ядра не сопровождается делением цитоплазмы, образуются многоядерные клетки. Последние сведения указывают на то, что амитоз встречается в человеческом организме только в случае патологических процессов.

МИТОЗ

В норме размножение соматических клеток происходит путем непрямого деления - митоза (гр. митос - нить). Несмотря на то, что еще в 1882-м году Флемминг описал процессы происходящие во время митоза на примере животных клеток, данные касательно их молекулярных механизмов стали накапливаться в последние 20-30 лет.

Во время митоза, по времени занимающего всего 5-10 % клеточного цикла, в ходе процессов, которые охватывают практически все структурные элементы клетки, из одной "материнской" клетки образуются две новые "дочерние" клетки. Для этого, в первую очередь, должны произойти конденсация хроматина интерфазного ядра, растворение ядерной оболочки, фрагментация комплекса Гольджи и эндоплазматической сети, а также формирование веретена деления.

Важным условием выполнения указанных процессов является активация белкового комплекса Cdk-1-циклинов В. Этот белковый комплекс был открыт Й.Мацуи и К.Маркертом (1971). Его также называют **фактором ускорения созревания** (maturation promoting factor – MAF).

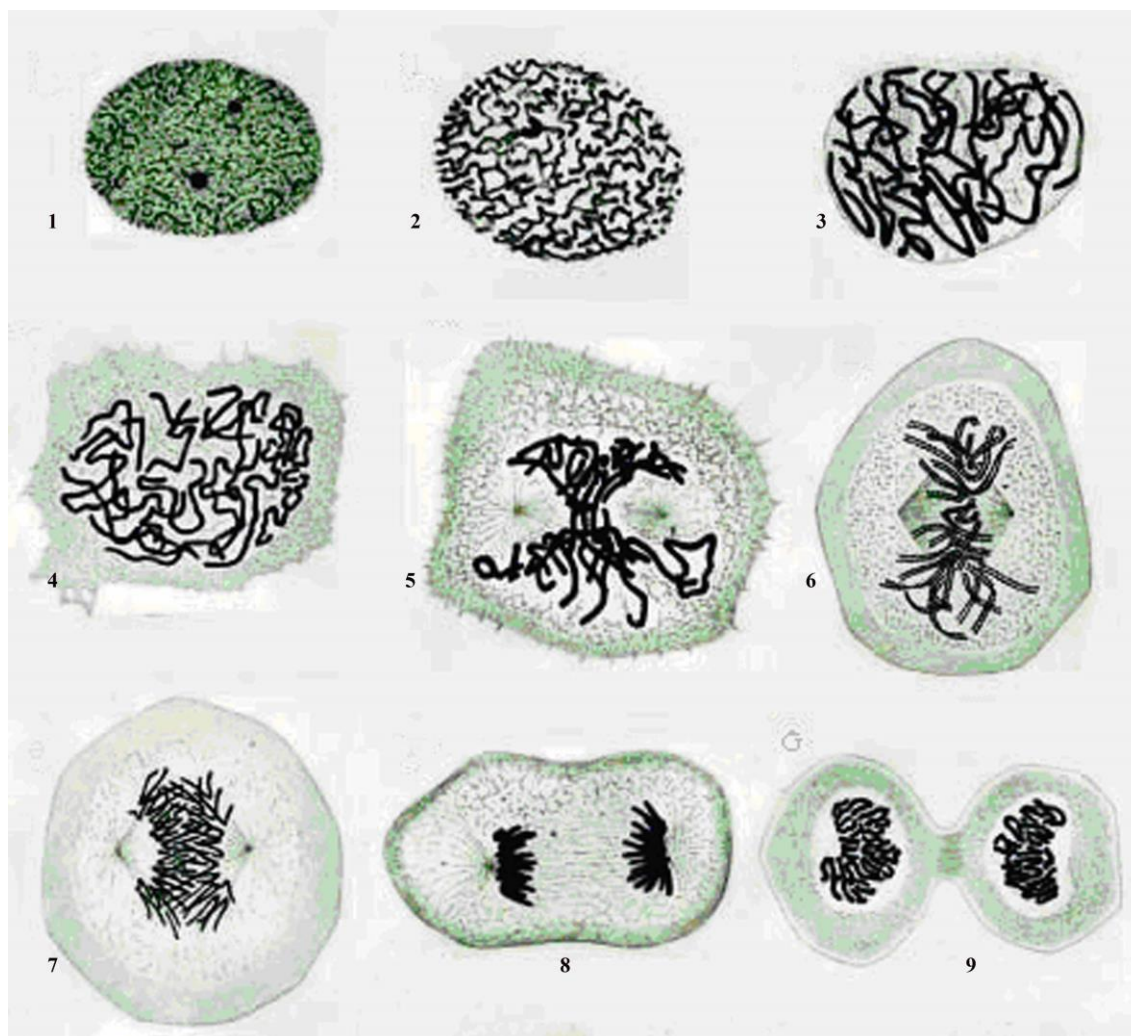


Рис.6.5. Схематический рисунок фаз митоза клеток тритона, созданный Флеммингом (1882).

Различают следующие последовательно протекающие стадии фазы митоза:

- профаза (лат.: pro - до, phasis - фаза);
- метафаза (греч.: meta - после);
- анафаза (греч.: ana - назад);
- телофаза (греч.: telos - конец).

В качестве наилучшей иллюстрации процессов, происходящих в клетке во время митоза, можно рассмотреть рисунок из книги В. Флемминга (1882). (рис.6.5) Несмотря на то, что с момента создания этого рисунка прошло достаточно много времени, изображенная на рисунке последовательность процессов, протекающих в клетке во время митоза, полностью соответствует данным современных иммуногистохимических методов исследований.

ПРОФАЗА

Профаза начинается с появления тончайших нитевидных хромосом, видимых под световым микроскопом и полученных в результате ускорения конденсации (рис. 6.5.-2, 6.6 и 6.7-1). Как было указано выше дупликация молекул ДНК и синтез гистонных и негистонных белков, принимающих участие в процессах конденсации хроматина происходили ранее, в S периоде интерфазы.

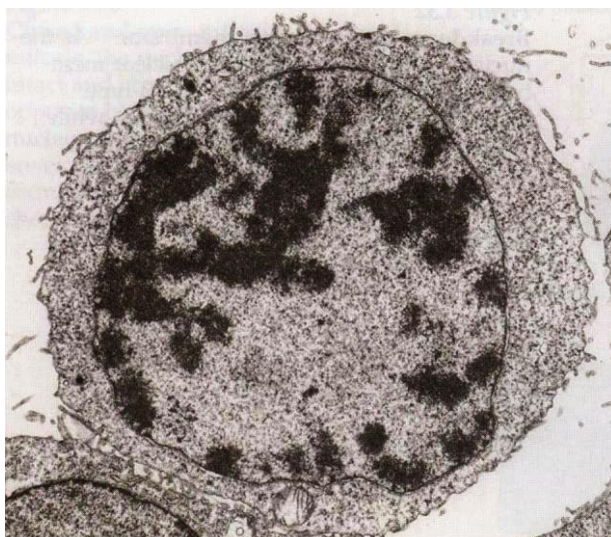


Рис.6.6. Конденсация отдельных хромосом на этапе профазы митоза.

Следует отметить, что каждая хромосома, наблюдаемая в течение профазы, состоит из двух сестринских хроматид (**дочерних хромосом**) с одинаковым составом. Формирование хроматид становится возможным в результате фосфорилирования белков H_1 , H_3 , конденсина и коэзина. В фосфорилировании белков H_1 , конденсина и коэзина участвует Cdk1-циклин В, тогда как в фосфорилировании H_3 - фермент Aurora В киназа. В результате фосфорилирования H_1 и H_3 предотвращается деконденсация эу- и гетерохроматина интерфазного ядра. При участии белка конденсина процесс конденсации эу- и гетерохроматина ускоряется.

В начале профазы тонкие нитевидные хромосомы сплетены друг с другом в форме клубочка (рис.6.5 -1,2,3). Хромосомы в клубочке, хотя и переплетаются друг с другом, однако самостоятельности они при этом не теряют. Далее, вследствие укорочения и утолщения хроматид, клубок начинает распутываться и тогда можно видеть хромосомы в отдельности (рис.6.7-1).

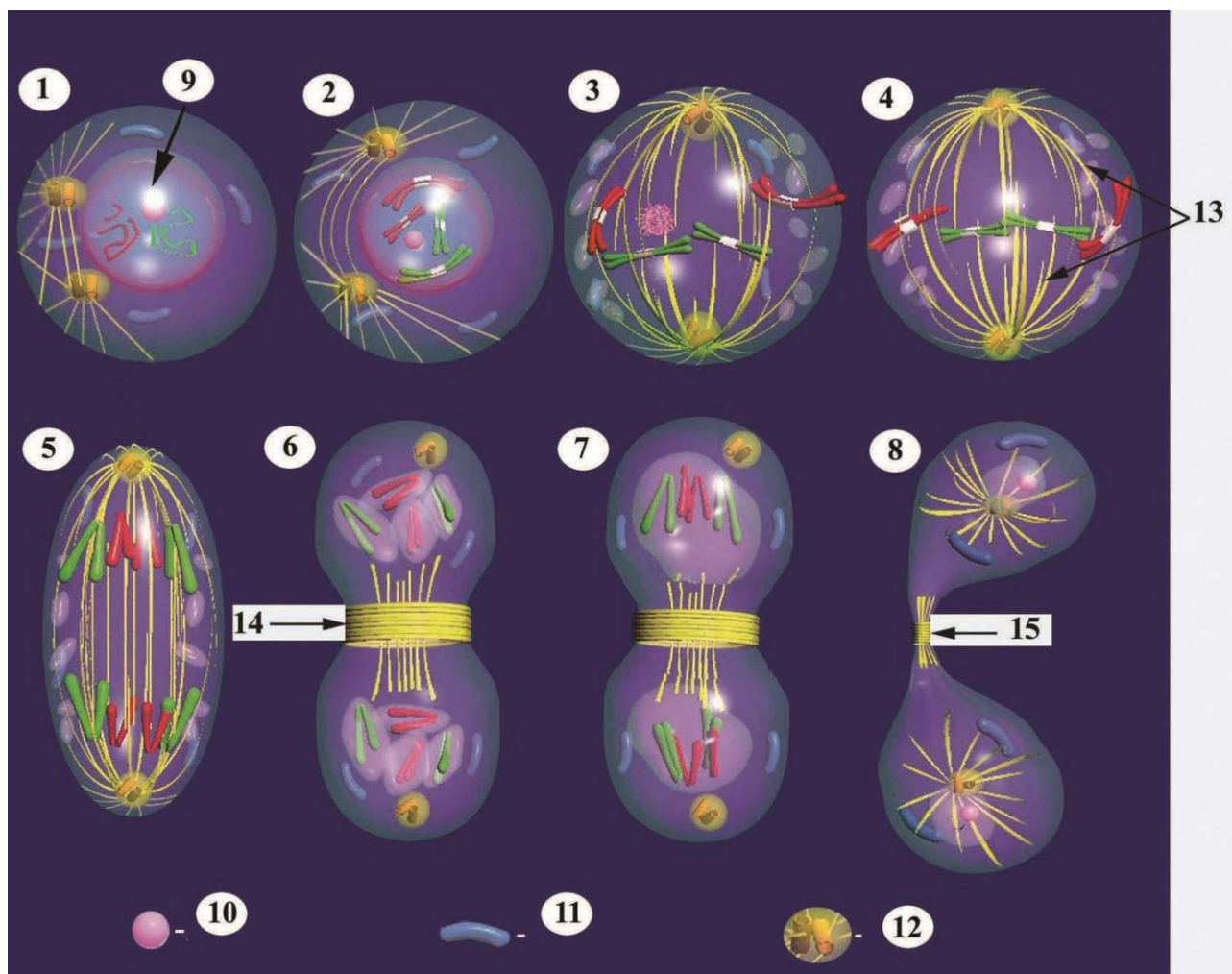


Рис.6.7. Схема изменений в клетке в различных фазах митоза.

1-2 – профаза; 3- прометафаза; 4- метафаза; 5- анафаза; 6- 8 – телофаза; 9- ядро; 10- ядрышко; 11- митохондрия; 12- центросома; 13- веретено деления; 14- борозда деления; 15- промежуточное тело.

Одним из важных моментов, имеющих место в начальной стадии профазы, является то, что ядрышки сначала уменьшаются в объеме, а затем исчезают. Причиной этому является проникновение конденсированных хроматинов ядрышек в состав соответствующих хромосом.

В результате деполимеризации микротрубочек в течение профазы, связанные с ними мембранные органеллы (комплекс Гольджи, эндоплазматическая сеть, эндосомы), превращаются в мелкие пузырьки и смешиваются с пиноцитозными, транспортными, секреторными и др. пузырьками. В профазе большинство клеток принимает сферическую форму и значки (маркеры), рецепторы на их поверхности переходят в цитоплазму.

В фазе G_2 микротрубочки, образующиеся вокруг двух свободных центросом, продолжают свое развитие. Наряду с этим, меняя свое положение в противоположных относительно друг друга направлениях, они приближаются к периферии клетки. Лучевидные микротрубочки, тесно прилегающие друг к другу, располагаясь по всей окружности центросом образуют звездообразную структуру (*астер*).

Так как эта лучистая корона образуется вокруг обеих центросом, то двойная звезда называется *диастер* или *амфиастер*. Далее эти звезды образуют полюса митозного веретена деления (рис.6.7-3).

Последняя стадия профазы также называется **прометафазой**. Характерной особенностью этой стадии является распад ядерной оболочки на отдельные клубочки в течение очень короткого отрезка времени и ее полное исчезновение (рис.6.7-2). Основным

условием для наступления этого процесса является фосфорилирование ламин, которые находятся в тесной связи с ядерной оболочкой.

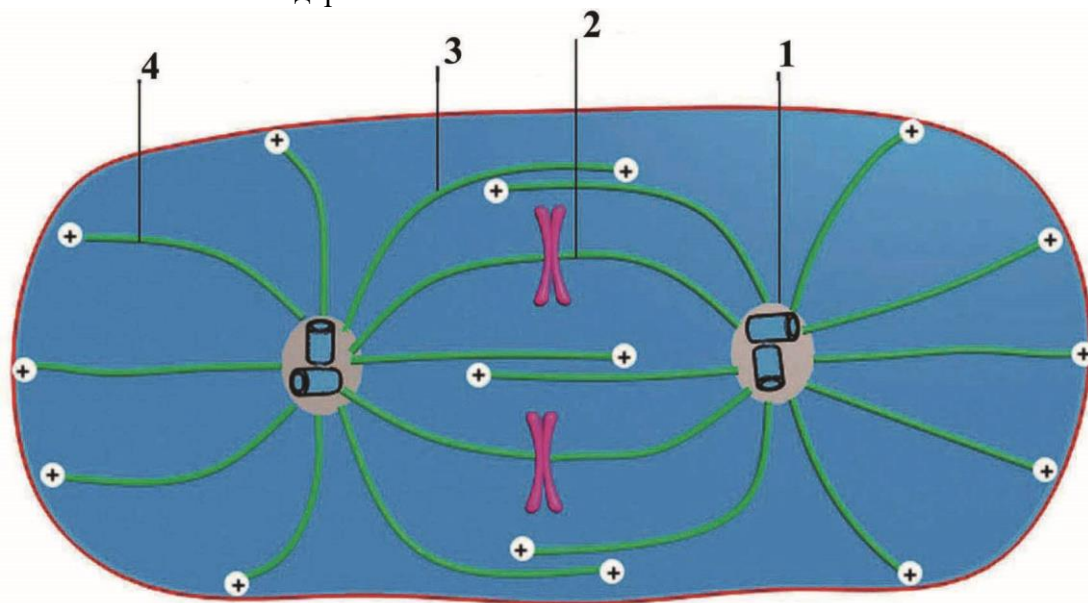


Рис.6.8. Схема микротрубочек веретена деления.

1- центросома; 2- кинетохорные микротрубочки; 3- межполюсные микротрубочки; 4- астральные микротрубочки.

Нарушение целостности оболочки ядра дает возможность создания связи между микротрубочками, начинающимися в центросомах, с кинетохорной частью сестринских хроматид. После этого микротрубочки, расположенные на полюсах веретена деления, делятся на три группы (рис.6.8):

1. астральные микротрубочки;
2. кинетохорные микротрубочки;
3. межполюсные микротрубочки;

Астральные микротрубочки, находясь на соответствующих полюсах центросомы клетки, поддерживают связь с элементами кортикального скелета при помощи положительных концов (рис.6.8 и 6.9).

Кинетохорные микротрубочки вступают в связь с кинетохорной частью хромосом при помощи положительных концов (рис.6.10). Каждый кинетохор связывается с 20-30 микротрубочками. Большинство микротрубочек, входящих в состав веретена деления, приходится на кинетохорные микротрубочки.

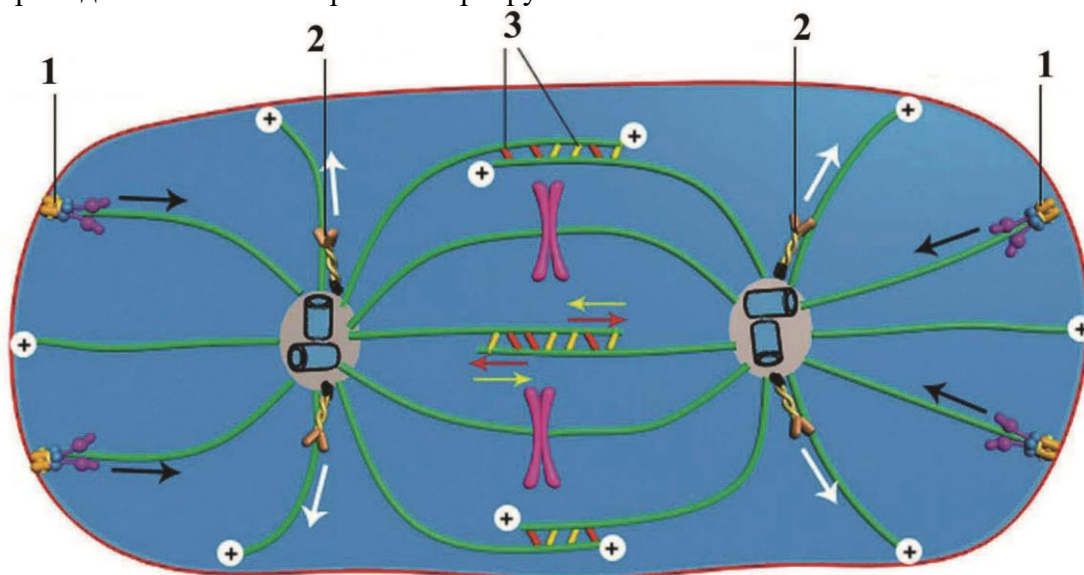


Рис.6.9. Схема взаимоотношений микротрубочек с двигательными белками во время митоза. 1- динеин; 2- кинезин; 3- биполярные кинезины.

Малая часть **межполярных микротрубочек** тянется до полюса, тогда как большая их часть, начинаясь на одном полюсе, переходит экватор и заканчивается в свободном порядке в различных частях цитоплазмы противоположной стороны (рис.6.7-3). Поэтому как в периферических, так и в центральных частях цитоплазмы межполярные трубочки, пришедшие из противоположных полюсов, располагаются параллельно друг к другу на определенном расстоянии (рис.6.8 и 6.9).

Таким образом, тогда как с одной стороны **веретена деления (митоза)** находятся элементы кортикального скелета с положительными концами и микротрубочки, соединяющиеся с кинетохором, в цитоплазме по обе стороны от экватора находятся межполярные микротрубочки со свободными положительными концами (рис.6.9).

Во время прометафазы кинетохорные трубочки поверхности экватора соединяются с кинетохорной частью хромосом, находящихся на различном расстоянии. По этой причине одна из микротрубочек, соединяющаяся с сестринскими кинетохорами, бывает короткой, а другая – длинной (рис.6.7).

В конце прометафазы при участии кинезина и связанных с ним белков происходит укорочение (деполимеризация) указанных микротрубочек, а также удлинение коротких микротрубочек (за счет присоединения молекул тубулина к их положительному концу - полимеризация). В результате этого хромосомы начинают менять места локализации, двигаясь от полюсов веретена деления к его центру. Это является сигналом для начала метафазы.

МЕТАФАЗА

Самым важным процессом метафазы, является обеспечение расположения хромосом, выстроенных в ряд вдоль одной линии в центре веретена деления. Такое расположение называется метафазной или экваториальной пластинкой (рис.6.7-4). Если даже одна из указанных хромосом не успеет занять вовремя свое положение, процесс митоза, регулируемый пропускным пунктом метафазы, приостанавливается. Спустя 20-30 минут после формирования метафазной пластинки начинается анафаза. Факторы, тормозящие развитие метафазы, синтезируются в кинетохоре. Так, в случае если целостность кинетохора, не связанного с микротрубочкой, будет нарушена лазерным лучом (т.е. даже если хромосома не находится на метафазной пластинке), то так же как и в нормальном состоянии спустя 20-23 минуты начнется стадия анафазы.

Стабильность метафазной пластинки в течение метафазы обеспечивается двумя путями.

С одной стороны - микротрубочки с противоположных полюсов, соединенные с сестринским кинетохором, создают силу равновесия, которая не дает хромосомам выйти за границы экваториальной пластинки (рис.6.10).

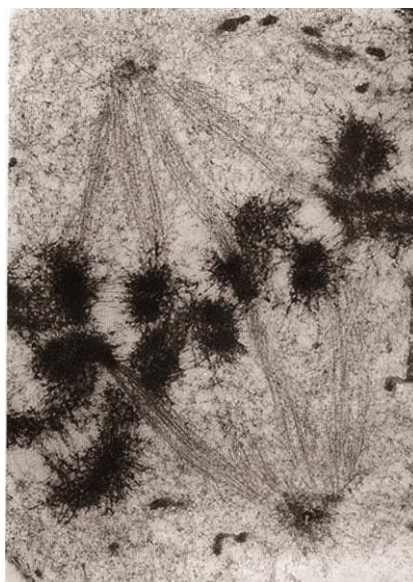


Рис.6.10. Электронно-микроскопический рисунок структур, принимающих участие организации хромосом и веретена в метафазе митоза.

А с другой стороны - межполярное пространство остается стабильным за счет деятельности биполярного кинезина, способного сдвинуть межполярные микротрубочки в противоположные направления. Таким образом, один из биполярных кинезинов направляется в сторону положительного конца определенной микротрубочки, второй - к отрицательному концу той же микротрубочки, что не дает измениться топографическому положению межполярных микротрубочек и полюса веретена деления не отделяются друг от друга.

АНАФАЗА

Отделение сестринских хроматид друг от друга является одним из важнейших этапов митоза. Петли хроматина в составе этих хроматид соединяются друг с другом при помощи коезина и белков, связанных с ним (коезиновый комплекс). Расхождение сестринских хроматид происходит не за счет деятельности веретена деления, а за счет процесса, происходящего внутри хромосомы. Так, даже в случае если все микротрубочки, участвующие в организации веретена деления, на стадии митоза разрезать лазерным лучом, сестринские хроматиды все равно отделяются друг от друга.

Деятельность белкового комплекса коезина, соединяющего сестринские хроматиды друг с другом зависит от протеазных белков **сепаразы** и дезактивирующего его **секурина**.

Комплекс, ускоряющий анафазу (anaphase-promoting complex) активируется под действием Cdk1циклина В и расщепляет белок секурин. В результате фермент сепараза, активируясь, нарушает целостность коезинового комплекса и, таким образом, начинается отделение сестринских хроматид друг от друга. APC также участвует в расщеплении циклинов и называется **циклосомой**. Поэтому этот комплекс отмечается как APC/C.

Отделение хроматид друг от друга начинается в конце метафазы и заканчивается в начале анафазы. После этого сестринские хроматиды, каждая из которых по отдельности называется хромосомами, могут расходиться к полюсам веретена деления (рис.6.11А)

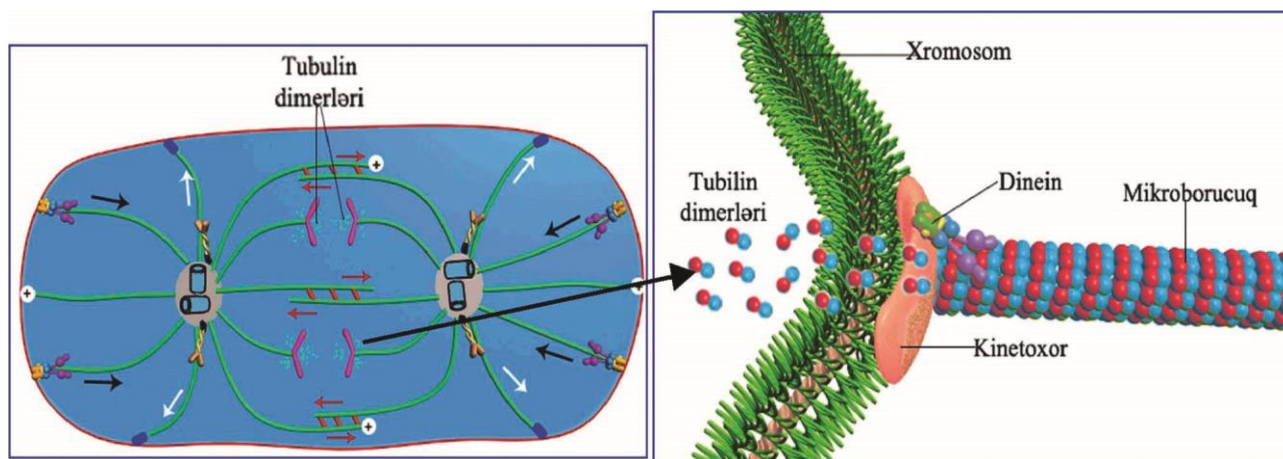


Рис.6.11. Схематический рисунок взаимосвязи моторных белков с микротрубочками во время перемещения хромосом к полюсам в анафазе.

Отделение сестринских хроматид (хромосом) друг от друга происходит за счет их движения в сторону полюсов веретена деления (анафаза А) и отдаления самих полюсов друг от друга (анафаза В). В основе процессов, происходящих во время анафазы лежит дезактивация Cdk1 на короткий промежуток времени в результате расщепления циклина В APC/С. Неслучайно, что расщепление коезиновых белков, соединяющих сестринские хроматиды друг с другом и увеличение активности моторных белков (кинезина и динеина), связанных с микротрубочками, становится возможным только в период деактивации Cdk1.

В результате деятельности моторного цитоплазматического белка динеина, связанного с кинетохором хромосомы, отделяющиеся друг от друга на экваториальной пластинке, начинают двигаться вдоль кинетохорных микротрубочек в направлении центросомы (рис.6.11А). В это время под действием ферментов, относящихся к семейству кинезинов, находящихся в головной части петли кинетохора, происходит деполимеризация микротрубочек (скорость отделения тубулина от положительных концов микротрубочек белка резко возрастает), кинетохорные микротрубочки начинают укорачиваться (рис.6.11В). В результате упомянутых процессов хромосомы достигают полюсов веретена деления (рис.6.7-5).

По мере продвижения хромосом к полюсам, в результате выхода из строя микротрубочек кинетохора, в центральной части клетки межполярные микротрубочки, в основном стоящие параллельно друг к другу, и окружающие их элементы матрикса образуют **центральное веретено** (рис.6.7-6,8).

Во время анафазы В, в результате взаимной деятельности моторных белков с астральными, межполярными микротрубочками, на фоне общего удлинения клетки происходит разъединение полюсов веретена деления (рис. 6.7-5). Этот процесс происходит в основном в результате двух следующих процессов:

1. возрастает активность биполярных кинезиновых белков, связанных с микротрубочками и обеспечивающих движение к «+» концу микротрубочек, стоящих параллельно друг к другу в составе центрального веретена. В связи с тем, что в это время микротрубочки скользят по поверхности друг друга, центросомы, соединенные с их отрицательными концами, отдаляются друг от друга и приближаются к полюсам клетки (рис.6.11А).
2. присоединение динеина, связанного с белками кортикального цитоскелета и кинезина, связанного с центросомой, к отрицательному и положительному концам астральных микротрубочек, соответственно, обеспечивает приближение самого полюса и соединенных с ним хромосом к клеточной мембране.

ТЕЛОФАЗА

Процессы, происходящие в анафазе В, продолжаются и в телофазе; полюса и

хромосомы приближаются к кортикальному скелету, ядерная оболочка восстанавливается и начинается формирование борозды деления, завершающееся делением клетки (цитокенез).

В результате выхода из строя микротрубочек кинетохора сестринские хроматиды располагаются теснее, в форме скоплений вблизи веретена деления. По мере приближения хромосом к полюсам, сформированные в период разрыва ядерной оболочки пузырьки соединяются друг с другом и окружают каждый из них с наружной стороны (рис.6.7-6). Это происходит за счет создания молекулярных связей между дефосфорилированной ламиной В, сохранившей связь с ядерной оболочкой и интегрированными белками ядерной оболочки с хромосомами. В период скопления всех хромосом у ядерного полюса, окружающие их элементы ядерной оболочки, соединяются друг с другом и восстанавливают оболочку ядра (рис.6.7-7).

Во время восстановления ядерной оболочки происходит включение комплекса ядерной поры в его состав. После восстановления функциональной способности комплекса ядерной поры к проводимости, в ядро из цитоплазмы проникают необходимые А-лаminy. Все это является показателем формирования независимо действующего ядра. В случае если ламина А по тем или иным причинам не сможет проникнуть в ядро, то деконденсации хромосом не происходит.

В течение периода телофазы, с помощью моторных белков митохондрии и другие органеллы, находящиеся в клетке распределяются равномерно по периферическим частям зарождающихся дочерних клеток.

Начиная со второй половины анафазы, состав элементов кортикального скелета, располагающихся вдоль экватора в направлении перпендикулярном к центральной борозде, подвергается серьезным изменениям. Так, в результате скопления актина F, двухполюсного миозина II и связанных с ними белков начинает формироваться **сократительное кольцо** (рис.3.16).

Во время скопления элементов сократительного кольца, по мере стягивания плазмолеммы в центре, образуется **борозда деления** (рис.6.7-6). По мере уменьшения количества биополимеров, участвующих в построении сократительного кольца, борозда деления углубляется и части клетки соединяются друг с другом тонкими мостиками. Межполярные микротрубочки, расположенные в этой области антипараллельно, прижимаясь друг к другу образуют **промежуточное тельце** (рис.6.7-8). После того как промежуточное тельце расщепляется под воздействием специальных киназ, края плазмолемм, расположенных вокруг него, смыкаются и клетки полностью отделяются друг от друга. Остатки промежуточного тельца отрываются от поверхности дочерней клетки и попадают в межклеточное пространство.

Микротрубочки, участвующие в составе веретена деления новообразованных дочерних клеток (рис. 6.7 -8) полностью выходят из строя. Вслед за этим из одной centrosомы, расположенной вблизи ядра, формируются микротрубочки в направлении периферии клеток и достигают элементов кортикального цитоскелета. По мере формирования микротрубочек, характерных для периода интерфазы происходит восстановление органелл, связанных с ними (комплекс Гольджи, эндоплазматическая сеть, эндосомы).

МЕЙОЗ

Важнейшей особенностью полового размножения является развитие первичных половых клеток в процессе гаметогенеза, созревание их путем митотического деления до зрелых гамет (сперматозоидов и яйцеклеток), готовых к оплодотворению.

Этот процесс происходит в яичниках и маточных трубах у женщин (овогенез) и извитых семенных канальцах семенника у мужчин (сперматогенез).

Первичные половые клетки (овогонии и сперматогонии) так же, как и соматические клетки организма, содержат **диплоидный** набор хромосом (2n, т.е. 46 хромосом).

Если принять во внимание, что зигота, образовавшаяся путем слияния двух гамет во

время оплодотворения, содержит 46 хромосом, становится ясным, что обязательным условием полового размножения является уменьшение количества хромосом в зрелых половых клетках (гаметах) до 23 (**n – гаплоидное число**).

Поскольку процесс уменьшения числа хромосом с 46-ти до 23-х происходит в ходе мейоза, последний (точнее его первую стадию) называют также **редукционным делением**.

Наряду с уменьшением количества хромосом во время мейоза (в первую его стадию) происходит обмен генов между конъюгированными гомологичными хромосомами (кроссинговер) в анафазе I имеет место расхождение не хроматид, а целых хромосом в сторону полюсов веретена деления. В целом все это обеспечивает созревание гамет с вариантом генома, отличающегося от генома первичных половых клеток.

В конечном счете именно эти процессы лежат в основе изменчивости генофонда популяции эукариотических организмов. Важно также подчеркнуть роль описанных изменений в приспособлении (адаптации) организма к меняющимся факторам окружающей среды.

Мейоз состоит из двух последовательных этапов, которые соответственно называются мейоз I и мейоз II.

В процессе гаметогенеза первичные половые клетки проходят стадию роста и дифференцируются в овоциты I порядка при овогенезе и сперматоциты I порядка при сперматогенезе. Общее количество хромосом в названных клетках соответствует 46-ти, а набор ДНК – диплоидному ($2n$). Однако перед вступлением в стадию созревания (мейоза) в S-периоде интерфазы этих клеток в результате репликации ДНК происходит синтез 92 молекул ДНК, т.е. количество ДНК удваивается.

С этого момента в результате процесса конденсации начинается формирование сестринских хроматид.

Этот период называется **премитотической S фазой**. Вслед за этой фазой клетка входит в стадию мейоза I (рис.6.12-3,4).

МЕЙОЗ I (редукционное деление)

Как и митоз, мейоз I состоит из профазы I, метафазы I, анафазы I и телофазы I.

Профаза I.

По сложности происходящих процессов в сравнении с другими фазами, профаза I сильно выделяется. Поэтому, в профазе I выделяют пять стадий: лептотена, зиготена, пахитена, диплотена и диакинез.

Лептотена характеризуется соединением сестринских хроматид друг с другом, с образованием тонких нитевидных хромосом. Во время конденсации сестринских хроматид образуются витки, которые присоединяются к аксиальным элементам белковой природы, располагающихся параллельно к их внешней стороне (рис.6.12-4). Сформированные хромосомы при помощи одного своего конца остаются на связи с ядерной оболочкой.

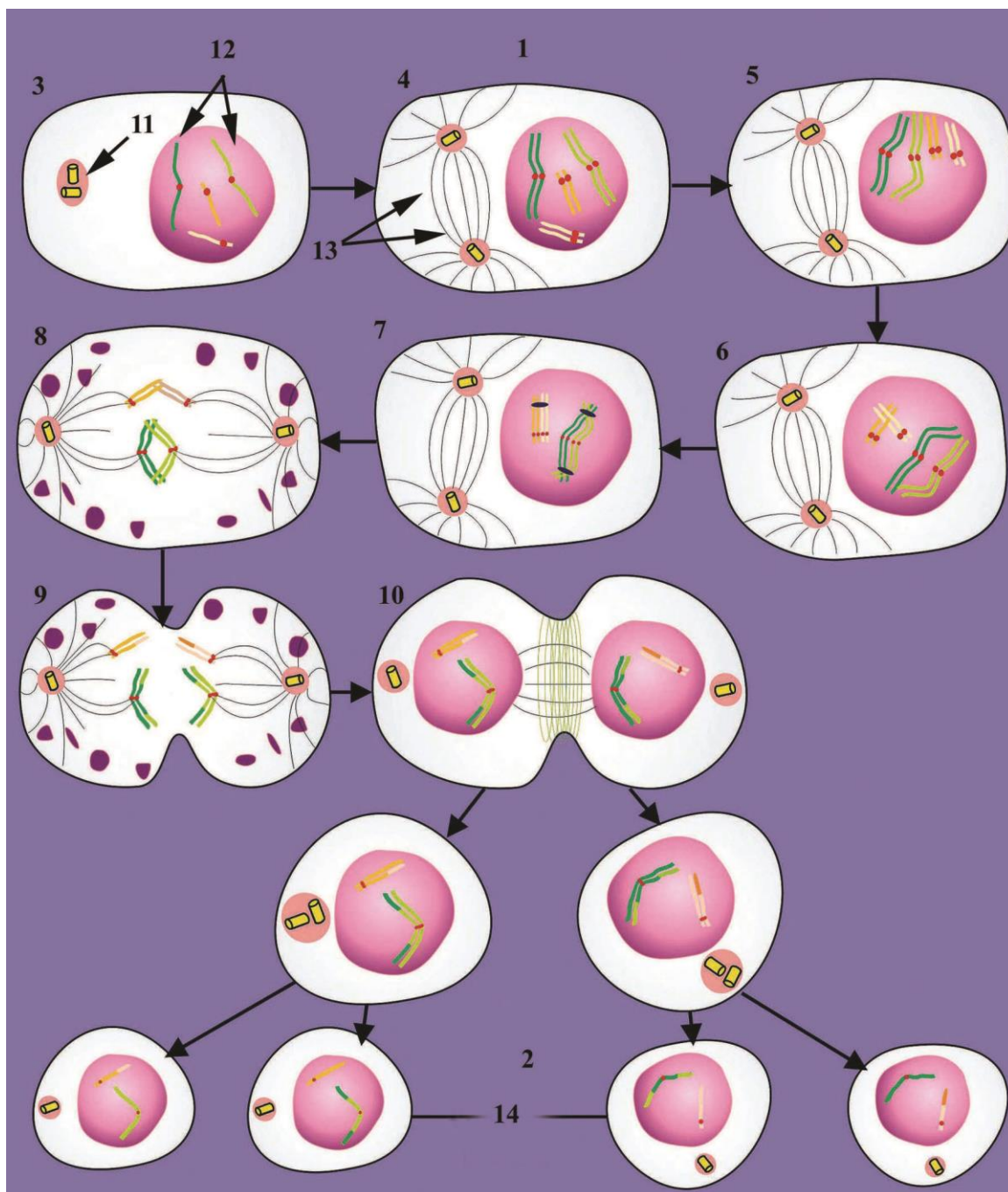


Рис. 6.12. Схема разных стадий мейоза при сперматогенезе.

1- I мейоз; 2- II мейоз; 3-4 – премейотическая S фаза; 5- букет лептотены-зиготены; 6- зиготена; 7- пахитена; 8- метафаза; 9- анафаза; 10- телофаза; 11- центросома; 12- хромосомы; 13- веретено деления; 14- дочерние клетки.

В стадии **зиготены** гомологичные хромосомы располагаются парами (конъюгируют). Процесс формирования означенных пар начинается еще в конце лептотены.

Находящиеся на одном конце этих пар теломеры собираются в одном месте и сливаются с ядерной оболочкой. Свободные же радиально расходящиеся концы располагаются внутри ядра в разнообразных направлениях. Полученная картина напоминает букет цветов. Эту структуру также называют *букетом лептотены/зиготены*. Основную роль в формировании конъюгирующих пар хромосом, входящих в этот букет, играют связи образованные при помощи **синаптонемного комплекса** (рис.6.12-5).

В синаптонемный комплекс входят парные параллельно расположенные краевые элементы, локализованные в местах соприкосновения гомологичных хромосом, а также

проходящая в промежутке между этими краевыми лентами срединная электронно-плотная линия с пересекающими его тонкими поперечными волокнами (филаментами) (рис.6.13 С и G).

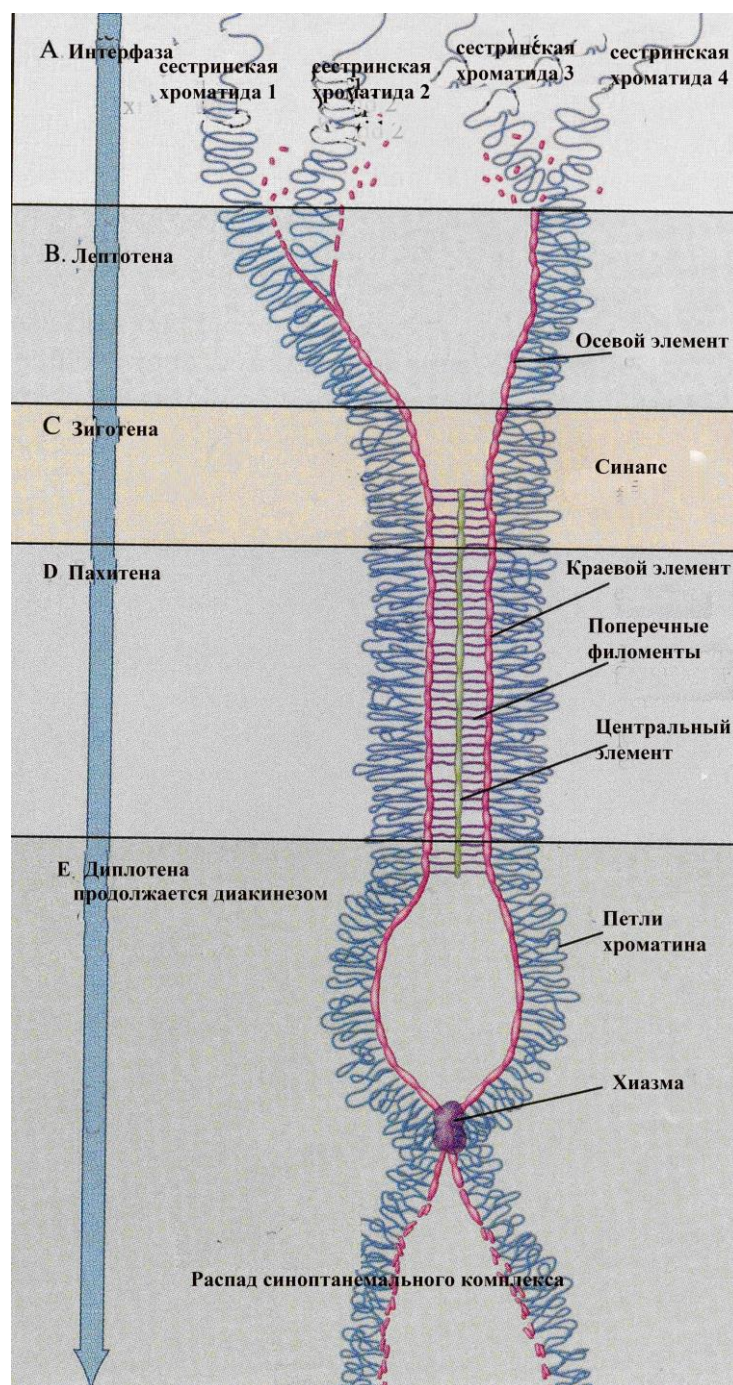


Рис.6.13. Схематический рисунок особенностей строения синаптонемальных комплексов на различных этапах профазы I/

В состав **краевых элементов** входят аксиальные элементы, объединяющие друг с другом сестринские хроматиды, а также белки, связанные с ними и с наружными концами поперечных волокон.

В состав поперечных филаментов входит специальный белок SEP1(synaptonemal complex protein 1).

Этот белок представляет собой димер с изогнутой срединной частью и глобулярными образованиями на концах. Наружные концы глобулярных образований образуют связь с аксиальными элементами, соединяющими сестринские хроматиды друг с другом, а внутренние концы соединяются друг с другом образуя **центральный элемент** (срединная

линия). Описанный комплекс между гомологичными хромосомами похож на замок (в форме “молнии”). Во время лептотены и зиготены вдоль синаптонемного комплекса образуются **узлы первичной рекомбинации**. Эти узлы играют важную роль в иницировании процессов рекомбинации между гомологичными хромосомами. Хромосомы, относящиеся к синаптонемному комплексу - называются *мейотными хромосомами*.

Дальнейшее формирование синаптонемного комплекса гомологичных хромосом продолжается на всем протяжении **пахитены** (рис.6.13 С). На этом фоне в результате ускорения процессов конденсации хромосомы еще более утолщаются и укорачиваются. При этом хотя и периферические части сестринских хроматид слегка отделены друг от друга, но в области центромера тесно сближены. Таким образом, в составе **бивалентных хромосом** выделяются 4 хроматиды – **тетрады**.

Еще одной особенностью пахитены является то, что в некоторых областях синаптонемного комплекса образуются **узлы конечной рекомбинации**, диаметром до 90 нм, образованные скоплениями белков (рис.6.12-7). В этих узлах и происходит процесс кроссинговера, который играет важнейшую роль в появлении наследственных изменений. Обмен информации между гомологичными хромосомами в период мейоза - **гомологическая рекомбинация**, осуществляется двумя способами: генной конверсией и кроссинговером (рис.6.14).

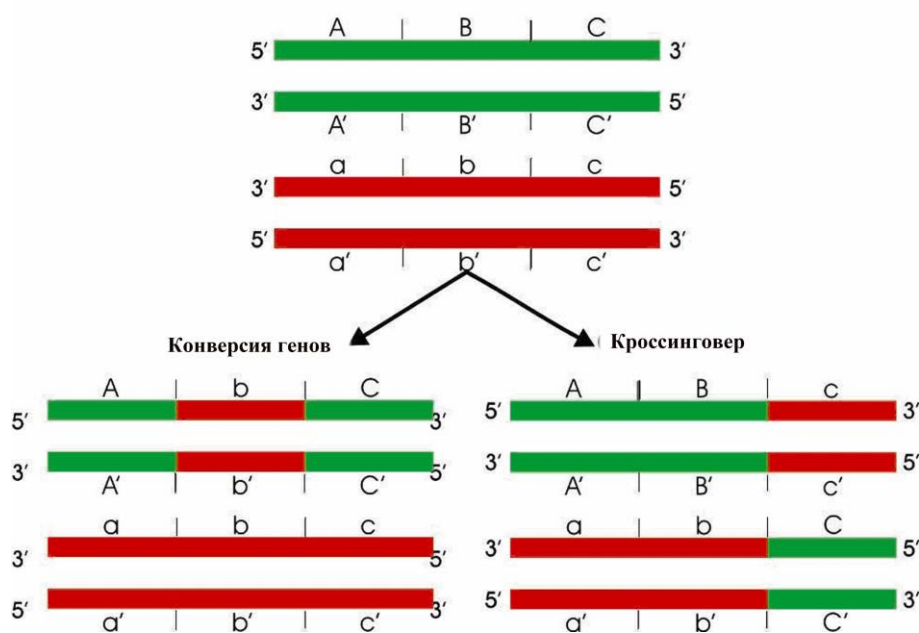


Рис.6.14. Схематический рисунок методов гомологической рекомбинации происходящей во время пахитены.

Во время **генной конверсии** взаимный обмен генетической информацией между гомологичными хромосомами не происходит. Так, в случае когда ген, входящий в состав одной молекулы ДНК заменяется соответствующей частью другой гомологичной молекулы ДНК, вторая молекула ДНК сохраняет свой состав неизменным. В связи с этим, если происходит удвоение одного из генов (аллелей), второй ген (аллель), его также называют маркером, исчезает.

В процессе же кроссинговера соответствующие части двух гомологичных молекул ДНК, несущие генетическую информацию, меняются друг с другом местами. То есть, эти части гомологичных молекул ДНК отрываются и прикрепляются к другой молекуле ДНК (рис. 6.14 внизу слева).

В **диплотене** наряду с продолжающимся процессом укорачивания хромосом,

начинается отделение гомологичных хромосом друг от друга (рис. 6.13D), что происходит вследствие расщепления элементов, участвующих в создании синаптонемального комплекса. Связь между ними остается только в области хиазм (перекрестков), сформировавшихся на месте узлов поздней рекомбинации. В зависимости от длины хромосом, число хиазм варьирует от одного до пяти. Они становятся ясно видны при импрегнации солями серебра (рис.6.15). Именно в результате наличия хиазм бивалентные тетрады выстраиваются в ряд в области экватора в период метафазы мейоза I.

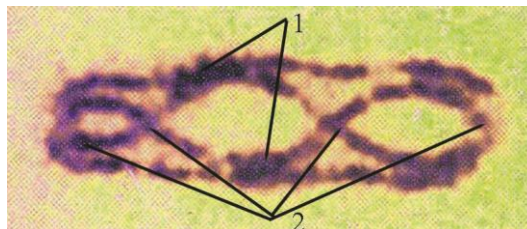


Рис.6.15. Микроскопический рисунок бивалентных хромосом на стадии диплосомы. Сестринские хроматиды соединяются при помощи центромеры (1). На перекрестных (2) участках гомологичных хромосом происходит конверсия генов.

Взаимная связь половых хромосом (X, Y) во время мейоза по сравнению со связями между аутосомными хромосомами, имеет отличительные черты. Синапсы между половыми хромосомами расположены не на всем их протяжении, а только в частях, содержащих короткие последовательности гомологичных нуклеотидов. Эти части называются *псевдоаутосомальными частями*. Во время налаживания связи между псевдоаутосомальными частями X и Y хромосом становится возможной и генетическая рекомбинация между ними.

В связи с тем, что в начале диплотены происходит деконденсация хромосом (в особенности в овоцитах I порядка), вокруг петель сестринских хроматид формируются вторичные петли, состоящие из нуклеосом и цепочек ДНК, соединяющих их. В результате экспрессии генов во вторичных петлях, в овоцитах I порядка происходит синтез питательных веществ, а также биологически активных веществ, которые регулируют процессы, происходящие на ранних этапах развития зародыша. В это время, в результате скопления молекул м-РНК, и соответствующих им белков, вокруг хроматид начинают вырисовываться высокие тонкие петли хромосом. Так как эти хромосомы по форме напоминают ламповые щетки, их называют *хромосомами типа ламповых щеток*.

В зависимости от вида организма и половой принадлежности, продолжительность диплотены может сильно варьироваться. Так если в сперматоцитах I порядка пахитена длится самое долгое 16 дней, то у женщин диплотена первичных овоцитов может продолжаться до 45-50 лет. Так, первичные овоциты, проникнувшие в диплотену между 3-м и 4-м месяцами беременности, выходят из этой стадии только в случае наступления овуляции.

Диакинез - конечная стадия профазы I. В этой стадии, окончательно сконденсированные хромосомы укорачиваются и теряют связь с ядерной оболочкой. Хиазмы, соединяющие гомологичные хромосомы, продолжают оставаться только в их периферических частях. Наряду с исчезновением ядрышек, ядерная оболочка теряет свою целостность, и также как и при митозе превращается в отдельные клубочки. Продолжается движение центросом к полюсам. Гомологичные хромосомы, оказавшиеся в цитоплазме, связываются с веретеном деления и начинают двигаться в направлении экваториальной пластинки. С этого времени начинается метафаза I мейоза I.

МЕТАФАЗА I

В процессе метафазы I мейоза происходит движение к центру клетки не отдельных хроматид, а целых хромосом и это движение обеспечивается кинетохорами сестринских

хроматид. Кинетохоры, сохраняющие свою прочность при митозе, в данной стадии мейоза соединяются друг с другом и образуют одно целое. Для этого сестринские кинетохоры достигают друг друга, кружась вокруг соответствующей хроматиды под углом 90° . Это является причиной того, что во время метафазы I кинетохоры бивалентных хромосом соединяются с подходящими к ним микротрубочками, идущими только с одного конца веретена деления (рис.6.12-8). В результате взаимодействия микротрубочек с двигательными белками (как и при митозе), бивалентные хромосомы выстраиваются в один ряд на экваториальной плоскости. Следует отметить, что еще одним из факторов, способствующих расположению хромосом на экваторе, являются хиазмы, соединяющие гомологичные хромосомы друг с другом.

АНАФАЗА I

В этой фазе происходит полное разрушение хиазм между бивалентными хромосомами, которые теперь могут двигаться в направлении к полюсам. Сестринские хроматиды остаются соединенными друг с другом при помощи центромер как в этой фазе, так и вплоть до анафазы II мейоза (рис.6.12 -9). Как результат вышеописанного в конце анафазы I на полюсах клетки располагается гаплоидное число хромосом.

Таким образом, из общего (диплоидного) числа имеющихся 46-ти хроматид (соответственно 46 молекул ДНК) обоих полюсов клетки достигают 23 хромосомы (гаплоидное число)

ТЕЛОФАЗА I

В течение этой фазы ядерная оболочка восстанавливает свою целостность (рис.6.12-10) и также как и при митозе происходит деление цитоплазмы, в результате чего образуются две новые клетки с гаплоидным набором хромосом.

Клетки, образованные после мейоза I, переходят в период интерфазы II. При этом в этот период синтез молекул ДНК не происходит. После короткой интерфазы II, клетки вступают в стадию мейоза II.

МЕЙОЗ II (эквационное деление)

Фазы мейоза II и процессы, происходящие в них, можно сказать такие же, как и в митозе. Основное различие заключается в том, что соответствующие гены в составе отделяющихся друг от друга хроматид во время анафазы II имеют различные вариации, что является результатом гомологичной рекомбинации (см. выше) (рис.6.12).

В результате делений мейоза I и II образуются 4 половые клетки (гаметы), содержащие гаплоидное число хромосом. У мужчин каждый из 4 новообразованных сперматозоидов обладает способностью к оплодотворению, тогда как у женщин в результате неравномерного деления первичных половых клеток только одна из 4 гамет новообразованных клеток может участвовать в оплодотворении.

Важную роль в процессах, происходящих во время митоза и мейоза, начиная с момента формирования веретена деления и вплоть до завершения цитогенеза, играют белки "пассажиры" (Auroga-A, -B, -C и сурвивин). Информация о белке Auroga-B была дана на странице 206-й. Белок Auroga-A находится на полюсах веретена деления (в области centrosom) и активно участвует в формировании микротрубочек веретена деления, начиная от профазы и вплоть до телофазы. В случае, если посредством соответствующей РНК синтез белка Auroga-A прерывается, то формирование микротрубочек и centrosom не доходит до конца. Увеличения же числа этих белков является причиной увеличения числа centrosom и анеуплоидии (см. выше).

В периодах от профазы до метафазы-анафазы белок Auroga-B находится в центромерах, в анафазе – в центре веретена деления и при участии белков кортикального цитоскелета формирует углубляющуюся борозду деления и наконец в телофазе в процессе цитокенеза между дочерними клетками остаются остаточные тельца. Приостановка синтеза

этого белка ведет к нарушению конденсации хроматид (хромосом) и отделению их друг от друга.

Топографическое положение Aurora-C полностью соответствует положению Aurora-B. Белок Aurora-C соединяясь с Aurora-B не напрямую, а с помощью белка сурвивина, принимает участие в делении клетки (цитокинезе). При дезактивации белка Aurora-C образуются **многоядерные клетки**, так как не происходит процесс цитокинеза.

Увеличение количества белков "пассажира" в хромосомах при развитии злокачественных опухолей было доказано на основании экспериментальных и клинических материалов.

ПОЛИПЛОИДИЯ И ХРОМОСОМНЫЕ НАРУШЕНИЯ

В некоторых соматических клетках (например в гепатоцитах, эпителиоцитах мочевого пузыря, пигментоцитах сетчатки глаза, в процессе дифференцировки мегакариоцитов и т.д.) процесс митоза не завершается, точнее не происходит разделения материнской клетки на две дочерние (цитокинез). В результате, несмотря на увеличение генетического материала клетки в два раза, количество клеток остается неизменным. Так как упомянутые процессы происходят в каждой из вышеназванных клеток в отдельности, эта разновидность митоза также называется **эндоми́тоз** (внутренний или "скрытый").

Эндоми́тоз осуществляется двумя способами:

1. имеет место полное разделение клеточного ядра на две части (кариокинез), однако цитокинез не происходит;
2. в случае даже если число хромосом возрастает вдвое, разделения ядра надвое (кариокинез), также как и цитокинез не происходит.

В первом случае образуется двухъядерная клетка, а во втором случае - одноядерная, содержащая в два раза больше хромосом (*тетраплоид*). Если описанные процессы повторяются последовательно, то число ядер или же число хромосом в составе одного ядра продолжает увеличиваться вдвое. В результате образуются **полиплоидные клетки** (ядра). Как правило, объем полиплоидных клеток по сравнению с диплоидными клетками бывает больше. В случае же резкого повышения полиплоидности ядер формируются **гигантские клетки**, что является результатом соответствующего роста цитоплазмы. В качестве примера можно привести *мегакариоциты*, являющиеся предшественниками пластинок крови (тромбоцитов) в красном костном мозге.

В большинстве учебников формирование полиплоидных ядер связывают с отсутствием веретена деления во время эндоми́тоза и нарушением целостности ядерной оболочки. Однако, исследования проведенные с помощью современных методов показали, что в составе мегакариоцитов в процессе эндоми́тоза, содержится больше 32-х центросом (что соответствует количеству центриолей), а также имеет место разрушение ядерной оболочки. К тому же, в результате формирования звезды из микротрубочек вокруг центросомы, структуры в форме расходящихся лучей (звездообразных), образуется *многополярное веретено деления*. При этом конденсированные, но не разделенные до конца хроматиды деконденсируются, а ядерная оболочка вновь восстанавливается. Так происходит образование мегакариоцитов с полиплоидным ядром.

Полиплоидность, являясь терминальной стадией дифференцировки, приводит к появлению специализированных клеток, выполняющих специфически важные функции в организме.

Формирование полиплоидных клеток также наблюдается во время эмбрионального развития. Чаще всего среди полиплоидных клеток эмбриона человека встречается **триплоидность**. В этом случае сформированная зигота и ядра клеток, которым она дает начало содержат 69 хромосом. Для того, чтобы это произошло необходимо, чтобы во время оплодотворения в яйцеклетку проникли два сперматозоида, или же в оплодотворении участвует сперматозоид с диплоидным набором хромосом, образованный в результате

нарушения процесса отделения хроматид друг от друга в ходе мейоза II. Следует отметить, что практически ни один из триплоидных эмбрионов не развивается до конца.

Наряду с полиплоидией, во время митоза под влиянием различных причин может происходить неравномерное разделение хроматид между дочерними клетками, что называется **анеуплоидией**. В результате подобных нарушений митоза образуются генетически изменчивые клетки, что в основном приводит к развитию злокачественных опухолей.

Среди хромосомных нарушений (анеуплоидий) у человеческого эмбриона чаще всего встречается увеличение или уменьшение числа одной или нескольких хромосом. В этом случае увеличение числа гаплоидных хромосом считается не в разгах, а поштучно. В результате нарушается равновесие числа гомологичных хромосом. Такие хромосомные нарушения называются **гетероплоидией**. Гетероплодия, сопровождающаяся увеличением числа хромосом ($2n+1$; $2n+2$... и т.д.) называется **полисомией**, напротив уменьшение ($2n-1$; $2n-2$... и т.д.) - **моносомией**.

Большинство случаев увеличения/уменьшения числа соматических хромосом, произошедших в процессе мейоза, приводят к самопроизвольному аборту на 4-й и 6-й неделях беременности. Только увеличение числа 21-й хромосомы (трисомия) в большинстве случаев приводит к благоприятному исходу беременности, хотя и является причиной развития **синдрома Дауна**.

Наряду с синдромом Дауна, некоторые изменения числа половых хромосом также могут закончиться нормальными родами. К таковым относятся **полисомия хромосомы X (XXX)**, **синдром Клайнфельтера (XXY)** и **синдром Шершевского-Тернера (XO)**. При выяснении причин протекания нормальных родов при наличии указанных хромосомных нарушений, было выяснено, что меньше всего генов в аутосомных хромосомах содержится в 21-й, 18-й и 13-й хромосомах. К тому же, количество жизнеспособных детей, родившихся с трисомией по 21-ой хромосоме (синдром Дауна), намного больше числа таковых с трисомией по 13-й и по 18-й хромосомам (**синдром Патау** и **синдром Эдварда**, соответственно). Таким образом, при формировании трисомии в хромосомах с меньшим числом генов (напр. по 21-ой паре), стабильность общего генома грубо не нарушается и процент рождения детей, способных жить, увеличивается.

Жизнеспособность жизни плода при трисомии хромосомы X, а также при синдроме Клайнфельтера (XXY) объясняется тем, что еще в начале эмбрионального развития происходит суперконденсация двух X хромосом в первом случае и одной X хромосомы во втором, и они теряют свою активность.

Моносомия хромосомы X (синдром Шершевского-Тернера) приводит к гибели 99% эмбрионов из-за суперконденсации всего одной имеющейся X хромосомы. В 1% случаев X хромосома не подвергается конденсации, сохраняет свою активность и, таким образом, рождаются здоровые дети.

Причина, по которой беременность с синдромом XXY доходит до конца, как и в случае с 21-й хромосомой, кроется в малом количестве генов (155) в составе Y хромосомы. Подробная информация об этом приводится в учебниках по медицинской генетике.

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ, СТАРЕНИЕ И ГИБЕЛЬ КЛЕТОК

Дифференциация клеток. В процессе цитогенеза (греч.: genesis - развитие, источник), являющегося неотъемлемой частью биологического развития, начиная с онтогенеза, клетки имеющие одинаковый геном начинают специализироваться для выполнения определенных функций. В процессе специализации клетки формируются характерные для данного типа клеток особенности внешнего вида, топографического стояния, взаимных связей с другими группами клеток и т.д. Весь этот процесс называют **дифференциацией** (греч.: differentia - разнообразие).

Как было отмечено в первой главе учебника, дифференцированные клетки происходят

из клеток – предшественников, которые в свою очередь образуются из олиго- и мультипотентных клеток, начало которым дает стволовая клетка. Причем, при осуществлении этих процессов уже с ранних этапов эмбриогенеза в периоде развития клеток наряду с их пролиферацией (увеличением числа) определяется также и их дальнейшая судьба. Точнее, клетки направляются только на одно из различных направлений развития. Этот процесс называется **детерминацией**. Конечным этапом детерминации является появление дифференцированной клетки, способной к выполнению строго определенных функций. Именно прошедшие дифференцировку клетки способны синтезировать белки, участвующие в создании специализированных структур и биологически активных веществ, выполняющих строго определенные функции. Это показывает, что при формировании определенного типа клеток происходит экспрессия различных групп генов в клетках с одинаковым геномом.

По подсчетам, в каждом типе клеток, в среднем, подвергаются экспрессии 10-15 тысяч генов. Около 90% их экспрессированных генов встречаются во всех типах клеток.

Характерные для живых организмов общебиологические процессы (синтез нуклеиновых кислот и белков; прием, транспортировка и утилизация продуктов питания; формирование клеточного ядра, цитоскелета и органелл) происходят при участии этих генов. Группы этих генов, которые экспрессируются во всех типах клеток называются **"домашними"** генами (от англ.: house-keeping).

Отличительные особенности различных типов клеток (например мышечных и нервных клеток, эритроцитов и пр.) возникают в результате количественно меньшей по сравнению с домашними генами экспрессии генов (в среднем 10%). Гены, которые отвечают за проявление отличительных признаков дифференцированных клеток, называют **специализированными генами** (англ. speciality). Деление генов на домашние и специализированные носит условный характер. Так, белок, который синтезируется при помощи гена, включенного в некоторых клетках в группу домашних, одновременно участвует в выполнении отличительных функций другой группы клеток.

По мере повышения степени дифференцированности клеток, их способность к делению падает. Раньше считалось, что дифференцированные клетки, такие как клетки нервной системы, кардиомиоциты, эпителиальные клетки, выполняющие эндокринную функцию, утратили свою способность к делению. Согласно современным данным, все эти клетки сохраняют способность к делению, однако период интерфазы G_0 у них может длиться на протяжении многих лет. Таким образом, только клетки, подвергшиеся терминальной дифференциации (потерявшие ядро, такие как эритроциты, кровяные пластинки, кератиноциты рогового слоя эпидермиса) и стареющие клетки полностью утрачивают способность к делению.

Старение клетки. При описании фазы G_1 клеточного цикла было отмечено, что пока еще дееспособные клетки, находящиеся в периоде между периодом зрелости и гибелью, называются **стареющими клетками**. Существуют различные теории и гипотезы касательно причин старения клеток. Однако, в последнее время указывают на существующую тесную связь между старением клеток и активностью фермента теломеразы.

Так, в результате действия фермента теломеразы число нуклеотидных пар в составе теломеров половых клеток, готовых к оплодотворению достигает 15 тысяч. В период последующего развития и дифференциации клеток, происходит постепенное уменьшение активности фермента теломеразы, что является причиной постепенного уменьшения длины теломеров. В среднем, во время каждого деления в теломерах теряется 35 нуклеотидных пар. У зрелых лиц количество оставшихся нуклеотидных пар в составе теломеров соматических клеток равно 4 тысячам.

Связь между числом делений клеток и старением становится ясно видна вовремя их размножения в питательной среде. Так в норме клетки, помещенные в питательную среду, могут делиться только определенное количество раз. Между тем как число делений клеток, взятых у лиц среднего возраста, в питательной среде меньше, чем число делений клеток

идентичного типа, взятых у плода. В честь ученого, впервые открывшего эту особенность, ее называют **лимитом Хейфлика** (L.Hayflick, 1965).

У людей среднего возраста активность теломеразы прослеживается только в сперматогенном эпителии, выстилающем стенки извитых семенных канальцев семенника, и в эпителиальной выстилке кишечника. В других соматических клетках активность теломеразы бывает или очень пониженной, или же отсутствует вовсе. Когда в соматических клетках, способных к делению длина теломеров в одной или нескольких хромосомах достигает определенной точки "кризиса" клетки перестают делиться. Старение и последующая за ней смерть клетки, объясняются объединением хромосом, утративших свои теломеры, друг с другом. Наряду с тем, что такие стареющие клетки утратили способность к делению, их объем увеличивается и маркерным признаком является экспрессия фермента β -галактозидазы в их клеточной оболочке.

В последнее время старение клеток в организме расценивается как одно из условий предупреждения развития злокачественных опухолей. Подробнее с этим вопросом можно ознакомиться в работах M.Marita с соавт. (2003), W.Ohtani с соавт. (2004), R.Zhang с соавт. (2005) и др.

Гибель клетки. На всех этапах развития организма, наряду с детерминацией, пролиферацией и дифференциацией клеток, происходит и их гибель. К примеру, за сутки погибают до 500 миллиардов форменных элементов крови и их место занимают новообразованные клетки.

Гибель клеток происходит или в результате непредвиденных внешних обстоятельств несовместимых с их нормальной деятельностью (некроз), или благодаря заранее определенному механизму (программированная гибель клеток), который является важной частью общебиологического развития.

К факторам, вызывающим гибель клеток по первому типу, относятся местный недостаток кислорода, ионизирующее излучение, механическая травма, высокая температура, осмотическое давление, повышение уровня реактивных форм кислорода и др. Действие этих факторов приводит к нарушению целостности клетки. Гибель клетки, произошедшая таким образом, называется **некрозом**.

При некрозе в первую очередь нарушается избирательная проницаемость клеточной оболочки, что ведет к проникновению межклеточного вещества в цитозоль и размеры клетки начинают увеличиваться. Вследствие возникшего набухания органелл нарушается целостность оболочек, окружающих их. В результате, активированные гидролазы из лизосом проникают в цитозоль и начинают разрушать биополимеры, находящиеся внутри клетки (лизис).

Когда данный процесс достигает клеточную оболочку, клетка полностью теряет свою целостность и гидролитически активные ферменты, выходя из ее состава начинают расщеплять окружающие клетки и межклеточное вещество. Таким образом, во время некроза повреждается не только сама клетка, но и окружающие ее клетки. При разрушении мембранных структур клетки происходит выделение промежуточных веществ – медиаторов воспаления (простогландинов, лейкотриенов, тромбоксанов). Результатом действия медиаторов воспаления является инфильтрация места повреждения нейтрофилами, цитотоксическими Т-лимфоцитами, макрофагами, что и приводит к развитию воспалительного процесса.

В отличие от некроза, **программированная гибель клетки** является энергозависимым процессом. Под воздействием сигналов, поступающих из окружающей среды или образующихся в самой клетке, происходят последовательные биохимические процессы, ведущие к гибели клетки.

Программированная смерть может наступить **внезапно** (англ. murder) или же в результате **самоубийства** (англ. suicide) клетки. В качестве примера специально запрограммированной смерти можно привести следующее: в процессе дифференцировки Т-лимфоцитов в тимусе путем программированной гибели элиминируются более 95% Т-

лимфоцитов, способных уничтожать собственные белки (антигены) организма. Эти клетки уничтожаются в самом тимусе и его не покидают. Малейшие отклонения от указанного процесса приводят к развитию аутоиммунных заболеваний.

Также можно привести в качестве примера запрограммированную гибель 25-75% нейробластов, образующихся в начальные периоды эмбриогенеза; клеток соединяющих пальцы друг с другом; клеток протока Мюллера у мужчин и т.д.

В результате же самоубийства заканчивают свою жизнь клетки, достигшие терминальной стадии дифференцировки, выполнение функций которых становится невозможным из-за недостатка факторов роста, а также в результате того, что эти клетки не могут получить необходимые для их деятельности воздействия от окружающих клеток.

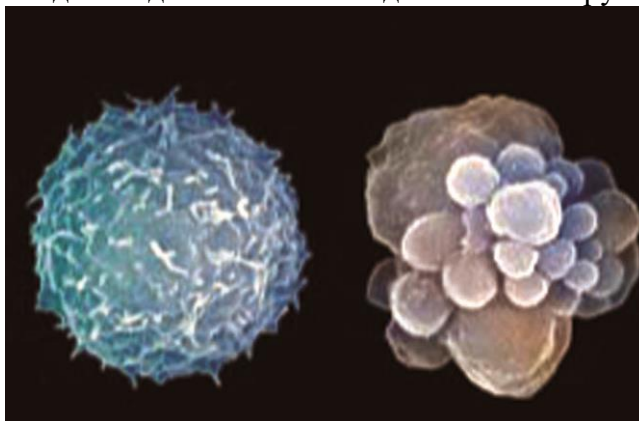


Рис.6.16. Электронно-микроскопический снимок нормального(слева) и апоптотического (справа) лимфоцита.

Внезапная смерть так же, как и самоубийство клеток происходит путем **апоптоза**. Апоптоз в переводе с греческого означает "падать", "листопад". В отличие от некроза, при апоптозе объем клетки не увеличивается, напротив, они съеживаются. Сначала исчезают выросты (микроворсинки и т.д.) на клеточной мембране и нарушаются межклеточные связи (рис.6.16). В результате суперконденсации хроматина ядра на его поверхности образуются выступы в направлении к цитоплазме. Далее в результате исчезновения ядерной оболочки ядро делится на отдельные фрагменты. На наружной поверхности клетки образуются водянистые **апоптозные пузырьки** (рис.6.16B). На последней стадии цитоплазма лопается и делится на части, окруженные клеточной мембраной. Каждая из этих частей называется **апоптозным тельцем**. Внутри апоптозных телец встречаются как фрагменты ядра, так и отдельные органеллы, везикулы, элементы цитоскелета и т.д. Некоторые пузырьки фрагменты ядра и других органелл не содержат.

Так как при апоптозе разделение клетки на отдельные части препятствует проникновению токсических веществ из внутреннего содержимого клетки в межклеточное пространство, воспалительный процесс не развивается.

Вместе с тем, фосфолипид *фосфатидилсерин*, в норме находящийся во внутреннем слое клеточной оболочки, меняет свое месторасположение и проникает в наружный слой оболочки, окружающей апоптозные тельца. Как только указанный фосфолипид, благодаря соответствующим рецепторам, присоединяется к макрофагам, дендритическим и другим группам клеток, находящимся вокруг апоптозной клетки, апоптозные тельца начинают поглощаться (фагоцитоз).

Таким образом, апоптоз ограничивается только одной клеткой и сформированные апоптозные тельца могут быть с легкостью поглощены клетками, способными к фагоцитозу. Другой причиной, препятствующей развитию воспалительного процесса при апоптозе, является выделение макрофагами специфических цитокинов (например IL-10 и TGF).

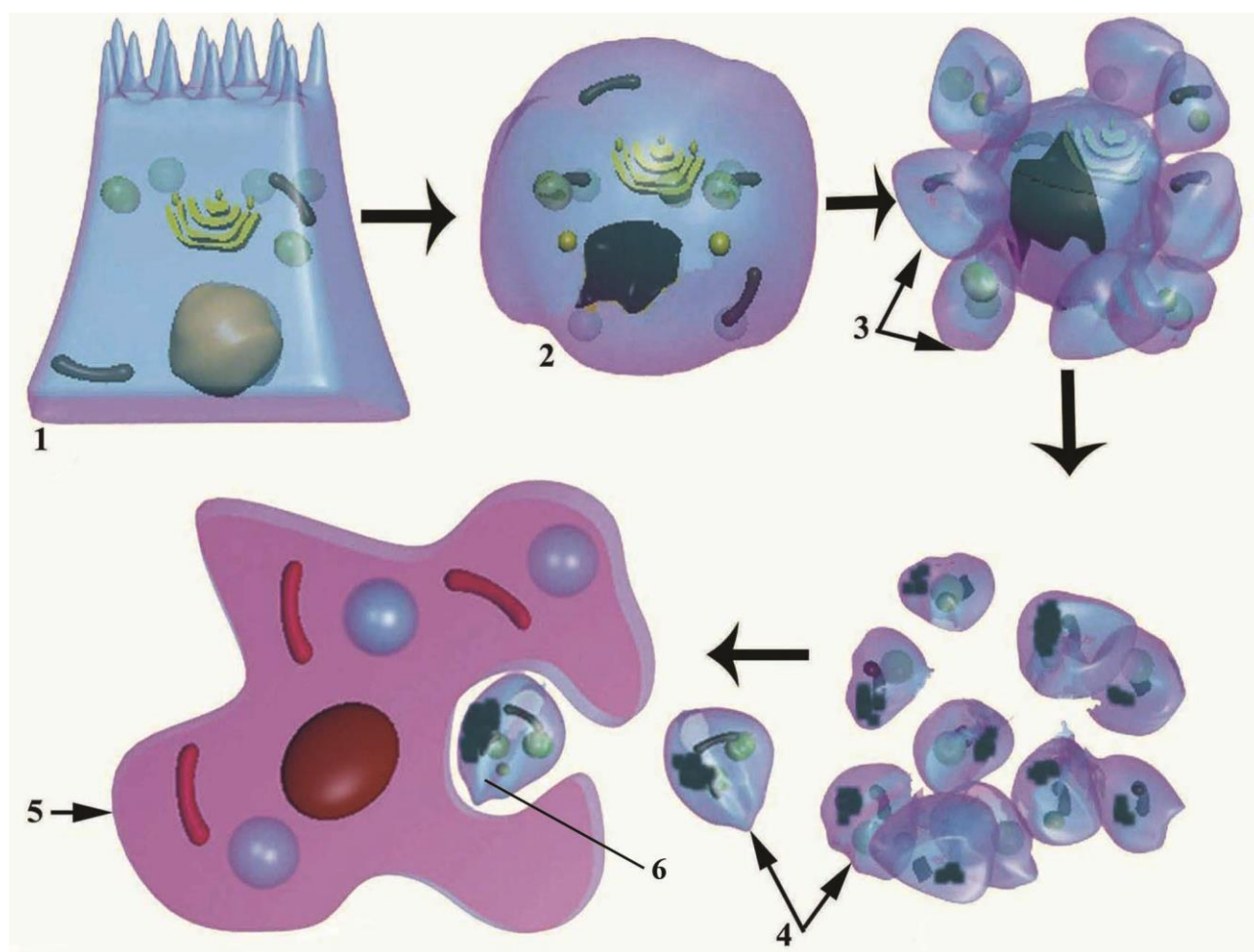


Рис.6.17. Морфологические изменения происходящие во время апоптоза в клетках (схема). 1- клетка; 2- исчезновение микроворсинок и нарушение контактов; 3- появление апоптических пузырьков; 4- распад клетки и апоптические тельца; 5- фагоцитарная клетка; 6- поглощение апоптического тельца.

Литература:

- Lung Cell Mol. Physiol., 2001; 281(6): L1392-1401.
- Bartek J, Bartkova J, Lukas J. The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp. Cell Res.*, 1997; 237:1-6.
- Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., et al. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J.*, 1998,17, 3052-3065.
- Charrier JL, Bou-Hanna C, Devilder MC, Crussaire V et al. Position in cell cycle controls the sensitivity of colon cancer cells to nitric oxide-dependent programmed cell death. *Cancer Res.*, 2004; 64(12):4227-4234.
- Ciriolo MR, De Martino A, Lafavia E, Rossi L, Carri MT, Rotilio G. Cu,Zn-superoxide dismutase-dependent apoptosis induced by nitric oxide in neuronal cells. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275(7):5065-72.
- Doonan F, Donovan M, Cotter TG. Caspase-independent photoreceptor apoptosis in mouse models of retinal degeneration *J. Neurosci.*, 2003; 23(13):5723-5731.
- Ekholm SV, Reed SI. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2000; 12:676-684.
- Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 2001; 411:342-348.
- Gassmann, R., et al. Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J. Cell Biol.*, 1999; 166, 179-191.
- Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 1989; 246:629-634.
- Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 1965; 37:614-

36.

Johnson DG, Walker CL: Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1999; 39:295-312.

Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J. Med. Invest.*, 2004; 51(3-4):146-53. Review.

Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J. Clin. Invest.*, 2004; 113(2):175-9. Review.

Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science*, 1996; 274:1672-1677.

Sampath, S.C. et al. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell*, 2004, 118, 187-202.

Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, 1976; 260:170-173.

Tarrant TK, Silver PB, Wahlsten JL, Rizzo LV, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR. Interleukin 12 protects from a T helper type 1-mediated autoimmune disease, experimental autoimmune uveitis, through a mechanism involving interferon gamma, nitric oxide, and apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1999; 189(2):219-30.

Thom SR, Fisher D, Xu YA, Notarfrancesco K, Ischiropoulos H. Adaptive responses and apoptosis in endothelial cells exposed to carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97(3):1305-10.

Weinert T. DNA damage and checkpoints pathways: Molecular anatomy and interactions with repair. *Cell*, 1998; 94:555-558.

Widlak P, Palyvoda O, Kumala S, Garrard WT. Modeling apoptotic chromatin condensation in normal cell nuclei. Requirement for intranuclear mobility and actin involvement. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277(24):21683-90.

Wu D, Ingram A, Lahti JH, Mazza B et al. Apoptotic release of histones from nucleosomes. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277(14):12001-8.

Yan X. et al. Aurora C is directly associated with Survivin and required for cytokinesis. *Genes to Cells*, 2005, 10, 617-626.

Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X, Santos Ha et al. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev. Cell*, 2005; 8(1):19-30.

Литература использованная при составлении учебника

С п и с о к :

1. Abdullayev M. S., Abiyev H. S. *Histologi nomenklatura*. Bakı, 1972, 181 s.
2. Abdullayev M. S., Abiyev H. S. *Ümumi histologiya*. Maarif, 1975, 323 s.
3. Balakışiyev K. Ə. *Anatomik nomenklatura*. Az. Döv. tədris-pedaqoci ədəbiyyatı nəşriyyatı. Bakı, 1964, 271 s.
4. Qasimov E. K. *Sitologiya*. Bakı, Azərnəşr, 2006, 183 s.
5. Qasimov E. K., Orucov M. T. Ağ siçovulun görmə sinirinin hörümçəktorunabənzər qışasının ultrastruktur quruluşu. *Azərbaycan Tibb jurnalı*, 2006, №2, s. 99-102.
6. Hacıyev D. V., Mehrəliyev Ə. Ə., Əliyev R. Ə., Əliyev S. D., Əzizov Ə. P. *Tibbi biologiyanın əsasları*. Azərbaycan Tibb Universiteti tələbələri üçün dərslik. Prof. Ə. Ə. Mehrəliyevin ümumi redaktəsilə. Bakı, 2005. 597 s.
7. Əkbərov E., Əhmədov İ. *Anatomiya. Rənglə və öyrən. I hissə*. Bakı, «Elm»-2005, 259 s.
8. Almazov İ. V., Sutulov L. S. *Atlas po qistologii i gmbriologii*. Moskva, izd. "Mediüina". 1978, 543 s.
9. Архипенко В.И., Маленков А.Г., Гербилоский Л.В. и др. Структура и функции межклеточных контактов. Под редак. проф. В.И.Архипенка и проф. А.Г.Маленкова. Киев, "Здоровье" 1982, 168 с.
10. Биологический энциклопедический словарь. Москва, "Советская энциклопедия", 1986, 831 с.

11. Гистология: (введение в патологию). Учебник для студентов / Под ред. Э.Г.Улумбекова, Ю.А.Челышева. М.: ГЭОТАР-МЕД, 1998. 960 с.
12. Гистология: Учебник. 2-е изд., перераб. и доп. / Под ред. Э.Г.Улумбекова, Ю.А.Челышева. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. 672 с.
13. Гистология: Учебник для студентов мед. вузов / Под ред. Ю.И. Афанасьева, Н.А.Юриной. Москва, изд. "Медицина", 1999, 743 с.
14. Елисеев В.Г., Афанасьев Ю.И., Котовский Е.Ф. Атлас микроскопического и ультрамикроскопического строения тканей и органов. Москва, изд. "Медицина", 1970, 399 с.
15. Кахал С.Р. Автобиография. М.: Медицина, 1985, 270 с.
16. Лабораторные занятия по курсу гистологии, цитологии и эмбриологии. Под ред. Ю.И.Афанасьева и А.Н. Яцковского. М.: Медицина, 1999, 323 с.
17. Хэм А., Кормак Д. Гистология. I том. Под ред. Ю.И.Афанасьева, Ю.С.Ченцова. Москва, "Мир" 1982, 272 с.
18. Ченцов. Общая цитология. Изд. Московского Университета. 1984, 349 с.
19. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. [Molecular Biology of the Cell](#). 4th ed. New York: [Garland Publishing](#); 2002.
20. Burgoyne R. D., Figher R. X., Graham M. E. Regulation of kiss and run exocytosis. Trends of Cell Biology. V7, №10, 2001, p. 404-405.
21. Carola R., Harley J. P., Noback C. R. Human Anatomy. New Jork. San Frasko, Toronto. McCraw-Hill. Inc. 1992.
22. Copper GM. The cell: a molecular approach. Geoffrey M. Cooper. USA, 2000, 650 p.
23. Cormack DH. Essential histology. J. B. Lippincott Company. Toronto, Canada, 1993, 430 p.
24. Endocytosis. <http://cellbio.utmb.edu/cellbio/recend.htm>.
25. Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology. 2nd ed. W. B. Saunders Company. Philadelphia London New York, 2001, 577 p.
26. Gray`s anatomy. 38th ed. Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P et all. Churchill Livingstone. USA, 1995, 2092 p.
27. Junqueira LC, Carneiro J. Basic histology. McGraw Hill Companies. New-York, Chicago, 2003, 515 p.
28. Kerr JB. Atlas of functional histology. Mosby, London St Louis Philadelphia Sydney Tokyo, 1999, 402 p.
29. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Krieger M, Scott MP, Zipursky S. and Darnell J. [Molecular cell biology](#). New York: [W. H. Freeman c Com](#), 2004. 961 p.
30. Lizosom. <http://cellbio.utmb.edu/cellbio/lysosome.htmcsort>.
31. Morii S., Nakao I., Shikata N., Tsubura A. Ultrastuctural detection of minute lipid droplets with a mixture of imidarole and paraphenylenediamine in the adrenal cortex. Acta Histochemica and Cytochemica. 1996, v29 (supplement), p. 587-589.
32. Oxford dictionary of biology. Oxford New York Tokyo, 1997, 738 p.
33. Pollard TD, Earnshaw WC. Cell biology. Illustrated by Graham T. Johnson. Elsevier Science (USA), 2002, 805 p.
34. Putz R. and Pabst R. Sobotta Atlas of Human Anatomy. Baltimore, London, Tokiyo. Williams c Wilkins, 1993, v1, 419 p.
35. Starr C, Taggart R. Biology. Wadsworth Publishing Company. Belmont, California, 1992, 921 p.
36. Sadler T. W. Langman`s Medical Embryology. 8-th edition, 2001, 507 p.
37. Visual Histology Atlas. - [www. VisualHistology. com/Visual](http://www.VisualHistology.com/Visual).
38. What is a cell? The basics on cell organization and division presented by the National Center for Biotechnology Information. [www. ncbi. nlm. nih. gov/About/primer/genetics](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/genetics) cell. html.
39. Wheater`s functional histology. Churchill Livingstone. Edinburgh London New York Philadelphia Toronto 2000, 413 p.

Гасымов Эльдар Кочарли ог.

Доктор медицинских наук, профессор,

**Заведующий кафедрой гитологии, эмбриологии и цитологии
Азербайджанского Медицинского Университета**

(E-mail: geldar1949@gmail.com, eldar.gasimov@amu.edu.az)

Цитология

(Учебник для вузов)

Директор издания:

Директор типографии:

Графика: Г.А.Самедов

Компьютерный набор и дизайн: В.М.Гусейнова.

Перевод с азербайджанского:

Старший преподаватель А.И.Шахмамедова

Ассистент С.А.Исрафилова (E-mail: israfilovi0506@mail.ru)